

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-239894

(P2004-239894A)

(43) 公開日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/531

F I

GO 1 N 33/531

B

テーマコード (参考)

審査請求 有 請求項の数 6 O L 外国語出願 (全 58 頁)

(21) 出願番号 特願2004-4171 (P2004-4171)
 (22) 出願日 平成16年1月9日 (2004.1.9)
 (31) 優先権主張番号 10/341,692
 (32) 優先日 平成15年1月14日 (2003.1.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(71) 出願人 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAF
 T
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124

(74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素阻害イムノアッセイ

(57) 【要約】

【課題】 生物学的サンプル中のアナライトを測定するための酵素阻害イムノアッセイを提供する。

【解決手段】 本発明は、非競合的阻害剤をリガンドに結合して均一アッセイに利用することを特徴とする、生物学的サンプル中のアナライトの測定方法を提供する。アナライトとしては、薬物もしくは薬物誘導体、ホルモン、ポリペプチド、またはオリゴヌクレオチドが対象となりうる。本発明はまた、そのような測定を行うのに有用である、新規な化合物、アッセイ試薬、およびパッケージ化キットを提供する。

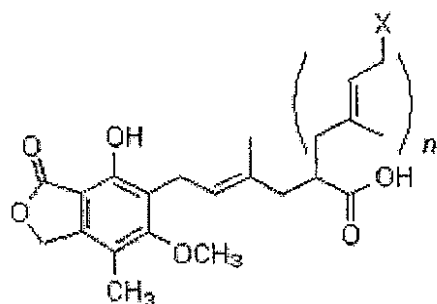
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造：

【化 1】



10

〔式中、 $n=1\sim 2$ 、かつ

xは、

-NH-CO-(CH₂)₃-フェニトイン、

-O-CO[NH-ゲンタマイシン]、

-NH-CO-Ph-CO[NH-ゲンタマイシン]（ここで、Phは、フェニルである）、

5'-[[[(ジゴキシシン(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボニル]アミノ]-、
および5'-[[[(ジギトキシシン(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボニル]アミノ]-
からなる群より選択される薬物誘導体である〕

を有するリガンド-阻害剤コンジュゲート。

20

【請求項 2】

xが-NH-CO-(CH₂)₃-フェニトインである、請求項 1 に記載のリガンド-阻害剤コンジュゲート。

【請求項 3】

xが-O-CO[NH-ゲンタマイシン]である、請求項 1 に記載のリガンド-阻害剤コンジュゲート。

30

【請求項 4】

xが-NH-CO-Ph-CO[NH-ゲンタマイシン]（ここで、Phは、フェニルである）である、請求項 1 に記載のリガンド-阻害剤コンジュゲート。

【請求項 5】

xが5'-[[[(ジゴキシシン(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボニル]アミノ]-である、請求項 1 に記載のリガンド-阻害剤コンジュゲート。

【請求項 6】

xが5'-[[[(ジギトキシシン(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボニル]アミノ]-である、請求項 1 に記載のリガンド-阻害剤コンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的には、液体媒体中のアナライトを測定する分野に関する。より特定のには、本発明は、生物学的サンプル中のアナライトを測定するためのイムノアッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

ボグスラスキー、アール・シー・(Boguslaski, R.C.)らの特許文献 1（1979年）には、液体媒体中のアラナイトを検出するための標識化用物質としての可逆的結合性酵素モジュレーターの使用、とくに、イムノアッセイにおけるアナライト類似体に結合させた競合的阻

50

害剤の使用が記載されている。

【0003】

ドーン, エイ.アール.(Dorn, A.R.)の特許文献2 (1999年6月9日出願) には、生物学的サンプル中のミコフェノール酸の酵素的測定方法が記載されている。

【0004】

イノシン-5'-一リン酸デヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.205) は、イノシン-5'-一リン酸 (IMP) からキサントシン-5'-一リン酸 (XMP) へのNAD依存性酸化を触媒する (非特許文献1および非特許文献2)。この酵素は、基質と補因子との結合および生成物の放出という順序づけられたBi-Bi反応シーケンスに従う。最初に、IMPはIMPDHに結合する。これに続いて、補因子NADの結合が起こる。次に、この生成物から還元型補因子NADHが放出され、続いて生成物XMPを生じる。この機序は、基質の添加順序がランダムであるかまたは基質よりも先にNADが結合する必要があるほとんどの他の既知のNAD依存性デヒドロゲナーゼの機序とは異なる。

10

【0005】

I型およびII型と呼ばれる2つのイソ型のヒトIMPDHの同定および配列決定がなされている (非特許文献3および非特許文献4)。それぞれのイソ型は、514個のアミノ酸であり、両者のイソ型は、84%の配列同一性を共有する。I型およびII型のIMPDHはいずれも、溶解状態で、サブユニットの分子量が56kDaである活性四量体を形成する (非特許文献5)。

【特許文献1】米国特許第4,134,792号明細書

【特許文献2】米国特許出願第09/328,741号明細書

20

【非特許文献1】マガサニク, ビー.(Magasanik, B.)ら著, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 1957年, 第226巻, p.339-350

【非特許文献2】ジャクソン (Jackson)ら著, ネイチャー (Nature), 1975年, 第256巻, p.331-333

【非特許文献3】コラート (Collart)ら著, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 1988年, 第263巻, p.15769-15772

【非特許文献4】ナツメダ (Natsumeda)ら著, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 1990年, 第265巻, p.5292-5295

【非特許文献5】ヤマダ (Yamada)ら, バイオケミストリー (Biochemistry), 1988年, 第27巻, p.2737-2745

30

【発明の開示】

【0006】

本発明は、その最も狭義の適用では、ミコフェノール酸による酵素イノシン-5'-一リン酸デヒドロゲナーゼ (IMPDH) の特異的非競合的阻害に基づく、ミコフェノール酸に特異的な定量的均一イムノアッセイにより例示される。ミコフェノール酸による阻害が非競合的であるため、IMPDH阻害は、ミコフェノール酸の濃度にのみ依存する。したがって、ミコフェノール酸の濃度が高くなるほど、酵素の阻害は大きくなる。還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の生成を340nmで測定することにより、反応をモニターする。IMPDHは、次の反応を触媒する。

【化1】

40

IMPDH



【0007】

均一イムノアッセイの開発は、IMPDHの非競合的阻害を妨げない形でミコフェノール酸もしくはMPA誘導体またはIMPDHの任意の非競合的阻害剤の所定位置にリガンドを結合させることにより達成できる。アナライトの不在下では、アナライト特異的抗体は、リガンド-MPA誘導体に結合し、そのIMPDH阻害を妨げる。アナライトの存在下では、アナライトは

50

、その抗体に結合することによりリガンド-MPA誘導体を放出し、IMPDHを阻害する(表3、サンプルセットC)。

【0008】

NADH(還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)の生成速度は、340nmの波長(すなわち、NADHの特性吸収領域)における吸光度の変化をモニターすることにより測定することができる。次に、この吸光度変化をアナライト濃度に関連づけることができる。

【0009】

リガンド結合の対象となる魅力的な位置は、ミコフェノール酸およびその誘導体のヘキサ酸の鎖上、とくに、4'炭素および5'炭素である(図1)。いくつかの化合物は、この基準を満足する。ネルソン, ピー.エイチ.(Nelson, P.H.)ら著, ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(Journal of Medicinal Chemistry), 1990年, 第33号, p.833-838、ローロフ, ジェイ.シー.(Rohloff, J.C.)ら著, テトラヘドロンのレターズ(Tetrahedron Letters), 1995年, 第36巻, 第43号, p.7803-7806、アーティス, ディー.アール.(Artis, D.R.)らの国際公開第95/22536号(1995年)パンフレット、およびアーティス, ディー.アール.(Artis, D.R.)らの国際公開第95/22538号(1995年)パンフレットを参照されたい。これらの誘導体のうちのいくつかは、ミコフェノール酸よりも大きい阻害を示すので、均一イムノアッセイをより高感度なものにできる可能性がある。スミス, ディー.ビー.(Smith, D.B.)ら著, ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー(J. Org. Chem.), 1996年, 第61巻, p.2236-2241を参照されたい。

【0010】

本発明の好ましい実施形態では、非競合的阻害剤であるミコフェノール酸(MPA)をリガンドに結合させてミコフェノール酸の均一イムノアッセイで使用した。

【0011】

非競合的阻害剤-リガンドコンジュゲートを使用するほうが、競合的阻害剤-リガンドコンジュゲートを使用するよりも好ましい。なぜなら、前者のコンジュゲートのほうが、一般に酵素の競合的阻害剤となりうる薬物および天然に存在する物質による妨害をはるかに受けにくいからである。酵素の非競合的阻害剤は、稀有な性質をもつので、薬物および天然の物質による妨害をそれほど受けないはずである。

【0012】

本発明は、その最も広義の適用では、任意のアナライトの測定に使用することができる。本明細書中に具体的に例示されているのは、ミコフェノール酸、ジゴキシゲニン、チロキサン、およびテオフィリンを測定するための本発明の使用である。また、薬物もしくは薬物誘導体、ホルモン、ポリペプチド、およびオリゴヌクレオチドを含む任意のアナライトを測定するための本発明の使用も教示されている。本発明の方法を用いるアッセイに好適であると思われる他の薬物もしくは薬物誘導体の例としては、抗生物質(たとえば、ゲンタマイシン、アミカシン、トブラマイシン、ネチルマイシン、およびバンコマイシン)；強心薬(たとえば、ジゴキシン、ジギトキシン、N-アセチルプロカインアミド、プロカインアミド、キニジン、およびリドカイン)；抗発作薬(たとえば、フェニトイン、フェノバルビタール、プリミドン、バルプロ酸、エトスクシミド、およびカルバマゼピン)；鎮痛薬(たとえば、アセトアミノフェンおよびアセチルサリチル酸)；および免疫抑制薬(たとえば、MPA、シクロスポリン、ラパマイシン(シロリムス)、FK506(タクロリムス))のような治療用薬物、ならびに、アンフェタミン、バルビツレート、ベンゾジアゼピン、カンナビノイド、コカイン代謝産物(ベンゾイルエクゴニン)、メタドン、アヘン類、フェンシクリジン、プロポキシフェン、およびLSDのような乱用薬物が挙げられる。本発明の方法を用いるアッセイに好適であると思われるホルモンの例としては、チロキシン、甲状腺刺激ホルモン、エストロゲン、プロゲステロン、テストステロン、プロラクチン、濾胞刺激ホルモン、絨毛性ゴナドトロピン、および黄体形成ホルモンが挙げられる。本発明の方法を用いるアッセイに好適であると思われるポリペプチドの例としては、ヘモグロビンA1c、トロポニンT、およびトロポニンIのようなタンパク質およびエピトープが挙げられる。本発明の方法を用いるアッセイに好適であると思われるオリゴヌクレオチドの例として

は、淋菌、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、クラミジア、および肝炎感染の検出および定量に対して十分に特異的である配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることのできる特定のオリゴヌクレオチド配列が挙げられる。

【0013】

本発明の他の態様は、NADと、IMPDHと、IMPと、MPAとアナライトのリガンドとを含むコンジュゲートと、を含む1種以上の試薬組成物をパッケージ化組合せ物として備えることを特徴とする、本発明の方法によりアナライト測定アッセイを行うための試験キットに関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

ミコフェノール酸によるIMPDHの阻害には均一酵素イムノアッセイの開発を容易にすると思われるいくつかの性質が存在することを見いだした。ミコフェノール酸による阻害の感度(10~20nM)およびその非競合的阻害は、それを均一酵素イムノアッセイに使用するうえで有利である。リガンドをミコフェノール酸に注意深く結合させてリガンド-阻害剤コンジュゲートを形成することにより、特定のアナライトを対象とする均一酵素イムノアッセイを開発することができる。IMPおよびNADの競合的阻害剤は多数存在し、アッセイの特異性を低下させるおそれがあるので、リガンドを非競合的阻害剤に結合させることは、ミコフェノール酸の測定という特定の場合に非常に好ましい。一般に、リガンド-阻害剤コンジュゲートにおいて競合的阻害剤を用いると、アッセイ性能が妨害されるであろう。なぜなら、多くの薬物および天然に存在する物質が競合的阻害剤として作用し、特異性を大きく低下させるおそれがあるからである。

【0015】

IMPDH酵素の非競合的阻害剤は、該酵素の活性部位に結合することにより阻害しかつ該酵素の阻害に関してIMPともNADとも競合しない物質である。阻害剤が該酵素の活性部位でIMPDH-XMP複合体と可逆的に結合してIMPDH-XMP-阻害剤複合体を形成する場合、非競合的阻害が起こり、その際、この複合体はXMP生成物を放出することができない。このタイプの阻害は、基質の濃度を増大させれば逆方向に進行することはない。NADHは一回だけ放出されるが、XMPは放出されない。一方、非競合的阻害剤は、基質結合部位以外の部位に結合する。非競合的阻害もまた、基質の濃度を増大させれば逆方向に進行することはない。

【0016】

使用に好適なIMPDH酵素は、ヒトTリンパ球由来の組換えIMPDH-II酵素である。

【0017】

アナライト濃度に対する本発明のイムノアッセイの感度は、MPAによる阻害に対する感度が異なるさまざまな形態のIMPDHを使用することにより変化させることができる。たとえば、いくつかの形態のヒトIMPDHに対するMPAの阻害定数(K_i)は、次のとおりである。

【表1A】

IMPDH の形態	K_i (IC_{50})	参考文献
IMPDH-I	37 nM	ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 1993年, 第268巻, p. 27286-27290
IMPDH-II	9.5 nM	ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 1993年, 第268巻, p. 27286-27290
IMPDH-II ser 275 → ala 275	4 nM	セル(Cell), 1996年, 第85巻, p. 921-930

10

20

30

40

50

さまざまな酵素形態はMPA阻害に対して異なる感度を有するので、それらはまた、リガンド-阻害剤による阻害に対しても異なる感度を有するはずであり、したがって、さまざまな感度レベルまたはアナライトの測定範囲を有するイムノアッセイを構築するのに有利である。

【0018】

本発明によれば、アッセイ感度の調整が行える。アッセイ感度の調整または変更は、MPAもしくはMPA誘導体、またはIMPDHの任意の非競合的阻害剤に対して異なる感度を有するさまざまな形態のIMPDHを用いなければ容易に達成することはできないであろう。

【0019】

アナライトを含むと推測されるサンプル： アナライト(すなわち、ミコフェノール酸または他のIMPDH阻害剤)を当然含んでいると推測される任意のサンプルを本発明の方法により分析することができる。サンプルは、典型的には、宿主からの体液(たとえば、尿、全血、血漿、血清、唾液、精液、糞便、痰、脳脊髄液、涙、粘液など)のような水性溶液であるが、好ましくは血漿または血清である。サンプルは、所望により、前備処理してもよく、アッセイを妨害しない任意の便利な媒体中に調製してもよい。水性媒体が好ましい。

【0020】

ミコフェノール酸の量の測定： ミコフェノール酸を測定するための定量的、半定量的、および定性的方法ならびにすべての他の方法が、ミコフェノール酸の量を測定する方法であるとみなされる。たとえば、ミコフェノール酸を含有すると推測されるサンプル中におけるミコフェノール酸の存在の有無を単に検出する方法は、本発明の範囲に含まれるとみなされる。「検出」および「決定」という用語ならびに測定に対応する他の一般的な類義語は、本発明の範囲内であるとみなされる。

【0021】

本発明に係るMPAの測定は、単位時間あたりのNADHの吸光度の変化を測定するレートアッセイ(rate assay)法または一定時間が経過した後に反応を停止させる終点法により行うことができる。本方法は、実験室的または臨床的分析のための自動分析装置に容易に適用することができる。自動実験室アナライザーの例は、COBAS INTEGRAおよびROCHE/HITACHIシリーズのアナライザー(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)である。NADHの他の測定方法も利用可能であると考えられる。たとえば、バブソン, エイ.エル.(Babson, A.L.)ら著, クリナカル・クリニカル・ケミストリー(Clinical Chemistry), 1973年, 第19巻, 第7号, p.766-769に記載されているように、中間電子伝達体として作用するフェナジメトスルフェートを用いてNADの還元をテトラゾリウム塩2-p-ニトロフェニル-5-フェニルテトラゾリウムクロリド(INT)の還元と組み合わせることが考えられる。

【0022】

検量物質とは、既知量の測定対象アナライトを含有する任意の標準物質または参照物質を意味する。アナライトを含有すると推測されるサンプルおよび検量物質は、同様の条件下でアッセイされる。次に、未知の試料で得られた結果を標準物質で得られた結果と比較することにより、アナライトの濃度を算出する。これは、通常、図2、3、4、および5に示されるような検量線を作成することにより行われる。

【0023】

補助物質： 本発明に係るアッセイでは、種々の補助物質が頻繁に利用されるであろう。たとえば、アッセイ媒体中には、アッセイ媒体およびアッセイ成分のための安定化剤だけでなく、通常、緩衝液も存在する。多くの場合、これらの添加剤に加えて、アルブミンのような追加のタンパク質または界面活性剤(とくに、非イオン性界面活性剤)などを含有させる。

【0024】

IMPDHとは、酵素イノシン-5'-一リン酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.205)を意味する。これは、イノシン-5'-一リン酸からのキサンチン-5'-一リン酸の生成を触媒する。本発明では、天然源もしくは組換え源または部位限定突然変異体由来するIMPDHの使用が対象となり、任意のイソ型、部位限定突然変異体、またはイソ型の混合物を使用することが可

10

20

30

40

50

能である。

【0025】

当然のことながら、本明細書および請求の範囲の全体を通して、ミコフェノールについてのいかなる言及も、ミコフェノール酸だけでなく、生物学的な意味でミコフェノール酸としての挙動を示す(すなわち、IMPDH阻害を介した挙動を示す)その生物学的に活性でかつ治療的に活性な代謝産物および誘導体をも包含するものとする。

【0026】

本発明の他の態様は、アナライトを測定するための本発明のアッセイ法を都合よく実施するのに有用なキットに関する。本発明の多用性を高めるために、本方法およびアッセイを実質的に最適化するような試薬比で、本発明の方法に有用な試薬を、液体形態または凍結乾燥形態で同一または別々の容器中にパッケージ化された組合せ物として提供することができる。試薬の交差反応性および安定性に応じて、試薬をそれぞれ別々の容器に入れてもよいし、種々の試薬を組み合わせて1つ以上の容器に入れてもよい。

【0027】

本発明のキットは、NADと、IMPDHの阻害剤とアナライトのリガンドとを含むリガンド-阻害剤コンジュゲートと、IMPと、IMPDHと、を含む。試薬は、液体形態で保持してもよいし、凍結乾燥させてもよい。キットはさらに、検量物質および対照物質をも含有しうる。

【0028】

しかしながら、本発明は、ミコフェノール酸の測定以外の用途をも有する。本明細書に記載の方法を用いれば、4'位または5'位で適切に誘導体化されたミコフェノール酸もしくはMPA誘導体またはIMPDHの任意の非競合的酵素阻害剤に結合させるのに適切な反応性基により誘導体化された任意のリガンド(たとえば、テオフィリン、ジゴキシン、フェニトイン、ペプチド断片、オリゴヌクレオチド、モルフィン、コカインなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない)を用いて、未知のサンプル中の対応するアナライトを測定することができる。これらの位置で誘導体化すると、新たな光学活性中心がつくられる。立体異性体は本発明の範囲内にあるとみなされる。

【0029】

本発明の中心の特徴は、薬物誘導体に結合させるべく伸長させることのできる適切な連結基で5'位が置換されたMPA誘導体を合成できることである。本発明には、5'-カルボキシアルキルMPA薬物誘導体および5'-イソプレニル連結MPA薬物誘導体に見られるような2つの異なるタイプの連結基が開示されている。

【0030】

MPAエステルの5'位で置換を行うには、低温においてナトリウムビス(トリメチルシリル)アミドおよびDMPUの存在下でアルキルハロアセテートによりアルキル化反応を行うことが必要である。DMPUの代わりにHMPAを用いれば、一般に、アルキル化反応が改良されると思われる。このアルキル化反応は、リンカーにおける選択的エステル加水分解の後でアルキルハロプロピオネートまたはアルキルハロブチレートを用いて5'-カルボキシエチルMPAエステルまたは5'-カルボキシプロピルMPAエステルを調製するように拡張することができる。次に、リンカーのカルボキシ官能基を活性エステルに変換することにより、多種多様な合成経路が可能になる。その後、適切に誘導体化された薬物誘導体(最も一般的には、アミド結合を形成するリンカー含有アミノ基を有する薬物)に結合させることができる。

【0031】

ナトリウムビス(トリメチルシリル)アミドおよびHMPAの存在下でブロモ-イソプレニルリンカー(1)を用いてMPAエステルの5'位に置換することにより、MPAの5'-イソプレニルTB DPS誘導体を得た。TBDPS基を加水分解して、5'-イソプレニル[OH]-MPA[OMEM](5)を得た。この重要な中間体アルコールをトリエチルアミンの存在下でジスクシンイミジルカーボネートで処理することによりN-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネートに変換し、活性化させた。この活性化カーボネートを単離せずに使用してアミノ修飾薬物に結合させ、ウレタン結合を有するMPA薬物コンジュゲートを得た。ウレタン結合はまた、1,1'-カルボニルジイミダゾールまたはp-ニトロフェニルクロロホルメートによる該アルコールの活性化お

10

20

30

40

50

よびその中間体とアミノ基修飾薬物誘導体との反応により形成することも可能である。この合成は、プロモ-ビス-イソプレニルTBDPSを用いることにより、MPAビス-イソプレニル薬物コンジュゲートを得るように拡張することができる。プロモ-ビス-イソプレニルTBDPSは、クロロ-ビス-イソプレニルTBDPSについてジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー(J. Org. Chem.), 1997年, 第62巻, p.3529に報告されたような文献記載の手順に従って、ゲラニオール誘導体から調製することができる。

【0032】

次に、先に述べたように、リンカー中にウレタン(カルバメート)結合を有するMPA-薬物コンジュゲートを、当技術分野で公知の試薬を用いて脱保護することが可能であるが、ただし、通常、若干の注意が必要である。例として、MPA自体のベンゼン核のフェノール性ヒドロキシの保護基、たとえば、種々の実施例で使用したメトキシエトキシメチル基(MEM基)などは、一般に使用されるトリフルオロ酢酸(TFA)をメチレンクロリド(CH_2Cl_2)中に希釈して用いることにより除去することが可能である。しかしながら、室温において CH_2Cl_2 中の1:1 TFAで処理したときに保護されたMPA-チロキシシンコンジュゲート(9)が破壊させることにより例示されるように、標準的な条件またはよく使用される条件を適用すると、リンカー中のカルバメート結合の開裂も起こり、MPAから薬物が切り離される。しかしながら、注意深く制御された条件下、より低い温度で、 CH_2Cl_2 中の希薄な限られた量のTFAを適用することにより、本発明で例示されるように、所望の脱保護されたMPA-薬物コンジュゲートを提供することに成功した。注意深い脱保護が必要とされるさらなる例は、完全に保護されたMPAゲンタマイシンコンジュゲート(N)から所望の最終的な脱保護されたMPA-ゲンタマイシンコンジュゲート(R)への脱保護により示される。この場合、温和な塩基性条件を用いてメチルエステル基およびN-トリフルオロアセテート基を逐次的に除去し、続いて、温和であるが制御された酸性条件下で3個のt-BOC基および1個のMEM基を除去することが必要であった。

【0033】

リンカーがウレタン結合またはウレタン基を含有するときには脱保護の順序にさらなる注意を払う必要があるので、その代わりにアミド結合に使用すると、温和な条件下における破壊に対するより大きな安定性および抵抗性などの利点を得られる。先に論じたカルボキシアルキルMPA誘導体の使用と相補的に、MPA-5'-イソプレニルアミン誘導体(先に述べた5'-イソプレニルアルコールの代替物質として)を使用すれば、より安定なアミド結合を有する対応するMPA-薬物コンジュゲートが得られるであろう。

【0034】

この目的のために、先に述べた5'-イソプレニル[OH]-MPA[OMEM](5)誘導体でミツノブ反応を行うことにより、対応するMPA-5'-イソプレニルアミン類似体を生成させることが可能である。多段階変換シーケンスを用いた場合、たとえば、アルコールからプロミドへの変換、続いて、アジドへの変換およびアミンへの加水分解を行った場合、二重結合の周りで異性化が観測された。しかしながら、図19に示されるように、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート(DIAD)のような活性化剤/メディエーターの存在下におけるMPA-5'-イソプレニルアルコールとトリフェニルホスフィンおよびフタルイミドとのワンステップ反応では、所望のMPAフタルイミドが得られ、これをエタノール中でメチルアミンで処理するとMPA-5'-イソプレニルアミン(B)が得られた。このアミンを用いて、それぞれ図25および24a、bに示されるように、いずれも安定なアミド結合を含有するMPA-フェニトインコンジュゲート(Y)およびMPA-ゲンタマイシンコンジュゲート(U)を調製した。

【0035】

図11、12、13、および14に示されるMPA-ジゴキシゲニン誘導体(すなわち、ジゴキシンの糖部分が欠失している誘導体)は、アミド結合を含有する。これらは、対応するジゴキシゲニン-アミン誘導体およびMPAの5'-カルボキシアルキル類似体から合成したものである。これに対して、図21に示されるジゴキシシンオキサゼピン類似体(G)を用いれば、上述したMPA-5'-イソプレニルアミンを用いて、同様にアミド結合を有しかつジゴキシンの糖を存在させたままのMPA-ジゴキシシンコンジュゲート(H)を形成することが可能である。対

