

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年10月8日(08.10.2015)

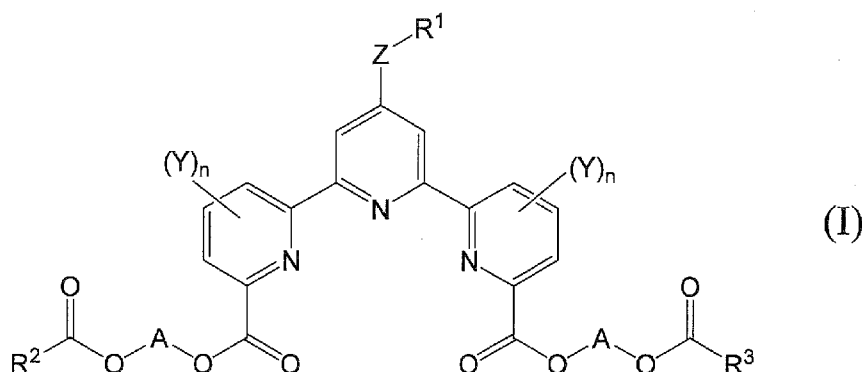


(10) 国際公開番号
WO 2015/152111 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 213/79 (2006.01) G01N 21/78 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/059838
- (22) 国際出願日: 2015年3月30日(30.03.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-073475 2014年3月31日(31.03.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 長崎大学(NAGASAKI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-1-4 Nagasaki (JP).
- (72) 発明者: 田中 義正(TANAKA, Yoshimasa); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-1-4 国立大学法人長崎大学内 Nagasaki (JP). 酒井 佑宜(SAKAI, Yuki); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-1-4 国立大学法人長崎大学内 Nagasaki (JP). 水田 賢志(MIZUTA, Satoshi); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-1-4 国立大学法人長崎大学内 Nagasaki (JP). 植田 弘師(UEDA, Hiroshi); 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-1-4 国立大学法人長崎大学内 Nagasaki (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: RAPID METHOD FOR MEASURING CYTOTOXICITY IN NON-RI SYSTEM

(54) 発明の名称: 非RI系における細胞障害能迅速測定法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a novel compound for measuring cytotoxicity or cellular proliferative potential accurately, simply, and rapidly at high reproducibility; and a method for measuring cytotoxicity or cellular proliferative potential using this compound. The present invention pertains to a compound represented by formula (I): (in the formula, R¹ represents a substituent, R² and R³ each represent an optionally substituted hydrocarbon group or an optionally substituted heterocyclic group, Y represents a substituent, m represents an integer of 0-3, Z represents a single bond, -O-, -S-, -SO-, -SO₂-, or -NR⁴- (R⁴ represents a hydrogen atom or substituent), and A represents an optionally substituted C₁₋₆ alkylene group), or a salt thereof.

(57) 要約: 本発明の目的は、正確で再現性が高く、かつ、簡便で迅速に細胞障害能または細胞増殖能を測定するための新規化合物および該化合物を用いた細胞障害能または細胞増殖能の測定方法を提供することにある。本発明は、式(I): (式中、R¹は、置換基を示し、R²およびR³は、それぞれ、置換されていてもよい炭化水素基、または置換されていてもよい複素環基を示し、Yは、置換基を示し、nは、0~3の整数を示し、Zは、単結合、-O-、-S-、-SO-、-SO₂-、または-NR⁴- (R⁴は、水素原子または置換基を示す。)を示し、およびAは、置換されていてもよいC₁₋₆アルキレン基を示す。)で表される化合物またはその塩に関する。



WO 2015/152111 A1

明 細 書

発明の名称：非 R I 系における細胞障害能迅速測定法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞障害能を非 R I でかつ迅速に測定するための新規化合物および該化合物を用いた細胞障害能の測定方法に関する。

背景技術

[0002] 免疫細胞治療では、血漿から NK 細胞、T 細胞などの免疫細胞を取り出し、体外で増殖および／または活性化した後、患者に投与することが行われている。しかしながら、現状では、同じ療法であっても、効果がまちまちである。この理由として、免疫細胞を増殖および／または活性化する過程において、免疫細胞がどの程度増殖および／または活性化されて細胞障害能を持つかの測定がされないまま、あるいは免疫細胞の増殖および／または活性化が不十分なまま、患者に投与されることが挙げられる。この結果、患者は場合によっては効果がないかもしれない治療を半年ないし一年以上も受けることになる可能性がある。

[0003] 細胞の活性あるいは生細胞の数を測定する方法として、R I 系では [5 1 C r] クロム酸ナトリウムを用いた γ 線測定法が知られており、非 R I 系では、乳酸脱水素酵素の漏出や、テルピリジン誘導体キレートを用いた時間分解蛍光法が知られている（特許文献 1、非特許文献 1）。 γ 線測定法は γ 線を扱うことのできる R I 施設の使用が必須であることから汎用性がなく、臨床現場などでの扱いが困難になる。乳酸脱水素酵素の漏出検定法では、標的細胞からだけでなく、エフェクター細胞からの自然漏出があり、バックグラウンドが高すぎるため正確な測定ができない点が問題となる。また、従来のテルピリジン誘導体キレート（例えば、ビス（アセトキシメチル） 2, 2' : 6', 6''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシレート：BATDA）を用いた Eu 時間分解蛍光法では、標的細胞からのキレート漏出が大きく、細胞の状態による結果のばらつきも大きいことから標準的な測定法とは

なりにくい。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表平3－500297号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Journal of Immunological Methods, 193 (2), 1996, pp. 199-206

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、正確で再現性があり、かつ簡便で迅速な細胞障害能を測定するための新規化合物および該化合物を用いた細胞障害能の測定方法を提供することを目的とする。

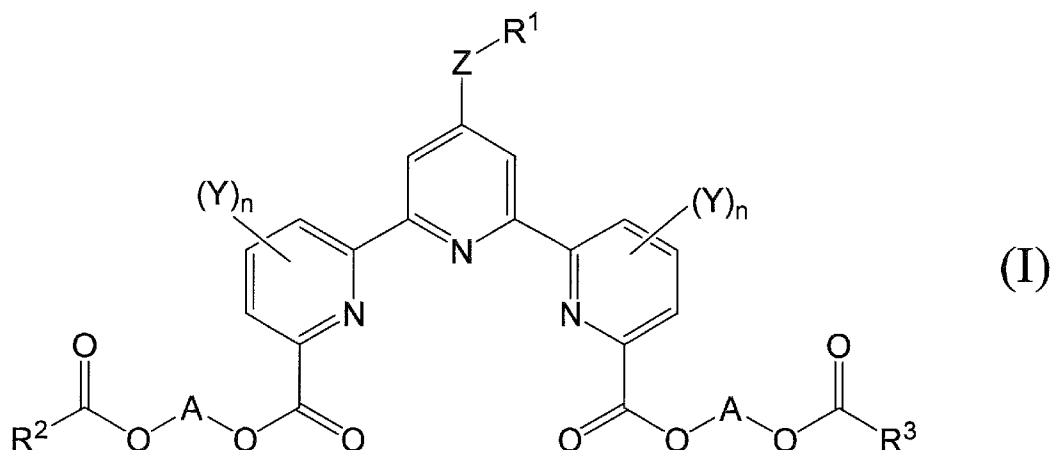
課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、下記の式（I）で示される化合物を用いることにより、自然漏出が低く、細胞の状態による値のばらつきが少なく、かつ簡便に細胞障害能を測定できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明は以下の通りである。

[1] 式（I）：

[0009] [化1]



[0010] (R^1 は、置換基を示し、

R^2 および R^3 は、それぞれ、置換されていてもよい炭化水素基、または置換されていてもよい複素環基を示し、

Yは、置換基を示し、

nは、0～3の整数を示し、

Zは、単結合、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、または $-NR^4-$ (R^4 は、水素原子または置換基を示す。)を示し、

および

Aは、置換されていてもよい C_{1-6} アルキレン基を示す。)

で表される化合物またはその塩（以下、化合物（I）と略記することがある。）。

[2] Aがメチレンである、上記[1]に記載の化合物またはその塩。

[3] 上記[1]または[2]に記載の化合物またはその塩を含む、有機錯体形成剤。

[4] 上記[1]または[2]に記載の化合物またはその塩を含む、生細胞数測定用試薬。

[5] 細胞障害能測定用試薬である、上記[4]に記載の試薬。

[6] 細胞増殖能測定用試薬である、上記[4]に記載の試薬。

[7] 上記[1]または[2]に記載の化合物またはその塩と細胞を混合する工程、および

ランタノイド元素と錯体を形成し、蛍光を測定する工程を含む、細胞障害能を測定する方法。

[8] ランタノイド元素と錯体を形成する前に、界面活性剤を加えることを特徴とする、上記[7]に記載の方法。

発明の効果

[0011] 本発明の化合物は、テルピリジン骨格に特定の置換基を導入し、細胞内におけるエステラーゼ分解後のキレート化合物の極性をあげることにより、正確で再現性が高く、かつ、簡便な、非RⅠ系での細胞障害能測定用試薬また

は細胞増殖測定用試薬として有用である。また、本発明の測定方法は、非R
Iで、しかも、簡便かつ迅速にエフェクター細胞／標的細胞系の細胞障害能
または細胞増殖能を測定できることから、がんやウイルス感染免疫研究、細
胞療法における新規の活性化物質等の探索、臨床検査などにおいて有用であ
る。さらに、細胞療法の際、免疫細胞の増殖能および／または活性化能を測
定し、治療効果を確認した後、患者に投与することにより、治療効果を高め
ることができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、本発明化合物（実施例8）を用いた細胞障害能の測定における
96穴プレートの配置を示す。

[図2]図2は、本発明化合物（実施例8）を用いたウイルス感染細胞HCT-
4および赤芽腫HCT-4およびK562における時間分解蛍光強度を示す
。

[図3]図3は、本発明化合物（実施例8）を用いて細胞障害能を測定した結果
を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 以下に、本発明について詳細に説明する。

以下、本明細書中で用いられる各置換基の定義について詳述する。

本明細書中、「ハロゲン原子」としては、例えば、フッ素、塩素、臭素、
ヨウ素が挙げられる。

本明細書中の「置換されていてもよい炭化水素基」としては、特に断りの
ない限り、例えば、「置換されていてもよいC₁₋₁₂アルキル基」、「置換さ
れていてもよいC₂₋₁₂アルケニル基」、「置換されていてもよいC₂₋₁₂アル
キニル基」、「置換されていてもよいC₃₋₈シクロアルキル基」、「置換され
ていてもよいC₃₋₈シクロアルケニル基」、「置換されていてもよいC₇₋₁₄
アラルキル基」、「置換されていてもよいC₆₋₁₄アリール基」などが挙げら
れる。

[0014] 本明細書中、「C₁₋₁₂アルキル（基）」としては、特に断りのない限り、

例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1, 1-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、2-エチルブチル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシルが挙げられる。本明細書中の「C₁₋₆アルキル（基）」としては、「C₁₋₁₂アルキル（基）」のうち、炭素数が1～6のものが挙げられる。

[0015] 本明細書中の「C₂₋₁₂アルケニル（基）」としては、特に断りのない限り、例えば、ビニル、プロペニル、イソプロペニル、2-ブテン-1-イル、4-ペンテン-1-イル、5-ヘキセン-1-イルなどが挙げられる。本明細書中の「C₂₋₆アルケニル（基）」としては、上記「C₂₋₁₂アルケニル（基）」のうち、炭素数が2～6のものが挙げられる。

[0016] 本明細書中の「C₂₋₁₂アルキニル（基）」としては、特に断りのない限り、例えば、2-ブチン-1-イル、4-ペンチン-1-イル、5-ヘキシン-1-イルなどが挙げられる。本明細書中の「C₂₋₆アルキニル（基）」としては、上記「C₂₋₁₂アルキニル（基）」のうち、炭素数が2～6のものが挙げられる。

[0017] 本明細書中の「C₃₋₈シクロアルキル（基）」としては、特に断りのない限り、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチルなどが挙げられる。

