

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターミナル* (参考)
C 0 7 C233/07		C 0 7 C233/07	4 H 0 0 6
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 6 数)

(21)出願番号	特願2001 - 73946(P2001 - 73946)	(71)出願人	000237204 富士レビオ株式会社 東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号
(22)出願日	平成13年3月15日(2001.3.15)	(72)発明者	小林 久子 東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富士レビオ株式会社内
		(72)発明者	丹羽 敏博 東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富士レビオ株式会社内
		(74)代理人	100098431 弁理士 山中 郁生 (外 3 名) F ターム (参考) 4H006 AA01 AB81 BJ50 BS10 BT12 BT14 BV25

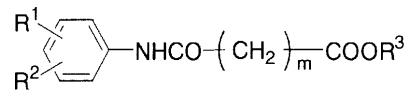
(54)【発明の名称】 置換フェニルカルバモイル誘導体

(57)【要約】

【課題】 従来の煩雑な P C B の測定法に替わる迅速且つ簡便、低コストの P C B の酵素免疫測定法に用いられる化合物の提供。

【解決手段】 一般式

【化 1 】

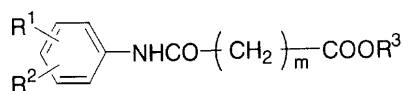


(式中、R¹およびR²は低級アルキル基、R³はアルキル基、アリール基、水素原子またはスクシンイミジル基、mは3ないし5の整数である。) で表される置換フェニルカルバモイル誘導体は、B S Aなどと結合させて、P C Bを測定する際の酵素免疫測定試薬として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式

【化 1】



で表される置換フェニルカルバモイル誘導体（式中、 R^1 および R^2 は低級アルキル基、 R^3 はアルキル基、アリール基、水素原子またはスクシンイミジル基、 m は 3 ないし 5 の整数である。）。

【請求項 2】 R^3 が水素原子である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】 R^3 がアルキル基である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】 アルキル基が低級アルキル基である請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】 R^3 がスクシンイミジル基である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】 m が 3 である請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

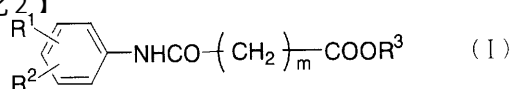
【請求項 7】 R^1 および R^2 がメチル基である請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般式

【化 2】



（式中、 R^1 および R^2 は低級アルキル基、 R^3 はアルキル基、アリール基、水素原子またはスクシンイミジル基、 m は 3 ないし 5 の整数である。）で表される置換フェニルカルバモイル誘導体であり、PCB を酵素免疫測定法で測定する際の試薬として使用できる。

【0002】

【従来の技術】置換フェニルカルバモイル誘導体は、新規な化合物であり、かつ、この化合物が PCB を測定するための試薬として有用である、ということは全く知られていなかった。

【0003】従来、PCB は、ガスクロマトグラフィーとマスペクトロメトリーとを一体化した機器等を用いて測定していたが、これらの測定機器は大変高価であり、また、サンプルが土や水の場合は、これら機器測定前に濃縮操作を行わねばならず、煩雑であった。これらの問題は酵素免疫測定法を採用することで解決することができた。この方法は、迅速かつ簡便、低コストで高感度測定ができる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、酵素免疫測定法でなしえなかった PCB の測定に有用な試薬を提供

することが課題である。

【0005】

【課題を解決するための手段】かかる課題を解決するため本発明者らは、新規な前記一般式（I）で表される置換フェニルカルバモイル誘導体を見出した。本発明の前記一般式（I）で表される置換フェニルカルバモイル誘導体は、PCB を酵素免疫測定法により広汎に測定できる化合物である。

