

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 311030

(P2002 - 311030A)

(43)公開日 平成14年10月23日(2002.10.23)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S 4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	U
// G 0 1 N 33/00		G 0 1 N 33/00	D

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 15数)

(21)出願番号 特願2001 - 125609(P2001 - 125609)

(22)出願日 平成13年4月24日(2001.4.24)

(31)優先権主張番号 特願2000 - 343565(P2000 - 343565)

(32)優先日 平成12年11月10日(2000.11.10)

(33)優先権主張国 日本(JP)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年3月5日 日本薬学会第121年会組織委員会発行の「日本薬学会第21年会要旨集1」に発表

(71)出願人 597096105

株式会社 矢内原研究所

静岡県富士宮市粟倉2480番地の1

(71)出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

(72)発明者 矢内原 昇

静岡県静岡市北403番地の22

(72)発明者 加藤 郁夫

静岡県富士宮市泉町675 ロイヤルプラザいずみ野310号

(74)代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外 8 名)

最終頁に続く

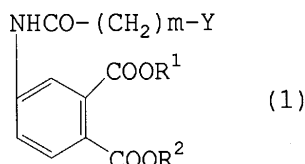
(54)【発明の名称】 フタル酸エステル類の測定法

(57)【要約】

【課題】フタル酸エステル類を特異的に認識する抗体を用いてフタル酸エステル類を簡便かつ特異的に免疫測定する方法を提供。

【解決手段】一般式

【化1】

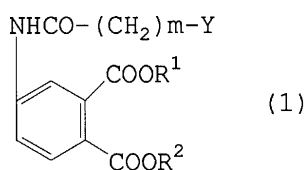


〔式中、R¹, R²はそれぞれ水素原子、アルキル基、シクロアルキル基またはフェニルアルキル基(但し同時に水素原子であってはならない)、mは1-5の整数およびYはアミノ基またはカルボキシル基を示す〕で表されるフタル酸エステル類とキャリア蛋白との結合体を免疫抗原として作成された抗体を用いて被検物質中のフタル酸エステル類を免疫測定する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式

【化1】

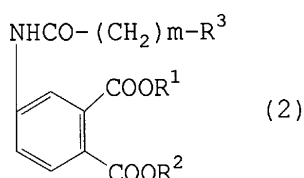


〔式中、R¹およびR²は同一または異なって水素原子、アルキル基、シクロアルキル基またはフェニルアルキル基を示し、mは1-5の整数を示し、Yはアミノ基またはカルボキシル基を示す。但し、R¹およびR²は同時に水素原子であってはならない。〕で表されるフタル酸エステル類とキャリア蛋白との結合体からなることを特徴とする抗フタル酸エステル抗体作成のための免疫抗原。

【請求項2】 請求項1に記載の免疫抗原を用いて作成された抗フタル酸エステル抗体。

【請求項3】 一般式

【化2】



〔式中、R¹、R²およびmは前記に同じ。R³はビオチン-(R⁴)_n-NH-基または基-CO-(R⁴)_n-NHNH-ビオチンを示し、R⁴は同一または異なってArg残基またはLys残基を示し、nは1-3の整数を示す。〕で表されるビオチン化フタル酸エステル誘導体。

【請求項4】 請求項2に記載の抗フタル酸エステル抗体を用いて被検物質中のフタル酸エステル類を免疫測定することを特徴とする、フタル酸エステル類の測定方法。

【請求項5】 請求項3に記載のビオチン化フタル酸エステル誘導体を測定系の標識体として利用する請求項4に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、フタル酸エステル類の測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】フタル酸エステル類は、プラスチック製品の製造における可塑剤として広く使用されている化学物質である。

【0003】最近、フタル酸エステル類が生体に内分泌攪乱作用を及ぼすことが確認され、上記プラスチック製品からの溶出が重大な環境汚染問題とされている。

【0004】フタル酸エステル類の検出・測定は、これまで、このような化学物質の検出・測定に一般に利用されている、例えば高速液体クロマトグラフィー、LC-Mas

s、GC-Massなどの物理化学的機器を用いた方法により実施されている。しかしながら、このような検出・測定方法は、用いられる機器類が高価であるばかりでなく、検体(サンプル)数、検体の処理能においても限界があり、より簡便でしかも多数の検体を正確に測定・検出できる方法の開発が望まれている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記従来技術の課題を解決して、フタル酸エステル類を簡便且つ特異的に測定・検出する方法およびそのための手段を提供することにある。

【0006】

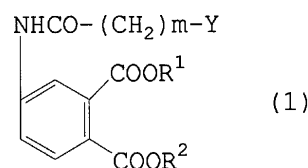
【課題を解決するための手段】本発明者は、鋭意研究の結果、上記目的に合致する免疫測定系の確立に成功し、ここに本発明を完成するに至った。

【0007】即ち、本発明は以下の要旨の免疫抗原、抗フタル酸エステル抗体、ビオチン化フタル酸エステル誘導体およびこれらを利用したフタル酸エステル類の測定方法を提供する。

20 (1) 一般式

【0008】

【化3】



30

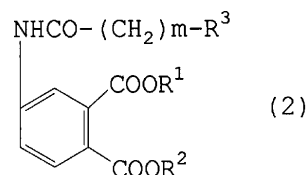
【0009】〔式中、R¹およびR²は同一または異なって水素原子、アルキル基、シクロアルキル基またはフェニルアルキル基を示し、mは1-5の整数を示し、Yはアミノ基またはカルボキシル基を示す。但し、R¹およびR²は同時に水素原子であってはならない。〕で表されるフタル酸エステル類とキャリア蛋白との結合体からなることを特徴とする抗フタル酸エステル抗体作成のための免疫抗原。

(2) 上記(1)に記載の免疫抗原を用いて作成された抗フタル酸エステル抗体。

(3) 一般式

【0010】

40 【化4】



【0011】〔式中、R¹、R²およびmは前記に同じ。R³はビオチン-(R⁴)_n-NH-基または基-CO-(R⁴)_n-NHNH-ビオチンを示し、R⁴は同一または異なってArg残基またはLys残基を示し、nは1-3の整数を示す。〕で表されるビオチ

ン化フタル酸エステル誘導体。

(4) 上記(2)に記載の抗フタル酸エステル抗体を用いて被検物質中のフタル酸エステル類を免疫測定することを特徴とする、フタル酸エステル類の測定方法。

(5) 上記(3)に記載のビオチン化フタル酸エステル誘導体を測定系の標識体として利用する上記(4)に記載の測定方法。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明免疫抗原を示す前記一般式(1)において、 R^1 および R^2 で定義される各基は次の通りである。

【0013】即ち、アルキル基には、炭素数1-10の直鎖状もしくは分枝鎖状アルキル基が含まれる。その例としては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、2-エチルヘキシル基などを挙げる事ができる。

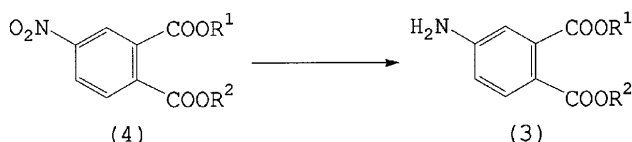
【0014】シクロアルキル基には、炭素数3-8のシクロアルキル基が含まれる。その例には、例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキサ

シル、シクロヘプチル、シクロオクチル基が含まれる。
【0015】フェニルアルキル基には、アルキル部分が炭素数1-6であるフェニルアルキル基が含まれる。具体的には、例えばベンジル、2-フェニルエチル、1-フェニルエチル、3-フェニルプロピル、4-フェニルブチル、5-フェニルペンチル、6-フェニルヘキシル、1,1-ジメチル-2-フェニルエチル、2-メチル-3-フェニルプロピル基などを例示することができる。

【0016】本発明ビオチン化フタル酸エステル誘導体を示す前記一般式(2)において、 R^3 で定義される各基におけるビオチンは、ビオチンの側鎖CO基で各アミノ酸残基(R^4)と結合しているものとする。また、各アミノ酸残基(R^4)は特に断らない限り、D体およびL体の両者を包含する。

本発明免疫抗原

〔反応式-1〕



【0022】〔式中、 R^1 および R^2 は前記に同じ。〕
反応式-1に記載の化合物(4)を化合物(3)に導く反応は、例えば(a)適当な溶媒中、接触還元触媒を用いて化合物(4)を還元するかまたは(b)適当な不活性溶媒中、金属もしくは金属塩と酸または金属もしくは金属塩とアルカリ金属水酸化物、硫化物もしくはアンモニウム塩との混合物などを還元剤として用いて化合物(4)を還元することにより行われる。

【0023】上記(a)に示す接触還元触媒を用いる方法

*本発明免疫抗原は、前記一般式(1)で表されるフタル酸エステル誘導体と、キャリア蛋白との結合体からなっている。

【0017】ここで、一般式(1)で表されるフタル酸エステル誘導体には、モノエステル類およびジエステル類が含まれる。該ジエステル類は、同一のエステル形成基(アルキル、シクロアルキル基など)を有するものである必要はなく、同一群または異なる群に属する2つのエステル形成基を有するものであってもよい。

