

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3828891号
(P3828891)

(45) 発行日 平成18年10月4日(2006.10.4)

(24) 登録日 平成18年7月14日(2006.7.14)

(51) Int. Cl.

GO 1 N 33/531 (2006.01)

F I

GO 1 N 33/531

Z

請求項の数 12 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2003-562632 (P2003-562632)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成15年1月23日(2003.1.23)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2005-515476 (P2005-515476A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成17年5月26日(2005.5.26)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/000655		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(87) 国際公開番号	W02003/062819		グレンツアーヘルストラツセ124
(87) 国際公開日	平成15年7月31日(2003.7.31)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成16年9月17日(2004.9.17)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	10/057,762	(74) 代理人	100096183
(32) 優先日	平成14年1月25日(2002.1.25)		弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 親油性薬物の水溶性誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I)：

 $G-(L)_n-Y$ (I)、

〔式中、

Gは、親油性薬物であり、

Lは、1～20個の炭素原子を含有する、アルキルおよびヘテロアルキルよりなる群から選択されるリンカーであり、

nは、0または1であり、そして

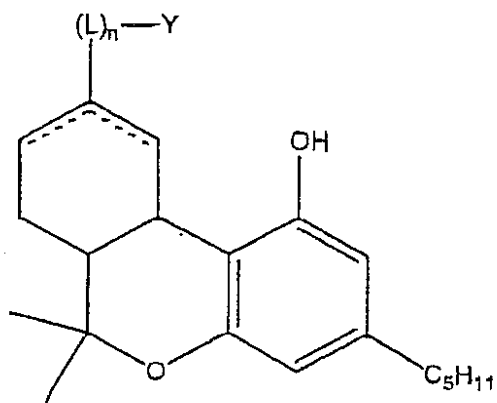
Yは、 $-SO_3^-$ 、 $-NR-SO_3^-$ 、 $-P(=O)(OH)(O^-)$ 、または $-O-P(=O)(OH)(O^-)$ （但し、Rは、Hおよび1～10個の炭素原子を含むアルキル基よりなる群から選択される）よりなる群から選択される水可溶化基である〕

で示される化合物の親油性薬物のイムノアッセイのための水溶性参照標準としての使用。

【請求項2】

 $G-(L)_n-Y$ が、式(V)

【化 1】



(V).

10

で示される化合物である、請求項 1 に記載の水溶性参照標準としての使用。

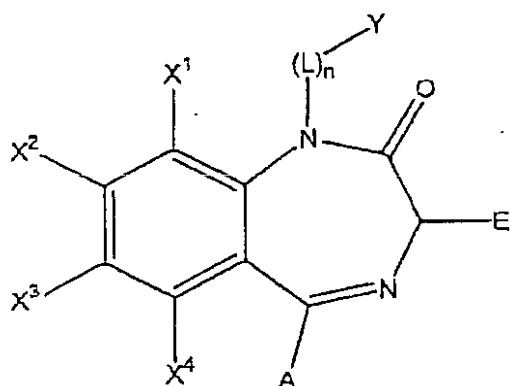
【請求項 3】

G がベンゾジアゼピンである、請求項 1 に記載の水溶性参照標準としての使用。

【請求項 4】

G-(L)_n-Y が、式 (II)

【化 2】



(II);

20

30

〔式中、

X¹、X²、X³、および X⁴ は、独立して、水素、F、Cl、Br、ニトロ、アミノ、およびアルキルアミドよりなる群から選択され、

-L- は、1～20 個の炭素原子を含有する、アルキル基またはヘテロアルキル基であり、

-E は、-H、アルキル、-OH、-COOH、または -COOR'（但し、R' は、1～10 個の炭素原子を含有するアルキル基である）であり、そして

A は、アリール基である〕

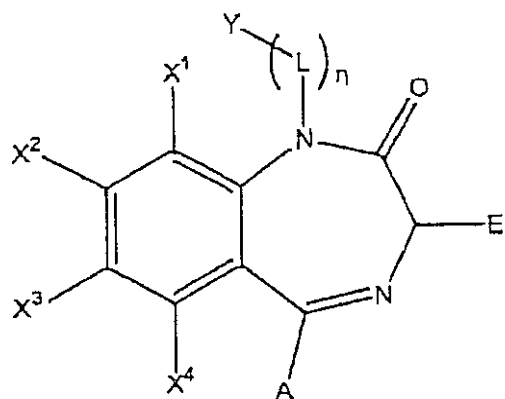
で示される化合物である、請求項 1 に記載の水溶性参照標準としての使用。

40

【請求項 5】

式 (II) :

【化 3】



(ii);

10

〔式中、

X^1 、 X^2 、 X^3 、および X^4 は、独立して、水素、F、Cl、Br、ニトロ、アミノ、およびアルキルアミドよりなる群から選択され、

Eは、-H、アルキル、-OH、-COOH、および-COOR'（但し、R'は、1～10個の炭素原子を含有するアルキル基である）よりなる群から選択され、

Aは、アリール基であり

Lは、1～20個の炭素原子を含有する、アルキルおよびヘテロアルキルよりなる群から選択されるリンカー基であり、

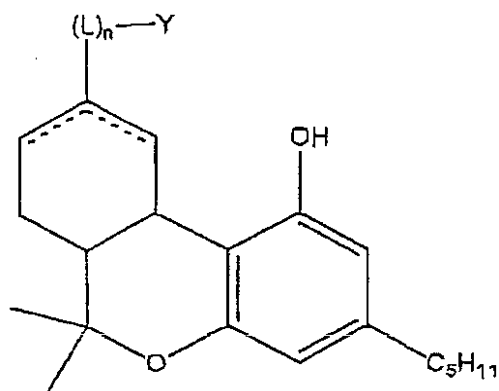
nは、0または1であり、そして

Yは、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{NR}'-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{O}^-)$ 、または $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{O}^-)$ （但し、R'は、Hおよび1～10個の炭素原子を含むアルキル基よりなる群から選択される）よりなる群から選択され〕で示され、かつ、25 において水に対して1ミリリットルあたり少なくとも100マイクログラムの溶解度を有する化合物の、ベンゾジアゼピン類のイムノアッセイのための水溶性参照標準としての使用。

【請求項 6】

式(V)：

【化 4】



(V);

40

〔式中、

Lは、1～20個の炭素原子を含有する、アルキルおよびヘテロアルキルよりなる群から選択され、

nは、0または1であり、そして

Yは、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{NR}'-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{O}^-)$ 、または $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{O}^-)$ （但し、R'は、Hおよび1～10個の炭素原子を含むアルキル基よりなる群から選択される）よりなる群から選

50

折される〕で示され、かつ、25 において水に対して1ミリリットルあたり少なくとも100 マイクログラムの溶解度を有する化合物の、THCのイムノアッセイのための水溶性参照標準としての使用。

【請求項 7】

親油性薬物を測定するためのアッセイ方法であって：

請求項 1 に記載の参照標準を含有する第1のサンプルを、該参照標準と第1の検出可能な複合体を形成することができる試薬と合わせ；

該サンプル中の該第1の検出可能な複合体の存在または量を測定し；

該薬物を含有すると推測される第2のサンプルを、該薬物の抗体を含み、該薬物と第2の検出可能な複合体を形成することができる試薬と合わせ；

該サンプル中の該第2の検出可能な複合体の存在または量を測定し；そして、

該第1の検出可能な複合体の存在または量を該第2の検出可能な複合体の存在または量と比較し、該サンプル中の該薬物の指標とすること；を特徴とする前記方法。

【請求項 8】

ベンゾジアゼピン類を測定するためのアッセイ方法であって：

請求項 5 に記載の参照標準を含有する第1のサンプルを、該参照標準と第1の検出可能な複合体を形成することができる試薬と合わせ；

該サンプル中の該第1の検出可能な複合体の存在または量を測定し；

該薬物を含有すると推測される第2のサンプルを、該薬物の抗体を含み、該薬物と第2の検出可能な複合体を形成することができる試薬と合わせ；

該サンプル中の該第2の検出可能な複合体の存在または量を測定し；そして、

該第1の検出可能な複合体の存在または量を該第2の検出可能な複合体の存在または量と比較し、該サンプル中の該薬物の指標とすること；を特徴とする前記方法。

【請求項 9】

THCを測定するためのアッセイ方法であって：

請求項 6 に記載の参照標準を含有する第1のサンプルを、該参照標準と第1の検出可能な複合体を形成することができる試薬と合わせ；

該サンプル中の該第1の検出可能な複合体の存在または量を測定し；

該薬物を含有すると推測される第2のサンプルを、該薬物の抗体を含み、該薬物と第2の検出可能な複合体を形成することができる試薬と合わせ；

該サンプル中の該第2の検出可能な複合体の存在または量を測定し；そして、

該第1の検出可能な複合体の存在または量を該第2の検出可能な複合体の存在または量と比較し、該サンプル中の該薬物の指標とすること；を特徴とする前記方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の参照標準を含む、参照標準キット。

【請求項 11】

請求項 5 に記載の参照標準を含む、参照標準キット。

【請求項 12】

請求項 6 に記載の参照標準を含む、参照標準キット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

ヒトをはじめとする生物中の薬物の存在を迅速かつ正確に検出することが広く必要とされている。いくつかの薬物は、濃度の最適なウィンドウを有することもあり、その範囲内であれば、副作用を最小限に抑えて最大限の治療効果が得られる。いくつかの薬物は、閾値濃度を有することもあり、それを超えてそれらを長期間使用すると患者の健康を害するおそれがある。さらに他の薬物は、違法であったり、さもないければ、規制機関により禁止または制限されていたりする。被験者中の薬物の存在または量の測定は、体液の分析により達成することができる。多くの場合、対象の薬物は低濃度で存在するため、正確な分析結果を得ることが困難である。たとえば、薬物は、多くの場合、生物中で広範に代謝され

10

20

30

40

50

、その結果として、尿や血漿のサンプル中の薬物は低濃度であり、唾液サンプル中の薬物は痕跡量にすぎない。

【 0 0 0 2 】

薬物および/またはその代謝産物は、ガスクロマトグラフィー(GC)および高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)により、正確に検出することができるが、これらの方法は、高価でありかつ時間がかかる。したがって、尿や血漿中の薬物を分析するためのイムノアッセイが広く用いられている。イムノアッセイを用いると、親の薬物化合物をその代謝産物などの他の構造上関連のある薬物と一緒に検出することができる。一般的には、イムノアッセイでは、薬物または薬物代謝産物のようなアナライトとアナライトに対する抗体との間の結合が測定される。この測定は、アナライト - 抗体複合体の検出により、直接行うことが可能であるか、または抗体とアナライト誘導体との結合の変化がアナライトの存在に基づく場合にはその変化を測定することにより、間接的に行うことが可能である。イムノアッセイは、典型的には、液体サンプルの分析を必要とする。液体は、容器中の自由流動性液体であってもよいし、ポーラス固相内または不連続固相内に含浸されていてもよい。

