

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4658281号
(P4658281)

(45) 発行日 平成23年3月23日(2011.3.23)

(24) 登録日 平成23年1月7日(2011.1.7)

(51) Int. Cl.		F I	
CO7D 277/66	(2006.01)	CO7D 277/66	
GO1N 21/78	(2006.01)	GO1N 21/78	C
GO1N 33/532	(2006.01)	GO1N 33/532	B

請求項の数 38 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願平11-349396	(73) 特許権者	596121507
(22) 出願日	平成11年12月8日(1999.12.8)		ルミゲン インコーポレイテッド
(65) 公開番号	特開2000-169459(P2000-169459A)		アメリカ合衆国 ミシガン 48033
(43) 公開日	平成12年6月20日(2000.6.20)		サウスフィールド ウェスト エイト マ
審査請求日	平成18年11月22日(2006.11.22)		イル ロード 22900
(31) 優先権主張番号	208.065	(74) 代理人	100064908
(32) 優先日	平成10年12月9日(1998.12.9)		弁理士 志賀 正武
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人	100108578
			弁理士 高橋 詔男
		(74) 代理人	100089037
			弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100101465
			弁理士 青山 正和
		(74) 代理人	100094400
			弁理士 鈴木 三義

最終頁に続く

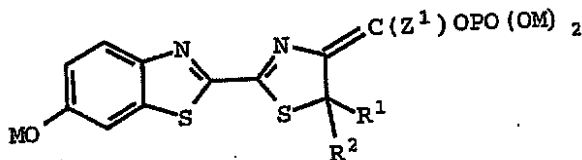
(54) 【発明の名称】 赤色の化学発光を生じさせる化合物及びその方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式：

【化1】



[上記式において、Z¹はOR³及びSR³から選択される基であり、R³はアルキル基、塩素で置換されたかまたは無置換のアリール基、及び、アラルキル基から選択され、

R¹及びR²は、別個に、アルキル基（一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい）、アリール基、及び、アラルキル基から選択され、そして、

Mは水素原子、並びに、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、アンモニウムイオン、第4級アンモニウムイオン、第4級ホスホニウムイオン、及び、ジカチオン性のアンモニウム又はホスホニウム化合物から選択されるカチオンから選択される]を有する化合物。

【請求項2】

R¹及びR²の各々がアルキル基である、請求項1記載の化合物。

10

20

【請求項 3】

Z¹がO - Ar及びS - Ar基 [Arは塩素で置換されたかまたは無置換のアリール基] から選択される、請求項 2 記載の化合物。

【請求項 4】

Arがフェニル、塩素で置換されたフェニル及びナフチルから選択される請求項 3 記載の化合物。

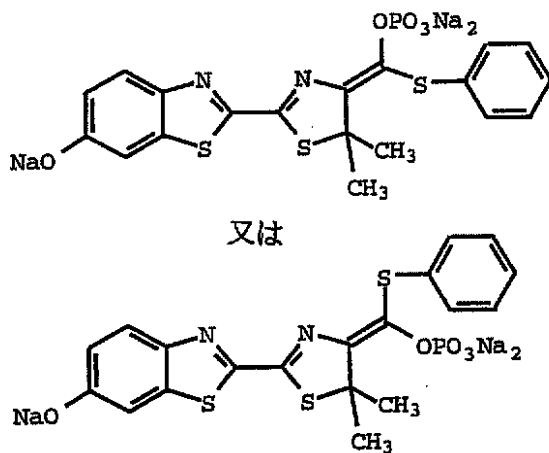
【請求項 5】

Z¹がS - Ar基であり、R¹及びR²の各々がメチル基であり、そして、Mが水素原子及びアルカリ金属イオンから選択される、請求項 2 記載の化合物。

【請求項 6】

下記式：

【化 2】

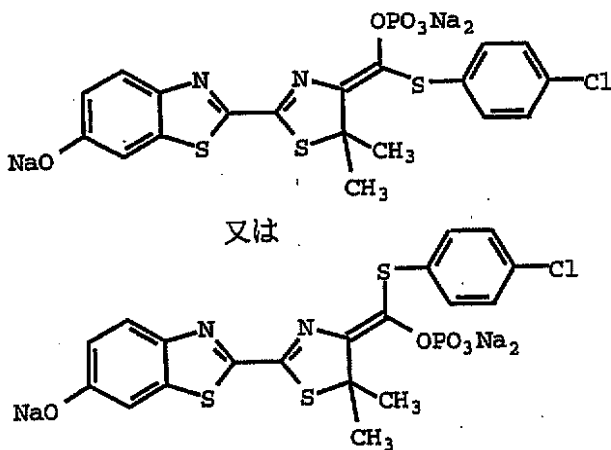


を有する請求項 5 記載の化合物。

【請求項 7】

下記式：

【化 3】



を有する請求項 5 記載の化合物。

【請求項 8】

下記式：

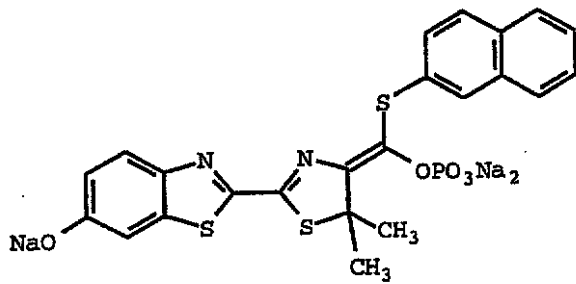
10

20

30

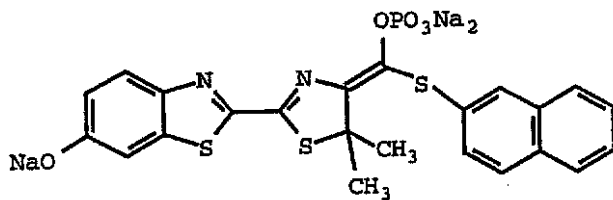
40

【化4】



10

又は



を有する請求項5記載の化合物。

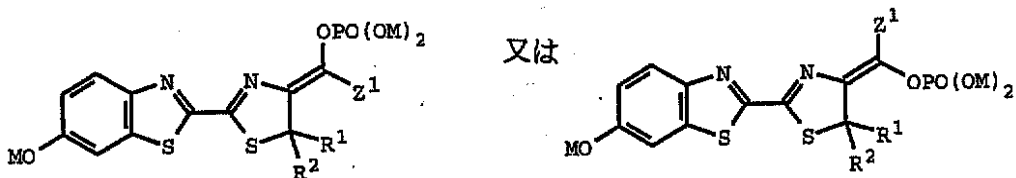
20

【請求項9】

水性溶液中に

a) 少なくとも1つの

【化5】



30

[上記式において、 Z^1 は OR^3 及び SR^3 から選択される基であり、 R^3 はアルキル基、塩素で置換されたかまたは無置換のアリール基、及び、アラルキル基から選択され、

R^1 及び R^2 は、別個に、アルキル基（一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい）、アリール基、及び、アラルキル基から選択され、そして、

Mは水素原子、並びに、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、アンモニウムイオン、第4級アンモニウムイオン、第4級ホスホニウムイオン、及び、ジカチオン性のアンモニウム又はホスホニウム化合物から選択されるカチオンから選択される、及び、

b) ルシゲニン、ベーシックブルー41、ベーシックブルー66及びメチレンブルーから選択されるカチオン性芳香族化合物を含む試薬組成物。

40

【請求項10】

非イオン性界面活性剤を更に含む請求項9記載の組成物。

【請求項11】

前記非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレン化アルキルフェノール、ポリオキシエチレン化アルコール、ポリオキシエチレン化エーテル及びポリオキシエチレン化ソルビトールエステルから選択される請求項10記載の組成物。

【請求項12】

 R^1 及び R^2 が各々アルキル基である請求項9記載の組成物。

【請求項13】

50

Z¹がO - Ar及びS - Ar基 [Arは塩素で置換されたかまたは無置換のアリール基] から選択される、請求項12記載の組成物。

【請求項14】

Arがフェニル、塩素で置換されたフェニル及びナフチルから選択される請求項13記載の組成物。

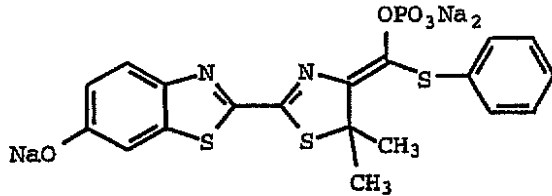
【請求項15】

Z¹がS - Ar基であり、R¹及びR²の各々がメチル基であり、そして、Mが水素原子及びアルカリ金属イオンから選択される、請求項12記載の組成物。

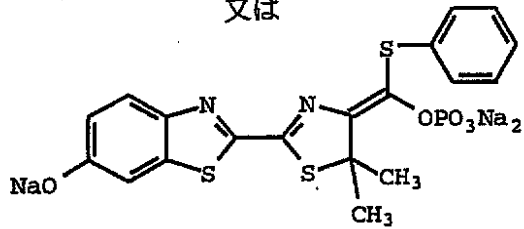
【請求項16】

式Iの化合物が式

【化6】



又は

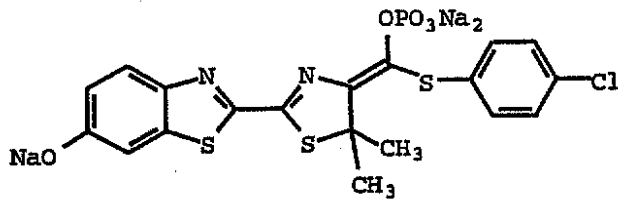


を有する請求項15記載の組成物。

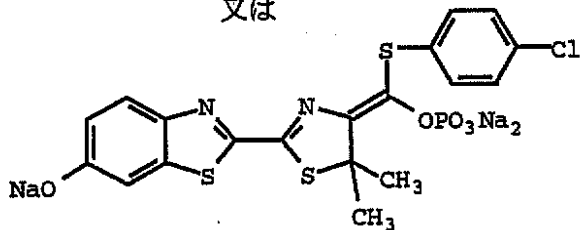
【請求項17】

式Iの化合物が式

【化7】



又は



を有する請求項15記載の組成物。

【請求項18】

式Iの化合物が式

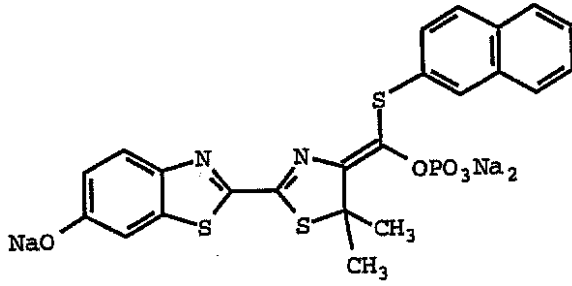
10

20

30

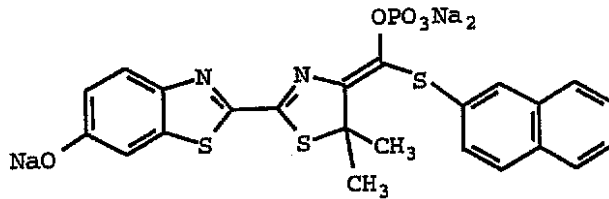
40

【化 8】



10

又は



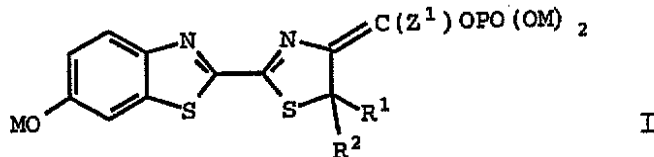
20

を有する請求項 1 5 記載の組成物。

【請求項 1 9】

ホスファターゼ酵素と下記式：

【化 9】



I

30

[上記式において、 Z^1 は OR^3 及び SR^3 から選択される基であり、 R^3 はアルキル基、塩素で置換されたかまたは無置換のアリール基、及び、アラルキル基から選択され、

R^1 及び R^2 は、別個に、アルキル基（一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい）、アリール基、及び、アラルキル基から選択され、

M は水素原子、並びに、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、アンモニウムイオン、第 4 級アンモニウムイオン、第 4 級ホスホニウムイオン、及び、ジカチオン性のアンモニウム又はホスホニウム化合物から選択されるカチオンから選択される] を有する化合物とを反応させることを含む化学発光生成方法。

【請求項 2 0】

前記ホスファターゼ酵素がバクテリアアルカリホスファターゼ、動物アルカリホスファターゼ、植物酸ホスファターゼ、動物酸ホスファターゼ及びアルカリホスファターゼ複合体 (conjugates) からなる群から選択される請求項 1 9 記載の方法。

40

【請求項 2 1】

前記ホスファターゼ酵素がアルカリホスファターゼである請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 2】

前記アルカリホスファターゼ複合体が、ハプテン、抗体、蛋白、核酸及びオリゴヌクレオチドからなる群から選択された生物学的分子に結合したアルカリホスファターゼを含む請求項 2 1 記載の方法。

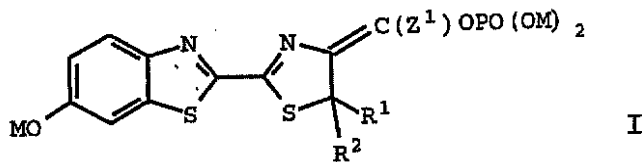
【請求項 2 3】

化学発光アッセイ法によって試料中の分析物を検出する方法であって、(a) 少なくとも

50

1つの式 I :

