

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-509075

(P2004-509075A)

(43) 公表日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7D 471/22</b>	CO7D 471/22	2G045
<b>GO1N 21/76</b>	GO1N 21/76	2G054
<b>GO1N 21/78</b>	GO1N 21/78	4C065
<b>GO1N 33/533</b>	GO1N 33/533	
<b>GO1N 33/58</b>	GO1N 33/58	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-510955 (P2002-510955)	(71) 出願人	501358080
(86) (22) 出願日	平成13年6月12日 (2001.6.12)		シ ビオ アンテルナショナル
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月16日 (2002.12.16)		フランス国, エフ-91400 サクレ,
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/006642		エールエヌ 306
(87) 国際公開番号	W02001/096877	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成13年12月20日 (2001.12.20)		弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	00/07650	(74) 代理人	100092624
(32) 優先日	平成12年6月15日 (2000.6.15)		弁理士 鶴田 準一
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100089901
			弁理士 吉井 一男
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也
		(74) 代理人	100081330
			弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光消光にあまり敏感でない新規な希土類金属クリプテート

## (57) 【要約】

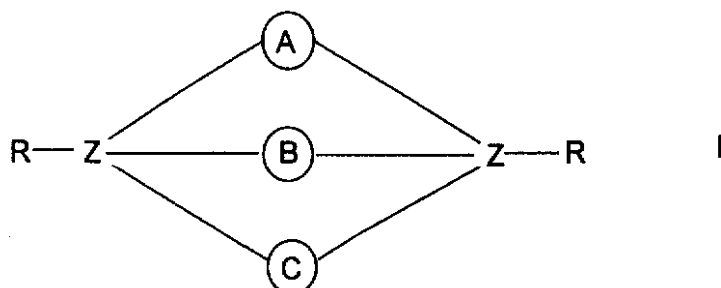
本発明は、蛍光消光にあまり敏感でない希土類金属クリプテートの測定媒体に、1回以上置換されたかまたは置換されていない、少なくとも1つのピリジン基を含む前記希土類金属クリプテートを導入することによって、蛍光アッセイにおいて、測定媒体によって生じる蛍光消光を減少させる方法に関する。本発明はまた、測定媒体によって生じる蛍光消光にあまり敏感でない新規の希土類金属クリプテートに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも1つの蛍光標識を使用する分析物の蛍光アッセイにおいて、測定媒体によって生じる蛍光消光を減少させる方法であって、希土類金属マクロ多環式錯体が測定媒体に導入され、該錯体は、

## 【化 1】



10

(式中、Zは3または4価の原子であり、Rは存在しないかまたは水素、水酸基、アミノ基もしくは炭化水素基を表し、2価の基

## 【数 1】

20



は、それぞれ独立して、1以上のヘテロ原子を任意に含有し、ヘテロマクロ環で所望により中断されていてもよい炭化水素に基づく鎖であって、基

## 【数 2】



30

の少なくとも1つはさらに、少なくとも1つの分子単位を含むかまたは錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位から本質的に成り、前記分子単位を含まないかまたは前記分子単位から本質的に成らない基

## 【数 3】



40

の少なくとも1つは、1回以上置換されたかまたは置換されていないピリジン基を含む)のマクロ多環式化合物と錯体形成した少なくとも1つの希土類金属塩から成ることを特徴とする、少なくとも1つの蛍光標識を使用する分析物の蛍光アッセイにおいて、測定媒体によって生じる蛍光消光を減少させる方法。

## 【請求項 2】

前記錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位を含まないかまたは前記分子単位から本質的に成らない2つの基

【数 4】

Ⓐ, Ⓑ または Ⓒ

は、1回以上置換されたかまたは置換されていないピリジン基を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位は、電子供与基で置換されることを特徴とする、請求項1および2のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項4】

前記錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位は、フェナントロリン、アントラセン、ベンゼン、ナフタレン、ピフェニル、テルフェニル、アゾベンゼン、アゾピリジン、ビピリジンおよびビスイソキノリンから選択されることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位はビピリジン基である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項6】

前記ビピリジン基は、特にカルボキシレート、 $-NH_2$ 、 $-NHAlk$ 、 $-N(Alk)_2$ 、 $OH$ 、 $O^-$ 、 $-OAlk$ 、 $Alk$ 、 $-CH(Alk)_2$ 、 $-C(Alk)_3$ 、 $-NHCOAlk$ 、および置換されたまたは置換されていないフェニル基（ここで、 $Alk$ は $(C_1 - C_4)$ アルキル基である）から選択される電子供与基で置換されることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

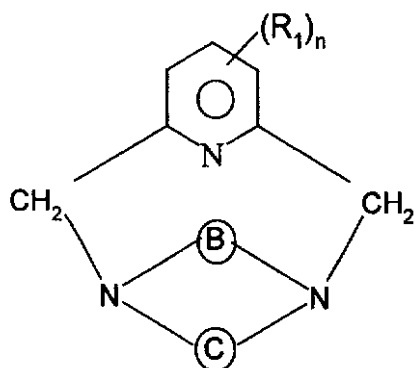
前記1以上のビピリジン単位はカルボキシレート基で置換されることを特徴とする、請求項4～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記マクロ多環式錯体は、式II：

30

【化2】

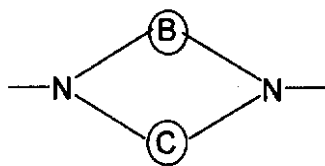


II

40

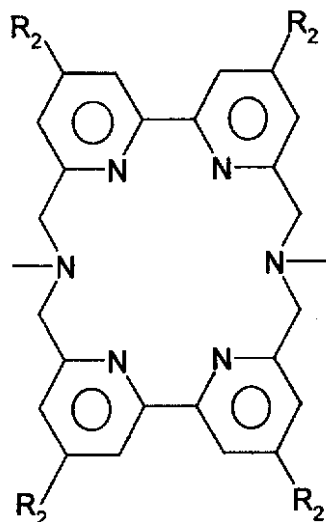
(式中、以下の式

## 【化3】



の環は以下の式：

## 【化4】



のビス・ピピリジンマクロ環であり；

$n = 0$ 、 $1$ または $2$ であり；

Aは生体物質に共有結合することが可能な官能基であり、

$R_1$ は $-COOR_3$ 基（式中、 $R_3$ は水素であるかまたは $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基であり、好ましくはメチル、エチルもしくは $tert$ -ブチル基を表す）であるかあるいは $R_1$ は $-CO-NH-Y-A$ であるかまたは $-Y-A$ 基であり；

$R_2$ は水素、電子供与基、特にカルボキシレート、 $-NH_2$ 、 $-NHAlk$ 、 $-N(Alk)_2$ 、 $OH$ 、 $O^-$ 、 $-OAlk$ 、 $Alk$ 、 $-CH(Alk)_2$ 、 $-C(Alk)_3$ 、 $-NHCOAlk$ 、置換されたもしくは置換されていないフェニル基、ここで、 $Alk$ は( $C_1 - C_4$ )アルキル基であるか、または $-CO-NH-Y-A$ もしくは $-Y-A$ 基であり、但し、 $R_1$ および $R_2$ の1つを超えない置換基は $-CO-NH-Y-A$ または $-Y-A$ 基を表し、 $R_1$ および $R_2$ 置換基は同時に $-CO-NH-Y-A$ または $-Y-A$ 基を表さず；

Yは、1以上の二重結合および/または酸素、窒素、イオウもしくはリンなどの1以上のヘテロ原子または1以上のカルバモイルもしくはカルボキシアミド基を任意に含有する直鎖または分岐 $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン基から選択されるか、あるいは $C_5 \sim C_8$ シクロアルキレン基または $C_6 \sim C_{14}$ アリーレン基から選択される2価の有機ラジカルから成るスペーサー基あるいはスペーサーアームであり、前記アルキレン、シクロアルキレンまたはアリーレン基は、任意にアルキル基、アリール基またはスルホン酸基で置換される)に対応するマクロ多環式化合物と錯体形成する少なくとも1つの希土類金属塩から成ることを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項9】

前記錯体形成した希土類金属イオンはユウロピウムイオンであることを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

10

20

40

50

## 【請求項10】

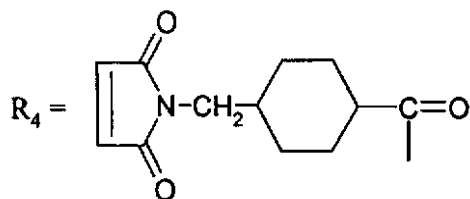
前記希土類金属マクロポリ環式錯体は、ユウロピウムクリプテート  $[Eu^{3+} \text{ py} \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2]$ 、

$[Eu^{3+} \text{ bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{py}(\text{NH}_2)_2]$  および