【 0 0 0 3 】

従来のイムノアッセイ技術にポーラスマトリックス材料の使用を組み入れたクロマトグラフィーイムノアッセイについては、たとえば、米国特許第5,770,458号に記載されている。この特許は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。この方式では、複合化試薬を繊維状膜またはポーラス膜のようなポーラスマトリックス材料の領域に結合させる。複合化試薬は、対象のアナライトに対する抗体またはその検出を可能にするように標識化されたアナライトの誘導体のいずれかである。アナライトを含有する液体サンプルを、結合された複合化試薬から離れた領域でマトリックス材料上にローディングし、結合された複合化試薬を含有する領域までポーラス担体を介して移動させる。マトリックス材料内にもしくはそれに隣接して存在させることによりまたはユーザーが添加することにより、第2の複合化試薬をこの流体の流れに添加することが可能である。第2の複合化試薬もまた、アナライトに対する抗体であってもよいし、標識化されたアナライト誘導体であってもよい。したがって、アナライトの存在および/または濃度の測定は、アナライトと2種の異なる抗体との間の複合化(サンドイッチ型)、アナライトと1種の抗体との間の複合化(直接的)、または抗体とアナライトの標識化誘導体との間の期待される複合化の変化(競合的)の検出に基づいて行うことができる。

【 0 0 0 4 】

イムノアッセイによる薬物の検出は、クロマトグラフィーイムノアッセイを含めて、薬物標準を必要とする。緩衝配合物中に既知濃度の薬物標準を有する溶液を調製し、保存する。この濃度および標準に対するアッセイの測定された応答を用いて、試験サンプル中の薬物の量を計算する。この検量は、サンプルの分析前、分析時、または分析後に行うことが可能である。使い捨てのストリップとして典型的に構成されるクロマトグラフィーイムノアッセイでは、製造プロセスの一部としてストリップの代表サンプリングにより検量を行うことが可能である。所定量の薬物の標準溶液を品質管理物質として使用することもできる。

【 0 0 0 5 】

水に容易に溶解させることのできない薬物(疎水性薬物または親油性薬物と呼ばれる)では、完全に溶解しうる薬物標準を一定した量で保持することが困難であると思われるので、クロマトグラフィーイムノアッセイによる測定は、多くの場合、困難である。この溶解挙動は、イムノアッセイにおけるアナライトの測定に悪影響を及ぼし、標準溶液を吸収性パッドやポーラスマトリックス材料のような表面に接触させるイムノクロマトグラフィー検出ではとりわけ問題となる。化合物は、均一な状態で存在しない可能性があり、標準の正確な濃度を終始一貫して保持することができない。したがって、薬物測定の一貫性および再現性が損なわれる。

【 0 0 0 6 】

このため、イムノアッセイに有用な親油性薬物に対する標準を提供することが望まれる

10

20

30

40

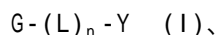
50

。これらの標準は水溶性であることが望ましい。また、これらの標準は、クロマトグラフィーイムノアッセイ条件下で適切な可動性を有し、しかも水中（とくに、生理学的環境中）で安定であることが望ましい。そのような標準は、理想的には、アッセイで使用される抗体と特異的に相互作用するであろう。

【発明の開示】

【0007】

本発明の一態様には、式(I)：



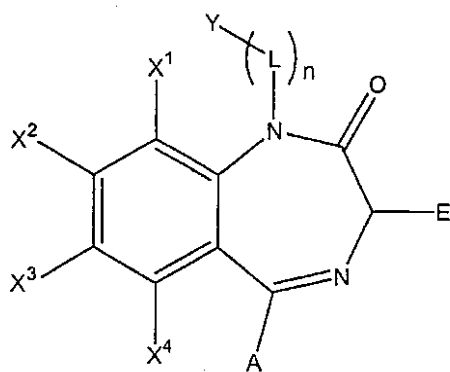
で示される、親油性薬物のイムノアッセイのための水溶性参照標準が存在する。Gは、親油性薬物であり、Lは、1～20個の炭素原子を含有する、アルキルおよびヘテロアルキルよりなる群から選択されるリンカーであり、nは、0または1であり、そしてYは、 $-SO_3^-$ 、 $-NR$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-P(=O)(OH)(O^-)$ 、または $-O-P(=O)(OH)(O^-)$ よりなる群から選択される水可溶化基である。Rは、Hおよび1～10個の炭素原子を含むアルキル基よりなる群から選択される。

10

【0008】

本発明の他の態様には、式(II)：

【化1】



20

【0009】

で示される、ベンゾジアゼピン類のイムノアッセイのための水溶性参照標準が存在する。 X^1 、 X^2 、 X^3 、および X^4 は、独立して、水素、F、Cl、Br、ニトロ、アミノ、およびアルキルアミドよりなる群から選択され、Eは、 $-H$ 、アルキル、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、および $-COOR'$ （但し、 R' は、1～10個の炭素原子を含有するアルキル基である）よりなる群から選択され、Aは、アリール基であり、Lは、1～20個の炭素原子を含有する、アルキルおよびヘテロアルキルよりなる群から選択されるリンカー基であり、nは、0または1であり、そしてYは、 $-SO_3^-$ 、 $-NR'-SO_3^-$ 、 $-P(=O)(OH)(O^-)$ 、または $-O-P(=O)(OH)(O^-)$ よりなる群から選択される。 R' は、Hおよび1～10個の炭素原子を含むアルキル基よりなる群から選択される。この化合物は、25℃において水に対して1ミリリットルあたり少なくとも100マイクログラムの溶解度を有する。

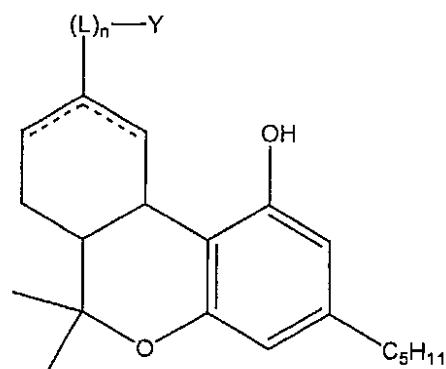
30

40

【0010】

本発明のさらに他の態様には、式(V)：

【化 2】



(V).

10

【0011】

で示される、THCのイムノアッセイのための水溶性参照標準が存在する。Lは、1～20個の炭素原子を含有する、アルキルおよびヘテロアルキルよりなる群から選択され、nは、0または1であり、そしてYは、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{NR}'-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{O}^-)$ 、または $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{O}^-)$ よりなる群から選択される。R'は、Hおよび1～10個の炭素原子を含むアルキル基よりなる群から選択される。この化合物は、25℃において水に対して1ミリリットルあたり少なくとも100マイクログラムの溶解度を有する。

20

【0012】

本発明のさらに他の態様には、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{NR}'-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{O}^-)$ 、または $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{O}^-)$ よりなる群から選択される水可溶化基で親油性薬物を官能化することを含む、親油性薬物のイムノアッセイのための水溶性参照標準の製造方法が存在する。

【0013】

本発明のさらに他の態様には、THC-9-カルボン酸をDPPAおよび水酸化ナトリウムと反応させてTHC-9-アミンを生成させること、ならびにTHC-9-アミンをクロロスルホン酸で処理すること、を含む、THCのイムノアッセイのための水溶性参照標準の製造方法が存在する。

【0014】

本発明のさらに他の態様には、THC-9-カルボン酸をDCCおよびNHSで処理してエステルを生成させること、該エステルを水酸化アンモニウムで処理してTHC-9-アミドを生成させること、該THC-9-アミドを水素化アルミニウムリチウムで還元してTHC-9-アミンを生成させること、ならびに該THC-9-アミンをクロロスルホン酸と反応させること、を含む、THCのイムノアッセイのための水溶性参照標準の製造方法が存在する。

30

【0015】

本発明のさらに他の態様には、ジデスエチルフルラゼパムをクロロスルホン酸で処理することを含む、ベンゾジアゼピン類のイムノアッセイのための水溶性参照標準の製造方法が存在する。

【0016】

詳細な説明

40

本発明は、親油性薬物の水溶性誘導体である化合物に関する。水溶性薬物誘導体は、水可溶化基を結合させるように薬物を修飾することにより製造される。これらの化合物は、もとの親油性薬物と比較して、増大された水溶性およびイムノアッセイ条件下における改良された安定性をもたせることが意図されている。本発明はまた、水溶性薬物誘導体化合物の調製、およびクロマトグラフィーイムノアッセイをはじめとするイムノアッセイにおけるその使用に関する。

【0017】

本発明はまた、水溶性薬物誘導体が血液、唾液、および尿のような体液中の親の親油性薬物化合物の検出および定量化のための参照標準として機能するイムノアッセイに関する

50

。本発明の水溶性参照標準は、クロマトグラフィーイムノアッセイにとりわけ有用である。水溶性薬物誘導体のような参照標準のほかに、クロマトグラフィーイムノアッセイには、アナライトに対する抗体およびアナライトの標識化された誘導体が含まれる。

【0018】

薬物のような物質の誘導体とは、該物質に類似した化学構造を有し、しかも該物質中に存在しない化学基を含有しかつ/または該物質中に存在する化学基が欠如した、種を意味する。誘導体と比較される物質は、「親」物質(たとえば、親薬物または親化合物)として知られている。誘導体は、親化合物の修飾により、または親に類似していない他の出発物質からの合成により、生成することが可能である。

【0019】

アナライトとは、液体媒質中の存在または量が測定の対象となる物質または物質群を意味し、たとえば、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、オリゴヌクレオチド、ハプテン、またはハプテン-担体複合体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0020】

アナライト類似体とは、アナライトに対する抗体の結合親和性および/または特異性に関してアナライトと同じようなまたは所望のアッセイ結果の達成を助けるような挙動を示す任意の物質または物質群を意味し、たとえば、その誘導体、代謝産物、および異性体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0021】

抗体とは、アナライトの特異的結合パートナーを意味し、他の物質を排除してアナライトに対する特異的結合親和性を有する任意の物質または物質群を含むものとする。この用語は、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、および抗体フラグメントを包含する。

【0022】

ハプテンとは、抗体産生を刺激できないが抗体と反応する典型的には低分子量の物質である。後者は、ハプテンを高分子量担体に結合させてこの結合生成物をヒトまたは動物に注射することにより、産生される。ハプテンの例としては、ジゴキシンおよびテオフィリンのような治療用薬物；モルヒネ、リセルグ酸ジエチルアミド(LSD)、および 9-テトラヒドロカナビノール(THC)のような乱用薬物；アミノグリコシドおよびバンコマイシンのような抗生物質；エストロゲンおよびプロゲステロンのようなホルモン；ビタミンB12および葉酸のようなビタミン；チロキシン；ヒスタミン；セロトニン；アドレナリンなどが挙げられる。