応するジギトキシシンオキサゼピン類似体(K)を用いれば、同様に糖が存在するMPA-ジギトキシシンコンジュゲート(L)を合成することが可能である。

【0036】

しかしながら、図20に示されるように、保護されたMPAアミン(B)を完全に脱保護されたMPA-5'-イソプレニルアミン(D)に変換してから、図21および22に示されるように、(G)または(K)と反応させるほうが効果的であることを見いだした。この変化の原因は、温和な条件下におけるグリコシド結合の破壊、とくに、ステロイド核のC3位と第1の糖部分との間の結合の破壊に対する、ラクトンのような種々の官能基およびグリコシド結合の感受性、とくに、ジゴキシシンまたはジギトキシシンの糖の感受性であった。例として、保護されたMPAアミン(B)と(G)との反応では、MEM基とメチルエステル基とを有する対応する保護されたコンジュゲートが得られ、このコンジュゲートから、温和な塩基処理(エステルの加水分解)により、一方または両方のラクトン基が開環した物質が得られた。一方、部分的に脱保護されたMPAアミン(C)と(G)との反応では、MEM基を有する対応する部分的に保護されたコンジュゲートが得られ、このコンジュゲートから、温和な酸処理(CH_2Cl_2 中のTFA)により、ジゴキシゲニンスステロイド核は開裂除去されているがMEM基は依然として大部分が存在する物質が得られた。

10

【0037】

ジゴキシシンおよびジギトキシシンのこれらのオキサゼピン類似体(G)および(K)ならびにそれぞれその前駆体酸(F)および(J)は、本質的にそれ自体で、2つの薬物の他の既知の同様なオキサゼピン類似体よりも優れた利点を有する有用な物質である。とくに、アミノベンゾエート部分を組み入れることにより、300nmよりも長い波長に実質的なUV吸収を有する分子が得られる。先行技術物質はそうしたUV吸収をもたない。このため、たとえば、他のUV吸収バンドを有する化合物中でまたは典型的な特性UV吸収ピークがたとえば280nmにある多くのタンパク質もしくはポリペプチドのコンジュゲート中で、これらの新しい誘導体を用いれば、ジュゲートの可視化および同定/定量化が容易になる。なぜなら、ジゴキシシンまたはジギトキシシンの類似体によるUV吸収は、タンパク質またはポリペプチドによるUV吸収から分離され、より長い波長位置にくるからである。

20

【0038】

完全に脱保護されたMPA-5'-イソプレニルアミン(D)を薬物-NHSエステルまたは他の薬物-活性化エステル誘導体(ただし、これらに限定されるものではない)のような任意の他のアミン反応性薬物類似体と併用することにより、安定なアミド結合を有するMPA-薬物コンジュゲートを形成することも可能である。完全に脱保護されたMPA-5'-イソプレニルアミン(D)のアミノ基は、存在する3つの官能基中で最も求核性が強く、遊離塩基として存在する通常の条件下、他の基から有意な妨害を受けることなく、そのような薬物誘導体と容易に反応するであろう。そのような方法を用いれば、全コンジュゲートの完全性を損なうおそれのあるさらなる脱保護ステップまたは化学的操作をまったく用いることなく、好適な薬物誘導体からMPA-薬物コンジュゲートを合成することが可能である。

30

【0039】

同様の方法で、保護されたMPA-5'-イソプレニルアミン(B)または部分的に脱保護されたアミン(C)を薬物-NHSエステルまたは他の薬物-活性化エステル誘導体(ただし、これらに限定されるものではない)のような任意の他のアミン反応性薬物類似体と併用することにより、安定なアミド結合を有するMPA-薬物コンジュゲートを形成し、続いて、これを脱保護して最終薬物-MPAコンジュゲートを形成することも可能である。

40

【0040】

さらに、例として、いずれも第一級アミンである保護されたMPA-5'-イソプレニルアミン(B)もしくは(C)または完全に脱保護されたアミン(D)(ただし、これらに限定されるものではない)を、それぞれ、当技術分野で周知の方法でアミノ基をアルキル化することにより、対応する低級アルキル第二級アミンに変換することも可能である。次に、これらの物質を用いて、これらの第二級アミンと、脱離基としてハロゲン(たとえば、ClまたはBrまたはI)を有するリンカーを含有する薬物と、の反応により、薬物自体がさらなる反応活性

50

基を含有しなければ、このほかのさらなるMPA-薬物コンジュゲートを形成することも可能である。多くの場合、それらを他のアミン反応性薬物類似体と反応させることにより、たとえば、薬物-NHSエステルもしくは薬物-イソチオシアネートもしくは薬物-トシレートなどまたは他の薬物-活性化エステル誘導体(ただし、これらに限定されるものではない)と反応させることにより、MPA-薬物コンジュゲートを形成することも可能である。次に、本発明に記載されているのと同じような方法を用いてまたは当業者に自明の方法により、OMEM基およびカルボン酸エステル基または使用しうるもしくは存在しうる他の保護基を脱保護することが可能である。同様の方法で、先の第一級アミン(B)、(C)、または(D)を同じように使用して、対応するMPA-薬物コンジュゲートを形成することも可能である。そのようなMPAアミンと薬物類似体との他の組合せを当業者に推奨しうるであろう。

10

【0041】

最後に、対応するイソプレニルアルコールをトシレートまたはメシレートに変換することにより、場合により、続いて、ハリド(好ましくは、ブロミドまたはヨージド)で置換してMPA-5'-イソプレニルハリドを形成することにより、MPA-5'-イソプレニルチオールを調製することが可能である。これらの化合物は、当業者に知られた方法により、たとえば、チオウレアとの反応およびそれに続く塩基加水分解により、またはチオアセテート(好ましくは金属塩として)との反応およびそれに続くアセチル基の温和な塩基開裂により、容易にチオールに変換することができる。

【0042】

ミコフェノール酸によるIMPDHの阻害については、アンダーソン, ジェイ.エイチ.(Anderson, J.H.)ら著, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry), 1968年, 第243巻, 第18号, p.4762-4768に記載されている。IMPDHの阻害剤は、米国特許第5,380,879号、同第5,444,072号、同第5,493,030号、同第5,536,747号、同第5,633,279号、および同第5,807,876号の明細書ならびに国際公開第94/01105号および同第094/12184号のパンフレットにも記載されている。

20

【0043】

大腸菌(E. coli)におけるヒトIMPDHのクローニングおよび発現については、コンノ, ワイ.(Konno, Y.)ら著, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 1991年, 第266巻, 第1号, p.506-509に記載されている。コラート, エフ.アール.(Collart, F.R.)らの米国特許第5,665,583号(1997年)明細書にも大腸菌(E. coli)におけるヒトIMPDHのクローニングおよび発現が記載されている。

30

【0044】

アナライトとは、液体媒体中の存在または量を決定する対象となる物質または物質群を意味し、任意の薬物もしくは薬物誘導体、ホルモン、タンパク質抗原、またはオリゴヌクレオチドが含まれるものとする。

【0045】

抗体または好ましくはレセプターとは、アナライトの特異的結合パートナーを意味し、リガンドに対して他の物質を排除する程度まで特異的結合親和性を有する任意の物質または物質群である。

【0046】

リガンドとは、アナライトに対する抗体の結合親和性に関して本質的にアナライトと同様の挙動を示す任意の物質または物質群を意味し、任意の薬物もしくは薬物誘導体およびそれらの異性体、ホルモン、ポリペプチド、またはヌクレオチドが含まれるものとする。

40

【0047】

薬物測定の一例では、サラモン, エス.ジェイ.(Salamone, S.J.)らの米国特許第5,618,926号(1997年)明細書に記載のモルフィンチオシアネートまたはコカインNHSエステル誘導体を、ミコフェノール酸もしくはMPA誘導体またはIMPDHの任意の阻害剤の4'-または5'-置換アルキルアミノ誘導体に結合させて、未知サンプル中のモルフィンまたはコカインを測定することが必要になるであろう。IMPDHの活性に対して薬物の濃度をプロットすることにより、定量的アッセイとすることができる。

50

【0048】

本発明はまた、特定の標的DNAまたはRNAの存在を決定するための分子診断にも使用することもできる。この場合、ヌクレオチド-ミコフェノール酸コンジュゲート(N-MPA)は、オリゴヌクレオチド鎖の一部になっていないときにIMPDHを阻害できるであろう。N-MPAがオリゴヌクレオチド鎖に取り込まれると、コンジュゲートのミコフェノール酸部分がIMPDHを阻害する能力はモジュレートされるであろう。

【0049】

N-MPAコンジュゲートは、当技術分野で周知の手順に従って調製することができる。オリゴヌクレオチドを合成する酵素の基質となるように、糖部分、塩基部分、またはリン酸部分を介してヌクレオチドを誘導体化することができる。たとえば、誘導体化ヌクレオチド塩基は、求電子剤または求核剤を含有するテザー(tether)を有してもよい。次に、この誘導体を適切に誘導体化されたMPA分子と反応させてN-MPAコンジュゲートを形成することができる。

10

【0050】

このアッセイは、オリゴヌクレオチドの合成に用いられるヌクレオチド混合物にN-MPAコンジュゲートを所定の割合で添加することにより行われるであろう。サンプルは、酵素およびオリゴヌクレオチドの重合に用いられるプローブと共に添加されよう。この際、DNAポリメラーゼおよびRNAポリメラーゼは、そのような重合酵素の例であろう。重合ステップの終了時、適切なIMPDH反応物質と共にIMPDHが添加されよう。サンプルが標的オリゴヌクレオチド配列を含有していない場合、オリゴヌクレオチド合成は進行せず、N-MPAは遊離状態であり、IMPDHを阻害する。標的配列がサンプル中に存在する場合、N-MPAはオリゴヌクレオチドに取り込まれ、IMPDHの阻害に利用しうるN-MPAコンジュゲートは減少するであろう。遊離N-MPAの濃度はIMPDHの活性に反比例するであろう。遊離N-MPAが消費されるほど、IMPDH活性は高くなる。

20

【0051】

このアッセイは、特定の標的DNAまたはRNA分子の存在を決定するために定性的にも定量的にも使用することができる。サンプル中に存在する標的の量はIMPDHの活性に比例するであろう。

【0052】

MPA誘導体によるIMPDH活性のモジュレーションは、タンパク質抗原の検出にも適用することができる。より大きな抗原のエピトープまたはミモトープを表す短いポリペプチドは、当技術分野で公知の方法に従って、適切に誘導体化されたMPA分子に結合させうる基を含有するように誘導体化することにより、ポリペプチド-MPAコンジュゲート(PP-MPA)を形成することができる。アメロンゲン, エイ.ブイ.(Amerongen, A.V.)ら著, ペプチド・リサーチ(Peptide Research), 1992年, 第5巻, 第5号, p.269-274を参照されたい。

30

【0053】

このアッセイは、臨床サンプルをPP-MPA、抗体もしくは対象抗原に対して選択性をもつ適切な結合パートナー、IMPDH、およびIMPDHアッセイで用いられる適切な反応物と混合することにより行われる。サンプルが抗原を含有しない場合、PP-MPAコンジュゲートは抗体により結合され、IMPDHの阻害に利用できなくなるであろう。サンプルがアッセイのデザインの対象となる特定の標的抗原を含有する場合、PP-MPAコンジュゲートは、存在する限られた抗体に対して抗原と競合するであろう。IMPDHの阻害量は、サンプル中に存在する遊離抗原の量に比例する。定量的アッセイは、IMPDH活性の大きさに対して抗原の濃度をプロットすることにより達成することができる。存在する抗原の量は、IMPDH活性の大きさに反比例する。

40

【0054】

以下の実施例を参照することにより、本発明のさらに完全な理解が得られるであろう。ただし、これらの実施例に限定されるものではない。

【0055】

使用した略号は以下のとおりである。

50

【0056】

ACES	N-[2-アセトアミド]-2-アミノエタンスルホン酸
DAD00	1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサ-オクタン 2,2'-(エチレンジオキシ)ビス-エチルアミン
DCC	1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド
DMF	N,N-ジメチルホルムアミド
DMPU	1,3-ジメチル-3,4,5,6-テトラヒドロ-2(1H)-ピリミジノン
EDC	1-エチル-3(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド
HMPA	ヘキサメチルホスホルアミド
MEM	2-メトキシエトキシメチル
NaHMDS	ナトリウムビス(トリメチルシリル)アミド
NHS	N-ヒドロキシスクシンイミド
RP-HPLC	逆相高速液体クロマトグラフィー
TAPSO	3-[N-トリス-(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]-2-ヒドロキシ-プロパンスルホネート, Na
TBAF	テトラブチルアンモニウムフルオリド
TBDPS	tert-ブチルジフェニルシリル
tBoc	tert-ブトキシカルボニル
TCEP	トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩
THF	テトラヒドロフラン

10

20

【実施例】

【0057】

以下の実施例において、カッコ内の数字は図面中の対応する構造を意味する。

【0058】

試薬は、別段の記載がないかぎり、ウィスコンシン州ミルウォーキーのアルドリッチ・ケミカル・カンパニー(Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI)またはミズーリ州セントルイスのシグマ・ケミカル・カンパニー(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)のいずれかから入手したものである。

【0059】

溶媒はすべて、ニュージャージー州フィリップスバーグのジェイ・ティー・ベイカー(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)から入手したものであり、A.C.S.グレードもしくはH.P.L.C.グレードまたは別段の記載がないかぎりそれよりも良好なグレードであった。

30

【0060】

トリエチルアミンは、フルカ・ケミカル・コーポレーション(Fluka Chemical Corp.)から入手したものである(Cat# 90340; puriss.; $\geq 99.5\%$)。

【0061】

トリフルオロ酢酸(TFA)は、フルカ・ケミカル・コーポレーション(Fluka Chemical Corp.)から入手したものである(Cat# 90340, UV分光用)。

【0062】

無水ピリジンおよびジメチルホルムアミド(DMF)は、あらかじめ「シュア・シール(Sure-Seal)(登録商標)」ボトル中にパッケージ化された形でアルドリッチ・ケミカル・カンパニー(Aldrich Chemical Co.)から入手したものである。無水溶媒の添加/回収および操作はすべて、シリンジ/針により行った。

40

【0063】

テトラヒドロフラン(THF)は、アルゴン下でナトリウム/ベンゾフェノンから沸騰蒸発および留出を行うことにより脱水した。

【0064】

メチレンクロリドは、アルゴン下で水素化カルシウムから沸騰蒸発(boiling over)および蒸留を行うことにより脱水した。

【0065】

50

カラムクロマトグラフィーは、イー・エム・サイエンス(E.M. Science)製のフラッシュグレードシリカゲル(Cat. # 9385-9; シリカゲル60; 230-400メッシュASTM)を用いて窒素の正圧下で行った。

【0066】

薄層クロマトグラフィー(TLC)は、イー・エム・サイエンス(E.M. Science)から入手したシリカゲルプレート(Cat. # 5715-7; 厚さ0.025cm)を用いて行った。

【0067】

混合溶媒は、体積対体積百分率として表現されている。たとえば、10% MeOH-CHCl₃(またはCHCl₃中の10% MeOH)は、10体積%のメタノールを含有するクロロホルムである。

【0068】

別段の記載がないかぎり、分析用RP-HPLCによる分析は、Agilent HP1100 LC/MSシステムまたはAgilent HP1100 HPLCシステムのいずれかを用いて行った。これらのシステムは、両方とも、ダイオードアレイディテクターおよび四相ポンプから構成されたものであった。LC/MS分析は、フェノメネックス(Phenomenex)ガードモジュール(Phenomenex KJ0-428 2/C18 ODS 5 μ)を備えたかつクロマトグラフィーストリームがカラムから出てMSディテクターに送入される形態を備えたバイダック(Vydac)218TP54カラム(RP-C18; 300Å, 5 μ)を用いて行った。利用したMSDは、ES(+)モード(エレクトロスプレー; ポジティブモード)で行った。HPLC分析は、バイダック(Vydac)218GK54ガードモジュールを備えたバイダック(Vydac)218TP54カラム(RP-C18, 300Å, 5 μ)を用いて行った。

10

【0069】

別段の記載がないかぎり、分取RP-HPLCは、2台のSD1チタンヘッド2000psiポンプを利用したかつバリアン・ダイナマックス(Varian Dynamax) UV-C可変波長ディテクターを備えたバリアン・ダイナマックス(Varian Dynamax) (Rainin)システムを用いて行った。分離は、ガードモジュール(R00083221G; C18, 8 μ)を備えたモジュラー・バリアン・ダイナマックス(modular Varian Dynamax)ラジアル圧縮カラム(R00083221C; Microsorb 60-8, C18, 250 $\times$ 21.4 mm)を用いて行った。

20

【0070】

別段の記載がないかぎり、HPLC画分の凍結乾燥は、減圧下におけるアセトニトリル(または他の有機共溶媒)の蒸発、それに続く水性残渣の凝固(たとえば、ドライアイス/アセトン冷却浴を使用して)、それに続く通常の方法による凍結乾燥機を用いた氷の昇華を必要とするものであった。

30

【0071】

¹H-NMRスペクトルは、Varian計測器またはBruker計測器のいずれかを用いて、200、300、または400MHzのいずれかで取得した。

【0072】

質量スペクトルは、ホフマン・ラ・ロシェ(Hoffmann-La Roche)(ニュージャージー州ナットレー(Nutley, NJ))、ロシュ・バイオサイエンス(Roche Bioscience)(カリフォルニア州パロアルト(Palo Alto, CA))、ロシュ・ダイアグノスティックス・ゲーエムベーハー(Roche Diagnostics GmbH)(独国ペンツベルク(Penzberg, Germany))、ロシュ・ダイアグノスティックス・コーポレーション(Roche Diagnostics Corp)(インディアナ州インディアナポリス(Indianapolis, IN))の物理化学/分析施設から、またはネブラスカ大学化学科ネブラスカ質量分析センター(Nebraska Center for Mass Spectrometry, Dept. of Chemistry, U. of Nebraska)(ネブラスカ州リンカーン(Lincoln, NE))から、取得した。

40

【0073】

UVスペクトルは、ニュージャージー州マディソンのロバートソン・マイクロリット・ラボラトリーズ(Robertson Microlit Laboratories, Madison, NJ)から取得した。使用した略号は、sh(シオルダー)である。

【0074】

燃焼マイクロ分析データは、ニュージャージー州マディソンのロバートソン・マイクロリット・ラボラトリーズ(Robertson Microlit Laboratories, Madison, NJ)から取得した

50

。

【0075】

実施例1: ミコフェノール酸アッセイ用の抗体試薬の調製

1リットルの抗体試薬(すなわち第1の試薬)を次のように調製した。約800mlの脱イオン水を容器に入れ、6.0gのACESを添加して溶解させた。2N NaOHでpHを6.0に調整した。次に、0.53gのNADを添加して完全に溶解させた。次に、10mlの腹水抗MPAモノクローナル抗体を添加した。次に、0.95gのアジ化ナトリウムを添加して溶解させ、最後に、1.0gのストシドA(SUTTOCID A)(ジーエーエフ・ケミカルス・コーポレーション(GAF Chemicals Corp.))を添加して溶解させた。脱イオン水で体積を1リットルに調整した。

【表1B】

10

表1: 抗体試薬の組成

抗体試薬					
pH 6.0					150 μ l
成分	分子量	M	g/l	機能	最終 M
ACES	182.2	0.0330	6.0	緩衝剤, NAD 安定化剤	0.0163
NAD	663.4	0.0008	0.53	酵素基質	0.0004
抗 MPA	—	—	1:100	モノクローナル抗体	—
アジ化ナトリウム	65.0	0.0146	0.95	抗微生物保存剤	0.0072
SUTTOCID A (50%)	127.1	0.004	1.0	抗微生物保存剤	0.004

20

使用した抗体は、アレキサンダー(Alexander)らの国際公開第96/02004号(1996年)パンフレットに記載されている手順に従って調製した。MPAに対する特異性を有する任意の抗体(モノクローナルまたはポリクローナルのいずれか)を本発明の実施の際に使用することが可能である。しかしながら、容易にかつ一貫性をもたせて産生できるという理由で、一般的には、モノクローナル抗体が好ましい。

【0076】

実施例2: ミコフェノール酸アッセイ用の酵素試薬の調製

1リットルの酵素試薬(すなわち第2の試薬)を次のように調製した。約800mlの脱イオン水を容器に入れ、56.3gのNaTAPSOを添加して完全に溶解させた。次に、81.6gの酢酸ナトリウム $\cdot 3H_2O$ を添加して溶解させた。次に、1.15gのTCEPを添加して溶解させた。次に、0.319gのIMPを添加して溶解させ、次に2.23gの Na_2EDTA を添加して溶解させた。次に、1.0gのSUTTOCID Aを添加して溶解させた。脱イオン水で体積を1リットルに調整した。約13.4mlの組換えヒトIMPDH-II(大腸菌(E. coli)溶解物)を添加して完全に溶解させ、37°Cで5分間にわたる340nmにおける吸光度変化が 4400×10^{-4} になるようにした。次に、0.002gのリガンド-阻害剤コンジュゲート(MPA-MPA、実施例42)を添加して溶解させた。

30

【0077】

IMPDH-IIのクローニングおよび精製に使用送達手順については、カール, エス.エフ.(Carr, S.F.)ら著, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biological Chemistry), 1993年, 第268巻, 第36号, p.27286-27290に記載されている。その内容は参照により本明細書に組み入れられるものとする。IMPDHのクローニングについては、コラート, エフ.アール.(Collart, F.R.)らの米国特許第5,665,583号(1997年)明細書にも記載されている。天然源に由来するIMPDHは市販されていない。MPA、MPA誘導体、またはIMPDHの非競合的阻害剤により阻害される天然源のIMPDHもまた、いずれも好適である。

40

【0078】

試薬成分の有効量は、特定の要件に応じて変化し、特定のアッセイ要件を満足するように実験室での簡単な実験により調整することが可能である。

【0079】

リガンド-阻害剤の濃度は、リガンドに特異的な抗体を用いたときおよび用いないとき

50

のリガンド-阻害剤によるIMPDH阻害の割合に基づいて選択した。イムノアッセイで使用するために、抗体を用いたときと用いないときの阻害の変化パーセントの最大差を選択した。一般に、阻害剤の濃度がその IC_{50} 値よりもわずかに低く、かつ抗体のモル濃度がリガンド-阻害剤のモル濃度の半分よりもわずかに少ないときに、IMPDH阻害の変化パーセントの最大差が得られることが判明した。1抗体あたり2つの結合部位を有するとき、リガンド結合部位の全数は、リガンド-阻害剤の全モル濃度よりもわずかに少なかった。酵素活性は、リガンド-阻害剤の IC_{50} 値にわずかな影響を及ぼした。酵素活性が低くなるほど、リガンド-阻害剤の IC_{50} 値は低くなった。これは、Nowak, I.らのTherapeutic Drug Monitoring 19, 358-360(1997)と一致する。したがって、IMPDHの活性は、リガンド-阻害剤の IC_{50} 値が最低になるように調整した。

10

【表2】

表2: 酵素試薬の組成

酵素試薬					
pH 8.0					
成分	分子量	M	g/l	機能	150 μ l 最終 M
Na TAPSO	281.3	0.2	56.3	緩衝剤	0.1
Na acetate-3H ₂ O	136.1	0.6	81.6	酵素安定化剤(酵素の凝集を減少させる)	0.3
TCEP	286.65	0.004	1.15	酵素安定化剤(システインスルフヒドリル基を還元する)	0.002
Na ₂ IMP	392.2	0.0008	0.319	酵素基質	0.0004
Na ₂ EDTA	372.2	0.006	2.23	酵素安定化剤(重金属をキレート化して還元型システインスルフヒドリルを保持する)	0.003
SUTTOCID (50%)	A 127.1	0.004	1.0	抗微生物保存剤	0.004
IMPDH-II	-	-	-	酵素	-
MPA-MPA	581	3.4×10^{-6}	0.002	リガンド-阻害剤	1.7×10^{-6}

20

30

【0080】

実施例3: ミコフェノール酸の測定

ミコフェノール酸を添加したヒト血漿サンプルに対して本発明の方法によりMPAアッセイを行った。3 μ lのサンプルおよび150 μ lの抗体試薬を37℃のキュベットに送入し、次に、それらを混合して5分間インキュベートし、その後、150 μ lの酵素試薬を添加して混合するように、HITACHI 717アナライザー(Roche Diagnostics Corp., Indianapolis)をプログラムした。最初の酵素試薬添加時から酵素試薬添加の5分後まで340nmにおける吸光度の差を計算した。

40

【表 3】

表3: リガンド-阻害剤コンジュゲート、抗体、およびアナライト
の濃度の関数としてのIMPDH活性

3 μ l サンプル (MPA μ g/ml)	150 μ l 抗体試薬 (+/- 抗 MPA)	150 μ l 酵素試薬 (+/- MPA-MPA)	$\Delta A \times 10^{-4}$ @ 340 nm
A	0	-	4338
	5	-	1939
	10	-	541
B	0	+	1666
	5	+	557
	10	+	214
C	0	+ (1:100)	3109
	5	+ (1:100)	2671
	10	+ (1:100)	2135
D	0	+ (1:1000)	1957
	5	+ (1:1000)	804
	10	+ (1:1000)	304
E	0	+ (1:100)	4330
	5	+ (1:100)	4075
	10	+ (1:100)	3667

10

20

【0081】

表3は、リガンド-阻害剤コンジュゲート(MPA-MPA)、MPA抗体、およびミコフェノール酸アナライト(MPA)の濃度の関数としてのIMPDHの活性を示している。このデータから、リガンド-阻害剤コンジュゲートが、均一イムノアッセイに必要な有用な阻害特性を有すること、すなわち、リガンド-阻害剤コンジュゲートがIMPDHおよびその特異的抗体の両方により結合され、この結合が互いに排他的な事象であることが示される。サンプルセットAでは、試薬は、抗体もリガンド-阻害剤も含有しておらず、最大のIMPDH活性を生じた。サンプルセットBでは、酵素試薬は、リガンド-阻害剤を含有しており、IMPDH活性に及ぼすリガンド-阻害剤の影響を示すために使用した。サンプルセットCは、抗体およびリガンド-阻害剤の両方が存在するときのMPAによるIMPDH活性のモジュレーションを示すために作製した。サンプルセットDでは、抗体試薬中にはMPAまたはMPA-MPAコンジュゲートに結合するのに十分な抗体が存在しておらず、不十分な抗体濃度の影響を示される。サンプルセットEでは、MPAの大部分に結合するのに十分な抗体が存在し、MPAにだけ結合する抗体の影響が示される。これらの結果を、サンプルセットAで観測される抗体なしで得られる結果と比較されたい。

