

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6310575号
(P6310575)

(45) 発行日 平成30年4月11日 (2018. 4. 11)

(24) 登録日 平成30年3月23日 (2018. 3. 23)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 213/36 (2006. 01)

C O 7 D 213/36 C S P

C O 7 D 401/04 (2006. 01)

C O 7 D 401/04

C O 7 D 405/04 (2006. 01)

C O 7 D 405/04

C O 7 D 409/04 (2006. 01)

C O 7 D 409/04

C O 7 D 401/14 (2006. 01)

C O 7 D 401/14

請求項の数 15 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-565479 (P2016-565479)
 (86) (22) 出願日 平成27年4月24日 (2015. 4. 24)
 (65) 公表番号 特表2017-520516 (P2017-520516A)
 (43) 公表日 平成29年7月27日 (2017. 7. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/058970
 (87) 国際公開番号 W02015/165826
 (87) 国際公開日 平成27年11月5日 (2015. 11. 5)
 審査請求日 平成28年10月31日 (2016. 10. 31)
 (31) 優先権主張番号 PA2014/00242
 (32) 優先日 平成26年5月2日 (2014. 5. 2)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(73) 特許権者 514043126
 ラジオメーター・トゥルク・オサケユキチ
 ユア
 フィンランド国エフイー-20750 ト
 ウルク, ビオリニア 12
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100104374
 弁理士 野矢 宏彰

最終頁に続く

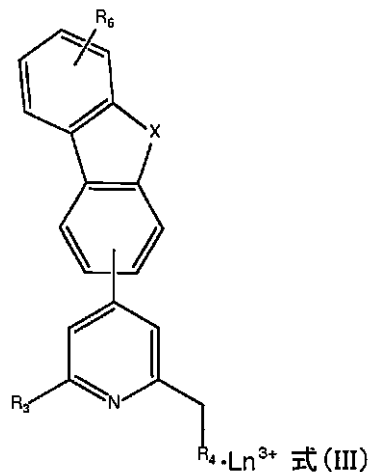
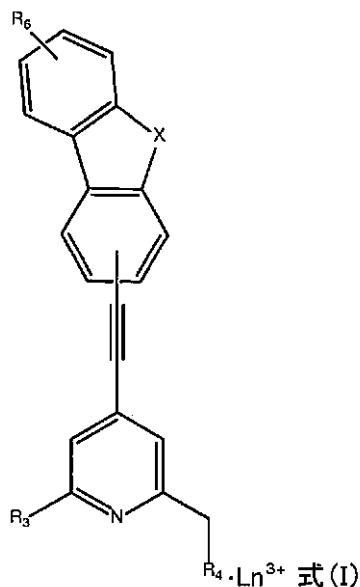
(54) 【発明の名称】 ランタニドキレートのための新規発色団構造

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) 又は式 (I I I) の 1 つ以上の発色団部分を含む発光ランタニドキレートであって、

【化 1】



式中、X は、 $-S-$ 、 $-O-$ 、 $-NR_1-$ 、 $-CR_1R_2-$ 、 $>C=O$ 、及び $>C=N$
 $-O-R_1$ ($>C(=O)$ のオキシム) から選択され、式中、 R_1 及び R_2 は、それぞれ
 独立して、水素、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3H$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3H_2$

2^- 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3^{2-}$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3^{2-}$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}NCH_3R_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}NEtR_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}N^+(CH_3)_2R_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}OH$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1 \sim 4}CH_2CH_2OH$ 、

$-(CH_2CH_2O)_{1 \sim 4}CH_2CH_2OCH_3$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}NCH_3C(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)NCH_3R_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)NEtR_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)N(R_5)_2$ 、

$-(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=S)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}-C_6H_4-R_5$ 、 $-COR_5$ 、 $-CO(CH_2)_{1 \sim 6}NHR_5$ 、及び $-CO(CH_2)_{1 \sim 6}NCH_3R_5$ から選択され、式中、 R_5 は、水素、 $C_{1 \sim 12}$ アルキル (特に、 $C_{1 \sim 6}$ アルキル)、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3H$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3^-$ 、

$-(CH_2)_{1 \sim 6}N^+(CH_3)_2(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3^{2-}$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3^{2-}$ 、親水性基 (任意選択的にスペーサーを含む)、反応性基 (任意選択的にスペーサーを含む)、オリゴペプチド、ポリペプチド及びヌクレオチドから選択され、

R_3 及び R_4 はそれぞれ、前記発色団部分と前記キレートのための他の部分との間の結合を表し、

R_6 は、水素、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-F$ 、 $-I$ 、 $-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}OH$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-O(CH_2)_{1 \sim 6}OH$ 、 $-O(CH_2)_{1 \sim 6}OCH_2$ 、 $-O(CH_2)_{1 \sim 6}COOH$ 、 $-O(CH_2)_{1 \sim 6}COO^-$ 、 $-SCH_3$ 、 $-S(CH_2)_{1 \sim 6}OH$ 、 $-S(CH_2)_{1 \sim 6}OCH_2$ 、 $-S(CH_2)_{1 \sim 6}COOH$ 、 $-S(CH_2)_{1 \sim 6}COO^-$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CONHCH_3$ 、 $-CON(CH_3)_2$ 、 $-CONH(CH_2)_{1 \sim 6}OH$

10

20

30

40

50

、 $-\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{OH})_2$ 、 $-\text{CONHC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ 、 $-\text{NHCOCH}_3$ 、 $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_{1\sim 6}\text{OH}$ 、 $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_{1\sim 6}\text{COOH}$ 、 $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_{1\sim 6}\text{COO}^-$ 、反応性基Z、及び親水性基から選択され、 Ln^{3+} はランタニドイオンである、発光ランタニドキレート。

【請求項2】

Xが $-\text{CR}_1\text{R}_2-$ である、請求項1に記載の発光ランタニドキレート。

【請求項3】

Xが $>\text{C}(=\text{O})$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-$ 及び $-\text{NR}_1-$ から選択される、請求項1に記載の発光ランタニドキレート。

【請求項4】

R_1 及び R_2 が、それぞれ独立して、水素、 $-(\text{CH}_2)_{1\sim 6}\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1\sim 6}\text{COO}^-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1\sim 6}\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1\sim 6}\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ 、 $-\text{COCH}_2\text{NHCH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{COCH}_2\text{NHCH}_2\text{COO}^-$ 、 $-\text{COCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ 、及び $-\text{COCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ から選択され、特に、水素、 $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ 、及び $-\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の発光ランタニドキレート。

10

【請求項5】

R_1 及び R_2 が、それぞれ独立して、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1\sim 4}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 及び $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1\sim 4}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ から選択され、特に、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の発光ランタニドキレート。

20

【請求項6】

前記1つ以上の発色団部分が前記式(I)の発色団部分である、請求項1～5のいずれか一項に記載の発光ランタニドキレート。

【請求項7】

1つ以上の発色団部分が前記式(III)の発色団部分である、請求項1～6のいずれか一項に記載の発光ランタニドキレート。

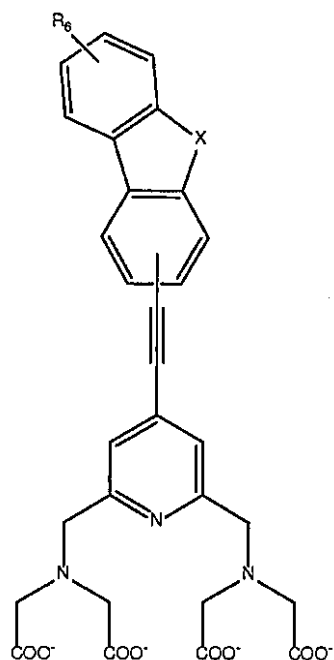
30

【請求項8】

構造式

(A-I)

【化 2】

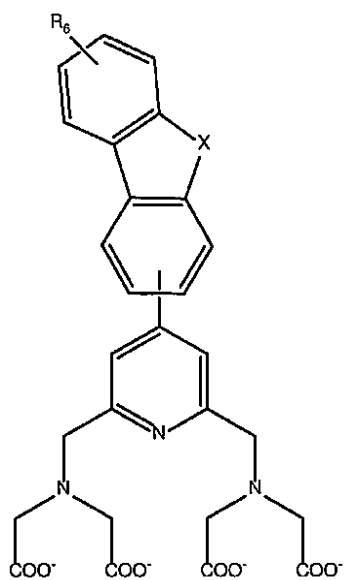


10

(A - I I I)

20

【化 3】



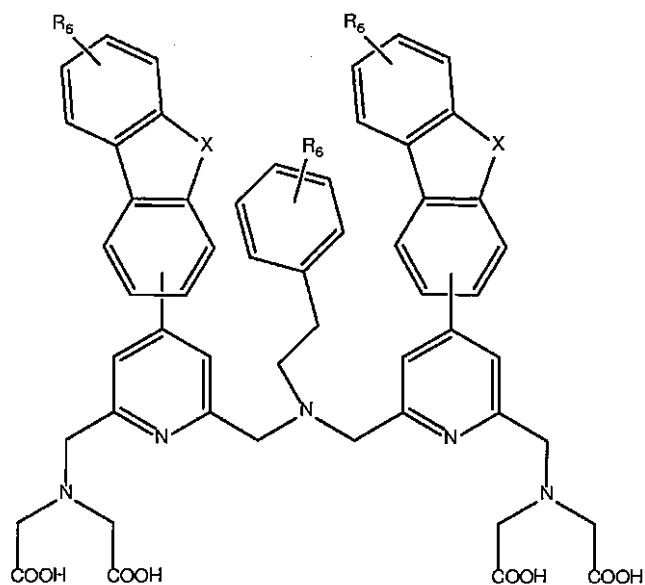
30

(B - I)

20

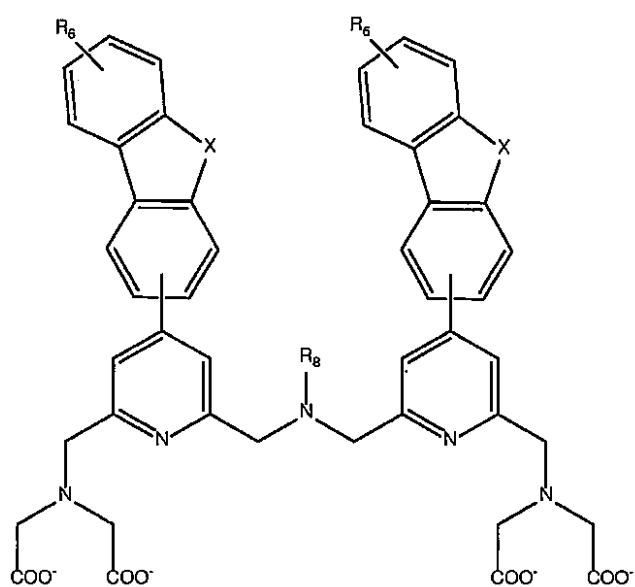
40

【化 6】



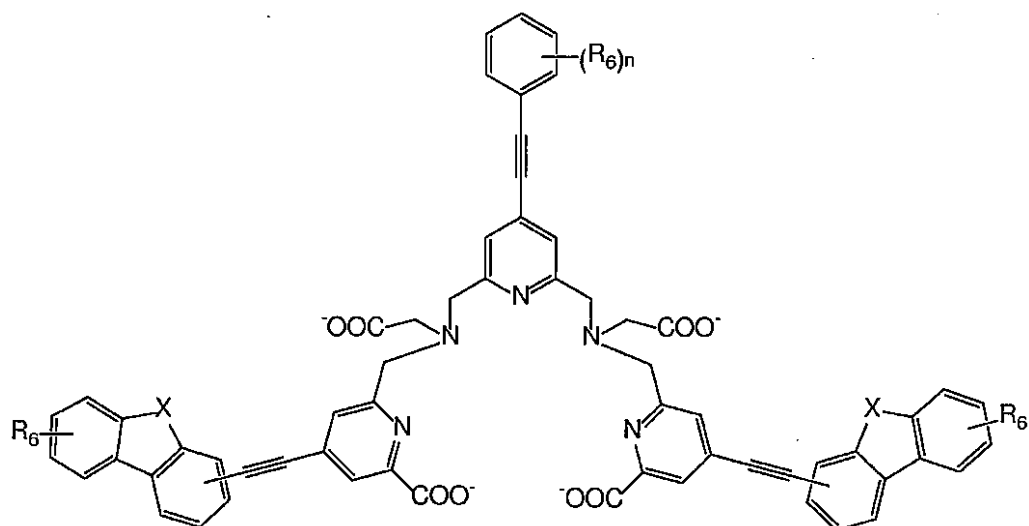
(B - I I I *)

【化 7】



(C - I)

【化 8】

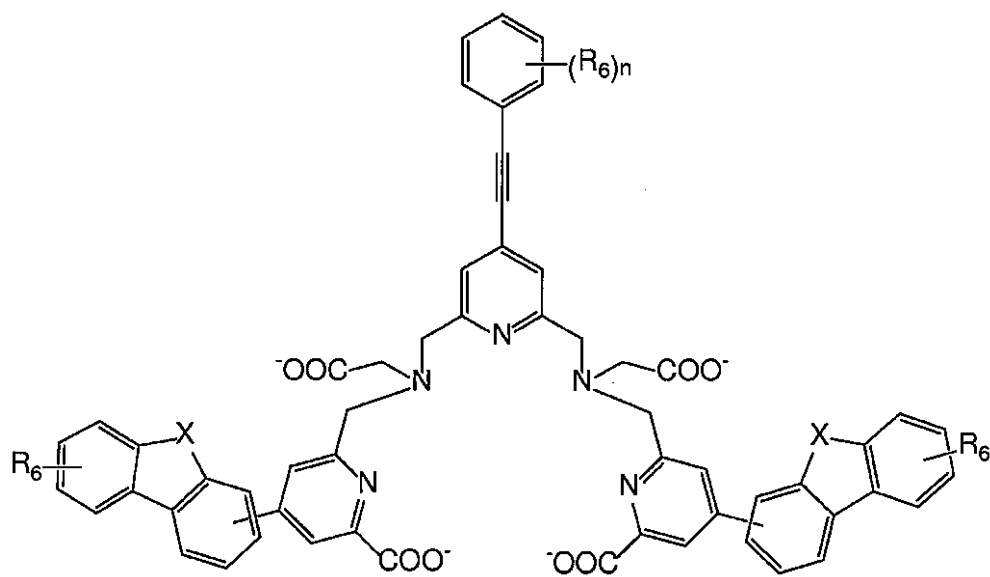


10

(式中、 $n = 1 \sim 5$ である)

(C - III)

【化 9】



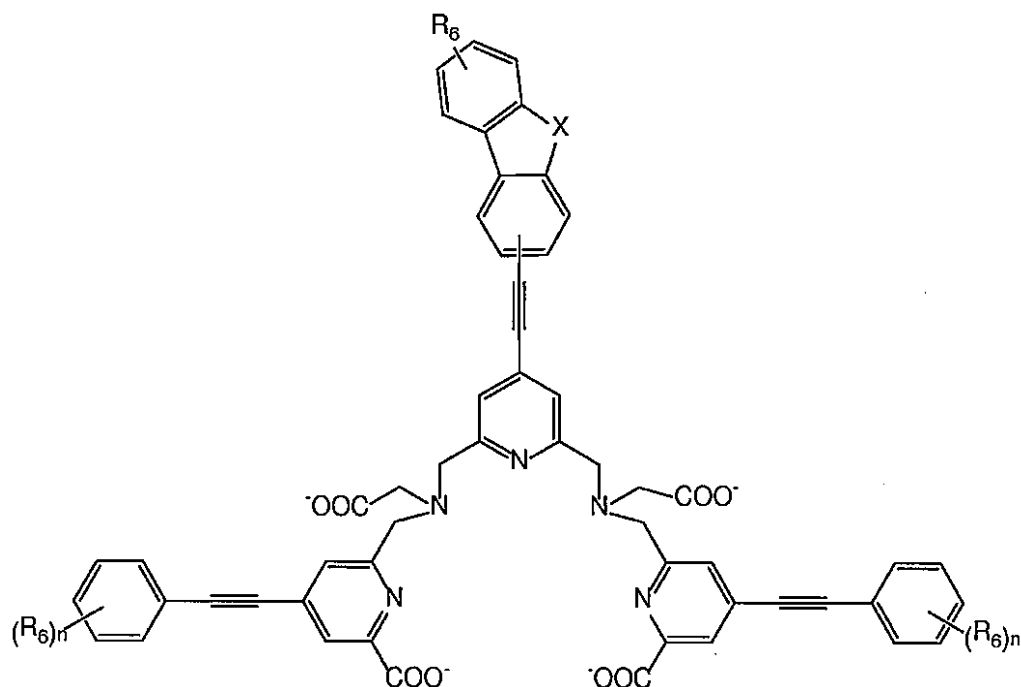
20

30

(式中、 $n = 1 \sim 5$ である)

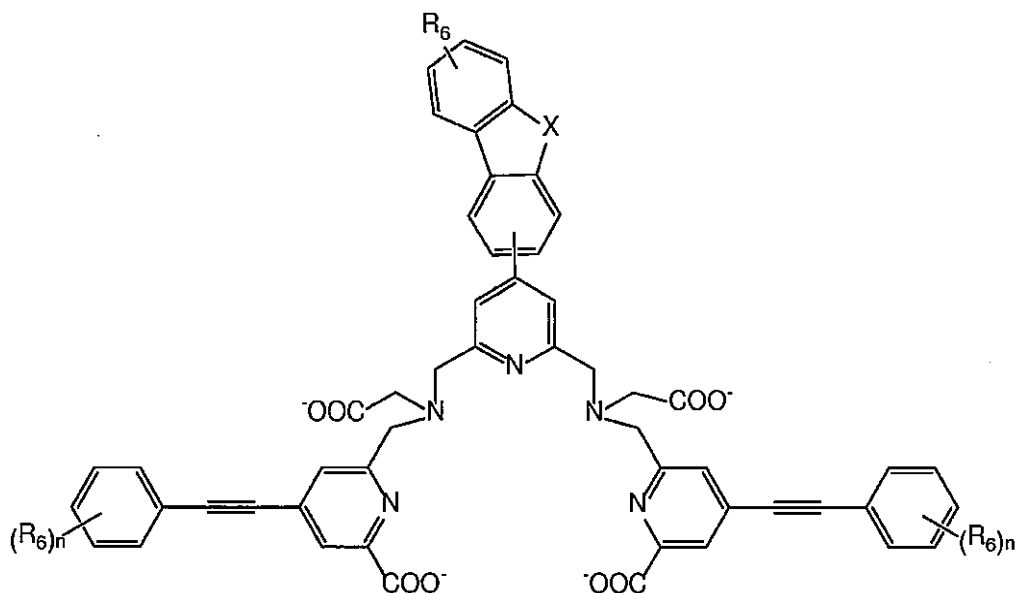
(D - I)

【化 10】

(式中、 $n = 1 \sim 5$ である)

又は (D - III)

【化 11】

(式中、 $n = 1 \sim 5$ である)

の 1 つを有し、

ここで、構造式 (A - I)、(A - III)、(B - I)、(B - I^{*})、(B - II I)、(B - III I^{*})、(C - I)、(C - III I)、(D - I)、又は (D - III I) において、X 及び R₆ はそれぞれ請求項 1 における構造式 (I) 及び (III I) について記載の X 及び R₆ を示し、そして R₈ は - (CH₂)_{1 ~ 6} COOH、- (CH₂)_{1 ~ 6} COO⁻、- (CH₂)_{1 ~ 6} SO₃H、- (CH₂)_{1 ~ 6} SO₃⁻、- (CH₂)_{1 ~ 6} - O - PO₃H₂、- (CH₂)_{1 ~ 6} - O - PO₃²⁻、- (CH₂)_{1 ~ 6} PO₃H₂、- (CH₂)_{1 ~ 6} PO₃²⁻、- (CH₂)_{1 ~ 6} NHR₉、- (CH₂)_{1 ~ 6} NCH₃R₉、- (CH₂)_{1 ~ 6} NEtR₉、- (CH₂)_{1 ~ 6} N(R₉)₂、- (CH₂)_{1 ~ 6} NHC(=O)R₉、- (CH₂)_{1 ~ 6} NCH₃C(=O)R₉、- (CH₂)_{1 ~ 6} C(=O)NHR₉、- (CH₂)_{1 ~ 6} C(=O)NCH₃R

9、
 $-(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=O)NHR_9$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=S)NHR_9$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)R_9$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}-C_6H_4-R_9$ 、 $-COR_9$ 、 $-CO(CH_2)_{1 \sim 6}NHR_9$ 、及び $-CO(CH_2)_{1 \sim 6}NCH_3R_9$ 、
 $-(CH_2)_{1 \sim 10}OH$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 10}OR_9$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 10}NH_2$ 、
 $-(CH_2)_{1 \sim 10}NHR_9$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 10}NCH_3R_9$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 10}SH$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 10}SR_9$ から選択され、 R_9 は $-(CH_2)_{1 \sim 6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3H$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3^{2-}$ 、
 $-(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3^{2-}$ 、及び反応性基 Z から
 選択される、

10

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の発光ランタニドキレート。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項の定義による前記式 (I) 又は (III) の発光ランタニドキレートと共役した生体特異的結合反応体を含む、検出可能分子。

【請求項 10】

前記生体特異的結合反応体が、抗体、抗原、受容体配位子、特異的結合タンパク質、DNAプローブ、RNAプローブ、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、修飾ポリヌクレオチド、タンパク質、オリゴ糖、多糖、リン脂質、PNA、ステロイド、ハプテン、ドラッグ、受容体結合配位子、及びレクチンから選択される、請求項 9 に記載の検出可能分子。

20

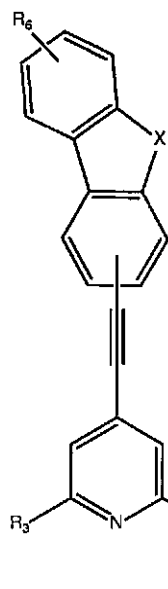
【請求項 11】

前記生体特異的結合反応体が抗体である、請求項 9 又は 10 に記載の検出可能分子。

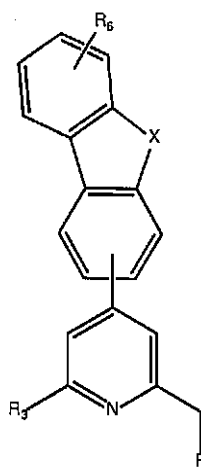
【請求項 12】

式 (II) 又は式 (IV) の 1 つ以上の発色団部分を含むランタニドキレート化配位子であって、

【化 12】



式 (II)



式 (IV)

30

40

式中、X、 R_3 、 R_4 及び R_6 のそれぞれは、それぞれ、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項の定義による前記基 X、 R_3 、 R_4 及び R_6 を表す、ランタニドキレート化配位子。

【請求項 13】

生体特異的結合アッセイを実施する方法であって、前記方法が、

a) 検体と、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の発光ランタニドキレートで標識化された生体特異的結合反応体との間でバイオ複合体を形成する工程、

b) 励起波長を有する放射線で前記バイオ複合体を励起させ、これにより励起バイオ複

50

合体を形成する工程、及び

c) 前記励起バイオ複合体から放出される発光放射線を検出する工程を含む、方法。

【請求項 14】

固有ルミネセンスの時間分解蛍光光度測定を利用した特異的生体親和性に基づく結合アッセイにおける、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の検出可能分子の使用。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の発光ランタニドキレート又は請求項 12 に記載のランタニドキレート化配位子と共役した固体担体物質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、発光ランタニドイオンの周りに、フルオレニル - 、フルオレニルエチニル、9H - カルバゾリル - 、9H - カルバゾリルエチニル - 、ジベンゾチオフェニル - 、ジベンゾチオフェニルエチニル - 、ジベンゾフラニル又はジベンゾフラニルエチニルピリジン発色団を有する新規ランタニドキレート設計に関する。この3員環発色団は、ランタニドイオンと共に高いモル吸光係数及びルミネセンスを有する。本発明は更に、生体特異的反応体に結合させるキレート、及び種々のアッセイにおけるその使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

時間分解蛍光光度法 (TRF) 用途に最適な発光ランタニドキレートは、次のようないくつかの要件を満たさなければならない。1) 基底状態と励起状態のいずれにおいても光化学的に安定でなければならぬ、2) 速度論的及び化学的に安定でなければならぬ、3) 励起波長はできるだけ高くなければならぬ (好ましくは300nm超)、4) 効率的なカチオン発光、すなわち、高いルミネセンス効率、すなわち、輝度 (励振係数 × 量子収率、 $\epsilon\phi$) を有さなければならない、5) ルミネセンス減衰時間が長くなければならぬ、6) キレートが良好な水溶性を有していなければならない、6) 標識化のため、生体特異的結合反応体への共有結合を可能にする反応性基を有していなければならない、並びに7) 標識化生体分子の親和性及び非特異的結合特性が保持されなければならない。

20

【0003】

一般的に、励起エネルギーは、配位子の三重項状態を通じて、配位子から特定のランタニドイオンに移動する。しかし、配位子が低エネルギーの電荷移動 (CT) 状態を示す場合、感作が、三重項の関与なく、緩和CT状態から直接起こる可能性がある (Andraud, C., Maury, O., Eur. J. Inorg. Chem., 2009, 4357)。更に、配位子の一重項状態を直接通る励起も実証されている。

30

【0004】

1 ~ 3 個の別々の4 - (フェニルエチニル) ピリジン (米国特許第4,920,195号; Takalo, H., et al., 1996, Helv. Chim. Acta., 79, 789) 及び4 - フェニルピリジン (欧州特許第0195413号; 国際公開第87/07955号) を含有する標識キレートが公開されて以来、設計された配位子構造が多数の特許、特許出願及び刊行物において利用されてきた。ルミネセンス強度を改善するために一般的に使用されている1つの方法は、構造設計内に組み合わされた数個の独立した発色団部分、すなわち、4 - (フェニルエチニル) ピリジン及び4 - フェニルピリジンを有することによって、キレートのモル吸光係数を増強することであり、これは、高い安定性及びルミネセンス量子収率をもたらす (例えば、米国特許出願公開第2013/210165 (A1) 号及び米国特許出願公開第2013/183771 (A1) 号参照)。

40

【0005】

ルミネセンス強度は、発色団のモル吸光係数を量子収率と共に増大することによっても改善されることが一般的に知られている。モル吸光係数は、芳香族発色団の π 電子共役を増すことによって増強できる。同時に、励起波長は通常は赤色側にシフトする。しかし、共役が増大すると、通常は三重項状態及び/又はCTのエネルギーレベルが低下し、量子

50

収率及び減衰時間の低下が観察される。この理由から、実際の生体標識用途において、ランタニドキレートに使用される単一発色団のモル吸光係数は、最も良い場合で数万である。更に、発色団の芳香族共役が増すと、キレートの水溶性が低下し、ランタニド標識及び標識化生体分子の非特異的結合特性及び凝集物形成が増大する。4 - フェニルエチニルピリジン及び4 - フェニルピリジン系キレート標識に関しては、4 - [4 - (フェニルエチニル) フェニルエチニル] ピリジン、4 - (4 - フェニル - 1 , 3 - ブタジイン - 1 , 4 - ジイル) ピリジン、4 - (ビフェニル - エチニル) ピリジン、4 - ビフェニルピリジン、4 - (ベンゾイルフェニルエチニル) ピリジン、ナフチルエチニルピリジン及び4 - (2 - フルオレニルエチニル) - ピリジン (例えば、Takalo, H. , et al. J. Alloys and Compounds, 225 (1995) 511 ; D'Aléo, A. , et al. Inorg Chem. , 47 (2008) 10269 ; Picot A. , et al. Inorg. Chem. 46 (2007) 2659 参照) 等の、より高い芳香族共役発色団の候補が公開されている。しかし、開示されたキレート設計は、親塩基キレートと比べて、ルミネセンス強度の有意な改善を示していない。例えば、Picot et al. は、4 - (2 - (7 - ヘキシルオキシ - 9 , 9' - ジヘキシルフルオレニル) エチニル) - 2 , 6 - ビス (ジエチルカルバモイル) ピリジン・[OTf]₃ のユーロピウムキレートについて、「室温で有意な放出は観察されない」及び「[おそらく、ピリジン配位子のCT又は三重項状態が] 室温で、エネルギーが低すぎるため、ユーロピウムイオンを感作しない」と記載している。

【 0006 】

多数の発色団を有するキレート及び配位子に関して周知の課題は、高い水溶性を付与すると同時に、起こり得るいかなるバイオプロセスに対しても不活性であるような、好適な構造設計を見出すことである。発色団の追加は、配位子及びキレートの水への溶解性を低下し、標識化プロセス中の生体特異的結合反応体凝集物の形成及び標識化生体分子の非特異的結合特性を増大することが知られている。凝集物は、精製の問題を生じ、標識化物質の収率を低下させる。更に、標識化分子の非特異的結合が増大すると、生体特異的アッセイのバックグラウンドルミネセンスが増強され、そのためアッセイ感度が低下する。

【 0007 】

以前に公開された構造と反対に、この新規発色団ランタニドキレート設計は、改善されたルミネセンス強度 (すなわち、輝度) 及び高い励起波長を示した。これらの発色団は、観察されたルミネセンス強度の主な理由である、驚くべき高いモル吸光係数を示した。

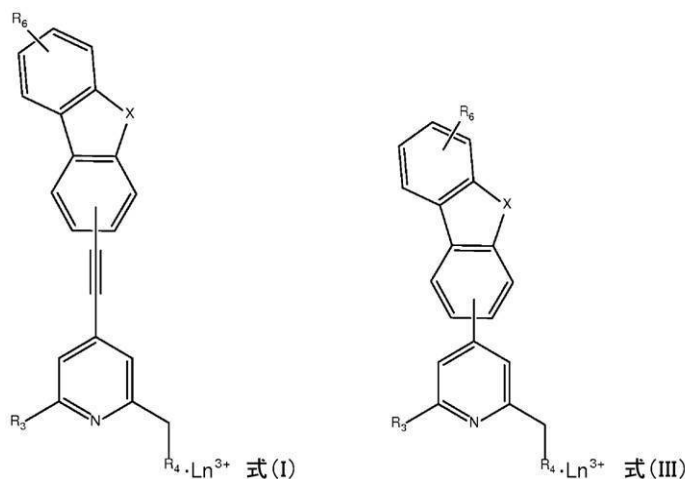
【 発明の概要 】

【 0008 】

本発明の第1の態様は、式 (I) 又は式 (III) の発色団部分を1つ以上含む発光ランタニドキレートに関する。

【 0009 】

【 化 1 】



10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

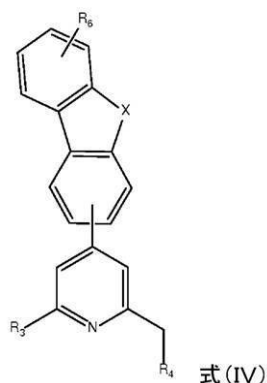
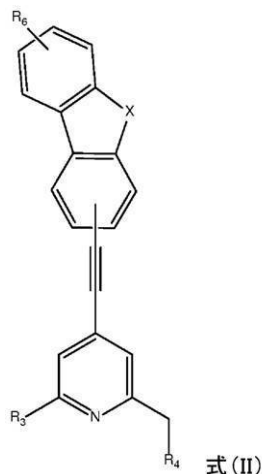
本発明の第 2 の態様は、本明細書で定義される式 (I) 又は (I I I) の部分を 1 つ以上含む発光ランタニドキレートに共役した生体特異的結合反応体を含む検出可能分子に関する。