【0023】

担体とは、ハプテンと一緒にすることによりハプテンによる免疫応答の刺激を可能する免疫原性物質(一般的には、タンパク質)を意味する。担体物質としては、外来物として確認されることにより宿主からの免疫学的応答を惹起する、タンパク質、糖タンパク質、複合多糖、および核酸が挙げられる。

【0024】

免疫原および免疫原性という用語は、生物中で免疫応答を誘発または発生させることのできる物質を意味する。

【0025】

ペプチドとは、アミド(ペプチド)結合で2種以上のアミノ酸を結合させることにより産生される任意の化合物であり、通常、各アミノ酸残基の α -アミノ基(NH_2 末端以外)が直鎖状に次の残基の α -カルボキシル基に結合された α -アミノ酸のポリマーである。ペプチド、ポリペプチド、およびポリ(アミノ酸)という用語は、サイズに関する制約条件を課すことなくこのクラスの化合物を指すために本明細書中では同義的に用いられる。このクラスの最大のメンバーは、タンパク質と称される。

【0026】

「アルキル」とは、置換もしくは無置換の、直線状、分枝状、もしくは環状の炭化水素鎖を意味する。「ヘテロアルキル」とは、少なくとも1個のヘテロ原子(窒素、酸素、硫黄

10

20

30

40

50

、またはリン)を含有するアルキル基を意味する。ヘテロアルキル基の例としては、エーテル、エステル、アミン、アミド、チオエーテル、ウレア、チオウレア、カーボネート、およびカルバメートが挙げられる。

【0027】

「アリール」とは、5～10個の炭素原子の任意の一価芳香族炭素環式基を意味する。芳香族基は、多環式(すなわち、ナフチル)であってもよいし、置換されていてもよいし、少なくとも1個のヘテロ原子を含んでいてもよい。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、フリル、チエニル、ピリジル、ニコチニル、イソニコチニル、インドリル、キノリニルおよびイソキノリニルが挙げられる。

【0028】

アナライトを含有す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、宿主由来の体液のような水溶液、たとえば、尿、全血、血漿、血清、口腔内液、精液、糞便、痰、脳脊髄液、涙、粘液などであるが、好ましくは、尿、口腔内液、血漿、または血清である。サンプルは、所望により前処理することができ、アッセイを妨害しない任意の便利な媒質中に調製することができる。水性媒質が好ましい。

【0029】

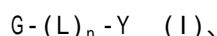
検量物質とは、既知量の測定対象アナライトを含有する任意の標準物質または参照物質を意味する。アナライトを含有すると推測されるサンプルおよび検量物質は、類似の条件下でアッセイされる。次に、未知試料で得られた結果を標準で得られた結果と比較することにより、アナライト濃度を計算する。

【0030】

本発明の水溶性参照標準は、薬物(とりわけ、親油性薬物)の誘導体である。一般的には、「親油性」という用語は、pHに敏感なオクタノール/水分配係数を有することを意味する。たとえば、親油性薬物は、中性pH(6.5～8.5のpH)のときよりも塩基性pH(8.5～14のpH)のときのほうが高いオクタノール/水分配係数を有するであろう。「親油性」という用語はまた、中性pHで25℃の水への溶解度が水1ミリリットルあたり100マイクログラム($\mu\text{g}/\text{mL}$)未満であることをも意味しうる。水可溶化基を含有するように修飾しうる薬物の例としては、ベンゾジアゼピン類；THCのようなカンナビノイド類；ヘロイン、モルヒネ、およびコデインのようなオピエート類；コカイン；プロポキシフェン；PCPのようなフェンシクリジン類；メタカロン；バルビツレート類；LSD；アンフェタミン類；三環系抗鬱剤；ならびにメタドンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。同様に親油性である親油性薬物の誘導体もまた、水可溶化基を含有するように修飾することが可能である。

【0031】

本発明の水溶性参照標準は、式(1)：



〔式中、Gは、親油性薬物または親油性薬物誘導体であり、Lは、1～20個の炭素原子を含有する、アルキル基またはアルキルエーテル基であり、nは、0または1であり、そしてYは、スルファメート($-\text{NR}-\text{SO}_3^-$)、スルホネート($-\text{SO}_3^-$)、ホスフェート($-\text{O}-\text{PO}_3^-$)、またはホスホネート($-\text{PO}_3^-$) (但し、Rは、Hまたは1～10個の炭素原子を含有するアルキル基である)である水可溶化基である〕で示される化合物である。可溶化基Yは、必然的に、これらの基の環境依存的形態、たとえば、プロトン化された形態(すなわち、 $-\text{NR}-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}$)、ならびにナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、およびアンモニウムのような適切なカチオンとの該基の塩を包含する。好ましくは、水可溶化基は、スルファメートまたはスルホネートである。より好ましくは、水可溶化基は、スルファメートである。

【0032】

本発明の水溶性参照標準は、薬物(G-)と水可溶化基(-Y)の間に連結部分(-L-)を含有していてもよいし含有していなくてもよい。リンカーは、当技術分野で周知であり、化合物

10

20

30

40

50

と可溶化基との間にスパーサーを提供するために用いられる。適切な連結基の選択および調製については、たとえば、米国特許第5,144,030号および同第5,237,057号に記載されている。これらの特許は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。水可溶化基による官能化の前にリンカーを薬物に付加させてもよいし、官能化プロセス時にリンカーを生成させてもよい。

【0033】

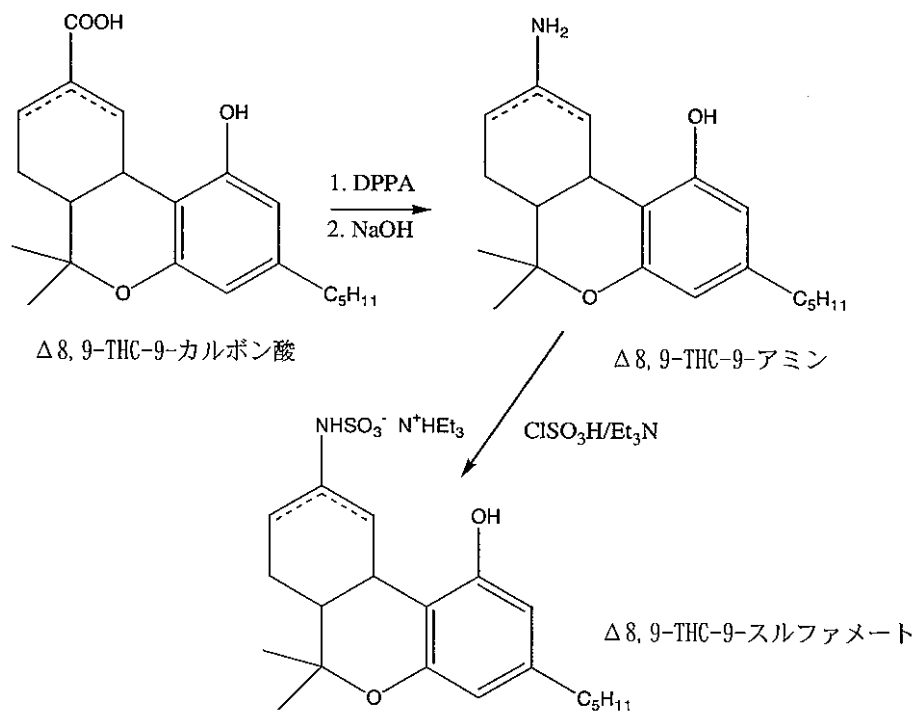
水可溶化基による親油性薬物の官能化は、さまざまな合成法により達成することができる。たとえば、アミン基(-NH₂)は、クロロスルホン酸のような官能化試薬で処理することにより、対応するスルファメート(Y = -NR-SO₃⁻)誘導体に容易に変換される。アミンは、薬物自体上に存在していてもよいしリンカー上に存在していてもよい。アミンは、アルキルハリドによるアンモニアのアルキル化ならびにニトロ、ニトリル、またはアミド化合物の還元のような周知の合成法によりいくつかの異なる出発物質から誘導することが可能である。Gabriel合成は、塩基の存在下におけるアルキルハリドとフタルイミドとの反応それに続くアルキルフタルイミド中間体の加水分解を介する第一級アミンの調製にとりわけ有用である。カルボキシル炭素の消失を伴うカルボン酸から第一級アミンへの変換は、シュミット転位として知られており、酸をナトリウムアジドで処理してからNaOHで処理することにより達成される。アルデヒドは、アンモニアまたはアミンによる処置それに続く水素化(hydrogenation)により、アミンに変換することが可能であり、これは還元的アミノ化として知られている。したがって、多種多様な基が、先に述べたようにスルファメートに変換しうるアミンに容易に変換される。(たとえば、Streitwieser, Jr. et al. *Introduction to Organic Chemistry*, Macmillan, 1985, p.698-707を参照されたい; March, *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley, 1992, p. 499-500をも参照されたい)

アリールスルホネートは、官能化試薬として発煙硫酸を用いる芳香族化合物の求電子のスルホン化により一般に調製され、一方、アルキルスルホン酸塩は、官能化試薬として硝酸または過マンガン酸バリウムを用いるチオール酸化により調製可能である。-ヒドロキシスルホン酸のナトリウム塩は、重硫酸ナトリウムのような官能化試薬をカルボニル化合物に付加させることにより、調製可能である。エポキシドもまた、亜硫酸イオンのような官能化試薬で処理することにより、-ヒドロキシスルホン酸に変換可能である。(たとえば、Streitwieser, Jr. et al. *Introduction to Organic Chemistry*, Macmillan, 1985, p.766-769)を参照されたい; March, *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley, 1992, p. 410-411および1199-1200をも参照されたい)

ホスフェート誘導体(Y = -O-PO₃⁻)は、リン酸のエステル化またはホスフェートトリエステルの加水分解を介して取得可能である。ホスホネート誘導体(derivatives)(Y = -PO₃⁻)は、ホスホネートエステルの加水分解から調製可能である。また、該エステルは、アルブゾフ・ミカエリス反応により調製される。(たとえば、Streitwieser, Jr. et al. *Introduction to Organic Chemistry*, Macmillan, 1985, p.776-780を参照されたい)

たとえば、マリファナ(marijuana)の主要向精神成分であるテトラヒドロカナビノール(THC)の誘導体は、以下の反応スキームに示されるように、市販の⁸-または⁹-THC-9-カルボン酸(SIGMA, Milwaukee, WI)から容易に調製することができる。