【0018】上記フタル酸エステル誘導体は、常法に従い製造することができる。例えば、以下の方法に従い製造することができる。即ち、まず、市販のフタル酸無水物をニトロ化し、加水分解した後、エステル化して、フタル酸エステルのニトロ化物を得、次いで該ニトロ化物を、例えば錫と塩酸とを用いて還元して、アミノ体(4-アミノフタル酸エステル)に変換し、更に該アミノ体のアミノ側鎖に、例えばアミノカプロン酸などの一般式 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{Y}$ (式中、 y および m は前記に同じ。)で示される適当なスパーサーを結合させることにより、所望のフタル酸エステル誘導体を得ることができる。

【0019】尚、上記アミノ体およびその合成における各反応はそれぞれ既知であるか既知の方法に従うことができる(例えばCA登録番号第22572-84-5、J. Med. Chem., 30, 509-514 (1987)など参照)。また、スパーサーの結合反応は、例えば、後述するビオチン化フタル酸エステル誘導体の製造において記載する縮合反応に従うことができる。

【0020】上記フタル酸エステル誘導体の製造のための原料化合物(フタル酸エステルのニトロ体およびアミノ体)は、例えば下記反応式-1に示す方法に従い製造することができる。

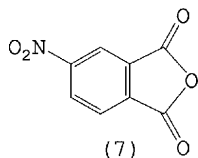
【0021】

【化5】

の場合、溶媒としては、例えば水、酢酸などの低級アルカン類、メタノール、エタノール、イソプロパノールなどのアルコール類、ヘキサン、シクロヘキサンなどの炭化水素類、ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、ジエチルエーテル、ジエチレングリコールジメチルエーテルなどのエーテル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類、*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)などの非プロトン性極性溶媒などおよびこれらの混合溶媒が用いられる。接触還元触媒としては、例えばパラジウム、パラ

ジウム-黒、パラジウム-炭素、白金、酸化白金、亜クロム酸銅、ラネーニッケルなどを使用することができる。これらの触媒は、出発原料に対して一般に0.02-1倍重量程度で用いられるのがよい。反応温度は、通常-20-150 付近、好ましくは0-100 付近であり、水素圧は通常1-10気圧とするのがよい。反応は一般に0.5-10時間程度で終了する。また上記反応の系内には塩酸などの酸を添加することもできる。

【0024】前記(b)に示す方法の場合、還元剤としては、例えば鉄、亜鉛、錫もしくは塩化第1錫と塩酸、硫酸などの鉱酸との混合物、または鉄、硫酸第1鉄、亜鉛もしくは錫と水酸化ナトリウムなどのアルカリ金属水酸化物、硫化アンモニウムなどの硫化物、アンモニア水、塩化アンモニウムなどのアンモニウム塩との混合物が用いられる。不活性溶媒としては、例えば水、酢酸などの低級アルカン酸類、メタノール、エタノールなどのアルコール類、ベンゼン、トルエン、キシレンなどの芳香族炭化水素類、ジオキサンなどのエーテル類などおよびこれらの混合溶媒が用いられる。還元反応は、用いる還元剤の種類に応じて適宜選択決定することができる。例えば亜鉛と塩酸とを還元剤として用いる場合、反応は有利には0 ~ 室温付近で、約0.5-15時間程度を要して実施されるのがよい。亜鉛および塩酸の使用量は、それぞれ原料化合物に対して大過剰量とすることができる。通常*



【0029】〔式中、 R^{1a} は前記に同じ。 R^{1b} は水素原子またはアルカリ金属原子を示す。化合物(4b)のニトロ基の置換位置はベンゼン環上の4-位または5-位とする。〕アルカリ金属原子としては、ナトリウム原子、カリウム原子などを例示できる。

【0030】上記式-3における化合物(7)と化合物(8)との反応は、適当な不活性溶媒中または無溶媒下に、塩基性化合物の存在下または不存在下に行われる。

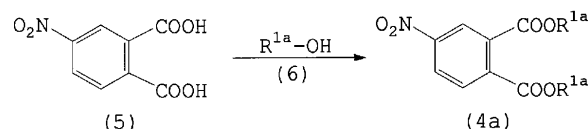
【0031】不活性溶媒としては、例えばベンゼン、トルエン、キシレンなどの芳香族炭化水素類、THF、ジオキサン、ジエチレングリコールジメチルエーテルなどのエーテル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素などのハロゲン化炭化水素類、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノール、tert-ブタノール、n-ヘキサノールなどのアルコール類、酢酸などの低級アルカン酸類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトニトリル、ピリジン、DMSO、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ヘキサメチルリン酸トリアミド(HMPA)などの非プロトン性極性溶媒などおよ

*それぞれ等モル量~20倍モル量用いられる。

【0025】前記反応式-1における出発原料である化合物(4)は、例えば下記式-2~ -4に示す各方法に従い製造することができる。

【0026】

【化6】
〔反応式-2〕

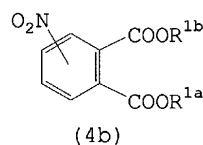


【0027】〔式中、 R^{1a} はアルキル基、シクロアルキル基またはフェニルアルキル基を示す。〕

上記式-2における化合物(5)と化合物(6)との反応は、例えば塩酸、硫酸などの鉱酸類、チオニルクロライド、オキシ塩化リン、五塩化リン、三塩化リンなどのハロゲン化剤の存在下に、0-200 程度、好ましくは50-150 程度の温度で1-30時間程度を要して実施できる。化合物(6)の使用量は、化合物(5)に対して通常大過剰量とするのがよい。

【0028】

【化7】

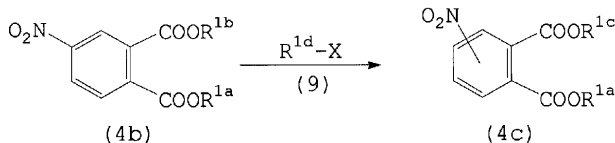


びこれらの混合溶媒が用いられる。塩基性化合物としては、例えば炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等の炭酸塩、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどのアルカリ金属水酸化物、水素化ナトリウム、カリウム、ナトリウムアミド、ナトリウムメチラート、ナトリウムエチラートなどの金属アルコラート類、ピリジン、N-エチルジソプロピルアミン、ジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン、1,5-ジアザビシクロ[4.3.0]ノネン-5(DBN)、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデセン-7(DBU)、1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン(DABCO)などの有機塩基などを挙げることができる。化合物(8)の使用量は化合物(7)に対して少なくとも等モル量、好ましくは等モル~10倍モル量程度とされるのがよい。反応は通常0-200 程度、好ましくは0-150 程度で行われ、一般に約5分~3時間程度で終了する。

【0032】

【化8】

〔反応式-4〕



【0033】〔式中、 R^{1a} および R^{1b} は前記に同じ。 R^{1c} はアルキル基、シクロアルキル基またはフェニルアルキル基を示す。 X はハロゲン原子または水酸基を示す。化合物(4c)のニトロ基の置換位置はベンゼン環上の4-位または5-位とする。〕ここでハロゲン原子は、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、沃素原子を包含する。

【0034】上記式-4における化合物(4b)と化合物(9)中 x がハロゲン原子を示す化合物との反応は、適当な不活性溶媒中、塩基性化合物の存在下に行われる。

【0035】不活性溶媒としては、例えばベンゼン、トルエン、キシレンなどの芳香族炭化水素類、THF、ジオキサン、ジエチレングリコールジメチルエーテルなどのエーテル類、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素などのハロゲン化炭化水素類、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノール、tert-ブタノール、n-ヘキサノールなどのアルコール類、酢酸などの低級アルカン酸類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトニトリル、ピリジン、DSMO、DMF、HMPAなどの非プロトン性極性溶媒などおよびこれらの混合溶媒が用いられる。塩基性化合物としては、例えば炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等の炭酸塩、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどのアルカリ金属水酸化物、水素化ナトリウム、カリウム、ナトリウムアミド、ナトリウムメチラート、ナトリウムエチラートなどの金属アルコラート類、ピリジン、N-エチルジイソプロピルアミン、ジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン、DBN、DBU、DABCOなどの有機塩基などを挙げることができる。化合物(9)の使用量は化合物(4b)に対して少なくとも等モル量、好ましくは等モル~3倍モル量程度とされるのがよい。反応は通常0-200 程度、好ましくは0-170 程度で行われ、一般に約5分~10時間程度で終了する。

【0036】化合物(4b)中 R^{1b} がアルカリ金属原子を示す化合物と、化合物(9)中 x が水酸基を示す化合物との反応は、適当な不活性溶媒中または無溶媒下に、酸の存在下に行われる。

