



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103534232 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201280023319. 5

(22) 申请日 2012. 04. 05

(30) 优先权数据

MI2011A000713 2011. 04. 29 IT

13/083, 047 2011. 04. 08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/056274 2012. 04. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/136761 EN 2012. 10. 11

(71) 申请人 伯拉考成像股份公司

地址 意大利米兰

(72) 发明人 P·L·阿内力 M·阿尔格赛

V·波尔 L·卡瓦雷力

L·嘉礼姆波蒂 S·加泽多

L·拉图阿达 F·麦萨诺

G·利沃尔塔 F·韦拉

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 于巧玲

(51) Int. Cl.

C07C 303/08 (2006. 01)

C07C 309/42 (2006. 01)

A61K 31/198 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书18页 附图2页

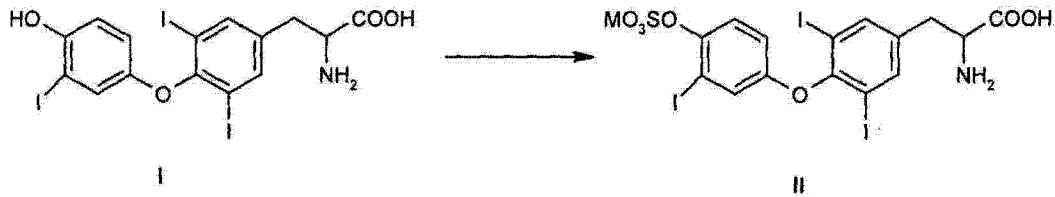
(54) 发明名称

用于制备 3, 5- 二碘 -O-[3- 碘苯基]-L- 酪氨酸的硫酸化衍生物的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种通过在作为溶剂的氯磺酸和二甲基乙酰胺的存在下, 由相应酚化合物开始来制备衍生物 3, 5- 二碘 -O-[3- 碘 -4-(磺基氧基) 苯基]-L- 酪氨酸 (T3S) 的单钠盐的方法。如此得到的 T3S 化合物可以方便地以良好产率、作为固体以纯形式分离。本发明进一步涉及用于 T3S 的制备方法, 其中起始试剂为 T2, 并且进一步包括片剂形式的该化合物的制剂。进一步, 本发明公开了基于 T3S 衍生物的非放射性免疫分析法。

1. 一种按照下述反应制备具有式 II (T₃S) 的甲状腺激素的硫酸化形式的方法：



其中：

M 为碱金属, 优选 Na；

包括步骤：

- a) 在二甲基乙酰胺 (DMAC) 的存在下, 用氯磺酸 (CSA) 硫酸化式 I 的化合物；
 - b) 在碱金属无机盐的水溶液中盐化, 得到式 II 的化合物。
2. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述无机盐为钠盐。
 3. 根据权利要求 1-2 中任一项的方法, 其中 CSA 和式 I 的化合物之间的摩尔比为 4 至 10, 优选 7 至 9。
 4. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法, 其中在步骤 a) 中, 式 I 的化合物在 DMAC 中的浓度为 0.060-0.090mol/L 的 DMAC。
 5. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法, 其中步骤 a) 中的硫酸化反应是在低于 10°C 的温度, 优选 -10°C 至 8°C 的温度下进行。
 6. 根据权利要求 5 的方法, 其中使步骤 a) 中的硫酸化进行至少 2 小时。
 7. 根据权利要求 1-6 中任一项的方法, 其中根据步骤 b) 的盐化是在 NaHCO₃ 水溶液中进行的。
 8. 根据权利要求 1-7 中任一项的方法, 其进一步包括步骤 c) 通过在聚合吸附剂固相上、用水和有机溶剂的极性递减混合物洗脱的色谱纯化式 II 的化合物, 其中所述步骤 c) 任选地在过滤步骤之后。
 9. 根据权利要求 8 的方法, 其中所述极性递减的混合物是比例为 1.0 : 0 至 0.7 : 0.3 的水和极性溶剂的混合物。
 10. 根据权利要求 8-9 中任一项的方法, 其中在洗脱之后, 将该溶液浓缩至至少 10g 的式 II 化合物 /kg, 并且使溶液 pH 值达到 5.5 至 6.5。
 11. 根据权利要求 8-10 中任一项的方法, 其中在用有机极性溶剂处理之后, 获得呈固体的式 II 的化合物。
 12. 根据权利要求 11 的方法, 其中所述极性有机溶剂选自: 丙酮、乙醇、异丙醇和乙腈。
 13. 根据权利要求 11-12 中任一项的方法, 其中将固体形式的式 II 的化合物进一步微粉化。
 14. 根据权利要求 11-13 中任一项的方法, 其包括进一步混合任选地与左旋甲状腺素 (T₄) 组合的式 II 的化合物的固体和 / 或微粉化形式与至少一种选自下述的稀释剂: 纤维素或其衍生物、高岭土、淀粉和选自碳酸钙和碳酸镁的无机碱性盐。
 15. 根据权利要求 14 的方法, 其中将式 II 的化合物和其中稀释剂为微晶纤维素的稀释剂的混合物进一步与至少一种助流剂、至少一种崩解剂、和任选的润滑剂混合, 然后通过直接压制该混合物配制成片剂, 其中, 所述助流剂选自二山嵛酸甘油酯、磷酸三钙、滑石、淀粉

及其衍生物；所述崩解剂选自交联羧甲基纤维素或其衍生物、交聚维酮、聚甲基丙烯酸甲酯、麦芽糖糊精、乙醇酸淀粉钠、预胶化淀粉、海藻酸钠；所述润滑剂选自硬脂酸镁、硬脂酸锌、水合胶体二氧化硅和胶体二氧化硅。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项的方法，其中式 I 的试剂是可以通过在水介质中且在脂族胺的存在下，用碘化剂，优选包括 I_2/NaI 的混合物碘化 3',5-二-碘甲腺原氨酸 (T₂) 获得的。

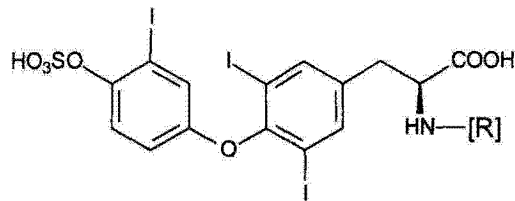
17. 药物组合物，包括 1 至 1000 μg 的量的作为活性成分的 T₃S，任选地与 T₄、以及与所述成分一起组合：碳酸钙、二山嵛酸甘油酯、交联羧甲基纤维素钠盐、水合胶体二氧化硅、硬脂酸镁、微晶纤维素。

18. 权利要求 17 的组合物，其中 T₃S 的量为 2.5 到 500 μg ，更优选 5-250 μg 。

19. 权利要求 17-18 中任一项的组合物，包括下述量的作为活性成分的 T₃S 和 T₄，2.5-500 μg 的 T₃S 和 1 至 800 μg 的 T₄，5-250 μg 的 T₃S 和 5-400 μg 的 T₄，10-100 μg 的 T₃S 和 10-200 μg 的 T₄。

20. 一种用于 T₃S 检测和定量的非放射性免疫分析法，包括非放射性 T₃S- 缀合物。

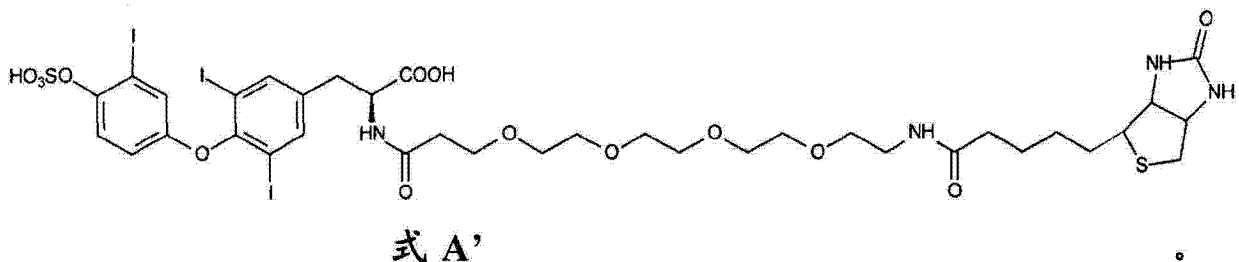
21. 根据权利要求 20 的非放射性免疫分析法，其中所述非放射性 T₃S- 缀合物具有式 A：



其中 R 选自：

- 可检测部分，选自：荧光基团，
- 酶，选自：辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶，
- 抗生物素蛋白-结合衍生物，任选地连接可检测部分，
- 镧系元素螯合剂。

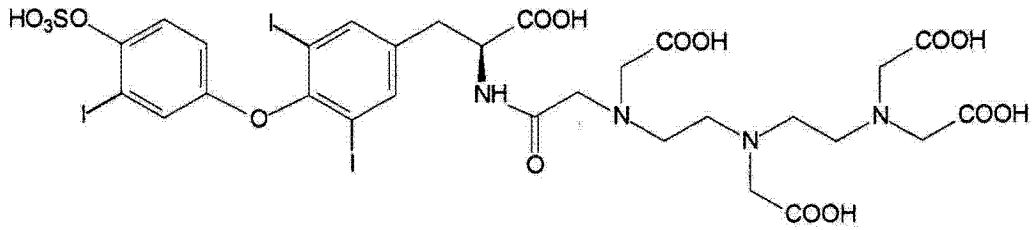
22. 权利要求 21 的免疫分析法，其中所述非放射性缀合物为式 A' 的 T₃S- 生物素或 T₃S-HRP，



23. 权利要求 20-22 的免疫分析法，其中所述免疫分析法为竞争性 ELISA。

24. 权利要求 21 的免疫分析法，包括镧系元素荧光检测系统。

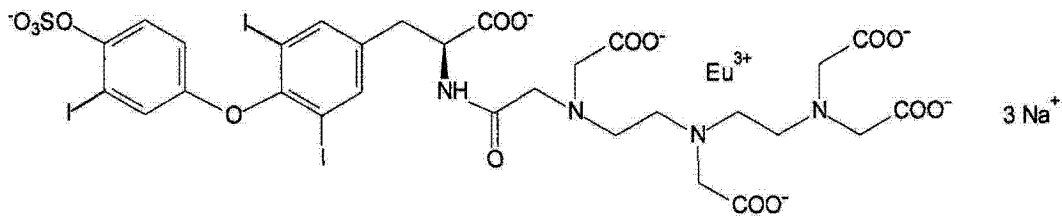
25. 权利要求 24 的免疫分析法，其中所述式 A 的非放射性 T₃S- 缀合物为式 IV 的化合物，并且为镧系元素螯合剂，