【化 3】



10

20

【 0 0 3 4 】

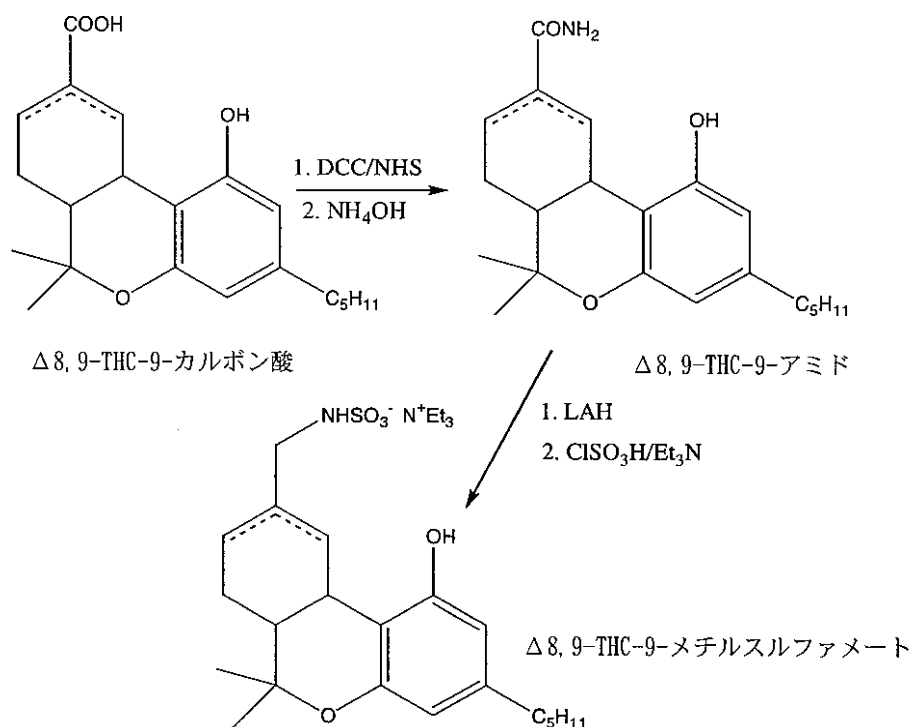
酸からアミン(THC-9-アミン)への変換は、ジフェニルリン酸アジド(diphenyl phosphorous azide)(DPPA)を用いるクルチウス転位それに続くアシルアジド中間体の水酸化ナトリウム(NaOH)加水分解により達成される。得られたアミンをクロロスルホン酸(ClSO_3H)およびトリエチルアミン(Et_3N)で処理すると、水溶性THC-9-スルファメート誘導体を得られる。この特定の誘導体(derviative)は、水可溶化基と疎水性薬物との間に連結基を含有しない。

【 0 0 3 5 】

THC-9-カルボン酸からリンカー(この場合、 $-\text{CH}_2-$)を含有する水溶性誘導体への変換方法の例を、以下の反応スキームに示す。

30

【化 4】



10

20

【0036】

酸をジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(N-hydroxysuccinimide)(NHS)で処理して活性化エステルを生成させ、続いて、水酸化アンモニウム(NH_4OH)で処理する。次に、得られたアミド(THC-9-アミド)を水素化アルミニウムリチウム(LAH)で対応するアミン(THC-9-アミン)に還元し、その後、アミンをクロロスルホン酸で処理し、水溶性スルファメート誘導体(THC-9-メチルスルファメート)を得る。

【0037】

水可溶化基を含有するように修飾しうる親油性薬物のファミリーの他の例は、ベンゾジアゼピン類である。ベンゾジアゼピン類は、鎮静剤や筋弛緩剤として知られるCNS抑制剤薬物のクラスに属する。一般に処方されるベンゾジアゼピン類の例を図1および2に示す。ベンゾジアゼピンリブリウム(100)の偶然の発見により、フルラゼパム(200)やバリウム(300)をはじめとするさまざまな類似体の開発が行われるようになった。これらの化合物は、不安、抑鬱、不眠、筋痙攣、頭痛、および性交疼痛をはじめとするさまざまな心理的および生理的障害を処置するために広範に処方されてきた。単独でまたは他の薬物との組合せで投与されるベンゾジアゼピン類の用量を増大させると、依存症を引き起こす可能性があり、さらには有害な過量に至るおそれがある。また、ベンゾジアゼピン類を慢性的に使用すると、過敏、筋緊張、より重篤な場合には幻覚や発作を含む禁断症状を伴う身体的依存症になる可能性もある。

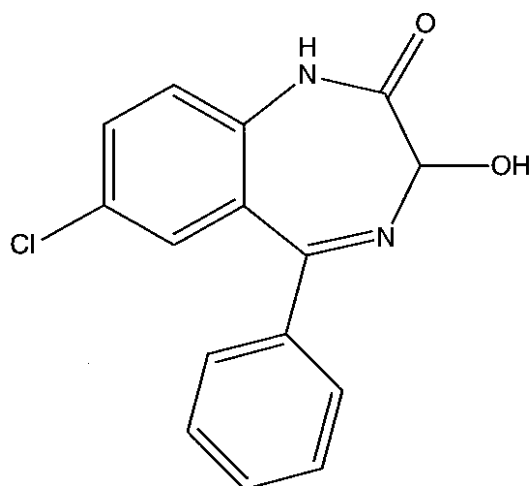
30

40

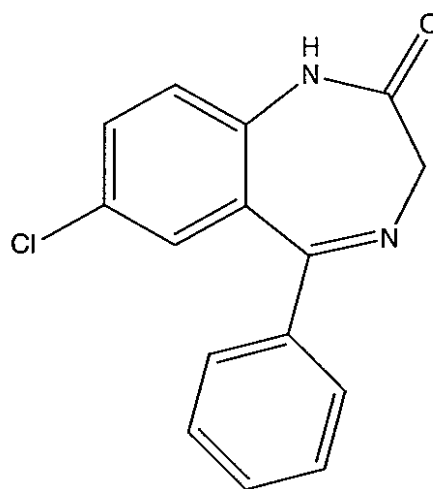
【0038】

生物中のベンゾジアゼピン類およびそれらの代謝産物の存在および/または濃度をモニターすることは重要であるが、ベンゾジアゼピンイムノアッセイの標準として典型的に用いられる化合物は、混成的な結果を与える。ベンゾジアゼピン標準として用いられる従来の化合物は、ノルジアゼパムおよびオキサゼパムである。

【化5】



オキサゼパム



ノルジアゼパム

10

【0039】

20

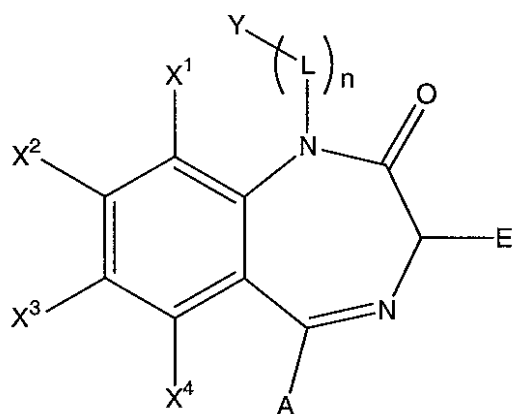
遊離塩基形態で存在する場合、ノルジアゼパムおよびオキサゼパムは両方とも親油性であり、イムノアッセイに用いられる水性緩衝液への溶解性が制限される。典型的には、遊離塩基形態のこれらの化合物を少量の有機溶媒(たとえば、DMSOまたはメタノール)により可溶化させ、その後、適切な緩衝液(これは、標準とサンプルとの相関の確度を低下させる)を添加する。これらの親油性標準が固定相のサンプル受容パッドのようなアッセイ媒質に非特異的に吸着する可能性のある固相イムノアッセイ条件下では、溶解性の問題がとりわけ顕在化する。これらの化合物の塩酸塩は水に可溶であり、標準緩衝溶液を調製するために遊離塩基の代わりに使用しうる。しかしながら、それらの溶解度はpHに敏感であるため、塩酸塩の使用は、中性または酸性の条件(pH7)に限定される。pHが増加するにつれて、遊離塩基が生成し、溶解度が減少する。オキサゼパムはノルジアゼパムよりもわずかに高い溶解度を有するが、オキサゼパムは、溶解状態で、とりわけ、室温以上で、不安定である。

30

【0040】

本発明の化合物は、水溶性ベンゾジアゼピン誘導体を包含する。好ましくは、水溶性ベンゾジアゼピン誘導体は、式(II)：

【化6】



(II);

40

50

【0041】

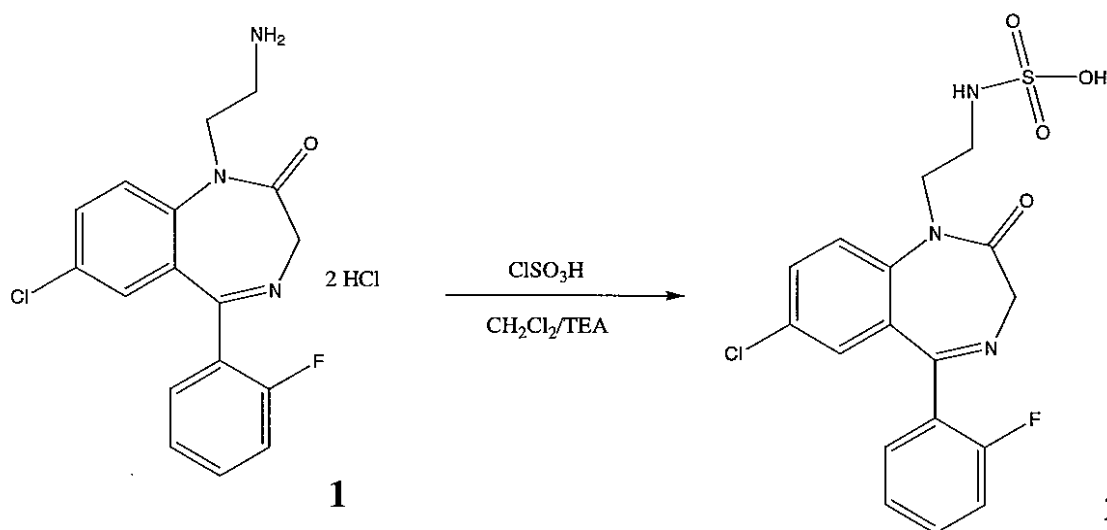
〔式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、および X^4 は、独立して、水素、F、Cl、Br、ニトロ、アミノ、およびアルキルアミドよりなる群から選択され、-L-は、1~20個の炭素原子を含有する、アルキル基およびヘテロアルキル基であり、-Eは、-H、アルキル、-OH、-COOH、および-COOR'（但し、R'は、1~10個の炭素原子を含有するアルキル基である）であり、Aは、アリール基であり、そしてYは、式(1)に対して先に記載した水可溶化部分である〕で示される化合物である。好ましくは、-L-は、-CH₂CH₂-である。好ましくは、-Yは、-NHSO₃⁻または-NHSO₃Hである。好ましくは、Aは、フェニル、ピリジル、ニコチニル、イソニコチニル、およびそれらの置換誘導体よりなる群から選択される。より好ましくは、 X^1 、 X^2 、および X^4 は、水素であり、 X^3 はClであり、Aは2-フルオロフェニルであり、Lは-CH₂CH₂-であり、EはHであり、そしてYはNHSO₃⁻である。