【0037】不活性溶媒としては、前記化合物(4b)と化合物(9) (x がハロゲン原子を示す化合物)との反応において例示したそれらをいずれも使用することができる。また、酸としては塩酸、硫酸などの鉱酸類を使用することができる。化合物(9)の使用量は化合物(4b)に対して少なくとも等モル量程度、好ましくは等モル~3倍モル量程度とされるのがよい。反応は通常0-200 程度、好ましくは0-170 程度で行われ、一般に約5分~10時間程

度で終了する。

【0038】化合物(4b)中 R^{1b} が水酸基を示す化合物と、化合物(9)中 x が水酸基を示す化合物との反応は、前記反応式-2に示した化合物(5)と化合物(6)との反応と同様にして、同様の条件下に実施することができる。

【0039】一般式(1)で表されるフタル酸エステル誘導体とキャリア蛋白との結合反応は、一般式(1)で表されるフタル酸エステル誘導体の有する官能基 Y を利用して、慣用の試薬を用いた縮合反応に従い実施される。

【0040】上記においてキャリア蛋白としては、抗原乃至ハプテンの免疫原性を高めるものとして当該分野で慣用される各種キャリア蛋白をいずれも使用できる。その例としては、例えばアルブミン、グロブリン、ヘモシアニンなどの各種動物蛋白質、ポリリジンなどの人工ポリペプチドなどを例示できる。

【0041】縮合反応のための試薬としても公知の各種のものを利用することができる。その例としては、例えば1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(WSCD)などの水溶性カルボジイミド類、ジメチルスルペイミデート(DMS)のような縮合剤などを好適なものとして挙げることができる。

【0042】上記フタル酸エステル誘導体とキャリア蛋白との結合体は、そのまま本発明抗フタル酸エステル抗体の製造に利用することができ、また所望によりこれを高分子吸着体に吸着させた吸着体の形で本発明抗体の製造に利用することもできる。

【0043】高分子吸着体としては、免疫原性を高めるものとして当該分野で慣用される各種高分子物質を採用できる。これには、例えば炭素末、ポリビニルピロリドン、ラテックス、ブタチログロブリンなどの血清蛋白質などが包含される。該高分子吸着体と本発明免疫抗原とを、常法に従い混和することにより、所望の吸着体が得られる。

本発明抗体

本発明抗体は、本発明免疫抗原を利用して、一般的な抗体の製造法に従い、免疫抗原を温血動物(ヒトを除く)に免疫することにより製造することができる。その方法乃至手法は、基本的には常法に従うことができる。尚、本発明抗体には、温血動物の抗血清や鶏卵抗体などのポリクローナル抗体とともにモノクローナル抗体も含まれる。

【0044】より具体的には、ポリクローナル抗体は、例えば、ウサギ、ヒツジ、モルモット、ニワトリのような温血動物に、本発明免疫抗原を、通常フロイントの完

全アジュバントとともに複数回免疫し、その後、血液を採取し、常法に従い該血液より抗血清を取得することにより製造することができる。ニワトリの場合には、上記免疫抗原を複数回免疫して、該ニワトリが産卵する鶏卵にイムノグロブリンY(IgY)を産生させ、該鶏卵の卵黄より常法に従いIgYを取得することによっても、ポリクローナル抗体を得ることができる。

【0045】またモノクローナル抗体は、例えば、本発明免疫抗原をフロイントの完全アジュバントとともにマウスに複数回投与して免疫化し、その後、例えば細胞融合法などの常法に従い、抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合し、クローニングし、目的とする抗体を産生する単一クローン細胞を分離し、該細胞の培養により取得することができる。

【0046】得られる本発明抗体(ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体)は、所望により、硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの常法に従い更に精製することができる。

【0047】本発明抗体の取得に際しては、所望のフタル酸エステルに対する特異的反応性を有し、他のフタル酸エステル類とは実質的に交差反応しないことで特徴付けられる反応性を有する抗体の選択が重要である。

【0048】この選択は、本明細書の開示に従い、取得された抗体と供試化合物としての各種フタル酸エステルとの反応性を試験することにより、例えば、免疫された温血動物の個体間より、或いはクローン化された単一クローン間より、適宜再現性をもって行うことができる。

【0049】上記反応性の試験は、本発明抗体と供試化合物との免疫反応性が確認できるものである限りにおいて特に制限なく行うことができる。例えばこの反応性試験は好ましくは後述の実施例に記載の測定法に従い実施することができる。

【0050】本発明抗体は、免疫抗原として利用するフタル酸エステル誘導体を適宜選択することによって、この選択されたフタル酸エステル誘導体に対応するフタル酸エステルに特異的反応性を有するものとすることができる。即ち、フタル酸エステルの側鎖領域に特異的なものとすることができる。この特異抗体には、例えばフタル酸ジメチル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジ*n*-ブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジイソブチル、フタル酸ベンジル*n*-ブチルなどに特異的な抗体が含まれる。これらは、所望により関連する他のフタル酸エステルのいくつかと交差反応性を有するものであることもできるが、好ましくは、単一のフタル酸エステルに特異的であって、他の類似の側鎖構造を有する化合物とは実質的に交差反応しないものであるのがよい。

【0051】ここで「実質的に交差反応しない」とは、特定のフタル酸エステルとの反応性を基準(100%)として、その交差反応性が、5%を越えないもの、より好まし

くは1%以下であることを意味する。

フタル酸エステル類の測定・検出

本発明抗体の利用によれば、一般の免疫測定法に従い、フタル酸エステル類の特異的測定・検出が可能である。

【0052】この免疫測定法には、例えば、酵素免疫測定法(EIA)、酵素イムノメトリックアッセイ法(ELISA)、蛍光免疫測定法(FIA)、発光免疫測定法などが含まれる。これらの方法は、また一般的な競合法、サンドイッチ法などの手法に従って実施することができる。

【0053】本発明のフタル酸エステル類の特異的免疫測定方法は、特に好ましくは、後述の実施例に記載した高感度ELISA系により実施される。

【0054】ここで、本発明抗体としては、測定が望まれるフタル酸エステル類の種類に応じて、それに特異反応性を有するものが選択される。この抗体は、一般には固相化抗体として利用される。また、この系においては、測定を要求されるフタル酸エステルそれ自体を標準物質として利用することができる。

【0055】高感度ELISA系においては、標識抗原(標識体)として、前記した式(2)で表されるビオチン化フタル酸エステル誘導体を好適なものとして利用することができる。その製造の詳細は後述するとおりである。この誘導体としても、測定が望まれるフタル酸エステル類の種類に応じて、対応するエステルの誘導体を選択して用いられる。

【0056】これらのビオチン化フタル酸エステル誘導体は、総じて、免疫測定系の液相に可溶性である(水溶性である)ことによって特徴づけられる。従って、これはフタル酸エステル類の免疫測定系における標識体としてきわめて有用である。

【0057】本発明の免疫測定法によれば、後記実施例に示す通り、各種のフタル酸エステルを、最小検出限界約50-100pg/ml程度にて、非常に高感度に測定可能である。

【0058】本発明に従うフタル酸エステル類の測定・検出に際しては、本発明抗体を有効成分として含有する測定キットを利用するのが簡便である。当該キットには、本発明抗体に加えて、当該測定・検出を実施するに際して必要な任意の他の試薬を更に包含させることができる。その例としては、例えば上記した標識体(標識抗原)、標準抗原液などを挙げるができる。更に、アッセイ緩衝液などもキットに含ませることができる。

【0059】本発明のフタル酸エステル類の測定・検出系において、被検物質としては、ヒトおよび動物の各種組織、血液、尿、骨髓液、唾液などを利用することができる。これらを被検物質とするときには、本発明方法によって、これら被検物質中のフタル酸エステル類が測定乃至検出できる。この結果は、例えば外因性物質の生体刺激・分泌機構への影響の解明・研究に役立つ。

【0060】また、本発明方法においては、例えば河

川、海水、廃水、大気、土壌などを被検物質とすることもできる。これらを被検物質とするときには、本発明方法によって、これら環境中のフタル酸エステル類の測定乃至検出が可能であり、これによって環境汚染の程度を把握することができる。

ビオチン化フタル酸エステル誘導体

本発明測定法に標識体として利用することができる前記一般式(2)で示されるビオチン化フタル酸エステル誘導体は、前述した一般式(1)で示されるフタル酸エステル誘導体を原料とし、その側鎖官能基Yを利用して、これにビオチン-(R⁴)_n-OHおよびH-(R⁴)_n-NHNH-ビオチンから選ばれるビオチン-アミノ酸結合物を結合させることにより製造することができる。

【0061】上記ビオチン-アミノ酸結合物の結合は、例えばR⁴に対応する所定のアミノ酸(ArgおよびLys)の1-3個およびビオチンまたはそのヒドラジドを順次縮合反応させるか、予め縮合反応させたビオチン-アミノ酸結合物を縮合反応させるか、或いはこれらの両縮合反応を組合せることにより実施することができる。

【0062】各縮合反応は、公知の各種縮合反応方法、例えばアジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA(ジフェニルホスホリルアジド)法、DCC+添加物(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシスクシンアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミドなど)、ウッドワード法などに従うことができる。

