

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-104742

(P2016-104742A)

(43) 公開日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 219/04 (2006.01)	C07D 219/04	CSP 2G054
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	A 4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A 4B063
C09B 15/00 (2006.01)	C09B 15/00	4C063
C09K 11/06 (2006.01)	C09K 11/06	

審査請求 有 請求項の数 14 O L 外国語出願 (全 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-237389 (P2015-237389)	(71) 出願人	507269175 シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノステ ィックス・インコーポレーテッド SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC. アメリカ合衆国、ニューヨーク 1059 1、タリータウン、ベネディクト・アベニ ュー 511
(22) 出願日	平成27年12月4日 (2015.12.4)	(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(62) 分割の表示	特願2012-539002 (P2012-539002) の分割	(72) 発明者	ナトラジャン, アナンド アメリカ合衆国、ニューハンプシャー 0 3104、マンチェスター、マデリン・ロ ード 77
原出願日	平成22年11月12日 (2010.11.12)		
(31) 優先権主張番号	61/261,465		
(32) 優先日	平成21年11月16日 (2009.11.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

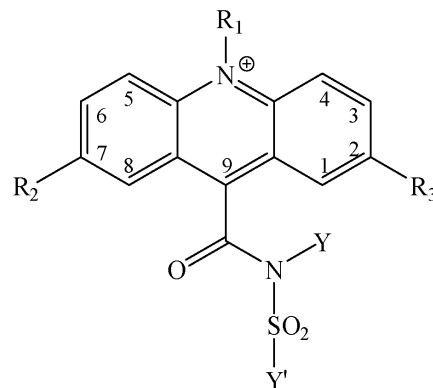
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 両性イオン含有アクリジニウム化合物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】免疫化学アッセイ等における化学発光標識として有用な、両性イオンを含有する化合物の提供。

【解決手段】下式で表される化学発光アクリジニウムスルホンアミド化合物。



(R1は、C1-35アルキル等；R2及びR3は、H、電子供与基、又は基-Z；Y及びY'は、R、-Ra-Z又は-Ra-L；Lは脱離基、求電子基又は求核基を含む、誘導体化可能官能基；R1~R3、Y及びY'のいずれかは両性イオン基Zを含む)

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) アクリジニウム核の窒素原子に結合している炭化水素基であって、該炭化水素基は、最大 20 個までのヘテロ原子で場合により置換されている、炭化水素基、及び (ii) 置換炭化水素部分に連結している、前記アクリジニウム核の C₉ 位におけるカルボキシル又はスルホンアミド基を含む、化学発光アクリジニウム化合物であって、

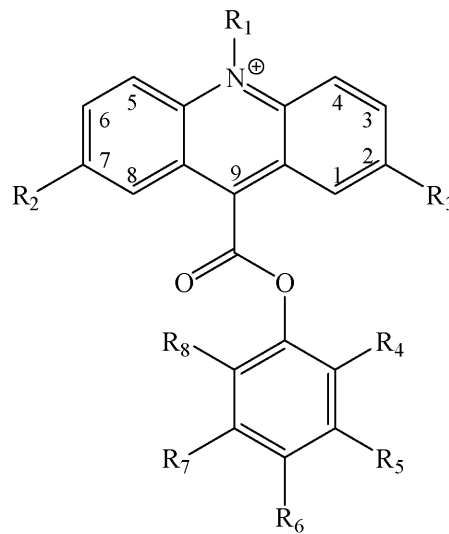
該アクリジニウム化合物は、前記アクリジニウム核の C₂ 位、前記アクリジニウム核の C₇ 位、前記カルボキシルもしくはスルホンアミド基に連結している前記炭化水素部分、又は前記アクリジニウム核の前記窒素原子に結合している前記炭化水素基に結合している、少なくとも 1 個の両性イオン官能基を含み；前記アクリジニウム化合物は、前記両性イオン官能基を含まない以外は同一のアクリジニウム化合物と比較して、固相に対する非特異的結合の減少を示す、化学発光アクリジニウム化合物。

10

【請求項 2】

以下の構造：

【化 48】



20

30

[式中、

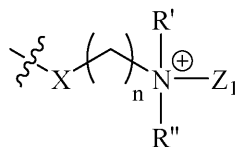
R₁ は、C₁ - 35 アルキル、アルケニル、アルキニル又はアラルキル基であり、それらの各々は、最大 20 個までのヘテロ原子、又はスルホプロピルもしくはスルホブチル基を含有することができるか、あるいは R₁ は、基 - R^a - Z であり；ここで、R^a は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、C₁ - 35 アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択される二価の基であり；

R₂ 及び R₃ は、(i) 水素、(ii) 電子供与基、又は (iii) 基 - Z から独立して選択され；

Z は、下記形態：

40

【化 49】



で示される両性イオン基であり、

X は、各々出現ごとに独立して、結合、-CH₂-、酸素、硫黄、-NR^N-、アミド (-NR^N(CO)-)、カルバマート (-NR^NC(O)O-) 又はウレア (-NR^N

50

C(O)NR^N-)から選択され；

R'及びR''は、各々出現ごとに独立して、各々が最大20個までのヘテロ原子を場合により含有する、C₁₋₃₅アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択され；

Z₁は、基-R^a-Z₂(ここで、Z₂は、カルボキシラート(-COO⁻)、スルホナート(-SO₃⁻)、スルファート(-OSO₃⁻)、ホスファート(-OP(O)(OR)(O⁻))もしくはオキシド(-O⁻)から選択される)であるか；又は、Z₂が、オキシド(-O⁻)である場合、R^aは、存在しなくてもよく；

nは、各々出現ごとに独立して、1~12の間の整数から選択され；そして

R₄及びR₈は、同じか、又は異なり、そして水素、C₁₋₃₅アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシル(-OR)、アルキルチオール(-SR)又は置換アミノ基(-NR₂)から選択され；

R₅、R₆及びR₇は、水素又は基-(CO)-R₁₅から独立して選択されるが、但し、R₅、R₆及びR₇のうち2つは、水素であり、そしてR₅、R₆及びR₇のうちの1つは、前記基-(CO)-R₁₅であり；

R₁₅は、基-Z又は基-X^aR*であり、ここで、X^aは、酸素、硫黄又は-NR^N-であり、そしてR*は、各々が最大20個までのヘテロ原子を場合により含有する、水素、C₁₋₃₅アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択されるか、あるいはR*は、基-R^a-Lであり、ここで、Lは、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基であるが；但し、R₁₅が、基-Zであるとき、Xは、各々出現ごとに独立して、結合、-CH₂-、酸素、硫黄又は-NR^N-から選択され；

Rは、各々出現ごとに独立して、各々が最大20個までのヘテロ原子を含有する、C₁₋₃₅アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され；そして

R^Nは、各々出現ごとに独立して、各々が最大20個までのヘテロ原子を含有する、水素、C₁₋₃₅アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択されるが；

但し、R₁、R₂、R₃、R₅、R₆及びR₇のうち少なくとも1つは、基Zである]
]を有する化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項3】

R₁、R₂、R₃、R₆のうち1つが、基-L又は-R^a-Lを含み、ここで、Lが、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基、求電子基又は求核基を含む、誘導体化可能官能基である、請求項2記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項4】

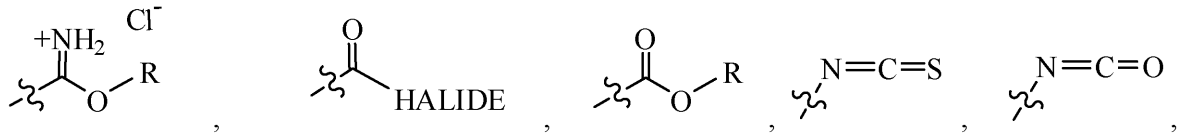
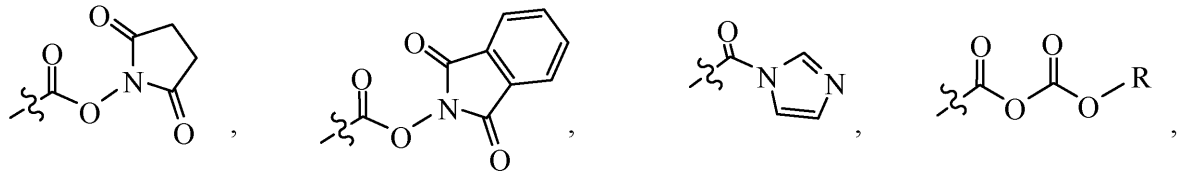
Lが、

10

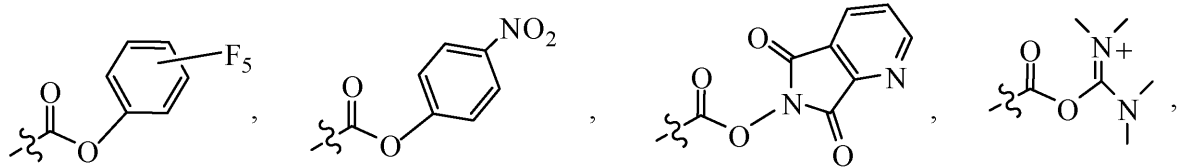
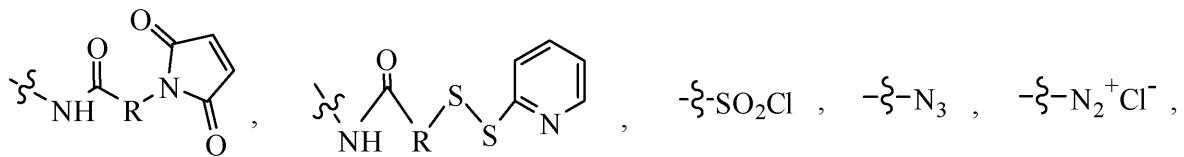
20

30

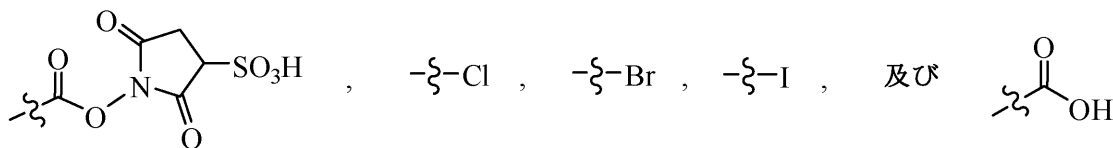
【化50】



10



20



30

からなる群より選択される、請求項3記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項5】

R_{15} が、

- (1) -OH;
- (2) -O-N-スクシンイミジル;
- (3) -NH-(CH₂)₅-C(O)-O-N-スクシンイミジル;
- (4) -NH-(CH₂)₅-COOH;
- (5) -NH-(C₂H₄O)_i-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-C(O)-O-N-スクシンイミジル(ここで、 $i = 1 \sim 5$ である);
- (6) -NH-(C₂H₄O)_i-C₂H₄NH-C(O)-(CH₂)₃-COOH(ここで、 $i = 1 \sim 5$ である);
- (7) -NH-(C₂H₄O)_i-C₂H₄NH₂(ここで、 $i = 1 \sim 5$ である); 及び
- (8) -NH-R-NHR; ならびに
- (9) -Z

からなる群より選択される、請求項2記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項6】

R_{15} が、-OHである、請求項4記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項7】

R' 又は R'' が、基 - R^a - L を含み、ここで、L が、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための、誘導体化可能な脱離基、求電子基又は

50

求核基である、請求項 2 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

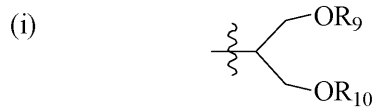
【請求項 8】

R' 又は R'' が、一出現で、基 - R^a - C(O) - CH₂CH₂CH₂ - C(O) - N - スクシンイミジル、- R^a - N - マレイミド、- R^a - C(O) - CH₂ - Br 又は - R^a - C(O) - CH₂ - I である、請求項 7 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

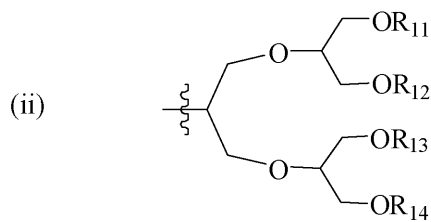
【請求項 9】

前記電子供与基が、(i) アルコキシル (-OR)、(ii) 基 - O - (CH₂CH₂ - O)₁ - CH₃ (ここで、1 は、1 ~ 12 の整数である) 及び (iii) 基 - O - G ならびに (vi) 基 - Z からなる群より選択され；ここで、G が、各々出現ごとに独立して、

【化 5 1】



又は、

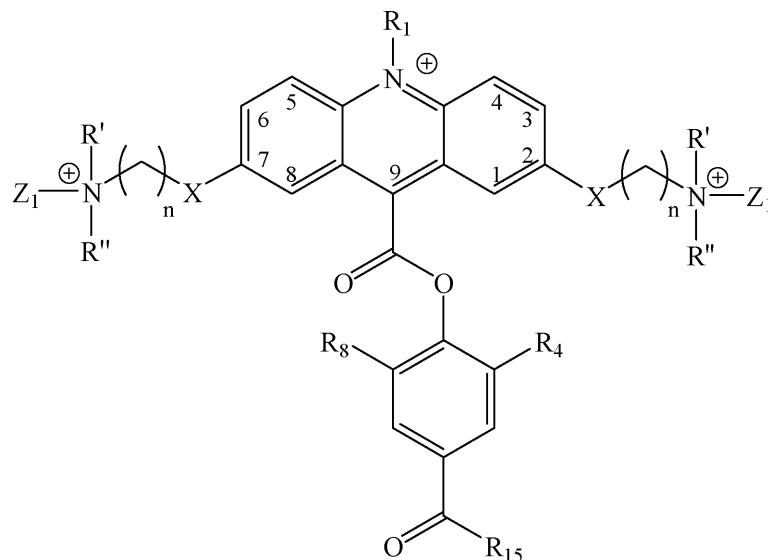


[式中、R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃ 及び R₁₄ は、各々出現ごとに独立して、メチル基又は基 - (CH₂CH₂O)_mCH₃ であり、ここで、m が、1 ~ 5 の整数である] から選択される分岐基である、請求項 2 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 10】

以下の構造：

【化 5 2】



[式中、R₁、R₄、R₈、R₁₅、R'、R''、X、Z₁ 及び n は、請求項 2 において定義したとおりであり、そして R'、R''、X、Z₁ 及び n は、各々出現ごとに独立して選択される] を有する、請求項 2 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 11】

以下の構造：

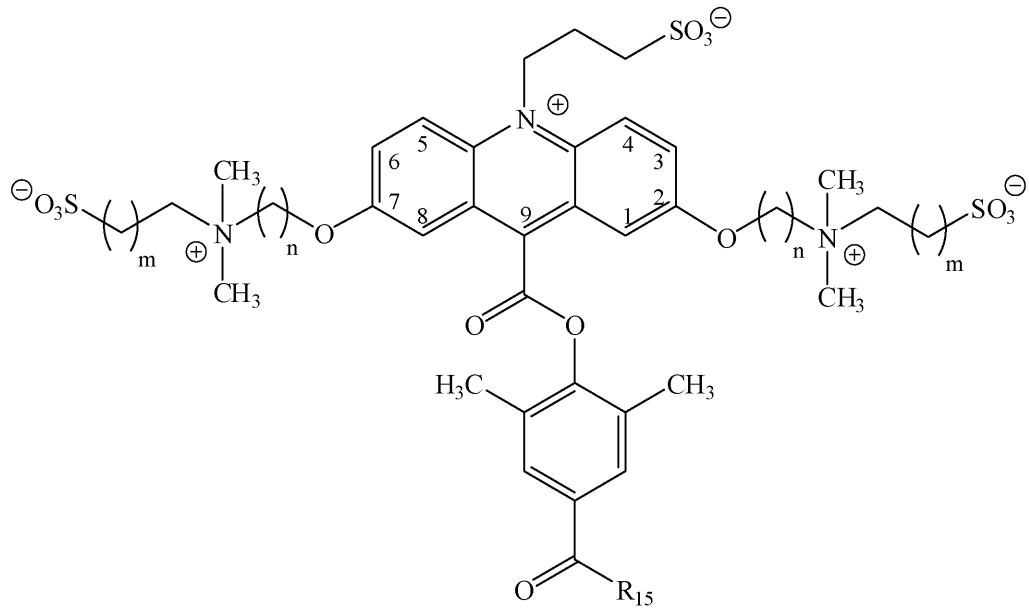
10

20

30

40

【化 5 3】



10

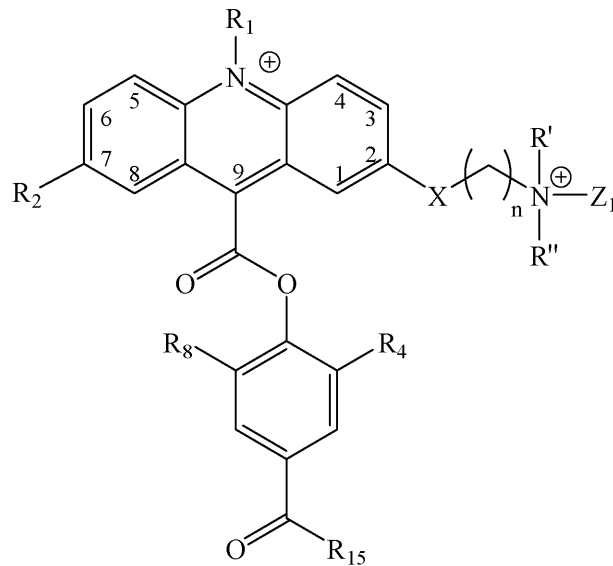
[式中、 m は、 $0 \sim 3$ の整数であり、そして R_{15} 及び n は、請求項2で定義したとおりであり、 m 及び n は、各々出現ごとに独立して選択される] を有する、請求項10記載の化学発光アクリジニウム化合物。

20

【請求項12】

以下の構造：

【化 5 4】



30

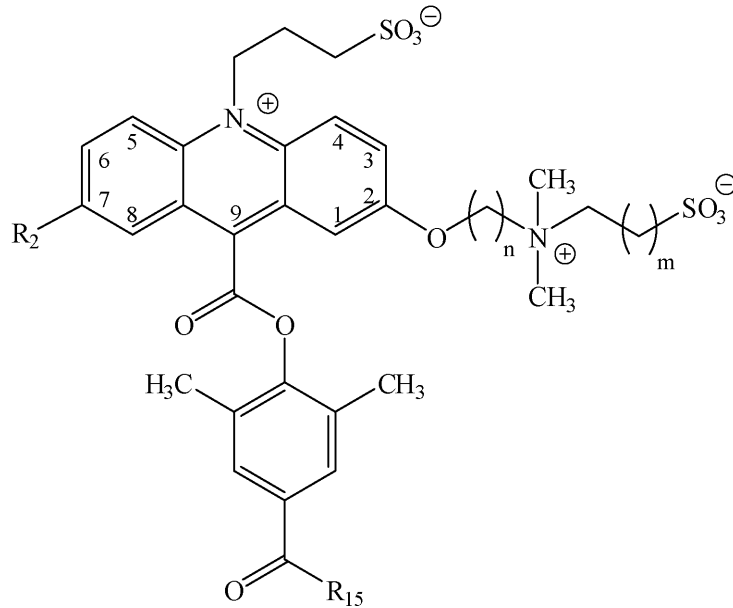
40

[式中、 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_8 、 R_{15} 、 R' 、 R'' 、 X 、 Z_1 及び n は、請求項2で定義したとおりである] を有する、請求項2記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項13】

以下の構造：

【化 5 5】



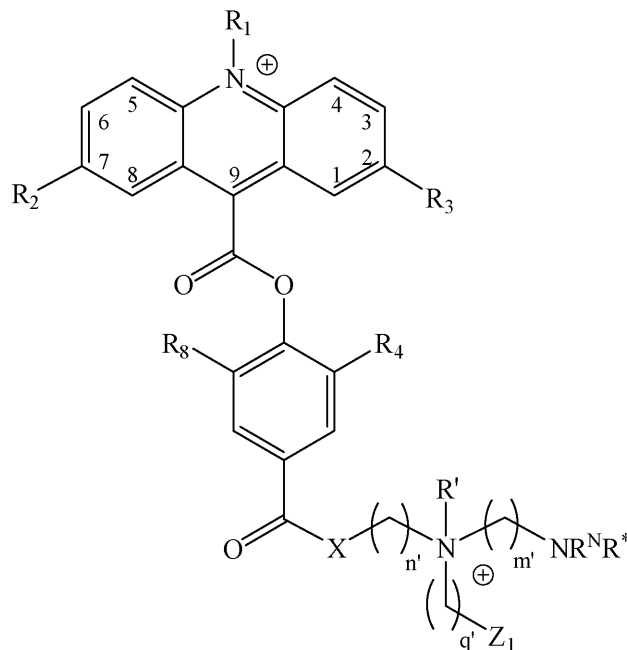
10

[式中、mは、0～3の整数であり、そしてR₂、R₁₅及びnは、請求項2で定義したとおりである] を有する、請求項12記載の化学発光アクリジニウム化合物。 20

【請求項14】

以下の構造：

【化 5 6】



30

40

[式中、n'、m'及びq'は、独立して1～4の整数であり、そしてR₁、R₂、R₃、R₄、R₈、R^N、R^{*}、R'、X及びZ₁は、請求項2で定義したとおりである] を有する、請求項2記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項15】

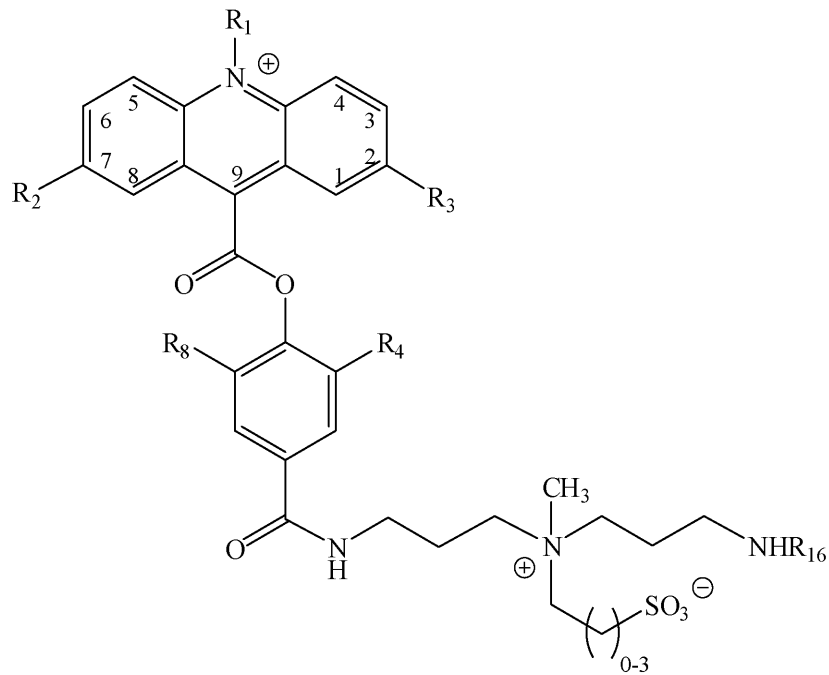
R^{*}が、基-R^a-Lを含み、ここで、Lが、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基である、請求項14記載の化学発光アクリジニウム化合物。

50

【請求項 16】

以下の構造：

【化 57】



10

20

[式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_8 は、請求項 2 で定義したとおりであり；そして R_{16} が、(i) 水素、(ii) $-C(O)-CH_2CH_2CH_2-C(O)-N$ -スクシンイミジル、(iii) $-R-N$ -マレイミド（ここで、 R が、独立して、アルキル、アルケニル、アルキニルもしくはアラルキルであり、これらの各々が、最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含むことができる）又は (iv) $-C(O)-CH_2-X$ （ここで、 X が、臭素 (Br) もしくはヨウ素 (I) である）から選択される] を有する、請求項 14 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 17】

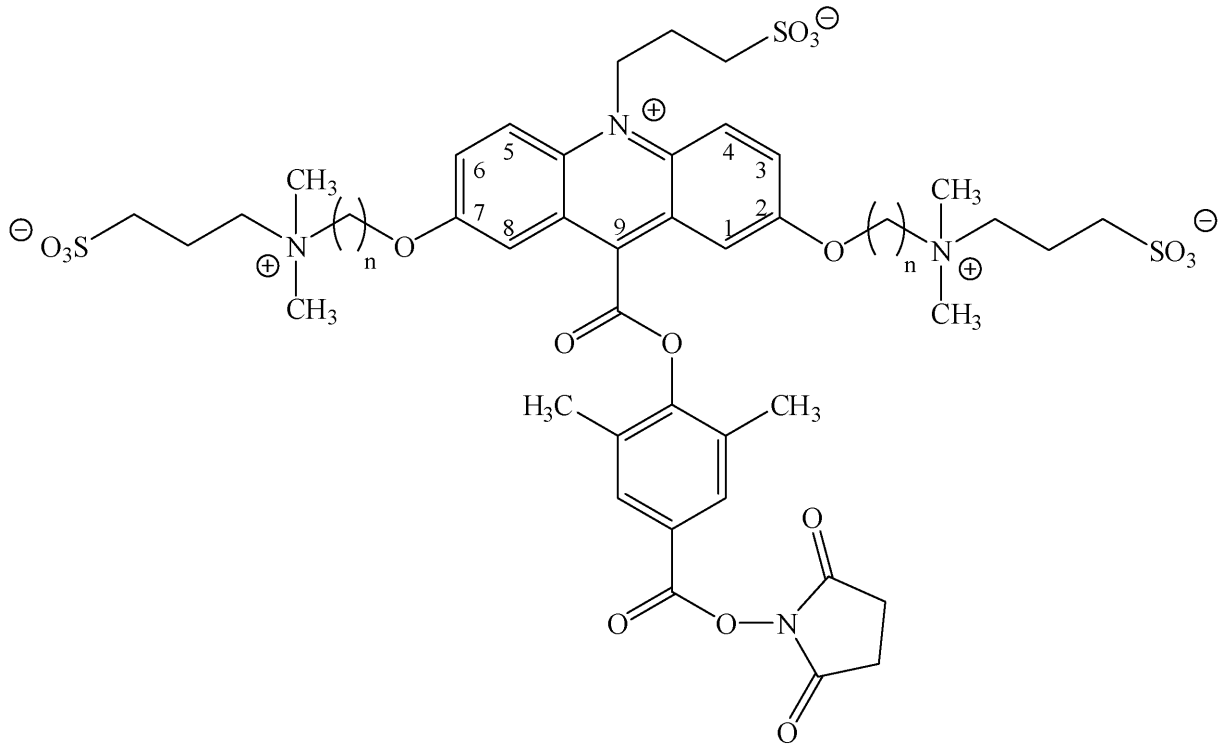
R_1 が、メチル、スルホプロピル ($-CH_2CH_2CH_2-SO_3^-$) 又はスルホブチル ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-SO_3^-$) 基から選択され；そして R_2 及び R_3 が、水素又は基 $-O-G$ （ここで、 G は、請求項 2 で定義されている）から独立して選択される、請求項 16 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

30

【請求項 18】

以下の構造：

【化 5 8】



10

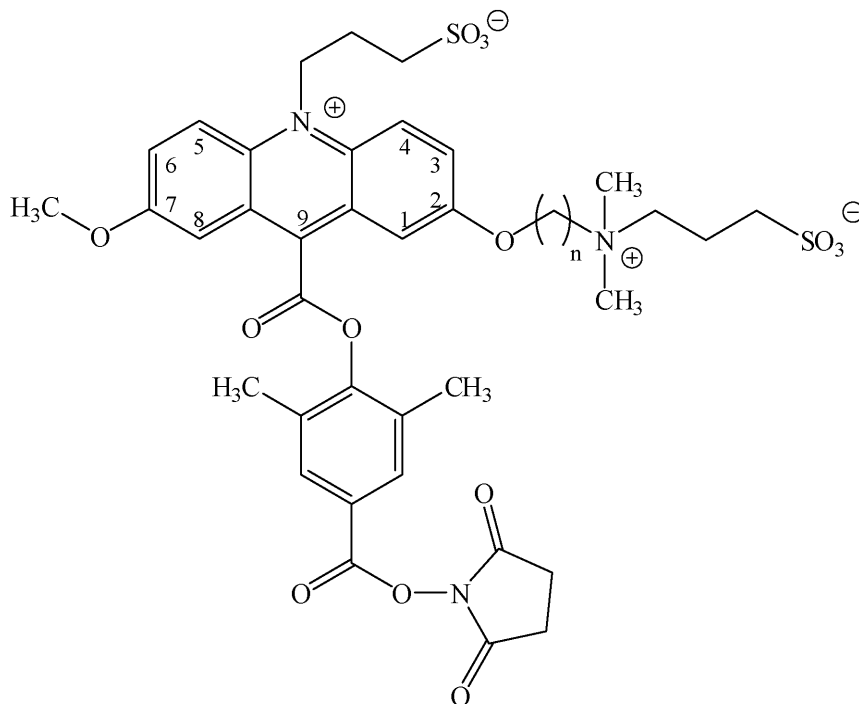
20

[式中、n は、各々出現ごとに独立して選択される、1 ~ 12 の整数である] を有する、請求項 2 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 19】

以下の構造：

【化 5 9】



30

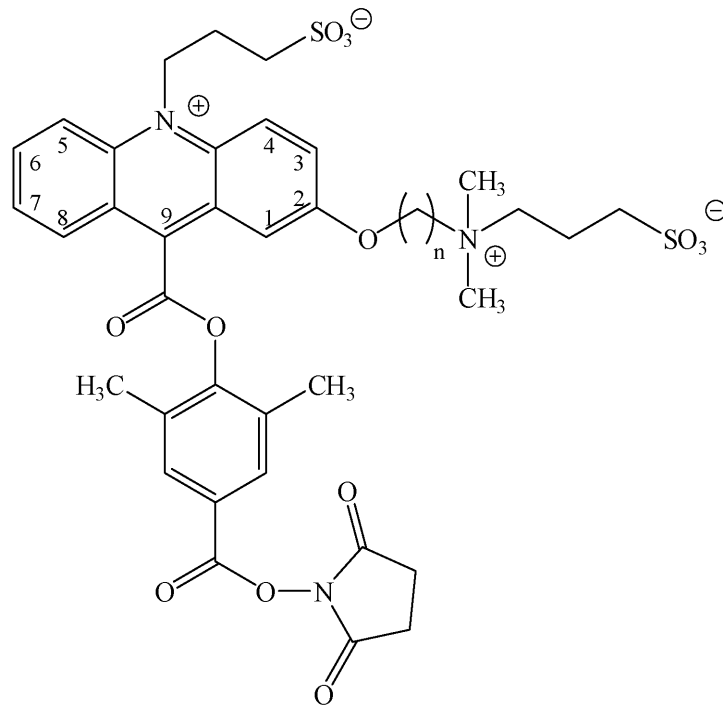
40

[式中、n は、1 ~ 12 の整数である] を有する、請求項 2 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 20】

50

以下の構造：
【化 6 0】



10

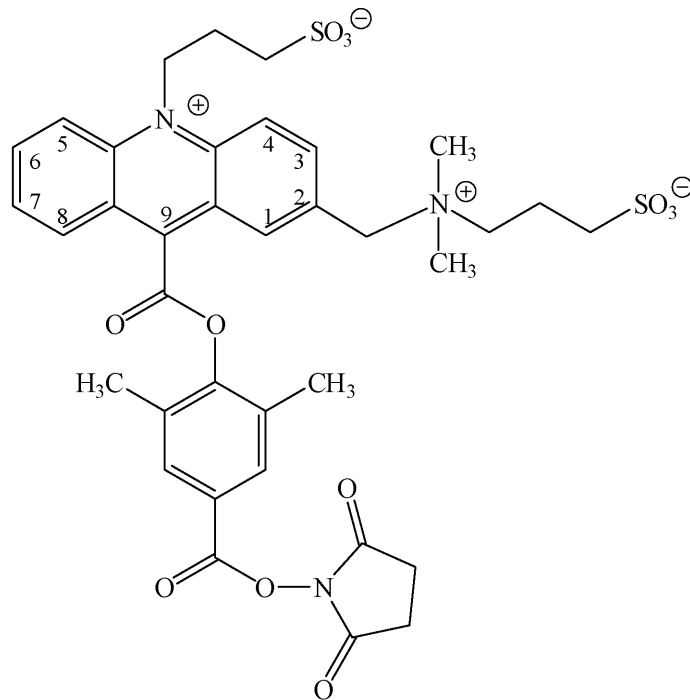
20

[式中、nは、1～12の整数である]を有する、請求項2記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項21】

以下の構造：

【化 6 1】



30

40

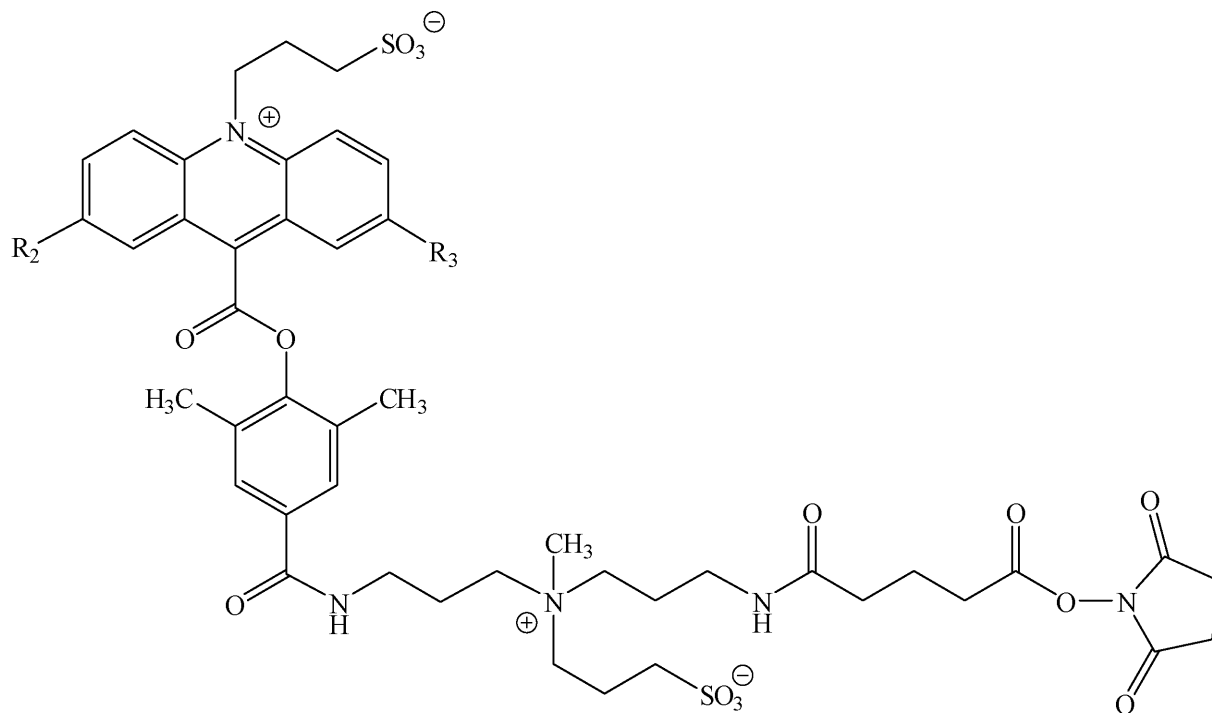
を有する、請求項2記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項22】

以下の構造：

50

【化 6 2】



10

20

[式中、 R_2 及び R_3 は、請求項 2 で定義したとおりである] を有する、請求項 2 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 2 3】

R_2 及び R_3 が、水素又は基 - O - G (ここで、G は、請求項 2 で定義したとおりである) から独立して選択される、請求項 2 2 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 2 4】

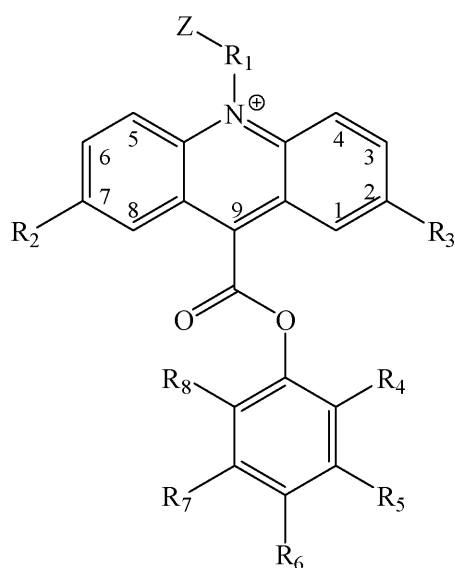
R_2 及び R_3 が、水素である、請求項 2 2 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 2 5】

以下の構造：

30

【化 6 3】



40

[式中、 $R_1 \sim R_8$ 及び Z は、請求項 2 で定義したとおりであるが；但し、 R_1 が、アルキルスルホナート基であるときは、X は、各々出現ごとに独立して、結合、-CH₂-、酸素又は -NR^N- から選択される] を有する、請求項 2 記載の化学発光アクリジニウム

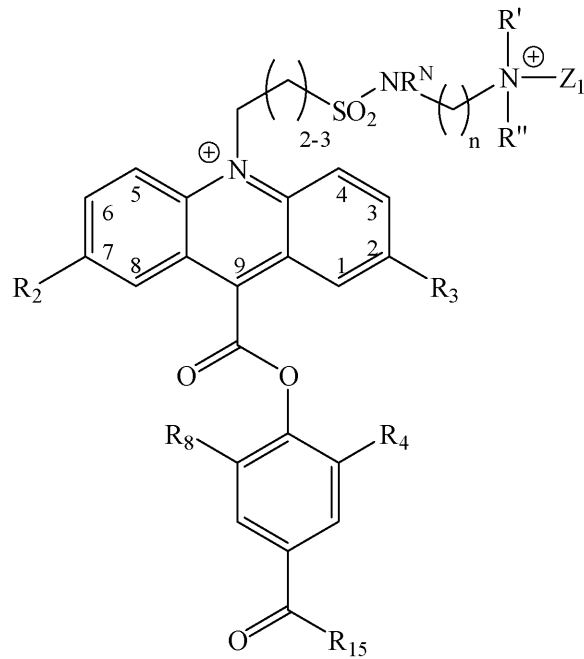
50

化合物。

【請求項 26】

以下の構造：

【化 64】



10

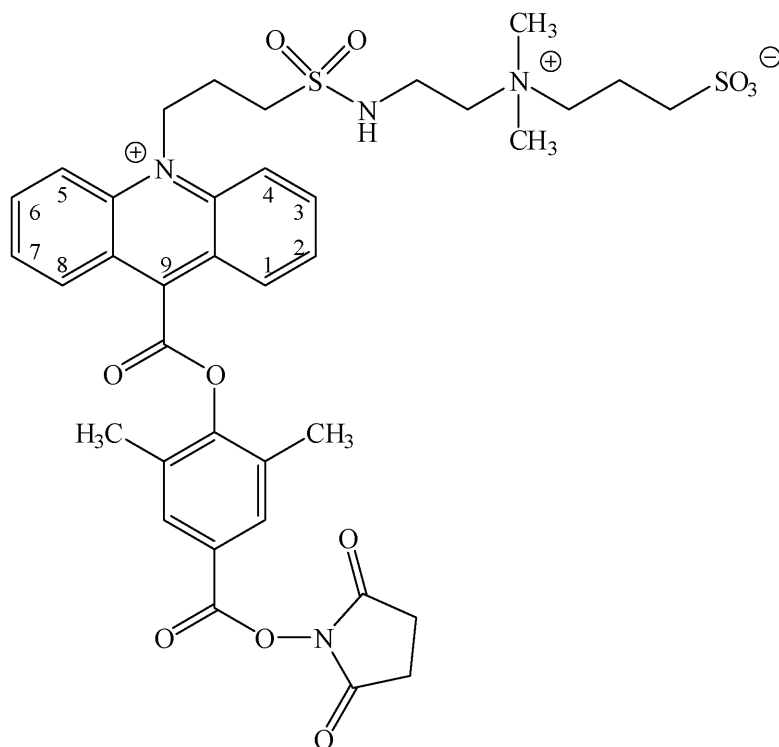
20

[式中、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_8 、 R_{15} 、 R' 、 R'' 、 R^N 、 Z_1 及び n は、請求項 2 で定義したとおりである] を有する、請求項 25 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 27】

