

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3667753号
(P3667753)

(45) 発行日 平成17年7月6日(2005.7.6)

(24) 登録日 平成17年4月15日(2005.4.15)

(51) Int. Cl.⁷

C O 7 D 493/10

G O 1 N 33/533

F I

C O 7 D 493/10

G O 1 N 33/533

E

請求項の数 14 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願平5-517593
 (86) (22) 出願日 平成5年3月29日(1993.3.29)
 (65) 公表番号 特表平7-505627
 (43) 公表日 平成7年6月22日(1995.6.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1993/002905
 (87) 国際公開番号 W01993/020060
 (87) 国際公開日 平成5年10月14日(1993.10.14)
 審査請求日 平成12年1月7日(2000.1.7)
 審判番号 不服2002-24673(P2002-24673/J1)
 審判請求日 平成14年12月24日(2002.12.24)
 (31) 優先権主張番号 859, 775
 (32) 優先日 平成4年3月30日(1992.3.30)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 596079219
 アボット・ラボラトリーズ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064-
 3500、アボット・パーク、ワン・アボ
 ット・パーク・ロード、チヤド・0377
 /エイ・ピー・6・デー-2
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (72) 発明者 マツテイングリー、フィリップ・ジー
 アメリカ合衆国、イリノイ・60030、
 グレイスレイク、シーフアラー・ドライブ
 ・204

最終頁に続く

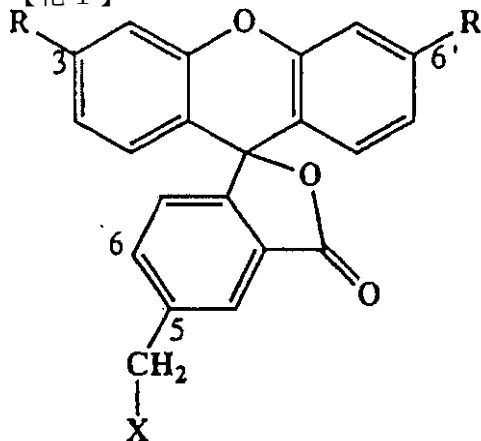
(54) 【発明の名称】 5 (6) -メチル置換のフルオレスセイン誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

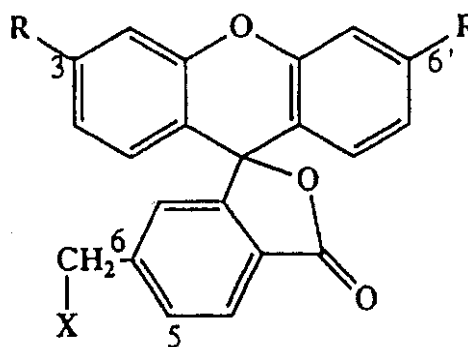
次式：

【化1】



式 I

及び



式 II

[式中、Rはヒドロキシ及び保護ヒドロキシよりなる群から選択され；

Xはヒドロキシ、保護ヒドロキシ、チオール、保護チオール、離脱基、ミハエルアクセプ

タ、ホスホルアミダイト、ホスホネート及び結合基よりなる群から選択され；

X及び／又はRが保護ヒドロキシル基である場合は、該保護ヒドロキシル基はアルキルエステル、アリールエーテル、シリルエーテル、エステル、カーボネート及びカルバメートよりなる群から選択され；

Xが保護チオール基である場合は、該保護チオール基はチオエーテル、チオエステル、チオカーボネート、チオカルバメート及びジスルフィドよりなる群から選択され；

Xが離脱基である場合は、該離脱基はハライド（X＝－Cl、－Br、－I）、スルホネートエステル（X＝－OS（＝O）₂－アルキル、－OS（＝O）₂－アリール）、活性アミノ（X＝－N（アルキル）₃⁺、N₂）よりなる群から選択され；

Xが結合基である場合は、これは式－O－A－Bであり、式中Aは0～50個の炭素原子及び10個以下の異原子よりなる飽和もしくは不飽和の直鎖もしくは分枝鎖状のスペーサ基であり、ただし

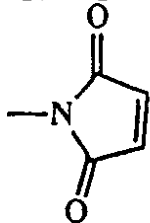
（a）配列－O－A－B中において2個の異原子同士が直接結合することができ、

（b）配列－O－A－Bは－O－O－を有することができず；

（c）分枝鎖は炭素原子にのみ存在することができ；

Bは－C（＝O）OH、－NH₂、－CH（＝O）、ハロ（－Cl、－Br、－I）、スルホネートエステル（－OS（＝O）₂－アルキル、－OS（＝O）₂－アリール）、

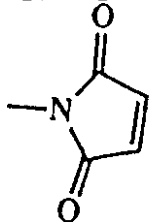
【化2】



ホスホルアミダイト及びホスホネートよりなる群から選択される反応性官能基であり；及び

Xがミハエルアクセプタである場合は、該ミハエルアクセプタは

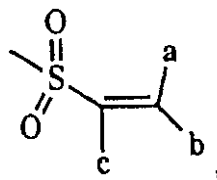
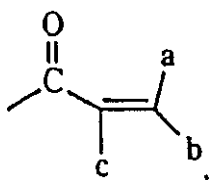
【化3】



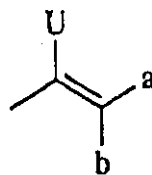
であるか又は式－O－「MA」

〔式中、「MA」は式

【化4】



及び



から選択される基であり；ここで

a、b及びcは独立して水素、アルキル又はアリールであり；

Uは－CH（＝O）、－C（＝O）R、－C（＝O）NH₂、－CN、－NO₂、－S（＝O）R、－S（＝O）₂Rから選択され、nは0若しくは1である]

で表されるフルオレスセイン誘導体。

【請求項2】

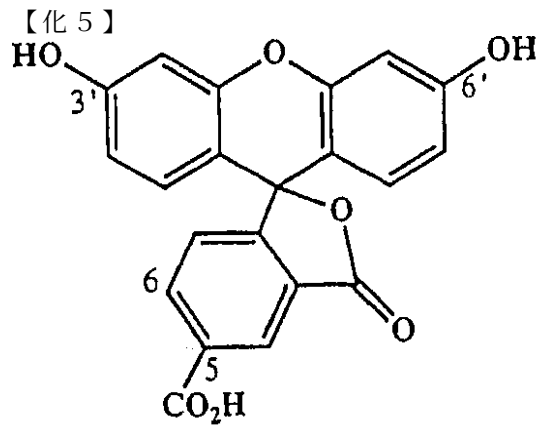
（a）独立して次式ⅠⅠⅠ及びⅠⅣ：

10

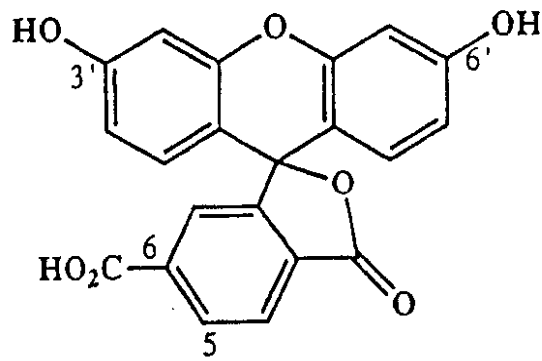
20

30

40

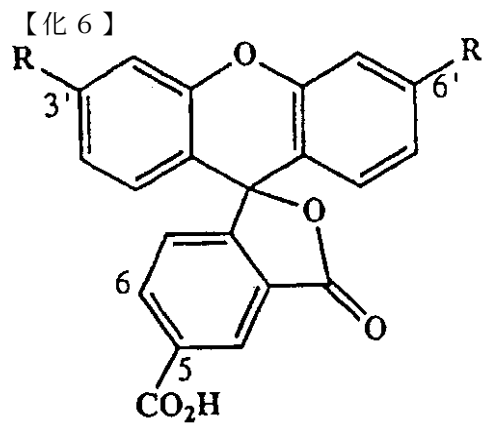


式 III

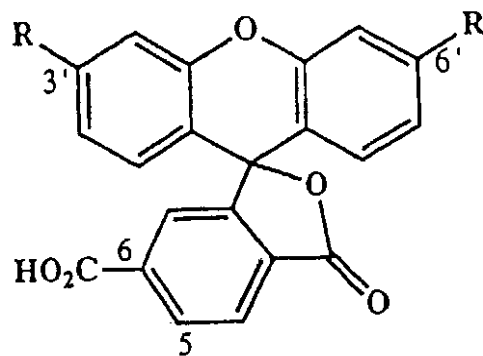


式 IV

の化合物の又は混合物として該化合物の 3' 及び 6' 位置におけるヒドロキシルを保護して次式 V 及び V I :



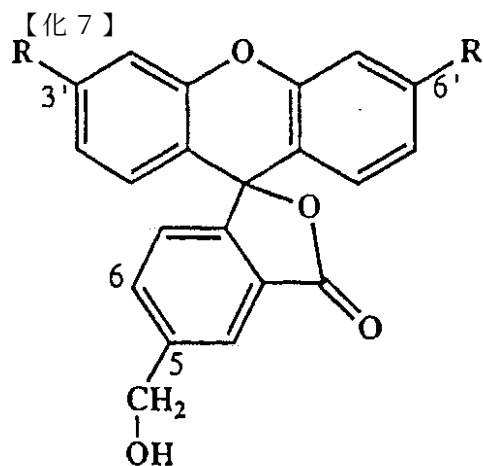
式 V



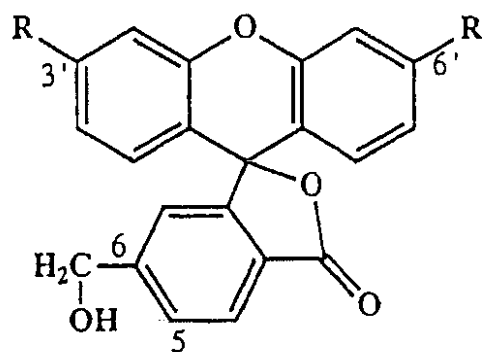
式 VI

[式中、R はヒドロキシ及び保護ヒドロキシよりなる群から選択される]
の化合物を生成させ；

(b) 式 V 及び V I の化合物のカルボン酸基を還元して次式 V I I 及び V I I I :



式 VII



式 VIII

の化合物を生成させ；

(c) 式 V I I 及び V I I I の化合物の位置 3' 及び 6' におけるヒドロキシル基を保護

10

20

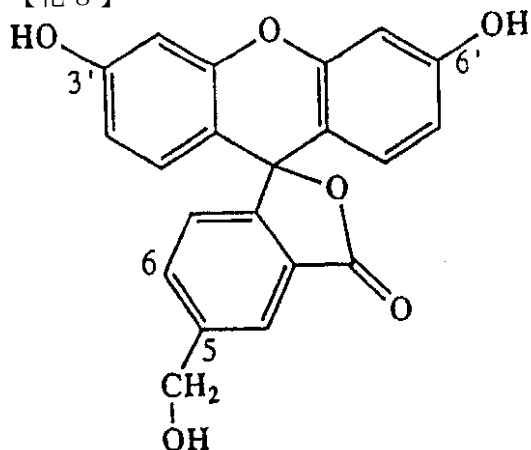
30

40

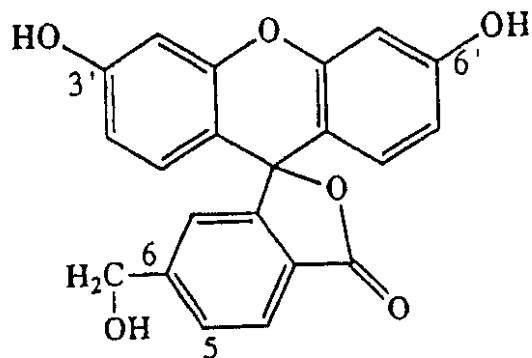
50

解除して式XVII若しくはXVIII

【化8】



式 XVII



式 XVIII

の化合物を生成させる

ことを特徴とする、請求項1に記載の5（6）-メチルー置換フルオレスセイン誘導体の製造方法。

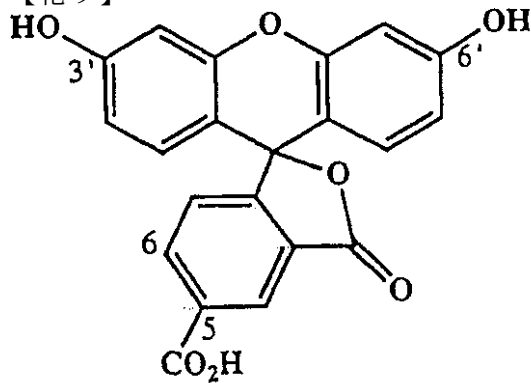
【請求項3】

式VII及びVIIIの化合物が両者の混合物として得られる場合に、式VII及びVIIIの異性体を工程（b）の後にクロマトグラフ分離して前記式VII及びVIIIの精製異性体を得る、請求の範囲第2項に記載の方法。

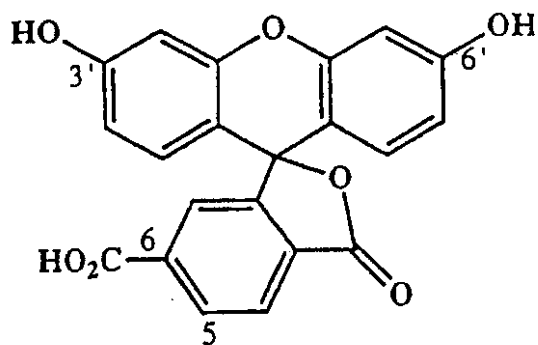
【請求項4】

（a）独立して次式III及びIV：

【化9】



式 III



式 IV

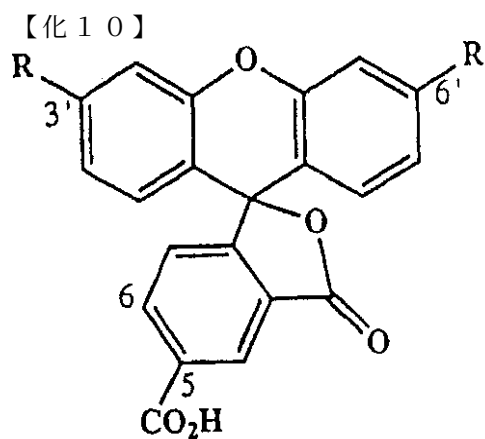
の化合物の又は混合物として該化合物の3'及び6'位置におけるヒドロキシルを保護して次式V及びVI：