【0063】これら各方法において利用される溶媒は、この種のペプチド縮合反応に慣用される各種の溶媒から適宜選択することができる。その例としては、例えばN-メチルピロリドン(NMP)、DMF、DMSOなど、およびこれら

の混合溶媒を例示できる。

【0064】尚、上記縮合反応において、反応に関与しない官能基は、常法に従い、通常の保護基により保護でき、これらは反応終了後に脱離できる。これら各方法は公知であり、それらに用いられる試薬類も公知のものから適宜選択できる。

【0065】例えば、アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル(Z)、第三級ブトキシカルボニル(Boc)、イソボルニルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基などを例示できる。

【0066】カルボキシル基の保護基としては、例えばメチルエステル、エチルエステル、第三級ブチルエステルなどの低級アルキルエステル或いはベンジルエステル、p-メトキシベンジルエステルなどを形成し得る基を例示することができる。

【0067】アルギニンのグアニジノ基の保護基としては、例えば2,2,5,7,8-ペンタメチルクロモン-6-スルホニル(Pmc)、2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル(Pbf)、ニトロ、Z、Boc、p-トルエン

【0068】これら保護基の脱離反応もまた慣用される方法、例えば接触還元法、液体アンモニア/ナトリウム、フッ化水素、臭化水素素、塩化水素、トルフルオロ酢酸(TFA)、酢酸、メタンスルホン酸などを用いる方法などに従い実施できる。

【0069】得られる本発明の一般式(2)で表されるビオチン化されたフタル酸エステル誘導体は、常法に従い、高速液体クロマトグラフィーなどの各種の精製手段により適宜その精製を行うことができる。

10 【0070】

【実施例】以下、参考例および実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。しかし、これらの例は非制限的なものであり、本発明の範囲はそれらの例によって限定解釈されるべきものではない。

【0071】尚、各例で使用した略号は、前述したものであるかまたは次のものを示す。

【0072】HATU; 0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート

20 DIEA; N,N-ジイソプロピルエチルアミン
TFE; トリフルオロエタノール
TIPS; トリイソプロピルシラン

【0073】

【参考例1】(1) 4-ニトロフタル酸ジエチル(化合物401)の製造

4-ニトロフタル酸2.0g(9.5mmol)を乾燥エタノール30mlに溶解し、これに濃硫酸0.3mlを加えた。混合物を24時間還流し、溶媒を減圧留去した。油状残渣をジエチルエーテルに溶解し、3回水洗し、次いで10%Na₂CO₃水溶液で洗浄した。エーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去して、淡黄色粗固体を得た。この粗生成物を冷エタノールから再結晶した。得られた淡黄色結晶を真空乾燥器内で一夜乾燥して、4-ニトロフタル酸ジエチル(化合物401)1.9g(75.3%)を得た。

【0074】¹H-NMR(CDCl₃); 8.62(1H, d, J=1.8Hz), 8.39(1H, dd, J=8.8, 1.8Hz), 7.85(1H, d, J=8.8Hz), 4.43(2H, q, J=7.3Hz), 4.42(2H, q, J=7.3Hz), 1.41(3H, t, J=7.3Hz), 1.40(3H, t, J=7.3Hz)

(2) 4-アミノフタル酸ジエチル(化合物402)の製造
40 化合物401の1.5g(5.6mmol)をベンゼン280mlに溶解し、これに精製亜鉛末3.4gを加えた。次いで、濃塩酸10mlを分割添加した。15分間室温で攪拌後、更に亜鉛末3.4gを加え、混合物を12時間室温で攪拌した。反応混合物に冷水340mlを加え、混合物を1N NaOH溶液で中和した。混合物を分液漏斗で分配し、ベンゼン層を除去した。水層をベンゼン抽出した。ベンゼン抽出液を合わせ、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去して、淡黄色粗固体を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製(n-ヘキサン:酢酸=8:1)して、4-アミノ

50 ノフタル酸ジエチル(化合物402)1.1g(80.6%)を得

た。

【0075】融点：95.6

元素分析値(C₁₂H₁₅NO₄として)

理論値：C 60.75, H 6.37, N 5.90

実測値：C 60.70, H 6.33, N 5.76

¹H-NMR(CDCl₃)；7.72(1H, d, J=8.4Hz), 6.73(1H, d, J=2.2Hz), 6.68(1H, dd, J=8.4, 2.2Hz), 4.36(2H, q, J=7.3Hz), 4.29(2H, q, J=7.3Hz), 4.11(2H, brs), 1.36(3H, t, J=7.3Hz), 1.34(3H, t, J=7.3Hz)

(3) 4-ニトロフタル酸ジブチル(化合物403)の製造
4-ニトロフタル酸2.0g(9.5mmol)を乾燥エタノール30mlに溶解し、これに濃硫酸0.3mlを加えた。混合物を120で24時間加熱し、溶媒を減圧留去した。油状残渣をジエチルエーテルに溶解し、3回水洗し、次いで10%Na₂CO₃水溶液で洗浄した。エーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去して、淡黄色粗固体を得た。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製(n-ヘキサン：酢酸=10:1)して、4-ニトロフタル酸ジブチル(化合物403)2.1g(68.4%)を得た。

【0076】¹H-NMR(CDCl₃)；8.61(1H, d, J=1.8Hz), 8.39(1H, dd, J=8.8, 1.8Hz), 7.84(1H, d, J=8.8Hz), 4.38(2H, q, J=7.3Hz), 4.36(2H, q, J=7.3Hz), 1.80-1.68(2H, m), 1.50-1.40(2H, m), 0.98(3H, t, J=7.3Hz), 0.90(3H, t, J=7.3Hz)

(4) 4-アミノフタル酸ジ-n-ブチル(化合物404)の製造
化合物403の1.5g(4.6mmol)をベンゼン230mlに溶解し、これに精製亜鉛末2.8gを加えた。次いで、濃塩酸8.2mlを分割添加した。15分間室温で攪拌後、更に亜鉛末2.8gを加え、混合物を12時間室温で攪拌した。反応混合物に水280mlを加え、混合物を1N NaOH溶液で中和した。混合物を分液漏斗で分配し、ベンゼン層を除去した。水層をベンゼン抽出した。ベンゼン抽出液を合わせて水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製(n-ヘキサン：酢酸=10:1)して、4-アミノフタル酸ジ-n-ブチル(化合物404)980mg(89.6%)を得た。

【0077】元素分析値(C₁₆H₂₃NO₄として)

理論値：C 65.51, H 7.90, N 4.77

実測値：C 65.44, H 7.90, N 4.65

¹H-NMR(CDCl₃)；7.71(1H, d, J=8.4Hz), 6.72(1H, d, J=2.2Hz), 6.68(1H, dd, J=8.4, 2.2Hz), 4.29(2H, t, J=7.3Hz), 4.23(2H, t, J=7.3Hz), 4.11(2H, brs), 1.75-1.62(2H, m), 1.50-1.36(2H, m), 0.95(6H, t, J=7.3Hz)

(5) 4-ニトロフタル酸ジシクロヘキシル(化合物405)の製造

4-ニトロフタル酸2.0g(9.5mmol)をシクロヘキサノール30mlに溶解し、これに濃硫酸0.3mlを加えた。混合物を120で24時間加熱し、溶媒を減圧留去した。油状残渣をジエチルエーテルに溶解し、3回水洗し、次いで10%Na₂CO₃水溶液で洗浄した。エーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製(n-ヘキサン：酢酸=10:1)して、4-ニトロフタル酸ジシクロヘキシル(化合物405)2.3g(65.5%)を得た。

【0078】¹H-NMR(CDCl₃)；8.58(1H, d, J=1.8Hz), 8.37(1H, dd, J=8.4, 1.8Hz), 7.81(1H, d, J=8.4Hz), 5.10-5.00(2H, m), 2.08-1.20(2H, m)

(6) 4-アミノフタル酸ジシクロヘキシル(化合物406)の製造
化合物405の2.0g(5.3mmol)をベンゼン265mlに溶解し、これに精製亜鉛末3.2gを加えた。次いで、濃塩酸9.3mlを分割添加した。15分間室温で攪拌後、更に亜鉛末3.2gを加え、混合物を12時間室温で攪拌した。反応混合物に水320mlを加え、混合物を1N NaOH溶液で中和した。混合物を分液漏斗で分配し、ベンゼン層を除去した。水層をベンゼン抽出した。ベンゼン抽出液を合わせて水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製(n-ヘキサン：酢酸=10:1)して、4-アミノフタル酸ジシクロヘキシル(化合物406)1.3g(72.2%)を得た。

【0079】元素分析値(C₂₀H₂₇NO₄として)
理論値：C 69.54, H 7.88, N 4.05
実測値：C 68.93, H 7.77, N 3.96
¹H-NMR(CDCl₃)；7.70(1H, d, J=8.4Hz), 6.70(1H, d, J=2.2Hz), 6.65(1H, dd, J=8.4, 2.2Hz), 5.03-4.89(2H, m), 4.08(2H, brs), 2.10-1.83(20H, m)