$[Eu^{3+} \text{ bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{py}(\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}_4)_2]$

(式中、

【化5】



10

である)

から選択されることを特徴とする、請求項1～7および9のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項11】

前記希土類金属マクロポリ環式錯体は唯一の標識としてまたはアッセイにおける標識の1つとして使用されることを特徴とする、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。 20

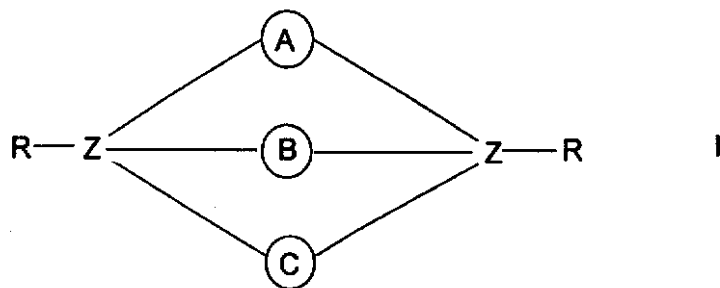
## 【請求項12】

前記測定媒体は、生体媒体、特に血清媒体であることを特徴とする、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項13】

式

【化6】



30

(式中、Zは3または4価の原子であり、Rは存在しないかまたは水素、水酸基、アミノ基または炭化水素に基づくラジカルを表し、2価の基

【数5】

40



は、それぞれ独立して、1以上のヘテロ原子を任意に含有し、ヘテロマクロ環で任意に中断される炭化水素に基づく鎖であって、基

【数 6】

①, ②および③

の少なくとも1つはまた、少なくとも1つの分子単位を含むかまたは錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位から本質的に成り、

前記分子単位を含まないかまたは前記分子単位から本質的に成らない基

【数 7】

10

①, ②および③

の少なくとも1つは、1回以上置換されたピリジン基を含むか、

あるいは前記分子単位を含まないかまたは前記分子単位から本質的に成らない基

【数 8】

①, ②および③

20

の少なくとも1つは、1回以上置換されたかまたは置換されていないピリジン基を含み、前記基以外の基

【数 9】

①, ②または③

は電子供与基で置換される)

のマクロ多環式化合物と錯体形成した少なくとも1つの希土類金属塩から成る希土類金属マクロ多環式錯体。

30

【請求項 14】

前記錯体形成した希土類金属イオンはユウロピウムイオンである、請求項 13 に記載の錯体。

【請求項 15】

前記錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位を含まないかまたは前記分子単位から本質的に成らない2つの基

【数 10】

40

①, ②または③

は、1回以上置換されたかまたは置換されていないピリジン基を含むことを特徴とする、請求項 13 および 14 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 16】

前記錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位は、フェナントロリン、アントラセン、ベンゼン、ナフタレン、ピフェニル、テルフェニル、アゾベンゼン、アゾピリジン、ピピリジンおよびビスイソキノリンから選択されることを特徴とする、請求項 13 ~ 15 のいずれか1項に記載の錯

50

体。

【請求項 17】

錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位はピピリジン基である、請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の錯体。

【請求項 18】

ピピリジン基は、特にカルボキシレート、 $-NH_2$ 、 $-NHAlk$ 、 $-N(Alk)_2$ 、 $OH$ 、 $O^-$ 、 $-OAlk$ 、 $Alk$ 、 $-CH(Alk)_2$ 、 $-C(Alk)_3$ 、 $-NHCOAlk$ 、および置換されたまたは置換されていないフェニル基（ここで、 $Alk$ は $(C_1 - C_4)$ アルキル基である）から選択される電子供与基で置換されることを特徴とする、請求項 17 に記載の錯体。

10

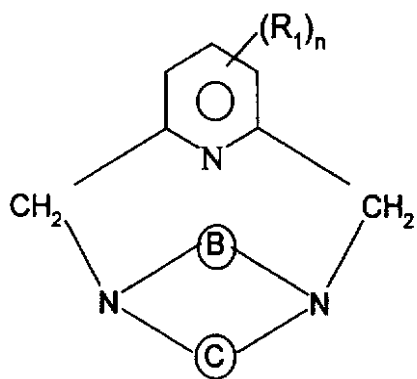
【請求項 19】

前記ピピリジン単位はカルボン酸基で置換されることを特徴とする、請求項 17 または 18 に記載の錯体。

【請求項 20】

前記錯体は、式 I I :

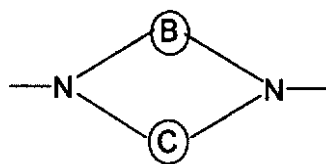
【化 7】



20

(式中、以下の式

【化 8】

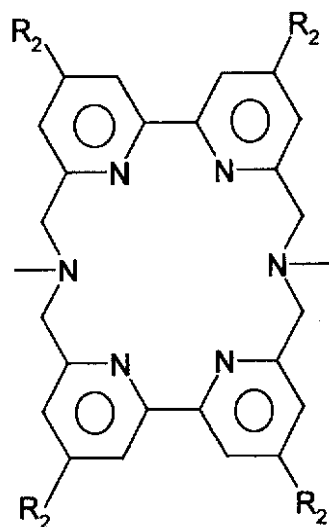


30

の環は以下の式：

40

## 【化 9】



10

のビス・ピピリジンマクロ環であり；

$n = 0$ 、 $1$ または $2$ であり；

Yは、 $1$ 以上の二重結合および/または酸素、窒素、イオウもしくはリンなどの $1$ 以上のヘテロ原子または $1$ 以上のカルバモイルもしくはカルボキシアミド基を任意に含有する直鎖または分岐 $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン基から選択されるか、あるいは $C_5 \sim C_8$ シクロアルキレン基または $C_6 \sim C_{14}$ アリーレン基から選択される $2$ 価の有機ラジカルから成るスペーサー基あるいはスペーサーアームであり、前記アルキレン、シクロアルキレンまたはアリーレン基は、任意にアルキル、アリールもしくはスルホン酸基で置換され；

20

Aは生体物質に共有結合することが可能な官能基であり；

$R_1$ は $-COOR_3$ 基（式中、 $R_3$ は水素であるかまたは $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基であり、好ましくはメチル、エチルもしくはtert-ブチル基を表す）であるかあるいは $R_1$ は $-CO-NH-Y-A$ であるかまたは $-Y-A$ 基であり；

$R_2$ は水素、電子供与基、特にカルボキシレート、 $-NH_2$ 、 $-NHAlk$ 、 $-N(Alk)_2$ 、 $OH$ 、 $O^-$ 、 $-OAlk$ 、 $Alk$ 、 $-CH(Alk)_2$ 、 $-C(Alk)_3$ 、 $-NHCOAlk$ 、置換されたもしくは置換されていないフェニル基、ここで、 $Alk$ は( $C_1 \sim C_4$ )アルキル基である、または $-CO-NH-Y-A$ もしくは $-Y-A$ 基であり、但し、 $R_1$ および $R_2$ 置換基の $1$ つを超えない置換基は $-CO-NH-Y-A$ または $-Y-A$ 基を表し、 $R_1$ および $R_2$ は同時に $-CO-NH-Y-A$ または $-Y-A$ 基を表さない、ならびに但し、 $n = 0$ の場合、 $R_2$ は水素以外である)

30

に対応するマクロ多環式化合物と錯体形成する少なくとも $1$ つの希土類金属塩から成ることを特徴とする、請求項 $13 \sim 19$ のいずれか $1$ 項に記載の錯体。

## 【請求項 21】

前記錯体は、式II（式中、 $n = 0$ であり、

40

Y、Aおよび $R_1$ は請求項20に記載の通りであり、

$R_2$ は請求項20に記載の通りであり、 $R_2$ 置換基は $-CO-NH-Y-A$ または $-Y-A$ 基である)

に対応するマクロ多環式化合物と錯体形成する少なくとも $1$ つの希土類金属塩から成ることを特徴とする、請求項20に記載の錯体。

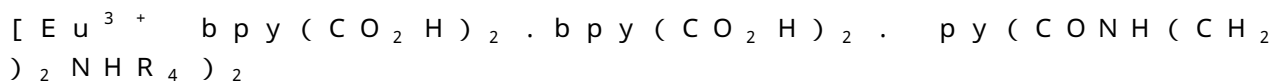
## 【請求項 22】

前記錯体は、ユウロピウムクリプテート [ $Eu^{3+} \cdot py \cdot Bpy(CO_2H)_2 \cdot Bpy(CO_2H)_2$  ]、