[0018] 本明細書中の「C₃₋₈シクロアルケニル（基）」としては、特に断りのない限り、例えば、シクロプロペニル（例、2-シクロプロペン-1-イル）、シクロブテニル（例、2-シクロブテン-1-イル）、シクロペンテニル（例、1-シクロペンテン-1-イル、2-シクロペンテン-1-イル、3-シクロペンテン-1-イル）、シクロヘキセニル（例、1-シクロヘキセン-1-イル、2-シクロヘキセン-1-イル、3-シクロヘキセン-1-イル）などが挙げられる。

[0019] 本明細書中の「C₇₋₁₄アラルキル（基）」としては、特に断りのない限り

、例えば、ベンジル、フェネチル、1-メチル-2-フェニルエチル、ジフェニルメチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、2, 2-ジフェニルエチル、3-フェニルプロピル、4-フェニルブチル、5-フェニルペンチルなどが挙げられる。

[0020] 本明細書中、「C₆₋₁₄アリール(基)」としては、特に断りのない限り、例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、1-アントリル、2-アントリル、9-アントリルが挙げられる。

[0021] 本明細書中、「C₁₋₁₂アルコキシ(基)」としては、特に断りのない限り、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、ヘプチルオキシ、オクチルオキシ、ノニルオキシ、デシルオキシ、ウンデシルオキシ、ドデシルオキシが挙げられる。「C₁₋₆アルコキシ(基)」としては、「C₁₋₁₂アルコキシ(基)」のうち、炭素数が1~6のものが挙げられる。

[0022] 本明細書中の「C₂₋₁₂アルケニルオキシ(基)」としては、特に断りのない限り、例えば、ビニルオキシ、プロペニルオキシ、イソプロペニルオキシなどが挙げられる。「C₂₋₆アルケニルオキシ(基)」としては、「C₂₋₁₂アルケニルオキシ(基)」のうち、炭素数が2~6のものが挙げられる。

[0023] 本明細書中の「C₂₋₁₂アルキニルオキシ(基)」としては、特に断りのない限り、例えば、2-ブチニルオキシ、2-ペンチニルオキシ、5-ヘキシルオキシなどが挙げられる。「C₂₋₆アルキニルオキシ(基)」としては、「C₂₋₁₂アルキニルオキシ(基)」のうち、炭素数が2~6のものが挙げられる。

[0024] 本明細書中の「C₃₋₈シクロアルキルオキシ(基)」としては、特に断りのない限り、例えば、シクロプロピルオキシ、シクロブチルオキシ、シクロペンチルオキシ、シクロヘキシルオキシ、シクロヘプチルオキシ、シクロオクチルオキシなどが挙げられる。

[0025] 本明細書中の「C₃₋₈シクロアルケニルオキシ(基)」としては、特に断り

のない限り、例えば、シクロプロペニルオキシ（例、2-シクロプロペニルオキシ）、シクロブテニルオキシ（例、2-シクロブテニルオキシ）、シクロペンテニルオキシ（例、1-シクロペンテニルオキシ、2-シクロペンテニルオキシ、3-シクロペンテニルオキシ）、シクロヘキセニルオキシ（例、1-シクロヘキセニルオキシ、2-シクロヘキセニルオキシ、3-シクロヘキセニルオキシ）などが挙げられる。

[0026] 本明細書中の「C₇₋₁₄アラルキルオキシ（基）」としては、特に断りのない限り、例えば、ベンジルオキシ、フェネチルオキシなどが挙げられる。

[0027] 本明細書中の「C₆₋₁₄アリールオキシ（基）」としては、特に断りのない限り、例えば、フェノキシ、1-ナフチルオキシ、2-ナフチルオキシなどが挙げられる。

[0028] 本明細書中の「複素環-オキシ（基）」としては、後述の「複素環（基）」で置換されたヒドロキシ基が挙げられる。該複素環-オキシ（基）の好適な例としては、テトラヒドロピラニルオキシ、チアゾリルオキシ、ピリジルオキシ、ピラゾリルオキシ、オキサゾリルオキシ、チエニルオキシ、フリルオキシなどが挙げられる。

[0029] 本明細書中の「C₁₋₆アルキルスルファニル（基）」としては、特に断りのない限り、例えば、メチルスルファニル、エチルスルファニル、プロピルスルファニル、イソプロピルスルファニル、ブチルスルファニル、sec-ブチルスルファニル、tert-ブチルスルファニルなどが挙げられる。

[0030] 本明細書中の「C₂₋₆アルケニルスルファニル（基）」としては、特に断りのない限り、例えば、ビニルスルファニル、プロペニルスルファニル、イソプロペニルスルファニルなどが挙げられる。

[0031] 本明細書中の「C₁₋₆アルキルスルホニル（基）」としては、特に断りのない限り、例えば、メチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、イソプロピルスルホニル、ブチルスルホニル、sec-ブチルスルホニル、tert-ブチルスルホニルなどが挙げられる。

[0032] 本明細書中、「C₁₋₆アルキレン基」としては、例えば、メチレン、エチレ

ン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレンが挙げられる。

[0033] 本明細書中の「複素環（基）」としては、特に断りのない限り、例えば、環構成原子として、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1又は2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む3ないし14員（単環、2環又は3環式）複素環基、好ましくは、(i) 5ないし14員（好ましくは、5ないし10員）芳香族複素環基、(ii) 3ないし8員非芳香族複素環基などが挙げられる。なかでも5または6員芳香族複素環基、あるいは5または6員非芳香族複素環基が好ましい。具体的には、例えば、チエニル（例：2-チエニル、3-チエニル）、フリル（例：2-フリル、3-フリル）、ピリジル（例：2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル）、チアゾリル（例：2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル）、オキサゾリル（例：2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、5-オキサゾリル）、ピラジニル、ピリミジニル（例：2-ピリミジニル、4-ピリミジニル）、ピロリル（例：1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル）、イミダゾリル（例：1-イミダゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル）、ピラゾリル（例：1-ピラゾリル、3-ピラゾリル、4-ピラゾリル）、トリアゾリル（例：1-トリアゾリル、2-トリアゾリル）、テトラゾリル、ピリダジニル（例：3-ピリダジニル、4-ピリダジニル）、イソチアゾリル（例：3-イソチアゾリル、4-イソチアゾリル、5-イソチアゾリル）、イソキサゾリル（例：3-イソキサゾリル、4-イソキサゾリル、5-イソキサゾリル）、インドリル（例：1-インドリル、2-インドリル、3-インドリル）、2-ベンゾチアゾリル、2-ベンズオキサゾリル、ベンズイミダゾリル（例：1-ベンズイミダゾリル、2-ベンズイミダゾリル）、ベンゾ[b]チエニル（例：2-ベンゾ[b]チエニル、3-ベンゾ[b]チエニル）、ベンゾ[b]フリル（例：2-ベンゾ[b]フラニル、3-ベンゾ[b]フラニル）、キノリル（例：2-キノリル、3-キノリル、4-キノリル、5-キノリル、8-キノリル）、イソキノリル（例：1-イソキノリル、3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-イソキノリル）、ピラゾロピリジ

ニル（例：ピラゾロ [1, 5-a] ピリジン-3-イル）などの芳香族複素環基；

例えば、ピロリジニル（例：1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル）、オキサゾリジニル（例：2-オキサゾリジニル）、イミダゾリニル（例：1-イミダゾリニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル）、ピペリジニル（例：ピペリジノ、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-ピペリジニル）、ピペラジニル（例：1-ピペラジニル、2-ピペラジニル）、モルホリニル（例：2-モルホリニル、3-モルホリニル、モルホリノ）、チオモルホリニル（例：2-チオモルホリニル、3-チオモルホリニル、チオモルホリノ）、テトラヒドロフリル、テトラヒドロピラニルなどの非芳香族複素環基などが挙げられる。

[0034] 本明細書中、「置換されていてもよい C_{1-12} アルキル基」、「置換されていてもよい C_{2-12} アルケニル基」、「置換されていてもよい C_{2-12} アルキニル基」、「置換されていてもよい C_{1-6} アルキレン基」としては、例えば、
[置換基群A]

- (1) ハロゲン原子；
- (2) ヒドロキシ；
- (3) アミノ；
- (4) ニトロ；
- (5) シアノ；
- (6) ハロゲン原子、ヒドロキシ、アミノ、ニトロ、シアノ、ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-アミノ、 C_{6-14} アリール、モノー又はジ- C_{6-14} アリール-アミノ、 C_{3-8} シクロアルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルコキシ- C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルキルスルファニル、 C_{1-6} アルキルスルフィニル、 C_{1-6} アルキルスルホニル、エステル化されていてもよいカルボキシル、カルバモイル、チオカルバモイル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル、モノー又はジ- C_{6-14} アリール-カルバモイル、スルファモイル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-

スルファモイル及びモノー又はジ- C_{6-14} アリールスルファモイルから選ばれる1ないし3個の置換基で置換されていてもよい複素環基；

- (7) モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-アミノ；
- (8) モノー又はジ- C_{6-14} アリール-アミノ；
- (9) モノー又はジ- C_{7-14} アラルキル-アミノ；
- (10) $N-C_{1-6}$ アルキル- $N-C_{6-14}$ アリール-アミノ；
- (11) $N-C_{1-6}$ アルキル- $N-C_{7-14}$ アラルキル-アミノ；
- (12) C_{3-8} シクロアルキル；
- (13) ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルコキシ；
- (14) C_{1-6} アルキルスルファニル；
- (15) C_{1-6} アルキルスルフィニル；
- (16) C_{1-6} アルキルスルホニル；
- (17) エステル化されていてもよいカルボキシル；
- (18) C_{1-6} アルキル-カルボニル；
- (19) C_{3-8} シクロアルキル-カルボニル；
- (20) C_{6-14} アリール-カルボニル；
- (21) カルバモイル；
- (22) チオカルバモイル；
- (23) モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル；
- (24) モノー又はジ- C_{6-14} アリール-カルバモイル；
- (25) $N-C_{1-6}$ アルキル- $N-C_{6-14}$ アリール-カルバモイル；
- (26) モノー又はジ-5ないし7員複素環-カルバモイル；
- (27) カルボキシルで置換されていてもよい C_{1-6} アルキル-カルボニルアミノ；
- (28) ハロゲン原子、ヒドロキシ、アミノ、ニトロ、シアノ、ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-アミノ、 C_{6-14} アリール、モノー又はジ- C_{6-14} アリール-アミノ、 C_{3-8} シクロアルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルコキシ- C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アル

キルスルファニル、 C_{1-6} アルキルスルフィニル、 C_{1-6} アルキルスルホニル、エステル化されていてもよいカルボキシル、カルバモイル、チオカルバモイル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル、モノー又はジ- C_{6-14} アリール-カルバモイル、スルファモイル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-スルファモイル及びモノー又はジ- C_{6-14} アリール-スルファモイルから選ばれる1ないし3個の置換基で置換されていてもよい C_{6-14} アリールオキシ；

(29) ハロゲン原子、ヒドロキシ、アミノ、ニトロ、シアノ、ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-アミノ、 C_{6-14} アリール、モノー又はジ- C_{6-14} アリール-アミノ、 C_{3-8} シクロアルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルコキシ- C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルキルスルファニル、 C_{1-6} アルキルスルフィニル、 C_{1-6} アルキルスルホニル、エステル化されていてもよいカルボキシル、カルバモイル、チオカルバモイル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル、モノー又はジ- C_{6-14} アリール-カルバモイル、スルファモイル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-スルファモイル及びモノー又はジ- C_{6-14} アリール-スルファモイルから選ばれる1ないし3個の置換基で置換されていてもよい C_{6-14} アリール；

(30) 複素環-オキシ；

(31) スルファモイル；

(32) モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-スルファモイル；

(33) モノー又はジ- C_{6-14} アリール-スルファモイル；

(34) ハロゲン原子、ヒドロキシ、アミノ、ニトロ、シアノ、ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-アミノ、 C_{6-14} アリール、モノー又はジ- C_{6-14} アリール-アミノ、 C_{3-8} シクロアルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルコキシ- C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルキルスルファニル、 C_{1-6} アルキルスルフィニル、 C_{1-6} アルキルスルホニル、エステル化されていてもよいカルボキシル、カルバモイル、チオカルバモイル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル、モノー又はジ- C_{6-14}

₄ アリール-カルバモイル、スルファモイル、モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-スルファモイル及びモノー又はジ- C_{6-14} アリール-スルファモイルから選ばれる 1 ないし 3 個の置換基で置換されていてもよい C_{7-14} アラルキルオキシ；