【 0 0 1 1 】

本発明の第 3 の態様は、式 (I I) 又は式 (I V) の発色団部分を 1 つ以上含む発光ランタニドキレート配位子に関する。

【 0 0 1 2 】

【 化 2 】



【 0 0 1 3 】

本発明の第 4 の態様は、生体特異的結合アッセイの実施方法に関し、この方法は、a) 検体と、本明細書の定義による発光ランタニドキレートで標識化された生体特異的結合反応体との間でバイオ複合体を形成する工程、b) 上記バイオ複合体を、励起波長を有する放射線で励起させ、これにより励起バイオ複合体を形成する工程、及び c) 上記励起バイオ複合体から放出される発光放射線を検出する工程を含む。

【 0 0 1 4 】

本発明の第 5 の態様は、(例えば、1 又は 2 光子励起に基づく) 固有ルミネセンスの時間分解蛍光光度測定を利用した特異的生体親和性に基づく結合アッセイにおける、本明細書に定義する検出可能分子の使用に関する。

【 0 0 1 5 】

本発明の第 6 の態様は、本明細書の定義による発光ランタニドキレートと共役した固体担体物質に関する。

本発明による構造的改良を、いくつかの異なるキレート構造に使用した(実施例参照)。改良が導入されたこれらのキレートでは、従来の置換パターンを有するキレートと比較して、モル係数(ε、すなわち、吸光係数)が有意に増大した。驚くべきことに、吸光係数が一般的に $5000 \sim 30000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ であるところ、 $100000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ / 発色団さえも超える吸光係数が、新規ランタニド標識を用いて得られた。芳香族構造の共役は高いが、観察された三重項状態は、少なくとも中程度の量子収率(Φ)を提供するのに十分な高さである。これらの特徴の結果として、観察された全体的なルミネセンス効率(εΦ、すなわち、輝度)は、他の類似の標識設計と比較して、有意に高い。更に、 340 nm さえも超える励起波長(λ_{exc})が得られ、これは低価格の LED ベースの装置による励起をもたらす。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 6 】

本発明の目的は、固有ルミネセンスの蛍光光度測定又は時間分解蛍光光度測定を利用した、特異的生体親和性に基づく結合アッセイ(例えば、イムノアッセイ(均一系及び不均一系の両方)、核酸ハイブリダイゼーションアッセイ、受容体結合アッセイ、酵素アッセイ

10

20

30

40

50

イ、免疫細胞化学的アッセイ、免疫組織化学的アッセイ、及び細胞ベースアッセイ)で使用するための、改善されたランタニドキレート標識を得るための手段を提供することである。本発明のキレートは、340nmを超える波長でも、例えば、アッセイ感度、及びバックグラウンドに関連する、生体親和性に基づく改善された結合アッセイを得るための手段を提供する。

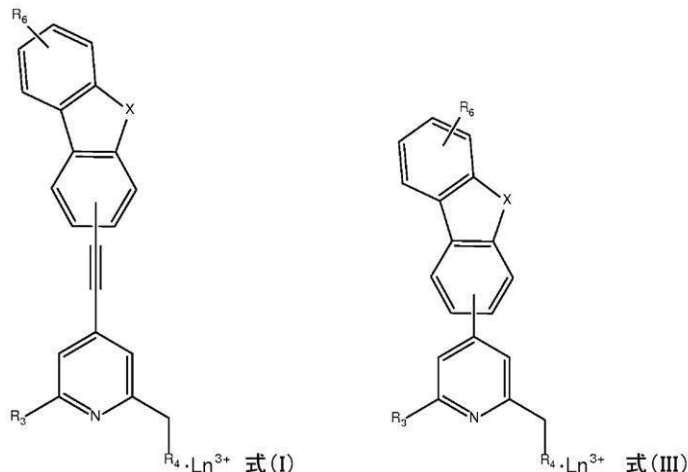
【0017】

発光ランタニドキレート

本発明の1つの態様は、式(I)又は式(III)の発色団部分を1つ以上含む発光ランタニドキレートに関する。

【0018】

【化3】



【0019】

式中、Xは、-S-、-O-、-NR₁-、-CR₁R₂-、>C=O、及び>C=N-O-R₁(>C(=O)のオキシム)から選択され；式中、R₁及びR₂は、それぞれ独立して、

水素、-(CH₂)₁₋₆COOH、-(CH₂)₁₋₆COO⁻、-(CH₂)₁₋₆SO₃H、-(CH₂)₁₋₆SO₃⁻、-(CH₂)₁₋₆-O-PO₃H₂、-(CH₂)₁₋₆-O-PO₃²⁻、-(CH₂)₁₋₆PO₃H₂、-(CH₂)₁₋₆PO₃²⁻、-(CH₂)₁₋₆NHR₅、-(CH₂)₁₋₆NCH₃R₅、-(CH₂)₁₋₆NEtR₅、-(CH₂)₁₋₆N(R₅)₂、-(CH₂)₁₋₆N⁺(CH₃)₂R₅、-(CH₂)₁₋₆OH、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OH、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OCH₃、-(CH₂)₁₋₆NHC(=O)R₅、-(CH₂)₁₋₆NCH₃C(=O)R₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)NHR₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)NCH₃R₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)NEtR₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)N(R₅)₂、-(CH₂)₁₋₆NHC(=O)NHR₅、-(CH₂)₁₋₆NHC(=S)NHR₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)R₅、-(CH₂)₁₋₆-C₆H₄-R₅、-COR₅、-CO(CH₂)₁₋₆NHR₅、及び-CO(CH₂)₁₋₆NCH₃R₅から選択され、式中、R₅は、水素、C₁₋₁₂アルキル(特にC₁₋₆アルキル)、-(CH₂)₁₋₆COOH、-(CH₂)₁₋₆COO⁻、-(CH₂)₁₋₆SO₃H、-(CH₂)₁₋₆SO₃⁻、-(CH₂)₁₋₆N⁺(CH₃)₂(CH₂)₁₋₆SO₃⁻、-(CH₂)₁₋₆-O-PO₃H₂、-(CH₂)₁₋₆-O-PO₃²⁻、-(CH₂)₁₋₆PO₃H₂、-(CH₂)₁₋₆PO₃²⁻、親水性基(任意選択的にスペーサーを含む)、反応性基(任意選択的にスペーサーを含む)、オリゴペプチド、ポリペプチド及びヌクレオチドから選択され；

R₃及びR₄は、それぞれ、発色団部分とキレートの他の部分との間の結合を表し、

R₆は、水素、-Cl、-Br、-F、-I、-CH₃、-(CH₂)₁₋₆OH、-

(CH₂)_{1~6}OCH₃-CF₃、-CN、-NO₂、-OH、-OCH₃、-O(CH₂)_{1~6}OH、-O(CH₂)_{1~6}OCH₂、-O(CH₂)_{1~6}COOH、-O(CH₂)_{1~6}COO⁻、-SCH₃、-S(CH₂)_{1~6}OH、-S(CH₂)_{1~6}OCH₂、-S(CH₂)_{1~6}COOH、-S(CH₂)_{1~6}COO⁻、-CONH₂、-CONHCH₃、-CON(CH₃)₂、-CONH(CH₂)_{1~6}OH、-CONHCH(CH₂OH)₂、-CONHC(CH₂OH)₃、-NHCOCH₃、-NHCO(CH₂)_{1~6}OH、-NHCO(CH₂)_{1~6}COOH、-NHCO(CH₂)_{1~6}COO⁻、反応性基Z、及び親水性基から選択され；Ln³⁺はランタニドイオンである。

【0020】

10

一実施形態において、R₁及びR₂は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、-(CH₂)_{1~6}COOH、-(CH₂)_{1~6}COO⁻、-(CH₂)_{1~6}SO₃H、-(CH₂)_{1~6}SO₃⁻、-(CH₂)_{1~6}-O-PO₃H₂、-(CH₂)_{1~6}-O-PO₃²⁻、-(CH₂)_{1~6}PO₃H₂、-(CH₂)_{1~6}PO₃²⁻、-(CH₂)_{1~6}NHR₅、-(CH₂)_{1~6}NCH₃R₅、-(CH₂)_{1~6}NEtR₅、-(CH₂)_{1~6}N(R₅)₂、-(CH₂)_{1~6}N⁺(CH₃)₂R₅、-(CH₂)_{1~6}OH、-(CH₂CH₂O)_{1~4}CH₂CH₂OH、-(CH₂CH₂O)_{1~4}CH₂CH₂OCH₃、-(CH₂)_{1~6}NHC(=O)R₅、-(CH₂)_{1~6}NCH₃C(=O)R₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)NHR₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)NCH₃R₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)NEtR₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)N(R₅)₂、-(CH₂)_{1~6}NHC(=O)NHR₅、-(CH₂)_{1~6}NHC(=S)NHR₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)R₅、-(CH₂)_{1~6}-C₆H₄-R₅、-COR₅、-CO(CH₂)_{1~6}NHR₅、及び-CO(CH₂)_{1~6}NCH₃R₅から選択され、式中、R₅は水素、C_{1~12}アルキル(特に、C_{1~6}アルキル)、-(CH₂)_{1~6}COOH、-(CH₂)_{1~6}COO⁻、-(CH₂)_{1~6}SO₃H、-(CH₂)_{1~6}SO₃⁻、-(CH₂)_{1~6}N⁺(CH₃)₂(CH₂)_{1~6}SO₃⁻、-(CH₂)_{1~6}-O-PO₃H₂、-(CH₂)_{1~6}-O-PO₃²⁻、-(CH₂)_{1~6}PO₃H₂、及び-(CH₂)_{1~6}PO₃²⁻から選択される。

20

【0021】

30

別の実施形態において、R₁及びR₂は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、-(CH₂)_{1~6}COOH、-(CH₂)_{1~6}COO⁻、-(CH₂)_{1~6}NHR₅、-(CH₂)_{1~6}NCH₃R₅、-(CH₂)_{1~6}NEtR₅、-(CH₂)_{1~6}N(R₅)₂、-(CH₂)_{1~6}N⁺(CH₃)₂R₅、-(CH₂)_{1~6}NHC(=O)R₅、-(CH₂)_{1~6}NCH₃C(=O)R₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)NHR₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)NCH₃R₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)NEtR₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)N(R₅)₂、-(CH₂)_{1~6}NHC(=O)NHR₅、-(CH₂)_{1~6}NHC(=S)NHR₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)R₅、-(CH₂)_{1~6}-C₆H₄-R₅、-COR₅、-CO(CH₂)_{1~6}NHR₅、及び-CO(CH₂)_{1~6}NCH₃R₅から選択され、式中、R₅は-(CH₂)_{1~6}COOH、及び-(CH₂)_{1~6}COO⁻から選択される。

40

【0022】

実施形態(他の実施形態と組み合わせられてもよい)において、R₁及びR₂の1つは、存在する場合、-(CH₂)_{1~6}NHR₅、-(CH₂)_{1~6}NCH₃R₅、-(CH₂)_{1~6}NEtR₅、-(CH₂)_{1~6}N(R₅)₂、-(CH₂)_{1~6}N⁺(CH₃)₂R₅、-(CH₂)_{1~6}NHC(=O)R₅、-(CH₂)_{1~6}NCH₃C(=O)R₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)NHR₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)NCH₃R₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)NEtR₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)N(R₅)₂、-(CH₂)_{1~6}NHC(=O)NHR₅、-(CH₂)_{1~6}NHC(=S)NHR₅、-(CH₂)_{1~6}C(=O)R₅、-(CH₂)_{1~6}-C₆

50

$H_4 - R_5$ 、 $-COR_5$ 、 $-CO(CH_2)_{1-6}NHR_5$ 、及び $-CO(CH_2)_{1-6}NCH_3R_5$ から選択され、式中、 R_5 は反応性基（任意選択的にスペーサーを含む）であり、特に、 R_5 は $-NCS$ であり、 R_1 及び R_2 のもう一方は、 R_5 が反応性基ではないことを除いて、上記の定義の通りである。この1つの変形において、 R_1 及び R_2 の1つは、 $-(CH_2)_{1-6}-C_6H_4-NCS$ 、 $-CO(CH_2)_{1-6}-C_6H_4-NCS$ であり、特に、 $-CH_2-C_6H_4-NCS$ である。

【0023】

更に別の実施形態において、 R_1 及び R_2 は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3H$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}N^+(CH_3)_2(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}-O-PO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}-O-PO_3^{2-}$ 、 $-(CH_2)_{1-6}PO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}PO_3^{2-}$ 、 $-(CH_2)_{1-6}OH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(CH_2COOH)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(CH_2COO^-)_2$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、及び $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ から選択され；特に、 R_1 及び R_2 は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、 $-CH_2COOH$ 、 CH_2COO^- 、 $-CH_2SO_3H$ 、 $-CH_2SO_3^-$ 、 $CH_2-O-PO_3H_2$ 、 $-CH_2-O-PO_3^{2-}$ 、 $-CH_2PO_3H_2$ 、 $-CH_2PO_3^{2-}$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2C(=O)N(CH_2COOH)_2$ 、 $-CH_2C(=O)N(CH_2COO^-)_2$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、及び $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ から選択される。

【0024】

本明細書で言及するとき、 $-(CH_2)_{1-6}$ は、1、2、3、4、5又は6個の炭素原子を有する直鎖アルキル鎖を意味する。本明細書の好ましい例は、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 及び $-CH_2-CH_2-CH_2-$ であり、特に、 $-CH_2-$ である。

【0025】

現在、いくつかの種類の置換基、すなわち、カルボン酸型及びスルホン酸型の置換基が特に興味深いと考えられる。したがって、好ましい実施形態において、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、水素、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3H$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 、 $-CH_2CONHCH_2COOH$ 、 $-CH_2CONHCH_2COO^-$ 、 $-CH_2CON(CH_2COOH)_2$ 、 $-CH_2CON(CH_2COO^-)_2$ 、 $-COCH_2NHCH_2COOH$ 、 $-COCH_2NHCH_2COO^-$ 、 $-COCH_2N(CH_2COOH)_2$ 、及び $-COCH_2N(CH_2COO^-)_2$ から選択され、特に、 $-CH_2-COOH$ 、 $-CH_2-COO^-$ 、 $-CH_2CON(CH_2COOH)_2$ 、及び $-CH_2CON(CH_2COO^-)_2$ から選択される。

【0026】

一実施形態において、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、 $-CH_2-COOH$ 及び CH_2-COO^- から選択される。

別の実施形態において、 X は $-CR_1R_2-$ であり、式中、 R_1 及び R_2 はいずれも水素である。

【0027】

一実施形態において、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立して、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ から選択され、特に、 $-(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2OCH_3$ から選択される。

【0028】

置換基がカルボキシレート、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート等である場合、対イオンとしてカチオン、例えば、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 等を含んでもよいことが理解されるべきである。

【0029】

10

20

30

40

50

一実施形態において、Xは、フルオレノン発色団に対応する $>C=O$ である。

別の実施形態において、Xはフルオレノンオキシム発色団に対応する $>C=N-OR_1$ である。この実施形態の1つの変形において、 R_1 は、水素、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3H$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}N^+(CH_3)_2(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}CH_2CH_2OCH_3$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NCH_3C(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NCH_3R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=S)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=S)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)R_5$ から選択され、式中、 R_5 は、水素、 C_{1-12} アルキル（特に、 C_{1-6} アルキル）、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3H$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ から選択される。

【0030】

別の実施形態において、Xは、ジベンゾチオフエンに対応する $-S-$ である。

更に別の実施形態において、Xは、ジベンゾフランに対応する $-O-$ である。

更に別の実施形態において、Xは、9H-カルバゾリルに対応する $-NR_1-$ である。この実施形態の1つの変形において、 R_1 は、水素、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3H$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}N^+(CH_3)_2(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}CH_2CH_2OCH_3$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NCH_3C(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NCH_3R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=S)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=S)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)R_5$ から選択され、式中、 R_5 は、水素、 C_{1-12} アルキル（特に、 C_{1-6} アルキル）、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3H$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ から選択される。

【0031】

更に別の実施形態において、Xは、フルオレンに対応する $-CR_1R_2-$ である。この実施形態の1つの変形において、 R_1 及び R_2 は、好ましくは独立して、水素、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3H$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}N^+(CH_3)_2(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}CH_2CH_2OCH_3$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NCH_3C(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NCH_3R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=S)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=S)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)R_5$ から選択され、式中、 R_5 は、水素、 C_{1-12} アルキル（特に、 C_{1-6} アルキル）、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3H$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ から選択される。

【0032】

親水性基の例は、単糖及びオリゴ糖、例えば、単糖及び二糖、オリゴアルキレングリコール（例えば、1～20個の繰返し単位を有するもの）、例えば、オリゴエチレングリコール及びオリゴプロピレングリコール等である。

【0033】

一実施形態において、親水性基は、単糖、二糖、 $-(CH_2)_{1-6}CH_2OH$ 、 $-C$

10

20

30

40

50

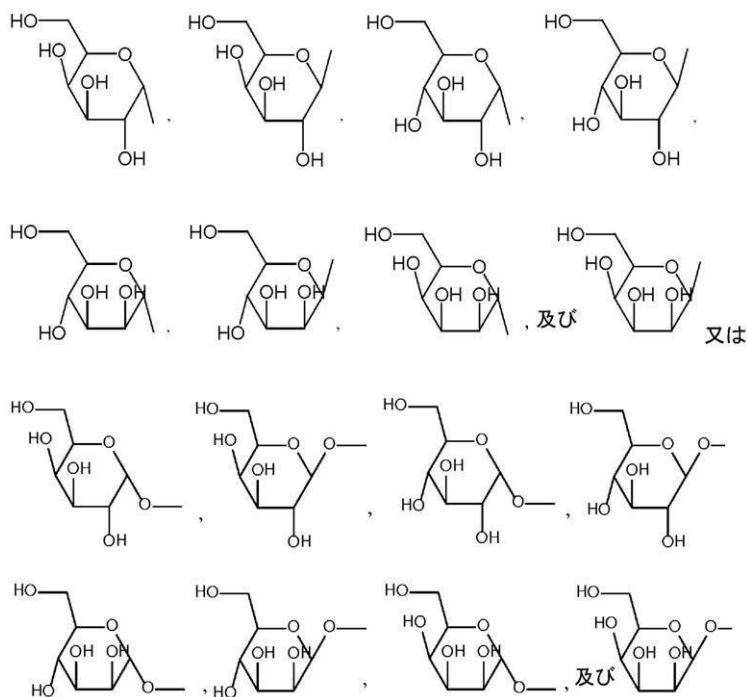
$H(CH_2OH)_2$ 、 $-C(CH_2OH)_3-(CH_2)_{1-3}-O-(CH_2CH_2O)_{0-5}-H$ 、 $-(CH_2)_{1-3}-O-(CH_2CH_2O)_{0-5}-C_{1-4}$ アルキル、 $-O-(CH_2CH_2O)_{1-6}-H$ 、及び $-O-(CH_2CH_2O)_{1-6}-C_{1-4}$ アルキル、特に、単糖から選択される。

【0034】

本文脈において、用語「単糖」は、非環式又は環式のいずれかの形態の $C_5 \sim C_7$ 炭水化物を意味することを意図する。単糖の例は、 C_6 炭水化物であり、例えば、以下から選択される。

【0035】

【化4】



10

20

【0036】

本文脈において、用語「二糖」は、好ましくはグリコシド結合によって、互いに結合した2個の単糖（上記参照）を意味することを意図する。

他の考えられる実施形態において、親水性基（規定の通り）はキレート構造に存在するが、式（I）又は（I I I）の発色団部分には存在しない。

【0037】

いくつかの代替的な実施形態において、置換基 R_1 及び/又は R_2 は、好ましくはスパーサーを含む反応性基Zを含む（更に下記参照）。このような場合、反応性基Zは、生体特異的結合反応体の標識を容易にするか、又は固体担体物質との共有結合の形成を容易にする。キレートが重合基を反応性基として有する場合、キレートを固体担体（例えば粒子）中に、粒子の製造と同時に、導入してもよい。

【0038】

存在する場合、反応性基Zは、典型的には、アジド（ $-N_3$ ）、アルキニル（ $-C \equiv CH$ ）、アルキレン（ $-CH=CH_2$ ）、アミノ（ $-NH_2$ ）、アミノオキシ（ $-O-NH_2$ ）、カルボキシル（ $-COOH$ ）、アルデヒド（ $-CHO$ ）、ヒドラジド（ $-CONHNH_2$ ）、メルカプト（ $-SH$ ）、マレイミド、マレイミドの活性化誘導体、イソシアナト（ $-NCO$ ）、イソチオシアナト（ $-NCS$ ）、ジアゾニウム（ $-N^+N$ ）、プロモアセトアミド、ヨードアセトアミド、反応性エステル、ピリジル-2-ジチオ、及び6-置換4-クロロ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミノから選択され、特に、反応性基は、イソチオシアナト（ $-NCS$ ）基を含む。6-置換4-クロロ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミノ中の置換基は、水素、ハロゲン、アルコキシ、アリールオキシ、アミノ、 C_{1-6} アルキル、置換アミノ又はチオエーテルからなる群から選択でき、好ましく

30

40

50

は、クロロ、フルオロ、エトキシ、2 - メトキシエトキシ、2 - シアノエトキシ、2 , 2 , 2 - トリフルオロエトキシ、チオフェノキシ、又はエトキシカルボニル - チオメトキシからなる群から選択できる。置換アミノ又はチオエーテルは、好ましくは一置換又は二置換であり、各置換基は、好ましくは $C_1 - 6$ アルキル、 $C_1 - 6$ アルキル - O - 、フェニル、カルボニル又はカルボキシルから独立して選択される。

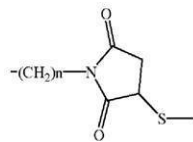
【 0 0 3 9 】

反応性基 Z は、生体特異的結合反応体（更には下記参照）と反応すると、上記生体特異的結合反応体への結合（例えば、下記の種類のうちの 1 つ）を確立する：チオ尿素（ - NH - C (= S) - NH - ）、アミノアセトアミド（ - NH - CO - CH₂ - NH - ）、アミド（ - NH - CO - 、 - CO - NH - 、 - NCH₃ - CO - 及び - CO - NCH₃ - ）、オキシム（ - O - N = CH - ）、ヒドラゾン（ - CO - NH - NH = CH - ）（及び脂肪族チオエーテル（ S ）ジスルフィド（ - S - S - ）、6 - 置換 - 1 , 3 , 5 - トリアジン - 2 , 4 - ジアミン、

10

【 0 0 4 0 】

【 化 5 】



【 0 0 4 1 】

（式中、 $n = 1 \sim 6$ ）、及びトリアゾール（例えば、いわゆる「クリック」ケスミトリールによって形成される）。

20

他の考えられる実施形態において、反応性基 Z（規定のとおり）はキレート構造内に存在するが、式（ I ）の発色団部分には存在しない。

【 0 0 4 2 】

反応性基 Z が存在する場合、基 Z は、必要又は望ましい場合に、反応性基 Z が生体特異的結合反応体との反応に関与できる位置に配置されるよう、スペーサー、すなわち、距離形成ピラジカルを含んでもよいことが理解されるべきである。同様に、 R_1 及び R_2 のいずれかが親水性基を含む場合、この親水性基はスペーサーを含んでもよい。いずれの場合も、スペーサーは、配位子又はキレートの合成の過程で容易に導入することができる。

30

【 0 0 4 3 】

「スペーサー」という用語は、例えば、共役基又はコア構造のピリジン部分と、例えば、反応性基 Z 又は親水性基との間の距離形成基を意味することを意図する。スペーサーは、典型的には、連結箇所と反応性基（又は親水性基）との間に 1 ~ 20 結合（例えば、3 ~ 15 結合又は 5 ~ 12 結合）の長さを有する。上記スペーサーは 1 ~ 5 つの部分で形成され、各部分は、フェニレン、 $-C_1 - 10$ アルキレン - 、エチンジイル（ - C $\equiv$ C - ）、エチレンジイル（ - C = C - ）、エーテル（ - O - ）、チオエーテル（ - S - ）、ジスルフィド（ - S - S - ）、アミド（ - C (= O) - NH - 、 - NH - C (= O) - 、 - C (= O) - NCH₃ - 及び - NCH₃ - C (= O) - ）、カルボニル（ - CO - ）、エステル（ - COO - 及び - OOC - ）、スルホアミド（ - SO₂ - NH - 、 - SO₂ - NR' - ）、スルホン（ - SO₂ - ）、ホスフェート（ - O - PO₂ - O - ）、ジアザ（ - N = N - ）、第三級アミン、チオ尿素（ - NH - C (= S) - NH - ）、オキシム（ - O - N = CH - ）、ヒドラゾン（ - CO - NH - NH = CH - ）及びトリアゾールからなる群から選択され、式中、 R' は 1 ~ 10 個の炭素原子からなるアルキル基を表す。

40

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態において、置換基 R_1 及び / 又は R_2 の少なくとも 1 つは、オリゴペプチド、ポリペプチド又はポリヌクレオチドを含む。

R_3 及び R_4 はそれぞれ、発色団部分とキレートの他の部分、例えば、発色団部分とキレート化部分との間の結合を表す。少なくとも 2 個のカルボン酸又はリン酸基、これらの酸のエステル、アミド又は塩を含むキレート化部分は、直接的に又は環式若しくは非環式

50

N - 及び / 若しくは O - 含有炭化水素鎖を介してのいずれかで、発色団部分の芳香族単位に結合する。式 (I) 及び / 又は (III) の発色団部分が、従来のキレート内の任意の他の発色団部分に置き換わってよいことは理解されるべきである。したがって、式 (I) 及び / 又は (III) の発色団部分を、式 (I) 又は (III) の発色団部分と類似の又は異なる他の発色団部分を有する従来のキレートに単純に組み込むことができることが理解される。実施例の節に実例が提供されている。

【0045】

R_3 及び R_4 はそれぞれ、キレートの他の部分に対する結合、例えば、別の発色団部分に対する結合（一般にはリンカーを介する）、又は錯体形成基（例えば、 $-\text{COOH}/-\text{COO}^-$ ）に対する結合、又は単に末端基若しくは水素原子に対する結合を表わす。

10

【0046】

1つの変形において、 R_3 及び $-\text{CH}_2-R_4$ の1つ又は両方は、 $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{N}(\text{R}_7)-(\text{CH}_2)_{1-3}-$ であってもよく、式中、 R_7 は $-(\text{CH}_2)_{1-6}-$ アリールであり、ここで、アリール（例えば、フェニル）は、上記定義による反応性基 Z で置換されてもよい。

【0047】

別の変形において、 R_3 及び $-\text{CH}_2-R_4$ の1つ又は両方は、 $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{N}(\text{R}_8)-(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{Chr}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{O}(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{Chr}$ 、又は $-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{S}(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{Chr}$ であってもよく、式中、 R_8 は、
 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COO}^-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{SO}_3^-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{PO}_3^{2-}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NHR}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NCH}_3\text{R}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{N}(\text{R}_5)_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NHC}(=\text{O})\text{R}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NCH}_3\text{C}(=\text{O})\text{R}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{C}(=\text{O})\text{NHR}_5$ 、
 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NHC}(=\text{S})\text{NHR}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{C}(=\text{O})\text{R}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}_5$ 、 $-\text{COR}_5$ 、 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NHR}_5$ 、及び $-\text{CO}(\text{CH}_2)_{1-6}\text{NCH}_3\text{R}_5$ 、
 $-(\text{CH}_2)_{1-10}\text{OH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-10}\text{OR}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-10}\text{NH}_2$ 、
 $-(\text{CH}_2)_{1-10}\text{NHR}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-10}\text{NCH}_3\text{R}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-10}\text{SH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-10}\text{SR}_5$ から選択され、式中、 R_5 は、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$ 、
 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COO}^-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{SO}_3^-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{PO}_3^{2-}$ 、及び反応性基 Z から選択され、式中、Chr は別の発色団部分を表す。

20

30

【0048】

更に別の変形（これは他の実施形態と組み合わせられてもよい）において、 R_3 及び $-\text{CH}_2-R_4$ の1つ又は両方は、独立して、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ 及び $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$ から選択される。

40

【0049】

更に別の変形（これは他の実施形態と組み合わせられてもよい）において、 R_3 及び $-\text{CH}_2-R_4$ の1つ又は両方は、独立して、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{PO}_3^{2-}$ 、 $-\text{P}(\text{CH}_3)\text{O}_2\text{H}$ 、 $-\text{P}(\text{CH}_3)\text{O}_2^-$ 、 $-\text{P}(\text{Ph})\text{O}_2\text{H}$ 及び $-\text{P}(\text{Ph})\text{O}_2^-$ から選択される。

【0050】

代表的な R_3 及び R_4 並びに開示されたピリジン系発色団部分を本発明の発色団で置き換えることができるキレート設計の例は、例えば、以下の刊行物のものである。Hovinen, J., et al., Bioconjugate Chem., 20 (2009)

50

) 404; He., S., et al., Organic Lett., 13 (2011), 5036; Wang., Q., et al., Inorg. Chem., 52 (2013) 8461; Butler, S. J., et al., Chem Eur. J., 19 (2013) 9511 及び国際公開第2013/011236号。

【0051】

一実施形態において、基 - R_3 及び - $CH_2 - R_4$ は、それぞれ独立して、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}H$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}COOH$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}COO^-$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3H$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3^-$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3H_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3^{2-}$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3H_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3^{2-}$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NHR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NCH_3R_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NEtR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}N(R_5)_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}OH$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}OR_5$ 、 - $(CH_2CH_2O)_{1 \sim 4}CH_2CH_2OH$ 、 - $(CH_2CH_2O)_{1 \sim 4}CH_2CH_2OCH_3$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}SH$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}SR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=O)R_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NCH_3C(=O)R_5$ 、