10

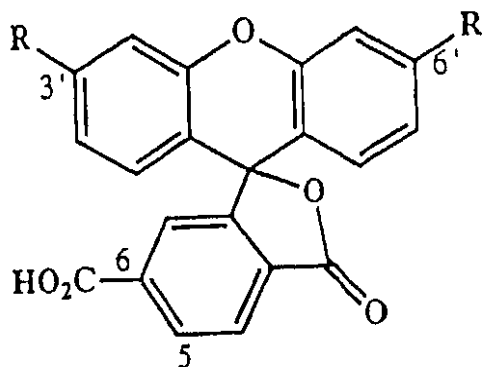
20

30

40



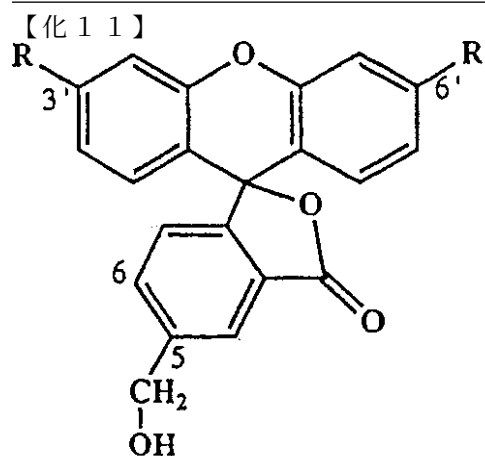
式 V



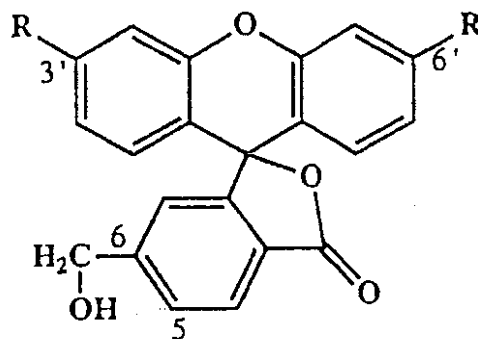
式 VI

〔式中、Rはヒドロキシ及び保護ヒドロキシよりなる群から選択される〕
の化合物を生成させ；

(b) 式V及びVIの化合物のカルボン酸基を還元して次式VII及びVIII：



式 VII



式 VIII

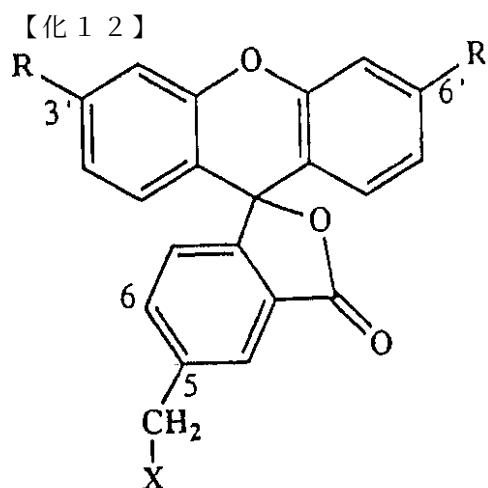
の化合物を生成させ；

(c) 式VII及びVIIIの化合物のヒドロキシル部分を独立して又は混合物として離脱基に変換させて式IX若しくはX：

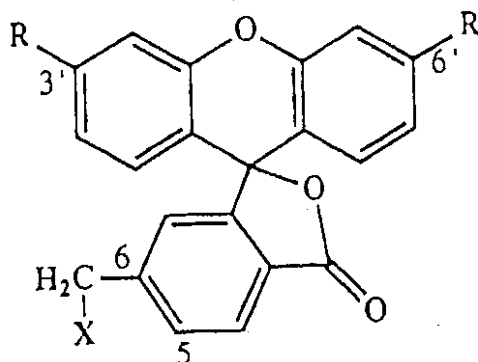
10

20

30



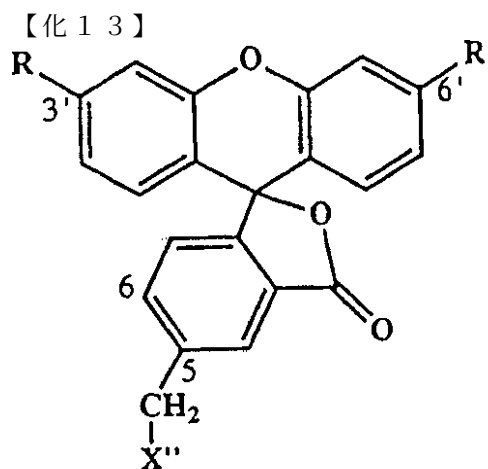
式 IX



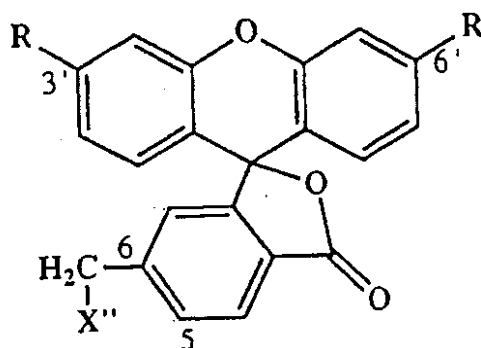
式 X

の化合物を生成させ；

(d) 離脱基 X を求核性「プロ」アミノ、「プロ」チオール及びナトリウムスルフヒドリド基よりなる群から選択される置換基で置換して、式 XI 及び XII



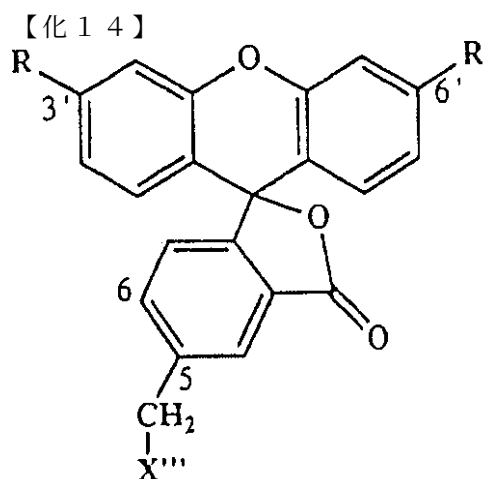
式 XI



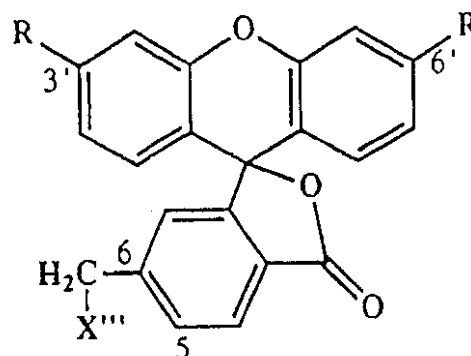
式 XII

[式中、X'' = 「プロ」アミノ、「プロ」チオール基若しくはチオールである]
の化合物を生成させ；

(e) 式 XI 若しくは XII の化合物における X'' 基を変換させて式 XIII 若しくは XIV



式 XIII

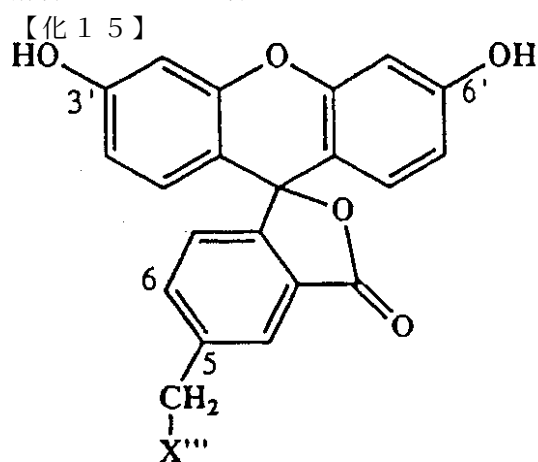


式 XIV

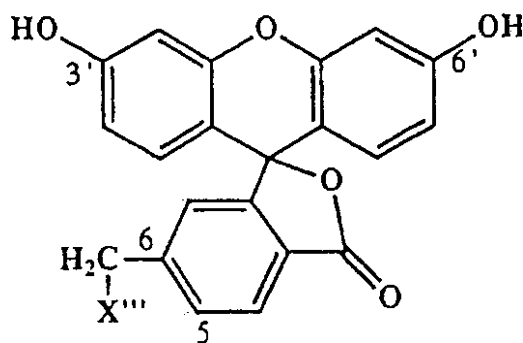
[式中、X' ' ' = NH₂若しくはSHである]

の化合物を生成させ；

(f) 式X I I I及びX I Vの化合物の位置3'及び6'におけるヒドロキシル基を保護解除して式X V若しくはX V I：



式 XV



式 XVI

[式中、X' ' ' = NH₂若しくはSHである]

の化合物を生成させる工程を行なって、式X V又は式X V Iの化合物を生成させることを含む、請求項1に記載の5（6）-メチル-置換フルオレスセイン誘導体の製造方法。

【請求項5】

式V I I及びV I I Iの化合物が両者の混合物として得られる場合に、式V I I及びV I I Iの異性体を工程（b）の後にクロマトグラフ分離して前記式V I I及びV I I Iの精製異性体を得る工程を更に含む、請求の範囲第4項に記載の方法。

【請求項6】

前記求核性「プロ」アミノ基がジカルボキシイミド陰イオン、イミノジカーボネート陰イオン、スルホンアミド陰イオン、スルホンイミド陰イオン、O-置換ヒドロキシルアミン、O-置換ヒドロキサム酸陰イオン、アジド陰イオン、シアニド陰イオン、イソシアネート陰イオン及びイソチオシアネート陰イオンよりなる群から選択される、請求の範囲第4項又は第5項に記載の方法。

【請求項7】

前記ジカルボキシイミド陰イオンが式

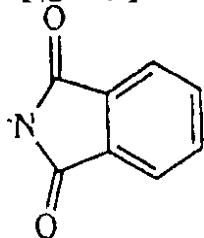
10

20

30

40

【化 1 6】



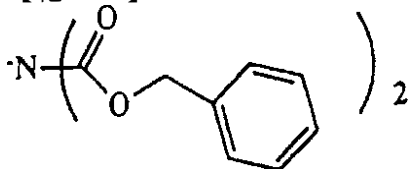
のフタルイミド陰イオンである、請求の範囲第 6 項に記載の方法。

【請求項 8】

10

前記イミノジカーボネート陰イオンが式

【化 1 7】



のジベンジルイミノジカーボネート陰イオンである、請求の範囲第 6 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記スルホンアミド陰イオンが $-N(H)_n$ (アルキル、アリール、アルケニル、アシル) $_{2-n} S(=O)_2$ (アルキル、アリール、アルケニル) よりなる群から選択され、ここで $n = 0 \sim 2$ であり；

前記スルホンイミド陰イオンが $-N(S(=O)_2)$ (アルキル、アリール及びアルケニル) $_2$ よりなる群から選択され；

前記 O -置換ヒドロキシルアミンが NH_2O (アルキル、アリール及びアシル) よりなる群から選択され；

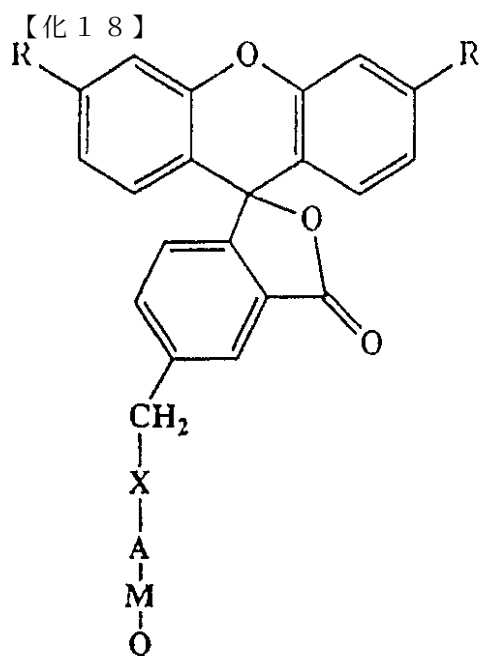
前記 O -置換ヒドロキサム酸陰イオンが $-N(アシル)O$ (アルキル、アリール及びアシル) よりなる群から選択される、請求の範囲第 6 項に記載の方法。

【請求項 10】

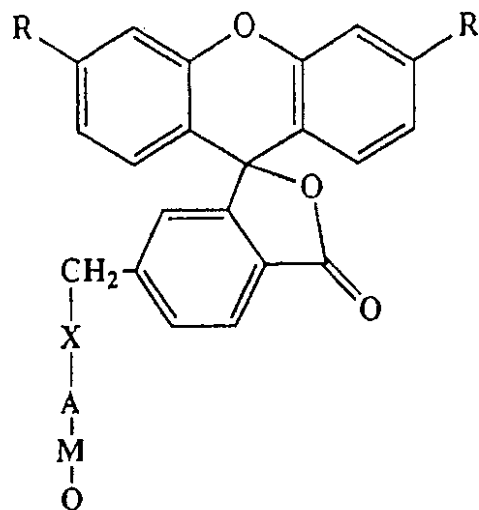
前記「プロ」チオール基がチオ尿素、ナトリウム N, N -ジメチルチオカルバメート、チオサルフェート陰イオン及びジスルフィド陰イオンよりなる群から選択される、請求の範囲第 4 項又は第 5 項に記載の方法。

【請求項 11】

次式 XIX 若しくは XX ：



式 XIX



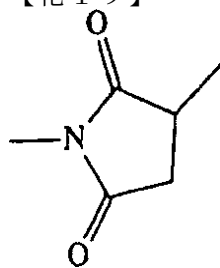
式 XX

〔式中、Rは請求の範囲第1項で定義されたとおりであり、Xは－O－若しくは－S－よりなる群から選択され；

Aは0～50個の炭素原子及び10個以下の異原子よりなる飽和もしくは不飽和の直鎖もしくは分枝鎖状のスペーサ基であり、ただし配列－X－A－M－Q中において2個の異原子同士が直接結合し得、配列－X－A－M－Qは－O－O－を有することができず、さらに分枝鎖は炭素原子にのみ存在することができ；

Mは＜C（＝O）、－NH－、－O－C（＝O）－、－N（H）－C（＝O）－、－N（H）－C－（＝S）－、－S－、－P（＝O）（O－）－及び

【化 19】



から選択される結合基であり；

Qはタンパク質、ペプチド、アミノ酸、DNAもしくはRNAプローブ配列、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬物、官能化ポリマー（可溶性及び不溶性の両者）、ハプテン、及びポリ塩素化ビフェニルからなる群より選択される〕
のフルオレスセイン結合体。

【請求項12】

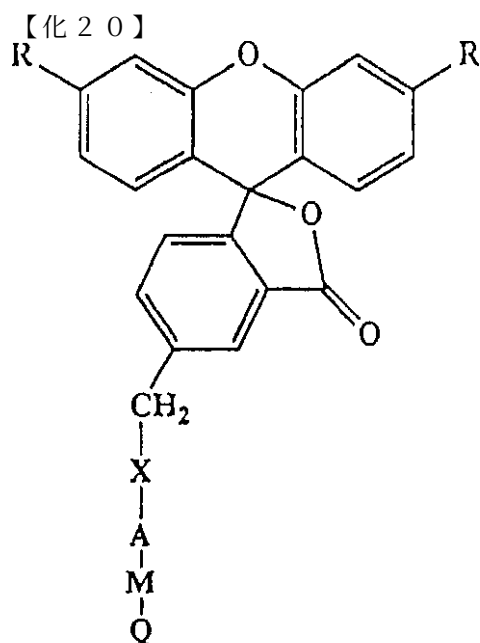
試験試料を、式XIX若しくはXX：

10

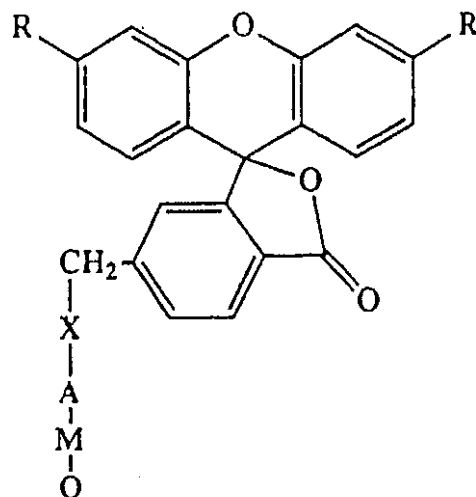
20

30

40



式 XIX



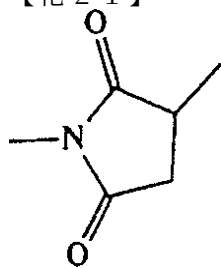
式 XX

〔式中、Rは請求の範囲第1項で定義されたとおりであり、Xは—O—若しくは—S—よりなる群から選択され；

Aは0～50個の炭素原子及び10個以下の異原子よりなる飽和もしくは不飽和の直鎖もしくは分枝鎖状のスペーサ基であり、ただし配列—X—A—M—Qにおいて2個の異原子同士が直接結合し得、配列—X—A—M—Qは—O—O—を有することができず、さらに分枝鎖は炭素原子にのみ存在することができ；

Mは>C(=O)、—NH—、—O—C(=O)—、—N(H)—C(=O)—、—N(H)—C(=S)—、—S—、—P(=O)(O)—及び

【化 2 1】



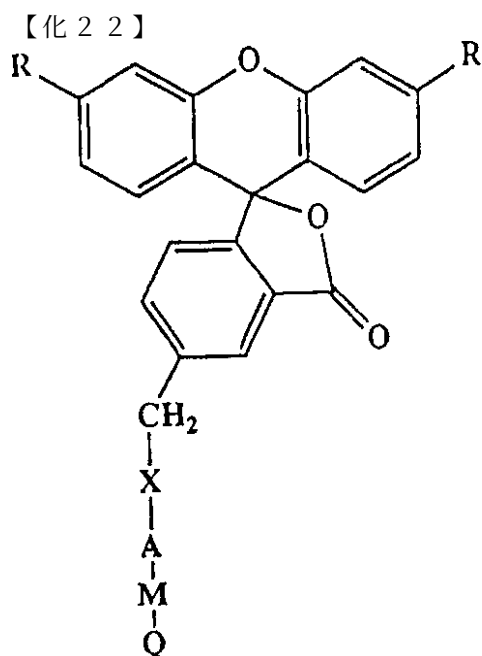
から選択される結合基であり；

Qはタンパク質、ペプチド、アミノ酸、DNAもしくはRNAプローブ配列、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬物、官能化ポリマー（可溶性及び不溶性の両者）、ハプテン、及びポリ塩素化ビフェニルからなる群より選択される〕

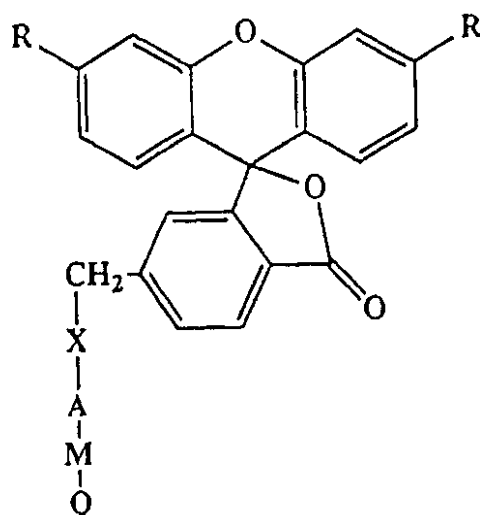
の化合物を含んでなる指示薬と接触させることを特徴とする、試験試料における分析物の存在の検出方法。

【請求項13】

式XIX若しくはXX：



式 XIX



式 XX

〔式中、Rは請求の範囲第1項で定義されたとおりであり、Xは-O-若しくは-S-よりなる群から選択され；

Aは0～50個の炭素原子及び10個以下の異原子よりなる飽和もしくは不飽和の直鎖もしくは分枝鎖状のスペーサ基であり、ただし

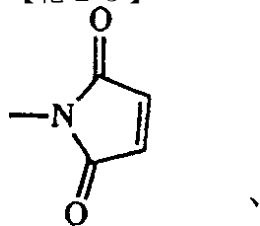
(a) 配列-O-A-Bにおいて2個の異原子同士が直接結合することができ、

(b) 配列-O-A-Bは-O-O-を有することができず；

(c) 分枝鎖は炭素原子にのみ存在することができ；

Bは-C(=O)OH、-NH₂、-CH(=O)、ハロ(-Cl、-Br、-I)、スルホネートエステル(-OS(=O)₂-アルキル、-OS(=O)₂-アリール)、

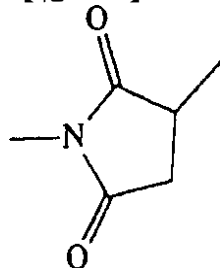
【化 2 3】



ホスホルアミダイト及びホスホネートよりなる群から選択される反応性官能基であり；

Mは>C(=O)、-NH-、-O-C(=O)-、-N(H)-C(=O)-、-N(H)-C(=S)-、-S-、-P(=O)(O)-及び

【化 2 4】



から選択される結合基であり；

Qはタンパク質、ペプチド、アミノ酸、DNAもしくはRNAプローブ配列、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬物、官能化ポリマー（可溶性及び不溶性の両者）、ハプテン、

