

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4199830号
(P4199830)

(45) 発行日 平成20年12月24日 (2008. 12. 24)

(24) 登録日 平成20年10月10日 (2008. 10. 10)

(51) Int. Cl. F I
CO7F 9/12 (2006.01) CO7F 9/12
GO1N 21/76 (2006.01) GO1N 21/76

請求項の数 15 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願平10-521531	(73) 特許権者	ルミゲン インク
(86) (22) 出願日	平成9年11月7日 (1997. 11. 7)		アメリカ合衆国 ミシガン 48033
(65) 公表番号	特表2000-506544 (P2000-506544A)		サウスフィールド ウェスト エイト マ
(43) 公表日	平成12年5月30日 (2000. 5. 30)		イル ロード 22900
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/019618	(74) 代理人	弁理士 本多 一郎
(87) 国際公開番号	W01998/019989		アクハヴァン-タフティ, ハシム
(87) 国際公開日	平成10年5月14日 (1998. 5. 14)	(72) 発明者	アメリカ合衆国 ミシガン 48116
審査請求日	平成16年10月29日 (2004. 10. 29)		ブライトン ジョンズ ドライヴ 210
(31) 優先権主張番号	08/748, 107		7
(32) 優先日	平成8年11月8日 (1996. 11. 8)	(72) 発明者	アルガヴァニ, ザラ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ミシガン 48116
			ブライトン ジョンズ ドライヴ 210
			7

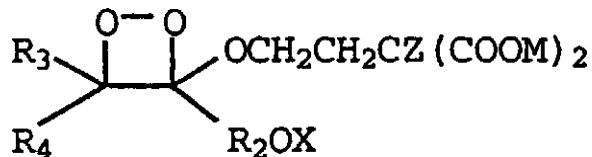
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善された保存安定性を有する水溶性トリ置換 1, 2-ジオキセタン化合物、合成方法と中間体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

増大した保存安定性を有し、式：



〔式中、 R_3 、 R_4 は、ヘテロ原子によって任意に置換でき且つジオキセタン環にスピロ融合して環式の又は多環式の環基を形成するために任意に共に接合できる非環式の、環式の及び多環式の有機の基からなる群から各々選択され、

式中、 R_2 は、付加的な置換基を含めることができるフェニル及びナフチル基からなる群から選択されるアリール環基であり、

式中 Z は、フッ素原子と 1 - 4 炭素アルキル基からなる群から選択され、

M は、水素、アルカリ金属イオン又は第四級アンモニウム又はホスホニウムイオンから選択され、

式中 X は光を生成するための活性化剤によって除去可能な保護基である〕

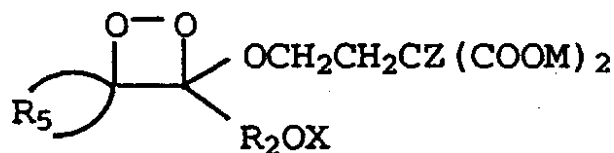
を有するジオキセタン。

【請求項 2】

増大した保存安定剤を有し、式：

10

20



[式中、 R_5 は、ジオキセタン環にスピロ融合され且つ6から30までの炭素原子を含有し且つ付加的な置換基を任意に含むことができる環式及び多環式アルキル基からなる群から選択され、

式中、 R_2 は、付加的な置換基を任意に含めることができるフェニル及びナフチル基からなる群から選択されるアリール環基であり、

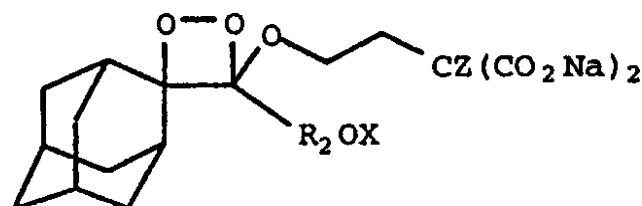
式中Zは、フッ素原子と1 - 4炭素アルキル基からなる群から選択され、

Mは、水素、アルカリ金属イオン又は第四級アンモニウム又はホスホニウムイオンから選択され、

式中Xは光を生成するための活性化剤によって除去可能な保護基である]

【請求項3】

式：



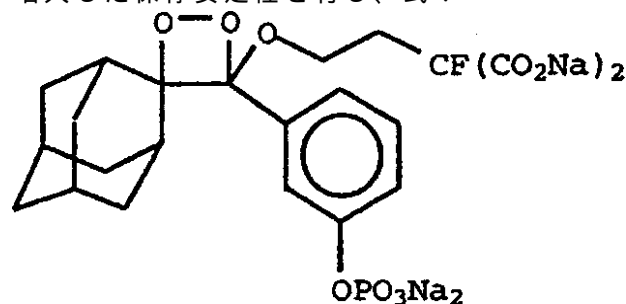
を有する請求項2記載のジオキセタン。

【請求項4】

式中、OX基が、 O^-M^+ 基 [ここでMは水素、アルカリ金属イオン、第四級アンモニウム、及び第四級ホスホニウムイオンからなる群から選択される]、 $OCOR_8$ 基 [ここで R_8 は、炭素原子2から8を含み且つヘテロ原子を任意に含むアルキル及びアリール基からなる群から選択される]、 OPO_3^{2-} 塩、 OSO_3^- 塩、 β -D-ガラクトシドキシ、及び β -D-グルクロニジロキシ基からなる群から選択されることを特徴とする請求項1，2又は3のいずれか1項記載のジオキセタン。

【請求項5】

増大した保存安定性を有し、式：



のジオキセタン。

【請求項6】

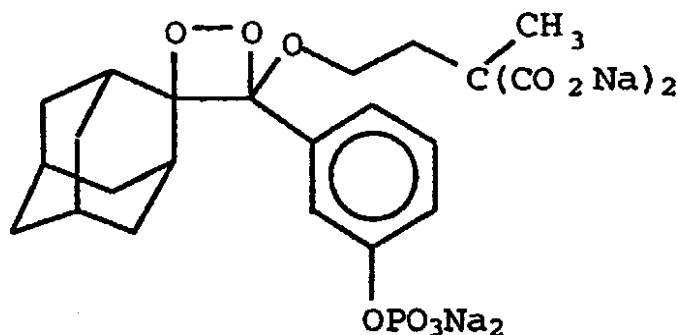
増大した保存安定性を有し、式：

10

20

30

40



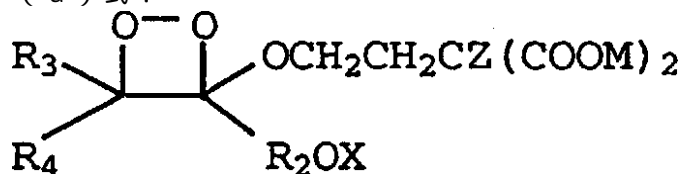
のジオキセタン。

10

【請求項 7】

増大した保存安定性を有し、水性溶媒中に、

(a) 式：



[式中、 R_3 と R_4 は、ヘテロ原子によって任意に置換でき且つジオキセタン環にスピロ融合して環式の又は多環式の環基を形成するために任意に共に接合できる非環式の、環式の及び多環式の有機の基からなる群から各々選択され、

20

式中、 R_2 は、付加的な置換基を含めることができるフェニル及びナフチル基からなる群から選択されるアリール環基であり、

式中 Z は、フッ素原子と1 - 4 炭素アルキル基からなる群から選択され、

M は、水素、アルカリ金属イオン又は第四級アンモニウム又はホスホニウムイオンから選択され、

式中 X は光を生成するための活性化剤によって除去可能な保護基である]

を有する安定なジオキセタン；及び

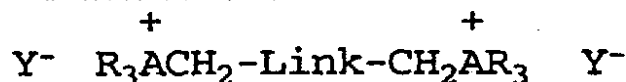
(b) 増強剤の不在において生成される量に比べてジオキセタンと活性化剤との反応によって生じる光の量を増加させる非ポリマーのカチオン性増強物質、

30

を備える光生成用組成物。

【請求項 8】

上記増強物質が、式：



[式中、 A のそれぞれは、 P と N 原子からなる群から独立して選択され、

式中、 $Link$ は、置換又は非置換アリール、アルキル、アルケニル及びアルキニル基からなる群から選択される少なくとも2つの炭素原子を含む有機の結合基であり、且つ $Link$ はヘテロ原子を任意に含むことができ、

式中 R_3 は1 から20 炭素原子を含有する低級アルキル又はアラルキルから選択され、且つ

40

式中 Y はアニオンである]

の2 カチオン性表面活性剤である請求項 7 記載の組成物。

【請求項 9】

上記増強物質が、式：



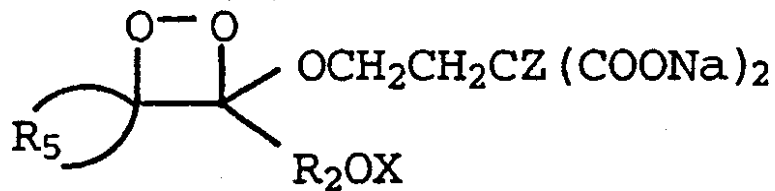
[式中、 $Link$ はフェニレンである]

を有する二カチオン性界面活性剤である請求項 7 記載の組成物。

50

【請求項 10】

ジオキセタンが、式：



〔式中、 R_5 は、ジオキセタン環にスピロ融合され且つ6から30までの炭素原子を含有し且つ付加的な置換基を任意に含むことができる環式及び多環式アルキル基からなる群から選択される〕

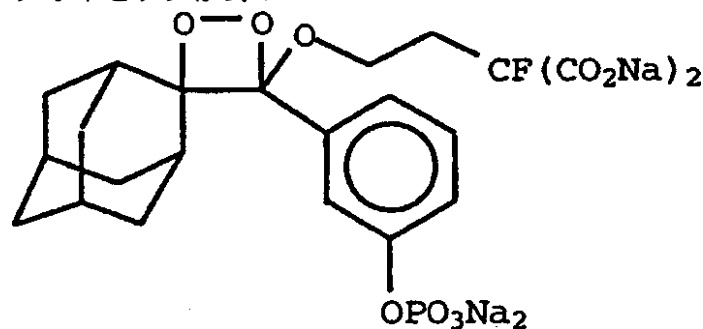
を有するジオキセタンである請求項7，8又は9のいずれか1項記載の組成物。

【請求項 11】

R_5 が、アダマンチル基と置換されたアダマンチル基からなる群から選択される請求項10記載の組成物。

【請求項 12】

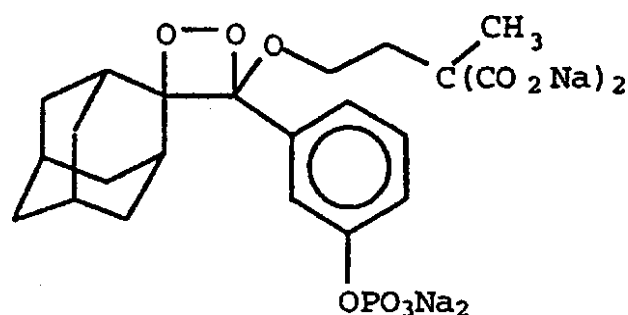
ジオキセタンが式：



を有する請求項10記載の組成物。

【請求項 13】

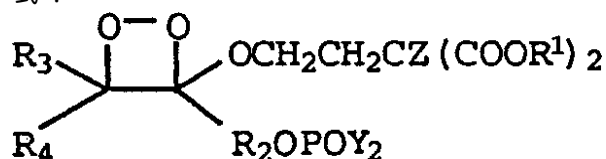
ジオキセタンが式：



を有する請求項10記載の組成物。

【請求項 14】

式：



〔式中、 R_3 と R_4 は、ヘテロ原子によって任意に置換でき且つジオキセタン環にスピロ融合して環式の又は多環式の環基を形成するために任意に共に接合できる非環式の、環式の及び多環式の有機の基からなる群から各々選択され、

式中、 R_2 は、付加的な置換基を含めることができるフェニル及びナフチル基からなる群から選択されるアリール環基であり、

式中Zは、フッ素原子と1-4炭素アルキル基からなる群から選択され、

式中各 R' は1-4炭素のアルキル基であり、

10

20

30

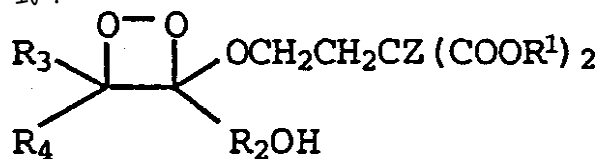
40

50

各 Y はハロゲン原子、置換したまたは非置換のアルコキシ、アリールオキシ、アラルキルオキシ、及びトリアルキルシリルオキシ基から選択される]
を有するジオキセタン。

【請求項 15】

式：



[式中、 R_3 と R_4 は、ヘテロ原子によって任意に置換でき且つジオキセタン環にスピロ融合して環式の又は多環式の環基を形成するために任意に共に接合できる非環式の、環式の及び多環式の有機の基からなる群から各々選択され、

式中、 R_2 は、付加的な置換基を含めることができるフェニル及びナフチル基からなる群から選択されるアリール環基であり、

式中 Z は、フッ素原子と 1 - 4 炭素アルキル基からなる群から選択され、

式中各 R' は 1 - 4 炭素のアルキル基である]

を有するジオキセタン。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

(1) 発明の分野

本発明は、1, 2 - ジオキセタン (1,2-dioxetane) を総括的に安定化させるための且つ化学ルミネッセンスを生起するための、酵素を含む、化学試薬によって誘発される (triggered) ことのできる化合物に関する。ジオキセタンは、アルコキシ置換基の部分である 1 つ又はそれ以上のイオン化可能基を含有する。該ジオキセタンは、該ジオキセタンの保存安定性を改善する該アルコキシ置換基上の水素原子の一つを置換してフッ素原子又は低級アルキル基を更に含む。本発明は、特に、そのようなジオキセタンの合成方法に更に関係する。

本発明の合成方法によって作製されるジオキセタンは、該ジオキセタン、カチオン性界面活性剤及び誘発される化学ルミネッセンスの量を増強する付加的な蛍光体 (fluorescer) とを含む組成物において利用される。本発明のジオキセタンと増強された組成物は、発光 (化学ルミネッセンス) のための方法において、及び分析物の存在又は量を検出するための分析方法において利用される。重要なことは、該イオン化可能な基がより水溶性のジオキセタンとすることができ、且つカプセル化学分析システムにおける予期しない化学的な繰り越し (carryover) の問題を解消し、同時にフッ素原子又は低級アルキルの存在がジオキセタンの保存安定性を改善する。

(2) 関連技術の開示

a . 酵素的に誘発可能なジオキセタン。酵素的に誘発可能 (triggerable) なジオキセタンの第 1 の実施例は、米国特許出願 (A.P.Schaap, 米国特許出願第 887,139 号) と連続出版物 (A.P.Schaap, R.S.Handley, and B.P.Giri, Tetrahedron Lett., 935 (1987); A.P.Schaap, M.D.Sandison, and R.S.Handley, Tetrahedron Lett., 1159 (1987) 及び A.P.Schaap, Photochem.Photobiol., 47S 50S, (1988)) 中に開示されている。アリールオキシド置換基で保護されて生じる高度安定アダマンチル-置換ジオキセタンは、ジオキセタンの分解の割合を劇的に増加する強力な電子ドナー化アリールオキシアニオンを与えるための酵素と水性緩衝液の両方の作用によって光の放射を伴って分解するのを誘発する。その結果、化学ルミネッセンスは、ジオキセタンの保護された形態の緩やかな熱分解から生じるより高い規模の幾つかのオーダーの強さで放出される。Scaap による米国特許第 5,068,339 号は、蛍光体 (fluorescer) へのエネルギー転移を経て化学ルミネッセンスを増大する結果となる蛍光体基に共有結合される酵素的に誘発可能なジオキセタンの分解が記載される。Bronstein による米国特許第 5,112,960 号と 5,220,005 号及び PCT 出願 (WO88/00695) には、アダマンチル基で置換されて生じる誘発可能なジオキセタンが記載されている。Edwards によ

10

20

30

40

50

る米国特許第4,952,707号には、ホスフェート置換ジオキセタンが開示される。BronsteinによるPCT出願(WO94/26726)には、酵素標識OX基とアリール環上の付加的な基で、非共役位置が置換されたフェニル又はナフチル基を生じるアダマンチルジオキセタンが記載される。