10

【0042】

好ましい水溶性誘導体(2)は、以下のスキームに従ってベンゾジアゼピン親ジデスエチルフルアゼパム(1)から調製することができる。

【化7】



20

30

【0043】

本発明の水溶性参照標準は、その対応する親化合物と対比して大幅に増大した水溶性を有する。好ましくは、本発明の水溶性薬物誘導体の水への溶解度は、25 で少なくとも10 0 μg/mLである。より好ましくは、本発明の水溶性薬物誘導体の水への溶解度は、25 で少なくとも500 μg/mLである。さらにより好ましくは、本発明の水溶性薬物誘導体の水への溶解度は、25 で1ミリリットルあたり少なくとも1ミリグラム(mg/mL)である。

【0044】

参照標準の水への溶解度は、イムノアッセイの水性媒質中におけるそれらの使用を容易にする。水への溶解度はまた、クロマトグラフィーイムノアッセイで遭遇する表面に非特異的に吸着する参照標準の傾向を最小化するかまたは排除する。たとえば、水への溶解度がごくわずかである親油性ベンゾジアゼピン薬物のフルアゼパムおよびジアゼパムとは対照的に、水溶性ベンゾジアゼピン参照標準2は2mg/mLを超える水への溶解度を有すると考えられる。従来のベンゾジアゼピン標準のオキサゼパムおよびノルジアゼパムは、実際上、水に不溶である。

40

【0045】

また、本発明の水溶性参照標準は、周囲温度以上において水溶液中でより安定である。安定性は、以下の実施例3に記載されているように、便宜上、ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(GC/MS)で溶液中の化合物の初期濃度の減少をモニターすることにより、測定される。水溶性誘導体の安定性により、従来の標準と対比して延長された貯蔵

50

期間(貯蔵寿命)が提供されるとともに、さらに多岐にわたる条件下(たとえば、周囲温度を超える温度下)におけるイムノアッセイが可能になる。好ましくは、本発明の水溶性参照標準は、45 で2週間にわたり水溶液中のその初期濃度の少なくとも50%を保持する。より好ましくは、本発明の水溶性参照標準は、45 で2週間にわたり水溶液中のその初期濃度の少なくとも75%を保持する。さらにより好ましくは、本発明の水溶性参照標準は、45 で2週間にわたり水溶液中のその初期濃度の少なくとも90%を保持する。さらにより好ましくは、本発明の水溶性参照標準は、45 で2週間にわたり水溶液中のその初期濃度の少なくとも93%を保持する。

【0046】

たとえば、実施例3を参照すると、2週間にわたり尿溶液中に保存したとき、水溶性ベンゾジアゼピン参照標準2の濃度は、55 においてさえも有意に変化しない。これと比較して、2週間にわたる尿中のオキサゼパムの濃度は、4 に保持したとき有意に変化しないが、化合物の分解に起因して45 では88%、55 では100%減少する。実施例4を参照すると。水溶性ベンゾジアゼピン参照標準2では、3ヶ月間程度の長い貯蔵期間にわたり、45 における安定性は4 のときと比べて減少を示さない。

【0047】

水溶性参照標準の安定性はまた、典型的には、従来の標準のときのように水溶液のpHに依存することはない。このpH許容度のおかげで、さらに多岐にわたる条件下(たとえば、酸性、塩基性、または中性の条件下)でイムノアッセイを行うことが可能になる。好ましくは、本発明の水溶性参照標準は、45 において2週間にわたり2~13のpHで水溶液中のその初期濃度の少なくとも50%を保持する。より好ましくは、本発明の水溶性参照標準は、45 において2週間にわたり5~9のpHで水溶液中のその初期濃度の少なくとも50%を保持する。さらにより好ましくは、本発明の水溶性参照標準は、45 において2週間にわたり6~8のpHで水溶液中のその初期濃度の少なくとも50%を保持する。

【0048】

たとえば、再び実施例3を参照すると、水溶性ベンゾジアゼピン参照標準2の濃度は、pHが酸性(pH=6.4)であるか塩基性(pH=7.4)であるかにかかわらず、4 または45 のいずれにおいても、4週間まで保存したとき、有意に変化しない。この安定性は、少なくとも100 ng/mL~200ng/mLの間の濃度で観測される。

【0049】

水溶性参照標準は、塩基性、中性、または酸性のpHを有する水性環境で可溶である。この結果、水溶性参照標準では2~14のpHの範囲内で一定したオクタノール/水分配係数が得られる。一定したオクタノール/水分配係数は、指定のpH範囲にわたり±5%未満の変動を伴う値を有するものとして定義される。好ましくは、水溶性参照標準のオクタノール/水分配係数は、3~12のpHの範囲内で一定している。より好ましくは、水溶性参照標準のオクタノール/水分配係数は、5~9のpHの範囲内で一定している。

【0050】

本発明の水溶性化合物は、イムノアッセイの標準として有用である。水溶性参照標準は、薬物または標識化された薬物誘導体により形成されるレベルと類似のレベルで抗体との複合体を形成する。したがって、一連の濃度の水溶性参照標準に対するイムノアッセイの応答は、イムノアッセイの検量線を作成するために使用することができる。有用な標準化合物のほかに、薬物のイムノアッセイ系はまた、抗体および薬物の標識化誘導体をも含有する。好ましくは、系は、競合結合イムノアッセイ系であり、抗体、および担体でコンジュゲートされた薬物誘導体の両方を含有する。

【0051】

米国特許第5,770,458号に記載されているようなクロマトグラフィーイムノアッセイの場合、参照標準は、アッセイ製品を開発するため、製造時に製品の形成を支援するため、および所定のサンプルの試験による製品の信頼性の保証(すなわち、品質管理)を行うために、使用される。クロマトグラフィーイムノアッセイストリップの構成要素の変動因子としては、たとえば、ポーラスマトリックス材料上の抗体または薬物誘導体の濃度、使用さ

10

20

30

40

50

れる任意の粒子上の対応する結合パートナーの濃度、およびマトリックス材料のポロシティーが挙げられる。

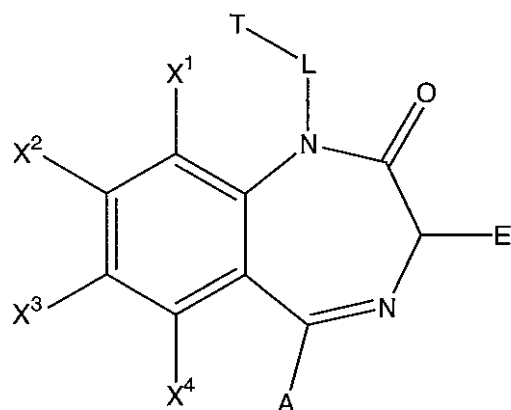
【 0 0 5 2 】

抗体は、J. Pharm. Sci. 66, 235 (1977); Biochem. Pharm. Exp. Therapeutics 186, 167 (1973); J. Imm. 4, 135 (1983); 米国特許第4,243,654号; 同第4,046,636号; 同第4,777,169号; 同第4,043,989号; および同第4,083,948号に開示されているような標準的方法により抗血清中に調製可能である。免疫原を用いるポリクロナール抗体の調製は、当業者に公知の従来技術のいずれかに従って行いうる。一般に、ウサギ、ヤギ、マウス、モルモット、またはウマのような宿主動物に免疫原混合物を注射する。最適力価に到達したことが確定されるまで、血清の抗体価を評価しながら、さらなる注射を行う。次に、宿主動物から採血し、好適な体積の特異的抗血清を得る。所望により、精製ステップを行って非特異的抗体のような望ましくない物質を除去することが可能であり、その後であれば、抗血清は、アッセイの実施に使用するのに好適であると考えられる。モノクロナール抗体は、先に述べたように免疫化されたマウスリンパ球と骨髓腫細胞とをMethods in Enzymology 73 (Part B), pp3-46, 1981に記載の技術のようなポリエチレングリコール法を用いてハイブリダイズさせることにより、取得可能である。ウシ血清アルブミン(BSA)とのコンジュゲートは、Elisaに使用するためのマイクロタイタープレートにコーティングするのに好適である。この方法は、抗体をスクリーニングするために使用されてきたものであり、当業者に周知である。

【 0 0 5 3 】

構造上関連のある薬物を含有するアナライトで容易に置き換えることができる最適な抗体-抗原反応を提供するために、薬物もしくは薬物誘導体と担体とのコンジュゲートで動物を免疫化することにより、好ましい抗体を産生させる。好ましくは、担体はタンパク質である。より好ましくは、担体は、ウシ血清アルブミン(BSA)またはウシチログロブリン(BTG)である。たとえば、所与の水溶性ベンゾジアゼピン誘導体では、式(III)で示される免疫原を使用することが好ましい。

【 化 8 】



(III)

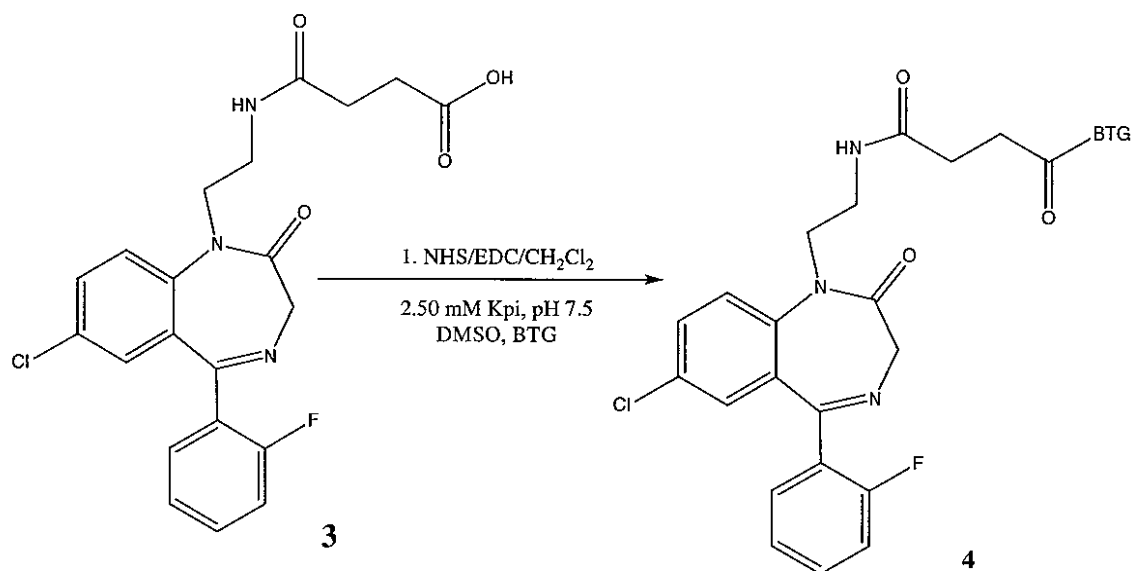
【 0 0 5 4 】

式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、A、E、およびLは、先に記載したとおりであり、そしてTは担体である。