(7) 4-(または5-)ニトロフタル酸ベンジルn-ブチル(化合物407)の製造

4-ニトロフタル酸無水物2.0g(10.4mmol)を、ナトリウムn-ブチラート1.0gのn-ブタノール1.0g溶液中に100以下の温度でゆっくり加え、混合物を90-100度で10分間保持した。この溶液に塩化ベンジル1.3gおよびトリエチルアミン36mgを加え、全体を45分間還流した。反応混合物を冷却し、ジエチルエーテルに溶解した。エーテル溶液を、3回水洗した。次いで、エーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製(n-ヘキサン：酢酸=10:1)して、4-ニトロフタル酸ベンジルn-ブチルおよび5-ニトロフタル酸ベンジルn-ブチル(1:1混合物)(化合物407)1.4g(37.2%)を得た。

【0080】¹H-NMR(CDCl₃)；8.62(1H, d, J=8.4Hz), 8.61(1H, d, J=8.4Hz), 8.40-8.35(2H, m), 7.88-7.36(12H, m), 5.38(4H, s), 4.24(2H, t, J=7.3Hz), 4.22(2H, t, J=7.3Hz), 1.72-1.25(8H, m), 0.94(3H, t, J=7.3Hz), 0.93(3H, t, J=7.3Hz)

(8) 4-(または5-)アミノフタル酸ジブチル(化合物408)の製造
化合物407の1.2g(3.4mmol)をベンゼン170mlに溶解し、これに精製亜鉛末2.1gを加えた。次いで、濃塩酸6.0ml

を分割添加した。15分間室温で攪拌後、更に亜鉛末2.1gを加え、混合物を12時間室温で攪拌した。反応混合物に水200mlを加え、混合物を1N NaOH溶液で中和した。混合物を分液漏斗で分配し、ベンゼン層を除去した。水層をベンゼン抽出した。ベンゼン抽出液を合わせて水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去して淡黄色粗固体を得、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (n-ヘキサン : 酢酸 = 10:1) して、4-アミノフタル酸ベンジルn-ブチルおよび5-アミノフタル酸ベンジルn-ブチル (1:1混合物) (化合物408) 970mg (80.0%) を得た。

【0081】元素分析値 (C₁₉H₂₁NO₄として)

理論値 : C 69.71, H 6.47, N 4.28

実測値 : C 69.00, H 6.41, N 4.10

¹H-NMR(CDCl₃) ; 7.76(1H, d, J=8.8Hz), 7.72(1H, d, J=8.8Hz), 7.45-7.30(10H, m), 6.74-6.65(4H, m), 5.33(2H, s), 5.27(2H, s), 4.18(2H, m), 4.17(2H, t, J=7.3Hz), 4.13(2H, t, J=7.3Hz), 4.09(4H, brs), 1.70-1.20(8H, m), 0.93(3H, t, J=7.3Hz), 0.91(3H, t, J=7.3Hz)

(9) 4-(または5-)ニトロフタル酸エチルn-ヘキシル (化合物409) の製造

4-ニトロフタル酸無水物2.0g(10.4mmol)のn-ヘキサノール溶液に、水酸化ナトリウム73mgを加えた。この混合物にエタノール720mg(15.8mmol)および硫酸少量を加えた。混合物を5時間還流した。反応混合物を冷却し、ジエチルエーテルに溶解した。エーテル溶液を3回水洗した。次いで、エーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (n-ヘキサン : 酢酸=10:1) して、4-ニトロフタル酸エチルn-ヘキシルおよび5-ニトロフタル酸エチルn-ヘキシル (1:1混合物) (化合物409) 1.2g(36.5%)を得た。

【0082】¹H-NMR(CDCl₃) ; 8.63-8.61(2H, m), 8.39(2H, dd, J=8.8, 1.8Hz), 7.86(1H, d, J=8.8Hz), 7.83(1H, d, J=8.8Hz), 4.46-4.33(6H, m), 1.77-1.30(24H, m), 0.89-0.86(6H, m)

(10) 4-(または5-)アミノフタル酸エチルn-ヘキシル (化合物410) の製造

化合物409の1g(3.1mmol)をベンゼン155mlに溶解し、これに精製亜鉛末1.9gを加えた。次いで、濃塩酸5.5mlを分割添加した。15分間室温で攪拌後、更に亜鉛末1.9gを加え、混合物を12時間室温で攪拌した。反応混合物に水180mlを加え、混合物を1N NaOH溶液で中和した。混合物を分液漏斗で分配し、ベンゼン層を除去した。水層をベンゼン抽出した。ベンゼン抽出液を合わせて水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去して淡黄色粗固体を得、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (n-ヘキサン : 酢酸 = 10:1) して、4-アミノフタル酸エチルn-ヘキシルおよび5-アミノフタル酸エチルn-

ヘキシル (1:1混合物) (化合物410) 691mg(76.1%)を得た。

【0083】MS m/z: 293(M⁺)

¹H-NMR(CDCl₃) ; 7.72(2H, d, J=8.4Hz), 6.73-6.72(2H, m), 6.69(2H, dd, J=8.4, 2.2Hz), 4.40-4.20(8H, m), 4.11(4H, brs), 1.79-1.58(6H, m), 1.45-1.20(16H, m), 0.90-0.80(6H, m)

(11) 4-ニトロフタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (化合物411) の製造

4-ニトロフタル酸2.0g(9.5mmol)を2-エチルヘキサノール30mlに溶解し、これに硫酸0.3mlを加えた。混合物を24時間120℃で加熱し、溶媒を減圧留去した。過剰の2-エチルヘキシルを油状残渣から留去した。油状残渣をジエチルエーテルに溶解し、3回水洗し、次いで、10%Na₂CO₃溶液で洗浄した。エーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (n-ヘキサン : 酢酸=30:1) して、4-ニトロフタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (化合物411) 2.3g(65.5%)を得た。

20 【0084】¹H-NMR(CDCl₃) ; 8.59(1H, d, J=2.6Hz), 8.40(1H, dd, J=8.4, 2.6Hz), 7.83(1H, d, J=8.4Hz), 4.33-4.22(4H, m), 1.72-1.68(2H, m), 1.49-1.27(16H, m), 0.97-0.88(12H, m)

(12) 4-アミノフタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (化合物412) の製造

化合物411の2.0g(5.3mmol)をベンゼン265mlに溶解し、これに精製亜鉛末3.2gを加えた。次いで、濃塩酸9.3mlを分割添加した。15分間室温で攪拌後、更に亜鉛末3.2gを加え、混合物を12時間室温で攪拌した。反応混合物に水320mlを加え、混合物を1N NaOH溶液で中和した。混合物を分液漏斗で分配し、ベンゼン層を除去した。水層をベンゼン抽出した。ベンゼン抽出液を合わせて水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (n-ヘキサン : 酢酸 = 15:1) して、4-アミノフタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (化合物412) 1.3g(72.2%)を得た。

【0085】¹H-NMR(CDCl₃) ; 7.70(1H, d, J=8.4Hz), 6.72(1H, d, J=2.4Hz), 6.68(1H, dd, J=8.4, 2.4Hz), 4.22-4.13(6H, m), 1.72-1.62(2H, m), 1.43-1.22(6H, m), 0.94-0.87(12H, m)

【0086】

【実施例1】(1) アミノカプロニル - 4 - アミノ - フタル酸ジエチル (一般式(1) : R¹=R²=エチル基, m=5, Y=NH₂) の合成

Boc-アミノカプロン酸69.4mg(0.3mmol)をTHF2mlに溶解し、その中に、N-メチルモルホリン30.6μl(0.3mmol)およびイソブチルクロロホーマート39.6μl(0.3mmol)から調製した混合酸無水物と4-アミノ-フタル酸ジエチル23.7mg(0.1mmol)のTHF1ml溶液を-15℃で混和し、室温で18時間攪拌した。

【0087】溶媒を留去し、残渣を酢酸エチルに溶解後、5%NaHCO₃および飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濾過し、溶媒を留去して、粗Boc-アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジエチル74.4mgを油状物質として得た。

【0088】この油状物質をメタノール2mlに溶解後、0.1%TFA/CH₃CN混合溶媒系(70/30 60/40, 20分間)を用い、逆相HPLC用カラム(YMC-Pack D-ODS-5, YMC Kyoto社製、20×250mm)による分取用逆相HPLCで精製して、保護された目的物質31.0mgを得た。

【0089】この保護体をTFA1mlで室温で30分間処理後、凍結乾燥して、目的物質28.8mgを得た。

【0090】Fab-マスペクトル分析結果：

計算値(C₁₈H₂₆N₂O₅として)：350

実測値：351

(2) H-Lys(Boc)-アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジエチルの合成

Fmoc-Lys(Boc)-OH12.3mg(0.027mmol)、HOBt3.9mg(0.029mmol)および上記(1)で得た化合物8.8mg(0.025mmol)をTHF2mlに溶解し、これに-10℃でWSCD5.6μl(0.032mmol)を加え、室温で18時間攪拌後、溶媒を留去し、残渣を上記(1)と同様に酢酸エチル中、1N HClに溶解し、5%NaHCO₃および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去して、保護された目的物質19.5mgを得た。