式 IV

26. 根据权利要求 21、23-25 中任一项的免疫分析法,其中所述整合的镧系元素金属选自:钐、铽、镱和铕。

27. 根据权利要求 26 的免疫分析法,包括式 V 的铕螯合物



28. 试剂盒,包括含有如在权利要求 21-27 的任一项中定义的式 A 的非放射性 T_3S^- 缀合物的容器,和具有用于制备 T_3S^- 校正曲线的试剂和选自下述的任选的试剂或其组合的容器:稀释剂、染料分子、缓冲剂、防腐剂、抗 T_3S^- 抗体、说明书小册子。

用于制备 3, 5- 二碘 -0-[3- 碘苯基]-L- 酪氨酸的硫酸化衍生物的方法

发明领域

[0001] 本发明的领域涉及用于制备甲状腺激素的硫酸化衍生物或其盐的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 甲状腺激素三碘甲状腺原氨酸 (3, 5- 二碘 -0-[3- 碘苯基]-L- 酪氨酸或 T3) 是代谢的最有活性的甲状腺激素。如同甲状腺素 (T4), 其是甲状腺生理学生成的, 且与其甲状腺球蛋白形式 (一种糖蛋白前体) 一起被贮存。平均而言, 一个甲状腺球蛋白分子包含三或四个 T4 残基和至多一个 T3 残基。TSH 生成通过酶组织蛋白酶 D、B 和 L 活化甲状腺球蛋白蛋白水解, 释放甲状腺激素 T3 和 T4。然而, T3 生成不限于该机制: 实际上, 在外周组织中, 甲状腺素转化成三碘甲状腺原氨酸 (80% 的三碘甲状腺原氨酸是由甲状腺素外周生成的, 20% 是由内部甲状腺生成的)。

[0004] T3 的重要性不仅在于其是唯一最有活性的甲状腺激素的事实。实际地, 在这方面, 已知由于其不足可引起多种病理学病症。特别地, 例如, 在胚胎发育期间和童年期的神经组织中, T3 缺乏会导致脑和小脑皮层生长、轴突增殖、细胞迁移、髓鞘形成、树突分支和突触形成的减少。由于在生命初期 T3 缺乏, 观察到神经系统发育延迟, 接着观察到认知缺陷和运动缺陷, 其可引起一种称为白痴病的临床现象。而且, 在成年人中, 已经通过脑 PET 证实, 当三碘甲状腺原氨酸水平降低时, 大脑内血流量和大脑葡萄糖代谢较低。这些数据可以解释甲状腺机能减退的个体中心理运动性缺陷。

[0005] 除了在神经组织中观察到的影响之外, 也已知在骨组织中观察到影响, 其中三碘甲状腺原氨酸刺激软骨内成骨, 因而经由骨骺骨中心成熟产生线性更长的骨。即使三碘甲状腺原氨酸不是出生后骨线性生长所必需的, 其也是适宜的胎儿骨发育必不可少的。

[0006] 而且, 已经证实了 T3 在表皮组织中的作用, 其中三碘甲状腺原氨酸不仅参与皮附件的成熟, 而且参与其分解从而促进细胞再生。因此, 该激素的过量和不足都可引起皮肤病学问题。

[0007] 因此, T3 甲状腺激素可以肯定地被认为是一种多效激素, 其除了具有上述作用之外还具有已确证的作用, 在血液组织中, 其增加红细胞生成素生成, 并因而促进血生成; 在脂肪组织中, 其促进前脂肪细胞向脂肪细胞的成熟, 增加脂肪酸脂解, 最后还调节胆固醇代谢。

[0008] 通过自身免疫病理学非常频繁地产生的甲状腺机能减退相当普遍: 实际地, 在意大利人中的患病率, 女性为约 1.5%, 男性为 1%。通过替代疗法以令人满意地方式对其进行药理学治疗, 所述替代疗法主要是基于合成性左旋甲状腺素 (T4), 选择该药物是因为其更有活性的形式即 T3 的半衰期非常短, 为此通常不能使用。

[0009] 然而, 采用左旋甲状腺素治疗还显示出一些与如下事实相关的缺点: 虽然血浆的甲状腺得到恢复, 组织的却不一定得到恢复。药理学替代物的研究, 比如在 EP1560575B 中描述的基于拟甲状腺素 T3 活性可提出的替代物, 可能代表目前选择治疗的期望替代物。

[0010] 然而, 就涉及的 T3S 而言, 主要障碍似乎表现为难于实现大规模合成。实际地, 迄

今为止,仅仅以实验室规模制备 T3S 是可能的。

[0011] 在这点上,已经描述了利用大量过量的硫酸化试剂例如浓硫酸 (H_2SO_4) 或氯磺酸 (CSA) 由 T3 制备 T3S,例如在 US2970165 和 *Biochim. Biophys. Acta*, 33, 461 (1959) 中,其描述了在低温下,利用直接加入浓硫酸由固体形式的 T3 制备 T3S。

[0012] *Endocrinology*, Vol. 117, No. 1, 1-7 (1985) 和 *Endocrinology*, Vol. 117, No. 1, 8-12 (1985) 预期利用在冷却下在二甲基甲酰胺中加入氯磺酸 (CSA) 溶液,接着通过 Sephadex LH-20 的纯化步骤,由 T3 合成 T3S。

[0013] 然而,迄今为止,没有任何现有技术的方法可以放大用于于纯形式的最终产物的克计产出,主要是因为报道的纯化方步需要极大体积。

[0014] 有利地,现在发现在 DMAC 的存在下,用氯磺酸 (CSA) 作为硫酸化试剂由三碘甲状腺原氨酸开始硫酸化反应得到高转化率。而且,可以采用比已知的现有技术方法报道的更小体积进行纯化。最终,产物 T3S 可以以必需的数量和质量(数百克)被纯化至其临床用途所需的水平,并且是在工业规模可适用的情况下。

[0015] 此外,因为迄今为止,只描述检测血清中 T3S 水平的放射性分析,比如在 Chopra et al. (*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1992, 75 :189-194) 中描述的 RIA,需要基于例如非放射性试剂的更安全的免疫分析法。使用这类试剂也允许临床和 / 或研究机构进行这些测量。为此目的,开发了非放射性免疫分析法,并且其属于本发明的一部分。

附图说明

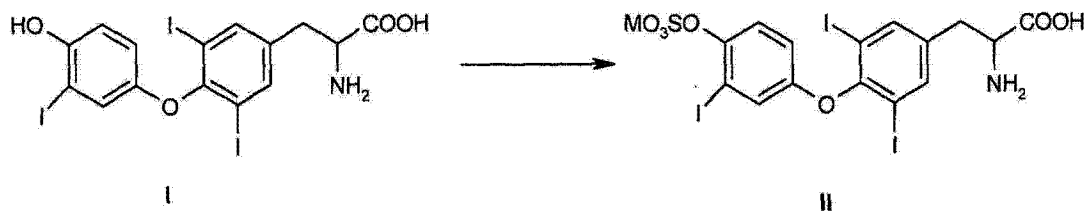
[0016] 图 1. 图面 a) 竞争性 ELISA 的 T3S 校正曲线;图面 b) DELFIA 校正曲线。T3S 是以 33.6、56、93.3、155.5、259、432、720、1200、2000pg/ml 分析的。

[0017] 图 2. DTPA-T3S 单酰胺合成的示意图。

[0018] 发明简述

[0019] 本发明涉及一种由式 I 的 3,5-二碘-0-(4-羟基-3-碘苯基)-L-酪氨酸或其盐开始,制备 3,5-二碘-0-[3-碘-4-(磺基氧基)苯基]-L-酪氨酸的单阳离子盐的方法,其按照下述方案:

[0020]



[0021] 其中 M 为碱金属,优选 Na,

[0022] 包括下述步骤:

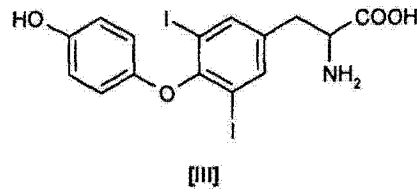
[0023] a) 在作为溶剂的二甲基乙酰胺 (DMAC) 的存在下,用氯磺酸 (CSA) 硫酸化式 I 的化合物或其盐;

[0024] b) 通过将 a) 中得到的反应混合物加入到碱金属无机盐,优选单阳离子钠,更优选 $NaHCO_3$ 的水溶液中来盐化 a) 中得到的硫酸化衍生物,得到式 II 的化合物 (T3S)。

[0025] 根据一个特别优选的实施方案,式 I 的化合物 (T3) 是通过在脂族胺、优选地选自直链单烷基 (C_1-C_4) 脂肪族胺 (其中,乙胺是优选的) 的存在下,用碘化剂 (优选 NaI 和 I_2)

碘化式 III 的化合物 (T2) 获得的：

[0026]



[0027] 碘化剂的加入是在优选地低于 25℃ 的温度下,在水性溶剂、优选水的存在下进行。优选地,碘化剂以在 0.9 至 1.1mol/mol 的化合物 III (T2) 之间的摩尔比存在。

[0028] 因此,用于制备 T3S 的方法包括通过在上述条件下碘化 T2,然后在二甲基乙酰胺中用氯磺酸将其硫酸化来制备 T3,如在详细说明中更好地描述的。

[0029] 而且,根据一个进一步的方面,本发明还包括将活性成分 T3S 配制成药物组合物,优选固体,其中将 T3S (优选地粉末形式) 与稀释剂混合,然后,向该混合物中加入助流剂、润滑剂 (优选二山萣酸甘油酯) 和崩解剂 (优选交联羧甲纤维素或其衍生物),将该混合物过筛并与包括活性成分的稀释混合物进一步混合。

[0030] 因此,根据该方案,所述方法包括步骤:其中以个或多个部分加入稀释剂例如微晶纤维素,使其混合,然后配制包括助流剂 (优选二山萣酸甘油酯)、润滑剂 (优选硬脂酸镁或硬脂酸锌)、水合胶体二氧化硅、胶体二氧化硅,以及优选地崩解剂 (优选交联羧甲纤维素或其衍生物) 的混合物,然后使其过筛,并将其与包括活性成分的混合物与稀释剂进一步混合。然后,可以加入其它赋形剂、稳定剂和稀释剂 (比如例如碳酸钙),并且混合可变的时间。