(35) C_{1-6} アルキル-カルボニルオキシ；

(36) C_{1-6} アルコキシ-カルボニル；

(37) モノー又はジ- C_{1-6} アルキル-カルボニルアミノ；

(38) モノー又はジ- C_{1-6} アルコキシ-カルボニルアミノ；

(39) モノー又はジ- C_{6-14} アリールオキシ-カルボニルアミノ；

(40) モノー又はジ- C_{7-14} アラルキルオキシ-カルボニルアミノ；

(41) トリ C_{1-6} アルキルシリルオキシ；

などから選ばれる 1 ないし 5 個の置換基をそれぞれ置換可能な位置に有していてもよい、「 C_{1-12} アルキル基」、「 C_{2-12} アルケニル基」、「 C_{2-12} アルキニル基」、「 C_{1-6} アルキレン基」が挙げられる。置換基が複数存在する場合、各置換基は同一でも異なってもよい。

[0035] 本明細書中、「置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル基」、「置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルケニル基」、「置換されていてもよい C_{7-14} アラルキル基」、「置換されていてもよい C_{6-14} アリール基」、「置換されていてもよい複素環基」としては、例えば、

[置換基群 B]

(1) 置換基群 A；

(2) 置換されていてもよい C_{1-6} アルキル；

(3) 置換されていてもよい C_{2-6} アルケニル；

(4) 置換されていてもよい C_{2-6} アルキニル；

などから選ばれる 1 ないし 5 個の置換基をそれぞれ置換可能な位置に有していてもよい、「 C_{3-8} シクロアルキル基」、「 C_{3-8} シクロアルケニル基」、「 C_{7-14} アラルキル基」、「 C_{6-14} アリール基」、「複素環基」が挙げられる。置換基が複数存在する場合、各置換基は同一でも異なってもよい。

[0036] 置換基B群中の、「置換されていてもよいC₁₋₆アルキル」、「置換されていてもよいC₂₋₆アルケニル」、「置換されていてもよいC₂₋₆アルキニル基」の置換基としては、例えば、上記置換基A群から選択される置換基が挙げられる。当該置換基の数は、1個～置換可能な最大数、より好ましくは1～3個である。

[0037] 以下、式(1)中の各記号の定義について詳述する。

R¹は、置換基を示す。

R¹は、好ましくは、置換されていてもよいC₁₋₁₂アルキル基、または置換されていてもよいC₁₋₁₂アルコキシ基である。

R¹は、より好ましくは、

(1) ヒドロキシ基、

(2) ホルミル基、

(3) C₁₋₆アルキル-アミノカルボニル基(例、エチルアミノカルボニル)、および

(4) ヒドロキシ-C₁₋₆アルコキシ基(例、ヒドロキシエトキシ)

から選択される1ないし3個の置換基で置換されていてもよいC₁₋₆アルキル(例、メチル、エチル、プロピル)

である。

[0038] R²およびR³は、それぞれ、置換されていてもよい炭化水素基、または置換されていてもよい複素環基を示す。

R²およびR³は、好ましくは、C₁₋₁₂アルキル基である。

R²およびR³は、より好ましくは、C₁₋₆アルキル基(例、メチル、エチル、プロピル)である。

[0039] Yは、置換基を示す。

nは、0～3の整数を示す。

nは、好ましくは0である。

[0040] Zは、単結合、-O-、-S-、-SO-、-SO₂-、または-NR⁴- (R⁴は、水素原子または置換基を示す。)を示す。

Zは、好ましくは、単結合または—O—である。

[0041] Aは、置換されていてもよいC₁₋₆アルキレン基を示す。

Aは、好ましくは、メチレンである。

[0042] 本明細書中で説明される基、置換基などの好ましい例は、より好ましくは、組み合わせて用いられる。

[0043] 好適な化合物（I）としては、以下の化合物が挙げられる。

[化合物A]

R¹が、

（1）ヒドロキシ基、

（2）ホルミル基、

（3）C₁₋₆アルキル—アミノカルボニル基（例、エチルアミノカルボニル）、および

（4）ヒドロキシ—C₁₋₆アルコキシ基（例、ヒドロキシエトキシ）

から選択される1ないし3個の置換基で置換されていてもよいC₁₋₆アルキル（例、メチル、エチル、プロピル）であり、

R²およびR³が、C₁₋₆アルキル基（例、メチル、エチル、プロピル）であり、

nが0であり、

Zが、単結合または—O—であり、および

Aが、メチレン基

である化合物またはその塩。

[0044] 上記化合物（I）の具体例としては、実施例1～9の化合物が挙げられる。

[0045] 化合物（I）のうち、塩としては、例えば、金属塩、アンモニウム塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩等が挙げられる。金属塩の好適な例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩等が挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えば、ト

リメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン等との塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等との塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等との塩が挙げられる。

[0046] 次に、本発明の化合物(1)もしくはその塩の製造法について説明する。

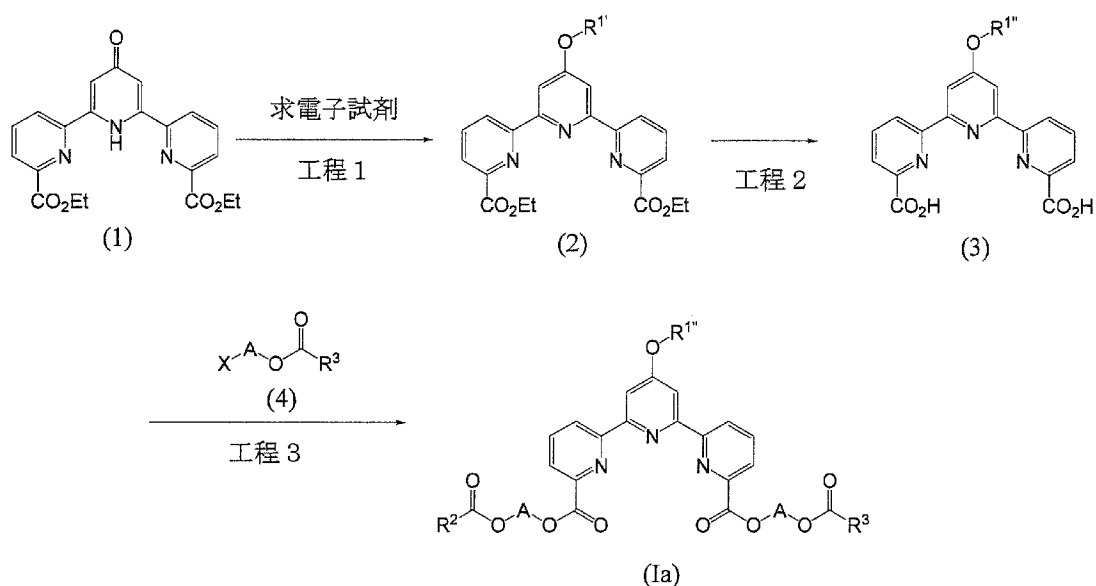
なお、以下の製造法において得られる製造中間体は、精製せずに次の反応に用いることもできるが、反応混合物からクロマトグラフィー、再結晶等の公知の手法により単離、精製して用いてもよい。

[0047] 本発明の化合物(1)は、例えば下記A法およびB法を用いて製造することができる。

化合物(1)中、R¹がアルコキシ基である式(1a)で表される化合物またはその塩(以下、化合物(1a)ともいう)は、以下のA法またはこれに準ずる方法により製造することができる。

[A法]

[0048] [化2]



[0049] [式中、 $R^{1'}$ および $R^{1''}$ は、それぞれ置換されていてもよい C_{1-12} アルキル基を示し、 X はハロゲン原子を示し、 A は上記と同意義を示す。 R^2 および R^3 は上記と同意義を示し、かつ、同一である。]

X は、好ましくは、塩素原子である。

(工程 1)

アルカリ金属水素化物に、ジエチル $1'$, $H-[2, 2' : 6', 2'']$ テルピリジン- $4'$ -オキソ- $6, 6''$ -ジカルボキシラート (以下、化合物 (1) ともいう) を加えた後、求電子試剤を反応させることにより O -置換- $2, 2' : 6', 2''$ -テルピリジン- $6, 6''$ -ジカルボキシラート (以下、化合物 (2) ともいう) を製造する。

化合物 1 は、公知の方法 (P. Kadjane, C. Plata-Iglesias, R. Ziesel, L. J. Charbonniere, Dalton Trans. 2009, 5688-5700) またはそれに準ずる方法で製造することができる。

アルカリ金属水素化物としては、例えば、水素化ナトリウム、水素化カリウムなどが挙げられる。

求電子試剤としては、例えば、ヨウ化メチル、臭化エチルなどが挙げられる。

求電子試剤の使用量は、化合物 (1) 1 モルに対して、通常約 1 ~ 3 モル、好ましくは約 1 ~ 2 モルである。

本工程は、反応に悪影響を及ぼさない溶媒中で行われる。

反応に悪影響を及ぼさない溶媒としては、例えば、ジメチルホルムアミド、THF、ジエチルエーテル等が挙げられる。

反応温度は、通常約 0 ~ 100 °C、好ましくは約 20 ~ 50 °C である。

反応時間は、通常約 2 ~ 48 時間、好ましくは約 12 ~ 24 時間である。

(工程 2)

化合物 (2) と塩基の混合物を攪拌した後、酸で反応混合物の pH を調整することにより、 $4'$ -置換- $2, 2' : 6', 2''$ -テルピリジン- $6,$

6”-ジカルボン酸（以下、化合物（3）ともいう）を製造する。

塩基としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等が挙げられる。

塩基の使用量は、化合物（2）1モルに対して、通常約2～10モル、好ましくは約3～5モルである。

酸としては、例えば、塩酸、酢酸が挙げられる。

pHは、通常約2～5、好ましくは約3～4である。

反応温度は、通常約0～100℃、好ましくは約20～40℃である。

反応時間は、通常約10～48時間、好ましくは約12～36時間である。

（工程3）

塩基の存在下、化合物（3）と式（4）で表されるハロアルキルアルコキシラート誘導体（以下、化合物（4）ともいう）を反応させることにより、化合物（1a）を製造する。

塩基としては、例えば、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N，N-ジメチル-4-アミノピリジン等が挙げられる。

塩基の使用量は、化合物（3）1モルに対して、通常約2～10モル、好ましくは約2～4モルである。

化合物（4）は、市販品を使用してもよく、あるいは公知の方法により対応する原料化合物から製造することもできる。

化合物（4）の使用量は、化合物（3）1モルに対して、通常約2～6モル、好ましくは約2～4モルである。

本工程は、反応に悪影響を及ぼさない溶媒中で行われる。

反応に悪影響を及ぼさない溶媒としては、例えば、ジメチルホルムアミド、THF等が挙げられる。

反応温度は、通常約0～100℃、好ましくは約40～60℃である。

反応時間は、通常約12～48時間、好ましくは約12～36時間である。

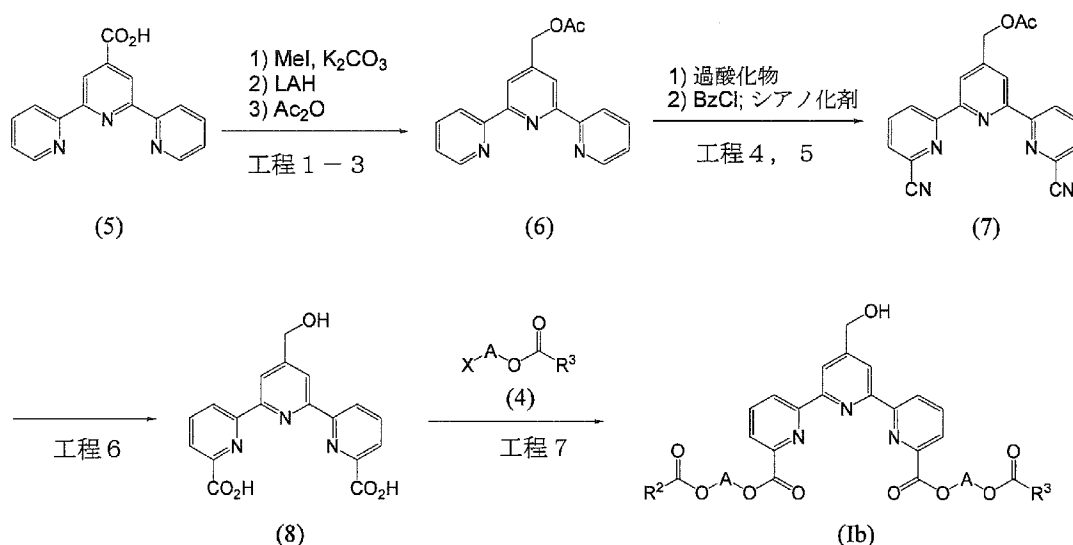
[0050] 上記A法により得られる化合物(1)、化合物(2)および化合物(3)は、種々のアシル化反応、アルキル化反応、アミド化反応、酸化反応、還元反応、加水分解反応、脱水反応等の公知の反応に付すことにより、さらに誘導体化することもできる。このような反応は、それ自体公知の方法またはそれに準じて行うことができる。