[  $Eu^{3+} \cdot bpy(CO_2H)_2 \cdot bpy(CO_2H)_2 \cdot py(NH_2)_2$  ] およ

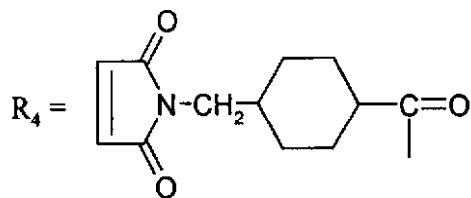
50

び



(式中、

【化10】



10

である)

から選択されることを特徴とする、請求項20または21に記載の錯体。

【請求項23】

特にポリペプチド、タンパク質、細胞レセプター、抗原、抗体または核酸に特異的に相互に結合可能な分子の対のメンバーの1つに共有結合した、請求項13～20のいずれか1項に記載の錯体から成る蛍光複合体。

【請求項24】

分析物の蛍光アッセイにおいて、測定媒体によって生じる蛍光消光を減少させるための請求項13～22のいずれか1項に記載のマクロ多環式錯体の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、蛍光消光にあまり敏感でない希土類金属クリプテートの測定媒体に導入することによって、蛍光アッセイにおいて、測定媒体によって生じる蛍光消光を減少させる方法に関する。

【0002】

本発明はまた、測定媒体によって生じる蛍光消光にあまり敏感でない新規な希土類金属クリプテートに関する。

30

【0003】

生物学に関する知識の向上により、生体分子のモニターまたは定量が可能な診断方法に対するニーズが高まっている。

【0004】

同時に、対照アッセイ法に一般的に伴う放射性標識には不都合がある。一般に、現在、放射性トレーサーを他の標識、主に蛍光標識に置き換えるための努力が払われている。理想条件下で蛍光標識を使用すると、放射性トレーサーで得られる感度と理論的に同等の高感度を得ることが可能である。

【0005】

この種のアッセイにおいてトレーサーとして使用することができる多くの蛍光分子については先に記載されており、これらのうち希土類金属錯体は有利な特性を有する。

40

【0006】

特定の錯体、希土類金属クリプテートの使用については、例えば、欧州特許出願EP 0 180 492号および同EP 0 321 353号において開示されている。

【0007】

実際には、第1にしばしば高いバックグラウンドノイズが存在するため、第2に蛍光トレーサーはその環境の変化に一般に極めて敏感であるという事実のために、蛍光トレーサーの定量性能には限度がある。pHの微細な変化、極性、溶存酸素の存在または重原子(例えば、ヨウ素)の接近または吸収基により、(励起または消光の意味での)量子収量に変化したり、発光波長がシフトする可能性がある。

50

## 【0008】

蛍光測定による分析方法に内在する問題については、総説記事に列挙されている (I. Hemmila, Clin. Chem. 31/3, 359-370 (1985))。

## 【0009】

生物学的サンプルに存在するタンパク質並びに他の生体分子の固有の蛍光から生じるバックグラウンドノイズに内在する問題は、希土類金属 (主にユウロピウム) の錯体から形成される蛍光標識を使用して解決することができ、これによって、特定のシグナルの時間的選択を可能にしている。ユウロピウム錯体の特徴たる特に長い寿命 (約 0.1 ms ~ 1 ms) は、分解時間測定 (resolved-time measurement) 例えば、比較的短い寿命 (約 4 ns) を特徴とする血清タンパク質からのバックグラウンドノイズの上昇を除くことを可能とする。

10

## 【0010】

均質型の形式は、免疫学的複合体の形成の動力学的リアルタイムモニタリングを可能にするという顕著な利点を有するが、標識と生体媒体中に存在する分子との間の望ましくない任意の相互作用 (蛍光の消光) を除くことはできない。

## 【0011】

欧州特許 EP 0 539 435 号において開示されているように、媒体にフッ化物イオンを添加することによって、血清媒体における光物理特性、特に寿命の回復を得ることができる。

20

## 【0012】

それにもかかわらず、測定媒体中に存在する分子によって生じる干渉の問題は、これらの方法のいずれによっても十分に解決されない。蛍光による測定感度の限界の主な原因が、アッセイにおいて標識として使用される蛍光分子の蛍光を阻害することが可能な媒体中に存在する分子によって生じる消光プロセスの存在であることがその理由である。希土類金属の錯体の場合、消光は、接近による電子伝達機構 (ここで、阻害分子が錯体の遊離の配位部位を占める) の結果である可能性がある。特に、基底状態または励起状態にある蛍光分子と媒体中に存在する分子との間に生じる酸化還元反応にあるといえる。これらの機構は、励起された蛍光を相当変更する可能性がある。

## 【0013】

阻害因子は測定媒体の成分 (例えば、血清中の尿酸) として天然に存在するかまたはアッセイのための添加物もしくは安定化剤として測定媒体に添加されるため、電子伝達に参与する機構および消光機構によって蛍光が阻害されることは実際にかなり不都合である。

30

## 【0014】

これらの阻害剤は、標識分子の蛍光を顕著に損なう。実際には、酸化還元反応が干渉を受ける場合、酸化還元機構による希土類金属イオンの酸化状態から還元状態への移行の際、測定感度が顕著に損なわれるほどの寿命の短縮および該希土類金属イオンを含有する錯体の励起スペクトルの変化を伴う。

## 【0015】

今回、ピリジンから成る少なくとも 1 つの分子単位を含むマクロ多環式化合物と錯体形成した希土類金属塩から成る新規の希土類金属クリプテートが見出されたが、これは新規かつ予期されない光物理特性を示す。

40

## 【0016】

該マクロ多環式化合物が電子供与基で置換される錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの 3 重項エネルギーより大きな 3 重項エネルギーを有する分子単位を含む場合にも、これらの有利な特性が得られることも見出された。

## 【0017】

この点に関する機構的な 1 つの仮説として、立体的によりかさ高い分子単位をピリジンに置き換えると、マクロ環の間隙が減少し、その酸化状態を促進することによって希土類金属イオンの酸化還元平衡に影響を及ぼす。

50

【0018】

電子供与基の存在も、希土類金属イオンの酸化還元能に影響する可能性がある。

【0019】

従って、本発明の希土類金属クリプテートは、ピリジン単位および/または電子供与基による置換を含まない対応クリプテートと比較して、媒体中に存在する分子との相互作用から生じる蛍光消光の現象に対してそれほど感受性ではないという有利な特性を有する。

【0020】

このことにより、フッ化物イオンなどのアジュバントを使用せずに生物学的媒体において蛍光測定を実施することが可能であるため、この観察は極めて重要である。

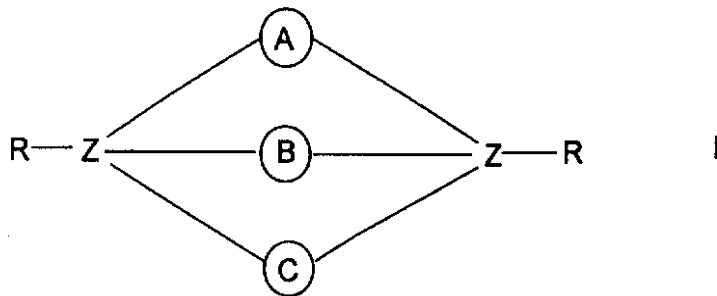
【0021】

従って、本発明の化合物は、認識の役割を有する生体分子に結合することができ、且つパートナーに結合可能であって、他方その耐消光特性を維持する新規の標識を構成する。

【0022】

従って、第1の態様によれば、本発明は、希土類金属マクロ多環式錯体が測定媒体に導入され、前記錯体は、  
式

【化11】



(式中、Zは3または4価の原子であり、Rは存在しないかまたは水素、水酸基、アミノ基もしくは炭化水素に基づく基を表し、2価の基

【数11】

Ⓐ, ⒷおよびⒸ

は、それぞれ独立して、1以上のヘテロ原子を任意に含有し、所望によりヘテロマクロ環で中断されていてもよい炭化水素に基づく鎖であって、基

【数12】

Ⓐ, ⒷおよびⒸ

の少なくとも1つはまた、少なくとも1つの分子単位を含むかまたは錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位から本質的に成り、そして、前記分子単位を含まないかまたは前記分子単位から本質的に成らない基

【数13】

10

20

30

40

Ⓐ, Ⓑ および Ⓒ

の少なくとも1つは、1回以上置換されたかまたは置換されていないピリジン基を含む)のマクロ多環式化合物と錯体形成した少なくとも1つの希土類金属塩から成ることを特徴とする、少なくとも1つの蛍光標識を使用する分析物の蛍光アッセイにおいて、測定媒体によって生じる蛍光消光を減少させる方法に関する。

