

51

Int. Cl. 2:

C 07 D 475/04

19 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



DT 26 05 387 A 1

11

Offenlegungsschrift 26 05 387

21

Aktenzeichen: P 26 05 387.2

22

Anmeldetag: 11. 2. 76

43

Offenlegungstag: 2. 9. 76

30

Unionspriorität:

32 33 31

20. 2. 75 USA 551462

54

Bezeichnung: Mit Isotopen markierte Folsäurederivate

71

Anmelder: Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif. (V.St.A.)

74

Vertreter: Splanemann, R., Dipl.-Ing.; Reitzner, B., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Richter, J., Dipl.-Ing.; Pat.-Anwälte, 8000 München u. 2000 Hamburg

72

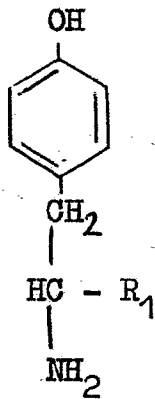
Erfinder: Lewin, Nathan, Corte Madera; Wong, Emmy Tong-in, Moraga;
Calif. (V.St.A.)

Das Protein wird in solchen Mengen zugesetzt, daß sein Bindevermögen der Menge des vorhandenen Materials nicht ganz äquivalent ist. Deshalb ist die gebundene Radioaktivität umgekehrt proportional der endogenen Folatkonzentration und wird unter Verwendung einer empirisch aufgestellten Standardkurve ermittelt.

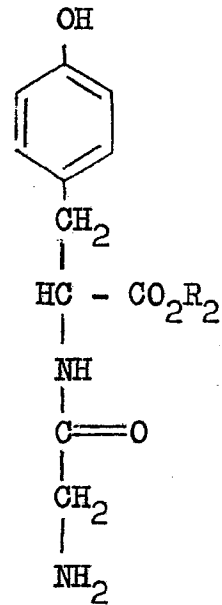
Ein derartiges Analysenverfahren zur kompetitiven Bindung von Folat ist im allgemeinen bekannt. Die bisher verwendeten Tracer sind aber mit Tritium markierte Substanzen. Bei diesen Tracern sind jedoch komplizierte und aufwendige Meßgeräte für Betastrahlung (mit Flüssigkeit-Szintillation) sowie eine bestimmte Arbeitsweise erforderlich, um die Löschung auszugleichen und Schwierigkeiten bei der Handhabung der Proben zu umgehen. Andere, nicht-radioaktive Analysemethoden, z.B. die mikrobiologische Analysemethode, die für Folatbestimmungen verwendet wurden, sind in der Praxis wesentlich aufwendiger und aus diesem Grund für Routineuntersuchungen in einem klinischen Laboratorium weniger erwünscht. Erfindungsgemäß sollen die Nachteile dieses Standes der Technik dadurch behoben werden, daß ein Gammastrahl aussendender Indikator oder Tracer zur Verfügung gestellt wird, der sich zur Bestimmung der gegenseitig miteinander reagierenden natürlichen Folate im Serum als geeignet erwiesen hat. Ein Gammastrahlen aussendender Tracer kann mit dem in klinischen Laboratorien zur Verfügung stehenden einfachen Instrumentarium verwendet werden.

Im einzelnen betrifft die vorliegende Erfindung Folsäurederivate, die als Indikatoren oder Tracer in einem Analysenverfahren für Serumfolate verwendet werden können; diese Folsäurederivate enthalten Folsäure, die durch eine oder

beide Carboxylgruppen mit dem Aminostickstoff von

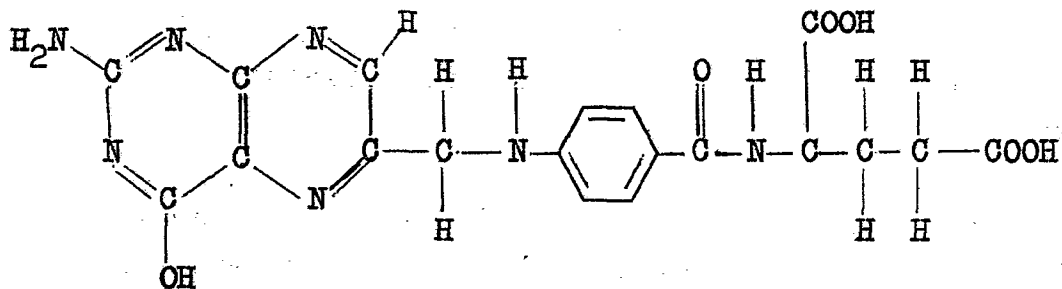


und bzw. oder



verknüpft sind, worin R_1 Wasserstoff, COOH oder COOR_3 (wobei R_3 eine niedere Alkylgruppe, z.B. von etwa 1 bis 5 Kohlenstoffatomen bedeutet) und R_2 Wasserstoff oder eine niedere Alkylgruppe, z.B. von etwa 1 bis 5 Kohlenstoffatomen, ist.