また、化合物(1)、化合物(2)および化合物(3)がヒドロキシ基等の官能基を有する場合、適宜保護して反応を行うことができる。このような保護基および保護・脱保護反応は、公知の保護基および方法(例えば、Wiley-Interscience社1999年刊「Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed.」(Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts著))に準じて行うことができる。

[0051] 化合物(1)中、 R^1 がヒドロキシメチル基である式(1b)で表される化合物またはその塩(以下、化合物(1b)ともいう)は、以下のB法またはこれに準ずる方法により製造することができる。

[B法]

[0052] [化3]



[0053] [式中、AおよびXは上記と同意義を示す。 R^2 および R^3 は上記と同意義を示し、かつ、同一である。]

Xは、好ましくは、塩素原子である。

[0054] (工程1)

式(5)で表される2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-4'-カルボン酸(以下、化合物(5)ともいう)、炭酸カリウムおよびヨウ化メチルを反応させ、化合物(5)のメチルエステル体を製造する。

炭酸カリウムの使用量は、化合物(5) 1モルに対して、通常約1～5モル、好ましくは約2～3モルである。

ヨウ化メチルの使用量は、化合物(5) 1モルに対して、通常約1～5モル、好ましくは約1～2モルである。

本工程は、反応に悪影響を及ぼさない溶媒中で行われる。

反応に悪影響を及ぼさない溶媒としては、例えば、ジメチルホルムアミド、THF等が挙げられる。

反応温度は、通常約0～100℃、好ましくは約20～40℃である。

反応時間は、通常約2～48時間、好ましくは約12～24時間である。

(工程2)

化合物(5)のメチルエステル体を水素化アルミニウムリチウムで還元し、化合物(5)のヒドロキシメチル体を製造する。

水素化アルミニウムリチウムの使用量は、化合物(5) 1モルに対して、通常約1～3モル、好ましくは約1～2モルである。

本工程は、反応に悪影響を及ぼさない溶媒中で行われる。

反応に悪影響を及ぼさない溶媒としては、例えば、THF、ジエチルエーテル等が挙げられる。

反応温度は、通常約-20～50℃、好ましくは約0～20℃である。

反応時間は、通常約1～12時間、好ましくは約3～5時間である。

(工程3)

化合物(5)のヒドロキシメチル体をピリジンに溶解し、無水酢酸と反応させることにより、式(6)で表される2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-4'-イルメチル アセテート(以下、化合物(6)ともいう)を製造

する。

ピリジンの使用量は、化合物（５）１モルに対して、通常約１～１０Ｌ、好ましくは約２～５Ｌである。

無水酢酸の使用量は、化合物（５）１モルに対して、通常約１～１０モル、好ましくは約１～２モルである。

反応温度は、通常約０～１００℃、好ましくは約２０～４０℃である。

反応時間は、通常約２～４８時間、好ましくは約１２～２４時間である。

（工程４）

化合物（６）と過酸化物を反応させることにより化合物（６）のピリジンオキシドを製造する。

本工程は、反応に悪影響を及ぼさない溶媒中で行われる。

反応に悪影響を及ぼさない溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、１，２－ジクロロエタン、クロロベンゼン等が挙げられる。

反応温度は、通常約－２０～５０℃、好ましくは約０～２０℃である。

反応時間は、通常約２～４８時間、好ましくは約１２～２４時間である。

（工程５）

化合物（６）のピリジンオキシドとベンゾイルクロリドを反応させ、次いでシアノ化剤を反応させることにより、式（７）で表される（６，６”－ジシアノ－２，２’：６’，２”－テルピリジン－４’－イル）メチル アセテート（以下、化合物（７）ともいう）を製造する。

本工程は、反応に悪影響を及ぼさない溶媒中で行われる。

反応に悪影響を及ぼさない溶媒としては、例えばジクロロメタン等が挙げられる。

ベンゾイルクロリドの使用量は化合物（６）１モルに対して、通常２～１０モル、好ましくは約４～５モルである。

シアノ化剤としては、トリメチルシリルシアニド等が挙げられる。

シアノ化剤の使用量は化合物（６）１モルに対して、通常２～１０モル、

好ましくは約4～5モルである。

反応温度は、通常約0～100℃、好ましくは約20～40℃である。

反応時間は、通常約2～48時間、好ましくは約12～24時間である。

(工程6)

化合物(7)をアルカリ加水分解に付すことにより、式(8)で表される4'-(ヒドロキシメチル)-2,2':6',2''-テルピリジン-6,6''-ジカルボン酸(以下、化合物(8)ともいう)を製造する。

本工程は上記A法の工程2と同様に行うことができる。

(工程7)

塩基の存在下、化合物(8)と化合物(4)を反応させることにより、化合物(1b)を製造する。

本工程は上記A法の工程3と同様に行うことができる。

[0055] 本発明の化合物は、細胞内におけるエステラーゼ分解後、ランタノイド元素と有機錯体を形成することができ、当該錯体の蛍光を測定することにより生細胞数を測定することができる。本発明の化合物によって測定できるものとしては、生細胞数に限定されるものではなく、例えば、細胞障害能、細胞増殖能が挙げられる。

次に、本発明の細胞障害能を測定する方法を説明する。

本発明の方法は、式(1)で表される化合物と細胞を混合する工程、およびランタノイド元素と錯体を形成し、蛍光を測定する工程を含む。

[0056] 本発明の方法における「細胞」としては、細胞障害能を持つ細胞であり、例えば、NK細胞、T細胞などの免疫細胞、白血病細胞などのがん細胞などが挙げられる。

本発明の方法における「ランタノイド元素」としては、例えば、ユーロピウム、サマリウム、テルビウムなどが挙げられる。好ましくは、ユーロピウムが用いられる。

本発明の方法における「界面活性剤」は、NP-40、トリトンX-100、ジギトニン、CHAPS等から適宜選択される。好ましくは、ジギトニ

ンである。

[0057] 上記蛍光は、例えば、時間分解蛍光測定により測定することができる。

本発明の細胞障害能を測定する方法は、従来の細胞障害アッセイと比べて感度がよいため、測定時間を短縮することができる。

[0058] 本発明の細胞障害能を測定する際、標識化合物の自然漏出量を検討する必要があるが、その方法として、例えば下記の方法が挙げられる。

1. RPMI 1640培地中、標的細胞を37℃、5%CO₂で終夜インキュベートする。

2. RPMI 1640培地中、 1×10^6 細胞/mLの濃度なるよう播種し、式(1)で表される化合物を終濃度が25 μMになるように加え、37℃、5%CO₂で15分間インキュベートする。

3. 用時調製した0.125%ジギトニンDMSO溶液を加え、よく混合した後、37℃、5%CO₂で15分間インキュベートする。

ここで、当該ジギトニンDMSO溶液は、ジギトニンをDMSOに溶解し、すぐに水を添加し、ジギトニン濃度が最終的に0.0625%になるように調製する。

4. よく混合し、遠心した後、Eu溶液250 μLを含むプレート（96ウェル、平底）に上清を移す。

5. 15分間静置した後、PHERAstarマイクロプレートリーダーにより時間分解蛍光を測定する。

実施例

[0059] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

全てのNMRデータは、Varian社のGemini 300、JEOL社のAL 400、Varian社の500PS分光器で測定された。1Hと13C NMRスペクトルは、内部標準物質としてテトラメチルシランか、(2, 2, 3, 3-D4)トリメチルシリル-3-プロピオン酸またはそのナトリウム塩(1H および 13C)を用いた溶媒ピーク

に対する100万分率 (ppm) で化学シフト (δ) として記した。化学シフト (δ) は、100万分率 (ppm) で記され、カップリング定数 (J) は、ヘルツ (Hz) 単位で記されている。多重度を記述するために次のような略語を使用している。

s = シングレット, d = ダブルレット, t = トリプレット, q = カルテット, quint. = クインテット, sext. = セクステット, sept. = セプテット, br = ブロード, m = マルチプレット

すべての反応は、マグネティックスターラーで攪拌され、不活性ガス雰囲気下で行われた。フラッシュカラムクロマトグラフィーは、Fujisilysia Chemical Ltd 社製の silica gel C60 (50–200 μ m)、あるいは CHROMATOREX DIOL (MB 100–40/75) で、実験の項で述べられているように溶出液システムを用いて行われた。TLC は、TLC Silic gel 60 F254 aluminium sheets (Merck 社) か、silica gel F254 glass plates (Merck 社) のどちらかを用いて行われた。

[0060] 実施例における略号の意味は以下の通りである。

NMR : 核磁気共鳴スペクトル

Hz : ヘルツ

J : カップリング定数

HRMS : 高分解能質量分析スペクトル

THF : テトラヒドロフラン

DMF : N, N-ジメチルホルムアミド

DMSO : ジメチルスルホキシド

DEA : ジイソプロピルエチルアミン

IPe : ジイソプロピルエーテル

TEA : トリエチルアミン

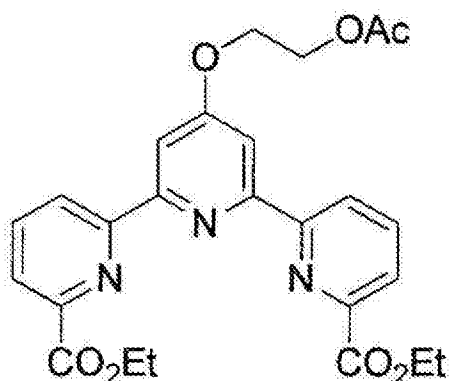
BATDA : ビス (アセトキシメチル) 2, 2' : 6', 2''-テルピリ

ジン-6, 6''-ジカルボキシラート

[0061] 実施例 1 :

ビス(ブチリロキシメチル) 4'-(2-ヒドロキシエトキシ)-2, 2'
': 6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシラート
(工程 1)

[0062] [化4]



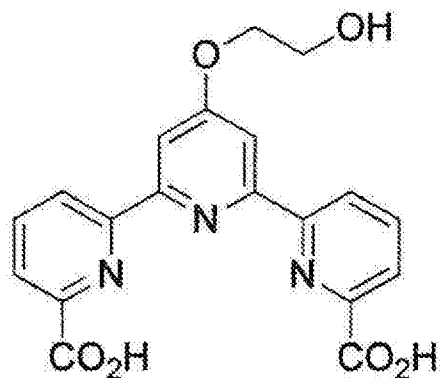
[0063] 上記A法工程1に記載の方法(2.5 mmol スケール)に従って、求電子試剤として2-アセトキシエチルブロミドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー(溶離液: 50% n-ヘキサン/酢酸エチル)で精製することにより、ジエチル 4'-(2-アセトキシエトキシ)-2, 2': 6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシラート(494 mg、収率41%)をオレンジ色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.48 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 2.14 (s, 3H), 4.49–4.54 (m, 4H), 4.52 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 8.00 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 8.16 (dd, $J = 1.0, 7.6$ Hz, 2H), 8.20 (s, 2H), 8.80 (dd, $J = 1.0, 7.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 14.3, 20.9, 61.8, 62.4, 66.1, 108.3, 124.3, 125.1, 137.7, 147.8, 156.0, 156.4, 165.2, 166.8, 170.9.