及びポリ塩素化ビフェニルからなる群より選択される]

の化合物を含んでなる指示薬を含有した容器を備えることを特徴とする、試験試料における少なくとも1種の分析物の存在を検出する試験キット。

【請求項14】

請求項11に記載のフルオレスセイン結合体を含む、試験試料に存在しうる分析物の存在を検出するのに有用な指示薬。

【発明の詳細な説明】

背景技術

本発明は一般にフルオレスセイン誘導体に関し、より詳細には5(6)-メチル置換のフルオレスセイン誘導体および5(6)-カルボキシフルオレスセインから5(6)-メチル置換フルオレスセインへの還元によるその製造に関するものである。

他の分子との反応に適する官能基を持った多くのフルオレスセイン誘導体が存在する。これら誘導体の多くは、細胞機能の検査から生理学的試験試料における1種もしくはそれ以上の薬物レベルの監視に至る範囲の分析用途につきトレーサを製造すべく産業的に使用されている[たとえばC. タイプ等、モレキュラ・アンド・セルラー・プローブス、第2巻、第31頁(1988); M. L. グラバー等、アナリチカル・バイオケミストリー、第156巻、第202頁(1986); P. J. ブリネス等、米国特許第4,869,132号; およびN. Y. ワング等、ヨーロッパ特許出願公開EP 264797号(1988)参照]。この種の用途の例は、たとえばアボットADx(登録商標)装置およびアボットTDx(登録商標)装置[アボット・ラボラトリース社、アボット・パーク、ILから入手しうる]のような市販の装置で使用するフルオレッセンス・ポラリゼーション・イミュノアッセー(FPIA)を包含する。これら誘導体は5-および6-カルボキシフルオレスセイン、5-および6-アミノフルオレスセイン、並びに4'-アミノメチルフルオレスセインを包含する[M. T. シップチャンドラ等、アナリチカル・バイオケミストリー、第162巻、第89頁(1987)]。これらのうち5-および6-アミノフルオレスセイン化合物は、アミノ基が殆ど求核性でないため操作するのが最も困難である。この困難性は、アミノ基が失活性芳香族環に直接結合すると言う予想の結果である。化合物4'-アミノメチルフルオレスセイン(4'-AMF)は、アミノ基と芳香族環との間にメチレン基を付加することにより上記問題を解決する初期の試みであった。この付加は、4'-AMFの通常のアミノ基反応性を回復することに成功した。しかしながら、或る種の4'-AMF誘導体は、水性緩衝液における長期貯蔵の条件下にて不安定であることが判明した。恐らく、この不安定性はレトロマンニッヒ反応またはその後のアミノ基の除去に起因する[H. O. ハウス、モダン・シンセチック・リアクションズ、第2版(1972)、第654~660頁]。さらに、4'-AMFの製造および精製は面倒である。

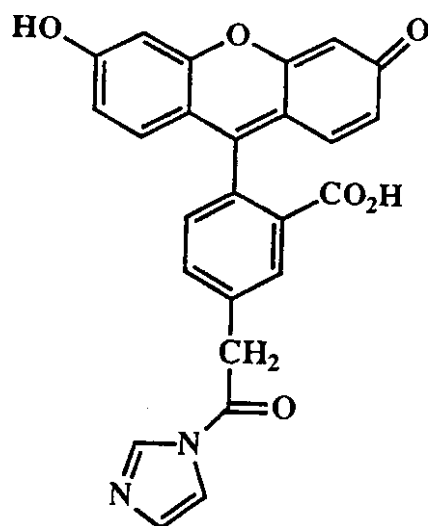
マーチン等[サイトメトリー、第12巻、第184~187頁(1991)]は、5-メチルフルオレスセインジアセテートのハロゲン化による5-クロルメチルフルオレスセインジアセテートの製造につき報告しているが、何ら実験の詳細を含んでいない。さらに、ピアス等[ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー、第260(10)巻、第6026~31頁(1985)]は、次の構造式:

10

20

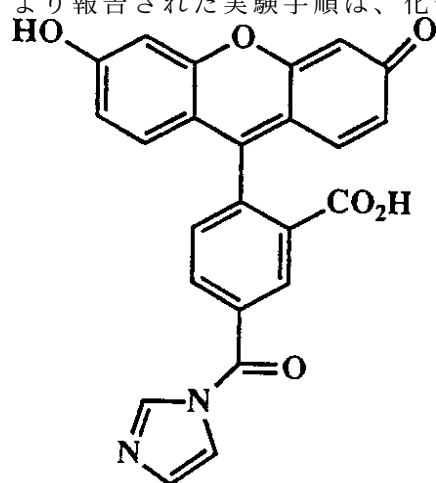
30

40



10

を有するメチル置換フルオレスセイン誘導体を報告している。しかしながら、ピアス等により報告された実験手順は、化合物が実際には次の構造式：

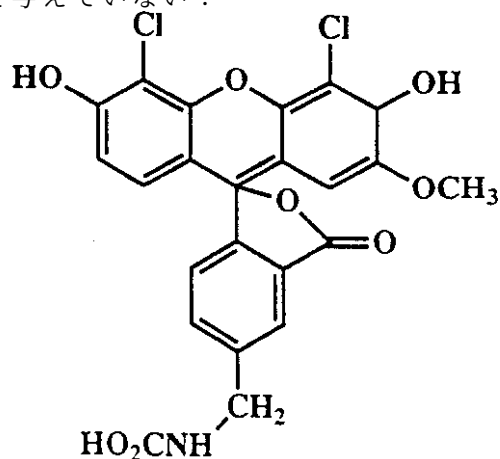
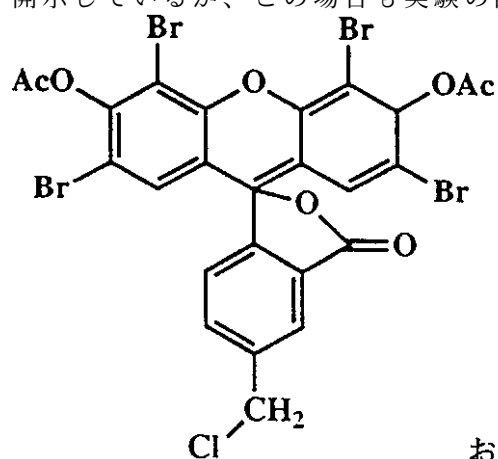


20

を有することを示す。

30

カーナ等（米国特許第4,439,365号）は次の構造式を有するキサントゲン化合物を開示しているが、この場合も実験の詳細を与えていない：



40

および

HO₂CNH

5(6)-カルボキシフルオレスセイン誘導体の還元については知られていない。しかしながら、一般にカルボン酸誘導体（すなわち遊離酸、金属塩、アミド、エステル、酸ハロゲン化物など）は各種の方法により還元することができる。これらの方法は文献中で広範に検討されている〔たとえばH. C. ブラウン、「有機化学におけるボラン類」、コーネル大学プレス（1972）；およびC. F. レイン、「ジボランによる有機化合物の還元」、ケミカル・レビュー、第76巻、第773～799頁（1976）参照〕。さらに、

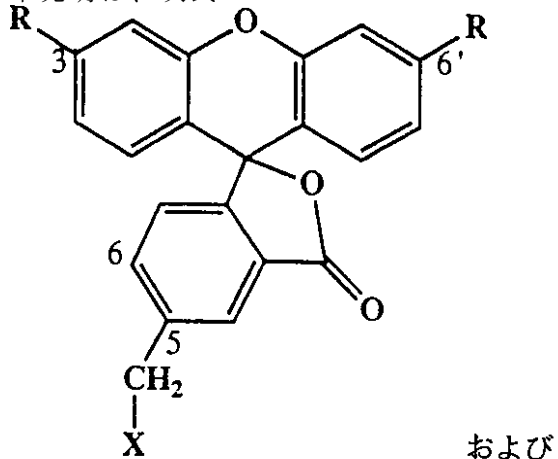
50

活性化されたカルボン酸からアルコールへの水素化ホウ素ナトリウムによる還元についても記載されている [K. ラマサミー等、シンセシス、第42巻 (1982)]。

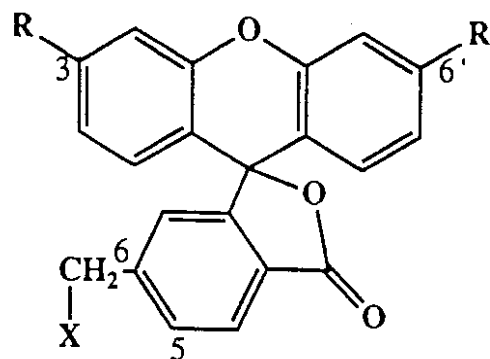
本発明は、5-もしくは6-位置におけるアミノ反応性の問題を、その位置と芳香族環との間にメチレン基を付加することにより解決する。さらに、用いる新規な方法はトレーサ合成における使用および分析における使用を可能にする新規かつ有用な誘導体の入手性をもたらす。

発明の要点

本発明は、次式：



式 I



式 II

[式中、Rはヒドロキシ (—OH) および保護ヒドロキシ (—OZ) よりなる群から選択され；

Xはヒドロキシ (—OH)、保護ヒドロキシ (—OZ)、アミノ (—NH₂)、保護アミノ (—NH_mZ' _{2-m})、チオール (—SH)、保護チオール (—SZ'')、離脱基、ミハエルクセプタ、ホスホルアミダイト、ホスホネートおよび結合基 (linking group) よりなる群から選択される]

のフルオレスセイン誘導体を提供する。

ヒドロキシル基はアルキルもしくはアリールエーテル (Z=アルキル、アリール、アルケニル)、シリルエーテル (Z=シリル)、エステル (Z=アシル)、カーボネート (Z=—C(=O)—O—アルキル)、—C(=O)—O—アリール、—C(=O)—O—アルケニル) およびカルバメート (Z=—C(=O)—NH—アルキル、—C(=O)—NH—アリール、—C(=O)—NH—アルケニル) として慣例的に保護される。アミノ基はカルバメート (Z'=—C(=O)—O—アルキル、—C(=O)—O—アリール、—C(=O)—O—アルケニル)、ビスカルバメート (m=0；Z'=—C(=O)—O—アルキル、—C(=O)—O—アリール、—C(=O)—O—アルケニル)、アミド (Z'=—C(=O)—アルキル、—C(=O)—アリール、—C(=O)—アルケニル)、環式イミド (m=0；Z'=フタロイル)、N-ベンジル誘導体 (Z'=—CH_(n)アリール_(3-n)、n=1~3)、イミン誘導体 (Z'=CH_(n)アルキル_(2-n)、=CH_(n)アリール_(2-n)、n=0~2)、シリル誘導体 (Z'=シリル)、N-スルフェニル誘導体 (Z'=—S—アリール、—S—CH_(n)アリール_(3-n)、n=0~3) およびN-スルホニル誘導体 (Z'=—SO₂—アリール、—SO₂—アルキル) として慣例的に保護される。チオール基はチオエーテル (Z''=—CH_(n)アリール_(3-n)、n=1~3、アルキル)、チオエステル (Z''=アシル)、チオカーボネート (Z=—C(=O)—O—アルキル、—C(=O)—O—アリール、—C(=O)—O—アルケニル)、チオカルバメート (Z=—C(=O)—NH—アルキル、—C(=O)—NH—アリール、—C(=O)—NH—アルケニル) およびジスルフィド (Z''=—S—アルキル、アリール) として慣例的に保護される。

10

20

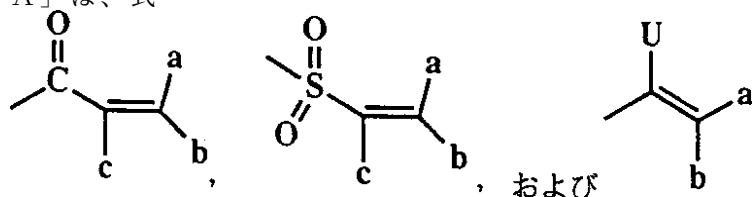
30

40

50

さらに本発明は、上記式のXが「離脱基」であるものを包含する。すなわちXが本発明にて離脱基であれば、これはハライド ($X = -Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$)、スルホネートエステル ($X = -OS(=O)_2$ -アルキル、 $-OS(=O)_2$ -アリール)、活性アミノ ($X = -N(アルキル)_3+$ 、 N_2) よりなる群から選択することができる。

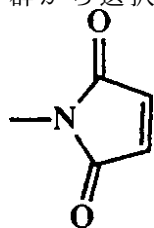
さらに本発明は、上記式のXが「ミハエルアクセプタ」である化合物をも包含する。すなわち本発明においてXは式 $-O-$ 「MA」もしくは $-N(H)_n-$ 「MA」〔式中、「MA」は、式



10

のミハエルアクセプタであり；

a、bおよびcは独立して水素、アルキルおよびアリールとすることができ；さらにUは $-CH(=O)$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-CN-$ 、 $-NO_2$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-S(=O)_2R$ から選択され、nは0もしくは1である〕の置換基よりなる群から選択することができる。好適ミハエルアクセプタはX =



20

のものである。

Xが結合基であれば、これは式 $-O-A-B$ もしくは $-N(H)_n-A-B$

〔式中、n = 0もしくは1であって窒素の原子価を満たす；

Aは飽和もしくは不飽和の直鎖もしくは分枝鎖にて配置する0～50個の炭素原子および10個以下の異原子を含む異原子よりなるスペーサ基であり、ただし2個以下の異原子は配列 $-O-A-B$ もしくは $-N(H)_n-A-B$ に直接結合することができ、配列 $-O-A-B$ もしくは $-N(H)_n-A-B$ は $-O-O-$ を含むことができず、さらに配列 $-N(H)_n-A-B$ においてn = 0であればN-Aは一緒になって6個以下の原子の環で構成することができ、さらに分枝鎖は炭素原子にのみ存在することができ；

30

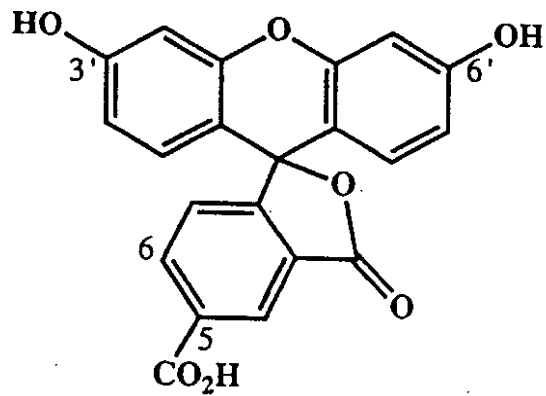
Bは $-C(=O)OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CH(=O)$ 、ハロ ($-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$)、スルホン酸エステル ($OS(=O)_2$ -アルキル、 $OS(=O)_2$ -アリール)、ミハエルアクセプタ、ホスホルアミダイトおよびホスホネートから選択される反応性官能基である

を有する。

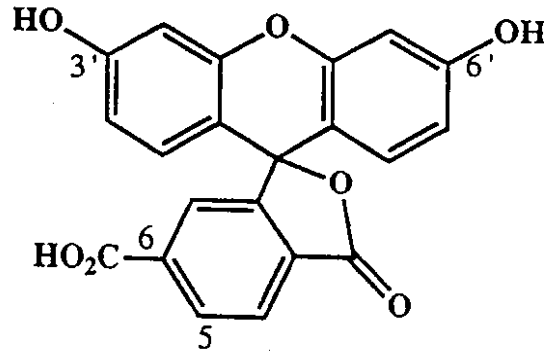
さらに本発明は5(6)-メチル置換フルオレスセイン誘導体の製造方法をも提供し、この方法は

(a) 別々に、又は混合物として、次式IIIおよびIV：

40

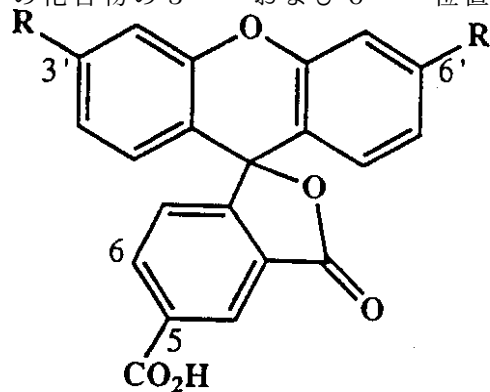


式 III

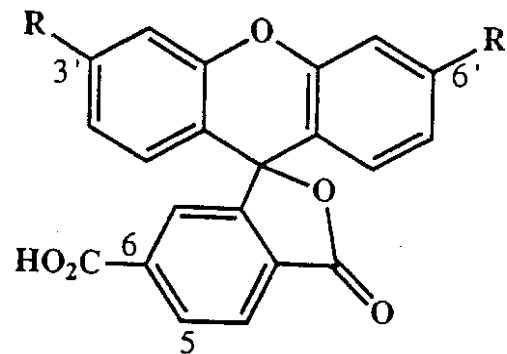


式 IV

の化合物の 3' - および 6' - 位置におけるヒドロキシルを保護して次式 V および V I :



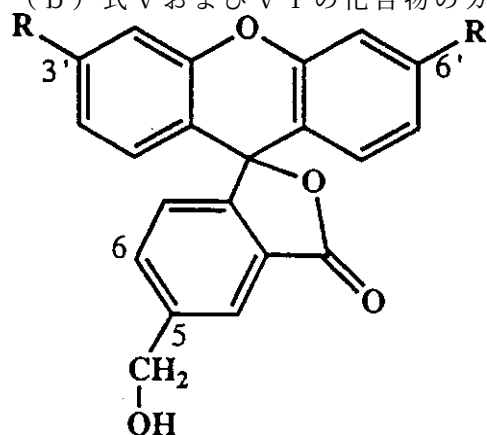
式 V



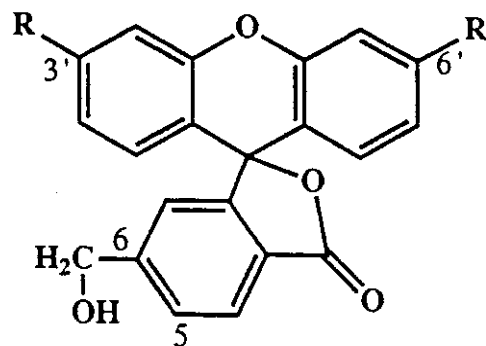
式 VI

の化合物を生成させ ;