以下の構造：

【化 65】



30

40

を有し、アクリジニウム核の正に荷電した窒素と釣り合わせるために対イオン A^- を場合

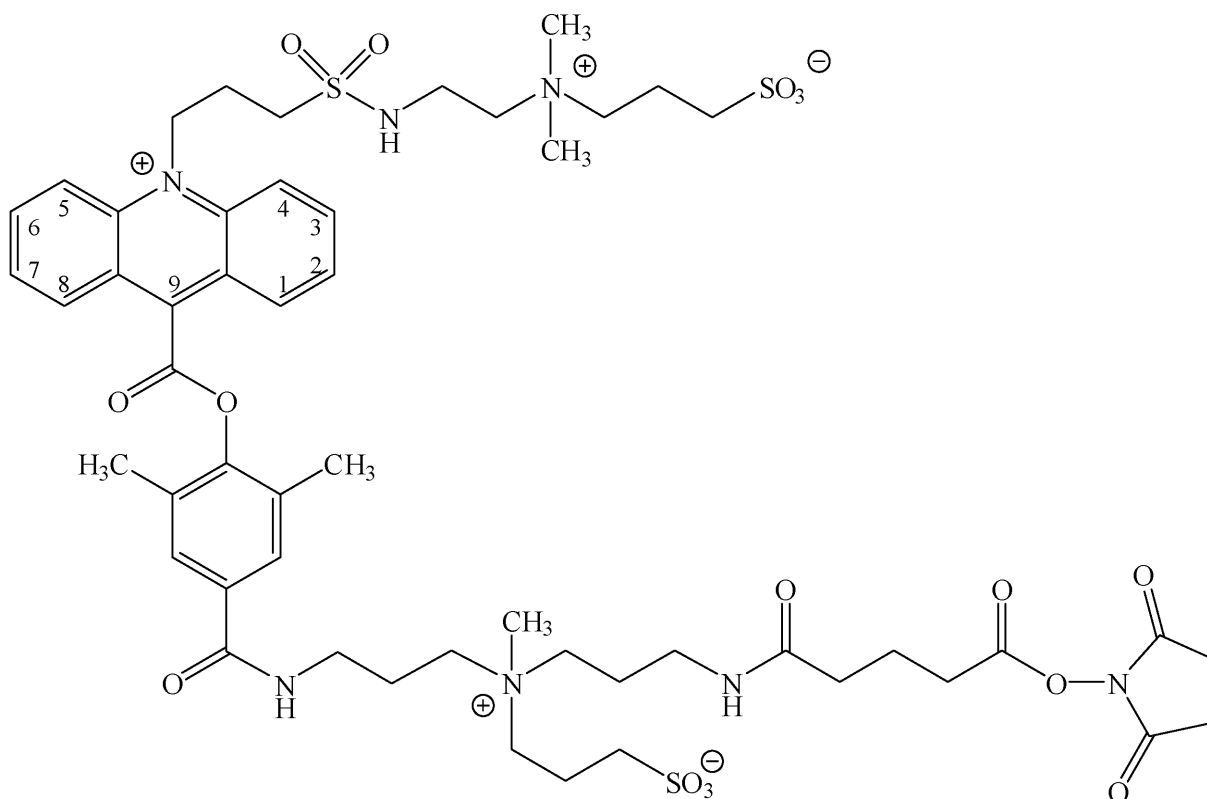
50

により含む、請求項 26 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 28】

以下の構造：

【化 66】



10

20

を有し、アクリジニウム核の正に荷電した窒素と釣り合わせるために対イオン A^- を場合により含む、請求項 26 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 29】

30

分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーに結合している化学発光アクリジニウム化合物を含む分析物の検出のための試薬であって、

前記アクリジニウム化合物は、(i) アクリジニウム核の窒素原子に結合している炭化水素基であって、該炭化水素基は、最大 20 個までのヘテロ原子で場合により置換されている、炭化水素基、及び (ii) 最大 20 個までのヘテロ原子で場合により置換されている置換炭化水素部分に連結している、前記アクリジニウム核の C₉ 位におけるカルボキシル又はスルホンアミド基を含み、ここで、前記アクリジニウム化合物は、前記アクリジニウム核の C₂ 位、前記アクリジニウム核の C₇ 位、前記カルボキシルもしくはスルホンアミド基に連結している前記炭化水素部分、又は前記アクリジニウム核の前記窒素原子に結合している前記炭化水素基に結合している、少なくとも 1 個の両性イオン官能基を含み；前記アクリジニウム化合物は、前記両性イオン官能基を含まない以外は同一のアクリジニウム化合物と比較して、固相に対する非特異的結合の減少を示す、試薬。

40

【請求項 30】

巨大分子分析物の検出又は定量のためのアッセイであって、

(a) 分析物に対して特異的な結合分子に結合している、請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物を含む抱合体を提供すること、

(b) 固体担体であって、その上に前記分析物に対して特異的な第 2 結合分子を固定している固体担体を提供すること、

(c) 前記抱合体、固相、及び前記分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成すること、

50

- (d) 前記固体担体上に捕獲された前記結合複合体を分離すること、
 (e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、工程(d)からの前記結合複合体の化学発光を誘発すること、
 (f) 照度計を用いて光放出の量を測定すること、及び
 (g) 放出された光の量を前記分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、前記分析物の存在を検出するか又は前記分析物の濃度を計算することを含む、アッセイ。

【請求項31】

提供された小分子分析物の検出又は定量のためのアッセイであって、

- (a) 分析物と請求項1記載の化学発光アクリジニウム化合物との抱合体を提供する工程、
 (b) 前記分析物に対して特異的な結合分子で固定された固体担体を提供する工程、
 (c) 前記抱合体、固体担体、及び前記分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成する工程、
 (d) 前記固体担体上に捕獲された前記結合複合体を分離する工程、
 (e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、工程(d)からの前記結合複合体の化学発光を誘発する工程、
 (f) 照度計を用いて光の量を測定する工程、及び
 (g) 放出された光の量を前記分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、前記分析物の存在を検出するか又は前記分析物の濃度を計算する工程を含む、アッセイ。

【請求項32】

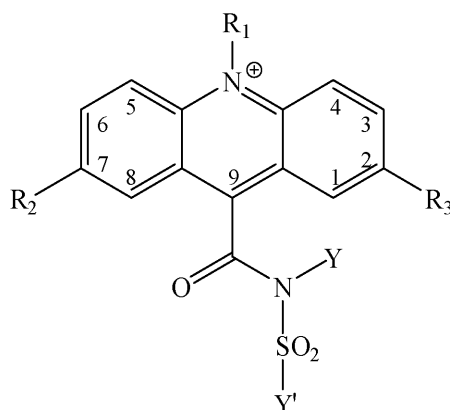
小分子分析物の検出のためのアッセイであって、

- (a) 分析物又は分析物類似体で固定された固体担体を提供すること、
 (b) 前記分析物に対して特異的な結合分子と請求項1記載の化学発光アクリジニウム化合物との抱合体を提供すること、
 (c) 前記固相、前記抱合体、及び前記分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成すること、
 (d) 前記固体担体上に捕獲された前記結合複合体を分離すること、
 (e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、(d)の前記結合複合体の化学発光を誘発すること、
 (f) 照度計を用いて光の量を測定すること、及び
 (g) 放出された光の量を前記分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、前記分析物の存在を検出するか又は前記分析物の濃度を計算することを含む、アッセイ。

【請求項33】

以下の構造：

【化67】



10

20

30

40

50

[式中、

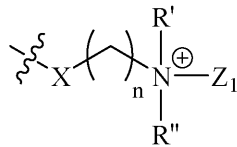
R_1 は、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル又はアラルキル基であり、それらの各々は、最大 20 個までのヘテロ原子、又はスルホプロピルもしくはスルホブチル基を含有することができるか、あるいは R_1 は、基 - R^a - Z であり；

R_2 及び R_3 は、(i) 水素、(ii) 電子供与基、又は (iii) 基 - Z から独立して選択され；

Y 及び Y' は、R、- R^a - Z 又は - R^a - L から独立して選択され；ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基、求電子基又は求核基を含む、誘導体化可能官能基であり；

Z は、形態：

【化 6 8】



で示される両性イオン基であり、

X は、各々出現ごとに独立して、結合、- CH_2 -、酸素、硫黄、- NR^N -、アミド (- NR^N (CO) -)、カルバマート (- NR^N C (O) O -) 又はウレア (- NR^N C (O) NR^N -) から選択され；

R' 及び R'' は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択され；

Z_1 は、基 - R^a - Z_2 であり、ここで、 Z_2 は、カルボキシレート (- COO^-)、スルホナート (- SO_3^-)、スルファート (- OSO_3^-)、ホスファート (- $OP(O)(OR)(O^-)$) 又はオキシド (- O^-) から選択されるか；あるいは、 Z_2 が、オキシド (- O^-) である場合、 R^a は、存在しなくてもよく；

n は、各々出現ごとに独立して、1 ~ 12 の間の整数から選択され；そして

R は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され；

R^N は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、水素、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され；そして

R^a は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択される、二価の基であるが；

但し、 R_1 、 R_2 、 R_3 、Y 及び Y' のうちの少なくとも 1 個は、前記両性イオン基 Z を含む] を有する、化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 3 4】

L が、

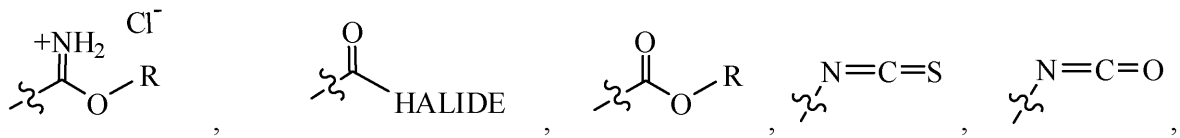
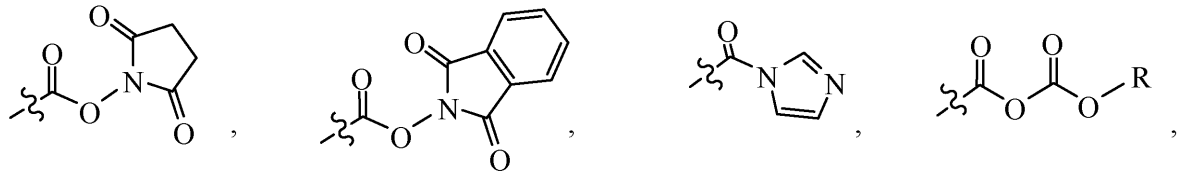
10

20

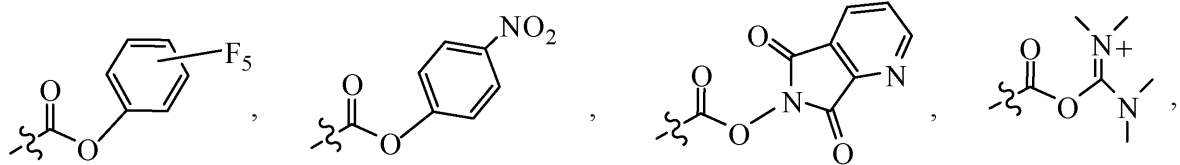
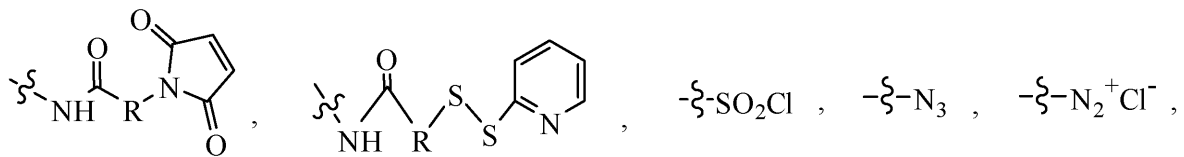
30

40

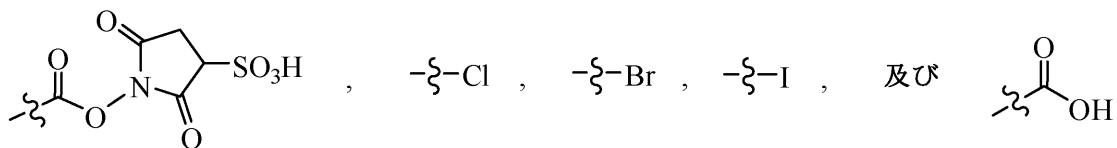
【化 6 9】



10



20



30

からなる群より選択される、請求項 3 3 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 3 5】

R' 又は R'' が、基 - R^a - L を含む、請求項 3 3 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

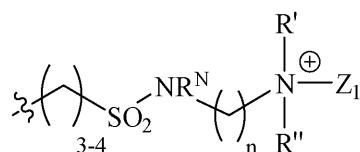
【請求項 3 6】

R' 又は R'' が、一出現で、基 - R^a - C(O) - CH₂CH₂CH₂ - C(O) - N - スクシンイミジル、- R^a - N - マレイミド、- R^a - C(O) - CH₂ - Br 又は - R^a - C(O) - CH₂ - I である、請求項 3 3 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 3 7】

R₁ が、メチル、スルホプロピル (- CH₂CH₂CH₂ - SO₃⁻)、スルホブチル (- CH₂CH₂CH₂CH₂ - SO₃⁻) 又は構造：

【化 7 0】



[式中、R^N、R'、R''、Z₁ 及び n は、請求項 3 2 で定義したとおりである] を有する基から選択される、請求項 3 3 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

40

50

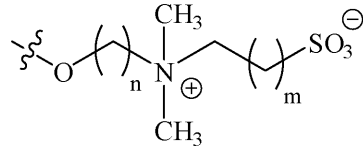
【請求項 38】

R₂ 及び R₃ の一方又は両方が、基 Z である、請求項 33 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 39】

R₂ 及び R₃ の一方又は両方が、基：

【化 7 1】



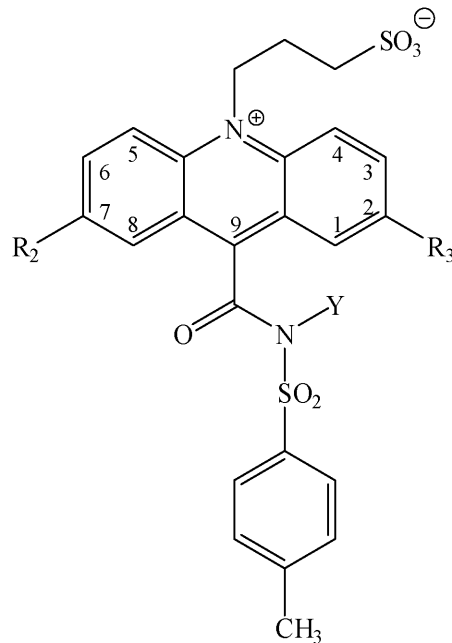
10

[式中、n は、1 ~ 12 の整数であり、そして m は、0 ~ 3 の整数である] である、請求項 38 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 40】

以下の構造：

【化 7 2】



20

30

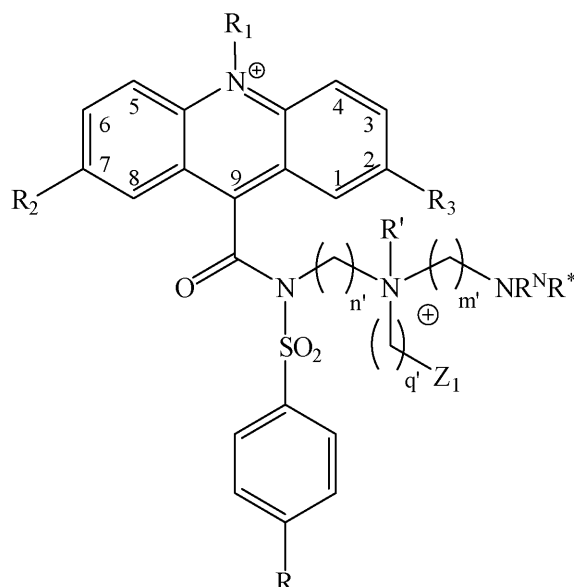
[式中、Y は、基 - R^a - Z を含み、ここで、R^a、R₂、R₃ 及び Z は、先に定義したとおりである] を有する、請求項 33 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 41】

以下の構造：

40

【化 7 3】



10

[式中、 R^* は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、水素、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択されるか、あるいは R^* は、基 - R^a - L (ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物のための結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基である) であり; n' 、 m' 及び q' は、独立して、1 ~ 4 の整数であり、そして R 、 R^N 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R' 及び Z_1 は、先に定義したとおりである] を有する、請求項 33 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、両性イオンを含有する親水性化学発光アクリジニウム化合物に関する。これらアクリジニウム化合物は、それらの親水性の性質のため、固相に対する低い非特異的結合を示し、そしてアッセイ感度を改善するのに潜在的に有用である。

30

【0002】

背景

化学発光アクリジニウムエステルは、イムノアッセイ及び核酸アッセイの両方のための極めて有用な標識であることが明らかになっている。アクリジニウムエステルからの光放出は、アルカリ性過酸化水素との反応によって誘発され、この反応は、フェノールエステル結合の開裂、及び発光種である励起状態アクリドンの形成を引き起こす。フェノール脱離基の離脱に続くジオキセタン中間体の形成が、その反応機構において提案されており、そして励起状態アクリドンへの前駆体であると推定される。アクリジニウムエステルからの光放出の期間は、反応条件にもよるが、通常は数秒以内で完了し、そして照度計を使用して定量的に測定することができる。イムノアッセイにおけるアクリジニウムエステル、9 - カルボキシフェニル - N - メチルアクリジニウムプロミドの適用が、Simpson, J.S.A.らによって開示された (Nature vol. 279, pp. 646-647 (1979))。しかしながら、このアクリジニウムエステルは、かなり不安定であり、それによってその商業的有用性を制限している。この不安定性は、フェノールとアクリジニウム環との間の不安定な 9 - カルボキシフェニルエステル結合の加水分解に起因する。

40

【0003】

アクリジニウムエステルにおけるフェノールエステルを安定させる試みにおいて、Lawら (Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, vol. 4, pp. 88-89 (1989)) は、このエステル結合を安定させるために 2 個の隣接メチル基を導入した。得られた立体

50

的に安定化されたアクリジニウムエステルは、DMAE-NHS [2', 6'-ジメチル-4'-(N-スクシンイミジルオキシカルボニル)フェニル10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシラート]と略されるが、2個のメチル基を欠くアクリジニウムエステルと同じ光出力を有することが見出された。他方では、先の化合物の安定性は、免疫グロブリンに抱される場合、はるかに優れており、そして37℃、pH7での1週間後でさえ化学発光活性の損失を示さなかった。対照的に、非置換のアクリジニウムエステルは、同じ処理に付された場合、その活性のたった10%を保持するだけであった。

【0004】

DMAE及びその誘導体の疎水性の性質を緩和するために、Lawらによる米国特許第5,656,426号は、N-メチル基がN-スルホプロピル(NSP)基で置き換えられている、NSP-DMAE-NHSエステルと呼ばれるDMAEの親水性バージョンを開示した。DMAE及びNSP-DMAEの両方とも、現在、Siemens Healthcare Diagnosticsの市販の自動イムノアッセイ分析器ACS:180(商標)及びCentaur(商標)において広く使用されている。

10

【0005】

NSP-DMAEの親水性をさらに増大させるために、Natrajanらは、米国特許第6,664,043(B2)号において、フェノールに結合しているポリ(エチレン)グリコール及びアニオン性スルミン誘導体などの親水性修飾剤を有するNSP-DMAE誘導体を開示した。そのような、NSP-DMAE-HEG-グルタラート-NHSと呼ばれ(NSP-DMAE-HEGと略され)、そしてヘキサ(エチレン)グリコール誘導体(HEG)を含有するアクリジニウムエステルの1つの構造は、以下の図において例示されている。この化合物において、-ジアミノヘキサ(エチレン)グリコール(ジアミノ-HEG)部分が、アクリジニウムエステルの水溶解度を増大させるために、フェノールに結合している。グルタラート部分が、ジアミノ-HEGの末端に付加され、そして種々の分子の標識化を可能にするためにNHSエステルに変換された。HEGに加えて、スルホン酸基及びカルボキシラート基を有するスルミンから誘導されたアニオン性修飾剤はまた、米国特許第6,664,043(B2)号において、Natrajanらによって開示された。

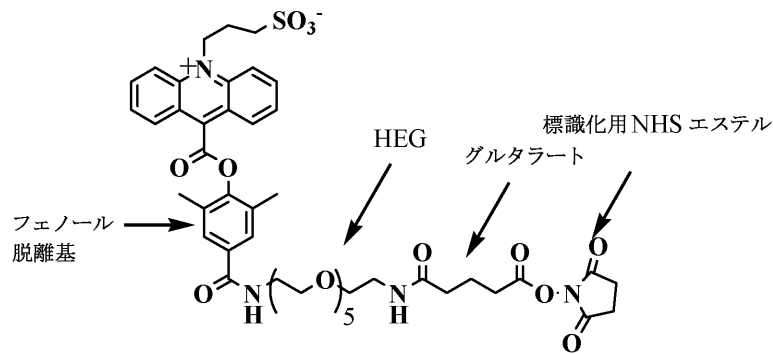
20

【0006】

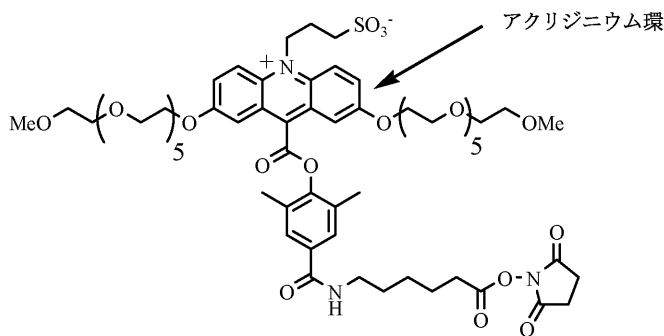
最近、Natrajanらは、米国特許第7,309,615(B2)号において、アクリジニウム環のC2及び/又はC7における親水性アルコキシ基(OR*) (ここで、R*は、スルホプロピル部分もしくはエチレングリコール部分又はその組合せを含む基である)を含有する、親水性の高量子収率アクリジニウム化合物を記載した。このような化合物からの高められた光出力及びそれらの親水性の性質により、それらはイムノアッセイの感度を改善するのに有用になった。そのような、NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHS(HQYAEと略される)と呼ばれる化合物の1つの構造は、以下に例示されている。この化合物及び米国特許第7,309,615(B2)号に記載されている他の化合物は、フェノールに代わってアクリジニウム環に結合しているポリ(エチレン)グリコール又はアニオン性スルホン酸基を含有した。

30

【化 1】



NSP-DMAE-HEG-グルタラート-NHSの構造

NSP-2,7-(OMHEG)₂-DMAE-AC-NHSの構造

【 0 0 0 7 】

前述の特許に開示されているアクリジニウムエステルの構造におけるポリ(エチレン)グリコール(PEG)部分及びアニオンの取り込みは、これらのアクリジニウムエステルの親水性の性質を増大させるほか、これらの化合物から誘導される抱合体の非特異的結合を低下させることが意図されている。非特異的結合とは、粒子又はマイクロタイタプレートなどの固相を使用するアッセイにおいて、これらの固相に対するこれらのアクリジニウムエステル抱合体の望ましくない結合相互作用である。これらの望ましくない結合相互作用は、典型的には、アッセイのバックグラウンドを増大させ、それがアッセイにおいてシグナル対バックグラウンド比の正味の低下をもたらし、それによってアッセイ感度が下がる。

【 0 0 0 8 】

タンパク質吸着に抵抗する不活性表面を作り出すためのポリ(エチレン)グリコールの使用は、先行技術において説明されている。例えば、Ostuniらは、J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 5605-5620において、タンパク質吸着に対する抵抗性について自己集合単分子層に結合した多数の官能基を評価し、そしてポリ(エチレン)グリコール官能基が最良の抵抗性を与えるということを観察した。より最近になって、Laddらが、Biomacromolecules 2008, 9, 1357-1361において；及び他の者が、両性イオンで修飾された親水性表面は、タンパク質吸着に対してPEGと同程度に不活性であるということ報告しており、そしてさらに、両性イオンは、PEGの酸化的開裂に対する性向のため、PEGよりも化学的により安定であろうということが仮定されている。幾つかの一般的な両性イオン、例えば、スルホベタイン、カルボキシベタイン、ホスホベタイン及びアミノオキsidなどの構造は、以下の図において例示されている。PEGのように、これらの両性イオンは、通常、所与の構造における正及び負電荷の釣り合いにより、電気的に中性である(R1~R4は、典型的には、アルキル基である)。

【 0 0 0 9 】

両性イオンの例

10

20

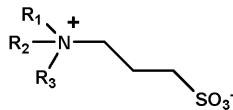
30

40

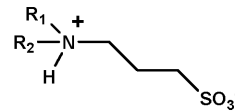
50

【化 2】

スルホベタイン

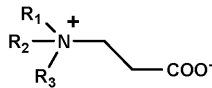


低及び高pHの両方において両性イオン性



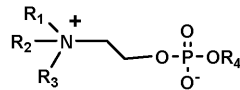
pH >7においてアニオン性

カルボキシベタイン

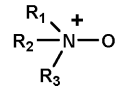


低pHにおいてカチオン性

ホスホベタイン



第三級アミンオキシド



10

【0010】

窒素原子が第四級であるスルホベタインは、それらの電気的中性を広いpH範囲にわたって維持する。他方では、三置換窒素有するスルホベタインは、より高いpH (pH > 7) において、窒素で脱プロトン化され、それによってその正電荷を中和することができるので、負電荷を獲得することができる。同様に、カルボキシベタインは、より高いpH 20 において電気的に中性であるが、低いpH (pH < 5) において、カルボキシラート基でプロトン化されて正味の正電荷を獲得することができる。

【0011】

プロテオミクスにおける適用のための、両性イオンで修飾された蛍光色素が、最近、米国特許出願第0259333 (A1)号においてDratz及びGriecoによって報告されている(2007年11月)。両性イオン色素で標識されたタンパク質は、水溶性であり、そして電気泳動分析をより施しやすいことが観察された。また、上記の著者は、両性イオン色素を使用したタンパク質分析のための方法をクレームしている。

【0012】

非特異的結合などの化学発光アクリジニウムエステルの特性を改善するために、それに電気的に中性な両性イオン官能基を取り込むことは、先行技術において説明されていない。このような化合物は、米国特許第6,664,043 (B2)号及び米国特許第7,309,615 (B2)号においてNatrajanらによって記載されているPEG含有アクリジニウムエステルを補完し、そしてアッセイ感度を改善する可能性を有するものである。

30

【0013】

当技術分野において、イムノアッセイ等のための改善された化学発光タグに対する必要性が引き続き存在する。したがって、本発明の目的は、固相に対する非特異的結合の減少を示す化学発光アクリジニウム化合物を提供することである。

【0014】

発明の概要

上述の目的及びその他にしたがって、化学発光アクリジニウム化合物の特性は、分子内に両性イオン基を取り込んで、その親水性を増大させ、結果として固相との非特異的結合を減少させることによって、改善されるということが驚くべきことに見出された。

40

【0015】

本発明の一態様において、(i)アクリジニウム核の窒素原子に結合している炭化水素基であって、該炭化水素基は、最大20個までのヘテロ原子で場合により置換されている、炭化水素基、及び(ii)置換炭化水素部分に連結している、アクリジニウム核のC₉位におけるカルボキシル又はスルホンアミド基を含む、化学発光アクリジニウム化合物が提供され、ここで、このアクリジニウム化合物は、アクリジニウム核のC₂位、アクリジニウム核のC₇位、カルボキシルもしくはスルホンアミド基に連結している炭化水素部分、

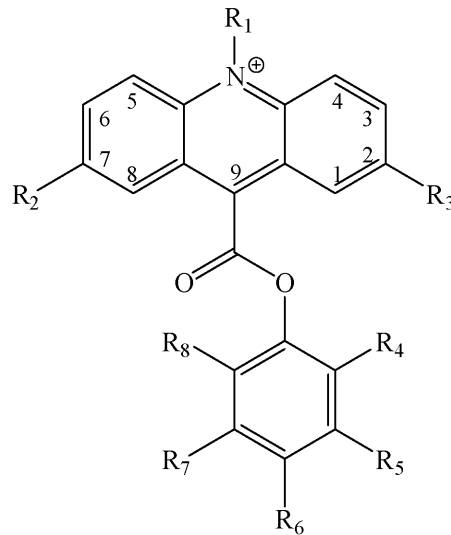
50

又はアクリジニウム核の窒素原子に結合している炭化水素基に結合している、少なくとも1個の両性イオン官能基を含み；前記アクリジニウム化合物は、前記両性イオン官能基を含まない以外は同一のアクリジニウム化合物と比較して、固相に対する非特異的結合の減少を示す。

【0016】

一実施態様において、化学発光アクリジニウム化合物は、式(I)で示される以下の構造：

【化3】



I

10

20

[式中、

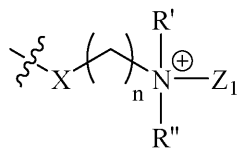
R₁は、C₁₋₃₅アルキル、アルケニル、アルキニル又はアラルキル基であり、それらの各々は、最大20個までのヘテロ原子、又はスルホプロピルもしくはスルホブチル基を含有することができるか、あるいはR₁は、基-R^a-Zであり；ここで、R^aは、各々が最大20個までのヘテロ原子を場合により含有する、C₁₋₃₅アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択される二価の基であり；

30

R₂及びR₃は、(i)水素、(ii)電子供与基、又は(iii)基-Zから独立して選択され；

Zは、以下の形態：

【化4】



40

で示される両性イオン基であり、

Xは、各々出現ごとに独立して、結合、-CH₂-、酸素、硫黄、-NR^N-、アミド(-NR^N(CO)-)、カルバマート(-NR^NC(O)O-)又はウレア(-NR^NC(O)NR^N-)から選択され；

R'及びR''は、各々出現ごとに独立して、各々が最大20個までのヘテロ原子を場合により含有する、C₁₋₃₅アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択され；

Z₁は、基-R^a-Z₂(ここで、Z₂は、カルボキシラート(-COO⁻)、スルホナート(-SO₃⁻)、スルファート(-OSO₃⁻)、ホスファート(-OP(O)(OR)(O⁻))もしくはオキシド(-O⁻)から選択される)であるか；又は、Z₂が

50

、オキシド (- O ⁻) である場合、R^a は、存在しなくてもよく；

n は、各々出現ごとに独立して、1 ~ 12 の間の整数から選択され；そして

R₄ 及び R₈ は、同じか、又は異なり、そして水素、C₁₋₃₅ アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシル (- OR)、アルキルチオール (- SR) 又は置換アミノ基 (- NR₂) から選択され；

R₅、R₆ 及び R₇ は、水素又は基 - (CO) - R₁₅ から独立して選択されるが、但し、R₅、R₆ 及び R₇ のうちの2つは、水素であり、そして R₅、R₆ 及び R₇ のうちの1つは、前記基 - (CO) - R₁₅ であり；

R₁₅ は、基 - Z 又は基 - X^a R^{*} であり、ここで、X^a は、酸素、硫黄又は - NR^N - であり、そして R^{*} は、各々が最大20個までのヘテロ原子を場合により含有する、水素、C₁₋₃₅ アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択されるか、あるいは R^{*} は、基 - R^a - L であり、ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基であるが；但し、R₁₅ が、基 - Z であるとき、X は、各々出現ごとに独立して、結合、- CH₂ -、酸素、硫黄又は - NR^N - から選択され；

R は、各々出現ごとに独立して、各々が最大20個までのヘテロ原子を含有する、C₁₋₃₅ アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され；そして

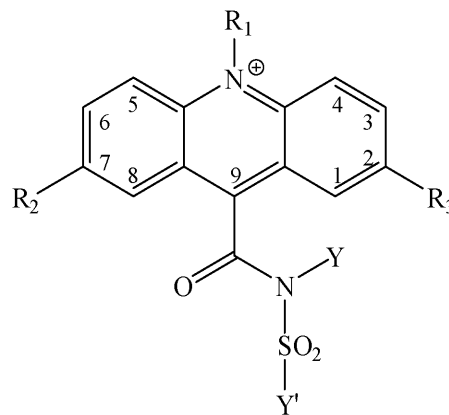
R^N は、各々出現ごとに独立して、各々が最大20個までのヘテロ原子を含有する、水素、C₁₋₃₅ アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択されるが；

但し、R₁、R₂、R₃、R₅、R₆ 及び R₇ のうちの少なくとも1つは、基 Z である] を有するアクリジニウムエステルである。

【0017】

別の実施態様において、化学発光アクリジニウム化合物は、式 (II) で示される以下の構造：

【化5】



II

[式中、

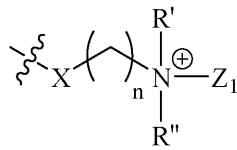
R₁ は、C₁₋₃₅ アルキル、アルケニル、アルキニル又はアラルキル基であり、これらの各々は、最大20個までのヘテロ原子、又はスルホプロピルもしくはスルホブチル基を含有することができるか、あるいは R₁ は、基 - R^a - Z であり；

R₂ 及び R₃ は、(i) 水素、(ii) 電子供与基、又は (iii) 基 - Z から独立して選択され；

Y 及び Y' は、R、- R^a - Z 又は - R^a - L から独立して選択され；ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基、求電子基又は求核基を含む、誘導体化可能官能基 (derivitizable functional group) であり；

Z は、以下の形態：

【化 6】



で示される両性イオン基であり、

X は、各々出現ごとに独立して、結合、 $-CH_2-$ 、酸素、硫黄、 $-NR^N-$ 、アミド ($-NH(CO)-$)、カルバマート ($-NHCOO-$) 又はウレア ($-NHCO)NH-$) から選択され；

R' 及び R'' は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択され；

Z₁ は、基 $-R^a-Z_2$ であり、ここで、Z₂ は、カルボキシラート ($-COO^-$)、スルホナート ($-SO_3^-$)、スルファート ($-OSO_3^-$)、ホスファート ($-OP(O)(OR)(O^-)$) 又はオキシド ($-O^-$) から選択されるか；あるいは、Z₂ が、オキシド ($-O^-$) である場合、R^a は、存在しなくてもよく；

n は、各々出現ごとに独立して、1 ~ 12 の間の整数から選択され；

R は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され；

R^N は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、水素、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され；

そして R^a は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択される、二価の基であるが；

但し、R₁、R₂、R₃、Y 及び Y' のうちの少なくとも 1 個は、前記両性イオン基 Z を含む] を有するアクリジニウムスルホンアミドである。

【0018】

本発明の別の態様において、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーに結合している化学発光アクリジニウム化合物を含む分析物の検出のための試薬が提供され、このアクリジニウム化合物は、(i) アクリジニウム核の窒素原子に結合している炭化水素基であって、該炭化水素基は、最大 20 個までのヘテロ原子で場合により置換されている、炭化水素基、及び (ii) 最大 20 個までのヘテロ原子で場合により置換されている置換炭化水素部分に連結している、アクリジニウム核の C₉ 位におけるカルボキシル又はスルホンアミド基を含み、ここで、前記アクリジニウム化合物は、アクリジニウム核の C₂ 位、アクリジニウム核の C₇ 位、カルボキシルもしくはスルホンアミド基に連結している炭化水素部分、又はアクリジニウム核の窒素原子に結合している炭化水素基に結合している、少なくとも 1 個の両性イオン官能基を含み；前記アクリジニウム化合物は、前記両性イオン官能基を含まない以外は同一のアクリジニウム化合物と比較して、固相に対する非特異的結合の減少を示す。

【0019】

本発明のさらなる態様において、巨大分子分析物の検出又は定量のためのアッセイが提供され、このアッセイは、(a) 分析物に対して特異的な結合分子に結合している、本発明による化学発光アクリジニウム化合物を含む抱合体を提供すること；(b) 固体担体であって、その上に前記分析物に対して特異的な第 2 結合分子を固定している固体担体を提供すること；(c) 上記抱合体、固相、及び分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成すること；(d) 固体担体上に捕獲された結合複合体を分離す

ること；(e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、工程(d)からの結合複合体の化学発光を誘発すること；(f) 照度計を用いて光放出の量を測定すること；及び(g) 放出された光の量を分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、分析物の存在を検出するか又は分析物の濃度を計算することを含む。

【0020】

さらに別の態様において、小分子分析物の検出又は定量のためのアッセイが提供され、このアッセイは、(a) 分析物と本発明による化学発光アクリジニウム化合物との抱合体を提供する工程；(b) 分析物に対して特異的な結合分子で固定された固体担体を提供する工程；(c) 上記抱合体、固体担体、及び分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成する工程；(d) 固体担体上に捕獲された結合複合体を分離する工程；(e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、工程(d)からの結合複合体の化学発光を誘発する工程；(f) 照度計を用いて光の量を測定する工程；及び(g) 放出された光の量を分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、分析物の存在を検出するか又は分析物の濃度を計算する工程を含む。

10

【0021】

さらに別の態様において、小分子分析物の検出のためのアッセイが提供され、このアッセイは、(a) 分析物又は分析物類似体で固定された固体担体を提供すること；(b) 分析物に対して特異的な結合分子と本発明による化学発光アクリジニウム化合物との抱合体を提供すること；(c) 固相、抱合体、及び分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成すること；(d) 固体担体上に捕獲された結合複合体を分離すること；(e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、(d)の結合複合体の化学発光を誘発すること；(f) 照度計を用いて光の量を測定すること；及び(g) 放出された光の量を分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、分析物の存在を検出するか又は分析物の濃度を計算することを含む。

20

【0022】

本発明のこれら及び他の態様は、添付の特許請求の範囲を含む、以下の詳細な説明を参照することによってよりよく理解されるであろう。

30

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本発明の複数の例示的両性イオン含有アクリジニウム化合物の化学構造を示す図である。

【図2】本発明の他の例示的両性イオン含有アクリジニウム化合物の化学構造を示す図である。

【図3】本発明の別の例示的両性イオン含有アクリジニウム化合物の化学構造を示す図である。

【図4】時間の関数としてプロットされた、相対光単位(RLU)%での、対照(NSP-DMAE-HEG)及び例示的両性イオン含有アクリジニウム(NSP-DMAE-Z-NHS)抱合体から放出された光のプロットである。