[0031] 根据一个特别优选的方面,本发明进一步公开了一种通过上述方法制备的片剂,其包括 1 至 1000 μg 的量的作为活性成分的 T3S,并且包括下述稀释剂、赋形剂、助流剂和润滑剂:碳酸钙、二山萣酸甘油酯、交联羧甲纤维素钠盐、水合胶体二氧化硅、硬脂酸镁、微晶纤维素。单剂量的优选的量在下表中给出:

[0032]

	每片的量
碳酸钙	20-40mg
二山萣酸甘油酯	2-15mg
交联羧甲纤维素钠盐	1-10mg
水合胶体二氧化硅	0.1-5mg
硬脂酸镁	0.01-2mg
微晶纤维素	至少 30mg

[0033] 本发明的一个进一步的实施方案由非放射性免疫分析法来表示。

[0034] 优选地,免疫分析法为酶联免疫分析法 (ELISA),更优选竞争性 ELISA,更优选地在多孔板中进行,使用荧光基或酶 (例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等) 或抗生物素蛋

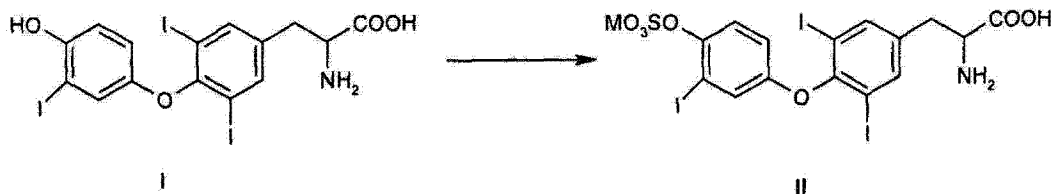
白-衍生物可检测部分(即生物素)作为可检测部分。

[0035] 作为 T3S 非放射性检测分析的进一步发展,已经开发了用于镧系元素荧光免疫分析的试剂。基于新试剂用于 T3S 定量的分析、合成试剂及试剂盒代表本发明的进一步的目的。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明的目的是一种从式 I 的 3,5-二碘-0-[4-羟基-3-碘苯基]-L-酪氨酸或其成盐的衍生物开始,制备甲状腺激素 T3 的硫酸化形式、作为单阳离子盐的具有式 II 的 3,5-二碘-0-[3-碘-4-(磺基氧基)苯基]-L-酪氨酸 (T3S) 的方法。

[0038]



[0039] 其中 M 是碱金属,优选 Na,其包括下述步骤:

[0040] a) 在作为溶剂的二甲基乙酰胺 (DMAC) 的存在下,用氯磺酸 (CSA) 硫酸化式 I 的化合物 (T3);

[0041] b) 盐化 a) 中得到的硫酸化衍生物,得到式 II 的化合物。盐化通常是通过将 a) 中得到的反应混合物加入到碱金属无机盐,优选钠盐,更优选 Na_2CO_3 或 NaHCO_3 的水溶液中来获得的。

[0042] 为了本发明的目的, T3S 指式 II 的化合物,包括三碘甲状腺原氨酸的硫酸化形式或其单阳离子盐(式 II 的化合物)。

[0043] 步骤 a) 是通过在冷却下向 T3 在 DMAC 中的悬浮液中加入 CSA,同时使该溶液保持在强力搅拌下进行的。

[0044] 温度保持在低于约 10°C 的值,更优选 -10°C 至 8°C ,更优选 -8°C 至 6°C ,甚至更优选 -5°C 至 5°C 。

[0045] 向悬浮液中加入 CSA 是慢慢进行的,优选地在 30 至 60min 的时间段,这取决于使用的试剂的量,并且优选地在惰性气氛下,例如在氮气气氛或氩气气氛下。

[0046] 根据一个优选的实施方案,CSA 和 T3 之间的摩尔比大于 4,优选 4.5 至 10,甚至更优选 7 至 9。甚至更优选 7.5 至 8.5mol 的 CSA/mol 的 T3。T3 在 DMAC 中的浓度(表示为 mol 的 T3/L 的 DMAC)为 0.06 至 0.15mol/L,更优选 0.12 至 0.14mol/L。由此可见,CSA 和溶剂之间的比例可以是 0.35 至 1.28mol 的 CSA/L 的 DMAC,优选约 0.8 至 1.15mol/L,甚至更优选约 0.96 至 1.1mol 的 CSA/L 的 DMAC。

[0047] 在加入 CSA 之后,使该混合物反应不超过 4-5 小时的时间段,通常无需冷却,允许温度达到室温 ($20-25^\circ\text{C}$)。

[0048] 在所描述条件下,当超过 85%、优选地超过 90%、甚至更优选地超过 95% 的 T3 已经转化为 T3S 时,硫酸化通常完成。

[0049] 根据一个特别优选的实施方案,该方法的步骤 a) 预期在 30-40min 时间段内,在约 -5°C 至约 5°C 的温度下,向在 DMAC 中的 T3 溶液(浓度为 0.12-0.14mol 的 T3/L 的 DMAC)中加入 CSA,优选的比例为每摩尔 T3 约 8 摩尔的 CSA。在加入结束时,通常停止冷却,在不

超过 4-5 小时,优选地不超过 2-3 小时,使温度升高至室温(约 15 至 25°C)。

[0050] 然后,根据盐化步骤 b) 将硫酸化混合物加入到无机碱金属盐(优选单阳离子,其中 Na 是特别优选的阳离子)的水溶液中,加入量能够中和存在的氯磺酸。

[0051] 盐化优选地用碳酸钠(Na_2CO_3)或碳酸氢钠(NaHCO_3)的水溶液进行,其用量是在前述步骤中使用的氯磺酸的量的函数,并且至少足够中和得到的溶液的 pH。通常,当使用 Na_2CO_3 时,用量为约 1.5 摩尔每摩尔 CSA 是足够的。根据该实施方案, Na_2CO_3 溶液的浓度为约 0.7mol/L 的溶液。在这种条件下,在猝灭之后获得溶液 pH 为 6.5 至 7.5。

[0052] 根据该实施方案,得到的 T3S 化合物的相应单阳离子盐具有式 II,其中 M 优选地为 Na。

[0053] 根据步骤 b) 加入反应混合物在可变的时间段内进行,典型地为 1h 至 3h,同时保持温度低于 30°C。

[0054] 按照进一步的步骤 c),通过色谱纯化根据上述步骤 b) 得到在溶液中呈单阳离子盐的式 II 的 T3S 化合物。为了减少作为副产物形成的无机盐的一部分,色谱之前任选地进行 b) 中得到的反应混合物的沉淀和/或过滤,例如重量分析的过滤或在真空下的过滤。

[0055] 色谱(c)是在聚合物类型的吸附树脂上进行的。优选地,这类树脂由大孔芳香族聚合物基质构成。优选的树脂的实例为 XAD™Amberlites™,甚至更优选 Amberlite™ XAD™1600。

[0056] 还熟知,在使用之前,将树脂通过本领域已知的方法活化,所述方法比如例如用水、丙酮等冲洗(关于一般参考文献,参见 Rohm 和 Haas 于“Laboratory Column Procedures and Testing of Amberlite and Duolite Polymeric Adsorbents”,section“Preparation of Resins”)。根据本发明的方法,优选地用选择用于再次洗脱的溶剂(即,丙酮或水/丙酮混合物)活化树脂。

[0057] 优选地,通过用由具有较高极性的混合物开始的具有递减梯度极性的溶剂的洗脱混合物从树脂洗脱 T3S。根据一个优选的实施方案,所述洗脱混合物首先为水,接着为具有合适反比的适合的极性有机溶剂的连续稀释液。

[0058] 优选的洗脱混合物由比例为 1:0 至 0.7:0.3 的水/乙腈和水/丙酮代表。优选地,洗脱混合物由比例为 1:0 至 0.85:0.15 的水和丙酮的混合物代表,并且通过柱的洗脱速率通常为 0.9 至 1.1 体积的柱/h。

[0059] 将由柱洗脱的且包含具有纯度水平高于 95%、更优选地高于 96%、98% 99%(通过本领域众所周知分析方法测量,比如例如 UV 检测和 HPLC 分析的分析)的最终产物的级分收集在一起,并且可以通过蒸发溶剂,即在真空下冷冻干燥或其它已知方法分离活性成分。

[0060] 然而,根据一个优选的实施方案,例如通过在真空下部分蒸发至约 10g/kg 溶液的浓度来浓缩洗脱的级分。

[0061] 在该浓度下,通过加入稀释的强无机酸溶液将溶液的 pH 调节为低于 6.5 的值,优选 5.5 至 6.5,所述无机酸优选地为选自硫酸和盐酸的一种酸,盐酸是特别优选的,并且以 0.9 至 1.1N 的浓度的稀释形式使用。

[0062] 将该溶液进一步浓缩约 10-15 倍,并且可以分离呈固体的 T3S,例如通过冷冻干燥、喷雾干燥或优选地用有机溶剂(优选的极性类型)处理分离为固体形式,然后任选地进

一步微粉化。

[0063] 因此,根据该优选的实施方案,通过用选自:丙酮、乙腈和 C₁-C₄ 醇的溶剂处理来分离固体形式的式 II 的化合物。然而,可以使用其它溶剂,其选自:芳香族烷烃、醚、氯化溶剂、酯、二甲基甲酰胺、硝基甲烷 (nitromethane)、二甲亚砜、2-甲氧基乙醇或其混合物,其能够获得固体形式且可分离的盐。

[0064] 因此,详细地,在色谱和将包含 T3S 的级分浓缩至浓度为约 10g/kg 的溶液之后,pH 调节至低于 6.5 的值,优选 5.5 至 6.5,并且进一步蒸发至式 II 化合物的浓度为 170 到 500g/kg 悬浮液或凝胶,用有机溶剂处理该浓缩溶液。优选地,所述溶剂为极性有机溶剂,选自:丙酮,低级醇比如乙醇、丙醇、异丙醇等,和乙腈,丙酮是特别优选的。

[0065] 为了使固体形式的单阳离子 T3S 盐完全地沉淀出,向浓缩的 T3S 溶液中加入丙酮是在 20 至 25°C 下进行,优选地在 0 至 25°C 的温度下在搅拌下放置 1-3h。

