(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5920995号
(P5920995)
(45)発行日　平成28年5月24日(2016.5.24)　(24)登録日　平成28年4月22日(2016.4.22)

(51)Int.Cl.		F I		
C07H 17/075	(2006.01)	C07H	17/075	CSP
G01N 21/64	(2006.01)	G01N	21/64	F
C12Q 1/34	(2006.01)	C12Q	1/34	
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04	
C07D 311/18	(2006.01)	C07D	311/18	

請求項の数 13　(全 24 頁)

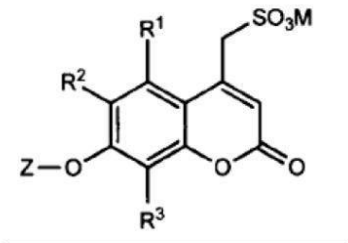
(21)出願番号　特願2013-528736(P2013-528736)
(86)(22)出願日　平成23年9月16日(2011.9.16)
(65)公表番号　特表2013-539749(P2013-539749A)
(43)公表日　平成25年10月28日(2013.10.28)
(86)国際出願番号　PCT/FR2011/000504
(87)国際公開番号　WO2012/038614
(87)国際公開日　平成24年3月29日(2012.3.29)
審査請求日　平成26年8月25日(2014.8.25)
(31)優先権主張番号　10/03759
(32)優先日　平成22年9月21日(2010.9.21)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

(73)特許権者　513067565
ウテエス　ズィ．スフレ
フランス国　エフ　－　１０４０２　ノージャン　－　シュル　－　セーヌ、ケ　サライ
(73)特許権者　513066937
ユニヴェルスィテ　ドゥ　ストラスブール
フランス国　エフ　－　６７００　ストラスブール、リュ　ブレーズ　－　パスカル、４
(74)代理人　110000855
特許業務法人浅村特許事務所
(72)発明者　ドレヴェル、アントワーヌ
フランス国、フォンテーヌ　マコン、リュ　デ　ラ　モット　７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】スルホン化クマリン、その合成、前記クマリンを糖にグラフトすることにより得られる蛍光発生基質、前記基質の調製方法、及びその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
一般式（ＩＩ）
【化１】



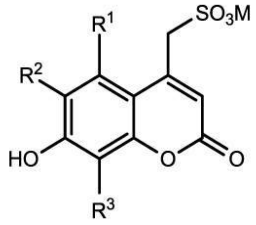
［式中、
R^1は、Ｈ、又はＯＨ、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐C_1～C_6アルキル基、又は－ＣＯＲ^4、又は－ＣＯＯＲ^4、又は－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、
R^2は、Ｈ、又はハロゲン、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐C_1～C_6アルキル基、又は－ＣＯＲ^4、又は－ＣＯＯＲ^4、又は－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、
R^1とR^2とは環を一緒に形成してもよく、環は置換若しくは非置換の、アリール又はフランから選択され、

R^3は、H、又はハロゲン、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐C_1～C_6アルキル基を表し、
R^4は、H、又は置換若しくは非置換の、直鎖又はC_1～C_6分岐アルキル基、又は置換若しくは非置換のアリールであり、
MはＮａ又はＫを表し、
Ｚは、以下の糖、即ちセロビオース、キシロビオース、マルトース、サッカロース、グルコース、キシロース、ガラクトース、アラビノース、キシラン、グルカン、キシロトリオース、マルトトリオース、セロトリオース、キシロテトラオース又は、セロビオース、キシロビオース、マルトース、サッカロース、グルコース、キシロース、ガラクトース、アラビノース、キシラン、グルカン、キシロトリオース、マルトトリオース、セロトリオース、及びキシロテトラオースからなる群より選ばれる複数の糖の組み合わせにより形成される多糖類から選択され：
R^1がH、R^2及びR^3がＦ及びMがＮａの場合、Ｚはガラクトースではない］
の蛍光発生基質。
【請求項２】
R^2及び／又はR^3がハロゲンを表し、該ハロゲンがフッ素である、請求項１に記載の蛍光発生基質。
【請求項３】
ナトリウムβ－Ｄ－セロビオシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－グルコシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－キシロシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－キシロビオシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－キシロポリオシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－グルコシド５，６－ベンゾ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－キシロシド５，６－ベンゾ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－グルコシド７－ヒドロキシ－８－メチルクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－ガラクトシド７－ヒドロキシ－８－メチルクマリン－４－メタンスルホネートから選択される、請求項１又は２に記載の蛍光発生基質。
【請求項４】
請求項１から３のいずれかに記載の蛍光発生基質を調製する方法であって、糖のクマリンへのグラフトがＤＭＦ中で実現されることを特徴とする上記方法。
【請求項５】
請求項４に記載の蛍光発生基質を調製する方法であって、グラフトがアセチル部位を脱保護することによって起こることを特徴とする上記方法。
【請求項６】
請求項４又は５のいずれかに記載の蛍光発生基質を調製する方法であって、前記クマリンにグラフトされる前に前記糖が臭素化されることを特徴とする上記方法。
【請求項７】
請求項４～６のいずれかに記載の蛍光発生物質を調製する方法であって、クマリンの精製が、シリカカラムでの逆相吸着クロマトグラフィーによって実現されることを特徴とする上記方法。
【請求項８】
請求項４～７のいずれかに記載の蛍光発生基質を調製する方法であって、基質がＤＭＦ中でスルホン化クマリンと一緒に前記糖のアセトブロモ誘導体の反応を含む糖のスルホン化クマリンへのグラフトによって得られ、アセタール部位を脱保護することによって起こることを特徴とする上記方法。
【請求項９】
精製若しくは未精製の酵素抽出物又は微生物又は細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．

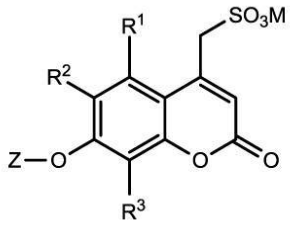
２．１）の検出方法であって、前記検出が、請求項１から３のいずれかに記載の蛍光発生基質のうち１つを使用して達成されることを特徴とする上記検出方法。
【請求項１０】
前記抽出物又は微生物又は細胞が油相中に懸濁している水滴中に分画されていることを特徴とする、請求項９に記載の精製若しくは未精製の酵素抽出物又は微生物又は細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．２．１）の検出方法。
【請求項１１】
前記水滴が、マイクロ流体デバイスによって作製されることを特徴とする、請求項１０に記載の精製若しくは未精製の酵素抽出物又は微生物又は細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．２．１）の検出方法。
【請求項１２】
前記クマリンが、ナトリウム５，６－ベンゾ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネートであることを特徴とする置換スルホン化クマリン。
【請求項１３】
請求項１２に記載のクマリンを取得する方法であって、エチル４－クロロアセトアセテートをメタンスルホン酸中で１，３－ジヒドロキシナフタレンに作用させ、次いで、これによって得られた生成物に亜硫酸ナトリウムを作用させることから成ることを特徴とする上記方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、スルホン化クマリン、その合成、これらのクマリンを糖にグラフトすることにより得られる蛍光発生基質、この基質を取得する方法、及びその適用に関する。
【背景技術】
【０００２】
このようなスルホン化クマリンを作製する他の方法は、例えば、６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリンの誘導体の合成を記載している、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＰＲＯＢＥＳ名義の英国特許ＧＢ９７２３３６５によって、既知のものとなっている。
【０００３】
したがって、本特許では、特に、ナトリウム６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート（化合物番号３７）について記載する。
【０００４】
特許ＧＢ９７２３３６５には、ヒドロキシル基を糖残基と置き換えることから得られる、糖残基がスルホン化クマリンにグラフトされている化合物についても記載されている。上記の特許に記載されたグラフト方法の再現は、スルホン化クマリンについては確実でない。その理由は、スルホン化クマリンは記載された条件下で可溶性ではないからである。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
本発明の目的は、新規な置換スルホン化クマリンを合成することである。
【０００６】
本発明の別の目的は、種々の糖と、種々の置換スルホン化クマリンとの再現可能なグラフト方法によって、置換スルホン化クマリンを糖にグラフトすることにより得られる蛍光発生基質を提供することである。本明細書において、蛍光発生基質とは、この基質において糖とクマリンとの間の化学結合が加水分解されると、それ自体が蛍光を発するクマリンが放出される、非蛍光の基質を意味する。
【０００７】
本発明の別の目的は、精製若しくは未精製の酵素抽出物又は微生物又は細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．２．１）の検出方法に関する。

【課題を解決するための手段】
【０００８】
本発明は、より具体的には、一般式（Ｉ）
【化１】



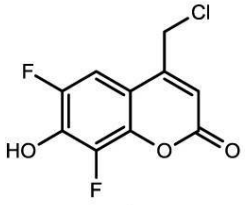
［式中、
Ｒ^{1}は、Ｈ、又はＯＨ、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、
Ｒ^{2}は、Ｈ、又はハロゲン、特にフッ素、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、
Ｒ^{1}とＲ^{2}とは、置換又は非置換の、アリール又はフランなどの環を一緒に形成してもよく、
Ｒ^{3}は、Ｈ、又はハロゲン、特にフッ素、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、
Ｒ^{4}は、Ｈ、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は置換若しくは非置換のアリールであり、
ＭはＮａ又はＫを表す］
の置換スルホン化クマリンの一群に関する。
【０００９】
本発明は、一般式（ＩＩ）
【化２】