他の誘発可能なジオキセタンは、WangによるPCT出願(WO94/10258)中に記載される。Wangの中に記載されたジオキセタンは、モノ-置換及びフェニル-OX基で置換して良いアルコキシ基を含む、ここで1又はそれ以上の非-水素基は誘発可能なOX基に加えてベンゼン環置換基上にある。

ジオキセタンは、芳香族カルボン酸、典型的にはヒドロキシ安息香酸又はヒドロキシナフトエ酸の又はその他のヒドロキシアリールケトンのメチルエステルを備える光放出性カルボニル化合物を生成する先の公知文献全てが記載される。

本出願人により1995年7月31日付で提出された米国同時継続出願第08/509,305号('305出願)は、水溶性の改善が示され且つ参考によってここに完全に合併されるヒドロキシジオキセタン(hydroxy dioxetane)である、二置換ジオキセタンが開示される。

b. 誘発可能なジオキセタンからの化学ルミネッセンスの界面活性剤による増強。アンモニウム界面活性剤と蛍光体とを含む水溶性物質の存在における安定な1,2-ジオキセタンの酵素-誘発分解からの化学ルミネッセンスの増強は報告されている(A.P.Schaap,H.AkhavanとL.J.Romano,Clin.Chem.,35(9),1863(1989))。蛍光体ミセルは、ヒドロキシ-置換ジオキセタンを介在してセチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)と5-(N-テトラデカノイル)アミノ-フルオレセインを備え、且つエキサイト状態のエステルのアニオン性形態からミセルの疎水性包囲体内部のフルオレセインへのエネルギーの効率的な移動の効力により多量に生じる化学ルミネッセンスの400倍の増加に至る。

Schaapによる米国特許第4,959,182号及び5,004,565号中には、第四級アンモニウム界面活性剤CTABによって形成されるミセルの存在において安定なジオキセタンの化学的及び酵素的な誘発から化学ルミネッセンスの増強の付加的な実施例が記載される。蛍光体ミセルはまた、ヒドロキシ-及びアセトキシ-置換ジオキセタンの塩基-誘発分解からの光放出も増加する。

Voytaによる米国特許第5,145,772号は、ペンダント状第四級アンモニウム基単独又はフルオレセインとの混合物と共にポリマーの存在中で1,2-ジオキセタンから酵素的に生成する化学ルミネッセンスの増強を開示する。他の物質は、ウシアルブミンと第四級アンモニウム界面活性剤のような球状タンパク質を含む化学ルミネッセンスの増強が報告される。別なカチオン性ポリマー化合物は、化学ルミネッセンス増強剤として不十分な効果であり、非イオン性ポリマー化合物は一般に効果が無く、且つアニオン性ポリマーは、光放射を有意に減少させる。BronsteinによるPCT出願(WO 94/21821)は、増強添加物と共に前記のポリマー性の第四級アンモニウム界面活性剤増強物の混合物の使用を開示する。

CTABの存在においてピラニンによる増強と非誘発ジオキセタンの触媒作用は開示される(Martin Josso,Ph.D.Thesis,Wayne State University(1992),Diss.Abs.Int.,Vol.53,No.12B,p.6305)。

Akhavan-Taftiによる米国特許第5,393,469号は、蛍光エネルギー受容体で任意に置換されたポリマーの第四級ホスホニウム塩の存在において1,2-ジオキセタンから酵素学的に生成される化学ルミネッセンスの増強を開示する。

欧州特許出願第94108100.2は、2カチオン性ホスホニウム塩の存在中で1,2-ジオキセタンから酵素学的に生成される化学ルミネッセンスの増強を開示する。誘発可能なジオキセタンからの化学ルミネッセンスの増強のためのアニオン性の蛍光体と2カチオン性増強剤の組合せを開示するものはない。本発明のタイプの置換されたジオキセタンの増強の実例がないことは報告されている。

c. 水溶性を改善した誘発可能なジオキセタン。酵素学的に誘発可能なジオキセタンは、免疫アッセイ、遺伝子発現実験、ウエスタンブロット法、サザンブロット法、DNA配列及び感染性剤中の拡散配列の同定を含む各種の適用における標識酵素のための基質として広範囲に及び使用を現に経験している。これらの化合物の使用が成長するにも関わらず、幾

10

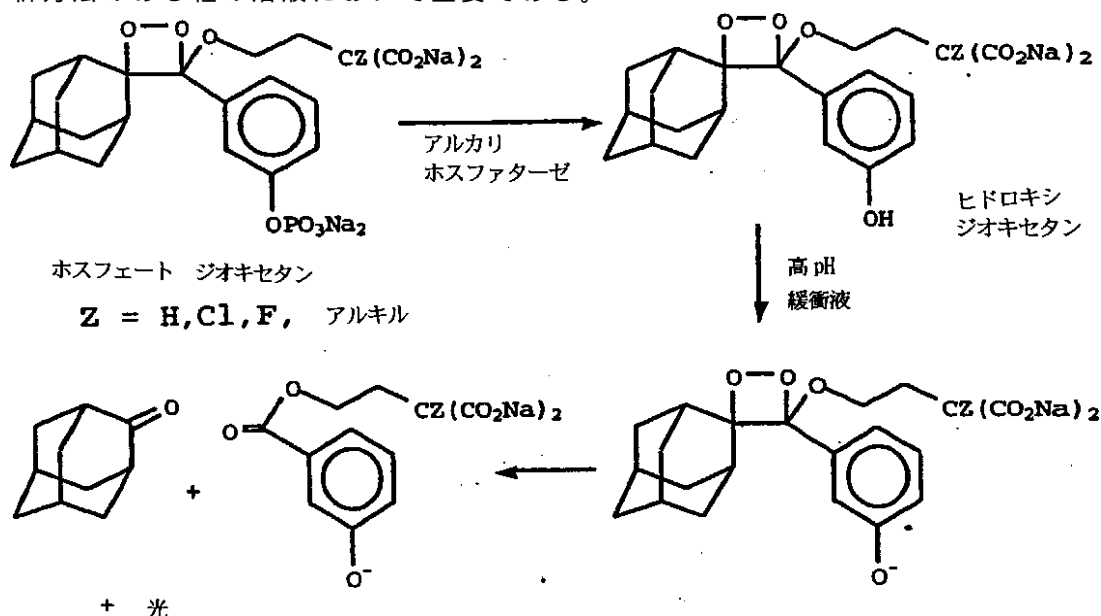
20

30

40

50

つかの分析方法においてこれらの使用が制限されている。保護を外した形態のヒドロキシジオキセタンである誘発可能なジオキセタンは、より水溶性であることが望まれる。後述の構造において示す通り、それは、水性溶液中に高度に溶解するアルカリホスファターゼによってジオキセタンリン酸エステルの脱リン酸化によって形成されるヒドロキシジオキセタン、及び化学ルミネッセンス増強物質を含む組成物であることが殊に望ましい。そのようなジオキセタンと組成物は、加水分解酵素の検出又は加水分解酵素の接合のための分析方法のある種の溶液において重要である。



本発明の更なる背景として、且つ後述の実施例においてより完全に説明するように、カプセル化学分析 (capsule chemistry analysis) の原理に基づく自動化された装置の使用を実行するアッセイにおける通常の化学ルミネッセントジオキセタン試薬の使用は、一つの流体画分から他方への試薬の繰り越し (carryover) の結果を生じ、潜在的に精密でない測定、間違った結果、及び非-再現性のために不正確となることが見出されている。カプセル化学分析は米国特許第5,399,497号中に開示され、ここに参考により完全に合併される。繰り越し問題に打ち勝つための他の可能性のある手段の中で、ヒドロキシジオキセタンの水溶性の改善、特にカプセル化学分析システムの隣接した流体分画内に介在するこのルミネッセント反応の排除又は最小限の繰り越し能力が要求されている。

何らかの可溶化基を併合していない市販品使用におけるジオキセタン化合物には、アルコキシ基が付加される。そうした、これらのジオキセタンは繰り越しゼロが要求される分析方法への使用が好ましくない。ジオキセタンへの可溶化基の併合の示唆はなされている (米国特許第5,220,005号)。アダマンチル置換基上に置換されるカルボキシ基を持つジオキセタンがクレームされているが、しかしながらそのようなジオキセタンの調製は記載がない。重要なことは、何らかのジオキセタン可溶性及び他の特性に関してカルボキシ基に付加される効果が記載がないことである。どれほど多くの可溶化基が要求され又は個々の有効な能力が授与されるか、当該分野における教示は無い。光の放出を起こす又は他方では光の生成を妨げる保護基の除去を妨げる可溶化基の使用は、価値がないものであろう。同様のルミネッセント反応の間に除去されるであろう可溶化基は利用できないであろう。本出願人による同時継続出願 '305において、一つのイオン性可溶化基の併合はホスフェートジオキセタン (phosphate dioxetane) の脱リン酸化によって生成したヒドロキシジオキセタンに関連付けられる繰り越し問題を排除するためには不満がある。ヒドロキシジオキセタンが高い水溶性となるホスフェートジオキセタンとそのようなホスフェートジオキセタンを含有する増強された組成物が、この問題の解消に提供される。それは、繰り越し問題に対する解決を提供するジオキセタンは、室温での不十分な保存安定性 (storage stability) を示すことを次に発見した。かくして、ヒドロキシジオキセタンの高い可溶性と長期の保存安定性の両方を有するジオキセタンは当該分野で知られていない。

本出願人による、08/748,107出願は、フッ素原子又は低級アルキル基による２つのイオン性可溶化基を生じるアルコキシ基上の水素原子の置換がこれらのジオキセタンの保存安定性を劇的に改善することを開示する。本発明において、改善された製造方法、それに用いる中間体 (intermediates) も同じく開示する。

目的

水性溶液中で高度に溶解される、誘発酵素の作用で形成されるヒドロキシジオキセタン生成物である、改善された保存安定性を持つ酵素的に誘発される１，２－ジオキセタンを提供することが、本発明の目的である。優れた保存安定性を提供するジオキセタン構造のアルコキシ置換基に配置されるフッ素原子又は低級アルキル基の何れか一方と２つ又はそれ以上の水-可溶化イオン基とで置換された１，２－ジオキセタンを提供することが本発明の第２の目的である。２つ又はそれ以上のイオン性の水-可溶化基を持つフッ素又は低級アルキル基-置換ジオキセタン、非ポリマーのカチオン性増強剤および増強された化学ルミネッセンスの提供のための、任意な蛍光体とを備える組成物を提供することが本発明の更なる目的である。カプセル化学分析システムを実行するアッセイにおいて使用する場合に、試薬繰り越しの問題を排除するとともに延長された保存安定性を有するジオキセタンと組成物を提供することが、本発明の更なる目的である。ジオキセタン構造のアルコキシ置換基に配置されるフッ素原子又は低級アルキル基の何れか一方と２つ又はそれ以上の水-可溶化イオン基とで置換された１，２－ジオキセタンの調製のための合成プロセスとそれに用いる中間体を提供することが本発明の更に別な目的である。

【図面の簡単な説明】

図１は繰り越しが問題となるような測定におけるカプセル化学分析システムのダイアグラムである。

図２は後述の実施例中により完全に記載された通りの繰り越しに起因すると考えるルミネッセンスの観測を示すカプセル化学分析システムにおける隣り合った分画のプロファイルである。

図３は後述の実施例中により完全に記載された通りの実験において観測された繰り越しが自然の光でないことを確かめる、隣り合った分画の更なるプロファイルである。

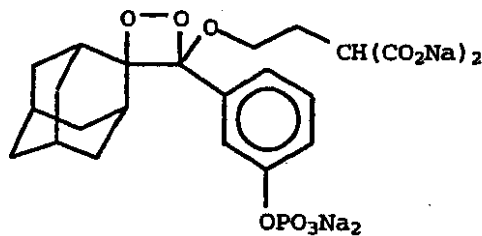
図４は後述の実施例中により完全に記載された通りの実験において観測された繰り越しが本質において化学的なものである事実を確かめる、隣り合った分画の更なるプロファイルである。

図５は、フッ素-置換ジオキセタン、塩素-置換ジオキセタン、メチル-置換ジオキセタン及びハロゲン原子を含まない参考のジオキセタンの２５ での分解の相対比率を表現するグラフである。

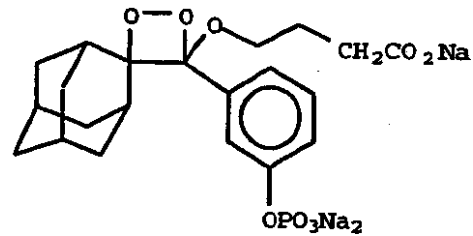
好適な実施態様の開示

本発明は、改善された保存安定性を持ち、且つ誘発酵素の作用で形成されるヒドロキシジオキセタン生成物が水性溶液中で高度に安定であり、且つ化学ルミネッセンスを生成するための酵素によって誘発可能とされる、ジオキセタンに関する。そのような誘発可能なジオキセタンは、米国特許第5,399,497号中に記載されたようなカプセル化学分析システムにおける隣り合う分画 (adjacent segments) 中へのヒドロキシジオキセタンのルミネッセントの繰り越しを排除又は最小限にする。繰り越しは、カプセル化学システム中で分離する流体として供されるフッ化炭素油中の低い水溶性の光放射材料の可溶化 (solubilization)、析出 (deposition)、沈殿 (precipitation) から生じることができる。試薬の繰り越しは、不正確な測定、間違った結果及び不良な生成特性 (irreproducibility) のための不正確さに通じることができる。

同時継続出願 ' 305において、下記のジオキセタン１が水性溶液中のアルカリホスファターゼの化学ルミネッセント検出用に特に有効であることが発見されている。



1

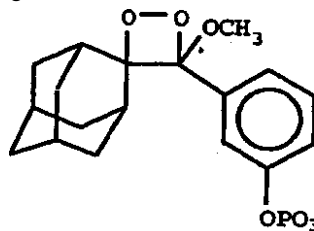


2

比較のために、単一のイオン化可能基が併合されたジオキセタン 2 が調製される。このジオキセタンは上述の繰り越し問題を排除することはできない。

10

米国特許第5,399,497号中に開示される試験システムにおけるジオキセタン 1 の使用は、繰り越し問題の完全な排除に通じる。しかしながら、水性緩衝液中でジオキセタン 1 の溶液が不十分な保存安定性を示すことが続いて思いがけずに発見された。アルカリ性緩衝液中のジオキセタン 1 溶液は、25 で2週間の保存の後、著しい分解を示した。事実、ジオキセタン 1 は、アルコキシ基上にイオン性可溶化基の無い下記に示す関連化合物、Lumigen PPDよりも著しく安定性を欠くことが見出される。



Lumigen PPD

20

本出願人が承知している限り、1の低い安定性の原因の化学的なジオキセタンの当該分野における教示はない。その保存安定性、同時にその別な有益な特性を改善するために構造的に1を修正する手段は、参考によって個々に完全に合併される本出願人による同時継続出願第08/748,107号中に開示されている。

定義：

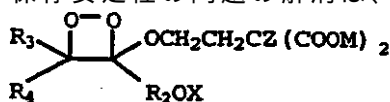
保存安定性とは、自然発生的な反応のためにジオキセタンが分解する割合に関し、且つ本質的な特性である。誘発可能な (triggerable) ジオキセタンの分解はまた、保護基の除去を触媒する微量の薬剤の存在によって誘導することもでき、かくして分解が開始される。ジオキセタンの保存安定性は、周期的な間隔で周知のサンプル中に存在するジオキセタンの量を測定することによって評価することができる。その測定は、ジオキセタンの量に関連付けが可能な特性の測定として知られる何れかの形態で行うことができる。分光光度法、NMR 分光法及び類似下ような技法が典型的である。簡便な手段は、標準に設定された条件の下で該反応によって生成した光の量を測定することによる。放出される光の量又は強度の減退はジオキセタン化合物の損失のシグナルとなる。

30

保存安定性は、純粋な形態及び緩衝溶液中で溶液又は組成物としての両方におけるジオキセタンの安定性に関する。その組成物は、生成される光の量を増加させるための又は酵素的な誘発剤の活性を改善するための各種の添加物をも含めることができる。組成物中のジオキセタンが理にかなっている一定期間、環境温度で著しい分解を受けないことが望ましい。自動化された分析装置において使用されるべき組成物は、望ましくは少なくとも1週間、安定とすべきである。0 - 5 での冷却状態について、少なくとも2 - 3ヶ月の間、著しい分解が観測されないことが望ましい。より望ましくは、自動分析装置に使用すべき組成物は、約2 - 4週の保存安定性の観測される指標において2 - 3%を越えない変化を示すようにするべきである。