Folsäure hat die nachstehend angegebene Strukturformel:



Aus der Formel erkennt man, daß zwei Carboxylgruppen vorhanden sind. In den Derivaten gemäß der Erfindung ist der Stickstoff der Aminogruppe des ausgewählten Reagens mit einem oder beiden Carboxylgruppen der Folsäure verknüpft.

Diese Verknüpfungsreaktion zwischen der Aminogruppe und der Carboxylgruppe erfolgt nach einem an sich bekannten Reaktionsmechanismus, wobei die üblichen Reagenzien verwendet werden. Geeignete Reagenzien und Versuchsbedingungen sind in "Prinziples of Competitive Protein-Binding Assays" von Odell, W.D. und Daughaday, W.H., Hrsg., J.B. Lippincott Company 1971, beschrieben. Besonders ist auf Seite 25 hinzuweisen, auf der in einer Tabelle eine Anzahl von Varianten zur Durchführung der Reaktion angegeben ist.

Das erhaltene Derivat kann ein Jodisotop, z.B. J^{125} , aufnehmen, das durch Substitution am Benzolring mit der phenolischen Gruppe eingeführt werden kann. Nach einem bevorzugten Verfahren wird eine Jodierung mit Chloramin-T (p-Toluolsulfochloramid) und einem Natriumsalz von J^{125} oder J^{131} durchgeführt. Dieses Verfahren wird häufig angewendet und ist zur Markierung einer Vielzahl von Proteinen und Peptiden mit Phenolgruppen brauchbar. Bei dieser Reaktion wird das Derivat im allgemeinen kurzzeitig bei Raumtemperatur mit Chloramin-T in Gegenwart des radioaktiven Natriumjodids in Berührung gebracht.

Es gibt weitere Verfahren und Reagenzien für die gewünschte Jodierung des Derivats, z.B. (a) Jodmonochlorid-(125) und -(131); (b) Austauschmarkierung mit Natriumjodid-(125) und -(131); (c) elektrolytische Jodierung mit J^{125} und J^{131} ; und (d) enzymatische Jodierung mit Lactoperoxidase als Katalysator. Diese allgemeinen Verfahrensweisen sind z.B. in den nachstehenden Literaturstellen angegeben:

1. Liebster, J., et al, Nature 183, 1474 (1959)
2. Koros, E., et al., Acta Chem. Acad, Sci. Hung., 26, 187 (1961)
3. McFarlan, A.S., Nature 182 (1958)
4. Greenwood, F.C. und Hunter, W.M., Nature, 194, 495 (1962)
5. Rosa, U., "Labeled Proteins in Tracer Studies", 17-28, 61-69, EUR 2950, Pisa, Italien (1966)

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Herstellung der erfindungsgemäßen Derivate und die Einführung von Gammastrahlern.

Beispiel 1

Tyraminderivat von Folsäure

0,441 g (1 mMol) Folsäure in 100 ml eines 0,05-molaren Phosphatpuffers (pH-Wert = 7,4) wurden mit 0,173 g (1 mMol) Tyraminhydrochlorid und 0,382 g (2 mMol) 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid behandelt. Nach drei Stunden bei Raumtemperatur wurde das Material zentrifugiert, und die überstehende Flüssigkeit wurde verworfen. Das erhaltene Gel wurde durch Suspendieren und Zentrifugieren zweimal mit Methanol und zweimal mit Aceton gewaschen. Das Produkt wurde bei Raumtemperatur getrocknet, fein gemahlen und für das nächste Beispiel ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel 2

A. Jodierung des Tyraminfolat-Derivats

21,0 mg des nach Beispiel 1 hergestellten Materials wurden mit 100 μ l konzentrierter wäßriger Ammoniumhydroxidlösung (etwa 29,4 % NH_3) etwa 1 Minute behandelt, dann bis zur Auflösung mit 0,90 ml destilliertem Wasser verrührt und schließlich mit weiteren 9,0 ml destilliertem Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde durch ein Filterpapier Nr. 1 filtriert, im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und im gefrorenen Zustand aufbewahrt, bis sie für die nächste Verfahrensstufe benötigt wurde.