40

【図5】時間の関数としてプロットされた、相対光単位(RLU)%での、2つの抗体に対する対照(HQYAE)及び例示的両性イオン含有アクリジニウム(NSP-2,7-DMG-DMAE)抱合体から放出された光のプロットである。

【図6】時間の関数としてプロットされた、相対光単位(RLU)%での、抗TSH Mabに対する対照(NSP-DMAE-Z)及び例示的両性イオン含有アクリジニウム(ZC6M-AE及びZC8M-AE)抱合体から放出された光のプロットである。

【0024】

詳細な説明

本発明の主な目的は、両性イオン含有アクリジニウム化合物の構造であって、これらの

50

構造的特徴を欠くアクリジニウム化合物と比較した場合、固相に対する低い非特異的結合を示す、両性イオン含有アクリジニウム化合物の構造を開示することである。本発明の別の目的は、2つの種類の両性イオン修飾のアクリジニウム化合物：(a)アクリジニウム環内に両性イオンを含有するアクリジニウム化合物、及び(b)フェノール脱離基に結合している両性イオンを含有するアクリジニウム化合物を開示することである。本発明の別の目的は、フェノールに結合している両性イオンを有するアクリジニウム化合物からの光放出が、この構造的修飾を持たないアクリジニウム化合物と比較した場合、予想外に速いことを開示することである。本発明のさらに別の目的は、両性イオン含有アクリジニウム化合物が、両性イオンを持たないアクリジニウム化合物と同程度に安定であり、そして同様の量子収率を有するということを実証することである。

10

【0025】

本発明による化学発光アクリジニウム化合物は、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホンアミド等であり得る。一実施態様において、化学発光アクリジニウム化合物は、(i)アクリジニウム核の窒素原子に結合している炭化水素基であって、この炭化水素基は、最大20個までのヘテロ原子で場合により置換されている、炭化水素基、及び(ii)置換炭化水素部分に連結している、アクリジニウム核のC₉位におけるカルボキシル又はスルホンアミド基を含み、ここで、このアクリジニウム化合物は、アクリジニウム核のC₂位、アクリジニウム核のC₇位、カルボキシルもしくはスルホンアミド基に連結している炭化水素部分、又はアクリジニウム核の窒素原子に結合している炭化水素基に結合している、少なくとも1個の両性イオン官能基を含み；前記アクリジニウム化合物は、前記両性イオン官能基を含まない以外は同一のアクリジニウム化合物と比較して、固相に対する非特異的結合の減少を示す。

20

【0026】

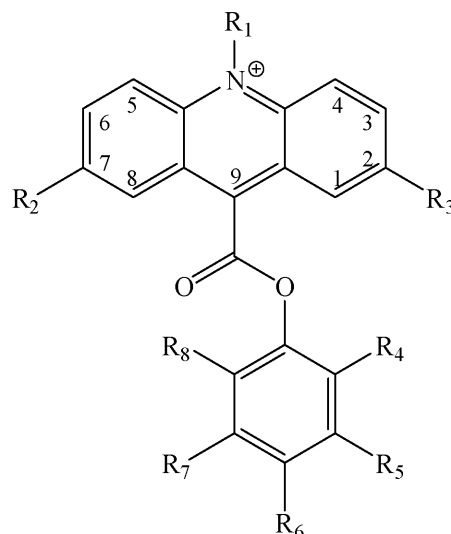
窒素原子に結合している炭化水素基は、最大20個までのヘテロ原子で場合により置換されており、したがって、それ自体、例えば、スルホプロピルもしくはスルホブチル基が環窒素に結合し、第四級環窒素上に正電荷及び-SO₃基上に負電荷がある場合、両性イオン基を構成することができる。そのような両性イオン基が存在したとしても、本発明による化合物は、さらに少なくとも1個の両性イオン基を含むであろうことは理解されるであろう。言い換えれば、本発明による化合物は、アクリジニウム核の窒素以外又はそれに加えて、ある原子上に正電荷を含むであろう。

30

【0027】

一実施態様において、化学発光アクリジニウム化合物は、式(I)で示される以下の構造：

【化7】



I

40

50

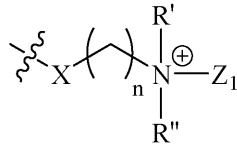
[式中、

R_1 は、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル又はアラルキル基であり、それらの各々は、最大 20 個までのヘテロ原子、又はスルホプロピルもしくはスルホブチル基を含有することができるか、あるいは R_1 は、基 - R^a - Z であり；ここで、 R^a は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択される二価の基であり；

R_2 及び R_3 は、(i) 水素、(ii) 電子供与基、又は (iii) 基 - Z から独立して選択され；

Z は、以下の形態：

【化 8】



10

で示される両性イオン基であり、

X は、各々出現ごとに独立して、結合、- CH_2 -、酸素、硫黄、- NR^N -、アミド (- NR^N (CO) -)、カルバマート (- NR^N C (O) O -) 又はウレア (- NR^N C (O) NR^N -) から選択され；

20

R' 及び R'' は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択され；

Z_1 は、基 - R^a - Z_2 (ここで、 Z_2 は、カルボキシラート (- COO^-)、スルホナート (- SO_3^-)、スルファート (- OSO_3^-)、ホスファート (- $OP(O)(OR)(O^-)$) もしくはオキシド (- O^-) から選択される) であるか；又は、 Z_2 が、オキシド (- O^-) である場合、 R^a は、存在しなくてもよく；

n は、各々出現ごとに独立して、1 ~ 12 の間の整数から選択され；そして

R_4 及び R_8 は、同じか、又は異なり、そして水素、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシル (- OR)、アルキルチオール (- SR) 又は置換アミノ基 (- NR_2) から選択され；

30

R_5 、 R_6 及び R_7 は、水素又は基 - (CO) - R_{15} から独立して選択されるが、但し、 R_5 、 R_6 及び R_7 のうちの 2 つは、水素であり、そして R_5 、 R_6 及び R_7 のうちの 1 つは、前記基 - (CO) - R_{15} であり；

R_{15} は、基 - Z 又は基 - X^a R^* であり、ここで、 X^a は、酸素、硫黄又は - NR^N - であり、そして R^* は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、水素、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択されるか、あるいは R^* は、基 - R^a - L であり、ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基であるが；但し、 R_{15} が、基 - Z であるとき、X は、各々出現ごとに独立して、結合、- CH_2 -、酸素、硫黄又は - NR^N - から選択され；

40

R は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され；そして

R^N は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、水素、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択されるが；

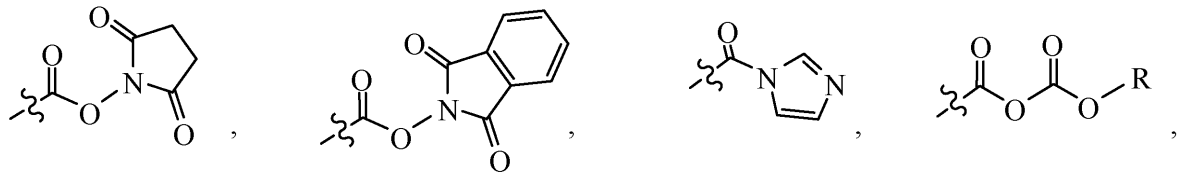
但し、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 及び R_7 のうちの少なくとも 1 つは、基 Z である] を有するアクリジニウムエステルである。

【0028】

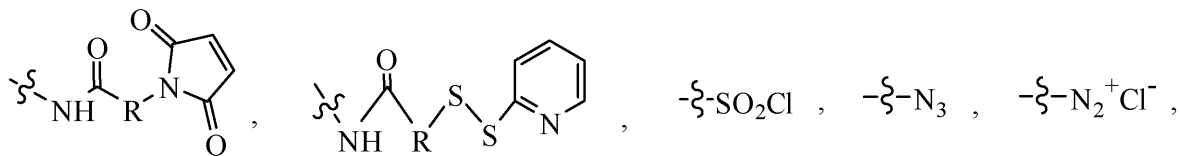
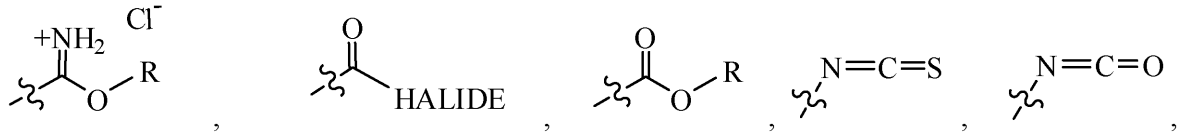
50

一実施態様において、 R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_6 のうちの少なくとも1つ又は厳密に1つが、基 - L 又は $-R^a-L$ を含み、ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための、脱離基、求電子基又は求核基を含む、誘導体化可能官能基である。いくつかの実施態様において、L は、以下：

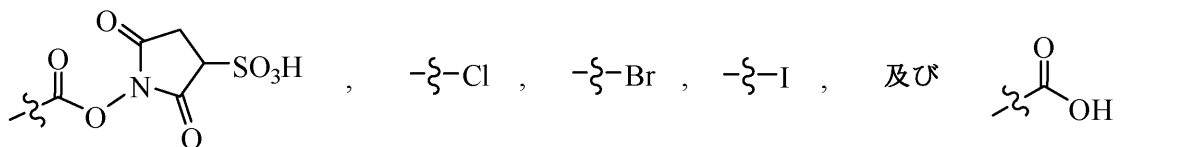
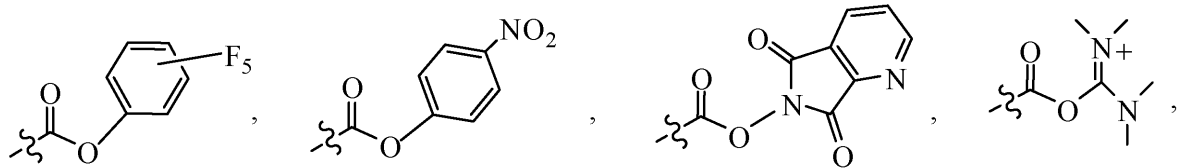
【化9】



10



20



30

からなる群より選択されるであろう。

【0029】

ある実施態様において、 R_{15} は、以下：

- (1) $-OH$;
- (2) $-O-N-$ スクシンイミジル ;
- (3) $-NH-(CH_2)_5-C(O)-O-N-$ スクシンイミジル ;
- (4) $-NH-(CH_2)_5-COOH$;
- (5) $-NH-(C_2H_4O)_i-C_2H_4NH-C(O)-(CH_2)_3-C(O)-O-N-$ スクシンイミジル (ここで、 $i = 1 \sim 5$ である) ;
- (6) $-NH-(C_2H_4O)_i-C_2H_4NH-C(O)-(CH_2)_3-COOH$ (ここで、 $i = 1 \sim 5$ である) ;
- (7) $-NH-(C_2H_4O)_i-C_2H_4NH_2$ (ここで、 $i = 1 \sim 5$ である) ; 及び
- (8) $-NH-R-NHR$; ならびに
- (9) $-Z$

からなる群より選択されるであろう。

【0030】

50

R_{15} が -OH である場合について、特に言及することができる。

【0031】

一実施態様において、 R' 又は R'' は、基 - R^a - L を含み、ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための、誘導体化可能脱離基、求電子基又は求核基である。いくつかの実施態様において、L は、上記で提供された基から選択されるであろう。一実施態様において、 R' 又は R'' は、一出現で、基 - R^a - C(O) - CH₂CH₂CH₂ - C(O) - N - スクシンイミジル、- R^a - N - マレイミド、- R^a - C(O) - CH₂ - Br 又は - R^a - C(O) - CH₂ - I である。

【0032】

いくつかの実施態様において、 R_2 及び R_3 は両方とも、水素である。他の実施態様において、 R_2 及び / 又は R_3 は、例えば、電子供与基から選択されることができる。典型的な電子供与基は、OR、OH、SR、SH、NH₂、NR^NR^N を非限定的に含み；ここで、R 及び R^N は、各々出現ごとに独立して選択され、そして各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、水素 アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール及びアラルキルからなる群より選択される。好ましい電子供与基は、アルコキシル (-OR) である。

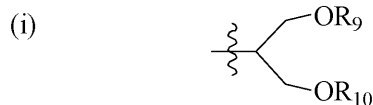
10

【0033】

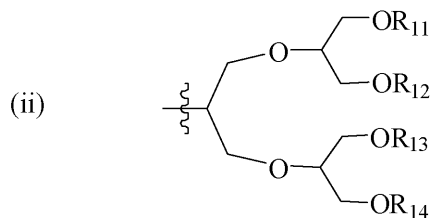
いくつかの実施態様において、 R_2 及び / 又は R_3 は、(i) アルコキシル (-OR)、(ii) 基 - O - (CH₂CH₂ - O)_l - CH₃ (ここで、l は、1 ~ 12 の整数である) 及び (iii) 基 - O - G ならびに (vi) 基 - Z からなる群より選択され得；ここで、G は、各々出現ごとに独立して、

20

【化10】



又は;



30

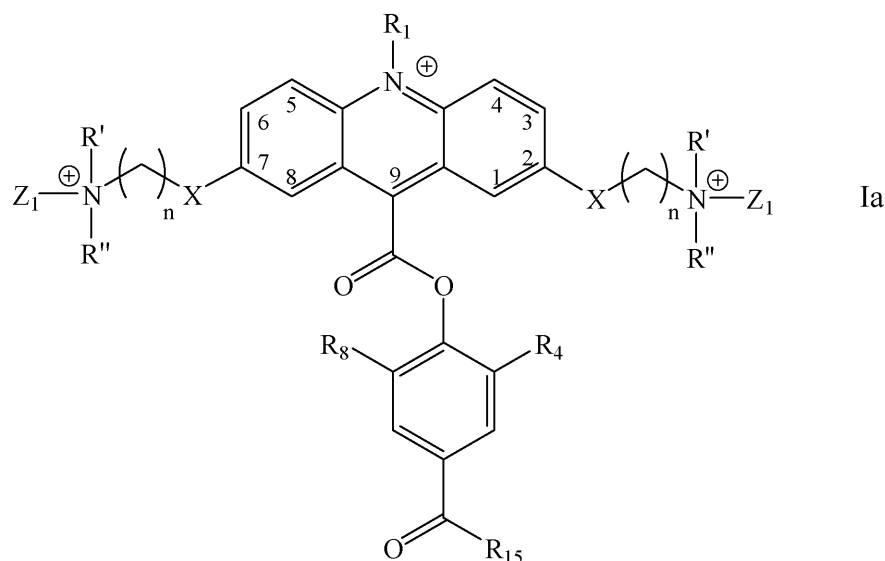
[式中、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 及び R_{14} は、各々出現ごとに独立して、メチル基又は基 - (CH₂CH₂O)_mCH₃ であり、ここで、m は、1 ~ 5 の整数である] から選択される分岐基である。

【0034】

一実施態様において、本発明による化学発光アクリジニウムエステル化合物は、式 (1a) で示される構造：

40

【化 1 1】



10

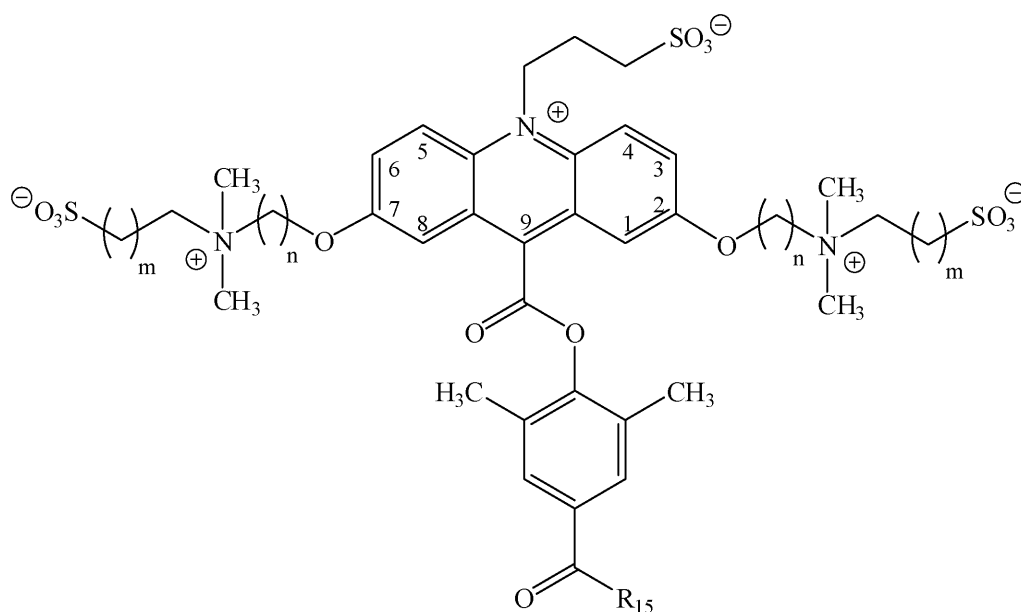
20

[式中、 R_1 、 R_4 、 R_8 、 R_{15} 、 R' 、 R'' 、 X 、 Z_1 及び n は、式 (I) で定義したとおりであり、そして R' 、 R'' 、 X 、 Z_1 及び n は、各々出現ごとに独立して選択される] を有するであろう。

【0035】

特定の実施態様において、 R_1 は、適切に、アルキル基、スルホプロピル基もしくはスルホブチル基であってもよく、 R_4 及び R_8 は、低級アルキル、特にメチルであってもよく、 X は、酸素であってもよく、及び / 又は Z_1 は、 $-SO_3^-$ であってもよい。一実施態様において、式 (Ia) のアクリジニウムエステルは、以下の構造：

【化 1 2】

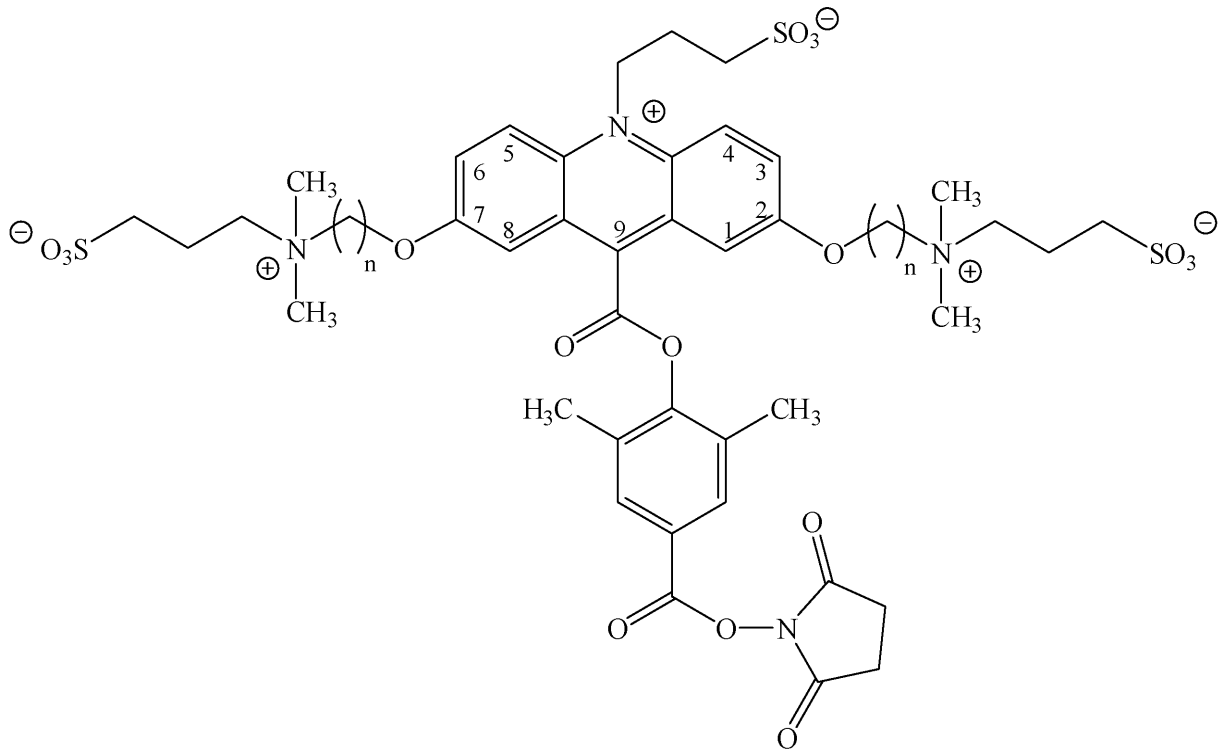


30

40

[式中、 m は、0 ~ 3 の整数であり、そして R_{15} 及び n は、式 (I) について先に定義したとおりであり、 m 及び n は、各々出現ごとに独立して選択される] を有するであろう。一実施態様において、本化合物は、以下の構造：

【化 1 3】



10

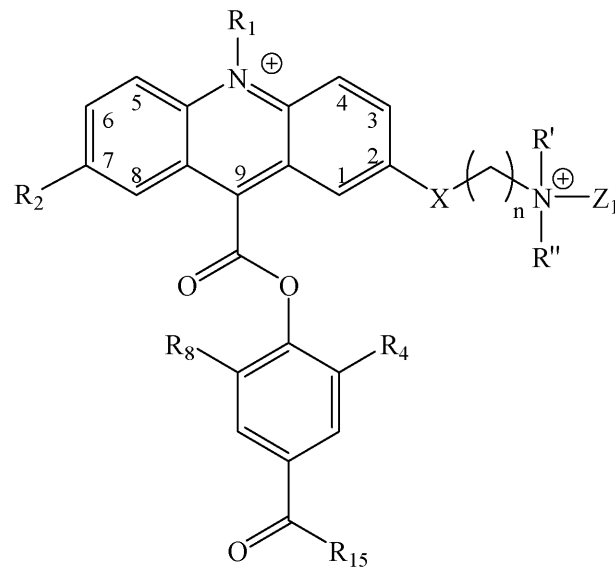
20

[式中、 n は、各々出現ごとに独立して選択される、 $1 \sim 12$ の整数である] を有するであろう。

【 0 0 3 6】

式 (I) の別の代表的アクリジニウムエステル化合物は、式 (Ib) :

【化 1 4】



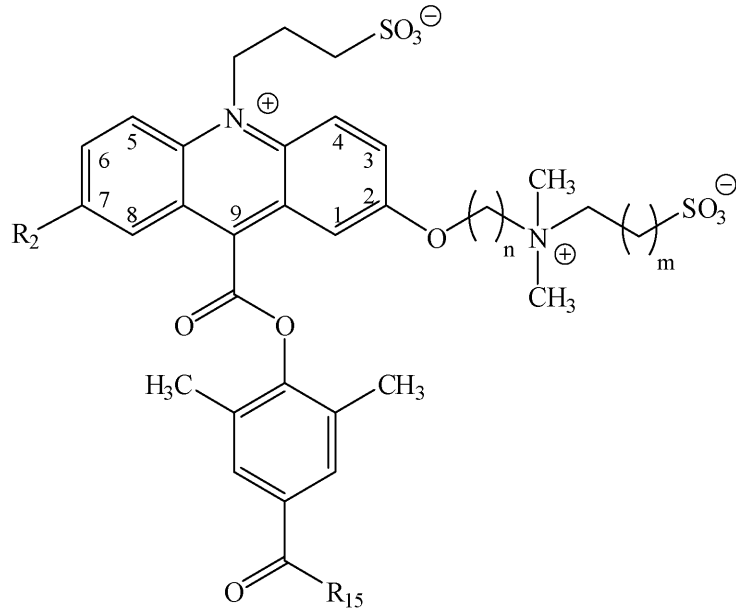
30

Ib

40

[式中、 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_8 、 R_{15} 、 R' 、 R'' 、 X 、 Z_1 及び n は、先に定義したとおりである] で示される構造を有する。一実施態様において、式 (Ib) で示される化学発光アクリジニウムエステル化合物は、以下の構造 :

【化 1 5】

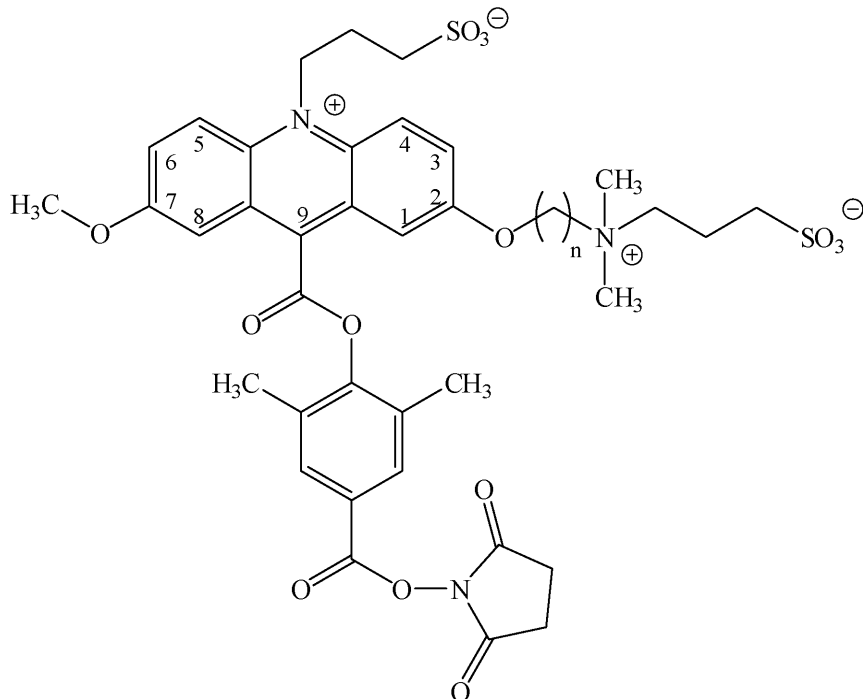


10

[式中、 m は、 $0 \sim 3$ の整数であり、そして R_2 、 R_{15} 及び n は、先に定義したとおりである] を有する。一実施態様において、本発明によるアクリジニウムエステル化合物は、以下の構造：

20

【化 1 6】

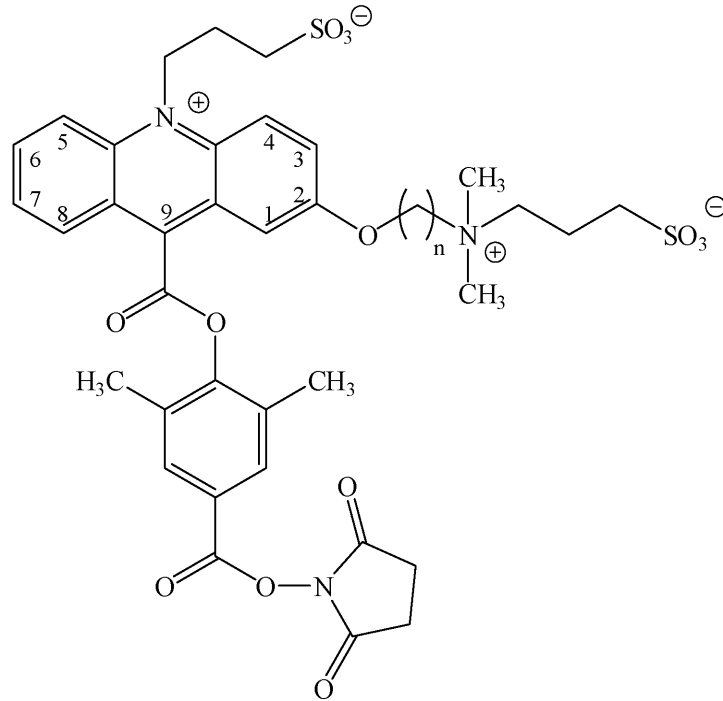


30

40

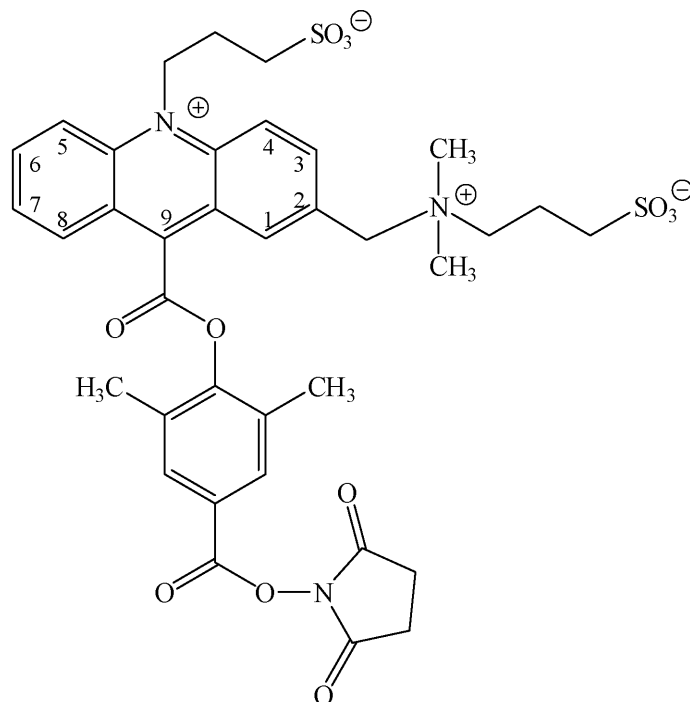
[式中、 n は、 $1 \sim 12$ の整数である] を有する。以下の構造：

【化 17】



[式中、n は、1 ~ 12 の整数である] を有する。式 (IB) のさらに別の化合物は、以下の構造 :

【化 18】

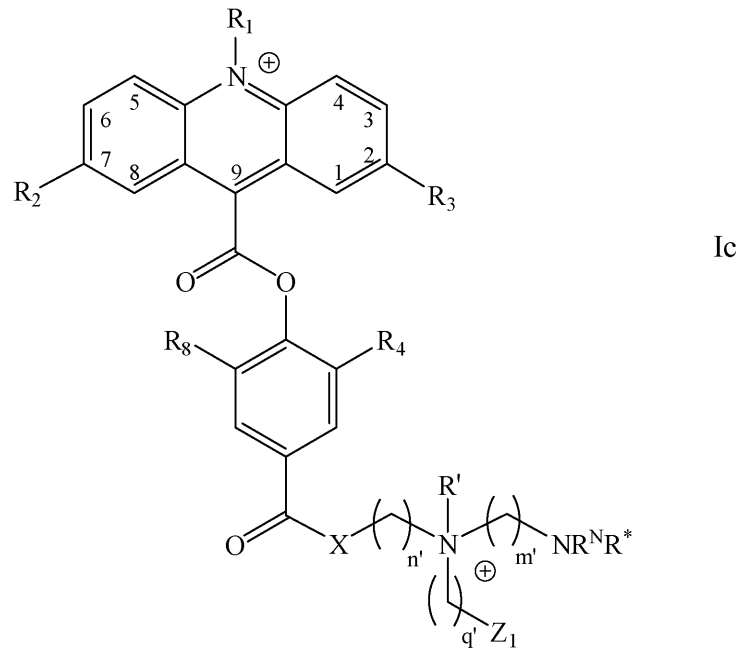


を有しており、そしてXが、結合(すなわち、Xが全く存在しない)又はメチレン単位 -CH₂- である場合を表している。

【0037】

式 (I) の化学発光アクリジニウムエステル化合物の別の例は、式 (Ic) :

【化 19】

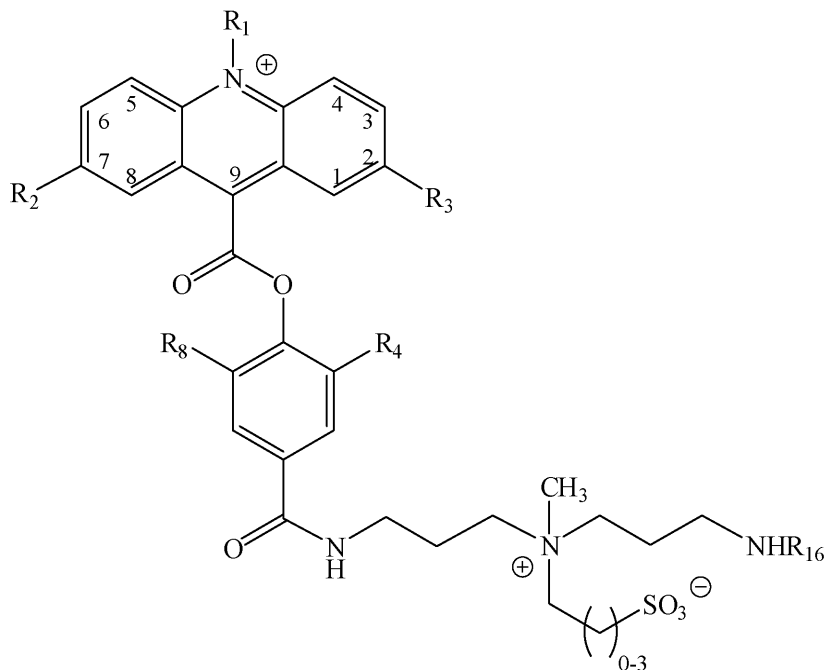


10

[式中、 n' 、 m' 及び q' は、独立して 1 ~ 4 の整数であり、そして R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_8 、 R^N 、 R^* 、 R' 、 X 及び Z_1 は、先に定義したとおりである] で示される構造を有する。一実施態様において、 R^* は、基 - R^a - L を含み、ここで、 L は、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基である。この実施態様による代表的化合物は、以下の構造：

20

【化 20】



30

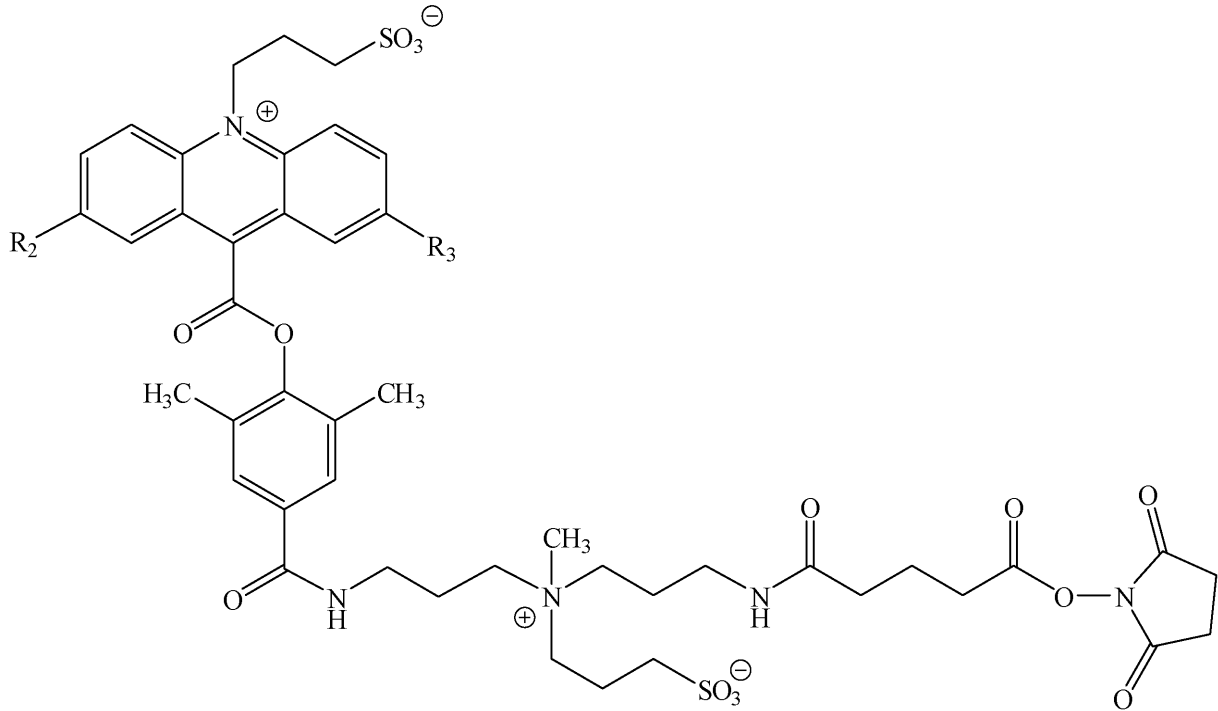
40

[式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_8 は、先に定義したとおりである] を有する。いくつかの実施態様において、 R_4 及び R_8 は、独立して、低級アルキル基、特にメチルであり； R_1 は、アルキル（例えば、メチル）、スルホプロピル（ $-CH_2CH_2CH_2-SO_3^-$ ）又はスルホブチル（ $-CH_2CH_2CH_2CH_2-SO_3^-$ ）であり； R_2 及び R_3 は、水素又は基 - $O-G$ （ここで、 G は、先のように定義されている）から独立して選択され；そして、 R_{16} は、(i) 水素、(ii) $-C(O)-CH_2CH_2CH_2-$

50

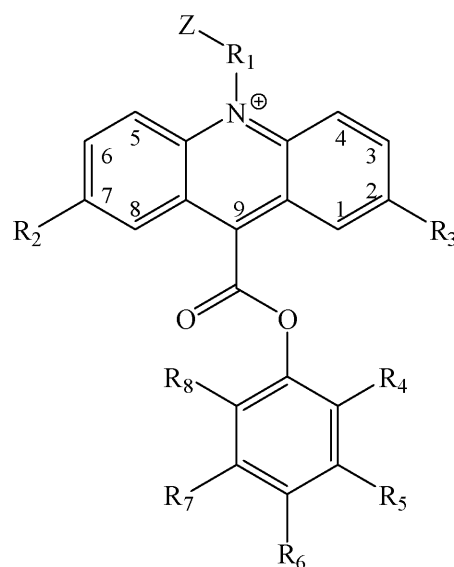
C(O)-N-スクシンイミジル、(iii)-R-N-マレイミド(ここで、Rは、独立して、アルキル、アルケニル、アルキニルもしくはアラルキルであり、これらの各々は、最大20個までのヘテロ原子を場合により含むことができる)又は(iv)-C(O)-CH₂-X(ここで、Xは、臭素(Br)もしくはヨウ素(I)である)から選択される。
【0038】

一実施態様において、式(Ic)の化学発光アクリジニウム化合物は、以下の構造：
【化21】



[式中、R₂及びR₃は、先のように定義したとおりである]を有する。一実施態様において、R₂及びR₃は、水素又は基-O-G(ここで、Gは、本明細書で定義したとおりである)から独立して選択される。