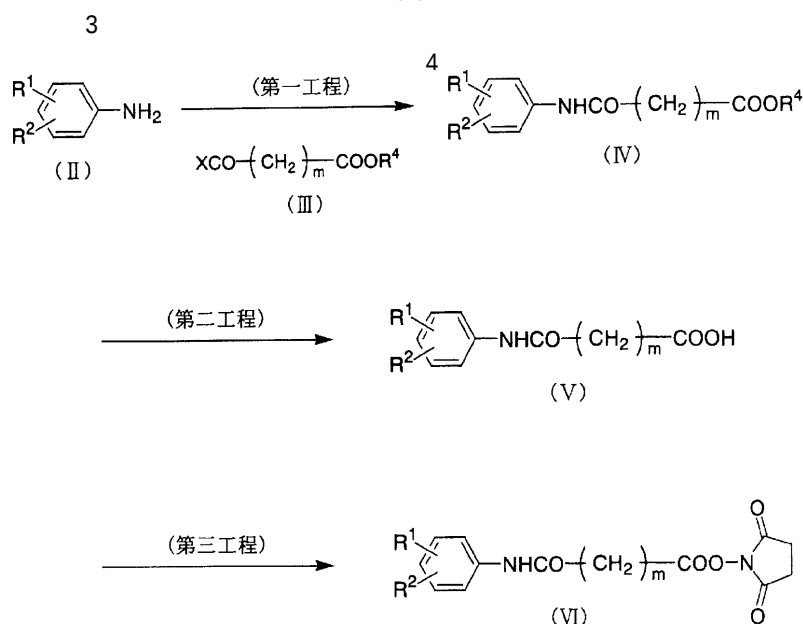
【0006】以下、本発明を詳細に説明するにあたって、「アルキル基」としては、炭素原子数 1 ~ 12 の直鎖状、分枝鎖状または環状のアルキル基のいずれでもよく、例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、1-メチルエチル基、シクロプロピル基、 n -ブチル基、2-メチルプロピル基、1-メチルプロピル基、1,1-ジメチルエチル基、シクロブチル基、 n -ペンチル基、3-メチルブチル基、シクロペンチル基、2,2-ジメチルプロピル基、1-メチルシクロブチル基、シクロブチルメチル基、 n -ヘキシル基、4-メチルペンチル基、シクロヘキシル基、1-メチルシクロペンチル基、シクロペンチルメチル基、（1-メチルシクロブチル）メチル基、 n -ヘプチル基、5-メチルヘキシル基、4,4-ジメチルペンチル基、シクロヘプチル基、シクロヘキシルメチル基、（1-メチルシクロペンチル）メチル基、 n -オクチル基、6-メチルヘプチル基、5,5-ジメチルヘキシル基、（1-メチルシクロヘキシル）メチル基、 n -ノニル基、7-メチルオクチル基、6,6-ジメチルヘプチル基、 n -デシル基、8-メチルノニル基、7,7-ジメチルオクチル基、 n -インデカシル基、9-メチルデシル基、8,8-ジメチルノニル基、 n -ドデカシル基、10-メチルウンデカシル基、9,9-ジメチルデカシル基等を挙げることできる。また、「低級アルキル基」としては、前記アルキル基のうち、炭素原子数 1 ~ 6 の直鎖状、分枝鎖状又は環状のアルキル基を挙げることできる。

【0007】「アリール基」としては、単環式または多環式であり、さらに環上に 1 個以上の種々の置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基をいい、例えば、フェニル、メチルフェニル、ジメチルフェニル、メトキシフェニル、ジメトキシフェニル、ニトロフェニル、ジニトロフェニル、クロロフェニル、ジクロロフェニル、ブロモフェニル、ジブロモフェニル、ヨードフェニル、フルオロフェニル、トリフルオロメチルフェニル、アミノフェニル、ヒドロキシフェニル、メルカプトフェニル、 α -ナフチル、 β -ナフチル基等を挙げることできる。「ハロゲン原子」としては、塩素、臭素、ヨウ素、フッ素等を挙げることできる。

【0008】本発明の前記一般式（I）で表される置換フェニルカルバモイル誘導体は以下の式に従い製造することができ。

【0009】

【化 3】



【0010】(式中、 R^1 および R^2 は低級アルキル基、 R^4 はアルキル基またはアリール基、 m は3ないし5の整数である。Xはハロゲン原子である。)

【0011】(第一工程)本工程は、前記一般式(IV)で表わされるエステル誘導体を、一般式(II)で表される置換アニリンと一般式(III)で表される酸塩化物とを塩基の存在下、反応させることにより製造する工程である。