40

保存安定性の問題の解消は、式 I を有するジオキセタンにおいて見出される：



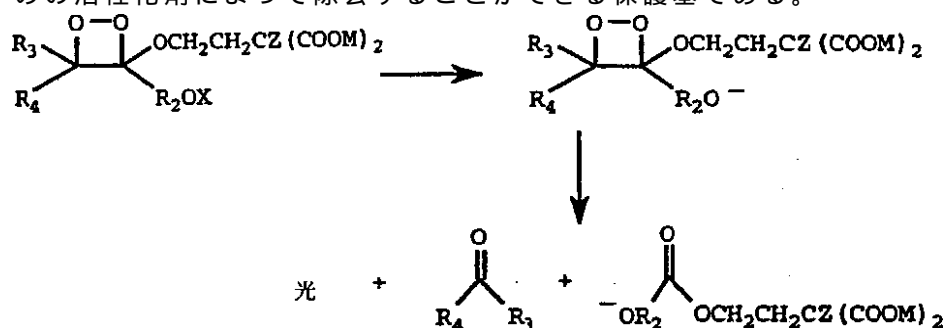
I

式中 Z は、フッ素原子と1 - 4 炭素のアルキル基からなる群から選択され、及び M は、水

50

素、アルカリ金属イオン又は第四級アンモニウム又はホスホニウムイオンからなる群から選択され、式中 R_3 と R_4 は、ヘテロ原子によって任意に置換でき且つ該ジオキセタンに安定性を提供する非環式の、環式の及び多環式の有機の基からなる群から各々選択され、式中 R_2 は、ハロゲン、アルキル、置換 (substituted) アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アミノ及びアルキルアミノ基から選択される付加的な置換基を含めることができるフェニル及びナフチル基からなる群から選択されるアリール環基であり、及び式中 X は、分解されたオキシアニオン-置換 (oxyanion-substituted) ジオキセタンと生成した光と二つのカルボニル-含有化合物、その一つは下記に示すような二つのカルボキシレート基を含むオキシアニオン-置換エステルである、を形成するための活性化剤によって除去することができる保護基である。

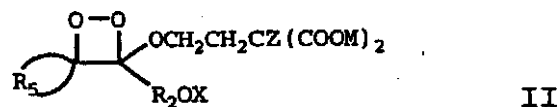
10



M が H である時、それぞれのジオキセタン化合物が、カルボン酸官能基がイオン化する pH 、すなわち pH 約 7 となる pH の条件の下でのみ使用されることが好ましいであろうことを認める。好ましい M は、アルカリ金属イオン、最も好ましくはナトリウムイオンである。

20

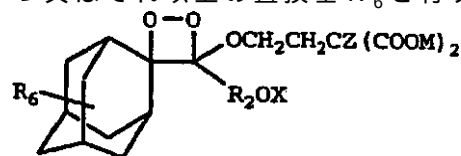
別な実施態様において基 R_3 と R_4 は、熱安定性を提供し且つ付加的な非-水素置換基を含めることができる 6 から 30 までの炭素原子を含む、ジオキセタン環にスピロ融合される環式又は多環式アルキル基 R_5 中に一緒に組み合わされる。



II

該基 R_5 は、より好ましくは多環基、好ましくはアダマンチル基又は、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、フェニル、置換フェニル、アミノおよびそれらに共有結合するアルキルアミノ基から選択される 1 つ又はそれ以上の置換基 R_6 を有するアダマンチル基である。

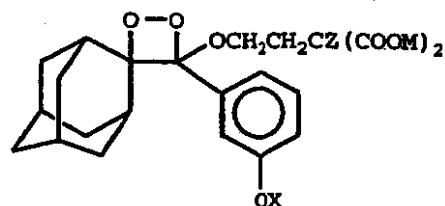
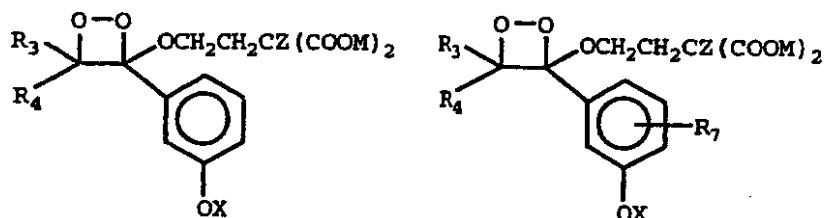
30



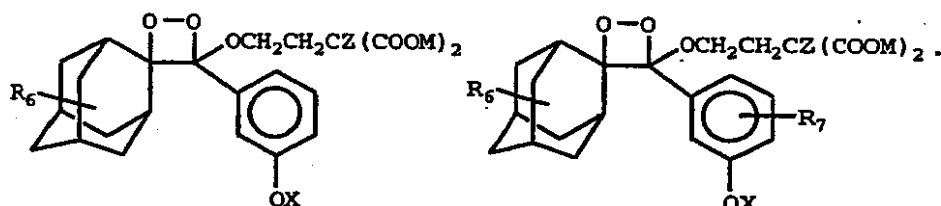
III

別の実施態様において、 R_2 はフェニル又はナフチル基である。 R_2 は、 OX 基が下記に示すようなジオキセタン環のメタ位に配置されたフェニル基であることが特に好ましい。該フェニル環は、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、フェニル、置換フェニル、アミノおよびアルキルアミノ基から独立して選択される付加的な置換基 R_7 を含めることができる。幾つかの典型的な構造が説明のために包含される：

40

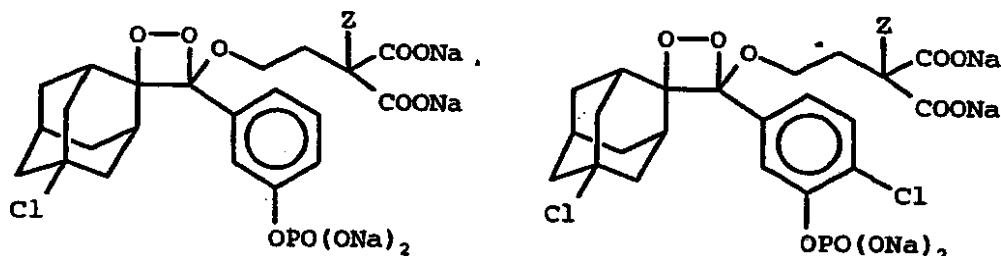


10



20

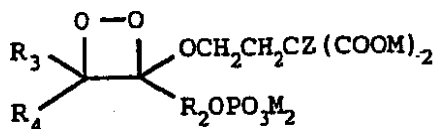
下記に示すように R_6 が H 又は Cl であり且つ R_7 が Cl である後者 2 つの構造式の化合物は、更に好適な化合物として認められる。



30

OX 基の特性は、それが使用されるべき分析において使用する誘発剤によって影響され且つヒドロキシル、OM 基（ここで M は水素、アルカリ金属イオン又は第四級アンモニウム若しくは第四級ホスホニウムイオン）、 $OO-CR_8$ 基（ここで R_8 は、炭素原子 2 から 8 を含み且つヘテロ原子を任意に含むアルキル及びアリール基から選択される）、 OPO_3^{-2} 塩、 OSO_3^{-} 塩、 β -D-ガラクトシドキシ及び β -D-グルクロニジロキシ基から選択されてよい。

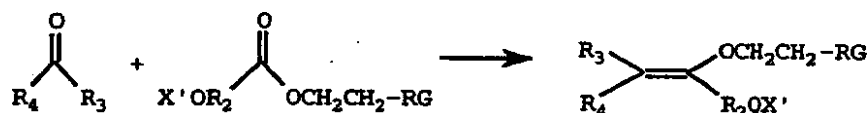
式：



IV

40

（式中、 R_2 、 R_3 、 R_4 、M 及び Z は上述した通りである）を有する本発明のジオキセタンは、本出願人による同時継続出願 No. 08/748,107 中に開示された方法及びジオキセタン化学の分野において周知の別な方法を用いて調製することができる。例えば、下記の式を有するケトンとエステル（式中、 R_G は入れ替え可能な（replaceable）原子又は基であり、 X' は水素又はアルキル基又はトリアルキルシリル基のような入れ替え可能な原子又は基である）は中間体ビニルエーテルを形成するための低価（low-valent）チタニウム試薬によって結合することができる。入れ替え可能な基は、Cl、Br 及び I から選択されるハロゲン原子、硫酸、トシレート、メシレート及びトリフレートのようなスルホン酸、第 4 級アンモニウム基、及びアジドのような脱離基を含む。

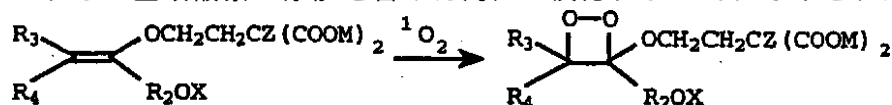


中間体ビニルエーテルは、ビニルエーテルリン酸塩前駆体に 1 又はそれ以上の工程のプロセスにおいて変換される。1 つの入れ替え可能な基を他の入れ替え可能な基に入れ替える合成の簡便さを望んで良い。基 RG は、エステル基のケン化の後で Z-置換マロン酸エステルとの反応によって CZ (COOM)₂ フラグメントで入れ替えられる。基 X' は、X と X' が、X' の除去及び X 基又は X 基の保護形態を加える試薬との反応によって同一でない場合において、基 X に変換される。例えば X' が H であり X が PO₃Na₂ である時、リン酸化剤との反応によって続発する脱プロトン化のための塩基との処理は、二ナトリウム

10



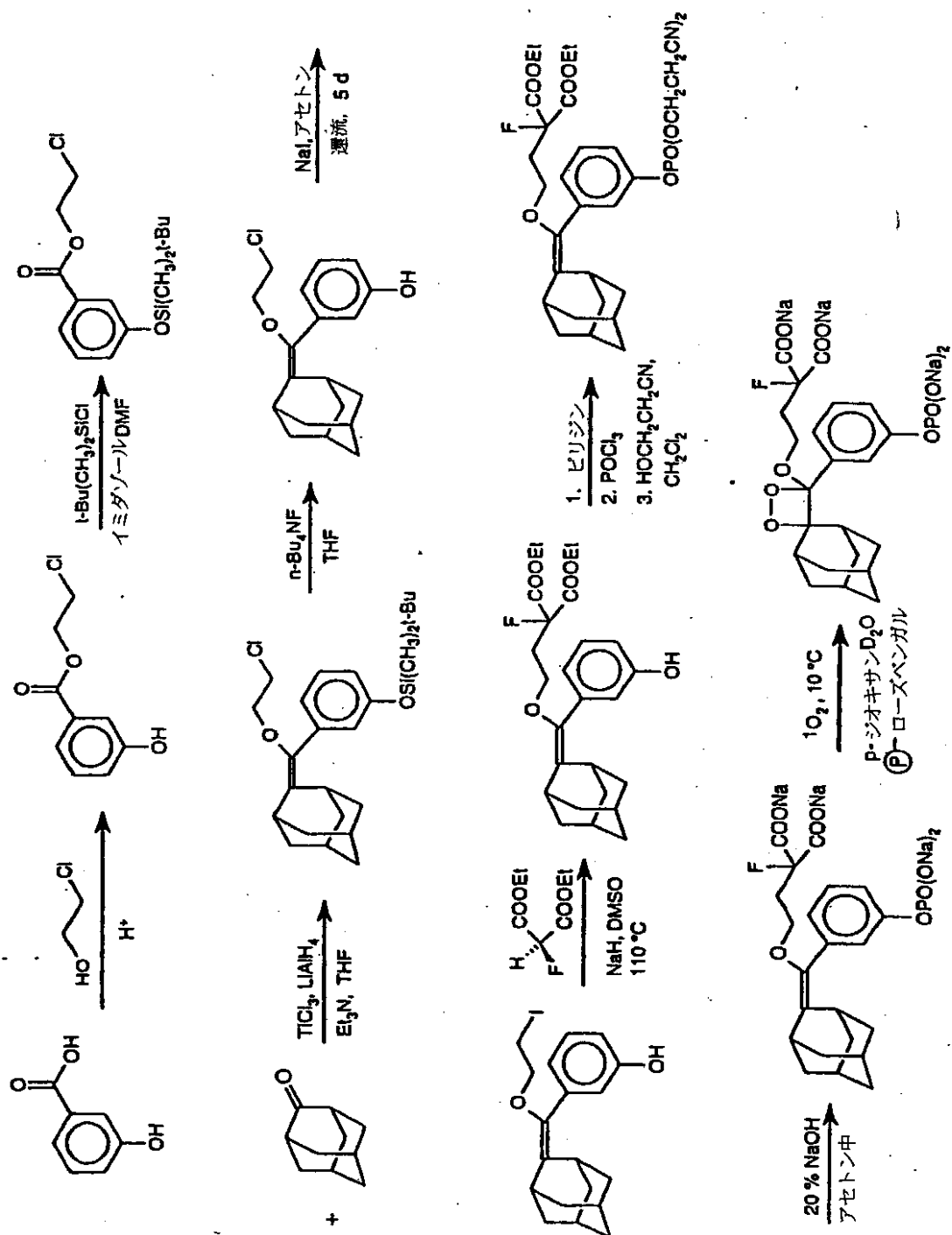
ビニルエーテルリン酸塩前駆体は、例えば色素増感 (dye sensitization) によって生成される一重項酸素の添加を含めた周知の反応によってジオキセタンに直接変換される。



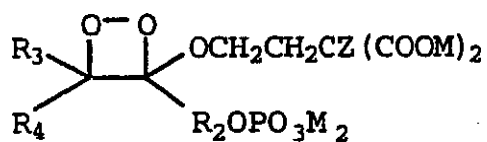
20

これらのプロセスのそれぞれは、下記の特有な実施例における説明によって例証される。特に、スキーム 1 は先に述べた 748,107 出願において開示され且つ例示された上述した工程に従い、ジオキセタン 3 - 5 の調製のために使用される合成経路を概略的に表現する。

スキーム 1



本発明の好適な実施態様は、増強された保存安定性を有する式 I V :



(式中、 R_3 と R_4 は、ヘテロ原子によって任意に置換でき且つジオキセタン環にスピロ融合されて環式の又は多環式の環基を形成するために任意に共同で接合できる非環式の、環式の及び多環式の有機の基からなる群から各々選択され、式中、 R_2 は、付加的な置換基

10

20

30

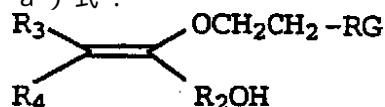
40

50

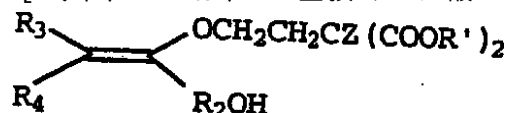
を含めることができるフェニル及びナフチル基からなる群から選択されるアリール環基であり、式中Zは、ハロゲン原子と1 - 4炭素のアルキル基からなる群から選択され、及びMは、水素、アルカリ金属イオン又は第四級アンモニウム又はホスホニウムイオンからなる群から選択される)

のジオキセタン塩化合物を調製するための製造方法であり、

a) 式:



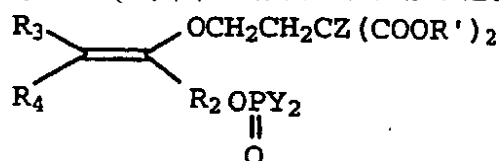
[式中、RGは、Z-置換マロン酸エステルと、式:



(式中R'は1 - 4炭素のアルキル基である) を有するマロネート-置換アルケン化合物を生成するための塩基とを持つ除去可能な基である]

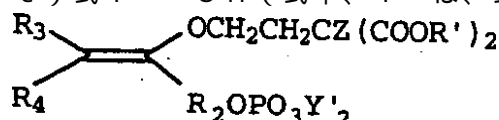
を有する第一のアルケン化合物を反応させること;

b) 式WP(O)Y₂を有するリン酸化試薬と上記マロネート-置換アルケンとを反応させること(式中、Wはハロゲンから選択され且つYはハロゲン原子であり、式:



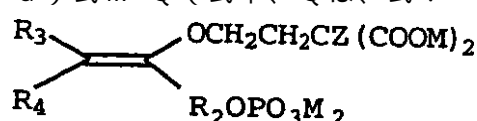
を有するリン酸化アルケン化合物を形成するためのものである);

c) 式Y'-OH(式中、Y'は、式:



を有する第二のリン酸化アルケン化合物を形成するための置換又は非置換アルキル基から選択される) のヒドロキシル化合物と上記リン酸化アルケン化合物とを反応させること;

d) 式M-Q(式中、Qは、式:

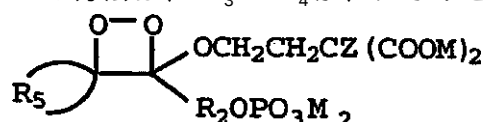


を有するアルケン塩化合物を形成するための塩基性アニオンである) の塩基と、水性溶媒中で上記第二のリン酸化アルケン化合物を加水分解すること; 及び

e) ジオキセタン塩化合物を形成するために水性溶液中で酸素と上記アルケン塩化合物の存在中、照射感作によって該アルケン塩化合物を光酸素化すること;

の各工程を備える。

この方法は、R₃とR₄が、ジオキセタン環と式:



を有するジオキセタン塩化合物にスピロ融合して環式又は多環式環基R₅を形成するように一緒に結合されるジオキセタンを調製するために使用されることがより好ましい。別の好適な方法において、基R₂はメタ-フェニル基であり、Zはハロゲン又は1 - 4炭素原子を有するアルキル基であり、より好適なZは、F又はCH₃であり、且つMはアルカリ金属イオン、より好適なMはNaである。

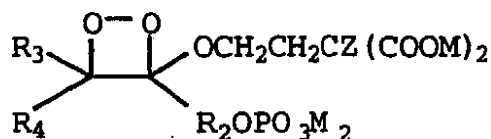
増強された保存安定性を有する式IVの化合物:

10

20

30

40



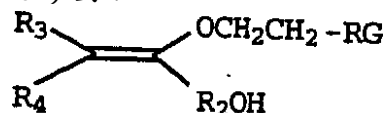
IV

(式中、 R_3 と R_4 は、ヘテロ原子によって任意に置換でき且つジオキセタン環にスピロ融合されて環式の又は多環式の環基を形成するために任意に共同で接合できる非環式の、環式の及び多環式の有機の基からなる群から各々選択され、式中、 R_2 は、付加的な置換基を含めることができるフェニル及びナフチル基からなる群から選択されるアリール環基であり、式中 Z は、ハロゲン原子と1 - 4炭素のアルキル基からなる群から選択され、及び M は、水素、アルカリ金属イオン又は第四級アンモニウム又はホスホニウムイオンからなる群から選択される)

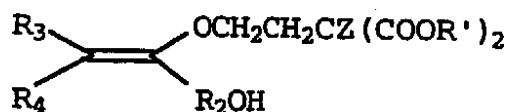
10

は、次の工程：

a) 式：



[式中、 RG は、 Z -置換マロン酸エステルと、式：

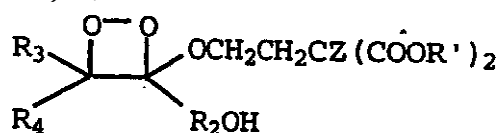


20

(式中 R' は1 - 4炭素のアルキル基である) を有するマロネート-置換アルケン化合物を生成するための塩基とを持つ除去可能な基である]

を有する第一のアルケン化合物を反応させること；

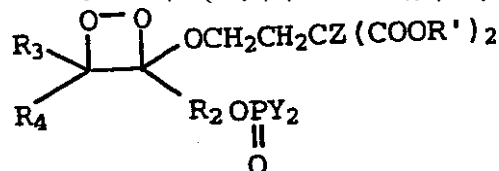
b) 式：



を有するマロネート-置換ジオキセタンを形成するための酸素とマロネート-置換アルケン化合物の存在中で照射感作によって上記マロネート-置換アルケン光酸化する；

30

c) 式 $\text{WP}(\text{O})\text{Y}_2$ を有するリン酸化試薬と上記マロネート-置換ジオキセタンとを反応させること、(式中、 W と Y は、式：

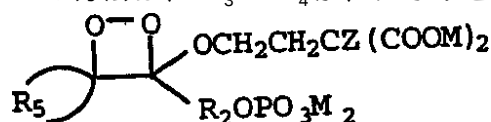


を有するリン酸化ジオキセタン化合物を形成するために、ハロゲン原子、置換又は非置換アルコキシ、アリールオキシ、アラルキロシキ及びトリアルキルシリロキシ基から各々選択される)；及び

40

d) 式 M-Q (式中、 Q はジオキセタン塩化合物を形成するための塩基性アニオンである) の塩基とともに水性溶媒中で上記リン酸化ジオキセタンを加水分解すること、を備える改善された方法によって有利に製造することができる。

この方法は、 R_3 と R_4 が、ジオキセタン環と付加的な置換基を含むことができる式：



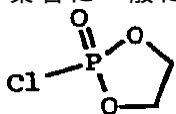
を有するジオキセタン塩化合物にスピロ融合して環式又は多環式環基 R_5 を形成するように一緒に結合されるジオキセタンを調製するために使用されることがより好ましい。別の好適な方法において、基 R_2 は付加的な置換基を含むことができるメタ-フェニル基であり

50

、Zはハロゲン又は1 - 4炭素原子を有するアルキル基であり、より好適なZは、F又はC H₃であり、且つMはアルカリ金属イオン、より好適なMはNaであるジオキセタンの製造のために使用される。

Z-置換マロン酸エステルC H Z (C O O R ')₂を持つ第一のアルケン化合物と、マロネート-置換アルケン化合物を生成するための塩基との反応は、D M S O、D M F、N , N -ジメチルアセトアミド、求核塩基、好ましくはナトリウム又はカリウム水素化物を用いて貧溶媒化したN-メチルピロリドンのような極性非プロトン性溶媒中で実施される。その反応は好ましくは、反応時間を減じるために昇温条件で、一般には50と150の間、より実用的には80と120の間で実行される。除去可能な(removable)基は、C l、B rとIから選択されるハロゲン原子、硫酸塩、トシレート、メシレート及びトリフレートのようなスルホン酸塩、第四級アンモニウム基、及びアジドのような脱離基を含む。ここに記載された改善された方法において、光酸素化する工程は、748,107出願中に開示されたような総合的な方法(overall process)の最終工程としてのホスフェートアルカンの光酸素化に代えてマロネート-置換アルケンを介して実行される。この工程において、フェニル基を生じるマロネート-置換アルケン化合物は、有機溶媒中に溶解され且つマロネート-置換ジオキセタンを形成するために増感剤と酸素の存在中で照射される。可視光を用いる、光による増感剤と酸素の照射は、マロネート-置換アルケンのビニルエーテル型二重結合と反応する一重項酸素を生成する。その増感剤は、溶媒中に溶解させ又は、好ましくは当該分野において通常用いられるようなポリマー性粒子上に固定化することができる。一重項酸素を生成するために利用される増感剤は、限定されないが、ローズベンガル、メチレンブルー、エオシン、テトラフェニルボルフィリン(T P P)、T P Pの金属複合体、殊に亜鉛とマンガンとC₆₀を含むことができる。好適な有機溶媒は、C H₂ C l₂、C H C l₃及びC C l₄のようなハロカーボン、重水素化(deuterated)ハロカーボン、低分子量ケトンとその重水素化類似物、脂肪族及び芳香族炭化水素とそれらの重水素化類似物を含む。最も好適にはC H₂ C l₂である。有機溶媒中での光酸素化の誘導は、一重項酸素のライフタイムが最小化される反応媒体が有利に提供される。これは反応時間を著しく減じることと、より直ちに完成に進展させるための光酸素化を許すことの効果を有する。生成物の分離は、多くの場合において要求される簡単な増感剤の濾過と溶媒の除去と同じく容易になされる。

式W P (O) Y₂(ここでWはハロゲンから選択され、Yはリン酸化ジオキセタン化合物を形成するためのハロゲン原子、飽和又は不飽和アルコキシ基及びトリアルキルシロキシ基である)を有するリン酸化試薬と上記マロネート-置換ジオキセタンを反応させる工程は、有機溶媒、好ましくはC H₂ C l₂、C H C l₃及びC C l₄のようなハロカーボン、ジエチルエーテル又はテトラヒドロフラン(T H F)のようなエーテル中でアミン塩基の存在中、実行される。利用されるアミン塩基は、限定されないが、ピリジンとトリエチルアミンを含む。Yが置換又は非置換アルコキシ基、アリーロキシ、アラルキシロキシ、又はトリアルキルシリロキシ基である時、Y基の典型例は、実施例のために、O C H₃、O C H₂ C H₃のようなアルコキシ、及びその類似物、シアノエトキシ(O C H₂ C H₂ C N)又はトリメチルシリルエトキシ(O C H₂ C H₂ S i (C H₃)₃)のような置換アルコキシ、フェノキシ、置換フェノキシ、ベンジルオキシ、トリメチルシリロキシ及び有機化学の当業者に一般に周知のような他のものを含む。二つの基Yは試薬



中で生成するエチレンジオキシのような単一な基として一緒に結合することもできる。好適な基Yは、シアノエトキシ基である。より好適な実施態様において、Yはハロゲンであり、好ましくはYとWは両方ともC lである。

該リン酸化工程は、約 - 78 から約 25 の範囲の温度で溶媒中で実行される。約 0 - 5 の温度が特に便利である。リン酸化剤W P (O) Y₂は、反応溶液が高温となることが原因とならないように制御された方式において添加される。そのリン酸化試薬は添加の

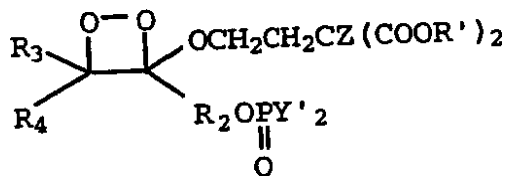
間、アミン塩基、好ましくはピリジンによって好適に同伴される。

加水分解又は脱保護工程は、式 M-Q（ここで Q は、ジオキセタン化合物を形成するために保護基 Y 及び R' の除去の原因となるための十分な量の塩基アニオンである）の塩基と共に水性溶媒中でリン酸化ジオキセタンの加水分解によって達成される。その溶媒は、水、水性緩衝液又は水と 1 種又はそれ以上の有機溶媒との混合物を含めることができる。好適な有機溶媒は、水-混合可能なメタノール、エタノール、アセトン及び THF のような溶媒である。4 当量の塩基が典型的には要求され、しかしながら簡便性のために、過量を使用することができる。保護基の除去は、好ましくは連続して又は同時に実施することができる。特別な基 Y と R' 及び塩基に基づいて、部分的に加水分解された中間体を分離することを可能として良く又はしなくて良い。

塩基性の脱保護剤の選択は、部分的に、除去すべき基 Y と R' の本質によって決定されるであろう。その脱保護剤は、ビニルエーテルホスフェート塩が最初に調製され又は保護されたジオキセタンが調製されるプロセスにおけるジオキセタン環基の分解のプロセスにおけるビニルエーテル基の加水分解のような望ましくない副反応の原因とならないようにもする必要がある。好適な脱保護剤は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、カリウム t-ブトキシド、アンモニア、アンモニア水及びその類似物のような有機及び無機の塩基を含む。別の好適な脱保護剤は、シアニドイオン、フルオリドイオンのような求核試薬を含む。

他の実施態様において、リン酸化試薬とマロネート-置換ジオキセタンとを反応させる工程は、

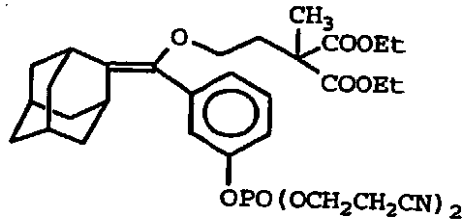
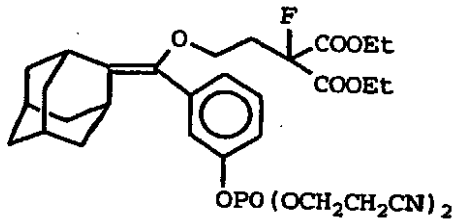
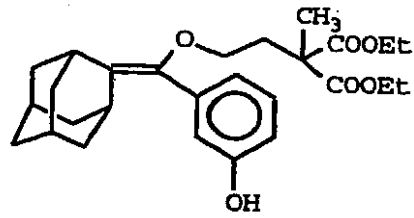
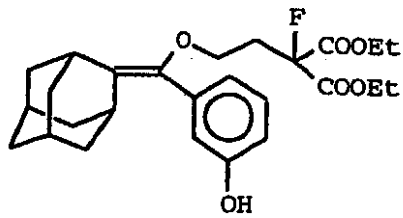
a) 式WP(O)Y'₂を有するリン酸化試薬とマロネート-置換ジオキセタンとを反応させること(式中、WとY'は、式:



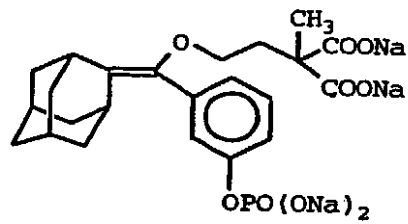
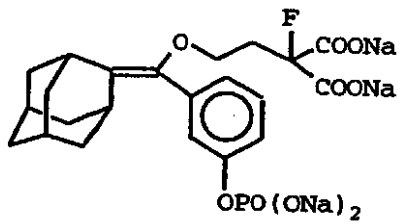
を有するジオキセタンホスホリルハライド化合物を形成するためのハロゲン原子である)
 ; 及び

b) 式 Y - OH (式中、Y はリン酸化ジオキセタン化合物を形成するための置換又は非置換アルキル基から選択される) のヒドロキシル化合物とジオキセタンホスホリルハライド化合物とを反応させること、
 を備える。

該ジオキセタンホスホリルハライド化合物は、少なくとも 2 当量、好ましくは過量のヒドロキシル化合物 Y - OH との反応によって、リン酸化ジオキセタン化合物に変換される。ヒドロキシル化合物 Y - OH として利用できる典型的な化合物は、限定されないが、メタノール、エタノールのような低級アルコール、3 - ヒドロキシプロピオニトリル ($\text{HOC-CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$) と 2 - トリメチルシリルエタノールのような置換低級アルコール、フェノール、置換フェノール、ベンジルアルコール及びその他の一般に周知であるものを含む。別な態様において、本発明は、本ジオキセタンを調製するための方法において使用される合成中間体に関する。特に、下記の新規なアルケン中間体化合物が有用である。

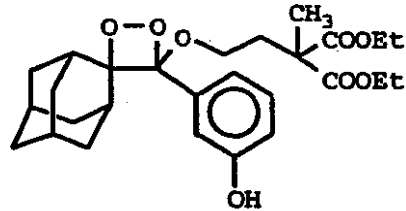
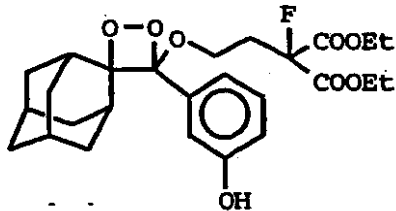


10

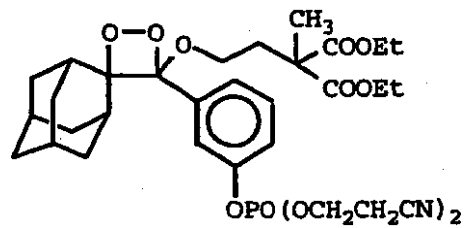
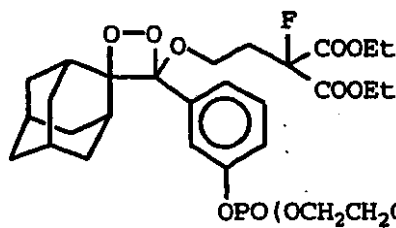