[0066] 根据已知的比例向该悬浮液中加入溶剂:当使用丙酮时,其在温度为 20-25°C 下加入量为 1-11g 的丙酮 /g T3S。

[0067] 在例如通过过滤分离液相与固相之后,如此获得固体形式的式 II 的单阳离子或更优选地其钠盐,其具有的 HPLC 纯度高于 95%,更优选地高于 96%、98% 或者甚至 > 99%。

[0068] 因此,作为一个整体来看,根据本发明的方法能够获得以高产率(总产率: ≥ 60%) 和高纯度水平(HPLC > 99%) 分离最终产物(T3S)。

[0069] 实际地,比现有技术的方法有利地是,已经在 DMAC 的存在下在硫酸化混合物 a) 中,副产物的含量低于 10%,通常低于 7%。

[0070] 在硫酸化反应及其后盐化中的高转化百分数则能够通过工业可适用的色谱步骤及限定体积获得纯形式的产物。

[0071] 即使当以数百克制备时,T3S 可有效地与其它副产物分离,且具有高纯度(> 99%),因此使得在临床实施中有可能使用该三碘甲状腺原氨酸衍生物。

[0072] 为了制备临床使用的制剂,优选地将固体形式且纯度直至 99% 的 T3S 进一步微粉化,例如在氮气压力微粉化,以减小粒径。

[0073] 特别优选的粒径小于 25 μm (至少 90%,更优选地至少 95% 的颗粒具有低于 25 μm 的尺寸),当在老化试验箱中进行加速稳定性试验时,使其稳定至少一个月。

[0074] 因此,根据本发明的一个优选的方面,所述方法包括微粉化纯形式的固体 T3S,得到上述定义尺寸的颗粒,并且使用其制备用于口服给药的固体制剂。

[0075] 根据该方面,在微粉化之后,将 T3S 与合适的其它组分一起配制成粉末混合物,也可任选地以颗粒或微粒形式,优选地通过直接压片将该粉末混合物配制成片剂或丸剂。

[0076] 向固体形式或更优选地为片剂的 T3S 制剂中加入微粉化的活性成分(或多种活性成分,当优选地与左旋甲状腺素组合时),首先加入一部分量的必需的最终稀释剂,优选地稀释剂的 30、40 或优选地至少 50%,并且将它们混合,得到混合物 a)。优选的稀释剂是纤维素或其衍生物,例如微晶纤维素。其它的合适的稀释剂为高岭土(caolin)、淀粉或碱金属无机盐比如碳酸镁或碳酸钙。特别优选的是碳酸钙,更优选地与微晶纤维素组合。

[0077] 然后,将混合物 a) 与包括其它组分的混合物 b) 混合,通常,所述混合物 b) 包括:助流剂、润滑剂和崩解剂,将其过筛,并且与包括活性成分的混合物 a) 连续混合。

[0078] 在崩解剂中,特别优选的是交联羧甲基纤维素或其衍生物。为此目的其它可用的试

剂为交聚维酮、聚甲基丙烯酸酯、麦芽糊精 (maltodextrines)、淀粉羟乙酸钠、预胶化淀粉、海藻酸钠。

[0079] 在助流剂中,特别优选的是二山嵛酸甘油酯。其它的可用的助流剂为:磷酸三钙、滑石、淀粉或其衍生物。

[0080] 在润滑剂中,特别优选的是硬脂酸镁或硬脂酸锌,水合胶体二氧化硅、胶体二氧化硅。其它赋形剂、稳定剂和稀释剂(比如例如碳酸钙)可以连续地加入,并且混合可变的时间。然后,量取最终混合物,并且优选地通过直接压片制备片剂。

[0081] T3S 在固体剂量单元中的存在量为 1 至 1000 μg ,更优选 2.5 至 500 μg ,甚至更优选 5 至 250 μg ,其作为唯一活性成分或者与其它活性成分优选 T4(左旋甲状腺素)组合。根据该实施方案,T4 的存在量为 1 至 800 μg ,或 5-400 μg ,更优选 10-200 μg 。因此,在同时包括 T3 和 T4 作为活性成分的片剂的制备方法中,将其与混合物 a) 中的优选的稀释剂混合,并进一步与如上所述的其它组分依次预混合。

[0082] 因此,根据一个优选的方面,本发明公开了一种通过上述方法制备的片剂,其包括 1 至 1000 μg 的量的作为活性成分的 T3S,与下述其它组分一起:

[0083] - 稀释剂,选自纤维素或其衍生物,优选地与第二稀释剂(优选碳酸钙)一起,至多为全部稀释剂的 35% (w/w);

[0084] - 助流剂,选自二山嵛酸甘油酯(最优选的)、滑石、二氧化硅衍生物(其中三硅酸镁)、酰胺、磷酸三钙,在组合物中的存在量通常为 1 至 10%,最优选 4 至 6% (w/w);

[0085] - 崩解剂,选自:淀粉、交联羧甲纤维素钠和交聚维酮。优选的是 0.5 至 10% 的量、甚至更优选 1-5%、最优选 2- 到 4% (w/w) 的交联羧甲纤维素钠盐;

[0086] - 润滑剂,选自:硬脂酸镁、水合胶体二氧化硅和滑石,更优选硬脂酸镁和硅胶,总量范围为 0.1 至 7%,甚至更优选第一润滑剂为 0.1 至 2% 且第二润滑剂为 0.5 至 5% (w/w)。

[0087] 特别优选的赋形剂为下述成分:碳酸钙、二山嵛酸甘油酯、交联羧甲纤维素钠盐、水合胶体二氧化硅、硬脂酸镁、微晶纤维素,根据下述优选的量:

[0088]

	每片的量
碳酸钙	20-40mg, 优选 25-35mg, 更优选 30mg
二山嵛酸甘油酯	2-15mg, 优选 4-8mg, 更优选 5mg
交联羧甲纤维素钠盐	1-10mg, 优选 2-6mg, 更优选 3.5mg
水合胶体二氧化硅	0.1-5mg, 优选 0.5-4, 更优选 2mg
硬脂酸镁	0.01-2mg, 优选 0.1-1mg, 更优选 0.5mg
微晶纤维素	至少 30mg

[0089] 在一个更优选的实施方案中,所述组合物包括 2.5 至 500 μg 的 T₃S,或更优选地 5-250 μg 的 T₃S。

[0090] 对于其中还存在 T4 的组合组合物, T3S 的存在量优选地为 2.5-500 μg , T₄ 的存在量为 1 至 800 μg , 或者甚至更优选地: T₃S :5-250 μg , T₄ :5-400 μg , 或 T₃S :10-100 μg 和 T₄10-200 μg 。

[0091] 意图上述量针对单剂量单元, 优选约 110mg 的片剂, 优选地用于每日单剂量施用, 但是本领域技术人员可以根据可替代的组合物形式、片剂重量和 / 或治疗方案进行调节。

[0092] 根据优选的实施方案的片剂显示出活性成分的最佳溶解速率 (参见下表) 和最佳稳定性 (至少 24 个月)。

[0093] 根据 ICH Guidelines 的条件测量下述性质:

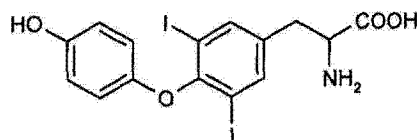
[0094]

溶出试验	在 45' 之后 $\geq 75\%$
水分含量	$\leq 10\%$
抗压碎性	$\geq 20\text{N}$
HPLC 标题 T3S	90-110%
HPLC 标题 T4 (当存在时)	90-110%

[0095] 在根据本发明的方法中, 包括 T3 (式 I 的化合物) 的所有试剂都是市售可获得的。

[0096] 然而, 根据一个特别优选的实施方案, T3 是通过在脂族胺、优选地选自单烷基 (C₁-C₄) 直链脂肪族胺 (其中, 优选乙胺) 的存在下, 用碘化剂 (优选 NaI 和 I₂) 碘化式 III 的化合物 (3,5-二碘-甲状腺原氨酸, Levoditi 或 T2) 制备的:

[0097]



III

[0098] T2 优选地如描述的制备。

[0099] 碘化剂的加入是在优选地低于 25°C 下, 在水性溶剂、优选水的存在下进行的。

[0100] 优选地, 碘化剂以 0.9 至 1.1mol/mol 的化合物 III (T2) 的摩尔比存在。

[0101] 在碘化之后, 优选地通过过滤分离呈钠盐的 T3, 然后通过再悬浮在水中且用酸 (优选乙酸或硫酸) 酸化将其转化成酸形式。

[0102] 优选地通过过滤分离酸形式, 再次再悬浮在水中以除去盐并过滤。

[0103] 将呈湿固体的 T3 悬浮在 N, N-二甲基乙酰胺中, 使该悬浮液脱水并进行硫酸化反应。

[0104] 根据一个优选的方案, CSA 和 T3 之间的摩尔比大于 4, 优选 4.5 至 10, 甚至更优选 7 至 9。甚至更优选, 7.5 至 8.5mol 的 CSA/mol 的 T3。T3 在 DMAC 中的浓度, 表示为 mol 的 T3/L 的 DMAC, 为 0.10 至 0.15mol/L, 更优选 0.12 至 0.14mol/L。由此可见, CSA 和溶剂之间的比例可以是 0.58 至 1.28mol 的 CSA/L 的 DMAC, 优选 0.89 至 1.15mol/L, 甚至更优选 0.96 至 1.09mol 的 CSA/L 的 DMAC。

[0105] 在加入 CSA 之后,使该混合物反应不超过 4-5 小时的时间段,通常无需冷却,使温度升高至室温。

[0106] 在所描述条件下,当超过 85%、优选地超过 90%、甚至更优选地超过 95% 的 T3 已经转化为 T3S 时,硫酸化通常完成。

[0107] 根据一个特别优选的实施方案,该方法的步骤 a) 预期在 30-40min 时间段内,在约 -5°C 至约 10°C 的温度下,向在 DMAC 中的 T3 溶液(浓度为 0.12-0.14mol 的 T3/L 的 DMAC)中加入 CSA,优选的比例为约 8 摩尔的 CSA 每摩尔的 T3。在加入结束时,通常停止冷却,在不超过 4-5 小时,优选地不超过 2-3 小时,使温度升高至室温(约 15 至 25°C)。