- $(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)NHR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)NCH_3R_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)NEtR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)N(R_5)_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=O)NHR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=S)NHR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)R_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}-C_6H_4-R_5$ 、 - COR_5 、 - $CO(CH_2)_{1 \sim 6}NHR_5$ 、 及び - $CO(CH_2)_{1 \sim 6}NCH_3R_5$ 、 - $CONH(CH_2)_{1 \sim 6}OH$ 、 - $CONH(CH_2)_{1 \sim 6}OR_5$ 、 - $CONH(CH_2)_{1 \sim 6}SH$ 、 - $CONH(CH_2)_{1 \sim 6}SR_5$ 、 - $CONH(CH_2)_{1 \sim 6}NH_2$ 、 - $CONH(CH_2)_{1 \sim 6}NHR_5$ から選択され、式中、 R_5 は、水素、 $C_{1 \sim 12}$ アルキル、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}COOH$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}COO^-$ 、

- $(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3H$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3^-$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3H_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3^{2-}$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3H_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3^{2-}$ 、親水性基（任意選択的にスペーサーを含む）、反応性基（任意選択的にスペーサーを含む）、オリゴペプチド、ポリペプチド及びヌクレオチドから選択される。

【0052】

特に興味深い1つの変形において、基 - R_3 及び - $CH_2 - R_4$ は、それぞれ独立して、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}COOH$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}COO^-$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3H$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3^-$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3H_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3^{2-}$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3H_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3^{2-}$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NHR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NCH_3R_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NEtR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}N(R_5)_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=O)R_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NCH_3C(=O)R_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)NHR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)NCH_3R_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)NEtR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)N(R_5)_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=O)NHR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}NHC(=S)NHR_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}C(=O)R_5$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}-C_6H_4-R_5$ 、 - COR_5 、 - $CO(CH_2)_{1 \sim 6}NHR_5$ 、 及び - $CO(CH_2)_{1 \sim 6}NCH_3R_5$ から選択され、式中、 R_5 は、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}COOH$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}COO^-$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3H$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}SO_3^-$ 、

- $(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3H_2$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}-O-PO_3^{2-}$ 、 - $(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3H_2$ 、 及び - $(CH_2)_{1 \sim 6}PO_3^{2-}$ から選択される。一実施形態（これは、他の実施形態と組み合わせられてもよい）において、 R_3 及び - $CH_2 - R_4$ の1つ又は両方は、独立して、 $CH_2 - N(CH_2COOH)_2$ 及び - $CH_2 - N(CH_2COO^-)_2$ から選択される。

【0053】

一実施形態（これは他の実施形態と組み合わせられてもよい）において、 R_3 及び $-CH_2-R_4$ の1つは、独立して、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NCH_3C(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NCH_3R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NEtR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=S)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)R_5$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}-C_6H_4-R_5$ から選択され、式中、 R_5 は、親水性基（任意選択的にスペーサーを含む）、反応性基（任意選択的にスペーサーを含む）、オリゴペプチド、ポリペプチド及びヌクレオチドから選択される。1つの変形において、 R_5 は反応性基（任意選択的にスペーサーを含む）である。

10

【0054】

置換基 R_6 は、典型的には、水素、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-F$ 、 $-I$ 、 $-CH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-SCH_3$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CONHCH_3$ 、 $-CON(CH_3)_2$ 、 $-NHCOCH_3$ 、反応性基 Z 、及び親水性基から選択される。いくつかの実施形態において、 R_6 は存在しない。他の実施形態において、1つの R_6 は、反応性基である（上記参照）。

【0055】

いくつかの興味深い実施形態において、キレートは、例えば、化合物 47、48、49、50、53、54、57、58、64、65、66、78、79 及び 80 で例示されるような発色団基を合計で2又は3個有する。

20

【0056】

「ランタニドイオン」又は「 Ln^{3+} 」という用語は、元素周期表のランタニド系列の三価イオン、例えば、ユーロピウム（III）、テルビウム（III）、サマリウム（III）、及びジスプロシウム（III）、すなわち、 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 又は Dy^{3+} を意味することを意図する。多くの実施形態において、ユーロピウム（III）（ Eu^{3+} ）が好ましい。

【0057】

更に、本発明は、多標識の可能性をもたらす、全てのランタニドに対する高発光性の標識を提供する。

【0058】

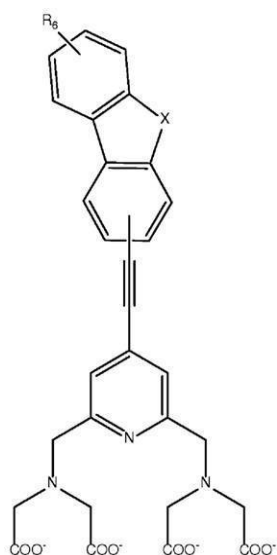
30

いくつかの特定の実施形態において、キレートは、以下の構造式（A-I）、（A-II）、（B-I）、（B-I^{*}）、（B-III）、（B-III^{*}）、（C-I）、（C-II）、（D-I）及び（D-III）の1つを有する：

（A-I）は、14、40、41、42の化合物に対応し、

【0059】

【化 6】



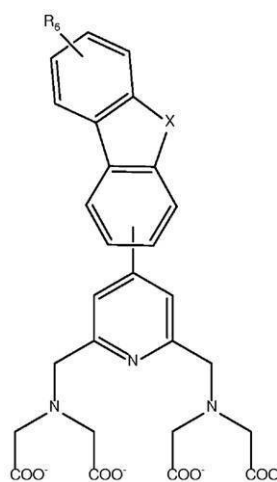
10

【 0 0 6 0】

(A - I I I) は、化合物 1 1、1 2、2 6、2 7、2 8、3 0 に対応し、

【 0 0 6 1】

【化 7】



20

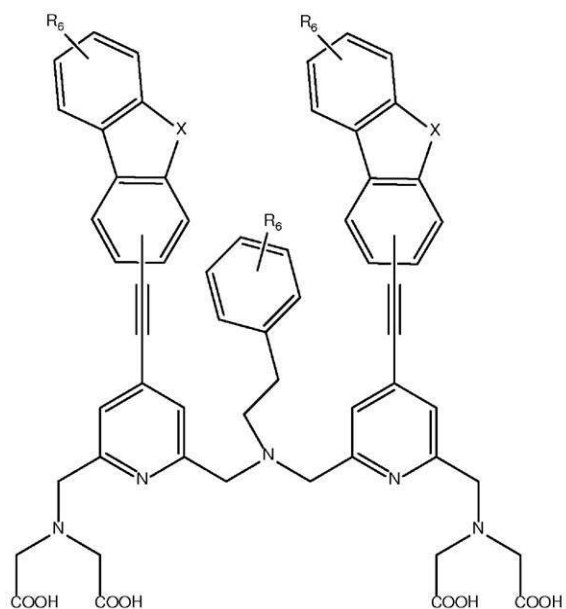
30

【 0 0 6 2】

(B - I) は、化合物 4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0 に対応し、

【 0 0 6 3】

【化 8】



10

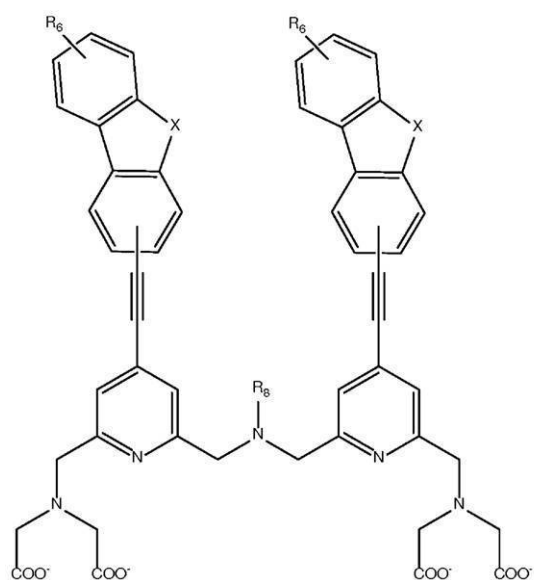
【 0 0 6 4 】

(B - I *) :

【 0 0 6 5 】

20

【化 9】



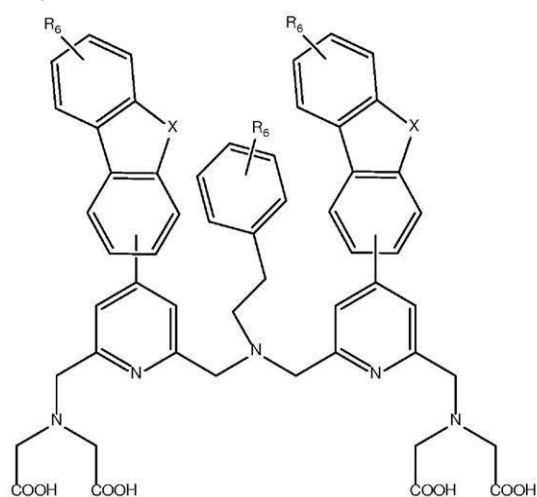
30

【 0 0 6 6 】

(B - I I I) は、化合物 5 2、5 3、5 4、5 6、5 7、5 8 に対応し :

【 0 0 6 7 】

【化 1 0】



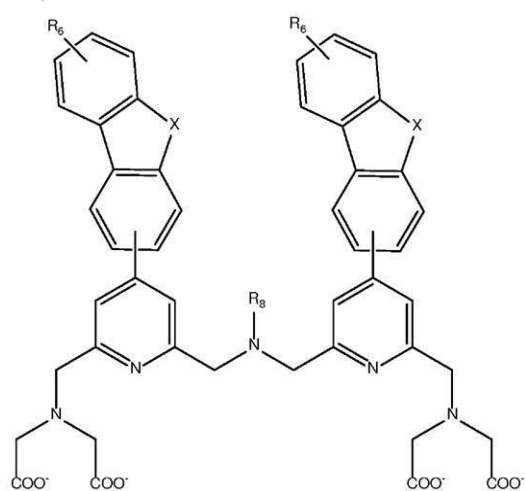
10

【 0 0 6 8】

(B - I I I *) :

【 0 0 6 9】

【化 1 1】



20

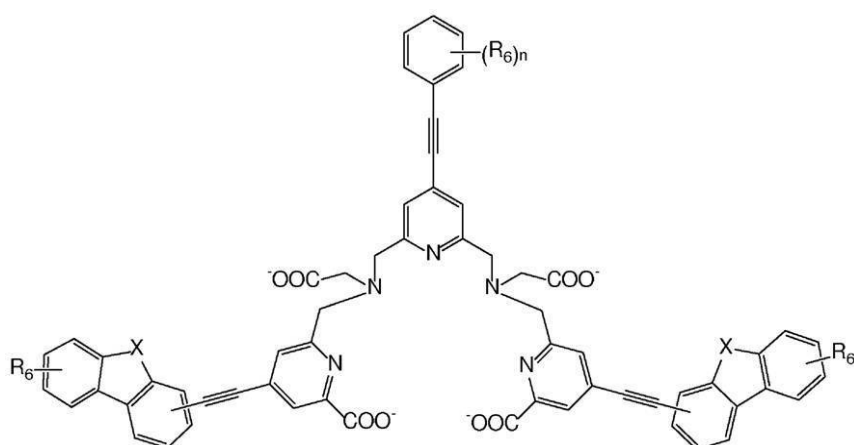
30

【 0 0 7 0】

(C - I) は、化合物 6 4、6 5、6 6 に対応し

【 0 0 7 1】

【化 1 2】



40

【 0 0 7 2】

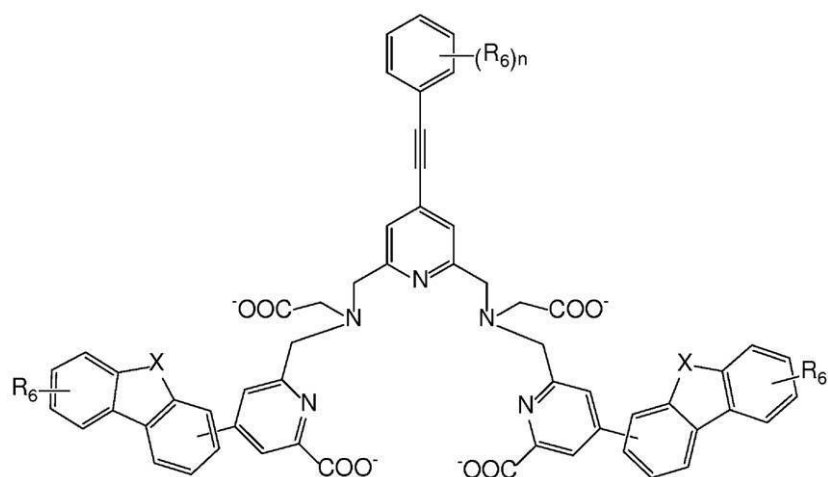
(式中、n = 1 ~ 5 である)

(C - I I I) :

50

【 0 0 7 3 】

【 化 1 3 】



10

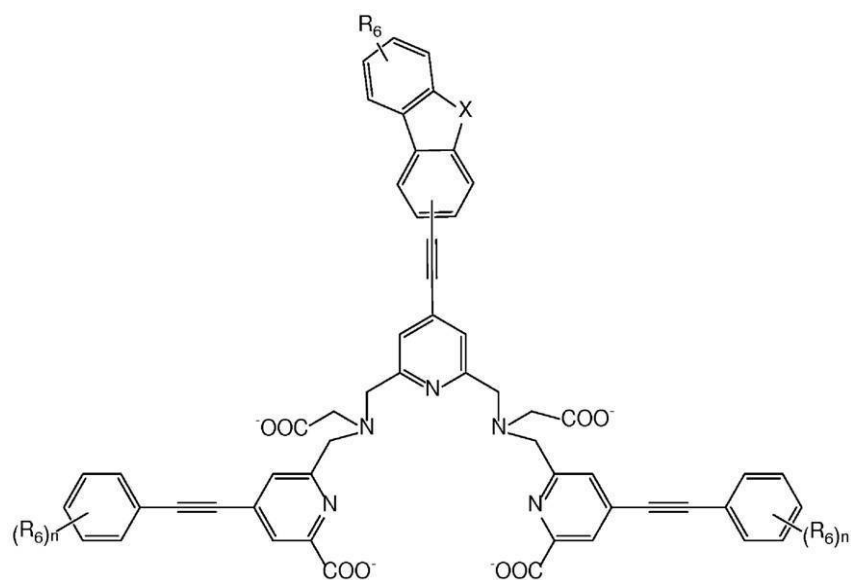
【 0 0 7 4 】

(式中、 $n = 1 \sim 5$ である)

(D - I) は、化合物 78、79 に対応し：

【 0 0 7 5 】

【 化 1 4 】



20

30

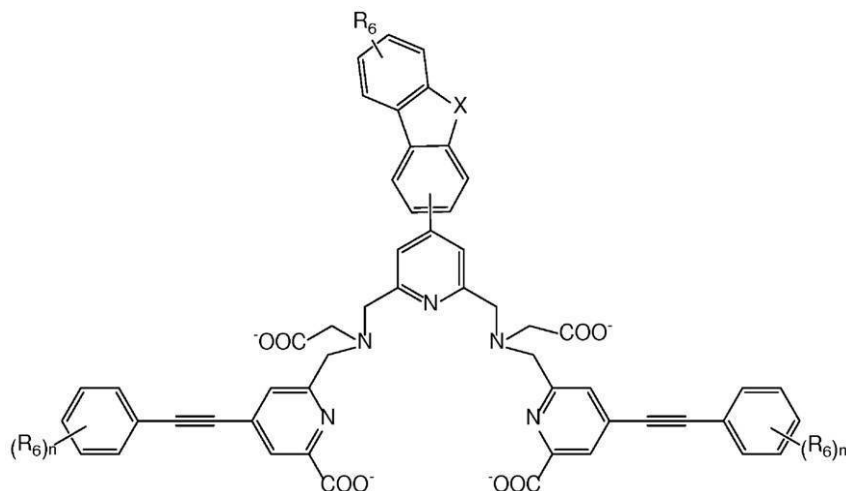
【 0 0 7 6 】

(式中、 $n = 1 \sim 5$ である)

(D - I I I) :

【 0 0 7 7 】

【化 15】



10

【0078】

式(A-I)、(A-III)、(B-I)、(B-I*)、(B-III)、(B-III*)、(C-I)、(C-III)、(D-I)及び(D-III)のそれぞれにおいて、X、R₃、R₄、R₆及びR₈は、それぞれ、上記式(I)及び(III)に関して定義された基X、R₃、R₄、R₆及びR₈を表す。式(I)及び(III)に関して上に記載された各規定、実施形態、変形及び優先性(等)は、式(A-I)、(A-III)、(B-I)、(B-I*)、(B-III)、(B-III*)、(C-I)、(C-III)、(D-I)及び(D-III)の対応する実施形態、変形及び優先性ともみなされるべきである。

20

【0079】

1つの好ましい実施形態において、キレートは、式(A-I)又は(A-III)を有する。本発明の1つの変形において、Xは、-NHR₁又は-CR₁R₂-であり、R₁及びR₂は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、-(CH₂)₁₋₆COOH、-(CH₂)₁₋₆COO⁻、-(CH₂)₁₋₆N⁺(CH₃)₂R₅、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OH、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OCH₃、-(CH₂)₁₋₆C(=O)NHR₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)NCH₃R₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)NEtR₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)N(R₅)₂、-(CH₂)₁₋₆NHC(=O)NHR₅、-(CH₂)₁₋₆NHC(=S)NHR₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)R₅、-(CH₂)₁₋₆-C₆H₄-R₅、-COR₅、-CO(CH₂)₁₋₆NHR₅、及び-CO(CH₂)₁₋₆NCH₃R₅から選択され、式中、R₅は、-(CH₂)₁₋₆COOH、及び-(CH₂)₁₋₆COO⁻から選択される。特に、R₁及びR₂は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、-(CH₂)₁₋₆COOH、-(CH₂)₁₋₆COO⁻、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OH、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OCH₃、及び-(CH₂)₁₋₆C(=O)N(R₅)₂から選択され、式中、R₅は、-(CH₂)₁₋₆COOH、及び-(CH₂)₁₋₆COO⁻から選択され；特に水素、-CH₂COOH、-CH₂COO⁻、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OH、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OCH₃、-CH₂C(=O)N(CH₂COOH)₂、及び-CH₂C(=O)N(CH₂COO⁻)₂から選択される。

30

40

【0080】

別の好ましい実施形態において、キレートは、式(B-I)又は(B-I*)又は(B-III)又は(B-III*)を有する。本発明の1つの変形において、Xは、-NHR₁又は-CR₁R₂-であり、R₁及びR₂は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、-(CH₂)₁₋₆COOH、-(CH₂)₁₋₆COO⁻、-(CH₂)₁₋₆N⁺(CH₃)₂R₅、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OH、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OCH₃、-(CH₂)₁₋₆C(=O)NHR₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)NCH₃R₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)NEtR₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)N(R₅)₂、-(CH₂)₁₋₆NHC(=O)NHR₅、-(CH₂)₁₋₆NHC(=S)NHR₅、-(CH₂)₁₋₆C(=O)R₅、-(CH₂)₁₋₆-C₆H₄-R₅、-COR₅、-CO(CH₂)₁₋₆NHR₅、及び-CO(CH₂)₁₋₆NCH₃R₅から選択され、式中、R₅は、-(CH₂)₁₋₆COOH、及び-(CH₂)₁₋₆COO⁻から選択され；特に水素、-CH₂COOH、-CH₂COO⁻、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OH、-(CH₂CH₂O)₁₋₄CH₂CH₂OCH₃、-CH₂C(=O)N(CH₂COOH)₂、及び-CH₂C(=O)N(CH₂COO⁻)₂から選択される。

50

$(CH_2)_{1-6}C(=O)NCH_3R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NEtR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=S)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}-C_6H_4-R_5$ 、 $-COR_5$ 、 $-CO(CH_2)_{1-6}NHR_5$ 、及び $-CO(CH_2)_{1-6}NCH_3R_5$ から選択され、式中、 R_5 は、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ から選択される。特に、 R_1 及び R_2 は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(R_5)_2$ から選択され、式中、 R_5 は、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ から選択され；特に水素、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2COO^-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ 、 $-CH_2C(=O)N(CH_2COOH)_2$ 、及び $-CH_2C(=O)N(CH_2COO^-)_2$ から選択される。

10

【0081】

更に別の好ましい実施形態において、キレートは、式(C-I)又は(C-III)を有する。本発明の1つの変形において、 X は、 $-NHR_1$ 又は $-CR_1R_2$ であり、 R_1 及び R_2 は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}N^+(CH_3)_2R_5$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NCH_3R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NEtR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=S)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}-C_6H_4-R_5$ 、 $-COR_5$ 、 $-CO(CH_2)_{1-6}NHR_5$ 、及び $-CO(CH_2)_{1-6}NCH_3R_5$ から選択され、式中、 R_5 は、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ から選択される。特に、 R_1 及び R_2 は、存在する場合、それぞれ独立して水素、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(R_5)_2$ から選択され、式中、 R_5 は、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ から選択され；特に、水素、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2COO^-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ 、 $-CH_2C(=O)N(CH_2COOH)_2$ 、及び $-CH_2C(=O)N(CH_2COO^-)_2$ から選択される。

20

30

【0082】

更に別の好ましい実施形態において、キレートは、式(D-I)又は(D-III)を有する。本発明の1つの変形において、 X は、 $-NHR_1$ 又は $-CR_1R_2$ であり、 R_1 及び R_2 は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}N^+(CH_3)_2R_5$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NCH_3R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)NEtR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(R_5)_2$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=O)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}NHC(=S)NHR_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}C(=O)R_5$ 、 $-(CH_2)_{1-6}-C_6H_4-R_5$ 、 $-COR_5$ 、 $-CO(CH_2)_{1-6}NHR_5$ 、及び $-CO(CH_2)_{1-6}NCH_3R_5$ から選択され、式中、 R_5 は、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ から選択される。特に、 R_1 及び R_2 は、存在する場合、それぞれ独立して、水素、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ 、及び $-(CH_2)_{1-6}C(=O)N(R_5)_2$ から選択され、式中、 R_5 は、 $-(CH_2)_{1-6}C$

40

50

OOH、及び $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ から選択され；特に水素、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2COO^-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OH$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{1-4}CH_2CH_2OCH_3$ 、 $-CH_2C(=O)N(CH_2COOH)_2$ 、及び $-CH_2C(=O)N(CH_2COO^-)_2$ から選択される。

【0083】

更に、 Eu^{3+} が、式 (A-I)、(A-III)、(B-I)、(B-I^{*})、(B-III)、(B-III^{*})、(C-I)、(C-III)、(D-I) 及び (D-III) のキレートにおいて好ましいが、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 又は Dy^{3+} から選択される任意の他のランタニドで置換されてもよいと考えられる。

【0084】

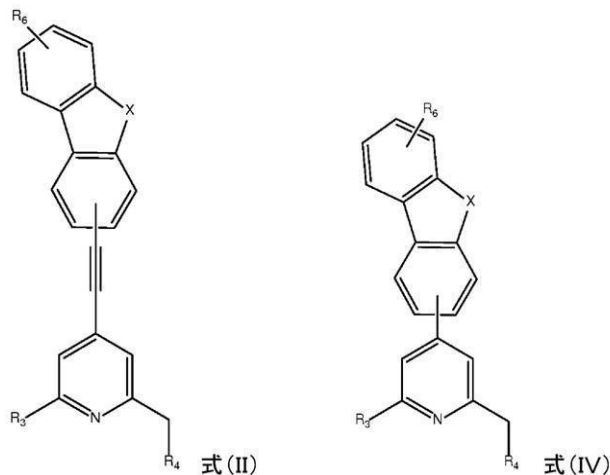
特に興味深いのは、構造 11、12、14、49、54、66、及び 80 のいずれか 1 つをベースとするランタニドキレートである。

ランタニドキレート化配位子

したがって、本発明の別の態様は、式 (II) 又は式 (IV) の発色団部分を 1 つ以上含むランタニドキレート化配位子に関し、

【0085】

【化 16】



【0086】

式中、X、 R_3 、 R_4 及び R_6 のそれぞれは、それぞれ、式 (I) 及び (III) に関する上記定義による基 X、 R_3 、 R_4 及び R_6 を表す。

いくつかの興味深い実施形態において、ランタニドキレート化配位子は、上記 (A-I)、(A-III)、(B-I) 又は (B-III) の 1 つ (Eu^{3+} を除く) を有する。

【0087】

検出可能分子

本発明の更に別の態様は、上記定義による発光ランタニドキレートと共役した生体特異的結合体を含む検出可能分子に関する。共役は通常、上記キレートの反応性基によって得られる。

【0088】

生体特異的結合反応体は、サンプル中の検体を定量又は定性分析するために、その検体と特異的に結合することが必要である。

生体特異的結合反応体の例としては、抗体、抗原、受容体配位子、特異的結合タンパク質、DNAプローブ、RNAプローブ、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド（例えば LNA 修飾オリゴヌクレオチド）、修飾ポリヌクレオチド（例えば LNA 修飾ポリヌクレオチド）、タンパク質、オリゴ糖、多糖、リン脂質、PNA、ステロイド、ハプテン、ドラッグ、受容体結合配位子、及びレクチンから選択されるものが挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

好ましい実施形態において、生体特異的結合反応体は、抗体、例えば、トロポニン I 抗体（抗 T n I）から選択される。

生体特異的結合アッセイの実施方法

本発明のまた更なる態様は、生体特異的結合アッセイの実施方法に関し、この方法は以下の工程を含む：

a) 検体と、本明細書の定義によるランタニドキレートで標識化された生体特異的結合反応体との間でバイオ複合体を形成する工程、

b) 励起波長を有する放射線で上記バイオ複合体を励起させ、これにより励起バイオ複合体を形成する工程、及び

c) 上記励起バイオ複合体から放出される発光放射線を検出する工程。

10

【 0 0 9 0 】

工程 b) において、励起波長は、好ましくは 3 0 0 n m 以上、例えば、約 3 2 0 ~ 3 8 0 n m であり、励起の有意な拡張は 3 6 0 n m ~ 3 8 0 n m で得られる。

本発明の方法は、当業者には明白であると思われる従来のアッセイ工程に従う。

【 0 0 9 1 】

つまり、本発明の更なる態様は、固有ルミネセンスの時間分解蛍光光度測定を利用した特異的生体親和性に基づく結合アッセイにおける、上記定義による検出可能分子の使用に関する。一実施形態において、特異的生体親和性に基づく結合アッセイは、不均一系イムノアッセイ、均一系イムノアッセイ、DNA ハイブリダイゼーションアッセイ、受容体結合アッセイ、免疫細胞化学的アッセイ、又は免疫組織化学的アッセイである。

20

【 0 0 9 2 】

固体担体

本発明の更に別の態様は、上記定義による発光ランタニドキレートと共役した固体担体物質に関する。発光ランタニドキレートは通常、共有結合又は非共有結合のいずれかにより固体担体物質に固定化される。

【 0 0 9 3 】

いくつかの興味深い実施形態では、固体担体物質は、ナノ粒子、マイクロ粒子、スライド、プレート、及び固相合成樹脂から選択される。

新規ランタニドキレート配位子並びに対応する発光ランタニドキレート及び標識化生体特異的結合反応体は、開鎖（すなわち非環式）の配位子構造をベースとし、この構造はキレート化ランタニドイオンの驚くほど効率的な励起をもたらす。同時に、発光ランタニドキレート及び標識化生体特異的結合反応体の重要な特徴を、凝集物の追加形成及び精製問題を生じることなく、全て保持することができる。

30

【 0 0 9 4 】

本発明のキレートは、以下のような、単一標識のいくつかの重要な特徴を組み合わせることを目的とする：

(a) より長い波長へのシフト（実施例を参照）により、計器製造におけるコスト削減及び計器小型化の可能性をもたらすと予想される UV LED を励起源として使用することを可能にする。

40

【 0 0 9 5 】

(b) 高い吸光係数 (ϵ) と適切な量子収率 (ϕ) との組み合わせにより、高感度の時間分解バイオアッセイにおいて拡張された輝度 ($\epsilon \times \phi$) の使用をもたらす。

(c) キレートを、異なるランタニドに適用できる。

【 0 0 9 6 】

(d) シグナルの損失なく、標識化度を低下することができる。

(e) 標識化度の低下により、生体分子の親和性の改善及びアッセイ中の非特異的結合の減少が可能になる。より速い反応速度が可能となり、アッセイ感度を向上させることもできるより低いバックグラウンドが見られる。

【 0 0 9 7 】

50

(f)特に、数個の芳香族発色団部分を有するキレートに関して、水溶性の向上を伴う発色団部分の望ましくない吸光特性の低下。これは、標識化抗体の非特異的結合を低減し、アッセイ感度の向上をもたらす。

【実施例】

【0098】

以下の非限定的実施例は、本発明を更に実証することを目的とする。

FC = フラッシュクロマトグラフィー。RT = 室温。マイクロウェーブ合成装置は Initiator システム (Biotope) であった。¹H NMR 及び ¹³C NMR スペクトルは、SiMe₄ を内部標準として使用して、Bruker AVANCE 500 DRX (Bruker, Karlsruhe, Germany) で記録し、ケミカルシフト δ は ppm 単位である。質量スペクトルは、Voyager DE Pro (Applied Biosystems, Foster City, CA) 質量分析計で記録した。HPLC は、Dionex の Ultimate 3000 ダイオードアレイ検出器を含む Dionex の Ultimate 3000 システムで実施した。使用したカラムは、ThermoHypersil 150 × 4 mm 5 μm Hypersil (登録商標) ODS であった。使用した溶離液は、100 mM TEAA 及び CH₃CN であった。HPLC は、75 % の H₂O、20 % の 100 mM TEAA 及び 5 % の CH₃CN から開始して、30 分以内に、30 % の H₂O、20 % の TEAA 及び 50 % の CH₃CN に至る溶離液グラジエントを使用して実施した。HPLC に関して、試料濃度は、水 1 mL 中に約 1 mg のキレートであった。試料体積は、20 ~ 25 μL であった。モル吸光係数 (ε)、励起最大波長 (λ_{exc})、ルミネセンス寿命 (τ)、量子収率 (Φ)、及び三重項段階エネルギー (T) の計器、測定及び計算原理については、例えば、Raesaenen, M., et al., 2014, J. Luminescence, 146, 211 - 217 を参照。