【0091】この保護体を20%ピペリジンのCH₂Cl₂溶液2ml中で室温下に10分間処理し、溶媒を留去し、残渣を酢酸エチルに溶解後、5%NaHCO₃および飽和食塩水で洗浄し、乾燥して、粗な目的物質18.0mgを得た。

【0092】この粗目的物質を前記(1)と同様にして、メタノール2mlに溶解後、0.1%TFA/CH₃CN混合溶媒系(63/37 45/55, 20分間)を用い、YMC-Pack D-ODS-5(20×250mm)による分取用逆相HPLCで精製して、目的物質7.4mgを得た。

【0093】(3) ビオチン-Arg(Pbf)-OHの合成
 ビオチン479mg(0.76mmol)、HATU745mg(0.76mmol)およびH-Arg(Pbf)-Trt(2-Cl)-樹脂1.0g(0.49mmol)のDMF20ml懸濁液に、512μl(2.94mmol)を加え、室温で2時間攪拌後、濾過し、DMFおよびCH₂Cl₂で洗浄して、ビオチン-Arg(Pbf)-Trt(2-Cl)-樹脂1.12gを得た。

【0094】尚、樹脂としては1%ジビニルベンゼンポリスチレンコポリマー(100-200mesh)を用いた。

【0095】上記で得られた保護ペプチド-樹脂を酢酸：TFE：CH₂Cl₂=1:2:7の混合溶液20ml中に投入し、室温下、60分間処理し、樹脂を濾過して除き、濾液を留去し、残渣にジエチルエーテルを加えて固化し、メタノール-ジエチルエーテルより再沈殿させて、目的物質340mgを得た。

【0096】Fab-マスペクトル分析結果：

計算値(C₂₉H₄₄N₆O₇S₂として)：652.834

実測値：653.389

(4) ビオチン-Arg-Lys-アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジエチル(一般式(2)：R¹=R²=エチル基、R³=ビオチン-Arg-Lys-NH、m=5)の合成

上記(2)で合成したH-Lys(Boc)-アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジエチル7.4mg(0.013mmol)、(3)で合成したビオチニル-Arg(Pbf)-OH8.8mg(0.013mmol)およびHOBt2.2mg(0.016mmol)のDMF1ml溶液に、-10℃でWSCD3.1μl(0.017mmol)を加え、室温で18時間攪拌後、溶媒を留去し、氷冷下に残渣に蒸留水を加えて固化し、固体を遠心分離により集め、乾燥して目的物質の粗保護体13.0mgを得た。

【0097】得られた粗保護体を蒸留水40μlおよびTIP S40μlを含むTFA1.5ml溶液中加入し、室温下に120分間処理し、反応液をジエチルエーテルで処理して、粗な目的物質11.5mgを得た。

【0098】この粗生成物を20%酢酸2mlに溶解し、0.1%TFA/CH₃CN混合溶媒系(75/25 65/35, 30分間)を用い、YMC-Pack D-ODS-5(20×250mm)による分取用逆相HPLCで精製して、目的物質4.5mgを得た。

【0099】Fab-マスペクトル分析結果：

計算値(C₄₀H₆₄N₁₀O₉Sとして)：860

実測値：861

【0100】

【実施例2】実施例1の(1)と同様にして、対応する4-アミノ-フタル酸エステル類を用いて以下のフタル酸エステル誘導体(2-1, 2-3, 2-5および2-7)を得た。またこれら各化合物を用いて実施例1の(3)と同様にして、以下のビオチン化フタル酸エステル誘導体(2-2, 2-4, 2-6および2-8)を得た。

【0101】(2-1) アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジシクロヘキシル(一般式(1)：R¹=R²=シクロヘキシル基、m=5, Y=NH₂)

Fab-マスペクトル分析結果：

計算値(C₂₆H₃₈N₂O₅として)：458

実測値：459

(2-2) ビオチン-Arg-Lys-アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジシクロヘキシル(一般式(2)：R¹=R²=シクロヘキシル基、R³=ビオチン-Arg-Lys-NH、m=5)

40 Fab-マスペクトル分析結果：

計算値(C₄₈H₇₆N₁₀O₉Sとして)：968

実測値：969

(2-3)アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジ*n*-ブチル(一般式(1)：R¹=R²=*n*-ブチル基、m=5, Y=NH₂)

Fab-マスペクトル分析結果：

計算値(C₂₂H₃₄N₂O₅として)：406

実測値：407

(2-4)ビオチン-Arg-Lys-アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジ*n*-ブチル(一般式(2)：R¹=R²=*n*-ブチル基、R³=ビオチン-Arg-Lys-NH、m=5)

50

Fab-マスペクトル分析結果：

計算値 ($C_{44}H_{72}N_{10}O_9S$ として)：916

実測値：917

(2-5)アミノカプロニル-4-(または5-)アミノ-フタル酸ベンジルn-ブチル(一般式(1)： $R^1=n$ -ベンジル基(またはn-ブチル基)、 $R^2=n$ -ブチル基(またはベンジル基)、 $m=5$ 、 $Y=-NH_2$)

Fab-マスペクトル分析結果：

計算値 ($C_{25}H_{32}N_2O_5$ として)：440

実測値：441

(2-6)ピオチン-Arg-Lys-アミノカプロニル-4-(または5-)アミノ-フタル酸ベンジルn-ブチル(一般式(2)： $R^1=$ ベンジル基(またはn-ブチル基)、 $R^2=n$ -ブチル基(またはベンジル基)、 $R^3=$ ピオチン-Arg-Lys-NH-、 $m=5$)

Fab-マスペクトル分析結果：

計算値 ($C_{47}H_{70}N_{10}O_9S$ として)：950

実測値：951

(2-7)アミノカプロニル-4-(または5-)アミノ-フタル酸エチルn-ヘプチル(一般式(1)： $R^1=$ エチル基(またはn-ヘプチル基)、 $R^2=n$ -ヘプチル基(またはエチル基)、 $m=5$ 、 $Y=NH_2$)

Fab-マスペクトル分析結果：

計算値 ($C_{23}H_{36}N_2O_5$ として)：420

実測値：421

(2-8)ピオチン-Arg-Lys-アミノカプロニル-4-(または5-)アミノ-フタル酸エチルn-ヘプチル(一般式(2)： $R^1=$ エチル基(またはn-ヘプチル基)、 $R^2=n$ -ヘプチル基(またはエチル基)、 $R^3=$ ピオチン-Arg-Lys-NH-、 $m=5$)

Fab-マスペクトル分析結果：

計算値 ($C_{45}H_{74}N_{10}O_9S$ として)：930

実測値：931

【0102】

【実施例3】(1)モノグルタリル-4-アミノ-フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(一般式(1)： $R^1=R^2=2$ -エチルヘキシル基、 $m=3$ 、 $Y=COOH$)

4-アミノ-フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)101.4mg(0.25mmol)およびグルタル酸無水物85.6mg(0.75mmol)をTHF5mlに溶解し、8時間還流し、更に室温で18時間攪拌後、溶媒を留去した。残渣を酢酸エチルに溶解し、 H_2O および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濾過し、溶媒を留去し、乾固して、目的物質120mgを得た。

【0103】Fab-マスペクトル分析結果：

計算値 ($C_{29}H_{45}NO_7$ として)：519

実測値：520

(2) H-Arg(Pbf)-NHNH-ピオチンの合成

Fmoc-Arg(Pbf)-OH648.8mg(1mmol)、HOBt135.1mg(1.2mmol)およびピオチン- N_2H_3 258.3mg(1mmol)のDMF溶液5mlに、-10℃でWSCD176.4 μ l(1.2mmol)を加え、室温で18時間攪拌した。溶媒を留去後、残渣を酢酸エチルに溶解

し、1N HCl、5%NaHCO₃および飽和食塩水で洗浄し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過後、溶媒を留去し、残渣に石油エーテルを加えて固化し、更に酢酸エチル-石油エーテルから再沈殿して、Fmoc-Arg(Pbf)-NHNH-ピオチン800.2mgを得た。

【0104】上記で得た化合物800.2mgを20%ピペリジンのCH₂Cl₂溶液で10分間処理後、溶媒を留去し、残渣を酢酸エチルに溶解し、 H_2O および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、溶媒を留去し、乾固した。

【0105】得られた粗生成物をメタノールに溶解し、不溶物を濾過により除去し、濾液を留去して、目的化合物366.8mgを得た。

【0106】(3) H-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-NHNH-ピオチンの合成

上記(2)で得た化合物366.8mg(0.55mmol)を前記(2)と同様にしてFmoc-Arg(Pbf)-OH374.7mg(0.58mmol)およびHOBt89.2mg(0.66mmol)と共にDMF5mlに溶解し、-10℃でWSCD176.4 μ l(0.66mmol)を加え、室温で18時間攪拌した。溶媒を留去後、氷冷下に残渣に H_2O を加えて固化し、メタノール-ジエチルエーテルから再沈殿して、Fmoc-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-NHNH-ピオチン635.2mgを得た。