[0108] 然后,根据盐化步骤 b) 将硫酸化混合物加入到无机碱金属盐(优选二元阳离子,其中 Na 是特别优选的阳离子)的水溶液中,使得加入量中和存在的氯磺酸。

[0109] 盐化优选地用 Na_2CO_3 或碳酸氢钠 NaHCO_3 的水溶液进行,其用量是使用的氯磺酸的量的函数,至少足够中和得到的溶液的 pH。通常,当使用 Na_2CO_3 时,用量为至少 1.5 摩尔的盐每摩尔 CSA 是足够的。根据一个特别优选的方面,当无机碱金属盐是 Na_2CO_3 时,其最终浓度为至少 0.7mol/L 溶液。在这样的条件下,在猝灭之后,所得溶液的 pH 为 6.5 至 7.5。

[0110] 根据该实施方案,得到的 T3S 化合物的相应单阳离子盐具有式 II,其中 M 优选地为 Na。

[0111] 根据步骤 b) 加入反应混合物在可变的时间段内进行,典型地为 1h 至 3h,同时保持温度低于 30°C。

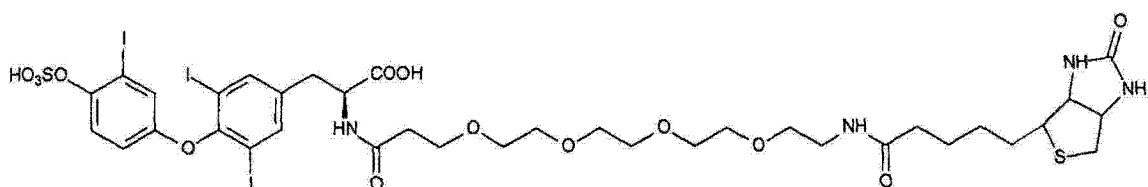
[0112] 按照如上所述步骤 b) 和 c),得到在溶液中呈单阳离子盐的式 II 的 T3S 化合物。

[0113] 根据申请人的最佳知识,根据本发明的方法首次描述了由 T3 或 T2 制备用于临床用途的 T3S,纯度为至少 95%,更优选地至少 96%、98% 或 > 99%。

[0114] 根据一个进一步的实施方案,本发明还涉及基于比色分析、荧光或化学发光检测的非放射性 T3S 免疫分析法。

[0115] 优选地,免疫分析法为酶联免疫分析法(ELISA),更优选地为竞争性 ELISA,其中递增量的 T3S 竞争性结合已结合抗-T3S 抗体(例如,在 Chopra et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 1992, 75 :189-194 中公开的多克隆抗体)的固相,固定量的 T3S 结合可检测部分比如荧光基或酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)或任选地连接可检测部分的抗生物素蛋白结合-衍生物(即,生物素)。

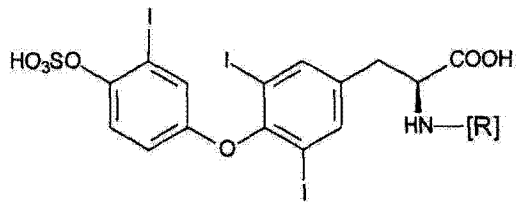
[0116]



式 A'

[0117] 用于非放射性分析的 T3S 衍生物通常含于通式 A:

[0118]



式 A

[0119] 其中 R 选自：

[0120] a) 可检测部分，选自：荧光基团或选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶的酶，

[0121] c) 抗生物素蛋白-结合衍生物，任选地连接可检测部分，

[0122] d) 镧系元素螯合剂。

[0123] 当 R 为镧系元素螯合剂时。T₃S 衍生物优选地为式 IV 的化合物。

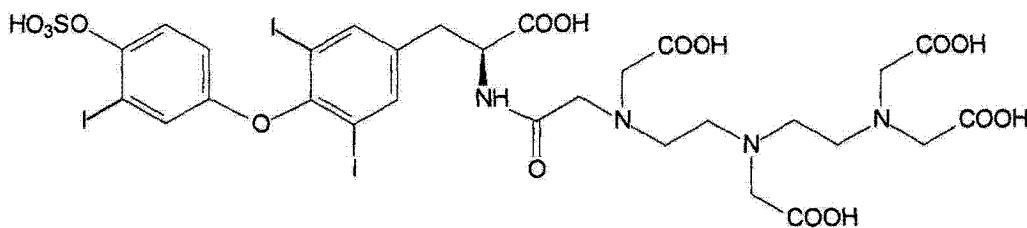
[0124] 所述分析为优选地在多孔板中进行。优选地，所述可检测部分为荧光基或酶（例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等）或抗生物素蛋白-衍生物（即生物素）。根据后一个实施方案，检测优选地采用抗生物素蛋白-衍生物进行，优选包括酶比如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶（优选 HRP）的抗生物素蛋白链菌素，其将特定底物转化成有色的、荧光或化学发光的产物。使用生物素-抗生物素蛋白的相互作用，与作为信号发展技术的各种检测发光结合，能够使信号扩增且具有与 RIA 试验相当的增强的灵敏性（参见，即 Chopra et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 1992, 75 :189-194），而不需要放射性，这是相对于现有技术的一个明确的优点。

[0125] ELISA 分析、T₃S-衍生物比如生物素衍生物、其合成及包括这类试剂用于 T₃S 定量的试剂盒，代表本发明的一个进一步的目的。

[0126] 作为一个可替代的实施方案，非放射性 T₃S 免疫分析法开发用于荧光技术，称为镧系元素荧光免疫分析，描述在 **Hemmilä** I et al. Anal Biochem. 1984Mar ;137(2) : 335-43 中，由其得到 1-1000pg/ml T₃S 的灵敏性。开发用于 T₃S 检测的该分析、合成的试剂、及包括所述试剂用于 T₃S 定量的试剂盒，代表本发明的一个进一步的目的。

[0127] 因此，式 IV 的 DTPA-T₃S 单酰胺 (3,5-二碘-N-[[[(羧甲基)[2-[(羧甲基)[2-[(羧甲基)氨基]乙基]氨基]乙基]氨基]乙酰基]-O-[3-碘-4-(磺基氧基)苯基]-L-酪氨酸) 代表根据一个优选的实施方案的螯合化合物：

[0128]



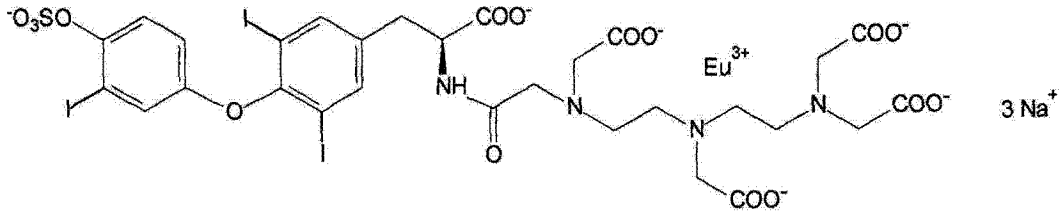
式 IV

[0129] 其它分子可以由本领域专家通过结合 T₃S 与各种螯合部分来设计和合成，其中适于络合镧系元素离子的分子例如次氨基三乙酸 (NTA)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、乙二胺-N, N' -二(2-羟基苯乙酸) (EDDHA)、乙二胺二琥珀酸 (EDDS)、丙二胺四乙酸 (PDTA)、二乙三胺四乙酸 (DTTA)、二乙三胺五乙酸 (DTPA) 及类似分子。螯合剂和 T₃S 之间的结合可以通过本领域专家已知的各种方法获得，包括直接酰胺键形成，如在试验性部分中示例的，或者使

用双官能螯合剂,其甚至可以是市售产品,比如(S)-1-对-异硫氰基苄基二乙三胺五乙酸(DTPA 异硫氰酸酯-Invitrogen 产品目录 I24221),或类似的产品。

[0130] 用作螯合物标记的合适的镧系元素金属选自:钐、铽、铈和镱。特别优选的为镱螯合物 3,5-二碘-N-[[[(羧甲基)[2-[(羧甲基)[2-[二(羧甲基)氨基]乙基]氨基]乙基]氨基]乙酰基]-O-[3-碘-4-(磺基氧基)苯基]-L-酪氨酸(式 V)。

[0131]



式 V

[0132] 其合成的示意图显示在图 2 中。该方法可以概述如下:通过加入溶于合适的有机溶剂中的等摩尔量的水部分水解 DTPA 二酸酐,然后在合适的有机碱或无机碱的存在下,使主要由 DTPA 单酸酐组成的产物与 T3S 反应。在溶剂蒸发之后,用水稀释油性残余物。收集得到的沉淀物,用水洗涤,并且溶于水/丙酮混合物中。将该粗反应产物在 Amberlite XAD1600 柱或类似树脂上纯化,用水/丙酮的混合物或梯度展开。将包含产物的级分收集并蒸干,得到期望的 DTPA-T3S 单酰胺。

[0133] 根据已知的方法,通过向单酰胺水溶液中加入等摩尔量的镧系元素盐,并且用合适的碱(例如 NaOH)调节 pH 为 7 得到镧系元素络合物。任选地,可以通过吸附在离子交换柱(例如 Amberlite XAD1600)上并且用水/溶剂混合物洗脱来使镧系元素螯合产物脱盐。

[0134] 而且在该情况下,获得与已知的 RIA 试验(参见 Chopra et al., 如上)相当的灵敏性,同时避免使用放射性同位素,其代表相对现有技术分析明确的优点。

[0135] 根据上述教导,技术人员可以预期 ELISA 的可替代形式,其仍然包括在本发明中。例如,靶激素 T3S 可以共价结合平皿和抗体,任选地连接示踪剂酶或者与连接示踪剂酶的抗体组合使用,用于竞争性测量未知样品中的 T3S 水平。根据一个进一步的实施方案,示踪剂为根据本领域技术人员已知的方法直接结合可检测酶(例如,碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)的抗原本身(T3S),也可以从即用结合试剂盒获得。

[0136] 根据一个进一步的实施方案,本发明包括用于 T3S 施用和血清中剂量的试剂盒,其中所述试剂盒包括用于按照上述非放射性分析进行 T3S 免疫检测的剂量试剂盒,和具有每日剂量(即,每周、两周、每月或两月需要)的量的 T3S 或 T3S 和 T4 组合物的施用/治疗试剂盒,所述组合物优选地为如上所述片剂的形式。