【0023】

式(I)のマクロポリ環式化合物が置換されたピリジン基を含む場合、該化合物は1以上の置換基で置換することができ、該置換基は、例えば、ハロゲン、CN、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>カルボン酸エステル、OH、NH<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>NHCONH-アリール、-CH<sub>2</sub>NHCSNH-アリール、-NHCONH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル、-NHCSNH-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル、-NHCONH-アリール、-NHCSNH-アリール、ピペリジル、-N-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル-カルボキシピペリジル、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルアミノ-アルキルアミン、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル、2~10個の炭素原子を含有するアルケニル、2~10個の炭素原子を含有するアルキニル、3~8個の炭素原子を含有するシクロアルキル、1~5個の炭素原子を含有するヒドロキシアリール、1~10個の炭素原子を含有するアルコキシ、2~10個の炭素原子を含有するアルコキシアリール、3~10個の炭素原子を含有するアルコキシアリールアルコキシアリール、2~10個の炭素原子を含有するアルコキシアリールアルコキシ、2~10個の炭素原子を含有するアルケニルオキシ、1~10個の炭素原子を含有するアルキルチオ、2~10個の炭素原子を含有するアルキルチオアルキル、1~7個の炭素原子を含有するアシルアミノ、2~8個の炭素原子を含有するアシルアミノアルキル、2~5個の炭素原子を含有するカルバモイルアルキル、3~9個の炭素原子を含有するアルキルアミノカルボニルアルキル、アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル、アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルカルボキサミド、アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルカルボキサミド(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルおよびカルボキシ(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)アルキルなどであり、同一であってもまたは異なってもよい。

【0024】

好ましくは、置換されたピリジンは、1つまたは2つの置換基を含む。本発明の目的に好適な置換基としては、例えば、以下の置換基：アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル、特にアミノメチルまたはアミノエチル；アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルカルボキサミド、特にアミノエチルカルボキサミド、フェニルカルバモイル；フェニルチオカルバモイル；ニトリル；ピペリジル；C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>カルボン酸エステル、特にカルボン酸メチルまたはカルボン酸エチル；アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルカルボキサミド(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル、特にアミノカプロイルアミドメチルおよびアミノカプロイルアミドエチルまたはカルボキシ(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)アルキルがある。

【0025】

本明細書では、用語「分析物」は、任意の物質あるいは物質の群、ならびに検出および/または定量が望まれるそれらの類似体を意味する。

【0026】

本発明の方法の1つの好適な態様によれば、錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位を含まないかまたは前記分子単位から本質的に成らない2つの基

【数14】

Ⓐ, Ⓑ または Ⓒ

は、置換されたかまたは置換されていないピリジン基を含む。

## 【0027】

有利には、錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位は、電子供与基で置換される。

## 【0028】

好ましくは、錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位は、フェナントロリン、アントラセン、ベンゼン、ナフタレン、ピフェニル、テルフェニル、アゾベンゼン、アゾピリジン、ピピリジンおよびビスイソキノリンから選択され、ピピリジンが好適である。

## 【0029】

本発明の方法の他の好適な態様によれば、1以上のピピリジン単位は、特に以下の基：カルボキシレート、 $-NH_2$ 、 $-NHA lk$ 、 $-N(A lk)_2$ 、 $OH$ 、 $O^-$ 、 $-OAlk$ 、 $Alk$ 、 $-CH(A lk)_2$ 、 $-C(A lk)_3$ 、 $-NHCOAlk$ 、置換されたまたは置換されていないフェニル（ここで、 $Alk$ は $(C_1 - C_4)$ アルキル基である）から選択される電子供与基で置換される。

10

## 【0030】

フェニルが置換される場合、フェニルは、例えば、スルフォネート、カルボキシレート、メチルカルボキシレート、 $N, N$ -ジメチルアミノ、メトキシエチルカルボキシレートおよびカルボキサミドから選択される1以上の置換基（同一であっても異なってもよい）で置換することができる。

## 【0031】

カルボキシレート基は、本発明の目的に特に好適である電子供与基である。

20

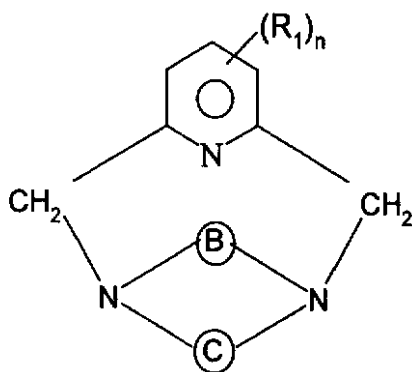
## 【0032】

用語「カルボキシレート基」は、 $-COOH / -COO^-$ 対を意味し：具体的には、マクロ環式錯体は、その合成中に、カルボン酸基（*carboxylic acid group*） $-COOH$ を含むことができ、測定媒体におけるその使用中に該基はカルボキシレート基（*carboxylate group*） $-COO^-$ にイオン化される。

## 【0033】

本発明の方法の1つの有利な態様によれば、マクロ多環式化合物は、式（II）：

## 【化12】

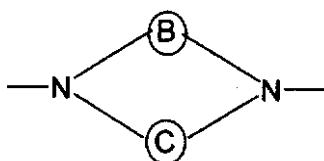


II

30

（式中、以下の式

## 【化13】

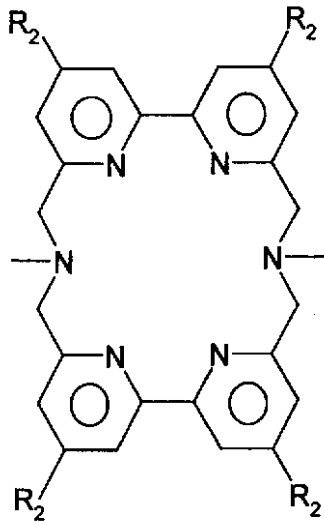


40

50

の環は以下の式：

【化14】



のビス-ピピリジンマクロ環であり；

$n = 0$ 、 $1$ または $2$ であり；

Aは生体物質に共有結合することが可能な官能基であり、

$R_1$ は $-COOR_3$ 基（式中、 $R_3$ は水素であるかまたは $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基であり、好ましくはメチル、エチルもしくは $tert$ -ブチル基を表す）であるかあるいは $R_1$ は $-CO-NH-Y-A$ であるかまたは $-Y-A$ 基であり；

$R_2$ は水素、電子供与基、特にカルボキシレート、 $-NH_2$ 、 $-NHAlk$ 、 $-N(Alk)_2$ 、 $OH$ 、 $O^-$ 、 $-OAlk$ 、 $Alk$ 、 $-CH(Alk)_2$ 、 $-C(Alk)_3$ 、 $-NHCOAlk$ 、置換されたもしくは置換されていないフェニル基、ここで、 $Alk$ は( $C_1 - C_4$ )アルキル基である、または $-CO-NH-Y-A$ もしくは $-Y-A$ 基であり、但し、 $R_1$ および $R_2$ の1つを超えない置換基は $-CO-NH-Y-A$ または $-Y-A$ 基を表し、 $R_1$ および $R_2$ 置換基は同時に $-CO-NH-Y-A$ または $-Y-A$ 基を表さず；

Yは、1以上の二重結合および/または酸素、窒素、イオウもしくはリンなどの1以上のヘテロ原子または1以上のカルバモイルもしくはカルボキシアミド基を任意に含有する直鎖または分岐 $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン基から選択されるか、あるいは $C_5 \sim C_8$ シクロアルキレン基または $C_6 \sim C_{14}$ アリーレン基から選択される2価の有機ラジカルから成るスペーサー基あるいはスペーサーアームであり、前記アルキレン、シクロアルキレンまたはアリーレン基は、任意にアルキル、アリールもしくはスルホン酸基で置換される)に対応するマクロポリ環式化合物と錯体形成する少なくとも1つの希土類金属塩から構成される(composed of)。

【0034】

本明細書において、用語「生体物質に共有結合することが可能な官能基」は、天然に存在するかまたは前記生体物質に人工的に導入された少なくとも1つの官能基と直接にまたは活性化後に共有結合を介して結合可能な任意の官能基を表す。そのような官能基は特に $NH_2$ 、 $COOH$ 、 $CHO$ 、 $SH$ および $OH$ 官能基である。そのような官能基および活性化方法については、P. Tijssen、「Practice and Theory of Enzyme immunoassays」Elsevier 1985に詳細に記載されている。

【0035】

本発明の目的に適した官能基の例としては、特に、アミノ、チオ、シアノ、イソシアノ、イソチオシアノ、チオシアノ、カルボキシル、水酸基、マレイミド、スクシンイミド、メ

10

20

30

40

50

ルカプト、フェノール、イミダゾール、アルデヒド、エポキシド、ハロゲン、チオニル、スルホニル、ニトロベンジル、カルボニル、トリアゾ、無水物、ハロ酢酸、ヒドラジノ基、アクリジンなどの基が挙げられる。

