

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3662610号
(P3662610)

(45) 発行日 平成17年6月22日(2005.6.22)

(24) 登録日 平成17年4月1日(2005.4.1)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C O 7 D 498/18

C O 7 D 498/18

G O 1 N 21/64

G O 1 N 21/64

Z

G O 1 N 21/78

G O 1 N 21/78

C

G O 1 N 31/22

G O 1 N 31/22

1 2 2

請求項の数 4 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願平6-249309
 (22) 出願日 平成6年10月14日(1994.10.14)
 (65) 公開番号 特開平7-188248
 (43) 公開日 平成7年7月25日(1995.7.25)
 審査請求日 平成13年4月25日(2001.4.25)
 (31) 優先権主張番号 140257
 (32) 優先日 平成5年10月21日(1993.10.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500204326
 テルモ カーディオバスキュラー システ
 ムズ コーポレーション
 アメリカ合衆国, 48013 ミシガン州
 , アナーバー, ジャクソン ロード 62
 00
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人 100083356
 弁理士 柴田 康夫
 (72) 発明者 ジョン・エドウィン・トレンド
 アメリカ合衆国55144-1000ミネ
 ソタ州セント・ポール、スリーエム・セン
 ター (番地の表示なし)

最終頁に続く

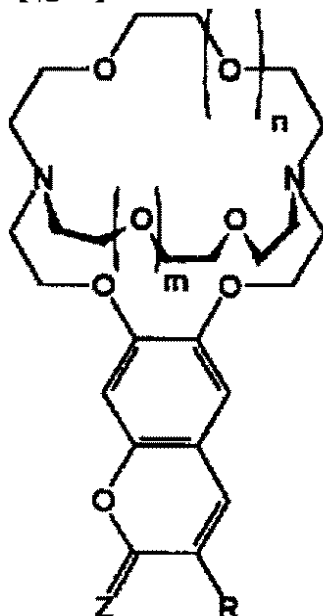
(54) 【発明の名称】 カチオン検出複合構造および使用する化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の一般式の構造を有する蛍光イオン透過性化合物であって、

【化1】



mおよびnは独立して0または1；

Rは少なくとも、電子求引基および分極性基の内の1つであり、カルボキシアミド、置換または非置換スルホニルアリールおよびケト-アルキルエステルから成る群から選択される基；および

Zは酸素またはN-R'、ここでR'はHまたはC₁～C₄アルキル基を表し；350～440nmの領域に吸光度の最大値を有する化合物。

【請求項2】

基材および請求項1記載の蛍光イオン透過性化合物から成るカチオン検出用複合構造体であって、該化合物が該基材と結合または結合基によってRを介して共有結合し、基材がポリマー材料から成り、膜上に被覆されており、該結合基が両末端の官能基から成り、片方の末端の該結合基の官能基がRの官能基と相補的であつて他方の末端の官能基が該基材上の官能基と相補的であり、該官能基がアミン、アミド、エステル、オキシラン、オレフィン、尿素、シラノール、カルバメート、イソシアネート、チオイソシアネート、スルホンアミド、スルホニルクロリド、カルボキシル、クロロトリアジン、ヒドラジン、ヒドラジド、およびアルデヒド基から成る群から独立して選択される複合構造体。

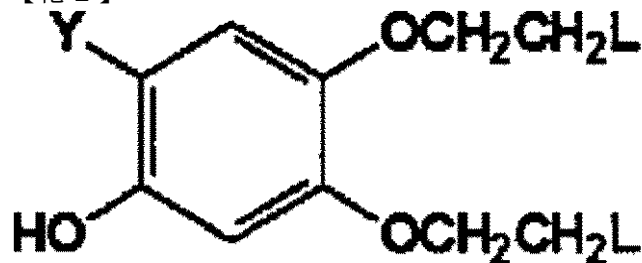
【請求項3】

a)イオンを運搬し得るカチオン含有媒質と接触する蛍光イオン透過性化合物を含有し、該カチオンを該検出用複合構造体に拡散して検出用複合構造体の蛍光イオン透過性化合物と共に平衡錯体を形成することを可能とするまたは形成する手段を提供する請求項2記載の検出用複合構造体を提供する段階であって、該イオン透過性化合物錯体がほぼλ₁に中心を有する波長領域の光を照射すると、ほぼλ₂に中心を有する波長領域の光を放射し得る、ここでλ₂はλ₁より少なくとも10nm大きく、λ₁は350～440nmの範囲である；b)該錯体が収束および検出される波長λ₂の可視光を放射するに十分な時間、ほぼλ₁に中心を有する波長領域の光で該錯体をインタロゲイトさせる段階；c)該放射光と該カチオン濃度との関連を明らかにし該カチオン濃度を測定する段階であって、ほぼλ₁に中心を有する波長領域の該インタロゲイト光が少なくとも1本の光ファイバーにより誘導され、ほぼλ₂に中心を有する波長領域の該放射光が少なくとも1本の光ファイバーにより該検出器に伝達される段階；から成るカチオンの存在を検出する方法。

【請求項4】

a)1)以下の一般式の構造を有するビス置換芳香族化合物であって、

【化2】



Yは水素およびアルデヒド基から成る群から選択され、

Lは塩素、臭素およびヨウ素、およびアルキルスルホネートおよびアリールスルホネート基から成る群から選択される残りの部分；を

2)約等モル量の一般式A-CH₂-Bの構造を有する二官能価メチレン化合物であって、該ビス置換芳香族化合物のYがアルデヒド基という制限下で有効量の触媒存在下で、

AはRであり、Rは前述のものと同様、

Bはカルボキシルおよびニトリル基から成る群から選択される、二官能価メチレン化合物、

と縮合し、残基置換ビス-エトキシクマリン誘導体を提供する段階；および

b)段階a)から誘導したクマリンを約等モル量のジアザクラウン化合物と反応させることにより、イオン透過性化合物クリプタンド部分を生じ、該蛍光イオン透過性化合物を提供する段階；

10

20

30

40

50

から成る請求項1記載の蛍光イオン透過性化合物を調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明には、蛍光クマロ-クリプタンドイオン透過体、および、それらの合成方法および使用方法が開示されている。これらのイオン透過体はカチオン検出剤として有用である。本発明には、これらのクマロ-クリプタンドイオン透過体を含み、かつ連続検出用途に有用なカチオン検出複合構造も開示されている。

【0002】

【従来の技術】

様々な液体中のイオン性化合物濃度の測定は、段々通常の方法となってきた。いくつかの環境試験方法には、1種以上の金属イオン、特に重金属イオンの頻繁なおよび時には連続的な定量が含まれる。同様に、ある医療診断法および治療方法には、1種以上の患者の体液中の1種以上のイオンの頻繁なおよび時には連続的な定量が含まれる。より良い連続試験方法に対する要求が、徐々に明らかになってきた。血液および他の体液中の血清カリウムイオン (K^+) レベルの連続かつ同時監視が、特に心臓バイパス手術の間に、非常に望ましい。

【0003】

金属カチオン濃度の測定に対して、様々な方法が報告されてきた。例として、イオン交換膜をベースとする検出；試薬を使用する分光光度技術および蛍光分析技術；湿潤電極；およびイオン透過体を含む。これらの内のいくつかはアルカリ金属イオン濃度の測定には有効でない。しかし、通常アルカリ金属イオン濃度の測定に用いられる方法の中には、様々な光学的特性を監視するものもある。これらの内、蛍光を測定する技術としては分光分析をベースとする方法が好ましい。蛍光を用いる方法は、励起(プローブ)および放射(シグナル)波長の本質的分離を基礎とする感度および操作上の便利さを有する。生体外のカチオン濃度測定に有用な化合物が、例えば米国特許第4,808,539号に開示されている。

【0004】

生体内システムに使用するファイバーオプチック化学センサーは、既知である。例えば、センサーが分析試料に作用し、光学的变化を検出するようにファイバーオプチック導波管へ化学センサーを導入することは、米国特許第4,577,109号に開示されている。ファイバーオプチック導波管内の化学センサーとしての蛍光エネルギー伝達指示計は、米国特許第5,037,615号に開示されている。共鳴エネルギー伝達エネルギーを発生させるほど十分に吸収体物質に近接した、基材に固定した蛍光剤によって発生したシグナルを監視するのにファイバーオプチックスを用いることが、米国特許第4,929,561号に開示されている。米国特許第4,822,746号には、光吸収配位子および光吸収錯体の組合せによる蛍光発生物質を含有する系内の蛍光を検出するのにファイバーオプチックスを用いることが開示されている。半透膜を通して特定のアルカリ金属イオンを選択的に透過する可動イオン透過体と接触するポリマーカチオン材料および蛍光アニオン材料を含む溶液から成る系内のファイバーオプチックスによる蛍光の検出が、米国特許第4,762,799号に開示されている。

【0005】

生体内/生体外で使用される可能性のある様々な蛍光分析法が、開示されている。例えば、蛍光透過体としてのローダミンエステルおよびメロシアニン540、およびイオン透過体としてのバリノミシン(valinomycin)から成る蛍光プローブは既知である。最近、蛍光透過体としてのローダミン(Rhodamine)-Bを選択的に錯体カリウムイオンに結合させた2,2-ビス[3,4-(15-クラウン-5-)-2-ニトロフェニルカルバモキシメチル]テトラデカノール-14を使用するファイバーオプチックセンサーが開示されている。この装置は特に生体内の使用に対して設計されている。しかし、それによって、補償しないなら、そのイオンのドンナン(Donnan)排除を誘導し検出し得る、染料-イオン透過体種のポテンシャルの外部への移動；重合時間で決定されるべき(架橋密度による)浸透性の制御；エステル結合の加水分解のためのポテンシャル不安定性；およびマトリックスの実効電荷の制御の欠乏を含