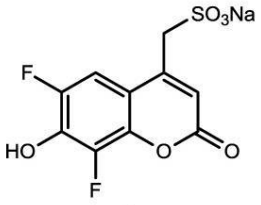
［式中、
Ｒ^{1}は、Ｈ、又はＯＨ、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、
Ｒ^{2}は、Ｈ、又はハロゲン、特にフッ素、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、
Ｒ^{1}とＲ^{2}とは、置換又は非置換の、アリール又はフランなどの環を一緒に形成してもよく、
Ｒ^{3}は、Ｈ、又はハロゲン、特にフッ素、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}

を表し、
　R^4は、H、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐C_1～C_6アルキル基、又は置換若しくは非置換のアリールであり、
　MはＮａ又はＫを表し、
　Ｚは、以下の糖、即ちセロビオース、キシロビオース、マルトース、サッカロース、グルコース、キシロース、ガラクトース、アラビノース、キシラン、グルカン、キシロトリオース、マルトトリオース、セロトリオース、キシロテトラオースから選択された糖、又はこれらのうち幾つかの混合物を表す］
を有する新規な基質にも関する。
【００１０】
　本発明は、１～２４の番号をつけた以下の化合物を参照しながら以下の記載を読めば、より深く理解されるであろう。

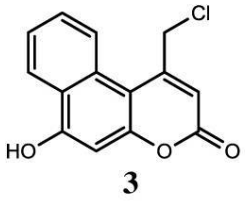
【化３－１】



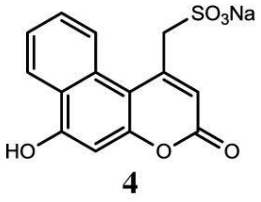
1



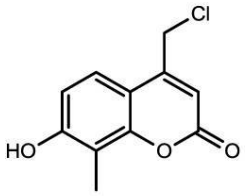
2



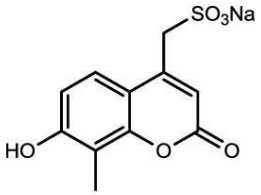
3



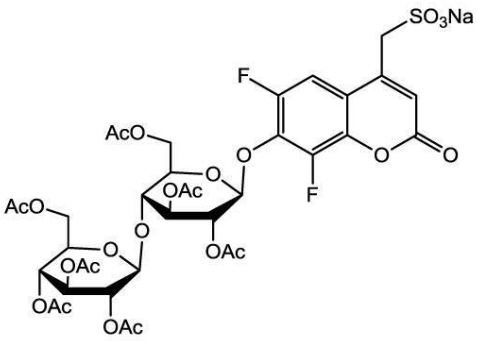
4



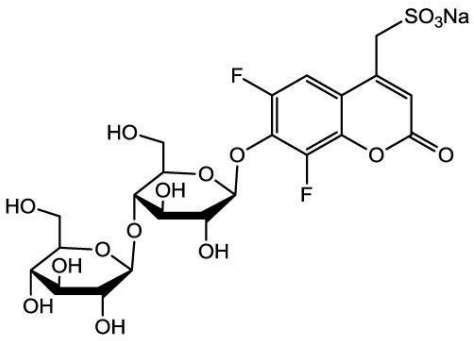
5



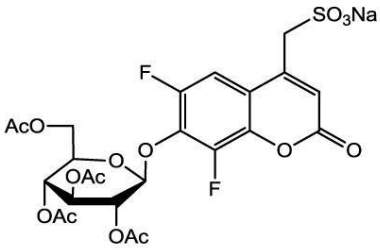
6



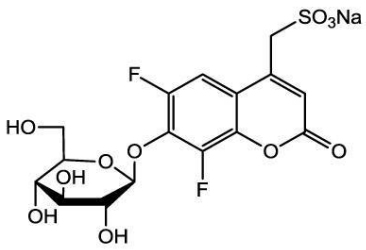
7



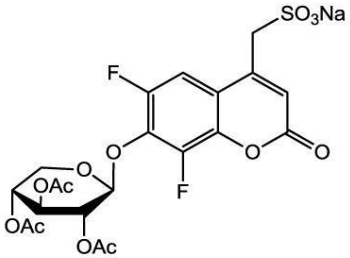
8



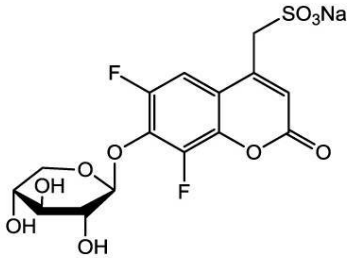
9



10

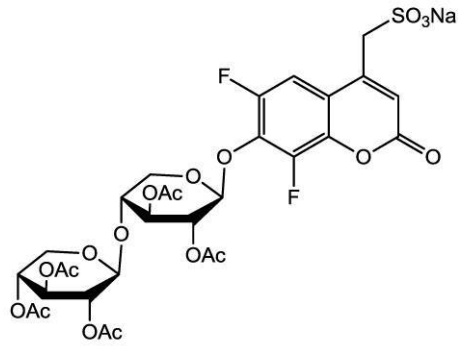


11

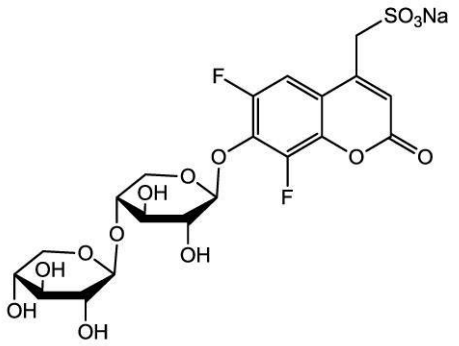


12

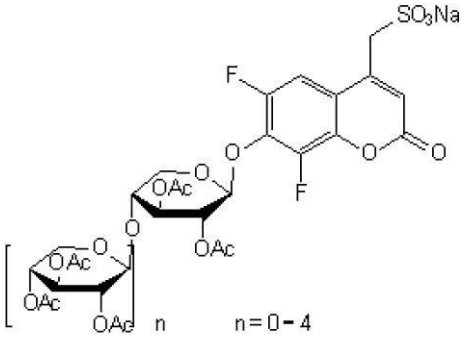
【化３－２】



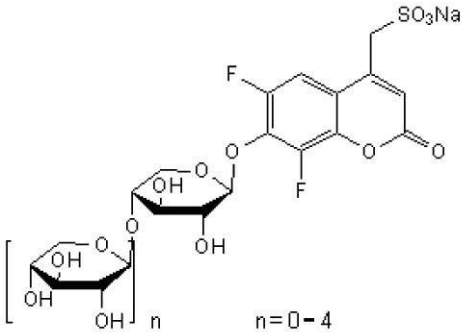
13



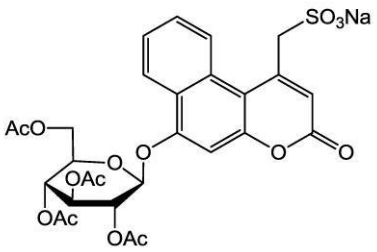
14



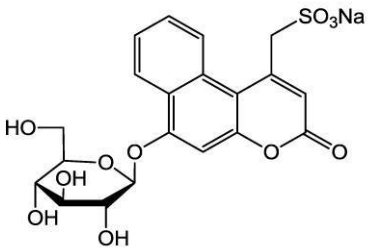
15



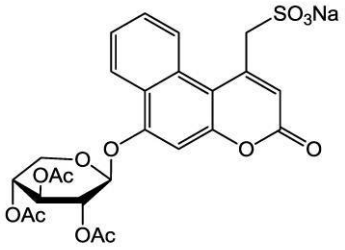
16



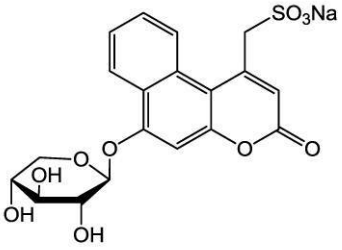
17



18

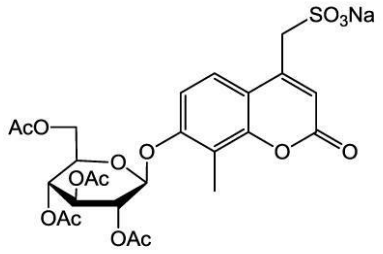


19

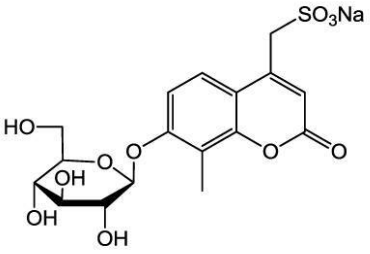


20

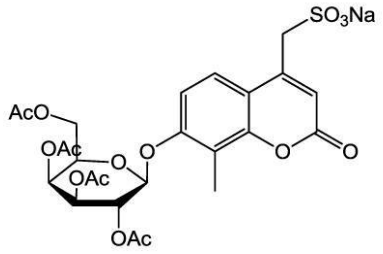
【化３－３】



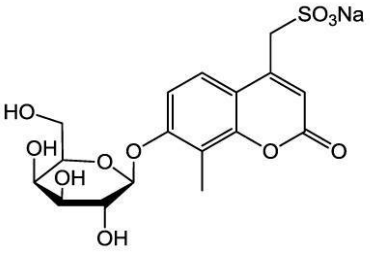
21



22



23



24

上の化合物の中で、化合物２、４及び６は、一般式（Ｉ）に入る置換スルホン化クマリンであり、化合物８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２及び２４は、一般式（ＩＩ）に入る基質の例である。

【実施例】

【００１１】

これらのクマリン及び基質を合成する種々の実施例を、決して限定としてではなく、指標として、以下に記載することにする。

【００１２】

（実施例１）４－クロロメチル－６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン（１）の合成

メチルスルホン酸８ｍＬ中に２，４－ジフルオロレゾルシノール（０．８ｇ）を溶解した溶液をフラスコ中に導入し、次いで、エチル４－クロロアセトアセテート１．３当量（９６３μＬ）を滴下する。室温で３時間攪拌した後、混合物を０℃まで冷却し、次いで、水１００ｍＬを添加する。その後、残留物を濾過し、乾燥し、ジエチルエーテルで洗浄して化合物１を０．３４ｇ（２５％）得る。

^{1}H NMR (MeOD) δ (ppm) 7.42 (d, 1H); 6.05 (s, 1H); 4.81 (s, 2H).