20

付加的な下記の新規ジオキセタン化合物は、本ジオキセタン化合物の調製における合成中間体として有用である。

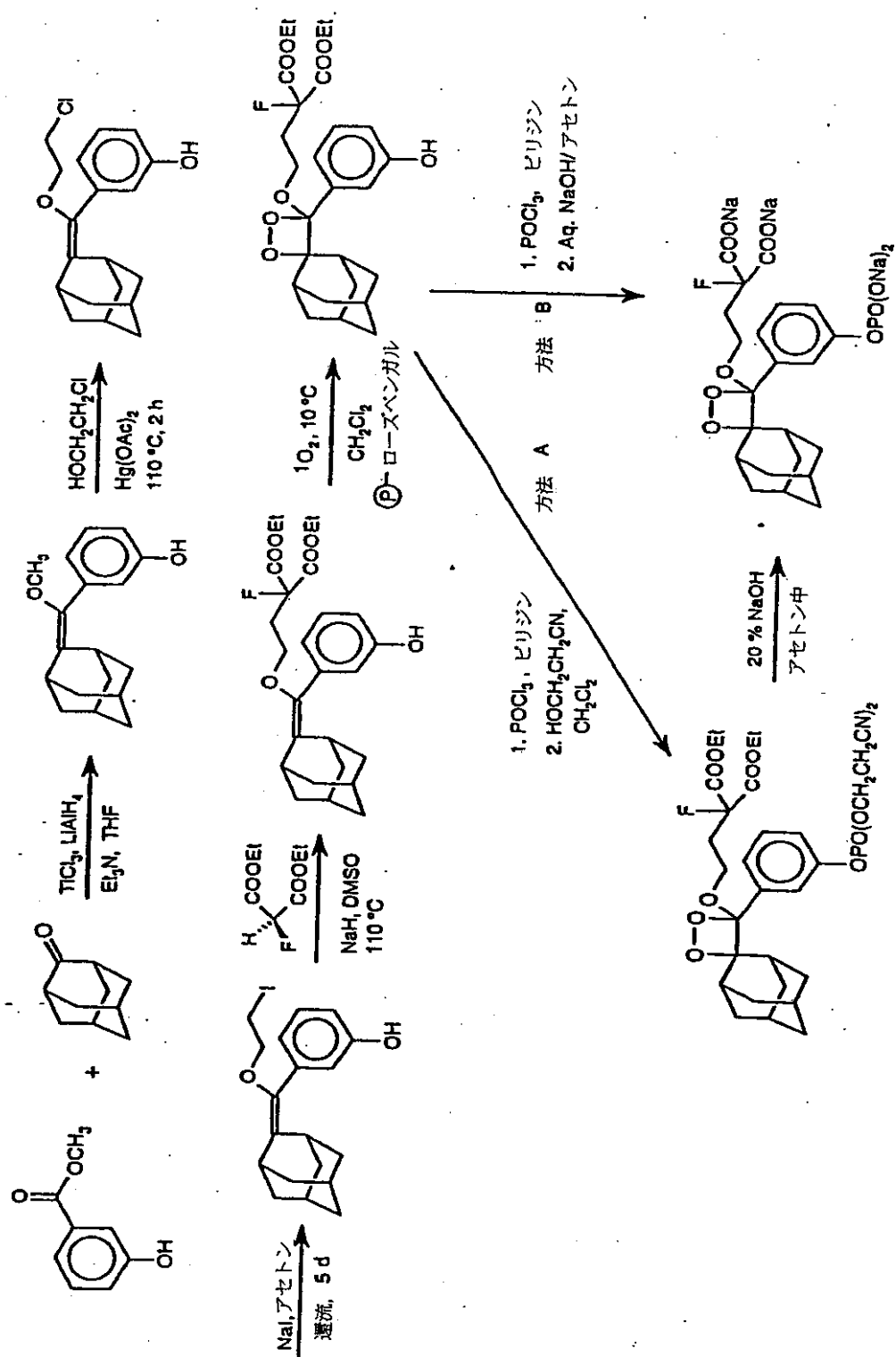


30

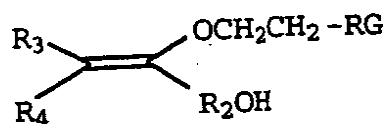


この改善された方法による本発明のジオキセタンの典型的な合成をスキーム 2 中に示す。

スキーム 2



上述した合成方法における式：

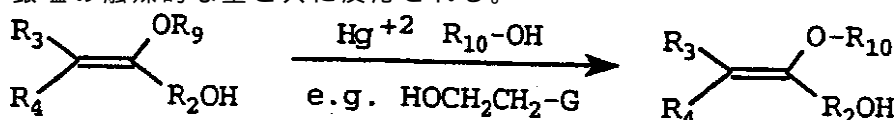


(式中、R Gは除去可能な基である)を有する出発材料(アルケン前駆体)は、当該分野において周知の方法によって調製することができる。一つの方法において、ビニルエーテル官能基は、米国特許第4,983,779号と4,982,192号中に開示されたケトン $R_3R_4C=O$ とエステル $HOR_2COOCH_2CH_2-G$ (式中、GはR Gと同一として良い基又はR Gによ

って置き換えられ又はRGに変換されることが出来る基で良い)のTi-介在カップリングにより調製される。RGがヨウ素原子であり、Gが塩素原子である典型的な合成方法が以下に与えられる。簡略化のために、そのカップリング反応のエステル化合物は、ヒドロキシル基がシリルエステル又はアルキルエーテルのようなマスクされた形態において存在する保護形態において使用されるであろう。カップリング反応の後、遊離のヒドロキシル基は標準の合成手段を用いて解放される。これらのアルケン前駆体は、先に報告されたこのタイプのビニルエーテルの調製ではない新規の方法によっても製造できることが、本出願人によって更に発見されている。先のTi-介在方法は、付加的な複雑さとコストが付加されるG又はRGを生じる個々のエステル化合物の調製に要求される一方で、該新規の方法は、市販の出発材料から調製することができる通例のビニルエーテル中間体を利用する。

10

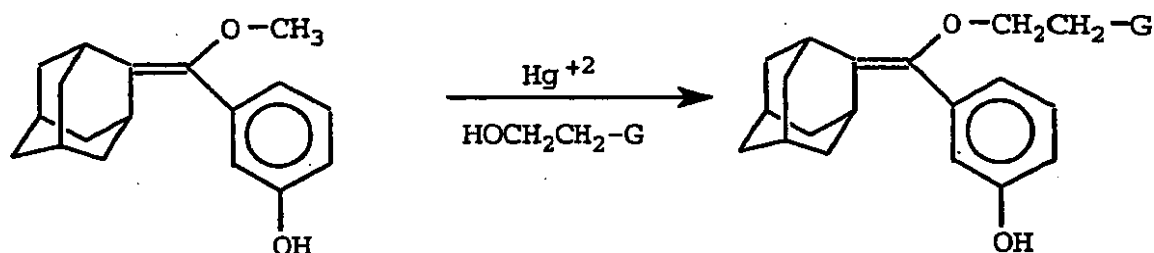
新規の方法によってアルケン前駆体を調製するための反応の実施例が下記に示される。低級アルキルビニル化合物(低級アルキル、 R_9 、ここでは $C_1 - C_4$ の直鎖又は分枝アルキル基を示す)は、望ましいアルケン前駆体を生成するための、例えば式 $HOCH_2CH_2G$ を有する一つのような、他のアルコール $R_{10}-OH$ の少なくとも1モル当量の存在中で水銀塩の触媒的な量と共に反応される。



式 $CH_2=CHOR_a$ を有する非置換ビニルエステルから、式 $CH_2=CHOR_b$ への変換は周知であり且つ、例えばW.H.WatanabeとL.E.Conlon, J. Am. Chem. Soc. 79, 2828 (1957)に記載され、本方法において用いる三置換アルケンの水銀塩-触媒反応による調製は、本出願人の知見が最も最初に報告されたものである。

20

この反応方法において、 R_3 と R_4 は、ヘテロ原子と任意に置換することができ且つジオキセタン環にスピロ-融合される環式又は多環式環基 R_5 を形成するように一緒に結合することができる、非環式、環式及び多環式の有機の基から各々選択され、 R_2 は任意な置換基を含んで良いフェニルとナフチル基から選択されるアリール基である。本発明のジオキセタンへのアルケン前駆体の調製のためのこの水銀-触媒反応の使用の実施例は、



30

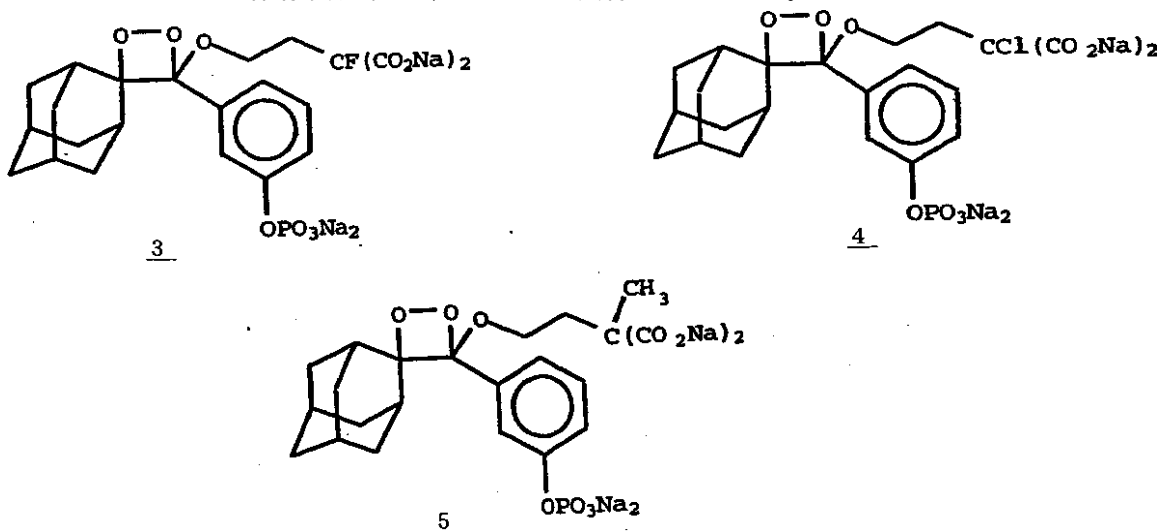
(式中、Gは塩素原子である)である。水銀塩はビニルエーテル基に触媒的に作用する何れかの $Hg(II)$ 塩であり、好ましくは酢酸塩又はトリフルオロ酢酸塩のような弱酸の塩である。水銀塩は触媒的な量、典型的にはアルケンのモル当たり0.01から0.5モル、より典型的には0.05から0.25とされる。アルコール化合物 $R_{10}-OH$ は、何れかのアルカノール、置換アルカノール、ベンジルアルコール、アリールアルコールのような不飽和アルコールとすることができる。アルコールは、アルケンのモル当たり少なくとも2モル、好ましくはアルケンのモル当たり少なくとも5モルの過量において使用される。好適な方法において、アルコールは反応溶媒として使用される。反応は、限定されないが典型的には環境温度より高く、溶媒の沸点までとされる。好適な反応温度は約70 - 120の範囲内である。反応物の可溶性の改善又は極性又は沸点の変更を意図する付加的な溶媒を使用することができる。

40

上述した水銀-触媒ビニルエーテル交換反応は本発明の水溶性三置換ジオキセタンへの更なる仕上げのために使用される中間体の調製における特別な仕様が見出されると同時に、アルケン又はビニルエーテル化合物の広い多様性の調製により全般的に適用可能である。特有な実施態様

50

ジオキセタン 1 のフッ素-置換類似物、3 と同一物、塩素-置換類似物 4 及びメチル-置換類似物 5 は調製されており、且つそれらの安定性を数週間以上に渡り評価した。全ての溶液は同じ組成で調製され、ジオキセタンの種類のみ異なる。安定性は試験溶液の固定された量及びアルカリホスファターゼの固定された制限量で、25 での光強度の停滞を測定する化学ルミネッセント酵素アッセイによって評価される。思いがけず、ジオキセタン 3 と 5 を含む水溶液は実質的に 1 よりもより安定であり、4 はそうでなかった。ジオキセタン 3 と 5 の溶液は 25 で 4 週間の後、本質的に分解を受けていない。驚くべきことに、ジオキセタン 4 の保存安定性は、1 よりも実際に悪かった。

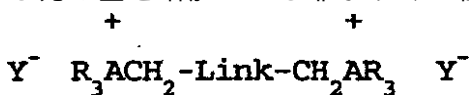


これら 4 つのジオキセタンの特性におけるこの相違の原因は、目下のところ理解できない。ジオキセタン 3 と 4 は、それらが異なるハロゲン置換基を有することによってのみ構造的に相違する時に保存安定性におけるそのような顕著な相違を示すであろう。本出願人はこれらの結果を説明又は予言するようなジオキセタン化学の分野における教示が無いことに気付いた。

さらに又、ジオキセタン 3 についての試験は、ジオキセタン 1 のように、カプセル化学分析システムにおいて、それが繰り越しの原因とならないことを示す。2 つのカルボキシレートとフッ素原子又は低級アルキル基の一方を含む置換基を生じる 3 及び 5 のようなジオキセタンとそのようなジオキセタンを含む組成物は、それ故にカプセル化学分析システムにおいて使用される他の周知のジオキセタンと組成物に対して優っている。

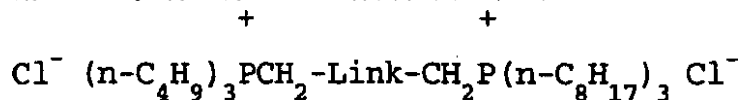
本発明の別な態様において、増大された化学ルミネッセンスを提供する化合物が提供される。増大された組成物は、高度な分析的感受性が要求される分析において有利となる。ジオキセタン分解反応の効率的な化学ルミネッセンスの増大と同時に、自然なジオキセタン分解からの無関係な光放出を維持すること又は減じることは、感受性を増強又は改善できる一つの手法である。

それ故に本発明はまた、カチオン性増強剤 (cationic enhancer) と、化学ルミネッセンスを生成するために誘発することができる増大された安定性を有する上述した通りの安定な 1, 2 - ジオキセタンとを備える組成物に関する。増大された化学ルミネッセンスを提供するためのそのような組成物は、水性溶液中に上述した通りのジオキセタン、及び増強剤の不在において生成される量に比して活性化剤とジオキセタンとの反応によって生成する光の量を増加させる非ポリマー性カチオン増強物質とを備える。その増強物質は式：



(式中、A のそれぞれは、P と N 原子からなる群から独立して選択され、式中、Link は、置換又は非置換アリール、アルキル、アルケニル及びアルキニル基からなる群から選択される少なくとも 2 つの炭素原子を含む有機の結合基であり、且つ Link はヘテロ原子を任意に含むことができ、式中 R_3 は 1 から 20 炭素原子を含有する低級アルキル又はアラルキ

ルから選択され、且つ式中 Y はアニオンである) の 2 カチオン性 (dicationic) 表面活性剤である。特に好ましい増強物質は、式：



(式中、Link はフェニレンである) を有する 2 カチオン性表面活性剤である。
増大された化学ルミネッセンスを提供するための本発明の組成物は、補充の増強剤として少なくとも 1 種の蛍光体を任意に含んで良い。利用される蛍光体は、エネルギー転移を通して生成される光の量を増加させることが可能なそれらの化合物である。アニオン性蛍光体が殊に有効であり、それはカチオン性増強剤との好適な静電的中間作用によると確信される。特に好適な蛍光体は、アニオン性化合物であり且つ限定されないがピラニンとフルオレセインを含む。

10

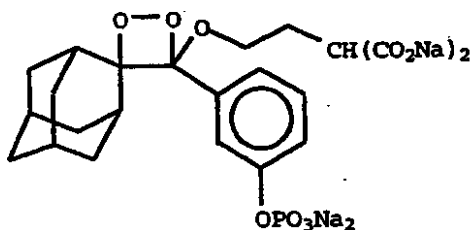
本発明の各種の態様をより明確に開示するために、特有の実施態様を記載した、制限されることのない以下の実施例は、本発明を説明する目的のために提示される。

実施例

実施例 1 . ジオキセタン 1 の調製

ジオキセタン [4 - (3 , 3 - ビスカルボキシプロポキシ) - 4 - (3 - ホスホロキシフェニル)] スピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - トリシクロ - [3.3.1.1^{3,7}] デカン] , 4 ナトリウム塩は、本出願人による米国特許第 5,631,167 号中に記載された反応のシーケンスによって調製される。中間体のアルケン [(3 - ヒドロキシフェニル) - (2 - ヨウ化エトキシ) - メチレン] トリシクロ - [3.3.1.1^{3,7}] デカン] までの合成は、本質的に米国特許第 5,013,827 号と 5,068,339 号中に記載された通りに誘導される。