10

20

30

40

50

む様々な制限が課せられる。

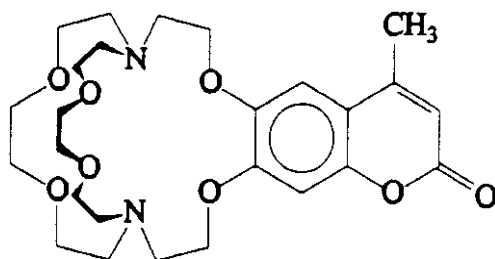
【0006】

【発明が解決しようとする課題】

これらの方法のいくつかは、生理学的濃度での、特に生理学的pHでの水性媒質内でのアルカリ金属イオンに対する感度および選択性の不足に悩まされてきた。選択性の問題のいくつかを克服する1つの方法は、例えば西独特許第3202779 A1号に開示の、カリウムと選択的に錯体を形成するクリプタンドを使用することに基づく。しかし、検出が光学的吸収をベースとするので、その方法の感度は限定される。また、その方法は有機塩基の存在下で有機溶媒中で行われなければならないので、連続的な血液または液体の測定役には立たない。米国特許第5,162,525号には、様々なクリプタンド類と化合する4-メチル-クマリン部分をベースとする蛍光を発生するイオン透過体の一群が開示されている。カリウムイオンに対して選択性を有する以下の化学式の構造を有する[2.2.2]クリプタンド誘導体は、前述の選択性の限定により悩まされず、蛍光によるカリウムイオン濃度の測定を可能とする。

10

【化4】



20

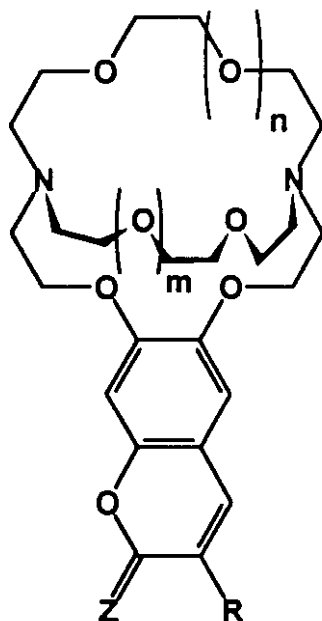
【0007】

【課題を解決するための手段】

【0008】

要するに、本発明は、以下の一般式の構造を有する蛍光イオン透過性化合物であって、

【化5】



A

30

40

mおよびnは独立して0または1；

Rは電子求引基または分極性基であり；および

Zは酸素またはN-R'、ここでR'はHまたはC₁～C₄アルキル基を表し；350～440nm

50

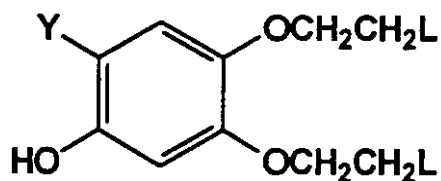
の領域に吸光度の最大値を有する化合物を提供する。

【0009】

他の態様において、本発明は、以下の一般式の構造を有するビス置換芳香族化合物であって、

【化6】

B



10

Yは水素およびアルデヒド基であり、

Lは塩素、臭素およびヨウ素、およびアルキルスルホネートおよびアリールスルホネート基から成る群から選択される化合物を提供する。

【0010】

更なる態様において、本発明は、蛍光イオン透過性化合物と直接または結合基によって共有結合した基材を有するカチオン検出複合構造を提供し、該蛍光イオン透過性化合物は、Rが基材または結合基の内の少なくともどちらかで官能基と化学反応し得る少なくとも1つの官能基を含有する前述の一般式(式A)の構造を有する。(「直接結合した(directly bound)」により、式AのR原子および基材表面上の原子の間の共有結合を表す。)

20

【0011】

更なる態様において、本発明は、a)1)上記ビス置換芳香族化合物(式B)と、

2)約等モル量の(a)および(b)の内の1つ：

(a)一般式A-CH₂-Bの構造を有する二官能価メチレン化合物であって、

要すれば、該ビス置換芳香族化合物のYがアルデヒド基という制限下で有効量の触媒存在下で、

AはRまたはその直接の先駆物質であり、Rは前述のものと同意義、

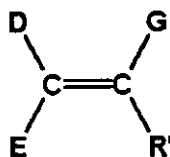
Bはカルボキシルおよびニトリル基から成る群から選択される、

二官能価メチレン化合物、

30

(b)以下の一般式の構造を有するオレフィン化合物であって、

【化7】



該ビス置換芳香族化合物のYが水素という制限下でルイス酸存在下で、

40

DおよびFは、AおよびBから成る群から独立して選択され、

Gは少なくとも1つの孤立電子対を有する原子を含む基、および

R'は水素または低級アルキル(即ち、1～4個の炭素原子を有するもの)

であるオレフィン化合物：

と縮合し、残基末端ビス-エトキシクマリン誘導体を提供する段階；および

b)段階a)から誘導したクマリンを約等モル量のジアザクラウン化合物と反応させることにより、イオン透過性化合物のクリプタンド部分を生じ、蛍光イオン透過性化合物を提供する段階；

から成る前述の蛍光イオン透過性化合物を調整する方法を提供する。

【0012】

50

なお更なる態様において、本発明は、(a)イオンを運搬し得、そのイオンを検出複合構造に拡散して検出複合材料の蛍光イオン透過性化合物を有する平衡錯体を形成する手段を可能または提供する金属イオン含有媒質と接触する蛍光イオン透過性化合物を含有する前で開示した検出複合構造を提供する段階であって、イオン透過性化合物錯体がほぼ λ_1 に中心を有する波長領域の光を照射すると、ほぼ λ_2 に中心を有する波長領域の光を放射し得る、ここで λ_2 は λ_1 より少なくとも10nm大きく、 λ_1 は350~440nmの範囲である；(b)錯体が収束および検出される波長 λ_2 の可視光を放射するに十分な時間、ほぼ λ_1 に中心を有する波長領域の光で錯体をインタロゲイトさせる段階；(c)要すれば、放射光と金属イオン濃度との関連を明らかにし金属イオン濃度を測定する段階；から成るカチオンの存在および濃度を検出する方法を提供する。

10

【0013】

本明細書中で、他に記載がなければ、以下の定義を適応する：

「基(group)」または「化合物(compound)」または「部分(moiety)」により、所望の生成物を妨害しない通常の置換基によって、置換可能な化学種を表し；

「クマロクリプタンド(coumarocryptand)」により、クリプタンド部分に6位および7位でベンゾ縮合したクマリン部分を表し；

「アルキル(alkyl)」により、最も長い分子鎖で1~30個の炭素原子を有する直鎖状または分岐状アルキル基を表し；

「アリール(aryl)」により、その環または複数の環中に5~15個の炭素原子またはヘテロ原子を有する芳香族環状または芳香族縮合環系を表し；

20

「芳香族(aromatic)」により、その環または複数の環中に5~15個の炭素原子またはヘテロ原子を有し、環の電子が非局在化されている環状または縮合環系を表し；そして「インタロゲイト(interrogate)」により、励起放射線源にさらすことを表す。

【0014】

本発明には、他の一価および二価のカチオンに対して非常に高い選択性を有する他のクマロクリプタンド類と同様、 Pb^{+2} または Ba^{+2} の不在下で、 K^+ に対して非常に高い選択性を有するクマロ [2.2.2] -クリプタンドイオン透過体が開示されている。更に、本発明の [2.2.2] クマロクリプタンドは、水性媒質内で用いると、 K^+ に対して非常に高い選択性を有する。（「高い選択性を有する(highly selective)」により、 K^+/Na^+ 錯形成反応比が少なくとも20:1であることを表す。）本発明のイオン透過体のクリプタンド部分がカチオンと錯体を形成する時、特定試料中のカチオン濃度を蛍光分析により同定し得るよう

30

に、イオン透過体の光学特性が変化する。

【0015】

クマリン置換基およびクマリン環のそれらの部分を選択することにより、本発明のイオン透過体の励起の最大が350~約440nmの領域に入ることを保証し得る。このことは、本発明のイオン透過体を、約330nmに励起の最大を有することを報告した米国特許第5,162,525号に開示の4-メチル化合物とは違って、従来のガラスオブチックスに使用し得ることを示す。加えて、4-メチル化合物とは違って、本発明により教示された置換基により、基材に結合する便利でかつ、加水分解および熱的に安定な方法を提供し、本発明のイオン透過体を容易に連続血液接触試験方法に組み込み得る。更に、励起の最大で連続照射する際に、4-メチル化合物が大きな蛍光出力の損失（たぶん同類の4-メチルクマリンレーザー染料において既知の、メチル基の光酸化による）を被るように見えるのに対して、本発明のイオン透過体は良好な蛍光安定性を示す。

40

【0016】

本発明の蛍光イオン透過体は、前述の一般式Aの構造を有する。クマリン環の3の位置にRを配置することおよびそれを電子求引または分極基に限定することによって、これらイオン透過体の最大吸収波長を、従来のガラスオブチックスを用いるシステムに使用し得る点まで増加した。

【0017】

これらユニットの第1番目にはクリプタンド基を含有する。その分子のこの部分は、分析

50

するカリウムイオンに物理的に作用する単位である。参照文献としてレーン(Lehn)およびソーベージ(Sauvage)の「[2]-クリプテーツ(Cryptates): スタビリティ・アンド・セレクトィビティ・オブ・アルカリ・アンド・アルカリン-アース・マクロバイサイクリック・コンプレックス(Stability and Selectivity of Alkali and Alkaline-Earth Macrobicyclic Complexes)」J. Am. Chem. Soc. 1975年、第97巻、6700~07ページを挙げることができるが、クリプタンドケージ(cage)は特定カチオンが錯体を形成するのに有用であることは当業者間で公知である。[2.2.1] ケージのサイズ(約0.21nm)により、同様の直径を有するカチオン(例えば、 Na^+ および Ca^{+2})に対して相当の選択性を有するようになり、[2.1.1] ケージのサイズ(約0.16nm)により、同様の直径を有するカチオン(例えば、 Li^+ および Mg^{+2})に対して相当の選択性を有するようになるのに対して、酸素および窒素原子により囲まれた[2.2.2] ケージのサイズ(約0.28nm)により、この単位が同様の直径を有するカチオン(例えば、 K^+ 、 Pb^{+2} 、 Sr^{+2} および Ba^{+2})に対して相当の選択性を有するようになる。(更に、これらクマロクリプタンド類を、 K^+ 、 Na^+ または Li^+ の生理学的濃度を測定するシステムに組み込めば、重金属がこれらイオンの内の1つの分析を妨害し得る濃度に含まれることはない。) このサイズ選択性は、例えば、 K^+ 以外にイオンを含む生理学的試料を $[\text{K}^+]$ に対して定量的に分析なら、臨界である。クリプタンド基は分析試料のpHに依存して、一または二プロトン化形(mono- or diprotonated form)に成り得る。橋頭窒素で起こるプロトン化は、生理学的pH領域を越えて、(他の金属イオン以上に) K^+ に対するクマロクリプタンドの選択性に有意な影響は与えないが、クマロクリプタンド種の組合せた蛍光強度に影響を与え得る。