[0137] 根据第一个优选的实施方案,用于 T3S 非放射性免疫检测的剂量试剂盒可以包括多克隆抗体、抗生物素蛋白-结合 T3S 衍生物,其中优选地所述缀合物为 T3S-生物素,所述抗生物素蛋白-衍生物可检测部分为即抗生物素蛋白链菌素。更优选地,所述抗生物素蛋白-衍生物为抗生物素蛋白链菌素,并且所述可检测部分包括酶化学发光部分(比如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶),优选 HRP。

[0138] 根据来源于镧系元素荧光免疫分析的实施方案,试剂盒可以包括与抗体一起的、特别地开发用于这种检测的试剂,比如镧系元素金属螯合复合物 T3S 衍生物,其中所述金属

选自：钐、铽、镱和铕。特别优选的是铕螯合物 3,5-二碘-N-[[[(羧甲基)[2-[[二(羧甲基)氨基]乙基]氨基]乙基]氨基]乙酰基]-O-[3-碘-4-(磺基氧基)苯基]-L-酪氨酸(式V的化合物)。

[0139] 试剂盒也可以包括用于配制校正曲线的 T₃S 标准品。标准品可以预稀释,并且即用作校正浓度的溶液或溶解在合适的溶剂中。试剂盒也可以包括其它试剂,选自:稀释剂、染料-分子、缓冲剂、防腐剂、抗-T3S 抗体、说明书小册子。

[0140] 现在,通过下述实施例描述本发明,其仅仅是示例性的,而不必看作限制本发明的范围。

[0141] 试验部分

[0142] 实施例 1. 在 DMAC 中 T₃S 的制备

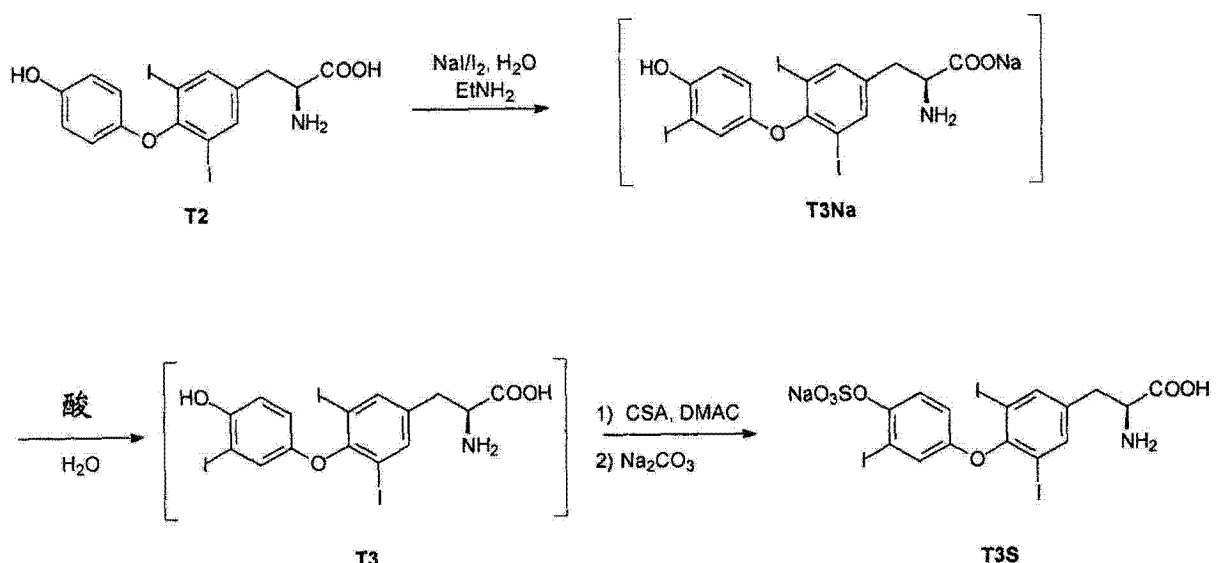
[0143] 原料的总量以相对于 100g 的 T3 表示。

[0144] 在氮气氛下,将 3,5-二碘-O-(4-羟基-3-碘苯基)-L-酪氨酸(100g;0.154mol)悬浮在 DMAC(2.0L)中,并强力搅拌以避免固体沉淀。在冷却至 -5°C 之后,在 40 分钟之内滴加 CSA(142.2g;1.229mol),同时保持温度在 -5 至 5°C 之间。在加入结束时,停止冷却,并且将反应混合物在搅拌下放置约 4h。在 1.5h 内,将反应混合物滴加到碳酸氢钠的搅拌水溶液(335.5g;3.994mol 水溶液,4.5L)中。在加入结束时,由如此得到的溶液中随时间观察到作为无机盐混合物的结晶固体沉淀物。过滤出这种固体,然后在 Amberlite™ XAD™1600 上,依靠用具有极性递减的水/丙酮混合物洗脱来纯化得到的溶液,将洗脱液收集到级分中。在真空下蒸发包含具有合适的纯度水平的产物的级分至浓度为 10g/kg。用 HCl1N 调节这种悬浮液的 pH 至 6.2。将悬浮液进一步浓缩至比例为约 1:3 的固体和残余水。在冷却下用丙酮处理这种残余物 2h,然后过滤并用丙酮洗涤。将产物在真空下 40°C 干燥。得到 74g 呈白色固体的 T₃S。无水碱的产率为:62%。

[0145] 实施例 2. 由 T2(Levoditi) 制备 T₃S

[0146] 反应示意图如下:

[0147]



[0148] 所有的原料量都以用于 1kg 的 Levoditi 来表示。

[0149] 将碘(约 0.48kg,来源:SQM)、NaI(约 0.65kg,来源:Ajay-SQM)和水装入反应器

18-22°C中,并且搅拌直到完全溶解。在室温下,持续搅拌得到的碘化混合物直至使用。

[0150] 将根据在 Chalmers, J. R. et al. A. J. Chem. Soc. 1949, 3424-3433) 中描述的方法由L-酪氨酸得到的Levoditi、NaI (approx. 0.32kg) 和水装入另一个反应器,并且加入70%的单乙胺。

[0151] 将碘化混合物加入反应混合物中。

[0152] 将得到的悬浮液在18-22°C下搅拌至少6h,然后在1h内冷却至0°C,搅拌3-4h并过滤。用水洗涤滤饼。

[0153] 将湿固体悬浮在水中,向该混合物中加入乙酸并搅拌。过滤该悬浮液,并且用水洗涤滤饼。

[0154] 将湿固体再悬浮在水中,搅拌、过滤并用水洗涤。

[0155] 然后,将滤饼悬浮在DMAC(约12.15kg)中,并且在真空下蒸馏使悬浮液脱水。

[0156] 将悬浮液冷却至5-10°C,在氮气氛中,慢慢地加入CSA(约1.54kg),并保持温度低于15°C。

[0157] 在1h内,将该溶液加入至18-22°C,并且再保持1小时,然后加入之前制备的、保持温度在30°C下、包含Na₂CO₃(约2.27kg)在水(约29.02kg)中的溶液的反应器中。

[0158] 在Amberlite XAD1600(12.5L)柱上,通过从95:5开始极性递减至70:30的水(87.5L)和水/丙酮混合物(125L)洗脱来纯化所述溶液。收集具有高HPLC纯度的级分,并且在真空下蒸馏直到得到期望的组合物(约0.04kg的T₃S/L的悬浮液)。

[0159] 将该悬浮液冷却至40°C,加入乙醇(约5.22kg),得到溶液。

[0160] 在2h内,将该混合物冷却至0°C,引起沉淀,再搅拌1小时,然后过滤。在室温下,用乙醇/水混合物洗涤滤饼。

[0161] 将湿固体在真空下,在近似40°C下干燥。

[0162] 得到0.98kg呈白色固体的纯T₃-硫酸钠盐(HPLC面积%>99%)。

[0163] 来自T₂的总产率(基于无水碱计):68.5%。

[0164] 实施例3. T₃S片剂的制备

[0165] 将活性成分、以及与不同量的左旋甲状腺素的组合与50%量的微晶纤维素预混合十五分钟。

[0166] 向该预混合物中依次加入下述成分:二山嵛酸甘油酯、水合胶体硅胶、交联羧甲基纤维素钠、硬脂酸镁和碳酸钙(之前过筛穿过0.6mm干净的光筛/网目筛)、与其余50%的微晶纤维素一起,再混合20分钟。

[0167] 通过从搅拌器的六个点采样来检查活性成分在混合物中分布均匀性;测试表明活性成分(或多种活性成分)均匀地分布在混合物内,在用左旋甲状腺素的制剂情况下也同样。

[0168] 然后,利用装有圆平冲头的旋转式压片机压制该粉末混合物,并且使片剂进行脆碎度、崩解时间和活性成分分布的试验。

[0169] 对于混合和压制方法进行的试验结果证实对于25至200μg的T₃S剂量,其都是可重现的。而且,其表明如此得到的片剂具有相当于官方欧洲药典(VI Ed.)所提供要求的参数。

[0170] 片剂组合物

[0171]

T ₃ S Na 盐	20.6 μg (相当于 20 μg T ₃ S)
碳酸钙	30mg
二山嵛酸甘油酯	5mg
交联羧甲纤维素钠盐	3.5mg
水合胶体二氧化硅	2mg
硬脂酸镁	0.5mg
微晶纤维素	直至 110mg

[0172] 在 I 期临床试验中,将如上制备的片剂用于切除甲状腺的个体,表明它们可用作甲状腺激素替代治疗(参见 US2011/0245342)。

[0173] 实际上,在口服施用之后在血清中发现显示被吸收的 T₃S(穿过胃肠屏障),并且其以剂量相关方式转化为临床活性 T₃。在单剂量施用之后 48 小时,仍可检测到 T₃ 在血清中的水平。

[0174] 实施例 4. 通过具有化学发光检测的免疫分析法对 T₃S 定量

[0175] T₃S 生物素衍生物的合成

[0176] 简而言之,如下合成 T₃S 生物素衍生物:将 N-羟基琥珀酰亚胺基 d-生物素-15-酰氨基-4,7,10,13-四氧杂十五烷酸酯 A (50mg ;0.0849mmol) 溶解在 DMAC (2mL) 中,向其中加入 DIPEA (14.5μL ;0.0866mmol),同时在连续搅拌下使反应混合物保持在 0°C。然后,加入 T₃S (68.4mg ;0.0908mmol,如在 Mol&Visser,Endocrinology1985,117 :1-7 中制备的),在几分钟之后,将该悬浮液放置加热至室温,得到澄清溶液。使其搅拌 2h,然后保持在同一温度下过夜。在减压 (10mbar ;40°C) 下蒸发 DMAC,得到无色油状物。将如此得到的粗物质溶于 H₂O 中,并且通过半制备性 HPLC 纯化。收集包含产物的级分,浓缩并最后冻干,得到呈白色固体的 T₃S-生物素 (59.6mg ;0.0495mmol)。产率 58%。