(b) 式 V および V I の化合物のカルボン酸基を還元して次式 V I I および V I I I ;



式 VII



式 VIII

の化合物を生成させ ;

(c) 混合物として製造される場合は式 V I I および V I I I の異性体をクロマトグラフ分離して式 V I I および V I I I の純異性体を得 ;

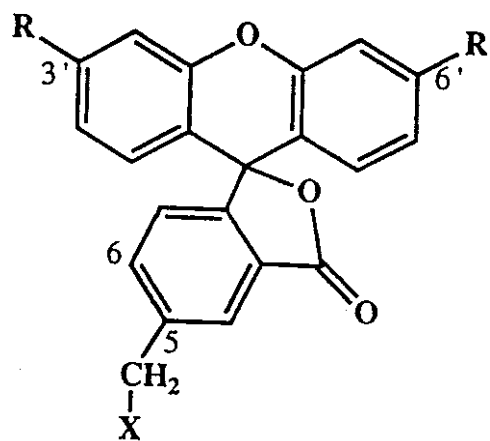
(d) 式 V I I および V I I I の化合物のヒドロキシル部分を別個にまたは混合物として離脱基に変換することにより、式 I X もしくは X :

10

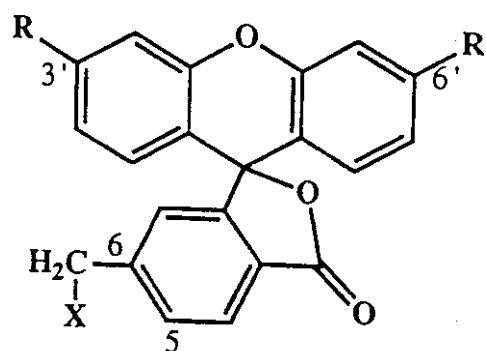
20

30

40



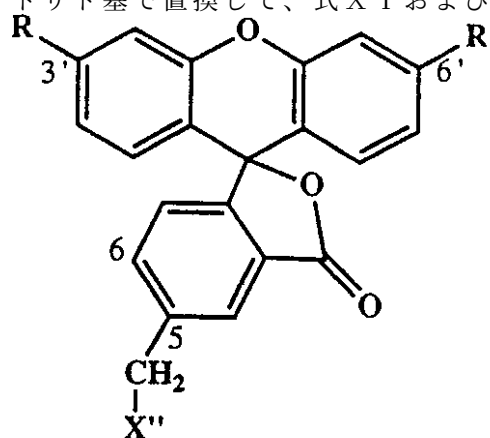
式 IX



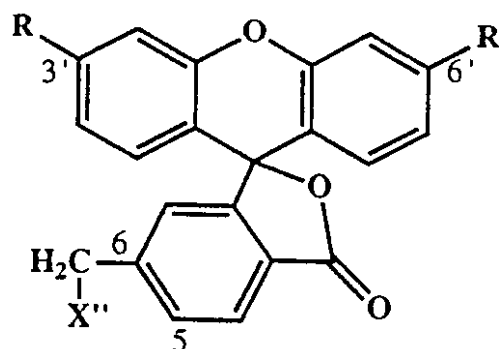
式 X

の化合物を生成させ；

(e) 離脱基Xを求核性「プロ」アミノ、「プロ」チオールもしくはナトリウムスルフィド基で置換して、式XIおよびXII：



式 XI



式 XII

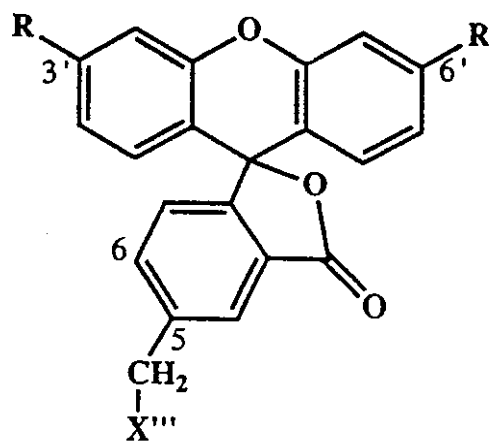
[式中、X'' = 「プロ」アミノ、「プロ」チオール基もしくはチオールである]
の化合物を得；

(f) 式XIもしくはXIIの化合物におけるX''基を変換して、式XIIIもしくはXIV：

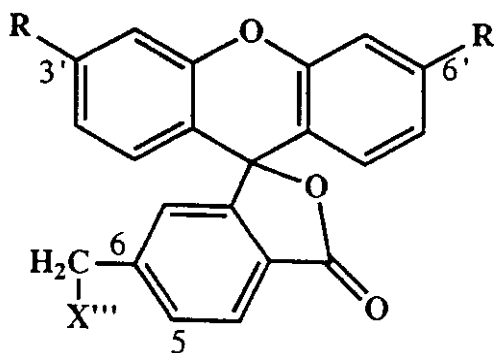
10

20

30



式 XIII

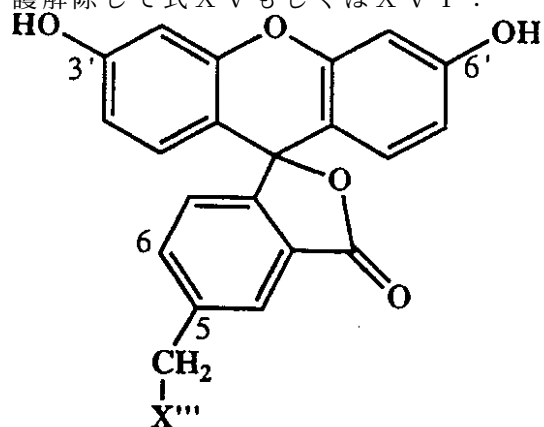


式 XIV

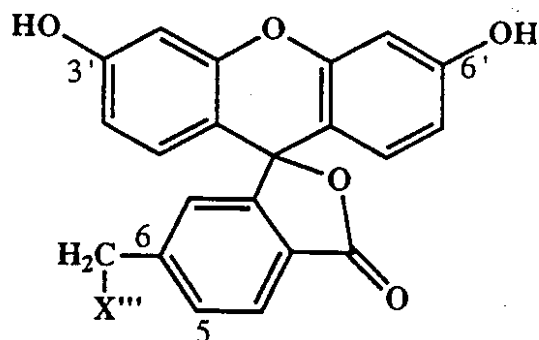
[式中、 $X''' = NH_2$ もしくは SH である]

の化合物を生成させ；

(g) 式 XIII および XIV の化合物の位置 3' および 6' におけるヒドロキシ基を保護解除して式 XV もしくは XVI：



式 XV



式 XVI

[式中、 $X''' = NH_2$ もしくは SH である]

の化合物を生成させることを特徴とする。さらに本発明は、上記工程 (a) ~ (e) と工程 (f) および (g) とを逆順序にしてなる 5 (6) -メチル置換フルオレスセイン誘導体の製造方法をも提供する。

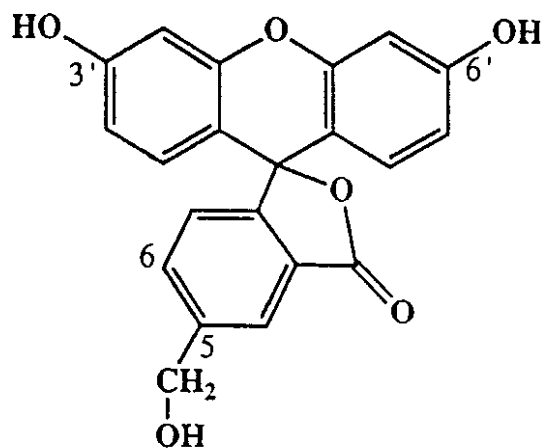
さらに本発明は、上記工程 (a) ~ (c) および (g) からなり、式 XVII もしくは XVIII：

10

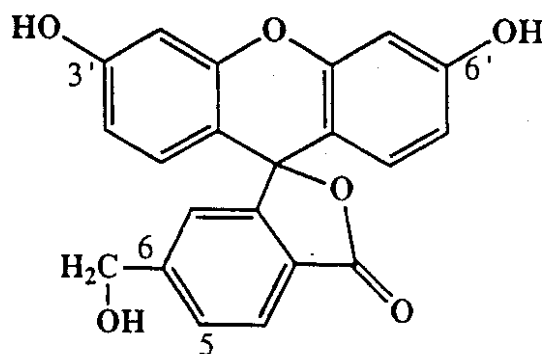
20

30

40



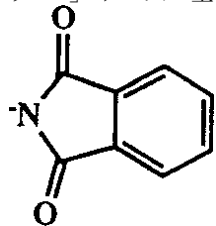
式 XVII



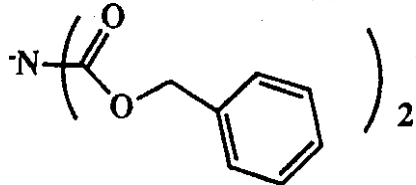
式 XVIII

の化合物を生成させる 5 (6) -メチル置換フルオレスセイン誘導体の製造方法をも提供する。

求核性の「プロアミノ」および「プロチオール」という用語は窒素および硫黄含有の求核性物質を包含し、これらはアミノ基もしくはチオール基まで容易に変換される。求核性「プロ」アミノ基はジカルボキシイミド陰イオン、たとえばフタルイミド陰イオン



イミノジカーボネート陰イオン、たとえばジベンジルイミノジカーボネート陰イオン



スルホンアミド陰イオン： $-N(H)_n$ (アルキル、アリール、アルケニル、アシル) $_{2-n}$ $S(=O)_2$ (アルキル、アリール、アルケニル)、 $n=0\sim 2$ ；スルホンイミド陰イオン： $-N(S(=O)_2)$ (アルキル、アリール、アルケニル) $_2$ ；O-置換ヒドロキシルアミン： NH_2O (アルキル、アリール、アシル)；O-置換ヒドロオキサミン酸陰イオン： $N(アシル)O$ (アルキル、アリール、アシル)；アジド陰イオン： N_3- ；シアニド陰イオン： $-CN$ ；イソシアネート陰イオン： $-N=C=O$ ；およびイソチオシアネート陰イオン： $-N=C=S$ よりなる群から選択される。

「プロ」チオール基はチオ尿素： $H_2NC(=S)NH_2$ ；ナトリウムN,N-ジメチルチオカルバメート；チオサルフェート陰イオン： $S_2O_3^{2-}$ ；ジスルフィド陰イオン： S_2^{2-} を包含する。

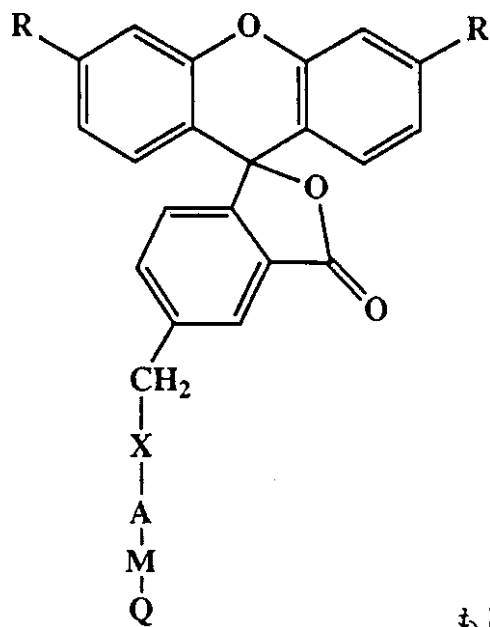
さらに本発明は、式XIVもしくはXX：

10

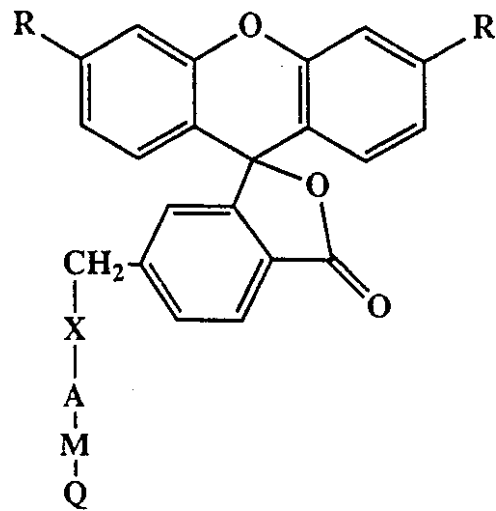
20

30

40



式 XIX



式 XX

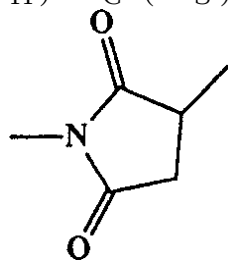
もしくは

[式中、Rは上記の意味を有し、Xは $-N(H)_n-$ 、 $-O-$ もしくは $-S-$ よりなる群から選択され；

$n=0$ もしくは1であって窒素原子価を満たし；

Aは飽和もしくは不飽和の直鎖もしくは分枝鎖にて配置される0～50個の炭素原子および10個以下の異原子よりなるスペーサ基であり、ただし2個以下の異原子は配列 $-X-A-M-Q$ にて直接結合し、配列 $-X-A-M-Q$ は $-O-O-$ を有することができず、 $n=0$ である際に配列 $-X-A-M-Q$ にて $X=-N(H)_n-$ であれば $N-A$ は一緒になって6個以下の原子の環を構成することができ、さらに分枝鎖は炭素原子にのみ存在することができ；

Mは $>C(=O)$ 、 $-NH-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-N(H)-C(=O)-$ 、 $-N(H)-C(=S)-$ 、 $-S-$ 、 $-P(=O)(O-)-$ および



から選択される結合基であり；

Qは結合相手である]

のフルオレスセイン結合体をも提供する。

さらに本発明は試験試料における分析物(analyte)の存在の検出方法をも提供し、この方法は試験試料を式XIXもしくはXXの化合物からなる指示薬と接触させることを特徴とする。

さらに本発明は、式XIXもしくはXXの化合物からなる指示薬を含んだ試験キットを提供する。

【図面の簡単な説明】

第1図は本発明による方法の略工程図である。

発明の詳細な説明

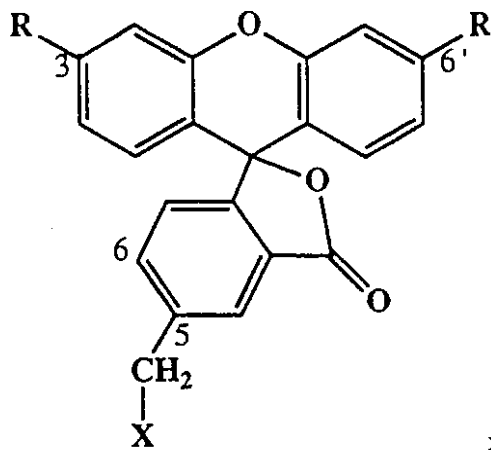
本発明は、次式：

10

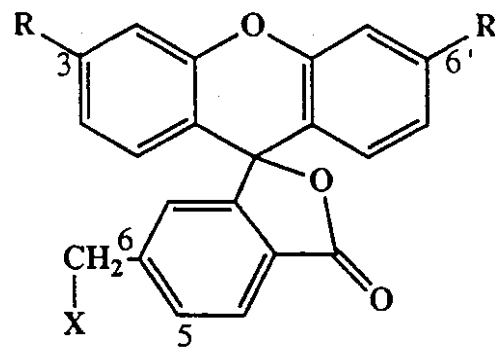
20

30

40



および



式 I

式 II

〔式中、Rはヒドロキシ（OH）および保護ヒドロキシ（—OZ）よりなる群から選択され；

Xはヒドロキシ（—OH）、保護ヒドロキシ（—OZ）、アミノ（—NH₂）、保護アミノ（—NH_mZ' _{2-m}）、チオール（—SH）、保護チオール（—SZ''）、離脱基、ミハエルクセプタ、ホスホルアミダイト、ホスホネートおよび結合基よりなる群から選択される〕

のフルオレスセイン誘導体を提供する。

ヒドロキシル、アミノおよびチオール官能基の保護基は当業界で周知されている〔T. W. グリーン、有機合成における保護基、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ社、NY、1981〕。ヒドロキシル基はアルキルもしくはアリールエーテル（Z=アルキル、アリール、アルケニル）、シリルエーテル（Z=シリル）、エステル（Z=アシル）、カーボネート（Z=—C(=O)—O—アルキル、—C(=O)—O—アリール、—C(=O)—O—アルケニル）およびカルバメート（Z=—C(=O)—NH—アルキル、—C(=O)—NH—アリール、—C(=O)—NH—アルケニル）として慣例的に保護される。アミノ基はカルバメート（Z'=—C(=O)—O—アルキル、—C(=O)—O—アリール、—C(=O)—O—アルケニル）、ビスカルバメート（m=0；Z'=—C(=O)—O—アルキル、—C(=O)—O—アリール、—C(=O)—O—アルケニル）、アミド（Z'=—C(=O)—アルキル、—C(=O)—アリール、—C(=O)—アルケニル）、環式イミド（Z'=フタロイル）、N-ベンジル誘導体（Z'=—CH_(n)アリール_(3-n)、n=1~3）、イミン誘導体（Z'=CH_(n)アルキル_(2-n)、CH_(n)アリール_(2-n)、n=0~2）、シリル誘導体（Z'=シリル）、N-スルフェニル誘導体（Z'=—S—アリール、—S—CH_(n)アリール_(3-n)、n=0~3）およびN-スルホニル誘導体（Z'=—SO₂—アリール、—SO₂—アルキル）により慣例的に保護される。チオール基はチオエーテル（Z''=—CH_(n)アリール_(3-n)、n=1~3、アルキル）、チオエステル（Z''=アシル）、チオカーボネート（Z=—C(=O)—O—アルキル、—C(=O)—O—アリール、—C(=O)—O—アルケニル）、チオカルバメート（Z=—C(=O)—NH—アルキル、—C(=O)—NH—アリール、—C(=O)—NH—アルケニル）およびジスルフィド（Z''=—S—アルキル、アリール）により慣例的に保護される。