10

20

【0018】

本発明のイオン透過体の第2の特定単位は、3の位置で置換したクマリン基である。この単位は「伝達(reporting)」単位と考えられている。例として生理学的試験を用いて、クリプタンドケージにプロトンまたは Na^+ が存在すると、クマリン単位は特徴的な蛍光強度-波長の図を示す。 K^+ がクリプタンドケージの酸素および窒素原子と錯体を形成すると、蛍光強度の増大が観察される。換言すれば、カリウム錯体の形成によりクマリン単位の蛍光収量が増加する。特定のクリプタンド基に選択性を有する他のカチオンに対しても、同様のメカニズムがあてはまる。

【0019】

本発明において、クマリン単位のカルボキシル官能基は、イミン官能基によりイオン透過性に影響を与えることなく置換され得る。しかし、もし本発明の分子を水性酸性環境下で用いるなら、このイミン官能基はカルボキシル基を加水分解し得る。

30

【0020】

クマリン単位の3の位置は電子求引または分極基、Rによって置換される。米国特許第5,162,525号(マシリマニ(Masilimani)等)の例とは異なって、本発明では、本発明の蛍光イオン透過体のクマリン部分がカルボキシル/イミン基に隣接する炭素で置換されることが必要である。この位置にRを配置することによって、本発明のイオン透過体は、4の位置で置換されたクマリン類より多少大きな(例えば、20%大きい)収量を有する。このことは、低下した励起強度を用い、それによって光崩壊の確度を低減し、より低強度光源を使用し得ることを表す。加えて、Rを電子求引または分極基に限定すると、十分に赤色側にシフト(即ち、350~440nmの領域)し、従来のガラスオプティクスに使用することおよび光崩壊の感受性を減じることを可能とする励起の最大を有するイオン透過体を得ることが明らかとなった。

40

【0021】

本発明のイオン透過体内の置換基として使用し得る電子求引または分極基には、カルボキシル、カルボキシアミド、スルホニルアリール、エステル、ケト-アルキルエステルおよび(おそらく1箇所以上で置換された)芳香族基を含む。好ましいR基には、エステル類、ケト-アルキルエステル類および置換芳香族基、例えば置換フェニル類、ベンゾイミダゾリル類、ベンゾオキサゾリル類およびベンズチアゾリル類を含む。エステル類の内、エチルエステルは特に好ましく；ケト-アルキルエステル類の内、 $-(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ (

50

$\text{CO})\text{OCH}_2\text{CH}_3$ は特に好ましい。好ましい芳香族置換基には、アミン類、カルボン酸
おそらくスルホン酸を含む。

【0022】

エステル類およびケト-アルキルエステル類および置換芳香族基の環のカルボニル部分は、マシリマニ(Masilimani)等の例に示されるメチル基より、励起領域を越えて照射による
蛍光分析の間に起こる光酸化を受けるようにはとても見えない。更に、その置換基が置換
芳香族基であると、様々な置換基は適切な共有結合点を供給し得；その置換基がエステル
およびケト-アルキルエステルであると、加水分解中に、これら基のカルボキシ部分は同
様に適切な共有結合点を供給し得る。

【0023】

本発明のクマロクリプタンドイオン透過体の調製は、基本的中間体（前述の式B）または
その中間体先駆物質（以下に示す反応式のIII）を提供する一般反応式をベースとしてお
り、式中Lは残基、例えばハロゲン（フッ素以外）および、アルキルおよびアリールスル
ホネート類、例えばメシル、トシル、プロシルを表す。様々なクマリン類およびその結果
のクマロクリプタンドをこの中間体から様々な方法によって合成し得る。

【0024】

それらの例では、前述のように、どんな残基末端ビス-エトキシ2-ヒドロキシベンズアル
デヒドを用いてもよいが、ビス-クロロエトキシ種を用いた。ビス-クロロエトキシ基本的
中間体を作成するために、1,2-ビス-(2'-ヒドロキシエトキシ)ベンゼンを出発原料として
選択した。この出発原料をランディニ(Landini)およびモンタナリ(Montanari)のシンセシ
ス(Synthesis)、1978年、223~25ページに開示のプロセスに従って調製し得る。この出発
原料を、過剰の塩化チオニルとの反応により、1,2-ビス-(2'-クロロエトキシ)ベンゼン (I)
に転化する（実施例1参照）。次いで、化合物Iは、塩化チタンの存在下で1,1-ジク
ロロメチルメチルエーテルと反応し、加水分解の間に、1,2-ビス-(2'-クロロエトキシ)ベ
ンズアルデヒド(II)を生成し得る（実施例2参照）。この化合物と過酸化水素および硫酸
との反応により、3,4-ビス-(2'-クロロエトキシ)フェノール(III)を得る（実施例3参
照）。次いで、化合物IIIを塩化チタンの存在下で1,1-ジクロロメチルメチルエーテルと
反応し、加水分解の間に、前述の基本的中間体を生成する（実施例4参照）。

【0025】

次いで、この中間体を、少なくとも2種の異なる方法で反応し、6,7-ビス-(2'-ヨードエ
トキシ)-3-カルボエトキシクマリン(IV)を生成し得る。本明細書中に開示の方法により
、エステル置換クマロクリプタンドの調製を教示するが、その中間体を以下で開示のもの
と同様の化合物と反応することによって、どのように異なったR基を有するクマロクリ
プタンド類を生成し得るか当業者間には公知である。

【0026】

最初に、その中間体を触媒、例えばピペリジンまたは酢酸の存在下でマロン酸ジエチルと
反応することによって、6,7-ビス-(2'-クロロエトキシ)-3-カルボエトキシクマリン(V)
に転化し得る（実施例5参照）。（化合物Vは、実施例6に示すようなあまり好ましくな
い方法によって、化合物IIIからも直接調製し得る。）次いで、化合物Vをヨウ化ナトリウ
ムと反応させ、化合物IVを得る（実施例7参照）。第2に、その中間体はヨウ化ナトリウ
ムとの反応によって、4,5-ビス-(2'-ヨードエトキシ)-2-ヒドロキシベンズアルデヒド(VI)
に転化し得る（実施例8参照）。次いで、化合物VIを触媒存在下でマロン酸ジエチル
を用いて縮合し、化合物IVを得る（実施例9参照）。

【0027】

次いで、化合物IVを、1,4,10,13-テトラオキサ-7,16-ジアザシクロオクタデカン（即ち、
4,13-ジアザ-18-クラウン-6）および炭酸ナトリウムと反応することによって直接転化し
得る（実施例10参照）。

【0028】

これらの反応は、以下の図式にまとめて示す。

【0029】

10

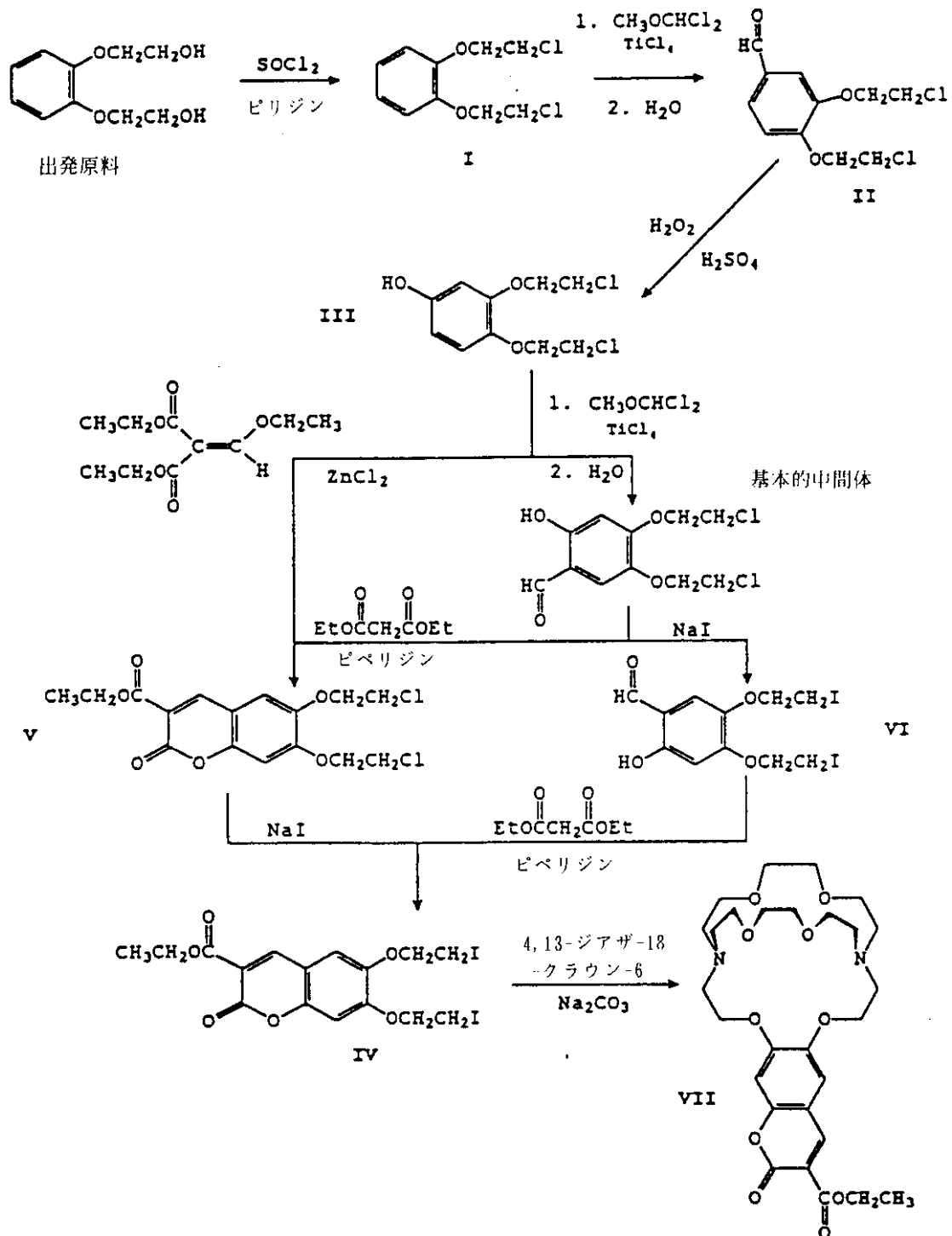
20

30

40

50

【化 8】



【0030】

ケト-アルキルエステルまたは置換芳香族基を置換したクマロクリプタンドを得るため、化合物Vが基本的中間体から調製される段階で、マロン酸ジエチルに適した（また更に、化合物Vが化合物IIIから調製される段階で、マロン酸ジエチルエトキシメチレンに適した）化合物を置換することだけが必要である。