【0107】この化合物635.2mgを20%ピペリジンのCH₂Cl₂溶液で10分間処理後、 H_2O および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、溶媒を留去し、乾固して、粗生成物を得た。

【0108】得られた粗生成物をメタノールに溶解し、不溶物を濾過により除去し、濾液を留去し、残渣にジエチルエーテルを加えて固化して、目的化合物503.2mgを得た。

【0109】(4) 前記(1)の化合物のピオチン-Arg-Arg-体(一般式(2)： $R^1=R^2=2$ -エチルヘキシル基、 $R^3=-CO-Arg-Arg-NHNH-$ ピオチン、 $m=3$)の合成

上記(3)で得たH-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-NHNH-ピオチン21.5mg(0.02mmol)、前記(1)で得たモノグルタリル-4-アミノ-フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)10.4mg(0.02mmol)およびHOBt5.9mg(0.04mmol)をDMF2mlに溶解させた後、これに-10℃でWSCD7.1 μ l(0.04mmol)を加え、室温で18時間攪拌後、溶媒を留去し、氷冷下に残渣に H_2O を加えて固化して、31.5mgの粗保護体(Argの保護体)を得た。

【0110】この粗保護体31.5mgをTIPSO.15mlを含むTFA3.85mlで室温下に120分間処理後、ジエチルエーテルを加えて、粗生成物12.9mgを得た。

【0111】この粗生成物12.9mgを10%酢酸2mlに溶解し、0.1%TFA/CH₃CN混合溶媒系(50/50 30/70, 30分間)を溶出液としてカラム(YMC-Pack D-ODS-5; 20 \times 250mm)による分取用逆相HPLCで精製して、目的とする標記化合物6.5mgを得た。

【0112】Fab-マスペクトル分析結果：

計算値 ($C_{51}H_{85}N_{13}O_{10}S$ として)：1072

実測値：1073

【0113】

【実施例4】抗血清の取得

実施例1の(1)で得たアミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジエチル7.1mgをH₂O1mlに溶解し、0.1M PBS(pH 6.0)緩衝液に溶解したキーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH: 10mg/ml; Pierce)と混合し、DMS(Dimethyl Suberimidate・2HCl: 70mg; Pierce)を添加して室温で30分間反応させた。

【0114】反応液はゲル濾過により脱塩し、得られた KLH-アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジエチル複合体を以下の免疫原として用いた。

【0115】上記免疫原2 mgを50%ポリビニルピロリドン1ml(Merck)と混合し、さらに等量のフロイントの完全アジュバント3ml(Calbiochem)を加え乳化させた。

【0116】得られた乳化物を家兎2匹(日本ホワイト・オス、体重：2.1-2.5 kg)に1匹あたり免疫原1mgとなる量で皮内に注射免疫した。2回目以降は1匹あたり約0.5mgの免疫原を2週間間隔で6回免疫した。最終免疫1週間後、十分な力価の抗血清を産生した家兎の血液を全採血し、続いてこれを37 にて1時間、その後4 にて一夜放置し、3000rpm(回転/分)で遠心分離することにより血清(RY778)を得、これを凍結乾燥した。

【0117】

【実施例5】フタル酸ジエチルの酵素免疫測定(ELISA)標準抗原としてフタル酸ジエチルを、標識抗原として実施例1の(4)で調製したビオチン-Arg-Lys-アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジエチルを、また特異抗体として実施例4で調製した抗血清RY778を用いて、以下の通り本発明ELISA系を作成した。

【0118】即ち、96ウエルマイクロタイタープレート(Maxi Sorp, Nunc)の各ウエルに、0.1Mクエン酸緩衝液で200倍に希釈したヤギ抗ウサギIgG(Jackson Immuno Research)をそれぞれ100μlづつ分注した。25 で2時間静置後、上清を捨て、次にブロックエース(大日本製薬)を各ウエルに340μl分注して、25 で2時間静置してブロッキングを完了させた。

【0119】洗浄液(0.1%TWEEN20を含む0.15M NaCl)

で5回洗浄後、希釈標準抗原溶液または検体50μl、標識抗原溶液50μlおよび特異抗体溶液100μlを順次加え、4 にて18-20時間インキュベートし、洗浄液(0.1%TWEEN20を含む18% NaCl)0.3mlで3回洗浄後、ストレプトアピジン-ホースラジッシュ-パーオキシダーゼ(×2500)0.1mlを加え、室温にて1.5時間インキュベート後、上記洗浄液0.3mlで4回で洗浄し、テトラメチルベンチジン含有発色液(Sigma)0.1mlを加え、30分間の発色後、2N硫酸にて反応を停止し、波長450nmの吸光度を測定した。

【0120】尚、希釈標準抗原溶液としては、フタル酸ジエチル12mgを15.7%DMSOにて溶解し(857μg/mL)、これをPBS緩衝液にて10倍に希釈して、濃度85.7μg/mlの標準液とし、更にこの溶液に5倍希釈の操作を繰り返し行って、85.7/17.1/3.4/0.69/0.137/0.027/0.005μg/mlの希釈液をそれぞれ調製利用した。

【0121】標識抗原溶液としては、フタル酸ジエチルをPBS緩衝液で2ng/mlに希釈して利用した。

【0122】また、特異抗体溶液としては、PBS緩衝液(0.1%BSA,0.1%Tween20含有)で10000倍に希釈した抗フタル酸ジエチル抗体(前記実施例4で得た抗体)を利用した。

【0123】上記に従って、希釈標準抗原を反応させた場合に得られた結果から、標準曲線を作成した(図1参照)。

【0124】図1において、縦軸は吸光度(450nm)を、横軸は標準抗原濃度(ng/ml)を示す。

【0125】該図より、フタル酸ジエチルの最小検出限界は、50pg/mlであることが判る。

【0126】また、本測定系の再現性試験を行った結果、測定内再現性は2.3%、測定間再現性は5.8%ときわめて良好であることが確認された。

【0127】

【実施例6】フタル酸ジエチルの交差反応性試験次に、実施例5に示される酵素免疫測定系におけるフタル酸ジエチルおよびその構造類似物質との交差反応性を求めた。その結果は、下記表1に示す通りである。

【0128】

【表1】

供試化合物	IC ₅₀ (ng/ml)	交差反応性(%)
フタル酸ジエチル	0.546	100
フタル酸ジメチル	98.178	0.556
フタル酸ジブチル	3893.432	0.014
フタル酸ジ2-エチルヘキシル	-	< 0.001
フタル酸	-	< 0.001
安息香酸	-	< 0.001
安息香酸エチル	4391.316	0.012
ギ酸エチル	3001.226	0.018
酢酸エチル	4480.033	0.012
コハク酸エチル	3534.158	0.015
エストラジオール	15053.168	0.004
ジメチルスチルベストロール	-	< 0.001

【0129】表1に示す結果より次のことが明らかである。即ち、上記免疫測定において、本発明抗体は、フタル酸ジエチルとの間で明らかな交差反応を発現した。また、構造類似物質の交差反応性の検討から、本発明抗体は、フタル酸エステル類の内、フタル酸ジメチルでは0.56%、フタル酸ジブチルでは0.01%の交差反応を示したが、フタル酸ジ2-エチルヘキシル、フタル酸との交差反応性は0.001%未満であった。

【0130】以上のことから、本抗体はフタル酸ジエチルの側鎖構造に非常に特異的であることが判った。

【0131】また、フタル酸ジエステル類以外の関連構造を有する化合物との交差反応性は、ベンゾイックアシッドで0.001%未満、エチルベンゾエートで0.012%、エチルフォルメートで0.018%、エチルアセテートで0.012%、エチルスクシネートで0.015%といずれも非常に低いものであった。

【0132】尚、フタル酸ジエチルは内分泌攪乱物質であるとの点から、同様の作用を有するエストラジオールおよびジメチルスチルベストロールについても同様にして交差反応性を調べたが、いずれも実質的に交差反応性を示さないことが確認された。

【0133】上記交差反応性(%)は、B/B₀が50%を示す抗原濃度(モル濃度)を、フタル酸ジエチルの当該濃度(100%)に対比したものであり、従って、交差反応性1%とは、抗体との結合が50%である条件下、標準品(フタル酸ジエチル)のそれに対して、1%の反応性であることを意味する。

【0134】

【実施例7】本例では、本発明測定系を利用して、近年話題となっている使い捨て手袋からのフタル酸ジエチルの溶出程度について、以下の通り検討した。

【0135】即ち、各種市販の使い捨て手袋を切断して約0.05-0.4gの切片を作成し、消毒時の条件を考慮して、これらのそれぞれに70%エタノール3.0mlを加え、一晩室温にて抽出操作を行い、抽出液を検体(被検物質)として、実施例5の方法に従い、フタル酸ジエチルを測