【0099】

実施例 1 . 化合物 1 の合成

2 - プロモフルオレン (0.74 g、3.0 mmol)、ビス (ピナコラト) ジボラン (1.22 g、4.8 mmol) 及び KOAc (0.88 g、9.0 mmol) の DMF (30 mL) 中混合物を、アルゴンで脱気した。[1, 1' - ビス (ジフェニルホスフィン) フェロセン] ジクロロパラジウム (II) の CH₂Cl₂ 錯体 (0.12 g、0.15 mmol) を添加した後、反応混合物を 60 ° で 22 時間撹拌した。水 (30 mL) を添加し、混合物を Et₂O (50 mL + 20 mL) で抽出し、合わせた有機相を Na₂SO₄ で乾燥した。生成物を、FC (シリカゲル、20 % EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65 °C)) により精製した。収率: 0.88 g (100 %)。¹H - NMR (CDCl₃): 1.37 (12 H, s); 7.32 (1 H, td, J = 7.4 及び 1.1 Hz); 7.38 (1 H, t, J = 7.4 Hz); 7.55 (1 H, d, J = 7.4 Hz); 7.80 (1 H, d, J = 7.7 Hz); 7.82 (1 H, d, J = 7.4 Hz); 7.84 (1 H, d, J = 7.7 Hz); 8.00 (1 H, s)。¹³C - NMR (CDCl₃): 24.99; 36.74, 83.78; 119.29; 120.39; 125.14; 126.76; 127.23; 131.29; 133.40; 134.76; 141.54; 142.47; 143.92; 144.59。MALDI TOF - MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 293.19; 測定値 293.51。

【0100】

実施例 2 . 化合物 2 の合成

2 - プロモフルオレン (1.23 g、5 mmol) を、NaH (0.36 g、15 mmol) と乾燥 DMF (25 mL) の混合物に、アルゴン下で添加した。5 分間撹拌した後、BrCH₂COOtBu (2.21 mL、15 mmol) を添加し、この混合物を室温で 10 分間及び 65 ° で 23 時間撹拌した。混合物を CH₂Cl₂ (60 mL) に溶解し、H₂O (3 × 30 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。生成物を、FC (シリカゲル、最初に 5 %、次いで 10 % EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65 °C)) によ

り精製した。収率：1.89 g (80%)。¹H-NMR (CDCl₃) : 1.06 (18 H, s) ; 2.89 (2 H, d, J = 14.2 Hz) ; 2.98 (2 H, d, J = 14.2 Hz) ; 7.33 (1 H, td, J = 7.3 及び 1.5 Hz) 、 7.35 (1 H, td, J = 7.3 及び 1.5 Hz) ; 7.48 (1 H, dd, J = 8.1 及び 1.7 Hz) ; 7.50 - 7.73 (1 H, m) 、 7.55 (1 H, d, J = 8.1 Hz) ; 7.64 - 7.68 (1 H, m) ; 7.69 (1 H, d, J = 1.7 Hz)。¹³C-NMR (CDCl₃) : 27.58 ; 44.42 ; 50.70 ; 80.43 ; 119.81 ; 120.80 ; 121.03 ; 123.96 ; 127.59 ; 127.65 ; 127.94 ; 130.72 ; 139.46 ; 139.68 ; 148.02 ; 150.51。MALDI TOF-MS 質量：計算値 (M + H⁺) 473.13 及び 475.12 ; 測定値 473.14 及び 475.13。

10

【0101】

実施例 3 . 化合物 3 の合成

この化合物 3 は、2-ブロモフルオレンと { 2 - [2 - (2 - メトキシエトキシ) - エトキシ] エトキシ } - p - トルエンスルホネートから、実施例 2 に記載の合成と類似の方法を用いて合成した。生成物を、FC (シリカゲル、最初に CH₂Cl₂、次いで 5 % MeOH / CH₂Cl₂) により精製した。収率：100%。¹H-NMR (D₆-DMSO) : 2.25 - 2.39 (4 H, m) ; 2.64 - 2.71 (4 H, m) ; 3.04 - 3.14 (4 H, m) ; 3.19 (6 H, s) ; 3.22 - 3.26 (4 H, m) ; 3.32 - 3.35 (4 H, m) ; 3.35 - 3.39 (4 H, m) ; 7.33 - 7.28 (2 H, m) ; 7.52 (1 H, dd, J = 8.1 及び 1.8 Hz) ; 7.54 - 7.57 (1 H, m) ; 7.76 (1 H, d, J = 8.1 Hz) ; 7.81 - 7.84 (1 H, m) ; 7.82 (1 H, d, J = 1.8 Hz)。¹³C-NMR (D₆-DMSO) : 38.38 ; 51.27 ; 57.39 ; 66.24 ; 69.71 ; 69.43 ; 69.56 ; 71.11 ; 120.13 ; 120.38 ; 121.65 ; 123.19 ; 126.44 ; 127.29 ; 127.52 ; 127.70 ; 138.83 ; 139.12 ; 148.56 ; 151.57。MALDI TOF-MS 質量：計算値 (M + H⁺) 537.19 及び 539.18 ; 測定値 536.91 及び 539.73。

20

【0102】

実施例 4 . 化合物 4 の合成

この化合物 4 は、実施例 1 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 2 から合成した。生成物を、FC (シリカゲル、最初に 10 %、次いで 20 % EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率：100%。¹H-NMR (CDCl₃) : 1.03 (18 H, s) ; 1.36 (12 H, s) ; 2.95 (2 H, d, J = 14.0 Hz) ; 2.99 (2 H, d, J = 14.0 Hz) ; 7.32 (1 H, td, J = 7.3 及び 1.3 Hz) ; 7.35 (1 H, td, J = 7.3 及び 1.3 Hz) ; 7.55 - 7.58 (1 H, m) ; 7.68 (1 H, d, J = 7.5 Hz) ; 7.69 - 7.72 (1 H, m) ; 7.81 (1 H, dd, J = 7.5 及び 0.7 Hz) ; 9.94 (1 H, s)。¹³C-NMR (CDCl₃) : 24.93 ; 28.11 ; 44.55 ; 50.56 ; 80.16 ; 83.51 ; 119.04 ; 120.16 ; 124.17 ; 127.64 ; 127.68 ; 130.23 ; 134.44 ; 134.74 ; 140.39 ; 143.47 ; 147.55 ; 148.85 ; 169.32。MALDI TOF-MS 質量：計算値 (M + H⁺) 521.31 ; 測定値 520.99。

30

40

【0103】

実施例 5 . 化合物 5 の合成

化合物 2 (0.48 g、1.0 mmol)、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)クロライド(35 mg、50 μmol)、CuI (10 mg、50 μmol) のジイソプロピルエチルアミン(1.5 mL) 及び乾燥 DMF (0.5 mL) 中混合物を、アルゴンで脱気した。トリメチルシリルアセチレン(0.198 mL、1.4 mmol) を添加した後、混合物を、120 のマイクロウェーブ合成装置内に 25 分間置いた。

50

混合物を Et_2O (30 mL) に溶解し、 H_2O (3×10 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。生成物を、 FC (シリカゲル、10% EtOAc / 石油エーテル (沸点 $40 \sim 65$)) により精製した。収率: 0.47 g (96%)。 ^1H -NMR (D_6 - DMSO): 0.25 (9H, s)、0.84 (18H, s); 2.95 (2H, d, $J = 13.9$ Hz); 3.06 (2H, d, $J = 13.9$ Hz); 7.32 (1H, td, $J = 7.3$ 及び 1.3 Hz); 7.35 (1H, td, $J = 7.3$ 及び 1.1 Hz); 7.43 (1H, dd; $J = 7.8$ 及び 1.1 Hz); 7.57 - 7.60 (1H, m); 7.72 (1H, d, $J = 1.1$ Hz); 7.77 (1H, d, $J = 7.8$ Hz); 7.79 - 7.82 (1H, m)。 ^{13}C -NMR (D_6 - DMSO): -0.12; 26.94; 44.09; 50.56; 79.07; 93.75; 106.26; 119.82; 120.12; 120.20; 124.05; 127.45; 127.48; 127.56; 130.91; 139.78; 141.46; 148.33; 148.56; 168.33。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 ($\text{M} + \text{H}^+$) 491.25; 測定値 491.05。

10

【0104】

実施例 6 . 化合物 6 の合成

この化合物 6 は、実施例 5 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 3 から合成した。生成物を、 FC (シリカゲル、最初に CH_2Cl_2 、次いで 1% ~ 2% MeOH / CH_2Cl_2) により精製した。収率: 67%。 ^1H -NMR (D_6 - DMSO): 0.25 (9H, s)、2.26 - 2.40 (4H, m)、2.56 - 2.67 (4H, m); 3.03 - 3.13 (4H, m); 3.19 (6H, s); 3.21 - 3.26 (4H, m); 3.32 - 3.35 (4H, m); 3.35 - 3.39 (4H, m); 7.34 - 7.39 (2H, m); 7.44 (1H, dd, $J = 7.8$ 及び 1.2 Hz); 7.54 - 7.58 (1H, m); 7.69 (1H, s); 7.80 (1H, d, $J = 7.8$ Hz); 7.81 - 7.75 (1H, m)。 ^{13}C -NMR (D_6 - DMSO): -0.13; 38.45; 50.97; 57.92; 66.24; 69.22; 69.42; 69.57; 71.11; 93.94; 106.03; 120.04; 120.38; 120.59; 123.19; 126.42; 127.29; 127.88; 130.91; 139.03; 140.61; 149.20; 149.22。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 ($\text{M} + \text{H}^+$) 555.32; 測定値 555.55。

20

30

【0105】

実施例 7 . 化合物 7 の合成

化合物 5 (0.45 g、0.92 mmol)、テトラブチルアンモニウムフルオリド (0.34 g、1.06 mmol) の CH_2Cl_2 (15 mL) 中混合物を、アルゴン下、室温で 1 時間攪拌した。混合物を 10% クエン酸 (15 mL)、 H_2O (2×15 mL) で素早く洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。生成物を、 FC (シリカゲル、10% EtOAc / 石油エーテル (沸点 $40 \sim 65$)) により精製した。収率: 0.35 g (91%)。 ^1H -NMR (D_6 - DMSO): 0.86 (18H, s); 2.96 (2H, d, $J = 13.9$ Hz); 3.04 (2H, d, $J = 13.9$ Hz); 4.16 (1H, s); 7.32 (1H, td, $J = 7.4$ 及び 1.3 Hz); 7.35 (1H, td, $J = 7.4$ 及び 1.3 Hz); 7.45 (1H, dd, $J = 7.8$ 及び 1.1 Hz); 7.57 - 7.60 (1H, m); 7.73 (1H, d, $J = 1.1$ Hz); 7.77 - 7.81 (2H, m)。 ^{13}C -NMR (D_6 - DMSO): 26.96; 44.09; 50.56; 79.07; 80.38; 84.39; 119.77; 119.81; 120.10; 124.07; 127.41; 127.49; 127.57; 131.07; 139.76; 141.37; 148.39; 148.44; 168.30。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 ($\text{M} + \text{H}^+$) 419.22; 測定値 419.12。

40

【0106】

実施例 8 . 化合物 8 の合成

この化合物 8 は、実施例 7 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 6 から合成した

50

。収率：99%。 ^1H -NMR (D_6 -DMSO)：2.26-2.39 (4H, m)；2.60-2.69 (4H, m)；3.06-3.12 (4H, m)；3.19 (6H, s)；3.22-3.26 (4H, m)；3.32-3.35 (4H, m)；3.35-3.38 (4H, m)；4.20 (1H, s)；7.33-7.39 (2H, m)；7.46 (1H, dd, $J=7.8$ 及び 1.2 Hz)；7.55-7.59 (1H, m)；7.70 (1H, s)；7.80 (1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$)；7.82-7.86 (1H, m)。 ^{13}C -NMR (D_6 -DMSO)：38.43；50.94；57.92；66.27；69.21；69.42；69.56；80.63；84.19；120.04；120.17；120.37；123.22；126.54；127.28；127.85；130.95；139.03；140.53；149.19；149.21。MALDI TOF-MS 質量：計算値 ($\text{M}+\text{H}^+$) 483.28；測定値 483.14。

10

【0107】

実施例9．化合物9の合成

化合物1 (0.260 g、0.71 mmol)、テトラ(tert-ブチル)2,2',2'',2'''-[(4-ブロモピリジン-2,6-ジイル)ビス(メチレンニトリロ)]テトラキス(アセテート)(H. Takalo, et al., 1988, Acta Chem. Scand., Ser. B, 42, 614) (0.314 g、0.41 mmol) 及び CsCO_3 (0.266 g、0.80 mmol) の乾燥 DMF (2 mL) 中混合物を、アルゴンで脱気した。テトラキス(トリフェニル-ホスフィン)パラジウム (11 mg、9.5 μmol) を添加した後、この混合物を 85 で 20 時間撹拌した。混合物を CH_2Cl_2 (30 mL) に溶解し、 H_2O (3 $\times$ 10 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。生成物を、FC (シリカゲル、40% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40~65)) 及び 0.5% トリエチルアミン) により精製した。収率：0.14 g (39%)。 ^1H -NMR (D_6 -DMSO)：1.40 (36H, s)；3.47 (8H, s)；3.98 (4H, s)；4.02 (2H, s)；7.37 (1H, td, $J=7.4$ 及び 0.7 Hz)；7.43 (1H, t, $J=7.4\text{ Hz}$)；7.62 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$)；7.76 (1H, dd, $J=7.4$ 及び 0.7 Hz)；7.77 (2H, s)；7.95 (1H, s)；7.98 (1H, d, $J=7.4\text{ Hz}$)；8.05 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$)。 ^{13}C -NMR (D_6 -DMSO)：27.68；36.43；55.26；59.22；80.15；117.99；120.39；120.55；123.25；125.17；125.45；126.84；127.19；136.25；140.31；141.97；143.39；143.87；148.18；159.03；169.99。MALDI TOF-MS 質量：計算値 ($\text{M}+\text{H}^+$) 758.44；測定値 758.86。

20

30

【0108】

実施例10．化合物10の合成

化合物4 (78 mg、0.15 mmol)、テトラ(tert-ブチル)2,2',2'',2'''-[(4-ブロモピリジン-2,6-ジイル)ビス(メチレンニトリロ)]テトラキス(アセテート) (67 mg、0.10 mmol)、 CsCO_3 (55 mg、0.17 mmol) の乾燥 DMF (2 mL) 中混合物を、アルゴンで脱気した。テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (11 mg、9.5 μmol) 及び H_2O (9 μL 、0.50 mmol) を添加した後、この混合物を 85 で 2.5 時間撹拌した。混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) に溶解し、 H_2O (3 $\times$ 10 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。生成物を、FC (シリカゲル、最初に 15% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40~65))、次いで 40% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40~65)) 及び 1% トリエチルアミン) により精製した。収率：76 mg (77%)。 ^1H -NMR (D_6 -DMSO)：0.86 (18H, s)；1.40 (36H, s)；3.02 (2H, d, $J=14.0\text{ Hz}$)；3.07 (2H, d, $J=14.0\text{ Hz}$)；3.47 (8H, s)；3.99 (4H, s)；7.34 (1H, td, $J=7.4$ 及び 1.2 Hz)；

40

50

7.37 (1H, td, J = 7.4 及び 1.1 Hz); 7.61 (1H, d, J = 7.4 Hz); 7.71 (1H, dd, J = 7.9 Hz 及び 1.2 Hz); 7.74 (2H, s); 7.85 (1H, d, J = 7.4 Hz); 7.93 (1H, d, J = 7.9 Hz); 7.95 (1H, d, J = 1.2 Hz)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 26.86; 27.69; 44.07; 50.52; 54.79; 55.27; 59.20; 78.95; 80.10; 118.25; 119.95; 120.15; 122.29; 123.99; 126.02; 127.17; 127.40; 136.49; 139.74; 141.43; 148.37; 148.50; 149.09; 158.81; 168.19; 169.89。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 986.58; 測定値 987.39。

10

【0109】

実施例 11. 化合物 11 の合成

化合物 9 (70 mg、92 μmol) の CF₃COOH (2.7 mL) 溶液を、室温で 2 時間撹拌した。加熱せずに蒸発させた後、混合物を Et₂O (10 mL) でトリチュレートし、遠心分離して、生成物を Et₂O (2 × 5 mL) で洗浄した。収率: 58 mg (83%)。¹H-NMR (D₆-DMSO): 3.67 (8H, s); 4.07 (2H, s); 4.32 (4H, s); 7.41 (1H, t, J = 7.3 Hz); 7.46 (1H, t, J = 7.3 Hz); 7.67 (1H, d, J = 7.3 Hz); 7.99 (1H, d, J = 7.8 Hz); 8.04 (1H, d, J = 7.3 Hz); 8.14 (1H, d, J = 7.8 Hz); 8.19 (1H, s); 8.27 (2H, s)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 36.44; 54.94; 56.10; 115.26; 120.10; 120.84; 120.89; 124.17; 125.30; 126.47; 126.96; 127.78; 133.51; 139.91; 144.77; 144.20; 155.27; 157.80; 172.45。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + 2H⁺) 535.19; 測定値 535.06。

20

【0110】

実施例 12. 化合物 12 の合成

この化合物 12 は、実施例 11 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 10 から合成した。収率: 98%。¹H-NMR (D₆-DMSO): 3.02 (2H, d, J = 15.4 Hz); 3.16 (2H, d, J = 15.4 Hz); 3.58 (8H, s); 4.15 (4H, s); 7.34 (1H, t, J = 7.4 Hz); 7.38 (1H, t, J = 7.4 Hz); 7.63 (1H, d, J = 7.4 Hz); 7.81 (1H, d, J = 7.9 Hz); 7.89 (1H, d, J = 7.4 Hz); 7.91 (2H, s); 7.97 (1H, d, J = 7.9 Hz); 8.07 (1H, s)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 42.00; 49.50; 54.81; 58.11; 118.88; 120.44; 120.57; 122.09; 122.23; 123.71; 126.44; 127.41; 127.59; 135.33; 139.19; 141.67; 149.39; 150.46; 157.73; 171.13; 172.50。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + 2H⁺) 651.20; 測定値 651.29。

30

【0111】

実施例 13. 化合物 13 の合成

化合物 7 (92 mg、0.22 mmol)、テトラ (tert-ブチル) 2, 2', 2'', 2''' - [(4-ブロモピリジン-2, 6-ジイル)ビス(メチレンニトリロ)]テトラキス(アセテート) (135 mg、0.20 mmol) の乾燥トリエチルアミン (1 mL) 及び THF (2 mL) 中混合物を、アルゴンで脱気した。ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)クロライド (14 mg、20 μmol)、CuI (8 mg、40 μmol) を添加した後、この混合物を 55 ° で 20 時間撹拌した。蒸発乾固した後、残渣を CH₂Cl₂ (20 mL) に溶解し、H₂O (3 × 10 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。生成物を、FC (シリカゲル、20% ~ 30% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65 °C)) により精製した。収率: 90 mg (45%)。¹H-NM

40

50

R (D₆ - DMSO) : 0.86 (18H, s) ; 1.42 (36H, s) ; 2.97 (2H, d, J = 13.9 Hz) ; 3.09 (2H, d, J = 13.9 Hz) ; 3.44 (8H, s) ; 3.92 (4H, s) ; 7.35 (1H, td, J = 7.2 及び 1.3 Hz) ; 7.38 (1H, td, J = 7.2 及び 1.2 Hz) ; 7.55 - 7.58 (1H, m) ; 7.57 (2H, s) ; 7.59 - 7.64 (2H, m) ; 7.83 - 7.86 (2H, m) ; 7.87 (1H, d, J = 7.9 Hz)。¹³C - NMR (D₆ - DMSO) : 26.96 ; 27.81 ; 44.10 ; 50.61 ; 55.54 ; 59.18 ; 79.09 ; 80.34 ; 87.29 ; 93.90 ; 119.25 ; 120.09 ; 120.26 ; 122.06 ; 124.06 ; 127.57 ; 127.59 ; 127.67 ; 130.99 ; 131.14 ; 139.68 ; 142.10 ; 148.59 ; 148.65 ; 159.27 ; 168.27 ; 170.05。MALDI TOF - MS 質量 : 計算値 (M + H⁺) 1010.58 ; 測定値 1011.07。

10

【0112】

実施例 14 . 化合物 14 の合成

この化合物 14 は、実施例 11 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 13 から合成した。収率 : 87%。¹H - NMR (D₆ - DMSO) : 3.04 (2H, d, J = 15.5 Hz) ; 3.09 (2H, d, J = 15.5 Hz) ; 3.51 (8H, s) ; 3.97 (4H, s) ; 7.34 (1H, td, J = 7.3 及び 1.2 Hz) ; 7.37 (1H, td, J = 7.3 及び 1.1 Hz) ; 7.58 (2H, s) ; 7.61 (1H, dd, J = 7.6 及び 1.2 Hz) ; 7.61 - 7.64 (1H, m) ; 7.86 (1H, d, J = 7.3 Hz) ; 7.89 (1H, d, J = 1.2 Hz) ; 7.89 (1H, d, J = 7.6 Hz)。¹³C - NMR (D₆ - DMSO) : 41.90 ; 49.54 ; 54.55 ; 58.98 ; 87.36 ; 94.17 ; 119.32 ; 120.41 ; 120.63 ; 122.31 ; 123.70 ; 127.09 ; 127.91 ; 131.29 ; 131.37 ; 139.12 ; 141.56 ; 149.63 ; 149.75 ; 159.24 ; 171.27 ; 172.42。MALDI TOF - MS 質量 : 計算値 (M + H⁺) 675.20 ; 測定値 675.16。

20

【0113】

実施例 15 . 化合物 15 の合成

3 - プロモ - 9 H - カルバゾール (0.25 g、1.0 mmol)、無水酢酸 (0.95 mL、10 mmol) のトリエチルアミン (5 mL) 及び CH₂Cl₂ (20 mL) 中混合物を、室温で 22 時間攪拌した。水 (20 mL) を添加した後、混合物を 15 分間攪拌した。有機相を分離し、5% NaHCO₃ (20 mL)、水 (2 × 20 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。収率 : 0.29 g (100%)。¹H - NMR (D₆ - DMSO) : 2.89 (3H, s) ; 7.35 (1H, t, J = 7.3 Hz) ; 7.57 (1H, td, J = 7.3 及び 1.2 Hz) ; 7.66 (1H, dd, J = 8.8 及び 2.1 Hz) ; 8.21 (1H, d, J = 8.8 Hz) ; 8.23 - 8.28 (2H, m) ; 8.47 (1H, d, J = 2.1 Hz)。¹³C - NMR (D₆ - DMSO) : 27.35 ; 115.91 ; 116.07 ; 118.14 ; 120.68 ; 122.72 ; 123.64 ; 124.35 ; 127.62 ; 128.10 ; 129.68 ; 136.94 ; 138.22 ; 170.42。MALDI TOF - MS 質量 : 計算値 (M + H⁺) 287.99 及び 289.99 ; 測定値 288.03 及び 288.83。

30

40

【0114】

実施例 16 . 化合物 16 の合成

塩化プロモアセチル (100 µl、1.2 mmol) を、ジ (tert - ブチル) イミノビス (アセテート) (0.245 g、1.0 mmol)、乾燥 K₂CO₃ (0.691 g、5.0 mmol) 及び乾燥 MeCN (5 mL) の混合物に、氷浴にて添加し、この混合物を 0 で 30 分間及び室温で 2 時間攪拌した。CH₂Cl₂ (40 mL) を添加した後、混合物を水 (2 × 20 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。収率 : 0.34 g (93%)。¹H - NMR (D₆ - DMSO) : 1.40 (9H, s) ; 1.43 (9H

50

, s); 3.94 (2H, s); 4.14 (2H, s); 4.21 (2H, s)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 27.33; 27.74; 49.39; 51.14; 80.89; 81.57; 166.92; 167.60; 167.90。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M+H⁺) 366.08 及び 367.08; 測定値 367.78 及び 368.80。

【0115】

実施例 17. 化合物 17 の合成

3-ブロモ-9H-カルバゾール (0.22 g, 0.9 mmol)、化合物 16 (0.66 g, 1.8 mmol)、乾燥 K₂CO₃ (0.25 g, 1.8 mmol) 及び乾燥 MeCN (10 mL) の混合物を、48 時間還流した。CH₂Cl₂ (40 mL) を添加した後、この混合物を水 (2 × 20 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。生成物を、FC (シリカゲル、10% ~ 30% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率: 0.41 g (85%)。¹H-NMR (D₆-DMSO): 1.37 (9H, s); 1.51 (9H, s); 3.97 (2H, s); 4.44 (2H, s); 5.32 (2H, s); 7.23 (1H, td, J = 7.8 及び 0.7 Hz); 7.37 (1H, d, J = 8.7 Hz); 7.40 (1H, d, J = 7.8 Hz); 7.47 (1H, td, J = 7.8 及び 1.0 Hz); 7.56 (1H, dd, J = 8.7 及び 2.0 Hz); 8.22 (1H, d, J = 7.8 Hz); 8.40 (1H, d, J = 2.0 Hz)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 27.73; 27.80; 27.80; 43.87; 49.52; 50.17; 80.86; 81.94; 109.35; 111.13; 111.15; 119.47; 120.81; 121.33; 122.84; 124.28; 126.46; 127.97; 139.55; 141.11; 167.76; 168.58。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M+H⁺) 531.14 及び 533.14; 測定値 530.94 及び 532.90。

【0116】

実施例 18. 化合物 18 の合成

この化合物 18 は、実施例 1 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 15 から合成した。生成物を、FC (シリカゲル、10% ~ 30% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率: 98%。¹H-NMR (D₆-DMSO): 1.35 (12H, s); 2.90 (3H, s); 7.43 (1H, t, J = 7.4 Hz); 7.53 (1H, td, J = 7.4 及び 0.9 Hz); 7.82 (1H, d, J = 8.4 Hz); 8.25 (1H, d, J = 8.4 Hz); 8.27 - 8.31 (2H, m); 8.47 (1H, s)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 24.64; 27.46; 83.67; 115.62; 116.04; 120.26; 123.67; 125.12; 125.31; 126.34; 127.42; 133.49; 138.06; 140.14; 170.58。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M+H⁺) 336.17; 測定値 337.04。

【0117】

実施例 19. 化合物 19 の合成

この化合物 19 は、実施例 1 に記載の合成と類似の方法を用いて、3-ブロモジベンゾフラン (Li, W., et al., 2009, J. Med. Chem., 52, 1799) から合成した。生成物を、FC (シリカゲル、5% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率: 48%。¹H-NMR (D₆-DMSO): 1.35 (12H, s); 7.42 (1H, td, J = 7.7 及び 0.6 Hz); 7.54 (1H, td, J = 7.7 及び 1.2 Hz); 7.70 (1H, d, J = 8.2 Hz); 7.71 (1H, d, J = 8.2 Hz); 7.83 (1H, dd, J = 7.7 及び 1.2 Hz); 8.27 (1H, dd, J = 7.7 及び 0.6 Hz); 8.49 (1H, s)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 24.76; 83.81; 111.33; 111.64; 121.51; 123.28; 123.39; 123.49; 127.77; 127.83; 133.80; 155.51; 157.63。MALDI TOF-MS 質量

: 計算値 ($M + H^+$) 295.14; 測定値 295.05。

【0118】

実施例 20. 化合物 20 の合成

この化合物 20 は、実施例 1 に記載の合成と類似の方法を用いて、3-プロモジベンゾチオフェン (Tedjamulia, M. L., et al., 1983, J. Heterocyclic Chem., 20, 1485) から合成した。生成物を、FC (シリカゲル、 CH_2Cl_2) により精製した。収率: 45%。 1H -NMR ($CDCl_3$): 1.40 (12H, s); 7.42 - 7.48 (2H, m); 7.82 - 7.90 (3H, m); 8.22 - 8.27 (1H, m); 8.62 (1H, s)。 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): 24.93; 83.96; 121.84; 122.12; 122.72; 124.46; 126.68; 128.27; 132.55; 135.10; 135.59; 139.17; 142.76。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 ($M + H^+$) 311.12; 測定値 311.18。

10

【0119】

実施例 21. 化合物 21 の合成

この化合物 21 は、実施例 1 に記載の合成と類似の方法を用いて、2-プロモ-9-フルオレノンから合成した。生成物を、FC (シリカゲル、10% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率: 88%。 1H -NMR (D_6 -DMSO): 1.32 (12H, s); 7.43 (1H, td; $J = 7.4$ 及び 0.8 Hz); 7.65 (1H, d, $J = 7.4$ Hz); 7.64 (1H, td, $J = 7.4$ 及び 1.0 Hz); 7.81 (1H, s); 7.83 (1H, d, $J = 7.4$ Hz); 7.85 (1H, dd, $J = 7.4$ 及び 0.8 Hz); 7.90 (1H, dd, $J = 7.4$ 及び 1.0 Hz)。 ^{13}C -NMR (D_6 -DMSO): 24.69; 84.09; 120.82; 121.72; 123.99; 129.01; 129.76; 130.10; 132.68; 133.53; 135.43; 141.54; 143.55; 146.59; 192.88。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 ($M + H^+$) 307.14; 測定値 307.93。

20

【0120】

実施例 22. 化合物 22 の合成

この化合物 22 は、実施例 1 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 17 から合成した。生成物を、FC (シリカゲル、30% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率: 91%。 1H -NMR (D_6 -DMSO): 1.34 (12H, s); 1.38 (9H, s); 1.52 (9H, s); 3.89 (2H, s); 4.46 (2H, s); 5.32 (2H, s); 7.23 (1H, td, $J = 7.5$ 及び 0.8 Hz); 7.39 (1H, d, $J = 8.0$ Hz); 7.40 (1H, d, $J = 8.0$ Hz); 7.44 (1H, td, $J = 7.5$ 及び 0.9 Hz); 7.73 (1H, dd, $J = 7.5$ 及び 0.9 Hz); 8.24 (1H, d, $J = 7.5$ Hz); 8.48 (1H, s)。 ^{13}C -NMR (D_6 -DMSO): 24.78; 27.73; 27.80; 43.80; 49.54; 50.20; 80.85; 81.93; 83.38; 108.64; 109.18; 119.57; 120.41; 122.11; 122.35; 125.82; 127.16; 128.11; 131.73; 140.85; 142.91; 167.78; 167.79; 168.60。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 ($M + H^+$) 579.32; 測定値 579.23。

30

40

【0121】

実施例 23. 化合物 23 の合成

化合物 18 (0.17 g、0.50 mmol)、テトラ (tert-ブチル) $_2$, 2', 2'', 2'''-[(4-プロモピリジン-2, 6-ジイル) ビス (メチレンニトリロ)] テトラキス (アセテート) (0.22 g、0.33 mmol)、 $CsCO_3$ (0.18 g、0.56 mmol) の乾燥 DMF (1.4 mL) 及び 1, 2-エタンジオール (1.4 mL) 中混合物を、アルゴンで脱気した。テトラキス (トリフェニルホスフィン)