50 μ l der so hergestellten Lösung (etwa 10 μ g Material) wurden mit 50 μ l 1-molarem Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) vermischt. Dann wurde trägerfreies Natriumjodid (J^{125}) (4,3 mCi; etwa 50 μ l) zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Chloramin-T, gelöst in 0,05-molarem Phosphatpuffer, pH-Wert = 7,4 (50 μ l; 150 μ g) in Gang gesetzt und nach einer Minute durch Zugabe von 50 μ l einer 1%igen wäßrigen Lösung von Natriummetabisulfit abgebrochen. Der Einbau des Jods in das organische Material erfolgte typischerweise zu mehr als 90 % (durch Elektrophorese oder Ionenaustauschchromatographie bestimmt).

B. Reinigung des Jodtyramin-Derivats der Folsäure

Das auf die vorstehend angegebene Weise erhaltene Reaktionsgemisch wurde auf eine Avicel-Platte mit einer Schichtdicke von etwa 500 μ ausgebreitet und mit der oberen Phase des Systems n-Butanol:2M-Essigsäure (1:1) entwickelt. Die Hauptbande wurde durch Polaroid-Autoradiographie nach der Methode von Prescott, K.M. und David, G.S., Analytical Biochemistry, 57, 232-239 (1974) ermittelt, abgeschabt und

über Nacht in 10 ml kältem Dimethylformamid stehengelassen. Nach dem Zentrifugieren kann die überstehende Lösung des Tracers für die Folat-Radioanalyse verwendet werden.

Beispiel 3

Tyrosin-Methylester-Derivat von Folsäure

0,441 g (1 mMol) Folsäure in 100 ml 0,05-molarem Phosphatpuffer (pH-Wert = 7,4) wurden mit 0,232 g (1 mMol) Tyrosin-Methylester-Hydrochlorid und 0,382 g (2 mMol) 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid behandelt. Nach 3 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Material in genau der gleichen Weise wie in Beispiel 1 und 2 zentrifugiert, gewaschen, jodiert und gereinigt.

Die Verdrängungseigenschaften dieses Tracers sind analog denen des Materials nach Beispiel 1 und 2.

Die vorstehenden Beispiele sind typisch für die Erfindung. Um andere Derivate und radioaktive Tracer im Rahmen der Erfindung zu erhalten, kommt es nur darauf an, statt der in diesen Beispielen verwendeten Substanzen das geeignete Hydroxyaryl-Alkylamin oder Tyrosin enthaltende Peptid zu verwenden. Ein weiteres bevorzugtes Derivat kann beispielsweise anstatt des Tyramins oder Tyrosins nach den vorstehenden Beispielen unter Verwendung von Glycyltyrosin erhalten werden.

Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen radioaktiven Tracer bei der Analyse von Serumfolat durch kompetitive Proteinbindung wurde mit zwei Systemen nachgewiesen, bei denen handelsübliche Analysenmethoden angewendet wurden. Die

Tracer gemäß der Erfindung wurden statt der bei der handelsüblichen Methode benutzten Tracer verwendet. Ansonsten wurde nach der handelsüblichen Arbeitsweise bzw. mit den vom Hersteller gelieferten Substanzen gearbeitet. Die angewendeten Arbeitsweisen sind nachstehend in den Fließschemata 1 und 2 angegeben. Das Fließschema 1 zeigt die Arbeitsweisen und Substanzen, die durch die Firma Radio Immuno Assay Products, Inc. vertrieben werden, während das Fließschema 2 der von Diagnostic Biochemistry Inc. vertriebenen Folat-Analyse folgt. Wie schon gesagt, wurden die Anweisungen der Hersteller befolgt. Es wurden jedoch die in den vorliegenden Beispielen beschriebenen Tracer verwendet.

Die Figuren 1 und 2 zeigen Verdrängungskurven unter Verwendung von THFS (N-Methyltetrahydrofolsäure) bzw. PGS (Pteroylglutaminsäure) als Standards, und des in Beispiel 2 (B) beschriebenen Tyramin- J^{125} -Derivats. Es wird also eine Dosisreaktion unter Verwendung von THFS bzw. PGS gezeigt.