(工程 2)

[0064]

[化5]

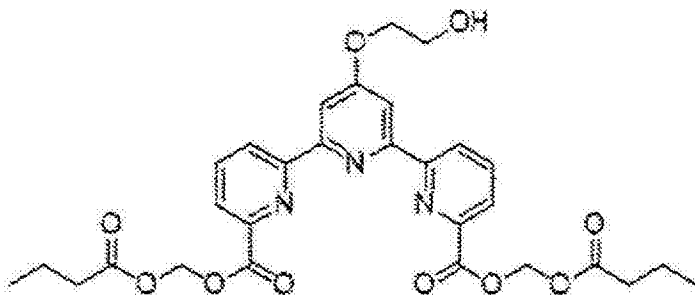


[0065] 上記A法工程2に記載の方法（0.8 mmol スケール）に従って、ジエチル 4'-(2-アセトキシエトキシ)-2,2':6',2''-テルピリジン-6,6''-ジカルボキシラートを用いて反応を行った。得られた粗生成物を減圧濃縮することにより、4'-(2-ヒドロキシエトキシ)-2,2':6',2''-テルピリジン-6,6''-ジカルボン酸（248 mg、収率 78%）を黄色固体として得た。得られた固体はさらに精製せず次の反応に用いた。

^1H NMR (500 MHz, d-DMSO) δ 3.84 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 4.32 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 8.16 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 8.19 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 8.24 (s, 2H), 8.84 (d, J = 7.6 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, d-DMSO) δ 59.4, 70.2, 107.9, 123.6, 124.8, 138.7, 154.3, 155.9, 166.3, 167.3.

(工程3)

[0066] [化6]



[0067] 上記A法工程3に記載の方法（0.39 mmol スケール）に従って、4'-(2-ヒドロキシエトキシ)-2,2':6',2''-テルピリジン

ン-6, 6''-ジカルボン酸およびブチリロキシメチルクロリドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー（溶離液：50% n-ヘキサン／酢酸エチル）で精製することにより、ビス（ブチリロキシメチル） 4' -（2-ヒドロキシエトキシ）-2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシラート（101 mg、収率45%）を黄色固体として得た。

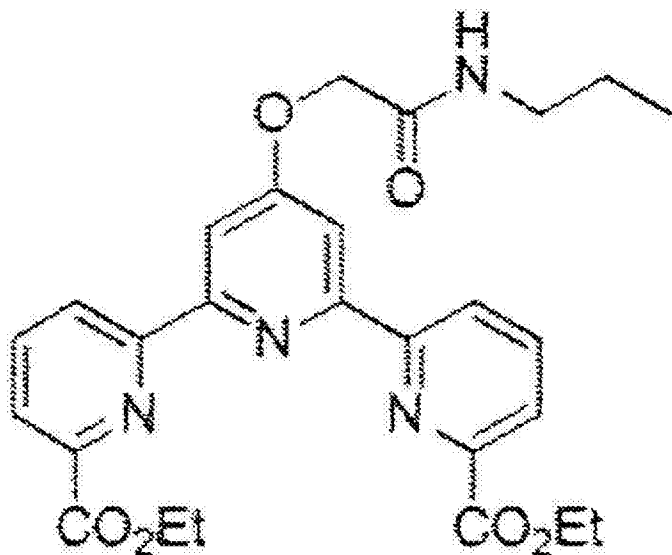
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H), 1.70 (sext. $J = 7.6$ Hz, 4H), 2.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 4.08 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.41 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 6.11 (s, 4H), 7.99 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 8.16 (dd, $J = 1.2, 7.6$ Hz, 2H), 8.18 (s, 2H), 8.78 (dd, $J = 1.0, 7.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 13.5, 18.1, 35.8, 61.1, 69.6, 80.1, 108.5, 124.9, 125.6, 137.8, 146.3, 156.0, 156.2, 163.9, 167.1, 172.3.

[0068] 実施例2：

ビス（アセトキシメチル） 4' -（2-オキソ-2-（プロピルアミノ）エトキシ）-2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシラート

（工程1）

[0069] [化7]

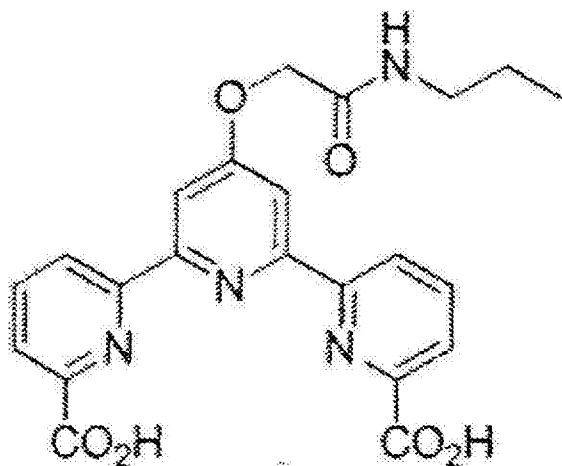


[0070] 上記A法工程1に記載の方法（1.0 mmol スケール）に従って、求電子試剤として2-オキソ-2-（プロピルアミノ）エトキシメチルブロミドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー（溶離液：50% n-ヘキサン／酢酸エチル）で精製することにより、ジエチル 4'-（2-オキソ-2-（プロピルアミノ）エトキシ）-2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシレート（342 mg、収率70%）を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.99 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.50 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H), 1.65 (sext. $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.38 (q, $J = 7.9$ Hz, 2H), 4.53 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H), 6.76 (br. t, NH), 8.01 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 8.17 (dd, $J = 1.0, 7.6$ Hz, 2H), 8.22 (s, 2H), 8.79 (dd, $J = 1.0, 7.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 11.3, 14.3, 22.8, 40.9, 61.9, 66.8, 108.2, 124.3, 125.3, 137.8, 147.8, 155.6, 156.7, 165.1, 165.3, 166.9.

（工程2）

[0071] [化8]



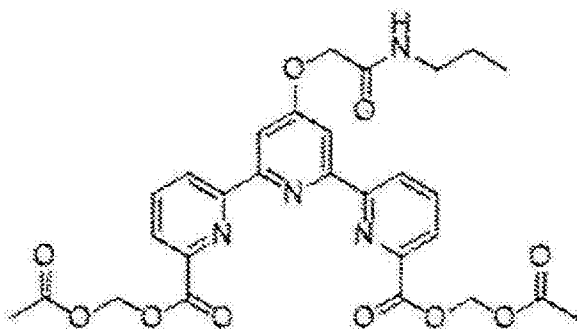
[0072] 上記A法工程2に記載の方法（0.6 mmol スケール）に従って、ジエチル 4'-（2-オキソ-2-（プロピルアミノ）エトキシ）-2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシレートを用いて反応を行うことにより、4'-（2-オキソ-2-（プロピルアミノ）エトキシ）-2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボン酸（

210 mg、収率79%)を薄黄色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, d-DMSO) δ 0.84 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 1.48 (sext. J = 7.1 Hz, 2H), 3.13 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 4.82 (s, 2H), 8.15 (dd, J = 1.2, 7.8 Hz, 2H), 8.20 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 8.25 (s, 2H), 8.37 (br. t, J = 5.9 Hz, NH), 8.86 (dd, J = 1.2, 7.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, d-DMSO) δ 11.4, 22.4, 40.2, 66.9, 108.1, 124.2, 125.2, 138.9, 147.9, 154.6, 155.8, 165.9, 166.2, 166.6.

(工程3)

[0073] [化9]



[0074] 上記A法工程3に記載の方法(0.14 mmol スケール)に従って、4'-(2-オキソ-2-(プロピルアミノ)エトキシ)-2,2':6',2''-テルピリジン-6,6''-ジカルボン酸およびアセトキシメチルクロリドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーで精製することにより、ビス(アセトキシメチル) 4'-(2-オキソ-2-(プロピルアミノ)エトキシ)-2,2':6',2''-テルピリジン-6,6''-ジカルボキシレート(78 mg、収率98%)を白色固体として得た。

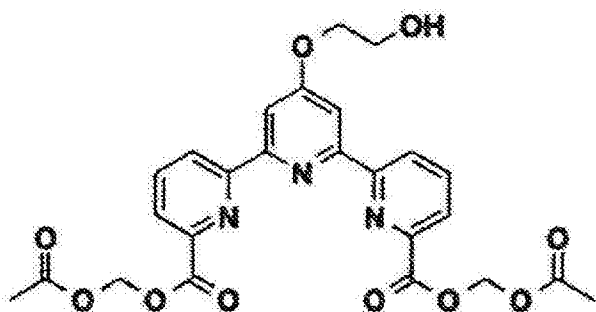
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.00 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 1.67 (sext, J = 7.4 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H), 3.40 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 4.79 (s, 2H), 6.11 (s, 4H), 6.78 (br. t, J = 5.6 Hz, NH), 8.03 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 8.20 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 8.22 (s, 2H), 8.82 (d, J = 7.6 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 11.4, 20.8, 22.8, 40.9, 66.9, 80.3, 108.4, 125.0

, 125.9, 138.0, 146.5, 155.9, 156.5, 163.8, 165.4, 166.8, 169.6.

[0075] 実施例 3 :

ビス(アセトキシメチル) 4' - (2-ヒドロキシエトキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボキシラート
(工程 1)

[0076] [化10]



[0077] 上記A法工程3に記載の方法(0.05 mmol スケール)に従って、4' - (2-ヒドロキシエトキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボン酸およびアセトキシメチルクロリドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をプレパラティブTLC(溶離液:クロロホルム:アセトン=4:1)で精製することにより、標題化合物(12mg、収率47%)を白色固体として得た。

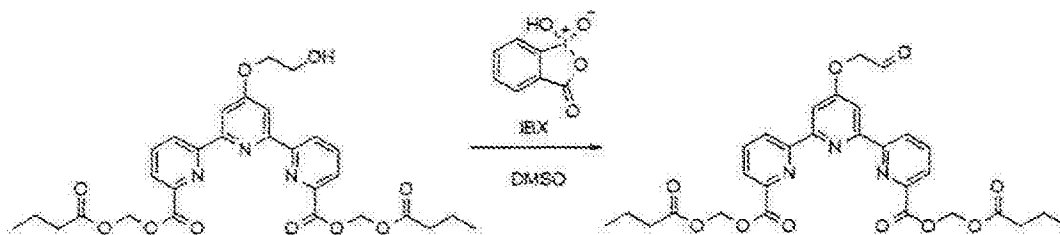
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.18 (s, 6H), 4.07-4.10 (m, 2H), 4.42 (t, J = 4.5 Hz, 2H), 6.11 (s, 4H), 8.01 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 8.18 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.21 (s, 2H), 8.81 (d, J = 8.0 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 20.8, 61.1, 65.6, 80.2, 108.5, 124.9, 125.7, 137.9, 146.4, 156.1, 156.3, 163.9, 165.5, 169.6.

[0078] 実施例 4 :

ビス(ブチロキシメチル) 4' - (2-オキシエトキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボキシラート
(工程 1)

[0079]

[化11]



[0080] 2-ヨードキシ安息香酸 (60 mg, 0.21 mmol) の DMSO (2 mL) 懸濁液に、ビス (ブチリロキシメチル) 4' - (2-ヒドロキシエトキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボキシラート (25 mg, 0.04 mmol) を室温に加え、24時間攪拌した。水で反応をクエンチし、有機層を分離し、水層を酢酸エチル (2 × 10 mL) で抽出した。有機層を合わせ、食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。ろ過した後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: 酢酸エチル) で精製することにより、標題化合物 (19 mg、収率 74%) を白色固体として得た。

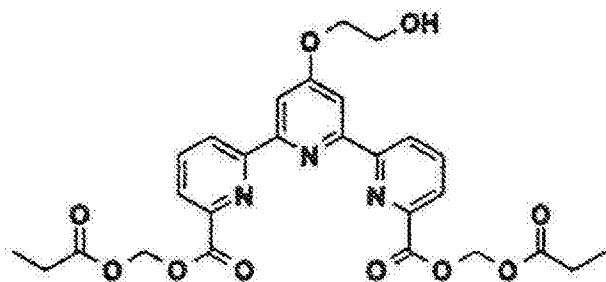
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H), 1.71 (sext, $J = 7.3$ Hz, 4H), 2.42 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 4.93 (s, 2H), 6.12 (s, 4H), 8.02 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.18–8.21 (m, 4H), 8.81 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 9.96 (s, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 13.5, 18.1, 35.8, 72.4, 80.1, 108.3, 124.9, 125.8, 137.9, 146.4, 163.8, 172.3, 172.5, 197.0.