【0031】

10

20

30

40

50

[2.2.2] 種以外のクマロクリプタンド類を4,13-ジアザ-18-クラウン-6以外のジアザクラウンエーテルを用いることによって調製し得ることは、当業者間で公知である。例えば、[2.2.1] クマロクリプタンドが所望であれば、1,4,10-トリオキサ-7,13-ジアザシクロペンタデカンを使用し得る。

【0032】

クマリン単位 of 3 の位置で結合し得る可能性のある置換基により、他の分子および/または化学基質と共有結合する便利な方法を提供する。これらの蛍光発生イオン透過体は基質と、検出組成物を形成するために、直接または分子テザー(tether) (即ち、結合基) を介してのいずれかで結合し得、次いでその組成物を連続検出または連続運転装置に導入し得る。

10

【0033】

本発明のイオン透過体をそのような結合基を介して基質と結合すれば、その最も長い分子鎖は、好ましくは5~125個の炭素および/またはヘテロ原子、例えば酸素、窒素等から成り、より好ましくは10~70個の炭素および/または少なくともそれらの一末端に遊離官能基を有するヘテロ原子から成る。これらの結合基は好ましくは親水性であり、金属イオンがイオン透過体へ作用し得るのを妨害はしない。しかし、もし結合基がその系の異なる物理特性に寄与することが所望であれば、また基質が十分親水性であるならば、繰り返し単位および末端官能基はそれに応じて選択される。

【0034】

クマロクリプタンドのR基と選択的に反応するように、これら結合官能基を選択し得る。可能な官能基には、アミン類、アミド類、エステル類、オキシラン類、オレフィン類、尿素樹脂、イソシアネート類、チオイソシアネート類、カルバメート類、スルホンアミド類、塩化スルホニル類、カルボキシル類、シラノール類、クロロトリアジン類、ヒドラジン類、およびアルデヒド類 (またはクマロクリプタンドのR基と反応してアミン類、アミド類、エステル類、エーテル類、尿素樹脂、ウレタン類、スルホンアミド類、シラン類およびヒドラジド類を形成する基) を含む。

20

【0035】

結合基は好ましくは、イオン透過体との反応前に基質と反応する。これは2種の方法の内の1つにより行われ得る。最初に、イオン透過体と結合する前にそれらを基質と反応し得る。こちらを選択すれば、各結合基は二官能性でなければならなく (即ち、各テザーの各末端に同様または異なるいずれかの官能基を有する)、かつ基質はテザーの官能基1つと反応する相補的な官能基を有し得る。第2に、その基質を予備結合した結合基を用いて形成し得る。これには、結合基が既に追加されているように基質ポリマーを選択することを含む。

30

【0036】

本発明のイオン透過体を、基質上に (即ち、直接または結合基を介してのいずれかで) 固定し、検出複合構造を形成し得るなら、様々な形状の基質を使用し得る。検出複合材料を連続監視装置に使用し得るなら、装置の寸法および形態だけのために、平面基質がおそらく好ましい。

【0037】

平面基質または容易に平面になり得る基質の例として、(自立している) ポリマー膜および被覆可能なポリマー (即ち、支持体上に被覆し得るポリマー) を含む。膜は、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニリデン、ポリ塩化ビニル(PVC)、ポリスルホン、ナイロン、およびシリカを含む様々なポリマーから作成され得る。(ある種のナイロン膜は不完全にリバーシブルな複合材料、即ち、金属イオン濃度の変化に伴って強度変化を示すのを徐々に終わる前に、高いおよび低いカチオン濃度の間で僅か数サイクルだけ使用し得る複合材料を提供する。) これら膜は好ましくはイオン浸透性であり、要すれば官能基R (イオン透過体からの) に相補的で、官能基Rと反応する基により機能的になり、またその基を本質的に運搬するように反応 (例えば、空気酸化) した。

40

【0038】

50

イオン透過体をできるだけ高濃度とするため、それらが膜表面に結合し得るなら、イオン透過体と結合する前または多孔性膜を用いる前に、シリカを含有するような膜の表面を粗面とすることが望ましい。

【0039】

水不溶性の被覆可能なポリマーは好ましい基質である。そのようなポリマーには、PVC、PVCのコポリマーおよびターポリマー、スチレンおよびマレイン酸またはマレイン酸無水物のコポリマー、アルキルビニルエーテルおよびマレイン酸またはマレイン酸無水物のコポリマー、ビニルジメチルアズラクトンのポリマーおよびコポリマー、および、アクリル酸およびメタアクリル酸を用いたアクリレートエステルおよびメタアクリレートエステル（またはアクリルアミドおよびメタアクリルアミド）のコポリマーを含む。本発明のイオン透過体が、一度これらのポリマーの内の1種と（直接または結合基を介してのいずれかで）共有結合すれば、ポリマーイオン透過体複合材料は、要すれば前述の膜の内の1つに分散され得る。更に、膜を被覆可能なポリマーで被覆し（要すれば結合基と反応し）、次いで、本発明のイオン透過体の溶液中で反応し得る。どちらかを行えば、基質は膜とイオン透過体を保持する被覆可能なポリマーとなる。

10

【0040】

PVCポリマーまたはコポリマーの使用による更なる有用性は、クマロクリプタンドの蛍光応答のpH依存性が低減することである。例えば、生理学的pH(7.3~7.5)および生理学的 K^+ 濃度(約4ミリモル%)でのそのような検出複合構造の蛍光強度変化は、総蛍光強度変化の僅か約2%である。

20

【0041】

特に好ましい複合構造は、本発明の3-クマロクリプタンドと（直接またはテザーを介してのいずれかで）反応したPVCで被覆したプリフォームした膜である。有用なプリフォームしたポリマー膜の内、特に好ましいのはPCT特許公告W092/07899に開示の親水性多孔性ポリプロピレン(HPPP)である。なぜならば、それらに対する強い親和力を示すことなく、金属イオンによりイオン透過体への妨害されないアクセスを可能とするからである。要すれば、このタイプの複合構造を巻締めプラグの形状にしてもよい。

【0042】

プロトン（またはヒドロニウムイオン）を選択的に浸透させる膜を単に選択することにより、様々な濃度の金属イオンの存在下でpHセンサーとして働く複合構造を調製し得ることは、当業者間で公知である。一定濃度の金属イオンを保持すれば、そのような選択性膜は必要ないかもしれない。

30

【0043】

連続運転装置を使用し得るなら、固体複合構造は例えば、粉末（または市販の粉末またはビーズと結合し得るクマロクリプタンド化合物）に粉碎し、またイオン浸透マトリックス、例えばヒドロゲル、アクリルアミドまたはアクリレート-タイプのゲル内に封止し得る。もしその複合構造が粉末（または粉末に粉碎）なら、要すれば平面基質と接着していてもよい。

【0044】

連続検出が所望であれば、基質は、特定の形態を用いたにもかかわらず、おそらく付近のカチオンには影響を受けず、付近のカチオンとの可逆的作用を可能とする（そして、イオンは容易に結合したイオン透過体との可逆的錯体を形成し得る）。カチオン/イオン透過体平衡の妨害を最小にするため、カチオン濃度が変化しても、この作用の可逆性が本質的に変わらないような方法で、選択された基質材料が好ましくはカチオンに影響を与える。基質自体は好ましくはカチオンと不可逆的には反応せずまたカチオンを吸着せず、負の実効電荷を有し、親水性である。選択された基質が本質的にこれら好ましい特性を有さないなら、そうなるように改良してもよい。例えば、スルホネートまたはホスフェート基を、その組成物に総負電荷を供給し親水性を向上するために、前述の結合基と共に結合し得る。

40

【0045】

50

検出組成物が、カチオンが結合したイオン透過体に達するため基質を介して拡散しなければならない装置に使用され得るなら、その基質は少なくとも幾分イオン浸透性または微孔性であることが必要である。加えて、光の応答ビームを使用し得るかどうか（及びどのように使用し得るか）によって、反透明または透明基質、および不透明、反射または光吸収オーバーコートを提供することが望ましいかもしれない。典型的なオーバーコートには、カーボンブラックのポリマー分散体（基質上に被覆）およびインキを含む。

【0046】

分析試料中のカチオン濃度を定量的に同定し得るなら、平衡イオン-イオン透過体錯体濃度を測定し得る分析技術が好ましい。分光法が特に有用であることが明らかとなった。特に好ましくは蛍光である。要すれば、そのような方法を改良し、励起および放射光の伝達 10
にファイバーオプティクスを使用してもよい。例えば、1種以上の光学繊維を使用して、ほぼ λ_1 に中心を有する波長領域のインタロゲイト光を誘導し、ほぼ λ_2 に中心を有する波長領域の光を放射した検出器へ伝達し得る。

【0047】

本発明の蛍光イオン透過体化合物は、特定カチオン濃度の決定を要求される様々な用途で使用され得る。 K^+ または Na^+ に対して選択性を有するイオン透過体は、特に生理学的系内の、特にこれらイオン濃度の測定に有用である。これらイオン透過体は、実存する試験器具に組込まれ、様々な基質上に被覆され、ファイバーオプティクスをベースとした分析器具に組込まれ得る。 Pb^{+2} に対して選択性を有するイオン透過体は、環境試験およびた 20
ぶん生理学的試験にでさえ有用であり得る。シリコンゴムまたは同様にガス浸透性の膜の内側の適当に緩衝液を充填した区画のpH付近の、 pK_a 、好ましくは二プロトン化種に対する pK_a を有するクマロクリプタンダイオン透過体に限定することによって、 $[CO_2]$ も定量し得る（即ち、そのイオン透過体は、 CO_2 の H_2CO_3 への水和により発生した酸性種に作用し得る）。これらイオン透過体を用いる他の検出および濃度測定の用途は当業者間に公知となる。