Fließschema 1

| Röhrchen Nr. | Puffer ¹ | Standard ² | unbekanntes Serum | Tracer ³ | Binde- mittel ⁴ | Kohle- ⁵ Dextran | |
|-----------------|---------------------|---|----------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 1, 2 | 1200 μ l | - | - | 100 μ l | - | - | Gesamtzahl der Impulse/min. |
| 3, 4 | 600 μ l | 100 μ l unbeladenes (unspiked) Serum | - | 100 μ l | - | 500 μ l | Standard-Leerprobe |
| 5, 6 | 500 μ l | 100 μ l (unbeladenes Serum) | - | 100 μ l | 100 μ l | 500 μ l | Bindung in Spuren |
| 7, 8 | 500 μ l | 100 μ l (Serum, mit 1,56 ng/cc beladen) | - | 100 μ l | 100 μ l | 500 μ l | 1,56 ng/cc Standard |
| 9, 10 | 500 μ l | 100 μ l (Serum mit 3,12 ng/cc beladen) | - | 100 μ l | 100 μ l | 500 μ l | 3,12 ng/cc Standard |
| 11, 12 | 500 μ l | 100 μ l (Serum mit 6,25 ng/cc beladen) | - | 100 μ l | 100 μ l | 500 μ l | 6,25 ng/cc Standard |
| 13, 14 | 500 μ l | 100 μ l (Serum mit 12,5 ng/cc beladen) | - | 100 μ l | 100 μ l | 500 μ l | 12,5 ng/cc Standard |
| 15, 16 | 500 μ l | 100 μ l (Serum mit 25 ng/cc beladen) | - | 100 μ l | 100 μ l | 500 μ l | 25 ng/cc Standard |
| 17, 18 | 500 μ l | 100 μ l (Serum mit 50 ng/cc beladen) | - | 100 μ l | 100 μ l | 500 μ l | 50 ng/cc Standard |
| 19, 20 | 600 μ l | - | 100 μ l | 100 μ l | - | 500 μ l | Serum-Leerprobe |
| 21, 22 | 500 μ l | - | 100 μ l | 100 μ l | 100 μ l | 500 μ l | Serum-Probe |

(Inkubation 30 min. bei Raumtemp.)

1. NaCl 8,1 g, Tris 1,21 g, Gelatine 1 g, Azid 1 g je Liter. Mercaptoäthanol 0,04 %, pH = 7,6
2. THFS im Serum.
3. J¹²⁵-Folat in 10 % DMF, 90 % Puffer.
4. beta-Lactoglobulin in H₂O
5. 5 g Norit-A-Kohle, 250 mg Dextran T-40 oder T-70 je 100 cc.

609836/0957

2605387

| Röhrchen Nr. | Puffer ¹ | Standard ² | Fließschema 2 | | | Kohle- ⁵ Dextran | |
|-----------------|---------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| | | | unbekanntes Serum | Tracer ³ | Binde- mittel ⁴ | | |
| 1, 2 | 1000 μ l | - | - | 100 μ l | - | - | Gesamtzahl der Impulse/min. |
| 3, 4 | 500 μ l | - | - | 100 μ l | - | 500 μ l | Standard-Leerprobe |
| 5, 6 | 500 μ l | - | - | 100 μ l | 50 μ l | 500 μ l | Bindung in Spuren |
| 7, 8 | 500 μ l | 5 μ l | - | 100 μ l | 50 μ l | 500 μ l | 1,5 ng/cc Standard |
| 9, 10 | 500 μ l | 10 μ l | - | 100 μ l | 50 μ l | 500 μ l | 3 ng/cc Standard |
| 11, 12 | 500 μ l | 20 μ l | - | 100 μ l | 50 μ l | 500 μ l | 6 ng/cc Standard |
| 13, 14 | 500 μ l | 30 μ l | - | 100 μ l | 50 μ l | 500 μ l | 9 ng/cc Standard |
| 15, 16 | 500 μ l | 50 μ l | - | 100 μ l | 50 μ l | 500 μ l | 15 ng/cc Standard |
| 17, 18 | 500 μ l | - | 10 μ l | 100 μ l | - | 500 μ l | Serum-Leerprobe |
| 19, 20 | 500 μ l | - | 10 μ l | 100 μ l | 50 μ l | 500 μ l | Serum-Probe |

(Inkubation 30 min. bei Raumtemp.)

1. 5 g Tris, 2 g Gelatine, 667 mg Azid je Liter
2. PGS 3 ng/cc in Gelatinelösung
3. J¹²⁵-Folat in 10 % DMF, 90 % Puffer
4. 20 mg beta-Lactoglobulin in 100 ml Gelatinelösung
5. 1 g Norit-A-Kohle, 25,3 mg Dextran T-80, 66 mg Azid je 100 cc.