40

【0082】

実施例4: プロモ-イソプレニルリンカー、MPA-メチルエステル、および3- β -アミノ-ジゴキシゲニンの調製

プロモ-イソプレニルリンカー(1)は、ステファニー イー・セン(Stephanie E. Sen)およびグレゴリー ジェイ・ユーイング(Gregory J. Ewing)著、ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー(J. Org. Chem.), 1997年, 第62巻, p.3529-3536に発表された手順に従って調製した。

【0083】

MPAメチルエステル(2)は、ウィリアム エイ・リー(William A. Lee), レオ グー(Leo G u), アンドリュー アール・ミクツタル(Andrew R. Miksztal), ナンシー チュー(Nancy C

50

hu), クワン レウング(Kwan Leung)およびピーター エイチ. ネルソン(Peter H. Nelson)著, ファーマシューティカル・リサーチ(Pharmaceutical Research), 1990年, 第7巻, p. 161-166に発表された手順に従って調製した。

【0084】

3-β-アミノ-ジゴキシゲニン¹は、バイオオーガニック・アンド・メディシナル・ケミストリー・レターズ(Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters), 1999年, 第9巻, p.771-744に発表された手順に従って調製した。

【0085】

実施例5: 5'-イソプレニル[OTBDPS]-MPAメチルエステル(3)の調製

4.02ml(4.01mmol)のナトリウムビス(トリメチルシリル)アミドの溶液(テトラヒドロフラン(THF)中の1M溶液)を、アルゴン雰囲気下、ドライアイス/アセトン浴中で冷却させた。600mg(1.79mmol)のMPAメチルエステル(2)を7mlの無水THFに溶解させた溶液を、この反応混合物に滴下した。得られた溶液を-78℃で30分間攪拌し、84mg(0.46mmol)のヘキサメチルホスホルアミド(HMPA)を2mlのTHFに溶解させた溶液を添加した。反応混合物を-78℃で15分間攪拌し、840mg(2.08mmol)のブromo-イソプレニルリンカー(1)を2mlのTHFに溶解させた溶液を滴下した。ドライアイス浴を取り除き、反応液を20分間かけてゆっくりと室温まで加温した。反応混合物に5mlの飽和塩化アンモニウムを添加して反応を停止させた。反応混合物に、100mlの水を添加し、200mlのエチルアセテートで抽出した。有機層を分離し、水性部分をエチルアセテート(3×100ml)で再抽出した。合せた有機部分を100mlのブラインで洗浄し、脱水し(Na₂SO₄)、濃縮した。ヘキサン中の20%エチルアセテートを用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗生成物を精製し、501mg(43%、0.76mmol)の5'-イソプレニル[OTBDPS]-MPAメチルエステル(3)を得た。¹H-NMR: 一致。LR-FAB MS: m/z 656。

【0086】

実施例5A: MPA-イソプレニルアルコール(ラセミ体)(3A)の調製

18mLの新たに蒸留したTHFに180mg(0.27mmol)の(3)を溶解させた溶液に、0℃でテトラブチルアンモニウムフルオリドの1M溶液760μLを添加し、得られた溶液を、0℃で1時間、さらに室温で18時間攪拌した。反応混合物に、12mLの0.5M HCl溶液は添加し、次に、濃縮してできるだけ多くのTHFを除去した。残渣に50mLの水を添加し、これをエチルアセテート(3×125mL)で抽出した。合わせたエチルアセテート層を2×100mLの水を用いて洗浄し、脱水し(無水Na₂SO₄)、濃縮させた。ヘキサン中の80%エチルアセテートを用いてシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製し、85mg(0.20 mmol、74%)の(x)を得た。

【0087】

34mg(0.081mmol)の(x)に470μLの新たに蒸留したTHFおよび470μLのメタノールを添加し、続いて、72mgの水酸化リチウム二水和物を1mLの水に溶解させて添加した。反応混合物を室温で18時間攪拌し、減圧下で濃縮した。これを20mLの水で希釈し、リン酸を用いてpHを6に調整した。水性層を3×20mLのクロロホルムで抽出した。有機層は合わせて、脱水し(Na₂SO₄)、減圧下で濃縮した。エチルアセテート中の40%メタノールを用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製し、10mg(0.024mmol、31%)の(3A)を白色固体として得た。¹H-NMR: 一致。LR-FAB MS: M+Na 427。

【0088】

実施例5B: MPA-イソプレニルアルコール(キラルなRエナンチオマー)(3B)の調製

MPA-オキサゾリジノンイミド(xi)は、ローロフ(Rohloff)ら(ジェイ.シー. ロホルフ(J. C. Rohloff), ジェイ.オー. ガードナー(J.O. Gardner)およびアール.ダブリュー. トウネ(R.W. Towne), テトラヘドロン・レターズ(Tetrahedron Lett.), 1995年, 第36巻, 第43号, p.7803-7806)の方法によりミコフェノール酸(MPA)から作製された。

【0089】

オープン乾燥したケルダール(Kjeldahl)型フラスコにナトリウムヘキサメチルジシラジドの溶液(Aldrich; THF中の1M溶液0.876mL)を仕込み、フラスコおよび内容物を10分間に

10

20

30

40

50

わたり攪拌しながらアルゴン下で-78℃(ドライアイス/アセトン浴)まで冷却させた。冷却を続けながら、無水THF(合計1.5mL)中のMPA-オキサゾリジノン(xi)(200mg、0.417mmol)の溶液をシリンジにより滴下し、10分後、無水ヘキサメチルホスホルアミド(HMPA、0.10mL; 水素化カルシウムから留出)を添加した。20分後、無水THF(1mL)中のプロモ-イソプレニルリンカー(1、202 mg、0.50mmol)の溶液を添加した。-78℃で数分間攪拌した後、3.5時間にわたり反応液を10℃まで加温させた。TLC分析から、出発物質が消費され1種の主要生成物が他の少量と共に生じたことが示された。飽和水性塩化アンモニウムにより反応を停止させ、少量の0.1N HClで酸性化し、エチルアセテート(EtOAc)で2回抽出し、0.1N HCl、水、半飽和水性NaCl、飽和水性NaClで有機層を洗浄し、脱水し(Na_2SO_4)、濾過し、蒸発させ、378mgの固体を得た。30% EtOAc-ヘキサン中にあらかじめ充填したシリカゲル(50g)を用いてカラムクロマトグラフィーにかけ、同一の溶媒で溶出させ、続いて50% EtOAc-ヘキサンを溶出させることにより、この物質を精製した。主要生成物を含有する画分を合わせ、蒸発させて、生成物(xii)(103mg、31%)を得た。この生成物は、文献(Rohloffらおよび上記参照)記載の方法に準拠してR異性体と帰属された。 ^1H -NMRにより、MPAとは関連のない痕跡量の不純物(UV法)を含む所望の生成物であることが示された。RP-HPLC[C18: Vydac 218TP54; キラルカラム: Chiralcel(登録商標) ODTM-RH](ペンシルバニア州エキソンのキラル・テクノロジーズ・インコーポレーテッド(Chiral Technologies Inc., Exton, PA)および日本国のダイセル化学工業株式会社(Daicel Chemical Industries, Japan))により、1種の明確な生成物異性体であることが示された。

10

【0090】

20

他の同様な実験(ただし、HMPAの代わりにジメチルテトラヒドロピリミジノン(DMPU)を用いた)において、先のように仕上げ処理した後の反応混合物を、シリカゲルによるカラムクロマトグラフィー(最初に15% EtOAc-ヘキサン、次に30% EtOAc-ヘキサンで溶出させた)にかけ、次に、分取TLC(20×20cm×0.025cmシリカ厚さ; EtOAc-ヘキサン-MeOH(20-80-2)で溶出させた)にかけ、次に、RP-HPLC[Chiralcel OD-RH、複数処理、イソクラティック80:20アセトニトリル/水(0.1% CF_3COOH)、流量0.5mL]にかけて精製することにより、凍結乾燥後、固体として精製された生成物(xii)を得た。 ^1H -NMR: 一致、先のスペクトルと同一。LR(+)-FAB MS: $\text{M}+\text{Na}$ 824, $\text{M}-\text{H}$ 800, $\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9$ 744。HR(+)-ES MS: 計算値 $\text{M}+\text{Na}$ 824.3589、観測値 824.3600。

【0091】

30

アルゴン下、氷水浴中で冷却された無水THF(3mL)中の(xii)(63mg)の攪拌溶液に、THF(Aldrich; 300 μL の1M溶液; 約4モル当量)中のテトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)の溶液を添加した。2時間後、反応液を室温まで加温し、続いてTLC分析を行ったところ、出発物質の消費はほとんど完全であり4.5時間後では変化しないことがわかった。反応液を減圧下で濃縮し、残渣をEtOAcと0.1N HClとの間で分配させ、0.1N HCl、水、飽和水性NaClで有機物を洗浄し、脱水し(Na_2SO_4)、濾過し、蒸発乾固させた。残渣を分取TLC(20×20cm×0.025cmシリカ厚さ)にかけて CHCl_3 -ヘキサン-MeOH(50-50-5)で溶出させることにより精製し、主要生成物バンドから固体/ガラスとして生成物(xiii)(24mg、55%)を得た。 ^1H -NMR: 一致。

【0092】

40

他の実験において、先に記載の方法と同じように約10mgの(xii)をTHF中のTBAFで処理して同様な方法で仕上げ処理してから分取TLC(1回目のプレーティング: 50% EtOAc-ヘキサンで溶出させた; 2回目のプレーティング: 60% EtOAc-ヘキサンで溶出させた)で2回精製することにより、主要バンドから精製物(xiii)(3mg)を得た。 ^1H -NMR: 一致、先のスペクトルと同一。キラルRP-HPLC(Chiralcel OD-RH): 明瞭な1つの異性体ピーク。LR(+)-FAB MS(マトリックス: 3-NBA+Na): $\text{M}+\text{Na}$ 586, $\text{M}-\text{H}+2\text{Na}$ 608。HR(+)-FAB MS: 計算値 $\text{M}+\text{Na}$ 586.2417、観測値 586.2410。

【0093】

氷水浴中で冷却された無水THF(2mL)中の(xiii)(15mg、0.0266 mmol)の溶液に、過酸化水素(Sigma; 水中の30重量/重量%の溶液16.3 μL 、5.4mgの実際の物質(約6モル当量)と等

50

価)を含有する水(0.24mL)中の水酸化リチウム(4.5mg、約4モル当量)の溶液を添加した。冷却を続けながらアルゴン下で反応液を2時間攪拌し、次に、一晩で室温まで加温した。RP-HPLC分析により、反応の終了が示された。減圧下でTHFを除去し、残渣を、EtOAcと、少量(スパチュラ先端量)の亜硫酸ナトリウムが添加された0.1N HCLと、の間に分配させた。混合物は十分に振盪させ、相を分離させ、有機物を0.1N HCL、水、飽和水性NaClで洗浄し、脱水し(Na_2SO_4)、濾過し、蒸発乾固させた。残渣を分取TLC(20×20cm×0.025cmシリカ厚さ)にかけて10% MeOH- CHCl_3 で溶出させることにより精製し、主要生成物バンドからつぶれた灰白色フォームとして所望の生成物(3B)(8mg、74%)を得た。 $^1\text{H-NMR}$: 一致。LC/MS: M+Na 427.1、M-OH 387.1。

【0094】

10

実施例6: 5'-イソプレニル[OTBDPS]-MPA[OMEM]メチルエステル(4)の調製

240mg(0.36mmol)の(3)を5mlの無水ジクロロメタンに溶解させた溶液を氷浴中で冷却させた。反応混合物に、76 μl (0.433mmol)のN,N-ジイソプロピルエチルアミンを添加し、続いて42 μl (0.36mmol)の2-メトキシエトキシメチルクロリドを添加した。混合物を、氷浴中で1時間さらに室温で18時間攪拌した。混合物を15mlのジクロロメタンで希釈した。有機層を3×20mlの水で洗浄し、脱水し(Na_2SO_4)、濃縮した。エチルアセテート中の60%ヘキサン溶液を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗生成物を精製し、175mg(0.23mmol、64%)の(4)を得た。

【0095】

20

実施例7: 5'-イソプレニル[OH]-MPA[OMEM]メチルエステル(5)の調製

1.09g(1.46mmol)の(4)を40mlのTHFに溶解させた溶液を0℃まで冷却させた。この冷却溶液に、4.37ml(4.35mmol)のテトラブチルアンモニウムフルオリド(THF中の1M溶液)をアルゴン雰囲気中で添加した。反応混合物を0℃で1.5時間および室温で1時間攪拌した。反応混合物に5mlの水を添加して反応を停止させ、濃縮した。反応混合物を75mlのジクロロメタンで希釈し、3×75mlの水で洗浄し、脱水し(Na_2SO_4)、濃縮した。ヘキサン中の80%エチルアセテート溶液を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗生成物を精製し、408mg(0.806mmol、55%)の(5)を得た。 $^1\text{H-NMR}$: 一致。LR-FAB MS: m/z 506。

【0096】

実施例8: L-チロキシン[N-tBoc](6)の調製

4.5g(5.8mmol)のL-チロキシンと、18mlのDMFと、5.85mlの1N NaOHと、495mgの NaHCO_3 と、18mlの水と、の混合物を磁気攪拌した。1.28g(5.8mmol)のジ-t-ブチルジカーボネートを18mlのジメチルホルムアミドに溶解させてこの懸濁液に添加した。得られた反応混合物を4時間攪拌し、次に、減圧下、室温で濃縮した。残渣に45mlのメタノールを添加し、未溶解物質を濾別した。沈殿が完了するまで濾液に1N HCl(20ml)を添加した。固形物を濾過し、風乾し、4.2g(4.78mmol、82%)のL-チロキシン[N-tBoc](6)を得た。

30

【0097】

実施例9: L-チロキシン(N-tBoc)-アミドエチレンアミン(7)の調製

500mg(0.57mmol)のL-チロキシン(N-tBoc)(6)に15mlの無水DMFを添加し、続いて149mg(1.29mmol)のN-ヒドロキシスクシンイミドおよび283mg(1.47mmol)の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミドを添加した。混合物を室温で3時間攪拌した。この活性化エステルをin situで次のステップに使用した。

40

【0098】

5.5mlの無水ピリジンに1.5ml(22mmol)のエチレンジアミンを添加した。混合物を室温で5分間攪拌し、この溶液にin situで調製したチロキシン活性化エステルの作製済み溶液を滴下した。混合物を室温で48時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、100mlの飽和 Na_2CO_3 溶液を添加した。固形物を濾別し、100mlの水で洗浄した。メタノール中の50%クロロホルム溶液を用いてカラムクロマトグラフィーによりこの粗固体を精製し、250mg(0.27mmol、48%)の(7)を得た。

【0099】

実施例10: 5'-[(イソプレニルオキシカルボニルアミノエチレンアミド)-チロキシン(N-tB

50

oc)]-MPA[OMEM]メチルエステルコンジュゲート(8)の調製

25mg(0.049mmol)の(5)に1mlのTHFを添加し、続いて12.6mg(0.046mmol)のN,N'-ジスクシンイミジルカーボネートおよび20μlのトリエチルアミンを添加した。混合物を室温で18時間攪拌して、対応するN-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネートを得た。

【0100】

L-チロキシン-[N-tBoc]-アミドエチレンアミン(7)(22mg、0.023mmol)を1mlの無水DMFに溶解させ、100μlのトリエチルアミンを添加した。この溶液に、先に調製したMPA-N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート溶液(in situで調製した)を滴下した。反応液を室温で30分間攪拌し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。0.1%トリフルオロ酢酸を含有する水/アセトニトリルグラジエント系を用いて分取RP-HPLC [Rainin C-18(ODS)21.4mm×250mm] により残渣を精製した。生成物を含有する画分を合わせ、アセトニトリルを蒸発させ、残存混合物を凍結乾燥させ、24mg(0.016mmol、34%)の(8)を得た。¹H-NMR: 一致。H R-ES(+): MS: 計算値 M+Na 1474.0173、観測値 1474.0176。

10

【0101】実施例11: 5'-[(イソプレニルオキシカルボニルアミノエチレンアミド)-チロキシン(N-tBoc)]-MPA[OMEM]コンジュゲート(9)の調製

22mg(0.015mmol)の5'-[(イソプレニルオキシカルボニルアミノエチレンアミド)-チロキシン(N-tBoc)]-MPA[OMEM]メチルエステル(8)に2mlのメタノールおよび40mg(1.6mmol)の水酸化リチウム(水1ml中の溶液)を添加した。混合物を室温で2日間攪拌し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。反応混合物に2mlの水を添加し、希リン酸を用いてpHを6に調整した。反応液を濃縮乾固し、100mlのメタノールを添加した。混合物を濾過し、濾液を濃縮した。0.1%のトリフルオロ酢酸を含有する水/アセトニトリルグラジエント系を用いて分取RP-HPLC [Rainin C-18(ODS)21.4mm×250mm] により残渣を精製した。生成物を含有する画分を合わせ、アセトニトリルを蒸発させ、残存混合物を凍結乾燥させ、11mg(0.007mmol、52%)の(9)を得た。

20

【0102】実施例12: 5'-[(イソプレニルオキシカルボニルアミノエチレンアミド)-チロキシン]-MPAコンジュゲート(11)の調製

5mg(0.003mmol)の5'-[(イソプレニルオキシカルボニルアミノエチレンアミド)-チロキシン(N-tBoc)]-MPA[OMEM]メチルエステルコンジュゲート(9)に1.5mlのジクロロメタンを添加し、溶液を0℃まで冷却させた。この溶液にジクロロメタン中の50%トリフルオロ酢酸の水冷溶液200μlを5分間隔で2回に分けて添加した。混合物を氷浴中でさらに15分間攪拌した。これを減圧下で濃縮した。0.1%トリフルオロ酢酸を含有する水/アセトニトリルのグラジエント系を用いて分析用RP-HPLC [C-18、Vydac 4.6mm×250mm] により生成物の形成をモニターした。反応液を再びトリフルオロ酢酸処理に供した。粗反応混合物を1.5mlのジクロロメタンに再溶解させ、溶液を0℃まで冷却させた。この溶液にジクロロメタン中の50%トリフルオロ酢酸の水冷溶液200μlを5分間隔で2回に分けて添加した。混合物を0℃で25分攪拌した。反応混合物をロータリーエバポレーターで濃縮し、次いで高真空ポンプで濃縮した。0.1%のトリフルオロ酢酸を含有する水/アセトニトリルのグラジエント系を用いて分析用RP-HPLC [C-18、Vydac 4.6mm×250mm] により生成物の形成をモニターした。その結果から、反応液が主にMEM-脱保護5'-[(イソプレニルオキシカルボニルアミノエチレンアミド)-チロキシン(N-tBoc)]-MPA(10)といくらかの所望の生成物(11)とを含むコンジュゲート混合物であることが示された。

30

40

【0103】

上記の生成物を再びトリフルオロ酢酸処理に供した。上記の反応混合物を2mlのジクロロメタンで処理し、氷浴中で冷却させた。混合物に、ジクロロメタン中の50%トリフルオロ酢酸の水冷溶液600μlを5分間隔で3回に分けて添加した。混合物を氷浴中でさらに25分間攪拌した。混合物を減圧下で濃縮した。0.1%のトリフルオロ酢酸を含有する水/アセトニトリルのグラジエント系を用いて半分取RP-HPLC [C-18、Vydac 10mm×250mm] により粗生成物を精製した(3ml/分)。生成物を含有する画分を合わせ、アセトニトリルを蒸発させ、

50

残存混合物を凍結乾燥させ、1.8mg(0.0013mmol、45%)の(11)を得た。¹H-NMR: 一致。LC/M S: M+Na 1271.8。

【0104】

実施例13: MPA t-ブチルエステル(12)の調製

700μlの濃H₂SO₄を含有する1,4-ジオキサンの溶液にミコフェノール酸(860mg、2.68mmol)を溶解させた。溶液を加圧ボトルに移し、これを氷で冷却させた。イソブチレン(20ml)をミコフェノール酸溶液に注いだ。加圧ボトルに蓋をして、室温で2日間にわたり非常にゆっくり磁気攪拌した。混合物をドライアイス/アセトン下で冷却させ、圧力を徐々に開放した。混合物を室温まで加温し、150mlのエチルアセテートで希釈した。水性部分を分離し、3×100mlのエチルアセテートで抽出した。合せた有機層を100mlの水、100mlの飽和NaHCO₃、続いて100mlの水で洗浄し、脱水し(Na₂SO₄)、濃縮した。エチルアセテート中の80%ヘキサン溶液を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗生成物を精製し、590mg(1.63mmol、60%)のMPA t-ブチルエステル(12)を得た。

10

【0105】

実施例14: 5'-エトキシカルボニルメチル-MPA t-ブチルエステル(13)の調製

3.2ml(3.19mmol)のナトリウムビス(トリエチルシリル)アミドの溶液(THF中の1.0M溶液)をアルゴン雰囲気下でドライアイス/アセトン浴により-78℃まで冷却させた。この冷却溶液に0.32ml(2.64mmol)のDMPUを添加し、-78℃で15分間攪拌した。新たに蒸留した5mlのTHF中に398mg(1.10mmol)のMPA t-ブチルエステル(12)を溶解させた溶液を、この反応混合物に滴下した。反応混合物を-78℃で30分間攪拌し、0.18ml(1.61mmol)のエチルプロモアセテートを添加した。得られた混合物を-40℃で3時間および0℃で1時間攪拌した。反応液に10mlの飽和塩化アンモニウムを添加して反応を停止させ、混合物を室温まで加温した。さらに80mlの飽和塩化アンモニウムを添加し、水部分をエチルアセテートで抽出した(3×80ml)。有機層を合わせ、脱水し(Na₂SO₄)、濃縮した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけて最初にエチルアセテート中の80%ヘキサン溶液で、次いでヘキサン中の50%エチルアセテート溶液で溶出させることにより精製し、不純物を含有する生成物330mgを得た。0.1%のトリフルオロ酢酸を含有する水/アセトニトリルのグラジエント系を用いて分取RP-HPLC [Rainin C-18(ODS) 21.4mm×250mm]により、これを再精製した。生成物を含有する画分を合わせ、アセトニトリルを蒸発させ、残存混合物を凍結乾燥させ、163mg(0.35mmol、32%)の(13)を得た。¹H-NMR: 一致。HR-FAB MS: M+Naに対する計算値 485.2151、観測値 485.2140。

20

30

【0106】

実施例15: 5'-カルボキシメチル-MPA t-ブチルエステル(14)の調製

41.1mlのDMSOに141mg(0.30mmol)の(13)を溶解させた溶液を調製した。これを81mlの0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で希釈し、306μlのエステラーゼ(ブタ肝臓由来、Roche Diagnostics, 10mg/mlの懸濁液)を添加した。反応混合物を室温で3日間攪拌し、濾過した。分取RP-HPLC [WATERS DELTAPAK C-18 50×250mm、0.1%のトリフルオロ酢酸を含有する水/アセトニトリル系]を用いて濾液を精製した。生成物を含有する画分を合わせ、アセトニトリルを蒸発させ、混合物を凍結乾燥させ、76mg(0.17mmol、57%)の5'-カルボキシメチル-MPA t-ブチルエステル(14)を得た。

40

【0107】

実施例16: 5'-(ジゴキシゲニン-3-イル-β-アミドメチル)-MPA t-ブチルエステルコンジュゲート(15)の調製

5'-カルボキシメチル-MPA t-ブチルエステル(20mg、46μmol)を193μlのDMFに溶解させた。この反応混合物に7.95mg(69μmol)のN-ヒドロキシスクシンイミドおよび11.4mg(55.2μmol)のDCCを添加した。反応混合物を室温で3時間攪拌した。さらに2.65mg(23μmol)のN-ヒドロキシスクシンイミドおよび2.85mg(13.8μmol)のDCCを55μlのDMFに溶解させて添加し、反応混合物を室温で1時間攪拌した。23.2mg(46μmol)の3-β-アミノ-ジゴキシゲニンを63.8μl(460μmol)のトリエチルアミンおよび120μlのDMFに溶解させた溶液を添加した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、蒸発させ、68mgの粗生成物(15)を得た。さらなる

50

精製を行うことなくこれを次のステップで使用した。

【0108】

実施例17: 5'-(ジゴキシゲニン-3-イル-β-アミドメチル)-MPAコンジュゲート(16)の調製
5'-(ジゴキシゲニン-3-イル-β-アミドメチル)-MPA t-ブチルエステル(15)の粗生成物を3mlのジクロロメタンに溶解させた。反応混合物に3mlのトリフルオロ酢酸を添加し、溶液を室温で正確に30分間攪拌した。次にこの溶液を蒸発させ、直ちに以下のように残渣を精製した。

【0109】

残渣を1.5mlのメタノールに溶解させ、直ちに半分取RP-HPLC [Vydac C-18 300 Å 10 μm 22×250mm、0.1%のトリフルオロ酢酸を含有する水/アセトニトリル系] を用いて精製し、7.3mgの異性体A(16A)および7.4mgの異性体B(16B)を得た。

【表4】

表4: 異性体の特性

	異性体 A	異性体 B
RP-HPLC (Vydac C-18 5 μm 300 Å 4.6 x 250 mm; グラジエント: 0~100%アセトニトリル + 0.1% TFA 50 分間)	93%(UV 226 nm) Rt = 25.09 分	87% (UV 226 nm) Rt = 25.34 分
MS	ok	ok
¹ H-NMR	一致	一致

20

【0110】

実施例18: チロキシニンアッセイ用の抗体試薬の調製

1リットルの抗体試薬(すなわち第1の試薬)を次のように調製した。約800mlの脱イオン水を容器に入れ、6.0gのN-[2-アセトアミド]-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)を添加して溶解させた。2N NaOHでpHを6.0に調整した。次に、0.663gのNADを添加して完全に溶解させた。その後、0.95gのアジ化ナトリウムを添加して溶解させ、最後に1.0gのSUTTOCIDE Aを添加して溶解させた。脱イオン水で体積を1リットルに調整した。最後に、10mgの抗L-チロキシニンモノクローナル抗体を添加した。