[0081] 実施例 5 :

ビス (プロピオニルオキシメチル) 4' - (2-ヒドロキシエトキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボキシラート (工程 1)

[0082]

[化12]



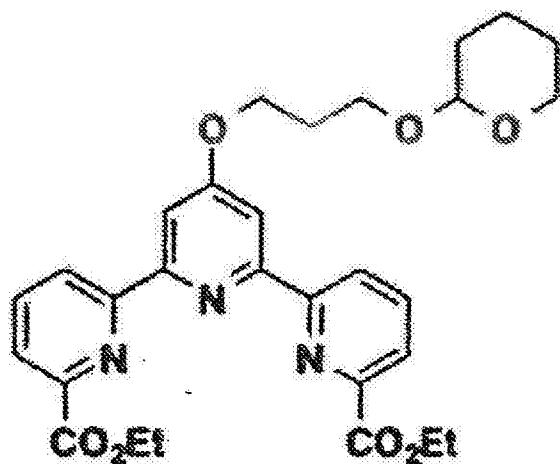
[0083] 上記A法工程3に記載の方法（0.05 mmol スケール）に従って、4' - (2-ヒドロキシエトキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボン酸およびプロピオニルオキシメチルクロリドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をプレパラティブTLC（溶離液：クロロホルム：アセトン＝2：1）で精製することにより、標題化合物（4 mg、収率13%）を白色固体として得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.19 (t, J = 8.0 Hz, 6H), 2.46 (q, J = 8.0 Hz, 4H), 4.07-4.10 (m, 2H), 4.41 (t, J = 4.5 Hz, 2H), 6.12 (s, 4H), 8.01 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 8.18 (dd, J = 1.0, 7.5 Hz, 2H), 8.21 (s, 2H), 8.82 (dd, J = 1.0, 7.5 Hz, 2H).

[0084] 実施例6：

ビス（ブチロキシメチル） 4' - (3-ヒドロキシプロポキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボキシラート
（工程1）

[0085] [化13]

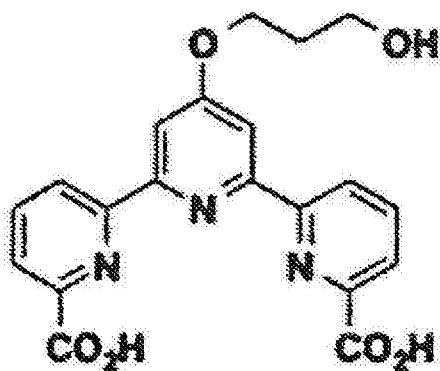


[0086] 上記A法工程1に記載の方法（0.5 mmol スケール）に従って、求電子試剤として3-（（テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル）オキシ）プロピルブロミドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー（溶離液：ヘキサン：酢酸エチル＝2：1～1：1）で精製することにより、ジエチル 4'-（3-（（テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル）オキシ）プロポキシ）-2, 2'：6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシラート（110 mg、収率40%）を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.49 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H), 1.52-1.63 (m, 4H), 1.70-1.76 (m, 1H), 1.80-1.89 (m, 1H), 2.18 (quint., $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.50-3.54 (m, 1H), 3.63-3.67 (m, 1H), 3.85-3.90 (m, 1H), 3.98-4.02 (m, 1H), 4.37-4.44 (m, 2H), 4.51 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H), 4.63 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 7.98 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 8.14 (dd, $J = 1.0, 8.0$ Hz, 2H), 8.17 (s, 2H), 8.78 (dd, $J = 1.0, 8.0$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 14.3, 19.6, 25.4, 29.5, 30.6, 61.8, 62.3, 63.7, 65.2, 99.0, 108.3, 124.3, 125.0, 137.6, 147.7, 156.2, 156.2, 165.3, 167.3.

(工程2)

[0087] [化14]



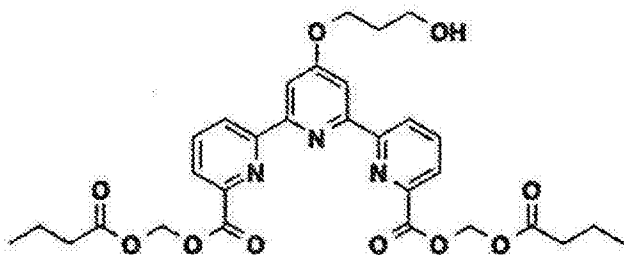
[0088] 上記A法工程2に記載の方法（0.20 mmol スケール）に従って、ジエチル 4'-（3-（（テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル）オキシ）プロポキシ）-2, 2'：6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシラートを用いて反応を行うことにより、4'-（3-ヒドロキシ

プロポキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボン酸 (61 mg、収率 77%) を黄色固体として得た。得られた固体はさらに精製せず次の反応に用いた。

^1H NMR (500 MHz, d-DMSO) δ 1.93–1.99 (m, 2H), 3.62 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.33 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 8.11–8.19 (m, 6H), 8.78–8.84 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, d-DMSO) δ 32.0, 57.2, 65.6, 108.0, 124.3, 125.3, 139.0, 147.9, 154.6, 155.6, 165.9, 167.4.

(工程 3)

[0089] [化15]



[0090] 上記 A 法工程 3 に記載の方法 (0.05 mmol スケール) に従って、4' - (3 - ヒドロキシプロポキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボン酸およびブチリルオキシメチルクロリドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をプレパラティブ TLC (溶離液 : ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) で精製することにより、ビス (ブチリロキシメチル) 4' - (3 - ヒドロキシプロポキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボキシラート (15 mg、収率 51%) を白色固体として得た。

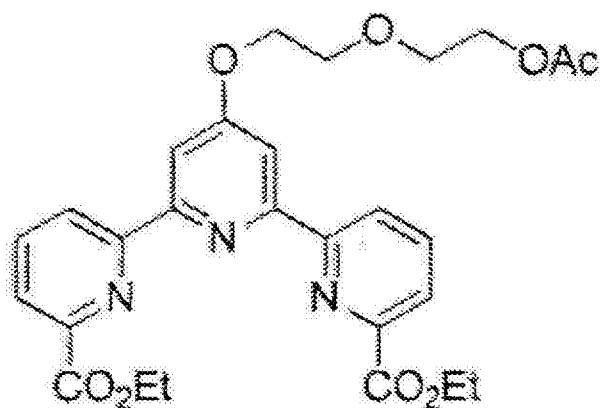
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.98 (t, J = 7.5 Hz, 6H), 1.71 (sext., J = 7.5 Hz, 4H), 2.16 (quint., J = 6.0 Hz, 2H), 2.41 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 3.93 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.46 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 6.11 (s, 4H), 8.01 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 8.17 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.22 (s, 2H), 8.81 (d, J = 8.0 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 13.5, 18.1, 31.9, 35.8, 59.6, 65.7, 80.1, 108.6, 124.9, 125.6, 137.8, 146.4, 156.1, 156.4, 163.9, 167.3, 172.4.

[0091] 実施例 7 :

ビス(ブチリロキシメチル) 4' - (2 - (2 - ヒドロキシエトキシ) エトキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボキシラート

(工程 1)

[0092] [化16]



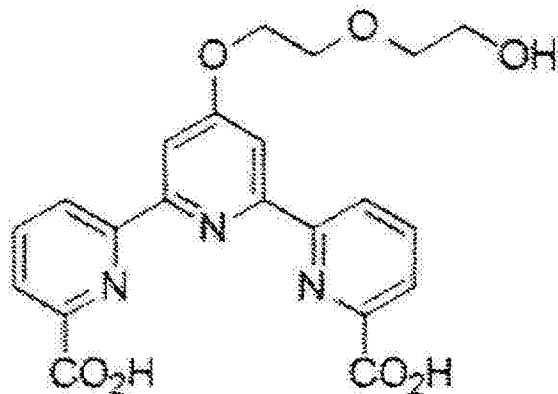
[0093] 上記 A 法工程 1 に記載の方法 (1.3 mmol スケール) に従って、求電子試剤として 2 - (2 - アセトキシエトキシ) エチルブロミドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶離液: 50% n-ヘキサン/酢酸エチル) で精製することにより、ジエチル 4' - (2 - (2 - アセトキシエトキシ) エトキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボキシラート (60 mg、収率 9%) をオレンジ色固体として得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.49 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 2.08 (s, 3H), 3.81–3.83 (m, 2H), 3.96–3.98 (m, 2H), 4.27 (t, $J = 3.5$ Hz, 2H), 4.43–4.46 (m, 2H), 4.50 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 7.98 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 8.13 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 8.19 (s, 2H), 8.87 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 14.2, 20.8, 61.8, 63.5, 67.6, 69.3, 108.4, 124.4, 125.1, 137.7, 147.8, 156.2, 156.4, 165.4, 167.1, 171.1.

(工程 2)

[0094]

[化17]

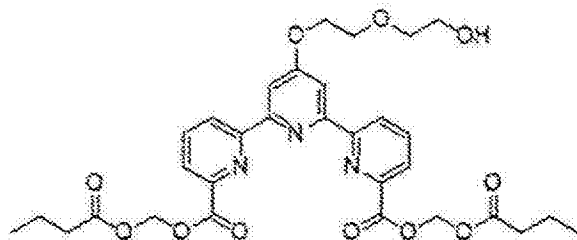


[0095] 上記A法工程2に記載の方法（0.1 mmol スケール）に従って、ジエチル 4' - (2 - (2 - アセトキシエトキシ) エトキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボキシラートを用いて反応を行い、減圧濃縮することにより、4' - (2 - (2 - ヒドロキシエトキシ) エトキシ) - 2, 2' : 6', 2'' - テルピリジン - 6, 6'' - ジカルボン酸（30 mg、収率 > 90%）を白色固体として得た。得られた固体はさらに精製せず次の反応に用いた。

^1H NMR (500 MHz, d-DMSO) δ 3.55 (m, 4H), 3.87 (t, J = 4.2 Hz, 2H), 4.44 (t, J = 3.9 Hz, 2H), 8.15 (dt, J = 1.3, 7.6 Hz, 2H), 8.20 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 8.26 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 8.86 (ddd, J = 1.3, 2.4, 7.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, d-DMSO) δ 60.7, 68.4, 69.1, 73.0, 108.5, 124.7, 125.6, 139.4, 148.2, 166.3, 167.5.

(工程3)

[0096] [化18]



[0097] 上記A法工程3に記載の方法（0.07 mmol スケール）に従って、4' - (2 - (2 - ヒドロキシエトキシ) エトキシ) - 2, 2' : 6',

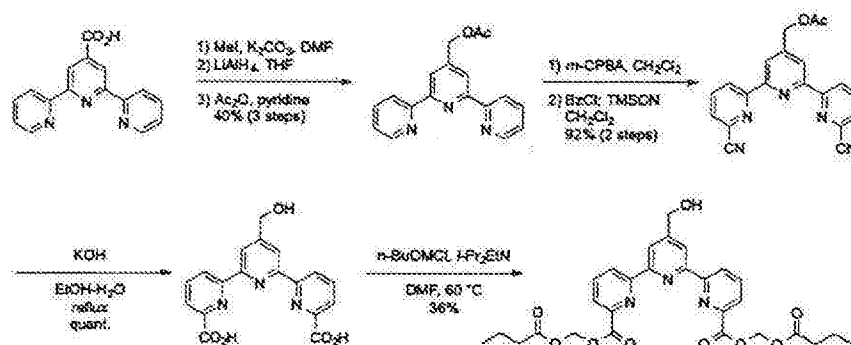
2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボン酸およびブチリロキシメチルクロリドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー（溶離液：酢酸エチル）で精製することにより、ビス（ブチリロキシメチル） 4' -（2-（2-ヒドロキシエトキシ）エトキシ）-2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシラート（21 mg、収率56%）を薄黄色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.98 (t, $J = 7.6$ Hz, 6H), 1.71 (sext. $J = 7.6$ Hz, 4H), 2.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H), 3.72 (dd, $J = 3.9, 5.6$ Hz, 2H), 3.80 (dd, $J = 4.2, 4.9$ Hz, 2H), 3.97–3.99 (m, 2H), 4.47–4.49 (m, 2H), 6.11 (s, 4H), 8.00 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 8.17 (dd, $J = 1.0, 7.8$ Hz, 2H), 8.24 (s, 2H), 8.81 (dd, $J = 1.0, 7.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 13.5, 18.1, 35.8, 61.2, 67.7, 69.6, 72.7, 80.1, 108.7, 124.9, 125.6, 137.8, 146.4, 156.0, 156.4, 163.9, 167.2, 172.3.