【0048】

本発明の目的および有用性を、以下の実施例に更に説明する。他の条件および詳細と同様に、これら実施例に例示された特定の材料およびその量は、本発明を不当に限定するものと解釈されるべきではない。

【0049】

【実施例】

実施例1～10には、6,7-[2.2.2]-クリプタン-3-カルボエトキシマリニン(VII)の調製の様々な段階を記載した。実施例11には、この化合物のエステル部分の加水分解を記載した。

【0050】

（実施例1）1,2-ビス-(2'-クロロエトキシ)ベンゼン

トルエン400ミリリットルおよびピリジン6ミリリットル中に（ランディニ(Landini)およびモンタナリ(Montanari)の方法に従って調製した）1,2-ビス-(2'-ヒドロキシエトキシ)ベンゼン6g(0.03モル)を含む溶液を、窒素ガス下で40℃に加熱した。過剰の塩化チオニル(9.2ミリリットル、0.13モル)を、攪拌しながら25分間かけて加えた。その反応混合物を沸点まで加熱し(約110℃)、3時間還流した。その溶液を室温まで冷却し、他の容器に移して保管した。残渣を粉碎し、水に溶解し、トルエンで抽出した。トルエン溶液を化合 40
し、最初に2NのHClで洗浄し、次いで飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄した。乾燥溶液を減圧下で蒸発して粗生成物4.5g(64%)を得、それをアスピレーター圧力でクーゲルロー(kugelrohr)により蒸留して融点55～56.5℃の分析用純粋試料4.43gを得た。分光分析によって、その生成物が1,2-ビス-(2'-クロロエトキシ)ベンゼンであることを確認した。

【0051】

（実施例2）1,2-ビス-(2'-クロロエトキシ)ベンズアルデヒド

この方法は、Org.Synth.Coll.第V巻、49～51ページ(1973年)およびChem.Ber.第96号、308～13ページ(1963年)に開示のメシトアルデヒドの合成に用いる方法の改良である。

10

20

30

40

50

60ミリリットル(0.18モル)の塩化メチレン中に実施例1の生成物25g(0.11モル)を含む溶液を0℃まで冷却した。溶液を0℃の反応温度に保持しながら、合計20ミリリットル(0.18モル)の四塩化チタン(ワイオミング州ミルウォーキー(Milwaukee)のアルドリッチ・ケミカル(Aldrich Chem.)社製)を窒素ガス下で、攪拌しながら、30分間かけて加えた。10ミリリットルの塩化メチレン中に13.5g(0.117モル)の1,1-ジクロロメチルメチルエーテル(アルドリッチ(Aldrich)社製)を含む溶液を、0℃で15分間かけて加えた。0℃で攪拌を5分間を続けた。溶液が室温になるまで水浴中で20分間加温した。次いで、15分間還流した。溶液を冷却した後、クラッシュドアイスを加えた。その混合物を分液漏斗内で振盪した後、塩化メチレン層を除去し、水性層を2つの100ミリリットルのクロロホルムで抽出した。クロロカーボン溶液を化合し、最初に水、次いでブライン溶液でよく洗浄した。有機層を乾燥し、減圧下で蒸留し、融点49~51℃の刺激的なサフラン色の固体としてのアルデヒド(87%)24.5gを得た。分光分析により、その生成物が1,2-ビス-(2'-クロロエトキシ)ベンズアルデヒドであることを確認した。

10

【0052】

(実施例3) 3,4-ビス-(2'-クロロエトキシ)フェノール

この化合物は最初に実施例2のベンズアルデヒドのバイアー-ビリガー(Baeyer-Villiger)酸化によって調製し、酸触媒加水分解によって3-クロロペルオキシ安息香酸またはモノペルオキシフタル酸マグネシウムを用いる蟻酸エステルとした。しかしこの方法によると、スケールアップの際に、分解による生成物の大きな損失が生じる。そこで、バイアー-ビリガー(Baeyer-Villiger)法以外の方法を用いた。

20

オーバーヘッド攪拌機および冷却槽を装備した2リットルフラスコに、実施例2の生成物162gおよび1.5リットルの冷却(10℃)メタノールを入れた。この溶液に、予備冷却した33重量%の硫酸溶液を加えた。

125ミリリットルのメタノールに30重量%の過酸化水素溶液94g(0.83モル)を加え、この混合物を攪拌および冷却しながら5分間かけて上記溶液に加えた。残留溶液は濁ったが、攪拌2時間後に透明になった。

【0053】

その溶液を、フラスコの底に生成した褐色油(11g、廃棄)から分離して移した。移した溶液を、一晩室温で攪拌した。メタノールを反応混合物から除去し、クロロホルム400ミリリットルおよび水100ミリリットルをその粗生成物に加えた。この混合物を攪拌した。その層を除去した後、水性層を更にクロロホルムで抽出した。クロロホルム層を化合し、中性pHになるまで水で洗浄した。次いで、有機層を水400ミリリットル中にNaOH30g(0.75モル)を含む溶液で抽出し、続いて同様に調製したNaOH溶液200ミリリットルで抽出した。その水性抽出物を化合し、200ミリリットルの6NのHClを用いて酸性化し、未使用のクロロホルム400ミリリットルで抽出した。そのクロロホルム層を硫酸ナトリウムで乾燥し、シリカの5cm×5cmのプラグを通過させた。その溶液を除去して、84gの僅かに褐色の固形物を得た。プロトンNMRにより、その生成物の構造を確認した。

30

【0054】

(実施例4) 4,5-ビス-(2'-クロロエトキシ)-2-ヒドロキシベンズアルデヒド

基本的中間体を、実施例2の1,2-ビス-(2'-クロロエトキシ)ベンゼンにアルデヒド官能基を導入するのに用いる方法により調製した。

40

塩化メチレン60ミリリットル中で、実施例3の粗フェノール12.4g(49.4ミリモル)を四塩化チタン16.3ミリリットル(148ミリモル)で処理し、次いで1,1-ジクロロメチルメチルエーテル4.5ミリリットル(50ミリモル)で処理し、基本的中間体5.2g(37%)を得た。この生成物をオイルポンプ真空で昇華させ、融点102~102.5℃を有するクリームホワイト色の結晶4.35gを得た。分光分析により、生成物が基本的中間体であることを確認した。

【0055】

(実施例5) 6,7-ビス-(2'-クロロエトキシ)-3-カルボエトキシクマリン(第1方法)

この方法は、2-ヒドロキシベンズアルデヒドの標準のクネベナーゲル(Knoevenagel)縮合であり、バライア(Balaiah)等のProc.Indian Acad.Sci.第16A号、68~82ページ(1942年)

50

(Chem. Abs. 第37号、1429ページ(1943年)) ; ボーシュ(Borsche)等のChem. Ber. 第85号、198~202ページ(1952年) ; 福井等のBull. Chem. Soc. Japan、第35号、1321~23ページ(1962年) ; の方法をベースとしている。

マロン酸ジエチル (アルドリッチ(Aldrich)) 6.03g(37.6ミリモル)に、実施例4の生成物10g(36ミリモル)を加えて、ゆっくりと混合した。この混合物を、窒素ガス下、蒸気浴で加熱した。溶解後、ピペリジンを2滴加えた。加熱を30分間続けた。次いで、その溶液を冷却し、スラリーが得られるまでエタノールで蒸留した。濾過および風乾後、黄褐色の粉末11.5g(85%)を得た。その融点は102~103.5℃であった。プロトンNMRスペクトルにより、実施例6の生成物が得られたことを確認した。

【0056】

(実施例6) 6,7-ビス-(2'-クロロエトキシ)-3-カルボエトキシクマリン (第2方法)
ビセル(Bissel)のシンセシス(Synthesis)、846~48ページ(1982年)をベースとしたこの方法は、不安定であり、連続的に行えば、低収率となる。1つの有利な点として、実施例3のフェノールから直接、化合物Vを提供し、結果として1段階少なくなる。

実施例3のフェノール0.9g(4ミリモル)をマロン酸ジエチルエトキシメチレン (アルドリッチ(Aldrich)) 0.9ミリリットル(5ミリモル)と混合した。この溶液に1MのZnCl₂のエーテル溶液 (アルドリッチ(Aldrich)) 5ミリリットルを塩化メチレンと共に加えた。この溶液を窒素ガス下で24時間還流し、アスピレーター圧でロータリー蒸留器による減圧下での蒸留により溶媒を除去し、水で冷却した。この混合物をクロロホルムで抽出した。溶離液として塩化メチレンを用いたアルミナの短カラムのクロマトグラフィーにより、生成物0.33g(24%)を得た。プロトンNMRスペクトルにより、その生成物が6,7-ビス-(2'-クロロエトキシ)-3-カルボエトキシクマリンであることを確認した。

【0057】

(実施例7) 6,7-ビス-(2'-ヨードエトキシ)-3-カルボエトキシクマリン (第1方法)
この方法は、対応する4-メチル誘導体に対する米国特許第5,162,525号の実施例3に開示の方法に従った。

実施例5のビス-クロロエトキシクマリン0.75g(2.0ミリモル)およびヨウ化ナトリウム0.9g(6ミリモル)を、アセトン25ミリリットル中で溶解した。溶液を窒素ガス下で2日間還流した。次いで、更にヨウ化ナトリウム0.45gを加えた。その溶液を更に24時間還流した。(アセトンの代わりにメチルエチルケトンを使用すると、総反応時間が約24時間に短縮されることが後でわかった。)最後のヨウ化ナトリウム0.45gを加えた。還流を更に6日間続けた。元の反応容積を保持するのに必要なアセトンを加えた。その溶液を冷却し、真空下で蒸発させた。残渣を、塩化メチレンおよびクロロホルムの混合物で抽出した。その生成物を含むクロロカーボン溶液を10%チオ硫酸ナトリウムで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、ロータリー蒸発器で乾燥するまで蒸発させた。その残渣をエタノールから結晶化し、融点164~166℃の淡黄色粉末0.92g(82%)を得た。その生成物のプロトンNMRスペクトルは、実施例9の生成物のものと一致した。