[0177] 如在 Chopra et al.,J.Clin.Endocrinol.Metab.,1992,75 :189-194 中描述的,得到多克隆的抗-T₃S 抗血清。

[0178] 该分析是基于竞争性 ELISA,其中在白色 96 孔板中,递增量的 T₃S 与结合了生物素的固定量的 T₃S 竞争结合抗体。使用生物素-抗生物素蛋白相互作用,其允许信号扩增,与作为用于信号发展技术的发光结合,能够得到与 RIA 试验(描述在 Chopra et al.,J.Clin.Endocrinol.Metab.,1992,75 :189-194) 相当的灵敏性。

[0179] 以下述浓度制备 T₃S 的标准溶液:在稀释缓冲液:PBS、0.05%吐温、0.3% BSA 中 1000、200、40、8、1.6pg/ml。

[0180] 在上述稀释缓冲液中制备示踪溶液 (T₃S-生物素,180.6 μM)。抗体溶液:将 T₃S 兔子抗血清以 1 :50000 稀释在稀释缓冲液加 8mM ANS (1-苯胺基-8-萘磺酸盐)、1.2mg/mL 水杨酸钠中。

[0181] 在 4°C 下,将 96 孔白色板用 100 μL/孔的稀释在磷酸盐缓冲液 pH7.8 中的 2 μg/

ml 抗兔子 IgG 涂覆过夜。同时,将生物素标记的 T3S 的标准溶液与如在表 A 中报道的稀释的抗血清和 T3S-生物素溶液混合。在室温下避光培养混合样品过夜。

[0182] 第二天,将所述板用洗涤缓冲液(在 PBS 中的 0.05%吐温 20)洗涤四次,然后在室温下,在阻断缓冲液(在洗涤缓冲液中的 2% BSA)培养 1h。

[0183] 此后,将所述板用洗涤缓冲液洗涤四次,加入 100 μ L/孔的混合样品,一式三份,并且在室温下培养所述板 3h。

[0184] 然后,将所述板用洗涤缓冲液洗涤三次,并且在室温下,用抗生蛋白链菌素(Streptavidin)Poly-HRP(在 RASA 中 10ng/mL,100 μ L 孔)培养 1h。

[0185] 在另外洗涤六次之后,将所述板用 SuperSignal ELISA Fento Maximum Sensitivity Substrate(100 μ L/孔)避光培养 5 分钟,采用荧光平板读数器以每秒计数(CPS)读取发射光。

[0186] 表 A:校正曲线的制备

[0187]

	T3S/1 (μ L)	T3S/1 抗血清 (μ L)	T3S-生物素 (μ L)
CS 5 (1000 pg/mL)	250	125	50
CS 4 (200 pg/mL)	250	125	50
CS 3 (40 pg/mL)	250	125	50
CS 2 (8 pg/mL)	250	125	50
CS 1 (1.6 pg/mL)	250	125	50
B0	-	125	50
NSB	-	-	50

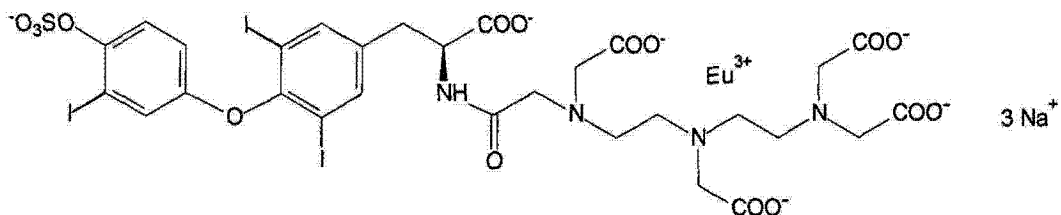
[0188] 在缓冲液中,使用范围为 1.6-1000pg/mL 的五种浓度的试验项目制备校正曲线。将曲线显示在图 1 的图面 a) 中。

[0189] 实施例 5. 通过镧系元素荧光免疫分析定量 T3S

[0190] 式 V 的化合物的制备:

[0191] [[3,5-二碘-N-[[[(羧甲基)[2-[(羧甲基)[2-[二(羧甲基)氨基]乙基]氨基]乙基]氨基]乙酰基]-O-[3-碘-4-(磺基氧基)苯基]-L-酪氨酸(6-)]镧酸酯(3-)]三钠(式 V)。

[0192]



[0193] Eu-DTPA-T3S 单酰胺的合成

[0194] 3,5-二碘-N-[[[(羧甲基)[2-[(羧甲基)[2-[二(羧甲基)氨基]乙基]氨基]乙基]氨基]乙酰基]-O-[3-碘-4-(磺基氧基)苯基]-L-酪氨酸(DTPA-T3S单酰胺)的合成反应方案显示在图2中。

[0195] 在室温下,将H₂O(0.282ml;15.64mmol)在DMAC(43mL)中的溶液滴加至N,N-二[2-(2,6-dioxylenol orange-4-吗啉基)乙基]甘氨酸A(4.27g;11.94mmol)在DMAC(85mL)中的悬浮液中。在加入结束时,将该混合物加热至80℃。在4.5h之后,将反应混合物冷却至25℃,经20分钟滴加T3S/1(3g;3.98mmol)和DIPEA(2.71mL;15.92mmol)在DMAC(85mL)中的溶液。在减压(10mbar;40℃)下蒸发DMAC。用H₂O(200mL)稀释油性残余物,得到淡黄色固体的沉淀,将其过滤、用H₂O洗涤并干燥。将如此得到的粗物质溶于丙酮/H₂O:80(v/v)中,将该溶液(pH=2.97)装载在Amberlite® XAD-1600树脂柱(200mL;直径6cm)上,并且用丙酮/H₂O梯度洗脱。收集包含具有类似组合物的产物的级分,并且蒸发,得到呈固体的配体DTPA-T3S(1.27g;1.15mmol)。产率26%。

[0196] 在20℃下,将二氯化铈六水合物(0.17g,0.46mmol)分批加入配体DTPA-T3S(0.51g;0.46mmol)在H₂O(50mL)中的溶液中(pH2.93);在每次加入之后,搅拌该悬浮液直到完全溶解。一旦络合完成,则用0.1NaOH调节pH至7,通过由Amberlite® XAD-1600树脂(100mL;直径3cm)用水/丙酮洗脱使该溶液脱盐。收集包含期望产物且不含盐的级分,并且蒸发,得到呈黄色固体的式IV的化合物(0.37g,0.28mmol)。产率:61%。

[0197] 根据Hemmilä I et al. Anal Biochem. 1984Mar;137(2):335-43设计免疫分析方法。使用的溶液为如在实施例4中描述的,除了下述不同:使用DELFLIA® Wash(Perkin Elmer)代替上述洗涤缓冲液。示踪剂储备溶液包含铈100μM,将其贮存在+4℃,避光保存。使用前,将其以1:300000稀释在分析缓冲液中,得到440pg/ml的最终浓度。

[0198] 在DELFLIA® Yellow板(Perkin Elmer)中进行分析。在用混合样品培养3-h之后,向所有孔中加入稀释的式V的化合物溶液(每孔50μL)。然后,用塑料粘合片密封所述板,并且在37℃下,在搅拌下培养1h。

[0199] 在三次洗涤之后,将所述板在吸水纸上轻敲干燥,并且加入Delfia增强作用溶液(Delfia Enhancement Solution)(Perkin Elmer)(200μL)。在25℃下1h之后,根据“Europium”制造商的试验设计在Victor3仪器中读取板。

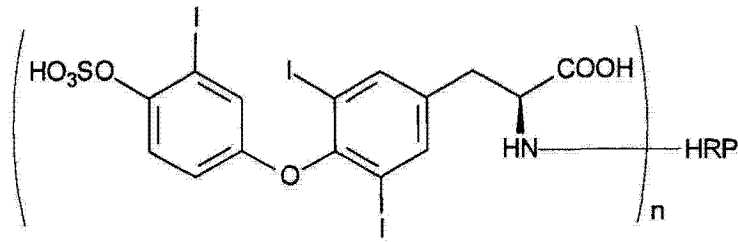
[0200] 使用范围为30-2000pg/mL的九种浓度的试验项目制备校正曲线。曲线显示在图1,图面b)中。

[0201] 实施例6. HRP-T3S单酰胺的合成

[0202] 使用包含活化的HRP的市售试剂盒(例如,HOOK™ HRP PLUS Labeling Kit-G-Biosciences)直接制备缀合物。将1-2mg的T3S溶于1mL所提供的碳酸盐缓冲液中,然后将该溶液分配到包含冻干的活化HRP的小瓶中,通过反复移液轻轻地混合,以便重构活化酶。在室温下约1小时之后,加入20μL所提供的氰基硼氢化钠(NaCNBH₃)溶液,然后在室温下使其反应约15分钟。最后,加入50μL的猝灭缓冲液,接着在轻轻搅拌或振荡下培养15分钟。通过透析或柱脱盐,使最终缀合物脱盐和在PBS中交换缓冲液。制备T3S-HRP缀合物的合适的稀释物,将其在单步骤ELISA中用作示踪剂,如在实施例4中描述

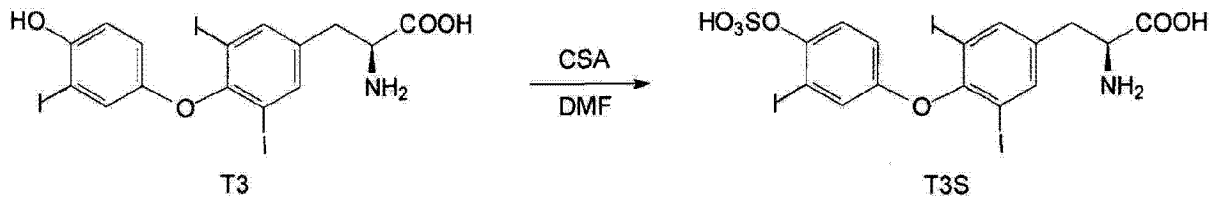
的,省略了抗生素链菌素-HRP 培养步骤。

[0203]