*定した。尚、抽出に利用したエタノールを除去するために、抽出液は遠心エバポレーターにて蒸発させた後、ELISAに用いる緩衝液3.0mlに再溶解して検体とした。

【0136】結果を下記表2に示す。

【0137】

【表2】

手袋製品	フタル酸ジエチル量(ng/g 手袋)
製品A	795.064
製品B	704.811
製品C	31.968
製品D	151.320
製品E	265.488
製品F	526.869
製品G	124.874
製品H	160.068
製品I	80.633
製品J	38.566

【0138】表2に示す結果より、本発明抗体を使用した測定系によれば、試験した全てのプラスチック製使い捨て手袋の70%エタノール抽出物中に、フタル酸ジエチルが溶出することが明らかとなり、このことから、本発明方法によって、フタル酸ジエチル免疫活性の測定が確実に実行できることが明らかとなった。

【0139】

【実施例8】フタル酸ベンジルn-ブチルの酵素免疫測定(ELISA)

標準抗原としてフタル酸ベンジルn-ブチル(関東化学社製)を、標識抗原として実施例2(2-6)で調製したピオチン-Arg-Lys-アミノカプロニル-4-(または5-)アミノ-フタル酸ベンジルn-ブチルを、また特異抗体として実施例4においてアミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジエチルに代えて実施例2(2-5)で得たアミノカプロニル-4-(または5-)アミノ-フタル酸ベンジルn-ブチルを用いる以外は同様にして調製した抗血清RY850(10000倍希釈)を用いて、実施例5に準じて本発明ELISA系を作成し、同様にし

て標準曲線を作成した(図2参照)。

【0140】図2において、縦軸は吸光度(492nm)を、横軸は標準抗原濃度(ng/ml)を示す。

【0141】該図より、フタル酸ベンジルn-ブチルの検出範囲は、0.64-10000ng/mlであることが判る。

【0142】

【実施例9】フタル酸ベンジルn-ブチルの交差反応性試験

次に、実施例8に示したELISA系におけるフタル酸ベンジルn-ブチルとその構造類似物質との交差反応性を求めた。

【0143】その結果、フタル酸ジメチル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸、ベンゾイックアシッド、エチルベンゾエート、エチルフォルメート、エチルアセテート、ジエチルスクシネート、ジエチルスチルベストロール、モノブチルフタレートおよびビスフェノールAのそれぞれとの交差反応性は、1%以下であった。また、ノニルフェノールとの交差反応性は2.3%であり、17-エストラジオールとのそれは3.5%であり、いずれも実質的に交差反応性を認めなかつた。尚、フタル酸ジブチルとの交差反応性は38.9%認められた。

【0144】

【実施例10】フタル酸ジn-ブチルの酵素免疫測定(ELISA)

標準抗原としてフタル酸ジn-ブチル(和光純薬社製)を、標識抗原として実施例2(2-4)で調製したビオチン-Arg-Lys-アミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジn-ブチルを、また特異抗体として実施例4においてアミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジエチルに代えて実施例2(2-3)で得たアミノカプロニル-4-アミノ-フタル酸ジn-ブチルを用いる以外は同様にして調製した抗血清RY849(1000倍希釈)を用いて、実施例5に準じて本発明ELISA系を作

*成した。

【0145】得られたELISA系の標準曲線を図2と同様に図3に示す。

【0146】該図より、フタル酸ジn-ブチルの検出範囲は、0.64-10000ng/mlであることが判る。

【0147】

【実施例11】フタル酸ジn-ブチルの交差反応性試験次に、実施例10に示したELISA系におけるフタル酸ジn-ブチルとその構造類似物質との交差反応性を求めた。

【0148】その結果、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸、ベンゾイックアシッド、エチルベンゾエート、エチルフォルメート、エチルアセテート、ジエチルスクシネート、フタル酸モノブチルおよびビスフェノールAのそれぞれとの交差反応性は、1%以下であった。また、フタル酸ジメチルとの交差反応性は1.2%であり、ジエチルスチルベストロールとのそれは1.5%であり、フタル酸ジエチルとのそれは4%であり、ノニルフェノールとのそれは3.4%であり、また17-エストラジオールとのそれは1.2%であり、いずれも実質的に交差反応性を認めなかつた。尚、フタル酸ベンジルn-ブチルとの交差反応性は100%であった。

【0149】

【発明の効果】本発明により、フタル酸エステル類のそれぞれに特異的な反応性を示す特異抗体を利用したフタル酸エステル類の高感度且つ簡便な測定・検出方法が提供される。

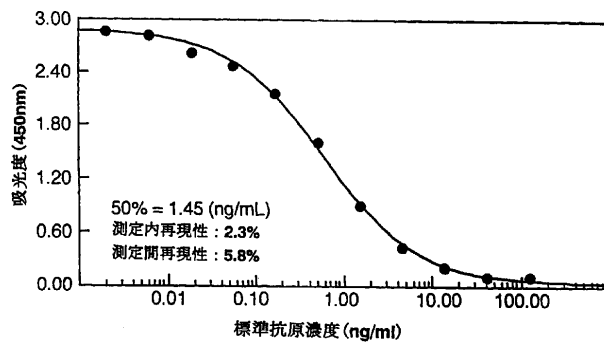
【図面の簡単な説明】

【図1】フタル酸ジエチルの酵素免疫測定系における標準曲線を示すグラフである。

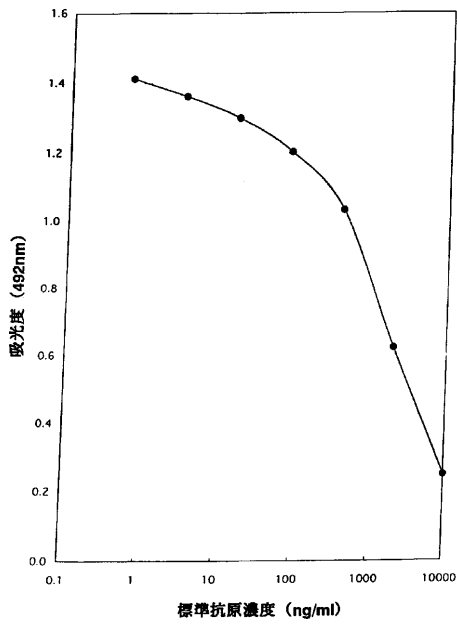
【図2】フタル酸ベンジルn-ブチルの酵素免疫測定系における標準曲線を示すグラフである。

【図3】フタル酸ジn-ブチルの酵素免疫測定系における標準曲線を示すグラフである。

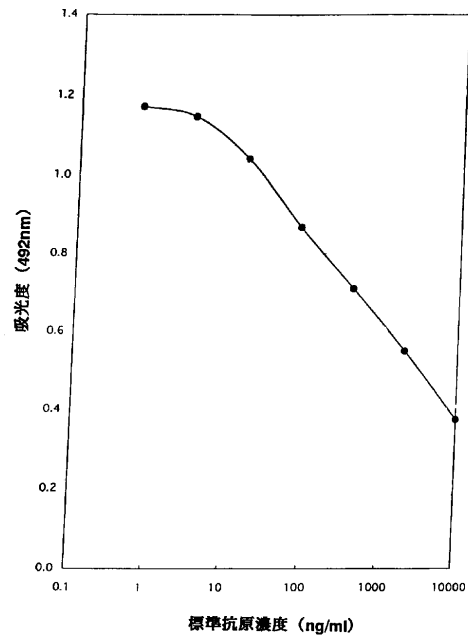
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 加藤 郁夫
 静岡県富士宮市泉町675 ロイヤルプラザ
 いずみ野310号

(72)発明者 長澤 晋吾
 静岡県富士市水戸島1-5-1 メゾンポ
 ワール305号

(72)発明者 小平 司
 徳島県板野郡松茂町広島字南川向56-7
 Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA50 DA75 EA61
 FA71

专利名称(译)	测量邻苯二甲酸酯的方法		
公开(公告)号	JP2002311030A	公开(公告)日	2002-10-23
申请号	JP2001125609	申请日	2001-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社 矢内原研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社 矢内原研究所 大冢制药有限公司		
[标]发明人	矢内原昇 加藤郁夫 長澤晋吾 小平司		
发明人	矢内原 昇 加藤 郁夫 長澤 晋吾 小平 司		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/00 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308 C07K16/44 Y10S436/815		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/53.U C07K16/44 G01N33/00.D		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA50 4H045/DA75 4H045/EA61 4H045/FA71		
优先权	2000343565 2000-11-10 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过使用特异性识别邻苯二甲酸酯的抗体，容易且特异地提供邻苯二甲酸酯的免疫测定的方法。解决方案：在待测物质中提供邻苯二甲酸酯的免疫测定的方法使用通过制备通式表达的邻苯二甲酸酯和载体蛋白的缀合物作为免疫抗原产生的抗体，其中R¹，R²分别为氢元素，烷基，环烷基或苯基烷基（但不能同时为氢元素），m为1~5的整数，Y为氨基或羧基。