【化22】



Id

式中、R₁~R₈及びZは、式(I)に対して定義したとおりであるが；但し、R₁が、アルキルスルホナート基であるときは、Xは、各々出現ごとに独立して、結合、-CH₂

10

20

30

40

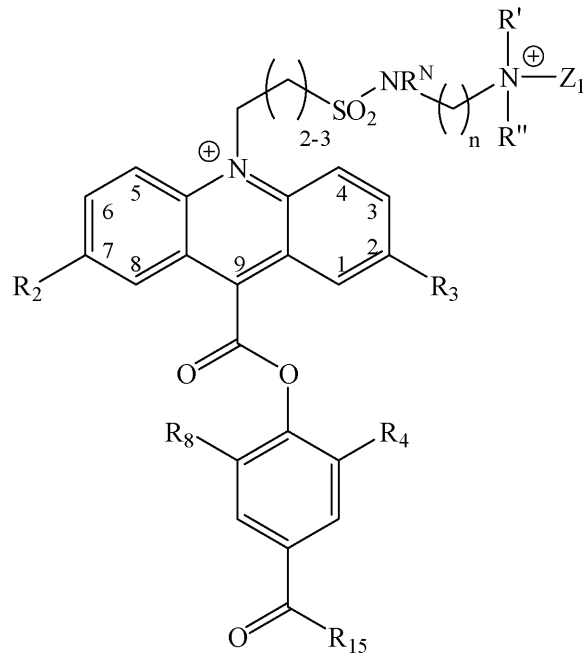
50

-、酸素又は -NR^N - から選択される。

【0039】

式(1d)のいくつかの化学発光アクリジニウム化合物は、式(1e)：

【化23】



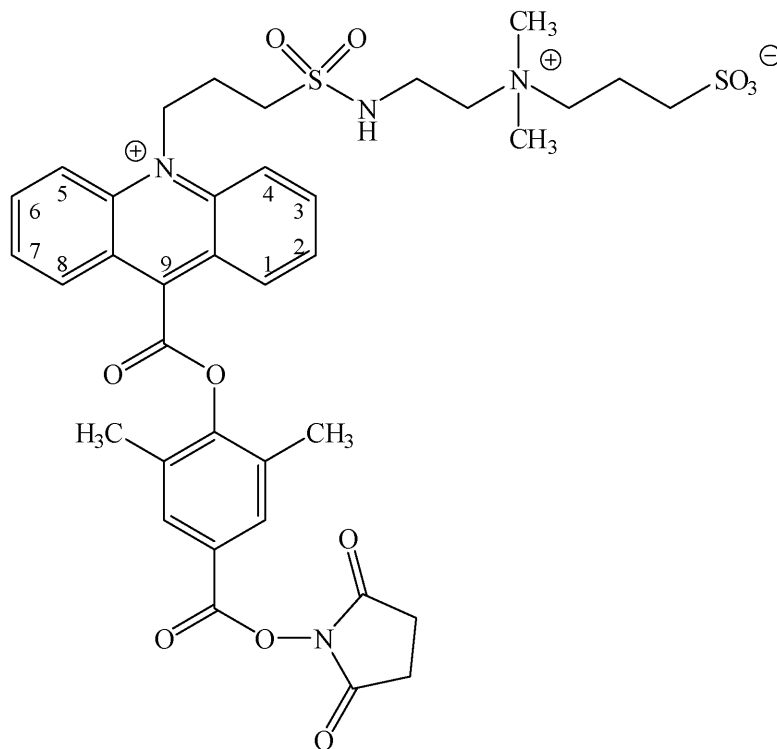
1e

10

20

[式中、R₂、R₃、R₄、R₈、R₁₅、R'、R''、R^N、Z₁及びnは、式(I)で定義したとおりである]で示される構造を有するであろう。式(1e)の例示的化合物は、以下の構造：

【化24】



30

40

を有し、この化合物は、アクリジニウム核の正に荷電した窒素と釣り合わせるために対イオンA⁻を場合により含む。対イオンの選択に本質的には限定はないが、いくつかの実施

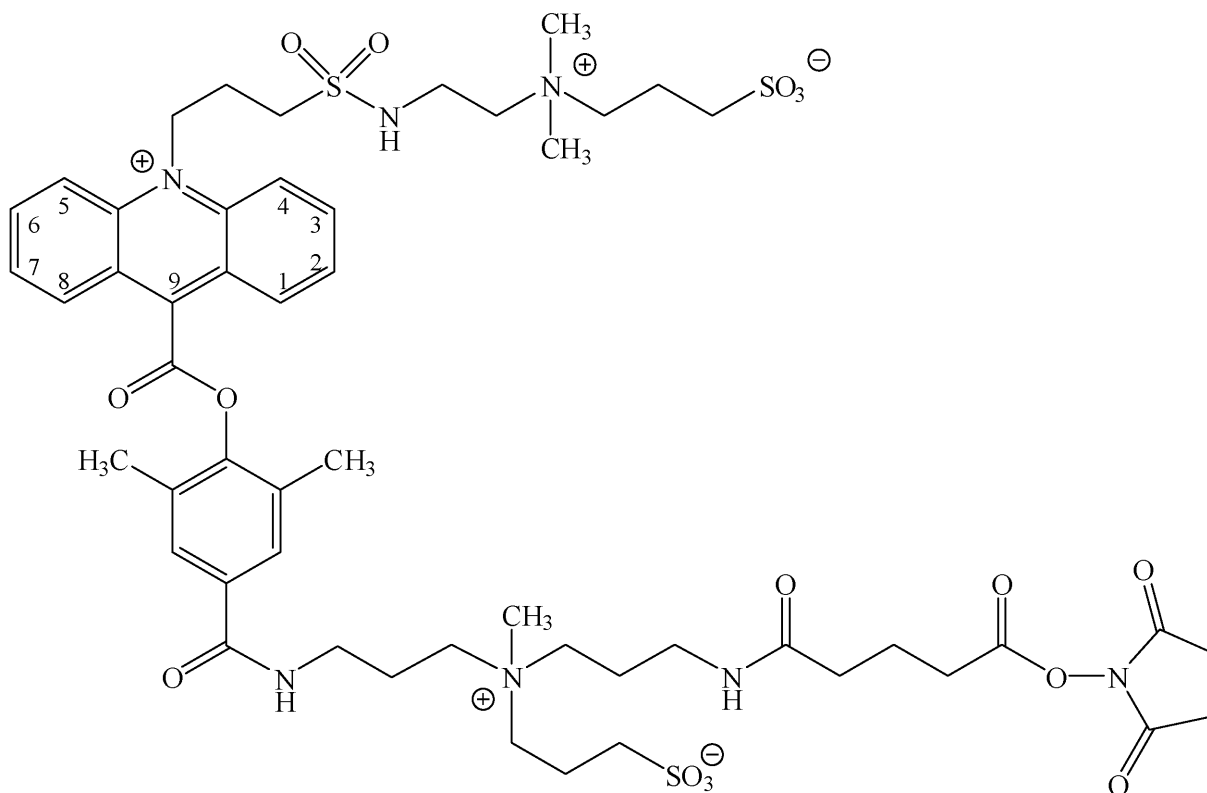
50

態様において、A⁻は、CH₃SO₄⁻、FSO₃⁻、CF₃SO₄⁻、C₄F₉SO₄⁻、CH₃C₆H₄SO₃⁻、ハロゲン化物、CF₃COO⁻、CH₃COO⁻、及びNO₃⁻からなる群より選択される。

【0040】

式(1e)の例示的化学発光アクリジニウム化合物(図3にも示されている)は、以下の構造:

【化25】



10

20

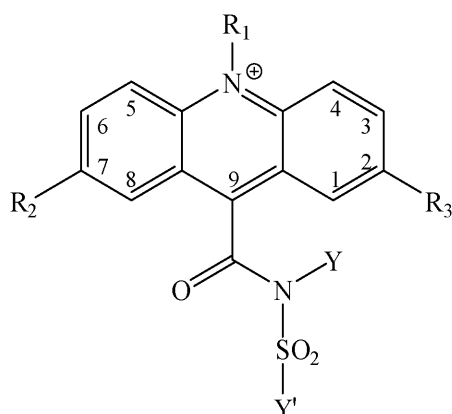
30

にしたがって、2個の両性イオン基を有し、本化合物は、アクリジニウム核の正に荷電した窒素と釣り合わせるために対イオンA⁻を場合により含む。

【0041】

先に記載したアクリジニウムエステルに加えて、本発明はまた、例えば、アクリジニウムスルホンアミドを含む、化学発光を起こすことができる他のアクリジニウム化合物を包含する。いくつかの実施態様において、本発明によるアクリジニウムスルホンアミドは、式(II):

【化26】



II

40

50

[式中、

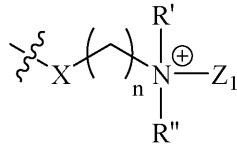
R_1 は、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル又はアラルキル基であり、それらの各々は、最大 20 個までのヘテロ原子、又はスルホプロピルもしくはスルホブチル基を含有することができるか、あるいは R_1 は、基 - R^a - Z であり；

R_2 及び R_3 は、(i) 水素、(ii) 電子供与基、又は (iii) 基 - Z から独立して選択され；

Y 及び Y' は、R、- R^a - Z 又は - R^a - L から独立して選択され；ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基、求電子基又は求核基を含む、誘導体化可能官能基であり；

Z は、以下の形態：

【化 27】



で示される両性イオン基であり、

X は、各々出現ごとに独立して、結合、- CH_2 -、酸素、硫黄、- NR^N -、アミド (- $NH(CO)$ -)、カルバマート (- $NHC(O)O$ -) 又はウレア (- $NHC(O)NH$ -) から選択され；

R' 及び R'' は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択され；

Z_1 は、基 - R^a - Z_2 (ここで、 Z_2 は、カルボキシラート (- COO^-)、スルホナート (- SO_3^-)、スルファート (- OSO_3^-)、ホスファート (- $OP(O)(OR)(O^-)$) もしくはオキシド (- O^-) から選択される) であるか；又は、 Z_2 が、オキシド (- O^-) である場合、 R^a は、存在しなくてもよく；

n は、各々出現ごとに独立して、1 ~ 12 の間の整数から選択され；そして

R は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され；

R^N は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、水素、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され；そして

R^a は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択される、二価の基であるが；

但し、 R_1 、 R_2 、 R_3 、Y 及び Y' のうちの少なくとも 1 つは、前記両性イオン基 Z を含む] で示される構造を有するであろう。

【0042】

式 (II) のアクリジニウムスルホンアミドのいくつかの実施態様において、L は、本化合物が、分析物、分析物類似体、分析物の結合パートナーなどと抱合体を形成することができるようにする、官能基であり、そして：

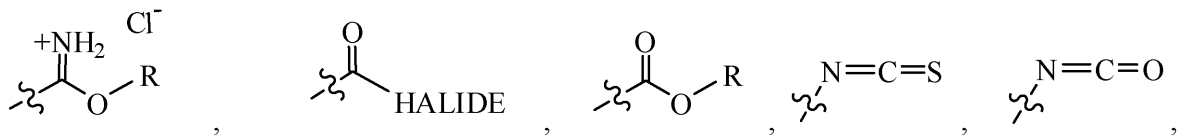
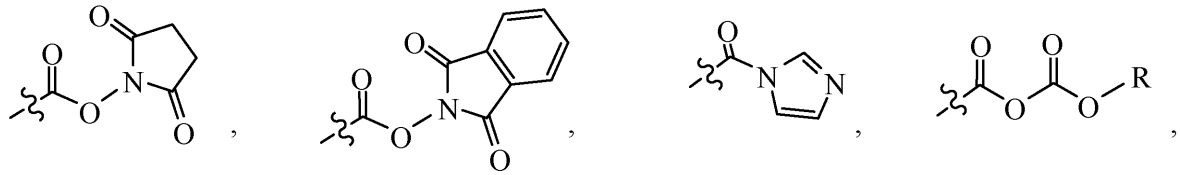
10

20

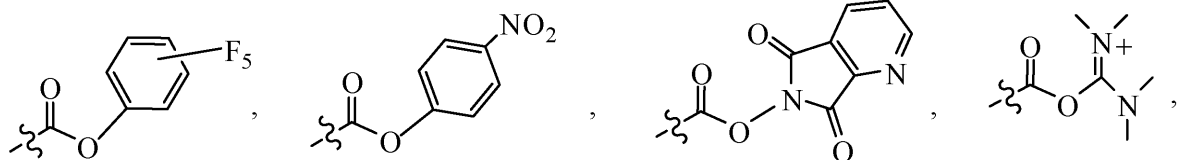
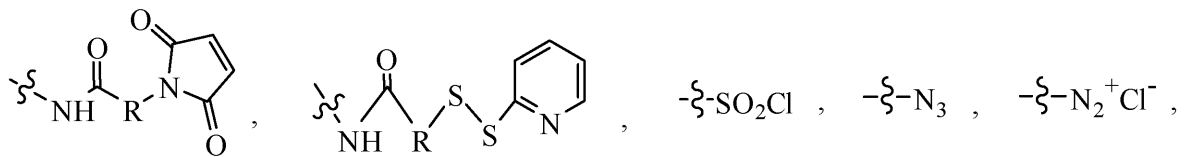
30

40

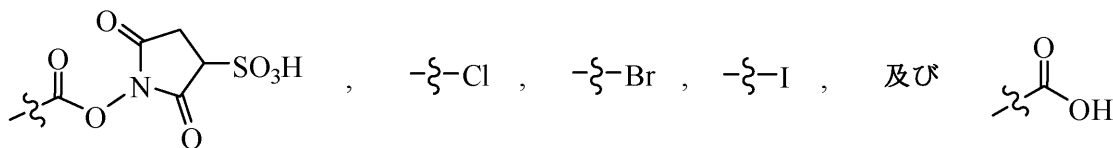
【化28】



10



20



30

からなる群より選択されうる。

【0043】

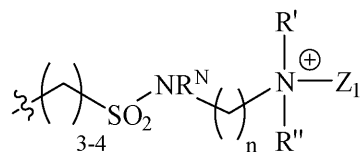
いくつかの実施態様において、 R' 又は R'' は、基 - R^a - L を含む。他の実施態様において、 R' 又は R'' は、一出現で、基 - R^a - C(O) - CH₂CH₂CH₂ - C(O) - N - スクシンイミジル、- R^a - N - マレイミド、- R^a - C(O) - CH₂ - Br 又は - R^a - C(O) - CH₂ - I である。

【0044】

式(11)の化学発光アクリジニウムスルホンアミド化合物の追加的实施態様において、 R_1 は、メチル、スルホプロピル(-CH₂CH₂CH₂-SO₃⁻)、スルホブチル(-CH₂CH₂CH₂CH₂-SO₃⁻)又は以下の構造：

40

【化29】



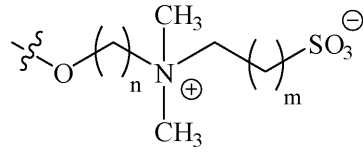
[式中、 R^N 、 R' 、 R'' 、 Z_1 及び n は、式(11)について定義したとおりである]を有する基から選択されるであろう。

【0045】

50

R₂ 及び R₃ の一方又は両方は、例えば、基 Z であってもよく、そしてより具体的には、R₂ 及び R₃ の一方又は両方は、基：

【化 3 0】

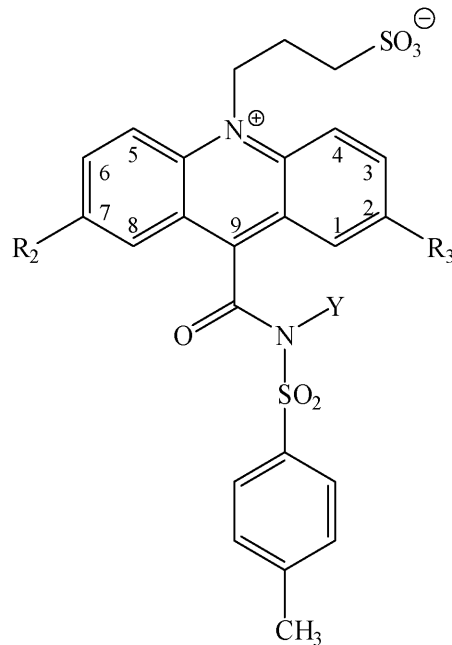


[式中、n は、1 ~ 12 の整数であり、そして m は、0 ~ 3 の整数である] であってもよい。 10

【0046】

式 (II) の好ましい化学発光アクリジニウムスルホンアミド化合物において、Y' は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子で場合により置換されている、アリール基、又はアルキル - アリール基、又はアリール、アルキル基を含むであろう。そのようなアクリジニウムスルホンアミド化合物の 1 つは、式 (IIb) :

【化 3 1】



IIb

20

30

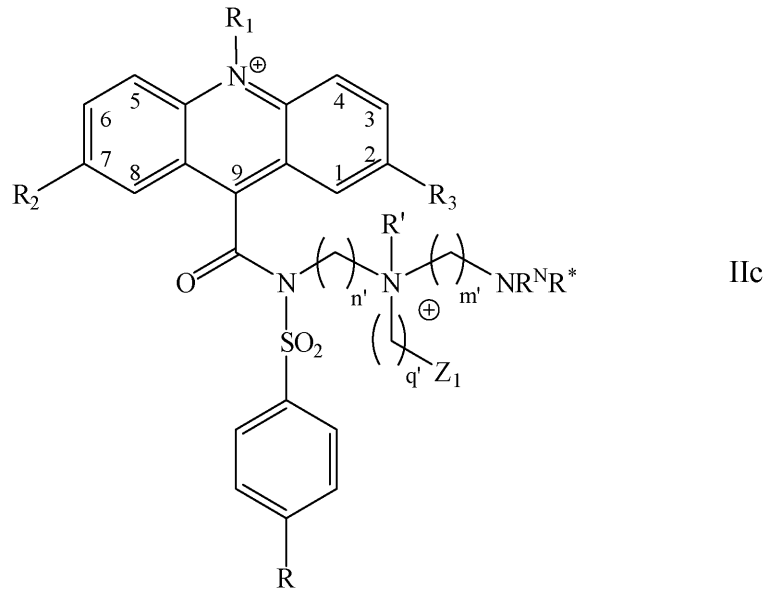
[式中、Y は、基 - R^a - Z (ここで、R^a、R₂、R₃ 及び Z は、先で定義したとおりである) を含む] で示される構造を有する。

【0047】

式 (II) の他の化学発光アクリジニウムスルホンアミド化合物は、式 (IIc) :

40

【化 3 2】



10

[式中、 R^* は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、水素、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択されるか、あるいは R^* は、基 - R^a - L (ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基である) であり; n' 、 m' 及び q' は、独立して、1 ~ 4 の整数であり、そして R 、 R^N 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R' 及び Z_1 は、先に定義したとおりである] で示される構造を有する。

20

【0048】

式 (I) に関連して定義された置換基 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R^N 、 R^* 、 R' 、 R'' 、 Z 、 X 、 n 、 m などの選択は、したがってその選好も含めて、式 (II) の相当するパラメータの選択に等しく適用されるということは理解されるであろう。

【0049】

本発明の両性イオン含有アクリジニウム化合物は、抗体などのタンパク質に抱合される
とき、低い非特異的結合を示す。非特異的結合とは、前述したように、粒子又はマイクロ
タイタープレートなどの固相を使用するアッセイにおいて、これらの固相に対する抱合体
の望ましくない結合相互作用である。これらの望ましくない結合相互作用は、典型的には
、アッセイのバックグラウンドを増大させ、それがアッセイにおいてシグナル対バックグ
ラウンド比の正味の低下をもたらし、それによってアッセイ感度が下がる。本発明の種々
の両性イオン含有アクリジニウム化合物の非特異的結合を評価するために、我々は、分析
物 TSH (甲状腺刺激ホルモン) に対して産生させたマウスモノクローナル抗体 (抗 TSH
Mab) を使用して、これらの化合物の抗体抱合体を調製した。次に、これらの抱合
体の非特異的結合を、NSP-DMAE-HEG 及び HQYAE を使用して調製した類似
抱合体の非特異的結合と比較した。後者の 2 つの親水性アクリジニウムエステルは、先に
述べ、かつ米国特許第 6,664,043 (B2) 号及び米国特許第 7,309,615
(B2) 号にそれぞれ記載されているように、それぞれフェノール及びアクリジニウム環
に結合しているヘキサ (エチレン) グリコールを含有する。後者の化合物、HQYAE は
また、米国特許第 7,309,615 (B2) 号に記載されているようにアクリジニウム
環内の 2 個のアルコキシ電子供与基のため、増加した光出力 (より高い量子収率) を有す
る。非特異的結合を、2 つの異なる種類の粒子; 民間販売業者 (DynaI (商標)) からの
常磁性粒子 (PMP) 及び磁性ラテックス粒子 (MLP) 上で測定した。2 つの粒子は、
それらの固有組成が異なる。PMP は、主に、アミンを含有するシランコーティングを有
する酸化鉄粒子からできている。アミンは、グルタルアルデヒドなどの試薬を使用してタ
ンパク質を粒子表面に架橋結合するために使用される。一方、MLP は、磁気分離ができ

30

40

50

るようにドーブした磁鉄鉱を有する多孔質ポリスチレンからできている。本評価で使用されるPMPは、グルタルアルデヒドカップリング化学を使用して、粒子表面上において抗TSH抗体でコーティングされた(固相「PMP」)。本評価のために使用されたMLP(Dynal M280 - ストレプトアビジン結合ビオチン化ポリクローナルヤギ抗PTH抗体(固相「M280」)及びDynal M270 - ストレプトアビジン結合ビオチン化モノクローナルマウス抗cTnI抗体(固相「M270」))は、ストレプトアビジンを表面上に固定し、次にそれらを使用して、分析物PTH(副甲状腺ホルモン)又はcTnI(心筋トロポニンI)を結合することができるビオチン標識抗体をさらに固定した。ストレプトアビジン-ビオチン結合相互作用は、周知であり、かつアッセイにおいて一般的に使用される。2つの種類の粒子(PMP及びMLP)を、特定期間の間、抱合体の溶液と混合して、そして次に粒子を磁氣的に分離し、一回洗浄し、そして次に、粒子と関連する化学発光を測定した(実験の詳細は、実施例18に見出すことができる。)。総化学発光入力と比較したこの化学発光値の比は、非特異的結合部分(fNSB)と呼ばれる。したがって、低い非特異的結合を有する抱合体は、低いfNSB値を有するであろうし、また、(以下でさらに説明される)本発明の両性イオン含有アクリジニウム化合物の例示的实施態様のこれらの値は、対照化合物と共に、以下の表1にまとめられている。

【0050】

【表1】

表1.

アクリジニウム化合物	抱合体中の 標識数	固相			
		PMP	M280	M270	
対照	<i>NSP-DMAE-HEG</i>	5	4.0×10^{-5}	5.2×10^{-4}	4.6×10^{-4}
	<i>HQYAE</i>	6	1.6×10^{-5}	1.5×10^{-4}	1.3×10^{-4}
1d	<i>ZC3-AE</i>	7	2.0×10^{-5}	1.6×10^{-5}	1.5×10^{-5}
5d	<i>ZC3M-AE</i>	7	3.4×10^{-5}	2.2×10^{-5}	1.7×10^{-5}
2d	<i>ZC6-AE</i>	5	2.8×10^{-5}	1.9×10^{-5}	1.6×10^{-5}
6d	<i>ZC6M-AE</i>	6	3.7×10^{-5}	3.4×10^{-5}	3.3×10^{-5}
3d	<i>ZC8-AE</i>		2.4×10^{-5}	3.2×10^{-5}	2.7×10^{-5}
7d	<i>ZC8M-AE</i>	7	3.9×10^{-5}	5.7×10^{-5}	3.9×10^{-5}
4e	<i>ZC12-AE</i>	5	3.3×10^{-5}	1.7×10^{-4}	1.8×10^{-4}
11f	<i>NSP-DMAE-Z</i>	5	1.3×10^{-5}	1.6×10^{-5}	1.3×10^{-5}
10f	<i>NSP-2Z-DMAE</i>	6	1.3×10^{-5}	1.2×10^{-5}	1.1×10^{-5}
8d	<i>AZC3-AE</i>	6	6.2×10^{-6}	2.0×10^{-5}	1.6×10^{-5}
9d	<i>AZC6-AE</i>	5	1.0×10^{-5}	1.4×10^{-5}	1.5×10^{-5}

PMP = PMP 抗 TSH 抗体

M280 = Dynal M280-ストレプトアビジン結合ビオチン化ポリクローナルヤギ抗 PTH 抗体

M270 = Dynal M270-ストレプトアビジン結合ビオチン化モノクローナルマウス抗 cTnI 抗体

【0051】

PMP上のNSP-DMAE-HEG及びHQYAEの抱合体は、それぞれ 4×10^{-5} 及び 1.6×10^{-5} のfNSB値を有する。本発明の両性イオン含有アクリジニウムエステルを使用して作製された他の全ての抱合体は、これらの値と同様の又はこれらの値よりも低いfNSB値を有する。例えば、NSP-DMAE-Z及びZC6M-AE由来の抱合体は、それぞれ 1.3×10^{-5} 及び 3.7×10^{-5} のfNSB値を有する。前者のアクリジニウムエステルは、フェノールに結合している両性イオンを含有するのに対して、後者の化合物は、アクリジニウム環内に両性イオンを含有する。したがって、両方

の種類両性イオン修飾は、PMP粒子に対して、fNSBを減少するのに有効である。粒子表面上に抗PTH抗体を有するDynaI MLPに関して、NSP-DMAE-HEG及びHQYAEの抱合体は、それぞれ 5.2×10^{-4} 及び 1.5×10^{-4} のfNSB値を有する。両性イオン含有アクリジニウムエステル由来の他の全ての抱合体は、fNSB (1.7×10^{-4})がHQYAE抱合体のものと同様のZC12-AEを除いて、大幅に低いfNSB値を有する。同様の結果が、抗cTNI抗体が表面上に固定された状態のDynaI MLPに関して観察される。したがって、両性イオン含有アクリジニウムエステル抱合体は、これまで試験したMLPに関して著しく低いfNSB値を有し、そして先に論じたようにバックグラウンドシグナルを減少させることによってアッセイ感度を改善する可能性を提供する。

10

【0052】

フェノールに結合した両性イオンを有する、NSP-DMAE-Z及びNSP-2,7-DMG-DMAE-Z (DMG = ジメトキシグリセリルオキシ)のアクリジニウムエステル抱合体は、また、予想外に、図3及び図4中のグラフに図示されているように、それぞれNSP-DMAE-HEG及びHQYAE由来の類似抱合体と比較すると、より速い光放出を示す。アクリジニウムエステル、NSP-DMAE-Z-NHSは、NSP-DMAE-HEG-グルタレート-NHSに類似しているが、それは両方のアクリジニウムエステルは、同じアクリジニウム環を含有するが、フェノールに結合している異なる官能基を含有するという点においてである。前者の化合物は、フェノールに結合している両性イオンを含有するのに対して、後者の化合物は、ヘキサ(エチレン)グリコール誘導体を含有する。両性イオン含有化合物、NSP-2,7-DMG-DMAE-Z-NHSは、フェノールに結合している両性イオンを含有することに加えて、アクリジニウム環内に電子供与ジメトキシグリセリルオキシ(DMG)官能基も有する。本化合物からの光出力は、2つの電子供与基のために、HQYAEのそれと同様であり、そして、NSP-DMAE-HEGの光出力よりも高い。

20

【0053】

光測定は、照度計上で行い、そして各抱合体から放出された光(相対光単位;RLUとして表される)を種々の時間間隔で測定した。次に、各抱合体から放出された光の合計を使用して、各時間間隔で放出された光(%RLU)を計算した。図4から明らかのように、NSP-DMAE-HEGの抗TSH Mab (Mab = モノクローナル抗体)抱合体は、完全な光放出に>4秒を必要とするのに対して、NSP-DMAE-Zの抱合体については、光放出は2秒以内で完了する。2つのアクリジニウムエステルのBSA抱合体(BSA = ウシ血清アルブミン)の同様の比較が、両性イオン含有アクリジニウムエステルについて著しく速い光放出を示す。

30

【0054】

2つの異なる抗体、抗TSH Mab及び抗HBsAg-Mab (HBsAg = B型肝炎、表面抗原)に対する高光出力アクリジニウムエステル、HQYAE及びNSP-2,7-DMG-DMAEの抗体抱合体からの光放出を、図5で比較する。この場合においても、両性イオン含有化合物は、総光放出の完了が<2秒である、著しく速い光放出を示すのに対し、HQYAE由来の抱合体は、完全な光放出に約4秒かかる。加えて、2つのアクリジニウムエステルの相対化学発光(Rel.CL)は、2つの異なる抗体で同じであることが観察された。したがって、フェノールでの両性イオン導入は、光放出を加速させるが、アクリジニウムエステルの光出力全体を損なわない。

40

【0055】

アクリジニウム化合物は、特に、アクリジニウムエステル、NSP-DMAE-HEG及びHQYAEを使用する自動免疫化学機器、例えば、Centaur(商標)及びACS:180(商標)(Siemens Healthcare Diagnostics)において、非常に有用な化学発光標識である。これら両方の機器は高いスループットを有し、このことは、これらがそれぞれ毎時、多数のイムノアッセイ試験、それぞれ240及び180試験を実施することを実行できるということを意味する。NSP-DMAEから誘導される試薬は、典型的には、それらの化

50

学発光が、0.5%過酸化水素を含有する100mM硝酸、続いて0.25N水酸化ナトリウム+界面活性剤の第2溶液を加えることによって誘発されるとき、5秒間にわたって光を放出する。両性イオンがフェノール上に位置する、本発明の両性イオン含有アクリジニウム化合物は、それらの速い光放出(放出された光の合計の90%について2秒)のおかげで、ADVIA:Centaur(商標)などの自動免疫化学機器で使用されて、アクリジニウムエステル、NSP-DMAE-HEG及びHQYAEを利用する以外は同一の試験と比較して、それらのスループットを増加させることができる。

【0056】

最後に図6において、両性イオン含有アクリジニウムエステル、ZC6M-AE、ZC8M-AE(これらの構造は図1に示されている)及びNSP-DMAE-Z-NHSの抗TSH Mab抱合体からの光放出の速度論を、NSP-DMAE-HEGのそれと比較した。フェノールでの両性イオン修飾を有するNSP-DMAE-Z抱合体は、先に述べたようにNSP-DMAE-HEGよりも速い光放出を示す一方で、両性イオンがアクリジニウム環内に位置する、ZC6M-AE及びZC8M-AEの2つのアクリジニウムエステル抱合体は、NSP-DMAE-HEGと同様の放出速度論を示す。したがって、アクリジニウム環内の両性イオン導入も、これら2つの事例で観察されるように放出速度論に弊害をもたらすものではない。3つの両性イオン含有化合物、ZC6M-AE、ZC8M-AE及びNSP-DMAE-Zの抗TSH Mab及び抗HbsAg Mab抱合体からの総光出力も、NSP-DMAE-HEGと同様で同等のものであることが観察された。

10

20

【0057】

最初にDMAEについてLawらにより説明されたアクリジニウムエステルの高められた安定性は、商業的な自動免疫分析器でのそれらの有用性を促進する、これらの化合物の別の重要な特徴である。「安定性」とは、本化合物又は抱合体を、典型的には、生理的pH内である6~9のpH範囲の水溶液中で保存した場合の、RLUの損失により測定する、最小損失化学発光活性を意味する。構造的見地から、フェノールエステルの加水分解は、化学発光アクリジニウムエステルが非化学発光になる主な経路である。安定な抱合体は、アクリジニウムエステル試薬の長期の貯蔵寿命を確実にし、そしてまた、アッセイ性能が、所与の期間にわたって大きく変化しないということを確認にする。本発明の抗TSH抗体の種々のアクリジニウムエステル抱合体(以下でさらに説明する)の安定性は、表2に列挙されている。抱合体の水溶液は、pH7.7の水性緩衝液中で、Centaur(商標)などの市販の自動機器に典型的な4か又は37のいずれかで保存した。アクリジニウムエステルの加水分解が加速されると予想される37でのより厳しい貯蔵条件は、種々のアクリジニウムエステルの相対的安定性の公正な比較を可能にした。光はRLUとして、全ての抱合体について照度計を使用して定期的に記録した。一日目とも呼ばれる最初の時点で測定されたRLUには、100%の値を割り当てた。4週間後の各抱合体からの残りのRLUは、表2に列挙されている。これらの測定に関係する他の詳細は、実施例19に見出すことができる。

30

【0058】

【表 2】

表 2.

アクリジニウム化合物		4 週間の時点での化学発光安定性 (% RLU)	
		4°C	37°C
対照	<i>NSP-DMAE-HEG</i>	98	75
	<i>HQYAE</i>	92	58
1d	<i>ZC3-AE</i>	106	64
5d	<i>ZC3M-AE</i>	99	67
2d	<i>ZC6-AE</i>	93	52
6d	<i>ZC6M-AE</i>	99	68
7d	<i>ZC8M-AE</i>	98	66
11f	<i>NSP-DMAE-Z</i>	88	73
10f	<i>NSP-2Z-DMAE</i>	118	94
8d	<i>AZC3-AE</i>	100	60
9d	<i>AZC6-AE</i>	100	56

10

20

【0059】

表 2 から、本発明の種々の両性イオン含有アクリジニウムエステル抱合体の化学発光安定性は、NSP-DMAE-HEG 及び HQYAE のそれと同等である。37 で、4 週間後、これら 2 つのアクリジニウムエステルの抱合体は、それらの化学発光活性のそれぞれ 75 % 及び 58 % を保持する。他の両性イオン含有アクリジニウムエステルの全ての抱合体は、ZC6-AE の抱合体についての 52 % から NSP-2Z-DMAE の抱合体についての 94 % までと、同様の安定性を示す。4 で、4 週間後、全てのアクリジニウムエステル抱合体は、化学発光活性の最小損失を示した。

【0060】

本発明の両性イオン含有アクリジニウム化合物は、分析物の測定又は定量化についてのアッセイにおける標識として有用である。そのようなアッセイで典型的に測定される分析物は、何らかの臨床関連の物質であることが多く、そして大きな巨大分子、例えば、タンパク質、核酸、ウイルス、バクテリアなどから、小分子、例えば、エタノール、ビタミン、ステロイド、ホルモン、治療薬などまで幅広い分子に及ぶことができる。「サンドイッチ」イムノアッセイは、典型的には、抗体などの 2 つの結合分子を使用する、大分子（巨大分子分析物とも呼ぶ）の検出を包含する。1 種の抗体を、固相、例えば、粒子、ビーズ、膜、マイクロタイタープレートもしくは任意の他の固体表面に固定又は結合させる。抗体などの結合分子の固相への結合のための方法は、当技術分野において周知である。例えば、抗体を、グルタルアルデヒドなどの架橋分子を使用することによって、表面上にアミンを含有する粒子に共有結合させることができる。この結合はまた、非共有結合性であってもよく、そして固相、例えば、ポリスチレンビーズ及びマイクロタイタープレートの表面への結合分子の単純吸着を含むこともできる。第 2 抗体は、しばしば標識と呼ばれる化学発光分子又は蛍光分子と共有結合させることが多い。抗体及び他の結合タンパク質などの結合分子の標識化も、当技術分野において周知であり、そして一般的に抱合反応と呼ばれており、そして標識抗体は、抱合体と呼ばれることが多い。典型的に、標識上のアミン反応性部分は、抗体上のアミンと反応して、アミド結合を形成する。抗体と標識との間の他の結合、例えば、チオエーテル、エステル、カルバマート等も周知である。アッセイにおいて、2 種の抗体は、巨大分子分析物の異なる領域に結合する。巨大分子分析物は、例えば、タンパク質、核酸、オリゴ糖、抗体、抗体フラグメント、細胞、ウイルス、受容体

30

40

50

又は合成ポリマーであり得る。結合分子は、抗体、抗体フラグメント、核酸、ペプチド、結合タンパク質又は合成結合ポリマーであり得る。例えば、葉酸結合タンパク質（「F B P」）は、分析物である葉酸に結合する。様々な分析物に結合することができる合成結合分子も、Mossbach et al. *Biotechnology* vol. 14, pp. 163-170 (1995)によって開示されている。

【0061】

固定された抗体及び標識抗体を有する固相が、分析物を含有するサンプルと混合されると、分析物と2種の抗体との間で結合複合体が形成される。この種類のアッセイはしばしば、固相が関与するので、異種アッセイと呼ばれる。それから、結合複合体と関連する化学発光又は蛍光シグナルを測定することができ、そして分析物の存在又は非存在を推測することができる。通常、結合複合体を、シグナル発生前に、過剰量の標識抗体などの残りの結合反応成分から分離する。例えば、結合複合体が、磁性ビーズと結合する場合、磁石を使用してバルク溶液からビーズと結合した結合複合体を分離することができる。一連の「標準」、すなわち既知濃度の分析物を使用することによって、2種の抗体を使用して、「用量反応」曲線を生成することができる。したがって、用量反応曲線は、ある量の測定されたシグナルを分析物の特定濃度と関連させる。サンドイッチアッセイにおいて、分析物の濃度が上昇すると、シグナルの量も増加する。次に、未知のサンプルにおける分析物の濃度を、巨大分子分析物を含有する未知のサンプルによって生成されたシグナルを用量反応曲線と比較することによって計算することができる。

10

【0062】

同様に、2種の結合成分はまた、核酸分析物の異なる領域に結合又はハイブリダイズする核酸であることができる。次に、核酸分析物の濃度を、同様の方法で演繹することができる。

20

【0063】

小分子分析物、例えば、ステロイド、ビタミン、ホルモン、治療薬又は小ペプチドなどのための別クラスのイムノアッセイは、一般的には競合アッセイと呼ぶアッセイ形式を利用する。典型的には、競合アッセイでは、抱合体は、対象の分析物及び化学発光又は蛍光標識から、2個の分子を共有結合することによって、できている。小分子分析物をそういうものとして使用することができるか、又はその構造を、標識への抱合前に変化させることができる。変化させられた構造を有する分析物は類似体と呼ばれる。標識を分析物と連結させるための化学作用を可能にするために、分析物の構造類似体を使用することがしばしば必要である。時には、分析物の構造類似体を、抗体などの結合分子へのその結合を弱めるか又は高めるために使用する。そのような技術は、当技術分野において周知である。対象の分析物に対する抗体又は結合タンパク質を、しばしば、直接的又はビオチン-アビジン系などの二次的結合相互作用を介するかのいずれかで固相上に固定する。

30

【0064】

サンプル中の分析物の濃度は、競合アッセイにおいて、分析物含有サンプル及び分析物-標識抱合体を限定量の固相固定結合分子に対して競合させることによって演繹することができる。サンプル中の分析物の濃度が上昇すると、固相上の結合分子により捕獲された分析物-標識抱合体の量は、減少する。一連の「標準」、すなわち既知濃度の分析物を利用することによって、固相上の結合分子によって捕獲された分析物-標識抱合体からのシグナルを、分析物の濃度と逆相関させる、用量反応曲線を構築することができる。いったん用量反応曲線をこの方法で編み出したら、未知のサンプル中の同じ分析物の濃度を、この未知のサンプルから得たシグナルを用量反応曲線におけるシグナルと比較することによって演繹することができる。

40

【0065】

小分子分析物についての競合アッセイの別の形式は、対象の分析物又は分析物類似体、及び化学発光標識又は蛍光標識と抱合している、分析物に特異的な抗体又は結合タンパク質で固定されている固相の使用を伴う。この形式では、抗体-標識抱合体は、固相上の分析物又は分析物類似体との結合相互作用を介して、固相上に捕獲される。次に、サンプル

50

中に存在する対象の分析物は、抗体 - 標識抱合体に「競合的に」結合し、このようにして抗体 - 標識抱合体と固相との相互作用を阻害又は置き換える。このようにして、固相上に捕獲された抗体 - 標識抱合体から生成されたシグナルの量を、サンプル中の分析物の量と関連させる。