【 0 0 5 5 】

たとえば、特定の水溶性ベンゾジアゼピン誘導体(2)では、抗体を産生させるのに好適な免疫原は、以下の反応スキームに従って調製可能である。

【化9】



10

【0056】

酸化合物(3)は、標準的方法により、たとえば、トリエチルアミンのような塩基の存在下における化合物1と無水コハク酸との反応により、生成可能である。次に、酸化合物3をタンパク質などのさまざまな担体に結合させてベンゾジアゼピン免疫原を提供することができる。好ましくは、酸化合物をBSAまたはBTGに結合させる。タンパク質コンジュゲートを調製する他の周知の方法もまた、同様に利用可能である。

20

【0057】

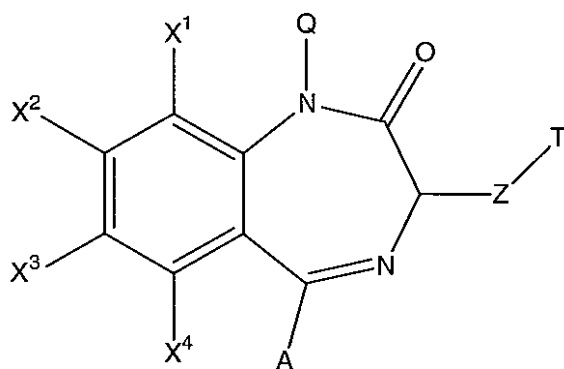
抗体のほかに、薬物-担体コンジュゲートも、イムノアッセイを行うのに有用であると思われる。担体は、 α -ガラクトシダーゼやペルオキシダーゼなどの酵素；フルオレセイン化合物などの蛍光性分子； ^{125}I などの放射性元素；微粒子；およびBSAやBTGなどのタンパク質のようなトレーサーであってもよい。担体は、着色されたラテックスまたは金属ナノ粒子のような着色コロイド粒子であってもよい。着色されたラテックスおよび金ゾルは、クロマトグラフィーイムノアッセイの検出ゾーンに結合させたとき、肉眼で容易に見えるので、さらなる発色手順の必要性は低減されるかまたは回避される。

30

【0058】

たとえば、ベンゾジアゼピンでは、好ましいコンジュゲートは、一般式(IV)

【化10】



(IV)

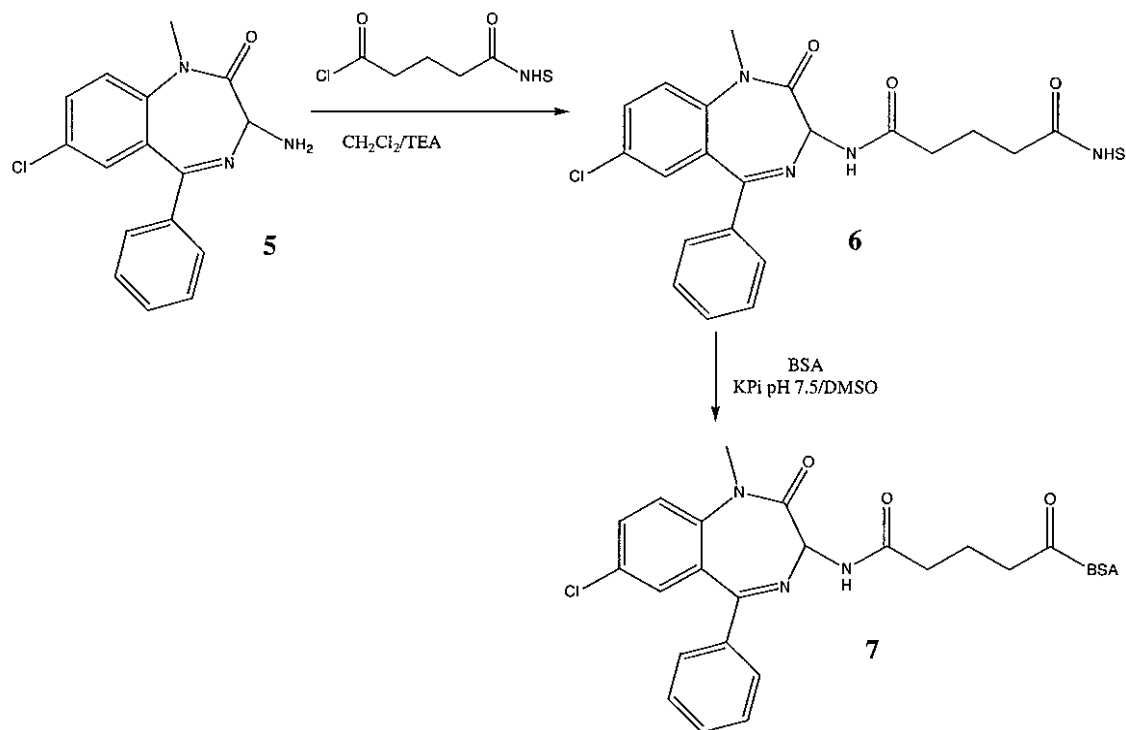
40

【0059】

50

〔式中、式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、Z、およびAは、先に定義したものと同一であり、Zは、上記のLに対して記載したとおりの連結基であり、Qは、1～20個の炭素原子を含有するアルキル基であり、そしてTは担体である〕で示される構造を有する。好ましくは、 X^3 はClであり、Zは、 $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ であり、そしてAはフェニルである。好ましくは、TはBSAである。好ましいコンジュゲートは、以下のスキームに従って調製可能である。

【化11】



【0060】

分析対象サンプル中の親油性薬物の不在下で、薬物コンジュゲートは、抗体に結合可能であり、この結合は測定可能である。親油性薬物がサンプル中に存在する場合、薬物は、抗体への結合に関して薬物コンジュゲートと競合する。親油性薬物に結合された抗体は、もはや、結合測定に寄与しない。親油性薬物含有量は、既知濃度の標準化合物で得られた値と対比して決定される (Adler, F.L. J. Immunol. 1971, 106(6):1684-1685. Bates, M. Amer. Acad. Forensic Sci. 1991, 37(6):1000をも参照されたい)

多くの場合、種々の補助物質が本発明に係るアッセイで利用されるであろう。たとえば、アッセイ媒質用およびアッセイ成分用の安定化剤だけでなく、通常、緩衝剤がアッセイ媒質中に存在するであろう。多くの場合、これらの添加剤のほかに、追加のタンパク質 (たとえば、アルブミン) または界面活性剤 (とりわけ、非イオン性界面活性剤) などが含まれるであろう。

【0061】

アナライトを定量するためのアッセイ方法を都合よく行うのに有用なキットに水溶性薬物誘導体を他の試薬と一緒にパッケージ化することが可能である。本発明の多用性を増大させるために、本方法およびアッセイを実質的に最適化する試薬比になるように、パッケージ化された組合せ物として、同一または個別の容器に入れて、液体または凍結乾燥形態で、試薬を提供することができる。試薬をそれぞれ個別の容器に入れてもよいし、試薬の交差反応性および安定性に応じて種々の試薬を1つまたはそれ以上の容器に組み合わせることも可能である。

【0062】

たとえば、参照標準キットは、パッケージ化された組合せ物として、特定の薬物に特異的な抗体と、標識化部分に結合された薬物誘導体のリガンドを含む複合体と、を含有し、さらに、イムノアッセイの検量のために既知量の1種以上の水溶性薬物誘導体(参照標準)を含有しうる。そのような参照標準キットは、親油性薬物および構造上関連のある化合物に対する増強された臨床的感度を有するアッセイ用の試薬を備えうる。

【実施例】

【0063】

以下の実施例は、実例として提供されたものであり、本発明の範囲を限定しようとするものではない。これらの実施例に挙げられた試薬および溶媒は、SIGMA-ALDRICH (Milwaukee, WI)またはFISHER (Suwanee, GA)から一般に入手可能である。

【0064】

実施例1: 1-(2-スルファミドエチル)-2'-フルオロ-7-クロロ-1,4-ベンゾジアゼピン(2)の合成

室温の20mLの塩化メチレン中の405mg(1.0mmol)の1-(2-アミノエチル)-2'-フルオロ-7-クロロ-1,4-ベンゾジアゼピン二塩酸塩(1, HOFFMANN-LA-ROCHE INC, Nutley, NJ)の懸濁液に、2mLの塩化メチレン中の840μL(6.0mmol)のトリエチルアミンの溶液を滴下した。得られた混合物を30分間攪拌した後、140μL(2.1mmol)のクロロスルホン酸を滴下した。反応混合物を1時間攪拌し、次に、水(60mL×4)で抽出した。有機相を廃棄し、水相はすべて合わせた。合わせた水溶液のpHを35% NaOH溶液で10.5~11に調整し、塩基性溶液を塩化メチレン(65mL×6)で抽出した。抽出された水溶液を真空中で蒸発乾固させ、426mgの粗生成物を得た。これはトリエチルアミンの硫酸塩を約12%(wt/wt)含有していることが判明した。生成物を精製するために、粗製物質の200mgを約14mLの水に溶解させ、得られた溶液の一部分(2mL)を、WATERS充填済みC-18カートリッジカラム(25×100mm)(VARIAN, Palo Alto, CA)を備えたRAININ分取HPLC系に注入した。溶出は、7.0mL/分の流量で10mMの酢酸アンモニウム/アセトニトリル(70/30v/v)の移動相によりイソクラチックに行った。308nmにおけるUV検出を選択し、約8~9分で溶出した画分を捕集した。残りの粗製溶液を同一の手順を用いて精製した。7回の精製処理がすべて終了した後、約8~9分で捕集した画分はすべて合わせ、次に、蒸発乾固させた。約50mLの水で乾燥粉末を溶解させ、混合物を遠心した。次に、上清を100mL丸底フラスコに移して凍結乾燥を行い、175mgの白色の粉末を得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) 7.82 (d, 1 H, J = 9 Hz), 7.51 - 7.68 (m, 3 H), 7.33 (t, d, 1 H, J1 = 7.6 Hz, J2 = 1.1 Hz), 7.10 - 7.22 (m, 2 H), 4.68 (d, J = 10.7 Hz), 4.27 (quintet, 1 H, J = 7.0 Hz), 4.03 (quintet, 1 H, J = 7.0 Hz), 3.88 (d, 1 H, J = 10.7 Hz), 3.25 (t, 2 H, J = 7.0 Hz).