さらに本発明は、上記式のXが「離脱基」である化合物を包含する。「離脱基」は当業界にて次のように規定されている：「基質分子が切断される反応において、その部分（炭素を含まない部分）は一般に離脱基と呼ばれる」〔J. マーチ、アドバンスド・オーガニック・ケミストリー、第2版、マックグロウ・ヒル社、NY（1977）、第187頁〕。最も一般的には、求核性反応にて最も有用な離脱基はハロゲンである一方、反応の前にアルコール、アミンおよびチオールを活性化せねばならない。アルコールはスルホン酸エステルもしくはハロゲン化物への変換により最も一般的に活性化され、或いはミツノブ反応

10

20

30

40

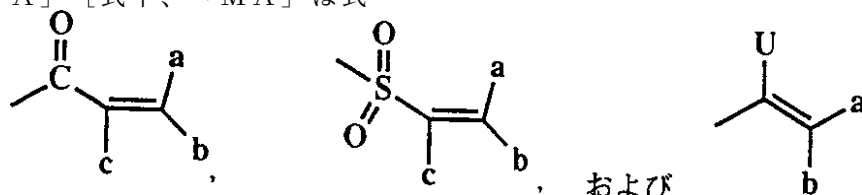
50

によりその場で発生する。アミンは4級化もしくはジアゾ化により発生する。たとえばXが本発明にて離脱基である場合、これはハロゲン ($X = -Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$)、スルホン酸エステル ($X = -SO(=O)_2$ -アルキル、 $-OS(=O)_2$ -アリール)、活性化アミノ ($X = -N(アルキル)_3+$ 、 N_2) よりなる群から選択することができる。当業者は同様に本発明の新規な方法で用いる他の離脱基を決定しうることが了解されよう。

さらに本発明は、上記式のXが「ミハエルアクセプタ」である化合物をも包含する。「ミハエルアクセプタ」は当業界で次のように規定されている：

「a, b-不飽和ケトン、アルデヒド、ニトリルもしくはカルボン酸誘導体の炭素-炭素二重結合に対するエノラート（もしくは同族）陰イオンの求核性付加はミハエル反応として知られる過程である。しばしばミハエルアクセプタと呼ばれる反応における不飽和化合物は、カルバニオン中間体を安定化させる官能基を持った任意の不飽和系を包含しうる。さらにミハエルアクセプタはたとえばアルコール、チオールおよびアミンのような各種の求核性物質を付加させることができる」[H. O. ハウス、モダン・シンセチック・リアクションズ、W. A. ベンジャミン・インコーポレーション社、メンロパーク、CA、1972、第595~96頁]。

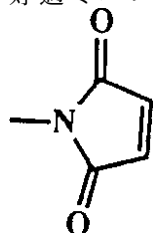
この種の求核性付加に対し二重結合を活性化させる一般的な官能基は $-CH(=O)$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-S(=O)_2R$ を包含する。たとえば本発明においてXは式 $-O-$ 「MA」もしくは $-N(H)_n$ 「MA」[式中、「MA」は式



のミハエルアクセプタであり、ここでa, bおよびcは独立して水素、アルキルおよびアリールとすることができ、Uは $-CH(=O)$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-S(=O)_2R$ から選択され、nは0もしくは1である]

よりなる群から選択することができる。

好適ミハエルアクセプタはX =



である。

Xが結合基である場合、これは式 $-O-A-B$ もしくは $-N(H)_n-A-B$ を有し、ここでn = 0もしくは1であって窒素の原子価を満たし；

Aは飽和もしくは不飽和の直鎖もしくは分枝鎖にて配置される0~50個の炭素原子および10個以下の異原子を含む異原子よりなるスペーサ基であり、ただし2個以下の異原子は配列 $-O-A-B$ もしくは $-N(H)_n-A-B$ にて直接結合することができ、配列 $-O-A-B$ もしくは $-N(H)_n-A-B$ は $-O-O-$ を含むことができず、配列 $-N(H)_n-A-B$ においてn = 0であればN-Aは一緒になって6個以下の原子の環を構成することができ、さらに分枝鎖は炭素原子にのみ存在し；Bは $-C(=O)OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CH(=O)$ 、ハロ ($-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$)、スルホン酸エステル ($OS(=O)_2$ -アルキル、 $OS(=O)_2$ -アリール)、ミハエルアクセプタ、ホスホルアミダイトおよびホスホネートよりなる群から選択される反応性の官能基である。

さらに本発明は5(6)-メチル置換フルオレスセイン誘導体の製造方法をも提供し、この方法は

10

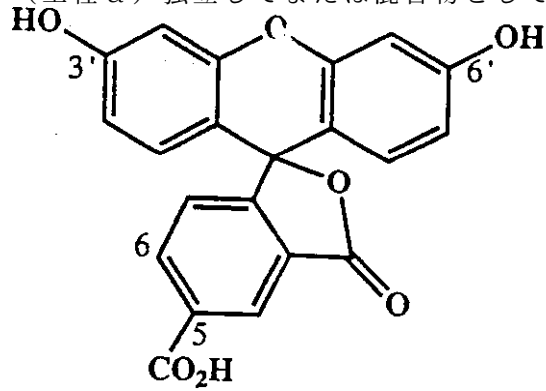
20

30

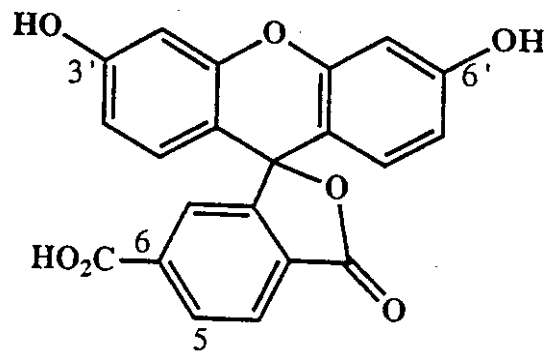
40

50

(工程 a) 独立してまたは混合物として次式 I I I および I V :

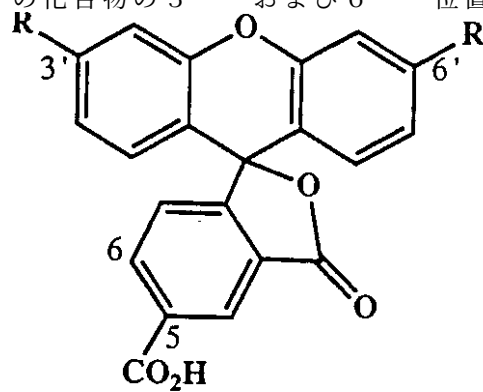


式 III

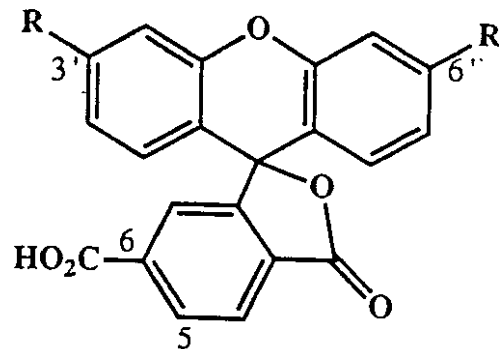


式 IV

の化合物の 3' - および 6' - 位置におけるヒドロキシルを保護して次式 V および V I :



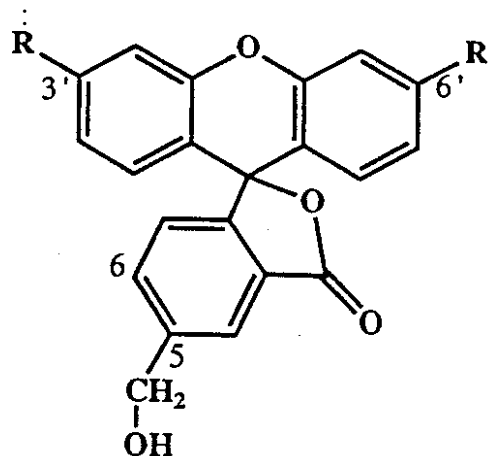
式 V



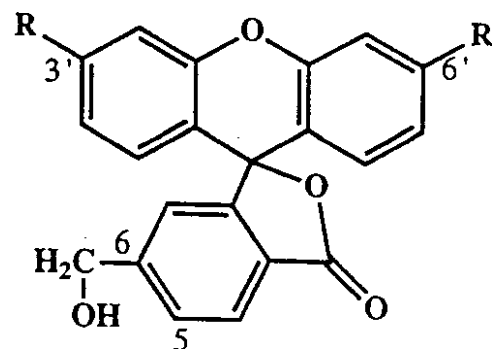
式 VI

の化合物を生成させ ;

(工程 b) 式 V および V I の化合物のカルボン酸基を還元して次式 V I I および V I I I 30



式 VII



式 VIII

の化合物を生成させ ;

(工程 c) 混合物として作成される場合は式 V I I および V I I I の異性体をクロマトグラフ分離して式 V I I および V I I I の純異性体を得 ;

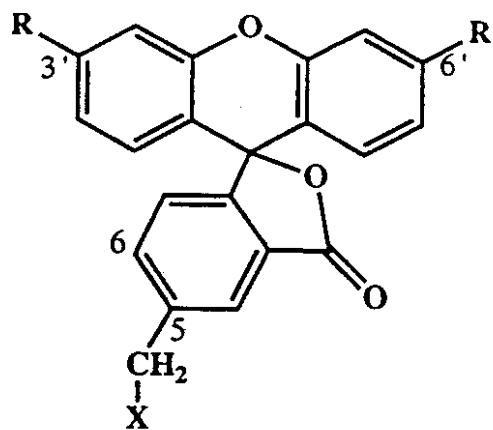
(工程 d) 式 V I I および V I I I の化合物のヒドロキシル部分を別々に或いは混合物として離脱基に変換させて、式 I X もしくは X :

10

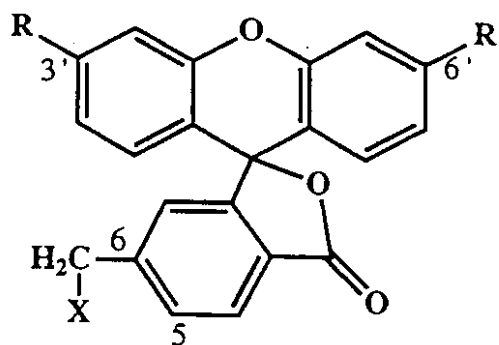
20

40

50



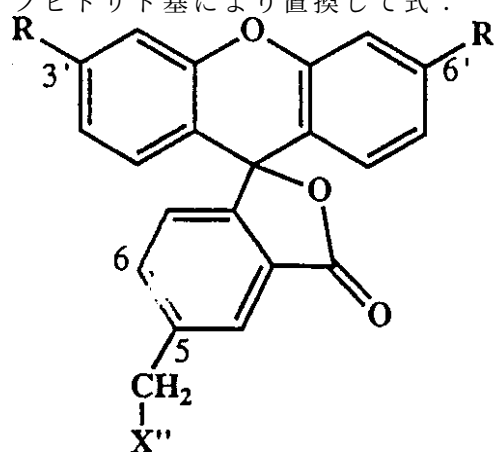
式 IX



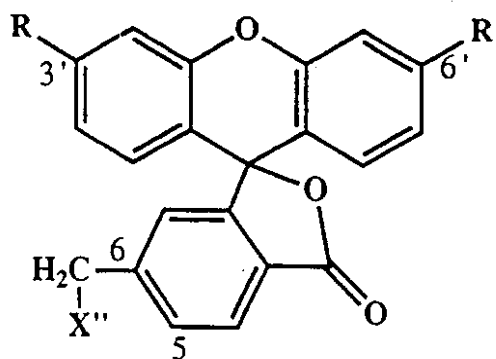
式 X

の化合物を得；

(工程 e) 離脱基 X を求核性「プロ」アミノ、「プロ」チオールもしくはナトリウムスルフィド基により置換して式：



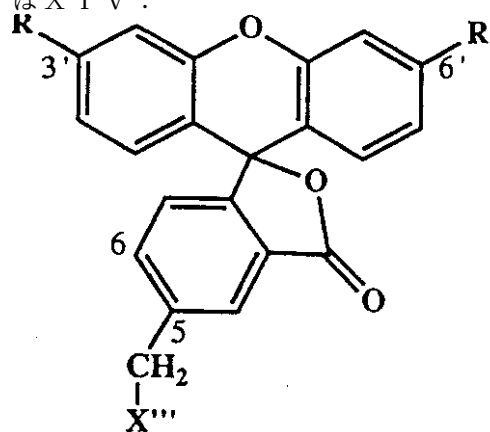
式 XI



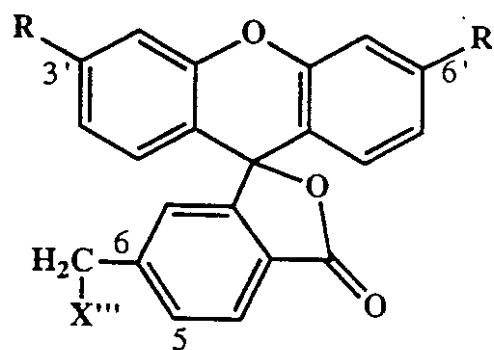
式 XII

[式中、X'' = 「プロ」アミノ、「プロ」チオール基もしくはチオールである]
の化合物を得；

(工程 f) 式 XI もしくは XII の化合物における X'' 基を変換させて式 XIII もしくは XIV：



式 XIII



式 XIV

10

20

30

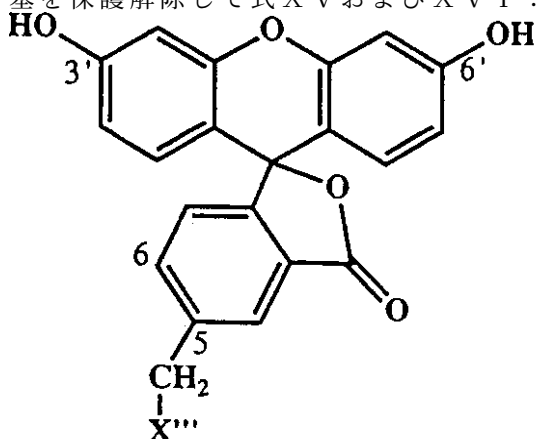
40

50

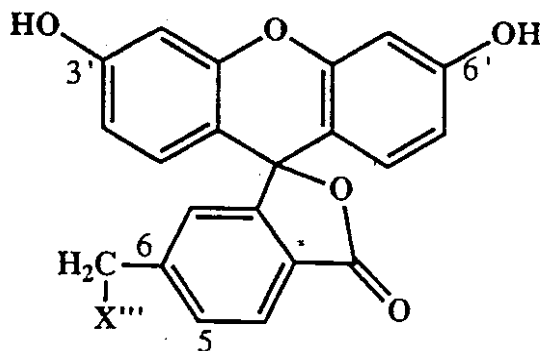
[式中、 $X''' = NH_2$ もしくは SH である]

の化合物を得；

(工程 g) 式 $XIII$ および XIV の化合物における位置 $3'$ および $6'$ のヒドロキシル基を保護解除して式 XV および XVI ：



式 XV

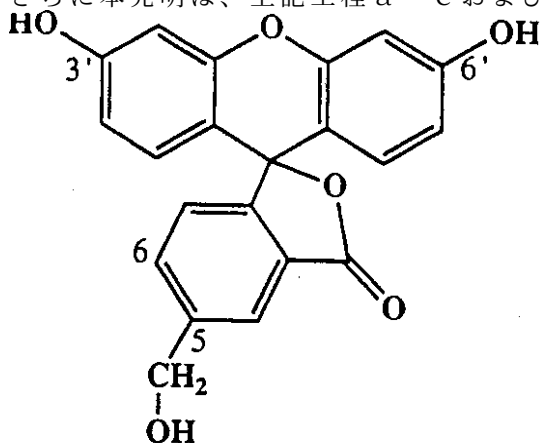


式 XVI

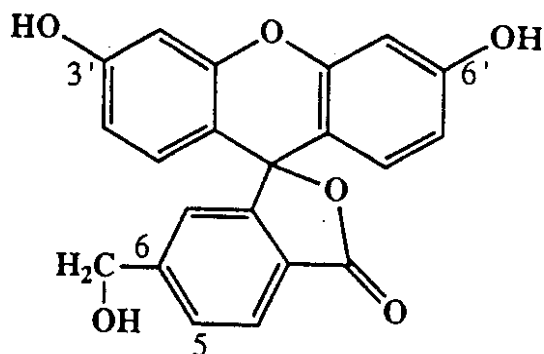
の化合物を得ることを特徴とする。

さらに本発明は、上記工程 a～e 並びに工程 f および g をその逆順序で含む 5 (6) -メチル置換フルオレスセイン誘導体の製造方法をも提供する。

さらに本発明は、上記工程 a～c および g からなり、式 $XVII$ および $XVIII$ ：



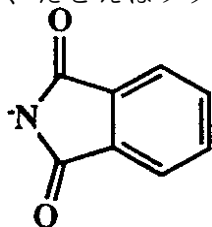
式 XVII



式 XVIII

の化合物を製造する 5 (6) -メチル置換フルオレスセイン誘導体の製造方法をも提供する。

求核性「プロアミノ」および「プロチオール」という用語は、ここでは当業界で知られた窒素および硫黄含有の求核性物質であってアミノもしくはチオール基まで容易に変換されるものとして規定される。求核性「プロ」アミノ基は一般にジカルボキシイミド陰イオン、たとえばフタルイミド陰イオン、