50

パラジウム (8 m g 、 6 . 6 μ m o l) を添加した後、混合物を 8 5 で 1 時間攪拌した。混合物を CH_2Cl_2 (3 0 m L) に溶解し、 H_2O (3 $\times$ 1 0 m L) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。生成物を、FC (シリカゲル、最初に 4 0 % ~ 5 0 % EtOAc / 石油エーテル (沸点 4 0 ~ 6 5) 、次いで 1 0 % トリエチルアミン含有 5 0 % EtOAc / 石油エーテル (沸点 4 0 ~ 6 5)) にて精製した。収率 : 8 0 m g (3 2 %) 。¹ H - NMR (D_6 - DMSO) : 1 . 4 0 (3 6 H , s) ; 3 . 4 9 (8 H , s) ; 3 . 9 9 (4 H , s) ; 7 . 2 1 (1 H , t d , J = 7 . 7 及び 0 . 8 H z) ; 7 . 4 3 (1 H , t d , J = 7 . 7 及び 1 . 0 H z) ; 7 . 5 3 (1 H , d , J = 7 . 7 H z) ; 7 . 6 1 (1 H , d , J = 8 . 5 H z) ; 7 . 7 7 (1 H , d d , J = 8 , 5 及び 1 . 7 H z) ; 7 . 8 2 (2 H , s) ; 8 . 1 8 (1 H , d , J = 7 . 7 H z) ; 8 . 5 2 (1 H , s) 。¹³ C - NMR (D_6 - DMSO) : 2 7 . 6 8 ; 5 5 . 2 8 ; 5 9 . 2 6 ; 8 0 . 1 3 ; 1 1 1 . 2 1 ; 1 1 1 . 4 1 ; 1 1 8 . 0 0 ; 1 1 8 . 3 4 ; 1 1 8 . 8 6 ; 1 2 0 . 0 9 ; 1 2 2 . 2 9 ; 1 2 2 . 9 4 ; 1 2 4 . 2 7 ; 1 2 5 . 9 5 ; 1 2 8 . 1 8 ; 1 4 0 . 1 2 ; 1 4 0 . 1 8 ; 1 4 9 . 0 3 ; 1 5 8 . 7 2 ; 1 7 0 . 0 2 。MALDI TOF - MS 質量 : 計算値 ($\text{M} + \text{H}^+$) 7 5 9 . 4 3 ; 測定値 7 6 0 . 2 8 。

10

【 0 1 2 2 】

実施例 2 4 . 化合物 2 4 の合成

この化合物 2 4 は、実施例 1 0 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 1 9 から合成した。生成物を、FC (シリカゲル、2 0 % ~ 4 0 % EtOAc / 石油エーテル (沸点 4 0 ~ 6 5)) により精製した。収率 : 7 2 % 。¹ H - NMR (D_6 - DMSO) : 1 . 3 9 (3 6 H , s) ; 3 . 5 0 (8 H , s) ; 4 . 0 1 (4 H , s) ; 7 . 4 6 (1 H , t d , J = 7 . 8 及び 0 . 6 H z) ; 7 . 5 8 (1 H , t d , J = 7 . 8 及び 1 . 3 H z) ; 7 . 7 6 (1 H , d , J = 7 . 8 H z) ; 8 . 8 1 (2 H , s) ; 7 . 8 4 - 7 . 8 7 (2 H , m) ; 8 . 2 1 (1 H , d d , J = 7 . 8 及び 0 . 6 H z) ; 8 . 5 1 (1 H , s) 。¹³ C - NMR (D_6 - DMSO) : 2 7 . 7 9 ; 5 5 . 4 6 ; 5 9 . 4 2 ; 8 0 . 2 6 ; 1 1 1 . 9 2 ; 1 1 2 . 3 1 ; 1 1 8 . 6 5 ; 1 1 9 . 4 8 ; 1 2 1 . 2 6 ; 1 2 3 . 3 4 ; 1 2 3 . 4 2 ; 1 2 4 . 4 3 ; 1 2 6 . 4 9 ; 1 2 8 . 1 1 ; 1 3 3 . 4 5 ; 1 4 8 . 2 2 ; 1 5 5 . 9 0 ; 1 5 6 . 0 4 ; 1 5 9 . 1 5 ; 1 7 0 . 1 1 。MALDI TOF - MS 質量 : 計算値 ($\text{M} + \text{H}^+$) 7 6 0 . 4 1 ; 測定値 7 6 0 . 9 8 。

20

【 0 1 2 3 】

実施例 2 5 . 化合物 2 5 の合成

この化合物 2 5 は、実施例 1 0 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 2 0 から合成した。生成物を、FC (シリカゲル、2 0 % EtOAc / 石油エーテル (沸点 4 0 ~ 6 5)) により精製した。収率 : 6 8 % 。¹ H - NMR (CDCl_3) : 1 . 4 6 (3 6 H , s) ; 3 . 5 6 (8 H , s) ; 4 . 1 4 (4 H , s) ; 7 . 4 8 (1 H , t d , J = 3 . 6 及び 0 . 6 H z) ; 7 . 4 9 (1 H , t d , J = 3 . 6 及び 0 . 4 H z) ; 7 . 8 4 (1 H , d d , J = 8 . 3 及び 1 . 2 H z) ; 7 . 8 6 - 7 . 8 9 (1 H , m) 、7 . 9 2 (1 H , d , J = 8 . 3 H z) ; 7 . 9 6 (2 H , s) ; 8 . 3 2 - 8 . 3 7 (1 H , m) ; 8 . 6 0 (1 H , d , J = 1 . 2 H z) 。¹³ C - NMR (CDCl_3) : 2 8 . 2 0 ; 5 5 . 9 8 ; 6 0 . 1 9 ; 8 1 . 0 0 ; 1 1 8 . 7 5 ; 1 2 0 . 2 7 ; 1 2 2 . 0 2 ; 1 2 2 . 8 5 ; 1 2 3 . 0 8 ; 1 2 4 . 4 6 ; 1 2 5 . 7 8 ; 1 2 6 . 9 7 ; 1 3 5 . 0 7 ; 1 3 5 . 5 2 ; 1 3 6 . 2 3 ; 1 3 9 . 8 4 ; 1 4 0 . 0 3 ; 1 4 9 . 1 8 ; 1 5 9 . 5 7 ; 1 7 0 . 6 6 。MALDI TOF - MS 質量 : 計算値 ($\text{M} + \text{H}^+$) 7 7 6 . 3 9 ; 測定値 7 7 6 . 9 4 。

30

40

【 0 1 2 4 】

実施例 2 6 . 化合物 2 6 の合成

この化合物 2 6 は、実施例 1 1 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 2 3 から合成した。収率 : 7 3 % 。¹ H - NMR (D_6 - DMSO) : 3 . 6 1 (8 H , s) ; 4 . 2 0 (4 H , s) ; 7 . 2 5 (1 H , t d , J = 7 . 7 及び 0 . 7 H z) ; 7 . 4 6 (1 H , t d , J = 7 . 7 及び 1 . 1 H z) ; 7 . 5 6 (1 H , d , J = 7 . 7 H z) ; 7 .

50

6.5 (1H, d, J = 8.2 Hz); 7.93 (1H, dd, J = 7.7 及び 1.1 Hz); 8.11 (2H, s); 8.23 (1H, d, J = 8.2 Hz); 8.72 (1H, s); 11.61 (1H, s)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 54.88; 57.43; 111.34, 111.67; 118.68; 119.16; 120.37; 122.31; 123.15; 124.07; 125.67; 126.22; 140.26; 140.83; 152.36; 156.67; 172.62。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + 2H⁺) 536.18; 測定値 536.21。

【0125】

実施例 27. 化合物 27 の合成

この化合物 27 は、実施例 11 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 24 から合成した。収率: 70%。¹H-NMR (D₆-DMSO): 3.64 (8H, s); 4.23 (4H, s); 7.49 (1H, t, J = 7.7 Hz); 7.60 (1H, td, J = 7.7 及び 1.2 Hz); 7.77 (1H, d, J = 7.7 Hz); 7.91 (1H, d, J = 8.6 Hz); 8.01 (1H, dd, J = 8.6 及び 1.5 Hz); 8.11 (2H, s); 8.25 (1H, d, J = 7.7 Hz); 8.68 (1H, d, J = 1.5 Hz)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 54.82; 57.56; 111.81; 112.43; 119.48; 120.06; 121.29; 123.05; 123.40; 124.50; 126.74; 128.16; 131.62; 150.86; 155.95; 156.34; 157.07; 172.37。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + 2H⁺) 537.16; 測定値 536.84。

【0126】

実施例 28. 化合物 28 の合成

この化合物 28 は、実施例 11 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 25 から合成した。収率: 67%。¹H-NMR (D₆-DMSO): 3.63 (8H, s); 4.24 (4H, s); 7.59 (1H, t, J = 3.5 Hz); 7.61 (1H, t, J = 3, 5 Hz); 8.00 (1H, dd, J = 8.4 及び 1.5 Hz); 8.08 - 8.12 (1H, m); 8.19 (2H, s); 8.24 (1H, d, J = 8.4 Hz); 8.50 - 8.55 (1H, m); 8.87 (1H, d, J = 1.5 Hz)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 55.50; 58.26; 119.99; 121.11; 122.84; 123.78; 124.50; 125.52; 126.14; 128.17; 133.55; 135.23; 136.43; 139.65; 141.09; 157.82; 158.51, 173.10。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + 2H⁺) 553.16; 測定値 552.80。

【0127】

実施例 29. 化合物 29 の合成

この化合物 29 は、実施例 23 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 22 から合成した。反応時間は 6 時間であった。生成物を、FC (シリカゲル、20% ~ 50% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率: 55%。¹H-NMR (D₆-DMSO): 1.39 (36H, s); 3.48 (8H, s); 3.98 (4H, s); 7.44 (1H, td, J = 7.4 及び 0.7 Hz); 7.66 (1H, td, J = 7.4 及び 1.0 Hz); 7.67 (1H, d, J = 7.4 Hz); 7.78 (2H, s); 7.89 (1H, dd, J = 7.4 及び 1.0 Hz); 7.93 (1H, s); 7.97 - 7.99 (2H, m)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 27.67; 55.38; 59.22; 80.19; 117.88; 121.56; 121.73; 121.87; 124.04; 129.76; 133.38; 133.49; 134.17; 135.50; 138.89; 143.28; 144.27; 146.69; 159.28; 170.00; 192.45。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 772.41; 測定値 773.03。

【0128】

実施例 30. 化合物 30 の合成

この化合物 30 は、実施例 11 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 29 から合成した。収率：77%。¹H-NMR (D₆-DMSO)：3.61 (8H, s)；4.16 (4H, s)；7.45 (1H, td, J = 7.6 及び 0.7 Hz)；7.65 - 7.70 (2H, m)；7.91 (1H, d, J = 7.6 Hz)、8.00 (1H, d, J = 7.8 Hz)；8.02 (2H, s)；8.04 (1H, d, J = 1.4 Hz)；8.08 (1H, dd, J = 7.8 及び 1.4 Hz)。¹³C-NMR (D₆-DMSO)：54.78；58.00；119.02；121.70；121.96；122.16；124.08；129.93；133.55；133.84；134.25；135.53；137.79；139.87；143.17；144.92；157.76；172.35；192.40。MALDI TOF-MS 質量：計算値 (M + 2H⁺) 549.16；測定値 549.37。

10

【0129】

実施例 36 . 化合物 36 の合成

7-ヨード-2-ニトロフルオレン (1.7 g、5 mmol；Marhevka, V. C., et al., 1985, J. Med. Chem., 28, 18.)、SnCl₂ × 2H₂O (5.6 g、25 mmol) の乾燥 EtOH (100 mL) 中混合物を、18 時間還流した。低温のこの混合物を H₂O (70 mL) に注ぎ、固体 NaHCO₃ で中和し、CH₂Cl₂ (200 mL 及び 2 × 100 mL) で抽出して、Na₂SO₄ で乾燥した。収率：1.5 g (97%)。%。¹H-NMR (CDCl₃)：3.76 (2 + 2H, s)；6.89 (1H, dd, J = 8.1 及び 2.1 Hz)；6.84 (1H, s)；7.36 (1H, d, J = 8.0 Hz)；7.52 (1H, d, J = 8.1 Hz)；7.61 (1H, d, J = 8.0 Hz)；7.78 (1H, s)；¹³C-NMR (CDCl₃)：36.52；89.52；111.52；114.10；120.24；120.87；131.94；133.79；135.58；141.82；144.60；144.73；146.33。MALDI TOF-MS 質量：計算値 (M + H⁺) 307.99；測定値 307.89。

20

【0130】

実施例 37 . 化合物 37 の合成

この化合物 37 は、実施例 13 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 36 から合成した。反応時間 3 時間。生成物を、FC (シリカゲル、50% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率：99%。¹H-NMR (CDCl₃)：0.26 (9H, s)、3.76 (2 + 2H, s)；6.69 (1H, dd, J = 8.0 及び 2.0 Hz)；6.84 (1H, s)；7.43 (1H, d, J = 8.0 Hz)；7.53 (2 + 2H, d, J = 8.0 Hz)；7.56 (1H, s)。¹³C-NMR (CDCl₃)：0.10；36.56；93.25；106.30；111.61；114.11；118.27；119.28；121.10；128.26；130.88；132.30；142.03；142.61；145.69，146.25。MALDI TOF-MS 質量：計算値 (M + H⁺) 278.13；測定値 278.12。

30

【0131】

実施例 38 . 化合物 38 の合成

この化合物 38 は、実施例 7 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 37 から合成した。収率：95%。¹H-NMR (CDCl₃)：3.07 (1H, s)；3.78 (2 + 2H, s)；6.70 (1H, dd, J = 8.1 及び 2.1 Hz)；6.85 (1H, s)；7.45 (1H, d, J = 7.8 Hz)；7.54 (1H, d, J = 8.1 Hz)；7.55 (1H, d, J = 7.8 Hz)；7.57 (1H, s)。¹³C-NMR (CDCl₃)：36.58；76.37；84.74；111.60；114.12；118.19；118.34；121.15；128.39；131.03；132.16；142.13；142.92；145.66；146.34。MALDI TOF-MS 質量：計算値 (M + H⁺) 206.09；測定値 205.82。

40

【0132】

50

実施例 39 . 化合物 39 の合成

この化合物 39 は、実施例 13 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 38 から合成した。生成物を、FC (シリカゲル、30% ~ 50% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65 °C)) により精製した。収率: 51%。¹H-NMR (D₆-DMSO): 1.42 (36H, s); 3.44 (8H, s); 3.78 (2H, s); 3.91 (4H, s); 6.61 (1H, dd, J = 8.2 及び 1.6 Hz); 6.78 (1H, s); 7.48 (1H, d, J = 7.8 Hz); 7.53 (2H, s); 7.57 (1H, d, J = 8.2 Hz); 7.62 (1H, s); 7.85 (1H, d, J = 7.8 Hz)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 28.26; 36.49; 55.94; 55.94; 80.79; 87.22; 94.95; 110.50; 113.52; 116.77; 118.64; 121.85; 122.46; 128.26; 128.98; 131.03; 131.88; 142.49; 144.31; 146.00; 149.81; 159.58; 170.51。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 797.44; 測定値 797.43。

【0133】

実施例 40 . 化合物 40 の合成

この化合物 40 は、実施例 11 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 39 から合成した。収率: 91%。¹H-NMR (D₆-DMSO): 3.60 (8H, s); 3.88 (2H, s); 4.10 (4H, s); 6.86 (1H, d, J = 7.9 Hz); 7.03 (1H, s); 7.59 (1H, d, J = 7.9 Hz); 7.68 (2H, s); 7.73 (1H, d, J = 7.9 Hz); 7.74 (1H, s); 7.79 (1H, d, J = 7.9 Hz)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 36.02; 54.45; 57.91; 86.63; 96.30; 112.90; 115.61; 116.79; 118.00; 121.66; 123.13; 128.13; 128.15; 130.85; 131.70; 133.14; 142.44; 143.36; 145.46; 145.53; 157.39; 171.96。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + 2H⁺) 574.21; 測定値 574.09。

【0134】

実施例 41 . 化合物 41 の合成

四酸 40 (44 mg、48 μmol) を H₂O (0.78 mL) に溶解し、固体 NaHCO₃ で pH を 6.5 に調節した。EuCl₃ × 6H₂O (20 mg、55 μmol) の H₂O (0.39 mL) 溶液を 15 分間以内に添加し、固体 NaHCO₃ で pH を 5 ~ 7 に維持した。1.5 時間攪拌した後、1M NaOH で pH を 8.5 に上昇させ、沈殿を遠心分離で除去し、上清をアセトンでトリチュレートし、沈殿を遠心分離し、アセトンで洗浄した。生成物を、それ以上精製せずに次の工程に使用した。

【0135】

実施例 42 . 化合物 42 の合成

アミノキレート 41 (48 μmol) の水溶液 (1.3 mL) を、SCCl₂ (26 μL、0.34 mmol)、NaHCO₃ (40 mg、0.48 mmol) 及び CHCl₃ (1.3 mL) の混合物に、10 分以内に添加した。30 分間攪拌した後、H₂O 相を CHCl₃ (3 × 1.3 mL) で洗浄し、アセトンでトリチュレートし、沈殿を遠心分離してアセトンで洗浄した。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 786.03; 測定値 787.50。R_f (HPLC): 30.9 分。UV (HPLC): 346 及び 360 nm。

【0136】

実施例 43 . 化合物 43 の合成

化合物 7 (0.23 g、0.55 mmol)、テトラ (tert-ブチル) 2,2',2'',2'''-{[2-(4-アミノフェニル)エチルイミノ]ビス(メチレン)ビス(4-プロモピリジン-6,2-ジイル)ビス(メチレン-ニトリロ)}テトラキス(アセテート) (Takalo, H., et al., 1996, Helv. Chim. A

10

20

30

40

50

c t a . , 7 9 , 7 8 9) (0 . 2 3 g 、 0 . 2 3 m m o l) の乾燥トリエチルアミン (2 m L) 及び乾燥 T H F (4 m L) 中混合物を、アルゴンで脱気した。ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)クロライド(10 mg、14 μ mol)、CuI(5.3 mg、28 μ mol)を添加した後、この混合物を55 で22時間攪拌した。蒸発乾固した後、残渣をCH₂Cl₂(30 mL)に溶解し、H₂O(3 × 10 mL)で洗浄して、Na₂SO₄で乾燥した。生成物をFC(シリカゲル、5% MeOH/CH₂Cl₂)により精製した。収率：0.25 g(65%)。¹H-NMR(D₆-DMSO)：0.85(36H, s)；1.40(36H, s)；2.64-2.71(4H, m)；2.87(4H, d, J = 13.9 Hz)；3.08(4H, d, J = 13.9 Hz)；3.45(8H, s)；3.87(4H, s)；3.95(4H, s)；4.77(2H, s)；6.56(2H, d, J = 8.2 Hz)；6.81(2H, d, J = 8.2 Hz)；7.32-7.39(4H, m)；7.49(2H, s)；7.56-7.65(6H, m)；7.78-7.83(4H, m)；7.88(2H, s)。¹³C-NMR(D₆-DMSO)：26.84；27.68；32.17；43.95；50.47；55.42；56.13；59.10；59.20；78.98；80.19；87.22；93.83；113.90；119.22；120.02；120.10；122.06；122.19；123.98；126.94；127.47；127.54；128.80；130.93；131.02；131.91；139.53；141.88；146.37；148.46；148.53；159.10；159.19；168.17；169.91。MALDI TOF-MS質量：計算値(M+H⁺)1666.91；測定値1665.47。

【0137】

実施例44．化合物44の合成

この化合物44は、実施例43に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物8から合成した。生成物を、FC(シリカゲル、CH₂Cl₂ ~ 10% MeOH/CH₂Cl₂)により精製した。収率：44%。¹H-NMR(D₆-DMSO)：1.40(36H, s)；2.26-2.41(8H, m)；2.61-2.74(4+8H, m)；3.00-3.10(8H, m)；3.16(12H, s)；3.19-3.23(8H, m)；3.29-3.32(8H, m)；3.32-3.36(8H, m)；3.44(8H, s)；3.85(4H, s)；3.95(4H, s)；4.74(2H, s)；6.47(2H, d, J = 8.1 Hz)；6.81(2H, d, J = 8.1 Hz)；7.32-7.42(4H, m)；7.50(2H, s)；7.53-7.61(6H, m)；7.72-7.79(4H, m)；7.83(2H, s)。¹³C-NMR(D₆-DMSO)：27.65；32.12；38.44；51.05；55.33；56.33；57.88；59.06；59.33；66.26；69.18；69.41；69.54；71.09；80.18；87.49；93.74；113.89；119.76；120.19；120.42；121.99；122.30；123.30；126.58；126.90；127.33；128.06；128.79；129.53；130.93；131.06；138.90；141.08；149.36；149.42；159.02；159.30；169.87。MALDI TOF-MS質量：計算値(M+H⁺)1795.02；測定値1794.46。

【0138】

実施例45．化合物45の合成

化合物43(130 mg、78 μ mol)のCF₃COOH(2.3 mL)溶液を、室温で2時間攪拌した。加熱せずに蒸発させた後、混合物をEt₂O(10 mL)でトリチュレートし、遠心分離して、生成物をEt₂O(5 × 5 mL)で洗浄した。収率：105 mg(86%)。¹H-NMR(D₆-DMSO)：2.94-3.14(2+8H, m)；3.28-3.37(2H, m)；3.56(8H, s)；4.07(4H, s)；4.59(4H, s)；6.80(2H, d, J = 7.6 Hz)；7.05(2H, d, J = 7.6 Hz)；7.34(2H, t, J = 7.4 Hz)；7.38(2H, t, J =

7.0 Hz); 7.60 (2H, d, J = 7.9 Hz); 7.63 (2H, d, J = 7.0 Hz); 7.65 (2H, s); 7.79 (2H, s); 7.85 (2H, d, J = 7.4 Hz); 7.87 (2H, d, J = 7.9 Hz); 7.89 (2H, s)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 29.26; 41.73; 49.42; 54.41; 54.96; 56.61; 58.99; 86.59; 95.20; 117.30; 118.92; 120.33; 120.54; 123.61; 123.93; 124.51; 126.97; 127.47; 127.89; 129.44; 131.30; 131.86; 138.92; 141.69; 149.49; 149.69; 151.15; 157.70; 157.96; 160.11; 171.12; 172.24。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 1217.42; 測定値 1217.63。

10

【0139】

実施例 46. 化合物 46 の合成

この化合物 46 は、実施例 45 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 44 から合成した。収率: 100%。¹H-NMR (D₆-DMSO): 2.30 - 2.42 (8H, m); 2.62 - 2.72 (8H, m); 3.03 - 3.13 (8 + 2H, m); 3.14 - 3.19 (2H, m); 3.17 (12H, s); 3.20 - 3.26 (8H, m); 3.29 - 3.36 (8H, m); 3.36 - 3.39 (8H, m); 3.56 (8H, s); 4.09 (4H, s); 4.59 (4H, s); 6.94 (2H, d, J = 6.7 Hz); 7.14 (2H, d, J = 6.7 Hz); 7.36 - 7.42 (4H, m); 7.56 - 7.62 (4H, m); 7.64 (2H, s); 7.79 (2H, s)、7.83 - 7.89 (6H, m)。¹³C-NMR (D₆-DMSO): 29.38; 38.44; 51.09; 54.39; 55.12; 56.64; 57.89; 58.95; 66.26; 69.20; 69.41; 69.55; 71.09; 86.80; 95.20; 118.78; 119.30; 120.30; 120.56; 123.34; 123.94; 124.51; 126.66; 127.38; 128.18; 129.58; 131.18; 131.98; 138.87; 141.48; 149.36; 149.53; 151.15; 157.88; 158.14; 159.97; 172.16。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 1569.77; 測定値 1569.33。

20

【0140】

実施例 47. 化合物 47 の合成

化合物 45 (94 mg、60 μmol) を H₂O (0.96 mL) に溶解し、固体 NaHCO₃ で pH を 6.5 に調節した。EuCl₃ × 6H₂O (25 mg、69 μmol) の H₂O (0.48 mL) 溶液を 15 分間以内に添加し、固体 NaHCO₃ で pH を 5 ~ 7 に維持した。室温で 2.5 時間攪拌した後、1M NaOH で pH を 8.5 に上昇させ、沈殿を遠心分離で除去し、上清をフェノールで抽出した (約 0.75 g)。フェノール相を H₂O (0.5 mL) 及び Et₂O (10 mL) で処理し、水相を Et₂O (2 × 10 mL) で洗浄した。NaCl (17.5 mg、0.3 mmol) を添加した後、混合物をアセトンでトリチュレートし、沈殿を遠心分離し、アセトンで洗浄した。生成物を、それ以上精製せずに次の工程に使用した。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 1477.22; 測定値 1477.78。R_f (HPLC): 22.0 分。UV (HPLC): 345 nm。

30

40

【0141】

実施例 48. 化合物 48 の合成

この化合物 48 は、実施例 47 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 46 から合成した。生成物がアセトンに可溶であることから、フェノール抽出後、水相を蒸発乾固した。生成物を、それ以上精製せずに次の工程に使用した。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 1741.65; 測定値 1741.50。

【0142】

実施例 49. 化合物 49 の合成

この化合物 49 は、実施例 42 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 47 から合

50

成した。0.5時間の反応時間後、混合物をEt₂O(2×5mL)で洗浄し、水溶液を蒸発乾固した。MALDI TOF-MS質量(ネガティブモード):計算値1518.17;測定値1518.78。R_f(HPLC):34.6分。UV(HPLC):350nm。

【0143】

実施例50.化合物50の合成

この化合物50は、実施例42に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物48から合成した。MALDI TOF-MS質量:計算値(M+H⁺)1783.68;測定値1783.59。R_f(HPLC):24.9分。UV(HPLC):340及び349nm。

【0144】

実施例51.化合物51の合成

化合物4(0.33g、0.63mmol)、テトラ(tert-ブチル)2,2',2'',2'''-{[2-(4-アミノフェニル)エチルイミノ]ビス(メチレン)ビス(4-プロモピリジン-6,2-ジイル)ビス(メチレン-ニトリロ)}テトラキス(アセテート)(Takalo, H., et al., 1996, Helv. Chim. Acta., 79, 789)(0.21g、0.21mmol)、CsCO₃(0.23g、0.71mmol)の乾燥DMF(2mL)及び1,2-エタンジオール(1mL)中混合物を、アルゴンで脱気した。テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(10mg、8.4μmol)を添加した後、この混合物を85℃で3.5時間攪拌した。混合物をCH₂Cl₂(40mL)に溶解し、H₂O(3×15mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。生成物を、FC(シリカゲル、最初に2~3%MeOH/CH₂Cl₂(不純物)、次いで5~10%MeOH/CH₂Cl₂(生成物))により精製した。収率:0.13g(38%)。¹H-NMR(D₆-DMSO):0.84(36H, s);1.37(36H, s);2.70-2.76(4H, m);2.98(4H, d, J=13.9Hz);3.05(4H, d, J=13.9Hz);3.39(8H, s);3.91(4H, s);4.02(4H, s);6.43(2H, d, J=8.2Hz);6.81(2H, d, J=8.2Hz);7.34(2H, t, J=7.4Hz);7.36(2H, t, J=7.4Hz);7.61(2H, d, J=7.4Hz);7.66(2H, d, J=7.1Hz);7.75(4H, s);7.78(2H, d, J=7.1Hz);7.88(2H, J=7.4Hz);7.96(2H, s)。¹³C-NMR(D₆-DMSO):24.84;26.84;27.66;43.92;50.51;54.60;55.26;59.25;59.41;78.95;80.08;113.85;118.07;118.28;119.87;120.22;122.37;124.01;126.10;127.19;127.40;128.24;128.82;135.96;136.43;139.60;141.30;146.32;148.42;148.99;158.82;159.52;168.25;169.86。MALDI TOF-MS質量:計算値(M+H⁺)1618.92;測定値1618.88。

【0145】

実施例52.化合物52の合成

この化合物52は、4時間の反応時間を有し、実施例45に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物51から合成した。収率:93%。¹H-NMR(D₆-DMSO):3.01(4H, d, J=15.4Hz);3.17(4H, d, J=15.4Hz);3.30-3.37(4H, m);3.59(8H, s);4.16(4H, s);4.65(4H, s);6.60(2H, d, J=7.9Hz);6.95(2H, d, J=7.9Hz);7.34(2H, td, J=7.4及び0.7Hz);7.38(2H, td, J=7.4及び1.0Hz);7.63(2H, d, J=7.4Hz);7.77(2H, dd, J=7.9及び0.9Hz);7.86(2H, d, J=7.4Hz);7.87(2H, s);7.95(2H, d, J=7.9Hz);8.01(2H, s);

8.06 (2H, s)。 ^{13}C -NMR (D_6 -DMSO): 29.31; 41.97; 49.50; 54.59; 54.98; 56.92; 59.24; 115.29; 118.28; 119.91; 120.38; 120.52; 120.60; 121.85; 123.73; 126.27; 127.41; 127.55; 129.23; 135.36; 139.20; 141.46; 149.30; 150.50; 151.43; 157.57; 157.83; 159.79; 171.13; 172.42。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 ($\text{M} + \text{H}^+$) 1169.42; 測定値 1169.49。

【0146】

実施例 53. 化合物 53 の合成

この化合物 53 は、実施例 47 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 52 から合成した。MALDI TOF-MS 質量 (ネガティブモード): 計算値 1428.21; 測定値 1428.03。

【0147】

実施例 54. 化合物 54 の合成

この化合物 54 は、実施例 42 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 53 から合成した。MALDI TOF-MS 質量 (ネガティブモード): 計算値 1470.17; 測定値 1471.36。R_f (HPLC): 24.7 分。UV (HPLC): 326 nm。

【0148】

実施例 55. 化合物 55 の合成

化合物 22 (0.19 g、0.33 mmol)、テトラ (tert-ブチル)₂, 2', 2'', 2''' - { [2 - (4-アミノフェニル)エチルイミノ]ビス(メチレン)ビス(4-プロモピリジン-6, 2-ジイル)ビス(メチレン-ニトリロ)}テトラキス(アセテート) (Takalo, H., et al., 1996, Helv. Chim. Acta., 79, 789) (0.11 g、0.11 mmol)、CsCO₃ (0.12 g、0.37 mmol) の乾燥 DMF (1 mL) 中混合物をアルゴンで脱気した。テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (10 mg、8.4 μmol) 及び H₂O (10 μL、0.55 mmol) を添加した後、この混合物を 85 ° で 3.5 時間攪拌した。混合物を CH₂Cl₂ (20 mL) に溶解し、H₂O (2 × 10 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。生成物を、FC (シリカゲル、最初に 40% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65 °)、次いで 40% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65 °) 及び 10% トリエチルアミン) により精製した。収率: 0.12 g (63%)。 ^1H -NMR (D_6 -DMSO): 1.36 (36 + 18H, s); 1.53 (18H, s); 2.76 - 2.83 (4H, m); 3.47 (8H, s); 3.97 (4H, s); 3.99 (4H, s); 4.00 (4H, s); 4.44 (4H, s); 4.69 (2H, broad s); 5.26 (4H, s); 6.43 (2H, d, J = 8.3 Hz); 6.87 (2H, d, J = 8.3 Hz); 7.15 (2H, t, J = 7.8 Hz); 7.39 (2H, d, J = 7.8 Hz); 7.43 (2H, t, J = 7.8 Hz); 7.46 (2H, d, J = 8.7 Hz); 7.75 (2H, dd, J = 8.7 及び 1.1 Hz); 7.82 (4H, s); 8.07 (2H, d, J = 8.7 Hz); 8.49 (2H, d, J = 1.1 Hz)。 ^{13}C -NMR (D_6 -DMSO): 27.71; 27.79; 35.80; 43.88; 49.53; 50.21; 54.92; 55.49; 59.57; 59.70; 80.19; 80.84; 81.94; 109.34; 109.71; 113.95; 118.02; 118.26; 118.34; 119.37; 120.27; 122.32; 122.94; 124.44; 126.00; 126.02; 127.38; 128.83; 129.02; 141.22; 148.72; 158.81; 159.35; 162.31; 167.79; 168.58; 170.12。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 ($\text{M} + \text{H}^+$) 1734.95; 測定値 1735.18。