[0204] 比较实施例:在 DMF 中的 T3S 合成和洗脱试验。

[0205]



[0206] 根据上述方案,在 DMF 中进行反应。

[0207] 简而言之:将 T3(40mg) 溶于氨性乙醇中。

[0208] 在氮气流下蒸发该溶液。

[0209] 向残余物中,加入 2ml 的氯磺酸的热溶液(通过混合 2.5ml 的 99% 氯磺酸和 8ml 的 N,N-DMF 获得)。随后,使该混合物在搅拌下达到室温,并且继续反应过夜。

[0210] 将混合物用水(5ml)稀释,然后在 Sephadex LH-20 柱(5ml)上洗脱,得到级分 A。用 0.1N 的 HCl(5ml)继续洗脱,得到级分 B。

[0211] 将这些级分再装载在柱上,并且通过 0.1N HCl(约 4ml)、水和无水乙醇连续洗脱来纯化。

[0212] 然而,使用五种不同量的水和无水乙醇进行纯化。将通过这五种条件获得的 T3S 产率和纯度概括在表 B 中。

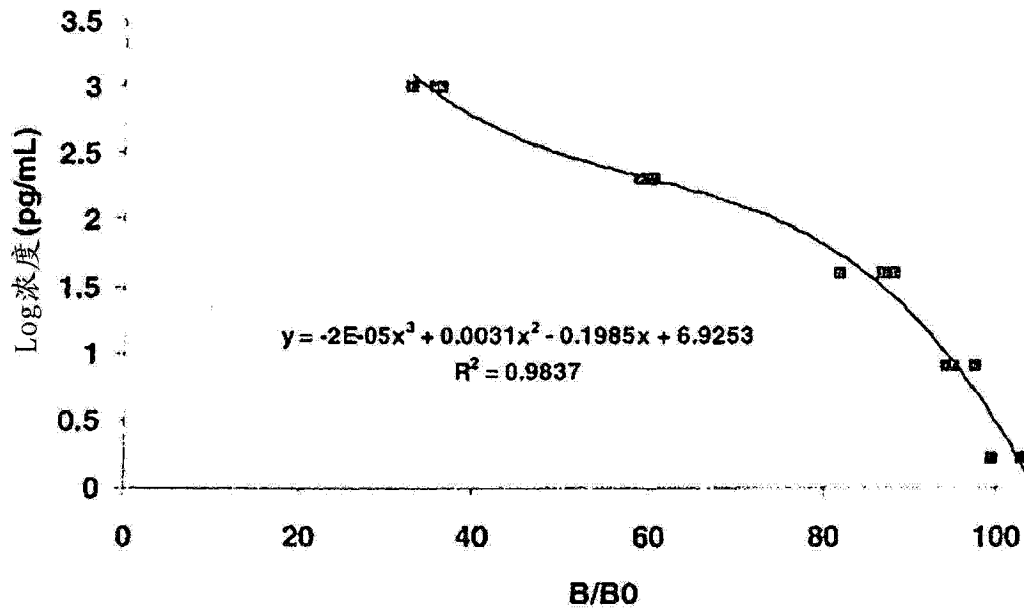
[0213] 表 B:纯化试验

[0214]

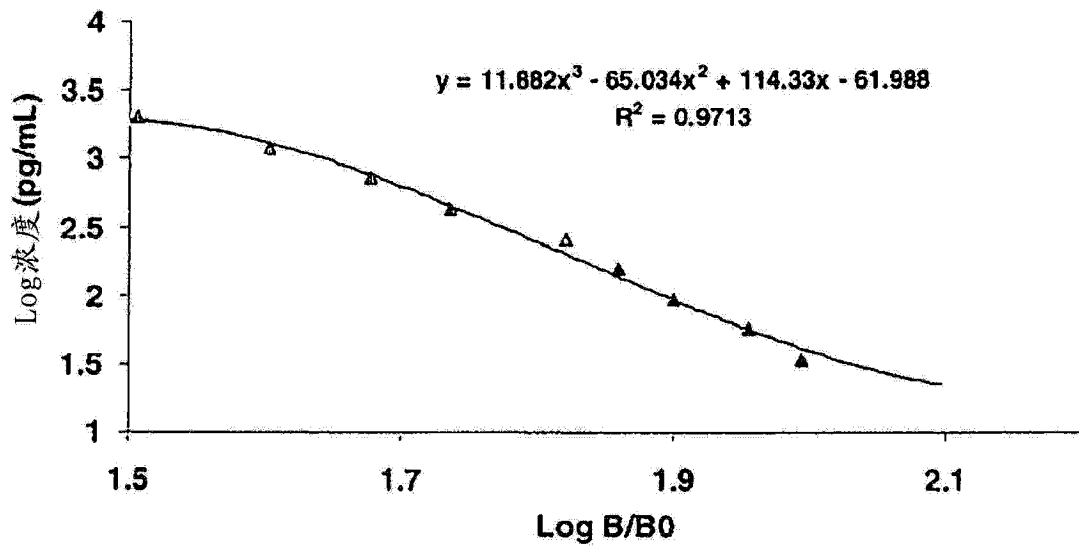
试验	H ₂ O	无水 EtOH	来自水性级分的 T3-硫酸盐			来自醇级分的 T3-硫酸盐		
	(mL)	(mL)	量 (mg)	纯度 ^(a) (%)	产率 (%)	量 (mg)	纯度 (a)(b) (%)	产率 (c) (%)
1	5	10	1.0	100	2.2	35	80	62.3
2	50	100	2.5	100	5.6	30	80	53.4
3	125	125	8.0	100	17.8	30	75	50.1
4	没有登记	100	没有登记	没有登记	-	30	75	50.1
5	40	10	没有登记	没有登记	-	10	50	11.1
		20	没有登记	没有登记	-	20	70	31.2

(a) ¹H-NMR 纯度。
(b) 根据该分析，产物为 T3S 和 T3 的混合物。
(c) 产率是基于 T3-硫酸盐的含量计算的。

[0215] 表 B 显示当在上述条件下进行合成并且使用 DMF 作为溶剂时，可以获得高转化率，但是总产率相当低。



图面a)



图面b)

图 1

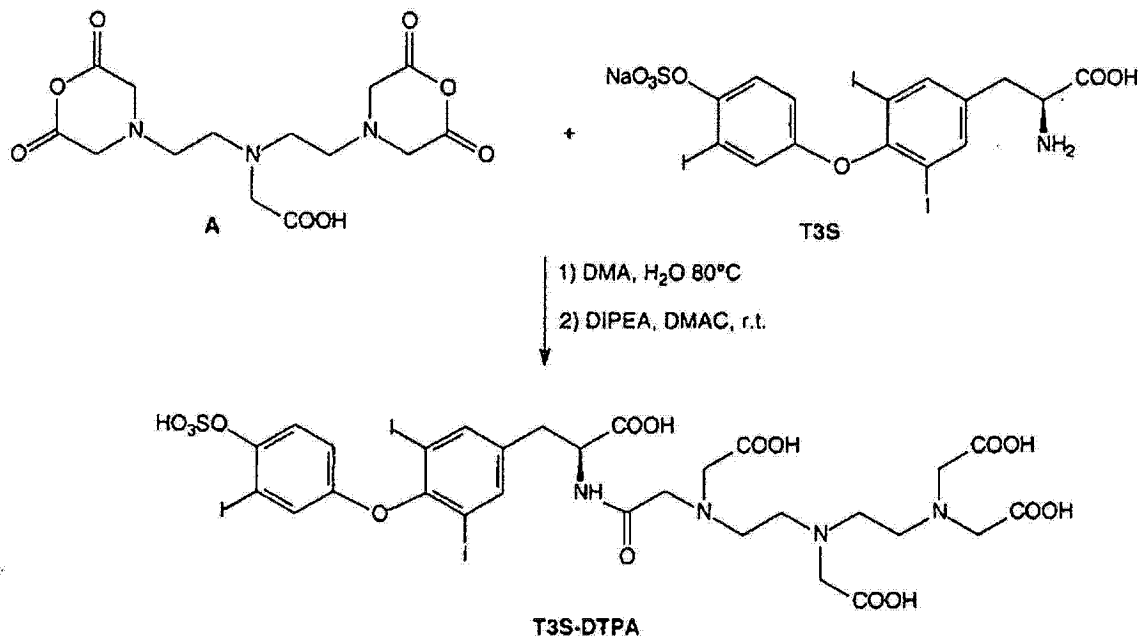


图 2

专利名称(译)	用于制备3,5-二碘-O-[3-碘苯基]-L-酪氨酸的硫酸化衍生物的方法		
公开(公告)号	CN103534232A	公开(公告)日	2014-01-22
申请号	CN201280023319.5	申请日	2012-04-05
[标]申请(专利权)人(译)	伯拉考成像股份公司		
申请(专利权)人(译)	伯拉考成像股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	伯拉考成像股份公司		
[标]发明人	PL阿内力 M阿尔格赛 V波尔 L卡瓦雷力 L嘉礼姆波蒂 S加泽多 L拉图阿达 F麦萨诺 G利沃尔塔 F韦拉		
发明人	P·L·阿内力 M·阿尔格赛 V·波尔 L·卡瓦雷力 L·嘉礼姆波蒂 S·加泽多 L·拉图阿达 F·麦萨诺 G·利沃尔塔 F·韦拉		
IPC分类号	C07C303/08 C07C309/42 A61K31/198 G01N33/53		
CPC分类号	C07C303/32 C07C309/42 A61P5/14 A61P43/00 C07C303/24 C07C303/44 G01N33/78 C07C305/24 A61K31/198 C07C303/08		
代理人(译)	于巧玲		
优先权	102011901940427 2011-04-29 IT 13/083047 2011-04-08 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种通过在作为溶剂的氯磺酸和二甲基乙酰胺的存在下，由相应酚化合物开始来制备衍生物3, 5-二碘-O-[3-碘-4-(碘基氧基)苯基]-L-酪氨酸(T3S)的单钠盐的方法。如此得到的T3S化合物可以方便地以良好产率、作为固体以纯形式分离。本发明进一步涉及用于T3S的制备方法，其中起始试剂为T2，并且进一步包括片剂形式的该化合物的制剂。进一步，本发明公开了基于T3S衍生物的非放射性免疫分析法。