【００１３】

（実施例２）ナトリウム６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート（２）の合成

エタノール２５ｍＬ中に溶解した３２０ｍｇの化合物１の溶液をフラスコ中に導入し、次いで、水６ｍＬ中に亜硫酸ナトリウム（１．１当量、１８５ｍｇ）を溶解した溶液を添加する。混合物を還流させ、反応の進展をＴＬＣ（薄層クロマトグラフィー）によって追跡する。４０時間加熱した後、混合物を０℃まで冷却する。溶液を濾過し、次いで、濾液を減圧下で蒸発させて黄色の固体を得る。

【００１４】

得られた固体を、充填済みシリカカラム（溶離剤：純水、カートリッジ　Ｐｕｒｉｆｌａｓｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈｒｏｍ　Ｃ１８）での逆相クロマトグラフィーによって１回精製し、その後続いて、精製装置Ｂｉｏｔａｇｅ－ＩｓｏｌｅｒａＯｎｅ（溶離剤：純水、カートリッジ　ＳＮＡＰ　Ｃ１８　１２０ｇ、溶離流速：２５ｍＬ／分）で精製する。

【００１５】

減圧下で水を蒸発させた後、生成物２が、純粋な状態で、収率４０％で得られる。

^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 7.28 (d, 1H); 6.18 (s, 1H); 4.32 (s 2H).

^{13}C NMR (D_2O) δ (ppm) 163.7; 153.1 (dd); 150.5 (t); 149.0; 142.2 (dd); 140.7 (m); 109.2; 105.3 (d); 103.6 (d); 52.7.

【００１６】

最大励起波長／蛍光波長＝３７０／４７０ｎｍ（５０ｍＭリン酸緩衝液、ＮａＣｌ１５０ｍＭ、ｐＨ＝７．５中１０μＭ）。

【００１７】

（実施例３）５，６－ベンゾ－４－クロロメチル－７－ヒドロキシクマリン（３）の合成

メタンスルホン酸１０ｍＬ中に１，３－ジヒドロキシナフタレン（１ｇ）を溶解した溶液をフラスコ中に導入し、次いで、エチル４－クロロアセトアセテート１．３当量（１．１０ｍｌ）を滴下する。室温で４日攪拌した後、混合物を０℃まで冷却し、次いで、水５０ｍＬを添加する。その後、残留物を濾過し、水で洗浄し、乾燥して化合物３を１．３０ｇ（８０％）得る。

^{1}H NMR (DMSO) δ (ppm) 8.47 (d, 1H); 8.32 (d, 1H); 7.75 (t, 1H); 7.60 (t, 1H); 6.88 (s, 1H); 6.58 (s, 1H); 5.33 (s, 2H).

【００１８】

（実施例４）ナトリウム５，６－ベンゾ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート（４）の合成

エタノール５０ｍＬに溶解した０．７ｇの化合物３の溶液をフラスコ中に導入し、次いで、水１３ｍＬ中に亜硫酸ナトリウム（１．１当量、３７０ｍｇ）を溶解した溶液を添加する。混合物を還流させ、反応の進展をＴＬＣによって追跡する。２０時間加熱した後、混合物を０℃まで冷却する。溶液をブフナー漏斗で濾過し、次いで、濾液を減圧下で蒸発させて、黄色固体の形態の粗化合物４を収率７７％で得る。

【００１９】

得られた固体を、充填済みシリカカラム（溶離剤：純水、カートリッジ　Ｐｕｒｉｆｌａｓｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈｒｏｍ　Ｃ１８）での逆相クロマトグラフィーによって一度精製し、その後続いて、精製装置Ｂｉｏｔａｇｅ－ＩｓｏｌｅｒａＯｎｅ（溶離剤：１０％アセトニトリル／９０％水、カートリッジ　ＳＮＡＰ　Ｃ１８　１２０ｇ、溶離流速：２５ｍＬ／分）で精製する。

【００２０】

減圧下で溶媒を蒸発させた後、生成物４が、純粋な状態で、収率３１％で得られる。

^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 8.26 (d, 1H); 8.02 (d, 1H); 7.56 (t, 1H); 7.44 (t, 1H); 6.32 (s, 1H); 6.11 (s, 1H); 4.45 (s, 2H).

【００２１】

最大励起波長／蛍光波長＝４２０／５１０ｎｍ（５０ｍＭリン酸緩衝液、ＮａＣｌ１５０ｍＭ、ｐＨ＝７．５中１００μＭ）。

【００２２】

（実施例５）４－クロロメチル－７－ヒドロキシ－８－メチルクマリン（５）の合成

メチルスルホン酸１０ｍＬ中に２－メチルレゾルシノール（１ｇ）を溶解した溶液をフラスコ中に導入し、次いで、エチル４－クロロアセトアセテート１．３当量（１．４２ｍｌ）を滴下する。室温で一晩攪拌した後、混合物を０℃まで冷却し、次いで、水５０ｍＬを添加する。その後、残留物を濾過し、乾燥し、ジエチルエーテルで洗浄して化合物５を１．６３ｇ（９０％）得る。

^{1}H NMR (DMSO) δ (ppm) 7.52 (d, 1H); 6.90 (d, 1H); 6.41 (s, 1H); 4.93 (s, 2H); 2.16 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO) δ (ppm) 160.8; 159.7; 153.6; 151.7; 123.5; 112.3; 111.6; 111.1; 109.8; 41.9; 8.4.

【００２３】

（実施例６）ナトリウム４－クロロメチル－７－ヒドロキシ－８－メチルクマリン－４－

メタンスルホネート（６）の合成
エタノール９０ｍＬ中に１ｇの化合物５を溶解した溶液をフラスコ中に導入し、次いで、水２２ｍＬ中に亜硫酸ナトリウム（１．１当量、６１７ｍｇ）を溶解した溶液を添加する。混合物を還流させる。２０時間加熱した後、混合物を０℃まで冷却する。溶液をブフナー漏斗で濾過し、得られたベージュ色の残留物をエタノールで洗浄し、濾液については、減圧下で蒸発させて黄色の固体を得る。この固体をエタノール及びジエチルエーテルで洗浄する。得られた両方の固体を収集して粗化合物６を１ｇ（８０％）得る。

【００２４】
その後、粗化合物６を、充填済みシリカカラム（溶離剤：純水、カートリッジ　Ｐｕｒｉｆｌａｓｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈｒｏｍ　Ｃ１８）での数回連続の逆相クロマトグラフィーによって精製して、純粋な生成物６を収率２３％で得る。

^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 7.32 (d, 1H); 6.69 (d, 1H); 6.15 (s, 1H); 4.19 (s, 2H); 1.97 (s, 3H).

^{13}C NMR (D_2O) δ (ppm) 164.2; 158.5; 148.9; 123.9; 112.6; 112.2; 111.8; 111.3; 52.4; 7.3.

【００２５】
最大励起波長／蛍光波長＝３４０／４８５ｎｍ（５０ｍＭリン酸緩衝液、ＮａＣｌ１５０ｍＭ、ｐＨ＝７．５中１０μＭ）。

【００２６】
（実施例７）ナトリウムβ－Ｄ－セロビオシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート基質（８）の合成
保護糖の臭素化
窒素雰囲気下で、アセト－α－Ｄ－セロビオース１ｇ及び無水ＤＣＭ（ジクロロメタン）１２．５ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、酢酸中３３％の臭化水素酸溶液１５ｍＬを滴下する。０℃で５時間反応させた後、ＤＣＭ２５ｍＬを添加し、次いで、混合物を１０分間さらに攪拌する。その後、炭酸カリウム溶液を、CO_2が発生しなくなるまで慎重に添加し、中間物を攪拌しながら２０分間置く。デカンテーションの後、有機相を回収し、水相をＤＣＭで３回抽出し、次いで有機相をまとめ、$MgSO_4$で乾燥し、減圧下で蒸発させる。アセトブロモ－α－Ｄ－セロビオースが白色の固体として収率６２％で得られる。これによって得られた生成物は不安定で、直ちに使用するか、又は－２０℃で保存するべきである。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 6.67 (m, 1H); 5.55 (t, 1H); 5.13 (m, 2H); 4.95 (t, 1H); 4.78 (m, 1H); 4.55 (m, 2H); 4.38 (m, 1H); 4.20 (m, 2H); 4.07 (m, 1H); 3.84 (m, 1H); 3.68 (m, 1H); 2.09 (m, 21H).