【0149】

実施例 56. 化合物 56 の合成

この化合物 56 は、実施例 52 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 55 から合成した。収率：94%。¹H-NMR (D₆-DMSO)：3.05-3.13 (2H, m)；3.31-3.43 (2H, m)；3.61 (8H, s)；4.03 (4H, s)；4.18 (4H, s)；4.49 (4H, s)；4.68 (4H, s)；5.34 (4H, s)；6.73 (2H, d, J = 8.0 Hz)；7.06 (2H, d, J = 8.0 Hz)；7.25 (2H, t, J = 7.6 Hz)；7.44 (2H, d, J = 7.6 Hz)；7.47 (2H, t, J = 7.6 Hz)；7.51 (2H, d, J = 8.6 Hz)；7.88 (2H, dd, J = 8.6 及び 1.1 Hz)；7.98 (2H, s)；8.13 (2H, s)；8.18 (2H, d, J = 7.6 Hz)；8.60 (2H, d, J = 1.1 Hz)。¹³C-NMR (D₆-DMSO)：34.75；45.89；48.69；49.49；54.77；55.30；57.11；59.26；109.62；109.98；118.19；118.83；119.51；119.57；119.83；120.35；120.52；122.26；123.03；124.52；126.25；127.37；129.51；141.38；141.72；150.26；157.86；158.12；159.41；167.91；170.28；170.97；172.58。MALDI TOF-MS 質量：計算値 (M + 2H⁺) 1286.45；測定値 1286.46。

【0150】

実施例 57．化合物 57 の合成

この化合物 57 は、実施例 47 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 56 から合成した。MALDI TOF-MS 質量 (ネガティブモード)：計算値 1544.25；測定値 1543.99。R_f (HPLC)：18.4 分。UV (HPLC)：285 (sh)、300 及び 329 nm。

【0151】

実施例 58．化合物 58 の合成

この化合物 58 は、実施例 42 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 57 から合成した。MALDI TOF-MS 質量 (ネガティブモード)：計算値 1586.20；測定値 1585.17。R_f (HPLC)：21.1 分。UV (HPLC)：285、298 及び 340 nm。

【0152】

実施例 59．化合物 11、12、14、27 及び 28 の Eu (III) キレート のルミネセンス測定

配位子 11、12、14、27、28、及び 35 を有する Eu (III) 錯体のルミネセンスパラメータを、10 mM NH₃-HCl 緩衝液中、pH 8.3 で測定した。モル吸光係数 (ε)、励起最大波長 (λ_{exc})、ルミネセンス寿命 (τ)、量子収率 (Φ)、ルミネセンス効率の計算値 (ε × Φ) 及び三重項段階 (T) を表 1 に示す。参照配位子 2, 2', 2'', 2''' - [(4-フェニルエチニルピリジン-2,6-ジイル)ビス(メチレンニトリロ)]テトラキス-(酢酸) (Latva, M, et al., 1997, J. Luminescence, 75, 149) を参照として使用して、本発明の配位子の改善を、従来技術の 7 座配位子と比較して実証した。

【0153】

【表 1】

表 1

配位子	ε / cm ⁻¹ M ⁻¹	λ _{exc} / nm	τ / μs	Φ	ε × Φ / cm ⁻¹ M ⁻¹	T / cm ⁻¹
11	104000	323	380	0.046	4800	20000
12	35000	328	390	0.10	3500	20100
14	38200	342	355	0.11	4200	19200
27	36700	288	387	0.12	4400	22000
28	26000	315	382	0.10	2600	21300
参照配位子	26950	293	385	0.067	1800	21600

【0154】

配位子 28 に関して、参照配位子と比較してキレートの吸光係数が低下した理由として、アンテナ発色団からのエネルギーが $E_u(I I I)$ イオンに移動する際に通る低 CT 状態又は三重項状態によるものである可能性が最も高い。ただし、低 CT 及び / 又は三重項状態を考慮しても、参照配位子と比較して、なお高い量子収率を有し、そのため、より高い発光を与える（すなわち、より明るい）。

【0155】

実施例 60 . キレート 49 及び 54 並びにタンパク質へのカップリング

標識は、10 mM ホウ酸緩衝液中、pH 8.6 ~ 9.0 で、30 倍モル過剰のキレートを用いて実施した。反応は、通常、+4 又は室温で、一晚実施した。標識化抗体を、Superfex 200 HR 10/30 又は Superdex 200 HiLoad 26/60 ゲル濾過カラムで、トリス - 生理食塩水 - アジド（トリス 86.1 g/L、NaCl 9.0 g/L、及び NaN_3 0.5 g/L）、pH 7.75 を溶離液として用いて精製した。抗体を含有する画分をプールし、ユーロピウム濃度を、ユーロピウム標準物質を基準にして測定した。精製した抗体共役及び標識化率（すなわち、タンパク質 1 つ当たりのキレート）を、タンパク質収率を計算することによって、又は 280 nm における吸光度を測定し、添加したキレートによって生じた吸収を減算することによって、定量した。

【0156】

先に公開された 9 座配位子標識 { 2 , 2' , 2'' , 2''' } - { [2 - (4 - イソチオシアナト - フェニル) エチルイミノ] ビス (メチレン) ビス { 4 - { [4 - (α - ガラクトピラノキシ) フェニル] エチニル } - ピリジン - 2 , 6 - ジイル } ビス (メチレンニトリロ) } テトラキス (アセタト) } ユーロピウム (I I I) (von Loden , P . , et al . , 2003 , Anal . Chem . 75 , 3193) を参照標識として使用した。

【0157】

実施例 61 . キレート標識化抗体を用いて実施したモデルイムノアッセイ

2 つの標識 49 及び 54 を、モデル cTnI アッセイで試験した。cTnI イムノアッセイは、ピオチン化捕捉 cTnI 抗体を上記の標識化 cTnI 検出抗体と共に使用し、公開された方法 (von Loden , P . , et al . , 2003 , Anal . Chem . 75 , 3193) の主要原理に従って実施した。混合アッセイ / 洗浄用緩衝液は、5 mmol の HEPES、2.1 g/L の NaCl、0.1 mmol の EDTA、0.055 g/L の Tween 20 及び 1 g/L の Gernall II を含有し、pH 7.75 であった。捕捉ピオチン化抗体を、アッセイウェル内でプレインキュベートした。それぞれ 20 μ L 及び 10 μ L のアッセイ緩衝液に希釈した標準物質、続いて、検出標識抗体を、上記ウェルに入れた。36 で 1 時間インキュベートした後、ウェルを洗浄、乾燥し、測定した。

【0158】

表 2 は、試験したキレート標識 49 及び 54 が、参照 Eu 標識と比較して、有意に改善されたシグナルレベルを与えることを示す。

【0159】

【表 2】

表 2

標識	第 1 の試験		第 2 の試験	
	参照キレート	キレート 49	参照キレート	キレート 54
0 ng/mL (cTnI 標準) のカウント	358	1095	446	421
5 ng/mL (cTnI 標準) のカウント	46291	110698	70986	59602
Eu/IgG	8.2	8.9	9.3	6.3
シグナル/Eu	5602	12254	7585	9394
シグナル改善/Eu	—	2.2	—	1.2
Abs max/nm	320	348	320	327

【0160】

タンパク質内でカップリングした後の標識 49 は、350 nm 付近にブロードな励起を示し、これが低価格の LED ベースの装置による励起をもたらすことは、記載すべきである。

【0161】

実施例 62 . 化合物 59 の合成

この化合物 59 は、実施例 2 に記載の合成と類似の方法を用いて、2 - ブロモフルオレン及び $\text{BrCH}_2\text{COOEt}$ から合成した。生成物を、FC (シリカゲル、4% ~ 10% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率: 50%。 ^1H -NMR (CDCl_3): 1.01 (6H, t, $J = 7.2\text{ Hz}$); 3.01 (2H, d, $J = 15.3\text{ Hz}$); 3.06 (2H, d, $J = 15.3\text{ Hz}$); 3.93 (4H, q, $J = 7.2\text{ Hz}$); 7.32 (1H, td, $J = 7.4$ 及び 1.2 Hz); 7.37 (1H, td, $J = 7.4$ 及び 1.2 Hz); 7.49 (1H, dd, $J = 8.1$ 及び 1.8 Hz); 7.66 - 7.69 (1H, m); 7.57 (1H, d, $J = 8.1\text{ Hz}$); 7.50 - 7.53 (1H, m); 7.70 (1H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$)。MALDI TOF - MS 質量: 計算値 ($M + H^+$) 417.07 及び 419.07; 測定値 417.72 及び 419.79。

【0162】

実施例 63 . 化合物 60 の合成

この化合物 60 は、実施例 5 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 59 から合成した。反応時間 20 分。生成物を、FC (シリカゲル、10% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率: 88%。 ^1H -NMR (CDCl_3): 0.27 (9H, s); 1.00 (6H, t, $J = 7.1\text{ Hz}$); 3.02 (2H, d, $J = 15.2\text{ Hz}$); 3.06 (2H, d, $J = 15.2\text{ Hz}$); 3.92 (4H, q, $J = 7.1\text{ Hz}$); 7.31 (1H, td, $J = 7.4$ 及び 1.1 Hz); 7.36 (1H, td, $J = 7.4$ 及び 1.1 Hz); 7.48 (1H, dd, $J = 7.8$ 及び 1.3 Hz); 7.53 (1H, d, $J = 7.4\text{ Hz}$); 7.63 (1H, d, $J = 7.8\text{ Hz}$); 7.63 (1H, $J = 1.3\text{ Hz}$); 7.68 (1H, d, $J = 7.4\text{ Hz}$)。 ^{13}C -NMR (CDCl_3): 0.01; 13.84; 42.07; 49.73; 60.22; 94.29; 105.69; 119.73; 120.27; 121.76; 123.82; 127.39; 127.80; 128.00; 131.90; 139.43; 140.48; 148.56; 148.88; 170.36。MALDI TOF - MS 質量: 計算値 ($M + H^+$) 435.20; 測定値 435.10。

【0163】

実施例 64 . 化合物 61 の合成

この化合物 61 は、実施例 7 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 60 から合成した。生成物を、FC (シリカゲル、10% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65)) により精製した。収率: 100%。 ^1H -NMR (CDCl_3): 1.00 (6H, t, $J = 7.2\text{ Hz}$); 3.03 (2H, d, $J = 15.6\text{ Hz}$); 3.06 (2H, d, $J = 15.6\text{ Hz}$); 3.11 (1H, s); 3.91 (2H, q, $J = 7.2\text{ Hz}$); 3.92 (2H, q, $J = 7.2\text{ Hz}$); 7.32 (1H, td, $J = 7.5\text{ Hz}$ 及び 1.2 Hz); 7.37 (1H, td, $J = 7.5$ 及び 1.2 Hz); 7.51 (1H, d, $J = 7.8\text{ Hz}$); 7.53 (1H, d, $J = 7.4\text{ Hz}$); 7.65 (1H, d, $J = 7.8\text{ Hz}$); 7.68 (1H, d, $J = 1.2\text{ Hz}$); 7.70 (1H, d, $J = 7.4\text{ Hz}$)。 ^{13}C -NMR (CDCl_3): 13.85; 42.04; 49.77; 60.22; 77.23; 84.21; 119.81; 120.33; 120.68; 123.81; 127.66; 127.92; 128.05; 132.06; 139.29; 140.81; 148.62; 148.89; 170.31。MALDI TOF - MS 質量: 計算値 ($M + H^+$) 363.16; 測定値 393.98。

【0164】

実施例 65 . 化合物 63 の合成

化合物 6 1 (9 1 m g、2 5 2 μ m o l)、化合物 6 2 (国際公開第 2 0 1 3 2 6 7 9 0 号) (1 1 6 m g、1 0 5 μ m o l) の乾燥トリエチルアミン (1 m L) 及び T H F (2 m L) 中混合物を、アルゴンで脱気した。ビス (トリフェニル - ホスフィン) パラジウム (I I) クロライド (1 0 m g、1 4 μ m o l)、C u I (6 m g、2 8 μ m o l) を添加した後、混合物を 5 5 で 1 8 時間撹拌した。蒸発乾固の後、生成物を F C (シリカゲル、1 % T E A 含有 7 0 % E t O A c / 石油エーテル (沸点 4 0 ~ 6 5)) により精製した。収率 : 1 2 5 m g (7 1 %)。M A L D I T O F - M S 質量 : 計算値 (M + N a ⁺) 1 6 9 0 . 6 2 及び 1 6 9 2 . 6 2、測定値 1 6 9 0 . 9 6 及び 1 6 9 2 . 7 0。

【 0 1 6 5 】

実施例 6 6 . 化合物 6 4 の合成

化合物 6 3 (1 1 3 m g、6 7 μ m o l) 及び 0 . 5 M K O H の E t O H (9 m L) 中混合物を、室温で 0 . 5 時間撹拌し、H₂O を添加した (2 m L)。室温で 3 時間撹拌した後、E t O H を蒸発させ、混合物を室温で 5 時間撹拌し、p H を 6 M H C l で約 6 . 5 に調節した。E u C l₃ × 6 H₂O (2 5 m g、6 7 μ m o l) の H₂O (0 . 2 m L) 溶液を 1 0 分間以内に添加し、固体 N a H C O₃ で p H を 5 ~ 7 に維持した。室温で 2 0 時間撹拌した後、p H を、1 M N a O H で 8 . 5 に上昇させ、この混合物を一晩撹拌して、沈殿を遠心分離で除去し、上清をフェノールで抽出した (0 . 7 5 g で 1 回、3 × 0 . 5 g)。合わせたフェノール相を、H₂O (1 m L) 及び E t₂O (2 0 m L) で処理し、水相を E t₂O (2 × 2 0 m L) で洗浄し、アセトンでトリチュレートした。沈殿を遠心分離し、アセトンで洗浄した。生成物を、それ以上精製せずに次の工程に使用した。M A L D I T O F - M S 質量 : 計算値 (M + H ⁺) 1 6 0 2 . 0 9、測定値 1 6 0 2 . 2 5。

【 0 1 6 6 】

実施例 6 7 . 化合物 6 5 の合成

この化合物 6 5 は、実施例 4 2 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 6 4 から合成した。M A L D I T O F - M S 質量 : 計算値 (M + H ⁺) 1 6 4 4 . 1 5、測定値 1 6 4 3 . 0 1。

【 0 1 6 7 】

実施例 6 8 . 化合物 6 6 の合成

タウリン (1 2 . 5 m g、1 0 0 μ m o l) の 5 0 m M N a₂C O₃ 緩衝液 (p H 9 . 8 ; 0 . 5 5 m L) 溶液を、化合物 6 5 (1 6 . 4 m g、1 0 μ m o l) の 5 0 m M N a₂C O₃ 緩衝液 (p H 9 . 8 ; 0 . 5 5 m L) 溶液に加えた。室温で一晩撹拌した後、反応混合物を蒸発乾燥固し、生成物を逆相 H P L C (R P - 1 8 カラム) を用いて精製した。溶媒は、A : トリエチル酢酸アンモニウム緩衝液 (2 0 m M、p H 7) 及び、B : 5 0 % アセトニトリル / トリエチル酢酸アンモニウム緩衝液 (2 0 m M、p H 7) であった。グラジエントは、5 % の溶媒 B から開始して、溶媒 B の量を 2 5 分間で 1 0 0 % まで直線的に増やした。R_f (H P L C) : 2 0 . 9 分。U V (H P L C) : 2 8 0 及び 3 5 2 n m。

【 0 1 6 8 】

実施例 6 9 . 化合物 6 7 の合成

7 - ヨード - 2 - ニトロフルオレン (0 . 5 1 g、1 . 5 m m o l)、乾燥 K₂C O₃ (0 . 8 3 g、6 . 0 m m o l) 及び B r C H₂C O O E t (0 . 4 8 m L、4 . 4 m m o l) の乾燥 D M F 中混合物を、1 0 0 で 1 時間撹拌した。混合物を濾過し、D M F で洗浄して、濾液を蒸発乾固した。生成物を、F C (シリカゲル、5 % ~ 1 5 % E t O A c / 石油エーテル (沸点 5 0 ~ 6 5)) により精製した。収率 : 0 . 5 1 g (6 7 %)。¹ H - N M R (C D C l₃) : 1 . 0 3 (6 H, t, J = 7 . 1 H z) ; 3 . 0 6 (2 H, d, J = 1 5 . 6 H z) ; 3 . 1 2 (2 H, d, J = 1 5 . 6 H z) ; 3 . 9 4 (4 H, q, J = 7 . 1 H z) ; 7 . 7 4 (1 H, d, J = 8 . 0 H z) ; 7 . 7 8 (1 H, d, J = 8 . 0 及び 1 . 2 H z) ; 7 . 8 0 (1 H, d, J = 8 . 4 H z) ; 7 . 9 4 (1 H, d, J = 1 . 2 H z) ; 8 . 3 0 (1 H, d d, J = 8 . 4 及び 1 . 9 H z) ; 8

. 42 (1H, d, J = 1.9 Hz)。¹³C-NMR (CDCl₃) : 13.82; 41.67; 49.99; 60.56; 95.24; 119.35; 120.16; 122.76; 124.20; 133.30; 137.52; 137.55; 145.66; 147.45; 149.22; 151.87; 169.43。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 510.04; 測定値 510.29。

【0169】

実施例70. 化合物68の合成

化合物67 (0.50g、0.98mmol) 及び SnCl₂ × HCl (1.03g、4.64mmol) の乾燥 EtOH (20mL) 中混合物を、2.5時間還流した。低温の混合物を H₂O (20mL) に注ぎ、固体 NaHCO₃ で中和し、CH₂Cl₂ (2 × 40mL) で抽出し、Na₂SO₄ で乾燥した。生成物を、FC (シリカゲル、30% ~ 40% EtOAc / 石油エーテル (沸点 50 ~ 65 °C)) により精製した。収率: 0.39g (83%)。¹H-NMR (CDCl₃) : 1.06 (6H, t, J = 7.1 Hz); 2.95 (2H, d, J = 15.4 Hz); 3.01 (2H, d, J = 15.4 Hz); 3.7 - 3.9 (2H, bs); 3.96 (2H, qd, J = 14.2 及び 7.1 Hz); 3.97 (2H, qd, J = 14.2 及び 7.1 Hz); 6.66 (1H, dd, J = 8.1 及び 2.0 Hz); 6.87 (1H, d, J = 2.0 Hz); 7.29 (1H, d, J = 8.0 Hz); 7.44 (1H, d, J = 8.1 Hz); 7.61 (1H, dd, J = 8.0 及び 1.4 Hz); 7.77 (1H, d, J = 1.4 Hz)。¹³C-NMR (CDCl₃) : 13.89; 41.76; 49.44; 60.17; 89.82; 110.35; 114.78; 120.25; 120.96; 129.81; 132.75; 136.60; 140.16; 146.74; 149.99; 150.21; 170.46。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 480.07; 測定値 479.92。

【0170】

実施例71. 化合物69の合成

この化合物69は、実施例13に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物68から合成した。反応時間3時間。生成物を、FC (シリカゲル、40% EtOAc / 石油エーテル (沸点 40 ~ 65 °C)) により精製した。収率: 100%。¹H-NMR (CDCl₃) : 0.26 (9H, s); 1.04 (6H, t, J = 7.1 Hz); 2.99 (4H, s); 3.94 (2H, qd, J = 14.2 及び 7.1 Hz); 3.96 (2H, qd, J = 14.2 及び 7.1 Hz); 6.67 (1H, dd, J = 8.1 及び 2.0 Hz); 6.89 (1H, d, J = 2.0 Hz); 7.42 (1H, dd, J = 7.8 及び 1.1 Hz); 7.45 (1H, d, J = 8.1 Hz); 7.46 (1H, J = 7.8 Hz); 7.59 (1H, d, J = 1.1 Hz)。¹³C-NMR (CDCl₃) : 0.06; 13.90; 41.93; 49.35; 60.21; 93.47; 106.10; 110.59; 114.84; 118.35; 119.76; 121.27; 127.14; 130.30; 131.89; 141.00; 146.72; 147.74; 151.08; 170.64。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 450.21; 測定値 449.93。

【0171】

実施例72. 化合物70の合成

この化合物70は、実施例7に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物69から合成した。収率: 100%。¹H-NMR (CDCl₃) : 1.04 (6H, t, J = 7.2 Hz); 2.98 (2H, d, J = 15.4 Hz); 3.02 (2H, d, J = 15.4 Hz); 3.07 (1H, s); 3.95 (2 × 2H, qd, J = 14.3 及び 7.2 Hz); 6.67 (1H, dd, J = 8.2 及び 2.0 Hz); 6.88 (1H, d, J = 2.0 Hz); 7.44 (1H, dd, J = 7.9 及び 1.1 Hz); 7.47 (1H, d, J = 8.2 Hz); 7.48 (1H, d, J = 7.9 Hz); 7.58 (1H, d, J = 1.1 Hz)。¹³C-NMR (CDCl₃) : 13.91; 41.91; 49.3

9 ; 60 . 22 ; 76 . 53 ; 84 . 56 ; 110 . 52 ; 114 . 86 ; 118 . 43 ; 118 . 66 ; 121 . 33 ; 127 . 38 ; 130 . 13 ; 132 . 05 ; 141 . 33 ; 146 . 85 ; 147 . 80 ; 151 . 08 ; 170 . 59。MALDI TOF - MS 質量 : 計算値 ($M + H^+$) 378 . 17 ; 測定値 377 . 95。

【0172】

実施例 73 . 化合物 71 の合成

化合物 70 (1 . 04 g、2 . 76 mmol) の乾燥 THF 溶液 (15 mL) を、氷水上で、10 分以内に、乾燥 THF (10 mL) と無水トリフルオロ酢酸 (1 . 53 mL、11 . 0 mmol) の溶液に加えた。氷上で 10 分間、及び室温で 30 分間攪拌した後、溶液を氷水 (100 mL) に注ぎ、固体 $NaHCO_3$ で中和し、 CH_2Cl_2 (2×40 mL) で抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥した。収率 : 1 . 31 g (100%)。 1H - NMR ($CDCl_3$) : 1 . 01 (6H, t, $J = 7.2$ Hz) ; 3 . 03 (2H, d, $J = 15.4$ Hz) ; 3 . 08 (2H, d, $J = 15.4$ Hz) ; 3 . 13 (1H, s) ; 3 . 92 (2H, qd, $J = 14.3$ 及び 7.2 Hz) ; 3 . 93 (2H, qd, $J = 14.3$ 及び 7.2 Hz) ; 7 . 51 (1H, dd, $J = 7.9$ 及び 1.3 Hz)、7 . 57 (1H, dd, $J = 8.3$ 及び 1.9 Hz) ; 7 . 62 (1H, d, $J = 7.9$ Hz)、7 . 65 (1H, d, $J = 1.3$ Hz) ; 7 . 67 (1H, d, $J = 8.3$ Hz) ; 7 . 86 (1H, d, $J = 1.9$ Hz)、8 . 12 (1H, s)。 ^{13}C - NMR ($CDCl_3$) : 13 . 82 ; 42 . 06 ; 49 . 94 ; 60 . 45 ; 77 . 62 ; 83 . 97 ; 112 . 23 ; 114 . 53 ; 116 . 14 ; 116 . 82 ; 119 . 13 ; 119 . 87 ; 120 . 28 ; 120 . 92 ; 120 . 99 ; 127 . 53 ; 132 . 28 ; 135 . 00 ; 137 . 49 ; 139 . 88 ; 148 . 49 ; 150 . 23 ; 154 . 16 ; 154 . 47 ; 154 . 75 ; 170 . 12。MALDI TOF - MS 質量 : 計算値 ($M + H^+$) 474 . 16 ; 測定値 474 . 95。

【0173】

実施例 74 . 化合物 72 の合成

化合物 71 (1 . 10 g、2 . 40 mmol)、6 - ブロモ - 2, 6 - ジヒドロキシメチルピリジン (Takalo, H., et al., 1988, Acta Chem. Scand. Ser. B, 42, 614) (0 . 44 g、2 . 00 mmol) の乾燥トリエチルアミン (5 mL) 及び乾燥 THF (10 mL) 中混合物を、アルゴンで脱気した。ビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) クロライド (28 mg、0 . 04 mmol)、CuI (15 mg、0 . 08 mmol) を添加した後、この混合物を 55 で 23 時間攪拌した。蒸発乾固及び CH_2Cl_2 (40 mL) の添加の後、低温の混合物を濾過し、生成物を冷 CH_2Cl_2 で洗浄した。収率 : 0 . 97 g (80%)。 1H - NMR (D_6 - DMSO) : 0 . 79 (6H, t, $J = 7.1$ Hz) ; 3 . 12 (2H, d, $J = 15.0$ Hz) ; 3 . 19 (2H, d, $J = 15.0$ Hz) ; 3 . 78 (4H, q, $J = 7.1$ Hz) ; 4 . 55 (4H, s) ; 5 . 51 (2H, s) ; 7 . 36 - 7 . 56 (2H, bs) ; 7 . 62 (1H, dd, $J = 7.9$ 及び 1.3 Hz) ; 7 . 68 (1H, dd, $J = 8.3$ 及び 1.8 Hz) ; 7 . 86 (1H, d, $J = 7.9$ Hz) ; 7 . 89 (1H, d, $J = 8.3$ Hz) ; 7 . 90 - 7 . 94 (2H, m)、11 . 39 (1H, s)。 ^{13}C - NMR (D_6 - DMSO) : 13 . 98 ; 42 . 51 ; 50 . 49 ; 59 . 91 ; 88 . 13 ; 94 . 28 ; 112 . 83 ; 115 . 13 ; 117 . 04 ; 117 . 42 ; 119 . 71 ; 119 . 84 ; 120 . 64 ; 121 . 30 ; 121 . 41 ; 127 . 63 ; 131 . 95 ; 136 . 40 ; 137 . 41 ; 141 . 36 ; 149 . 47 ; 149 . 85 ; 154 . 36 ; 154 . 58 ; 155 . 02 ; 169 . 59。MALDI TOF - MS 質量 : 計算値 ($M + H^+$) 611 . 20 ; 測定値 612 . 47。

【0174】

実施例 75 . 化合物 73 の合成

化合物 71 (0 . 96 g、1 . 57 mmol) の EtOH フリー乾燥 $CHCl_3$ (65 mL) 懸濁液に、PBr₃ (0 . 22 mL、2 . 36 mmol) を加えた。60 で 3 日

間攪拌した後、混合物を5% NaHCO_3 (50 mL) で中和した。水相を CHCl_3 (50 mL) で抽出し、合わせた有機相を Na_2SO_4 で乾燥した。生成物を、FC (シリカゲル、0.5% ~ 3% $\text{MeOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$) により精製した。収率：0.72 g (62%)。 ^1H -NMR (CDCl_3) : 1.02 (6H, t, $J = 7.2 \text{ Hz}$) ; 3.07 (2H, d, $J = 15.5 \text{ Hz}$) ; 3.11 (2H, d, $J = 15.5 \text{ Hz}$) ; 3.94 (2H, qd, $J = 14.4$ 及び 7.2 Hz) ; 3.95 (2H, qd, $J = 14.4$ 及び 7.2 Hz) ; 4.54 (2H, s) ; 7.48 (2H, s) ; 7.58 (1H, dd, $J = 7.9$ 及び 1.2 Hz) ; 7.60 (1H, dd, $J = 8.2$ 及び 1.9 Hz) ; 7.70 (1H, d, $J = 7.9 \text{ Hz}$) ; 7.72 (1H, d, $J = 8.2 \text{ Hz}$) ; 7.74 (1H, d, $J = 1.2 \text{ Hz}$) ; 7.89 (1H, d, $J = 1.9 \text{ Hz}$) ; 8.10 (1H, s)。 ^{13}C -NMR (CDCl_3) : 13.87 ; 33.04 ; 42.04 ; 50.00 ; 60.49 ; 86.70 ; 95.36 ; 112.48 ; 114.53 ; 116.82 ; 119.12 ; 120.10 ; 120.35 ; 120.53 ; 121.18 ; 124.52 ; 127.44 ; 132.20 ; 133.67 ; 135.18 ; 137.37 ; 140.60 ; 148.83 ; 150.42 ; 154.18 ; 154.42 ; 154.78 ; 156.97 ; 170.04。MALDI TOF-MS 質量：計算値 ($\text{M} + 2\text{H}^+$) 738.04、736.03 及び 740.03 ; 測定値 737.95、735.85 及び 740.01。