【 0 0 6 6 】

これらの方法と関連して使用するための試薬も、本発明によって提供され、そして典型的には、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーに結合している化学発光アクリジニウム化合物を含み、このアクリジニウム化合物は、(i)アクリジニウム核の窒素原子に結合している炭化水素基であって、該炭化水素基は最大 20 個までのヘテロ原子で場合により置換されている、炭化水素基、及び(ii)最大 20 個までのヘテロ原子で場合により置換されている置換炭化水素部分に連結しているアクリジニウム核の C₉ 位におけるカルボキシル又はスルホンアミド基を含み、ここで、前記アクリジニウム化合物は、アクリジニウム核の C₂ 位、アクリジニウム核の C₇ 位、カルボキシルもしくはスルホンアミド基に連結している炭化水素部分、又はアクリジニウム核の窒素原子に結合している炭化水素基に結合している、少なくとも 1 個の両性イオン官能基を含み；前記アクリジニウム化合物は、前記両性イオン官能基を含まない以外は同一のアクリジニウム化合物と比較して、固相に対する非特異的結合の減少を示す。

10

【 0 0 6 7 】

上記にしたがって、巨大分子分析物の検出又は定量のためのアッセイは、本発明の一実施態様によれば、以下の工程：

20

- (a) (i) 分析物に対して特異的な結合分子及び(ii)本発明の両性イオン含有アクリジニウムエステル又はスルホンアミド化合物の任意のものを含む抱合体を提供する工程；
- (b) 固体担体であって、その上に前記分析物に対して特異的な第 2 結合分子を固定した、固体担体を提供する工程；
- (c) 上記抱合体、固相、及び分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成する工程；
- (d) 上記固体担体上に捕獲された結合複合体を分離する工程；
- (e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、工程(d)からの結合複合体の化学発光を誘発する工程；
- (f) 照度計を用いて光放出の量を測定する工程；及び
- (g) 放出された光の量を分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、分析物の存在を検出するか又は分析物の濃度を計算する工程を含む。

30

【 0 0 6 8 】

別の実施態様において、小分子分析物の検出又は定量のためのアッセイが提供され、それは、

- (a) 分析物と本発明の両性イオン含有アクリジニウムエステル又はスルホンアミド化合物の任意のものとの抱合体を提供する工程；
- (b) 分析物に対して特異的な結合分子で固定された固体担体を提供する工程；
- (c) 上記抱合体、固体担体、及び分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成する工程；
- (d) 固体担体上に捕獲された結合複合体を分離する工程；
- (e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、工程(d)からの結合複合体の化学発光を誘発する工程；
- (f) 照度計を用いて光の量を測定する工程；及び
- (g) 放出された光の量を分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、分析物の存在を検出するか又は分析物の濃度を計算する工程を含む。

40

50

【0069】

代替的アッセイ形式において、本発明の両性イオン含有アクリジニウム化合物は、また、以下の工程：

- a) 分析物又は分析物類似体で固定された固体担体を提供する工程；
 - b) 分析物に対して特異的な結合分子と本発明の両性イオン含有アクリジニウムエステル又はスルホンアミド化合物との抱合体を提供する工程；
 - c) 上記固相、抱合体、及び分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成する工程；
 - d) 固体担体上に捕獲された結合複合体を分離する工程；
 - e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、(d)の結合複合体の化学発光を誘発する工程；
 - f) 照度計を用いて光の量を測定する工程；及び
 - g) 放出された光の量を分析物の既知濃度と関連させる標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、分析物の存在を検出するか又は分析物の濃度を計算する工程、
- を含むアッセイで、小分子分析物の検出に有用である。

10

【0070】

化学発光誘発試薬は、過酸化水素又はペルオキシド塩のいずれかであり得る。

【0071】

巨大分子分析物は、タンパク質、核酸、オリゴ糖、抗体、抗体フラグメント、細胞、ウイルス、合成ポリマー等であり得る。

20

【0072】

小分子分析物は、ステロイド、ビタミン、ホルモン、治療薬、小ペプチド等であり得る。

【0073】

本アッセイにおける結合分子は、抗体、抗体フラグメント、結合タンパク質、核酸、ペプチド、受容体又は合成結合分子であり得る。

【0074】

実施例 1

ZC3-AE-NHS、化合物 1 d の合成

30

a) 化合物 1 a

無水テトラヒドロフラン (10 mL) 中の 2,7-ジヒドロキシアクリジンメチルエステル (0.1 g、0.24 mmol)、(米国特許第 7,309,615 号)、3-ジメチルアミノプロパノール (0.112 mL、4 当量) 及びトリフェニルホスフィン (0.252 g、4 当量) の溶液を、窒素雰囲気下、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (0.188 mL、4 当量) で処理した。この反応物を室温で 16 時間攪拌した。溶離剤として酢酸エチルを使用するシリカでの TLC 分析は、出発物質を示さず、そして 75% 酢酸エチル、24% メタノール及び 1% トリエチルアミンを使用して、極性生成物 (R_f 約 0.15) が観察された。次に、溶媒を減圧下で除去し、そして残留物を 1N HCl (25 mL) と酢酸エチル (25 mL) で分液した。生成物を含有する水層を、さらに 2 回酢酸エチル (2 × 25 mL) で抽出した。次に、酸性水層を、鮮黄色の懸濁液が形成されるまで、2.5% 水酸化ナトリウム水溶液を滴下して処理した。この懸濁液を、酢酸エチル (3 × 25 mL) で抽出した。次に、少量のこの溶液を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 2.5 cm カラム及び 1.0 mL/分の流速での 10-60% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 40 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する HPLC によって分析した。生成物が、R_t = 2.5 分で溶離して観察され、それは主要成分であった。酢酸エチル溶液を、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして減圧下で濃縮して黄色の粘着性固体を得た。収量 = 12.6 mg (89%) ; MALDI-TOF MS 588.3 実測値。

40

【0075】

50

b) 化合物 1 c

イオン性液体 [B M I M] [P F 6] (1 ~ 2 mL) 中の化合物 1 a (0 . 1 2 6 g 、 0 . 2 1 5 mmol) 、 蒸留した 1 , 3 - プロパンスルホン (0 . 7 8 5 g 、 3 0 当量) 及び 2 , 6 - ジ - tert - ブチルピリジン (0 . 4 7 0 mL 、 1 0 当量) の混合物を、窒素雰囲気下、150 で 2 4 時間加熱した。次に、この反応物を室温に冷ました。少量 (1 ~ 2 μ L) の反応混合物を抜き取り、メタノール (0 . 1 mL) で希釈し、そしてセクション (a) において先に記載した勾配を使用して分析 H P L C によって分析した。主要生成物は、R t = 1 8 分にて溶離して観察され、それは、MALDI-TOF MS 分析によると (953.5 実測値) 、トリアルキル化アクリジニウムエステル生成物 1 b に一致した。粗反応混合物を酢酸エチル (3 0 mL) と水 (3 0 mL) で分液した。生成物を含有する水層を、さらに 3 回酢酸エチル (3 \times 3 0 mL) で抽出した。水層を減圧下で濃縮して粗アクリジニウムエステル 1 b を得た。この物質を 1 N H C l (1 5 mL) に溶解し、そして窒素下、1 . 5 時間還流し、そして次に室温に冷ました。反応混合物の H P L C 分析はメチルエステルの完全な加水分解を示し、そして生成物 1 c が R t = 1 6 分にて溶離された。反応混合物を約 1 0 mL に濃縮し、そして生成物を、YMC、C₁₈ 3 0 \times 3 0 0 mm カラム及び 2 0 mL / 分の溶媒流速でのセクション (a) に記載したのと同じ勾配ならびに 2 6 0 nm での UV 検出を使用する分取 H P L C によって精製した。生成物を含有する H P L C 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮した。収量 = 1 1 6 mg (全体で 5 7 %) ; MALDI-TOF MS 941.2 実測値。

10

【 0 0 7 6 】

c) 化合物 1 d

D M F (3 mL) 及び水 (0 . 3 mL) 中のアクリジニウムカルボン酸 1 c (3 0 mg 、 3 2 μ mol) の部分溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (7 μ L 、 1 . 5 当量) 及び T S T U (1 9 mg 、 2 当量) で処理した。この反応物を室温で激しく撹拌した。2 4 時間後、セクション (a) に記載した勾配を使用する反応混合物の H P L C 分析は、溶離 R t = 1 7 . 5 分にて生成物 (約 2 0 % 変換) を示した。次に、反応物を水 (2 . 7 mL) で希釈し、それによって清澄な溶液を得て、そして次にさらなるジイソプロピルエチルアミン (1 0 μ L 、 2 当量) 及び T S T U (5 0 mg 、 5 当量) で処理した。反応物を室温で 0 . 5 時間撹拌し、そして次に、H P L C によって分析すると、約 4 0 % 変換を示した。次に、生成物を、セクション (b) に記載した勾配及びカラムを使用する分取 H P L C によって精製した。生成物を含有する H P L C 画分を、- 8 0 で凍結し、そして凍結乾燥して鮮黄色の粉末を得た。収量 = 1 1 mg (3 3 %) ; MALDI-TOF MS 1037.4 実測値。

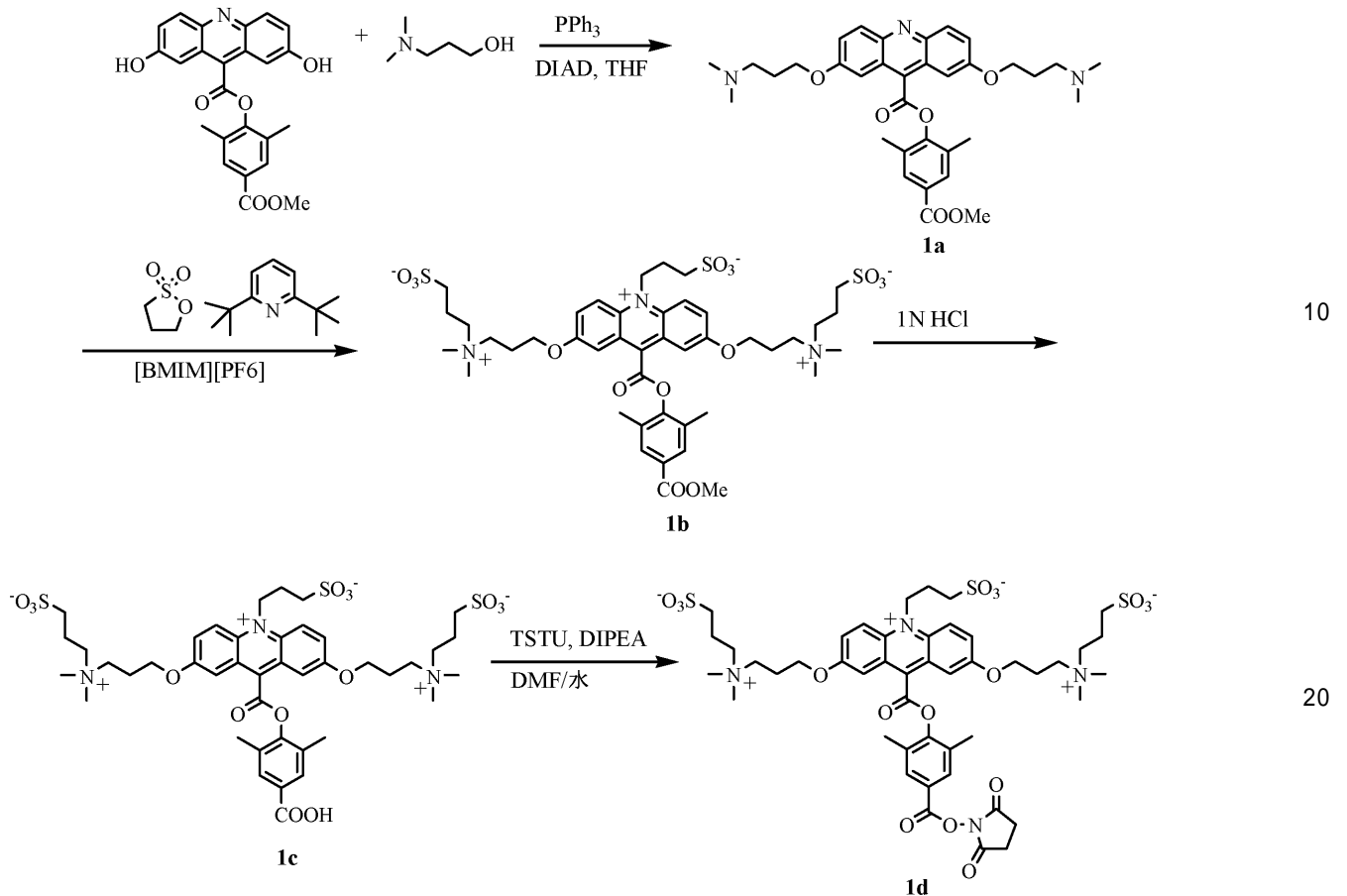
20

30

【 0 0 7 7 】

以下の反応は、Z C 3 - A E - N H S 、 化合物 1 d の合成を説明するものである。

【化 3 3】



【0078】

実施例 2

ZC6-AE-NHS、化合物 2 d の合成

a) 化合物 2 a

無水テトラヒドロフラン (5 mL) 中の 2, 7 - ジヒドロキシアクリジンメチルエステル (30 mg、72 μmol)、6 - ジメチルアミノ - 1 - ヘキサノール (42 mg、4 当量) 及びトリフェニルホスフィン (75 mg、4 当量) の溶液を、ジイソプロピルアゾジカルボキシラート (0.06 mL、5 当量) で処理した。反応物を、窒素雰囲気下、室温で 16 時間攪拌した。70% 酢酸エチル、28% メタノール、2% トリエチルアミンを使用するシリカでの TLC 分析が、極性生成物への完全な変換を示した。反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 25 cm カラム及び 1.0 mL/分の流速での 10 - 70% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物は R_t = 2.5 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。生成物を、実施例 1、セクション (a) に記載したように単離した。収量 = 36 mg (75%)。

【0079】

b) 化合物 2 c

イオン性液体 [BMIM][PF₆] (1 g) 中の化合物 2 a (36 mg、54 μmol)、蒸留した 1, 3 - プロパンスルホン (0.2 g、30 当量) 及び 2, 6 - ジ - tert - ブチルピリジン (0.120 mL、10 当量) の混合物を、窒素雰囲気下、150 °C で 24 時間加熱した。次に、反応物を室温に冷まし、そして酢酸エチル (30 mL) と水 (50 mL) で分液した。生成物を含有する水層を分離し、そして酢酸エチルで 2 回 (2 × 30 mL) 洗浄した。セクション (a) に記載した勾配を使用するこの水溶液の HPLC 分析は、R_t = 1.9 分にて溶離するトリアルキル化生成物への > 80% 変換を、そして R_t = 2.4 分にて溶離する約 20% ジアルキル化生成物を示した。粗アクリジニウムエステル生成物 2 b

を含有する水層を、減圧下で濃縮した。残留物を、1 N H C l (1 0 mL) に溶解し、そして窒素雰囲気下で2時間還流した。次に、反応混合物を室温に冷まし、そしてH P L Cによって分析すると、それはR t = 1 7 分にて溶離するアクリジニウムカルボン酸への完全な変換を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mmカラム及び20 mL / 分の溶媒流速でセクション (a) に記載したのと同じ勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用する分取H P L Cによって精製した。生成物を含有するH P L C画分を合わせ、そして減圧下で濃縮して化合物2 cを得た。収量 = 39.4 mg (全体で71%) ; MALDI-TOF MS 1025.1 実測値。

【0080】

c) 化合物2 d

10

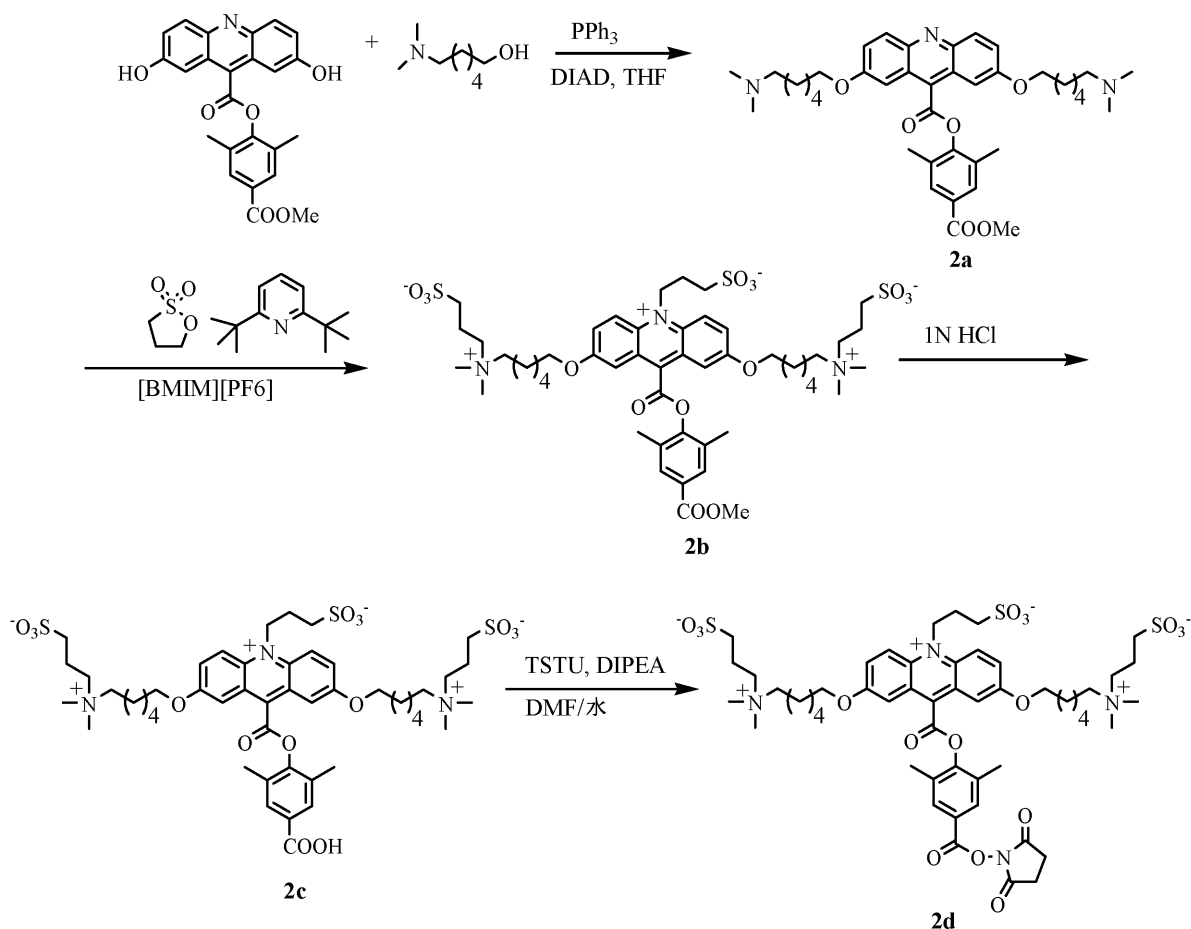
15% 水 / D M F (4 mL) 中の化合物2 c (39 mg、38 μmol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (0.033 mL、5 当量) 及びT S T U (57 mg、5 当量) で処理した。反応物を室温で15分間攪拌し、そしてセクション (a) に記載したようにH P L Cによって分析した。N H S エステル生成物2 d への完璧な変換を、溶離してR t = 18.4 分にて観察した。生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mmカラム及び20 mL / 分の溶媒流速でセクション (a) に記載したのと同じ勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用する分取H P L Cによって精製した。生成物を含有するH P L C画分を合わせ、-80 で凍結し、そして凍結乾燥して化合物2 dを得た。収量 = 28 mg (66%) ; MALDI-TOF MS 1120.8 実測値。

【0081】

20

以下の反応は、Z C 6 - A E - N H S、化合物2 d の合成を説明するものである。

【化34】



30

40

【0082】

実施例 3

Z C 8 - A E - N H S、化合物3 d の合成

50

a) 化合物 3 a

無水テトラヒドロフラン (5 mL) 中の 2, 7 - ジヒドロキシアクリジンメチルエステル (30 mg、72 μ mol)、8 - ジメチルアミノ - 1 - オクタノール (50 mg、4 当量) 及びトリフェニルホスフィン (75 mg、4 当量) の溶液を、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (disopropyl azodicarboxylate) (0.06 mL、5 当量) で処理した。反応物を窒素雰囲気下で 16 時間撹拌した。少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm \times 2.5 cm カラム及び 1.0 mL/分の流速での 10 - 100% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物を溶離して、Rt = 22.5 分にて観察され、それは主要成分であった。生成物 3 a を、実施例 1、セクション (a) に記載したように単離した。収量 = 58 mg (定量的)、MALDI-TOF MS 728.6 実測値。

10

【0083】

b) 化合物 3 c

イオン性液体 [BMIM][PF6] (1 g) 中の化合物 3 a (58 mg、80 μ mol)、蒸留した 1, 3 - プロパンスルトン (0.291 g、30 当量) 及び 2, 6 - ジ - tert - ブチルピリジン (0.175 mL、10 当量) の混合物を、窒素雰囲気下、150 で 24 時間加熱した。次に、反応物を室温に冷まし、そして酢酸エチル (30 mL) と水 (30 mL) で分液した。生成物を含有する水層を分離し、そして酢酸エチルで 2 回 (2 \times 30 mL) 洗浄した。セクション (a) に記載した勾配を使用するこの水溶液の HPLC 分析は、溶離して Rt = 1.5 分にてアクリジニウムエステル生成物 3 b を示した (MALDI-TOF MS 1094 実測値)。水層を減圧下で濃縮し、そして回収した褐色の油状物を、窒素下、1N HCl (10 mL) 中で還流した。2 時間後、反応物を室温に冷まし、そして HPLC によって分析すると、溶離して Rt = 16 分にて生成物を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 30 \times 300 mm カラム及び 2.0 mL/分の溶媒流速での 10 - 70% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物を含有する HPLC 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮して化合物 3 c を得た。収量 = 30 mg (全体で 39%) ; MALDI-TOF MS 1082.4 実測値。

20

【0084】

c) 化合物 3 d

15% 水 / DMF (2 mL) 中の化合物 3 c (23 mg、21.3 μ mol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (18.6 μ L、5 当量) 及び TSTU (32 mg、5 当量) で処理した。反応物を室温で撹拌した。15 分後、少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm \times 2.5 cm カラム及び 1.0 mL/分の流速での 10 - 60% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 40 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物を、Rt = 29 分にて溶離して観察すると、それは主要成分であった。生成物を、YMC、C₁₈ 30 \times 300 mm カラム及び 2.0 mL/分の溶媒流速での 10 - 70% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物を含有する HPLC 画分を合わせ、-80 で凍結し、そして凍結乾燥して生成物 3 d を得た。収量 = 15 mg (60%) ; MALDI-TOF MS 1178.8 実測値。

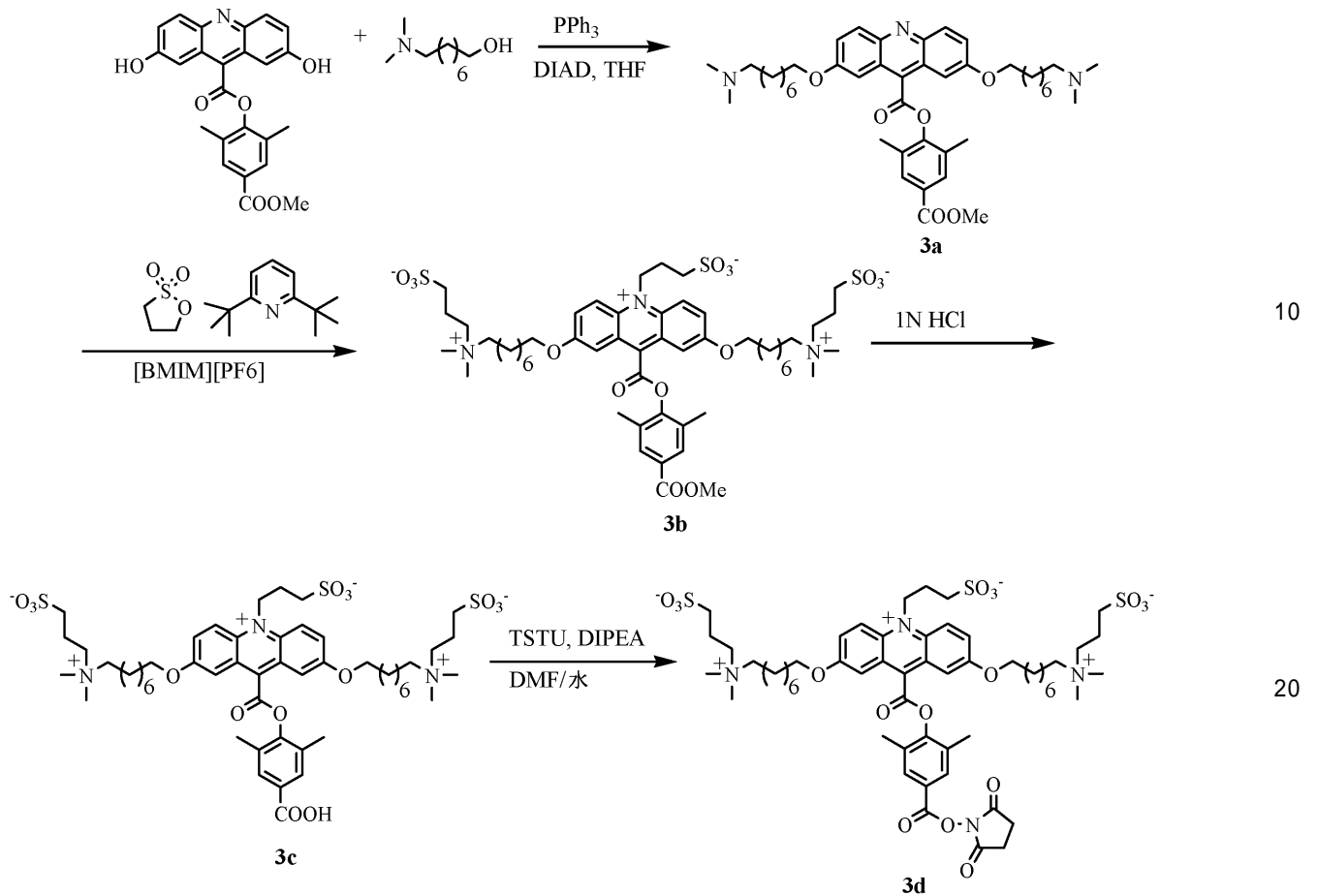
30

40

【0085】

以下の反応は、ZC8 - AE - NHS、化合物 3 d の合成を説明するものである。

【化 3 5】



【 0 0 8 6】

実施例 4

Z C 1 2 - A E - N H S、化合物 4 e の合成

a) 1 2 - ジメチルアミノ - 1 - ドデカノール、4 a

無水テトラヒドロフラン (1 0 mL) 中の 1 2 - プロモ - 1 - ドデカノール (1 g、3 . 8 mmol) の溶液を、テトラヒドロフラン (1 0 mL) 中のジメチルアミンの 2 . 0 M 溶液で処理した。反応物を室温で 3 日間攪拌した。溶離剤として 2 5 % 酢酸エチル、7 5 % ヘキサンを使用するシリカでの T L C 分析が、ほとんど出発物質を含まない極性生成物の形成を示した。反応物を酢酸エチル (7 5 mL) で希釈し、そして重炭酸ナトリウム水溶液及び水で 2 回洗浄した。次に、その酢酸エチル溶液を、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして減圧下で濃縮した。収量 = 1 . 2 g (ロウ) 。シリカでの T L C 分析 (2 5 % メタノール、7 5 % 酢酸エチル) は、R f 約 0 . 1 で縞状生成物 (streaking product) を示した。この生成物 4 a を精製せずに使用した。

【 0 0 8 7】

b) 化合物 4 b

無水テトラヒドロフラン (5 mL) 中の 2 , 7 - ジヒドロキシアクリジンメチルエステル、(3 0 mg、7 2 μmol)、1 2 - ジメチルアミノ - 1 - ドデカノール (6 6 mg、4 当量) 及びトリフェニルホスフィン (7 5 mg、4 当量) の溶液を、ジイソプロピルアゾジカルボキシラート (0 . 0 6 mL、5 当量) で処理した。2 時間後、反応物を、追加のトリフェニルホスフィン 4 当量及びジイソプロピルアゾジカルボキシラート 5 当量で処理した。3 0 分後、少量を、Phenomenex、C₁₈、4 . 6 mm × 2 5 cm カラム及び 1 . 0 mL / 分の流速での 1 0 - 1 0 0 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、B = 0 . 0 5 % T F A を含む M e C N) の 3 0 分間勾配ならびに 2 6 0 nm での U V 検出を使用する H P L C によって分析した。生成物を溶離して R t = 3 0 分にて観察され、それは主要成分であった。生成物

4 b を、実施例 1、セクション (a) に記載したように単離した。収量 = 5.7 mg (9.5 %)、MALDI-TOF MS 840.3 実測値。

【 0088 】

c) 化合物 4 d

イオン性液体 [B M I M] [P F 6] (1 mL) 中の化合物 4 b (5.7 mg、6.8 μ mol)、1,3-プロパンスルホン (0.250 g、3.0 当量) 及び 2,6-ジ-tert-ブチルピリジン (0.15 mL、1.0 当量) の混合物を、窒素下、150 °C で 24 時間加熱した。次に、反応物を室温に冷まし、そして実施例 2、セクション (b) に記載したように処理した。セクション (a) に記載した勾配を使用した粗反応混合物の HPLC 分析が、 $R_t = 2.4$ 分で溶離するアクリジニウムエステル生成物 4 c を示した (MALDI-TOF MS 1206.2 実測値)。粗生成物 4 c を、1 N HCl (10 mL) 中で 4 時間還流した。次に、反応物を室温に冷まし、そして HPLC によって分析すると、 $R_t = 2.1$ 分で溶離する生成物 4 d への約 70% 変換を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 3.0 \times 3.0 mm カラム及び 2.0 mL / 分の溶媒流速での 10 : 100% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物を含有する HPLC 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮して、化合物 4 d を得た。収量 = 2.2 mg (全体で 2.7%) ; MALDI-TOF MS 1193.4 実測値。

10

【 0089 】

d) 化合物 4 e

DMF (3.4 mL) 及び水 (0.6 mL) 中の化合物 4 d (2.2 mg、1.8.4 μ mol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (16 μ L、5 当量) 及び TSTU (2.8 mg、5 当量) で処理した。反応物を室温で撹拌した。15 分後、少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm \times 2.5 cm カラム及び 1.0 mL / 分の流速での 10 : 100% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物が、 $R_t = 2.2$ 分で溶離して観察され、それは主要成分であった。生成物を、YMC、C₁₈ 3.0 \times 3.0 mm カラム及び 2.0 mL / 分の溶媒流速での 10 : 100% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物を含有する HPLC 画分を合わせ、-80 °C で凍結し、そして凍結乾燥して生成物 4 e を得た。収量 = 1.5.4 mg (6.4%) ; MALDI-TOF MS 1290.6 実測値。

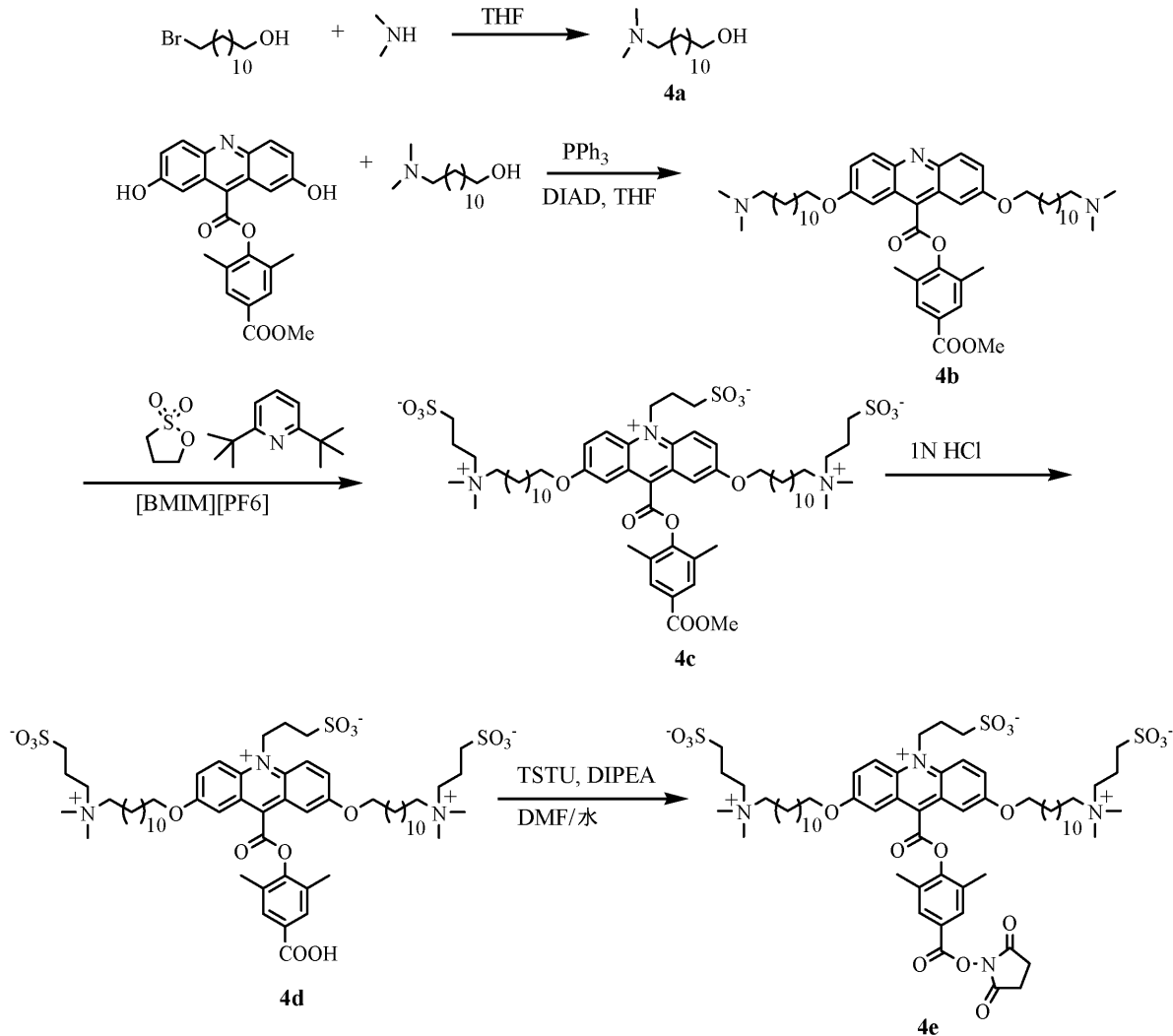
20

30

【 0090 】

以下の反応は、ZC12-AE-NHS、化合物 4 e の合成を説明するものである。

【化 3 6】



10

20

30

40

50

【 0 0 9 1】

実施例 5

Z C 3 M - A E - N H S、化合物 5 d の合成

a) 化合物 5 a

無水テトラヒドロフラン (3 mL) 中の 2 - ヒドロキシアクリジンメチルエステル (2 5 mg、6 2 . 3 μmol) (米国特許第 7 , 3 0 9 , 6 1 5 号でのジヒドロキシ誘導体と同様の方法で合成した)、3 - ジメチルアミノ - 1 - プロパノール (1 5 μL、2 当量) 及びトリフェニルホスフィン (3 3 mg、2 当量) の溶液を、ジイソプロピルアゾジカルボキシラート (2 5 μL、2 当量) で処理した。反応物を、窒素下、室温で撹拌した。1 時間後、溶離剤として 1 : 1、酢酸エチル / メタノールを使用するシリカでの T L C 分析は、R f 約 0 . 2 の極性生成物の完全形成を示した。少量の反応混合物の H P L C 分析は、Phenomenex、C₁₈ 4 . 6 mm x 2 5 cm カラム及び 1 . 0 mL / 分の流速での 1 0 - 7 0 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、B = 0 . 0 5 % T F A を含む Me C N) の 3 0 分間勾配ならびに 2 6 0 nm での U V 検出を使用して実施した。生成物を R t = 2 5 . 2 分にて溶離し観察すると、それは主要成分であった。反応物を酢酸エチル (2 5 mL) 及び 1 N H C l (2 5 mL) で希釈した。生成物を含む H C l 層を分離し、そして酢酸エチルで 2 回 (2 x 2 5 mL) 洗浄した。次に、H C l 層を水中で冷却し、そして懸濁が形成されるまで 5 % K O H 水溶液で処理した。この懸濁液を酢酸エチル (2 x 2 5 mL) で抽出した。合わせた酢酸エチル抽出物を水 (2 5 mL) で洗浄した。次に、それを無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして減圧下で濃縮して化合物 5 a を得た。収量 2 4 . 5 mg (8 2 %) ; MALDI - TOF MS 487.5 実測値。

【0092】

b) 化合物 5 c

イオン性液体 [BMIM][PF6] (0.5 mL) 中の化合物 5 a (24.5 mg、51.3 μmol)、1,3-プロパンスルトン (125 mg、20 当量) 及び 2,6-ジ-tert-ブチルピリジン (79 μL、7 当量) の混合物を、150 で 24 時間加熱した。次に、反応物を室温に冷まし、そして少量 (1~2 μL) を抜き取り、メタノールで希釈し、そしてセクション (a) に記載したように HPLC によって分析した。アクリジニウムエステル生成物 5 b を、Rt = 18 分にて溶離し観察した (>80% 変換; MALDI-TOF MS 731.04 実測値)。反応物を酢酸エチル (25 mL) と水 (25 mL) で分液した。生成物を含有する水層を分離し、そして酢酸エチル (50 mL) で 1 回洗浄した。次に、それを減圧下で濃縮した。残留物を、窒素下、1N HCl 10 mL 中で 2 時間還流し、そして室温に冷ました。反応混合物の HPLC 分析が、Rt = 15 分で溶離する生成物 5 c の完全形成を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mm カラム及び 2.0 mL / 分の溶媒流速での 10-70% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物を含有する HPLC 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮して化合物 5 c を得た。収量 = 32 mg (全体で 89%) ; MALDI-TOF MS 717.1 実測値。

10

【0093】

c) 化合物 5 d

DMF (3.4 mL) 及び水 (0.6 mL) 中の化合物 5 c (32 mg、44.6 μmol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (39 μL、5 当量) 及び TSTU (67 mg、5 当量) で処理した。反応物を室温で撹拌した。15 分後、少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 25 cm カラム及び 1.0 mL / 分の流速での 10-70% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物が Rt = 17 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mm カラム及び 2.0 mL / 分の溶媒流速での 10-70% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物 5 d を含有する HPLC 画分を合わせ、-80 で凍結しそして凍結乾燥した。収量 = 25 mg (69%) ; MALDI-TOF MS 814.1 実測値。