【００２７】
糖のクマリンへのグラフト
窒素雰囲気下で、且つ光から保護して、無水ＤＭＦ（ジメチルホルムアミド）５ｍＬ中に希釈した４０ｍｇのクマリン２、及び炭酸銀１５０ｍｇをフラスコ中に導入する。アセトブロモ－α－Ｄ－セロビオース４当量（３５０ｍｇ）を無水ＤＭＦ１０ｍＬ中に溶解する。その後、この溶液を先の混合物にきわめてゆっくり添加する。室温で一晩攪拌した後、溶液をセライトで濾過し、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００２８】
得られた固体を、シリカカラム（溶離剤：２０％ＭｅＯＨ／８０％ＤＣＭ）でのクロマトグラフィーによって最終的に精製する。化合物７が収率４．８％で得られる。

【００２９】
アセタール型の官能基の脱保護
窒素雰囲気下で、４０ｍｇの化合物７及び無水メタノール７．５ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、メタノール５ｍＬ中にナトリウムメチレート１６ｍｇを溶解した溶液を滴下する。反応の進展をＬＣ／ＭＳによって追跡する。１時間攪拌した後、クエン酸の希釈溶液を添加することによって中間物を中和する。２０分間さ

らに攪拌した後、溶媒を減圧下で蒸発させて半透明の黄色の油を得る。

【００３０】

得られた残留物を、充填済みシリカカラム（溶離剤：純水、カートリッジ　Ｐｕｒｉｆｌａｓｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈｒｏｍ　Ｃ１８）での逆相クロマトグラフィーによって１回精製し、その後続いてＨＰＬＣ（高圧液体クロマトグラフィー）によって精製する。

ＨＰＬＣの方法：・０分→１０分、１．５ｍＬ／分：１００％水
・１０分→１９分、１．５ｍＬ／分：９０％水／１０％アセトニトリル
・１９分→２３分、１．５ｍＬ／分：１００％アセトニトリル
・２３分→２５分、１．５ｍＬ／分：１００％水

【００３１】

カラムの特性：Ｈｙｐｅｒｓｉｌカラム、Ｇｏｌｄ　Ｐｈｅｎｙｌ、Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ５、長さ２５０ｍｍ、直径４．６ｍｍ。

【００３２】

注入物は８０μＬであり、生成物は、０分→１０分の間には水相中に流出するのみであり、その後すぐに遊離クマリンが溶解して存在する。

【００３３】

凍結乾燥後、生成物８が、純粋な状態で、白色の固体として、収率３０％で得られる。

^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 7.55 (d, 1H); 6.60 (s, 1H); 5.17 (d, 1H); 4.45 (d, 1H); 4.38 (s, 2H); 3.9-3.2 (m, 12H).

【００３４】

（実施例８）ナトリウムβ－Ｄ－グルコシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート基質（１０）の合成

糖のクマリンへのグラフト

窒素雰囲気下で、且つ光から保護して、無水ＤＭＦ５ｍＬ中に希釈した１００ｍｇのクマリン２、及び炭酸銀５当量をフラスコ中に導入する。アセトブロモ（ａｃｅｔｒｏｂｒｏｍｏ）－α－Ｄ－グルコース５当量を無水ＤＭＦ５ｍＬ中に溶解する。その後、この溶液を先の混合物にきわめてゆっくり添加する。反応の進展をＬＣ／ＭＳによって追跡する。室温で終夜攪拌した後、溶液をセライトで濾過し、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００３５】

得られた固体を、シリカカラム（溶離剤：２０％ＭｅＯＨ／８０％ＤＣＭ）でのクロマトグラフィーによって最終的に精製する。化合物９が収率３７％で得られる。

^{1}H NMR (MeOD) δ (ppm) 7.73 (d, 1H); 6.63 (s, 1H); 5.4-5.1 (m, 4H); 4.4-4.1 (m, 2H); 4.34 (s, 2H); 4.04 (m, 1H); 2.1 (m, 12H).

【００３６】

アセタール型の官能基の脱保護

窒素雰囲気下で、４５ｍｇの化合物９及び無水メタノール１０ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、メタノール中１％（ｇ／ｇ）のナトリウムメチレート溶液３５０μＬを滴下する。反応の進展をＬＣ／ＭＳによって追跡する。２時間３０分攪拌した後、中間物が中和するまでＡｍｂｅｒｌｉｔｅ　ＩＲ１２０をいくらか添加する。Ａｍｂｅｒｌｉｔｅを濾過した後、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００３７】

得られた残留物を、充填済みシリカカラム（溶離剤：純水、カートリッジ　Ｐｕｒｉｆｌａｓｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈｒｏｍ　Ｃ１８）での逆クロマトグラフィーによって１回精製し、その後続いて、精製装置Ｂｉｏｔａｇｅ－ＩｓｏｌｅｒａＯｎｅ（溶離剤：純水、カートリッジ　ＳＮＡＰ　Ｃ１８　１２ｇ、溶離流速：５ｍＬ／分）で精製する。

【００３８】

凍結乾燥後、生成物１０が、純粋な状態で、収率５４％で得られる。

^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 7.52 (d, 1H); 6.54 (s, 1H); 5.11 (d, 1H); 4.32 (s, 2H); 3.78 (m, 1H); 3.63 (m, 1H); 3.6-3.4 (m, 4H).

【００３９】

（実施例９）ナトリウムβ－Ｄ－キシロシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート基質（１２）の合成

保護糖の臭素化

窒素雰囲気下で、アセト－β－Ｄ－キシロピラノース５００ｍｇ及びＤＣＭ１０ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、酢酸中３３％の溶液とした臭化水素酸５当量を滴下する。２４時間反応させた後、ＤＣＭ１５ｍＬを添加し、混合物を０℃まで冷却し、次いで、氷水２０ｍＬを添加する。両層の分離後、有機相を飽和ＮａＨＣＯ$_3$溶液で３回、水で３回洗浄する。ＭｇＳＯ$_4$で乾燥し、濾過した後、濾液を減圧下で蒸発させる。その後、得られたアセトブロモ－α－Ｄ－キシロースを直ちに次のステップに導入する。

【００４０】

糖のクマリンへのグラフト

窒素雰囲気下で、且つ光から保護して、無水ＤＭＦ８ｍＬ中に希釈した１００ｍｇのクマリン２、及び炭酸銀５当量をフラスコ中に導入する。アセトブロモ－α－Ｄ－キシロース５当量を無水ＤＭＦ６ｍＬ中に溶解する。その後、この溶液を先の混合物にきわめてゆっくり添加する。反応の進展をＬＣ／ＭＳによって追跡する。室温で一晩攪拌した後、溶液をセライトで濾過し、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００４１】

得られた固体を、シリカカラム（溶離剤：２０％ＭｅＯＨ／８０％ＤＣＭ）でのクロマトグラフィーによって最終的に精製する。化合物１１が、純粋な状態で、収率３４％で得られる。

^{1}H NMR (MeOD/D_2O) δ (ppm) 7.70 (d, 1H); 6.66 (s, 1H); 5.46 (d, 1H); 5.25 (m, 2H); 5.04 (m, 1H); 4.37 (s, 2H); 4.32 (m, 1H); 3.70 (m, 1H); 2.13 (m, 9H).

【００４２】

アセタール型の官能基の脱保護

窒素雰囲気下で、６２ｍｇの化合物１１及び無水メタノール１５ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、メタノール中１％（ｇ／ｇ）のナトリウムメチレート溶液５００μＬを滴下する。反応の進展をＬＣ／ＭＳによって追跡する。１時間３０分攪拌した後、中間物が中和するまでＡｍｂｅｒｌｉｔｅ　ＩＲ１２０をいくらか添加する。Ａｍｂｅｒｌｉｔｅを濾過した後、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００４３】

得られた残留物を、充填済みシリカカラム（溶離剤：純水、カートリッジ　Ｐｕｒｉｆｌａｓｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈｒｏｍ　Ｃ１８）での逆クロマトグラフィーによって１回精製し、その後続いて、精製装置Ｂｉｏｔａｇｅ－ＩｓｏｌｅｒａＯｎｅ（溶離剤：純水、カートリッジ　ＳＮＡＰ　Ｃ１８　３０ｇ、溶離流速：１５ｍＬ／分）で精製する。

【００４４】

凍結乾燥後、生成物１２が、純粋な状態で、収率６２％で得られる。

^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 7.64 (d, 1H); 6.66 (s, 1H); 5.14 (d, 1H); 4.43 (s, 2H); 4.02 (m, 1H); 3.5-3.7 (m, 3H); 3.35 (m, 1H).

【００４５】

（実施例１０）ナトリウムβ－Ｄ－キシロビオシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート基質（１４）の合成

保護糖の臭素化

アセト－Ｄ－キシロビオースを出発物として使用し、操作条件は実施例９において使用した条件と同一である。その後、得られたアセトブロモ－α－Ｄ－キシロビオースを直ちに次のステップに導入する。

【００４６】

糖のクマリンへのグラフト

窒素雰囲気下で、且つ光から保護して、無水ＤＭＦ５ｍＬ中に希釈した６０ｍｇのクマリン２、及び炭酸銀５当量をフラスコ中に導入する。アセトブロモ－α－Ｄ－キシロビオ

ース３当量を無水ＤＭＦ５ｍＬ中に溶解する。その後、この溶液を先の混合物にきわめてゆっくり添加する。室温で一晩攪拌した後、溶液をセライトで濾過し、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００４７】

得られた固体を、シリカカラム（溶離剤：ＤＣＭ中１０％ＭｅＯＨ～２０％ＭｅＯＨのグラジエント）でのクロマトグラフィーによって２回連続して精製する。化合物１３が、純粋な状態で、収率１８％で得られる。

^{1}H NMR (MeOD) δ (ppm) 7.70 (d, 1H); 6.61 (s, 1H); 5.38 (d, 1H); 5.16 (m, 3H); 4.92 (m, 1H); 4.78 (m, 2H); 4.32 (s, 2H); 4.18 (m, 1H); 4.10 (m, 1H); 4.03 (m, 1H); 3.54 (m, 2H); 2.09 (m, 15H).