10

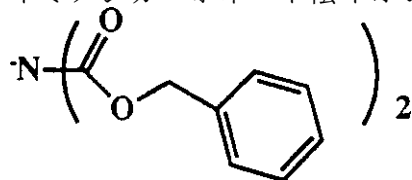
20

30

40

50

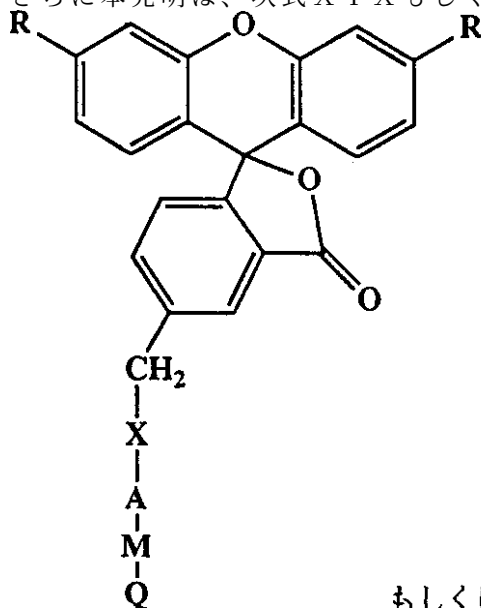
イミノジカーボネート陰イオン、たとえばジベンジルイミノジカーボネート陰イオン、



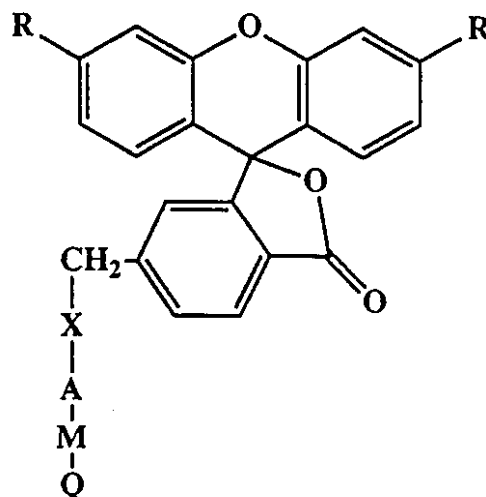
スルホンアミド陰イオン： $-N(H)_n$ （アルキル、アリール、アルケニル、アシル） $_{2-n}$ $S(=O)_2$ （アルキル、アリール、アルケニル）、 $n=0\sim 2$ ；スルホンイミド陰イオン： $-N(S(=O)_2)$ （アルキル、アリール、アルケニル） $_2$ ；O-置換ヒドロキシルアミン： NH_2O （アルキル、アリール、アシル）；O-置換ヒドロオキサミン酸陰イオン： $-N(アシル)O(アルキル、アリール、アシル)$ ；アジド陰イオン： N_3- ；シアニド陰イオン： $-CN$ ；イソシアネート陰イオン： $-N=C=O$ ；およびイソチオシアネート陰イオン： $-N=C=S$ よりなる群から選択される。

一般的に使用される「プロ」チオール基はチオ尿素： $H_2NC(=S)NH_2$ ；ナトリウムN,N-ジメチルチオカルバメート；チオサルフェート陰イオン： $S_2O_3^{2-}$ ；ジスルフィド陰イオン： S_2^{2-} を包含する。当業者は本発明の新規な方法にて同様に作用しうる他の「プロ」アミノおよび「プロ」チオール基を決定しうる事が了解されよう。

さらに本発明は、次式XIXもしくはXX：



式 XIX



式 XX

〔式中、Rは上記の意味を有し、Xは $-N(H)_n-$ 、

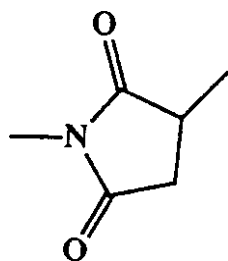
$-O-$ もしくは $-S-$ よりなる群から選択され；

$n=0$ もしくは1であって窒素原子価を満たし；

Aは飽和もしくは不飽和の直鎖もしくは分枝鎖にて配置される0～50個の炭素原子および10個以下の異原子よりなるスペーサ基であり、ただし2個以下の異原子は配列 $-X-A-M-Q$ にて直接結合し、配列 $-X-A-M-Q$ は $-O-O-$ を有することができず、 $n=0$ である際に配列 $-X-A-M-Q$ にて $X=-N(H)_n-$ であればN-Aは一緒になって6個以下の原子の環を構成することができ、さらに分枝鎖は炭素原子にのみ存在することができ；

Mは $>C(=O)-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、

$-N(H)-C(=O)-$ 、 $-N(H)-C(=S)-$ 、 $-S-$ 、 $-P(=O)(O)-$ および



から選択される結合基であり；

Qは結合相手である]

のフルオレスセイン結合体をも提供する。

10

さらに本発明は試験試料における分析物の検出方法をも提供し、この方法は試験試料を式 X I X もしくは X X の化合物からなる指示薬と接触させることを特徴とする。

出発物質 5 (6) -カルボキシフルオレスセインはイーストマン・コダック社、ロチェスター、NY から入手できる。3', 6' -ジアセチル-5 (6) -カルボキシフルオレスセインの製造は純異性体 3', 6' -ジアセチル-6 -カルボキシフルオレスセインとして間違っ て従来記載されており、化合物の特徴を何も示していない [J. W. ブルニグ等、ジャーナル・イミューノロジカル・メソッズ、第 33 巻、第 33 ~ 44 頁 (1980) 参照]。化合物 5 -アミノメチルおよび 5 -プロモメチルフルオレスセインはモレキュラ・プローブス・インコーポレーション社、ユーゲン、OR 97492 から最近市販入手しうようになった。

20

開放型および閉鎖型の両者にて存在する 5 (6) -カルボキシフルオレスセインの約 40 : 60 混合物を無水酢酸での処理により改変して、その有機溶剤に対する溶解度を増大させると共に 2 個のカルボキシ基を区別した。この溶解性を達成する他の手段は当業者に公知であり、種々異なる無水物、酸ハロゲン化物もしくは活性エステルによるヒドロキシルのアシル化、または多数のシリルハロゲン化物によるシリル化、または適する誘導体を生ぜしめるアルキル化を包含する。処理した後、5 (6) -カルボキシフルオレスセイン誘導体は、カルボン酸誘導体の還元一般的に使用される有機溶剤に対し可溶性となる。たとえば 5 (6) -カルボキシフルオレスセインからジアセチル化合物まで変換する手順は未置換フルオレスセインのそれに従った [W. R. オルンドルフおよび A. J. ヘンマー、「フルオレスセインおよびその誘導体」、ジャーナル・アメリカン・ケミカル・ソサエティ、第 49 巻、第 1272 ~ 1280 頁 (1927) に記載されている]。要するに、この手順は 5 (6) -カルボキシフルオレスセインを無水酢酸中で還流下に酢酸ナトリウムと反応させ；水中で仕上処理し；生成混合物 3' 6' -ジアセチル-5 (6) -カルボキシフルオレスセインをシリカ上でのカラムクロマトグラフィーにより精製することを含む。

30

残留するカルボン酸は、カルボン酸につき選択されるボラン-テトラヒドロフラン複合体、ボラン-ジメチルスルフィド複合体もしくは他の任意の還元剤でのエステルの存在下における 1 ~ 2 日間にわたる処理により、アルコールまで還元することができる。好適な還元剤はボラン-ジメチルスルフィド複合体である。

或いは、カルボン酸はクロル蟻酸エチルもしくは他の活性エステルにより混合無水炭酸まで変換することができ、硼水素化ナトリウム (NaBH_4) により緩衝メタノール THF (pH 6.0) 中で 0 °C にて約 5 分間でアルコールまで還元することができる。

40

たとえば 3', 6' -ジアセチル-5 (6) -カルボキシフルオレスセインを、上記の両方法により 3', 6' -ジアセチル-5 (6) -ヒドロキシメチルフルオレスセインまで変換させた。

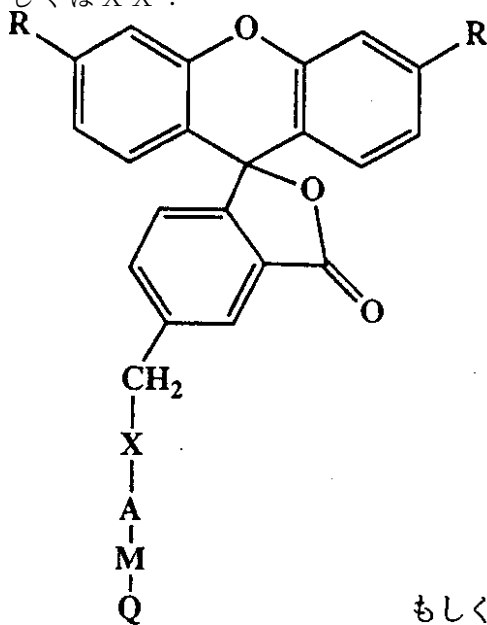
このように生成したアルコールの混合物はこの段階でシリカゲル上でのカラムクロマトグラフィーにより便利に分離することができ、これには当業者に知られた方法を用いる。たとえば 3', 6' -ジアセチル-5 (6) -ヒドロキシメチルフルオレスセインは純異性体 3', 6' -ジアセチル-5 -ヒドロキシメチルフルオレスセインと 3', 6' -ジアセチル-6 -ヒドロキシメチルフルオレスセインとに分離される。

50

この段階におけるアルコールは、当業界で周知されているように数種の他の誘導体まで変換することができる。好適誘導体は、アルコールをアミンまで変換することにより得られた。これは、ヒドロキシルを離脱基まで変換すると共に求核性「プロ」アミノ基で置換して達成された。好適「プロ」アミノ基はジベンジルイミノジカーボネートおよびフタルイミドである。これは、便利にはO. ミツノブ、「天然生産物の合成および転移におけるジエチルアゾジカルボキシレートおよびトリフェニルホスフィンの使用」、シンセシス、第1巻(1981)、に記載されたミツノブ条件の下で行われる。

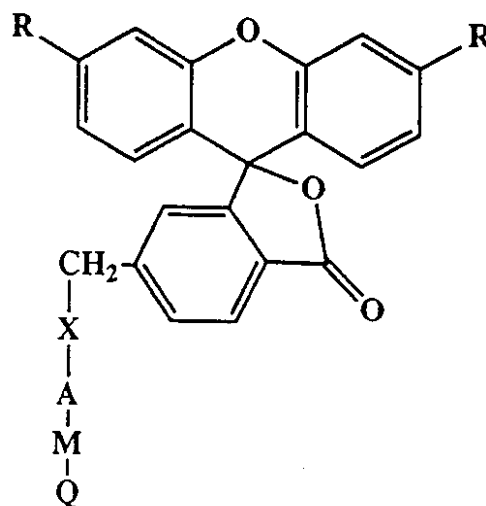
要するに、この方法は3', 6'-ジアセチル-5-ヒドロキシメチルフルオレスセインもしくは3', 6'-ジアセチル-6-ヒドロキシメチルフルオレスセインとジエチルアゾジカルボキシレート、トリフェニルホスフィンおよびジベンジルイミノジカーボネートもしくはフタルイミドとのテトラヒドロフラン中における不活性雰囲気下での室温における反応；それに続くシリカゲル上でのクロマトグラフィーによる精製を含む。触媒ジメチルアミノピリジンを含む塩基性メタノールによるアセチル基の保護解除(除去)と、それに続くフタルイミド基のヒドラジン分解もしくはHBr/酢酸でのイミノジカーボネート基の酸処理により、5-もしくは6-アミノメチルフルオレスセインを遊離塩基として或いは臭化水素酸塩としてそれぞれ得た。

本発明のフルオレスセイン誘導体は、たとえば蛋白、ペプチド、アミノ酸、DNAもしくはRNAプローブ配列、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬物、官能価ポリマー(可溶性および不溶性の両者)、ハプテン、並びにたとえばポリ塩素化ビフェニルのような他の薬品など各種の結合相手と反応させることができる。本発明の結合体は、次の式XIXもしくはXX：



式 XIX

もしくは



式 XX

[式中、Rは上記の意味を有し、Xは $-N(H)_n-$ 、

$-O-$ もしくは $-S-$ よりなる群から選択され；

$n=0$ もしくは1であって窒素原子価を満たし；

Aは飽和もしくは不飽和の直鎖もしくは分枝鎖にて配置される0~50個の炭素原子および10個以下の異原子を含む異原子よりなるスペーサ基であり、ただし2個以下の異原子は配列 $-X-A-M-Q$ にて直接結合し、配列 $-X-A-M-Q$ は $-O-O-$ を有することができず、 $n=0$ である際に配列 $-X-A-M-Q$ にて $X=-N(H)_n$ であればN-Aは一緒になって6個以下の原子の環を構成することができ、さらに分枝鎖は炭素原子にのみ存在することができ；

Mは $>C(=O)-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、

$-N(H)-C(=O)-$ 、 $-N(H)-C(=S)-$ 、 $-S-$ 、 $-P(=O)(O)-$

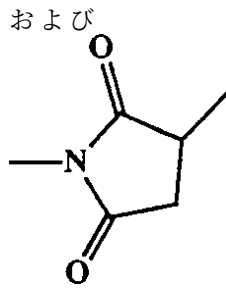
10

20

30

40

50



から選択される結合基であり；

Qは結合相手である]

の一般構造の1つを有する。

本発明の結合体において、フルオレスセイン誘導体における反応性官能基と結合相手との間の化学結合は多数の方法により形成させることができる。しばしばアミド結合を生成させることが好ましい。たとえば式IもしくはI I ($X = -O-A-B$ もしくは $N(H)_n - A - B$)のフルオレスセイン誘導体において、Bがカルボキシル基であれば、結合相手におけるアミノとの結合を形成するには当業界で知られた各種の方法を用いる数種の方法が存在する。

たとえばアミド結合は、先ず最初にフルオレスセイン誘導体のカルボン酸部分をたとえば1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミドのような活性化剤およびたとえばN-ヒドロキシスクシンイミドのような添加剤との反応により活性化して形成される。次いで活性化型のフルオレスセイン誘導体を結合相手と反応させる。或いは、カルボン酸含有のフルオレスセイン誘導体を単離して或いは単離なしに高反応性の混合無水物、アシルハロゲン化物、アシルイミダゾリドまたは混合カーボネートまで変換することができ、次いで結合相手と合することができる。

これら任意の方法は、 $M = -C(=O) - NH-$ である式X I XもしくはX X ($-X - A - M - Q$)の誘導体をもたらし、 $-C(=O) -$ はフルオレスセイン誘導体から生ずる一方 $-NH-$ は結合相手から生ずる。当業者は、ここに挙げたもの以外のアミド結合を形成すべく使用しうる多くの試薬が存在することを認識するであろう。

末端アミン官能性を有するフルオレスセイン誘導体は、たとえばアセトニトリルもしくはジメチルホルムアミドのような適する溶剤中でのN, N'-ジスクシニミジルカーボネートとの反応により高反応性のN-ヒドロキシスクシンイミドウレタンまで変換することができる。得られるウレタンを次いで結合相手におけるアミノ基と反応させる。

末端アルデヒド官能性を有するフルオレスセイン誘導体は、シアノ硼水素化ナトリウムの存在下にて当業界で知られた方法にしたがい還元アミノ化により結合相手におけるアミノもしくはヒドラジド基にカップリングさせることができる。

或いは、末端アルコール基を有するフルオレスセイン誘導体は、先ず最初にこれをホスゲンもしくはホスゲン均等物(たとえばジ-もしくはトリ-ホスゲンまたはカルボニルジイミダゾール)と反応させて高反応性クロル蟻酸もしくはイミダゾール蟻酸誘導体を生成させることにより(一般に単離なし)結合相手にカップリングさせることができる。次いで、得られた活性蟻酸エステルを結合相手と反応させる。

或いは、末端チオール基を有するフルオレスセイン誘導体をミハエルアクセプタを有する結合相手にカップリングさせることもでき、またはミハエルアクセプタを有するフルオレスセイン誘導体をチオール基を持った結合相手と反応させることもできる。

或いは、末端ホスホルアミダイトもしくはホスホネート基を有するフルオレスセイン誘導体は、ヒドロキシル、アミノもしくはチオール基を有する結合相手とカップリングさせることもできる。

このように生成した誘導体は、分析物を検出するための各種の免疫分析で指示薬として用いることができる。ここで用いる「分析物 (Analyte)」は試験試料中に存在しうる検出すべき物質である。分析物F、天然産の特異的結合成分(たとえば抗体)が存在する或いは特異的結合成分を作成しうる任意の物質とすることができる。たとえば分析物は、分析

10

20

30

40

50

にて1種もしくはそれ以上の特異性結合成分に結合しうる物質である。さらに「分析物」は、たとえばウィルス、細菌、真菌類、リケッチャもしくは他の抗原のような感染病抗原、並びにたとえばC E Aのような癌マーカーを包含する任意の抗原物質、さらに巨大分子、ハプテンおよび／またはその代謝物、抗体、並びにその組合物を包含する。特異的結合対の成分として、分析物は天然産の特異的結合相手（対）により、たとえばビタミンB 1 2を測定するための特異的結合対の成分として固有ファクタ蛋白を用い或いは炭水化物を測定するための特異的結合対の成分としてレクチンを用いることにより検出することができる。分析物は蛋白、ペプチド、アミノ酸、DNAもしくはRNAプローブ配列、ホルモン、ステロイド、ビタミン、治療目的および不法目的で投与されるものを包含する薬物、またはたとえばポリ塩素化ビフェニル、細菌、ウィルス、その代謝物または上記物質に