【化 1 0】



[上記式において、 Z^1 は OR^3 及び SR^3 から選択される基であり、 R^3 はアルキル基、塩素で置換されたかまたは無置換のアリール基、及び、アラルキル基から選択され、

R^1 及び R^2 は、別個に、アルキル基（この場合は一緒になってシクロアルキル基を形成してもよい）、アリール基、及び、アラルキル基から選択され、

M は水素原子、並びに、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、アンモニウムイオン、第4級アンモニウムイオン、第4級ホスホニウムイオン、及び、ジカチオン性のアンモニウム又はホスホニウム化合物から選択されるカチオンから選択される」の化合物を、もし前記試料中に存在しない場合は化学発光を生成させるためのフォスファターゼ酵素と共に、前記試料に接触させ、(b)化学発光を検出し；そして(c)化学発光量を前記試料中の前記分析物の量に関連づけることを含む方法。

【請求項 2 4】

検出されるべき前記分析物がフォスファターゼ酵素である請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

検出されるべき前記分析物が前記酵素の阻害剤である請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 6】

前記試料中の前記分析物を、当該分析物と特異的に結合する分析物結合化合物と反応させることを更に含み、しかも、当該分析物結合化合物がアルカリフォスファターゼと結合している、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記分析物結合化合物がハプテン、抗体、蛋白、核酸及びオリゴヌクレオチドからなる群から選択される請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 8】

前記フォスファターゼ酵素が前記分析物に標識として直接取り付けられている請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 9】

前記試料中の前記分析物を、分析物結合化合物、並びに、フォスファターゼが結合されており当該分析物結合化合物に特異的に結合する物質と反応させることを更に含む請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 3 0】

前記試料中の前記分析物を (a) 前記分析物及び少なくとも1つの第2の特異結合物質と特異的に結合する分析物結合化合物を含む標識された分析物結合化合物；及び (b) フォスファターゼ標識された、前記第2の特異結合物質の結合パートナー；と反応させることを更に含む請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 3 1】

前記検出が膜上で行われる請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 3 2】

式 I の化合物を、水性溶液中に式 I の化合物及びカチオン性芳香族化合物を含む試薬組成物で提供することを更に含み、

前記カチオン性芳香族化合物が、ルシゲニン、ベーシックブルー 4 1、ベーシックブルー 6 6 及びメチレンブルーから選択される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 3 3】

前記化学発光が電荷対デバイス (charge-coupled device) 又は赤色感受性フォトダイオ

10

20

30

40

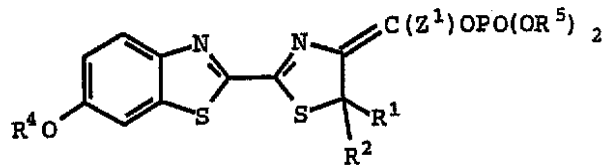
50

ードによって検出される請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 3 4】

下記式：

【化 1 1】



[上記式において、 Z^1 は OR^3 及び SR^3 から選択される基であり、 R^3 はアルキル基、塩素で置換されたかまたは無置換のアリール基、及び、アラルキル基から選択され、 R^1 及び R^2 は、別個に、アルキル基、アリール基、及び、アラルキル基から選択され、また、 R^1 及び R^2 は一緒になってのシクロアルキル基を形成してもよく、 R^4 はトリアルキルシリル基、アルキルジアリールシリル基、アルキルカルボニル基及びアリールカルボニル基から選択される基であり、 R^5 基の一つは、アルキル、トリアルキルシリル、アルキルジアリールシリル及びアラルキル基から選択される保護基であり、 R^5 基の他方は、アルキル、トリアルキルシリル、アルキルジアリールシリル及びアラルキル基又はアルカリ金属イオンから選択される] を有する化合物。

【請求項 3 5】

両方の R^5 基が 2 - シアノエチル基である請求項 3 4 記載の化合物。

【請求項 3 6】

R^4 がピバロイル基及び *t* - ブチルジフェニルシリル基から選択される請求項 3 4 記載の化合物。

【請求項 3 7】

Z^1 が *S* - Ar 基であり、 R^1 及び R^2 の各々がメチル基であり、そして、Ar がフェニル、4 - クロロフェニル及び 2 - ナフチルから選択される、請求項 3 4 記載の化合物。

【請求項 3 8】

Z^1 が *S* - Ar 基であり、 R^1 及び R^2 の各々がメチル基であり、そして、Ar がフェニル、4 - クロロフェニル及び 2 - ナフチルから選択される、請求項 3 6 記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、フォスファターゼ酵素と反応して化学発光を生じさせる化学発光化合物及び組成物に関する。本発明はさらに赤色の化学発光を生成させる方法に関する。また、本発明はイムノアッセイ、核酸プローブアッセイ等の分析 (assay) において上記酵素或いは酵素標識した特異結合パートナーを検出するためのこれらの方法の使用にも関する。

【0002】

【従来の技術】

化学発光を検出する様々な手段が公知であり、また、商業的に使用されている。最も簡便な手段は、通常、カメラ (CCDカメラ) に組み込まれている電荷対デバイス (charge-coupled device: CCD) である。このタイプのデバイスは事実上どのような形状の対象物であろうと定量的なイメージングを可能とし、また、コンピュータを用いたデータ保存及び操作が簡単であるので急速に多くの研究所に導入されている。CCDの特徴は赤色光に対する優れた感受性にある。残念なことに、酵素の定性的及び定量的な検出に現在利用可能な化学発光化合物は青又は緑に発光する。CCDの検出感度はその波長では著しく悪化する。したがって、CCD検出技術の利点を十分引き出すためにスペクトル中で赤色の領域の光を生成する化学発光化合物が求められていた。

【0003】

10

20

30

40

50

アルカリフォスファターゼ (AP) は生物学的分子、並びに、薬物、ホルモン、ステロイド及び癌マーカーのような他の興味ある分析物の酵素結合アッセイにおけるマーカー又はラベルとして頻繁に使用されている。この酵素の化学発光検出は、試料中の酵素の量、或いは、酵素標識された分析物又は分析物と特異的に結合する標識されたパートナーの量の定量的な測定を可能とする、安全、簡便かつ高感度の手段を提供する。商業的に使用されている化学発光酵素基質は赤色の化学発光を生成しない。赤色の化学発光を生じさせることの可能な基質は CCD 検出と連係して使用されると有利であると思われる。そのような基質は高い効率で、しかも、長い間持続して赤色の化学発光を生成することが好ましいと考えられる。これらの要求の双方とも本発明の化合物及び組成物によって満たされる。

【 0 0 0 4 】

本出願人の公開された国際特許出願 W097/26245 はフォスファターゼとの反応によって光を発生させる化学発光複素環式化合物を開示している。そして、ありうる複素環断片は 2 - (4 - ヒドロキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 2 - チアゾリル基 (ルシフェリン基) を含んでいる。

【 0 0 0 5 】

ルシフェリンと命名された、様々な種類の甲虫が有している発光化合物は、ルシフェラーゼによって酸化されて緑色からオレンジ色の範囲で生体内生物発光を生じさせる。赤色の化学発光は、試験管内で天然のルシフェリンとルシフェラーゼを pH < 7 で使用して、DM SO 又は水性ベース中でルシフェリンを自動酸化させることによって得ることができる (W. D. McElroy, H. H. Seliger, E. H. White, Photochem. Photobiol., 10, 153-170 (1969))。4 , 6 - ジヒドロキシルルシフェリン及び 6 - アミノルシフェリンのようなルシフェリンの合成類似体はルシフェラーゼと反応して赤色の生物発光を生じさせることが報告されている (E. H. White, H. Worther, J. Org. Chem. 31, 1484-1488(1966); E. H. White, H. Worther, H. H. Seliger, W. D. McElroy, J. Am. Chem. Soc., 88, 2015-2019(1966))。別の類似体である 5 , 5 - ジメチルルシフェリンは酸化 DMSO 又は水性アルカリ溶液中で赤色の化学発光を行うが、ルシフェラーゼと一緒に生物発光を生じさせることはない (T. A. Hopkins, H. H. Seliger, E. H. White, M. W. Cass, J. Am. Chem. Soc., 89, 7148(1967))。上記した赤色放射生物又は化学発光反応のいずれもイムノアッセイや DNA プローブアッセイのような酵素標識アッセイにおいて商業的に有用であるとされなかったことは重要であり、特記すべきである。

【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、フォスファターゼ酵素と反応して赤色の化学発光を生成する化合物及び組成物を提供することである。

本発明は、フォスファターゼ酵素と反応して、酵素複合体の検出用の赤色の化学発光を生成する化合物及び組成物を提供することをも目的とする。

本発明の目的は、フォスファターゼ酵素と反応して、長時間持続する赤色の化学発光を生成する化合物及び組成物を提供することである。

本発明は、CCDカメラ及び光度計を含む電荷対デバイス (CCD) での検出のために、フォスファターゼ酵素と反応して赤色の化学発光を生成する化合物及び組成物を提供することをも目的とする。

そして、本発明の目的は、化学発光化合物の合成に中間体として有用な化合物を提供することである。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段及び発明の実施の形態】

定義：

「アルキル」 - 1 ~ 20 の炭素を含む分岐状、直鎖状又は環状の炭化水素基。

ここで使用される低級アルキルは炭素を 8 まで含むアルキル基である。

【 0 0 0 8 】

「アルケニル」 - 少なくとも 1 つの C - C 二重結合と 2 ~ 20 の炭素を含む分岐状、直鎖

10

20

30

40

50

状又は環状の炭化水素基。ここで使用される低級アルケニルは炭素を8まで含むアルケニル基である。

【0009】

「アルキニル」 - 少なくとも1つのC - C三重結合と2 ~ 20の炭素を含む分岐状又は直鎖状の炭化水素基。ここで使用される低級アルキニルは炭素を8まで含むアルキニル基である。

【0010】

「分析物」 - 試料中の存在又はその量がアッセイ(分析)によって測定されるべき物質。特異的な結合親和性を有する特異結合パートナーが存在する有機及び生物学的分子が分析物に含まれる。典型的な分析物には、制限はないが、一本鎖又は二本鎖DNA、RNA、DNA-RN
A複合体、オリゴヌクレオチド、抗体、抗体断片、抗体 - DNAキメラ、抗原、ハプテン、蛋白、レクチン、アビジン、ストレプトアビジン及びビオチンが含まれる。他の典型的な分析物としては加水分解酵素、加水分解酵素の阻害剤及びジヒドロキシ芳香族化合物も含まれる。

10

【0011】

「アリール」 - 1 ~ 5の炭素環又は複素環式芳香族環を含む芳香族環含有基であり、それらの環は水素原子以外の1又はそれ以上の置換基によって置換されてもよい。典型的なアリール基には、フェニル、ナフチル、ピリジル、キノリル、フリル、チオフェニル及びピロリルが含まれる。

【0012】

「カチオン中心」 - カチオン中心とは、正に荷電した原子又は原子団、或いは、1つ又はそれ以上の正電荷のサイトを有する分子の一部を意味する。典型的なカチオン中心は、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、アンモニウム、第4級アンモニウム及び第4級ホスホニウムイオン、ジカチオン性アンモニウム又はホスホニウム化合物、及び、複数のカチオン性基を有する重合体化合物が含まれる。カチオン中心はそれらの「価(valence)」に応じた数で存在する。

20

【0013】

「ハロゲン」 - フッ素、塩素、臭素又はヨウ素原子である。

【0014】

「発光」 - 電子的な励起状態に励起されたときに光を放射すること。光は、一重項励起状態から減衰するときには蛍光として、或いは、三重項励起状態から減衰するときには燐光として放射される。

30

【0015】

「試料」 - 分析されるべき1つ又はそれ以上の分析物を含む、或いは、含んでいると思われる流体。化学発光反応法によって分析される典型的な試料は血液、血漿、血清、尿、精液、唾液、細胞分離物(cell lysates)、組織抽出物等の体液を含む生物学的試料である。他のタイプの試料は土壌又は水等の環境的試料及び食品試料を含む。

【0016】

「特異結合対」 - 相互結合親和性を示す二つの物質。例としては、抗原 - 抗体、ハプテン - 抗体又は抗体 - 抗体対、相補的なオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、アビジン - ビオチン、ストレプトアビジン - ビオチン、ホルモン - 受容体、レクチン - 炭水化物、IgG - プロテインA、核酸 - 核酸結合蛋白及び核酸 - 抗核酸抗体が含まれる。

40

【0017】

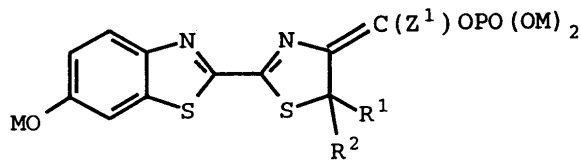
「置換(され)」 - ある基上の少なくとも1つの水素原子が非水素原子基によって置き換えられることをさす。置換された基に関して注意すべきことは、明示がなければ、複数の置換部位が存在することができるというつもりであるということである。

【0018】

下記式Iの化合物がフォスファターゼ酵素と反応すると高い強度の赤色の化学発光を生成することが見いだされた。更に、式Iの化合物は予期しないほど長時間にわたって化学発光を行うことも発見された。式I:

50

【化 1 2】



I

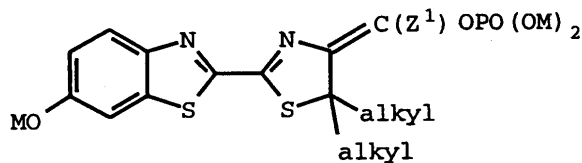
において、 Z^1 及び Z^2 の一つは式 $OPO(OM)_2$ を有する基であり、他方は OR^3 及び SR^3 から選択される基である。 R^3 は置換又は無置換アルキル基、置換又は無置換アリール基、及び、置換又は無置換アラルキル基から選択される。 R^1 及び R^2 は、別個に、水素原子、置換又は無置換アルキル基、置換又は無置換アリール基、置換又は無置換アラルキル基から選択され、また、 R^1 及び R^2 は一緒になって置換又は無置換のシクロアルキル基を形成してもよい。 M は水素原子及びカチオン中心から選択される。

10

【0019】

式Iの化合物の好ましいクラスは下記の構造IIを有しており、ここで、 R^1 及び R^2 はアルキル基である。

【化 1 3】



II

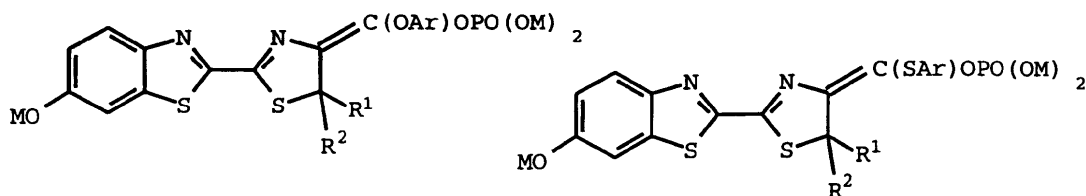
20

【0020】

式Iの他の好ましい化合物は下記の構造III及びIVを有しており、 R^1 及び R^2 はアルキル基であり、 Z^1 は $O-Ar$ 及び $S-Ar$ 基から選択される。ここで、 Ar は置換又は無置換アリール基である。

30

【化 1 4】



III

IV

【0021】

好ましい R^1 及び R^2 は、それぞれ、1～8の炭素原子を有する低級アルキル基であり、より好ましくは1～4の炭素原子を有する低級アルキル基であり、さらに好ましくは、メチル基である。 M は好ましくはアルカリ金属カチオンであり、より好ましくはリチウム、ナトリウム又はカリウムイオンである。アリール基 Ar は好ましくは置換又は無置換フェニル或いは置換又は無置換ナフチル基である。

40

【0022】

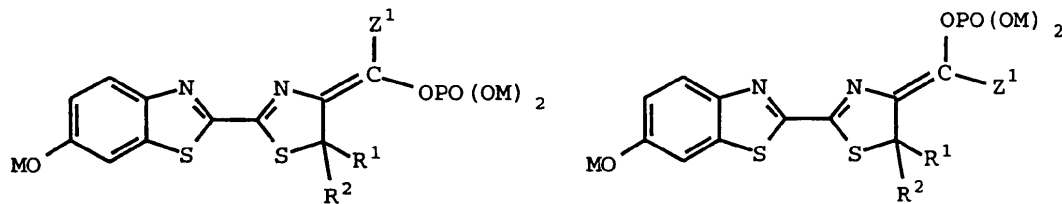
M が水素又はアルカリ金属イオンである化合物はその高い水溶性のために、中性からアルカリ性のpHの水溶液中での使用に好適である。そのような化合物は溶液中でイオン化するようなイオン性基を有しており、それ自体が溶液中でイオン化し、そして、緩衝塩を含む利用可能な反対の電荷のイオンと可逆的にイオン対をつくることがわかる。

50

【 0 0 2 3 】

式 I の化合物とフォスファターゼ酵素との反応によって赤色の化学発光が開始されるということは、二重結合異性体のいずれも、また、その二つの異性体のどのような割合の混合物も使用することができるということを意味する。ここで二重結合異性体とは環外の二重結合の一方の末端での置換基の交換によって形成される二つの幾何異性体をさす。

【 化 1 5 】



10

【 0 0 2 4 】

式 I ~ IV のいずれの化合物もフォスファターゼ酵素との反応によって赤色の化学発光を生成するのに有用である。式 I の化合物と酵素との反応は簡単に検出できる赤色の化学発光を生成する。反応がアルカリの pH で行われると光強度は室温で数分以内に最大レベルに到達する。反応は任意にエンハンサー (enhancer) の存在下で行われる。

【 0 0 2 5 】

本発明の方法で放射される光は適当な公知の手段によって検出することができるが、最も有利なのは CCD 又は赤色感受性フォトダイオードによる検出である。検出装置の選択はその応用及び費用を考慮して行われるであろうし、利便性及び永久的な記録の作成が求められるかどうかにも支配されるであろう。CCD に基づく検出器の赤色感受性は本発明の方法に従って生成される赤色の化学発光に最も有利である。CCD 画像化と酵素的な赤色化学発光の生成の組み合わせは、サザン、ノザン及びウェスタンブロットティングのようなブロットティング技術を使用するとき、核酸及び蛋白分析物の検出用の予期せぬ強力な道具となる。CCD カメラ画像システムによって画像化したときの検出感受性、信号強度及び持続性は他の商業的に使用されている化学発光フォスファターゼ基質の性能を越えることができる。

20

30

【 0 0 2 6 】

本発明の方法では、化合物 I が化学発光を生じさせるためにフォスファターゼ酵素と反応する。好ましい方法では、化合物 I はリン酸塩基を有しており、赤色の化学発光を生成させるための反応は pH 8 ~ 10 のアルカリ性緩衝液中で行われる。分析感度は以下に詳細に記載されるような様々な補助試薬を加えることで増大させることができる。酵素反応は 5 ~ 50 、好ましくは 20 ~ 40 で、pH 7 ~ 10.5、好ましくは 8.5 ~ 10 の水性緩衝溶液中で行われる。化合物 I は、1 μM ~ 20 mM の間、好ましくは 10 μM ~ 1 mM の間の濃度で使用される。

【 0 0 2 7 】

本発明の化学発光反応で有用なフォスファターゼ酵素は、E. coli 等の微生物源からのアルカリフォスファターゼ、動物アルカリフォスファターゼ、植物又は動物源からの酸フォスファターゼ、及び、そのような酵素の複合体を含む。

40

【 0 0 2 8 】

フォスファターゼ酵素と化学発光物質の反応混合物へのあるカチオン性芳香族化合物の導入は化学発光量を著しく増大させる。有効なカチオン性芳香族化合物のリストは公開された本出願人の PCT 出願 W097/26245 に記載されている。好ましい化合物には、ルシゲニン、ベーシックブルー 41、ベーシックブルー 66 及びメチレンブルーが含まれる。非イオン性界面活性剤は分析感度を改善するために本願の化学発光反応に添加剤として添加することができる。本発明のプラクティスにおいて有用な非イオン性界面活性剤には、例えば、ポリオキシエチレン化アルキルフェノール、ポリオキシエチレン化アルコール、ポリオ

50

キシエチレン化エーテル、ポリオキシエチレン化ソルビトールエステル及びポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレン共重合体が含まれる。

【0029】

米国特許第5,393,469号に開示されている重合体化合物を含む、第4級アンモニウム及びホスホニウム塩化合物のようなカチオン性界面活性剤はこの化学発光反応に関して使用することができる。例えば、ポリ(ビニルベンジルトリブチルホスホニウム)ポリマー等のポリ(ビニルベンジルトリアルキルホスホニウム)ポリマーがあげられる。

【0030】

本発明での反応は、便利には、酵素で被覆されたビーズ、チューブ、膜又はマイクロウェルプレート等の固体支持部材の表面に接触しうる水性緩衝液等の溶液中で行われる。好適な緩衝液はpHを約6～約10の間に維持できる、広く使用されている緩衝剤のいずれをも含み、例えば、フォスフェート、ボーレート、カーボネート、トリス(ヒドロキシメチルアミノ)メタン、グリシン、グルカミン(glucamine)、トリシン(tricine)、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(「221」)、ジエタノールアミン等がある。緩衝液は1つ以上の緩衝化合物の混合物を含むことができる。この点で、本発明の実施の好適な方法は特に意図された使用の要求によって決定される。

10

【0031】

この反応はフォスファターゼ酵素によって触媒されるために、検知可能な光を生成させるためには非常に少量の酵素で十分である。0.01アットモル(1×10^{-20} モル)での感度が達成されている。そのような少量の酵素の検知能力はこの化学発光技術を酵素結合アッセイを使用する多くのタイプの分析物の高感度分析に好適なものとする。

20

【0032】

本発明の化学発光方法の重要な用途は化学発光反応によるアッセイ手法における分析物の存在又はその量の検知である。その方法は分析物を含んでいると思われる試料を、試料中にフォスファターゼ酵素が存在しないならばそれと共に、本発明の化学発光化合物と接触させる工程を含み、定性的な方法では生成した光を検出し、もし定量が求められるなら、生成した光を分析物の量と関連づける工程が含まれる。光強度と分析物量の関係は既知の量の分析物を用いたカリブレーション曲線を構築することによって簡単に見いだすことができる。化学発光化合物は典型的には約 10^{-5} M～約 10^{-2} M、好ましくは、約 10^{-4} M～約 10^{-3} Mの濃度で使用される。酵素は、溶液中で検出されるときには、好ましくは約 10^{-9} M以下である。化学発光反応方法によって分析される典型的な試料は血液、血漿、血清、尿、精液、唾液、CSF等の体液や食品及び環境的な試料である。

30

【0033】

本発明の方法によって分析可能な分析物は、フォスファターゼ酵素(その場合は付加的な酵素を添加する必要はない)、フォスファターゼ阻害剤、及びフォスファターゼ酵素で直接又は間接に標識可能な様々な種類の有機及び生物学的分子を含む。酵素標識アッセイ及び酵素標識特異結合アッセイの技術及び形式は当該分野で広く知られている。本発明に従ってアッセイ(分析)を行う方法を例証するためにいくつかの例が以下に存在する。

【0034】

第1の典型的な方法では、フォスファターゼ酵素が分析物に標識として直接取り付けられる。第2の典型的な方法では、フォスファターゼ酵素が分析物に特異的に結合する親和性を有する化合物に取り付けられる。この化合物の例は分析物の酵素標識抗体である。第3の典型的な方法では、分析物に結合する化合物が、当該化合物に特異的に結合する少なくとも1つの酵素標識された物質に結合する。この方法での例には、分析物の標識されていない一次抗体に結合する酵素標識された二次抗体、又は、核酸分析物と相補的な標識されていない第1のオリゴヌクレオチドと1つ又はそれ以上の標識されたオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションが含まれる。第4の典型的な方法では、分析物に結合する化合物が少なくとも1つの第2の特異結合物質によって標識されうるが、それは当該第2の特異結合物質の酵素標識された結合パートナーと結合する。第4の方法の例は、アビジン標識された抗分析物抗体とビオチン-酵素複合体との反応である。

40

50

【0035】

上記したように、分析物自体が化学発光反応を触媒するために使用されるフォスファターゼ酵素であってもよい。そのようなアッセイ方法は本発明の化学発光反応によってもたされる速度及び感度のために、臨床上の検体の酵素レベルの検知に有用である。酵素アッセイを実施するための技術は周知である。ここに教示される例によって得られる指針によって、試料の調製、試薬の適当な量と比率の決定、反応時間、カリブレーション曲線の構築等の工程を変動させることは当業者の日常的な実験事項的な工夫としての能力の範囲内である。

【0036】

他の態様では、分析物は酵素阻害剤でありうる。試料中の酵素阻害剤を検知する方法は、その試料を適当な酵素と式 I の化合物とを接触させ、化学発光の特性を検知することを含む。阻害定数 K_i や阻害の半減期 $t_{1/2}$ 等の阻害剤の特徴や阻害剤の量の測定は、式 I の化合物への酵素の作用によって生成される光を、阻害剤の存在下で、並びに、阻害剤の不存在下で測定し、その結果を比較することによってなされる。阻害剤の存在は、光強度の低下、光強度の低い上昇率又は光放射開始までの時間の遅延、といった作用によって測定することができる。フォスファターゼの阻害剤には、無機フォスフェート及びレバミゾールが含まれる。

【0037】

別のタイプのアッセイでは、フォスファターゼ酵素が特異結合対の一つのメンバーに結合される。その例は、いわゆる酵素結合イムノソルベントアッセイ或いは E L I S A 等の化学発光酵素結合イムノアッセイである。そのようなアッセイは、通常、自動化マルチテストイムノアッセイシステムと同じ様に、マニュアルフォーマットで使用される。典型的なイムノアッセイでは、分析物であるハプテン、抗原又は抗体が、その分析物の酵素標識された特異結合パートナー又は分析物の酵素標識された類似体の存在又は量を検出することによって検定される。イムノアッセイの工程を実施するための様々なアッセイフォーマットは当業者に周知である。これらのアッセイは2つのカテゴリーに広く分類される。競合的アッセイは、分析物及び分析物類似体（例えば、検出可能に標識された分析物分子）と特定の抗体との免疫結合を特徴とする。サンドイッチアッセイは、分析物と、一方が検出可能に標識された二つの抗体の逐次又は同時の結合に帰着する。そこで形成された検出可能に標識された結合対は本発明の化合物及び方法によって検定される。検出可能な標識が酵素である場合、それは直接検出される。検出可能な標識が他の特異結合対のメンバー、例えば、ハプテン、の場合は、その結合パートナーと酵素の複合体がまず反応し、次に、その酵素が本発明の方法によって検出される。測定は、当該分野で広く使用されているビーズ、チューブ、マイクロウェル、磁気粒子、テストストリップ、膜及びフィルター等を含む固体の表面又は支持体に付着した酵素標識種を用いて行うことができる。酵素標識された検出可能な種は溶液中に存在してもよく、また、リボゾームのような有機的なアセンブリ中に含まれていてもよい（この場合は、リボゾームを溶解して酵素を検出可能とする溶解剤が使用される）。