【００４８】

アセタール型の官能基の脱保護

窒素雰囲気下で、２７ｍｇの化合物１３及び無水メタノール７ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、メタノール中１％（ｇ／ｇ）のナトリウムメチレート溶液２００μＬを滴下する。反応の進展をＬＣ／ＭＳによって追跡する。３時間３０分攪拌した後、中間物が中和するまでＡｍｂｅｒｌｉｔｅ　ＩＲ１２０をいくらか添加する。Ａｍｂｅｒｌｉｔｅを濾過した後、濾液を減圧下で蒸発させる。残留物を水中に採り、溶液を０．４５μｍまで濾過し、濾液を減圧下で再度蒸発させる。

【００４９】

得られた残留物を精製装置Ｂｉｏｔａｇｅ－ＩｓｏｌｅｒａＯｎｅ（溶離剤：純水中５％のアセトニトリル、カートリッジ　ＳＮＡＰ　Ｃ１８　１２ｇ、溶離流速：３ｍＬ／分）で精製する。

【００５０】

溶媒を蒸発させた後、生成物１４が、純粋な状態で、収率４０％で得られる。

^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 7.56 (d, 1H); 6.58 (s, 1H); 5.11 (d, 1H); 4.40 (d, 1H); 4.36 (s, 2H); 4.10 (m, 1H); 3.91 (m, 1H); 3.82 (m, 1H); 3.7-3.5 (m, 3H); 3.40 (m, 2H); 3.21 (m, 2H).

【００５１】

（実施例１１）ナトリウムβ－Ｄ－キシロポリオシド（ｘｙｌｏｐｏｌｙｏｓｉｄｅ）６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート基質（１６）の合成

キシロポリオース（ｘｙｌｏｐｏｌｙｏｓｅ）即ちキシロビオース、キシロトリオース、・・・の混合物のアセチル化

窒素雰囲気下で、キシロポリオース３００ｍｇ、４－ジメチルアミノピリジン数粒、無水ＤＣＭ２８ｍＬ及び無水ピリジン９ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、無水酢酸３ｍＬを滴下する。その後、中間物を攪拌しながら一晩置く。その後、混合物を水で３回洗浄し、$MgSO_4$で乾燥し、減圧下で蒸発させる。

【００５２】

ＬＣ／ＭＳによる分析から、混合物が、ｎ＝１～５のアセト－キシロポリオースから成ることがわかる。

【００５３】

保護糖の臭素化

アセト－キシロポリオース１０２ｍｇを出発物として使用し、操作条件は実施例９において使用した条件と同一である。その後、得られたアセトブロモ－α－Ｄ－キシロポリオースを直ちに次のステップに導入する。

【００５４】

糖のクマリンへのグラフト

窒素雰囲気下で、且つ光から保護して、無水ＤＭＦ５ｍＬ中に希釈した６０ｍｇのクマリン２、及び炭酸銀５当量をフラスコ中に導入する。アセトブロモ－キシロポリオース１０６ｍｇを無水ＤＭＦ５ｍＬ中に溶解する。その後、この溶液を先の混合物にきわめてゆ

っくり添加する。室温で３６時間攪拌した後、溶液をセライトで濾過し、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００５５】

得られた固体を、シリカカラム（溶離剤：２０％ＭｅＯＨ／８０％ＤＣＭ）でのクロマトグラフィーによって最終的に精製する。

【００５６】

ＬＣ／ＭＳによる分析から、混合物が、ｎ＝０～４の化合物１５から成ることがわかる。

【００５７】

アセタール型の官能基の脱保護

窒素雰囲気下で、１０ｍｇの化合物１５及び無水メタノール５ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、メタノール中１％（ｇ／ｇ）のナトリウムメチレート溶液１００μＬを滴下する。数時間攪拌した後、中間物が中和するまでＡｍｂｅｒｌｉｔｅ　ＩＲ１２０をいくらか添加する。Ａｍｂｅｒｌｉｔｅを濾過した後、濾液を減圧下で蒸発して、化合物１６を得る。

【００５８】

（実施例１２）ナトリウムβ－Ｄ－グルコシド５，６－ベンゾ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート基質（１８）の合成

糖のクマリンへのグラフト

窒素雰囲気下で、且つ光から保護して、無水ＤＭＦ６ｍＬ中に希釈した８０ｍｇのクマリン４、及び炭酸銀５当量をフラスコ中に導入する。アセトブロモ－α－Ｄ－グルコース５当量を無水ＤＭＦ５ｍＬ中に溶解する。その後、この溶液を先の混合物に４５分以内に添加する。室温で攪拌した後、溶液をセライトで濾過し、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００５９】

得られた固体を、シリカカラム（溶離剤：１０％ＭｅＯＨ／９０％ＤＣＭ）でのクロマトグラフィーによって精製する。化合物１７が、純粋な状態で、収率３７％で得られる。

^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 8.04 (d, 1H); 7.50 (d, 1H); 7.25 (m, 2H); 6.56 (s, 1H); 6.31 (s,1H); 5.30 (m, 2H); 5.08 (m, 1H); 4.96 (d, 1H); 4.56 (d, 1H); 4.26 (m, 1H); 4.21 (s, 2H); 4.03 (m, 1H); 2.10 (m, 12H).

【００６０】

アセタール型の官能基の脱保護

窒素雰囲気下で、６０ｍｇの化合物１７及び無水メタノール１５ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、メタノール中１％（ｇ／ｇ）のナトリウムメチレート溶液４５０μＬを滴下する。反応の進展をＬＣ／ＭＳによって追跡する。２時間５０分攪拌した後、中間物が中和するまでＡｍｂｅｒｌｉｔｅ　ＩＲ１２０をいくらか添加する。Ａｍｂｅｒｌｉｔｅを濾過した後、濾液を減圧下で蒸発させる。残留物を水中に採り、次いで溶液を０．４５μｍまで濾過し、濾液を減圧下で再度蒸発させる。

【００６１】

得られた残留物を、精製装置Ｂｉｏｔａｇｅ－ＩｓｏｌｅｒａＯｎｅ（溶離剤：純水中５％のアセトニトリル、カートリッジ　ＳＮＡＰ　Ｃ１８　３０ｇ、溶離流速：１０ｍＬ／分）で精製する。

【００６２】

溶媒を蒸発させた後、生成物１８が、純粋な状態で、収率３３％で得られる。

^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 8.24 (d, 1H); 8.18 (d, 1H); 7.53 (m, 2H); 6.80 (s, 1H); 6.24 (s, 1H); 5.25 (d, 1H); 4.49 (m,2H); 4.0-3.5 (m, 6H).

【００６３】

（実施例１３）ナトリウムβ－Ｄ－キシロシド５，６－ベンゾ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート基質（２０）の合成

糖のクマリンへのグラフト

窒素雰囲気下で、且つ光から保護して、無水ＤＭＦ４ｍＬ中に希釈した５５ｍｇのクマ

リン４、及び炭酸銀５当量（０．３ｇ）をフラスコ中に導入する。アセトブロモ－α－Ｄ－キシロース（実施例９に記載した通りに得られたもの）５当量を無水ＤＭＦ４ｍＬ中に溶解する。その後、この溶液を先の混合物にゆっくり添加する。室温で２０時間攪拌した後、溶液をセライトで濾過し、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００６４】

得られた固体を、シリカカラム（溶離剤：１０％ＭｅＯＨ／９０％ＤＣＭ）でのクロマトグラフィーによって精製する。化合物１９が収率４２％で得られる。

^{1}H NMR (MeOD/D_2O) δ (ppm) 8.57 (d, 1H); 8.00 (d, 1H); 7.68 (t, 1H); 7.55 (t, 1H); 6.89 (s, 1H); 6.52 (s, 1H); 5.53 (m, 1H); 5.31 (m, 2H); 5.08 (m, 1H); 4.61 (m, 2H); 4.23 (m, 1H); 3.78 (m, 1H); 2.17 (m, 9H).

【００６５】

アセタール型の官能基の脱保護

窒素雰囲気下で、４０ｍｇの化合物１９及び無水メタノール１１ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、メタノール中１％（ｇ／ｇ）のナトリウムメチレート溶液５００μＬを滴下する。２時間１５分反応させた後、ナトリウムメチレート溶液４００μＬを再度添加する。３時間３０分攪拌した後、中間物が中和するまでＡｍｂｅｒｌｉｔｅ　ＩＲ１２０をいくらか添加する。Ａｍｂｅｒｌｉｔｅを濾過した後、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００６６】

得られた残留物を、充填済みシリカカラム（溶離剤：純水中１０％のアセトニトリル、カートリッジ　Ｐｕｒｉｆｌａｓｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈｒｏｍ　Ｃ１８）での逆相クロマトグラフィーによって精製し、化合物２０を収率３５％で得る。

^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 8.09 (d, 1H); 7.99 (d, 1H); 7.46 (m, 1H); 7.38 (m, 1H); 6.51 (s, 1H); 6.16 (s, 1H); 4.98 (m, 1H); 4.37 (m, 2H); 4.01 (m, 1H); 3.8-3.4 (m, 4H).

【００６７】

（実施例１４）ナトリウムβ－Ｄ－グルコシド７－ヒドロキシ－８－メチルクマリン－４－メタンスルホネート基質（２２）の合成

糖のクマリンへのグラフト

窒素雰囲気下で、且つ光から保護して、無水ＤＭＦ７ｍＬ中に希釈した８０ｍｇのクマリン６、及び炭酸銀５当量（３７７ｍｇ）をフラスコ中に導入する。アセトブロモ－α－Ｄ－グルコース５当量（５６３ｍｇ）を無水ＤＭＦ７ｍＬ中に溶解する。その後、この溶液を先の混合物にゆっくり添加する。室温で２０時間攪拌した後、溶液をセライトで濾過し、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００６８】

得られた固体を、シリカカラム（溶離剤：１０％ＭｅＯＨ／９０％ＤＣＭ）でのクロマトグラフィーによって１回精製し、次いで、逆相クロマトグラフィーによって、充填済みシリカカラム（溶離剤：純水中０％～５０％のアセトニトリルのグラジエント、カートリッジ　Ｐｕｒｉｆｌａｓｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈｒｏｍ　Ｃ１８）で精製する。

【００６９】

これによって、化合物２１が、純粋な状態で、収率１７％で得られる。

^{1}H NMR (MeOD) δ (ppm) 7.85 (d, 1H); 7.67 (d, 1H); 6.47 (s, 1H); 5.47 (m, 2H); 5.30 (t, 1H); 5.16 (t, 1H); 4.4-4.1 (m, 5H); 2.25 (s, 3H); 2.08 (m, 12H).