実施例2: イムノアッセイ用の尿標準溶液の調製

プールし濾過した正常ヒト尿(0.09パーセントのナトリウムアジドを含有する)を用いて、尿標準溶液を調製した。ベンゾジアゼピン類を含む一連の薬物のGC-MS分析により測定し、尿プールに薬物が含まれないことを保証した。それぞれ水溶性誘導体2、オキサゼパム、またはノルジアゼパムのいずれかを含有する3つの異なるセットの尿プールを調製すべく、尿標準を等分した。尿プールは、7.4のpH値を有していた。また、プールのアリコートはpH6.4に調整して、酸性尿中における水溶性誘導体2の安定性を中性尿中における安定性と比較した。分析のために各薬物ストック溶液を尿プールの割り当てられたアリコートに添加した。溶液中の最終的な薬物濃度は、ELSOHLY LABORATORIES (Oxford, MS)でGC-MS分析により測定した。

【0065】

実施例3: 尿標準溶液の安定性試験

3つの異なる分析技術: (1) GC/MS(ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー)分析、(2)ABUSCREEN ONLINEベンゾジアゼピンイムノアッセイ、および(3)HPLC(高圧液体クロマトグラフィー)分析を用いて、上記の標準溶液の安定性を評価した。

【0066】

ABUSCREEN ONLINE試薬および検量パックは、ROCHE DIAGNOSTICS CORPORATION, INC. (I

10

20

30

40

50

ndianapolis, IN)から取得した。ABUSCREEN ONLINEベンゾジアゼピンアッセイは、製造業者の説明書に従って、半定量的モードでROCHE MIRAアナライザーを用いるかまたは半定量的モードでROCHE COBAS INTEGRA 700アナライザーを用いるかのいずれかにより、行った。

【0067】

4、45、および55を含む種々の温度で標準溶液を保存し、さまざまな時間間隔で試験した。GC/MS定量により、オキサゼパムおよび水溶性誘導体2の熱ストレス安定性の比較を行った。表Aに示されるように、2週間で、55ではオキサゼパムの100%が消失し、45ではオキサゼパムの88%が消失した。これに対して、水溶性誘導体2は、すべての温度で安定であった。また、対応するGC/MS値は、すべて、GC/MS分析の許容する誤差範囲内にある(すなわち、0日目の開始濃度の $\pm 20\%$ 以内)。水溶性誘導体2の溶液を5ヶ月で再び評価したとき、GC/MS値は、4、45、および55で、それぞれ、147ng/mL、150ng/mL、および145ng/mLであった。これらの値もまた、GC/MS分析の許容する誤差範囲内にある(すなわち、ゼロ日目の開始濃度の $\pm 20\%$ 以内)。

【表1】

表 A

温度	4℃	45℃	55℃
オキサゼパム 0日 = 196 ng/mL	196	24	0
水溶性誘導体 2 0日 = 171 ng/mL	191	178	185

【0068】

ABUSCREEN ONLINEベンゾジアゼピンアッセイを用いて、水溶性誘導体2の熱ストレス安定性試験を評価した。表Bに示されるように、ONLINEアッセイを用いて、4で2つのノルジアゼパム標準を評価し、4および45で水溶性誘導体2の4つの異なる標準調製物(中性および酸性ネガティブ尿プール、各尿pHごとに2つの濃度)を評価した。水溶性誘導体2の4つの調製物はすべて、評価した時間および温度で安定であった。

【表2】

表 B

	pH	4℃			45℃		
		0日	2週間	4週間	0日	2週間	4週間
2 (ng/mL)	7.4	102	92	99	102	95	98
2 (ng/mL)	7.4	188	183	189	188	179	192
2 (ng/mL)	6.4	99	97	106	99	101	109
2 (ng/mL)	6.4	191	191	193	191	200	209
ノルジアゼパム (ng/mL)	7.4	139	140	134	139	N. D.	N. D.
ノルジアゼパム (ng/mL)	7.4	271	272	252	271	N. D.	N. D.

薬物を含まないことが保証されたヒト尿中に水溶性誘導体2を混入し(100ng/mL)、得られた溶液を2つの部分：4 で保存する部分および45 でストレスを加える部分に分けた。3ヶ月後、次の手順により両方の溶液中の水溶性誘導体2の濃度を分析した。抗ベンゾジアゼピン抗血清でコーティングされたラテックスビーズ(0.8 μ m)が充填されたアフィニティークラムに、ある体積(2.5~10mLの間)の尿溶液を通した。50mM, pH6.1 MES(4-モルホリンエタンスルファミル)緩衝液で洗浄した後、メタノールでカラムから溶出させた。次に、メタノール溶出液を蒸発させ、残渣を404 μ LのMES緩衝液中に再構成した。4.6 \times 150mm Hypersil C18カラムおよびUV-Visダイオードアレイディテクター(220~460nmで走査検出)(THERMO HYPERSIL-KESTONE (Bellefonte, PA))を備えたHP 1100 HPLC系に、再構成緩衝液の80 μ Lのアリコート注入了。50mM, pH6.8酢酸アンモニウム緩衝液とアセトニトリルとの間で生成させたグラジエントでカラムから溶出させた(表C)。

10

【表 3】

表 C

時間	50mM NH ₄ OAc (%)	アセトニトリル (%)	流量 (mL/分)
0	100	0	1.00
30	60	40	1.00
40	30	70	1.00
60	100	0	1.00

20

【0069】

水溶性誘導体2を約18分で溶出させ、220nmにおけるその面積計測値を用いて定量化した。ストレスが加えられたサンプルの相対的安定性は101%であることが判明した(二重反復試験方式のそれぞれの抽出およびHPLC実験で得られた96%および106%の平均)。これは、45 でストレスを加えたサンプルの面積計測値を4 で保存したサンプルの面積計数値で割った値として定義した。

30

【0070】

実施例5： 1-(2-スクシネートアミドエチル)-2'-フルオロ-7-クロロ-1,4-ベンゾジアゼピン(3)の合成

室温の30mLの塩化メチレン中の810mg(2.0mmol)の1-(2-アミノエチル)-2'-フルオロ7-クロロ-1,4-ベンゾジアゼピン二塩酸塩(1)および0.7mL(5.0mmol)のトリエチルアミンの懸濁液に、220mg(2.2mmol)の無水コハク酸を添加した。アルゴン下、周囲温度で、反応混合物を20時間攪拌した。溶液を30mLの0.1N HCLおよび3 \times 30mLの水で洗浄した。塩化メチレンを蒸発乾固させて油を得た。溶出液としての塩化メチレン/メタノール(90/10)の混合物を用いて、これをシリカゲルカラムに通した。所望の生成物画分を捕集し、有機溶媒を蒸発乾固させ、アモルファスなベージュ色の固体(905mg)を得た。所与の構造と一致した¹H-NMR(CDCl₃, 200 MHz)。

40

【0071】

実施例6： ベンゾジアゼピン免疫原(4)の調製

5mLの塩化メチレン中の40mgのベンゾジアゼピン酸3の溶液に30mgのN-ヒドロキシスクシンイミドおよび50mgのEDCを添加した。混合物をアルゴン下で20時間攪拌した。2 \times 10mLの0.1N HCL、2 \times 10mLの飽和重炭酸ナトリウム、および2 \times 10mLの水で、有機層を洗浄した。有機層を無水硫酸塩で脱水し、溶媒を減圧下で除去し、油を得た。これを5mLの無水DMSOに溶解させ、しばらく放置し、以下に記載のタンパク質カップリングに供した。

【0072】

BTG(800mg)を16mLの50mMリン酸カリウムpH7.5に溶解させた。氷浴中で溶液を冷却させ

50

、DMSO(16mL)を徐々に添加した。氷浴を取り除き、これに、上述したように調製されたベンゾジアゼピン活性エステルの5mL溶液を添加した。混合物を周囲温度で20時間攪拌し、得られた免疫原を50Kカットオフの透析バッグ中に注いだ。DMSO/50mMリン酸カリウムpH7.5(6:4)の1L溶液中、DMSO/50mMリン酸カリウムpH7.5(3:7)の1L溶液中、DMSO/50mMリン酸カリウムpH7.5(15:85)の1L溶液中、DMSO/50mMリン酸カリウムpH7.5(5:95)の1L溶液中、および50mMリン酸カリウムpH7.5の1L溶液中で、バッグを透析した。次に、免疫原を0.22ミクロン濾過カップに通して濾過し、そのタンパク質含有率をCOOMASIE BLUEアッセイ(BIORAD, Hercules, CA)により測定した。この免疫原のアリコートで凍結させ、動物免疫化にすぐに使用できる状態にした。

【0073】

10

実施例7： 活性化ベンゾジアゼピン誘導体(6)の調製

50mLのTHF中の10.0g(0.0876モル)のグルタル酸無水物の溶液に10.0g(1モル)のN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を添加し、反応混合物を還流下で3.5時間煮沸した。得られた溶液を減圧下で濃縮して油を得た。物質を50mLのエチルアセテート中に採取し、結晶化させて固体物質を生成させ、これを濾過し、少量のエチルアセテートで洗浄し、15.8g(79%)の5-[(2,5-ジオキソ-1-ピロリジニルオキシ)-5-オキソ-ペンタン酸を得た。エチルアセテートおよびヘキサンから再結晶化させ、白色針状結晶を得た。M.P.: 81-83 degC. $C_9H_{11}NO_6$ に対するMA.計算値: C, 47.17; H, 4.84; N, 6.11. 測定値: C, 46.99; H, 4.87; N, 6.11.