【0175】

実施例 76 . 化合物 75 の合成

化合物 73 (0.71 g、0.96 mmol)、乾燥 K_2CO_3 及び化合物 74 (国際公開第 201326790 号) (0.67 g、1.92 mmol) の乾燥 MeCN (30 mL) 中混合物を、65 で 4 時間攪拌した。固体物質を濾過し、 MeCN で洗浄した後、濾液を蒸発乾固した。生成物を、FC (シリカゲル、5% ~ 10% $\text{EtOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$) により精製した。収率 0.69 g (57%)。 ^1H -NMR (CDCl_3) : 1.01 (6H, t, $J = 7.1 \text{ Hz}$) ; 1.29 (6H, t, $J = 6.8 \text{ Hz}$) ; 1.41 (6H, t, $J = 7.0 \text{ Hz}$) ; 1.65 - 1.85 (1H, bs) ; 3.06 (2H, d, $J = 15.4 \text{ Hz}$) ; 3.13 (2H, d, $J = 15.4 \text{ Hz}$) ; 3.52 (4H, s) ; 3.93 (2H, qd, $J = 14.3$ 及び 7.1 Hz) ; 3.94 (2H, qd, $J = 14.3$ 及び 7.1 Hz) ; 3.99 (4H, s) ; 4.13 (4H, s) ; 4.19 (4H, d, $J = 6.8 \text{ Hz}$) ; 4.45 (4H, d, $J = 7.0 \text{ Hz}$)、7.46 (2H, s) ; 7.60 (1H, d, $J = 7.9 \text{ Hz}$) ; 7.64 (1H, dd, $J = 8.3$ 及び 1.5 Hz) ; 7.70 (1H, d, $J = 7.9 \text{ Hz}$) ; 7.73 (1H, d, $J = 8.3 \text{ Hz}$) ; 7.76 (1H, d, $J = 1.5 \text{ Hz}$) ; 7.90 (1H, s) ; 8.12 (2H, 2 × s) ; 8.17 (2H, s)。 ^{13}C -NMR (CDCl_3) : 13.79 ; 14.17 ; 14.18 ; 42.04 ; 49.91 ; 55.31 ; 59.63 ; 59.76 ; 60.31 ; 60.37 ; 60.59 ; 62.15 ; 87.60 ; 94.16 ; 112.17 ; 114.47 ; 116.77 ; 116.77 ; 119.06 ; 119.94 ; 120.27 ; 120.73 ; 121.01 ; 123.33 ; 126.86 ; 127.23 ; 129.19 ; 132.30 ; 134.01 ; 137.45 ; 140.21 ; 148.48 ; 148.74 ; 150.23 ; 154.40 ; 154.69 ; 154.99 ; 158.40 ; 161.85 ; 164.06 ; 169.90 ; 170.95。MALDI TOF-MS 質量：計算値 ($\text{M} + \text{H}^+$) 1265.25、1263.21 及び 1267.25 ; 測定値 1265.86、1263.01 及び 1267.81。

【0176】

実施例 77 . 化合物 77 の合成

この化合物 77 は、実施例 73 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 75 及び 76 (国際公開第 201326790 号) から合成した。反応時間 23 時間。生成物を、FC (シリカゲル、5% ~ 25% $\text{EtOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$) により精製した。収率：75%。 ^1H -NMR (D_6 -DMSO) : 0.79 (6H, t, $J = 7.1 \text{ Hz}$) ; 1.18

(6 H, t, J = 7.1 Hz); 1.20 (12 H, t, J = 7.1 Hz); 1.21 (6 H, t, J = 7.1 Hz); 1.32 (6 H, t, J = 7.1 Hz); 3.08 (2 H, d, J = 15.0 Hz); 3.17 (2 H, d, J = 15.0 Hz); 3.32 (4 H, s); 3.70 (4 H, q, J = 7.1 Hz); 3.07 (4 H, s); 4.03 (4 H, s); 4.06 (4 H, q, J = 7.1 Hz); 4.16 (4 H, q, J = 7.1 Hz); 4.17 (8 H, q, J = 7.1 Hz); 4.33 (4 H, q, J = 7.1 Hz); 4.79 (4 H, s); 4.87 (8 H, s)、6.25 (4 H, s); 7.46 (2 H, s); 7.47 (1 H, d, J = 7.8 Hz); 7.75 (1 H, d, J = 7.8 Hz); 7.69 (1 H, dd, J = 8.3 及び 1.6 Hz); 7.77 (2 H, 2 × 2 s); 7.82 (1 H, d, J = 8.3 Hz); 7.84 (1 H, s); 7.86 (2 H, 2 × 2 s); 7.92 (1 H, d, J = 1.6 Hz)。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺): 1920.69; 測定値 1920.31。

【0177】

実施例 78. 化合物 78 の合成

この化合物 78 は、実施例 66 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 77 から合成した。生成物を、それ以上精製せずに次の工程に使用した。R_f (HPLC): 14.4 分。UV (HPLC): 260 及び 364 nm。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 1834.03、測定値 1833.95。

【0178】

実施例 79. 化合物 79 の合成

この化合物 79 は、実施例 42 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 78 から合成した。生成物を、それ以上精製せずに次の工程に使用した。R_f (HPLC): 19.9 分。UV (HPLC): 255 及び 361 nm。MALDI TOF-MS 質量: 計算値 (M + H⁺) 1876.09、測定値 1877.06。

【0179】

実施例 80. 化合物 80 の合成

この化合物 80 は、実施例 68 に記載の合成と類似の方法を用いて、化合物 79 から合成した。R_f (HPLC): 13.9 分。UV (HPLC): 255 及び 357 nm。

【0180】

実施例 81. タウリンと共役した新規キレートの光物理的特性 (キレート 66 及び 80)

調製したイソチオシアネート活性化キレート (65 及び 79) を、上記実施例 68 のように、タウリンと共役した。生成物を、セミ分取逆相 HPLC (RP-18 カラム) で精製した。生成物の画分を蒸発させた後、残渣を 50 mM TRIS 緩衝液に溶解した。

【0181】

50 mM TRIS 緩衝液 (pH 7.75) 中の新規キレート (66 及び 80) について、測定した光物理的特性である励起波長 (λ_{exc})、ルミネセンス減衰時間 (τ)、モル吸光係数 (ϵ)、推定ルミネセンス効率 ($\epsilon\phi$) を表 3 に示す。9 座配位子標識 {2, 2', 2'', 2''' - {[2 - (4 - イソチオシアナト - フェニル) エチルイミノ]ピス(メチレン)ピス{4 - {[4 - (α - ガラクトピラノキシ)フェニル] - エチル} - ピリジン - 2, 6 - ジイル}ピス(メチレンニトリロ)}テトラキス(アセタト)} - ユーロピウム (III) (von Loden, P., et al., 2003, Anal. Chem. 75, 3193) を参照標識として使用した。

【0182】

【表 3】

表 3

キレート	$\epsilon / \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$	$\lambda_{exc} / \text{nm}$	$\tau / \mu\text{s}$	$\epsilon \times \phi / \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
66	100000	346	540	8700
80	105000	354	290	5600
参照キレート	55000	325	1000	4800

10

20

30

40

50

【 0 1 8 3 】

実施例 58 . キレート 66 による抗体の標識化

T n I 標識化抗体を、実施例 61 に記載のように調製した。

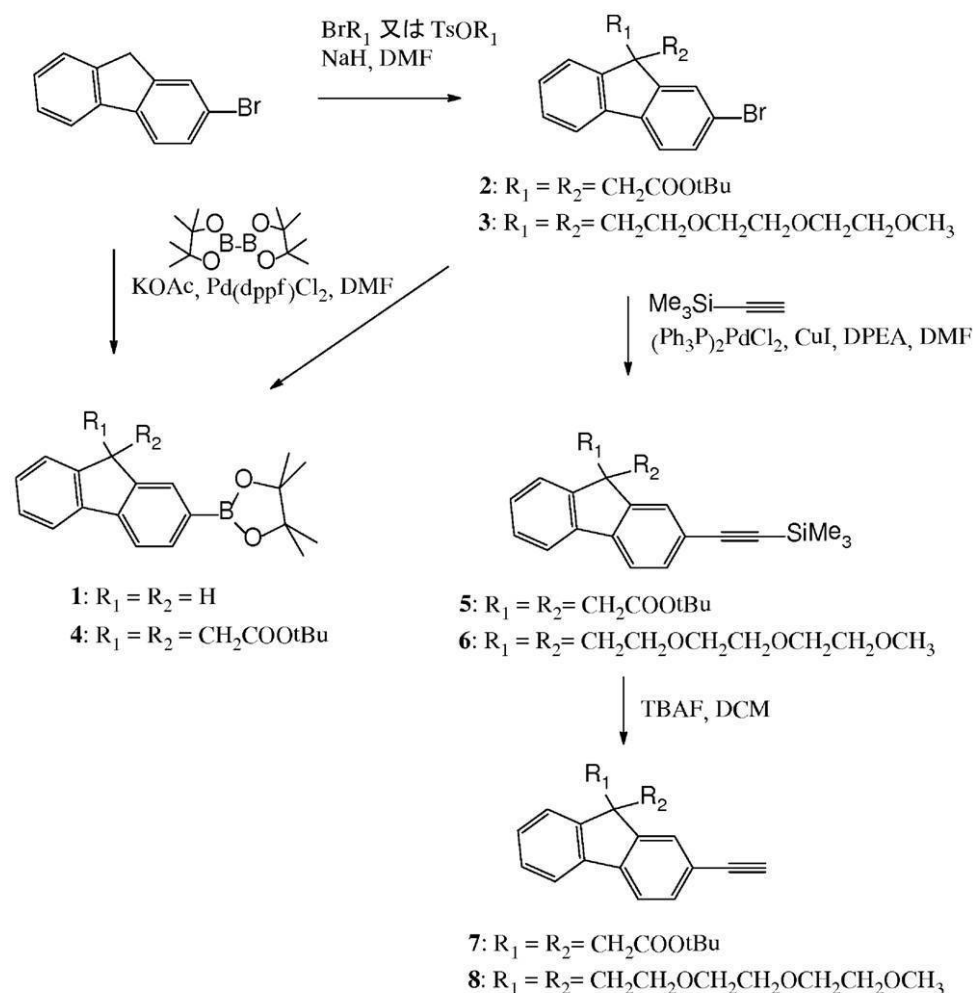
50 mM T R I S 緩衝液 (p H 7 . 7 5) 中のキレート 66 による標識化 c T n I について、光物理的特性の測定により、354 nm の励起波長 (λ_{exc})、460 μ s のルミネセンス減衰時間 (τ)、142000 $cm^{-1} M^{-1}$ のモル吸光係数 (ϵ) 及び 10500 $cm^{-1} M^{-1}$ のルミネセンス効率 ($\epsilon\phi$) を得た。

【 0 1 8 4 】

乾燥測定により、16500 $cm^{-1} M^{-1}$ のルミネセンス効率が得られ、これは、実施例 61 に記載のように実施したドライイムノアッセイの後のシグナル測定に基づく推定ルミネセンス効率を表す。

【 0 1 8 5 】

【 化 17 】



スキーム1

【 0 1 8 6 】

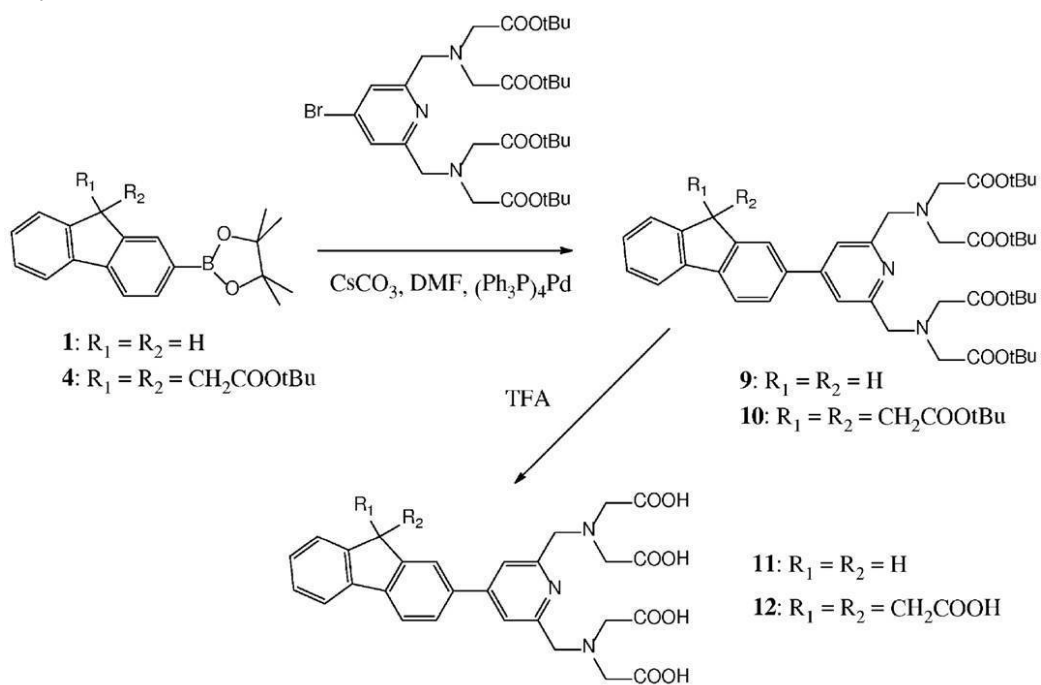
10

20

30

40

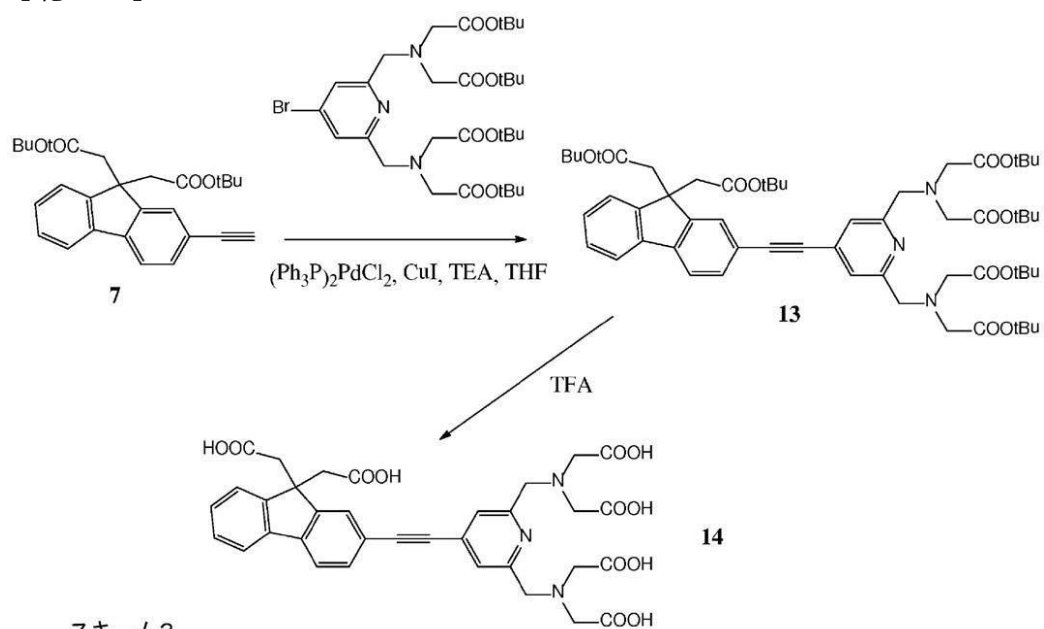
【化18】



スキーム2

【0187】

【化19】



スキーム3

【0188】

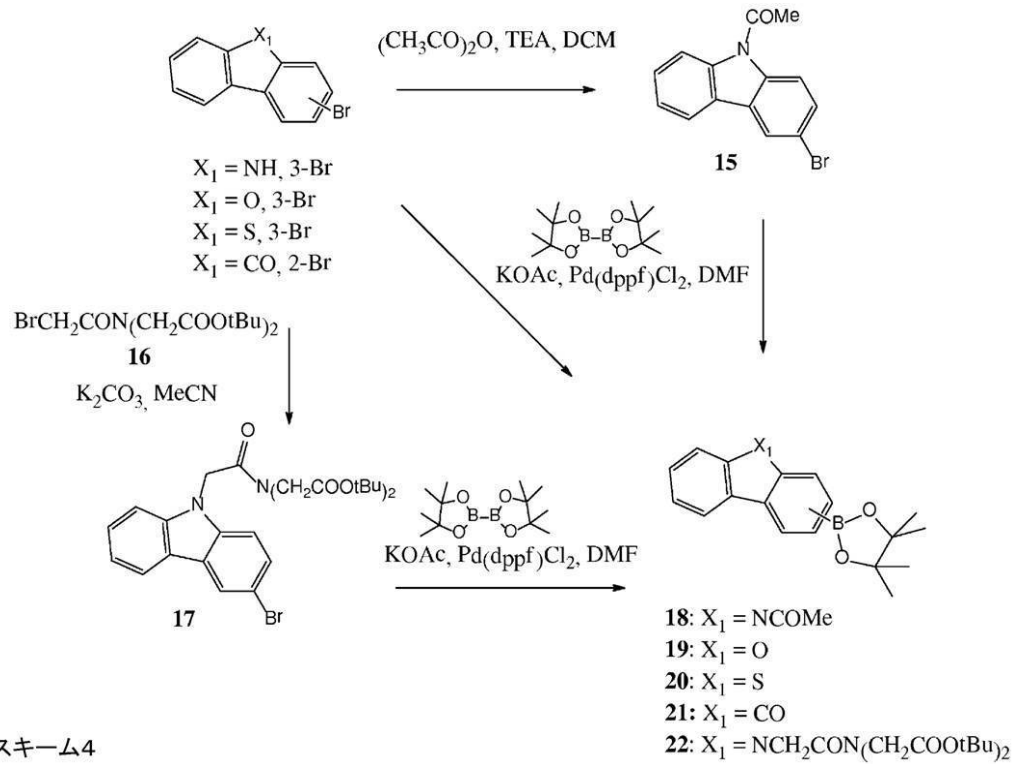
10

20

30

40

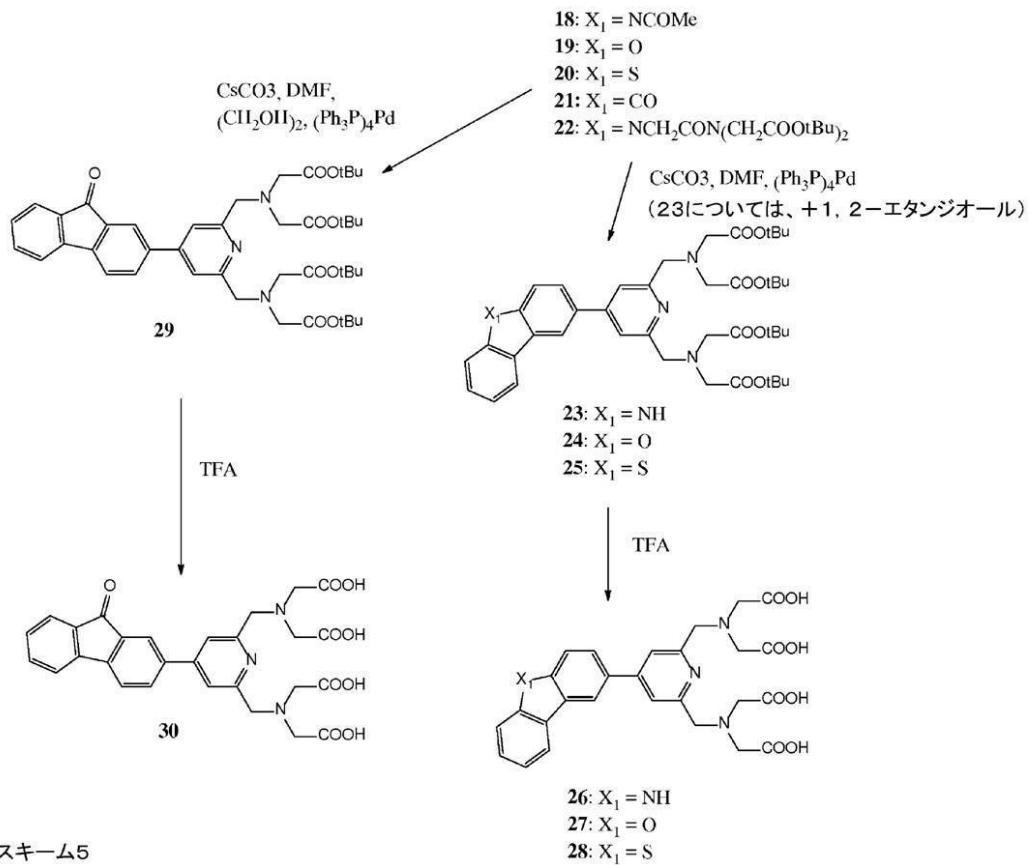
【化20】



スキーム4

【0189】

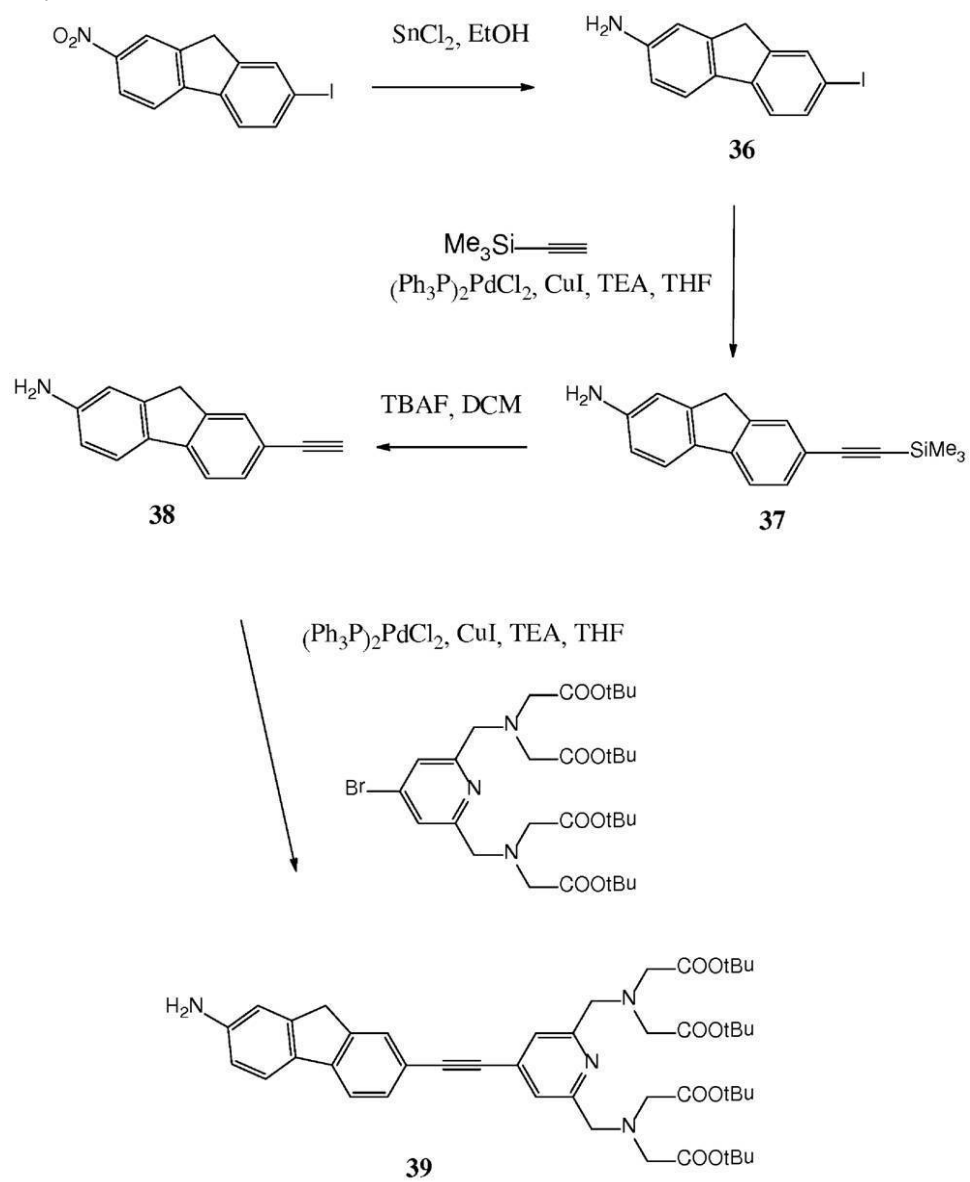
【化21】



スキーム5

【0190】

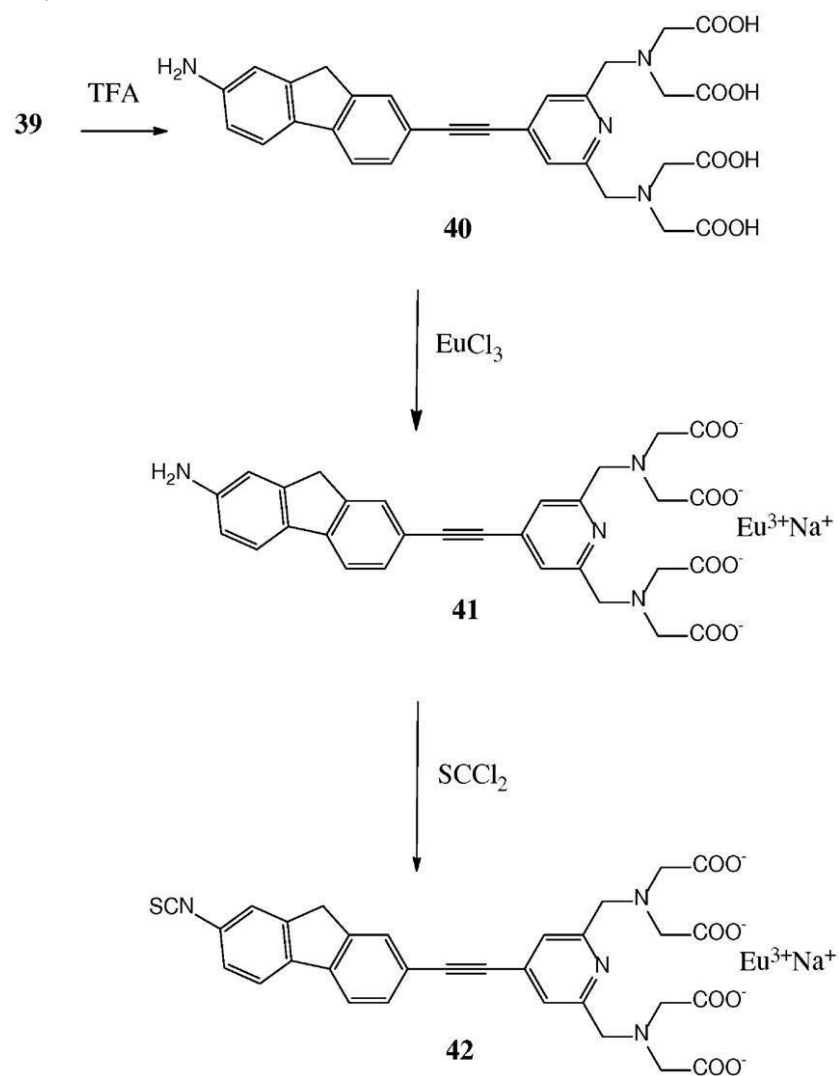
【化 2 2】



スキーム7

【 0 1 9 1 】

【化 2 3】



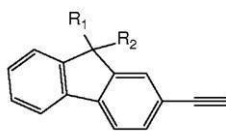
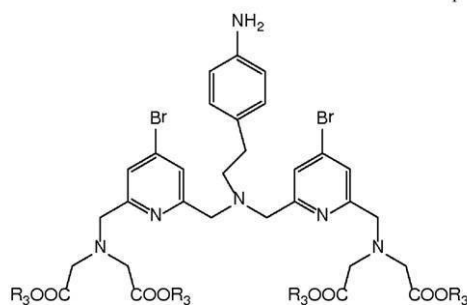
スキーム8
【 0 1 9 2 】

10

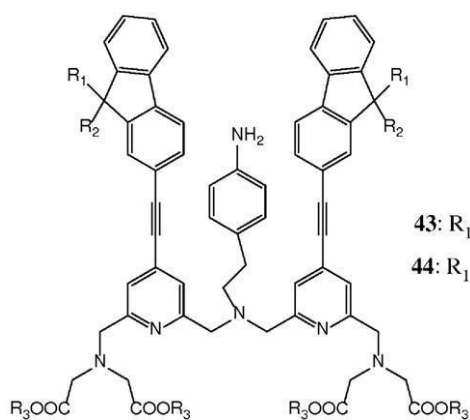
20

30

【化 2 4】

7: $R_1 = R_2 = \text{CH}_2\text{COOtBu}$ 8: $R_1 = R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 

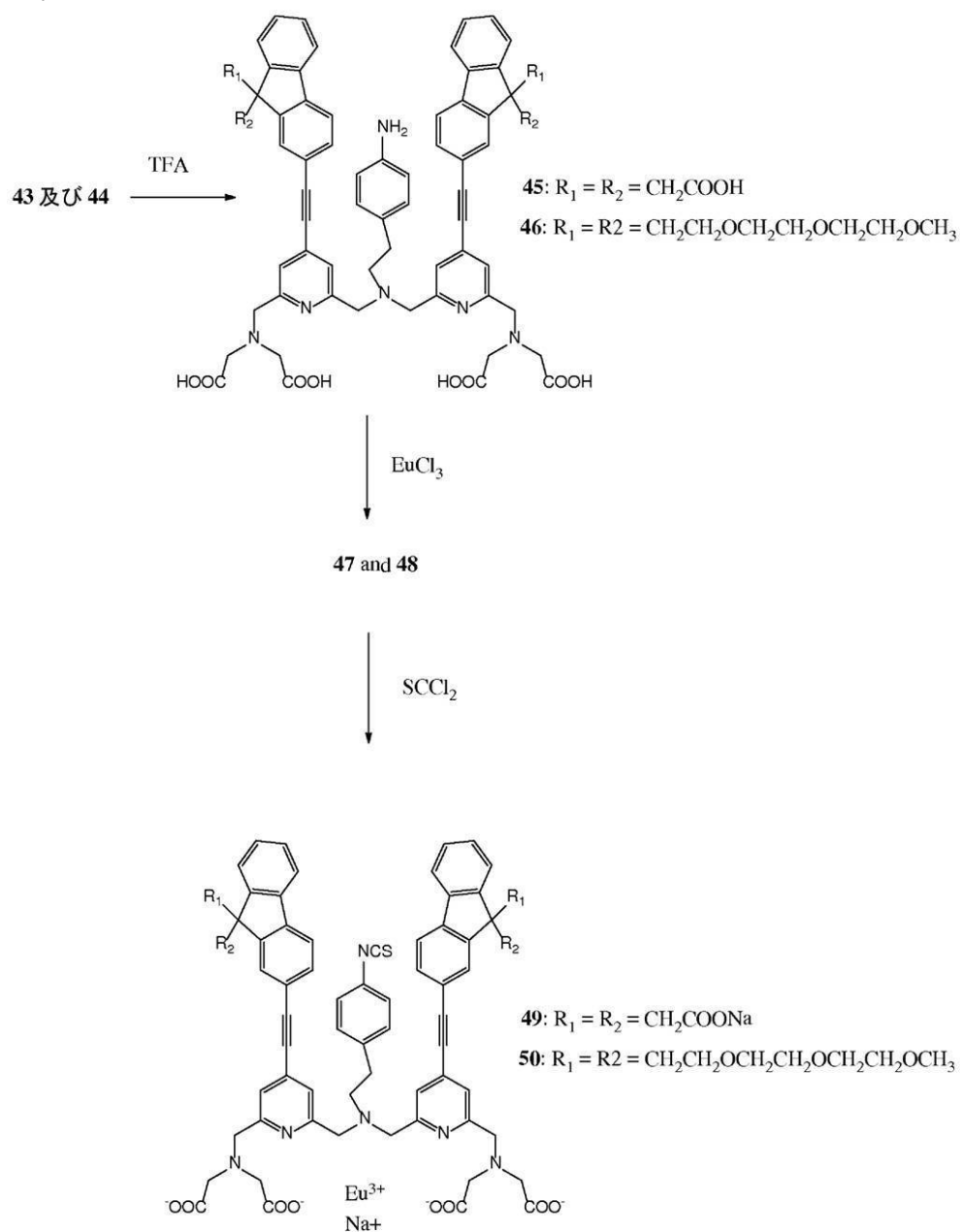
$(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$, CuI ,
TEA, THF