【００７０】

アセタール型の官能基の脱保護

窒素雰囲気下で、１８ｍｇの化合物２１及び無水メタノール５ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、メタノール中１％（ｇ／ｇ）のナトリウムメチレート溶液１００μＬを滴下する。反応の進展をＴＬＣによって追跡する。１時間３０分攪拌した後、中間物が中和するまでＡｍｂｅｒｌｉｔｅ　ＩＲ１２０をいくらか添加する。Ａｍｂｅｒｌｉｔｅを濾過した後、濾液を減圧下で蒸発させる。

【００７１】
化合物２２が収率３４％で得られる。
^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 7.53 (d, 1H); 7.06 (d, 1H); 6.26 (s, 1H); 5.15 (d, 1H); 4.24 (m, 2H); 3.90 (m, 1H); 3.73 (m, 1H); 3.6-3.4 (m, 4H); 2.13 (s, 3H).
【００７２】
（実施例１５）ナトリウムβ－Ｄ－ガラクトシド７－ヒドロキシ－８－メチルクマリン－４－メタンスルホネート基質（２４）の合成
糖のクマリンへのグラフト
窒素雰囲気下で、且つ光から保護して、無水ＤＭＦ５ｍＬ中に希釈した８０ｍｇのクマリン６、及び炭酸銀５当量（３７７ｍｇ）をフラスコ中に導入する。アセトブロモ－α－Ｄ－ガラクトース５当量（５６３ｍｇ）を無水ＤＭＦ５ｍＬ中に溶解する。その後、この溶液を先の混合物にゆっくり添加する。反応の進展をＴＬＣによって追跡する。室温で４０時間攪拌した後、溶液をセライトで濾過し、濾液を減圧下で蒸発させる。
【００７３】
得られた固体を充填済みシリカカラム（溶離剤：純水中０％～５０％のアセトニトリルのグラジエント、カートリッジ　Ｐｕｒｉｆｌａｓｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈｒｏｍ　Ｃ１８）での逆相クロマトグラフィーによって１回精製し、次いで、シリカカラム（溶離剤：１０％ＭｅＯＨ／９０％ＤＣＭ）でのクロマトグラフィーによって精製する。このようにして、化合物２３が、純粋な状態で、収率４２％で得られる。
^{1}H NMR (MeOD) δ (ppm) 7.81 (d, 1H); 7.65 (d, 1H); 6.45 (s, 1H); 5.49 (m, 3H); 5.37 (m, 1H); 4.37 (m, 3H); 4.20 (m, 2H); 2.23 (s, 3H); 2.19 (s, 3H); 2.12 (s, 3H); 2.08 (s, 3H); 2.03 (s, 3H).
^{13}C NMR (MeOD) δ (ppm) 170.80; 170.65; 170.08; 169.97; 161.57; 157.33; 152.52; 148.64; 124.58; 114.82; 114.41; 114.15; 110.77; 98.48; 70.93; 70.67; 68.60; 67.39; 61.29; 52.61; 19.41; 19.37; 19.19; 19.18; 7.03.
【００７４】
アセタール型の官能基の脱保護
窒素雰囲気下で、４５ｍｇの化合物２３及び無水メタノール２０ｍＬをフラスコ中に導入する。混合物を０℃まで冷却し、次いで、メタノール中１％（ｇ／ｇ）のナトリウムメチレート溶液３００μＬを滴下する。反応の進展をＴＬＣによって追跡する。１時間３０分攪拌した後も反応が完了しておらず、メチレート溶液３００μＬを再度添加する。３時間反応させた後、中間物が中和するまでＡｍｂｅｒｌｉｔｅ　ＩＲ１２０をいくらか添加する。Ａｍｂｅｒｌｉｔｅを濾過した後、濾液を減圧下で蒸発させる。
【００７５】
化合物２４が収率３６％で得られる。
^{1}H NMR (D_2O) δ (ppm) 7.51 (d, 1H); 7.07 (d, 1H); 6.24 (s, 1H); 5.09 (d, 1H); 4.0-3.6 (m, 8H); 2.13 (s, 3H).
【００７６】
このようにして得られた基質について、特に、精製若しくは未精製の酵素抽出物又は微生物又は細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．２．１）を検出するという用途が見出された。
【００７７】
例えば、酵素抽出物の、キシラナーゼ及び／又はセルラーゼ及び／又はセロビアーゼ及び／又はグルコシダーゼ及び／又はキシロシダーゼ及び／又はガラクトシダーゼの活性（ａｃｔｉｖｉｔｅ）の蛍光アッセイを実施すること、或いは、酵素又は微生物若しくは細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．２．１）に基づいた、蛍光によるスクリーニングを実施することが可能であろう。
【００７８】
より具体的には、本発明による新規な基質は、機械的攪拌によって作製した、油相中に懸濁している水滴（エマルジョン）中に分画した、精製若しくは未精製の酵素抽出物又は

微生物又は細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．２．１）の検出を可能にするであろう。したがって、油相中に懸濁している水滴中に分画した、酵素又は微生物又は細胞の、キシラナーゼ及び／又はセルラーゼ及び／又はセロビアーゼ及び／又はグルコシダーゼ及び／又はキシロシダーゼ及び／又はガラクトシダーゼの活性に基づいた、ＦＡＣＳ（蛍光活性化細胞選別（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｉｎｇ））によるスクリーニングを実施することが可能であろう。

【００７９】

さらにより具体的には、本発明による基質は、マイクロ流体デバイスによって作製した、油相中に懸濁している水滴（エマルジョン）中に分画した、精製若しくは未精製の酵素抽出物又は微生物又は細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．２．１）の検出を可能にするであろう。この仮定に従えば、例えば、マイクロ流体デバイスによって生成された、油相中に懸濁している水滴中に分画した、酵素又は微生物又は細胞の、キシラナーゼ及び／又はセルラーゼ及び／又はセロビアーゼ及び／又はグルコシダーゼ及び／又はキシロシダーゼ及び／又はガラクトシダーゼの活性に基づいた、スクリーニングを実施することが可能であろう。

【００８０】

上記の蛍光発生基質を使用した酵素活性の検出の種々の実施例を、決して限定としてではなく、指標として、以下に挙げることにする。

【００８１】

（実施例１６）基質１０、１２、１４及び１８を使用した、可溶性酵素抽出物の酵素活性の検出

酵素反応速度分析を、セルラーゼ及びキシラナーゼ型の活性に富む可溶性酵素抽出物（Ａ、Ｂ、Ｃ及びＤ）について、マイクロプレート中で実行する。これらの抽出物を、５０ｍＭリン酸緩衝液、ＮａＣｌ１５０ｍＭ、ｐＨ＝７．５中に、１０倍（基質１８、図１）又は１００倍（基質１０、１２及び１４、図２）に希釈する。体積２０μＬの希釈酵素抽出物を、５０ｍＭリン酸緩衝液、ＮａＣｌ１５０ｍＭ、ｐＨ＝７．５中０．２５ｍＭの蛍光発生基質（１０、１２、１４又は１８）２０μＬに添加する。反応速度分析を３０℃で実行する。異なる蛍光発生基質を酵素で加水分解してから、励起波長及び蛍光波長を、基質１０、１２及び１４では３３９ｎｍ及び４５２ｎｍ、基質１８では３７５ｎｍ及び５１０ｎｍとして、１２０分間蛍光を測定する。

【００８２】

得られた結果（図１及び２）は、試験した蛍光発生基質が、使用した酵素抽出物中のβ－グルコシダーゼ型（基質１０及び１８）、β－キシロシダーゼ（基質１２）及びキシラナーゼ型（基質１４）の酵素活性の検出を可能にすることを示す。