【0038】

他の典型的な用途はウェスタンブロットング技術による蛋白の検出である。蛋白分析物を含む試料が電気泳動的に分離される。分離された蛋白は膜状にプロットされ、特異一次抗体及び当該一次抗体に親和性を有する酵素標識された二次抗体によってプローブされる。標識となる酵素は化学発光反応の触媒によって検出される（化学発光の発生は分析物である蛋白の存在を反映している）。酵素標識された一次抗体、ビオチニル化抗体及びアビジン - A P 等の使用といったこの技術についてのバリエーションは本発明の方法を使用して行うことができるアッセイの範囲に含まれる。

【0039】

本発明の検出方法の他の応用分野は酵素標識された核酸プローブを用いた核酸の検出である。酵素標識を使用した核酸の分析及び化学発光検出方法はよく確立された技術であり、溶液ハイブリダイゼーションアッセイ、サザンブロットングによる DNA 検出、ノザン

10

20

30

40

50

プロットによるRNA検出、DNAシーケンス法、DNAフィンガープリント法、コロニーハイブリダイゼーション及びブランクリフトを含む。酵素標識はプローブオリゴヌクレオチド又は捕捉オリゴヌクレオチドとの直接複合体として存在することができ、又は、公知の技術手法を用いて間接結合手段を介して組み込むことができる。間接結合手段の例はハプテン標識されたオリゴヌクレオチド及び抗ハプテン-酵素複合体、或いは、ビオチン化されたオリゴヌクレオチド及びアビジン-酵素複合体を含む。このような核酸アッセイはプロット膜上又は当該分野で公知のビーズ、チューブ、マイクロウェル、磁気粒子又はテストストリップを含む固体表面に付着したオリゴヌクレオチドを使用して溶液中で行うことができる。

【0040】

本発明に従って行われるアッセイ方法において有用な他の特異結合対は相補的なオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、ホルモン-受容体、レクチン-炭水化物、IgG-プロテインA、核酸-核酸結合蛋白、及び、核酸-抗核酸抗体を含む。

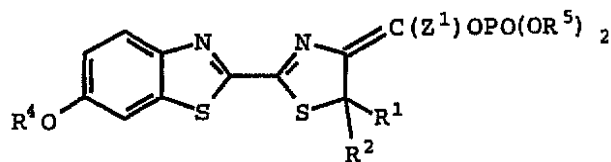
【0041】

他の側面からみれば、本発明は酵素との反応によって化学発光を生成する試薬組成物に関する。フォスファターゼとの反応によって化学発光を生成するために好ましい試薬組成物は約8~10の範囲のpHを有する水性緩衝液、0.001-10mM、好ましくは0.01-1mMの範囲の濃度の式Iの化合物であって、Z¹又はZ²基の一つとしてリン酸塩基を含む化合物、そして、0.001-10mM、好ましくは0.01-1mMの範囲の濃度のカチオン性芳香族化合物を含む。

【0042】

本発明の他の側面は、式Iの化合物の調製における合成中間体として有用な式Vの化合物を提供することである。

【化16】



V

式Vの化合物において、Z¹はOR³及びSR³から選択される基であり、R³は置換又は無置換アルキル基、置換又は無置換アリール基、及び、置換又は無置換アラルキル基から選択され、R¹及びR²は、別個に、水素原子、置換又は無置換アルキル基（この場合は一緒になって置換又は無置換シクロアルキル基を形成してもよい）、置換又は無置換アリール基、及び、置換又は無置換アラルキル基から選択され、そして、R⁴はトリアルキルシリル基、アルキルジアリールシリル基、アルキルカルボニル（例えばアセチル及びピバロイル）基及びアリールカルボニル（例えばベンゾイル）基から選択される保護基であり、R⁵の一つは置換アルキル、トリアルキルシリル、アルキルジアリールシリル及びアラルキル基から選択される保護基であり、他方のR⁵は置換アルキル、トリアルキルシリル、アルキルジアリールシリル及びアラルキル基又はアルカリ金属イオンから選択される基であり、R⁵基として使用可能な典型的な置換アルキル基は2-シアノエチル及び2-トリメチルシリルエチル基を含む。

【0043】

本発明の様々な側面をより十分に記述するために、下記に実施例が存在するが、これは本発明の範囲をどのように制限するものでもない。

【0044】

【実施例】

実施例1. 合成

下記の化合物が以下のように調製された。

10

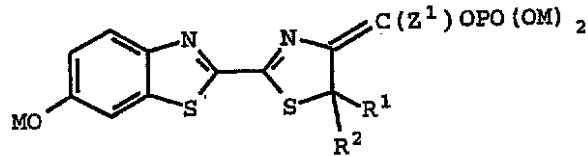
20

30

40

50

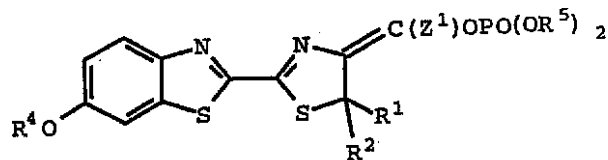
【化17】



化合物	Z ¹	R ¹ & R ²	M
1	Ph-O	H	Na
2	Ph-S	H	Na
3	4-ClC ₆ H ₄ -S	H	Na
4	Ph-S	CH ₃	Na
5	4-ClC ₆ H ₄ -S	CH ₃	Na
6	Np-S	CH ₃	Na

10

【化18】



化合物	Z ¹	R ¹ & R ²	R ⁴	R ⁵
7	Ph-O	H	Piv	CH ₂ CH ₂ CN
8	Ph-S	H	Piv	CH ₂ CH ₂ CN
9	4-ClC ₆ H ₄ -S	H	Piv	CH ₂ CH ₂ CN
10	Ph-S	CH ₃	Piv	CH ₂ CH ₂ CN
11	4-ClC ₆ H ₄ -S	CH ₃	Piv	CH ₂ CH ₂ CN
12	Np-S	CH ₃	Piv	CH ₂ CH ₂ CN
13	Ph-S	CH ₃	TBDPS	CH ₂ CH ₂ CN

20

30

pH = フェニル、4-ClC₆H₄-S = p-クロロフェニルチオ、Np = 2-ナフチル、Piv = ピバロイル (トリメチルアセチル)、TBDPS = t-ブチルジフェニルシリルである。

40

【0045】

化合物 1 - 13 の合成では、二つの異性体が生成しうる。二つの異性体が分離されたとき、それらは、シリカゲルクロマトグラフィにおいて溶出する順序に基づいて異性体 1 及び異性体 2 と称された。仮の立体化学アサイメントが実施例 20 に記載されている。

【0046】

実施例 2 . 化合物 5 及び 11 の合成

2 - シアノ - 6 - ピバロイルオキシベンゾチアゾール :

2 - シアノ - 6 - ヒドロキシベンゾチアゾール (2 . 1g、12 . 5mmol) の乾燥 THF の 30ml 溶液が不活性雰囲気下でピリジン (2 . 0g、25mmol) で処理され、次に、塩

50

化ピバロイル (1.95 g, 16.2 mmol) で処理された。この反応系は室温で15時間攪拌された。次に反応混合物は100 mlの蒸留水で希釈され、この溶液は酢酸エチル (4 × 50 ml) で抽出された。抽出された有機物は炭酸水素ナトリウム水溶液 (2 × 100 ml) 及び蒸留水 (1 × 100 ml) で洗浄され、次いで、 Na_2SO_4 上で乾燥され、減圧下で濃縮されて3.0 gの粘稠なオイルとされた。この物質はシリカゲルでクロマトグラフされ、10%の酢酸エチル/ヘキサンによって1.8 gの生成物が溶出した。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 1.39 (s, 9H); 7.34 - 7.38 (m, 1H); 7.74 - 7.75 (d, 1H); 8.20 - 8.23 (d, 1H)。

【0047】

2 - (6 - ピバロイルオキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 5, 5 - ジメチル - 2 - チアゾリン - 4 - カルボン酸:

2 - シアノ - 6 - ピバロイルオキシベンゾチアゾール (1.25 g, 4.8 mmol) が MeOH (30 ml, 無酸素) に溶解され、その溶液中にアルゴンを通じた。DL - ペニシラミン (0.789 g, 5 mmol) の15 ml水溶液と50 mgの炭酸ナトリウムにもアルゴンが5 ~ 10分通じられ、次に、それらは上記 MeOH 溶液に滴下された。滴下中、白色沈殿が反応混合物中に生成したが、さらに5 mlの MeOH を添加すると再溶解した。この薄い黄色の溶液には室温で45分間アルゴンが導入された。反応体積は半分に濃縮され、1:1の濃塩酸:タイプI水 (2 ml) によって酸性化された。白色沈殿物が生成し、酢酸エチル中に吸収された。この有機層は水で洗浄され、 Na_2SO_4 上で乾燥され、濃縮されて1.86 gの白色固体が生成した。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3COCD_3): 1.37 (s, 9H); 1.55 (s, 3H); 1.82 (s, 3H); 5.01 (s, 1H); 7.34 - 7.37 (dd, 1H); 7.92 (d, 1H); 8.09 - 8.13 (d, 1H)。

【0048】

p - クロロフェニル 2 - (6 - ピバロイルオキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 5, 5 - ジメチル - 2 - チアゾリン - 4 - チオカルボキシレート:

DCC (0.684 g, 3.3 mmol) が 2 - (6 - ピバロイルオキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 5, 5 - ジメチル - 2 - チアゾリン - 4 - チオカルボキシレート (1.0 g, 2.55 mmol) の乾燥 THF 30 ml 溶液に添加され、暗赤色の溶液が生成した。2 ~ 3分後、p - クロロチオフェノール (0.533 g, 3.8 mmol) が添加され、淡黄色溶液とされて2時間攪拌された。反応物は - 20 で1時間放置され、生成した白色沈殿物は濾過された。濾液は乾燥状態になるまで濃縮され、粗生成物はシリカゲルにて30%の CH_2Cl_2 /ヘキサンを用いてクロマトグラフされ、360 mgの生成物を得た。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3COCD_3): 1.37 (s, 9H); 1.54 (s, 3H); 1.83 (s, 3H); 5.15 (s, 1H); 7.37 - 7.55 (m, 5H); 7.96 - 7.97 (d, 1H); 8.14 - 8.17 (d, 1H)。

【0049】

化合物 11:

ジイソプロピルアミン 0.136 ml (0.97 mmol) 及び10 mlの乾燥 THF がシリンジを介して、不活性雰囲気下にある、漏斗を備えた100 mlの三つ首丸底フラスコ中に添加された。溶液は - 78 に冷却され、その温度で n - ブチルリチウム (0.39 ml, 0.97 mmol) がシリンジを介して添加され、反応物は15分間攪拌された。前工程からのチオエステル (0.36 g, 0.69 mmol) の12 ml THF 溶液が反応混合物に10分間わたって添加され、反応物である暗赤色溶液は - 78 で1時間攪拌された。乾燥 THF 0.5 ml、ピリジン (0.8 ml) 及び POCl_3 (0.113 ml, 1 mmol) の溶液が冷却された前記溶液に滴下され、混合物は - 78 で30分間攪拌された。反応混合物は室温へ戻された。室温で1時間攪拌した後、2 - ヒドロキシプロピオニトリル (0.331 ml, 4.8 mmol) が添加され、反応物は2.5時間攪拌された。反応溶液は - 20 で一晩保管された。沈殿は濾過によって収集され、THFによって洗浄されて廃棄された。濾液は濃縮されて得られた物質は酢酸エチルに吸収させて水で洗浄された。この有機層は乾燥及び濃縮され、粗生成物はシリカゲルのカラムでクロマトグラフされた。異性体 1 は 50 %

酢酸エチル/ヘキサンで溶出し、収量は65.3mgであった。異性体2は70%酢酸エチル/ヘキサンで溶出し、収量は51mgであった。

【0050】

異性体1：¹H NMR (CDCl₃)： 1.39 (s, 9H)；1.99 (s, 6H)；2.74 - 2.78 (t, 4H)；4.30 - 4.36 (m, 4H)；7.25 - 8.14 (m, 7H)。³¹P NMR (CDCl₃)： -9.82 ~ -9.55。

異性体2：¹H NMR (CDCl₃)： 1.39 (s, 9H)；1.95 (s, 6H)；2.74 - 2.78 (m, 4H)；4.26 - 4.47 (m, 4H)；7.215 - 8.10 (m, 7H)。³¹P NMR (CDCl₃)： -9.44 ~ -9.17。

【0051】

化合物5 (異性体1)：

6mlのアセトン中の化合物11の異性体1の65.3mg (93 μmol)が氷浴中で0 に冷却され、アルゴンが導入された。この溶液に1Nの水酸化ナトリウム水溶液296 μl (0.29mmol)と296 μlの水が添加された。前記塩基を添加すると反応混合物の色は暗赤色に変化し、更に、1時間の攪拌によって徐々にオレンジに変化した。1時間後、溶液中に沈殿が生成した。反応混合物は室温で18時間攪拌に供された。次に、反応混合物は遠心分離され、アセトンで洗浄され、再度遠心分離され、乾燥されて49mgのオレンジ色の固体を得た(96%)。¹H NMR (D₂O)： 1.86 (s, 6H)；6.85 - 6.89 (dd, 1H)；7.06 - 7.07 (d, 1H)；7.34 (s, 4H)；7.72 - 7.75 (d, 1H)。³¹P NMR (D₂O)：0.404。