【0012】前記一般式(II)で表される置換アニリンとしては、たとえば、ジメチルアニリン、ジエチルアニリン、エチルメチルアニリン等を挙げることができる。また、一般式(III)で表される酸塩化物としては、たとえば、4-クロロホルミルブタン酸エチル、4-クロロホルミルブタン酸メチル、4-クロロホルミルブタン酸t-ブチル、5-クロロホルミルペンタン酸エチル、5-クロロホルミルペンタン酸メチル、5-クロロホルミルペンタン酸t-ブチル、6-クロロホルミルヘキサン酸エチル、6-クロロホルミルヘキサン酸メチル、6-クロロホルミルヘキサン酸t-ブチルなどを使用することができる。

【0013】本工程は、塩基の存在下に行うものである。使用できる塩基としては、たとえば、ピリジン、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミンなどの有機塩基、水酸化ナトリウムなどのアルカリ金属水素化物、炭酸カリウムなどのアルカリ金属炭酸塩、n-ブチルリチウムなどのアルキルリチウム等を挙げることができる。反応溶媒は、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、ジメトキシエタン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルピロリドン等のアミド類、ジクロロメタンなどのハロゲン化炭化水素、ベンゼン-水、エーテル-水などの2層系溶媒、ピリジン等を挙げることができる。反応温度は、-20~40

で実施することができる。

【0014】(第二工程)本工程は、一般式(IV)で表わされる化合物に対し、塩基性条件下、酸性条件下または中性条件下において加水分解を行い、一般式(V)で表わされるカルボン酸誘導体を製造する工程である。

【0015】塩基性条件下で用いる試薬としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどのアルカリ金属水素化合物、水酸化カルシウム、水酸化バリウムなどのアルカリ土類金属水素化合物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどのアルカリ金属炭酸塩、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、ナトリウムt-ブトキシド、カリウムt-ブトキシドなどのアルカリ金属アルコキシド、トリエチルアミン、イミダゾール、アミジン、DBU(1,5-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデカ-5-エン)、DBN(1,5-ジアザビシクロ[4,3,0]ノナ-5-エン)などの有機塩等を挙げることができる。塩基性条件下で用いる溶媒としては、エタノール、メタノール、エチレングリコール等のアルコール類、水、ジメチルスルホキシド等を挙げることができる。また、酸性条件下で用いる試薬としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、燐酸などの鉱酸、酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸などの有機酸、三臭化ホウ素、三塩化ホウ素などのルイス酸、陽イオン交換樹脂等を挙げることができ、中性条件下で用いる試薬としては、ヨウ化リチウム、臭化リチウム、シアン化ナトリウム、チオール類のアルカリ塩等を挙げることができる。酸性または中性条件下で用いる溶媒としては、ピリジン、ルチジン、コリジン、ジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホリクトリアミドなどのアミド類、ジメチルスルホキシド、アルコール類、アセトン、水等を挙げることができる。反応温度は、20 から加熱還流することにより実施できる。

【0016】(第三工程)本工程は、一般式(V)で表わされるカルボン酸誘導体に対し縮合剤の存在下、N-ヒドロキシスクシンイミドと反応させ一般式(VI)で表わされるスクシンイミジル誘導体を製造する工程である。

【0017】この工程で使用する縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、ベンゾトリアゾリル-N-ヒドロキシトリスジメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロリン化合物塩、ジフェニルホスホリルアジド等を挙げることができる。反応は、不活性溶媒中を行うことが望ましく、たとえばジクロロメタン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどのアミド類等を挙げることができる。反応温度は、-10~40℃で実施することができる。

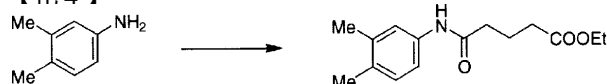
【0018】

【実施例】以下、参考例及び実施例により本発明をさらに詳細を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0019】実施例1 4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸エチルの合成

【0020】

【化.4】



【0021】アルゴン気流下、3,4-ジメチルアニリン500mg(4.12mmol)の無水ジクロロメタ



【0025】4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸エチル584mg(2.22mmol)のエタノール溶液(10ml)に、4N水酸化リチウム水溶液1.0ml加え、室温で16時間攪拌した。反応終了後、反応溶媒を減圧下留去し、10%クエン酸水溶液を加えて析出した結晶を濾取した。減圧下乾燥後メタノールとエーテルとヘキサンから再結晶することにより4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸414mg(収率79.3%)を得た。

【0026】mp:154.0~154.5

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): 1.78 (quintet, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.26 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 2.31 (t, $J=$

ン溶液(10ml)にジイソプロピルエチルアミン1.07ml(6.18mmol)を加え、さらに氷冷下4-クロロホルミルブタン酸エチル0.72ml(4.53mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液に投じ酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル=2:1)で精製し、さらにヘキサンとエーテルから再結晶することにより、4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸エチル792mg(収率72.9%)を得た。

【0022】mp:50.5~51.0

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.27 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 2.05 (quintet, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.38~2.46 (m, 4H), 4.15 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 7.06 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.21 (d with fine coupling, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.24~7.28 (m, 1H), 7.31 (s with fine coupling, 1H) ppm.

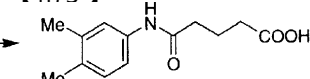
IR(KBr): 3376, 2972, 1716, 1694, 1596, 1532, 1402, 1312, 1180, 1020 cm^{-1}

Mass(m/z , %): 263 (M^+ , 40), 218 (21), 121 (100).

【0023】実施例2 4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸の合成

【0024】

【化.5】



7.3Hz, 2H), 7.02 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.29 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.36 (s, 1H), 9.71 (s, 1H) ppm.

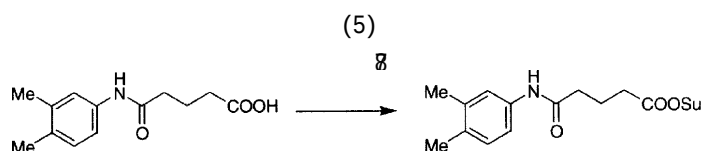
IR(KBr): 3296, 3032, 2948, 1698, 1660, 1538, 1308, 1196 cm^{-1}

Mass(m/z , %): 235 (M^+ , 69), 121 (100).

【0027】実施例3 N-スクシンイミジル-4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタノエートの合成

【0028】

【化.6】



【0029】4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸150mg(0.64mmol)の無水ジクロロメタン(10ml)と無水テトラヒドロフラン(2ml)の混合溶媒に、N-ヒドロキシスクシンイミド74mg(0.65mmol)、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド125mg(0.65mmol)を加え、室温で20時間50分撹拌した。反応終了後、反応溶媒を減圧下留去しシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム-メタノール=20:1)で精製し、さらにヘキサンとエーテルから再結晶することにより、N-スクシンイミジル-4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタノエート170mg(収率80.2%)を得た。

【0030】mp:150.0~151.0

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): 1.86~1.95(m, 2H), 2.15(s, 3H), 2.17(s, 3H), 2.41(t, J=7.4Hz, 2H), 2.75(t, J=7.4Hz, 2H), 2.82(s, 4H), 7.02(d, J=7.9Hz, 1H), 7.28(d, J=7.9Hz, 1H), 7.37(s, 1H), 9.76(s, 1H) ppm. IR(KBr): 3292, 2952, 1814, 1780, 1740, 1658, 1538, 1366, 1208, 1066 cm^{-1}

Mass(m/z, %): 332(M^+ , 71), 218(81), 121(100).

【0031】参考例1 4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSAの合成
ウシ血清アルブミン(BSA)5.0mgを0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.5)900 μl に溶解し、N-スクシンイミジル-4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタノエート1.0mgの無水ジメチルホルムアミド溶液100 μl を加え、室温で5時間撹拌した。その後反応液をPBS中で透析し脱塩して、標記4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSAを得た。

【0032】参考例2 4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSA感作粒子の作成
カルボキシル化粒子(日本ペイント社製)を0.1Mリン酸緩衝液(pH5.0)にて3回洗浄し、同緩衝液1mlにて懸濁後、50~400 $\mu\text{g/ml}$ に調整した参考例1で作成した4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSA溶液1mlを添加し25~2時間、ローテーターにて回転反応させた。粒子洗浄後、0.05Mメス緩衝液(pH5.5)1mlに懸濁し、80mg/mlの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩*