10

対する抗体を包含することができる。この種の抗体を作成するための詳細、および特異的結合成分として使用するための適性については当業者に周知されている。ここに説明した本発明のトレーサを用いて試験しうる試験試料は、たとえばヒトおよび動物の体液のような生物学的液体および非生物学的液体を包含する。生物学的液体の例は全血、血清、血漿、牛乳、脳髄液、尿、血清および体液滲出物、並びに細胞培養上澄液などを包含する。非生物学的液体の例は水、スレッジなどを包含する。試験しうる他の物質の例は、固定および非固定の外科組織試料を含む細胞、血球、骨髓、組織培養細胞などを包含する。

ここで用いる「捕獲試薬」という用語は、サンドイッチ分析におけるような分析物、競合分析におけるような指示薬もしくは分析物、または間接的分析におけるようなそれ自身で分析物に対し特異性である補助特異性結合成分に対し特異性である未標識の特異性結合成分を意味する。捕獲試薬は、分析を実施する前または分析を実施する間に固相物質に直接的または間接的に結合することにより、固定化複合体を試験試料から分離することを可能にする。

20

「指示薬」は信号発生化合物、すなわち本発明のトレーサからなり、これは分析物の特異性結合成分に結合した外部手段により検出しうる測定可能な信号を発生することができる。ここで用いる「特異性結合成分」とは、特異性結合対の成分を意味する。すなわち、2種の分子の一方が化学的もしくは物理的手段により他方の分子に特異的に結合する2種の異なる分子である。分析物に対する特異性結合対の抗体成分である他、指示薬はさらにたとえばビオチンもしくは抗ビオチンのようなハプテンー抗ハプテン系、アビジンもしくはビオチン、炭水化物もしくはレクチン、相補性ヌクレオチド配列、イフェクタ分子もしくはリセプタ分子、酵素コファクタおよび酵素、酵素抑制剤または酵素などを含め任意の特異性結合対の成分とすることができる。免疫反応性の特異性結合成分は抗体、抗原または抗体／抗原複合体とすることができ、サンドイッチ分析におけるような分析物、競合分析におけるような捕獲試薬、または間接的分析におけるような補助特異性結合成分に結合することができる。

30

使用しうる固相は磁性および非磁性の微小粒子または磁性化しうる高分子微小粒子と化学的もしくは物理的結合の抗原もしくは抗体との混合物を包含する。化学的もしくは物理的に結合した抗原もしくは抗体を有する高分子微小粒子は、本発明により結合反応で捕獲相として用いることにより、溶液におけるこれら粒子の急速な拡散速度を利用して急速な結果を得ることができる。本発明により使用しうる微小粒子はポリスチレン、カルボキシル化ポリスチレン、ポリメタアクリレートまたは約0.1～20 μmの範囲の直径を有する粒子を包含する。使用しうる磁性化可能な微小粒子は好ましくは酸化第二鉄または酸化クロムコアとポリスチレン、カルボキシル化ポリスチレン、ポリメタアクリレート被覆とを有する。これら粒子の好適な分離法は一定もしくはパルスの磁石を使用し、前記粒子を洗浄し、次いで分離された粒子を容器に懸濁させて信号を発生させると共に検出することである。さらに他の固体支持体も当業者に知られ、反応トレーサの穴、試験管、ポリスチレンビーズ、ニトロセルロースストリップ、膜、ガラスなどの壁部を包含する。

40

分析に用いる試薬はたとえば小瓶もしくは瓶のような1個もしくはそれ以上の容器を備えるキットとして提供することが考えられ、各容器は本発明のトレーサを信号発生化合物と

50

して含むたとえば指示薬のような分離した試薬を含有する。

信号発生化合物として指示薬の1部をトレーサとして用いる分析手段も使用することができる。分析手段の種々の例につきここに説明するが、これらは全て本発明のトレーサを検出可能な信号を発生しうる指示薬の部分として用いる。たとえば興味ある分析物、ここに説明したような標識した分析物のプローブの混合物、および分析物のための捕獲相の混合物を含有しうる試験試料を、分析物の最適な免疫化学的結合反応を生ぜしめるのに十分な時間および条件にて培養する。次いで、捕獲相を分離すると共に洗浄する。次いで本発明のトレーサに対し特異的な基質を添加する。酵素／基質の反応が終点に達した後、分離した反応混合物を停止させる。分析物の存在は、捕獲相から発生した信号を検出すると共に得られた結果を既知の陽性および陰性試料と比較して決定される。陰帯電したポリマーとの固定化可能な反応複合体を固定化するためのイオン捕獲法を本発明により用いて、迅速な溶液相の免疫化学反応を行うことができる。固定化可能な免疫複合体を、陰帯電のポリアニオン／免疫複合体と上記のように処理した陽帯電の多孔質マトリックスとの間のイオン相互作用により反応混合物の残部から分離すると共に、本発明のトレーサを用いて検出することにより信号測定を行う。

10

本発明の指示薬は非固相の分析系にも使用しうるということが考えられる。たとえば、興味ある分析物を含有すると思われる試験試料を標識トレーサと混合し、分析物およびトレーサに対し特異的な抗体を反応を生ぜしめるのに適する時間および条件にて培養する。試験試料中に存在しうる分析物とトレーサとは、抗体における限られた個数の結合部位につき競合して、分析物－抗体およびトレーサ抗体の複合体を形成する。トレーサおよび抗体の濃度を一定に維持することにより、分析物－抗体複合体とトレーサ－抗体複合体との生成比は試験試料中に存在する分析物の量に正比例する。

20

蛍光－ポラリゼーション検出法をここに説明したように用いることができる。すなわち、試料中の分析物の量は、混合物を偏光で励起させると共に遊離トレーサおよびトレーサ－抗体複合体により発する蛍光の偏光を測定して決定される。抗体に複合化されないトレーサは、吸着および蛍光の再放出に要する時間以内に自由に回転する。その結果、再放出された光は比較的ランダムに配向して、抗体に複合化されていないトレーサの蛍光偏光が低くなり0に達する。特異性抗体に複合化すると形成されたトレーサ－抗体複合体は抗体分子を回転させ、この回転は比較的小さいトレーサ分子の回転よりも遅く、これにより観察される偏光を増大させる。したがって、分析物が抗体部位につきトレーサと競合する場合、トレーサ－抗体の観察される蛍光の偏光は遊離トレーサとトレーサ－抗体複合体との間の数値となる。試料が高濃度の分析物を含有すれば、観察される偏光値は遊離トレーサの数値に近くなり、すなわち低くなる。試料が低濃度の分析物を含有すれば、偏光値は結合トレーサの数値に近くなり、すなわち高くなる。免疫分析の反応混合物を垂直の偏光および次いで水平の偏光により順次に励起させると共に発生した光の垂直成分のみを分析することにより、反応混合物における蛍光の偏光を正確に測定することができる。測定すべき分析物の偏光と濃度との間の正確な関係は、既知濃度を有する検量線の偏光値を測定して確定される。分析物の濃度は、このように作成された標準曲線から内挿することができる。この分析は均質分析と呼ばれ、結合トレーサが遊離トレーサから分離されない溶液から最終的な偏光測定値を得ることを意味する。

30

40

蛍光ポラリゼーションを用いる場合、その結果は「ミリ偏光単位」「スパン」（ミリ偏光単位における）および「相対強度」として定量することができる。ミリ偏光単位の測定値は、トレーサの最大量が試験試料における分析物の不存在下で抗体に結合する際の最大偏光を示す。正味の偏光単位が高いほど、抗体に対するトレーサの結合が良好となる。「スパン」は、正味のミリ偏光と抗体に結合したトレーサの最少量との間の差を示す尺度である。スパンが大きいほど、より良好なデータの数値分析が得られる。「相対強度」は、バックグラウンドの蛍光よりも高い蛍光信号の強度を示す尺度である。すなわち、強度が高いほど、より正確な測定値を与える。強度は、垂直偏光強度と水平偏光強度の2倍との合計として決定される。強度は、トレーサの濃度および他の分析変数に応じ、バックグラウンドノイズの約3倍～約30倍の範囲の信号とすることができる。さらに、この方法を実施す

50

る pH は、トレーサのフルオレスセイン部分をその開放型で存在させるのに充分とせねばならない。この pH は約 4～9、好ましくは 6～8、特に好ましくは約 7～7.5 の範囲とすることができる。種々の緩衝剤を用いて、この分析過程に際しその pH を得ると共に維持することができる。代表的な緩衝剤は硼酸塩、磷酸塩、炭酸塩、トリス、バルビタールなどを包含する。特定緩衝剤の選択はこの方法の実施に臨界的でない。しかしながら、一般にトリスおよび磷酸塩緩衝剤が好適である。

上記した分析法は、限定はしないがたとえばアボット T D_x（登録商標）治療剤監視システム、アボット A D_x（登録商標）乱用薬物システム、およびアボット I M_x（登録商標）蛍光ポラリゼーション分析器（これらは全てアボット・ラボラトリース社、アボット・パーク、I L 6 0 0 6 4 から入手しうる）のような自動化システムで行うのに適する。

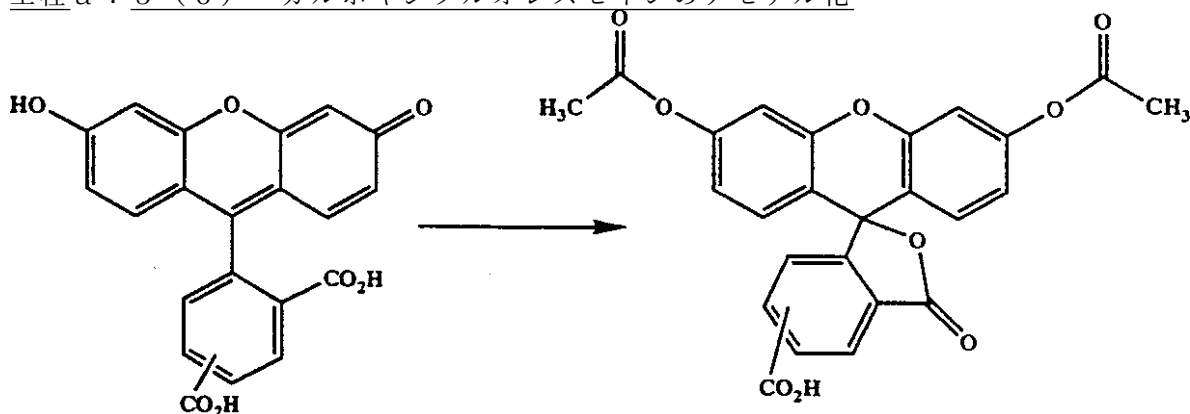
10

以下、限定はしないが本発明の思想および範囲を例示するため本発明を実施例によりさらに説明する。

実施例

実施例 1

工程 a：5（6）-カルボキシフルオレスセインのアセチル化



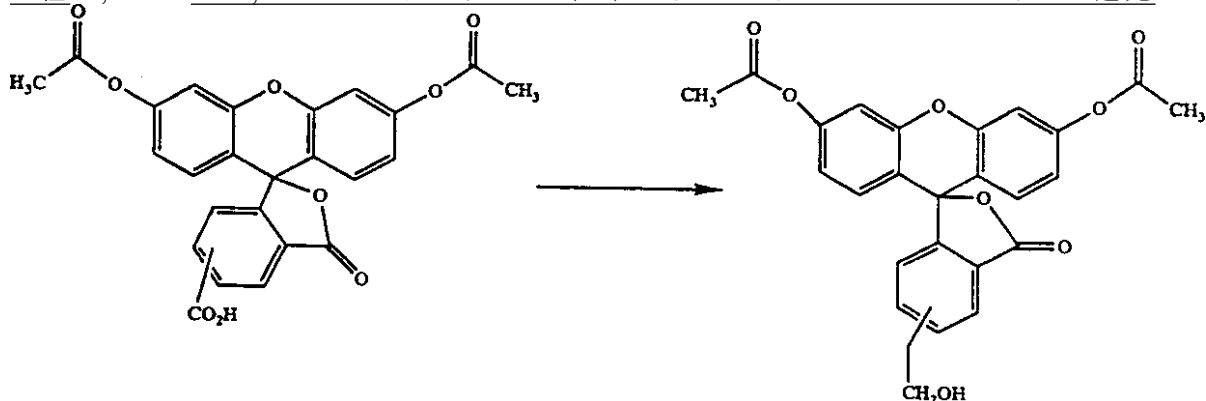
20

5（6）-カルボキシフルオレスセイン（10 g、27 ミリモル）を、酢酸ナトリウム（4.4 g、54 ミリモル）を含有する無水酢酸（200 ml）に溶解させた。この溶液を 2 時間にわたり加熱還流させ、室温まで冷却し、次いで 1 リットルの水に注ぎ入れた。混合物を室温にて 1 晩攪拌し、次いで得られた沈殿物を濾過により集め、フィルタ上で室温にて 14 時間にわたり風乾して暗褐色の固体生成物を得た。この生成物を酢酸エチルで溶出させるシリカゲル上でのクロマトグラフィーによりさらに精製した。純生成物を含有する得られたフラクションを合し、減圧下で蒸発乾固させた。得られた固体残留物をエーテル／ヘキサンから再結晶化させて 7.8 g の 3', 6'-ジアセチル 5（6）-カルボキシフルオレスセインを得た。

30

実施例 2

工程 b, c：3', 6'-ジアセチル 5（6）-カルボキシフルオレスセインの還元



40

3', 6'-ジアセチル 5（6）-カルボキシフルオレスセイン（0.5 g、1.1 ミリモル）をテトラヒドロフラン（THF）（5 ml）に溶解させ、0～5℃まで冷却し、次

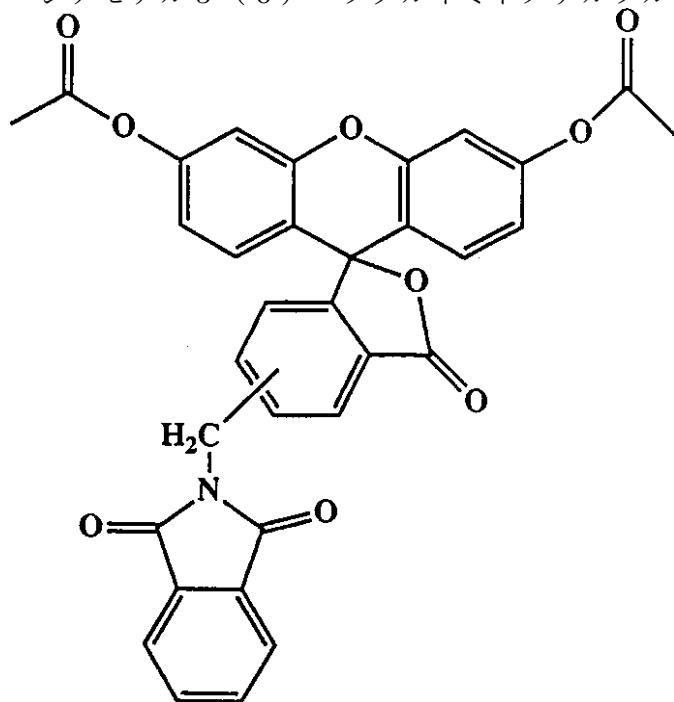
50

いでトリエチルアミン（153ml、1.1ミリモル）およびクロル蟻酸エチル（103ml、1.1ミリモル）により窒素雰囲気下で処理して反応混合物を得た。この反応混合物を1時間攪拌し、次いで反応混合物を濾過した。得られた濾液を冷燐酸ナトリウム緩衝液（pH6.0、3ml、1M）に添加し、次いで水（1ml）中の水素化ホウ素ナトリウム（83mg、2.2ミリモル）で処理した。5分間の後、反応混合物を水（50ml）で希釈し、酢酸エチル（50ml）で抽出した。この抽出工程を2回行った。抽出物を合して硫酸ナトリウムで脱水し、次いで蒸発乾固させて0.4gの3',6'-ジアセチル5(6)-ヒドロキシメチルフルオレスセインを得た。これら異性体の混合物をさらにシリカゲル（60g）で精製すると共に、塩化メチレンとメチルtertブチルエーテルとの9:1の比における混液で溶出し、分離させた。第1の溶出する化合物は3',6'-ジアセチル-6-ヒドロキシメチルフルオレスセインであった。 $C_{25}H_{19}O_8$ の計算値：447.1080；実測値：447.1075。第2の溶出する化合物は3',6'-ジアセチル-5-ヒドロキシメチルフルオレスセインであった。

$C_{25}H_{19}O_8$ の計算値：447.1080；実測値：447.1075。実施例3

工程d：3',6'-ジアセチル5(6)-ヒドロキシメチルフルオレスセインから5(6)-フタルイミドメチルフルオレスセインへの変換

3',6'-ジアセチル5(6)-ヒドロキシメチルフルオレスセイン（90mg、0.2ミリモル）の混合物をTHFに溶解させ、フタルイミド（30mg、0.2ミリモル）とトリフェニルホスフィン（53mg、0.2ミリモル）とジエチルアゾジカルボキシレート（DEAD）（32ml、0.2ミリモル）とで窒素雰囲気下に処理して反応混合物を生成させた。この反応混合物を30分間攪拌し、次いで反応混合物を蒸発乾固させた。残留物をシリカ上でのクロマトグラフにかけた〔（クロマトロン（登録商標）、ハリソン・リサーチ社、パロ・アルト、CA）2mmプレート、酢酸エチルおよびヘキサン〔1:1〕、10ml/minの速度〕。さらに得られた生成物の精製をクロマトグラフィーにより行い、この場合も塩化メチレンとエーテルとの混液（9:1）で行って3',6'-ジアセチル5(6)-フタルイミドメチルフルオレスセイン（90mg）を得た。