【表5】

表5: 抗体試薬の組成

抗体試薬					
pH 6.0					150 μl
成分	分子量	M	g/l	機能	最終 M
ACES	182.2	0.0330	6.0	緩衝剤, NAD 安定化剤	0.0163
NAD	663.4	0.001	0.6634	酵素基質	0.0005
抗L-チロキシニン	150,000	-	0.010	モノクローナル抗体	-
アジ化ナトリウム	65.0	0.0146	0.95	抗微生物保存剤	0.0072
SUTTOCIDE A (50%)	127.1	0.004	1.0	抗微生物保存剤	0.004

40

【0111】

使用した抗体は、本発明が属する技術分野の当業者が容易に利用可能な公知の手順に従って調製した。チロキシニンに対する特異性を有する任意の抗体(モノクローナルまたはポリクローナルのいずれか)を本発明の実施の際に使用することが可能である。しかしながら、容易にかつ一貫性をもたせて産生できるという理由で、一般的には、モノクローナル

50

抗体が好ましい。

【0112】

実施例19: チロキシニアッセイ用の酵素試薬の調製

1リットルの酵素試薬(すなわち第2の試薬)を次のように調製した。約800mlの脱イオン水を容器に入れ、168.8gのNaTAPSOを添加して完全に溶解させた。次に、1.15gのTCEPを溶解させた。次に31.4gのIMPを溶解させ、その後、2.23gのNa₂EDTAを溶解させた。次に、1.0gのSUTTOCID Aを溶解させた。脱イオン水で体積を1リットルに調整した。十分な組換えヒトIMPDH-II(大腸菌(E. coli)溶解物上清の35%硫酸アンモニウム沈殿物として)を添加して完全に溶解させ、37°Cで5分間にわたる340nmにおける吸光度変化が 780×10^{-4} になるようにした。次に、0.0005gのリガンド-阻害剤5'-[(イソプレニルオキシカルボニルアミノ-エチレンアミド)-チロキシ]-MPAコンジュゲート(11)を添加して溶解させた。

【表6】

表6: 酵素試薬の組成

酵素試薬					
pH 8.0					150 μ l
成分	分子量	M	g/l	機能	最終 M
Na TAPSO	281.3	0.6	168.8	緩衝剤、酵素安定化剤(酵素の凝集を減少させる)	0.3
TCEP	286.65	0.004	1.15	酵素安定化剤(システインスルフィドリル基を還元する)	0.002
Na ₂ IMP	392.2	0.08	31.4	酵素质質、酵素安定化剤	0.04
Na ₂ EDTA	372.2	0.006	2.23	酵素安定化剤(重金属をキレート化して還元型システインスルフィドリルを保持する)	0.003
SUTTOCID A (50%)	127.1	0.004	1.0	抗微生物保存剤	0.004
IMPDH-II	-	-	-	酵素	-
5'-[(イソプレニルオキシカルボニルアミノエチレンアミド)-チロキシ]-MPA	1363.44	3.7×10^{-7}	0.0005	リガンド-阻害剤	1.8×10^{-7}

【0113】

実施例20: チロキシンの測定

L-チロキシンを添加した生理食塩水サンプルに対して本発明の方法によりチロキシニアッセイを行った。生理食塩水中にL-チロキシ(Sigma Chemical)を懸濁させ、1N NaOHの滴下により溶解させ、その後、最終濃度が100、250、500、および1000ng/mlになるように生理食塩水で希釈することにより、サンプルを調製した。

【0114】

37°Cのキュベットに3 μ lのサンプルおよび150 μ lの抗体試薬を注入し、次に、これを混合して5分間インキュベートし、その後、150 μ lの酵素試薬を添加して混合するように、H ITACHI 917アナライザー(Roche Diagnostics Corp., Indianapolis)をプログラムした。酵素試薬添加の3分13秒後~4分42秒後(読取りウィンドウ29-34)の340nmにおける変化(mA/分)を計算した。得られた結果を図2に示す。

【0115】

実施例21: ジゴキシゲニンアッセイ用の抗体試薬の調製

1リットルの抗体試薬(すなわち第1の試薬)を次のように調製した。約800mlの脱イオン水を容器に入れ、6.0gのACESを添加して溶解させた。2N NaOHでpHを6.0に調整した。次に、0.53gのNADを添加して完全に溶解させた。その後、0.95gのアジ化ナトリウムを添加して溶解させ、最後に、1.0gのSUTTOCID Aを添加して溶解させた。脱イオン水で体積を1リットルに調整した。最後に、25mgの抗ジゴキシゲニンモノクローナル抗体を添加した。

【表 7】

表7: 抗体試薬の組成

抗体試薬					
pH 6.0					150 μ l
成分	分子量	M	g/l	機能	最終 M
ACES	182.2	0.0330	6.0	緩衝剤, NAD 安定化剤	0.0163
NAD	663.4	0.0008	0.53	酵素基質	0.0004
抗ジゴキシゲニン	150,000		0.025	モノクローナル抗体	
アジ化ナトリウム	65.0	0.0146	0.95	抗微生物保存剤	0.0072
SUTTOCID A (50%)	127.1	0.004	1.0	抗微生物保存剤	0.004

10

20

【0116】

使用した抗体は、市販品(Roche Cat. No. 1333062)である。しかしながら、ジゴキシゲニンに対する特異性を有する任意の抗体(モノクローナルまたはポリクローナルのいずれか)を本発明の実施の際に使用することが可能である。とはいえ、容易にかつ一貫性をもたせて産生できるという理由で、一般的には、モノクローナル抗体が好ましい。

【0117】

実施例22: ジゴキシゲニンアッセイ用の酵素試薬の調製

1リットルの酵素試薬(すなわち第2の試薬)を次のように調製した。約800mlの脱イオン水を容器に入れ、56.3gのNaTAPSOを添加して完全に溶解させた。次に、81.6gの酢酸Na・3H₂Oを添加して溶解させた。次に、1.15gのTCEPを溶解させた。次に、0.319gのIMPを溶解させ、その後、2.23gのNa₂EDTAを溶解させた。次に、1.0gのSUTTOCID Aを溶解させた。脱イオン水で体積を1リットルに調整した。十分な組換えヒトIMPDH-II(大腸菌(E. coli)溶解物上清の35%硫酸アンモニウム沈殿物として)を添加して完全に溶解させ、37°Cで5分間にわたる340nmにおける吸光度変化が 1280×10^{-4} になるようにした。次に、0.001gのリガンド-阻害剤4'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPAまたは5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPAを添加して溶解させた。

30

【表 8】

表8: 酵素試薬の組成

酵素試薬					
pH 8.0					150 μ l
成分	分子量	M	g/l	機能	最終 M
Na TAPSO	281.3	0.2	56.3	緩衝剤	0.1
酢酸 Na $\cdot$ 3H ₂ O	136.1	0.6	81.6	酵素安定化剤(酵素の凝集を減少させる)	0.3
TCEP	286.65	0.004	1.15	酵素安定化剤(システインスルフヒドリル基を還元する)	0.002
Na ₂ IMP	392.2	0.0008	0.319	酵素基質	0.0004
Na ₂ EDTA	372.2	0.006	2.23	酵素安定化剤(重金属をキレート化して還元型システインスルフヒドリルを保持する)	0.003
SUTTOCID A (50%)	127.1	0.004	1.0	抗微生物保存剤	0.004
IMPDH-II	-	-	-	酵素	-
4'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPA	939.12	1.07×10^{-6}	0.001	リガンド-阻害剤	5.3×10^{-7}
5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPA	939.12	1.07×10^{-6}	0.001	リガンド-阻害剤	5.3×10^{-7}

10

20

30

【0118】

実施例 23: ジゴキシゲニンの測定

ジゴキシゲニンを添加した生理食塩水サンプルに対して本発明の方法によりジゴキシゲニンアッセイを行った。最初に、ジゴキシゲニン(Sigma Chemical)を100% DMSO中に溶解させ、その後、0.5、1.0、5.0、および10.0 μ g/mlの濃度になるように正常ヒト血漿に添加した。37°Cのキュベットに20 μ lのサンプルおよび150 μ lの抗体試薬を注入し、次に、これを混合して5分間インキュベートし、その後、150 μ lの酵素試薬を添加して混合するように、HITACHI 717アナライザー(Roche Diagnostics Corp., Indianapolis)をプログラムした。最初の酵素試薬添加時から酵素試薬添加の5分後までの340nmにおける吸光度差を計算した。得られた結果を図3に示す。

40

【0119】

この実施例から、4'または5'位で調製されたコンジュゲートはいずれも本発明に使用可能であることが示される。

【0120】

実施例 24: ジゴキシゲニンアッセイ用の抗体試薬の調製

50

1リットルの抗体試薬(すなわち第1の試薬)を次のように調製した。約800mlの脱イオン水を容器に入れ、6.0gのACESを添加して溶解させた。2N NaOHでpHを6.0に調整した。次に、0.663gのNADを添加して完全に溶解させた。その後、0.95gのアジ化ナトリウムを添加して溶解させ、最後に、1.0gのSUTTOCID Aを添加して溶解させた。脱イオン水で体積を1リットルに調整した。最後に、10または15mgの抗ジゴキシゲニンモノクローナル抗体を添加した。

【表 9】

表9: 抗体試薬の組成

抗体試薬					
pH 6.0					150 μ l
成分	分子量	M	g/l	機能	最終 M
ACES	182.2	0.0330	6.0	緩衝剤, NAD 安定化剤	0.0163
NAD	663.4	0.001	0.6634	酵素基質	0.0005
抗ジゴキシゲニン	150,000	-	0.010	モノクローナル抗体	-
			または		
			0.015		
アジ化ナトリウム	65.0	0.0146	0.95	抗微生物保存剤	0.0072
SUTTOCID A (50%)	127.1	0.004	1.0	抗微生物保存剤	0.004

10

20

【0121】

ジゴキシゲニン異性体Bについては、より少量のモノクローナル抗体を使用した。なぜなら、この阻害剤についてはより少量のモノクローナル抗体でより良好なアッセイ感度が観測されたからである。これは、この阻害剤とIMPDHとの結合と、この阻害剤とモノクローナル抗体との結合と、の競合の改良に基づくものであろう。これはIMPDHおよびモノクローナル抗体に対する阻害剤の親和性が増加したことが原因であると考えられる。

【0122】

実施例25: ジゴキシゲニンアッセイ用の酵素試薬の調製

1リットルの酵素試薬(すなわち第2の試薬)を次のように調製した。約800mlの脱イオン水を容器に入れ、168.8gのNaTAPS0を添加して完全に溶解させた。次に、1.15gのTCEPを溶解させた。次に、31.4gのIMPを溶解させ、その後、2.23gのNa₂EDTAを溶解させた。次に、1.0gのSUTTOCID Aを溶解させた。脱イオン水で体積を1リットルに調整した。十分な組換えヒトIMPDH-II(大腸菌(E. coli)溶解物上清の35%硫酸アンモニウム沈殿物として)を添加して完全に溶解させ、37°Cで5分間にわたる340nmにおける吸光度変化が 3300×10^{-4} になるようにした。次に、0.0002gのリガンド-阻害剤(5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)- β -アミドメチル]-MPA(異性体A)もしくは5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)- β -アミドメチル]-MPA(異性体B))を添加して溶解させた。またはその代わりに、0.0005gのリガンド-阻害剤(5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPA(ラセミ体))を添加して溶解させた。

30

40

【表 10】

表10: 酵素試薬の組成

酵素試薬					150 μ l	
pH 8.0					最終 M	
成分	分子量	M	g/l	機能		
NaTAPSO	281.3	0.2	168.8	緩衝剤、酵素安定化剤(酵素の凝集を減少させる)	0.3	
TCEP	286.65	0.004	1.15	酵素安定化剤(システインスルフヒドリル基を還元する)	0.002	10
Na ₂ IMP	392.2	0.08	31.4	酵素基質、酵素安定化剤	0.04	
Na ₂ EDTA	372.2	0.006	2.23	酵素安定化剤(重金属をキレート化して還元型システインスルフヒドリルを保持する)	0.003	
SUTTOCID A (50%)	127.1	0.004	1.0	抗微生物保存剤	0.004	
IMPDH-II	-	-	-	酵素	-	
5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)- β -アミドメチル]-MPA(異性体 A)	749.91	2.7×10^{-7}	0.0002	リガンド-阻害剤	1.3×10^{-7}	20
5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)- β -アミドメチル]-MPA(異性体 B)	749.91	2.7×10^{-7}	0.0002	リガンド-阻害剤	1.3×10^{-7}	
5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DADOO-カルボニルメチル]-MPA(ラセミ体)	939.12	5.3×10^{-7}	0.0005	リガンド-阻害剤	2.7×10^{-7}	30

【0123】

実施例26: ジゴキシゲニンの測定

ジゴキシゲニンを添加した生理食塩水サンプルに対して本発明の方法によりジゴキシゲニンアッセイを行った。最初に、ジゴキシゲニン(Sigma Chemical)を100% DMSO中に溶解させ、その後、0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、および100 μ g/mlの濃度になるように生理食塩水に添加した。37°Cのキュベットに3 μ lのサンプルおよび150 μ lの抗体試薬を注入し、次に、これを混合して5分間インキュベートし、その後、150 μ lの酵素試薬を添加して混合するように、HITACHI 917アナライザー(Roche Diagnostics Corp., Indianapolis)をプログラムした。最初の酵素試薬添加時から酵素試薬添加の4分42秒後までの340nmにおける吸光度差を計算した。得られた結果を図4に示す。この実施例は、リガンド-阻害剤コンジュゲートにおける異なる長さのリンカーの使用を示すものである。

【0124】

実施例27: テオフィリンアッセイ用の第1の試薬の調製

50

1リットルの第1の試薬を次のように調製した。約800mlの脱イオン水を容器に入れ、6.0gのACESを添加して溶解させた。2N NaOHでpHを6.0に調整した。次に、0.66gのNADを添加して完全に溶解させた。その後、0.95gのアジ化ナトリウムを添加して溶解させ、最後に、1.0gのSUTTOCIDE Aを添加して溶解させた。脱イオン水で体積を1リットルに調整した。

【表 1 1】

表11: 第1の試薬の組成

第1の試薬					
pH 6.0					150 μ l
成分	分子量	M	g/l	機能	最終 M
ACES	182.2	0.0330	6.0	緩衝剤, NAD 安定化剤	0.0163
NAD	663.4	0.0010	0.66	酵素基質	0.0005
アジ化ナトリウム	65.0	0.0146	0.95	抗微生物保存剤	0.0072
SUTTOCIDE A (50%)	127.1	0.004	1.0	抗微生物保存剤	0.004

10

【0 1 2 5】

実施例28: テオフィリンアッセイ用の第2の試薬の調製

20

1リットルの第2の試薬を次のように調製した。約800mlの脱イオン水を容器に入れ、168.8gのNaTAPSOを添加して完全に溶解させた。次に、1.15gのTCEPを溶解させた。次に、31.4gのIMPを溶解させ、その後、2.23gのNa₂EDTAを溶解させた。次に、1.0gのSUTTOCIDE Aを溶解させた。脱イオン水で体積を1リットルに調整した。十分な組換えヒトIMPDH-II(大腸菌(E. coli)溶解物上清の35%硫酸アンモニウム沈殿物として)を添加して完全に溶解させ、37°Cで5分間にわたる340nmにおける吸光度変化が 3100×10^{-4} になるようにした。次に、0.00027gのリガンド-阻害剤5'-[(テオフィリン-8-ブチルアミドエチルアミノカルボニルオキシ)イソプレニル]-MPA(20)を添加して溶解させた。最後に、10mgまたは25mgの抗テオフィリンモノクローナル抗体を添加した。

【表 1 2】

表12: 第2の試薬の組成

第 2 の試薬					
pH 8.0					
成分	分子量	M	g/l	機能	150 μ l 最終 M
Na TAPSO	281.3	0.6	168.8	緩衝剤、酵素安定化剤(酵素の凝集を減少させる)	0.3
TCEP	286.65	0.004	1.15	酵素安定化剤(システインスルフィドリル基を還元する)	0.002
Na ₂ IMP	392.2	0.08	31.4	酵素基質、酵素安定化剤	31.4
Na ₂ EDTA	372.2	0.006	2.23	酵素安定化剤(重金属をキレート化して還元型システインスルフィドリルを保持する)	0.003
SUTTOCID A (50%)	127.1	0.004	1.0	抗微生物保存剤	0.004
IMPDH-II	—	—	—	酵素	—
抗テオフィリン	150,000	—	0.010	モノクローナル抗体	—
			—		
			0.025		
5'-[(テオフィリン-8-ブチルアミドエチルアミノカルボニルオキシ)イソプレニル]-MPA	738.78	3.6x10 ⁻⁷	2.7x10 ⁻⁴	リガンド-阻害剤	1.8x10 ⁻⁷

10

20

【0 1 2 6】

使用した抗体は、本発明が属する技術分野の当業者が容易に利用可能な公知の手順に従って調製した。テオフィリンに対する特異性を有する任意の抗体(モノクローナルまたはポリクローナルのいずれか)を本発明の実施の際に使用することが可能である。しかしながら、容易にかつ一貫性をもたせて産生できるという理由で、一般的には、モノクローナル抗体が好ましい。

【0 1 2 7】

実施例 29: テオフィリンの測定

テオフィリンを添加した生理食塩水サンプルを本発明の方法によりアッセイした。最初に、テオフィリン(Sigma Chemical)を生理食塩水に溶解させ(1mg/10ml)、その後、0、5、10、20、40、および50 μ g/mlの濃度になるように希釈した。37°Cのキュベットに3 μ lのサンプルおよび150 μ lの第1の試薬を注入し、次に、これを混合して5分間インキュベートし、その後、150 μ lの第2の試薬を添加して混合するように、HITACHI 717アナライザー(Roche Diagnostics Corp., Indianapolis)をプログラムした。第2の試薬の最初の添加時から第2の試薬の添加の5分後までの340nmにおける吸光度差を計算した。得られた結果を図5に示す。

【0 1 2 8】

この実施例では、阻害剤と抗体を同一の試薬中に配合した。この実施例で使用した特定のテオフィリン抗体は、薬物に対する親和性と比較して、阻害剤に対して比較的低い親和性を有していたので、あらかじめ阻害剤-抗体コンジュゲートを形成すべく、サンプルの添加前、最初に抗体と阻害剤を結合させた。その後、薬物を含有するサンプルを添加すると、薬物に対する抗体の親和性のほうが高いため、薬物は阻害剤と置き代わり、それによ

50

り阻害剤を遊離して酵素を阻害する。

【0129】

実施例30: リガンド-阻害剤の阻害定数

IC₅₀(阻害定数)とは、酵素活性の50%阻害を引き起こす阻害剤のモル濃度である。この実施例を用いて、種々のMPA誘導体による酵素阻害の能力を例示する。

【0130】

このアッセイでは、IMPDH IIによるIMPからXMPへの変換時のNADHの生成を測定する。分光光度計を使用して、40℃で10分間にわたり反応を340nmでモニターする。この実施例で使用する手順は、ネルソン, ピー.エイチ.(Nelson, P.H.)ら著、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(J. Med. Chem.), 1996年, 第39巻, p.4181-4196に記載のものである。阻害剤は、100% DMSOで希釈した。 10

【0131】

125mM Tris HCl, pH8.0、125mM KCl、3.75mM EDTA、125g/ml BSA、0.0625mM IMP、および0.125mM NADを含有する反応緩衝液100mlを調製した。100mM Tris HCl, pH8.0、100mM KCl、3.0mM EDTA、および100g/ml BSAを含有する酵素希釈液100mlを調製した。

【0132】

IMPDH II酵素を酵素希釈液で0.0065U/mlに希釈した。反応キュベット中の酵素の最終濃度は、0.00065U/mlであった。1mg/mlになるようにサンプル(誘導体)をDMSO中に溶解させた。100% DMSOでサンプルをさらに希釈した。希釈液はすべて、あらかじめ調製しておいた1mM原液から新たに調製したものである。 20

【0133】

アッセイ方式は次の通りである。分光光度計中の6つのキュベットに800μlの反応緩衝液を添加した。試験対象のコンジュゲート/MPA誘導体ごとに、100μlのDMSOのみ(対照)または所定のサンプル濃度液を添加した。反応緩衝液およびサンプルの入ったキュベットを反転させることにより混合した。反応緩衝液およびサンプルの入ったキュベットを40℃で5分間インキュベートした。100μlの酵素溶液の添加により反応を開始させた。キュベットを再び反転させることにより混合した。340nmで反応をモニターし、データを10分間取得した。この結果を用いてサンプルのIC₅₀を決定した。

【0134】

実施例5Aに記載されている当業者に知られた方法に従って、化合物(3)のエステル基の水酸化リチウム加水分解およびTBDPS基の脱保護を行うことにより、MPA-イソプレニル(ラセミ体)(3A)を調製した。実施例5Bに記載されている当業者に知られた方法を用いて、(2)の[(S)-4-ベンジル-2-オキサゾリジノン-1-イル]イミド類似体[Rohloffら、Tetrahedron Lett., 36, 7803-7806(1995)]の5'位を(3)の合成に対して記載したのと同じようにしてアルキルプロミド(1)によりアルキル化し、続いて、TBDPS基の脱保護およびオキサゾリジニル基の加水分解を行うことにより、キラルなMPA-イソプレニルアルコール(3B)(R異性体)を作製した。 30

【表 13】

表13: 阻害定数

MPA 誘導体	IC ₅₀
MPA	2.6 x 10 ⁻⁸ M
MPA-MPA	3.2 x 10 ⁻⁸ M
MPA-イソプレニルアルコール (キラル, R エナンチオマー) (3B)	1.3 x 10 ⁻⁸ M
MPA-イソプレニルアルコール (ラセミ体) (3A)	4.8 x 10 ⁻⁸ M
5'-(ジゴキシゲニン-3-イル-β-アミドメチル)-MPA (異性体 B, キラル, おそらく R エナンチオマー) (16B)	6.8 x 10 ⁻⁸ M
5'-(ジゴキシゲニン-3-イル-β-アミドメチル)-MPA (異性体 A, キラル, おそらく S エナンチオマー) (16A)	1.7 x 10 ⁻⁷ M
5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチル-カルボニル-DADOO-カルボニルメチル]-MPA (ラセミ体) (26)	1.7 x 10 ⁻⁷ M
5'-[(イソプレニルオキシカルボニルアミノ-エチレンアミド)-チロキシン]-MPA (11)	8.3 x 10 ⁻⁸ M*
5'-[(テオフィリン-8-ブチルアミドエチル-アミノカルボニル-オキシ)イソプレニル]-MPA (20)	2.5 x 10 ⁻⁷ M*
5'-[(フェニトイン-3-ブチルアミド)-イソプレニル]-MPA コンジュゲート (Y)	8.8 x 10 ⁻⁸ M
5'-[(ゲンタマイシン [C1a]-N ¹ -カルボニル-オキシ)-イソプレニル]-MPA コンジュゲート (R)	6.6 x 10 ⁻⁷ M
5'-[(ゲンタマイシン[C1a]-N ¹ -テレフタロイル)-アミノ-イソプレニル]-MPA コンジュゲート (アミド結合) (U)	2.7 x 10 ⁻⁷ M

10

20

【0135】

この表は、数種のMPA誘導体で得られたIC₅₀データを示している。IC₅₀データとは、酵素活性を50%低下させるMPA-阻害剤のモル濃度である。アッセイ混合物中のMPA-阻害剤のモル濃度をx軸にとり、活性比(fractional activity)(MPA-阻害剤をまったく用いないときの酵素反応速度に対するMPA-阻害剤を用いたときの酵素反応速度の比率)をy軸にとって得られたプロットに、非線形曲線あてはめを行うことにより、IC₅₀値を決定する。Sigma-Plot 4.0ソフトウェアを用いて、次の回帰式、すなわち、双曲線型減衰の2パラメーター式 $y = ab/(b+x)$ 〔式中、y=活性比、x=阻害剤のモル濃度、a=1、およびb=IC₅₀〕による非線形曲線あてはめを行った。

30

【0136】

IC₅₀の結果は、IMPDHのMPA誘導体阻害剤の5'位のキラリティーの重要性を示しており、本発明者らの見いだしたより効力の高いエナンチオマーの空間幾何学的形状は、スミス、ディー・ビー.(Smith, D.B.)ら著、ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー(Journal of Organic Chemistry), 1996年, 第61巻, p.2236-2241と一致する。

40

【0137】

MPA親構造に結合した薬物(MPA)を有するMPA-MPA誘導体をプロトタイプ阻害剤として使用した。プロトタイプ薬物-阻害剤としてのMPA-MPAは、MPAのイムノアッセイに有効であることが実証されたので、この阻害剤のIC₅₀値の大きさは、MPAのイムノアッセイだけでなく新しい薬物のイムノアッセイにおいても成功の予測指標となりうる。比較的小さいIC₅₀値を有する薬物阻害剤は、IMPDH活性のより強力な阻害剤となりうるので、記載のイムノアッセイに有用であろう。たとえば、MPA-チロキシンイソプレニルは、MPA-テオフィリンよりも小さいIC₅₀値を有し大きいイムノアッセイ感度を示した。また、MPA誘導体のSエナンチオマーがより効力が高いと報告している既報(ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー(J. of Org. Chem.), 1996年, 第61巻, p.2236-2241)と一致して、キラル誘導体は、IMPDHのより強力な阻害剤である。

50

【0138】

* これらの誘導体の IC_{50} 値は、わずかに異なる方法を用いて決定した。これらの誘導体の場合、第2の試薬に抗体を添加せずかつ生理食塩水のみをサンプルとして使用するように変更を加えて、チロキシニンについては実施例20、テオフィリンについては実施例29の記載に従って、阻害剤を用いたときと用いないときの酵素反応速度を決定した。それぞれが異なる濃度の阻害剤を含有する多数の第2の試薬をHITACHI 917によりアッセイした。第1の試薬は、実施例20および29に記載したとおりであり、変更は加えていない。これらの異なる濃度の阻害剤を用いて得られた反応速度比を阻害剤のモル濃度に対してプロットし、記載したように IC_{50} を計算した。