【化４】

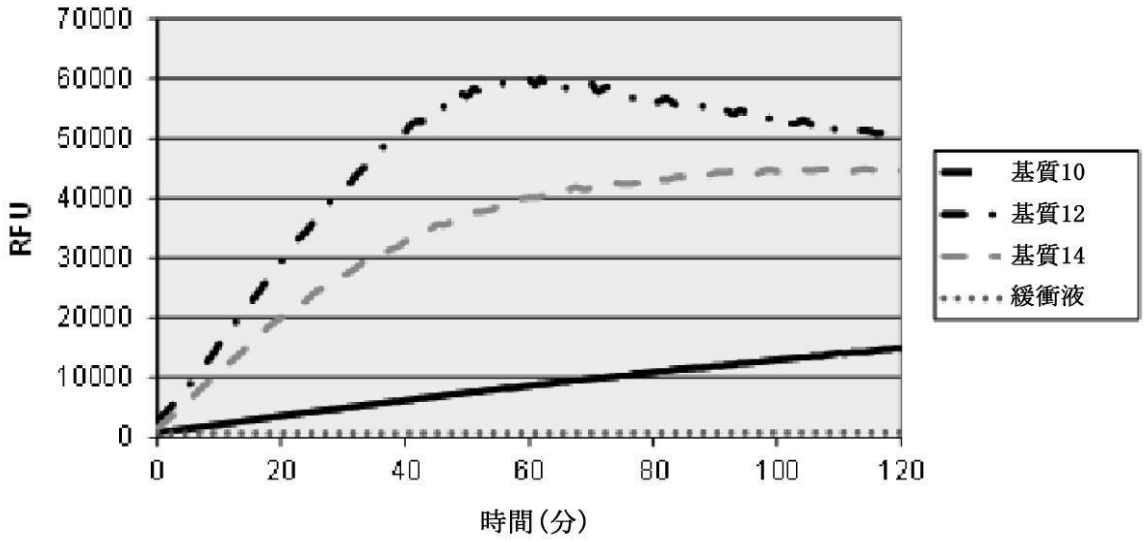


図１：基質10、12及び14を使用した、酵素Aの可溶性抽出物の酵素活性の検出

【化５】

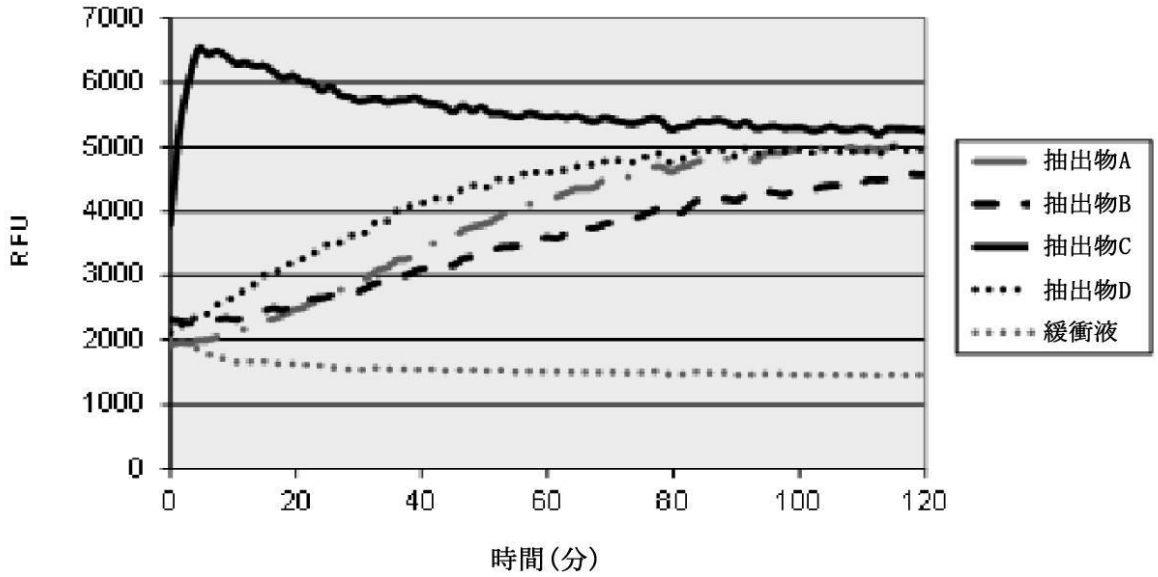


図２：基質18を使用した、酵素の可溶性抽出物の酵素活性の検出

【００８３】

（実施例１７）蛍光発生基質８及び１０を使用した、微生物の酵素活性の検出

種々の対照菌株を３０℃のＬＢ培地中で攪拌しながら（２４０ｒｐｍ）１８時間培養する。各菌株について、培養物を遠心分離し（２，５００ｇ、５分間）、細胞の沈殿物をＬＢ培地５ｍＬ中で２回洗浄する（２，５００ｇで、５分間遠心分離）。この沈殿物を使用して、蛍光発生基質（８又は１０）を０．２５ｍＭで含有する誘導培地（カルボキシメチルセルロース２．５ｇ／Ｌを添加されたデュボス培地）中に、培養物をＯＤ＝０．００５で接種する。培養物を３０℃で攪拌せずに２４時間インキュベートする。培養上清試料を種々のインキュベーション時間に採取して、培地中でのセルラーゼ活性又はβ－グルコシダーゼ活性の発生を追跡することができるようにする。これらの活性が発生してから、励

起波長及び蛍光波長を３８８ｎｍ及び４５５ｎｍとして、マイクロプレート中の培養上清の蛍光を測定する。

【００８４】

得られた結果（図３及び４）は、試験した蛍光発生基質が、微生物の培養物のβ－グルコシダーゼ型（基質１０）及びセルラーゼ型（基質８）の酵素活性の検出を可能にすることを示す。

【化６】

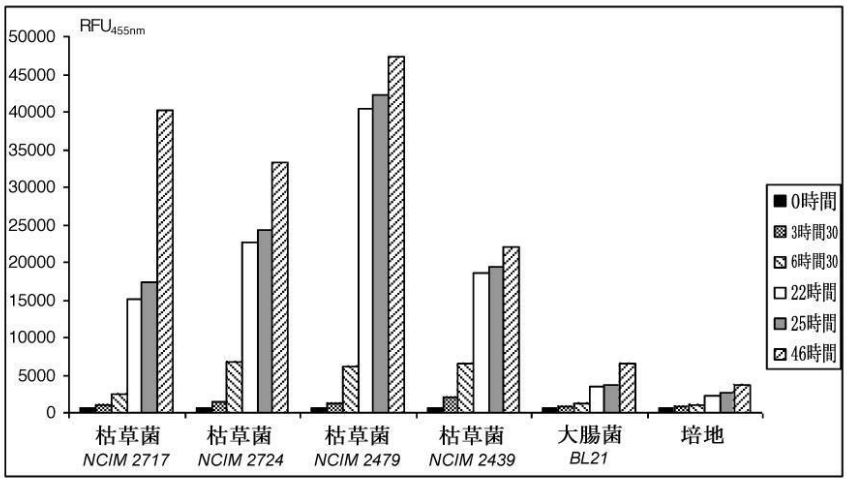


図３：蛍光原基質10を使用した、微生物のグルコシダーゼ活性測定

【化７】

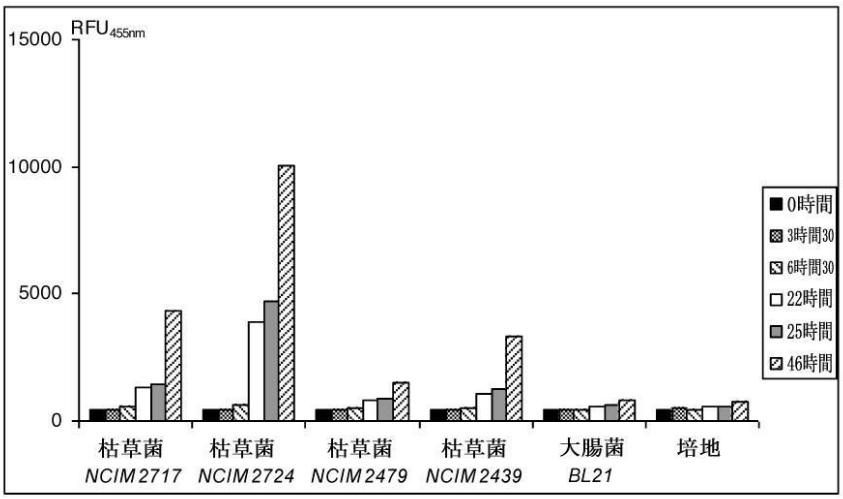


図４：蛍光原基質8を用いた微生物のセルラーゼ活性測定

【００８５】

（実施例１８）基質８を使用した、エマルジョン中の微生物のセルラーゼ活性の検出

２つの対照菌株を使用する。即ち、一方はセルラーゼ活性を有し（枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）ＮＣＩＭ２７２４）、他方はいずれの活性も有しない（大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）ＢＬ２１）。双方の菌株を３０℃のＬＢ培地中で攪拌しながら（２４０ｒｐｍ）１８時間培養する。各菌株について、培養物を遠心分離し（２，５００ｇ、５分間）、細胞の沈殿物をＬＢ培地５ｍＬ中で２回洗浄する（２，５００ｇで、５分間遠心分離）。この沈殿物を使用して、蛍光発生基質８及びスルホローダミン２．５μＭ（枯草菌ＮＣＩＭ２７２４）又は１０μＭ（大腸菌ＢＬ２１）を含有する誘導培地（カルボキシメチルセルロース２．５ｇ／Ｌを添加されたデュボス培地）中に、

培養物をＯＤ＝０．００５で接種する。これらの細胞懸濁液の両方をペルフルオロ化油とともに使用して、液滴の各々が上記の懸濁液のうち１つを含有する該液滴の集団２つから成るエマルジョンを作製する。エマルジョンの試料について、作製時（ｔ＝０時間）、及びエマルジョンを３０℃で２４時間インキュベートした後の再注入時に、液滴の青色及び赤色蛍光を個別に測定する。