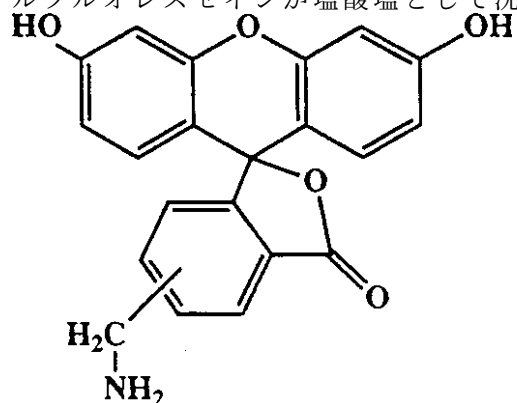
工程e～g：3',6'-ジアセチル5(6)-フタルイミドメチルフルオレスセインから5(6)-アミノメチルフルオレスセインへの変換

実施例4

工程e～g：3',6'-ジアセチル5(6)-フタルイミドメチルフルオレスセインから5(6)-アミノメチルフルオレスセインへの変換

3',6'-ジアセチル5(6)-フタルイミドメチルフルオレスセイン（90mg）を

、水酸化ナトリウム水溶液（0.1 N）を含有するメタノール（1 ml）に溶解させた。2時間の後、ヒドラジン水和物（100 ml）を添加し、得られた反応混合物をさらに2時間攪拌した。この時間の後、反応混合物を実施例1および2に上記したように蒸発乾固させた。残留物を、3滴のメタノール性HCl（3 N）を含有するメタノール（5 ml）に溶解させた。エーテル（50 ml）を添加し、次いで冷却すると5（6）-アミノメチルフルオレスセインが塩酸塩として沈澱し、これを濾過により回収した。

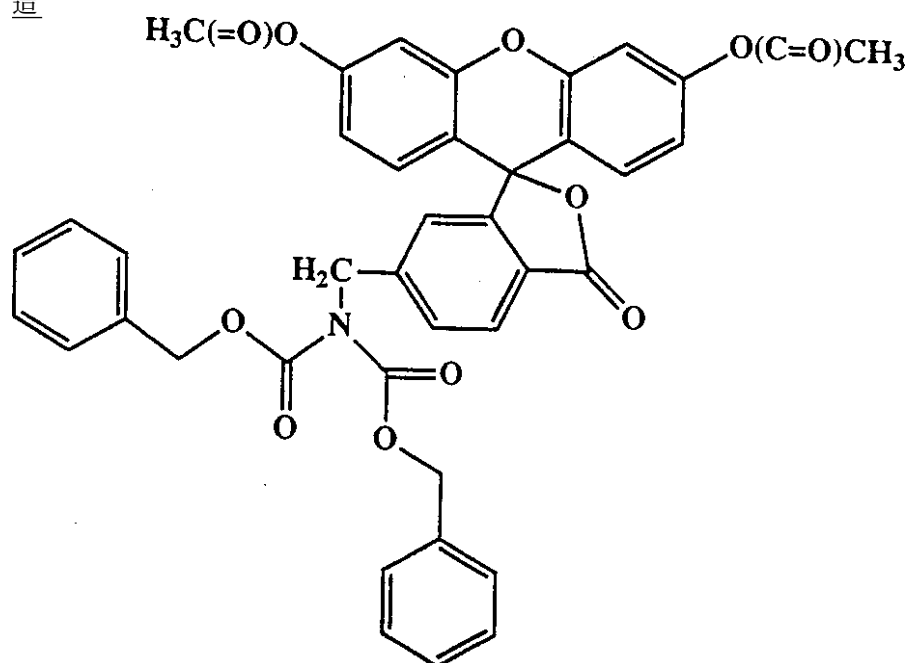


10

実施例 5

3', 6'-ジアセチル-6-[(N-ジCbz-アミノ)メチルフルオレスセインの製造

20



30

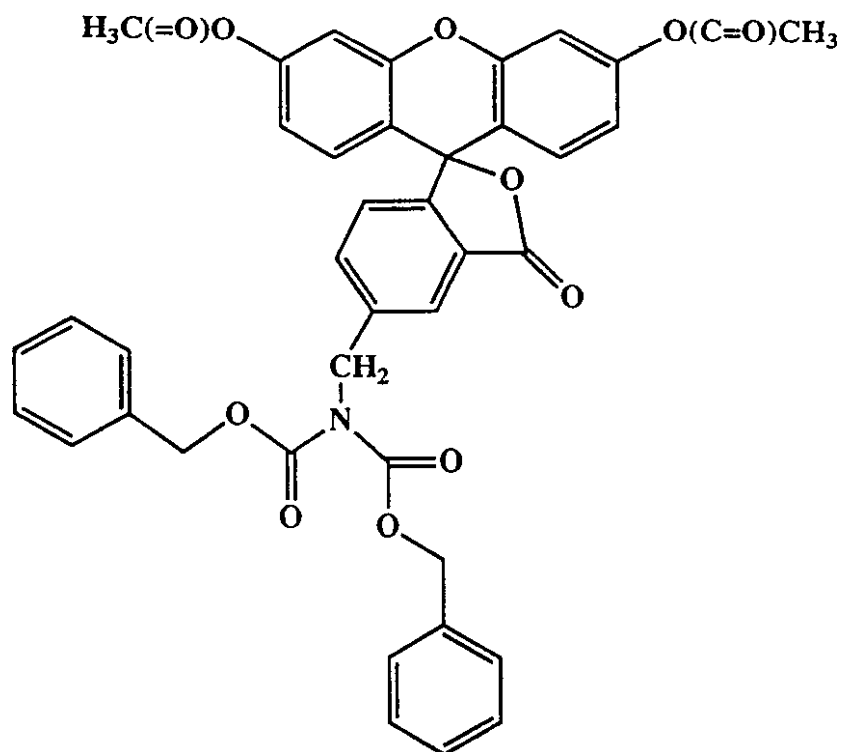
3', 6'-ジアセチル-6-ヒドロキシメチルフルオレスセイン（1 g、2.2ミリモル）とトリフェニルホスフィン（690 mg、2.6ミリモル）とジベンジルイミノジカーボネート（640 mg、2.2ミリモル）とをTHF（50 ml、ベンゾフェノンカリウムケチルから）中で窒素雰囲気下に攪拌した。この溶液にTHF（25 ml）におけるジエチルアゾジカルボキシレート（415 ml、2.6ミリモル）を30分間かけて滴下した。さらに1時間にわたり攪拌した後、溶液を蒸発させ、残留物を塩化メチレン／エーテル（9：1）で溶出させるシリカゲルでの濾過により精製して3', 6'-ジアセチル-6-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセイ（923 mg、1.3ミリモル、59%）を得た。 $C_{41}H_{32}NO_{11}$ の計算値：714.1975；実測値：714.1977。

40

実施例 6

3', 6'-ジアセチル-5-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセインの製造

50



10

20

3', 6'-ジアセチル-5-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセインを、実施例5と同様に3', 6'-ジアセチル-5-ヒドロキシメチルフルオレスセインから製造した(1g、1.4ミリモル、61%)。

$C_{41}H_{32}NO_{11}$ の計算値：714.1975；実測値：714.1977。

実施例7

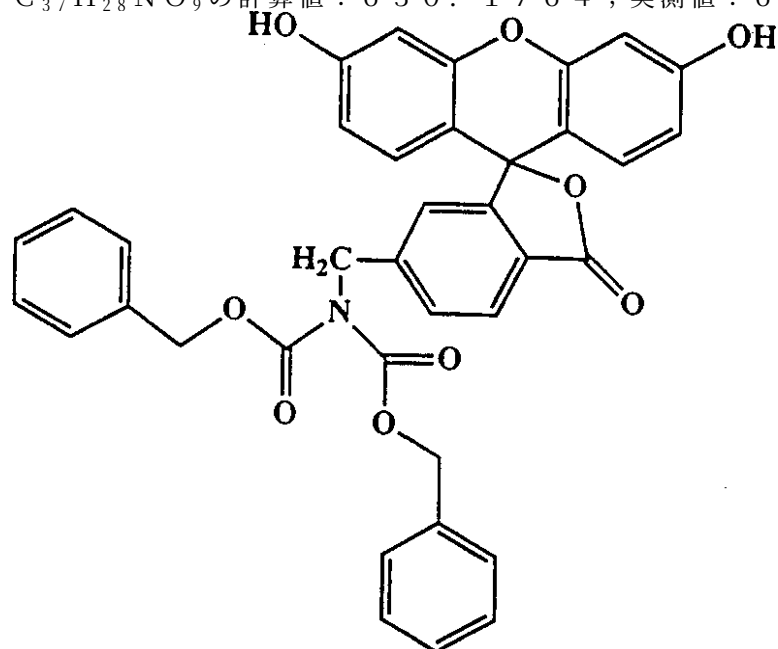
3', 6'-ジアセチル-6-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセインから6-アミノメチルフルオレスセインへの変換

(A) 実施例5からの3', 6'-ジアセチル-6-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセイン(675mg、0.95ミリモル)を、ジメチルアミノピリジン(10mg)を含有するメタノール(50ml)中にて24時間にわたり還流下で攪拌した。

30

溶剤を蒸発させて6-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセインを得た。

$C_{37}H_{28}NO_9$ の計算値：630.1764；実測値：630.1763。



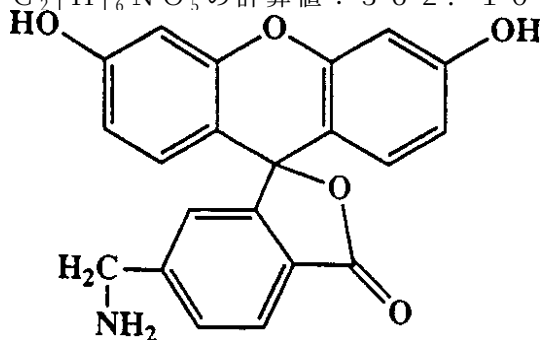
40

(B) さらに精製することなく、6-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセ

50

インを塩化メチレン（50 ml、 P_2O_5 から）に溶解させ、次いでHBr/HOAc（31%、5 ml）で処理した。4時間攪拌した後、反応混合物を濾過し、沈殿物を12時間にわたり減圧乾燥して6-アミノメチルフルオレスセイン（410 mg、0.93ミリモル、98%）を臭化水素酸塩として得た。

$C_{21}H_{16}NO_5$ の計算値：362.1028；実測値：362.1027。



10

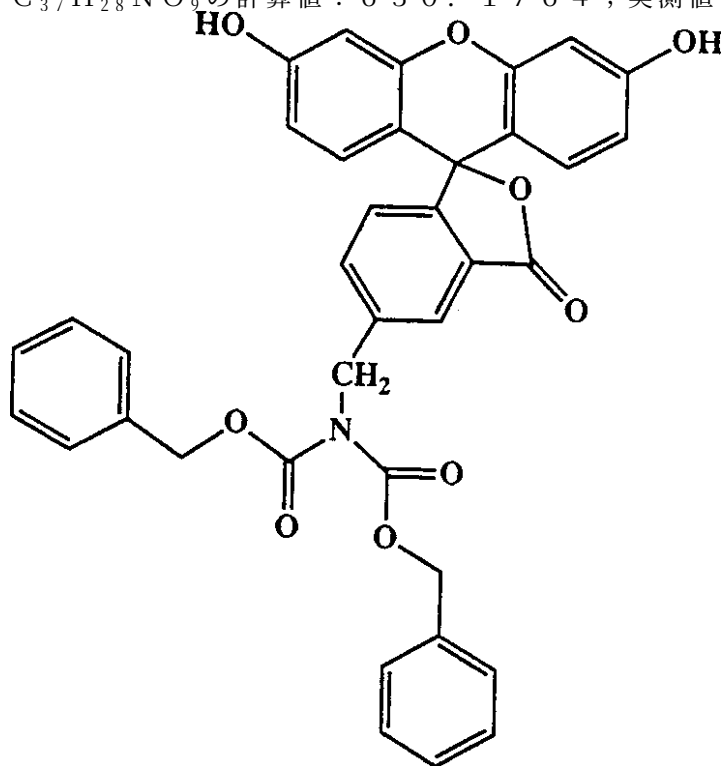
実施例 8

3', 6'-ジアセチル-5-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセインから5-アミノメチルフルオレスセインへの変換

(A) 5-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセインを実施例6の3', 6'-ジアセチル-5-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセイン（1 g、1.4ミリモル）から実施例7Aで用いた手順により製造した。

20

$C_{37}H_{28}NO_9$ の計算値：630.1764；実測値：630.1763。

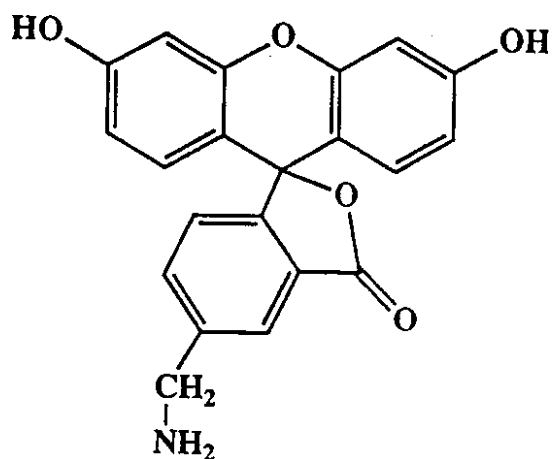


30

(B) 5-アミノメチルフルオレスセイン（600 mg、1.36ミリモル、98%）を実施例7Bにおけると同様に5-[(N-ジCbz-アミノ)メチル]フルオレスセインから製造した。

$C_{21}H_{16}NO_5$ の計算値：352.1028；実測値：362.1027。

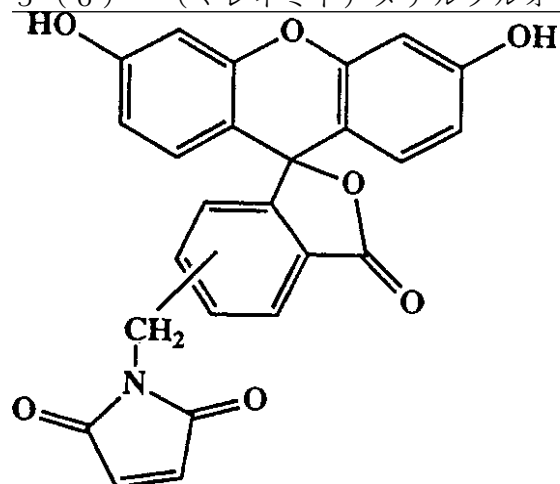
40



10

実施例 9

5 (6) - (マレイミド) メチルフルオレスセインの製造



20

(A) 3', 6'-ジアセチル-5 (6) -ヒドロキシメチルフルオレスセイン (100 mg、0. 2ミリモル) とマレイミド (20 mg、0. 2ミリモル) とトリフェニルホスフィン (57 mg、0. 2ミリモル) とをTHF (10 ml) に溶解させた。ジエチルアゾジカルボキシレート (40 μ l、0. 2ミリモル) を添加した。反応物を窒素雰囲気下で24時間撹拌した。この反応混合物を減圧下に蒸発乾固させ、次いでクロマトグラフィー [(クロマトトロン (登録商標)、ハリソン・リサーチ社、パロアルト、CA) 2 mm プレート、塩化メチレンおよびメチルtertブチルエーテル (9 : 1)、10 ml/min の速度] により精製して3', 6'-ジアセチル-5 (6) - (マレイミド) メチルフルオレスセインを得た。

30

(B) 3', 6'-ジアセチル-5 (6) - (マレイミド) メチルフルオレスセインを実施例7Aの手順により処理して5 (6) - (マレイミド) メチルフルオレスセインを得た。

本発明をフルオレスセイン標識されたハプテン、蛋白、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリマー、固相などの作成に使用することが考えられる。5-および6-アミノメチルフルオレスセインは分析に有用な数種のFPIAトレーサの成分である。上記フルオレスセイン誘導体および方法を種々の条件下で用いて最適感度および速度が得られることを当業者は了解するであろう。

40

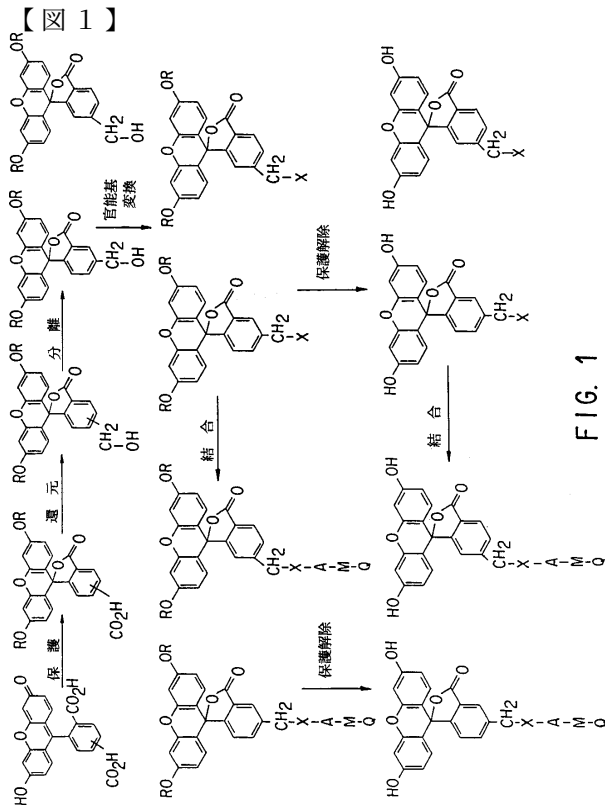


FIG. 1

フロントページの続き

合議体

審判長 森田 ひとみ

審判官 横尾 俊一

審判官 亀田 宏之

(56)参考文献 欧州特許出願公開第473961 (EP, A2)

欧州特許出願公開第455058 (EP, A2)

Biococonjugate Chem. Vol. 3, No. 5, p430~431 (1992)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C07D493/10 , G01N 33/533

CA, REGISTRY (STN)