## 【0036】

特に好適な基は、生体物質への共有結合の前に活性化されなければならないアミノ、チオールおよびカルボキシル基、ならびに生体物質に直接結合することができるマレイミド、スクシンイミドおよびイソチオシアネート基である。

## 【0037】

錯体形成した希土類金属イオンは、好ましくはユウロピウムイオンである。

## 【0038】

本明細書において、「クリプテート」の概念ならびにマクロ環および多環の命名については、J. M. Lehn, 「Struct. Bonding (Berlin)」16, 1, 1973および「Acc. Chem. Res.」11, 49, (1978)に規定されている通りである。

## 【0039】

マクロ(多)環の構成分子単位を表すために、以下の省略記号を使用するものとする：

2, 2' - ピピリジン = b p y

ピリジン = P y

4 - メチルイソニコチネート = P y ( C O <sub>2</sub> M e )

2, 2' - ピピリジン - 4, 4' - ジエチルカルボキシレート = b p y ( C O <sub>2</sub> E t ) <sub>2</sub> 20

2, 2' - ピピリジン - 4, 4' - ジ - t e r t - ブチルカルボキシレート = b p y ( C O <sub>2</sub> t b u ) <sub>2</sub>

2, 2' - ピピリジン - 4, 4' - ジカルボン酸 = b p y ( C O <sub>2</sub> H ) <sub>2</sub>

ピリジン - 3, 5 - ジエチルカルボキシレート = P y ( C O <sub>2</sub> E t ) <sub>2</sub>

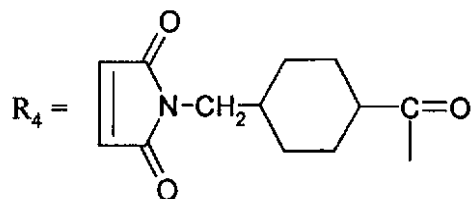
3, 5 - ビス [ N - ( 2 - アミノエチル ) カルボキシアミジル ] ピリジン = P y ( N H <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>

3, 5 - ビス [ N - ( 4 - マレイミドメチルシクロヘキシルカルボキシアミド - 2 - エチル ) カルボキシアミジル ] ピリジン = P y [ C O N H ( C H <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N H R <sub>4</sub> ] <sub>2</sub>

(式中、

## 【化15】

30



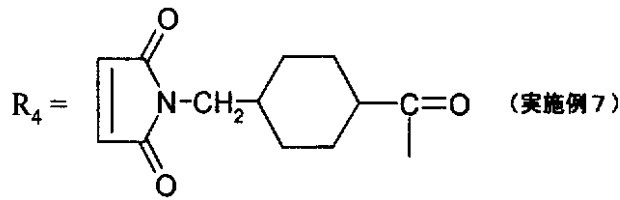
である)。

## 【0040】

本発明の目的に特に好適な希土類金属マクロ多環式錯体は、ユウロピウムクリプテート [ E u <sup>3+</sup> p y · B p y ( C O <sub>2</sub> H ) <sub>2</sub> · B p y ( C O <sub>2</sub> H ) <sub>2</sub> ] (実施例4、b)、 [ E u <sup>3+</sup> b p y ( C O <sub>2</sub> H ) <sub>2</sub> · b p y ( C O <sub>2</sub> H ) <sub>2</sub> · p y ( N H <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ] (実施例6) および [ E u <sup>3+</sup> b p y ( C O <sub>2</sub> H ) <sub>2</sub> · b p y ( C O <sub>2</sub> H ) <sub>2</sub> · p y ( C O N H ( C H <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N H R <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ] (式中、

## 【化16】

40



である)

である。

【0041】

本発明の方法の1つの好適な態様によれば、希土類金属マクロ環式錯体は唯一の標識としてまたはアッセイにおける標識の1つとして使用される。

【0042】

有利には、測定媒体は生体媒体、特に血清媒体である。

【0043】

本発明の方法に使用することができるマクロ(多)環式化合物は、公知の方法によって調製される。トシル中間体を経由するピピリジンマクロ環の調製については、特に、J. Org. Chem. 1983, 48, 4848に記載されており、bpy.bpy.(R<sub>2</sub>)<sub>2</sub>型の官能基化マクロ環類似体は、該アプローチによって得られた。

【0044】

一般に、マクロ二環式リガンドは、それぞれ欧州特許EP 0 321 353号およびHelv. Chim. Acta, 1988, 71, 1042に開示されている技術に従って調製される。特に、これらの分子は、塩基およびテンプレートイオンとして作用するアルカリ性カーボネートの存在下において、極性非プロトン性溶媒中で実施されるマクロ環式ジアミンをアルキル化することによって調製された。

【0045】

本発明に従って使用することができる希土類金属マクロ環式錯体は、錯体形成すべきカチオンを供与する化合物と錯体形成化合物とを反応させることから成る金属錯体を調製するための従来の方法によって調製した。

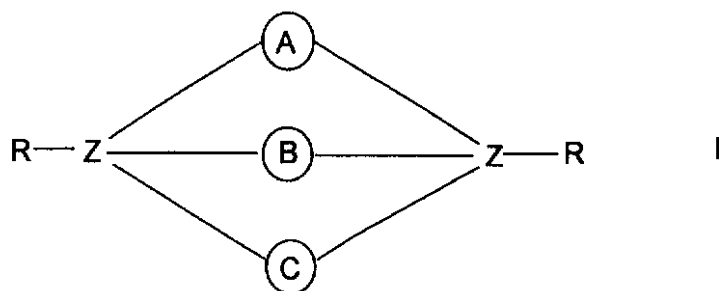
【0046】

例えば、マクロ多環式錯体は、希土類金属カチオンを供与する化合物と上記で規定される特性を有する化合物とを反応させることによって得ることができ、それぞれの化合物は、有利なことに、溶液中において、好ましくは、同じ溶媒または錯体形成に不活性な相溶性の複数溶媒中に存在する。一般に、アセトニトリルまたはメタノールが溶媒として使用され、還流のために加熱される。

【0047】

更なる態様によれば、本発明はまた、式

【化17】



(式中、Zは3または4価の原子であり、Rは存在しないかまたは水素、水酸基、アミノ

10

20

30

40

50

基もしくは炭化水素基を表し、2価の基

【数15】

Ⓐ, Ⓑ および Ⓒ

は、それぞれ独立して、1以上のヘテロ原子を所有により含有し、ヘテロマクロ環で所望により中断される炭化水素に基づく鎖であって、基

【数16】

Ⓐ, Ⓑ および Ⓒ

10

の少なくとも1つはまた、少なくとも1つの分子単位を含むかまたは錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位から本質的に成り、

前記分子単位を含まないかまたは前記分子単位から本質的に成らない基

【数17】

Ⓐ, Ⓑ および Ⓒ

20

の少なくとも1つは、1回以上置換されたピリジンに基づく基を含むか、

あるいは前記分子単位を含まないかまたは前記分子単位から本質的に成らない基

【数18】

Ⓐ, Ⓑ および Ⓒ

の少なくとも1つは、1回以上置換されたかまたは置換されていないピリジン基を含み、前記基以外の基

30

【数19】

Ⓐ, Ⓑ または Ⓒ

は電子供与基で置換される)

のマクロポリ環式化合物と錯体形成した少なくとも1つの希土類金属塩から成る希土類金属マクロポリ環式錯体に関する。

【0048】

40

ピリジンに基づくラジカル上の1つ以上の置換基は、例えば、ハロゲン、CN、 $C_1 - C_6$ カルボン酸エステル、OH、 $NH_2$ 、 $NO_2$ 、 $-CH_2NHCONH-$ アリアル、 $-CH_2NHCSNH-$ アリアル、 $-NHCONH-(C_1 - C_6)$ アルキル、 $-NHCSNH-(C_1 - C_4)$ アルキル、 $-NHCONH-$ アリアル、 $-NHCSNH-$ アリアル、ピペリジル、 $-N-(C_1 - C_6)$ アルキル-カルボキシピペリジル、 $(C_1 - C_4)$ アルキルアミノ-アルキルアミン、 $C_1 - C_{10}$ アルキル、2~10個の炭素原子を含有するアルケニル、2~10個の炭素原子を含有するアルキニル、3~8個の炭素原子を含有するシクロアルキル、1~5個の炭素原子を含有するヒドロキシアルキル、1~10個の炭素原子を含有するアルコキシ、2~10個の炭素原子を含有するアルコキシアルキル、3~10個の炭素原子を含有するアルコキシアルコキシアルキル、2~10個の炭素原子