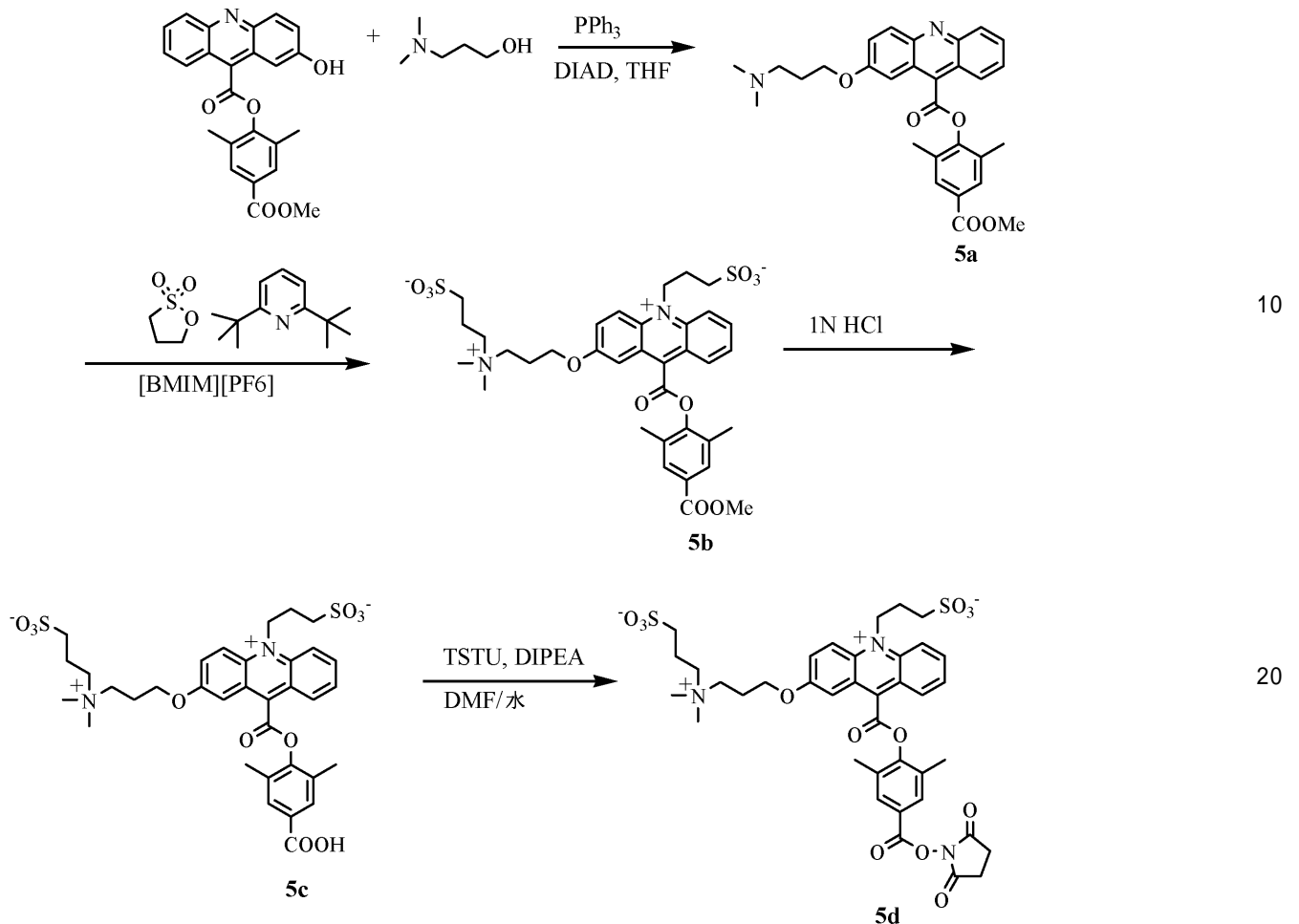
20

30

【0094】

以下の反応は、ZC3M-AE-NHS、化合物 5 d の合成を説明するものである。

【化 3 7】



【 0 0 9 5 】

実施例 6

Z C 6 M - A E - N H S、化合物 6 d の合成

a) 化合物 6 a

無水テトラヒドロフラン (3 mL) 中の 2 - ヒドロキシアクリジンメチルエステル (2 5 mg、6 2 . 3 μmol)、6 - ジメチルアミノ - 1 - ヘキサノール (1 8 mg、2 当量) 及びトリフェニルホスフィン (3 3 mg、2 当量) の溶液を、ジイソプロピルアゾジカルボキシルレート (2 5 μL 、2 当量) で処理した。反応物を、窒素下、室温で 1 時間攪拌し、そして次にセクション (a)、実施例 5 に記載したように処理した。少量の反応混合物の H P L C 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4 . 6 mm x 2 5 cm カラム及び 1 . 0 mL / 分の流速での 1 0 - 1 0 0 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、B = 0 . 0 5 % T F A を含む M e C N) の 3 0 分間勾配ならびに 2 6 0 nm での U V 検出を使用して実施した。生成物が、R t = 2 2 分にて溶離され観察すると、それは主要成分であった。収量 3 3 . 5 mg (定量的) ; MALDI-TOF MS 529.5 実測値。

【 0 0 9 6 】

b) 化合物 6 c

イオン性液体 [B M I M] [P F 6] (0 . 5 mL) 中の化合物 6 a (3 3 . 5 mg、6 3 . 3 μmol)、1 , 3 - プロパンスルトン (1 5 5 mg、2 0 当量) 及び 2 , 6 - ジ - tert - ブチルピリジン (9 7 μL 、7 当量) の混合物を、1 5 0 °C で 2 4 時間加熱した。次に、反応物を室温に冷まし、そして少量 (1 ~ 2 μL) を抜き取り、メタノールで希釈し、そしてセクション (a) に記載したように H P L C によって分析した。アクリジニウムエステル生成物 6 b が、R t = 1 6 分で溶離して観察された (> 8 0 % 変換 ; MALDI-TOF MS 773.5 実測値)。反応混合物を、セクション (b)、実施例 5 に記載したように処理し

た。アクリジニウムエステル 6 b を、窒素下、1 N HCl 10 mL 中で 2 時間還流し、そして室温に冷ました。反応混合物の HPLC 分析が、Rt = 14 分で溶離する生成物 6 c の完全な形成を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mm カラム及び 20 mL / 分の溶媒流速での 10 : 100 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物を含有する HPLC 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮して化合物 6 c を得た。収量 = 26.8 mg (全体で 56 %)。

【0097】

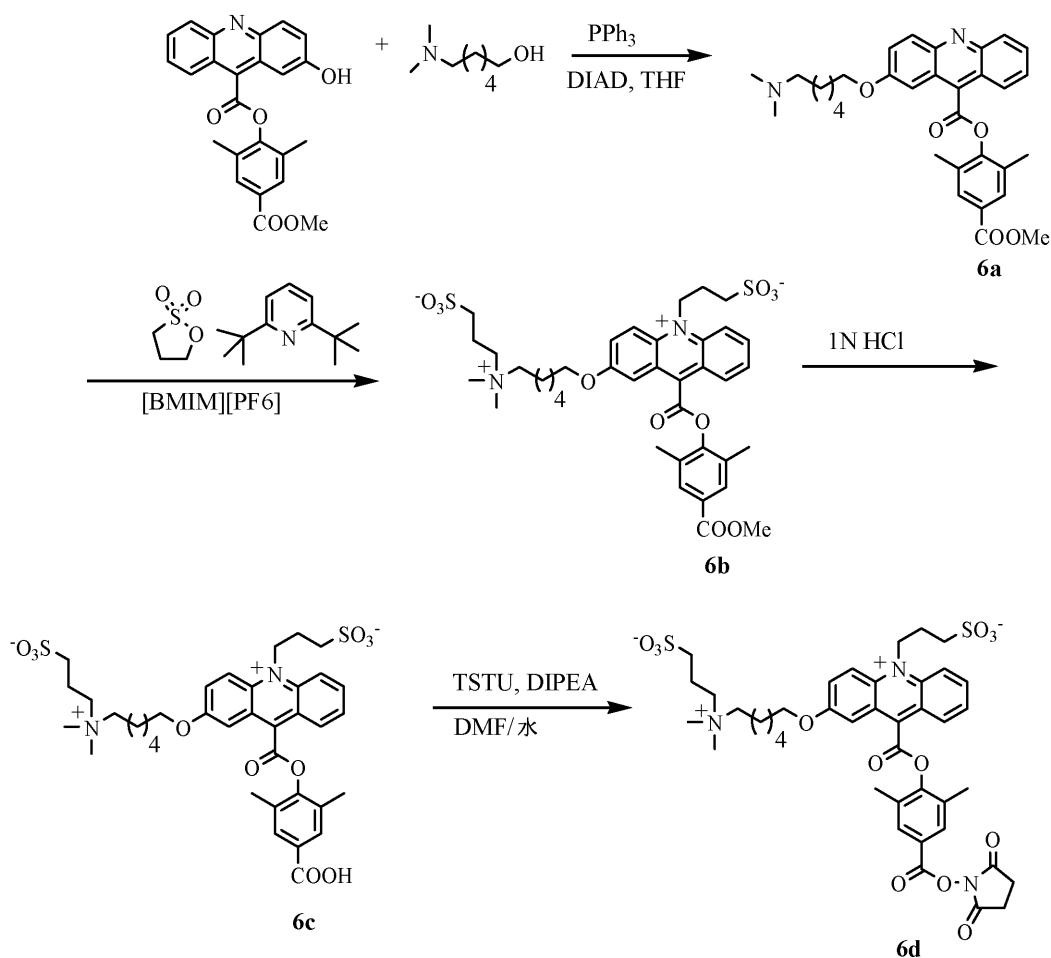
c) 化合物 6 d

DMF (3.4 mL) 及び水 (0.6 mL) 中の化合物 6 c (26.9 mg、35.3 μmol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (31 μL、5 当量) 及び TSTU (53 mg、5 当量) で処理した。反応物を室温で撹拌した。15 分後、少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 25 cm カラム及び 1.0 mL / 分の流速での 10 : 100 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物が、Rt = 15.4 分で溶離して観察され、それは主要成分であった。生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mm カラム及び 20 mL / 分の溶媒流速での 10 : 100 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物 6 d を含有する HPLC 画分を合わせ、-80 °C で凍結し、そして凍結乾燥した。収量 = 19.3 mg (63 %) ; MALD I-TOF MS 856.2 実測値。

【0098】

以下の反応は、ZCM-AE-NHS、化合物 6 d の合成を説明するものである。

【化38】



10

20

30

40

50

【 0 0 9 9 】

実施例 7

Z C 8 M - A E - N H S、化合物 7 d の合成

a) 化合物 7 a

無水テトラヒドロフラン (5 mL) 中の 2 - ヒドロキシアクリジンメチルエステル (3 0 mg、7 5 μ mol)、8 - ジメチルアミノ - 1 - オクタノール (2 6 mg、2 当量) 及びトリフェニルホスフィン (4 0 mg、2 当量) の溶液を、ジイソプロピルアゾジカルボキシラート (3 0 μ L、2 当量) で処理した。反応物を、窒素下、室温で 1 時間攪拌し、そして次に、セクション (a)、実施例 5 に記載したように処理した。少量の反応混合物の H P L C 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4 . 6 mm x 2 5 cm カラム及び 1 . 0 mL / 分の流速での 1 0 1 0 0 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、B = 0 . 0 5 % T F A を含む M e C N) の 3 0 分間勾配ならびに 2 6 0 nm での U V 検出を使用して実施した。生成物が、R t = 2 4 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。収量 1 3 mg (3 1 %) ; MALDI-TOF MS 557.1 実測値。

10

【 0 1 0 0 】

b) 化合物 7 c

イオン性液体 [B M I M] [P F 6] (0 . 2 mL) 中の化合物 7 a (1 3 mg、2 3 . 3 μ mol)、1 , 3 - プロパンスルトン (5 7 mg、2 0 当量) 及び 2 , 6 - ジ - tert - ブチルピリジン (3 6 μ L、7 当量) の混合物を、1 5 0 °C で 2 4 時間加熱した。次に、反応物を室温に冷まし、そして少量 (1 ~ 2 μ L) を抜き取り、メタノールで希釈し、そしてセクション (a) に記載したように H P L C により分析した。アクリジニウムエステル生成物 7 b が、R t = 1 7 . 4 分にて溶離して観察された (> 8 0 % 変換 ; MALDI-TOF MS 8 0 0 . 8 実測値) 。反応混合物を、セクション (b)、実施例 5 に記載したように処理した。アクリジニウムエステル 7 b を、窒素下、1 N H C l 5 mL 中で 2 時間還流し、そして室温に冷ました。反応混合物の H P L C 分析が、R t = 1 5 . 3 分で溶離する生成物 7 c の完全な形成を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 3 0 x 3 0 0 mm カラム及び 2 0 mL / 分の溶媒流速での 1 0 1 0 0 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、B = 0 . 0 5 % T F A を含む M e C N) の 3 0 分間勾配ならびに 2 6 0 nm での U V 検出を使用する分取 H P L C によって精製した。生成物を含有する H P L C 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮して化合物 7 c を得た。収量 = 6 . 8 mg (全体で 3 7 %) ; MALDI-TOF MS 787.8 実測値。

20

30

【 0 1 0 1 】

c) 化合物 7 d

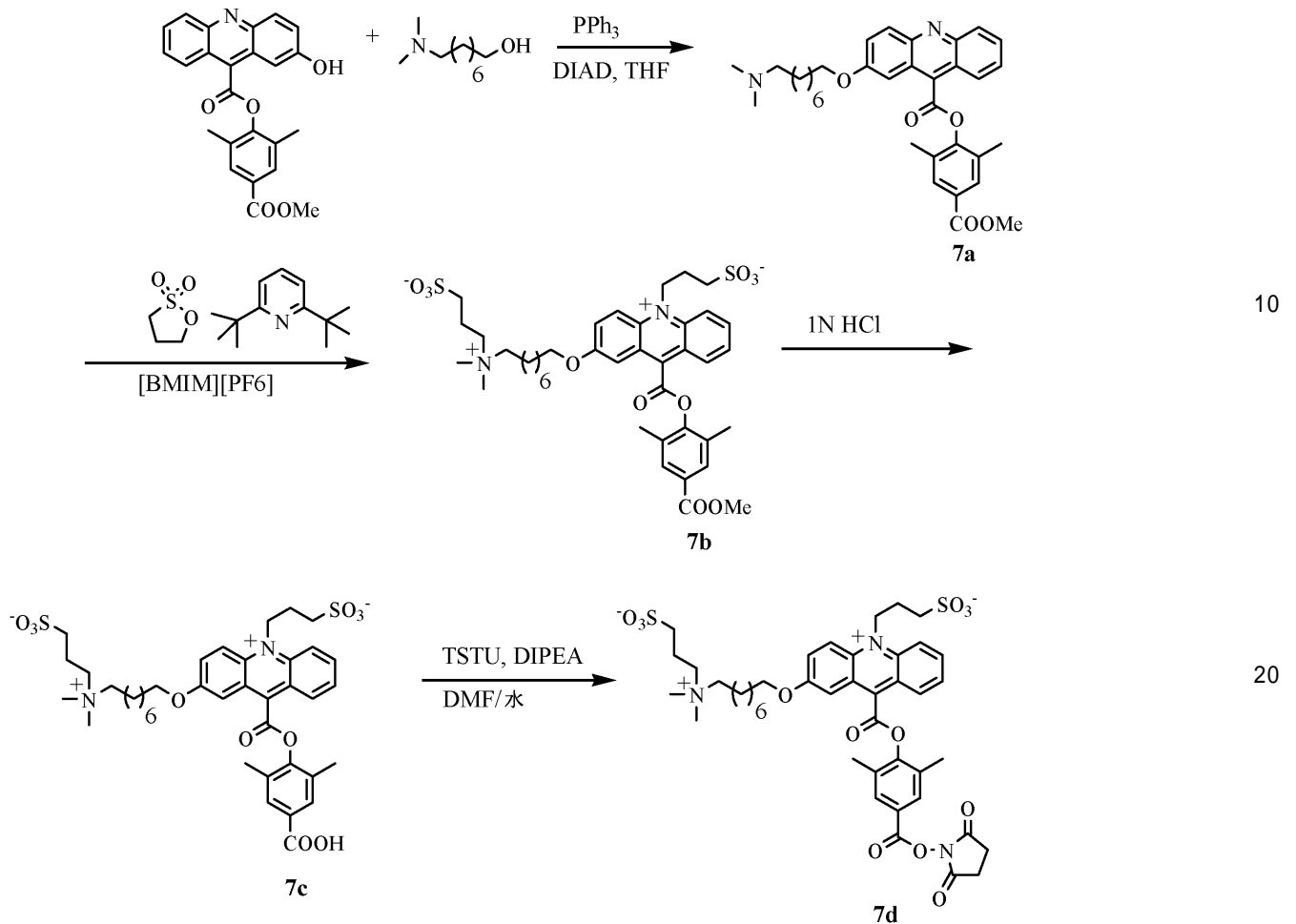
D M F (1 . 7 mL) 及び水 (0 . 3 mL) 中の化合物 7 c (6 . 8 mg、8 . 6 μ mol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (7 . 5 μ L、5 当量) 及び T S T U (1 3 mg、5 当量) で処理した。反応物を室温で攪拌した。3 0 分後、少量の反応混合物の H P L C 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4 . 6 mm x 2 5 cm カラム及び 1 . 0 mL / 分の流速での 1 0 1 0 0 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、B = 0 . 0 5 % T F A を含む M e C N) の 3 0 分間勾配ならびに 2 6 0 nm での U V 検出を使用して実施した。生成物が、R t = 1 6 . 5 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。生成物を、YMC、C₁₈ 3 0 x 3 0 0 mm カラム及び 2 0 mL / 分の溶媒流速での 1 0 1 0 0 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、B = 0 . 0 5 % T F A を含む M e C N) の 3 0 分間勾配ならびに 2 6 0 nm での U V 検出を使用する分取 H P L C によって精製した。生成物 7 d を含有する H P L C 画分を合わせ、- 8 0 °C で凍結し、そして凍結乾燥した。収量 = 5 mg (6 6 %) ; MALDI-TOF MS 885.0 実測値。

40

【 0 1 0 2 】

以下の反応は、Z C 8 M - A E - N H S、化合物 7 d の合成を説明するものである。

【化39】



【0103】

実施例 8

A Z C 3 - A E - N H S、化合物 8 d の合成

a) 化合物 8 a

化合物、2-ヒドロキシ-7-メトキシアクリジンメチルエステルを、米国特許第7,319,041(B2)号に記載されている反応を使用して、2-ベンジルオキシ-7-メトキシアクリジン-9カルボン酸及びメチル2,6-ジメチル-4-ヒドロキシベンゾアートから合成した。無水テトラヒドロフラン(5mL)中の2-ヒドロキシ-7-メトキシアクリジンメチルエステル(25mg、0.058mmol)、3-ジメチルアミノ-1-プロパノール(13.6μL、2当量)及びトリフェニルホスフィン(30mg、2当量)の溶液を、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート(23μL、2当量)で処理した。反応物を、窒素下、室温で撹拌した。1時間後、それをセクション(a)、実施例5に記載したように処理した。少量の反応混合物のHPLC分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6mm × 25cmカラム及び1.0mL/分の流速での10-100%B(A=0.05%TFAを含む水、B=0.05%TFAを含むMeCN)の30分間勾配ならびに260nmでのUV検出を使用して実施した。生成物がRt=20分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。収量27mg(90%);MALDI-TOF MS 517.9 実測値。

【0104】

b) 化合物 8 c

イオン性液体[BMIM][PF6](0.5mL)中の化合物8a(27mg、52.2μmol)、1,3-プロパンスルトン(128mg、20当量)及び2,6-ジ-tert-ブチルピリジン(80μL、7当量)の混合物を、150℃で24時間加熱した。次に、反応物を室温に冷まし、そして少量(1~2μL)を抜き取り、メタノールで希釈し、そし

30

40

50

てセクション (a) に記載したように H P L C によって分析した。アクリジニウムエステル生成物 8 b が、R t = 1 5 . 2 分にて溶離して観察された。反応混合物を、セクション (b)、実施例 5 に記載したように処理した。アクリジニウムエステル 8 b を、窒素下、1 N H C l 1 0 mL 中で 2 時間還流し、そして室温に冷ました。反応混合物の H P L C 分析は、R t = 1 3 . 5 分で溶離する生成物 8 c の完全な形成を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 3 0 × 3 0 0 mm カラム及び 2 0 mL / 分の溶媒流速での 1 0 - 1 0 0 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、B = 0 . 0 5 % T F A を含む M e C N) の 3 0 分間勾配ならびに 2 6 0 nm での U V 検出を使用する分取 H P L C によって精製した。生成物を含有する H P L C 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮して化合物 8 c を得た。収量 = 2 2 mg (全体で 5 6 %) ; MALDI-TOF MS 747.4 実測値。

10

【 0 1 0 5 】

c) 化合物 8 d

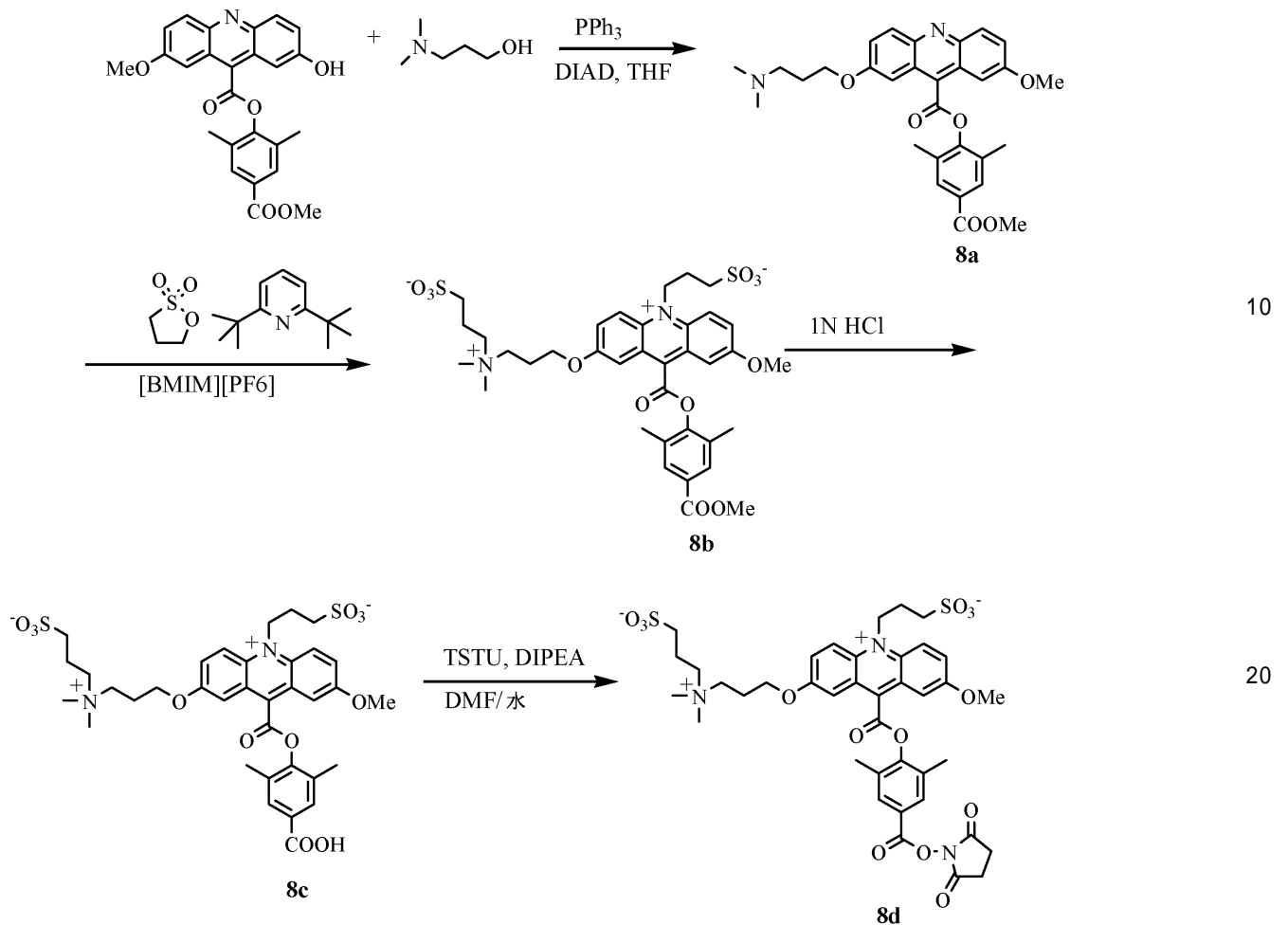
D M F (3 . 6 mL) 及び水 (0 . 4 mL) 中の化合物 8 c (2 2 mg、2 9 . 5 μ mol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (2 6 μ L、5 当量) 及び T S T U (4 4 mg、5 当量) で処理した。反応物を室温で撹拌した。3 0 分後、少量の反応混合物の H P L C 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4 . 6 mm × 2 5 cm カラム及び 1 . 0 mL / 分の流速での 1 0 - 1 0 0 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、B = 0 . 0 5 % T F A を含む M e C N) の 3 0 分間勾配ならびに 2 6 0 nm での U V 検出を使用して実施した。生成物が、R t = 1 4 . 6 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。生成物を、YMC、C₁₈ 3 0 × 3 0 0 mm カラム及び 2 0 mL / 分の溶媒流速での 1 0 - 1 0 0 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、B = 0 . 0 5 % T F A を含む M e C N) の 3 0 分間勾配ならびに 2 6 0 nm での U V 検出を使用する分取 H P L C によって精製した。生成物 8 d を含有する H P L C 画分を合わせて、- 8 0 °C で凍結し、そして凍結乾燥した。収量 = 1 7 . 6 mg (7 0 %) ; MALDI-TOF MS 843.9.0 実測値。

20

【 0 1 0 6 】

以下の反応は、A Z C 3 M - A E - N H S、化合物 8 d の合成を説明するものである。

【化 4 0】



【 0 1 0 7 】

実施例 9

A Z C 6 - A E - N H S、化合物 9 d の合成

a) 化合物 9 a

無水テトラヒドロフラン (3 mL) 中の 2 - ヒドロキシ - 7 - メトキシアクリジンメチルエステル (25 mg、 0 . 0 5 8 mmol)、 6 - ジメチルアミノ - 1 - ヘキサノール (17 mg、 2 当量) 及びトリフェニルホスフィン (30 mg、 2 当量) の溶液を、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (23 μ L、 2 当量) で処理した。反応物を窒素下、室温で撹拌した。2 時間後、それをセクション (a)、実施例 5 に記載したように処理した。少量の反応混合物の H P L C 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4 . 6 mm x 25 cm カラム及び 1 . 0 mL / 分の流速での 10 - 100 % B (A = 0 . 0 5 % T F A を含む水、 B = 0 . 0 5 % T F A を含む M e C N) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物が、R t = 22 . 5 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。収量 20 mg (63 %) ; MALDI-TOF MS 559.8 実測値。

【 0 1 0 8 】

b) 化合物 9 c

イオン性液体 [B M I M] [P F 6] (0 . 5 mL) 中の化合物 9 a (20 mg、 35 . 9 μ mol)、 1 , 3 - プロパンスルホン (87 mg、 20 当量) 及び 2 , 6 - ジ - tert - ブチルピリジン (59 μ L、 7 当量) の混合物を、150 $^{\circ}$ C で 24 時間加熱した。次に、反応物を室温に冷まし、そして少量 (1 ~ 2 μ L) を抜き取り、メタノールで希釈し、そしてセクション (a) に記載したように H P L C によって分析した。アクリジニウムエステル生成物 9 b が、R t = 15 . 7 分にて溶離して観察された (MALDI-TOF MS 803.9 実測値)。反応混合物を、セクション (b)、実施例 5 に記載したように処理した。アクリジニ

30

40

50

ウムエステル 9b を窒素下、1 N HCl 10 mL 中で 2 時間還流し、そして室温に冷ました。反応混合物の HPLC 分析は、Rt = 14.9 分で溶離する生成物 9c の完全な形成を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mm カラム及び 2.0 mL / 分の溶媒流速での 10 : 100 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物を含有する HPLC 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮して化合物 9c を得た。収量 = 18.3 mg (全体で 65 %) ; MALDI-TOF MS 790.4 実測値。

【0109】

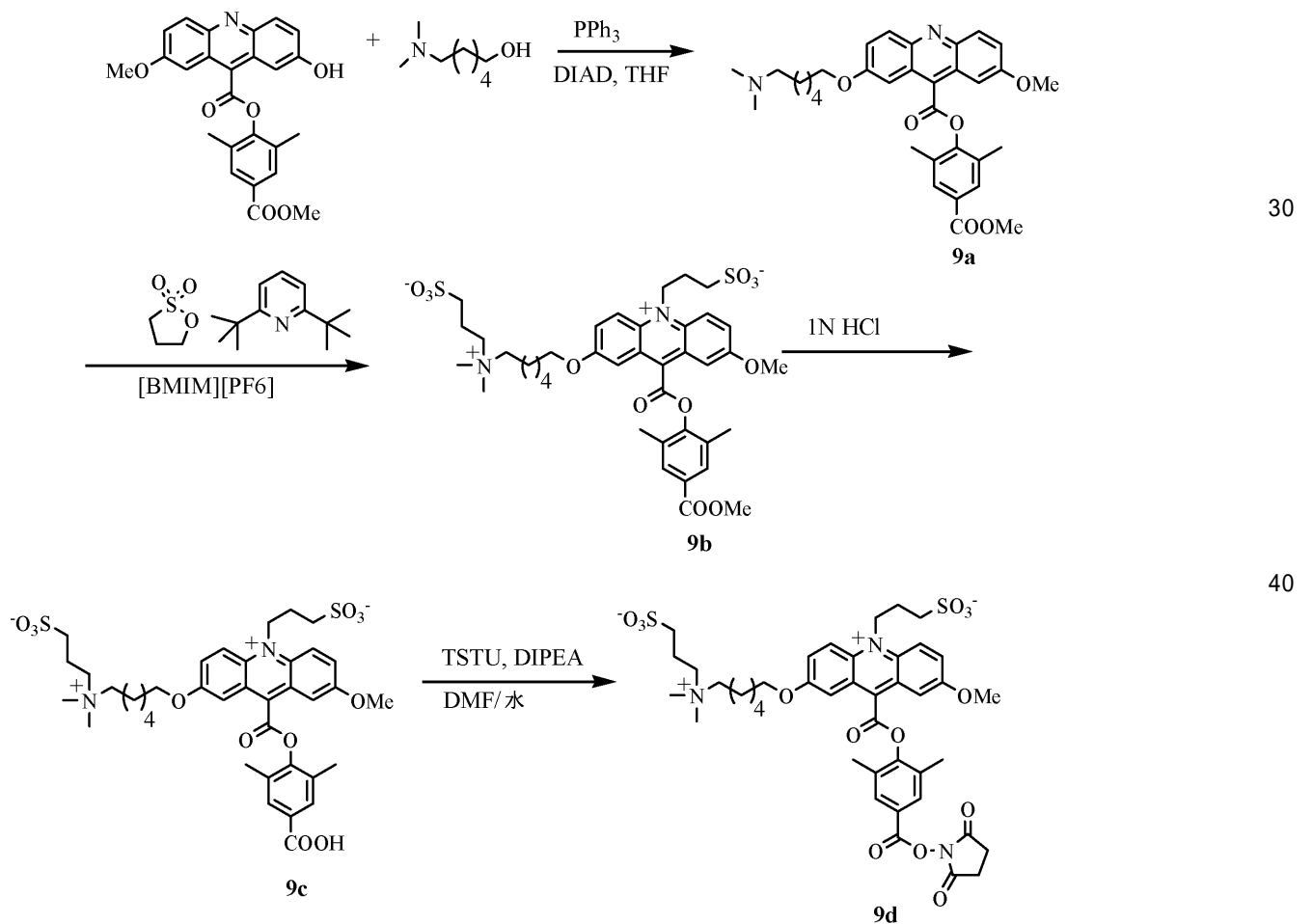
c) 化合物 9d

DMF (3.6 mL) 及び水 (0.4 mL) 中の化合物 9c (18.3 mg、23.2 μmol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (20 μL、5 当量) 及び TSTU (35 mg、5 当量) で処理した。反応物を室温で撹拌した。30 分後、少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 25 cm カラム及び 1.0 mL / 分の流速での 10 : 100 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物が、Rt = 16 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mm カラム及び 2.0 mL / 分の溶媒流速での 10 : 100 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物 9d を含有する HPLC 画分を合わせ、-80 °C で凍結し、そして凍結乾燥した。収量 = 14 mg (68 %) ; MALDI-TOF MS 887.6 実測値。

【0110】

以下の反応は、AZC6M-AE-NHS、化合物 9d の合成を説明するものである。

【化41】



【0111】

50

実施例 10

N S P - 2 Z - D M A E - N H S、化合物 10 f の合成

a) 化合物 10 a

無水テトラヒドロフラン (10 mL) 中の 4 - プロモベンジルブロミド (2 g、8 mmol) の溶液を、テトラヒドロフラン中のジメチルアミン (20 mL) mL) の 2.0 M 溶液で処理した。反応物を室温で3日間攪拌した。次に、反応混合物を、酢酸エチル (75 mL) で希釈し、そして飽和重炭酸ナトリウム水溶液 100 mL で洗浄した。酢酸エチル層を分離し、そして無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。ヘキサン中の 15% 酢酸エチルを使用するシリカでの T L C 分析は、出発物質を示さず、そして R f = 0.1 の極性生成物の形成を示した。その酢酸エチル溶液を減圧下で濃縮して明黄色の油状物を得た。収量 = 1.63 g。

10

【0112】

b) 化合物 10 b

無水 D M F (20 mL) 中のイサチン (1.12 g、7.6 mmol) の溶液を、窒素下、氷浴中で冷却し、そして水素化ナトリウム (0.366 g、1.2 当量、鉱油中 60% 分散液) で処理した。反応物を氷浴中で 30 分間攪拌し、そして次に、化合物 10 a (1.63 g、7.6 mmol) を D M F (5 mL) 中の溶液として、ヨウ化銅 (2.9 g、2 当量) と共に加えた。反応物を窒素下、140 °C で 24 時間加熱した。次に、それを室温に冷まし、酢酸エチル (30 mL) で希釈し、そして濾過した。溶離剤として酢酸エチル中の 10% メタノールを使用する、濾液のシリカでの T L C は、R f 約 0.1 の極性生成物を示した。濾液を減圧下で濃縮した。残留物を 10% K O H 水溶液 100 mL に懸濁し、そして窒素下、4 時間還流した。次に、反応混合物を室温に冷まし、そして pH 5 になるまで 2 N H C l で酸性化した。黄色の沈殿物が現れ、それを濾過により回収し、そして真空下で乾燥させた。収量 = 0.6 g。この化合物をそのまま次の反応に使用した。

20

【0113】

c) 化合物 10 c

無水ピリジン (15 mL) 中の化合物 10 b (0.2 g、0.714 mmol) の懸濁液を、窒素下、p - トルエンシルホニルクロリド (272 mg、2 当量) で処理した。5 分間簡単に攪拌した後、メチル 2,6 - ジメチル - 4 - ヒドロキシベンゾアート (128 mg、0.714 mmol) を加えた。得られた反応物を室温で3日間攪拌した。次に、溶媒を減圧下で除去し、そして残留物を酢酸エチル (40 mL) と 1 N H C l (50 mL) で分液した。生成物を含む H C l 層を分離し、そして酢酸エチルで 2 回 (2 x 40 mL) 洗浄した。次に、H C l 溶液を氷浴中で冷却し、そして黄色の沈殿物が分離するまで 5% K O H 水溶液を滴下して処理した (p H 約 8)。この懸濁液を、酢酸エチル (2 x 50 mL) で抽出した。合わせた酢酸エチル抽出物を、水で 1 回洗浄し、そして無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。次に、溶媒を減圧下で除去し、そして粗生成物を、溶離剤として酢酸エチルを使用するシリカでのフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。収量 = 95 mg (30%) ; MALDI-TOF MS 443.7 実測値。

30

【0114】

d) 化合物 10 e

イオン性液体 [B M I M] [P F 6] (0.5 mL) 中の化合物 10 c (22 mg、49.5 μmol)、1,3 - プロパンスルトン (120 mg、20 当量) 及び 2,6 - ジ - tert - ブチルピリジン (81.5 μL、7.5 当量) の混合物を、150 °C で 24 時間加熱した。次に、反応物を室温に冷まし、そして少量 (1 ~ 2 μL) を抜き取り、メタノールで希釈し、そして Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm x 25 cm カラム及び 1.0 mL / 分の流速での 10 ~ 70% B (A = 0.05% T F A を含む水、B = 0.05% T F A を含む M e C N) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での U V 検出を使用する H P L C によって分析した。生成物 10 d が、R t = 17.2 分にて溶離して観察された (約 40% 変換)。反応混合物を、セクション (b)、実施例 5 に記載したように処理した。アクリジニウムエステル 10 d を、窒素下、1 N H C l 10 mL 中で 2 時間還流し、そして室温に冷ました。反応混

40

50

合物のHPLC分析は、 $R_t = 14.0$ 分で溶離する生成物10eの完全な形成を示した。生成物を、YMC、 C_{18} 30×300mmカラム及び20mL/分の溶媒流速での10-70%B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の30分間勾配ならびに260nmでのUV検出を使用する分取HPLCによって精製した。生成物を含有するHPLC画分を合わせ、そして減圧下で濃縮して化合物10eを得た。収量 = 14.5mg (全体で44%) ; MALDI-TOF MS 673.3 実測値。

【0115】

c) 化合物10f

DMF (1.8mL) 及び水 (0.2mL) 中の化合物10e (14.5mg、21.5 μ mol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (18.8 μ L、5当量) 及びTSTU (32mg、5当量) で処理した。反応物を室温で撹拌した。15分後、少量の反応混合物のHPLC分析を、Phenomenex、 C_{18} 4.6mm×25cmカラム及び1.0mL/分の流速での10-70%B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN) の30分間勾配ならびに260nmでのUV検出を使用して実施した。生成物が、 $R_t = 16.5$ 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。生成物を、YMC、 C_{18} 30×300mmカラム及び20mL/分の溶媒流速での10-70%B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN) の30分間勾配ならびに260nmでのUV検出を使用する分取HPLCによって精製した。生成物10fを含有するHPLC画分を合わせ、-80℃で凍結し、そして凍結乾燥した。収量 = 14mg (85%) ; MALDI-TOF MS 769.5 実測値。