【0139】

実施例31: (ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00(24)の合成

1.3mlのトリエチルアミンおよび15mlのジオキサンに1.35g(9.2mmol)のジアミノ-ジオキサ-オクタンを溶解させ、室温で攪拌した。500mg(0.92mmol)のジゴキシゲニン-3-cme-NHSを10mlのジオキサンに溶解させた溶液を滴下ロートにより15分以内でこの混合物に添加した。室温で1時間攪拌した後、溶媒を蒸発させ、粗生成物を10mlのメタノールに溶解させ、分取RP-HPLC(Waters Delta Pak C-18 50×250 mm、水/アセトニトリル/0.1% TFA)で精製した。純粋画分をプールして凍結乾燥させ、520mgの油状生成物を得た。

【0140】

実施例32: [(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPA(28)の合成

820 μ lのTHFに41mg(0.1084mmol)のジカルボキシMPA(27、実施例43)を溶解させた溶液に、8.77 μ l(0.1084mmol)のピリジンおよび15.3 μ lのトリフルオロ酢酸無水物を添加し、混合物を3時間攪拌した。69.3mg(0.1084mmol)の(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00を820 μ lのピリジンに溶解させて添加し、混合物を室温で16時間攪拌した。反応混合物を1mlの酢酸で希釈し、分取RP-HPLC(Waters Delta Pak C-18 50×250 mm、水/アセトニトリル/0.1%TFA)を用いて精製した。生成物を含有する画分をプールして凍結乾燥させ、66mgを得た。 1H -NMRおよびMSにより生成物の特性決定を行った。

【0141】

実施例33: 5'-[(テオフィリン-8-ブチルアミドエチルアミノカルボニルオキシ)-イソプレニル]-MPA[OMEM]メチルエステルコンジュゲート(18)の調製

テオフィリンアミン(17)は、国際公開第87/07955号(1987年)パンフレットに発表された手順に従って調製した。

【0142】

23mg(0.045mmol)の5'-イソプレニル[OH]-MPA[OMEM]メチルエステル(5)に1.5mlのTHFを添加し、その後、20mg(0.078mmol)のN,N'-ジスクシンイミジルカーボネートおよび20 μ lのトリエチルアミンを添加した。混合物を室温で18時間攪拌し、対応するN-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネートを得た。

【0143】

14mg(0.045mmol)のテオフィリンアミン(17)を1mlの無水DMFに溶解させ、100 μ lのトリエチルアミンを添加した。この溶液に、先に調製したMPA-N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート溶液(in situ生成)を滴下した。反応混合物をアルゴン下で3時間攪拌し、減圧下で濃縮した。0.1%トリフルオロ酢酸を含有する水/アセトニトリルグラジエント系を用いて分取RP-HPLC(Rainin C-18(ODS) 21.4mm×250mm)により残渣を精製した。生成物を含有する画分を合わせてアセトニトリルを蒸発させ、残存混合物を凍結乾燥させ、10mg(0.011mmol、26%)の(18)を得た。 1H -NMR: 一致。LC/MS: M+H 841.3。

【0144】

実施例34: 5'-[(テオフィリン-8-ブチルアミドエチルアミノカルボニルオキシ)イソプレニル]-MPA[OMEM]コンジュゲート(19)の調製

アルゴン下で攪拌しながら、2.4mlのメタノールに11.7mg(0.014mmol)の5'-[(テオフィリン-8-ブチルアミドエチルアミノカルボニルオキシ)イソプレニル]-MPA[OMEM]メチルエ

10

20

30

40

50

ステルコンジュゲート(18)を溶解させた溶液に、24mg(0.572mmol)の水酸化リチウム一水和物を1.2mlの水に溶解させた溶液を添加した。RP-HPLC(Vydac C-18 ; 300Å 218TP54 ; 4.6mm×250mm ; 0.1%TFA-H₂O/0.1%TFA-CH₃CNグラジエント)によりモニターしながら、アルゴン下、室温で反応液を攪拌した。室温で4日後、出発物質の消費はほぼ完了し、より短い保持時間のピークの出現が増加した。反応混合物を希リン酸で酸性化し(沈殿)、濃縮乾固させ、メタノールで摩砕し、固体を濾別した。濾液を濃縮乾固させ、残渣を再びCH₃CN-H₂O(1:1)中に溶解させ、0.1%TFA-H₂O/0.1%TFA-CH₃CN勾配を用いて分取RP-HPLC(Rainin C-18 (ODS) 21.4mm×250mm)により精製した。生成物を含む画分を合わせて減圧下でアセトニトリルを蒸発させ、残渣を凍結乾燥させ、8mg(0.0097mmol、69%)の白色固体の(19)を得た。

【0145】

10

実施例35: 5'-[(テオフィリン-8-ブチルアミドエチルアミノカルボニルオキシ)イソプレニル]-MPA(20)の調製

200mlの無水メチレンクロリドに1.0mg(0.0012mmol)の5'-[(テオフィリン-8-ブチルアミドエチルアミノカルボニルオキシ)イソプレニル]-MPA[OMEM]コンジュゲート(19)を溶解させた溶液を、アルゴン下、氷浴中で冷却させた。これに、20mlのトリフルオロ酢酸を40mlのメチレンクロリドに溶解させた冷却溶液を約1分間かけて3回に分けて添加した。冷却を続けながら20分攪拌した後、高真空下で直接吸引することにより揮発性物質を蒸発させた。残渣のRP-HPLC(Vydac C-18 ; 300Å 218TP54 ; 4.6mm×250mm ; 0.1%TFA-H₂O/0.1%TFA-CH₃CNグラジエント)および¹H-NMR(CD₃OD)から、所望のMEM脱保護生成物が部分的に生成しているが示された。この物質を再プールし、濃縮乾固させ、無水メチレンクロリドに再溶解させ、そして再蒸発させた(3×)。35分間攪拌した以外は上述したように残渣をTFA処理した。前と同じように溶媒を除去した。残渣のRP-HPLCおよび¹H-NMR分析から、所望の生成物がさらに生成し、出発物質が減少していることが示された。再プールした物質を再濃縮し、前と同じように処理し、30分間攪拌しながら上述したように3回目のTFA処理を行った。得られた反応混合物のRP-HPLC分析から、反応が本質的な終了し、副生物のピークが増加していることが示された。反応液を濃縮乾固させ、CH₃CNに再溶解させ、半分取RP-HPLC(Vydac C-18 ; 300Å 218TP510 ; 0.1%TFA-H₂O/0.1%TFA-CH₃CNグラジエント)により精製した。生成物を含有する画分をプールし、減圧下でCH₃CNを蒸発除去し、残渣を凍結乾燥させ、約0.5g(約0.00068mmol、約56%)の白色固体として(20)を得た。¹H-NMR: 一致。LC/MS: M+H 739.3、M+Na: 761.3。

20

30

【0146】

実施例36: 5'-t-ブトキシカルボニルメチル-MPAメチルエステル(21)の調製

ナトリウムビス(トリメチルシリル)アミドの溶液(THF中の1.0M溶液) 26ml(26mmol)を、アルゴン雰囲気下、ドライアイス/アセトン浴中で-78℃まで冷却させた。この冷却溶液に2.6ml(22mmol)のDMPUを添加し、-78℃で15分間攪拌した。新たに蒸留した45mlのTHF中に2.86g(8.56mmol)のMPAメチルエステル(2)を溶解させた溶液を、反応混合物に滴下した。反応混合物を-78℃で1時間攪拌したところ、反応混合物の色が淡黄色から橙黄色に変化した。反応混合物に1.9ml(912.8mmol)のt-ブチルブROMアセテートを添加し、-78℃で反応混合物を3時間攪拌した。20mlの飽和塩化アンモニウム溶液で反応を停止させ、混合物を室温まで加温した。さらに200mlの飽和塩化アンモニウムを添加し、反応混合物をエチルアセテート3×200mlで抽出した。合わせた有機層を300mlの飽和塩化アンモニウムで洗浄し、乾燥させ、濃縮した。エチルアセテート中の30%ヘキサンを用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗生成物を精製し、3.87gの半固体を得た。0.1%トリフルオロ酢酸を含有するアセトニトリル/水のグラジエント系を用いてRP-HPLC(Rainin C-18(ODS) 21.4mm×250mm)によりこの生成物を一部分(1.45g)ずつ数回に分けて精製した。生成物を含む画分を合わせてアセトニトリルを蒸発させた。残渣を凍結乾燥させて669mg(1.49mmol、47%)の5'-t-ブトキシカルボニルメチル-MPAメチルエステル(21)を得た。

40

【0147】

実施例37: 5'-カルボキシメチル-MPAメチルエステル(22)の調製

300mg(0.67mmol)の5'-t-ブトキシカルボニルメチル-MPAメチルエステル(21)にジクロロ

50

メタン中の50%トリフルオロ酢酸溶液15mlを添加した。混合物を室温で攪拌し、濃縮した。エチルアセテート中の20%メタノールを用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製し、250mg(0.63mmol、95%)の5'-カルボキシメチル-MPAメチルエステル(22)を得た。¹H-NMR: 一致。HR-FAB MS: M+Naに対する計算値 415.1369、観測値 415.1352。

【0148】

実施例38: t-ブチルエステルの開裂(別法)

3.6mlのジクロロメタン中に360mg(0.8mmol)の(21)を溶解させた溶液に、3.6mlのTFAを添加し、反応混合物を10分間攪拌した。200mlの0.5Mリン酸カリウム緩衝液pH7.0を添加し、混合物を100mlのエチルアセテートで3回抽出した。有機層をプールし、硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を蒸発させた。HPLCおよび¹H-NMRにより生成物の特性決定を行った。

10

【0149】

実施例39: 5'-(スクシンイミド-N-オキシ)カルボニルメチル-MPAメチルエステル(23)の調製

244mg(2.12mmol)のN-ヒドロキシスクシンイミドおよび437mg(2.12mmol)のジシクロヘキシルカルボジイミドを2mlのTHFに溶解させて200mgの粗製5'-カルボキシメチル-MPAメチルエステル(22)に室温で添加し2時間攪拌した。沈殿したジシクロヘキシルウレアを濾別し、分取RP-HPLC(Waters Delta Pak C-18 50×250mm、水/アセトニトリル/0.1%TFA)を用いて濾液を精製した。

【0150】

生成物を含有する画分をプールし、直ちに凍結乾燥させ、129mgの(23)を得た。¹H-NMRおよびMSにより生成物の特性決定を行った。¹H-NMR: 一致。HR-FAB MS: M+Hに対する計算値 490.1713、観測値 490.1702。

20

【0151】

実施例40: 5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPAメチルエステル(25)の調製

1.74mlの無水DMFに127mg(0.259mmol)の(23)を溶解させて、3.48mlの無水DMFおよび179μlのトリエチルアミンに166mg(0.259mmol)の(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00を溶解させた溶液に、ピペットで添加した。反応混合物を2時間攪拌した。次に、この溶液に500μlの酢酸を添加し、分取RP-HPLC(Waters Delta Pak C-18 50×250mm、水/アセトニトリル/0.1%TFA)を用いて混合物を精製した。生成物を含む画分をプールし、凍結乾燥させ、240mgの(25)を得た。¹H-NMRおよびMSにより生成物の特性決定を行った。

30

【0152】

実施例41: 5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPA(26)の調製

200mg(0.2098mmol)の5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPAメチルエステル(25)を28.7mlのDMSOに溶解させて56mlの0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH7.0と徐々に混合した。混合物はわずかに濁った状態になった。219μlのエステラーゼ(Roche Diagnostics, Cat. No. 104698)を添加し、混合物を13日間攪拌した。沈殿物を濾過し、分取RP-HPLC(Waters Delta Pak C-18 50×250mm、水/アセトニトリル/0.1%TFA)を用いて濾液を精製した。生成物を含む画分をプールし、凍結乾燥させ、68mgの(26)を得た。¹H-NMRおよびMSにより生成物の特性決定を行った。

40

【0153】

実施例42: MPA-MPAの合成

ミコフェノール酸メチルエステル(2)(1.337g、4mmol)を6mlのテトラヒドロフランに溶解させた溶液を、不活性雰囲気下で-78℃まで冷却させ、25分間にわたりナトリウムヘキサメチルジシラジド(9ml、テトラヒドロフラン中1M、9mmol)で処理した。15分間攪拌した後、米国特許第5,493,030号明細書中の実施例ZA-12Bに従って調製した(E)-4-1,3-ジヒドロ-6-メトキシ-4-メトキシエトキシメトキシ-7-メチル-3-オキソイソベンゾフラン-5-イル)-2-メチルブト-2-エニルブロミド(1.36g、3.17mmol)をテトラヒドロフラン(4ml)に溶

50

解させた溶液として15分間かけて添加した。反応液を1.5時間かけて約-40℃まで徐々に加温し、その後、氷と水と濃塩酸との混合物(2ml)上に注ぐことにより、反応を停止させた。エチルアセテート(2×100ml)中に生成物を抽出した後、硫酸マグネシウムで脱水した。有機物を濾過し、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去した。ヘキサン中の40%エチルアセテート、次に、ヘキサン中の60%エチルアセテート、最後に、ヘキサン中の80%エチルアセテートを用いてクロマトグラフィーを行い、油としてアルキル化生成物(191mg)を得た。これを次の反応で使用した。

【0154】

アルキル化生成物(190mg)をメタノール(30ml)に溶解させ、660mgのp-トルエンスルホン酸で処理し、窒素下、周囲温度で5時間攪拌した。次に、減圧下でメタノールを除去し、反応液を水とエチルアセテートとの間で分配させた。水性相を75mlのエチルアセテートで洗浄し、その後、合わせた有機層を硫酸マグネシウムで脱水した。濾過後、溶媒を除去し、150mgの物質を得た。これを最終ステップに供した。

10

【0155】

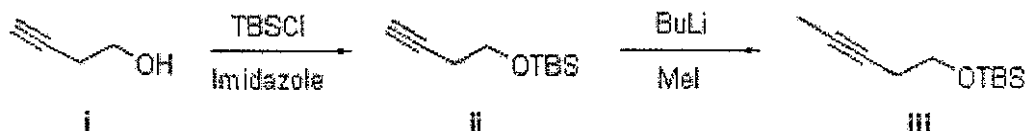
以上で得られたエステルを1:1のメタノール:水に溶解させ、400mgの水酸化リチウムを添加した。反応液を窒素下、60℃で20時間、磁気攪拌し、その後、冷却させ、1M NaHSO₄上に注ぎ、エチルアセテート(50ml×3)で3回抽出した。合わせた有機物を飽和ブラインで洗浄し、その後、硫酸マグネシウムで脱水した。減圧下で溶媒を除去し、次に、t-ブチルメチルエーテル/ヘキサンから再結晶化させて、粗生成物(101mg)を得た。1%酢酸を含む1:1ヘキサン:エチルアセテートを用いてこの物質をフラッシュクロマトグラフィーにかけ、続いて、エチルアセテートを用いてさらなる再結晶化を行い、最終生成物(80mg、融点146.4-147.4℃)を得た。

20

【0156】

実施例43: 4'-カルボキシメチルMPA(27)の調製

【化2】



30

【0157】

3-ブチン-1-オール(i)(10.0g、143mmol、Aldrich Chemical Company)を200mlのジクロロメタンに加えた溶液を室温で攪拌した。イミダゾール(12.6g、186mmol)を添加し、次に、t-ブチルジメチルシリルクロリド(22.6g、150mmol)(TBSCl)を添加し、溶液を20分間攪拌した。反応液をメチレンクロリドで希釈し、水、1N HCl水溶液、ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで脱水した。減圧下で溶媒を除去し、残渣をヘキサンで希釈し、濾過し、真空中で溶媒を除去し、油として23.1gのシリルエーテル(ii)を得た。さらなる精製を行うことなくこれを使用に供した。

【0158】

以上で調製したシリルエーテル(ii)(8.8g、48mmol)を200mlのテトラヒドロフランに溶解させた溶液を、不活性雰囲気下で-78℃まで冷却させ、シリンジを用いてn-BuLi溶液(31.5ml、50.5mmol、ヘキサン中1.6M)を15分間かけて添加した。溶液を-78℃で1.5時間攪拌し、この時点でヨードメタン(67.7g、480mmol)を希釈せずに添加し、溶液を一晩で室温まで加温した。20mlの1N塩化アンモニウム水溶液を添加し、真空中でテトラヒドロフランを除去し、水性液をジエチルエーテルで2回抽出した。エーテル溶液を水で2回洗浄し、次にブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで脱水した。真空中で溶媒を除去し、8.5gの油(iii)を得た。さらなる精製を行うことなくこれを使用に供した。

40

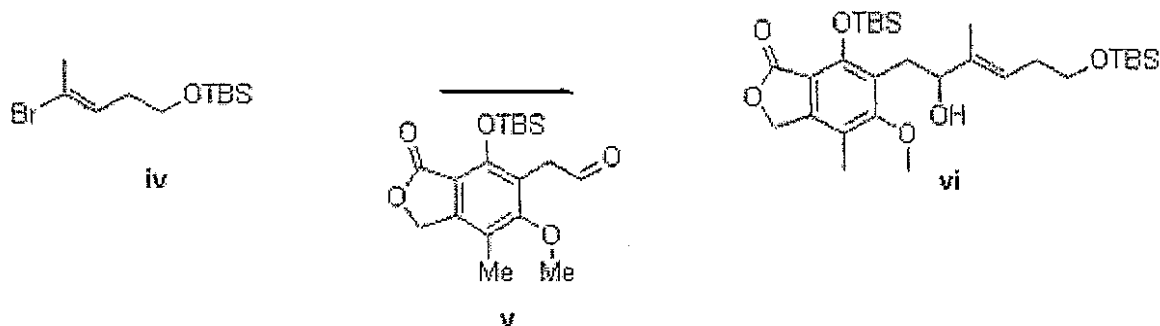
【化 3】



【0159】

100mlのTHF中のビス(シクロペンチルジエニル)ジルコニウムジクロリド(16.0g、55mmol)の懸濁液を、不活性雰囲気下、室温で攪拌した。リチウムトリエチルボロヒドリド溶液(55mmol、55ml、テトラヒドロフラン中1M)を添加し、溶液を1時間攪拌した。以上で調製したシリルエーテル(iii)(5.0g、27mmol)を10mlのテトラヒドロフランに溶解させた溶液を、カニューレにより添加した。次に、反応液を50℃まで1.5時間加熱し、その後、25℃まで冷却させた。次に、N-ブロモスクシンイミド(9.8g、55mmol)を添加し、反応液を20分間攪拌し、その後、50mlの1Nチオ硫酸ナトリウムで反応を停止させた。混合物をジエチルエーテルで希釈し、セライトに通して濾過し、1Nチオ硫酸ナトリウムおよびブラインで逐次洗浄し、その後、硫酸マグネシウムで脱水した。真空中で溶媒を除去した後に得られた残渣を、溶出液としてヘキサンを使用するシリカゲルのクロマトグラフィーにかけ、油として生成物ビニルブロミド(iv)(2.1g)を得た。これを次のステップで使用した。

【化 4】



【0160】

マグネシウム(350mg、14mmol)を20mlのジエチルエーテルおよび5mlのベンゼンの混合物に加えた懸濁液を、不活性雰囲気下、室温で攪拌した。反応液を緩やかに還流させながら、この混合物にエチレンジブロミド(2.7g、14.4mmol、1.24ml)をシリンジにより30分間かけて添加した。別のフラスコで、ビニルブロミド(iv)(3.65g、13mmol)を100mlのTHFに加えた溶液を、-78℃で攪拌した。この溶液にt-ブチルリチウム(27.4mmol、ヘキサン中の1.7M溶液16.1ml)を15分間かけて滴下した。得られたビニルリチウム溶液に先に得られた臭化マグネシウム溶液をカニューレにより10分間かけて添加し、溶液を-78℃で30分間攪拌し、ビニルグリニャール溶液を形成した。アルデヒド(v)「Smithら、J.Org.Chem.61,2236-2241(1996)」(5.0g、14.4mmol)を10mlのTHFに溶解させた溶液をカニューレによりビニルグリニャール溶液に5分間かけて添加した。反応液を0℃まで加温し、25分間攪拌した。次に、30mlの1N塩化アンモニウム水溶液で反応を停止させ、ジエチルエーテルで3回抽出し、エーテル溶液を1N塩化アンモニウム水溶液、ブラインで逐次洗浄し、硫酸マグネシウムで脱水した。真空中で溶媒を除去し、ヘキサン中の10%~20%エチルアセテートのグラジエントを用いてシリカゲルのクロマトグラフィーにより残渣を精製し、油として2.90gのアリル型アルコール生成物(vi)を得た。

【化5】

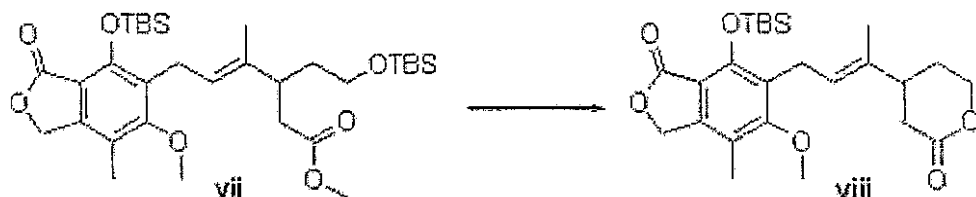


【0161】

10

トリメチルオルトアセテート(11.4g、12.0ml、95mmol)およびピバル酸(48mg、0.5mmol)の混合物にアリル型アルコール(vi)(2.6g、4.7mmol)を混合して還流しながら11時間加熱した。反応液を冷却させ、室温で一晩攪拌した。次に、反応液をジエチルエーテルで希釈し、水、飽和重炭酸塩水溶液、ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで脱水した。真空中で溶媒を除去し、溶出液としてヘキサン中の15%エチルアセテートを用いてシリカゲルのクロマトグラフィーにより残渣を処理し、油として1.5gのメチルエステル生成物(vii)を得た。

【化6】



20

【0162】

メチルエステル(vii)(1.5g、2.5mmol)を50mlのアセトニトリルに溶解させた溶液を、室温で攪拌した。5mlの40% HF溶液を50mlのアセトニトリルで希釈した溶液として添加し、反応液を5分間攪拌した。真空中で溶媒を除去した。残渣をジエチルエーテルに溶解させ、飽和重炭酸塩水溶液で3回洗浄し、次にブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで脱水した。溶媒を除去し、油として1.0gのラクトン(viii)を得た。さらなる精製を行うことなくこれを使用に供した。

30

【化7】

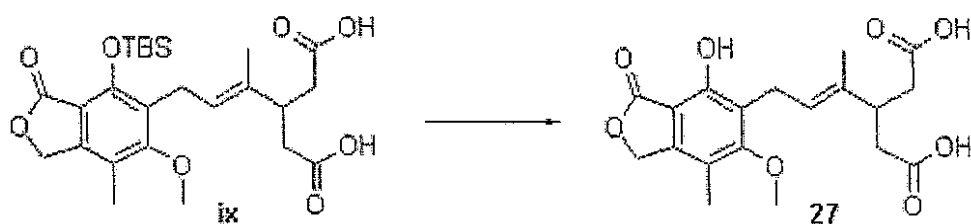


40

【0163】

ラクトン(viii)(1.0g、2.0mmol)を10mlのアセトンに溶解させ、この溶液を0℃まで冷却させた。ジョーンズ試薬(3M水溶液1.2ml、3.6mmol)を溶液に添加し、反応液を45分間攪拌した。3mlのメタノールで反応を停止させ、エチルアセテートで希釈し、1N塩酸水溶液で洗浄し、水で2回洗浄し、ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで脱水した。真空中で溶媒を除去し、溶離液としてヘキサン中の35%エチルアセテートおよび1%酢酸を用いてシリカゲルのクロマトグラフィーにより残渣を処理し、463mgの保護された二酸(ix)を油として得た。

【化 8】



【0164】

10

保護された二酸(ix)(401mg、0.8mmol)を室温で10mlのメタノールに添加して攪拌した。10mlのメタノールおよび2mlの水からなる溶液に水酸化リチウム水和物を溶解させ、二酸の溶液に添加し、反応液を3.5時間攪拌した。10mlの1N塩酸水溶液で反応を停止させ、エチルアセテートで3回抽出し、エチルアセテート層を合わせてブラインで洗浄した。溶媒を除去し、こうして得られた固体をジエチルエーテルとヘキサンの混合物で摩砕した。生成した固体をメチレンクロリド/ヘキサンから再結晶化させ、201mgの4'-カルボキシメチルMPA(27)(融点=178°C)を得た。

【0165】

実施例44: 5'-イソプレニル[フタルイミド]-MPA(OMEM)メチルエステル(A)の調製

144mg(0.28mmol)の5'-イソプレニル[OH]-MPA[OMEM]メチルエステル(5)に10mLの新たに蒸留したTHFを添加し、続いて、96mg(0.36mmol)のトリフェニルホスフィン、53mg(0.36mmol)のフタルイミド、および72 μ L(0.36mmol)のジイソプロピルアゾジカルボキシレート

を添加した。反応混合物を室温で18時間攪拌し、ヘキサン中の50%エチルアセテートを用いて薄層クロマトグラフィー(TLC)により反応の進行をモニターした。TLC分析から、所望の生成物が形成されていることおよび反応混合物中に有意量の出発MPAアルコール(5)が存在していることが示された。追加の96mg(0.36mmol)のトリフェニルホスフィン、53mg(0.36mmol)のフタルイミド、72 μ L(0.36mmol)のジイソプロピルアゾジカルボキシレート、および1gの4Åモレキュラーシーブを、反応混合物に添加した。反応混合物を室温で18時間攪拌し、減圧下で濃縮乾固した。残渣を100mLのエチルアセテートに溶解し、2 $\times$ 50mLの水で洗浄した。有機層を脱水し(Na₂SO₄)、濃縮した。ヘキサン中の50%エチルアセテートを用いてシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製し、粘稠な無色のガムとして151mg(0.24mmol、84%)の(A)を得た。¹H-NMR: 一致。HR-ES(+)MS: 計算値 M+Na 658.2622、観測値 658.2617。

20

30

【0166】

実施例45: MPA[OMEM]-5'-イソプレニルアミンメチルエステル(B)の調製

2Mのメチルアミンを含有するメタノール4mLを165mg(0.25mmol)の(A)(実施例44で得た化合物)に添加した。混合物を室温で18時間攪拌し、次に、濃縮した。溶出液としてメタノール中の80%クロロホルムを用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製し、粘稠な無色のガムとして70mg(0.14mmol、53%)の(B)を得た。¹H-NMR: 一致。HR-ES(+)MS: 計算値 M+H 506.2749、観測値 506.2750。