【0058】

(実施例8) 4,5-ビス-(2'-ヨードエトキシ)-2-ヒドロキシベンズアルデヒド
この実施例により、実施例9のビス-ヨードエトキシクマリン(IV)の2種の別の方法の1種を提供する。

20ミリリットルのアセトンにヨウ化ナトリウム2.21g(14.7ミリモル)および実施例4の生成物1.37g(4.91ミリモル)を溶解した。その溶液を4日間還流した。その後、アセトン10ミリリットルおよび第2のヨウ化ナトリウム(0.73g、2.6ミリモル)を加え、溶液を更に24時間還流した。その溶液を冷却し、濾過した。溶媒をロータリー蒸発器で除去し、残渣をクロロホルムに溶解した。そのクロロホルム溶液を水洗し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を除去し生成物2.05g(89%)を得た。プロトンNMRにより、その生成物の構造を確認した。

【0059】

(実施例9) 6,7-ビス-(2'-ヨードエトキシ)-3-カルボエトキシクマリン (第2方法)

実施例 8 のビス-ヨードエトキシ-ヒドロキシベンズアルデヒド 1.73g (10.8 ミリモル) にマロン酸ジエチル 2.1g (4.6 ミリモル) を加え、この混合物を蒸気浴で加熱した。その混合物が均質となった時、ピペリジンを 2 滴加えた。その混合物を冷却した後、沈殿を形成した。その溶液を数ミリリットルのエタノールで蒸留し、再加熱し蒸気浴で沸騰させた。溶液を冷却後、濾過し沈殿生成物が残留した。その生成物は融点 162~165°C の固形物であった。プロトン NMR により、生成物の構造を確認した。

【0060】

(実施例 10) 6,7-[2.2.2]-クリプタンド-3-カルボエトキシクマリン
対応する 4-メチル誘導体に対する米国特許第 5,162,525 号の実施例 4 に開示の方法を、このクマロクリプタンドを調製するのに用いた。

10

(実施例 7 または実施例 9 の) ビス-ヨードエトキシクマリン 1.0g (1.8 ミリモル) および 1,4,10,13-テトラオキサ-7,16-ジアザシクロオクタデカン (即ち、4,13-ジアザ-18-クラウン-6) を別々に乾燥アセトニトリル 50 ミリリットルに溶解した。混合溶液 (合計 100 ミリリットル) を、5 当量 (0.94g) の無水炭酸ナトリウム存在下、窒素ガス下で 6 日間還流した。反応の間、粗炭酸ナトリウムは微小粉末になった。冷却した反応混合物を濾過し、その溶液を乾燥するまで真空下で蒸発させた。その残渣を塩化メチレンで溶解し、その溶液を濾過した。ロータリー蒸発器を用いたアスピレーター圧、次いでオイルポンプ圧での塩化メチレンの蒸発により、黄色発泡体を得た (計算収率 > 100%)。粗生成物を、未反応出発原料の溶離に塩化メチレンを最初に用い、次いで生成物を溶離するのに 1~5% のエタノール/塩化メチレン混合物を用いた奪活中性アルミナのクロマトグラフィーにより精製した。本質的に所望の生成物 (VII) から成る生成物の計算量の約 50% を回収した。LRMS FAB (トリエタノールアミン) の $C_{28}H_{40}N_2O_{10}$ に対する計算 m/e は 564.27 であるが、実測 m/e は 587 であり、 $[VII-C(Na)]^+$; 遊離 $[VII]^+$ は観察されなかった。UV (塩類を緩衝剤として処理したフォスフェート) λ_{max} = 374nm, 312nm であった。蛍光 (塩類を緩衝剤として処理したフォスフェート) は λ_{ex} = 371nm および λ_{em} = 453nm を示した。更にクロマトグラフィーにより精製した同様に調製した試料の構造をプロトン NMR により確認した。

20

【0061】

(実施例 11) 実施例 10 のクマロクリプタンドの加水分解

実施例 10 の生成物試料 0.25g を 25 ミリリットルの 2N の HCl に溶解し、蒸気浴で 30 分間加熱した。溶解を促進するのに必要なだけ、少量のメタノールを加えた。反応物中の揮発性成分 (即ち、水、過剰の HCl、アルコール類) を最初にロータリー蒸発器を用いたアスピレーター圧、次いでオイルポンプ真空下で穏やかに蒸発させ、パンプキンイエローの固形物の 3-カルボキシクリプタンドクマリン塩酸塩を得た。所望の生成物をプロトン NMR により確認した。

30

【0062】

実施例 12~14 には、他のクマロクリプタンドの調製が開示された。

(実施例 12) 6,7-ビス-(2'-クロロエトキシ)-3-(1'-オキソ-4'-カルボエトキシブチル)クマリン

実施例 5 記載の方法を用いて、エタノール 100 ミリリットル中に実施例 4 の生成物 2.12g (7.60 ミリモル) および 3-オキソ-ピメリン酸ジエチル (アルドリッチ (Aldrich) 社製) 1.76g (7.64 ミリモル) を含む溶液を、蒸気浴で加熱した。約 20 滴のピペリジンを加えた。その混合物を 30 分間還流し、室温まで冷却した。形成された沈殿を濾過により単離し、乾燥し、3.53g (96%) の生成物を得た。生成物の構造をプロトン NMR により確認した。

40

【0063】

(実施例 13) 6,7-ビス-(2'-ヨードエトキシ)-3-(1'-オキソ-4'-カルボエトキシブチル)クマリン

実施例 7 記載の方法を用いて、メチルエチルケトン 300 ミリリットル中に実施例 12 の生成物 3.5g (7.5 ミリモル) および無水ヨウ化ナトリウム 3.4g (23 ミリモル) を含む溶液を加熱し、窒素ガス下で 48 時間還流した。その混合物を室温まで冷却し、溶媒をロータリー蒸発器を用いて真空下で除去した。残渣を約 20 ミリリットルの水で処理した。残留した固形物を

50

濾過により単離し、トルエン中に溶解した。トルエンをロータリー蒸発器を用いて減圧下で除去し、どんな残留水も除去した。生成物を高真空下で乾燥し、4.5g(95%)の所望の生成物を得た。生成物の構造をプロトンNMRにより確認した。

【0064】

(実施例14) 6,7-[2.2.2]-クリプタンド-3-(1'-オキソ-4'-カルボエトキシブチル)クマリン

実施例10記載の方法を以下のように用いた：電磁攪拌機、還流冷却管および窒素ガスバージ源を備えた250ミリリットルフラスコに、乾燥アセトニトリル（45ミリリットル、シリカゲルおよび0.4nmの分子篩で乾燥し、水素化カルシウムから蒸留）に溶解した実施例13の生成物0.79g(1.3ミリモル)を入れた。1当量(0.33g)の4,13-ジアザ-18-クラウン-6を乾燥アセトニトリルの第2の部分(20ミリリットル)に溶解し、この溶液を第1溶液に加えた。反応混合物を70℃に加熱し、炭酸ナトリウム0.62g(5.8ミリモル)を加えた。その溶液を窒素ガス下で7日間還流した。その後、クロロホルム60ミリリットルを加え、溶液を濾過した。

溶媒を除去した後、約1gの黄色の粘着性油を得た。その油にクロロホルム60ミリリットルおよびブライン20ミリリットルを加え、この化合物を混合した。その有機層を除去し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒の除去により、油性生成物0.85gを得た。これを、最初にフラッシュクロマトグラフィーにより酸化アルミニウム粉末の2cm×6cmカラム（溶離液として塩化メチレン70ミリリットルを用いた）を通して精製し、生成物0.65gを通過した。次いで、この材料を、塩化メチレン/ヘキサンの1:2混合物を用いた酸化アルミニウムの第2カラムを注意深く通過させ、粘着性黄色粉末の本質的に純粋な生成物370mg(46%)を得た。

プロトンNMRおよびIR分光分析を用いて、生成物の構造を確認した。UV分光分析（ホスフェートを緩衝剤として処理した塩類）により $\lambda_{\max}$ =382nm、317nmを示した。

【0065】

(実施例15) クマリン誘導体の光安定性の比較

以下のモデル化合物を用いて、クマリン類の3-および4-の位置の官能基変化の相対的光安定性への影響をアクセスする。化合物VIII、IX、XおよびXIのエタノール溶液を、 $0.05 \leq A_{\max} \leq 0.1$ の範囲の吸光度を有するように調製し、各々をSPEX Fluorolog 2TM Series蛍光分析計（ニュージャージー州エジソン(Edison)のスペックス・インダストリーズ(SPEX Industries)社製）により最大光源スリット幅（30nmバンドパス）で、 $\lambda_{\max}$ で、1時間連続的に照射した。試料の測定した励起源の輝度は、30~50mW/cm²の範囲であった。蛍光強度を、各々の放射の最大での照射の間中ずっと監視した。

Xを標準化したデータを以下の表Iに示した。（化合物III、IXおよびXの光安定性は1回の実験で測定し、化合物XIは別の実験で測定したが、比較し易いように結果は組合せて1つの表に示した。）

時間0での強度の差は、その誘導体の相対蛍光効率を反映する。3-カルボエトキシ誘導体(VIII)は優れた光安定性を、4-メチル誘導体(IX)またはカルボキシメチル誘導体(XI)の僅かに改良した蛍光効率と組合せる。