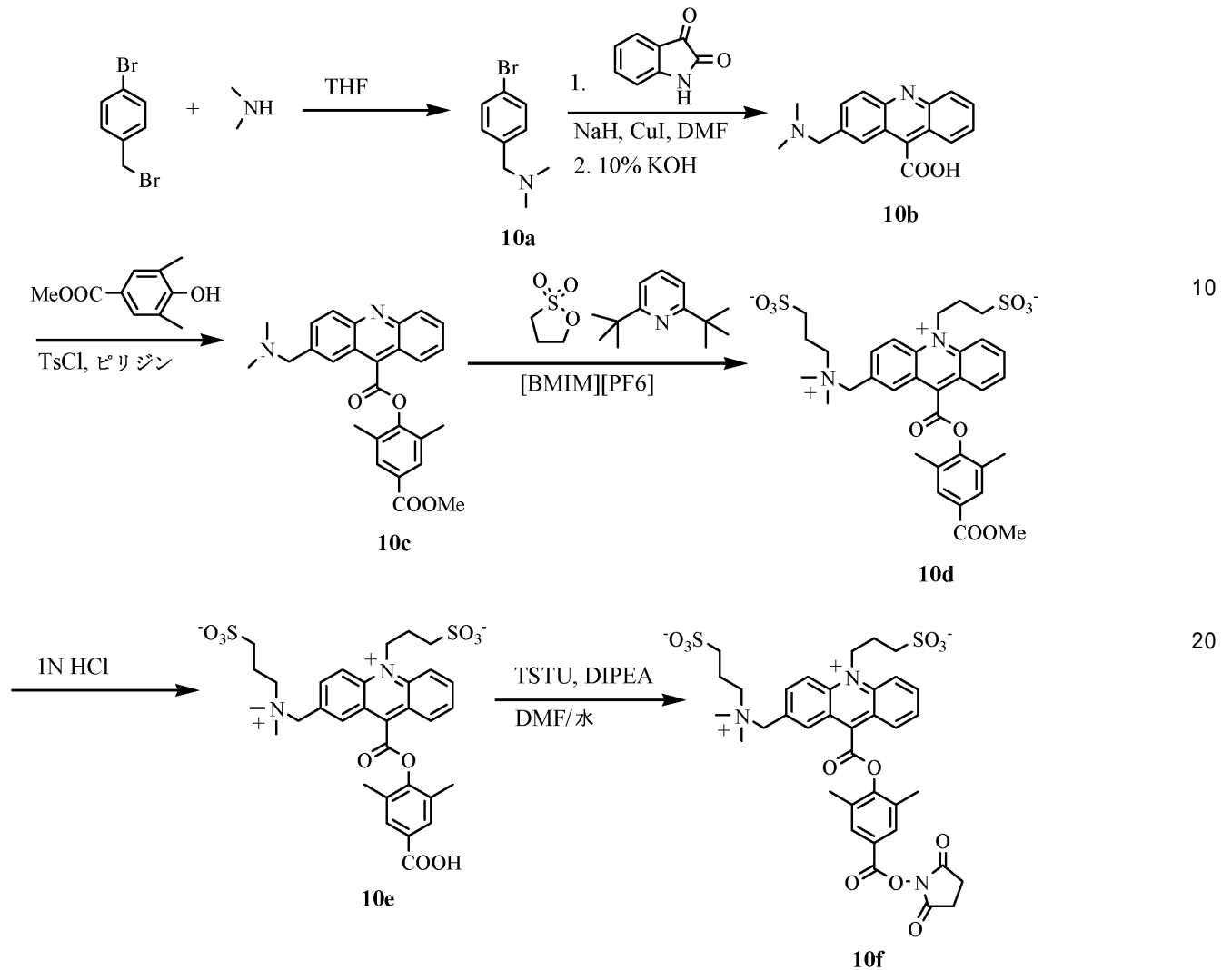
10

20

【0116】

以下の反応は、NSP-2Z-DMAE-NHS、化合物10fの合成を説明するものである。

【化 4 2】



【 0 1 1 7 】

実施例 1 1

N S P - D M A E - Z - N H S、化合物 1 1 f の合成

a) 化合物 1 1 a

クロロホルム (40 mL) 中の N, N - ビス (3 - アミノプロピル) メチルアミン (1 g、6.9 mmol) の溶液を、ベンジルオキシカルボニルスクシンイミド (3.78 g、2.2 当量) で処理した。反応物を室温で 16 時間攪拌した。酢酸エチル中の 15% メタノールを使用する反応混合物のシリカでの TLC 分析は、完全反応での極性生成物の形成を示した。反応混合物を、クロロホルム (40 mL) で希釈し、そして飽和重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄した。次に、それを、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして減圧下で濃縮して粘性油状物を得た。それは貯蔵すると凝固してロウ状の固体になった。収量 = 3.2 g; MALDI-TOF MS 414.4 実測値。

【 0 1 1 8 】

b) 化合物 1 1 b

無水 DMF (15 mL) 中の化合物 1 1 a (1.2 g、2.9 mmol) の溶液を、1, 3 - プロパンスルトン (0.71 g、2 当量) で処理した。反応物を窒素下、145 °C で 1 時間加熱した。少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈、4.6 mm × 25 cm カラム及び 1.0 mL/分の流速での 10 - 70% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物が、R_t = 19.6 分にて溶離 (約 80% 変換)、出発物質が

R t = 21.6分にて溶離して観察された。反応混合物を減圧下で濃縮し、そして回収した油状物を、メタノール(20 mL)に溶解した。40%メタノール、60%酢酸エチルを使用するシリカでのTLC分析は、出発物質(R f 約0.3)から生成物(R f 約0.2)の完全な分離を示した。上記の反応を、同じ規模で繰り返し、そして合わせた反応混合物を、溶離剤として40%メタノール、60%酢酸エチルを使用するシリカでのフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。収率 = 1.55 g (60%) ; 白色の泡状物 ; MALDI-TOF MS 536.4 実測値。

【0119】

c) 化合物 11c

化合物 11b (0.8 g、1.49 mmol) を、33% HBr / AcOH 15 mL 中、室温で24時間撹拌した。次に、エーテル(100 mL)を加えると、白色の粒状固体が分離した。生成物を沈降させ、そしてエーテルをデカントした。この手順を、エーテルで2回(2 x 50 mL)繰り返した。最後に、生成物を真空下で乾燥させた。回収した粘性油状物を、水 5 ~ 6 mL に溶解し、-80 に凍結し、そして凍結乾燥して、ガラス状固体を得た。収量 = 0.766 g (定量的) ; MALDI-TOF MS 268.2 実測値。可視化のために25%アンモニア、75%メタノール及びニンヒドリンを使用するシリカでのTLC分析が、R f 約0.2の単一スポットを示した。

10

【0120】

d) 化合物 11d

DMF (3 mL) 中のNSP - DMAE (30 mg、61 μmol、米国特許第6,664,043 (B2)号)の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン(16 μL、1.5当量)及びTSTU (22 mg、1.2当量)で処理した。反応物を室温で撹拌した。15分後、少量の反応混合物のHPLC分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm x 2.5 cmカラム及び1.0 mL/分の流速での10-70% B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の30分間勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用して実施した。生成物がR t = 20分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。このNHSEステルのDMF溶液(1.5 mL)の半分を、DMF (1 mL)及び0.15 M 重炭酸ナトリウム(1 mL)に溶解した化合物 11c (50 mg、0.187 mmol、遊離アミン形態)の溶液に、滴下した。反応物を室温で撹拌した。3時間後、HPLC分析は、12.4分にて溶離して、生成物 11d への完全な変換を示した。10-40% B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の40分間勾配を使用して、生成物をR t = 19.2分にて溶離した。

20

30

【0121】

生成物を、YMC、C₁₈ 30 x 300 mmカラム及び2.0 mL/分の溶媒流速での10-40% B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の40分間勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用する分取HPLCによって精製した。生成物 11d を含有するHPLC画分を合わせ、そして減圧下で濃縮した。収率 = 1.9 mg (83%) ; MALDI-TOF MS 743.2 実測値。

【0122】

e) 化合物 11f

メタノール(3.6 mL)及び水(0.4 mL)中の化合物 11d (45 mg、60.6 μmol)の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン(53 μL、5当量)及びグルタル酸無水物(35 mg、5当量)で処理した。反応物を室温で撹拌した。15分後、少量の反応混合物のHPLC分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm x 2.5 cmカラム及び1.0 mL/分の流速での10-70% B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の30分間勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用して実施した。生成物 11e がR t = 14分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。次に、溶媒を減圧下で除去した。残留物を、DMF (3.6 mL)及び水(0.4 mL)に溶解した。この溶液を、ジイソプロピルエチルアミン(106 μL、10当量)及びTSTU (182 mg、10当量)で処理した。反応物を室温で撹拌した。10分後、HPLC分析は、R t = 15.3

40

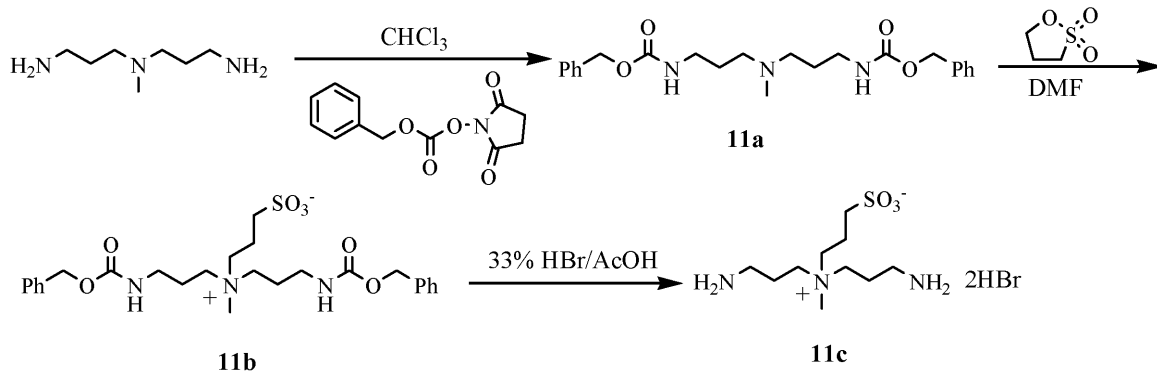
50

分で溶離する生成物 11f への完全な変換を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mmカラム及び 20 mL / 分の溶媒流速での 10 - 40 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 40 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物 11f を含有する HPLC 画分を合わせ、-80 °C で凍結し、そして凍結乾燥した。収率 = 28.7 mg (50 %) ; MALDI-TOF MS 955.2 実測値。

【0123】

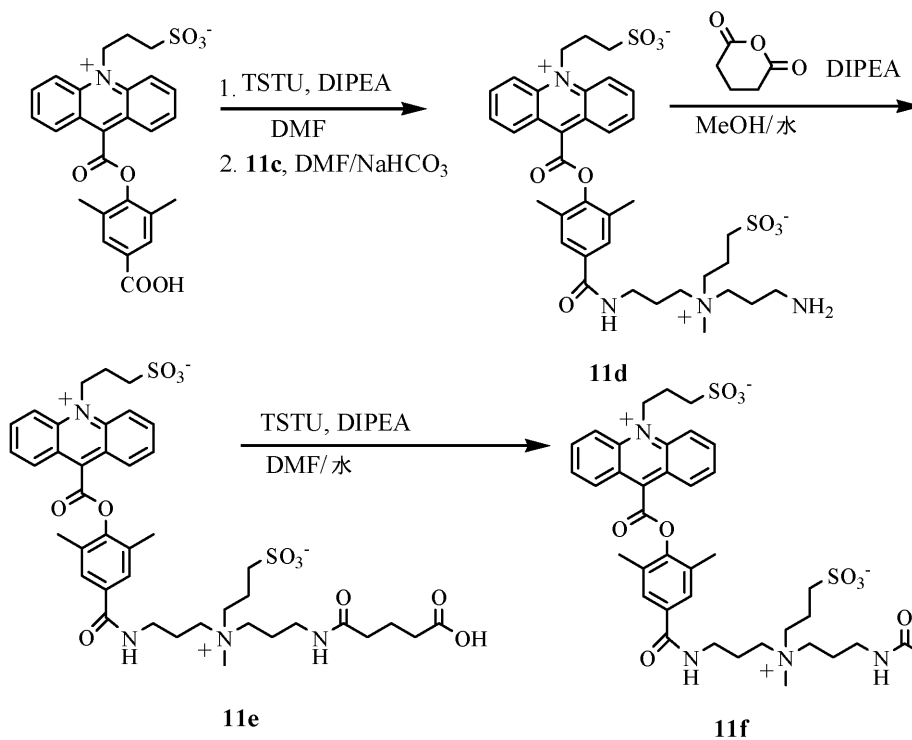
以下の反応は、NSP-DMAE-Z-NHS、化合物 11f の合成を説明するものである。

【化43】



10

20



30

40

【0124】

実施例 12

NSP-2, 7-DMG-DMAE-Z-NHS、化合物 12h の合成

a) 1, 3-ジメトキシグリセロール、化合物 12a

無水メタノール (100 mL) を、水酸化カリウムペレット (25 g, 0.446 mol) で処理し、そしてその懸濁液を、全ての塩基が溶解するまで室温で撹拌した。次に、この溶液を氷浴中で冷却し、そしてエピクロロヒドリン (0.223 mol, 20.6 g) を滴下した。添加の完了後、反応物を室温に温め、そして窒素下、油浴中で、75 ~ 80 °C で 16 時間加熱した。次に、反応物を、室温に冷まし、そして濾過した。濾液を減圧下で濃

50

縮した。回収した油状物を、酢酸エチル（150 mL）に溶解し、そして再度濾過し、そして次に減圧下で濃縮した。無色の油状物（21.5 g）を回収し、それを真空蒸留によって精製して、1,3-ジメトキシグリセロール、化合物12a 12.9 g（50%）を得た。

【0125】

b) 化合物12b

無水ピリジン（20 mL）中の1,3-ジメトキシグリセロール、化合物12a（1 g、8.3 mmol）の溶液を、p-トルエンスルホニルクロリド（2.38 g、1.5 当量）及び4-ジメチルアミノピリジン（0.253 g、0.25 当量）で処理した。反応物を窒素下、室温で3日間攪拌した。次に、溶媒を減圧下で除去し、そして残留物を酢酸エチル（100 mL）と1N HCl（50 mL）で分液した。酢酸エチル層を分離し、そして1N HCl（50 mL）で1回、続いて重炭酸ナトリウム水溶液（3×50 mL）で洗浄した。次に、それを無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして減圧下で濃縮した。粗生成物（2.5 g）を、溶離剤としてヘキサン中の20%酢酸エチルを使用するシリカでのフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。収量 = 1.79 g（65%）。

10

【0126】

c) 化合物12c

無水DMF（6 mL）中の2,7-ジヒドロキシアクリジンメチルエステル（0.1 g、0.24 mmol）、化合物12b（0.4 g、1.45 mmol）及び炭酸セシウム（0.2 g、2.5 当量）の溶液を、窒素下、油浴中、90~100 で加熱した。5時間後、反応物を室温に冷ました。少量の反応混合物のHPLC分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm×2.5 cmカラム及び1.0 mL/分の流速での10~100%B（A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN）の30分間勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用して実施した。生成物が、Rt = 26.5分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。次に、溶媒を減圧下で除去し、そして残留物を、酢酸エチル（50 mL）と水（50 mL）で分液した。酢酸エチル層を分離し、そして水で2回（2×50 mL）洗浄した。次に、それを無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして減圧下で濃縮した。粗生成物（0.37 g）を、1:1、酢酸エチル/ヘキサンを使用するシリカでの分取TLCによって精製した。精製済み収量 = 58 mg（40%）；MALDI-TOF MS 623.1 実測値。

20

30

【0127】

d) 化合物12e

化合物12c（58 mg、93.25 μmol）、蒸留した1,3-プロパンスルホン（1.14 g、100 当量）及び重炭酸ナトリウム（78 mg、10 当量）の混合物を、140~150 で加熱した。2時間後、反応物を室温に冷ました。少量の反応混合物のHPLC分析は、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm×2.5 cmカラム及び1.0 mL/分の流速での10~100%B（A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN）の30分間勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用して実施した。生成物12dが、Rt = 20分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。反応混合物を、1:1、酢酸エチル/ヘキサン 20 mLで処理し、そして混合物を短時間超音波処理してガム状物を分散させた。生成物を沈降させ、そして溶媒をデカントによって除去した。粗生成物を真空下で乾燥させ、そして次に、1N HCl 10 mLに懸濁し、そして窒素下で3時間還流した。次に、それを、室温に冷まし、そしてHPLCによって分析すると、メチルエステルの完全な加水分解を示し、生成物12eがRt = 17.0分で溶離した。生成物を、YMC、C₁₈ 30×300 mmカラム及び2.0 mL/分の溶媒流速での10~100%B（A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN）の40分間勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用する分取HPLCによって精製した。生成物12eを含有するHPLC画分を合わせ、そして減圧下で濃縮した。収量 = 56 mg（82%）；MALDI-TOF MS 730.9 実測値。

40

【0128】

50

e) 化合物 1 2 f

DMF (3 mL) 中の化合物 1 2 e (5.5 mg, 7.5 × 10⁻³ μmol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (20 μL, 1.5 当量) 及び TSTU (2.7 mg, 1.2 当量) で処理した。反応物を室温で撹拌した。10 分後、少量の反応混合物の HPLC 分析は、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 2.5 cm カラム及び 1.0 mL/分の流速での 10 : 100 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。NHS エステルが Rt = 1.8 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。次に、NHS エステルの DMF 溶液を、水 (1.68 mL) 及び 0.5 M 重炭酸ナトリウム (1.68 mL) に溶解した化合物 1 1 c (1.68 mg, 0.376 mmol, 2 HBr 塩) の溶液に滴下した。反応物を室温で撹拌した。30 分後、HPLC 分析は、12.4 分で溶離する生成物 1 2 e への完全な変換を示した。

10

【0129】

生成物を、YMC、C₁₈ 3.0 × 3.0 mm カラム及び 2.0 mL/分の溶媒流速での 10 : 100 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 40 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物 1 2 f を含有する HPLC 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮した。収量 = 63.8 mg (86 %) ; MALDI-TOF 979.1MS 実測値。

【0130】

f) 化合物 1 2 h

メタノール (4.0 mL) 中の化合物 1 2 f (63.8 mg, 65.2 μmol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (57 μL, 5 当量) 及びグルタル酸無水物 (7.4 mg, 5 当量) で処理した。反応物を室温で撹拌した。15 分後、少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 2.5 cm カラム及び 1.0 mL/分の流速での 10 : 100 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物 1 2 g が、Rt = 1.3.5 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。次に、溶媒を減圧下で除去した。残留物を、DMF (5.4 mL) 及び水 (0.6 mL) に溶解した。この溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (114 μL, 1.0 当量) 及び TSTU (200 mg, 1.0 当量) で処理した。反応物を室温で撹拌した。15 分後、HPLC 分析は、Rt = 14.3 分で溶離する生成物 1 2 h への完全な変換を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 3.0 × 3.0 mm カラム及び 2.0 mL/分の溶媒流速での 10 : 70 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 40 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物 1 2 h を含有する HPLC 画分を合わせ、-80 °C で凍結し、そして凍結乾燥した。収量 = 49.3 mg (63 %) ; MALDI-TOF MS 1188.9 実測値。

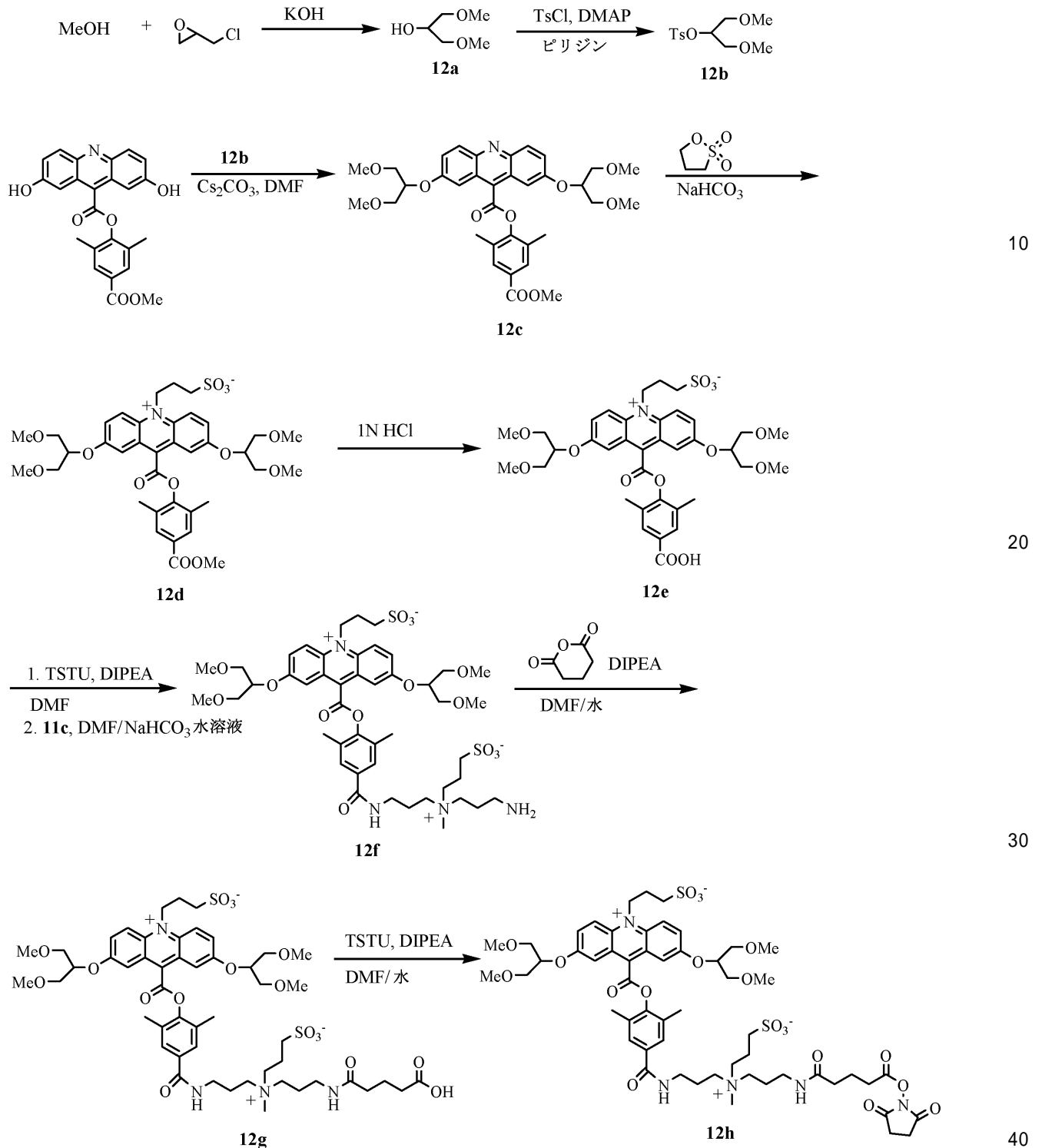
20

30

【0131】

以下の反応は、NSP-2, 7-DMG-DMAE-Z-NHS、化合物 1 2 h の合成を説明するものである。

【化 4 4】



10

20

30

40

【 0 1 3 2 】

実施例 13

NSP-DMAE-Z2-NHS、化合物 13 e の合成

a) 化合物 13 a

無水エーテル (5 mL) 中の 2-クロロエタンスルホニルクロリド (0.126 mL、1.2 mmol) の溶液を、窒素雰囲気下、氷塩浴中、 -5°C に冷却し、そして 2,6-ルチジン (0.14 mL、1.2 mmol) で一度に処理した。反応物を、 -5°C で 30 分間攪拌し、次に室温に温めた。次に、反応物を、ガラスウールを通して濾過して、酢酸 (5 mL) に溶解した 11a (0.325 g、0.79 mmol) の攪拌した溶液に注いだ。4~5 時間後、溶媒を減圧下で除去した。残留物をトルエン (5 mL) に懸濁し、そして減圧下で濃縮した。

50

粗生成物を水 (50 mL) と酢酸エチル (50 mL) で分液した。水層を分離し、そしてクロロホルム (50 mL) で1回洗浄した。水層を、水酸化アンモニウムで pH 9 に調整し、そして酢酸エチル (3 × 50 mL) で抽出した。次に、水層を減圧下で濃縮して白色の固体を得た。収量 = 0.18 g、(43%) ; MALDI-TOF MS 522.8 実測値)。

【0133】

少量の生成物の HPLC 分析を、Phenomenex PRODIGY、C₁₈ 10 mm × 25 cm カラム及び 4.0 mL / 分の流速での 10-70% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。清浄な生成物が Rt = 21 分にて溶離して、そして出発物質がないことが観察された。

10

【0134】

b) 化合物 13 b

化合物 13 a (78 mg、0.15 mmol) を、33% HBr / AcOH 5 mL 中、室温で 24 時間攪拌した。次に、エーテル (75 mL) を加えると、白色の粒状固体が分離した。生成物を沈降させ、そしてエーテルをデカントした。この手順を、エーテルで 2 回 (2 × 50 mL) 繰り返した。最後に、生成物を真空下で乾燥させた。収量 = 48 mg (77%)。この物質をそのまま次の反応に使用した。

【0135】

c) 化合物 13 c

DMF (1 mL) 中の NSP - DMAE (14 mg、28.4 μmol、米国特許第 6,664,043 (B2) 号) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (7.4 μL、1.5 当量) 及び TSTU (10.3 mg、1.2 当量) で処理した。反応物を室温で攪拌した。30 分後、少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 25 cm カラム及び 1.0 mL / 分の流速での 10-70% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物が、Rt = 20 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった。この NHS エステルの DMF 溶液を、0.25 M 重炭酸ナトリウム (3 mL) に溶解した化合物 13 b (48 mg、0.116 mmol、HBr 塩) の溶液に滴下した。反応物を、室温で攪拌した。30 分後、HPLC 分析は、12.4 分間で溶離する生成物 13 c への完全な変換を示した。

20

30

【0136】

生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mm カラム及び 2.0 mL / 分の溶媒流速での 10-60% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 40 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用する分取 HPLC によって精製した。生成物 13 c を含有する HPLC 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮した。収量 = 19 mg (90%)。

【0137】

d) 化合物 13 e

メタノール (3.6 mL) 及び水 (0.4 mL) 中の化合物 13 c (19 mg、26.1 μmol) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (22.8 μL、5 当量) 及びグルタル酸無水物 (15 mg、5 当量) で処理した。反応物を室温で攪拌した。30 分後、少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 25 cm カラム及び 1.0 mL / 分の流速での 10-70% B (A = 0.05% TFA を含む水、B = 0.05% TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物 13 d が、Rt = 14.6 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった (> 80%)。次に、溶媒を減圧下で除去した。残留物を、DMF (3.6 mL) 及び水 (0.4 mL) に溶解した。この溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (45.6 μL、10 当量) 及び TSTU (79 mg、10 当量) で処理した。反応物を室温で攪拌した。15 分後、HPLC 分析は、Rt = 15.7 分で溶離する生成物 13 e への完全な変換を示した。生成物を、YMC、C₁₈ 30 × 300 mm カラム及び 2.0 mL / 分の溶媒流速での 10-60% B (A =

40

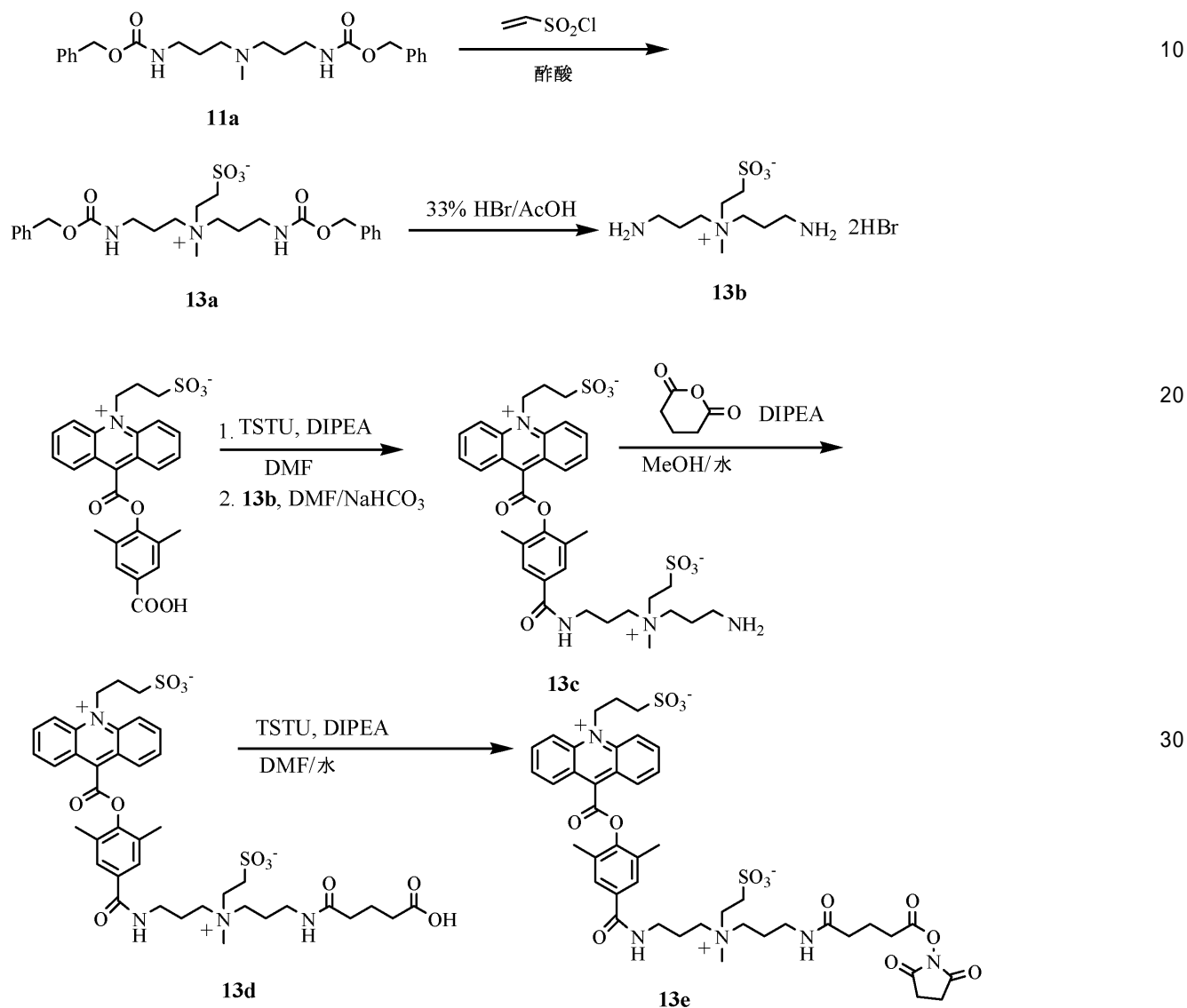
50

0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の40分間勾配ならびに260nmでのUV検出を使用する分取HPLCによって精製した。生成物13eを含有するHPLC画分を合わせ、-80で凍結し、そして凍結乾燥した。収量 = 15mg (60%)。

【0138】

以下の反応は、NSP-DMAE-Z2-NHS、化合物13eの合成を説明するものである。

【化45】



【0139】

実施例14

NSP-DMAE-ZCB-NHS、化合物14dの合成

a) 化合物14a

MeCN (5mL)に溶解した11a (0.6g、1.45mmol)の溶液を、アクリル酸 (1mL、1.45mmol)で処理した。反応物を室温で36時間攪拌した。次に、溶媒を減圧下で除去し、そして粗生成物を、溶離剤として3:2、MeOH:EtOAcを使用するシリカでのフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。生成物を含有する画分を合わせ、そして減圧下で濃縮した。収量 = 0.432g、(61%) ; MALDI-TOF MS 486.1 (実測値)。

【0140】

b) 化合物14b

40

50

化合物 14 a (0 . 43 g、 0 . 88 mmol) を、 33 % H B r / A c O H 10 mL 中、室温で 24 時間攪拌した。次に、エーテル (100 mL) を加えると、白色の粒状固体が分離した。生成物を沈降させ、そしてエーテルをデカントした。この手順をエーテルで 4 回 (4 × 50 mL) 繰り返した。最後に、生成物を真空下で乾燥させた。次に、それを水 (5 mL) に溶解し、凍結し、そして凍結乾燥した。収量 = 0 . 35 g (定量的) ; MALDI-TOF MS 218.3 実測値。

【 0141 】

c) 化合物 14 c

D M F (2 mL) 中の N S P - D M A E (25 mg、 51 . 0 μ mol、 米国特許第 6 , 664 , 043 (B2) 号) の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン (11 . 3 μ L、 1 . 5 当量) 及び T S T U (18 . 3 mg、 1 . 2 当量) で処理した。反応物を室温で攪拌した。30 分後、この N H S エステルの D M F 溶液を、 0 . 25 M 重炭酸ナトリウム (0 . 8 mL) に溶解した化合物 14 b (80 mg、 0 . 2 mmol、 H B r 塩) の溶液に滴下した。反応物を室温で攪拌した。30 分後、Phenomenex、 C₁₈ 4 . 6 mm × 25 cm カラム及び 1 . 0 mL / 分の流速での 10 - 70 % B (A = 0 . 05 % T F A を含む水、 B = 0 . 05 % T F A を含む M e C N) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での U V 検出を使用して実施した H P L C 分析は、 12 . 0 分間で溶離する生成物 14 c への完全な変換を示した。

10

【 0142 】

生成物を、YMC、 C₁₈ 30 × 300 mm カラム及び 20 mL / 分の溶媒流速での 10 - 60 % B (A = 0 . 05 % T F A を含む水、 B = 0 . 05 % T F A を含む M e C N) の 40 分間勾配ならびに 260 nm での U V 検出を使用する分取 H P L C によって精製した。生成物 14 c を含有する H P L C 画分を合わせ、そして減圧下で濃縮した。収量 = 38 mg (定量的) ; MALDI-TOF MS 692.9 実測値。

20

【 0143 】

e) 化合物 14 d

D M F (1 . 0 mL) 及び D M S O (2 . 0 mL) 中の化合物 14 c (20 mg、 29 μ mol) の溶液を、ジイソプロピルチルアミン (diisopropylthylamine) (8 . 6 μ L、 2 当量) で処理し、 D M F (1 mL) 中のグルタル酸ジスクシンイミジル (38 mg、 0 . 117 mmol) の攪拌した溶液に滴下した。この反応物を室温で攪拌した。60 分後、少量の反応混合物の H P L C 分析を、Phenomenex、 C₁₈ 4 . 6 mm × 25 cm カラム及び 1 . 0 mL / 分の流速での 10 - 70 % B (A = 0 . 05 % T F A を含む水、 B = 0 . 05 % T F A を含む M e C N) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での U V 検出を使用して実施した。生成物 14 d が、 R t = 15 . 0 分にて溶離して観察され、それは主要成分であった (> 70 %) 。この生成物を、YMC、 C₁₈ 30 × 300 mm カラム及び 20 mL / 分の溶媒流速での 10 - 60 % B (A = 0 . 05 % T F A を含む水、 B = 0 . 05 % T F A を含む M e C N) の 40 分間勾配ならびに 260 nm での U V 検出を使用する分取 H P L C によって精製した。生成物 14 d を含有する H P L C 画分を合わせ、 - 80 ° で凍結し、そして凍結乾燥した。収量 = 4 mg (15 %) ; MALDI-TOF MS 905.5 実測値。

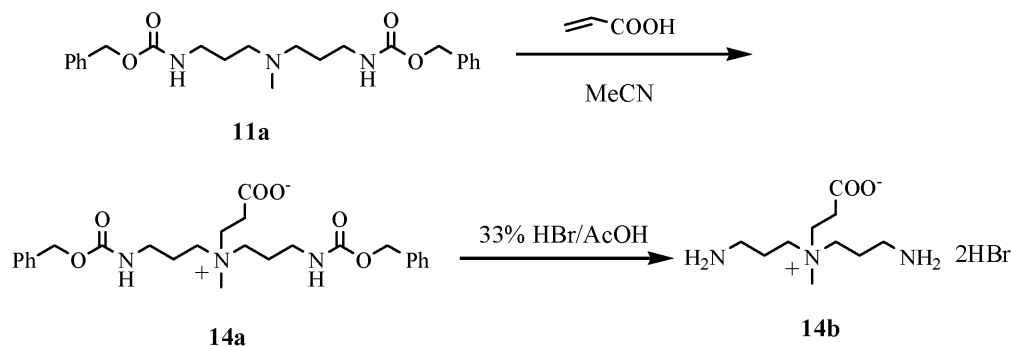
30

【 0144 】

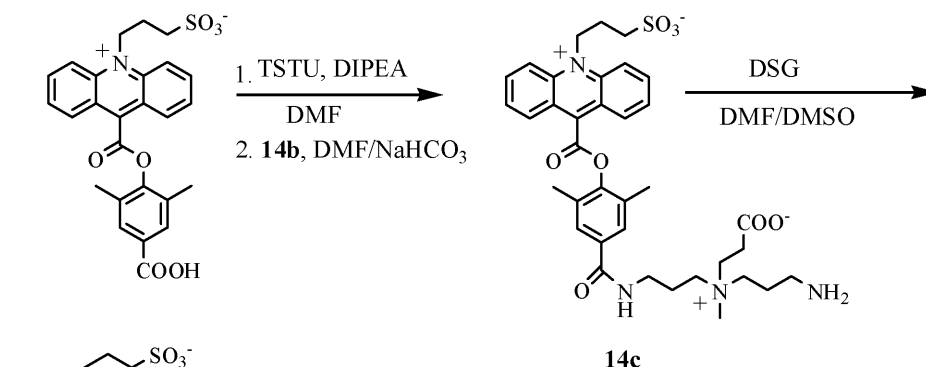
以下の反応は、 N S P - D M A E - Z C B - N H S、化合物 14 d の合成を説明するものである。

40

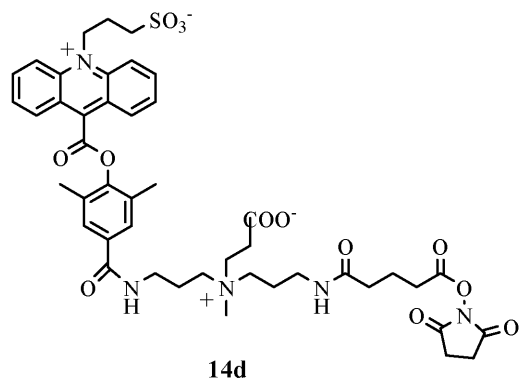
【化 4 6】



10



20



30

【 0 1 4 5 】

実施例 1 5

CN - NSP - DMAE - Z3 - NHS、化合物 15 f の合成

a) 化合物 15 a

塩化チオニル (5 mL) 中の NSP - DMAE メチルエステル (0.223 g、0.44 mmol) の懸濁液を、窒素雰囲気下、80 で激しく撹拌しながら加熱した。1 時間後、暗色の溶液が形成され、これを室温に冷ました。ヘキサン (50 mL) を加え、そして暗褐色の粘着性固体を分離させた。ヘキサンをデカントし、そして残留物をヘキサン (25 mL) で一回すすぎ、そして真空下で非常に軽く乾燥させた。この粘着性固体に、無水 MeCN (10 mL) 中の N, N - ジメチルエチレンジアミン (10 mL、過剰量) の溶液を加えた。暗褐色の溶液が形成され、これを室温で撹拌した。15 分後、少量の反応混合物の HPLC 分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm x 25 cm カラム及び 1.0 mL / 分の流速での 10 - 70 % B (A = 0.05 % TFA を含む水、B = 0.05 % TFA を含む MeCN) の 30 分間勾配ならびに 260 nm での UV 検出を使用して実施した。生成物 15 a は、R_t = 19 分にて溶離して幅広いピーク (abroad peak) として観察された。反応混合物を減圧下で濃縮し、そして残留物をメタノール (5 mL) に溶解し、トルエン (15 mL) で希釈し減圧下で濃縮して褐色の粘着泡状物を得た。粗収量 = 0.46 g。生成物を、溶離剤としてメタノールを使用するシリカでのフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。収量 = 0.22 g、(87%) ; MALDI-TOF MS 577.9 実測値。