【0052】

化合物5 (異性体2)：

5mlのアセトン中の化合物11の異性体2の51mg (92 μmol)が1Nの水酸化ナトリウム水溶液232 μl (0.23mmol)と250 μlの水と同様に反応させられ、34mgのオレンジ色の固体を得た(81%)。¹H NMR (D₂O)： 1.89 (s, 6H)；6.82 - 6.86 (dd, 1H)；7.00 (d, 1H)；7.26 - 7.45 (dd, 4H)；7.64 - 7.67 (d, 1H)。³¹P NMR (D₂O)：0.107。

【0053】

実施例3. 化合物2及び8の合成

2 - (6 - ピバロイルオキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 2 - チアゾリン - 4 - カルボン酸：

2 - シアノ - 6 - ピバロイルオキシベンゾチアゾール (1.35g, 5mmol)が30mlのMeOHに溶解され、溶液にはアルゴンを通じられた。システイン (0.629g, 5.7mmol)が7mlの水に溶解され、炭酸ナトリウムによって溶液のpHは8に調整された。この水溶液はアルゴンで飽和され、上記MeOH溶液に滴下されて添加された。得られた薄い黄色の溶液には室温で30分間、アルゴンを通じられた。反応物は0 に冷却され、1：1の濃塩酸：タイプI水 (1ml)によって酸性化された。溶液は酢酸エチルで希釈され、20mlの体積まで濃縮され、酢酸エチルで抽出 (3 × 50ml)された。得られた有機物は水で洗浄され、Na₂SO₄上で乾燥され、濃縮されて1.96gの白色固体を得た。¹H NMR (CD₃COCD₃)： 1.37 (s, 9H)；3.82 - 3.86 (dd, 2H)；5.49 (t, 1H)；7.35 - 7.38 (dd, 1H)；7.92 - 7.93 (d, 1H)；8.11 - 8.14 (d, 1H)。

【0054】

フェニル 2 - (6 - ピバロイルオキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 2 - チアゾリン - 4 - チオカルボキシレート：

DCC (0.736g, 3.5mmol)が、先程のカルボン酸 (1.0g, 2.7mmol)の乾燥THF溶液20mlに添加され、暗赤色の溶液を得た。チオフェノール (0.423ml, 4mmol)が添加されて淡黄色溶液が生成し、2時間攪拌された。副成生物である白色尿素を濾過で収集し、THFで洗浄して廃棄した。濾液は減圧下で10mlの体積へ濃縮された。粗生成物は4mlのヘキサンで希釈されて-20 で18時間保管した。さらなる尿素副

10

20

30

40

50

成生物は除去されて濾液はヘキサンで数回洗浄された。ヘキサン洗浄物は濃縮され、生成物はシリカゲル上でクロマトグラフされ、30% CH_2Cl_2 / ヘキサン、その次に、20% 酢酸エチル (ヘキサン中) によって溶出されて124mgの生成物を得た。残存する濾液層もシリカゲル上で同様にクロマトグラフされて、生成物がプール (660mg) された。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3COCD_3) : 1.38 (s, 9H) ; 3.82 - 3.97 (m, 2H) ; 5.77 - 5.83 (m, 1H) ; 7.38 - 7.46 (m, 6H) ; 7.97 - 7.98 (d, 1H) ; 8.15 - 8.18 (d, 1H)。

【0055】

化合物8 :

不活性雰囲気下にあるジイソプロピルアミン (132 μl 、0.94 mmol) の乾燥 THF 5 ml 溶液が -78 に冷却され、n-ブチルリチウム (376 μl 、0.94 mmol) がシリンジを介して添加された。反応物が15分間冷却された後、チオエステル (330 mg、0.72 mmol) の THF 溶液 10 ml が反応混合物に滴下されて添加された。生成した暗赤色の溶液は -78 で50分間攪拌された。ピリジン (0.58 ml、7.2 mol) の溶液と、乾燥 THF 2 ml 中の POCl_3 (118 μl 、1.2 mmol) が冷却された上記溶液に滴下され、混合物は -78 で更に45分間攪拌された。そして、冷却浴は除去されて反応混合物は室温へ戻されたが、その間に、反応混合物は暗赤色からオレンジ色へ変化した。反応物は氷浴中で短時間冷却され、2-ヒドロキシプロピオニトリル (360 mg、5 mmol) が反応物に注入され、次いで、300 μl のピリジンが注入された。反応物は室温で18時間攪拌された。沈殿物は濾過によって収集され、THFで洗浄されて廃棄された。濾液は減圧下で濃縮し、残渣は酢酸エチルに吸収させて水で洗浄された (2 x 50 ml)。有機層は乾燥及び濃縮されて、粗生成物はシリカゲルのカラムに担持された。カラムからは75~80%の酢酸エチル/ヘキサンによって二つの異性体が溶出した。異性体1及び2は分取 (prep.) TLCによってそれぞれ純化され、異性体1は60%の酢酸エチル/ヘキサンで溶出し、5mgが得られた。異性体2は75%の酢酸エチル/ヘキサンで溶出し、9mgが得られた。

【0056】

異性体1 : $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 1.39 (s, 9H) ; 2.77 (t, 4H) ; 4.33 - 4.45 (m, 6H) ; 7.26 - 7.48 (m, 6H) ; 7.69 - 7.70 (d, 1H) ; 8.13 - 8.16 (d, 1H)。 $^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3) : -9.67 ~ (-9.39)。

異性体2 : $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 1.39 (s, 9H) ; 2.67 - 2.76 (m, 4H) ; 4.20 - 4.30 (m, 4H) ; 4.55 - 4.57 (d, 2H) ; 7.32 - 7.49 (m, 6H) ; 7.66 - 7.67 (d, 1H) ; 8.11 - 8.15 (d, 1H)。 $^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3) : -9.56 ~ (-9.32)。

【0057】

化合物2 (異性体1) :

5 ml のアセトン中の4.5 mg の化合物8 (異性体1、7.0 μmol) が氷浴中で0 に冷却され、アルゴンが通じられた。この溶液に、0.2 N の水酸化ナトリウム水溶液 112 μl (22 μmol) 及び112 μl の水が添加された。反応混合物の色は塩基の添加によって暗赤色に変化し、攪拌によって徐々にオレンジ色となった。反応混合物は室温でアルゴン下、18時間攪拌された。反応混合物中に沈殿が見られたので、沈殿を動かさずに溶液を移し、残った固体物質はアセトンで洗浄され、遠心分離され、乾燥されて2.5 mg の固体とされた。 $^1\text{H NMR}$ (D_2O) : 4.25 (d, 2H) ; 6.85 - 7.75 (m, 8H)。

【0058】

化合物2 (異性体2) :

5 ml のアセトン中の9 mg の化合物8 (異性体2、14 μmol) が0.2 N の水酸化ナトリウム水溶液 224 μl (45 μmol) 及び225 μl の水と同様に反応させられ、6.4 mg の固体を得た。 $^1\text{H NMR}$ (D_2O) : 4.50 - 4.52 (d, 2H) ; 6.82 - 7

. 7 2 (m , 8 H) 。

【 0 0 5 9 】

実施例 4 . 化合物 4 及び 1 3 の合成

2 - シアノ - 6 - t - ブチルジフェニルシロキシ - ベンゾチアゾール :

2 - シアノ - 6 - ヒドロキシベンゾチアゾール (5 . 0 g , 2 8 mmol) の 1 0 0 ml の無水 DMF 溶液が不活性雰囲気下で 2 . 9 g のイミダゾール (4 . 2 mmol) 、続いて、 t - ブチルジフェニルクロロシラン (9 . 3 4 g , 3 4 mmol) によって処理された。反応物は室温で 3 時間攪拌されて、次に 2 0 0 ml の酢酸エチルで希釈され、水で洗浄された (4 × 4 0 0 ml) 。有機層は硫酸ナトリウム上で乾燥され、減圧下で濃縮された。粗生成物はカラムクロマトグラフィによって純化され、5 - 1 0 % の酢酸エチル / ヘキサンで溶出されて、収量で 1 0 % 以下のシリル不純物を含む目的物を 1 3 . 0 g 得た。目的物は更なる純化を必要としなかった。¹H NMR (C D C l ₃) : 1 . 1 2 (s , 9 H) ; 7 . 1 3 - 7 . 4 6 (m , 8 H) ; 7 . 7 0 - 7 . 7 2 (m , 4 H) ; 7 . 9 2 - 7 . 9 5 (d , 1 H) 。

10

【 0 0 6 0 】

2 - (6 - t - ブチルジフェニルシロキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 5 , 5 - ジメチル - 2 - チアゾリン - 4 - カルボン酸 :

2 - シアノ - 6 - t - ブチルジフェニルシロキシベンゾチアゾール (1 3 . 0 g , 3 1 mmol) が三つ首丸底フラスコ中の MeOH (5 0 0 ml , 酸素なし) に溶解され、この溶液にアルゴンが通じられた。DL - ペニシラミン (4 . 9 g , 3 3 mmol) が 9 0 ml の水に溶解され、炭酸ナトリウムによってこの溶液の pH は 8 に調整された。この水性溶液はアルゴンで飽和させられ、上記 MeOH 溶液に滴下されて添加された。反応物には室温で 1 . 5 時間にわたってアルゴンが導入された。反応中に生成した粘性沈殿物は MeOH を 1 5 ml 加えて再溶解させられた。反応物は濃縮されて MeOH の大部分が除去され、残った水性溶液は濃塩酸 : タイプ I の水 = 1 : 1 (6 ml) によって酸性化された。生成した白色沈殿は 3 5 0 ml の酢酸エチル中に抽出された。有機層は水で洗浄され (4 × 2 0 0 ml) 、硫酸ナトリウム上で乾燥され、濃縮されて、1 0 % のシリル不純物を含む目的物を 1 6 . 0 g 得た (9 4 %) 。目的物は更なる純化を要することなく採用された。

20

【 0 0 6 1 】

フェニル 2 - (6 - t - ブチルジフェニルシロキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 5 , 5 - ジメチル - 2 - チアゾリン - 4 - チオカルボキシレート :

DCC (0 . 6 3 5 g , 3 mmol) が上記カルボン酸 (1 . 3 g , 2 . 4 mmol) の乾燥 THF 3 0 ml 溶液に添加された。チオフェノール (0 . 4 6 8 g , 4 . 3 mmol) が添加され、反応物は 2 時間攪拌された。副生成物である白色尿素は収集され、濾過され、そして廃棄された。濾液は減圧下で濃縮されて粘性液体とされ、シリカゲル上でクロマトグラフされ、そこでは過剰のチオフェノールを除去するために 5 % 酢酸エチル / ヘキサンで溶出を行い、次に、1 0 - 1 5 % の酢酸エチル / ヘキサンで溶出を行って、0 . 3 8 g の目的物を得た (2 4 %) 。¹H NMR (C D C l ₃) : 1 . 1 3 (s , 9 H) ; 1 . 5 3 (s , 3 H) ; 1 . 7 9 (s , 3 H) ; 4 . 8 7 (s , 1 H) ; 6 . 9 9 - 7 . 0 4 (m , 1 H) ; 7 . 2 2 - 7 . 2 3 (d , 1 H) ; 7 . 3 2 - 7 . 4 3 (m , 1 1 H) ; 7 . 7 0 - 7 . 7 4 (m , 4 H) ; 7 . 8 5 - 7 . 8 8 (d , 1 H) 。

30

40

【 0 0 6 2 】

上記チオエステルの別の合成法 :

カルボニルジイミダゾール (1 . 9 2 g , 1 2 mmol) が上記カルボン酸 (5 . 0 g , 9 . 1 mmol) の乾燥 C H ₃ C N 溶液に不活性雰囲気下で添加された。2 分の攪拌後、チオフェノール (1 . 2 g , 0 . 0 1 mol) が添加され、反応物は 1 時間攪拌された。減圧下で溶媒が除去され、粗固体はシリカゲル上でクロマトグラフされ、そこでは過剰のチオフェノールを除去するために 5 % 酢酸エチル / ヘキサンで溶出が行われ、次いで、1 2 % 酢酸エチル / ヘキサンで溶出が行われ、1 . 9 g の目的物を得た (3 2 %) 。

【 0 0 6 3 】

50

化合物 13 :

ジイソプロピルアミン 0.73 ml (5 mmol) がシリンジを介して 50 ml の乾燥 THF にアルゴン雰囲気下で添加された。溶液は -78 に冷却され、n-ブチルリチウム (2.0 ml, 5 mmol) がシリンジを介して添加された。反応物は 20 分間冷却された後、前記チオエステル (2.5 g, 3.9 mmol) の乾燥 THF 50 ml 溶液が、当該反応物に滴下漏斗を介して添加された。溶液は -78 で 1 時間攪拌された。ピリジン (3.0 g, 38 mmol) と POCl_3 (0.6 ml, 6.2 mmol) が滴下漏斗に装填され、その混合物は冷却された前記溶液に滴下された。溶液は -78 で 15 分間攪拌され、その後、氷浴は外され、反応混合物は室温に戻されて 1 時間攪拌された。ヒドロキシプロピオニトリル (2.8 g, 39 mmol) が反応物に注入され、当該反応物は室温で 4 時間攪拌されて 4 で 15 時間保管された。反応混合物は減圧下で濃縮され、残存物は 100 ml の酢酸エチルに抽出され、水で洗浄された。有機層は乾燥され、減圧下で濃縮され、粗生成物 (3 g) はカラムクロマトグラフィで 10 - 85 % 酢酸エチル / ヘキサンで溶出されて純化され、0.38 g の異性体 1 と 0.92 g の異性体 2 を得た。