【化８】

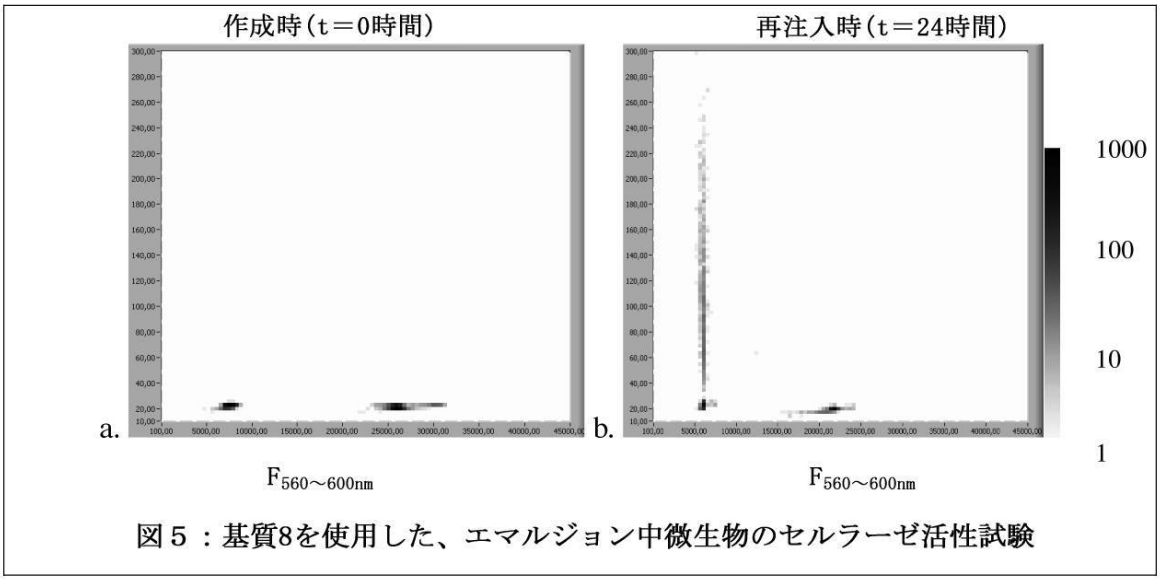


図５：基質8を使用した、エマルジョン中微生物のセルラーゼ活性試験

【００８６】

図５に示したグラフａ及びｂは、エマルジョンについて、その作製時（ａ）及び３０℃で２４時間インキュベートした後のその再注入時（ｂ）に測定した、赤色（横座標、ＲＦＵ）及び青色（縦座標、ＲＦＵ）蛍光強度の２次元ヒストグラムである。集団密度は、対数目盛で、ピンク（１液滴）から赤（＞１，０００液滴）に変化する色コードで示される。液滴の２つの集団は観察可能である。即ち、一方は枯草菌ＮＣＩＭ２７２４（活性菌株）及び２．５μＭスルホローダミンを含有し、赤色蛍光が弱く、他方は大腸菌ＢＬ２１（不活性菌株）及び１０μＭスルホローダミンを含有し、赤色蛍光が強い。これらのヒストグラムの統計的分析を表１に示す。

【表１】

	［スルホローダミン］	2.5 μM	10 μM
	菌株の識別	枯草菌 NCIM2724	大腸菌 BL21
作製時(t＝0時間)	分析した滴の数	16,083	
	平均赤色蛍光(RFU)	6,434 ±387	25,775 ±825
	平均青色蛍光(RFU)	18.78 ±1.19	
	陽性液滴の検出閾値(RFU)	**37.56**	
再注入時(t＝24時間)	分析した滴の数	15,869	
	陽性液滴の%	**27.61 %**	**0.26%**

表１：基質8を使用した、エマルジョン中の微生物のセルロース活性試験中の液滴集団の統計的分析

【００８７】

活性菌株（枯草菌ＮＣＩＭ２７２４）を含有する液滴では、２４時間インキュベートした後、その青色蛍光が顕著に増加したことがわかる（図５）。反対に、不活性菌株（大腸菌ＢＬ２１）を含有する液滴は、その青色蛍光が全く増加していない。活性菌株（枯草菌ＮＣＩＭ２７２４）については、液滴の２７％が陽性と認められるが、不活性菌株（大腸菌ＢＬ２１）については０．２９％である。結論として、基質８は、マイクロ流体システムによって生成されたエマルジョン内の微生物の、セルラーゼ型の活性の検出を可能にする。

なお、下記［１］から［１５］は、いずれも本発明の一形態又は一態様である。

［１］

一般式（Ｉ）

【化９】



［式中、

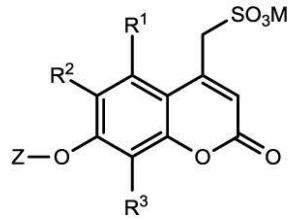
R^1は、Ｈ、又はＯＨ、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐C_1～C_6アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、

R^2は、Ｈ、又はハロゲン、特にフッ素、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐C_1～C_6アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、

R^1とR^2とは、置換又は非置換の、アリール又はフランなどの環を一緒に形成してもよく、

R^3は、Ｈ、又はハロゲン、特にフッ素、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐C_1～C_6アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^4

を表し、
Ｒ^{4}は、Ｈ、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は置換若しくは非置換のアリールであり、
ＭはＮａ又はＫを表し、
Ｒ^{1}がＨであり、且つＭがＮａである場合、Ｒ^{2}及びＲ^{3}は同時にフッ素基となることはできない］
の置換スルホン化クマリン。
［２］
前記クマリンが、ナトリウム５，６－ベンゾ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネートであることを特徴とする請求項１に記載のクマリン。
［３］
前記クマリンが、ナトリウム７－ヒドロキシ－８－メチルクマリン－４－メタンスルホネートであることを特徴とする請求項１に記載のクマリン。
［４］
請求項２に記載のクマリンを取得する方法であって、エチル４－クロロアセトアセテートをメタンスルホン酸中で１，３－ジヒドロキシナフタレンに作用させ、次いで、これによって得られた生成物に亜硫酸ナトリウムを作用させることから成ることを特徴とする上記方法。
［５］
請求項３に記載のクマリンを取得する方法であって、エチル４－クロロアセトアセテートをメタンスルホン酸中で２－メチルレゾルシノールに作用させ、次いで、これによって得られた生成物に亜硫酸ナトリウムを作用させることから成ることを特徴とする上記方法。
［６］
請求項１から３までのいずれか一項に記載のクマリンを取得する方法であって、クマリンの精製が、シリカカラムでの逆相吸着クロマトグラフィーによって実現されることを特徴とする上記方法。
［７］
一般式（ＩＩ）
【化１０】



［式中、
Ｒ^{1}は、Ｈ、又はＯＨ、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、
Ｒ^{2}は、Ｈ、又はハロゲン、特にフッ素、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、
Ｒ^{1}とＲ^{2}とは、置換又は非置換の、アリール又はフランなどの環を一緒に形成してもよく、
Ｒ^{3}は、Ｈ、又はハロゲン、特にフッ素、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル基、又は－ＣＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＯＲ^{4}若しくは－ＣＯＮＨＲ^{4}を表し、

R^4は、H、又は置換若しくは非置換の、直鎖若しくは分岐C_1～C_6アルキル基、又は置換若しくは非置換のアリールであり、
MはＮａ又はＫを表し、
Ｚは、以下の糖、即ちセロビオース、キシロビオース、マルトース、サッカロース、グルコース、キシロース、ガラクトース、アラビノース、キシラン、グルカン、キシロトリオース、マルトトリオース、セロトリオース、キシロテトラオースから選択された糖、又はこれらのうち幾つかの混合物を表し、
R^1がＨであり、R^2及びR^3がＦであり、且つＭがＮａである場合、Ｚはガラクトースとなることはできない］
を有する蛍光発生基質。

［８］
ナトリウムβ－Ｄ－セロビオシドナトリウム６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－グルコシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－キシロシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－キシロビオシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－キシロポリオシド６，８－ジフルオロ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－グルコシド５，６－ベンゾ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－キシロシド５，６－ベンゾ－７－ヒドロキシクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－グルコシド７－ヒドロキシ－８－メチルクマリン－４－メタンスルホネート、ナトリウムβ－Ｄ－ガラクトシド７－ヒドロキシ－８－メチルクマリン－４－メタンスルホネートからなる群に属することを特徴とする請求項７に記載の基質。

［９］
請求項７又は８に記載の基質を取得する方法であって、糖のクマリンへのグラフトがＤＭＦ中で実現されることを特徴とする上記方法。

［１０］
前記グラフトに続いてアセタール型の官能基を脱保護することを特徴とする請求項９に記載の方法。

［１１］
前記糖が、前記クマリンにグラフトされる前に臭素化されることを特徴とする請求項９又は１０に記載の方法。

［１２］
前記基質の精製が、シリカカラムでの逆相観察吸着クロマトグラフィーによって実現されることを特徴とする請求項９から１１までのいずれか一項に記載の方法。

［１３］
精製若しくは未精製の酵素抽出物又は微生物又は細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．２．１）の検出において、前記検出が、請求項７又は８に記載の蛍光発生基質のうち１つを使用して達成されることを特徴とする上記検出。

［１４］
前記抽出物又は微生物又は細胞が油相中に懸濁している水滴中に分画されていることを特徴とする、請求項１３に記載の精製若しくは未精製の酵素抽出物又は微生物又は細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．２．１）の検出。

［１５］
前記水滴が、マイクロ流体デバイスによって作製されることを特徴とする、請求項１４に記載の精製若しくは未精製の酵素抽出物又は微生物又は細胞のグリコシダーゼ活性（ＥＣ３．２．１）の検出。

フロントページの続き

(72)発明者　ラダーム、シルヴァン
イギリス国、ロンドン、クラウチ　エンド、トッテナム　レイン　７０エイ
(72)発明者　ナジャー、マジディ
フランス国、フォンテーヌ　マコン、テール　リュ　ロリン　９
(72)発明者　マイヨ、エステル
フランス国、ストラスブール、プラース　クレモン　５

審査官　三上　晶子

(56)参考文献　特表２００６－５１７３８２（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００７／００２６４８２（ＵＳ，Ａ１）
特開平０６－０９２９５５（ＪＰ，Ａ）
英国特許出願公開第０２３１９２５０（ＧＢ，Ａ）
Tetrahedron Letters, ２００４年, Vol.45, No.47, pp.8721-8724

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ０７Ｄ３０９／００－３１５／００
Ｃ０７Ｈ　１／００－　９９／００
Ｇ０１Ｎ　２１／６２－　２１／７４
Ｃ１２Ｑ　１／００－　３／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）