20

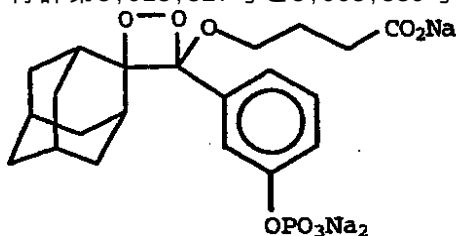


1

実施例 2 . ジオキセタン 2 の調製

ジオキセタン [4 - (3 - カルボキシプロポキシ) - 4 - (3 - ホスホロキシフェニル)] スピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - トリシクロ - [3.3.1.1^{3,7}] デカン] (2) は、本出願人による米国特許第 5,631,167 号中に記載された反応のシーケンスによって調製される。中間体のアルケン [(3 - カルボキシプロポキシ) - (3 - ヒドロキシフェニル) - メチレン] - トリシクロ - [3.3.1.1^{3,7}] デカン] までの合成は、本質的に米国特許第 5,013,827 号と 5,068,339 号中に記載された通りに誘導される。

30

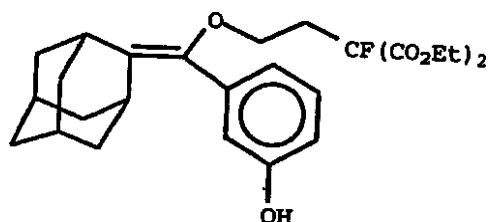


2

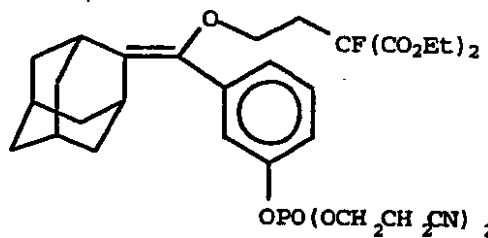
40

実施例 3 . ジオキセタン 3 の調製

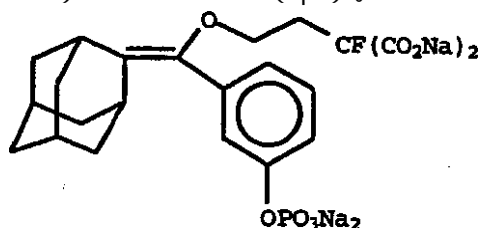
このジオキセタンは、下記の反応のシーケンスによって調製される。中間体アルケン [(3 - ヒドロキシフェニル) - (2 - ヨウ化エトキシ) - メチレン] トリシクロ - [3.3.1.1^{3,7}] デカン] までの合成は実施例 1 中の開示された通り誘導される。



(a) [(3,3-ビスカルボエトキシ)-3-フルオロプロポキシ)-(3-ヒドロキシフェニル)メチレントリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン]の合成。水素化ナトリウム(60%油中分散物75mg)がヘキサンで油分が無くなるまで洗浄され、真空下で乾燥され、そして無水DMSO 4mlを加える。ジエチルフルオロマロネート(0.3g)が添加され、Arの下で15分間攪拌される。無水DMSO 5ml中、ヨードエトキシアルケン(0.5g)の溶液が該反応混合物中に加えられる。100℃に加熱され且つ2時間攪拌され、反応される。冷却後、該混合物は30mlの酢酸エチルで希釈される。その酢酸エチル溶液は水で3-4回抽出され、乾燥して濃縮される。その粗材料はヘキサン中5-20%酢酸エチルを用いてクロマトグラフィーされる。目的の化合物(0.25g)が45%の収量で得られる：¹H NMR(CDCl₃) δ 1.28(t, 6H)、1.66-1.95(m, 12H)、2.45(t, 1H)、2.52(t, 1H)、2.67(br s, 1H)、3.20(br s, 1H)、3.52(t, 2H)、4.23-4.30(q, 4H)、6.74-7.22(m, 4H)。

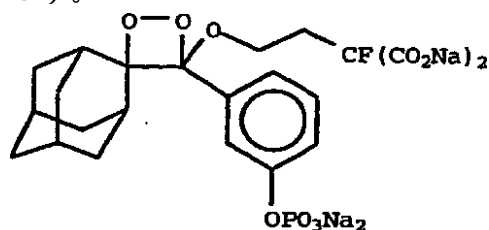


(b) [(3,3-ビスカルボエトキシ)-3-フルオロプロポキシ-(3-(ビス(2-シアノエチル)ホスホロキシ)フェニル)メチレン]トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン]の合成。アルゴンの層下に10mlのCH₂Cl₂を収容するフラスコが氷浴中で冷やされる。ピリジン(1.71ml)が添加され続いてPOCl₃(0.61ml)がゆっくり加えられ、そして15分間継続して攪拌される。10mlのCH₂Cl₂中の工程(a)からのアルケン(0.972g)が滴下混合される。氷浴が除かれ、溶液は2.5時間攪拌される。この溶液に1.71mlのピリジンと1.44mlの2-シアノエタノールが加えられる。その反応混合物は12-15時間攪拌され白色沈殿の状態とされる。その混合物はCH₂Cl₂で希釈されそして4×50mlの水で洗浄される。そのCH₂Cl₂抽出物は乾燥され濃縮される。粗生成物は、ヘキサン中75%酢酸エチルを用いるクロマトグラフィーで精製される。全量1.2gの油状物(88%)が得られる：¹H NMR(CDCl₃) δ 1.29(s, 6H)、1.79-1.97(m, 12H)、2.46-2.53(2t, 2H)、2.63(br s, 1H)、2.83(t, 4H)、3.20(br s, 1H)、3.50(t, 2H)、4.24-4.31(q, 4H)、4.35-4.51(m, 4H)、7.13-7.36(m, 4H)；³¹P NMR(CDCl₃) δ -9.49(p)。



(c) [(3,3-ビスカルボキシ)-3-フルオロプロポキシ)-(3-ホスホロキシフェニル)メチレン]トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン]、4ナトリウム塩の合成。工程(b)からのアルケン(1.2g)は20mlのアセトン中に溶解される。4mlの水

、297mgの水酸化ナトリウムの溶液が加えられる。その溶液は沈殿が形成される時点まで一晩攪拌される。その液体はデカンテーションされ、そしてその固体はアセトンの10×5mlで洗浄される。真空下で乾燥した後、白色の固体(1.0g)が得られる：¹H NMR(D₂O) δ 1.75 - 1.89 (m, 12H)、2.29 (t, 2H)、2.37 (t, 2H)、2.57 (br s, 1H)、3.12 (br s, 1H)、3.56 (t, 2H)、6.99 - 7.30 (m, 4H)；³¹P NMR(D₂O) δ 0.69 (s)。

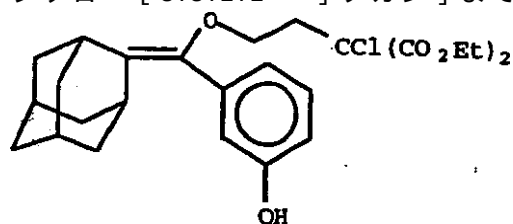


3

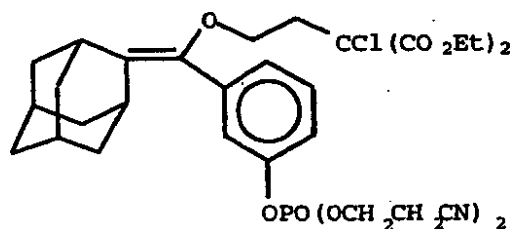
(d) [4-(3,3-ビスカルボキシ)-3-フルオロプロポキシ)-4-(3-ホスホロキシフェニル)]スピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-トリシクロ-[3.3.1.1^{3,7}]デカン], 4ナトリウム塩(3)の合成。工程(c)からのアルケン(348.6mg)は10mlのD₂O中に溶かされる。ポリマー結合ローズベンガル(500mg)がp-ジオキサン中に懸濁され、そして上記水溶液に加えられる。その反応混合物は5-8に冷却され、酸素のバブリングが開始され、その混合物は5milカプトン(KAPTON)フィルターを通してナトリウムランプによって照射される。トータルで2.5時間の後、ポリマービーズが濾別され、その溶液は乾燥した白色の固体(3)となるまで濃縮される。¹H NMR(D₂O) δ 0.93 - 1.79 (m, 12H)、2.19 (br s, 1H)、2.41 - 2.49 (m, 2H)、2.97 (br s, 1H)、3.40 - 3.49 (m, 2H)、7.19 - 7.42 (m, 4H)；³¹P NMR(D₂O) δ 0.575 (s)。

実施例4. ジオキセタン4の調製

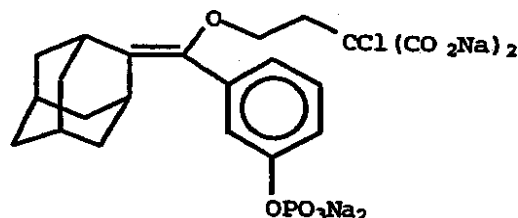
このジオキセタンは、下記の反応のシーケンスによって調製される。中間体アルケン[(3-ヒドロキシフェニル)-(3,3-ビスカルボエトキシ)プロポキシメチレン]トリシクロ-[3.3.1.1^{3,7}]デカン]までの合成は実施例1中の開示された通り誘導される。



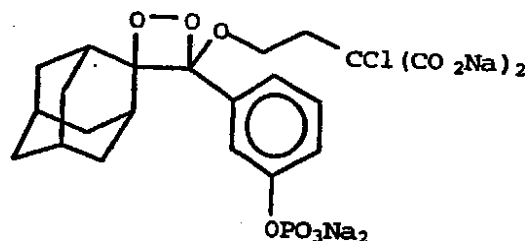
(a) [(3,3-ビスカルボエトキシ)-3-クロロプロポキシ)-(3-ヒドロキシフェニル)メチレントリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカンの合成。(3,3-ビスカルボエトキシプロポキシ)-(3-ヒドロキシフェニル)メチレントリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン(1.2g)の乾燥THF 10ml溶液は、アルゴン下-78度で、25-30ml THF中2.4当量LDA中に加えられる。-78で30分間攪拌することによって反応され、そして乾燥THF 15ml中、N-クロロサクシニアミド(0.58g)の溶液と共に処理される。その反応は室温に暖めて1時間以上でなされ、かつ追加の時間攪拌される。THFは真空下で除去され、残査は100ml酢酸エチルに溶かされる。その有機性溶液は水で洗浄され、乾燥され且つ濃縮される。その粗材料はカラムクロマトグラフィーによって分離される。¹H NMR(CDCl₃) δ 1.23 (t, 6H)、1.70 - 2.00 (m, 12H)、2.57 (t, 2H)、2.65 (br s, 1H)、3.2 (br s, 1H)、3.56 (t, 2H)、4.22 (q, 4H)、6.65 - 7.25 (m, 4H)。



(b) [(3,3-ビスカルボエトキシ)-3-クロロプロポキシ-(3-(ビス-(2-シアノエチル)ホスホロキシ)フェニル)メチレン]トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカンの合成。アルゴンの層下に25mlのCH₂Cl₂を収容するフラスコが氷浴中で冷やされる。ピリジン(1.5g)が添加され続いてPOCl₃(1.82g)がゆっくり加えられ、そして15分間継続して攪拌される。工程(a)からのアルケン(1.5g)と、25mlのCH₂Cl₂中に1.5gのピリジンが滴下混合される。氷浴が除かれ、溶液は1時間攪拌される。その溶液は再度氷浴で冷却され、3.0gのピリジンと2.8gの2-シアノエタノールが加えられる。その反応混合物は12-15時間攪拌され白色沈殿の状態とされる。その混合物はCH₂Cl₂で希釈され水で洗浄される。そのCH₂Cl₂抽出物は乾燥され濃縮される。粗生成物は、ヘキサン中50%酢酸エチルを用いるクロマトグラフィーで精製される。全量1.4gの油状物が得られる：¹H NMR(CDCl₃) δ 1.278(t, 6H)、1.80-1.97(m, 12H)、2.565(t, 2H)、2.63(br s, 1H)、2.826(t, 4H)、3.20(br s, 1H)、3.556(t, 2H)、4.271(q, 4H)、4.40-4.47(m, 4H)、7.15-7.36(m, 4H)。



(c) [(3,3-ビスカルボキシ-3-クロロプロポキシ)-(3-ホスホロキシフェニル)メチレン]トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン]、4ナトリウム塩の合成。工程(b)からのアルケン(0.9g)は25mlのアセトン中に溶解される。3mlの水、0.22gの水酸化ナトリウムの溶液が加えられる。その溶液は沈殿が形成される時点まで一晩攪拌される。その液体はデカンテーションされ、そしてその固体はアセトンで洗浄される。白色の固体が濾過され、更なるアセトンで洗浄され真空下で乾燥される：¹H NMR(D₂O) δ 1.77-1.92(m, 12H)、2.422(t, 2H)、2.59(br s, 1H)、3.15(br s, 1H)、3.635(t, 2H)、7.02-7.33(m, 4H)。



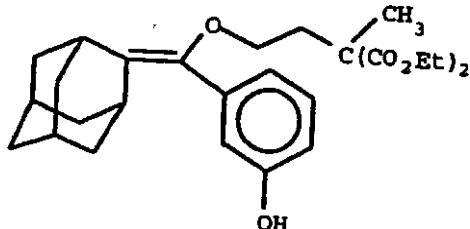
4

(d) [4-(3,3-ビスカルボキシ)-3-クロロプロポキシ]-4-(3-ホスホロキシフェニル)スピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン]、4ナトリウム塩(4)の合成。工程(c)からのアルケン(35mg)は1.0mlのD₂O中に溶かされる。ポリマー結合ローズベンガル(500mg)がp-ジオキサン-d₈の1.0ml中に5分間浸され、そして上記水溶液に加えられる。その反応混合物は0℃に冷却され、酸素のバブリングが開始され、その混合物は、NMRによって

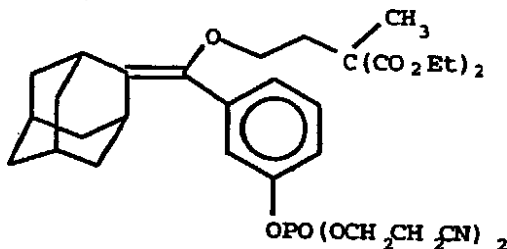
決定される通り 4 を生成するために、5mil カプトン (KAPTON) フィルターを通してナトリウムランプによって 45 分間照射される。その混合物は濾過され、その溶液は酵素アッセイのための緩衝液中に希釈される。 ^1H NMR (D_2O) δ 1.05 - 1.96 (m、12 H)、2.19 (br s、1 H)、2.60 - 2.62 (m、2 H)、3.07 (br s、1 H)、3.56 - 3.58 (m、2 H)、7.25 - 7.44 (m、4 H)。

実施例 5 . ジオキセタン 5 の調製

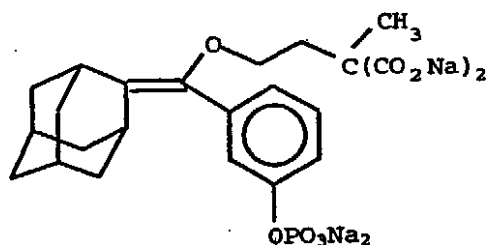
このジオキセタンは下記の反応のシーケンスによって調製される。中間体アルケン [(3 - ヒドロキシフェニル) - (2 - ヨウ化エトキシ) メチレン] トリシクロ - [3.3.1.1^{3,7}] デカン] までの合成は実施例 1 中の開示された通り誘導される。