【0066】

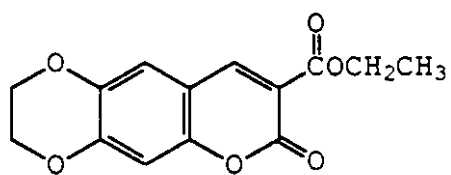
【化9】

10

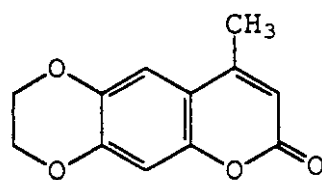
20

30

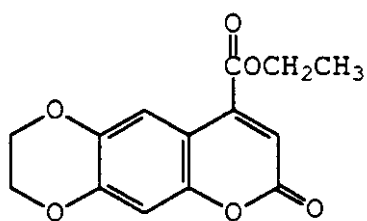
40



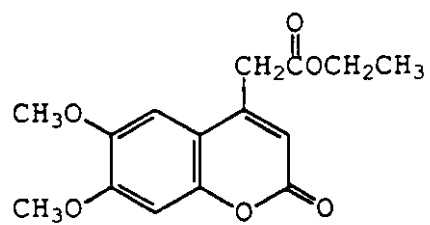
VIII



IX



X



XI

【 0 0 6 7 】

【表 1】

10

20

表 I				
時間 (秒)	クマリン類 VIII~XIの強度			
	VIII	IX	X	XI
0	6.94	6.15	1.00	8.97
120	6.95	5.99	1.00	8.90
240	6.94	5.82	1.00	8.74
360	6.93	5.78	1.00	8.60
480	6.93	5.68	1.00	8.47
600	6.91	5.57	1.00	8.34
720	6.91	5.52	1.00	8.22
840	6.90	5.45	1.00	8.10
960	6.90	5.39	1.00	7.98
1080	6.89	5.28	1.00	7.86
1200	6.88	5.21	1.00	7.76
1320	6.87	5.12	1.00	7.62
1440	6.87	5.04	1.00	7.52
1560	6.86	4.97	1.00	7.42
1680	6.85	4.89	1.00	7.31
1800	6.84	4.81	1.00	7.19
1920	6.84	4.74	1.00	7.09
2040	6.83	4.65	0.99	6.99
2160	6.82	4.55	1.00	6.89
2280	6.81	4.46	0.99	6.79
2400	6.81	4.37	0.99	6.68
2520	6.80	4.27	0.99	6.59
2640	6.79	4.22	1.00	6.50
2760	6.78	4.12	0.99	6.39
2880	6.77	4.05	0.99	6.29
3000	6.77	3.98	1.00	6.20
3120	6.76	3.92	0.99	6.11
3240	6.75	3.85	0.99	6.01
3360	6.74	3.76	0.99	5.92
3480	6.73	3.70	0.99	5.83
3600	6.72	3.64	0.99	5.74

【0068】

(実施例16) 生理学的濃度での $[K^+]$ の変化への実施例10のクマロクリプタンドの応答
 実施例10の生成物の約 $10^{-5}M$ 溶液を、ナトリウムだけのホスフェートを緩衝剤として処理
 した塩類を用いて調製した ($20^{\circ}C$ 、 $pH=7.36$ 、 $[Na^+]=134mM$ 、 $[K^+]=0mM$ 、 $[Cl^-]=64mM$)。
 $[K^+]=0.2M$ のホスフェートを緩衝剤として処理した塩類のアリコート
 を、キューベット内の3ミリリットル溶液に加え、2.4mMの段階の $[K^+]$ を0~12mMまで変化

10

20

30

40

50

させた。各段階で、蛍光放射強度を270nmの励起波長で、400～600nmで測定した。そのデータを、 $[K^+] = 0 \text{ mM}$ および $\lambda = 445 \text{ nm}$ での強度に標準化した。表IIに示した標準化したデータにより、 $[K^+]$ の増加に伴って蛍光強度が規則的に増加していることを示した。 $[Na^+]$ の145mMの増加により、僅かだけ蛍光が変化した。同様の結果が、実施例14の生成物に得られた。

【0069】

【表2】

表II				
λ	[K ⁺]の増加に伴う強度			
	0 mM	2.4 mM	4.8 mM	9.6 mM
400	0.059	0.061	0.060	0.060
410	0.227	0.229	0.238	0.238
425	0.659	0.692	0.707	0.725
430	0.779	0.826	0.861	0.892
445	1.000	1.086	1.135	1.177
450	0.996	1.088	1.144	1.196
460	0.966	1.057	1.102	1.186
470	0.839	0.918	0.971	1.033
480	0.701	0.778	0.809	0.859
490	0.552	0.616	0.648	0.684
500	0.423	0.472	0.506	0.531
510	0.331	0.363	0.392	0.411
520	0.248	0.273	0.293	0.305
530	0.183	0.200	0.220	0.230
540	0.138	0.152	0.155	0.166
550	0.096	0.110	0.121	0.129
560	0.070	0.080	0.087	0.090
570	0.054	0.058	0.063	0.065
580	0.038	0.044	0.048	0.050
590	0.028	0.030	0.037	0.037
600	0.021	0.024	0.028	0.027

【0070】

(実施例17) 分子テザーを有する被覆可能なポリマーの機能化

室温で、1リットルのテトラヒドロフラン(THF)に、1.8%のCOOHを有するポリ塩化ビニル-カルボキシ化(PVC-COOH)ポリマー(アルドリッチ(Aldrich)社製)を溶解した。これに4.9g(3当量)のジシクロヘキシルカルボジイミド(DDC)(アルドリッチ(Aldrich)社製)のTH

10

20

30

40

50

F溶液75ミリリットルを速やかに加えた。その混合物を蓋をしたフラスコ内で室温で30～60分間攪拌した後、72g(10当量)のジェファミン(Jeffamine)ED-900TMビス(2-アミノプロピル)ポリエチレングリコール800(ニューヨーク州ロンコンコマ(Ronkonkoma)のフルカ・ケミカル(Fluka Chemical)社から市販)を活性ポリマー溶液に速やかに加え、濁った溶液/懸濁液を得た。これを、室温で18時間攪拌した。この溶液をロータリー蒸発器(60℃)を用いて約300ミリリットルまで濃縮し、高速攪拌した水(約18リットル)の容器にゆっくりと加えた。(低剪断運動部分、即ち水の渦には、小粒子を避け、容易に濾過および精製し得るポリマー沈殿を用いることが必要である。)

【0071】

ポリマーを水から取り除きプラスチックメッシュシートを用いて濾過し、次いで500ミリリットルのメタノールに懸濁させ再度濾過した。そのポリマーをメタノールに懸濁させ更に2回濾過し、残留水を減じ反応副生成物を除去し、真空下で乾燥した。

そのポリマーを室温で約1リットルのTHFに再溶解し、最初にポリプロピレン濾布を通して、次いでポリプロピレン濾布上のセライト(CeliteTM)545(ペンシルバニア州ピッツバーグ(Pittsburgh)のフィッシャー・サイエンティフィック(Fisher Scientific)社製)ケイ藻土の厚い(3～4cm)パッドを含むポリエチレンブフナー漏斗(350～600ミリリットル)を通して濾過した。クリアな濾液を集め、60℃でロータリー蒸発器を用いて200ミリリットルまで濃縮した。

ポリマー水溶液の再沈殿およびポリマーの濾過を、前述のように行った。水中でのポリマーの細断(ブレンダー使用)を、減圧乾燥前の最終段階として行った。

【0072】

機能化ポリマーフィルムの赤外スペクトルにより、その反応を確認した(即ちC=O基を特徴付ける1720cm⁻¹の吸収の消失)。そのポリマーのゲル浸透クロマトグラフィーにより、分子量はPVC-COOH出発原料から本質的に変化しなかったことを示した(即ち、PVC-COOHロットにより160,000～220,000)。

サリン(Sarin)等のAnal.Biochem.第117号、147ページ(1981年)に開示の方法は以下のように、(ビス(2-アミノプロピル)ポリ(エチレングリコール)から)有効第1アミン濃度を決定することに適合した。試験管内の乾燥ポリマー試料20mgに、(a)フェノールおよびKCNのピリジン溶液0.40ミリリットルおよび(b)ニンヒドリンのエタノール溶液0.10ミリリットル(両方とも本明細書中に記載したように調製)を加えた。試験ブランクを同様に調製した。両方の試験管を100℃で約10分間加熱した。両方を冷水浴中で冷却し、それぞれにテトラヒドロフラン(THF)2ミリリットルを加えた。試験管内容物を移し、25ミリリットルフラスコに分離した後、THFで25ミリリットルに希釈した。1.2×10⁴M⁻¹cm⁻¹の吸光係数でのUV分光分析法(λ_{abs}=604nm)により、ニンヒドリン濃度を決定した。このことから、有効アミン濃度がポリマーの0.2ミリモル/gであることがわかった。

【0073】

(実施例18) 化合物VIIの被覆可能ポリマーへの結合

実施例17のPVC/ビス(2-アミノプロピル)ポリ(エチレングリコール)試料200mgをジメチルホルムアミド(DMF)に溶解した。DMF2ミリリットル中に加水分解したVIIを50mg(約90マイクロモル)を含む第2の溶液も調製した。第2の溶液に、ジイソプロピルカルボジイミド(アルドリッチ(Aldrich)社製)42マイクロリットル(0.27ミリモル)およびヒドロキシベンジルチアゾール(アルドリッチ(Aldrich)社製)40mg(0.27ミリモル)を加え、この混合物を約20分間攪拌し、第1の溶液に加えた。(第2の溶液を入れたフラスコを1ミリリットルのDMFで洗浄し、完全に移した。)

化合した混合物にジイソプロピルエチルアミン(アルドリッチ(Aldrich)社製)50マイクロリットル(0.27ミリモル)を加えた。これを窒素ガス雰囲気下、暗室で一晩攪拌した。その溶液容積を40℃でロータリー蒸発器により減じた。濃縮溶液を、200ミリリットルの水に攪拌しながら徐々に加えた。80メッシュスクリーン上で水性懸濁液を注ぐことにより、綿状の沈殿を収集した。その沈殿を、水で4回洗浄し、メタノールで3回洗浄した。沈殿を安全剃刀の刃でより細かいピースに細断した後、更にメタノールで3回洗浄した。機

10

20

30

40

50

能化したポリマーを減圧乾燥した。

試薬としてニンヒドリンを使用したカイザー (Kaiser) 等の Anal. Biochem. 第34号、595ページ (1970年) に開示の方法では、結合したビス (2-アミノプロピル) ポリ (エチレングリコール) のアミン基の95%以上が、おそらくVIIとの結合に、消費された。

【0074】

(実施例19) 多孔性膜上への機能化ポリマーの被覆

THFおよび水の90/10 (v/v) 混合物中に実施例18の機能化ポリマーを含む2% (w/w) 溶液を、6インチ幅のスロット供給ナイフダイを用いて、親水性多孔質ポリプロピレン (W092/0789 9参照) のロール (27.9cm幅、79 μ m厚) 上に押出被覆した。(HPPPウェブは最大孔径1.3 μ m および多孔度77%を有する。) ウェブ速度は3m/分で、溶液押出量は67ミリリットル/分 10