40

実施例46: MPA[OMEM]-5'-イソプレニルアミンメチルエステル(B)からMPA-5'-イソプレニルアミン(D)への脱保護

(i) メタノール(MeOH、1mL)にMPA[OMEM]-5'-イソプレニルアミンメチルエステル(B)(24mg)を溶解させた溶液に、水酸化リチウム(LiOH)一水和物(25mg)を1mLの脱イオン水に溶解させた溶液を添加し、アルゴン下、室温で混合物を3日間攪拌した。分析用RP-LC/MSにより反応液を追跡したところ、出発物質が徐々に消失し、ラクトン開環物質(Ca)に帰属されるより移動速度の大きい物質(分子イオン=C+18)と共に対応するMPA[OMEM]-5'-イソプレニルアミン(C)が出現することが示された。次に、1N HCLを用いて混合物をpH0~1に酸性化し、室温で攪拌した。分析用LC/MSから、(Ca)に帰属されるピークが消失し(ラクトン環の再閉環に起因するものと思われる)、メトキシエトキシメチル(MEM)基が徐々に脱保護され

50

、所望の完全に脱保護された物質(D)が得られることが示された。減圧下(回転蒸発器(rotavap))で混合物を濃縮してメタノールを除去し、続いて、高真空下(ドライアイス/アセトン凝縮器を備えた回転蒸発器(rotovap))でさらなる濃縮を行って、わずかに粘着性のある固体として粗製の(D)を与えることにより、脱保護を終了した。この物質を1:1アセトニトリル(MeCN):水に再溶解させ、分取RP-HPLC([0.1% TFA/水]中の[0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)/MeCN])を20分間にわたり5%ずつ100%まで増加させるグラジエント;流量=20mL/分)により精製し、2つの画分を凍結乾燥させた後、トリフルオロ酢酸塩に帰属される(D)(10.9mg)を白色固体として得た。¹H-NMR: 一致。LC/MS: M+H 404.2。

【0167】

(ii) 他の実験では、先に(i)で記載したように(ただし、5日間にわたり攪拌しながら)1 mLの水+1mLのメタノール中の25mgの水酸化リチウムで25mgの(B)を加水分解させた後、1N リン酸を用いて反応液をpH7に中和した。分析用LC/MSから、(C)と、先に(i)で記載したように帰属される(Ca)と、に対応する2つのピークが存続することが示された。MeCNおよび少量の水(いずれも0.1% TFAを含有する)で混合物を希釈し、先に述べたのと同じの溶媒およびグラジエントを用いて分取RP-HPLCにより精製した。溶出プロフィールから、この時点で(Ca)は消失しているかまたは大幅に減少していることが示された。これは、より強力な酸性条件下でラクトンの再閉環が起こることに起因する。適切な画分を単離して凍結乾燥させ、トリフルオロ酢酸塩に帰属される精製されたMPA[OMEM]-5'-イソプレニルアミン(C)(16.7mg)を白色固体として得た。¹H-NMR: 一致。LC/MS: M+H 492.2。

【0168】

(iii) 他の実験では、先に記載したようにMeOH-水中のLiOH(25mg)で(B)(25mg)を処理した後、1N HCLを用いて反応液をpH2に酸性化した。高真空下で蒸発乾固させることにより、完全に脱保護された(D)[主成分]とOMEMで保護された(C)との混合物を含有することが分析用LC/MSにより示される残渣を得た。無水CH₂Cl₂(800μL)とTFA(200μL)との混合物に残渣を溶解させ、室温で0.5時間攪拌した。蒸発、無水CH₂Cl₂への再溶解、および再蒸発を行うことにより、この時点で、所望の完全に脱保護された(D)[主成分]を他に多くの物質および2つの主不純物(両方とも、より速い移動速度を有し、一方は、LC/MSの分子イオンが所望の(D)と同じである)と共に含有することが分析用LC/MSにより示される残渣を得た。混合物の一部分を分取RP-HPLCにかけ、適切な画分を単離して凍結乾燥させた後、(D)(¹H-NMR: 一致; LC/MS: M+H 404.2)と、より移動速度の大きい不純物(LC/MS: M+H 404.2; 酸基がイソプレニル二重結合のうちの1つに作用して閉環し、第2のラクトンを生成することを示唆する¹H-NMRスペクトル)と、を得た。

【0169】

実施例47: ジゴキシシン-MPAコンジュゲートである5'-[[[(ジゴキシシン(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボニル]アミノ]イソプレニル]-MPAコンジュゲート(H)の調製

(i) SatohおよびAoyama(D. Satoh and K. Aoyama Chem. Pharm. Bull. (Jpn), 1970, 18, 94-99)の報告に準拠してジギトキシシンを用いる類似の手順に従って水性エタノール中において過ヨウ素酸ナトリウムで酸化させることによりジゴキシシンからジゴキシシジアルデヒド(E)を合成した。

【0170】

(ii) 合計3mLのメタノールにパラ-アミノ安息香酸(0.221g, 1.61mmol)を溶解させ、次に、3mLの0.3M酢酸水溶液で希釈した。得られた溶液をアルゴン下でメタノール(20mL)中のジゴキシシジアルデヒド(E)(1.0g, 1.28mmol)の攪拌溶液に添加した。得られた黄色混合物に合計4mLの0.3M酢酸水溶液中のシアノ水素化ホウ素ナトリウム(NaCNBH₃, 0.11g, 1.75mmol)の溶液を添加した。室温で一晩攪拌した後、薄層クロマトグラフィー(TLC)により、反応が終了していることが示された。清澄な反応混合物を減圧下で蒸発乾固した(30℃未満)。メチレンクロリド(CH₂Cl₂)と0.1N水性HCLとの間で灰白色固体残渣を分配させた。層を分離させ、0.1N HCL(×2)、水(×1)、飽和水性NaCl(×1)で有機相を逐次洗浄し、脱水し(Na₂SO₄)、濾過し、減圧下で蒸発させ、高真空下(マニホールド)で乾燥させ、白色固体として粗生成物(1.06g)を得た。この物質をクロロホルム(CHCl₃)-MeOHに再溶解させ、1

10

20

30

40

50

0% MeOHを含有するCHCl₃中にあらかじめ充填されたシリカゲルを用いて10% MeOHを含有するCHCl₃で溶出させるカラムクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含有する適切な画分を合わせて、痕跡量のフロントラン不純物を含有するフォアカット画分の生成物(F、75mg、6.6%)と、メインプールの生成物[(ジゴキシシン(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボン酸(F)(585mg、52%)と、を得た。¹H-NMR: 一致。LR(+)-SIMS MS: : 一致。HR-FAB MS: 計算値 M+H、883.4718、観測値 883.4702。UV(MeOH): λ 221(ε 17,384)、307(ε 22,621)nm。マイクロ分析: C₄₈H₆₉N₁₄O₁₄・5/4 CHCl₃に対する計算値: C 57.25; H 6.85; N 1.36% 観測値: C 57.11; H 6.90; N 1.25%。

【0171】

(iii)アルゴン下において、無水CH₂Cl₂(60mL)に(F)(600mg、0.679mmol)を溶解させた攪拌溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS、102mg、0.886mmol)を添加し、続いて、1-エチル-3-ジメチルアミノプロピル-カルボジイミド塩酸塩(EDC・HCl、170mg、0.886mmol)を添加し、アルゴン下、室温で混合物を16時間攪拌した。TLC分析から、反応が終了していることが示された。清澄な反応混合物をCH₂Cl₂で希釈し、0.1N HCL(×4)、水(×1)、飽和水性重炭酸ナトリウム(NaHCO₃、×4)、飽和水性NaCl(×1)を用いて逐次洗浄し、脱水し(Na₂SO₄)、濾過し、減圧下で蒸発させ、高真空下で乾燥させ、白色フォームとして粗生成物(634mg)を得た。最小体積の約9:1エチルアセテート(EtOAc)/ヘキサン中に再溶解させ、ヘキサン中の75% EtOAc中にあらかじめ充填されたシリカゲル(80g)を用いて、最初にヘキサン中の75% EtOAcで溶出させ、次にEtOAc単独で溶出させるカラムクロマトグラフィーにより、この物質を精製した。生成物を含有するメインカットの画分を合わせ、減圧下で蒸発させた。無水の蒸留されたCH₂Cl₂中に残渣を再溶解させ、再び蒸発乾固し、このプロセスを6~7回繰り返し、最後に、高真空(マニホールド)下、室温で一晩乾燥させ、白色固体として所望のNHSエステルである[(ジゴキシシン(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(G)(475mg、71%)を得た。¹H-NMR: 一致。LR(+)-SIMS MS: 一致。HR FAB MS: 計算値 M+Na 1003.4780、観測値1003.4767。UV(MeOH): λ 216 (ε 23,907)、324(ε 38,186)nm。マイクロ分析: C₅₂H₇₂N₂O₁₆・1/2 CH₂Cl₂・1/4 H₂Oに対する計算値: C 61.33; H 7.21; N 2.72%、観測値: 61.31; H 7.21; N 2.63%。

【0172】

(iv) v形キャビティを有し小さいv形攪拌子をも内包する1mL容量反応バイアル(Wheat on Reacti-Vial)中で、完全に脱保護されたMPA-5'-イソプレニルアミン(D)のトリフルオロ酢酸塩(3.3mg、0.0064mmol)およびNHSエステル(G、7.0mg、0.0071mmol)と一緒に無水CH₂Cl₂(200μL)に溶解させた。トリエチルアミン(Et₃N、5μL、約0.36mmol)を添加し、バイアルにしっかりとキャップをして(テフロン張りスクリュウキャップ)、反応液を室温で2.5日間攪拌した。分析用LC/MSから、反応が終了していることが示された。反応液を少量のCH₂Cl₂で希釈し、薄層クロマトグラフィー(4プレート、20×20cm×0.025cmシリカ厚さ; E.M. Science, Cat.# 5715-7)にかけてCHCl₃中の10% MeOHで溶出させることにより直接精製した。生成物バンド(R_f 約0.27)を切り取り、粉碎し、そしてCHCl₃中の25% MeOHを用いて洗浄/溶出(半融ガラスファンネル)を行った。収集した洗液を蒸発乾固させ、CH₂Cl₂中の10% MeOHを少量用いて取り出し、濾過し(Gelman Laboratory, GHP Acrodisc 25 mmシリンジフィルター、0.45μm GHP膜、part# 4560T)、蒸発乾固させ、無水CH₂Cl₂中に再溶解させ、再蒸発させ(反復×2)、そして高真空下(マニホールド)で乾燥させて、白色固体としてジゴキシシン-MPAコンジュゲート(H)(4.2 mg、52%)を得た。¹H-NMR: 一致。LC/MS: M+H 1269.6、M+Na 1291.6。

【0173】

実施例48: ジギトキシシン-MPAコンジュゲートである5'-[[[(ジギトキシシン(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボニル]アミノ]イソプレニル]-MPAコンジュゲート(L)の調製

ジギトキシシリアルデヒド(I)は、SatohおよびAoyama (D. Satoh and K. Aoyama Chem. Pharm. Bull. (Jpn), 1970, 18, 94-99)の方法に従って水性エタノール中において過ヨウ素酸ナトリウムで酸化させることによりジギトキシシンから調製した。

【0174】

実施例47(ii)のときと同じように、MeOH(20mL)中のジギトキシンジアルデヒド(I)(1.0g、1.31mmol)を、パラ-アミノ安息香酸(220mg、1.60mmol; 6mLの1:1 MeOH:0.3M HOAc水溶液に溶解させた)およびNaCNBH₃(108mg、1.72mmol; 3mLの0.3M HOAc水溶液に溶解させた)と1.5時間反応させた。さらにNaCNBH₃(52mg、0.83mmol)を添加し、合計して4.33時間経過した後、TLC分析を行ったところ、反応が終了していることが示された。実施例47(ii)に記載したのと同じように、反応液を仕上げ処理し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製することにより、メインカットのクロマトグラフィー画分から、[(ジギトキシニン(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボン酸(J)(443mg、39%)を得た。¹H-NMR: 一致。LR(+)-SIMS MS: 一致。HR FAB MS: 計算値 M+ 867.4769、観測値 867.4798。UV(MeOH): λ₂ 20(ε 18,094)、308(ε 23,364)nm。マイクロ分析: C₄₈H₆₉N_{0.13}・CHCl₃・1/3 H₂Oに対する計算値: C 59.24; H 7.17; N 1.41%、観測値: C 59.11; H 7.09; N 1.32%。後のほうの画分から、より低純度の物質(301mg)が得られた。

【0175】

実施例47(iii)のときと同じように、無水CH₂Cl₂(40mL)中、アルゴン下、室温で、酸(J)(535mg、0.616mmol)をNHS(92mg、0.80mmol)およびEDC・HCl(154mg、0.80mmol)と一晩反応させ、続いて、仕上げ処理を行い、さらに、蒸発および高真空下での乾燥を行った後、実施例47(iii)に記載したのと同じようにシリカゲルクロマトグラフィーにかけて精製することにより、適切な画分から、所望のNHSエステルである[(ジギトキシニン(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(K、423mg、71%)を白色固体として得た。¹H-NMR: 一致。LR(+)-SIMS MS: 一致。HR FAB MS: 計算値 M+ 964.4933、観測値 964.4945。UV(MeOH): λ₂ 216(ε 18,639)、324(ε 37,261)nm。マイクロ分析: C₅₂H₇₂N₂O₁₅・1/5 EtOAc・2/5 CH₂Cl₂に対する計算値: C 62.85; H 7.38; N 2.76%、観測値: C 62.97; H 7.27; N 2.82%。

【0176】

Et₃N(5μL、約0.036mmol)を含有する無水CH₂Cl₂(1mL)に、完全に脱保護されたMPA-5'-イソプレニルアミン(D)のトリフルオロ酢酸塩(3.4mg、0.0066mmol)およびNHSエステル(K、7.0mg、0.0073mmol)を加えた懸濁液を、アルゴン、室温で24時間攪拌した。わずかに曇りのある混合物を分析用LC/MSにかけたところ、両方の出発物質が所望の生成物と共に依然として存在することが示された。無水ジメチルホルムアミド(DMF)を添加し、反応液をさらに24時間攪拌し、その後、LC/MSにかけたところ、反応は本質的に終了していることが示された。減圧下さらには高真空下で反応液を蒸発乾固させた。CHCl₃中の10% MeOHを少量用いて残渣を再溶解させ、薄層クロマトグラフィー(4プレート、20×20cm×0.025cmシリカ厚さ; E.M. Science, Cat.# 5715-7)にかけてCHCl₃中の10% MeOHで溶出させることにより精製した。生成物バンド(R_f 約0.39)を切り取り、粉碎し、そしてCHCl₃中の25% MeOHを用いて洗浄/溶出(半融ガラスファンネル)を行った。収集した洗液を蒸発乾固させ、C H₂Cl₂中の10% MeOHを少量用いて取り出し、濾過し(Gelman Laboratory, GHP Acrodisc 25 mmシリンジフィルター、0.45μm GHP膜、part# 4560T)、蒸発乾固させ、無水CH₂Cl₂中に再溶解させ、再蒸発させ(反復×3)、そして高真空下(マニホールド)で乾燥させて、白色固体としてジギトキシニン-MPAコンジュゲート(L)(5.2mg、63%)を得た。¹H-NMR: 一致。LC/MS: M+H 1253.8、M+Na 1275.6。

【0177】

実施例49: 完全に保護されたゲンタマイシン-MPAコンジュゲート(カルバメート結合)である5'-[(N^{2'},N^{3'},N^{6'}-トリ-t-ブトキシカルボニル-N^{3''}-トリフルオロアセチル-ゲンタマイシン[C1a]-N¹-カルボニル-オキシ))-イソプレニル]-MPA[OMEM]メチルエステルコンジュゲート(N)の調製

20mg(0.039mmol)の5'-イソプレニルに[OH]-MPA[OMEM]メチルエステル(5)に1mLのTHFを添加し、続いて、10.1mg(0.039mmol)のN,N'-ジスクシンイミジルカーボネートおよび25μLのトリエチルアミンを添加した。混合物を室温で18時間攪拌することにより、対応するN-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネートを得た。

【0178】

550mg(1.22mmol)のゲンタマイシンC1aに35mLの無水DMFを添加し、続いて、1.04g(4.74mmol)の酢酸亜鉛二水和物を添加した。混合物をアルゴン雰囲気下、室温で5日間攪拌した。反応混合物に850mg(3.89mmol)のジ-t-ブチルジカーボネートを添加し、得られた混合物を室温で3日間攪拌した。次に、反応混合物を減圧下で濃縮し、カラムクロマトグラフィーにより精製した。カラム中で溶出液として使用した溶媒と同一の溶媒を最少量で用いて、粗製物質を溶解させた。CHCl₃-MeOH-28% NH₄OH(7:3:0.1)を用いてカラムから溶出させた。カラムで使ったのと同じ溶媒系を用いて薄層クロマトグラフィー(TLC)によりカラムからの画分を分析した。プレートをリンモリブデン酸溶液に浸漬してからホットプレート上で加熱することにより、プレートを発色させた。CHCl₃-MeOH-28% NH₄OH(7:3:0.1) 10
 中での生成物の遅延係数(R_f)は0.27であった。所望の画分を合わせて濃縮した。次に、残渣を25mLのジクロロメタン中に懸濁させ、そして濃縮した。ジクロロメタン中への懸濁および濃縮の手順を2回行って、481mg(0.62mmol, 51%)の3,2',6'-トリ-t-ブトキシカルボニルゲンタマイシンC1aを白色の粉末として得た。

【0179】

460mg(0.602mmol)の3,2',6'-トリ-t-ブトキシカルボニルゲンタマイシンC1aに9mLの無水DMSOを添加し、続いて、81μL(0.70mmol)のエチルトリフルオロアセテートを添加した。混合物を室温で3日間攪拌し、次に、減圧下で濃縮した。濃縮時、水浴の温度を45℃未満に保持した。CHCl₃とメタノールの9:1混合物を溶出液として使用しシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製された。同一の溶媒系を用いてカラムから流出する画 20
 分をTLCにより分析した。プレートをリンモリブデン酸溶液に浸漬してからホットプレート上で加熱することにより、プレートを発色させた。CHCl₃とメタノールの9:1混合物中での生成物のR_fは、0.30であった。所望の画分を合わせて濃縮した。残渣を20mLのジクロロメタン中に懸濁させ、次に、濃縮した。ジクロロメタン中への懸濁および濃縮の手順を2回以上行い、白色の粉末として480mg(0.55mmol, 93%)の3,2',6'-トリ-t-ブトキシカルボニル-3''-N-(トリフルオロアセチル)ゲンタマイシンC1a(Z1)を得た。

【0180】

16mg(0.019mmol)のゲンタマイシンアミン(2',3,6'-トリ-t-ブトキシカルボニル-3''-(N-トリフルオロアセチル)-ゲンタマイシン[C1a](Z1))を1mLの無水DMFに溶解させた溶液を調製し、100μLのトリエチルアミンを添加した。この溶液に、あらかじめ調製しておいた 30
 MPA-N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート溶液(in situで生成させた)を滴下した。反応混合物をアルゴン下で4時間攪拌し、減圧下で濃縮した。0.1%トリフルオロ酢酸を含有する水/アセトニトリルグラジエント系を用いて分取RP-HPLCにより残渣を精製した。生成物を含有する画分を合わせ、凍結乾燥し、15mg(0.010mmol, 57%)の保護されたゲンタマイシン-MPAコンジュゲート(N)を得た。¹H-NMR: 一致。HR(+)-ES MS: 計算値 M+Na 1400.6446、観測値 1400.6495。

【0181】

実施例50: 完全に保護されたゲンタマイシン-MPAコンジュゲート(5'-[(N^{2'},N³,N^{6'}-トリ-t-ブトキシカルボニル-N^{3''}-トリフルオロアセチル-ゲンタマイシン[C1a]-N¹-カルボニルオキシ)-イソプレニル]-MPA[OMEM]メチルエステルコンジュゲート(N))からゲンタマイシ 40
 ン-MPAコンジュゲート(5'-[(ゲンタマイシン[C1a]-N¹-カルボニル-オキシ)-イソプレニル]-MPAコンジュゲート(R))への脱保護

図23aおよび23bに関連した説明を行う。V形ウェルを有しv形攪拌子をも内包する0.5mL容量バイアル(Wheaton Reacti-Vial)中で、完全に保護されたゲンタマイシン-MPAコンジュゲート(N)(1.0mg, 0.73μmol)をMeOH(200μL)に溶解させた。水酸化リチウムの水溶液(100μLの[20mg/mL LiOH-水和物水溶液]、2mgのLiOHと等価)を添加した。バイアルにしっかりとキャップをして、清澄な溶液を室温で攪拌した。分析用HPLCにかけたところ、中間体(Q)に帰属されるより移動速度の大きいピークを介して中間体(P)に帰属されるさらに移動速度の大きいピークへと反応が徐々に進行することが示された。室温で3日後、分析用HPLCにより、反応液はほぼ化合物(P)から構成されていることが示された。希リン酸(2mLの 50

水に85% H_3PO_4 を1滴加えたもの)を用いて注意深く反応液のpHを約6に調整し、少量の固体(リン酸リチウム)を沈澱させた。高真空下で混合物を蒸発乾固させた。MeOHを用いて残渣を摩砕し、濾過し、減圧下で濾液を蒸発させ、少量の1:1 MeCN-水に残渣を再溶解させ、半分取RP-HPLC(カラム: Vydac 218TP510; 300 Å, 5 μ, C18, 10×250mm. ガード: Vydac 218GK54. グラジエント: [A = 0.1% TFAを含有する水]中の[C = 0.1% TFAを含有するMeCN]の濃度を次のように変化させた; 0分のとき5% C, 10分後 50% Cまで増加, 30分後 75% Cまで増加, 35分後 100% Cまで増加, 40分後 5% Cまで減少; 流量 = 3 mL/分)により精製した。所望の生成物を含有するピーク(保持時間[tR]~20分)の部分を集集し、凍結乾燥させ、白色固体として5'-[(N²',N³',N⁶'-トリ-t-ブトキシカルボニル-ゲンタマイシン[C1a]-N¹-カルボニルオキシ)-イソプレニル]-MPA[OMEM](P)(0.5mg)を得た。¹H-NMR: 一致。LC/M 10
S: M+H 1268.6。

【0182】

他の実験では、先に述べたのと同様な方法で、500 μLのMeOH中の3.0mgの(N)を、250 μLの水中の5mgのLiOHにより、室温で3日間処理した。先に記載したように仕上げ処理を行って残渣を形成し、これを分析用TLC(20×20cm; 0.025cmシリカ厚さ; 2プレート)にかけてCHCl₃中の15% MeOHで溶出させることにより精製した。生成物バンド(R_f 約0.4)を切り取り、CHCl₃中の30% MeOHを用いてシリカ洗浄/溶出を行い、洗液を蒸発乾固させ、先に述べたように半分取HPLCにより残渣を再精製した。生成物ピーク部分を収集し、凍結乾燥させ、白色固体として中間体ゲンタマイシン[(BOC)₃][NHMe]-MPA[OMEM][COOH](P)(1.1mg)を得た。¹H-NMR: 一致。 20

【0183】

アルゴン下、氷水浴(約4℃)中で冷却しながら、5'-[(N²',N³',N⁶'-トリ-t-ブトキシカルボニル-ゲンタマイシン[C1a]-N¹-カルボニル-オキシ)-イソプレニル]-MPA[OMEM]コンジュゲート(P)(1.1mg)を無水CH₂Cl₂(200 μL)に溶解させた。攪拌溶液(マイクロ磁気攪拌子)に無水CH₂Cl₂(60 μL)中のトリフルオロ酢酸(TFA, 20 μL)の溶液を約1分にわたり3回に分けて添加し、冷却しながら反応液を10分間攪拌した。冷却を続けながら高真空下で直接吸引することにより、反応液を蒸発乾固させた。少量の無水CH₂Cl₂を用いて残渣を洗浄し、高真空下で再吸引した。残渣を約0.5mLのMeCNに溶解させ、アリコートを引き取り、残りを高真空下で吸引して乾固させた。引き取ったアリコートを分析用HPLC(グラジエント: 先に記載したとおりであるが、流量は1mL/分である)により分析したところ、より短い保持 30
時間のところに新しい生成物ピークと共にかなりの出発物質(P)[tR 約18.1分]が存在することが示された。出発物質に対応するピークを注意深く調べたところ(UV)、MEM保護基が部分的に除去されて脱MEM物質が実際の出発物質とほぼ一緒に移動することが示された。反応液残渣を無水CH₂Cl₂(200 μL)に再溶解させ、先の場合とまったく同じようにCH₂Cl₂中のTFAで再処理した(2回目の処置)。ただし、20分間攪拌した。先に記載したとおりに吸引および操作を行い、反応液のアリコートをHPLC分析にかけたところ、(P)は徐々に減少し、移動速度の大きいピークのカルケードが出現することがわかった。先に記載したとおりにTFA/CH₂Cl₂で3回目の処置を行い(30分間/約4℃)、HPLC分析にかけ、続いて、TFA(30 μL)/CH₂Cl₂(90 μL、30分間/約4℃)で4回目の処置を行い、HPLC分析にかけ、さらに、TFA(30 μL)/CH₂Cl₂(90 μL、2時間/約4℃)で最後の5回目の処置を行い、HPLC分析にかけたところ 40
、次第に、すべての出発物質(P)[tR 約18.1]は消失し、中間的なより移動速度の大きいピークのカルケードは経時変化して1つの主要なフロントランピーク[tR 約10.4分]に蓄積していく傾向があることがわかった。有意量の親化合物5'-イソプレニル[OH]-MPA(3A)(リンカーのアリル系カルバメートの望ましくない併行的破壊から形成される)は、既知の物質と比較して観測されなかった。最後の分析用HPLCによる分析においてグラジエントを調整してみたが、いずれの場合にも、(3A)はもしあったとしても無視できる量で存在することが確認された。また、ピークの広がりを改良できることがわかった。高真空下で反応液を吸引乾固させ、3:1 MeCN-水に再溶解させ、半分取RP-HPLC(カラム: Vydac 218TP510; 300 Å, 5 μ, C18, 10×250mm. ガード: Vydac 218GK54. グラジエント: [A = 0.1% TFAを含有する水]中の[C = 0.1% TFAを含有するMeCN]の濃度を次のように変化させた; 0分のとき 50