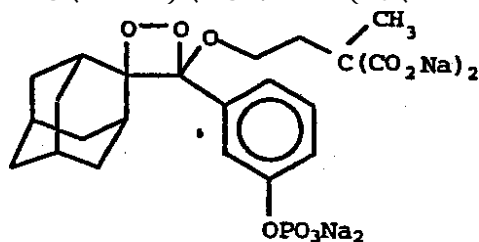
(a) [((3, 3 - ビスカルボエトキシブトキシ) - (3 - ヒドロキシフェニル) メチレン] トリシクロ [3.3.1.1^{3,7}] デカンの合成。水素化ナトリウム (60% 油中分散物 0.866 g) がヘキサンで油分が無くなるまで洗浄され、真空下で乾燥され、そして無水 DMSO 15 ml を加える。ジエチルメチルマロネート (2.4 g) が添加され、Ar の下で 15 分間攪拌される。無水 DMSO 15 ml 中、ヨードエトキシアルケン (2.8 g) の溶液が該反応混合物中に加えられる。100 °C に加熱され且つ 2 時間攪拌され、反応される。冷却後、該混合物は 30 ml の酢酸エチルで希釈される。その酢酸エチル溶液は水で 3 - 4 回抽出され、乾燥して濃縮される。その粗材料はヘキサン中 5 - 20% 酢酸エチルを用いてクロマトグラフィーされる。目的の化合物 (0.80 g) が 25% の収量で得られる： ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.208 (t、6 H)、1.347 (s、3 H)、1.76 - 1.96 (m、12 H)、2.20 (t、2 H)、2.66 (br s、1 H)、3.20 (br s、1 H)、3.41 (t、2 H)、4.09 - 4.17 (q、4 H)、6.78 - 7.26 (m、4 H)。



(b) [((3, 3 - ビスカルボエトキシブトキシ) - 3 - (ビス - (2 - シアノエチル) ホスホロキシ) フェニル) メチレン] トリシクロ [3.3.1.1^{3,7}] デカンの合成。アルゴンの層下に 15 ml の CH_2Cl_2 を収容するフラスコが氷浴中で冷やされる。ピリジン (1.38 g) が添加され続いて POCl_3 (0.8 g) がゆっくり加えられ、そして 15 分間継続して攪拌される。15 ml の CH_2Cl_2 中の工程 (a) からのアルケン (0.8 g) が滴下混合される。氷浴が除かれ、溶液は 1 時間攪拌される。この溶液に 1.38 g のピリジンと 1.24 g の 2 - シアノエタノールが加えられる。その反応混合物は 12 - 15 時間攪拌され白色沈殿の状態とされる。その混合物は CH_2Cl_2 で希釈されそして 4 x 50 ml の水で洗浄される。その CH_2Cl_2 抽出物は乾燥され濃縮される。粗生成物は、ヘキサン中 75% 酢酸エチルを用いるクロマトグラフィーで精製される。全量 0.55 g の油状物 (50%) が得られる： ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.208 (t、6 H)、1.34 (s、3 H)、1.78 - 1.97 (m、12 H)、2.18 (t、2 H)、2.61 (br s、1 H)、2.81 (t、4 H)、3.21 (br s、1 H)、3.41 (t、2 H)、4.09 - 4.16 (q、4 H)、4.37 - 4.46 (m、4 H)、7.14 - 7.34 (m、4 H)。



(c) [(3,3-ビスカルボキシブトキシ)-(3-ホスホロキシフェニル)メチレン]トリシクロ-[3.3.1.1^{3,7}]デカン]、4ナトリウム塩の合成。工程(b)からのアルケン(0.47g)は14mlのアセトン中に溶解される。1.5ml
 10
 の水中、0.117gの水酸化ナトリウムの溶液が加えられる。その溶液は沈殿が形成される時点まで一晩攪拌される。その液体はデカンテーションされ、そしてその固体はアセトンの10×5mlで洗浄される。真空下で乾燥した後、白色の固体(0.383g、92%)が得られる：¹H NMR(D₂O) δ 1.09(s, 3H)、1.75-1.90(m, 12H)、2.00(t, 2H)、2.57(br s, 1H)、3.13(br s, 1H)、3.47(t, 2H)、7.01-7.29(m, 4H)。



(5)

(d) 4-(3,3-ビスカルボキシブトキシ)-4-(3-ホスホロキシフェニル)スピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-トリシクロ-[3.3.1.1^{3,7}]デカン]、4ナトリウム塩(5)の合成。工程(c)からのアルケン(65mg)は3mlのD₂O中に溶かされる。ポリマー結合ローズベンガル(35mg)がp-ジオキサン中に懸濁され、そして上記水溶液に加えられる。その反応混合物は5-8℃に冷却され、酸素のバブリングが開始され、その混合物は(5)を生成するために1時間、5milカプトン(KAPTON)フィルターを通してナトリウムランプによって照射される。ポリマービーズが濾別され、その溶液は試験のためのストック溶液調製のために使用される。¹H NMR(D₂O) δ 0.92-1.33(m, 5H)、1.38-2.21(m, 13H)、2.92(br s, 1H)、3.19-3.32(m, 2H)、7.14-7.73(m, 4H)。
 30

実施例6. ジオキセタン3の代替の調製

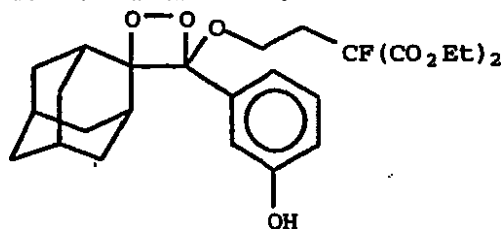
該ジオキセタンは、出発材料として[(3-ヒドロキシフェニル)メトキシメチレン-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン]を用いて下記に開示される反応のシーケンスによって調製される。この化合物は米国特許第4,983,779号中の記載の通りに調製することができる。

(a) アルケン[(3-ヒドロキシフェニル)メトキシメチレン-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン(12g)は2-クロロエタノール100mlを加え、攪拌する。Hg(OAc)₂の触媒量(2.8g)がアルゴン雰囲気下で混合物に添加される。110℃で5時間攪拌し反応させる。室温に冷却後、クロロエタノールが真空下で除去される。その固体はEtOAc中に溶解され、水で洗浄される。EtOAc層はNa₂SO₄で乾燥され、[(3-ヒドロキシフェニル)-(2-クロロエトキシ)メチレン]トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカンを生成するために濃縮される。
 40

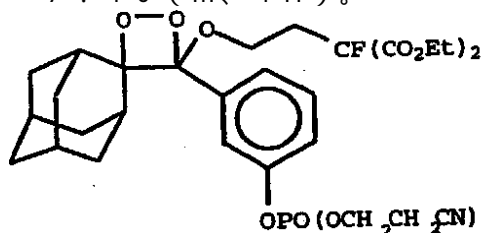
(b) ヨウ素原子による上記化合物中の塩素原子の置換は、本質的に米国特許第5,013,827号と5,068,339号中に記載された通り行われる。

(c) [(3-ヒドロキシフェニル)-(2-ヨードエトキシ)メチレン]トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカンからの[(3-ヒドロキシフェニル)-(3,3-ビスカルボキシ-3-フルオロプロポキシメチレン)トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカンの合成は、上記実施
 50

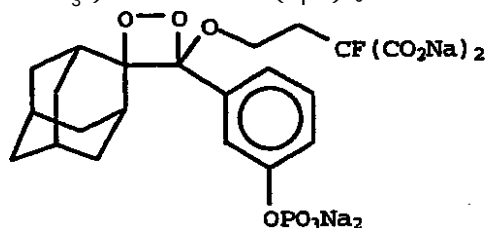
例 3 中に記載される。



(d) 工程 (c) からのフッ化マロネートアルケン (0.375 g) は、15 ml CH₂Cl₂ 中の ca. 1 mg メチレンブルーで光酸化される。O₂ バブリングと共に -78 °C に冷却後、その溶液は、5 ml カプトン (KAPTON) フィルターを通してナトリウムランプによって 45 分間照射され室温に暖めさせる。CH₂Cl₂ は留去され、残査は [4-(3,3-ビスカルボエトキシ-3-フルオロプロポキシ)-4-(3-ヒドロキシフェニル)] スピロ [1,2-ジオキセタン-3,2'-トリシクロ-[3.3.1.1^{3,7}]デカン] を生成するように溶離剤として CH₂Cl₂ 中 0-5% EtAc を用いてクロマトグラフィーされる：¹H NMR (CDCl₃) δ 0.97-1.02 (m, 1H)、1.21-1.33 (m, 7H)、1.45-1.91 (m, 10H)、2.23 (br s, 1H)、2.48-2.80 (m, 2H)、2.96 (br s, 1H)、3.35-3.44 (m, 1H)、3.65-3.75 (m, 1H)、4.21-4.40 (m, 4H)、6.85-7.40 (m, 4H)。



(e) 先の工程からのジオキセタンは、次の方法によってリン酸化される。アルゴン下、無水ピリジン 2 ml と CH₂Cl₂ 10 ml が 0 °C に冷やされ、0.424 g の POCl₃ の 10 ml CH₂Cl₂ 溶液が滴下により添加される。15 分後、10 ml CH₂Cl₂ 中の該ジオキセタン 0.424 g の溶液が滴下により添加される。その溶液は室温まで暖めさせ、且つ 4 時間攪拌される。その溶液は再び 0 °C に冷やされ、10 ml の CH₂Cl₂ 中に 0.75 g のシアノエタノールの溶液が滴下により添加される。この溶液は 2.5 時間攪拌し、室温まで暖めさせる。乾固するために濃縮した後、その残査は溶離剤としてヘキサン中 50-100% 酢酸エチルを用いてクロマトグラフィーされる。その溶媒は次いで真空中で除去され無色の油状物を得る。該ジオキセタンは次いで 100 ml の CH₂Cl₂ 中に溶かされ、タイプ I 水 (type I water) で 3 回洗浄される。その有機層は次いで Na₂SO₄ で乾燥され、濾過され、且つリン酸化ジオキセタンを生成するために濃縮される：¹H NMR (CDCl₃) δ 0.90-0.95 (m, 1H)、1.24-1.33 (m, 7H)、1.46-2.20 (m, 11H)、2.50-2.86 (m, 6H)、2.96 (br s, 1H)、3.32-3.41 (m, 1H)、3.62-3.73 (m, 1H)、4.20-4.48 (m, 8H)、7.30-7.70 (m, 4H)；³¹P (CDCl₃) -9.53 (p)。



(3)

(f) 10 ml のタイプ I 水中の NaOH 47.2 mg 溶液と 10 ml アセトンと、該ジオキセタンとを、アルゴン下で一晩反応させることによってそのアルキル基が除去される。溶媒は形成されている油状物残査からデキャンタされる。その油は、2 ml のアセトン

で2回洗浄し、次いで粉末状の白色固体を生成するために別の10mlのアセトンと粉砕される。固体のジオキセタン3は、吸引濾過によって捕集され、別な20mlのアセトンで洗浄される。

代替の手順において、工程(d)のジオキセタン生成物は、次の方法によって直接ジオキセタン3に変換することができる。無水ピリジン2mlと CH_2Cl_2 10mlの溶液はアルゴン下、0℃に冷やされ、そして CH_2Cl_2 の10ml中0.424gの POCl_3 溶液が滴下により加えられる。15分後、 CH_2Cl_2 の10ml中0.424gの該ジオキセタン溶液が滴下により加えられる。その溶液は室温に暖められ、4時間攪拌される。リン酸塩が形成され、そしてそのエステル基は、タイプI水1ml中、47.2mgの水酸化ナトリウム溶液と10mlのアセトンと、生じるジクロロホスフェートジオキセタンとを、アルゴン下で一晩反応させることによって加水分解される。溶媒が生成物を含む残渣から除去される。生成物は次いでアセトンで洗浄され、必要があれば、粉末の白色固体を生成させるためアセトンで粉砕される。ジオキセタン3が吸引濾過によって捕集される。

実施例7. カプセル化学分析システム中の試薬繰り越し問題の発見

以下に記載した実験は、光の放出(ルミネッセンス)を測定するために形作られた検出システムと共に、Kumarらの米国特許第5,399,497号中に本質的に記載されたようなプロトタイプのカプセル化学分析システムで実行される。該方法と装置は、テフロンチューブ、該チューブは内表面上のフッ化炭素油の分離層を有する、を通して流体セグメント(fluid segments)の流れを供給することを備える。サンプルと試薬は、このチューブ内に吸引され(aspirated)、且つ生じた液体セグメントは該チューブを通して移される。不均一イムノアッセイ法によって要求される分離工程と洗浄工程は、一方の水性セグメントから他方へ磁性粒子を移動させる磁力によって容易になされる。検出システムは、フォトンカウンターとファイバーが光捕集の効率を最大限とするための上記テフロンチューブの周囲に直接配置されているファイバー光学リードヘッド(fiber optic read head)を備える。

TECHNICON IMMUNO 1R TSH method (Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA) が、発光原性試薬(luminogenic reagents)の試験をするための典型的なイムノアッセイ法として使用される。該方法の原理は、フルオレセイン-標識抗体を含む第1の試薬(R1)、及び抗体-アルカリホスファターゼ(ALP)接合体を含んだ第2の試薬とを同時に、抗原TSHを含む試験品をインキュベートすることを含む。それぞれの抗体は、「サンドウィッチ」の形成が二つの抗体とTSH抗原との間で開始されるように、TSH抗原上の異なるエピトープのために特異的とされる。抗-フルオレセイン結合を含む磁性粒子は、サンドウィッチをカプセルするために使用され、且つ該粒子は、その後非結合試薬を除去するために洗浄される。該粒子は、次いでALPのための気質を含んだ発光原性試薬にさらされ、そしてルミネッセンスが測定される。

発光原性R3試薬は、0.2mMのCSPD(2ナトリウム3-(4-メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン}-4-イル)フェニルホスフェート、(Tropix, Inc., Bedford, MA, USA)、3mMのピラニン(ヒドロキシピレンスルホン酸)、1mMの MgCl_2 、1Mのジエタノールアミン緩衝液(pH10.0)、0.1%トリトンX-100及び0.1% NaN_3 を備える。カプセル化学分析上の結果のシーケンスは図面の図1中に表現される。流体カプセル又は試験パッケージは、6つの液体セグメントを備え、各々は28 μl の体積を有する。磁性粒子(TECHNICON IMMUNO 1 systemにおいて使用される磁性粒子1.4 μl は粒子洗浄緩衝液(25mMトリス、pH7.5、0.2Mの NaCl 、0.1%トリトンX-100と保存料を含む)する流体の残りと共に、第1のセグメント(MP)内に吸引される)。R1(TSHに対するフルオレセイン-標識抗体を含む血清ベースの溶液の10.4 μl)、R2(ALPと接合されたTSHに対する抗体を含む血清ベースの溶液の10.4 μl)及びS(血清サンプルの7.2 μl)が第2のセグメント中に吸引される。次の2つのセグメント(W1とW2)は上記MPセグメントにおいて用いたと同じ洗浄緩衝液を備える。第4のセグメントは、上述した組成物の、発光原性基質とルミネッセンス増強剤である鍵成分(key elements)を持つ、R3である。第6のセグメントは、隣接した試験を分離するのに用いられる、内部-試

10

20

30

40

50

験緩衝液（上述した粒子の緩衝液と同様である）である。磁力移送は図 1 中の矢印によって表す。これらの移送は 1 又は 2 の磁力移送アッセンブリ（M 1 と M 2）によって促進される。13 分間のインキュベートの後、サンドウィッチ構造が生じている間に、M 1 が獲得を開始するように、R1+R2+R3 セグメント内の磁性粒子に移送される。6 分間の付加的な期間の後、M 2 が第 1 の洗浄セグメント内に粒子に移送される。12 秒の付加的期間の後、M 2 は第 2 の洗浄セグメント内の粒子に移送される。12 秒間の別な期間の後、M 2 は R 3 セグメント中の粒子に移送され、このセグメントからの光放出がルミノメーターのリードヘッドを通して往復して通過する水性セグメントの流れとして検出される。