20mLのチオニルクロリド中の10.0g(0.044モル)の以上で得られたグルタレートモノ-NHS エステルの溶液に、アルゴン下において還流冷却器を取り付けた状態で45 で加熱した。次に、真空中で反応フラスコを直接吸引し、ドライアイス-アセトンにより冷却されたコールドトラップに通して揮発性物質を除去することにより、8.5g, 79%のグルタレートモノ-NHSエステルモノ酸クロリドを白色固体として得た。これは良好な純度であることが 1H -NMRにより実証された。

20

【0074】

3-アミノベンゾジアゼピン(5、HoffmannLa-Rocheから入手した)(2.95g, 0.008モル)およびトリエチルアミン(3mL)を150mLのTHFに溶解させた。溶液を氷浴中で冷却させ、次に、2.7g(0.011モル)の以上で調製したグルタレートモノ-NHSエステルモノ酸クロリドを添加した。これを約0 で15分間攪拌し、有機溶媒を除去し、淡黄色のフォームを得た。物質を100mLの塩化メチレンに溶解させ、50mLの水、50mLの飽和重炭酸ナトリウム、および再び50mLの水で、有機相を洗浄した。有機層を無水塩化マグネシウムで脱水した。塩化メチレン溶媒を蒸発させてフォーム(1.8g)を得る。塩化メチレンおよびジエチルエーテルからフォームを再結晶し、灰白色固体として1.5gの化合物5を得た。 1H NMRは、所与の構造と一致する。化合物は、このままの状態、以下に記載されているようにBSAとの結合に供される。

30

【0075】

実施例8： ベンゾジアゼピン-BSAコンジュゲート(7)の調製

BTGではなくBSAで処理すること以外は実施例6に記載したのと同様な方法で、ベンゾジアゼピン-BSAコンジュゲートを調製した。生成物を調製し、保存剤として0.05%ナトリウムアジドを加えて10mg/mL溶液として100mMリン酸カリウム中に保存した。

40

【0076】

実施例9： 検量物質として水溶性誘導体2を用いるベンゾジアゼピン類のイムノクロマトグラフィーアッセイ

米国特許第5,770,458号に詳述されているように、ニトロセルロースをベースとする試験ストリップを用いて、イムノクロマトグラフィーアッセイを行った。マイラーでバックリングされた大細孔サイズのニトロセルロース(8~12ミクロン)を、長さ15cmおよび幅5cmの部片にカットした。ベンゾジアゼピン-BSAコンジュゲート7(約5mg/mL)および抗BSAモノクロナール抗体(約2mg/mL)の溶液(いずれも50mMリン酸カリウム緩衝液pH7.5中)を、IVEK CORP. (North Springfield, VT) DIGISPENSE 2000TM系上にローディングした。15cmの側部

50

からそれぞれ2cmおよび1cmの距離でニトロセルロース上に速度1l/cmで溶液を送出した。ニトロセルロースセグメントを37℃で30分間乾燥させ、次に、20mM TRIS, pH8中のポリビニルアルコール(PVA, m.w. 13,000~23,000)溶液により室温で30分間ブロッキングした。次に、セグメントを水中ですすぎ、乾燥させた。

【0077】

この実施例中で先に記載したのと同じのニトロセルロースを、微粒子に対する個別の膜(上部膜)として使用した。二膜ストリップ構成体の構築は、米国特許第5,770,458号に詳述されているように行った。簡潔に述べると、主要膜と同一のプロトコルを用いて、上部膜をブロッキングし、洗浄した。ADHESIVE RESEARCH INC. (Glen Rock, PA)接着剤マイラーを用いて、適正量の微粒子を含有する上部膜を主要膜にラミネーションし、次に、セグメントから幅5mmのストリップを切り出す。サンプルパッドおよびシンクパッドをストリップの始端および終端にそれぞれ配置した。BIORAD LABORATORIES (Hercules, CA)製のセルロース(ゲルブロッター)をサンプル受容パッドおよびシンクパッドの両方に使用した。尿中に所定量の薬物を含有する溶液をサンプル受容パッドに添加することにより、または膜ストリップのサンプル受容パッドを溶液中に浸漬することにより、検量線を得た。種々のあらかじめ決められた濃度の水溶性誘導体2を用いて、尿中に標準を調製した。シグナル強度は、次のように測定される：2.5~3.0=暗青色、1.5~2.0=中濃青色、1.0=明青色、0.5=極淡知覚色、および0=無色。ストリップの読みが無色である場合、完全阻害が達成され、サンプルは、「標準」の調製に用いた200ng/mLの薬物を含有することが示唆される。

【0078】

水溶性誘導体2およびオキサゼパムを用いて作成したベンゾジアゼピンアッセイ検量線の比較を図3に示す。水溶性誘導体2および7-アミノフルニトラゼパムを用いて作成したベンゾジアゼピンアッセイ検量線の比較を図4に示す。水溶性誘導体2を検量物質として用いて作成された検量線は、最大のスパンおよび最良好のカットオフ近傍変化を有する。検量線再現性の例を表Dに示す。

【表4】

表 D

使用した標準	ベンゾジアゼピン標準の濃度 (ng/mL)				
	0	50	100	200	400
誘導体 2	3.00	2.50	2.00	0	0
誘導体 2	3.00	2.75	2.00	0	0
誘導体 2	3.00	2.50	2.00	0	0
オキサゼパム	2.50	2.00	1.50	0.50	0
オキサゼパム	2.50	2.00	1.00	0.50	0

【0079】

オキサゼパムおよびノルジアゼパムのいずれに対しても水溶性誘導体2の交差反応性は、ONLINEイムノアッセイおよびイムノクロマトグラフィーアッセイのいずれを用いた場合でも、約70%である。濃度が適切に調整された場合、アッセイの検出能力を損なうことなくノルジアゼパムおよび/またはオキサゼパムを置き換えてアッセイを検量し、他のベンゾジアゼピン様化合物を検出することができる。

【0080】

上記の好ましい実施形態および実施例は、本発明の範囲および精神を例示するために与えられている。これらの実施形態は、本発明を限定することを意図したものではないが、

これらの実施形態から、本発明の対象となりうる範囲内の他の実施形態および実施例は当業者には自明であろう。したがって、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】ベンゾジアゼピン類の構造の部分的なリストである。

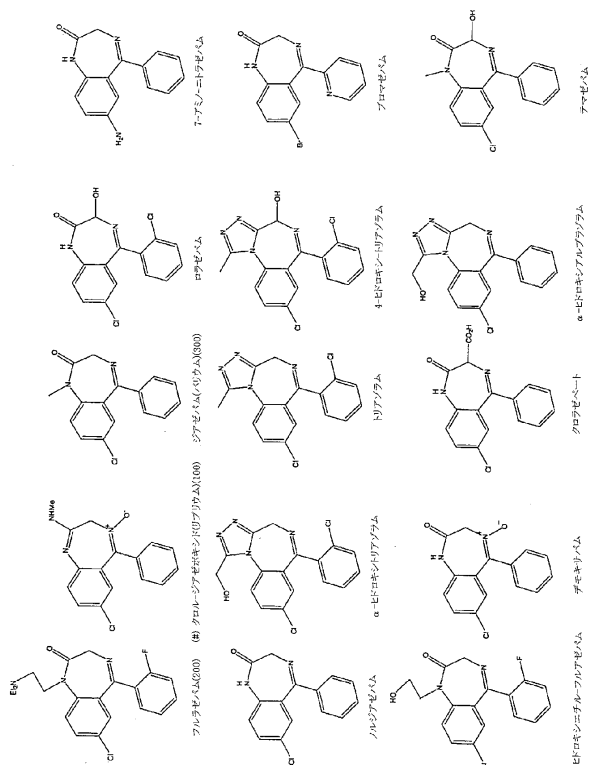
【図2】ベンゾジアゼピン類の構造の部分的なリストである。

【図3】水溶性誘導体2およびオキサゼパムを用いて作成したベンゾジアゼピンアッセイ検量線の比較である。

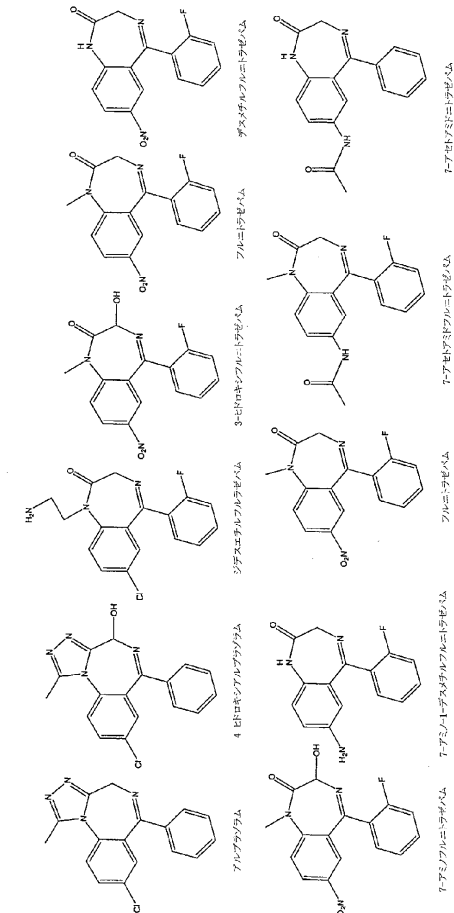
【図4】水溶性誘導体2および7-アミノフルニトラゼパムを用いて作成したベンゾジアゼピンアッセイ検量線の比較である。

10

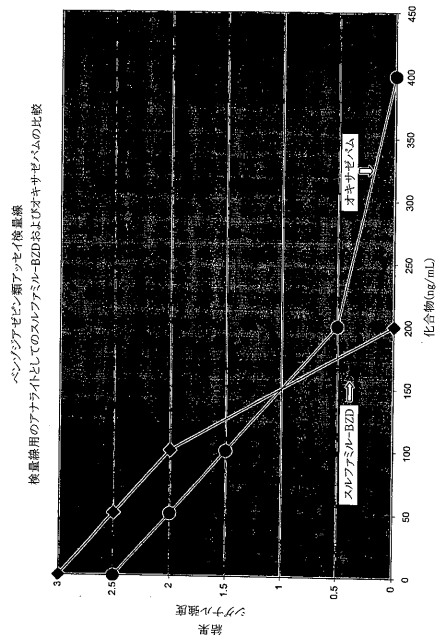
【図1】



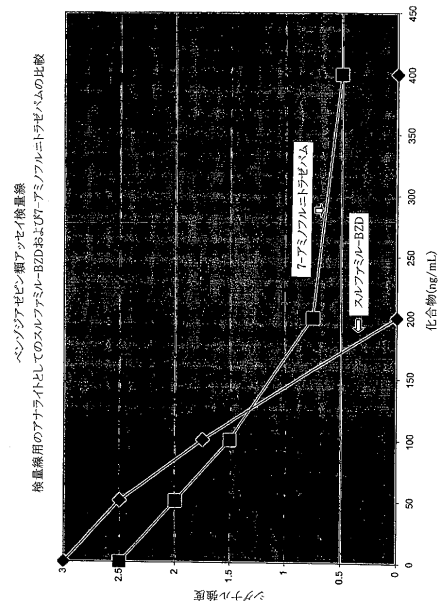
【図2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(72)発明者 リ, ミン

アメリカ合衆国 08551 ニュージャージー州, リンゴーズ, ベックス ブルバード 88

(72)発明者 ウー, ロバート, エス.

アメリカ合衆国 07052 ニュージャージー州, ウエスト オレンジ, ラルフ ロード 25

(72)発明者 ツァイ, ジェーン, エス., シー.

アメリカ合衆国 46256 インディアナ州, インディアナポリス, サージェント クリーク
ドライブ 9001

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特公昭48-010479(JP, B1)

Journal of Medical Chemistry, 1978年, vol.21, no.10, p.1079-1081

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/531