10

【0064】

異性体 1 : $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 1.12 (s, 9H) ; 1.98 (s, 6H) ; 2.65 - 2.69 (t, 4H) ; 4.19 - 4.38 (m, 4H) ; 6.98 - 7.02 (m, 1H) ; 7.24 - 7.43 (m, 12H) ; 7.71 - 7.74 (m, 4H) ; 7.83 - 7.86 (d, 1H)。 $^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3) : -10.13 ~ (-9.85)。

20

異性体 2 : $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 1.12 (s, 9H) ; 1.95 (s, 6H) ; 2.64 - 2.69 (m, 4H) ; 4.19 - 4.35 (m, 4H) ; 6.97 - 7.00 (m, 1H) ; 7.15 - 7.43 (m, 12H) ; 7.69 - 7.72 (m, 4H) ; 7.80 - 7.83 (d, 1H)。 $^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3) : -9.71 ~ (-9.45)。

【0065】

化合物 4 (異性体 1) :

化合物 13 (異性体 1 ; 0.15 g, 0.18 mmol) の 8 ml アセトン溶液にアルゴンが通じられた。この溶液に、0.675 N 水酸化ナトリウムの水溶液 800 μl (0.54 mmol) が添加された。反応混合物はアルゴン下で 18 時間、室温で攪拌された。反応混合物中に沈殿がみられたので、沈殿を動かさないように溶媒が移され、残った固体物質は 5 ml のアセトンで摩砕された (trituated)。この固体は濾過によって収集され、更にアセトンで洗浄され、乾燥されて 100 mg の固体を得た。 $^1\text{H NMR}$ (D_2O) : 1.88 (s, 6H) ; 6.85 - 6.89 (m, 1H) ; 7.06 - 7.07 (d, 1H) ; 7.22 - 7.24 (t, 1H) ; 7.33 - 7.38 (m, 4H) ; 7.72 - 7.75 (d, 1H)。 $^{31}\text{P NMR}$ (D_2O) : 0.38。

30

【0066】

化合物 4 (異性体 2) :

化合物 13 (異性体 2 ; 0.21 g, 0.26 mmol) の 8 ml アセトン溶液が 0.75 N 水酸化ナトリウムの水溶液 1.0 ml (0.76 mmol) と同様に反応させられ、120 mg の目的物を得た。 $^1\text{H NMR}$ (D_2O) : 1.90 (s, 6H) ; 6.80 - 6.83 (d, 1H) ; 6.97 (s, 1H) ; 7.14 - 7.17 (t, 1H) ; 7.26 - 7.31 (t, 2H) ; 7.46 - 7.48 (d, 2H) ; 7.63 - 7.66 (d, 1H)。 $^{31}\text{P NMR}$ (D_2O) : 0.07。

40

【0067】

実施例 5 . 化合物 6 及び 12 の合成

カルボニルジイミダゾール (0.537 g, 3.3 mmol) が 2 - (6 - ピパロイルオキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 5 , 5 - ジメチル - 2 - チアゾリン - 4 - カルボン酸 (1.0 g, 2.6 mmol) の CH_3CN 30 ml 溶液に添加され、暗赤色の溶液とされた。チオナフトール (0.654 g, 4 mmol) が添加され、薄いオレンジ色の溶液が形成された。溶

50

液は沈殿と粘性を有していたので、 CH_3CN が30ml更に反応物に添加された。20分後、反応混合物は濾過されて0.8gの白色粉体($^1\text{H NMR}$ によって純粋な目的物であると分かった)を得た。濾液は濃縮されてシリカゲル上でクロマトグラフされ、そこでは5%酢酸エチル/ヘキサンを使用した溶出によって更に0.53gのチオエステルを得た(全量1.33g、98%)。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3COCD_3): 1.38(s、9H); 1.59(s、3H); 1.84(s、3H); 5.18(s、1H); 7.38-7.62(m、4H); 7.97-8.18(m、6H)。

【0068】

化合物12:

ジイソプロピルアミン169 μl (1.2mmol)がシリンジを介して不活性雰囲気下で10mlの乾燥THFに添加された。この溶液は-78に冷却され、*n*-ブチルリチウム(482 μl 、 $1.2 \times 10^{-3}\text{mol}$)がシリンジを介して添加された。反応物を15分間冷却した後、上記チオエステル(460mg、0.86mmol)の14mlのTHF溶液が当該反応混合物にシリンジを介して滴下されて添加された。暗赤色の溶液は-78で1時間搅拌された。ピリジン(1.0ml、12.9mmol)と POCl_3 (140 μl 、1.46mmol)の乾燥THF0.7ml溶液がシリンジを介して滴下されて添加され、混合物は-78で35分間搅拌された。反応混合物は1時間かけて室温へ戻され、その間に反応混合物は暗赤色から黄色へ変色した。反応物は氷浴中で短時間冷却され、2-ヒドロキシプロピオニトリル(550 μl 、8mmol)が反応物に注入され、氷上で20分間搅拌され、そして、室温で一晩搅拌された。沈殿物は濾過によって収集され、THFで洗浄され、廃棄された。濾液は濃縮されて最終生成物は酢酸エチルに抽出され、水で洗浄された(3 \times 30ml)。有機層は乾燥・濃縮され粗生成物はシリカゲル上でクロマトグラフされた。異性体1(106mg)は50%酢酸エチル/ヘキサンの溶出された。異性体2(100mg)は70%酢酸エチル/ヘキサンで溶出され、次いで、分取TLCによって純化された。

【0069】

異性体1: $^1\text{H NMR}$ (CD_3COCD_3): 1.37(s、9H); 2.07(s、6H); 2.86-2.90(t、4H); 4.28-4.48(m、4H); 7.37-8.17(m、10H)。 $^{31}\text{P NMR}$ (CD_3COCD_3): -3.87~(-3.61)。

異性体2: $^1\text{H NMR}$ (CD_3COCD_3): 1.36(s、9H); 2.07(s、6H); 2.89-2.94(t、4H); 4.37-4.48(m、4H); 7.32-8.10(m、10H)。 $^{31}\text{P NMR}$ (CD_3COCD_3): -3.87~(-3.62)。

【0070】

化合物6(異性体1):

化合物12(異性体1; 105mg、0.14mmol)の6mlアセトン溶液にアルゴンが通じられた。この溶液に2N水酸化ナトリウム228 μl (0.45mmol)及び水250 μl が添加された。反応混合物の色は塩基の添加によって暗赤色に変化した。反応混合物はアルゴン下、室温で16時間搅拌された。反応混合物中に沈殿がみられたので、沈殿が動かないように溶媒が移され、残った固形物はアセトンで洗浄(2 \times 1.5ml)され、遠心分離され、乾燥されて86mgの固体を得た。 $^1\text{H NMR}$ (D_2O): 1.87(s、6H); 6.85-7.87(m、10H)。 $^{31}\text{P NMR}$ (D_2O): 0.425。

【0071】

化合物6(異性体2):

化合物12(異性体2; 96mg、0.13mmol)の6mlアセトン溶液が異性体1の場合と同様に2NNaOH水溶液213 μl 及び水250 μl と反応させられ、化合物6の異性体2を70mg得た。 $^1\text{H NMR}$ (D_2O): 1.91(s、6H); 6.75-6.82(m、2H); 7.32-7.84(m、7H); 7.96(s、1H)。 $^{31}\text{P NMR}$ (D_2O): 0.156。

【0072】

10

20

30

40

50

実施例 6 . 化合物 1 及び 7 の合成

DCC (0.736g、3.5mmol) が 2 - (6 - ピバロイルオキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 2 - チアゾリン - 4 - カルボン酸 (1.0g、2.7mmol) の乾燥 THF 30ml 溶液に添加され、暗赤色の溶液とされた。フェノール (0.335mg、3.5mmol) が添加され、反応混合物は 1 時間攪拌された。副生成物である白色尿素が濾過によって収集され、THF で洗浄され、廃棄された。濾液は 4 で一晩保存された。更なる副生成物の尿素が濾過によって除去された。濾液は濃縮され、30% CH₂Cl₂ / ヘキサン中のシリカゲルのカラム上でクロマトグラフされた。ここでは、30 - 75% CH₂Cl₂ / ヘキサンで溶出が行われ、過剰のフェノールを除去するために最終的にはほぼ CH₂Cl₂ だけで溶出が行われ、そして、次に 5% 酢酸エチル / CH₂Cl₂ で溶出が行われて生成混合物を得た。これらは分取 TLC プレートで更に純化されて、20% の酢酸エチル / ヘキサンで溶出されて 140mg の目的物を得た。¹H NMR (CD₃COCD₃): 1.37 (s、9H); 3.99 - 4.02 (d、2H); 5.79 (t、1H); 7.22 - 7.48 (m、6H); 7.94 (d、1H); 8.14 - 8.16 (d、1H)。

【0073】

化合物 7 :

アルゴン下のジイソプロピルアミン 65.4 μl (0.46mmol) の乾燥 THF 5ml 溶液が -78 に冷却されて n - ブチルリチウム (187 μl、0.46mmol) がシリンジを介して添加された。15 分後、上記フェニルエステル (140mg、0.33mmol) の THF 10ml 溶液がシリンジを介して滴下されて添加された。暗赤色の溶液は -78 で 1 時間攪拌された。ピリジン (500 μl、6.1mmol) 及び POCl₃ (54.2 μl、0.5mmol) の乾燥 THF 1ml 溶液がシリンジを介して滴下されて添加され、混合物は -78 で 45 分攪拌された。反応混合物は 45 分かけて室温に戻された。反応物は短時間氷浴で冷却され、2 - ヒドロキシプロピオニトリル (166mg、23mmol) が反応物に注入され、当該反応物は室温で 18 時間攪拌された。反応混合物は減圧下で濃縮され、残渣はシリカゲル上で 50% 酢酸エチル / ヘキサンを用いてクロマトグラフされ、2 つの異性体に分離された。異性体 1 を含むフラグションは酢酸エチルに抽出され、水で洗浄され乾燥・濃縮された。異性体 1 は分取 TLC で、60% 酢酸エチル / ヘキサンで溶出されて 1mg に純化された。異性体 2 は異性体 1 との混合物としてフラクション中に得られた。

異性体 1 : ¹H NMR (CDCl₃): 1.39 (s、9H); 2.75 (m、4H); 4.25 - 4.27 (d、2H); 4.33 - 4.38 (m、4H); 7.18 - 8.15 (m、8H)。

【0074】

化合物 1 :

化合物 7 が、実施例 3 の手法を用いて、ピバレート (pivalate) 基及びシアノエチル保護基のアルカリ加水分解によって化合物 1 に変換される。

【0075】

実施例 7 . 化合物 3 及び 9 の合成

2 - (6 - ピバロイルオキシ - 2 - ベンゾチアゾリル) - 2 - チアゾリン - 4 - カルボン酸 :

DL - システイン (0.84g、6.9mmol) が pH 8 の酸素なし炭酸ナトリウム溶液 30ml に溶解された。システインが完全に溶解すると、pH は炭酸ナトリウムを添加して再度 8 に調整された。アルゴンが溶液に 5 ~ 10 分通され、その後、2 - シアノ - 6 - ピバロイルオキシベンゾチアゾール (1.8g、6.9mmol) の MeOH (100ml、酸素なし) 溶液が当該溶液に添加された。反応物には室温で 35 ~ 40 分アルゴンが通され、時々、振り動かした。そして、反応混合物は 0.5ml の濃塩酸と 0.5ml の水の溶液で酸性化された。溶液は酢酸エチルですぐに抽出 (3 × 50ml) され、有機物は水で洗浄され、Na₂SO₄ で乾燥され濃縮されて粘性の赤色液体となった。この液体を 4 で一晩放置させて固化を行い、2.0g のオレンジ - ピンク色の固体を得た。¹H NMR (CD₃COCD₃): 1.37 (s、9H); 3.83 - 3.86 (d、2H); 5.47 - 5.5

10

20

30

40

50

3 (t, 1H); 7.35 - 7.39 (m, 1H); 7.92 - 7.93 (d, 1H); 8.12 - 8.15 (d, 1H)。

【0076】

p-クロロフェニル 2-(6-ピバロイルオキシ-2-ベンゾチアゾリル)-²-チアゾリン-4-チオカルボキシレート:

DCC (1.44g, 7mmol) が 2-(6-ピバロイルオキシ-2-ベンゾチアゾリル)-²-チアゾリン-4-カルボン酸 (2.0g, 5.4mmol) の無水THF 35ml 溶液に添加され、暗赤色の溶液とされた。2~3分後、p-クロロチオフェノール (1.58g, 10mmol) が添加されて淡黄色の溶液とされて2時間攪拌された。反応物は-4で1時間放置され、生成した白色沈殿 (副生成物である尿素) は収集され、THFで洗浄 (2 × 10ml) されて廃棄された。濾液は減圧下で濃縮・乾燥され、粗固体はp-クロロチオフェノールを除去するためにヘキサンで洗浄 (3 × 50ml) された。残った固体は真空下で乾燥されて1.4gの純粋な目的物を得た。¹H NMR (CDCl₃): 1.39 (s, 9H); 3.79 - 3.84 (m, 2H); 5.55 - 5.60 (m, 1H); 7.25 - 7.28 (m, 1H); 7.34 - 7.39 (m, 4H); 7.71 - 7.72 (d, 1H); 8.15 - 8.18 (d, 1H)。