50

を含有するアルコシアルコキシ、2～10個の炭素原子を含有するアルケニルオキシ、1～10個の炭素原子を含有するアルキルチオ、2～10個の炭素原子を含有するアルキルチオアルキル、1～7個の炭素原子を含有するアシルアミノ、2～8個の炭素原子を含有するアシルアミノアルキル、2～5個の炭素原子を含有するカルバモイルアルキル、3～9個の炭素原子を含有するアルキルアミノカルボニルアルキル、アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル、アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルカルボキサミド、アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルカルボキサミド(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルおよびカルボキシ(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)アルキルから選択することができる。

【0049】

好ましくは、置換されたピリジンは1つまたは2つの置換基を含む。本発明の目的に好適な置換基としては、例えば、以下の置換基：アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル、特にアミノメチルまたはアミノエチル；アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルカルボキサミド、特にアミノエチルカルボキサミド、フェニルカルバモイル；フェニルチオカルバモイル；ニトリル；ペペリジル；C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>カルボン酸エステル、特にカルボン酸メチルまたはカルボン酸エチル；アミノ(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルカルボキサミド(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル、特にアミノカプロイルアミドメチルおよびアミノカプロイルアミドエチルまたはカルボキシ(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)アルキルがある。

【0050】

好ましくは、錯体形成した希土類金属イオンはユウロピウムイオンである。

【0051】

有利には、錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位を含まないかまたは前記分子単位から本質的に成らない2つの基

【数20】



は、1回以上置換されたかまたは置換されていないピリジン基を含む。

【0052】

1つの好適な態様によれば、錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位は、フェナントロリン、アントラセン、ベンゼン、ナフタレン、ピフェニル、テルフェニル、アゾベンゼン、アゾピリジン、ビピリジンおよびビスイソキノリンから選択される。

【0053】

有利には、錯体形成した希土類金属イオンの発光レベルの3重項エネルギーより大きな3重項エネルギーを有する分子単位はビピリジン基である。

【0054】

好ましくは、ビピリジン基は、特にカルボキシレート、-NH<sub>2</sub>、-NHAlk、-N(Alk)<sub>2</sub>、OH、O<sup>-</sup>、-OAlk、Alk、-CH(Alk)<sub>2</sub>、-C(Alk)<sub>3</sub>、-NHCOAlk、および置換されたまたは置換されていないフェニル基、ここで、Alkは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル基である、から選択される電子供与基(カルボキシレートが特に有利である)で置換される。

【0055】

フェニルが置換される場合、フェニルは、例えば、スルフォネート、カルボキシレート、カルボン酸メチル、N,N-ジメチルアミノ、カルボン酸メトキシエチルおよびカルボキサミドから選択される1以上の置換基(同一であっても異なってもよい)で置換することができる。

【0056】

本発明は、特に、式II:

【化18】

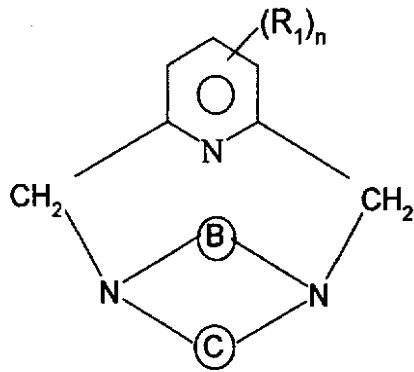
10

20

30

40

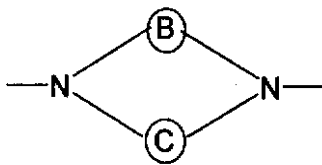
50



II

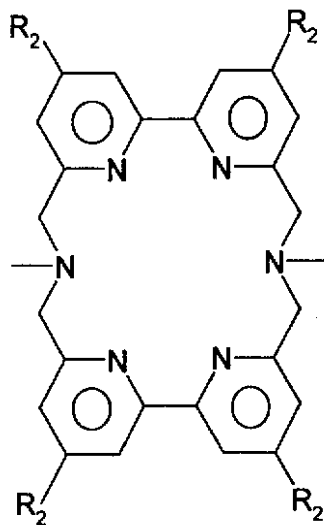
10

(式中、以下の式  
【化19】



20

の環は以下の式：  
【化20】



30

のビス-ピピリジンマクロ環であり；  
n = 0、1または2であり；

40

Yは、1以上の二重結合および/または酸素、窒素、イオウもしくはリンなどの1以上のヘテロ原子または1以上のカルバモイルもしくはカルボキシアミド基を任意に含有する直鎖または分岐C<sub>1</sub> ~ C<sub>20</sub>アルキレン基から選択されるか、あるいはC<sub>5</sub> ~ C<sub>8</sub>シクロアルキレン基またはC<sub>6</sub> ~ C<sub>14</sub>アリーレン基から選択される2価の有機ラジカルから成るスペーサー基あるいはスペーサーアームであり、前記アルキレン、シクロアルキレンまたはアリーレン基は、任意にアルキル、アリールもしくはスルホン酸基で置換され；

Aは生体物質に共有結合することが可能な官能基であり；

R<sub>1</sub>は-COOR<sub>3</sub>基(式中、R<sub>3</sub>は水素であるかまたはC<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub>アルキル基であり、好ましくはメチル、エチルもしくはtert-ブチル基を表す)であるかあるいはR<sub>1</sub>

50

は -CO-NH-Y-A であるかまたは -Y-A 基であり；

R<sub>2</sub> は水素、電子供与基、特にカルボキシレート、-NH<sub>2</sub>、-NHAlk、-N(Alk)<sub>2</sub>、OH、O<sup>-</sup>、-OAlk、Alk、-CH(Alk)<sub>2</sub>、-C(Alk)<sub>3</sub>、-NHCOAlk、置換されたもしくは置換されていないフェニル基、ここで、Alkは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキル基である、または -CO-NH-Y-A もしくは -Y-A 基であり、

但し、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> 置換基の 1 つを超えない置換基は -CO-NH-Y-A または -Y-A 基を表し、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は同時に -CO-NH-Y-A または -Y-A 基を表さない、ならびに

但し、n = 0 の場合、R<sub>2</sub> は水素以外である)

に対応するマクロ多環式化合物と錯体形成する少なくとも 1 つの希土類金属塩から成るマクロ多環式錯体に関する。

【0057】

好適な化合物は、マクロ多環式化合物が式 I I (式中、

n = 0 であり、

Y、A および R<sub>1</sub> は上記で規定の通りであり、

R<sub>2</sub> は上記で規定の通りであり、

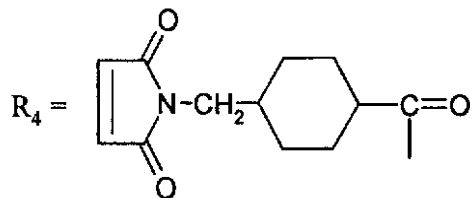
R<sub>2</sub> 置換基は -CO-NH-Y-A または -Y-A 基である)

に対応する錯体である。

【0058】

特に有利な錯体は、ユウロピウムクリプテート [Eu<sup>3+</sup> py · Bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub> · Bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>]、[Eu<sup>3+</sup> bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub> · bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub> · py(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] および [Eu<sup>3+</sup> bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub> · bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub> · Py(CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHR<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] (式中、

【化 2 1】



である)

である。

【0059】

本発明の希土類金属マクロ多環式錯体は、上記の方法によって調製される。

【0060】

本発明はまた、特にポリペプチド、タンパク質、細胞レセプター、抗原、抗体または核酸に特異的に相互に結合可能な分子の対のメンバーの 1 つに共有結合された、上記で規定された希土類金属マクロ多環式錯体から成る蛍光複合体に関する。

【0061】

更なる態様によれば、本発明はまた、分析物の蛍光アッセイにおいて、測定媒体によって生じる蛍光消光を減少するための上記で規定された希土類金属マクロ多環式錯体の使用にも関する。

【0062】

本発明を以下の実施例によって例示するが、それらの中で該化合物を特徴付け、同定するために使用した技術は以下の通りである。

【0063】

融点は、キャピラリ融点装置：電熱 I A 8 1 0 3 を使用して決定した。測定値は補正していない。

10

20

30

40

50

## 【0064】

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、Macherey - Nagel プレート：蛍光指示薬を含有する  $Al_2O_3$  (Polygram Allox N/UV254) および  $SiO_2$  (Polygram SIL 6/UV254) 上で行った。

## 【0065】

液体クロマトグラフィー (HPLC) は、以下のコンポーネント：2152 マイクロプロセッサ、2150 ポンプ、Uvicord 2158 検出器；Merck 50734 Lichrosphes 100RP18 カラム；適用勾配 [時間 (分) - 溶媒 B の流速 / ml 割合 (%) ] : 0 - 1 - 15 ; 5 - 1 - 15 ; 35 - 1 - 100 ] ; 溶媒 A = 1% TFA を含有する  $H_2O$ 、溶媒 B =  $CH_3CN$  から構成される LKB クロマトグラフィーシステムを使用して行った。