[0098] 実施例 8 :

ビス（ブチリロキシメチル） 4' -（ヒドロキシメチル）-2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボキシラート

[0099] [化19]



[0100] (工程 1)

2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-4'-カルボン酸（200 mg, 0.72 mmol）のDMF（3.6 mL）溶液に、炭酸カリウム（20 mg, 1.4 mmol）およびヨウ化メチル（0.07 mL, 1.1 mmol）を加え、反応混合物を室温で16時間攪拌した。反応混

合物に食塩水を加え、水層を酢酸エチル（3×5.0 mL）で抽出し、抽出液を食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。混合物をろ過し、減圧濃縮することにより、粗生成物を得た。得られた粗生成物は精製せずに次の反応に用いた。粗生成物（0.72 mmol）のテトラヒドロフラン（7.2 mL）溶液に、リチウム アルミニウム ヒドリド（28 mg, 0.7 mmol）を0℃で加えた。3時間攪拌した後、反応混合物に硫酸ナトリウム10水和物を加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物をセライトパッドでろ過し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をピリジン（3.6 mL）に溶解し、該溶液に無水酢酸（0.14 mL, 1.4 mmol）を加えた。16時間攪拌した後、混合物にトルエンを加え、減圧濃縮した。残渣をCHROMATOREX Diolシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：n-ヘキサン：酢酸エチル=1：0～1：1）で精製することにより、2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-4'-イルメチル アセテート（88 mg、収率40% 3工程）を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.20 (s, 3H), 5.28 (s, 2H), 7.32–7.35 (m, 2H), 7.85 (dt, $J = 2.0, 8.0$ Hz, 2H), 8.43 (s, 2H), 8.61 (td, $J = 1.0, 8.0$ Hz, 2H), 8.70–8.71 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 20.9, 64.8, 119.2, 121.3, 123.9, 136.8, 146.9, 149.1, 155.8, 155.8, 170.6.

(工程2)

2, 2' : 6', 2''-テルピリジン-4'-イルメチル アセテート（88 mg, 0.28 mmol）のジクロロメタン（2.8 mL）溶液に、m-クロロ過安息香酸（170 mg, 75%, 0.74 mmol）を0℃で加えた。19時間攪拌した後、混合物を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液（20 mL）で洗浄し、水層をクロロホルム（2×20 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、減圧濃縮した。残渣をジクロロメタン（2.8 mL）に溶解し、得られた溶液にベンゾイルクロリド（0.10 mL, 0.86 mmol）を室温で加えた。20分間

攪拌した後、トリメチルシリルシアニド（0.11 mL, 0.87 mmol）を滴下し、室温で19時間攪拌した。該溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（5.0 mL）を加え、分液した後、水層をクロロホルム（3×5.0 mL）で抽出した。合わせた有機層を食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：クロロホルム：酢酸エチル＝1：0～15：1）で精製することにより、（6, 6''-ジシアノ-2, 2'：6', 2''-テルピリジン-4'-イル）メチル アセテート（92 mg, 収率92%）を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.26 (s, 3H), 5.33 (s, 2H), 7.76 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 8.02 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 8.52 (s, 2H), 8.81 (d, J = 7.5 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ 20.9, 64.4, 117.2, 120.7, 124.3, 128.5, 133.4, 138.0, 148.1, 154.0, 157.0, 170.6.

（工程3）

（6, 6''-ジシアノ-2, 2'：6', 2''-テルピリジン-4'-イル）メチル アセテート（80 mg, 0.23 mmol）のエタノール（6.9 mL）溶液および蒸留水（1.8 mL）に水酸化カリウム（200 mg, 3.9 mmol）を加えた。反応混合物を11時間加熱還流した後、室温まで冷却した。1規定塩酸でpHを約4に調整し、析出物をろ取することにより、4'-（ヒドロキシメチル）-2, 2'：6', 2''-テルピリジン-6, 6''-ジカルボン酸を薄茶色固体として得た。得られた固体はさらに精製せずに次の反応に用いた。

^1H NMR (500 MHz, d-DMSO) δ 4.77 (s, 2H), 8.12 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 8.17 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 8.57 (s, 2H), 8.83 (d, J = 7.5 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, d-DMSO) δ 62.0, 124.0, 125.0, 138.8, 148.1, 154.0, 154.6, 155.2, 166.0.

（工程4）

4'-（ヒドロキシメチル）-2, 2'：6', 2''-テルピリジン-6

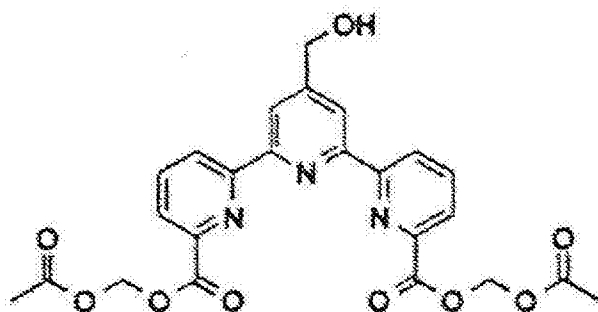
、6''-ジカルボン酸（18 mg, 0.05 mmol）のDMF（1.0 mL）溶液に、ジイソプロピルエチルアミン（0.05 mL, 0.29 mmol）およびクロロメチルブチラート（0.03 mL, 0.24 mmol）を加えた。反応混合物を50℃に加熱した。15時間攪拌した後、室温まで冷却し、混合物を飽和塩化アンモニウム水溶液（2.0 mL）で洗浄した。水層を酢酸エチル（3×5.0 mL）で抽出した。合わせた有機層を食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：n-ヘキサン：酢酸エチル＝2：1～1：1）で精製することにより、ビス（ブチリロキシメチル）4'－（ヒドロキシメチル）－2, 2'：6', 2''-テルピリジン－6, 6''-ジカルボキシラート（10 mg, 収率36%）を白色ろう状物質として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.98 (t, J = 7.5 Hz, 6H), 1.71 (sext., J = 8.0 Hz, 4H), 2.41 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 2.45 (brt, J = 6.0 Hz, 1H), 4.9 (br. d, J = 6.0 Hz, 2H), 6.12 (s, 4H), 8.01 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 8.17 (dd, J = 1.0, 7.5 Hz, 2H), 8.61 (s, 2H), 8.80 (dd, J = 1.0, 7.5 Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 13.5, 18.1, 35.8, 63.9, 80.2, 119.7, 124.9, 125.6, 137.9, 146.5, 152.6, 154.5, 156.5, 163.9, 172.3.

[0101] 実施例9：

ビス（アセトキシメチル）4'－（ヒドロキシメチル）－2, 2'：6', 2''-テルピリジン－6, 6''-ジカルボキシラート

[0102] [化20]



[0103] 上記A法工程3に記載の方法（0.05 mmol スケール）に従って、4' -（ヒドロキシメチル）- 2, 2' : 6' , 2'' -テルピリジン- 6, 6'' -ジカルボン酸およびアセトキシメチルクロリドを用いて反応を行った。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：ヘキサン：酢酸エチル＝2：1～1：3）で精製することにより、標題化合物（5.2 mg、収率20%）を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.18 (s, 6H), 4.96 (brs, 2H), 6.11 (s, 4H), 8.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 8.19 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 8.62 (s, 2H), 8.82 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 20.8, 63.9, 80.2, 119.7, 125.0, 125.7, 137.9, 138.9, 146.5, 154.6, 156.5, 169.6.

[0104] 実施例10：本発明化合物を用いた細胞障害能の測定（時間分解蛍光アッセイ（Euアッセイ：1）を行う際に、自然漏出量をモニターする必要があるが、その方法について下記に記す。）

30 mLのRPMI 1640培地中で、組織球腫U937細胞を、37℃、5% CO_2 条件下で一晩培養し、該培養液30 mLを50 mLのコニカルチューブに移し、細胞数を計測した。1700 rpm、4℃で5分間遠心し、上清を廃棄し、 1×10^6 cells/mLになるように細胞をRPMI 1640培地に再懸濁した。該細胞懸濁液1 mLを15 mLのコニカルチューブに移し、2.5 μL の式(I)で表される化合物またはその塩（10 mMの保存溶液）を加え（最終濃度：25 μM ）、37℃、5% CO_2 条件下で15分間インキュベートした。5 mLのRPMI 1640培地で細胞を3回洗浄した後、細胞を5 mLのRPMI 1640培地に再懸濁し、該細胞懸濁液2 mLを6 mLのRPMI 1640培地を含む15 mLのコニカルチューブに移し、細胞の濃度を 5×10^3 cells/100 μL とした。該細胞懸濁液100 μL を、96ウェル平底プレート（6つのウェル）に播種した。自然漏出量を決定するためのウェルには100 μL のRPMI 1640培地を、最大漏出量を決定するためのウェルには90 μL のRPMI 1640培地を加えた。該プレートを500 rpm、室温で2分間遠心した後、37℃、5% C

O₂条件下で30分間インキュベートした。新たに調製した19%DMSO中の0.125%ジギトニン溶液(3mgジギトニン、0.456mL DMSOおよび1.944mL H₂Oの混合溶液)10μLを、前記最大漏出量を決定するためのウェルにそれぞれ添加し、良く混合した後、さらに30分間インキュベートした。インキュベーション後、再度細胞懸濁液を良く混合し、1700rpm、室温で2分間遠心した。遠心後、上清25μLを慎重にとり、250μLのユーロピウム溶液を含む96ウェル平底プレートに移した後、そこから200μLの溶液を96ウェルNuncプレートに移した。該プレートを15分間静置した後、ARVOマルチプレートリーダーで時間分解蛍光を測定した。

上記の方法で測定した結果を下記表1に示す。

[0105] [表1]

化合物	自然漏出量 (A)	最大漏出量 (B)	自然漏出の 割合 (C) (100xA/B)	標識分子優位指数 (B/C)
実施例 1	6347	65576	9.7	6775
実施例 2	7085	60521	11.7	5170
実施例 3	4890	69372	7	9841
実施例 4	3590	43224	8.3	5204
実施例 5	6991	78831	8.9	8889
実施例 6	9538	103235	9.2	11174
実施例 7	6133	63594	9.6	6594
実施例 8	14441	199608	7.2	27590
実施例 9	21343	127955	16.7	7671
BATDA	14795	86785	17	5091

[0106] 実施例 11：本発明化合物を用いた細胞障害能の測定（時間分解蛍光アッセイ（Euアッセイ：1））

(1) ターゲット細胞の準備

30mLのRPMI 1640培地中で、HTLV-1に感染したHAM患者髄液由来の細胞株HCT-4細胞を、37℃、5%CO₂条件下で一晩培養し、RPMI 1640培地20mL中に細胞4.8×10⁶になるように、細胞を計測し0.24×10⁶cells/mLに調製した。1700rpm

、4℃で5分間遠心し、上清を廃棄し、 1×10^6 cells/mLになるように細胞を4.8 mLのRPMI 1640培地に再懸濁した。該細胞懸濁液を各1 mLずつ15 mLのコニカルチューブ2本（A-1、A-2）に移した。

（2）ターゲット細胞の準備

30 mLのRPMI 1640培地中で、ヒト慢性白血病由来細胞株K562細胞を、37℃、5%CO₂条件下で一晩培養し、RPMI 1640培地20 mL中に細胞 4.8×10^6 になるように、細胞数を計測し 0.24×10^6 cells/mLに調製した。1700 rpm、4℃で5分間遠心し、上清を廃棄し、 1×10^6 cells/mLになるように細胞を4.8 mLのRPMI 1640培地に再懸濁した。該細胞懸濁液を各1 mLずつ15 mLのコニカルチューブ3本（B-1、B-2、B-3）に移した。B-1に2.5 μLのDMSOを、B-2とB-3には、2.5 μLの10 mM実施例8の化合物を加えた。37℃で15分間静置した。5 mLのRPMI 1640培地で細胞を3回洗浄した後、1700 rpm、4℃で5分間遠心し、それぞれを5 mLのRPMI 1640培地に再懸濁し、該細胞懸濁液2 mLを6 mLのRPMI 1640培地を含む15 mLのコニカルチューブに移した。