40

50

【0146】

b) 化合物15b

[BMIM][PF6] (3 mL) 中の化合物15a、(0.22 g、0.38 mmol)、蒸留した1,3-プロパンスルホン(0.465 g、10当量、及び2,6-ジ-tertブチルピリジン(0.42 mL、5当量)の混合物を、155 で16時間、激しく攪拌しながら加熱した。次に、それを室温に冷まし、そして酢酸エチル(100 mL)を加えた。生成物が沈殿し、そして濾過により回収し、そして酢酸エチル(25 mL)及びメタノール(20 mL)ですすいだ。次に、粗生成物を、1:1 水/メタノール 50 mLを含むRBフラスコに移した。少量の粗反応混合物のHPLC分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 25 cmカラム及び1.0 mL/分の流速での10-40% B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の40分間勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用して実施した。生成物が、Rt = 33分にて溶離して観察された(約90%変換)。減圧下でこの水溶液を蒸発させて、褐色の固体 0.35 gを得た。MALDI-TOF MS 699.2 実測値。この物質をそのまま次の反応に使用した。

10

【0147】

c) 化合物15c

化合物15b (0.35 g、粗)を1N HCl (20 mL)に懸濁し、そして窒素雰囲気下で1.5時間加熱還流した。セクション(b)に示したHPLC分析が、Rt = 27分間にて溶離する生成物を示した。この反応物を室温に冷ました。生成物15cを、YMC、C₁₈ 30 × 300 mmカラム及び2.0 mL/分の溶媒流速での10-60% B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の40分間勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用する分取HPLCによって精製した。生成物を含有するHPLC画分を合わせ、そして減圧下で濃縮した。収量 = 1.4 mg; MALDI-TOF MS 685.7 実測値。

20

【0148】

d) 化合物15d

DMF (2 mL)中の化合物15c (1.4 mg、2.0 μmol)の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン(6 μL、2当量)及びTSTU (12.3 mg、2当量)で処理した。反応物を室温で攪拌した。10分後、少量の粗反応混合物のHPLC分析を、Phenomenex、C₁₈ 4.6 mm × 25 cmカラム及び1.0 mL/分の流速での10-40% B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の40分間勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用して実施した。22分にて溶離するNHSEステルへの完全な変換が観察された。このDMF溶液を、0.25M 重炭酸ナトリウム(1 mL)中の化合物11c (4.6 mg、5当量、HBr塩)の攪拌した溶液に滴下した。得られた溶液を室温で攪拌した。15分後、HPLC分析が、Rt = 14分にて溶離する主要生成物を示した。

30

【0149】

生成物15dを、YMC、C₁₈ 30 × 300 mmカラム及び2.0 mL/分の溶媒流速での10-60% B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の40分間勾配ならびに260 nmでのUV検出を使用する分取HPLCによって精製した。生成物を含有するHPLC画分を合わせ、そして減圧下で濃縮した。収量 = 1.8 mg (定量的); MALDI-TOF MS 935.8 実測値。

40

【0150】

e) 化合物15f

メタノール(1.8 mL)及び水(0.2 mL)中の化合物15d (1.8 mg、1.9 μmol)の溶液を、ジイソプロピルエチルアミン(26 μL、5当量)及びグルタル酸無水物(1.7 mg、5当量)で処理した。反応物を室温で攪拌した。15分後、セクション(d)に記載したHPLC分析が、Rt = 16.2分にて溶離するグルタル酸誘導体15eへの完全な変換を示した。この反応物をトルエン(5 mL)で希釈し、そして減圧下で濃縮した。残留物をDMF (1.8 mL)及び水(0.2 mL)に溶解し、そしてジイソプロピルエチルアミン(52 μL、10当量)及びTSTU (90 mg、10当量)で処理した。この反応

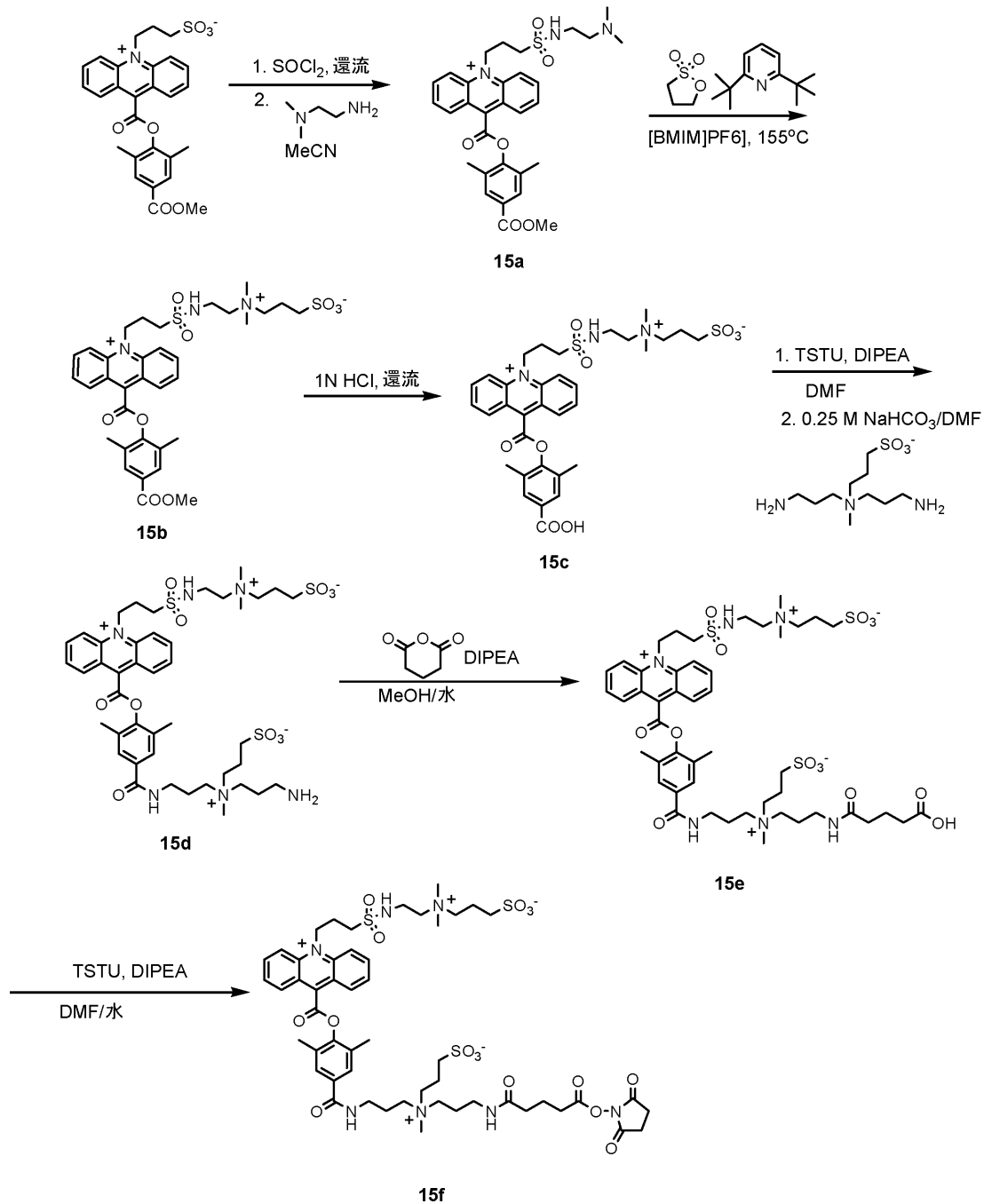
50

物を室温で撹拌した。30分後、HPLC分析が、 $R_t = 19$ 分にて溶離する生成物への完全な変換。生成物15fは、YMC、 C_{18} 、 30×300 mmカラム及び20mL/分の溶媒流速での10-60%B (A = 0.05% TFAを含む水、B = 0.05% TFAを含むMeCN)の40分間勾配ならびに260nmでのUV検出を使用する分取HPLCによって精製した。生成物を含むHPLC画分を合わせ、 -80°C で凍結し、そして凍結乾燥した。収量 = 6.5 mg (30%) ; MALDI-TOF MS 1146.6 実測値。

【0151】

以下の反応は、CN-NSP-DMAE-Z3-NHS、化合物15fの合成を説明するものである。

【化47】



【0152】

実施例16

抗TSH Mabのアクリジニウムエステルでの標識化のための一般手順

抗体の原液 (5 mg/mL、200 μL 、1.0 mg、6.7 nmol) を、0.1 M 炭酸ナトリ

10

20

30

40

50

ウム pH 9 (250 μ L) で希釈して約 2.0 mg/mL 溶液を得た。この溶液に、DMF / 水 1 : 1 溶液又は DMSO のいずれかにおける溶液としてアクリジニウム NHS エステル 10 当量を加えた。例えば、NSP-DMAE-Z-NHS、11f を使用する場合は、これは 64 μ g の添加を必要とし、このアクリジニウムエステルの 5 mg/mL 溶液 (12.8 μ L) として加えた。標識化反応物を 4 で 16 時間穏やかに攪拌し、そして次に、脱イオン水で 4 mL に希釈した。次に、これらの希釈溶液を、4 mL Centricon (商標) フィルター (MW 30,000 カットオフ) に移し、そして 4000 G で遠心分離して容量を約 0.2 mL まで減らした。この手順をさらに 3 回繰り返した。最終的に、濾過された抱合体を、質量スペクトル分析及び RLU 測定のために、総容量 250 μ L の水に希釈した。

【0153】

質量スペクトルを、Voyager DE MALDI-TOF 質量分析計に記録し、そして非標識抗体を基準として使用した。抱合体溶液 約 2 μ L を、シナピン酸 (sinapinic acid) マトリックス溶液 (HP) 2 μ L と混合し、そしてそれを MALDI プレート上に点在させた。完全に乾燥させた後、質量スペクトルを記録した。非標識抗体及び抱合体についての質量値における差から、AE 取り込みの範囲を測定することができた。典型的には、これらの標識化条件下で、約 5 つの AE 標識が、抗体に取り込まれた。

【0154】

実施例 17

化学発光測定

各アクリジニウムエステル標識抗体を、0.1 M リン酸ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウム、6 mM アジ化ナトリウム及び 1 g/L ウシ血清アルブミン (BSA) からなる緩衝液中、0.2 nM の濃度に希釈した。試験した各アクリジニウムエステル-抗体抱合体 10 μ L についての化学発光速度論を、試薬 1 (0.1 M 硝酸及び 0.5 % 過酸化水素) 及び試薬 2 (0.25 M 水酸化ナトリウム及び 0.05 % セチルトリメチル塩化アンモニウム) の各々 300 μ L を順次添加をして、Berthold Technologies Autolumat LB953 照度計を用いて、標準条件下、10 秒ごと (for 10 seconds) 0.1 秒間隔でまとめた。試験したアクリジニウム化合物の化学発光速度論を、光放出の相対速度ならびに総光出力について比較した。

【0155】

実施例 18

非特異的結合の測定

両性イオン性アクリジニウム化合物を、イムノアッセイにおける標識として、同じイムノアッセイにおいて別個に標識として使用した対照アクリジニウム化合物との比較のために、試験した。Siemens Healthcare Diagnostics ACS:180 (登録商標) TSH3 アッセイは、ACS:180 (登録商標) に適用するための Siemens Healthcare Diagnostics によって製造されている商業的に販売されている一連のイムノアッセイのうちの 1 つである。TSH3 アッセイは、サンプル中の分析物 TSH (甲状腺刺激ホルモン) の測定のために抗 TSH 抗体の化学発光アクリジニウム化合物を使用するサンドイッチイムノアッセイである。

【0156】

TSH3 アッセイは 2 つの抗体を有し、そのうちの一方はアクリジニウム化合物に結合したマウス抗体であり、この組合せはトレーサーと呼ばれ、一方、他方の抗体は常磁性粒子 (PMP) に結合し、ここで、この組合せは固相と呼ばれる。このアッセイ例において、両性イオン性アクリジニウム化合物そしてまた対照アクリジニウム化合物の両方とも、同じ抗体の別々の部分に各々結合した。このアッセイ例において、アクリジニウムエステル抱合体すなわちトレーサーが、サンプル中の TSH 分析物が非存在の下で試験された場合に、非特異的結合のみが測定された。トレーサーを、0.15 M N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンサルホン酸 (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) (HEPES)、0.15 M 塩化ナトリウム、7.7 mM アジ化ナトリウム、1.0 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、1.2 mM t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール (Triton X-100)、5 g/L ウシ血清アルブミン (BSA)、

10

20

30

40

50

0.20 g/L アムホテリシン B、0.48 g/L 硫酸ゲンタマイシン、1 g/L マウス Ig G、10 mg/L ヒツジ Ig G、5.0 g/L マウス血清、0.05 g/L antifoam Bを含有する pH 7.7 の緩衝液中、2.2 nM の濃度に希釈した。このアッセイ例において、3つの固相を、アクリジニウム化合物を用いて試験した：Siemens Healthcare Diagnostics TSH3アッセイ固相、Siemens Healthcare Diagnostics iPTH（無傷副甲状腺ホルモン）アッセイ固相（DynaI M280-ストレプトアビジン結合ビオチン化ポリクローナルヤギ抗PTH抗体）及びSiemens Healthcare Diagnostics TnI（トロポニンI）-ウルトラアッセイ（DynaI M270-ストレプトアビジン結合ビオチン化モノクローナルマウス抗TnI抗体）。

【0157】

Siemens Healthcare Diagnostics ACS:180（登録商標）は、異なる分析物についての一連のイムノアッセイを実施するように設計された自動ロボット装置である。Siemens Healthcare Diagnostics ACS:180（登録商標）TSH3アッセイについての自動手順は、TSH分析物を含有しない各々の血清サンプル 200 μ Lを別個のキュベットに分注することで開始した。キュベットは、トレーサー、サンプル及び固相を混合するための光学的に透明又は半透明の容器であり、そしてその中で化学発光を測定する。サンプルは、分析物TSHを含有しなかった。次に、ACS:180（登録商標）が、2.2 nM（0.22 pmol）トレーサー 0.100 mL及び0.3 g/L 固相 0.225 mL（67 μ g）を、サンプルを含有する各キュベット内に分注し、同量のトレーサー及び固相が、試験される全てのアクリジニウム化合物に使用されるようにした。2つのアッセイ試薬のうちの第1試薬は溶液であり、それは、アクリジニウム化合物と抱合した抗TSH抗体を含有した。両性イオン性アクリジニウム化合物及び対照アクリジニウム化合物の両方を、トレーサーのための標識として別個に試験した。トレーサーを、先に記載した手順を使用し、アクリジニウム化合物及びTSH結合マウス抗体を使用して調製及び精製した。各トレーサーにおける1抗体当たりのアクリジニウム化合物の数は、試験した全てのアクリジニウム化合物についてほぼ同じだった。したがって、各アクリジニウム化合物について測定した非特異的結合におけるいかなる差も、アクリジニウム化合物の構造に関連し得る。各キュベット内のトレーサー、サンプル及び固相の混合物を、37 で5.0分間加熱した。キュベット内の混合物からの固相の磁気分離、続くキュベットからの流体の除去、及びキュベット内の固相の水での洗浄によって、非結合トレーサーを固相から除去して、固相及びそれに結合している任意のトレーサー以外の全てを除去した。

【0158】

固相上のアクリジニウム化合物からの化学発光は、Siemens Healthcare Diagnostics ACS:180（登録商標）試薬1及びSiemens Healthcare Diagnostics ACS:180（登録商標）試薬2の各々 0.30 mLの順次添加に続く光放出で開始した。Siemens Healthcare Diagnostics ACS:180（登録商標）試薬1は、0.1M 硝酸及び0.5%過酸化水素であった。Siemens Healthcare Diagnostics ACS:180（登録商標）試薬2は、0.25M 水酸化ナトリウム及び0.05%セチルトリメチル塩化アンモニウムであった。次に、各キュベット内の化学発光を相対光単位（RLU）として測定した、各キュベットが一つのアッセイサンプルに対応する。試験される各アクリジニウム化合物についての非特異的結合を、RLUを単位とする化学発光として測定し、RLU数はSiemens Healthcare Diagnostics ACS:180（登録商標）によって測定された。非特異的結合部分を、トレーサー 0.22 pmolからの各キュベット内への総化学発光入力に対する非特異的結合化学発光の比率として定義する。非特異的結合部分の最小化が、特定シグナルの測定を最大化し、したがって少量の分析物の測定を改善し、そしてイムノアッセイ性能を高める。このアッセイ例において、両性イオン性アクリジニウム化合物は、より低い非特異的結合部分を有し、したがって、イムノアッセイ性能を高めることが期待されるだろう。

【0159】

実施例 19

アクリジニウム抱合体化学発光安定性の測定

10

20

30

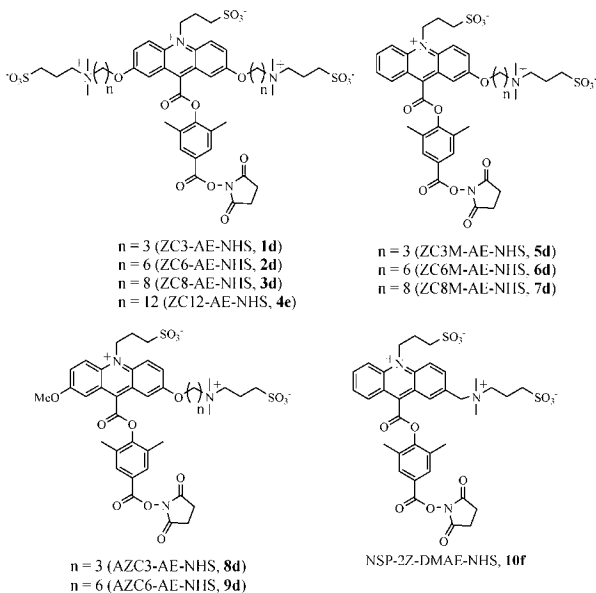
40

50

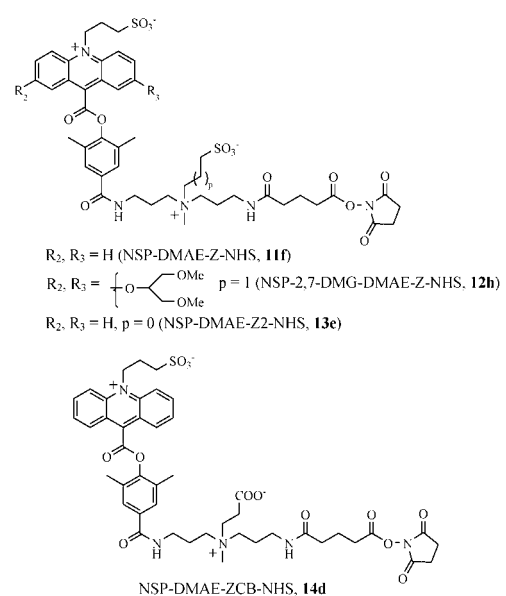
両性イオン性アクリジニウム化合物及び対照アクリジニウム化合物 NSP - DMAE - HEG 及び HQY - AE の抱合体を、0.15 M N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N' - 2 - エタンスルホン酸 (HEPES)、0.15 M 塩化ナトリウム、7.7 mM アジ化ナトリウム、1.0 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、1.2 mM t - オクチルフェノキシポリエトキシエタノール (Triton X-100)、5 g / L ウシ血清アルブミン (BSA)、0.20 g / L アムホテリシン B、0.48 g / L 硫酸ゲンタマイシン、1 g / L マウス Ig G、10 mg / L ヒツジ Ig G、5.0 g / L マウス血清、0.05 g / L antifoam B を含有する pH 7.7 の緩衝液中、0.1 nM の濃度に希釈した。次に、全ての抱合体を、密閉したポリエチレンボトル内で 4 週間、4 または 37 のいずれかで保存した。4 または 37 のいずれかで保存した各トレーサー 10 μ L を、Siemens Healthcare Diagnostics ACS:180 (登録商標) 試薬 1 及び 2 を使用する Siemens Healthcare Diagnostics ACS:180 (登録商標) と同じ化学発光測定方法を使用する、Bertholdt ALB953 化学照度計での化学発光測定のために、定期的に取り除いた。次に、化学発光を、4 または 37 のいずれかにおける保存開始時での各トレーサーについて決定した化学発光に対するパーセンテージとして比較した。対照アクリジニウム化合物に対して高められた又は同等の化学発光安定性が、新規アクリジニウム化合物に対する望ましい特性であり、生成物のより長い又は同等の貯蔵寿命、及びより良好又は同等の日毎の結果の再現性を提供するであろう。

10

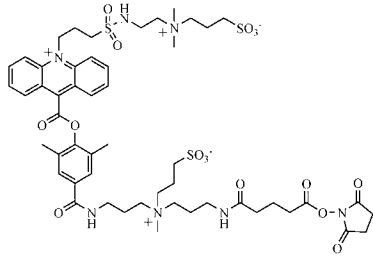
【 図 1 】



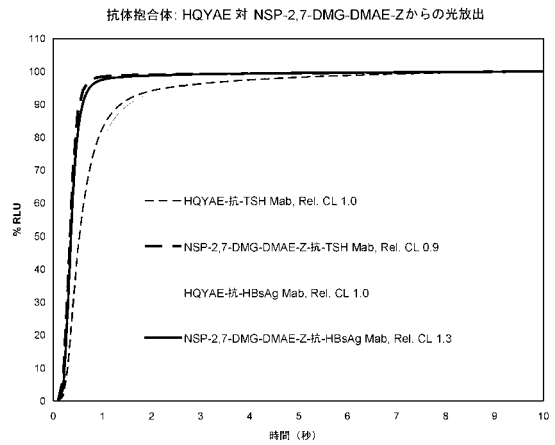
【 図 2 】



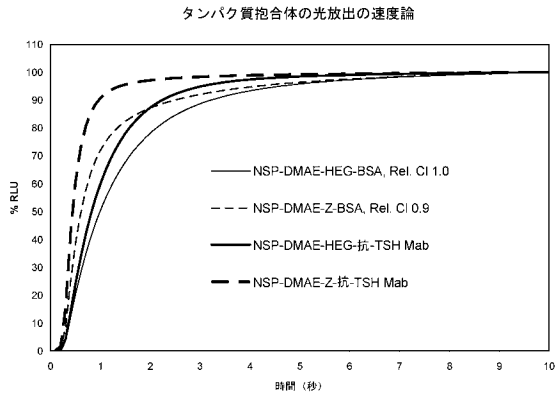
【 図 3 】



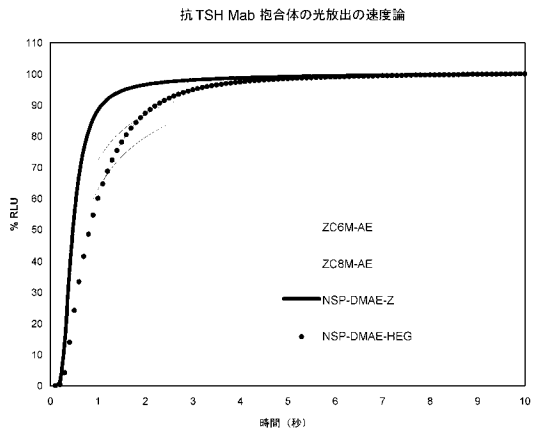
【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】



【手続補正書】

【提出日】平成27年12月4日(2015.12.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

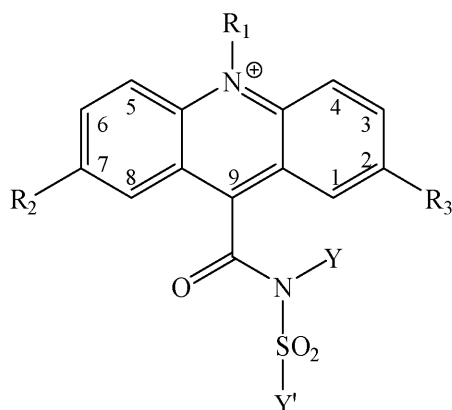
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の構造：

【化67】



[式中、

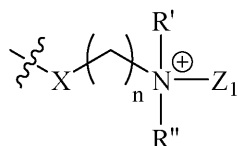
R_1 は、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル又はアラルキル基であり、それらの各々は、最大20個までのヘテロ原子、又はスルホプロピルもしくはスルホブチル基を含有することができるか、あるいは R_1 は、基 - R^a - Z であり；

R_2 及び R_3 は、(i) 水素、(ii) 電子供与基、又は (iii) 基 - Z から独立して選択され；

Y 及び Y' は、独立して、R、- R^a - Z 又は - R^a - L から選択され；ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーとの抱合体を形成するための、脱離基、求電子基又は求核基を含む、誘導体化可能官能基であり；

Z は、形態：

【化68】



で示される両性イオン基であり、

X は、各々出現ごとに独立して、結合、- CH_2 -、酸素、硫黄、- NR^N -、アミド (- NR^N (CO) -)、カルバマート (- NR^N C(O)O -) 又はウレア (- NR^N C(O)NR^N -) から選択され；

R' 及び R'' は、各々出現ごとに独立して、各々が最大20個までのヘテロ原子を含有する、 C_{1-35} アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択され；

Z_1 は、基 - R^a - Z_2 (ここで、 Z_2 は、カルボキシラート (- COO^-)、スルホナート (- SO_3^-)、スルファート (- OSO_3^-)、ホスファート (- $OP(O)($

O R) (O ⁻)) もしくはオキシド (- O ⁻) から選択される) であるか ; 又は、Z₂ が、オキシド (- O ⁻) である場合、R^a は、存在しなくてもよく ;

n は、各々出現ごとに独立して、1 ~ 12 の間の整数から選択され ;

R は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、C₁₋₃₅ アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され ;

R^N は、各々出現ごとに独立して、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を含有する、水素、C₁₋₃₅ アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択され ; そして

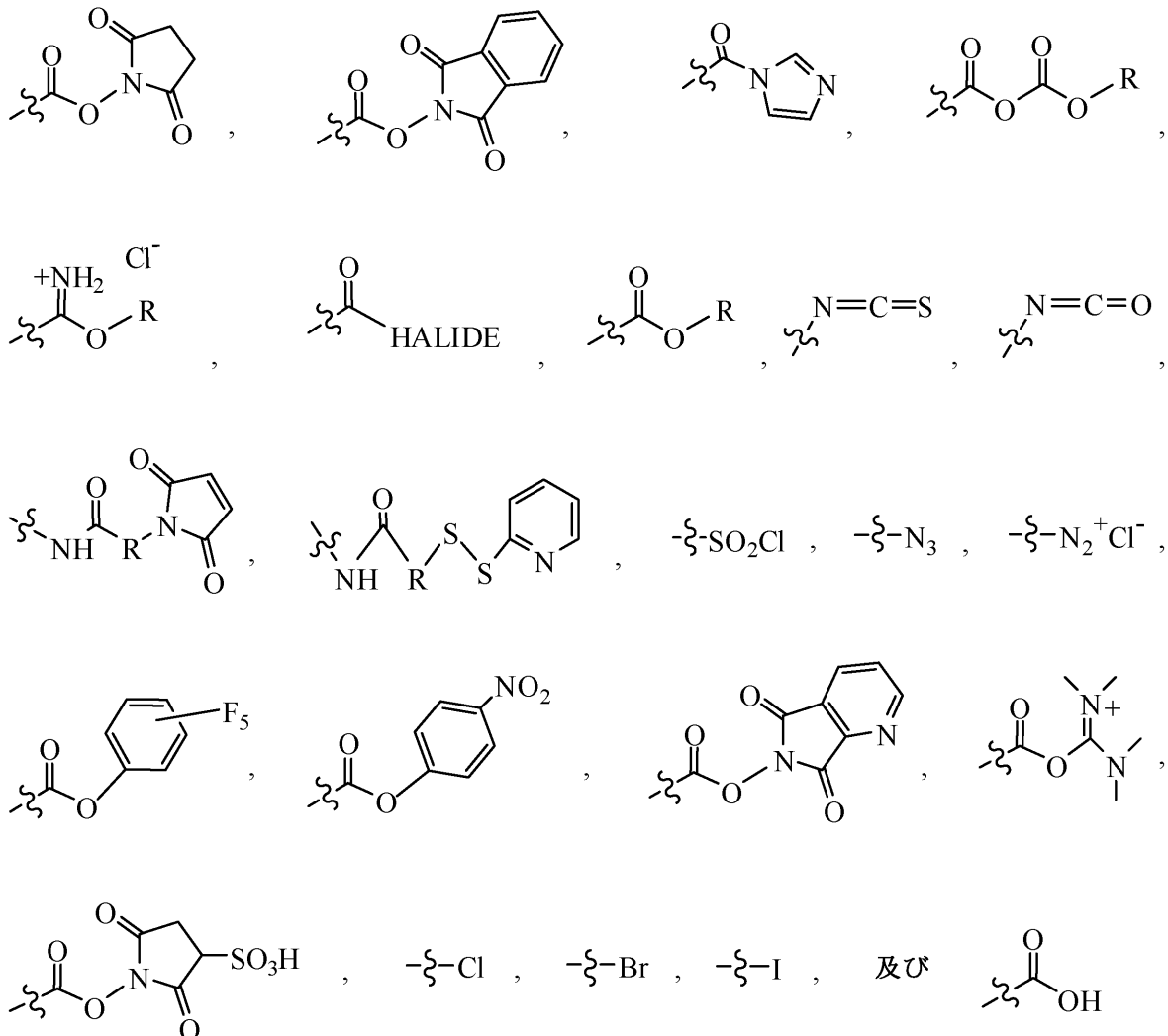
R^a は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、C₁₋₃₅ アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキル基から選択される、二価の基であるが ;

但し、R₁、R₂、R₃、Y 及び Y' のうちの少なくとも 1 つは、前記両性イオン基 Z を含む] を有する化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 2】

L が、

【化 69】



からなる群より選択される、請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 3】

R' 又は R'' が、基 - R^a - L を含む、請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

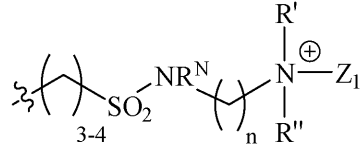
【請求項 4】

R' 又は R'' が、一出現で、基 - R^a - C(O) - CH₂CH₂CH₂ - C(O) - N - スクシンイミジル、- R^a - N - マレイミド、- R^a - C(O) - CH₂ - Br 又は - R^a - C(O) - CH₂ - I である、請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 5】

R₁ が、メチル、スルホプロピル (- CH₂CH₂CH₂ - SO₃⁻)、スルホブチル (- CH₂CH₂CH₂CH₂ - SO₃⁻) 又は構造：

【化 7 0】



[式中、R^N、R'、R''、Z₁ 及び n は、請求項 1 で定義したとおりである] を有する基から選択される、請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

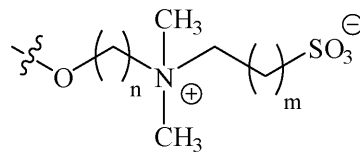
【請求項 6】

R₂ 及び R₃ の一方又は両方が、基 Z である、請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 7】

R₂ 及び R₃ の一方又は両方が、基：

【化 7 1】

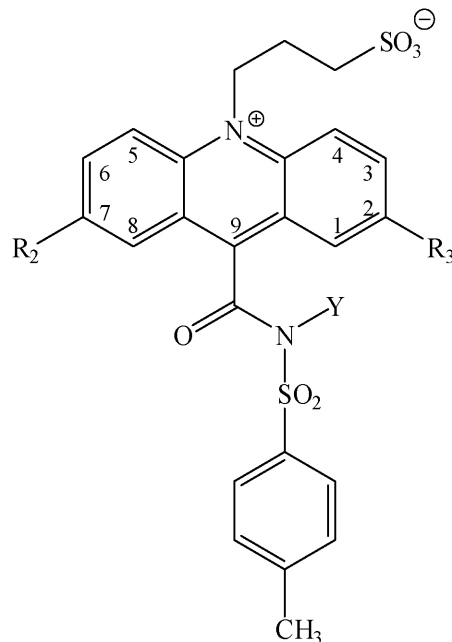


[式中、n は、1 ~ 12 の整数であり、そして m は、0 ~ 3 の整数である] である、請求項 6 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 8】

以下の構造：

【化 7 2】

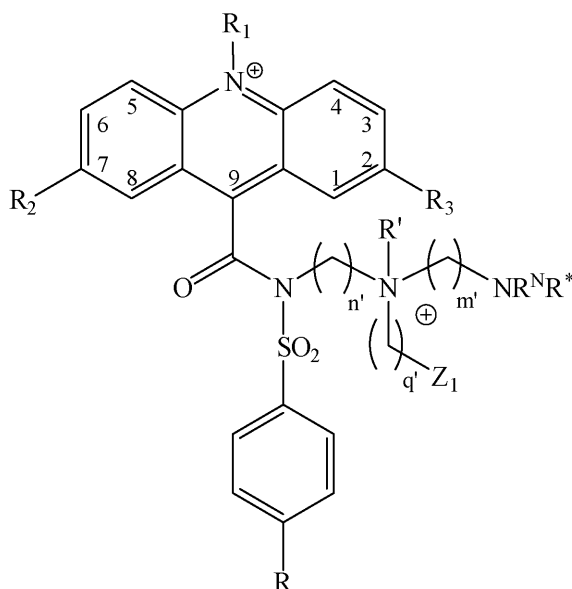


[式中、Y は、基 - R^a - Z を含み、ここで、R^a、R₂、R₃ 及び Z は、先に定義したとおりである] を有する、請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 9】

以下の構造：

【化 7 3】



[式中、R^{*} は、各々が最大 20 個までのヘテロ原子を場合により含有する、水素、C₁₋₃₅ アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール又はアラルキルから選択されるか、あるいは R^{*} は、基 - R^a - L (ここで、L は、分析物、分析物類似体又は分析物のための結合パートナーとの抱合体を形成するための脱離基である) であり；n'、m' 及び q' は、独立して、1 ~ 4 の整数であり、そして R、R^N、R₁、R₂、R₃、R' 及び Z₁ は、先に定義したとおりである] を有する、請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物。

【請求項 10】

前記両性イオン官能基を含まない以外は同一のアクリジニウム化合物と比較して、固相に対する非特異的結合の減少を示す、請求項 1 記載のアクリジニウム化合物。

【請求項 11】

分析物、分析物類似体又は分析物の結合パートナーに結合している、請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物を含む分析物の検出のための試薬であって、前記アクリジニウム化合物は、前記両性イオン官能基を含まない以外は同一のアクリジニウム化合物と比較して、固相に対する非特異的結合の減少を示す、試薬。

【請求項 12】

巨大分子分析物の検出又は定量のためのアッセイであって、

(a) 分析物に対して特異的な結合分子に結合している、請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物を含む抱合体を提供すること、

(b) 固体担体であって、その上に前記分析物に対して特異的な第 2 結合分子を固定している固体担体を提供すること、

(c) 前記抱合体、固相、及び前記分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成すること、

(d) 前記固体担体上に捕獲された前記結合複合体を分離すること、

(e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、工程 (d) からの前記結合複合体の化学発光を誘発すること、

(f) 照度計を用いて光放出の量を測定すること、及び

(g) 放出された光の量を前記分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、前記分析物の存在を検出するか又は前記分析物の濃度を計算することを含む、アッセイ。

【請求項 1 3】

提供された小分子分析物の検出又は定量のためのアッセイであって、

(a) 分析物と請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物との抱合体を提供する工程、

(b) 前記分析物に対して特異的な結合分子で固定された固体担体を提供する工程、

(c) 前記抱合体、固体担体、及び前記分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成する工程、

(d) 前記固体担体上に捕獲された前記結合複合体を分離する工程、

(e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、工程 (d) からの前記結合複合体の化学発光を誘発する工程、

(f) 照度計を用いて光の量を測定する工程、及び

(g) 放出された光の量を前記分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、前記分析物の存在を検出するか又は前記分析物の濃度を計算する工程を含む、アッセイ。

【請求項 1 4】

小分子分析物の検出のためのアッセイであって、

(a) 分析物又は分析物類似体で固定された固体担体を提供すること、

(b) 前記分析物に対して特異的な結合分子と請求項 1 記載の化学発光アクリジニウム化合物との抱合体を提供すること、

(c) 前記固相、前記抱合体、及び前記分析物を含有していると疑われるサンプルを混合して結合複合体を形成すること、

(d) 前記固体担体上に捕獲された前記結合複合体を分離すること、

(e) 化学発光誘発試薬を加えることによって、(d) の前記結合複合体の化学発光を誘発すること、

(f) 照度計を用いて光の量を測定すること、及び

(g) 放出された光の量を前記分析物の既知濃度と関連づける標準用量反応曲線と、反応混合物から放出された光の量を比較することによって、前記分析物の存在を検出するか又は前記分析物の濃度を計算することを含む、アッセイ。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/532 (2006.01)		G 0 1 N 33/532		B
G 0 1 N 21/76 (2006.01)		G 0 1 N 21/76		
C 0 7 D 401/12 (2006.01)		C 0 7 D 401/12		

(72)発明者 シャープ, ディビッド
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ 0 2 0 3 5、フォックスボロ、ピックネル・ストリート 1
 9

(72)発明者 ジャン, チンピン
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ 0 2 0 3 2、イースト・ウォルポール、エンディアン・ドラ
 イブ 6 5

F ターム(参考) 2G054 AA02 AB04 CE01 EA01
 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 HA12
 4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25 QS28 QS33
 QS34 QX02
 4C063 AA01 BB07 BB08 CC16 DD04 EE05

【外国語明細書】

2016104742000001.pdf

专利名称(译)	含有ZWITTERION的ACRIDINIUM化合物		
公开(公告)号	JP2016104742A	公开(公告)日	2016-06-09
申请号	JP2015237389	申请日	2015-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断公司		
[标]发明人	ナトラジャンアナンド シャープディビッド ジャンチンピン		
发明人	ナトラジャン, アナンド シャープ, ディビッド ジャン, チンピン		
IPC分类号	C07D219/04 C12Q1/68 C12N15/09 C09B15/00 C09K11/06 G01N33/532 G01N21/76 C07D401/12		
CPC分类号	C07D219/04 C07D401/12 G01N33/54393 C07D219/14 C09B15/00 Y10T436/13		
FI分类号	C07D219/04.CSP C12Q1/68.A C12N15/00.A C09B15/00 C09K11/06 G01N33/532.B G01N21/76 C07D401/12 C12N15/11.Z		
F-TERM分类号	2G054/AA02 2G054/AB04 2G054/CE01 2G054/EA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4C063/AA01 4C063/BB07 4C063/BB08 4C063/CC16 4C063/DD04 4C063/EE05		
优先权	61/261465 2009-11-16 US		
其他公开文献	JP6670597B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供含有两性离子的化合物，其在免疫化学测定等中用作化学发光标记。化学发光的cri啶磺酰胺化合物，由下式表示：（R1为C1-35烷基等；R2和R3为H，供电子基团或基团-Z；Y和Y#39;为R，-Ra-Z或-Ra-L；L为离去基团，（含有亲电基团或亲核基团的可衍生官能团；R1至R3，Y和Y#39;中的任何一个包括两性离子基团Z）[选择图]无