10

## 【0066】

保持時間  $T_r$  は、分で表現する。

## 【0067】

NMR スペクトルは、Bruker AC 250 装置 [ 250 ( $^1H$ ) ; 62.9 ( $^{13}C$ ) ] を使用して記録した。化学シフトは、対応する内部基準と比較して ppm で表す。

## 【0068】

( $^1H$ ) に関する測定について、 $CHCl_3 = 7.26$  ;  $CH_3OH = 3.34$  ;  $tBuOH = 1.36$  である。以下の符号を使用した：

20

s = 一重項

d = 二重項

t = 三重項

m = 多重項

AB = 結合系

J = 結合定数。

## 【0069】

( $^{13}C$ ) に関する測定について、 $CHCl_3 = 77.0$  であり、以下の符号を使用した：Ct = 3 級炭素；Cq = 4 級炭素。

## 【0070】

マススペクトルのために使用したイオン化方法は、 $FAB^+$  = 正モード (MNBA マトリックス：メタ-ニトロベンジルアルコールまたはチオグリセロール) での高速原子衝撃および電子衝撃 EI である。

30

## 【0071】

$10^{-5}$  M 溶液で Perkin Elmer 15 分光光度計を使用して、吸収スペクトル (UV ~ 可視) を記録した。

## 【0072】

以下の実施例により本発明を例示する。実施例では以下の省略記号を使用するものとする：

AIBN : アゾビスイソブチロニトリル

HPLC : 高速液体クロマトグラフィー

M.A. : マイクロ分析

m.p. : 融点

M.S. : 質量分析

NBS : N - プロモコハク酸イミド

$^1H$  NMR : 陽子核磁気共鳴

$^{13}C$  NMR :  $^{13}C$  核磁気共鳴

SPDP : N - スクシンイミジル 3 - ( 2 - ピリジルチオ ) プロピオネート

Sulf - SMCC = 4 - ( N - マレイミドメチル ) シクロヘキサン - 1 - カルボン酸の 3 - スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル

40

50

T F A : トリフルオロ酢酸

T L C : 薄層クロマトグラフィー

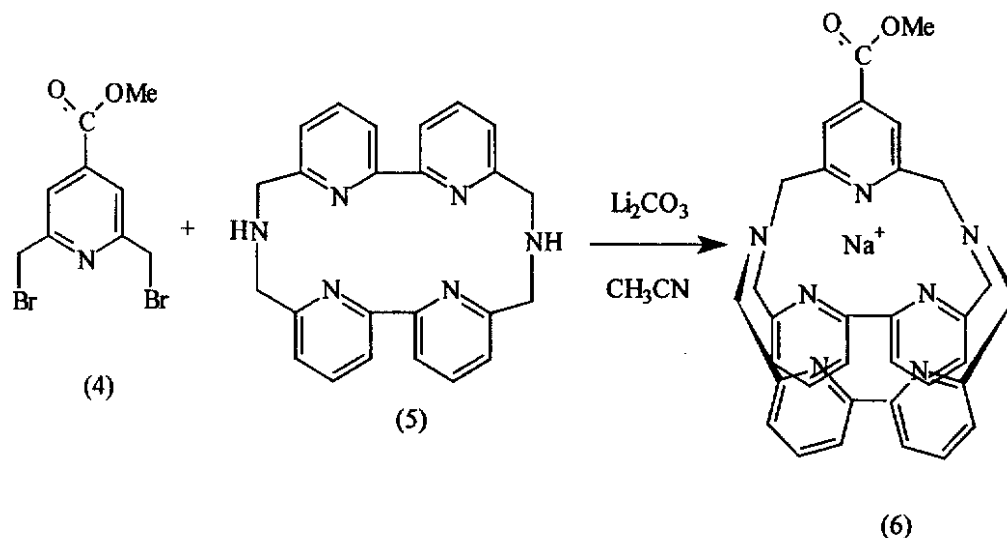
T M S : テトラメチルシラン

【 0 0 7 3 】

実施例 1 : 式 ( 6 ) b p y . b p y . p y ( C O <sub>2</sub> M e ) のマクロ二環の調製

ジブロモメチル誘導体 ( 4 ) によるマクロ環式ジアミンのアルキル化により、以下に示す化合物 ( 6 ) が得られる。

【 化 2 2 】

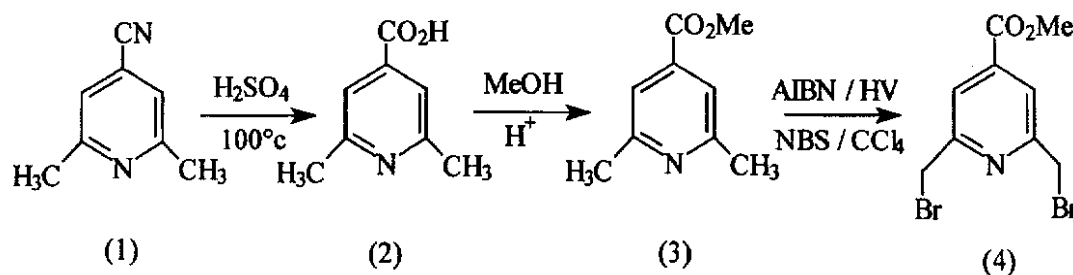


【 0 0 7 4 】

a ) 4 - メチル 2 , 6 - ジブロモメチルイソニコチネート ( 4 ) の調製

以下に示す一連の反応により、化合物 ( 4 ) を単離することができる。

【 化 2 3 】



【 0 0 7 5 】

4 - シアノ - 2 , 6 - ジメチルピリジン ( 1 )

アミノオキシド塩のシアノ化に関する W . E . Feely および E . M . Beavers、J . Am . Chem . Soc . , 1959 , 81 , 4004 に記載の研究により、化合物 ( 1 ) を得ることが可能である。

【 0 0 7 6 】

2 , 6 - ジメチルイソニコチン酸 ( 2 )

1 g ( 7 . 5 6 m m o l ) の ( 1 ) および 5 m l の濃硫酸の混合物を 5 時間、100 で加熱する。次いで、得られる溶液を氷浴上で冷却し、10 N 水酸化ナトリウムで pH 3 . 5 とし、次いで乾固するまで濃縮する。得られる残渣の一部を 48 時間エーテルで抽出 (ソックスレー) すると、分析のための 50 m g の 2 , 6 - ジメチルイソニコチン酸 ( 2 ) が得られる。残りの粗反応物 (エーテルで処理していない) は、更なる精製を行うことな

40

50

く、そのままの形でエステル化反応に使用する。

【0077】

NMR:  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ); 内部基準  $t\text{BuOH}$  1.29 ppm.

2.82 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ); 8.05 (s, 2H, Py).

MS (EI): 151 ( $\text{M}^+$ , 100); 134 ( $\text{M}^+ - \text{OH}$ , 7.2); 106 ( $\text{M}^+ - \text{CO}_2\text{H}$ , 16.4)

MA:  $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2 + 0.1\text{NaHSO}_4$  (163.16)

計算値: C 58.89 H 5.62 N 8.58 O 23.53

測定値: C 58.73 H 5.90 N 8.37 O 23.7

【0078】

4-メチル2,6-ジメチルイソニコチネート(3)

2gの2,6-ジメチルイソニコチン酸(2)(未精製)、100mlのメタノールおよび1mlの98%硫酸を24時間、還流する。冷却後、反応媒体を飽和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液で中和し、次いで、60mlの $\text{CHCl}_3$ で5回抽出する。次いで、合わせたクロロホルム相を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、次いで、濃縮する。次いで、得られる固体を50mlのエーテルで4回抽出し、その後、エーテル相を濃縮する。得られる白色残渣のアルミナ上でのクロマトグラフィー[勾配:クロロヘキサン/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50/50)~純 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ]により、1gの4-メチル2,6-ジメチルイソニコチネート(3)を得る。

【0079】

m.p.: 45~47

TLC: Rf : 0.3 [ $\text{SiO}_2 / \text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH}$  (97/3)]

HPLC: Tr: 2.4

UV:  $\text{CHCl}_3$ : 290.6 nm (3650)

NMR:  $^1\text{H}$   $\text{CDCl}_3$ ; 内部基準 TMS

2.59 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ); 3.93 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 7.51 (s, 2H, Py)

$^{13}\text{C}$   $\text{CDCl}_3$ ; 内部基準 77.0 ppm

24.5 ( $\text{CH}_3$ ); 52.5 ( $\text{OCH}_3$ ); 119.5 (Ct); 137.9, 158.9 (Cq); 166.1 (C=O).