であった。被覆ウェブを空気浮遊オープン (15.6°C) を通過させて溶媒を蒸発した。得られた乾燥被覆重量は約2.5g/m²であった。

0~8mMのK⁺溶液への浸漬および百分率応答の計算により、不整機能化ポリマー被膜が、ダイと接触した膜側に加えた主材料を有するHPPPウェブの内部孔表面積中に分布することを示した。

【0075】

(実施例20) 被覆膜の試験

実施例19の被覆HPPP膜から、円形ディスクを打ち抜いた。これらを用いて、検出複合材料の可逆性、pH依存性および安定性 (緩衝剤中および血液中の両方) を評価した。 20

【0076】

(可逆性)

カリウムイオン濃度変化に対するセンサーの可逆性を、395nmで励起源を供給し、440nm以上の波長で蛍光を検出したCDITMS400モニター (カリフォルニア州タスチン (Tustin) の CDI / 3Mヘルス・ケア (Health Care) 社製) を用いてセンサー蛍光強度を測定することによって決定した。約138mMのNaClを含む、50mMのN-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(エタンスルホン酸)緩衝剤 (ミズーリ州セントルイス (St. Louis) のシグマ・ケミカル (Sigma Chemical) 社製) (以下HEPESで表す) を速やかに循環することによってカリウムイオン濃度を変え、それには [K⁺] を2、4、6または8mMとするに十分なKClを加えた。(分析試料K⁺濃度変化に対する) 実際のセンサー応答時間は短い (即ち、約30~120秒) けれども、平衡の8分後に蛍光強度を測定した。これら測定結果を表IIIに示した。 30

【0077】

【表3】

表III

時間 (分)	[K ⁺]	蛍光強度		
		ディスク 1	ディスク 2	ディスク 3
0	2	724	700	676
8	4	748	720	695
16	8	762	734	711
24	8	770	743	720
32	6	763	736	712
40	4	748	722	698
48	2	722	700	678

10

【0078】

表IIIにより、実施例19のように調製したセンサーは、バイパス手術の間に通常測定されるもの(即ち、3～6 mM)より多いカリウムイオン濃度変化に関して可逆性を有することを示した。

【0079】

(pH依存性)

K⁺濃度2、4および6 mMでの前述のHEPES緩衝剤のpHの関数としてのセンサー蛍光強度の変化を、CDITMS400モニターを用いて測定した。これら測定結果を表IVに示した。

【0080】

【表4】

20

30

表IV

時間 (分)	様々な [K ⁺] でのセンサー強度		
	2 mM	4 mM	6 mM
7.07	356	373	398
7.34	346	366	391
7.48	339	366	386
7.69	334	363	385
7.90	326	353	380

40

【0081】

表IVには、実施例19のようにして調製したセンサーはpHの変化、特に生理学的pH範囲内、に伴って([K⁺]の変化に対する)応答が少し変化することを示した。更に、特に生理学的pH範囲(即ち、約7.3～7.5)および生理学的カリウムイオン濃度(即ち、約4 mM)で

50

のセンサーの蛍光強度変化は、 $\text{pH}=7.07\sim\text{pH}=7.90$ で観察された総蛍光変化の約2%となった。このことは、非PVCマトリックスに結合した同様のクマロクリプタンドに対する約6%以上の pH 依存性、および同一 pH 領域を有する水性緩衝剤溶液内の非固定クマロクリプタンドに対するより大きな依存性に匹敵する。

【0082】

(安定性)

検出複合材料の安定性を、緩衝剤溶液中、および血液中の両方について測定した。

A. 緩衝剤

AVL 9120TMナトリウム/カリウムアナライザー（ジョージア州ロスウェル(Roswell)のAVLサイエンティフィック(Scientific)社製）により測定した、約138mMのNaClを含むHEPESを、LaudaTMRC20サーモスタット調温水浴（独国のLauda Dr.R.Wobser GmbH & Co.KG製）内で24°Cの一定温度に保持し、13400型蠕動ポンプ（ミシガン州アナーバー(Ann Arbor)のサーンズ(Sarns)/3Mヘルスケア(Health Care)製）によりセンサーループを通して循環した。7～8の範囲の溶液の pH を、OrionTM pH メーター（マサチューセッツ州カンブリッジ(Cambridge)のオリオン・リサーチ(Orion Research)製）で監視した。285～305mOsmの範囲の溶液の浸透性を、アドバンスド・ワイドレンジ・オスモメーター(Advanced Wide-Range Osmometer)3W2TM（マサチューセッツ州ニーダムハイツ(Needham Heights)のアドバンスド・インスツルメント(Advanced Instrument)社製）で測定した。緩衝剤溶液の $[\text{K}^+]$ をIL 643TMフレイム光度計（マサチューセッツ州レクシングトン(Lexington)のインスツルメンタル・ラボラトリーズ(Instrumental Laboratories)製）にを用いて測定した。

【0083】

2組の $[\text{K}^+]$ 「段階(step)」実験を（両方とも室温で）行った。最初に、 $[\text{K}^+]$ を0～8mMの範囲で変化させた。実施例19記載の検出複合材料を0mMのKCl溶液で平衡にし、8mM溶液に浸漬し、その結果、検出複合材料を次の $[\text{K}^+]$ で5～10分間平衡にし得た（完全な平衡はほとんど短時間であったけれど）。5時間にわたって、このプロセスを5回繰り返した。両方の溶液の蛍光強度（即ち、CDITMS400モニターを用いて測定して、0mM溶液で約488カウントおよび8mM溶液で約567カウント）は試験時間中実質的に変化しなかった。

【0084】

第2「段階(step)」の実験には、IL 643TMフレイム光度計を用いて測定した、バイパス手術において通常遭遇する濃度範囲である3～7mMの $[\text{K}^+]$ を含む。検出複合材料を3mMのKCl溶液を用いて平衡にし得、7mM溶液に浸漬し、その結果、検出複合材料を数分間、（完全な平衡は約90秒間以内であったけれども）他の $[\text{K}^+]$ で平衡にし得た。約3時間半にわたって、このプロセスを5回繰り返した。両方の溶液の蛍光強度（即ち、CDITMS400モニターを用いて測定して、3mM溶液で約647カウントおよび7mM溶液で約677カウント）は試験時間中実質的に変化しなかった。

【0085】

B. 血液

前項記載のように、牛の血液を138mMの $[\text{Na}^+]$ および300mOsmの浸透性に調節した。前述のように、KClの添加により、約3～9mMのカリウムイオン濃度を得た。2.8% CO_2 、5.5% O_2 、91.7% N_2 のガス組成を連続分散することにより、ABL-4TM血液ガスアナライザー（デンマーク、コペンハーゲン(Copenhagen)のラジオメーター(Radiometer)A/S製）を用いて測定して、血液の pH を約 7.34 ± 0.02 に保持した。その血液溶液を調温した水浴に貯蔵し、試験用ループに誘導した後、蠕動ポンプ（前項参照）により循環した。そのセンサーを、CDITMS400カセットおよびCDITM6730型クイックセル(Quick-cell)血液ガス監視ユニット、3/8インチサイズ（CDI/3Mヘルスケア(Health Care)製）に固定した。

【0086】

2種の $[\text{K}^+]$ の溶液を入れ換えるため、3mM溶液を用いて初期センサー強度を得、その試験ループを空にし、9mM溶液を直接誘導した。このプロセスを逆にするとき、その試験

ループを $[K^+] = 3 \text{ mM}$ の洗浄溶液で濯ぎ、 3 mM 試験溶液の混入を防いだ。（この洗浄プロセスによりそのセンサーを、血液溶液入れ換えの間、空気にさらし、それによりセンサー応答時間を増加した。 8 mM の K^+ を含む HEPES 緩衝溶液内でそのセンサーを水和すること、およびトリトン (TritonTM) X-100 または トウィーン (TweenTM) 80（両方ともアルドリッチ (Aldrich) 社から市販）、おそらく内用薬用途に対する認可により後者、により安定なセンサー強度を示す。）

【0087】

血液溶液入れ換えの間に中間洗浄浴を使用することなく、 $[K^+]$ が 3 から 9 mM となる時の応答時間 (95%) は約 40 秒であり、 9 から 3 mM となる時の応答時間は約 65 秒であった。

【0088】

センサーは、約 5 時間に渡って良好な安定性を示した。 9 mM 溶液により試験過程の間中に、その強度は若干減少（即ち、約 5 カウント）したが、このことは、入れ換えた 3 mM 溶液によるこの溶液の溶離によるものであると考えられる。

【0089】

本発明の範囲および意図から逸脱することなく、本発明の様々な修飾および変更が当業者間では明らかである。本発明は、本明細書中に例示された実施例により不当に限定するものであると解されるべきではない。

フロントページの続き

- (72)発明者 キャリー・アラン・キプケ
アメリカ合衆国55144-1000ミネソタ州セント・ポール、スリーエム・センター（番地の表示なし）
- (72)発明者 ミッチェル・アラン・ロスマン
アメリカ合衆国55144-1000ミネソタ州セント・ポール、スリーエム・センター（番地の表示なし）
- (72)発明者 マサオ・ヤフソ
アメリカ合衆国カリフォルニア州タスティン、シーディアイ・スリーエム・ヘルス・ケア（番地の表示なし）
- (72)発明者 サンジャイ・ラックスマン・パティル
アメリカ合衆国55144-1000ミネソタ州セント・ポール、スリーエム・センター（番地の表示なし）

審査官 谷尾 忍

- (56)参考文献 特表平02-501481 (JP, A)
特開昭58-134097 (JP, A)
Otto A. GANSOW et al., "Synthesis and Characterization of Some Bifunctional 2B:2:1 Cryptands", J. Heterocyclic Chem., 1981年 3月, Vol.18, p.297-302
Akira TAKADATE et al., "Crowned-coumarin as a new fluorescence derivatization reagent for carboxylic acids", Chemistry Letters, 1993年 5月 5日, No.5, p.811-14
- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C07D498/18
CA(STN)
REGISTRY(STN)