0% C, 30分後 75% Cまで増加, 35分後 100% Cまで増加, 40分後 0% Cまで減少; 流量 = 3 mL/分, 3回)により精製した。生成物ピーク[tR 約17.8分]の部分を収集し、高真空下で蒸発乾固させ(<25°C)、白色固体としてゲンタマイシン-MPAコンジュゲート(カルバメート結合)(R)(<0.5mg)を得た。¹H-NMR: 一致。LR(+)FAB MS: M+H 880.4。HR(+)FAB MS: 計算値 M+H 880.4555、観測値 880.4553)。

【0184】

(N)からの(R)への脱保護を行う別法では、完全に保護されたゲンタマイシン-MPA(N)(21.0mg)をMeOH(4.2mL)に溶解させ、LiOH水溶液(2.1mL水中42mg)で処理した。清澄な反応液をアルゴン下、室温で4日間攪拌して分析用HPLCにかけたところ、反応はほぼ終了していることがわかった。希リン酸(2mLの水に85% H₃PO₄を2滴加えたもの)を用いて約pH5まで混合物を酸性化させた。混合物(この時点で若干の沈澱したリン酸リチウムを含有する)を攪拌混合し、水およびMeOHで希釈し、より希薄なリン酸を用いてpHを約pH4~5に再調整し、合計して約2時間にわたり混合物を攪拌混合した。減圧下でさらには高真空下で混合物を蒸発乾固させた。MeOHを用いて固体残渣を摩砕し、固体を濾別し、濾液を蒸発乾固させ、油状固体を得た。分析用HPLCにかけたところ、生成物混合物は、以上の実験と比較して、種々の中間的な部分的に脱保護された化学種のより少ないカルケードを伴って完全に脱保護されたMPA-ゲンタマイシン(R)を含有していることがわかった。この物質を1:1 MeCN-水に溶解させ、分取RP-HPLC(グラジエント: [0.1% TFA/水]中の[0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)/MeCN]の濃度を40分間で0%から75%まで増加させ、次に、60分間まで75%のイソクラティック状態にし、次に、20分間で100%まで増加させた; 流量=10mL/分)により精製し、凍結乾燥後、フロントラン(主要)ピークから、白色固体として所望のゲンタマイシン-MPA(R)(4.8mg)を得た。¹H-NMR: 一致。LR(+)FAB MS: 一致。HR(+)FAB MS: 計算値 M+H 880.4555、観測値 880.4561。

【0185】

実施例51: (N)の部分的塩基加水分解: 中間体5'-[(N^{2'}, N³, N^{6'}-トリ-t-ブトキシカルボニル-ゲンタマイシン[C1a]-N¹-カルボニル-オキシ)-イソプレニル]-MPA[OMEM]メチルエステルコンジュゲート(Q)の単離

さらに他の実験では、先に述べたのと同じように、200 μLのDMF中の1.0mgの(N)を100 μLの水中の2mgのLiOHで処理し、追加の20 μLの水で希釈して、清澄な溶液を得た。分析用HPLCにかけたところ、中間体(Q)はかなり急速に形成されるが、(P)に至る反応は非常に遅いことがわかった。室温で一晩攪拌した後、先に述べたように反応を停止させて仕上げ処理を行い、先に述べたような方式で半分取HPLCにより精製した。生成物[tR 約22 1/2分]を含有するピーク部分を収集し、凍結乾燥させ、部分的に脱保護された中間体(Q)(<0.5mg)を得た。¹H-NMR: 一致。

【0186】

実施例52: 保護されたゲンタマイシン-MPAコンジュゲート(アミド結合)5'-[(N^{2'}, N³, N^{6'}-トリ-t-ブトキシカルボニル-N^{3''}-トリフルオロアセチル-ゲンタマイシン[C1a]-N¹-テレフタロイル)-アミノ-イソプレニル]-MPA[OMEM]メチルエステルコンジュゲート(S)の調製

15g(73.8mmol)のテレフタロイルクロリドに300mLのジクロロメタンを添加した。アルゴン雰囲気下、0°Cで混合物を10分間攪拌した。反応混合物に30g(0.26mol)のN-ヒドロキシスクシンイミドを添加し、続いて、0°Cで30mL(0.22mol)のトリエチルアミンを滴下した。混合物に室温で加温し、次に、室温で2日間攪拌した。固体を濾別し、残渣を200mLのジクロロメタンで洗浄した。残渣を300mLのジクロロメタン中に懸濁させ、10分間攪拌した。固体を濾過し、乾燥させ、白色の粉末として24.12g(66.9mmol、91%)の生成物(テレフタル酸の1,4-ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)を得た。

【0187】

テレフタル酸の1,4-ジ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル64.5mgに6mLの無水DMFを添加し、ジ-N-ヒドロキシスクシンイミド(ジ-NHS)エステル溶液を作製した。他のフラスコに、64.5mg(0.17mmol)の(Z1)、6mLの無水DMF、および128 μL(0.89mmol)のトリエチルアミンを添加した。このゲンタマイシンアミン溶液をアルゴン雰囲気下でジ-NHSエステル溶

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

CH_2Cl_2 ($2 \times 150\text{mL}$)で抽出した。有機抽出物を蒸発させて、 1.29g (エチルアセテート層から)および 0.61g (CH_2Cl_2 層から)の白色固体を得た。合わせた固体を、穏やかに加温しながら(約 30°C)、 2% DMFを含有する 500mL のエチルアセテートに溶解させ、飽和水性 NaHCO_3 を加えて30分間攪拌した。有機層を単離し、再び飽和水性 NaHCO_3 を加えて30分間攪拌した。次に、有機層を脱水し(Na_2SO_4)、蒸発させ、濾過し、真空下で乾燥させ、 1.61g の所望のNHSエステル(W)を得た。 $^1\text{H-NMR}$: 一致。LR(+) APCI MS : $436(\text{M}+\text{H})$ 。マイクロ分析: $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6 \cdot 1/10 \text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ に対する計算値: C 63.27; H 4.95; N 9.46%、観測値: C 63.25; H 4.98; N 9.46%。

【0192】

実施例56: 5'-[(フェニトイン-3-ブチルアミド)-イソプレニル]-MPA[OMEM]メチルエステルコンジュゲート(X)の調製

37mg (0.073mmol)のMPA-5'-イソプレニルアミン(B)(実施例45で得られたもの)を 5mL の無水DMFに溶解させた溶液に、 $200\mu\text{L}$ のトリエチルアミンを添加した。 52mg (0.12mmol)のフェニトイン-3-酪酸NHSエステル(W)(実施例55で得られたもの)を 1mL の無水DMFに溶解させた溶液を、反応混合物に滴下した。得られた溶液を室温で18時間攪拌し、次に、減圧下で濃縮乾固させた。ヘキサン中の 50% エチルアセテートを用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより残渣を精製し、いくつかの不純物を含有する所望の生成物 48mg を得た。エチルアセテート中の 5% ヘキサンを用いて分取層クロマトグラフィー($20 \times 20\text{cm} \times 0.2\text{cm}$ シリカ厚さのプレート)により混合物を再精製し、 26mg (0.031mmol , 61%)の保護されたコンジュゲート(X)を得た。 $^1\text{H-NMR}$: 一致。LC/MS: $\text{M}+\text{H}$ 826.3 。

【0193】

実施例57: フェニトイン-MPAコンジュゲート5'-[(フェニトイン-3-ブチルアミド)-イソプレニル]-MPAコンジュゲート(Y)の調製

22mg (0.026mmol)の保護されたコンジュゲート(X)(実施例56で得られたもの)に 4.5mL のメタノールおよび 2mL の水を添加し、続いて、 100mg の水酸化リチウム一水和物を添加した。混合物を室温で72時間攪拌し、次に、減圧下で濃縮した。残渣に 1mL の水を添加し、希リン酸(1mL の $85\% \text{H}_3\text{PO}_4$ を 9mL の水に加えたもの)を用いて反応混合物のpHを6に調整した。得られた反応混合物を減圧下で濃縮乾固させた。残渣を 15mL のメタノールで摩砕し、無機固体を濾別した。濾液を濃縮し、ヘキサン中の 50% エチルアセテートを用いて分取薄層クロマトグラフィー($20 \times 20\text{cm} \times 0.025$ シリカ厚さ)により精製し、 12mg (0.016mmol , 63%)のフェニトイン-MPAコンジュゲート(Y)を得た。 $^1\text{H-NMR}$: 一致。HR-ES(+) MS: $\text{M}+\text{Na}$ に対する計算値 746.3048 、観測値 746.3044 。

【0194】

実施例58: フェニトインおよびゲンタマイシンのアッセイ

フェニトインおよびゲンタマイシンのアッセイは、HITACHI 917を用いて次のように行った。 $3\mu\text{L}$ のサンプルをキュベットに添加し、 $150\mu\text{L}$ の抗体試薬を添加し、混合し、 37°C で5分間インキュベートし、次に、 $150\mu\text{L}$ の酵素試薬は添加し、混合した。抗体試薬の添加後、 340nm の吸光度変化を9~10分間モニターした。既知量のフェニトインまたはゲンタマイシンを含有する標準を用いて検量線を作成した。フェニトインまたはゲンタマイシンに対する値は、HITACHI 917アナライザーにより計算した。方法の比較試験のために、Roche INTEGRAフェニトインまたはゲンタマイシン校正物質およびRoche INTEGRA FPフェニトインまたはゲンタマイシン試薬カセットを、Roche INTEGRA 700アナライザーと共に使用した。Passing/Bablok回帰統計を使用した。患者サンプルは血漿であった。酵素試薬および抗体試薬の組成を以下に記載する。

【表 1 4】

酵素試薬処方	
Tris	100 mM
KCL	100 mM
IMP	80 mM
TCEP	4 mM
EDTA	6 mM
フェニトイン-イソプレニル-MPA (ラセミ体) または ゲンタマイシン-イソプレニル-MPA (ラセミ体) 誘導体	1.47 μ M
SUTTOCID E A	4 mM
MAB	0.1 mg/mL
IMPDH-II	反応速度を調整する
pH 8.0	

10

抗体試薬処方	
NAD	1 mM
SUTTOCID E A	4 mM
NP-40	0.175%
pH 6.0	

20

【図面の簡単な説明】

【0195】

【図1】 ミコフェノール酸の構造と、リガンド-阻害剤コンジュゲートであるMPA-MPA(ビス-MPA)の構造と、を示す図である。

【図2】 本発明に従ってチロキシン含有サンプルをアッセイした実施例20で得られた結果をプロットすることにより作成したグラフである。チロキシンの濃度をX軸にプロットし、340nmにおける Δ (または終点)吸光度をY軸にプロットしてある。

30

【図3】 本発明に従ってジゴキシゲニン含有サンプルをアッセイした実施例23で得られた結果をプロットすることにより作成したグラフである。ジゴキシゲニンの濃度をX軸にプロットし、340nmにおける Δ (または終点)吸光度をY軸にプロットしてある。

【図4】 本発明に従ってジゴキシゲニン含有サンプルをアッセイした実施例26で得られた結果をプロットすることにより作成したグラフである。ジゴキシゲニンの濃度をX軸にプロットし、340nmにおける吸光度の変化をY軸にプロットしてある。

【図5】 本発明に従ってテオフィリン含有サンプルをアッセイした実施例29で得られた結果をプロットすることにより作成したグラフである。テオフィリンの濃度をX軸にプロットし、340nmにおける吸光度の変化をY軸にプロットしてある。

【図6】 実施例4、5、6、および7に記載されている5'-イソプレニル[OH]-MPA[OMEM]メチルエステルの調製を示す図である。

40

【図7】 実施例8、9、および10に記載されている5'-[イソプレニルオキシカルボニルアミノエチレンアミド]-チロキシン(N-tBoc)]-MPA[OMEM]メチルエステルコンジュゲートの調製を示す図である。

【図8】 実施例9に記載されているL-チロキシン(N-tBoc)-アミドエチレンアミンの調製を示す図である。

【図9】 実施例11および12に記載されている5'-[(イソプレニルオキシカルボニルアミノエチレンアミド)-チロキシン]-MPAコンジュゲートの調製を示す図である。

【図10】 実施例13、14、および15に記載されている5'-カルボキシメチル-MPA t-ブチルエステルの調製を示す図である。

50

【図 1 1】実施例 16 に記載されている 5'-(ジゴキシゲニン-3-イル-β-アミドメチル)-MPA t-ブチルエステルコンジュゲートの調製を示す図である。

【図 1 2】実施例 17 に記載されている 5'-(ジゴキシゲニン-3-イル-β-アミドメチル)-MPA コンジュゲートの異性体 A および異性体 B の調製を示す図である。

【図 1 3】実施例 31 および 32 に記載されている 4'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPA の調製を示す図である。

【図 1 4】実施例 31 および 32 に記載されている 4'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPA の調製を示す図である。

【図 1 5】実施例 33 に記載されている 5'-[(テオフィリン-8-ブチルアミドエチルアミノカルボニルオキシ)-イソプレニル]-MPA[OMEM]メチルエステルコンジュゲートの調製を示す図である。 10

【図 1 6】実施例 35 に記載されている 5'-[(テオフィリン-8-ブチルアミドエチルアミノカルボニルオキシ)-イソプレニル]-MPA の調製を示す図である。

【図 1 7】実施例 36、37、38、および 39 に記載されている 5'-(スクシンイミド-N-オキシ)カルボニルメチル-MPAメチルエステルの調製を示す図である。

【図 1 8】実施例 40 および 41 に記載されている 5'-[(ジゴキシゲニン-3-イル)-オキシメチルカルボニル-DAD00-カルボニルメチル]-MPA の調製を示す図である。

【図 1 9】実施例 44 および 45 に記載されている MPA[OMEM]-5'-イソプレニルアミンメチルエステル(B)の調製を示す図である。

【図 2 0】実施例 46 に記載されている MPA[OMEM]-5'-イソプレニルアミン(C)を経由する MP 20 A[OMEM]-5'-イソプレニルアミンメチルエステル(B)から MPA-5'-イソプレニルアミン(D)への脱保護を示す図である。

【図 2 1】実施例 47 に記載されている 5'-[[[(ジゴキシ(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボニル]アミノ]イソプレニル]-MPAコンジュゲート(H)の調製を示す図である。

【図 2 2】実施例 48 に記載されている 5'-[[[(ジギトキシ(1,4-オキサゼピン))-4-イル]-フェニル-4-カルボニル]アミノ]イソプレニル]-MPAコンジュゲート(L)の調製を示す図である。

【図 2 3 a】実施例 49、50、および 51 に記載されている 5'-[(ゲンタマイシン[C1a]-N¹-カルボニルオキシ)-イソプレニル]-MPAコンジュゲート(R)の調製を示す図である。 30

【図 2 3 b】実施例 49、50、および 51 に記載されている 5'-[(ゲンタマイシン[C1a]-N¹-カルボニルオキシ)-イソプレニル]-MPAコンジュゲート(R)の調製を示す図である。

【図 2 4 a】実施例 52、53、および 54 に記載されている 5'-[(ゲンタマイシン[C1a]-N¹-テレフタロイル)-アミノ-イソプレニル]-MPAコンジュゲート(アミド結合、U)の調製を示す図である。

【図 2 4 b】実施例 52、53、および 54 に記載されている 5'-[(ゲンタマイシン[C1a]-N¹-テレフタロイル)-アミノ-イソプレニル]-MPAコンジュゲート(アミド結合、U)の調製を示す図である。

【図 2 5】実施例 55、56、および 57 に記載されている 5'-[(フェニトイン-3-ブチルアミド)-イソプレニル]-MPAコンジュゲートの調製を示す図である。 40

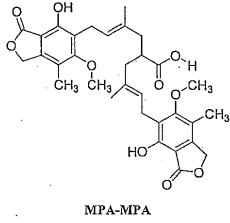
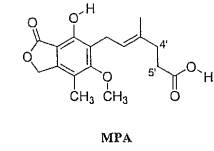
【図 2 6】実施例 58 に記載されている患者サンプル中のフェニトインを定量するアッセイの能力を蛍光偏光法と比較して示す図である。

【図 2 7】実施例 58 に記載されている患者サンプル中のゲンタマイシンを定量するアッセイの能力を蛍光偏光法と比較して示す図である。

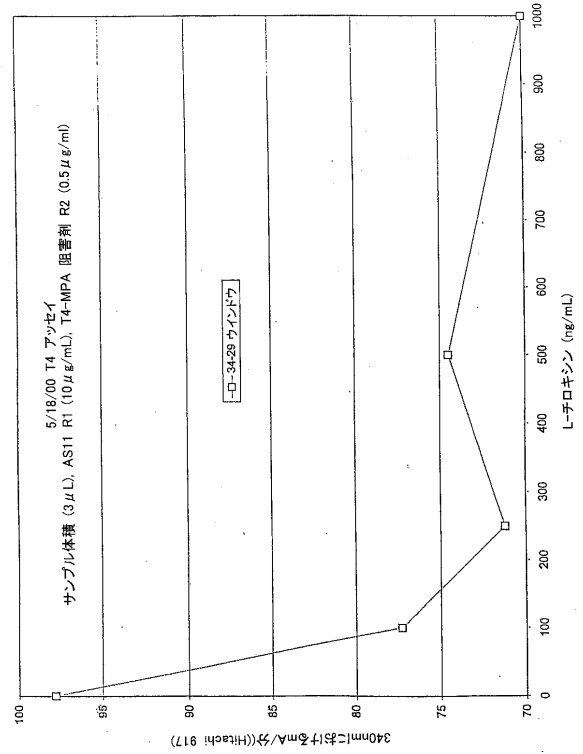
【図 2 8】実施例 5A に記載されている MPA-イソプレニルアルコール(ラセミ体、3A)の調製を示す図である。

【図 2 9】実施例 5B に記載されている MPA-イソプレニルアルコール(キラルな R エナンチオマー、3B)の調製を示す図である。

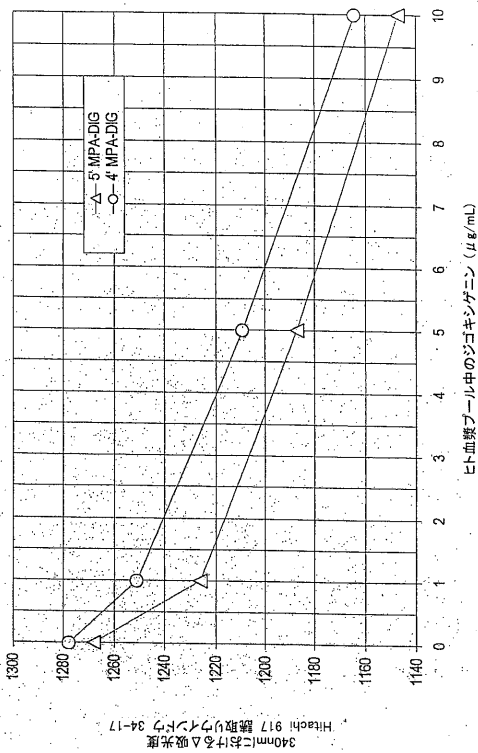
【図 1】



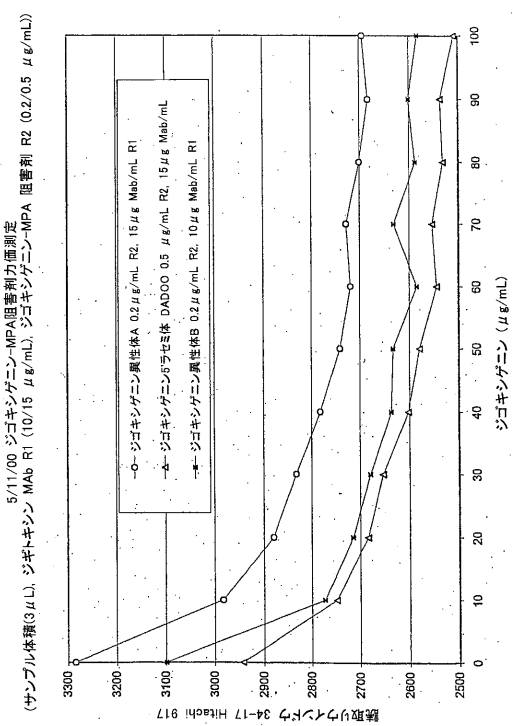
【図 2】



【図 3】

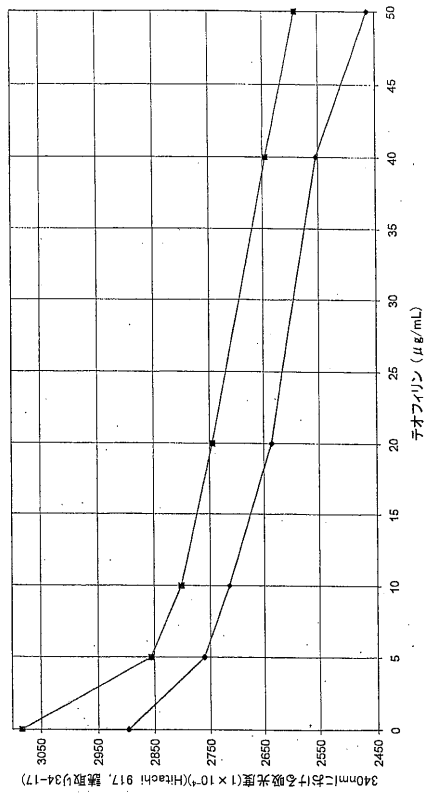


【図 4】

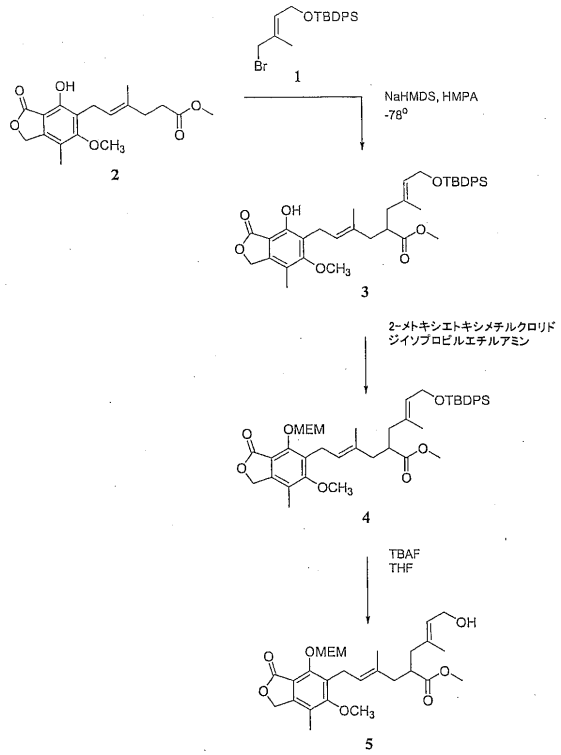


【図 5】

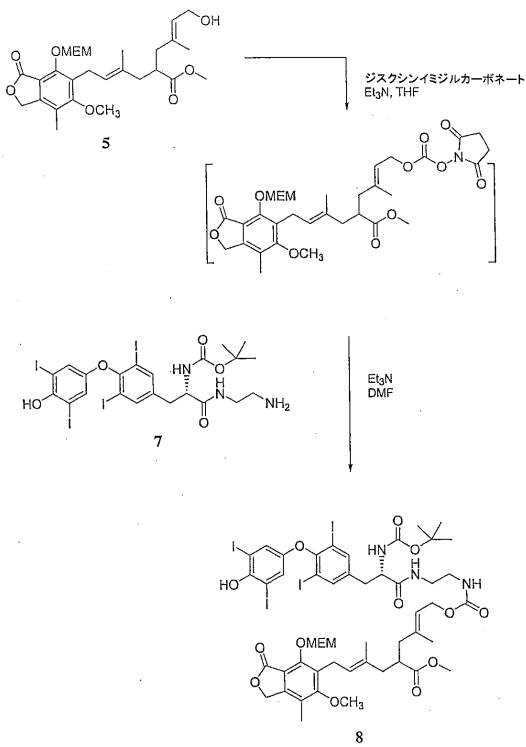
チオフィリンアッセイ 8/12/00 15MAB R2 25 MAB R2 阻害剤 (0.5 μg/ml), サンプル体積(3 μL)