43: $R_1 = R_2 = \text{CH}_2\text{COOtBu}$, $R_3 = \text{tBu}$ 44: $R_1 = R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $R_3 = \text{tBu}$

スキーム9

【 0 1 9 3 】

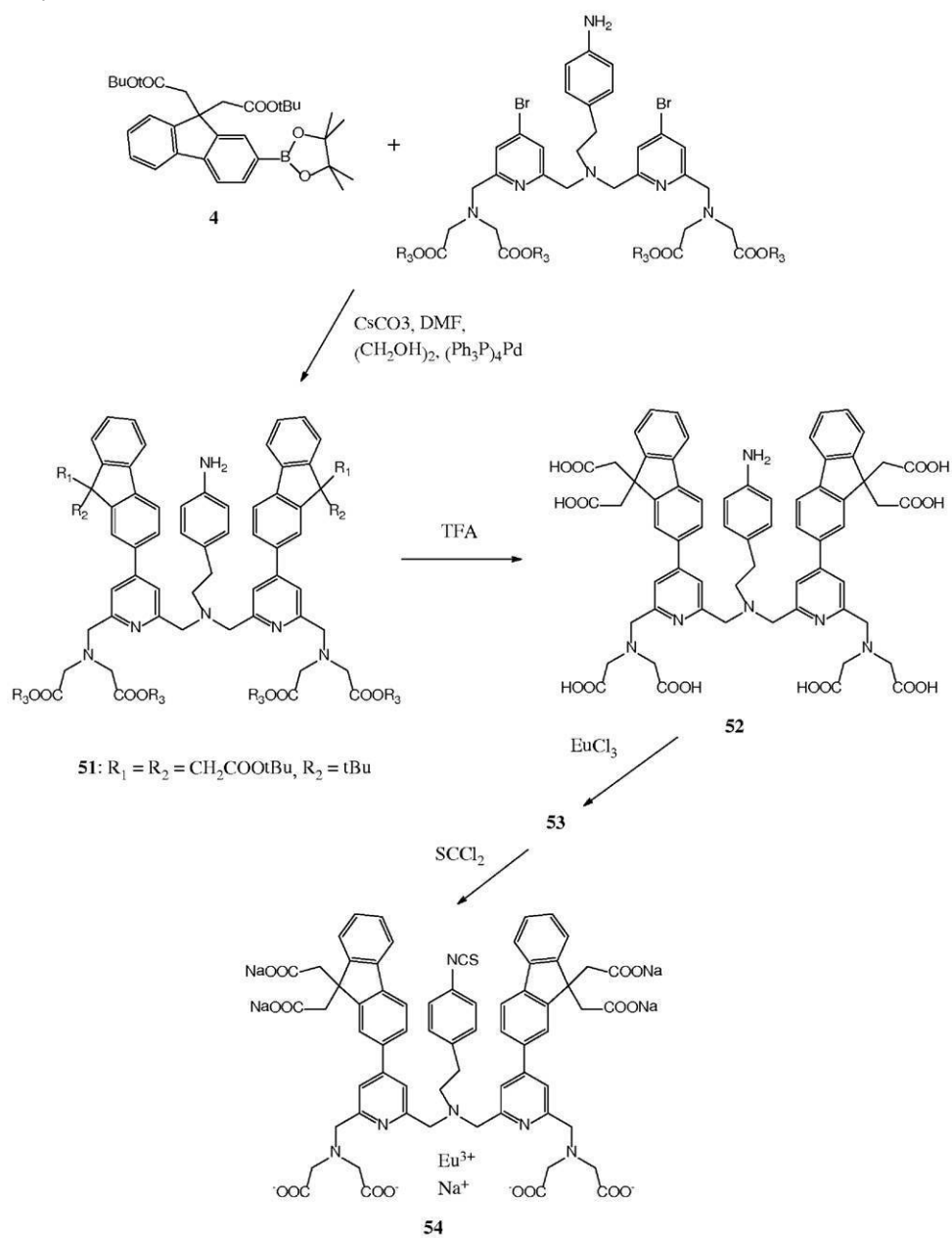
【化 2 5】



スキーム10

【 0 1 9 4 】

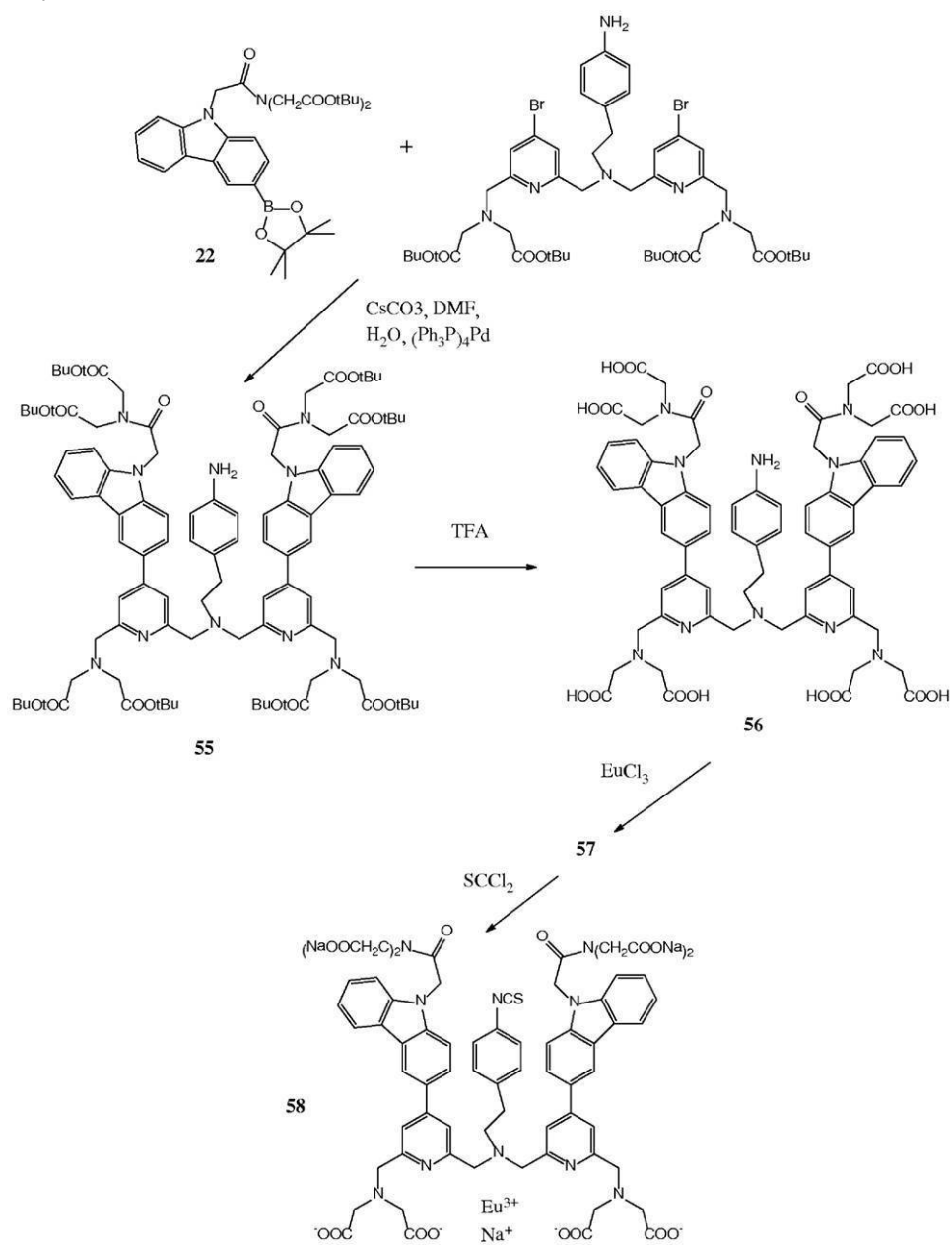
【化 2 6】



スキーム11

【 0 1 9 5】

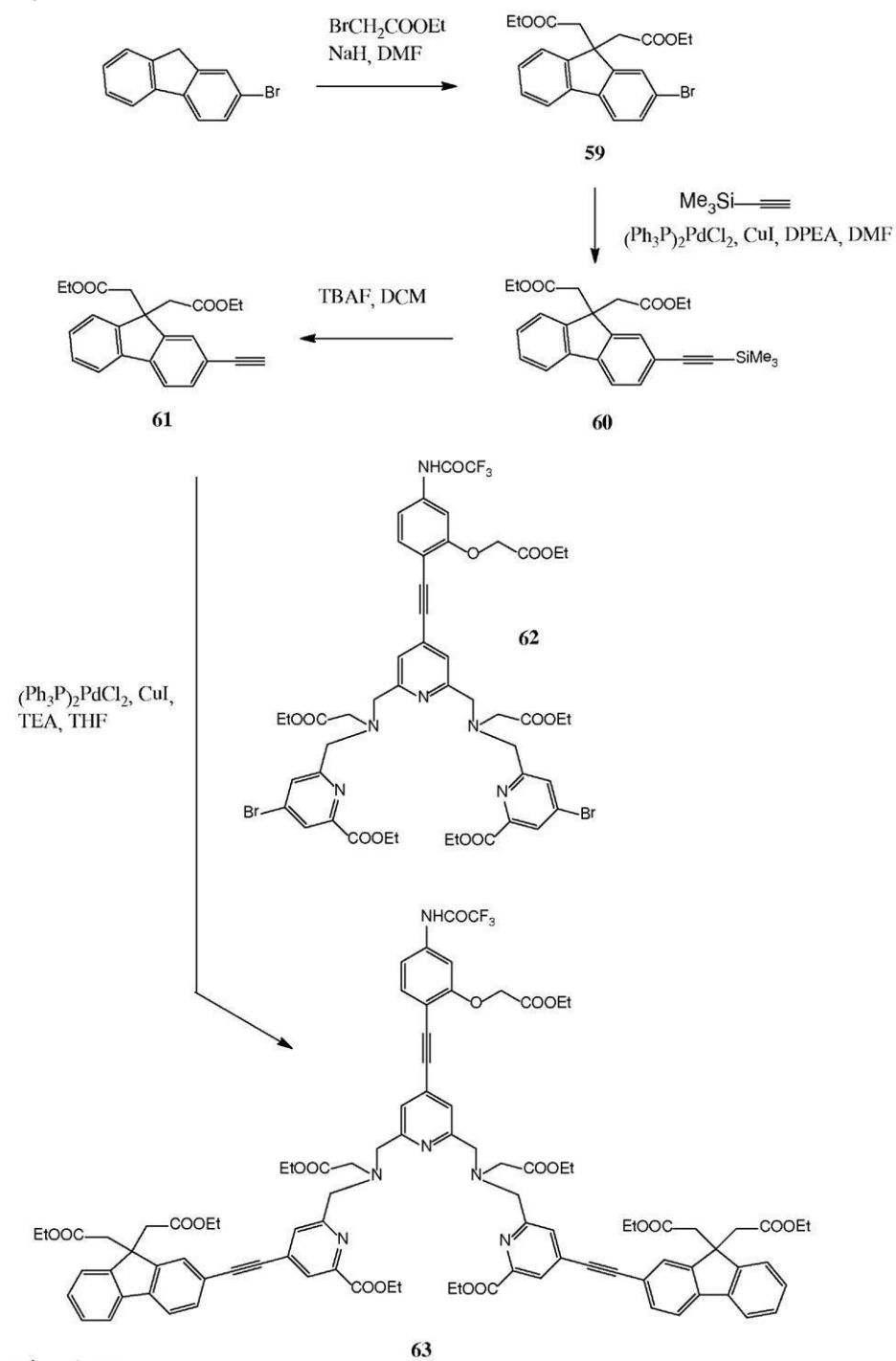
【化 2 7】



スキーム12

【 0 1 9 6 】

【化 2 8】

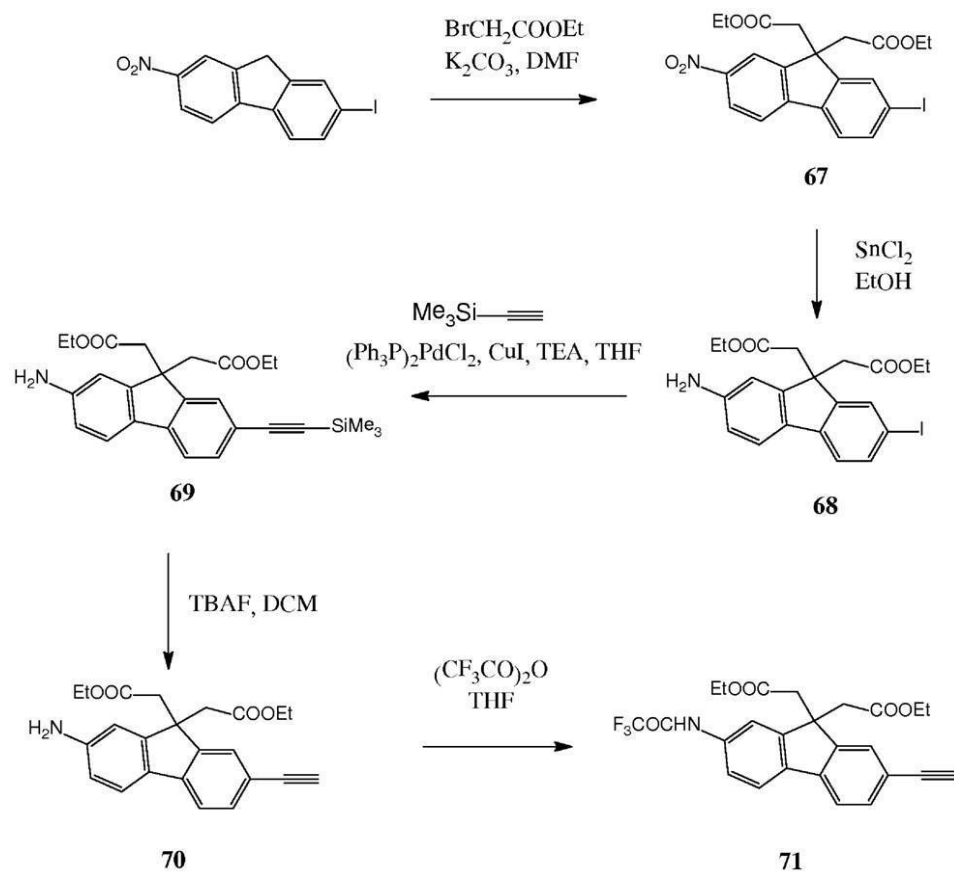


スキーム13

【 0 1 9 7 】

スキーム14
【 0 1 9 8 】

【化 3 0】



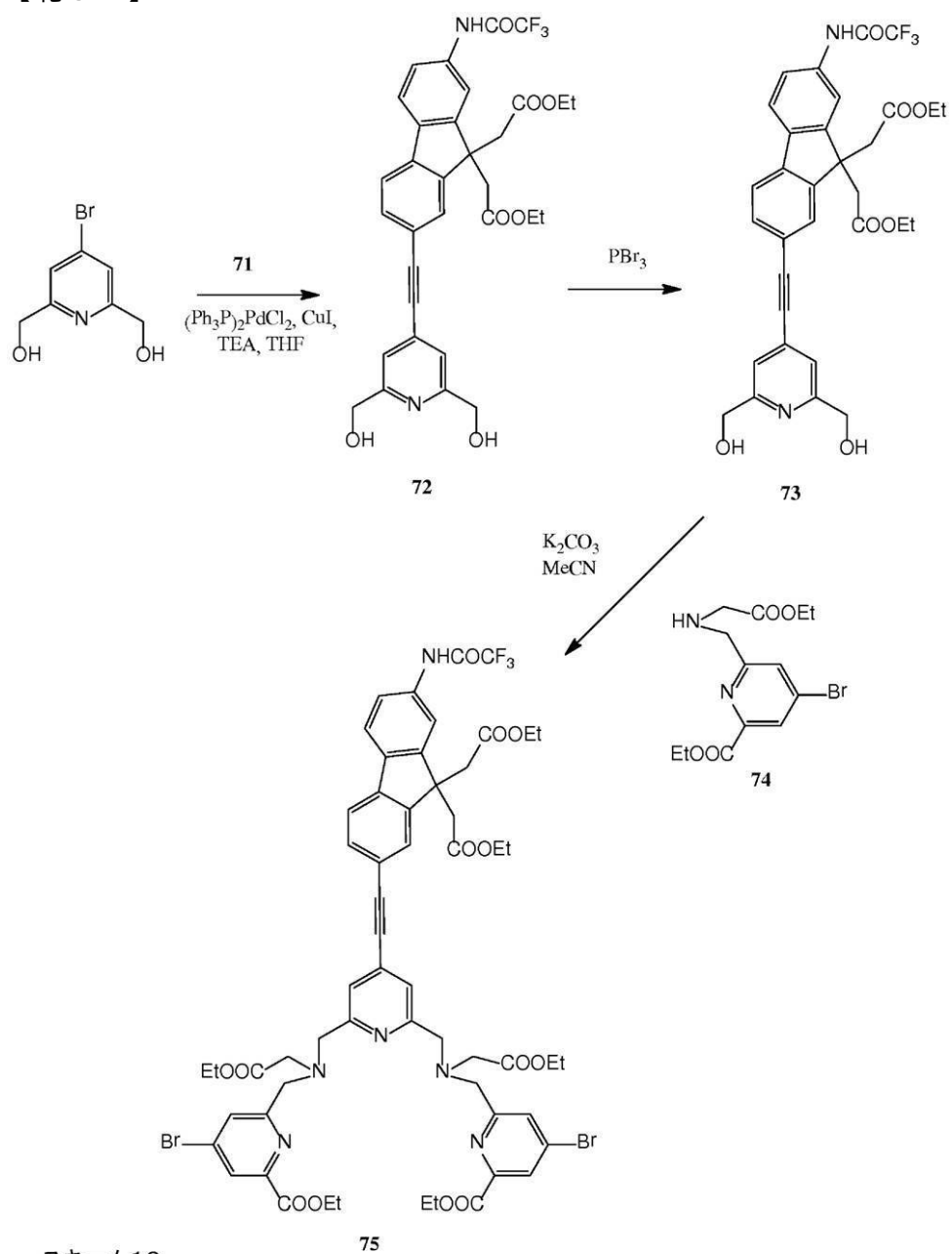
10

20

スキーム15

【 0 1 9 9 】

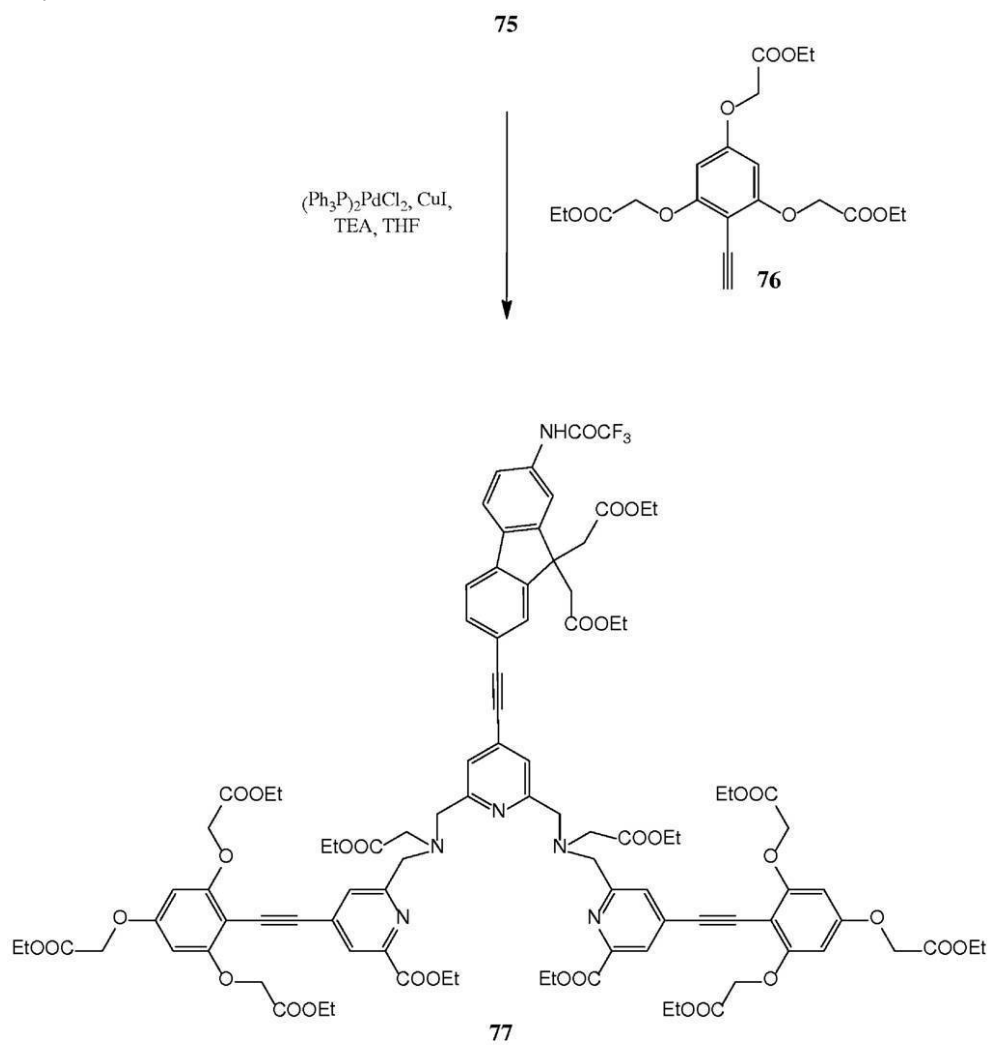
【化 3 1】



スキーム16

【 0 2 0 0 】

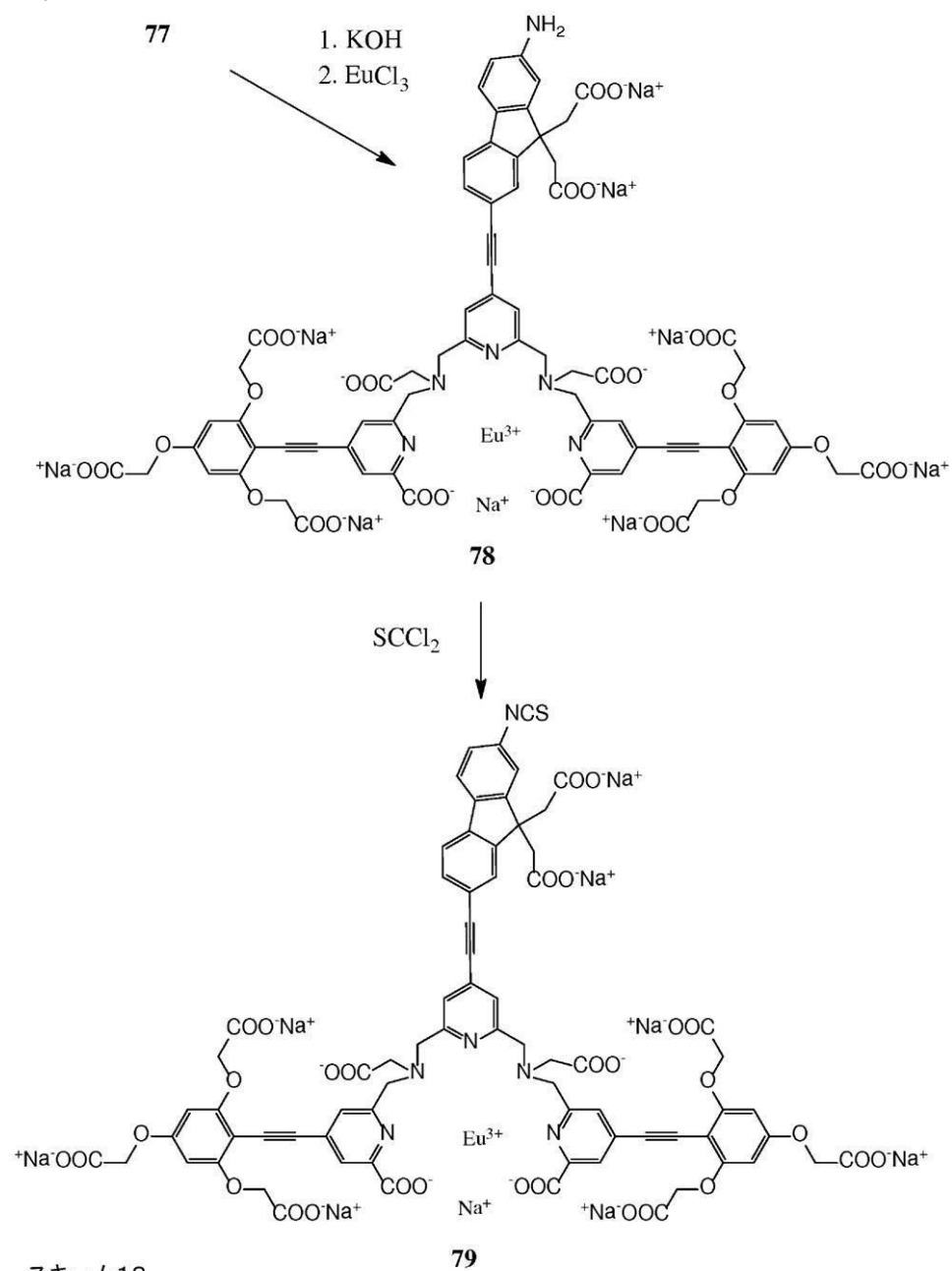
【化 3 2】



スキーム17

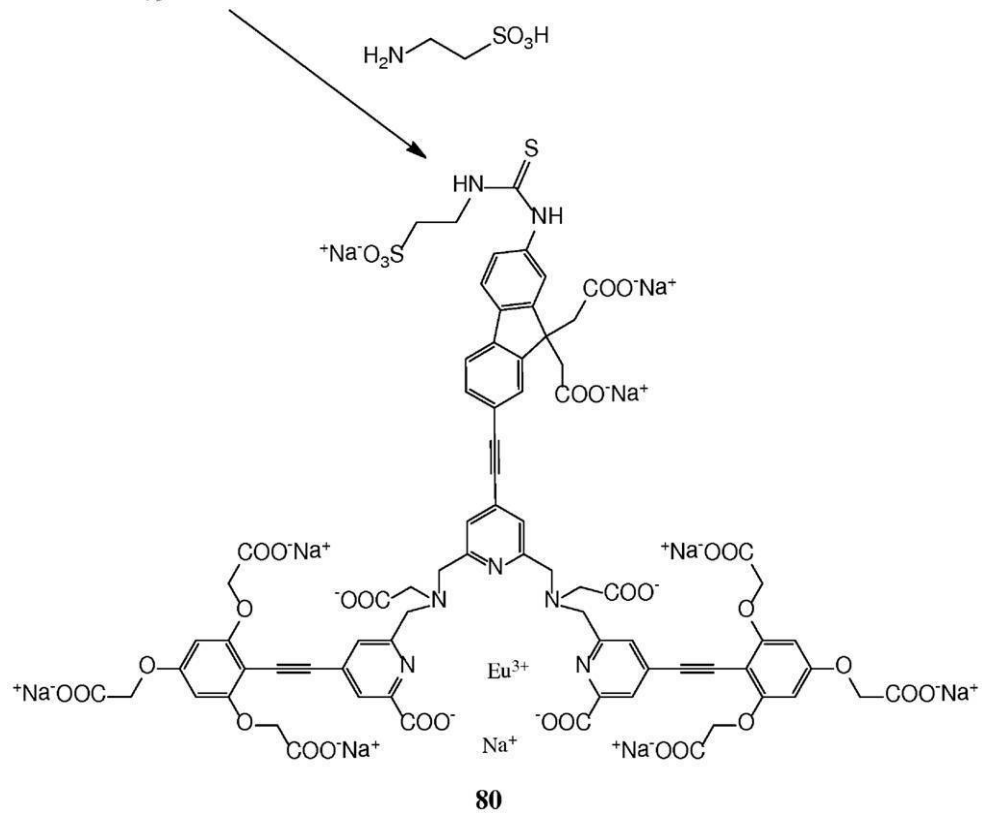
【 0 2 0 1 】

【化 3 3】



【化 3 4】

79

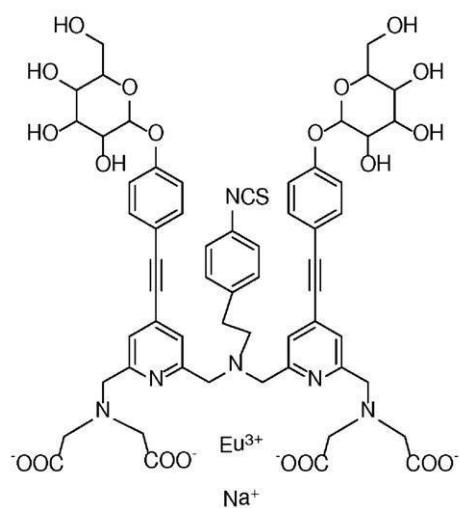


スキーム19

【 0 2 0 3 】

O=C(O)CN(C(=O)O)Cc1ccc(cc1)C#Cc2ccc(cc2)

実施例59で使用した参照配位子



実施例60及び80で使用した参照9座配位子標識。

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 0 7 D 213/79</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 D 213/79</i>	
<i>C 0 9 K 11/06</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 9 K 11/06</i>	6 4 5
<i>G 0 1 N 33/533</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N 33/533</i>	
<i>G 0 1 N 33/531</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N 33/531</i>	A
<i>C 0 7 F 5/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 F 5/00</i>	D

(72)発明者 タカロ, ハッリ
フィンランド国 2 0 3 6 0 トゥルク, プーノモンティエー 2 2

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 2 6 7 9 0 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 3 / 0 9 2 9 9 2 (W O , A 1)
特表 2 0 1 2 - 5 3 0 0 7 7 (J P , A)
Inorganic Chemistry , 2 0 0 7 年 , Vol.46, No.7 , pp.2659-2665

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 0 7 D 2 0 1 / 0 0 - 5 2 1 / 0 0
C 0 9 K 1 1 / 0 0 - 1 1 / 8 9
G 0 1 N 3 3 / 5 3 1
G 0 1 N 3 3 / 5 3 3
C 0 7 F 5 / 0 0
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)