テフロンチューブが光に対し透明であることから、光ピッピング（light piping）（又は「光の繰り越し」）に伴う問題が予期される。特に、フォトンが放出される R 3 セグメントに隣接するいくつかの試験は、テフロン材料が入り込むことができ、チューブの長さを下って伝搬され、且つ重要な試験の信号の測定の間を通して検出器内に散在される。しかしながら、信号が隣接した試験において検出されると同時に、それは予期される手法において生じることはない。試験 N と距離をおいて急速に衰えるどころか、光出力のピークは、図面の図 2 中に示す通り、隣接した試験パッケージの R 3 セグメントの周囲を中心として観測される。図 2 において、試験 N は概ね毎秒 7.5 ミリオンカウント（cps）の、高いレベルのルミネッセンスを生じる。試験 N - 1 と N - 2 は、試験 N の以前のチューブ内に吸引され、ルミノメーターを通してこの試験に先行し、且つ試験 N + 1 と N + 2 は試験 N 以後に続発する。該分析システムは、流れの中でそれぞれ個別の空気及び液体セグメントのためにカウントされるフォトンが記録される。図 2 中のプロファイルは、A L P の不在において誘導されるバックグラウンドの流みエッセンスのためのそれぞれを捕捉する 5 つの試験の 10 回繰り返しパネルの平均を表す。それぞれのデータ点から減じられる試薬のブランク値は、各々 5 つの試験の 10 回繰り返しパネルから得られた平均である。繰り越し信号の大きさ（magnitude）は、パーツパーミリオン（ppm）において表される、試験 N 中のピーク cps によってそれぞれの隣接試験中のピーク cps を分割することによって計算される。

この反応のための別な可能性のある説明は、意図しない手法における隣接した試験内に試験 N からの A L P の物理的な繰り越しである。これは、例えば、チューブを通して液体セグメントのスムーズな動きを混乱させることができる、壁上に析出された微粒子からなる材料をそのチューブが含むならば、生じることができる。しかしながら、隣接試験の R 3 セグメント中の 10 mM 無機リン酸塩の配置は、隣接試験中の信号の大きさに関して影響を及ぼさない。このリン酸塩の量がこれらの試験条件の下で少なくとも 90% において A L P を阻害していることから、その物理的な繰り越しの可能性は除外される。

光学的な繰り越しを更に除外するために、フルオレッセント増強剤ピラニンは、試験 N のみから省略されるが、しかしその隣接試験中には存在する。その結果、試験 N 中の信号の大きさは、概ね 10 のファクターによって低下される。しかしながら、図面の図 3 中に示す通り、隣接試験におけるピークの高さは、著しく変わってはいない。その繰り越し信号が隣接試験において釣り合って変化しないと言う事実は、この繰り越しが光学的なものではないことを明確に示す。

繰り越しの付加的な及び非予測的なタイプは、繰り越し問題の原因とされる。ヒドロキシジオキセタン中間体は、そのような繰り越しが隣接した試験の R 3 セグメント内への油分を経て溶解されたヒドロキシジオキセタン中間体を移送するためとされるように、テフロンチューブの内壁を被覆するために使用されたフッ化炭素油中に十分に溶解されることが見出された。このプロセスは、pH 10 での 1 M D E A から pH 7 でのトリスまでの隣接試験におけるセグメントの緩衝液を変更することにより試験される。pH 7 では、これら R 3 セグメント中に溶解したヒドロキシジオキセタン中間体は安定であり、光を放射することはない。図面の図 4 に示す通り、この pH の変更はルミネッセンスの側方帯の完全な排除の結果を生じる。N + 1 と N - 1 における残余の微小な繰り越しは、予想される光学的繰り越しに帰される。これらの結果は、隣接試験におけるピーク中の光放出の源が隣接する試験の R 3 セグメント内への C S P D から誘導されたヒドロキシジオキセタンの「化

10

20

30

40

50

学的な繰り越し」であることを証明している。

実施例 8 . ジカルボキシ酸-置換ジオキセタン 1 により観測される化学的繰り越しの排除

表 1 は、反応中間体の化学的繰り越しについて 3 つの別のジオキセタンを用いた効果を示す。LUMIGEN PPD [4 - (メトキシ) - 4 - (3 - ホスホロキシフェニル)] スピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1^{3,7}] - デカン、(Lumigen, Inc., Southfield, MI, USA)、ジオキセタン 2、モノカルボン酸誘導体及びジオキセタン 1、ジカルボン酸誘導体は、同じ濃度で試験組成物中にそれぞれ使用される。該 ppm の欄は、反応の最悪のケースを表す、N + 1 試験のための信号である。変更していない親化合物、PPD の繰り越しは、CSPD で観測されるものよりも 2 倍以上高いことが見出される。驚いたことに、モノカルボン酸誘導体、ジオキセタン 3 は、化学的繰り越しの大きさにおいて、ただ 84 % の減少を示した。これは、単一の電荷基がフッ化油中の反応性中間体の可溶化を完全に防ぐために不十分であることを示している。しかしながら、ジカルボン酸誘導体は、二つの電荷基が望ましい反応を達成するために完全に充足することを示す、100 % の有効性である。

表 1 . 化学的繰り越しの減少化

化合物	ppm	減少%
LUMIGEN PPD	1640	
ジオキセタン 2	260	84%
ジオキセタン 1	0	100%

実施例 9 . 増強剤の役割

ジオキセタン 1 に基づく試薬の最適化の一部として、幾つかの増強剤が検討される。pH 9 . 6 で、増強剤 A (1 - トリオクチルホスホニウムメチル - 4 - トリブチルホスホニウムメチルベンゼンジクロライド) は、6 . 2 のファクターによってルミネッセント信号を増加させ、増強剤 B (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)) は 19 . 7 のファクターによって信号を増加させる。pH 10 で、増強剤 A は 4 . 8 のファクターによって信号を増加させ、増強剤 B は 18 . 9 のファクターによって信号を増加する。増強剤 B が高い光強度を達成するにもかかわらず、増強剤 A は、それが低分子量のモノマー性化合物であることから、分析システム上で使用するために好適である。ポリマー性化合物は、殊にもしそれらがポリカチオン性であると、分析システムの操作のための意味のある問題を引き起こすであろう沈殿の原因となる、血清成分と相互作用する。

フルオレセインとピラニンの両方は、増強剤 A との組合せにおいて補充の蛍光体として有効であることが見出される。単に、これらの蛍光体は、約 10 倍の増強を達成するために相対的に高濃度 (3mM) で使用する必要がある。しかしながら、増強剤 A との組合せにおいて、増強剤の不在中で必要とされるよりも蛍光体の 100 倍の低濃度で匹敵する増強が得られるという相乗効果が観測される。表 2 と 3 は、各々増強剤 A の 1 mg / ml の存在においてピラニンとフルオレセインによる増強の大きさを示す。

表 2 . 増強剤 A とピラニンによる増強

〔ピラニン〕 (mM)	増強ファクター
0.01	3.7
0.02	7.3
0.03	9.8
0.04	12.2
0.05	13.7

10

表 3 . 増強剤 A とフルオレセインによる増強

〔フルオレセイン〕 (mM)	増強ファクター
0.01	2.6
0.02	4.0
0.05	7.1
0.10	8.7

20

実施例 10 . カプセル化学分析システムのための最適化された処方

上述した観測はカプセル化学分析システムのための最適化された処方の発展を生じさせている。この処方は、0.1 - 1 mM のジオキセタン 1、0 - 0.05 mM ピラニン、0.1 - 5 mg / ml 増強剤 A、0 - 1 mM の Mg^{+2} 、0.1 - 1 M の 2 - アミノ - 2 - メチル - 1 - プロパノール (pH 10.0) 及び 0.01 - 1 % トリトン X-100 とを備える。この処方の使用は、化学的な繰り越しの問題の完全な排除と増強された成果との結果を生じる。

実施例 11 . 酵素アッセイにより測定される 1, 3, 4 及び 5 の安定性。

0.1 mg / ml 増強剤 A、0.88 mM の Mg^{+2} 、0.2 M の 2 - アミノ - 2 - メチル - 1 - プロパノール、pH 10.0、0.1 % トリトン X-100 及び 0.5 mM のジオキセタン 1, 3, 4 及び 5 を備える、それぞれの処方が調製され、不透明なポリエチレンボトル中、4、25 及び 40 で保管される。それぞれのボトルから 24 の 100 μ l 分割が、96 穴プレートに分注し、且つその溶液は 37 でインキュベートされる。各々の穴に、 8×10^{-17} モルの AP を含む溶液 10 μ l が注入され、そして 5 時間を越えて光強度が記録される。データは 24 穴全ての平均とされる。その実験は、各々のジオキセタンのために示された時間的間隔で繰り返される。図 5 中のその結果は、25 で 3 つの処方の安定性の比較を示す。図 5 中に示す通り、フッ素 - 置換ジオキセタン 3 は、塩素 - 置換ジオキセタン 4 及び非 - 置換ジオキセタン 1 よりも本質的に良好な保存安定性を示すことが見出される。ジオキセタン 3 と 5 は、40 で 1 又は 4 よりも本質的により安定である。

30

40

表 4 . 各処方 の 保存安定性

時間 (wks)	ジオキセタン残存の%			
	1	3	4	5
0	100	100	100	100
1	94.8			100
2	91.1		77.0	99.8
3	87.5	99.1	66.0	
4	84.1		65.6	99.4
5	81.8			
6	80.7			
9	76.5	96.9		
10			57.5	
12		96.7		
14		93.8		
21		93.6		

10

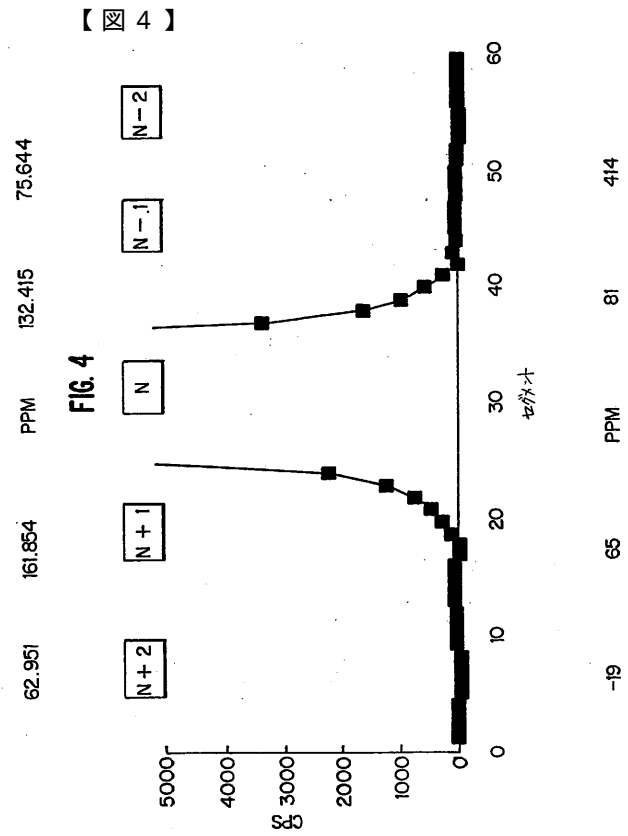
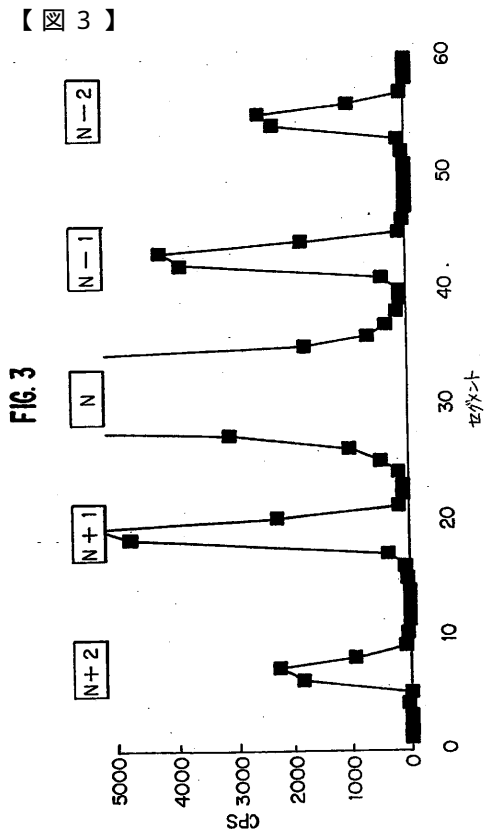
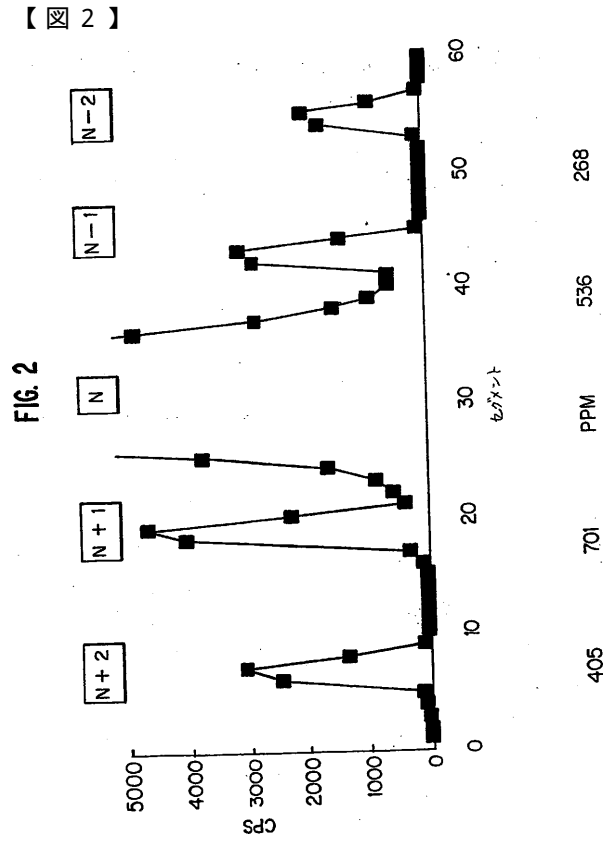
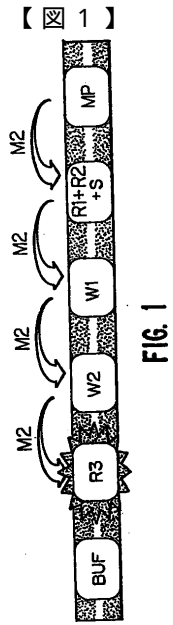
20

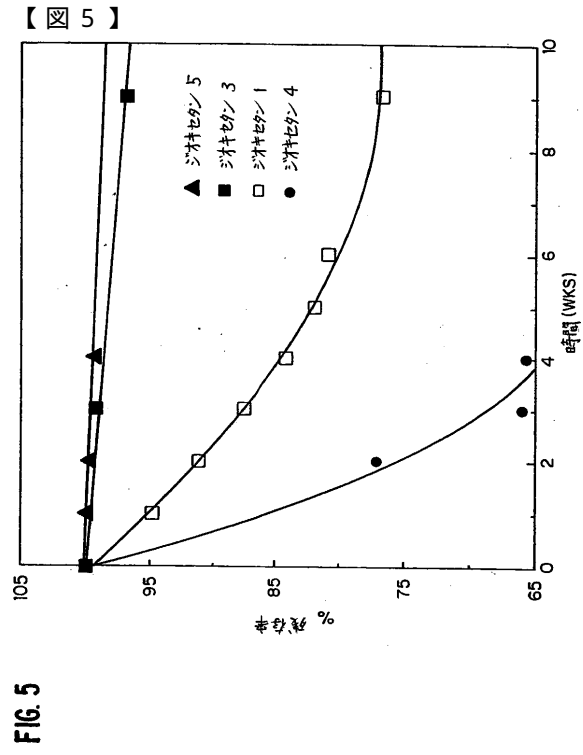
実施例 12 . 3 の効力

ジオキセタン 3 に併合する試薬の検出は、実施例 7 中に記載した通りの試験システムにおいて評価される。その試験材料は、磁性粒子上に捕捉されたフルオレセイン-標識アルカリホスファターゼ接合体とされる。3 を含む試薬を用いた AP のためのアッセイは、ジオキセタン 1 を用いた結果に比較して、感受性、ダイナミックレンジ及び正確さを伴う結果を導いた。

30

先の各実施例は説明のためのみのものであり、減縮を意図するものではない。発明の範囲は添付されたクレームと均等物によってのみ示される。





フロントページの続き

(72)発明者 デシルヴァ, ルヌカ

アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 6 7 ノースヴィル デルタ ドライブ 4 0 6 2 8

(72)発明者 タクール, クマール

アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 0 3 4 サウスフィールド グロダン 2 5 1 2 5 アパートメ
ント 2 1 7

審査官 藤森 知郎

(56)参考文献 特開平09 - 184810 (JP, A)

特開平09 - 249659 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)