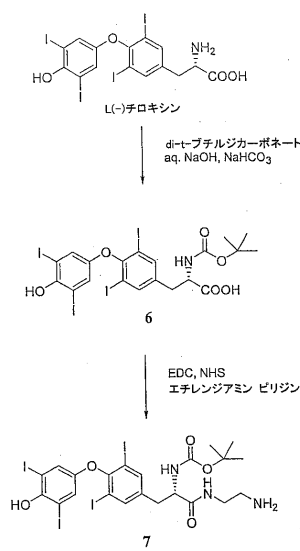
【図 6】



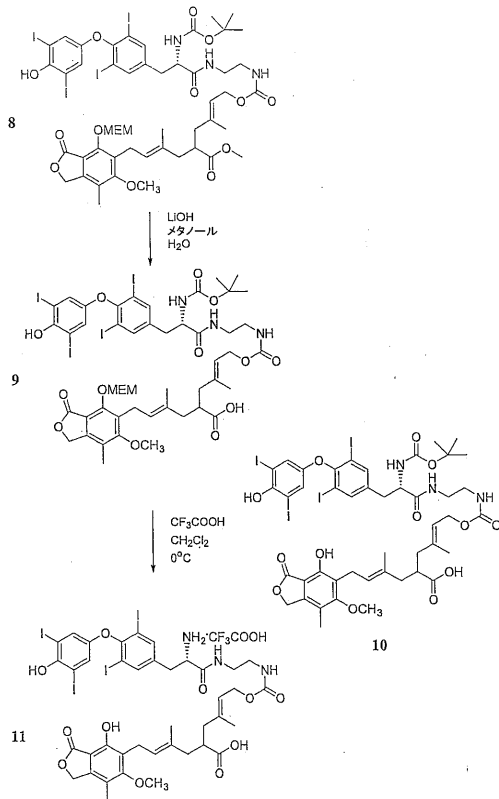
【図 7】



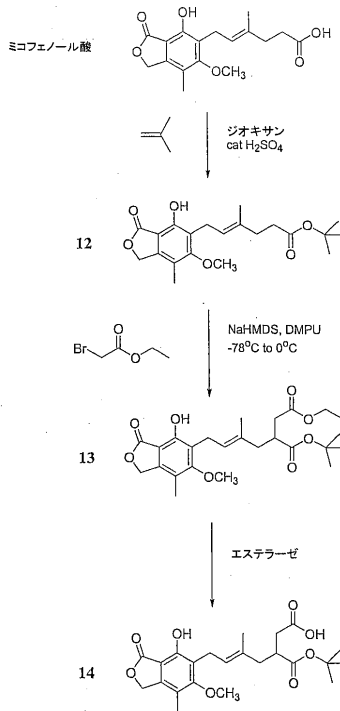
【図 8】



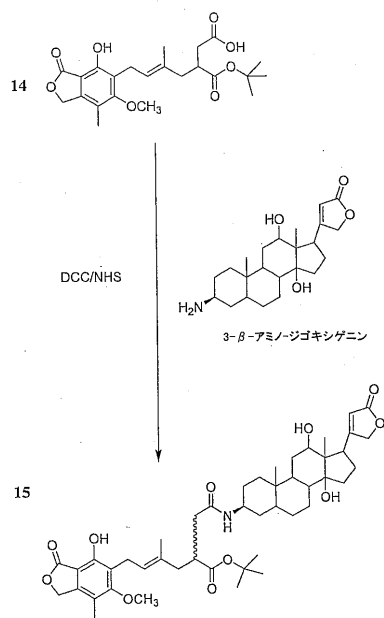
【図 9】



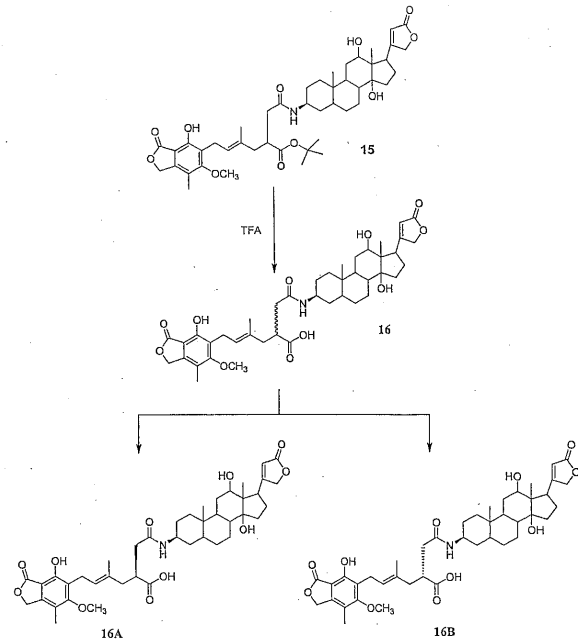
【図 10】



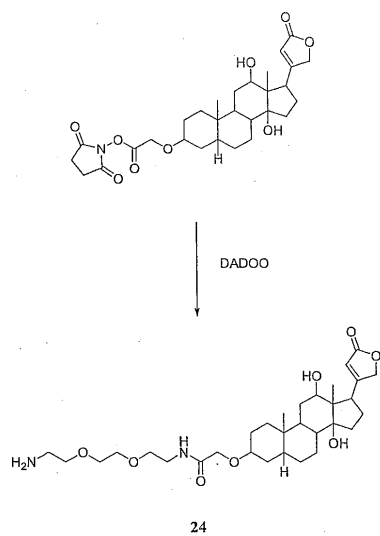
【図 11】



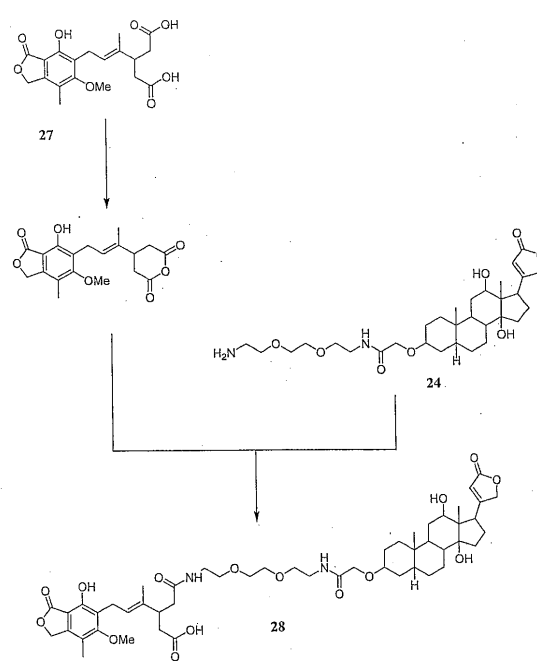
【図 12】



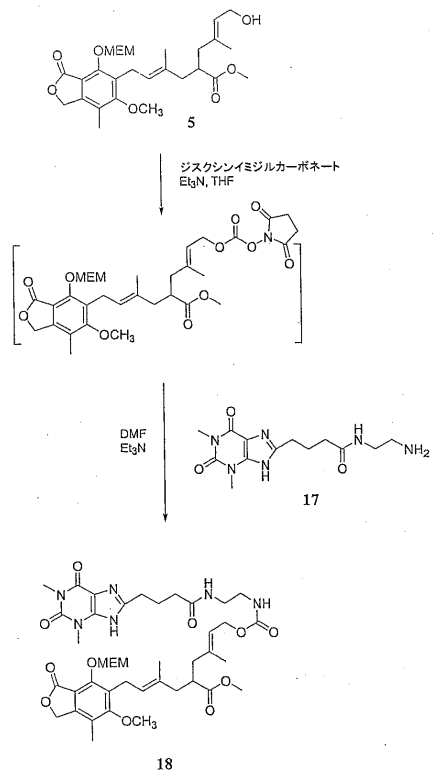
【図 13】



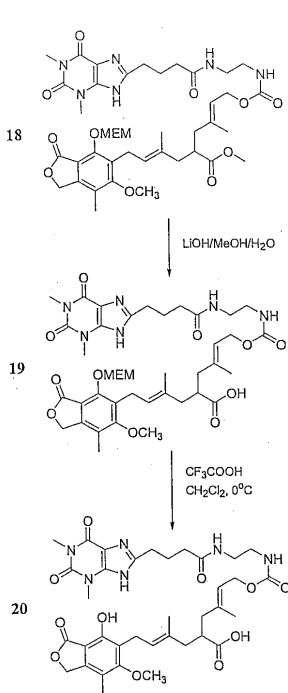
【図 14】



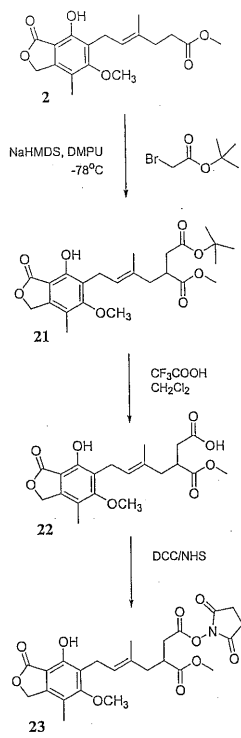
【図 15】



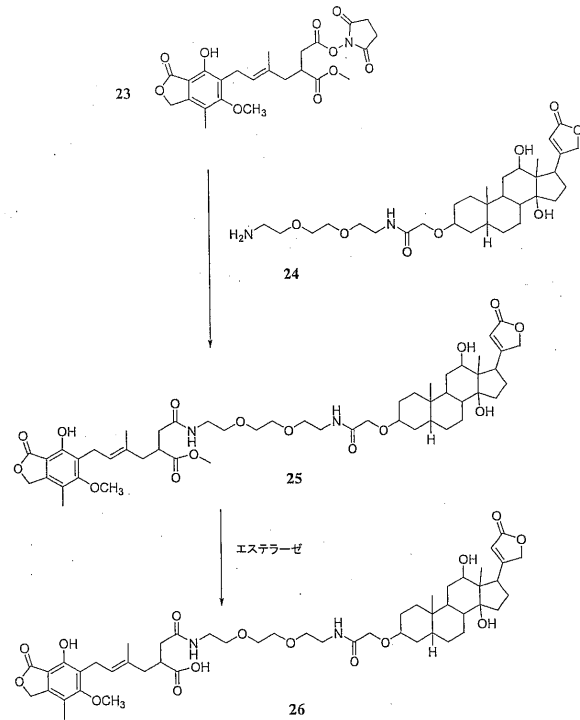
【図 16】



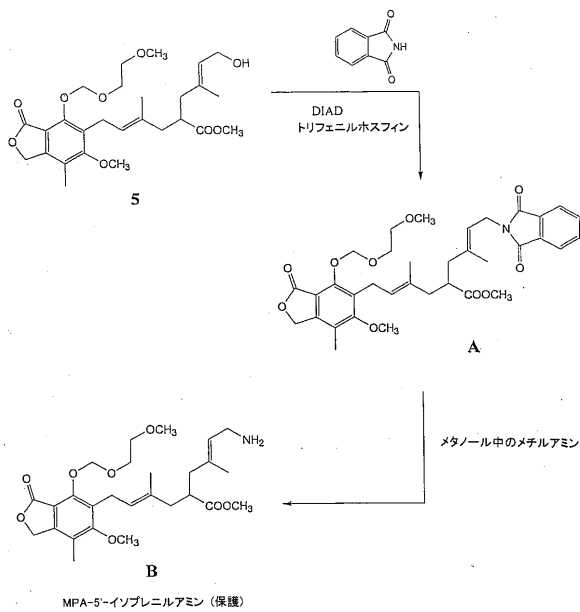
【図 17】



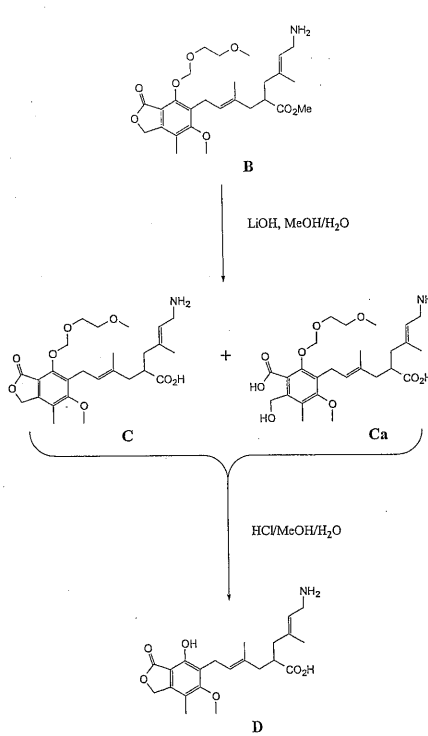
【図 18】



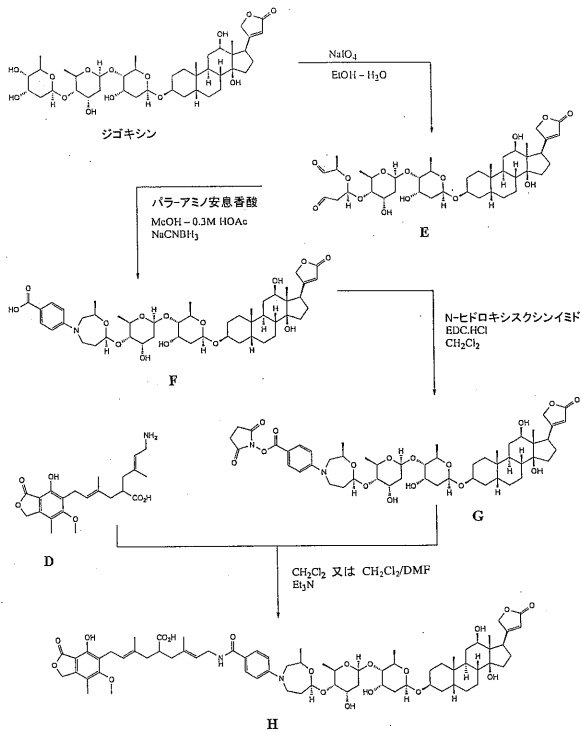
【図 19】



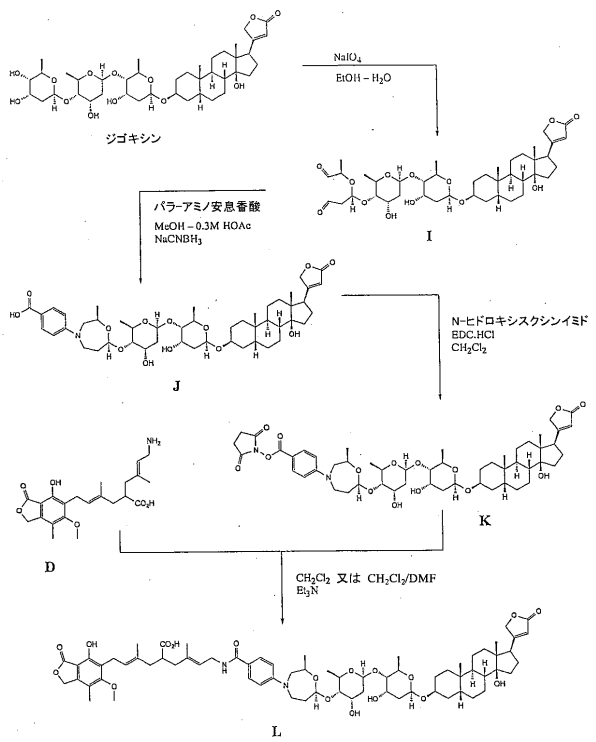
【図 20】



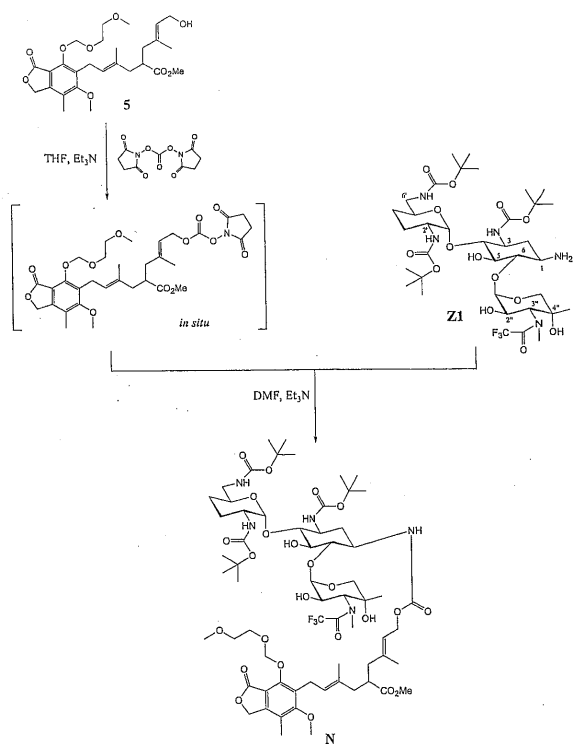
【図 2 1】



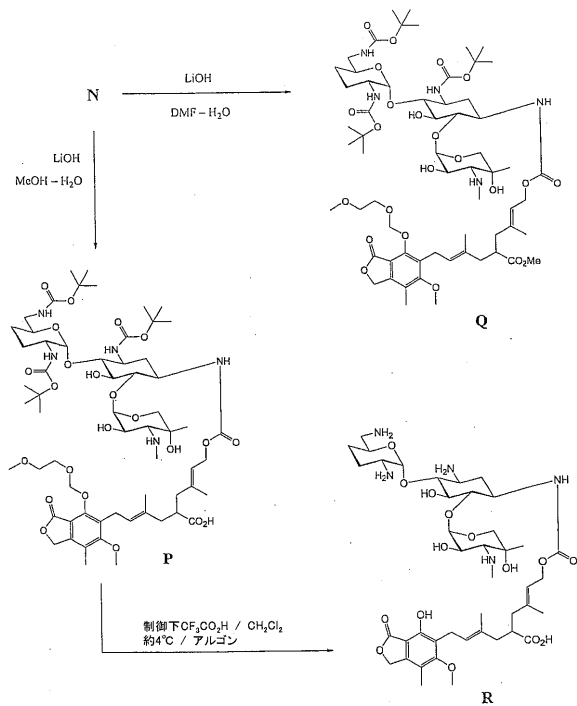
【図 2 2】



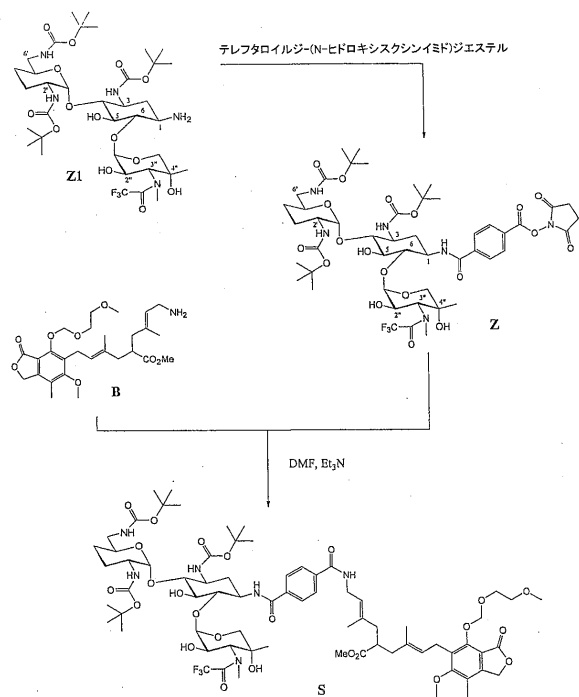
【図 2 3 a】



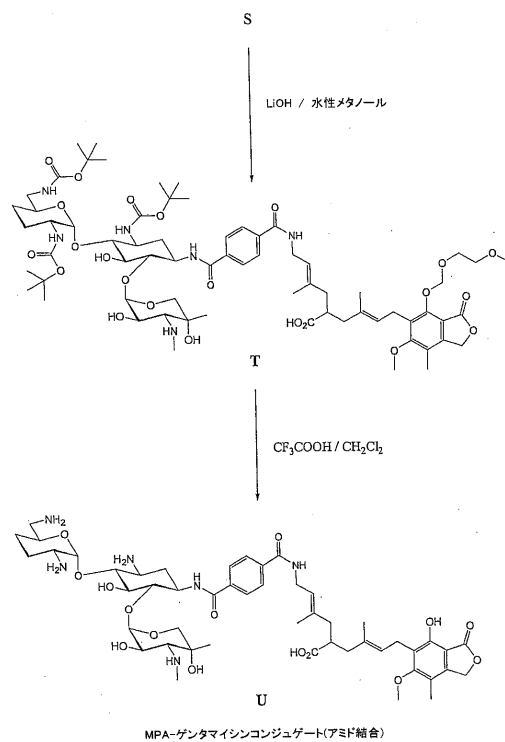
【図 2 3 b】



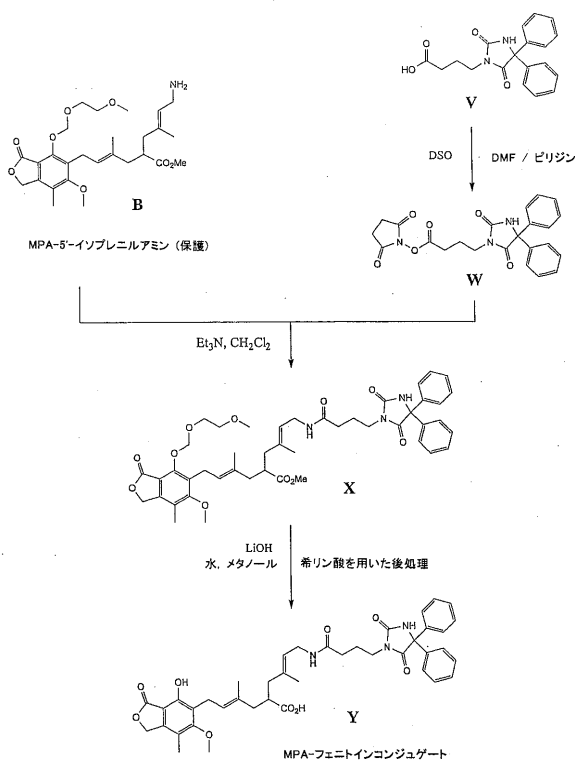
【図 24 a】



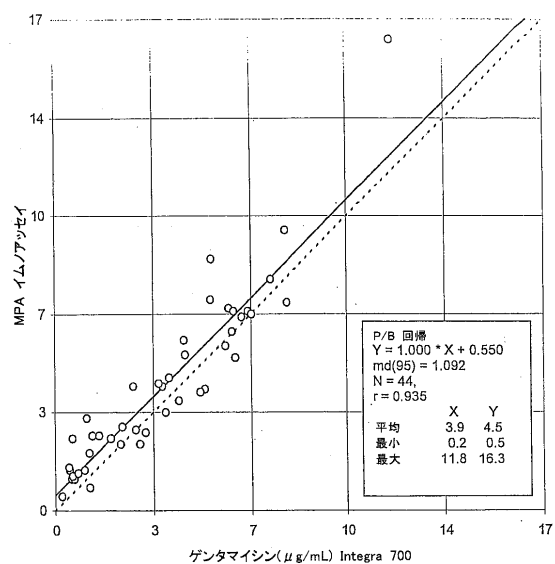
【図 24 b】



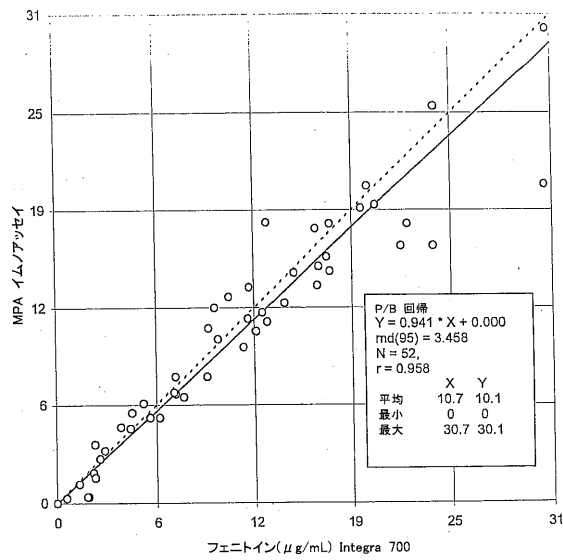
【図 25】



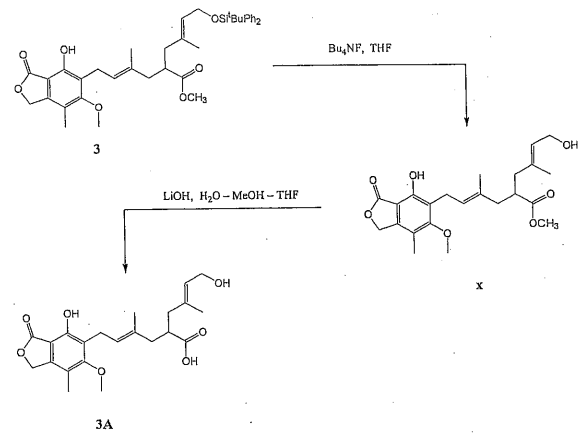
【図 26】



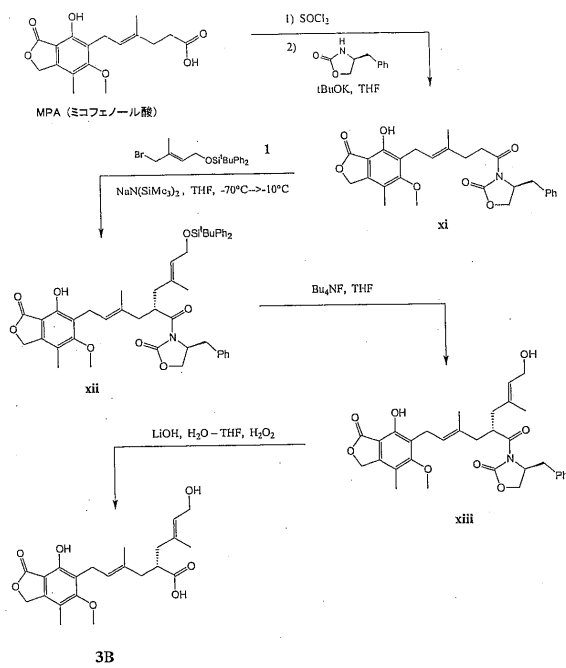
【図 27】



【図 28】



【図 29】



フロントページの続き

- (72)発明者 ミタリ ゴーシャル
アメリカ合衆国 46060 インディアナ州, ノーブルズビル, パークショア ドライブ 10
153
- (72)発明者 ジェラルド シグラ
アメリカ合衆国 46033 インディアナ州, カメル, アイアンウッド ドライブ 888
- (72)発明者 レイモンド エー. ファ
アメリカ合衆国 46250 インディアナ州, インディアナポリス, カングスホルム ドライブ
9346 アpartment ビー
- (72)発明者 ロナルド ホーリー
アメリカ合衆国 94041 カリフォルニア州, マウンテン ビュー, パロ アルト アベニュー
549 1/2
- (72)発明者 エヴァー ハース
ドイツ連邦共和国 81476 ミュンヘン, ツィツェルスベルゲルシュトラッセ 13アー
- (72)発明者 エラスムス ジェイ. フーバー
ドイツ連邦共和国 89623 フィニンゲ, ツァンクト ヴィリバルド 10
- (72)発明者 ジョーン ダブリュ. パターソン
アメリカ合衆国 94040 カリフォルニア州, マウンテン ビュー, モナルト ドライブ 1
619
- (72)発明者 サルヴァトーレ ジェイ. サラモネ
アメリカ合衆国 08559 ニュージャージー州, ストックトン, ヤード ロード 65
- (72)発明者 アラン ドーン
アメリカ合衆国 46033 インディアナ州, カメル, ダブ ドライブ 14241

【外国語明細書】
2004239894000001.pdf