10

【0077】

化合物9:

ジイソプロピルアミン (0.266ml, 1.8mmol) 及び25mlの無水THFが不活性雰囲気下におかれた。この溶液は-70に冷却され、n-ブチルリチウム (0.72ml, 1.8mmol) がシリンジを介して添加され、反応物は15分攪拌された。上記チオエステル (0.7g, 1.4mmol) の10ml THF 溶液が反応混合物に10分かけて添加され、生成した暗赤色溶液が-70で1時間攪拌された。無水THF (2ml) がこの冷却された溶液に添加漏斗を介して添加され、次いで、ピリジン (1.1ml, 14mmol) 及びPOCl₃ (0.216ml, 2.2mmol) が同様に添加されて、混合物は-70で20分攪拌された。氷浴が除去され反応混合物は室温へ戻された。室温で40分攪拌後、2-ヒドロキシプロピオニトリル (1.0g, 14mmol) が反応物に注入され、反応物は3時間攪拌された。反応物は100mlの酢酸エチルで希釈され、タイプIの水で洗浄 (3 × 80ml) された。有機層はNa₂SO₄上で乾燥され、濃縮されて700mgの粘性液体とされた。分取TLC (70%酢酸エチル/ヘキサンで溶出) による70mgの粗生成物の純化により、15mgの純粋な目的物を得た。¹H NMR (CDCl₃): 1.39 (s, 9H); 2.74 - 2.78 (t, 4H); 4.28 - 4.36 (m, 4H); 4.53 - 4.55 (d, 2H); 7.23 - 7.24 (d, 1H); 7.32 - 7.35 (d, 2H); 7.43 - 7.46 (d, 2H); 7.67 - 7.68 (d, 1H); 8.12 - 8.15 (d, 1H)。

20

30

【0078】

化合物3:

実施例3の手法を用いて、ピバレート基及びシアノエチル保護基のアルカリ加水分解によって化合物9は化合物3へ転換される。

【0079】

実施例8. 化合物10の合成

カルボニルジイミダゾール (2.1g, 13mmol) が 2-(6-ピバロイルオキシ-2-ベンゾチアゾリル)-5,5-ジメチル-²-チアゾリン-4-カルボン酸 (5.0g, 13mmol) と100mlのCH₃CNの混合物に添加された。チオフェノール (1.54g, 14mmol) が添加され、溶液は1時間攪拌された。反応混合物は濾過され、濾液は4に冷却されてチオエステル生成物を結晶化させた。生成物はヘキサンで洗浄され、乾燥されて3.8gの目的物を得た。¹H NMR (CDCl₃): 1.40 (s, 9H); 1.58 (s, 3H); 1.85 (s, 3H); 4.94 (s, 1H); 7.24 - 7.28 (m, 1H); 7.45 (m, 5H); 7.70 - 7.71 (d, 1H); 8.13 - 8.16 (d, 1H)。

40

50

【0080】

化合物10:

ジイソプロピルアミン 1.35 ml (9.4 mmol) の乾燥 THF 50 ml 溶液が不活性雰囲気下におかれた。この溶液は -78 に冷却され、n-ブチルリチウム (3.76 ml、9.4 mmol) がシリンジを介して添加された。20分後、上記チオエステル (3.5g、7.2 mmol) の 50 ml THF 溶液が反応混合物に滴下されて添加された。暗赤色の溶液は -78 で1時間攪拌された。ピリジン (5.6g、7.2 mmol) 及び POC_l₃ (1.1 ml、1.1 mmol) の乾燥 THF 溶液が滴下され、混合物は -78 で15分、そして、室温で1時間攪拌された。2-ヒドロキシプロピオニトリル (5.1g、7.2 mmol) が反応物に注入され、室温で一晩攪拌が継続された。混合物は減圧下で濃縮され、残渣は200 mlの酢酸エチルに抽出され、水で洗浄 (3 × 30 ml) された。有機層は乾燥・濃縮されて、粗生成物はシリカゲルカラム上でクロマトグラフされた。異性体1 (900 mg) と異性体2 (1.1g) が単離された。

10

【0081】

異性体1: ¹H NMR (CDCl₃): 1.38 (s, 9H); 2.02 (s, 6H); 2.68 - 2.72 (t, 4H); 4.25 - 4.35 (m, 4H); 7.25 - 7.47 (m, 6H); 7.69 - 7.70 (d, 1H); 8.11 - 8.14 (d, 1H)。
³¹P NMR (CDCl₃): -10.21 ~ -9.94 (m)。

異性体2: ¹H NMR (CD₃COCD₃): 1.38 (s, 9H); 1.98 (s, 6H); 2.66 - 2.72 (m, 4H); 4.20 - 4.40 (m, 4H); 7.20 - 7.47 (m, 6H); 7.63 - 7.64 (d, 1H); 8.07 - 8.10 (d, 1H)。
³¹P NMR (CDCl₃): -9.76 ~ -9.49 (m)。

20

【0082】

化合物10は、実施例4の手法を用いて、ピバレート (pivalate) 基及びシアノエチル保護基のアルカリ加水分解によって化合物4に変換される。

【0083】

実施例9

0.1 Mの221バッファー (221 = 2-メチル-2-アミノ-1-プロパノール)、0.33 mMのルシゲニン、0.1% トウィーン (Tween) 20及び0.66 mMの化合物4 (異性体2) を含む試薬組成物が、表1に示されるpHで、化学発光の生成についてテストされた。テストでは、室温で0.8 fmolの酵素を含むAP水溶液10 µlと100 µlの試薬との反応を3回行った。混合によって光が発生し、その光は26分後に測定された。

30

【表1】

表1.

pH	背景強度	シグナル強度	シグナル/背景
9.00	1.46	126.7	86.8
9.25	2.63	279.5	106.3
9.50	3.42	316.3	92.5
9.61	3.38	293.7	86.9
9.75	4.89	301.2	61.6
10.00	6.99	137.0	19.6

40

【0084】

実施例10

50

9.6のpHをそれぞれ有するが221バッファの濃度が異なる複数の試薬組成物を前述の実施例に従って調製した。光の生成が同様にテストされた。化学発光は、221バッファが0.05M~0.75Mの範囲にある全てのバッファ系で簡単に検出された。光強度は0.05~0.2Mの範囲のバッファ濃度で最大であった。

【0085】

実施例11

9.6のpH、0.1Mの221バッファをそれぞれ有するが化合物4(異性体2)の濃度が異なる複数の試薬組成物を実施例9に従って調製した。光の生成が同様にテストされた。化合物4を0.066mM~0.66mMの範囲の濃度で含む全てのサンプルで高いレベルの化学発光が生成した。

【0086】

実施例12

9.6のpH、0.1Mの221バッファ、0.33mMの化合物4(異性体2)をそれぞれ有するがルシゲニンの濃度が異なる複数の試薬組成物を実施例9に従って調製した。光の生成が同様にテストされた。ルシゲニンを0.033mM~0.66mMの範囲の濃度で含む全てのサンプルで高いレベルの化学発光が生成した。

【0087】

実施例13

9.6のpH、0.1Mの221バッファ、0.33mMの化合物4(異性体2)及び0.1mMのルシゲニンをそれぞれ有する複数の試薬組成物を実施例9に従って調製した。様々な界面活性剤がこのテスト組成物に添加され、8fmolのAPとの反応によって生成する化学発光のピークが決定された。トウィーン20、トウィーン40、トウィーン80、ブリジ(Brij)35及びポリ(ビニルベンジルトリブチルホスホニウム)クロライドを使用したときに光強度の有用な増大がみられた。

【0088】

実施例14

9.6のpH、0.1Mの221バッファ、0.33mMの化合物4(異性体2)及び0.1mMのルシゲニンをそれぞれ有するがトウィーン20の濃度が異なる複数の試薬組成物を実施例9に従って調製した。テストされた組成物の中で、シグナル/背景の比が最も高かったのはトウィーンの濃度が0.03~0.1%の範囲のときであった。

【0089】

実施例15

9.6のpH、0.1Mの221バッファ、0.33mMの化合物4(異性体2)及び0.1%のトウィーン20をそれぞれ有する複数の試薬組成物を実施例9に従って調製した。ルシゲニンの代わりにメチレンブルー又はベーシックブルー66が添加された。メチレンブルー又はベーシックブルー66を使用したときに、光強度とシグナル/背景の有用な増大がみられた。

【0090】

実施例16

9.6のpH、0.1Mの221バッファ、0.1mMのルシゲニン、0.1%のトウィーン20及び0.33mMの化合物6(異性体1又は2)を含む試薬組成物が化学発光の生成についてテストされた。そこでは、試薬の100µlの部分が、25で8fmolの酵素を含むAP水溶液10µlと反応させられた。ピークの光強度/背景の比は、異性体1:943、異性体2:1800であった。

【0091】

実施例17

0.1Mの221バッファ、9.6のpH、0.33mMの化合物4(異性体2)、0.1%のトウィーン20及び0.1mMのルシゲニンを含む試薬組成物の100µl部分と 8×10^{-16} ~ 8×10^{-22} モルの酵素を含む10µlのAP溶液とを3回反応させて、アルカリフォスファターゼ検出感度が分析された。光生成は室温で10分測定された。化

10

20

30

40

50

学発光強度と酵素量の関係が図 1 に示されている。

【 0 0 9 2 】

実施例 1 8

0.1 M の 2,2,1 バッファー、9.6 の pH、0.33 mM の化合物 4 (異性体 2)、0.1 % の トウィーン 20 及び 0.064 mM の ベーシックブルー 66 を含む 試薬組成物の 100 µl 部分と $8 \times 10^{-16} \sim 8 \times 10^{-22}$ モルの酵素を含む 10 µl の AP 溶液とを 3 回反応させて、AP 検出感度が分析された。光生成は室温で 10 分測定された。化学発光強度と酵素量の関係が図 2 に示されている。

【 0 0 9 3 】

実施例 1 9

AP と反応した化合物 4 (異性体 2) の化学発光プロファイルが図 3 に描かれている。実施例 17 の試薬組成物 100 µl と AP の 4×10^{-17} モルとの 25 での反応は、光放射における即座の上昇をもたらし、光放射は 5 分で最大強度に到達する。

【 0 0 9 4 】

実施例 2 0

化合物 4 及び 5 の二重結合異性体間の化学発光強度の比較を行った。複数の試薬組成物が、0.1 M の トリスバッファー、8.8 の pH 及び 0.66 mM の化合物 4 又は 5 の一つの異性体を含む第 1 の溶液と、0.2 M の 2,2,1 バッファー、9.6 の pH、0.66 mM の ルシゲニン及び 0.5 % の トウィーン 20 を含む第 2 の溶液とを等体積量ずつ組み合わせることによって調製された。このように調製された各試薬の 100 µl の部分が、室温で AP を 0.8 fmol 含む溶液 1 µl と反応させられた。任意のユニットにおけるピーク光強度が以下に示されている。

【表 2】

表 2.

<u>化合物</u>	<u>異性体</u>	<u>シグナル強度</u>
4	1	1000
4	2	2600
5	1	800
5	2	800

【 0 0 9 5 】

化合物 13 の二つの異性体 (化合物 4 の異性体の合成前駆体) についての NOE NMR 実験に基づいて、化合物 4 の異性体 1 は E 体であり、異性体 2 は Z 体であると思われる。同じ立体化学アサイメントが化合物 5 についても成り立つと思われる。化合物 4 の二つの異性体は AP との反応による光放射に対して同じキネティックプロファイルを示した。同様に、化合物 5 の二つの異性体も AP との反応による光放射に対して同じキネティックプロファイルを示した。

【 0 0 9 6 】

実施例 3 0 . T S H の化学発光イムノアッセイ

化学発光イムノアッセイによる T S H の検出方法がダイアグノスティックプロダクツ社の「イムライト (IMMULITE) T S H 第 3 世代 T S H アッセイ」キットを使用してイムライト自動分析機で、製造者のプロトコルに従って行われた。実施例 17 の試薬がキット中の検出試薬の代わりとされた。

【表 3】

10

20

30

40

表3. TSHアッセイ

<u>μIU/mL TSH</u>	<u>強度 (CPS)</u>
67.3	13682515
10	3240041
1	189588
0.3	67436
0.1	28645
0.03	19519
0.01	16277
0.003	15416
0.001	14977
Blank	14941

10

20

図4と表3に示されるアッセイ結果は本発明の組成物が高感度アッセイを提供するのに有用であることを示している。

【0097】

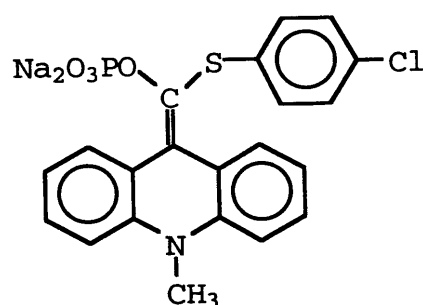
実施例33. ウェスタンブロットアッセイ

本発明の組成物が、ポリビニリデンジフルオライド (PVDf) 及びニトロセルロース膜上でのAP標識された抗体を用いたウェスタンブロットにおいて、蛋白(β-ガラクトシダーゼ)を検出し、定量するために使用された。5000、1000、180、30及び5pgのβ-ガラクトシダーゼをそれぞれ含む複数の希釈液が130Vで電気泳動にかけられ、PVDf(マサチューセッツのベッドフォードのミリポア(Millipore)社製)及びニトロセルロース(アメルシャム(Amersham)社製)の膜に23分かけて100Vで転写された。膜は1%の脱脂乳でブロックされ、マウス抗β-ガラクトシダーゼ及び羊抗マウス-AP複合体と順々に反応させられた。膜は、9.6のpHで0.5%のトウィーン20、0.66mMのルシゲニンを含む0.2Mの221バッファーと、8.8のpHで0.66mMの化合物4(異性体2)を含む0.1Mトリスバッファーとの等体積量を組み合わせることによって調製された本発明の試薬A(最終pH=9.35)に短時間浸漬された。膜は透明なプラスチックシートの中に挟まれ、CCDカメラシステムによって様々な長さの時間にわたってイメージ化された。比較のために、以下の構造を有する化合物、9-[(4-クロロ-フェニルチオ)ホスホリルオキシメチレン] -10-メチル-アクリダン、二ナトリウム塩(参照化合物1)

30

【化19】

40



参照化合物1

50

を含む試薬「ルミゲン (Lumigen; 商標、ミシガン、サウスフィールドのルミゲン社製) AP S-5」を試薬 B として使用して同様にプロットが作製され、イメージ化された。

【0098】

本発明の試薬を使用すると、P V D F とニトロセルロース膜の両方を試薬 A で濡らした後、1 分間露光すると、図 5 に示されるように、 β -ガラクトシダーゼのバンドは直ちに検出された。試薬 B を用いて得られた同じ露光では両方の膜について試薬 A より弱い強度のイメージを生成した。

【0099】

実施例 3 4 .