609836/0957

2605387

101

Die Wirksamkeit des Tracers gemäß der Erfindung wurde ferner durch das in der folgenden Tabelle I zusammengefaßte Experiment über die Beladungs-Wiedergewinnung (spike recovery) gezeigt. Bei diesem Experiment wurde die Analyse mit einem handelsüblichen Test zur kompetitiven Proteinbindung der Firma Diagnostic Biochemistry Inc. durchgeführt, wobei jedoch der Tracer gemäß der Erfindung anstatt des handelsüblichen Tracers verwendet wurde. Bei der Durchführung des Experiments wurde ein Kontrollserum, das einen sehr niedrigen Folatwert hatte, mit PGS und THFS beladen (spiked).

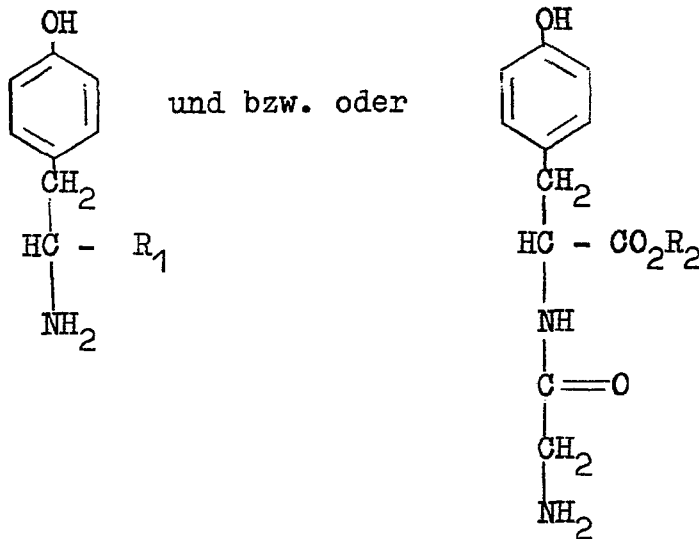
Tabelle I

| <u>Anzahl der Proben</u> | <u>THFS zuge- setzt</u> | <u>PGS zuge- setzt</u> | <u>Folate, erwartet</u> | <u>Folate, gefunden (Mittel+Stan- dardabw.)</u> | <u>% Wieder- gewinnung</u> |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---|--------------------------------|
| 10 | 0 | 2 | 3,24 | 2,87 ± 0,29 | 88,6 % |
| 10 | 0 | 8 | 9,24 | 9,44 ± 0,46 | 102,2 % |
| 10 | 2 | 0 | 3,24 | 2,49 ± 0,33 | 76,8 % |
| 10 | 8 | 0 | 9,24 | 7,92 ± 0,43 | 85,7 % |

- Patentansprüche -

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Folsäurederivat, das als Indikator oder Tracer bei Serumfolat-Analysen geeignet ist, dadurch gekennzeichnet, daß es Folsäure enthält, die über eine oder beide Carboxylgruppen mit



verknüpft ist, worin R_1 Wasserstoff, COOH oder COOR_3 (worin R_3 eine niedrigere Alkylgruppe darstellt) und R_2 Wasserstoff oder eine niedrigere Alkylgruppe bedeuten.

2. Folsäurederivat nach Anspruch 1; dadurch gekennzeichnet, daß der Benzolring durch ein Gammastrahlen aussendendes Isotop substituiert ist.
3. Folsäurederivat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Gammastrahler ein Jodisotop darstellt.
4. Folsäurederivat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Jodisotop J^{125} darstellt.

5. Folsäurederivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Verknüpfungsglied Glycyl-tyrosin darstellt.
6. Folsäurederivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Verknüpfungsglied Tyramin darstellt.
7. Folsäurederivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Verknüpfungsglied Tyrosin darstellt.
8. Folsäurederivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Verknüpfungsglied den Methylester von Tyrosin darstellt.
9. Verfahren zur Bestimmung von Serumfolaten durch kompetitive Bindung an Protein, wobei ein selektives Protein als Bindemittel in Gegenwart eines radioaktiven Tracers verwendet wird, dadurch gekennzeichnet, daß man als radioaktiven Tracer ein Folsäurederivat nach einem der Ansprüche 3, 5, 6, 7 oder 8 verwendet.

II/hi

14
Leerseite

• 15 •

C07D 475-04

AT:11.02.1976 OT:02.09.1976