(ナカライタスク社製)水溶液を50 μl 添加して、ローテーターで25~30分回転反応させた。粒子を洗浄後、ポストコート緩衝液を2ml添加しローテーターで37~1晩回転反応させた。粒子を洗浄後、粒子濃度を1.5%に合わせて4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSA感作粒子を得た。

【0033】参考例3 アルカリフォスファターゼ(ALP)標識抗PCB#169(3,3',4,4',5,5'-ペンタクロロビフェニル)抗体の作成
抗PCB#169モノクローナル抗体(PCB169E抗体; KRI社製)を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ(オリエンタル社製)を結合しALP標識抗PCB#169抗体を得た。

【0034】参考例4 PCB#169の測定
PCB#169の測定は、全自動化学発光免疫測定システム(ルミパルスf; 富士レビオ社製)を用いたDelay1ステップ競合法にて行った。PCB#169の標準抗原液130 μl とALP標識抗PCB#169抗体液10 μl とを37~10分間免疫反応し、次いで、その反応混合液120 μl と参考例2で作成した4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSA感作粒子150 μl とを、37~10分間免疫反応をさせた。洗浄後、基質(AMPPD)液200 μl を加えて37~5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。

【0035】前記PCB#169の標準抗原液は、PCB#169(ジーエルサイエンス社製)を10%ジメチルスルホキシド溶液に溶解し、0~5ng/mlの濃度に調整したものをを用いた。標準抗原0濃度のカウント値を100%としたときの各標準抗原液の応答(B/B0(%))で標準曲線を求めた。その結果を図1に示す。また、標準曲線から推定したB/B0=90%, 85%, 50%の値を表1に示す。

【0036】

【表1】

B/B0	ng/ml
90%	0.12
85%	0.16
50%	0.70

【0037】

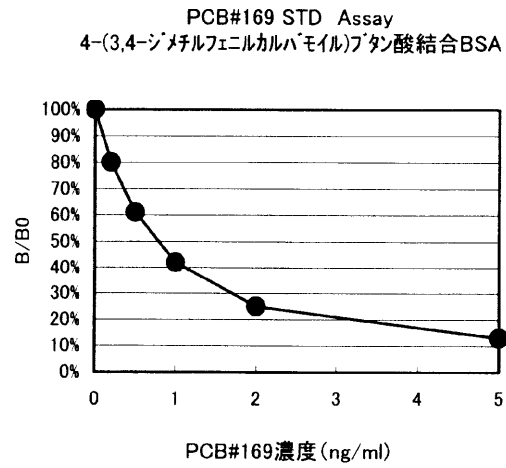
【発明の効果】本発明の一般式(I)で表される置換フェニルカルバモイル誘導体は、PCBを測定するための試薬として有用である。本発明の一般式(I)で表される置換フェニルカルバモイル誘導体は、例えばBSAと

結合させて、酵素免疫測定法によるPCBの測定に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】PCB#169を測定したときの標準曲線を示す。

【図1】



专利名称(译)	取代的苯基氨基甲酰基衍生物		
公开(公告)号	JP2002275143A	公开(公告)日	2002-09-25
申请号	JP2001073946	申请日	2001-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	小林久子 丹羽敏博		
发明人	小林 久子 丹羽 敏博		
IPC分类号	G01N33/53 C07C233/07		
FI分类号	C07C233/07 G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4H006/AA01 4H006/AB81 4H006/BJ50 4H006/BS10 4H006/BT12 4H006/BT14 4H006/BV25		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于PCB的快速，简单且低成本的酶联免疫吸附测定的化合物，该化合物替代了常规的复杂PCB测定方法。 解决方案：通用公式（式中，R¹及R²为低级烷基，R³为烷基，芳基，氢原子或琥珀酰亚胺基，m为3~5的整数。）取代的苯基氨基甲酰基衍生物可以通过与BSA等结合而用于测量PCB的酶免疫测定试剂。