ジゴキシゲニンで標識された DNA (pBR328) のドットプロットアッセイが本発明に従って調製された検知試薬 (試薬 A 及び C) を用いて行われた。試薬 A は前の実施例に記載されたものである。試薬 C は化合物 4 の異性体 2 の代わりに異性体 1 が含まれている以外は試薬 A と同一とされて調製された。

【0100】

正に荷電されたナイロン膜、抗体 - AP 複合体、標識された DNA 及びブロッキング試薬はボーリンガー - マンハイム (Boehringer-Mannheim) 社から得られた。洗浄バッファは pH 7.5 の 0.1 M マレイン酸、0.15 M NaCl であった。

【0101】

DNA 希釈液 (10、3、1、0.3、0.1、0.03、0.01 pg) はナイロン膜上にドットプロットされた。プロットはマレイン酸洗浄バッファに 3 分間浸漬され、2% ブロッキングバッファによってブロックされた。プロットは抗ジゴキシゲニン - AP 複合体に浸され、0.3% のトウイーン 20 を含むマレイン酸バッファで洗浄され、次いで、0.1 M NaCl を含む pH 9.5 の 0.1 M トリス (tris) に 3 分間浸漬された。過剰のバッファは吸引除去され、プロットは検出試薬 A 又は C に浸漬された。過剰の試薬は吸引除去され、プロットは透明シートの中に挟まれ、様々な長さの時間にわたって CCD カメラシステムによってイメージ化された。1 分間の露光 (exposure) で直ちに 10 pg - 0.03 pg のスポットが両方の試薬で検出された。30 分後、1 分の露光で全ての 7 個のスポットが検出された (図 6)。少なくとも 1 日に数回の露光を行うことができた。

【0102】

実施例 3 5 .

試薬 C、及び、前述の実施例に記載される試薬 B を用いてドットプロットアッセイが実施例 3 4 に記載されるようにして行われた。試薬 C は、試薬 B より有意に高い光強度 (CCD カメラで測定される) を生成した。試薬 C で現像されたプロットからの光放射は試薬 B で現像されたプロットからの放射が減衰した後も、何時間にもわたって持続した。

【0103】

既述した実施例は例証のためのものであり、なんらかの制限としてみなされるべきではない。ここに特に開示されなかった特定の化合物や方法の修正は本発明の範囲及び精神から外れることなく行えることが認識されよう。本発明の範囲は特許請求の範囲のみによって制限されるのである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】AP の量を化合物 4 を含む本発明の試薬によって発生した化学発光の強度に関連させたグラフ。アルカリフォスファターゼ検出感度は、0.1 M の 221 バッファ、pH 9.6、0.33 mM の化合物 4、0.1% のトウイーン (Tween) 20 及び 0.1 mM のルシゲニンを含む 100 μ L の試薬組成物と $8 \times 10^{-16} \sim 8 \times 10^{-22}$ モルの酵素を含む 10 μ L の AP 溶液とを組み合わせることによって決定された。生成した光は 25 で 10 分測定された。点で示されるデータは 3 回の分析の平均である。

【図 2】AP の量を化合物 4 を含む本発明の試薬によって発生した化学発光の強度に関連させたグラフ。アルカリフォスファターゼ検出感度は、0.1 M の 221 バッファ、pH 9.6、0.33 mM の化合物 4、0.1% のトウイーン 20 及び 0.64 mM のベシックブルー 66 を含む 100 μ L の試薬組成物と $8 \times 10^{-16} \sim 8 \times 10^{-22}$ モルの酵素を

10

20

30

40

50

含む $10 \mu\text{L}$ の AP 溶液とを組み合わせることによって決定された。生成した光は 25°C で 25 分測定された。点で示されるデータは 3 回の分析の平均である。

【図 3】 25°C において、 1.4 f モルの AP と、化合物 4（実施例 19 に記載される異性体 2）を含む $100 \mu\text{L}$ の試薬組成物とを反応させて得られた化学発光の時間プロファイルを示すグラフ。

【図 4】本発明の検出試薬を使用した甲状腺刺激ホルモン（thyroid stimulating hormone）の化学発光イムノアッセイの結果を示すグラフ。

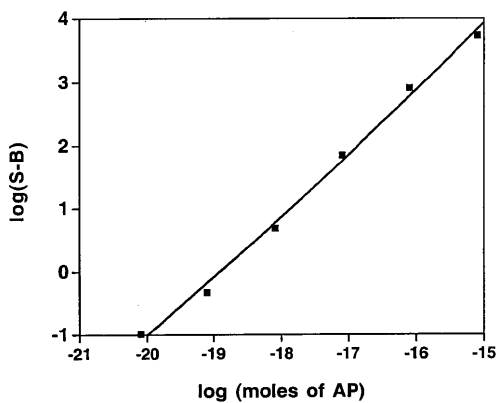
【図 5】PVDF 及びニトロセルロース膜上の AP 標識された抗体を化学発光試薬組成物と共に使用した α -ガラクトシダーゼのウェスタンブロットアッセイからの CCD カメラ像のセット。 5000 、 1000 、 180 、 30 及び 5 pg の蛋白を含む α -ガラクトシダーゼの希釈液が本発明の試薬及びアクリダンフォスフェートを含む試薬によって検出された。

10

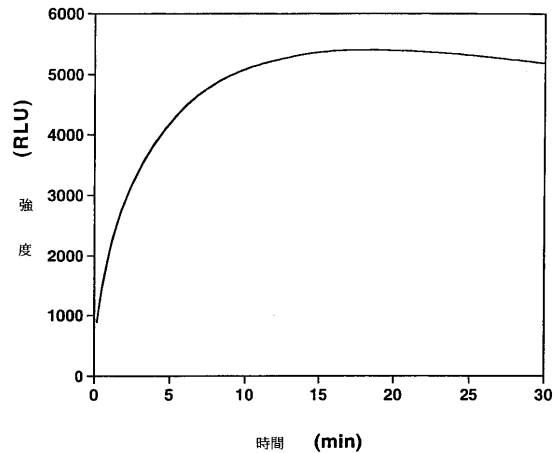
【図 6】AP 標識された抗体を使用した、ジゴキシゲニンで標識された pBR328DNA のドットブロットアッセイからの CCD カメラ像のセット。

【図 7】AP 標識された抗体を使用した、ジゴキシゲニンで標識された pBR328DNA のドットブロットアッセイからの CCD カメラ像のセット。

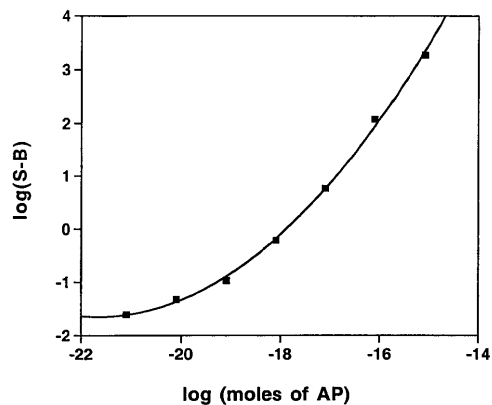
【図 1】



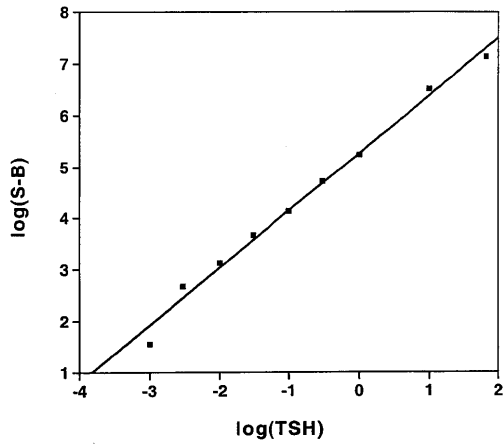
【図 3】



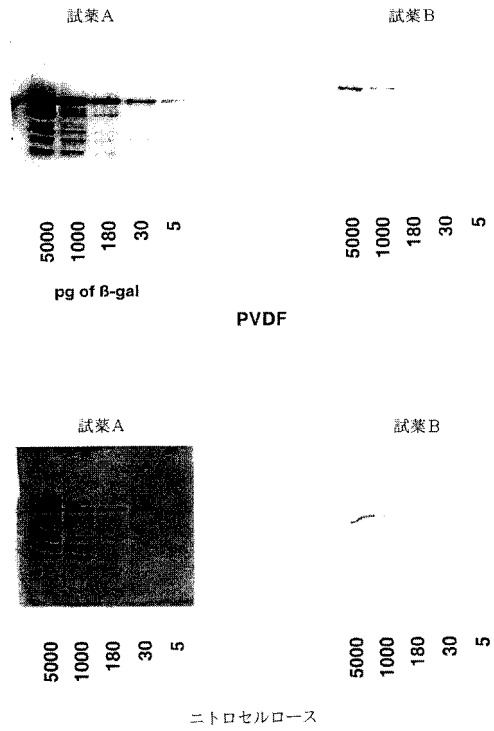
【図 2】



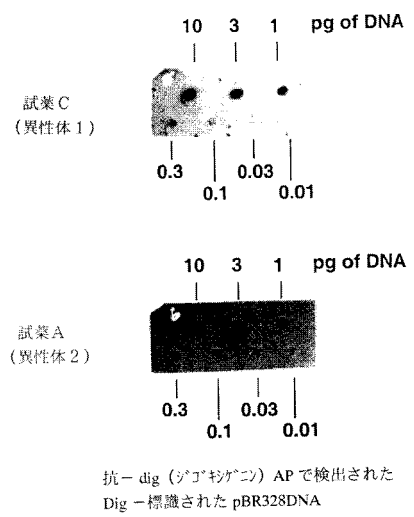
【 図 4 】



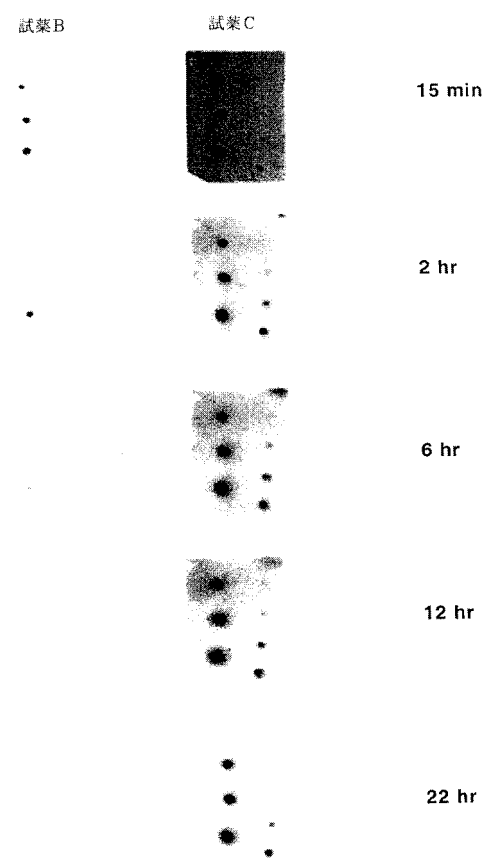
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(74)代理人 100106493

弁理士 松富 豊

(74)代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 ハシエム・アクハヴァン - タフティ

アメリカ合衆国・ミシガン・48843・ハウエル・サウス・ラトスン・ロード・1165・エー
ピーティ・16

審査官 植原 克典

(56)参考文献 特表平10-510848(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D 277/66

G01N 21/78

G01N 33/532

CA/REGISTRY(STN)