（3）エフェクター細胞の準備

ヘルパーNK細胞 60×10^3 cellsを、12 mLのRPMI培養液に懸濁し、1700 rpm、4℃で5分間遠心し、上清を捨て、RPMI 1640培養液3 mLに再懸濁した。

以下、下記の濃度に調整したものを3 mLずつ準備した。

ヘルパーNK細胞濃度

エフェクター細胞／標的細胞比40	2×10^6 /mL
エフェクター細胞／標的細胞比20	1×10^6 /mL
エフェクター細胞／標的細胞比10	5×10^5 /mL
エフェクター細胞／標的細胞比5	2.5×10^5 /mL

エフェクター細胞／標的細胞比 2.5	$1.25 \times 10^4/\text{ml}$
エフェクター細胞／標的細胞比 1.25	$6.25 \times 10^3/\text{ml}$
エフェクター細胞／標的細胞比 0.625	$3.125 \times 10^3/\text{ml}$
エフェクター細胞／標的細胞比 0	0/ml (Cell concentration)
:	

上記濃度ヘルパーNK細胞懸濁液をそれぞれ100 μL 、また自然漏出量を決めるためにRPMI 1640培養液100 μL 、最大漏出量を決定するためにRPMI培養液90 μL を、96ウェル平底プレートに加えた。HCT-4細胞液、K562細胞液を96穴プレートに100 μL 加えた。

上記までの96穴プレートの配置は図1に示す通りである。該プレートを500 rpm、室温で2分間遠心した後、37℃で20分間インキュベートした。19%DMSO中の0.125%ジギトニン溶液（3mgジギトニン、0.456mL DMSOおよび1.944mL H_2O の混合溶液）を、新たに調製しその10 μL を、最大放出量を決定するためのウェルにそれぞれ添加し、良く混合した後、さらに20分間インキュベートした。インキュベーション後、再度細胞懸濁液を良く混合し、1700 rpm、室温で2分間遠心した。遠心後、上清25 μL を慎重にとり、250 μL のユーロピウム溶液を含む96ウェル平底プレートに移した後、そこから200 μL の溶液を96ウェルNuncプレートに移した。該プレートを15分間静置した後、ARVOマルチプレートリーダーで時間分解蛍光を測定した。

上記の方法で測定した結果を図2および図3に示す。

これにより、エフェクター細胞の細胞障害能の測定が可能であることが示された。

産業上の利用可能性

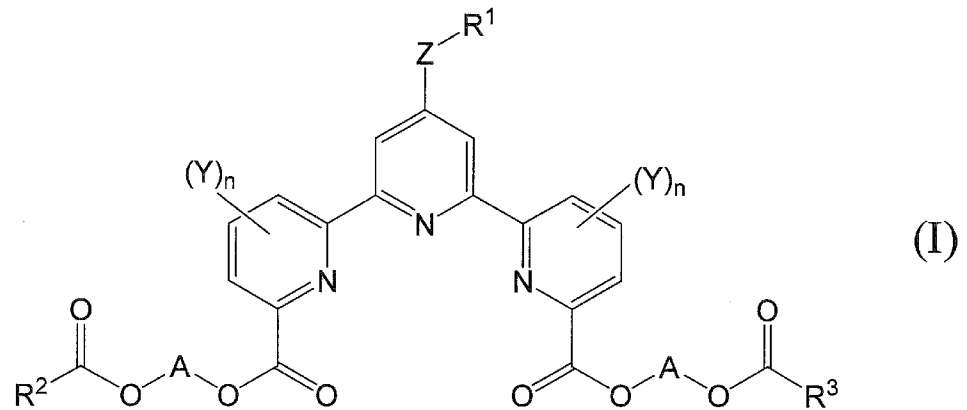
[0107] 本発明の化合物は、細胞障害能または細胞増殖能を測定するための試薬として有用である。また、当該試薬を用いて、細胞障害能または細胞増殖能を正確で再現性が高く、かつ、簡便で迅速に測定することができる。

本出願は、日本国で２０１４年３月３１日出願された特願２０１４－０
７３４７５を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含されるもの
である。

請求の範囲

[請求項1] 式 (I) :

[化1]



(式中、

R^1 は、置換基を示し、

R^2 および R^3 は、それぞれ、置換されていてもよい炭化水素基、または置換されていてもよい複素環基を示し、

Yは、置換基を示し、

nは、0～3の整数を示し、

Zは、単結合、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、または $-N$

R^4- (R^4 は、水素原子または置換基を示す。)を示し、

および

Aは、置換されていてもよい C_{1-6} アルキレン基を示す。)

で表される化合物またはその塩。

[請求項2] Aがメチレンである、請求項1に記載の化合物またはその塩。

[請求項3] 請求項1または2に記載の化合物またはその塩を含む、有機錯体形成剤。

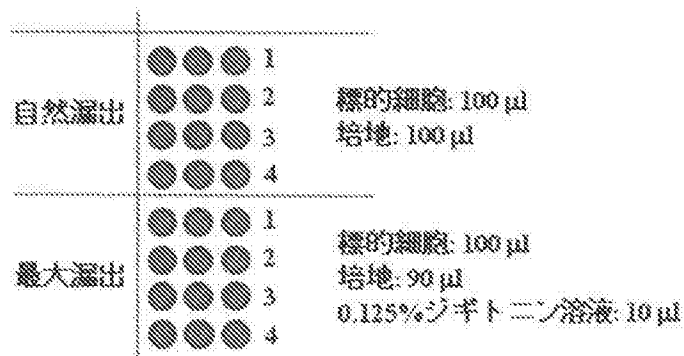
[請求項4] 請求項1または2に記載の化合物またはその塩を含む、生細胞数測定用試薬。

[請求項5] 細胞障害能測定用試薬である、請求項4に記載の試薬。

[請求項6] 細胞増殖能測定用試薬である、請求項4に記載の試薬。

- [請求項7] 請求項 1 または 2 に記載の化合物またはその塩と細胞を混合する工程、および
- ランタノイド元素と錯体を形成し、蛍光を測定する工程を含む、細胞障害能を測定する方法。
- [請求項8] ランタノイド元素と錯体を形成する前に、界面活性剤を加えることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

[図1]

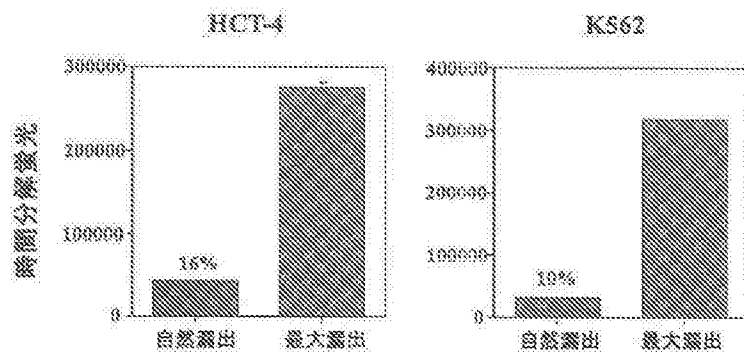


エフェクター細胞/ 標的細胞比	実施例8の化合物 25 μ M	
	HCT-4	KS62
0	● ● ●	● ● ●
0.625	● ● ●	● ● ●
1.25	● ● ●	● ● ●
2.5	● ● ●	● ● ●
5	● ● ●	● ● ●
10	● ● ●	● ● ●
20	● ● ●	● ● ●
40	● ● ●	● ● ●

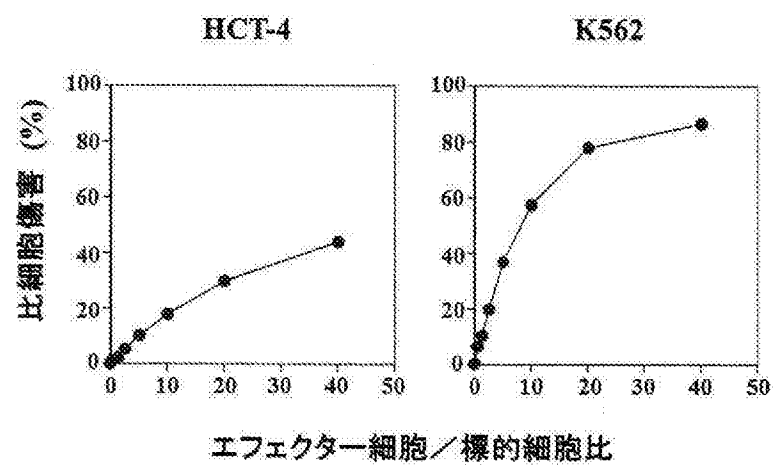
標的細胞: 100 μ l
エフェクター細胞: 100 μ l

標的細胞: HCT-4 HTLV-1感染細胞
KS62赤芽腫細胞
エフェクター細胞: ヘルパーNK細胞

[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/059838

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D213/79(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D213/79, C12Q1/04, G01N21/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BLOMBERG K. et al., Journal of Immunological Methods, Vol.193, No.2, 1996, p.199-206, entire text	1-8
Y	WO 1990/000550 A1 (WALLAC OY), 25 January 1990 (25.01.1990), page 4, formula I; definitions b) to d) of X1 to X5; page 6, lines 1 to 6, definitions of Z1, Z2; scheme 1, compounds 11b to c; examples 19 to 20; page 1, 2nd to 3rd paragraphs; page 10, 4th paragraph to page 11, 1st paragraph & SE 8802575 A & EP 403593 A1 & JP 3-500297 A & US 5202423 A & US 5324825 A	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 June 2015 (10.06.15)

Date of mailing of the international search report

23 June 2015 (23.06.15)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/059838

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HEMMILA I. et al., Di- and tetracarboxylate derivatives of pyridines, bipyridines and terpyridines as luminogenic reagents for time-resolved fluorometric determination of terbium and dysprosium, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Vol.26, No.4, 1993, p.283-90, Fig. 1, TABLE 2-4, p.288 Discussion, 1st to 2nd paragraphs, p.289, 1st, 3rd paragraphs	1-8
A	EP 68875 A2 (EASTMANN KODAK CO.), 05 January 1983 (05.01.1983), entire text & JP 58-8783 A & CA 1205028 A & US 4637988 A & US 4670572 A & EP 288256 A2 & US 4794191 A & US 4801722 A & JP 64-45365 A & US 4837169 A & US 4859777 A & CA 1292710 A	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C07D213/79(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C07D213/79, C12Q1/04, G01N21/78			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 5 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 5 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 5 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	BLOMBERG K. et al., Journal of Immunological Methods, Vol. 193, No. 2, 1996, p. 199-206, 全文	1-8	
Y	WO 1990/000550 A1 (WALLAC OY) 1990.01.25, p. 4 Formula I, X1-X5 の定義 b)~d), p. 6 11~16 の Z1, Z2 の定義, Scheme 1 Compound 11b-c, Example 19-20, p. 1 2~3 段落, p. 10 4 段落~p. 11 1 段落 & SE 8802575 A & EP 403593 A1 & JP 3-500297 A & US 5202423 A & US 5324825 A	1-8	
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 1 0 . 0 6 . 2 0 1 5		国際調査報告の発送日 2 3 . 0 6 . 2 0 1 5	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 清水 紀子 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 2	4 P 4 6 6 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	HEMMILA I. et al., Di- and tetracarboxylate derivatives of pyridines, bipyridines and terpyridines as luminogenic reagents for time-resolved fluorometric determination of terbium and dysprosium, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Vol. 26, No. 4, 1993, p. 283-90, Fig. 1, TABLE 2-4, p. 288 Discussion 1-2 段落, p. 289 1, 3 段落	1-8
A	EP 68875 A2 (EASTMANN KODAK COMPANY) 1983. 01. 05, 全文 & JP 58-8783 A & CA 1205028 A & US 4637988 A & US 4670572 A & EP 288256 A2 & US 4794191 A & US 4801722 A & JP 64-45365 A & US 4837169 A & US 4859777 A & CA 1292710 A	1-8