MS (EI): 165 ( $\text{M}^+$ , 24); 134 ( $\text{M}^+ - \text{OCH}_3$ , 13); 106 ( $\text{M}^+ - \text{CO}_2\text{Me}$ )

【0080】

4-メチル-2,6-ジプロモメチルイソニコチネート(4)

120mlの $\text{CCl}_4$ 中1.372g(8.3mmol)の(3)、60mgのAIBNおよび2.866g(16.1mmol)のNBSの混合物を、窒素大気下および100Wランプによる照射下で8時間還流する。次いで、反応媒体を室温に戻し、その後、該媒体を200mlの飽和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液で洗浄する。下相( $\text{CCl}_4$ )を取り出した後、水相を50mlの $\text{H}_2\text{O}$ で4回抽出し、次いで、合わせた有機相を100mlの $\text{H}_2\text{O}$ で洗浄し、乾燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )し、次いで、乾固するまで濃縮する。得られた残渣をシリカ上でのクロマトグラフィー[勾配:シクロヘキサン- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (80/20)~純 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ]によって精製すると、ポリプロモ種、対称および非対称ジプロモ誘導体の異性体混合物からおよび形成されたモノプロモ種からも、プロモ誘導体(4)の第1の画分を分離することが可能である。

【0081】

より大量のメチル-2,6-ジプロモメチルイソニコチネートを にするために、上記で単離されたモノプロモ化合物[0.543g(2.2mmol)]を0.4g(2.2mmol)のNBS、23mgのAIBNおよび50mlの $\text{CCl}_4$ と混合し、次いで、上記の臭素化条件下で処理して、(4)の第2の画分を得る。

【0082】

最後に、ジプロモ異性体(上記で単離された2つの反応物)の混合物をシリカ上でのクロ

10

20

30

40

50

マトグラフィー [ 勾配 : 純シクロヘキサン ~ シクロヘキサン / EtOAc ( 85 / 15 ) ] によって精製すると、( 4 ) の最終画分 ( 即ち、合計で 596 mg ( 22% ) ) が得られる。

## 【 0083 】

m . p . : 90 ~ 92

TLC : Rf : 0 . 6 ( SiO<sub>2</sub> / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> )

HPLC : Tr : 20分5秒

UV : CHCl<sub>3</sub> : 290 . 8 nm ( 4270 ) ; 240 . 3 nm ( 3010 )

NMR : <sup>1</sup>H C D C l<sub>3</sub> ; 内部基準 TMS

3 . 98 ( s , 3 H , CH<sub>3</sub> ) ; 4 . 58 ( s , 4 H , CH<sub>2</sub> ) ; 7 . 92 ( s , 2 H , Py )

<sup>13</sup>C C D C l<sub>3</sub> ; 内部基準 77 . 0 ppm

32 . 8 ( CH<sub>2</sub> ) ; 52 . 9 ( OCH<sub>3</sub> ) ; 122 . 2 ( Ct ) ; 139 . 8 , 157 . 9 ( Cq ) ; 164 . 7 ( C = O ) .

MS ( EI ) : 322 . 9 ( M<sup>+</sup> , 15 ) ; 243 . 9 ( M<sup>+</sup> - Br , 100 ) ; 163 ( M<sup>+</sup> - 2 Br , 15 . 7 ) .

MA : C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> ( 322 . 98 )

計算値 : C 33 . 47 H 2 . 80 N 4 . 33 O 9 . 90

測定値 : C 33 . 69 H 2 . 81 N 4 . 29 O 10 . 17

## 【 0084 】

b ) 式 ( 6 ) のアルカリ金属クリプテート [ Na<sup>+</sup> bpy . bpy . pyCO<sub>2</sub>Me ] Br<sup>-</sup> の精製

400 ml の CH<sub>3</sub>CN 中 0 . 2 g ( 0 . 508 mmol ) のピピリジンマクロ環式ジアミン ( 5 ) ( J . Org . Chem . , 1983 , 48 , 4848 に記載されている ) および 0 . 376 g ( 5 . 08 mmol ) の Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> の混合物を窒素大気下で 40 分間、還流する。得られる懸濁液に、100 ml の CH<sub>3</sub>CN 中 0 . 165 g ( 0 . 508 mmol ) の 4 - メチル 2 , 6 - ジブプロモメチルイソニコチネート ( 4 ) を段階的 ( 2 時間 ) に添加する。添加終了時に、さらに 22 時間、同条件下で攪拌を継続し、次いで、反応媒体を氷浴上で冷却する。次いで、カルボネートを濾過により除去し、濾液をエバポレートして乾固する。得られた残渣をシリカ上でのクロマトグラフィー [ 勾配 : 10% MeOH を含有する CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ] によって精製すると、117 . 5 mg の化合物 ( 6 ) ( 35% ) が得られる。

## 【 0085 】

TLC : Rf : 0 . 4 [ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / CHCl<sub>3</sub> - MeOH ( 90 / 10 ) ]

HPLC : Tr : 4分1秒

UV : CHCl<sub>3</sub> : 246 nm ( 27950 ) ; 291 nm ( 27410 ) .

NMR : <sup>1</sup>H ( C D C l<sub>3</sub> ) ; 内部基準 TMS .

3 . 94 ( s , 3 H , CH<sub>3</sub> ) ; 4 . 00 ( d , J = 15 Hz , AB , 4 H , CH<sub>2</sub> ) ;

4 . 08 ( d , J = 14 . 7 Hz , AB , 4 H , CH<sub>2</sub> ) ; 4 . 09 ( s , 4 H , CH<sub>2</sub> ) ;

7 . 39 - 7 . 42 ( m , 4 H , BPy ) ; 7 . 77 ( s , 2 H , Py ) ; 7 . 85 - 7 . 89 ( m , 8 H , BPy ) .

<sup>13</sup>C ( C D C l<sub>3</sub> ) ; 内部基準 77 ppm .

52 . 9 ( CH<sub>3</sub> , CO<sub>2</sub>Me ) ; 59 . 4 ( CH<sub>2</sub> ) ; 59 . 5 ( CH<sub>2</sub> ) ;

Ct ( 119 . 9 ; 122 . 1 ; 123 . 4 ; 138 . 8 )

Cq ( 139 . 2 ; 154 . 6 ; 158 . 5 ; 159 . 6 ) ; 165 . 3 ( CO<sub>2</sub>Me )

。

MS ( FAB<sup>+</sup> ) : チオグリセロールマトリックス。

578 . 2 ( リガンド - Li<sup>+</sup> + Na<sup>+</sup> , 100% ) ; 556 . 2 ( リガンド - Li<sup>+</sup> + H , 10% ) .

10

20

30

40

50

チオグリセロールマトリックス + 1% TFA

578 (リガンド -  $\text{Li}^+$  +  $\text{Na}^+$ , 20%) ; 556.1 (リガンド -  $\text{Li}^+$  + H, 100%)。

MA :  $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_2\text{NaBr}$ ,  $3\text{H}_2\text{O}$  (712.53)。

計算値 : C 55.62 H 4.95 N 13.76

測定値 : C 55.93 H 4.73 N 13.61

【0086】

実施例2 : ユロピウムクリプテートの調製

実施例(1)のリガンド(6)の  $[\text{Eu}^{3+} \text{ bpy} \cdot \text{bpy} \cdot \text{pyCO}_2\text{Me}] \text{Cl}^-$

10

11.8 mg の  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $3.22 \times 10^{-5}$  mol) を、5 ml の無水メタノールに含有する 20.2 mg ( $2.84 \times 10^{-5}$  mol) のマクロ二環(6)に添加する。得られる均質な混合物を窒素大気下で23時間、還流する。次に、室温に冷却して、4 ml のエーテルをこの溶液に添加すると、14.2 mg (52%) のユロピウムクリプテートの結晶が生じる。

【0087】

HPLC : Tr : 14.1

UV :  $\text{H}_2\text{O}$  : 250 nm (18270) ; 309 nm (24400)。

MS (FAB<sup>+</sup>) : ニトロベンジルアルコールマトリックス

778 [ $(\text{Eu}^{3+} \text{ L} + 2\text{Cl}^-)^+$ , 40%] ; 743 [ $(\text{Eu}^{2+} \text{ L} + \text{Cl}^-)^+$ , 90%]

20

707 [ $(\text{Eu}^{3+} \text{ L} - 2\text{H})^+$ , 100%]

MA :  $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_2\text{EuCl}_3$ ,  $0.13\text{EuCl}_3$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $2\text{CH}_3\text{OH}$  (1014.51)

計算値 : C 41.43 H 3.67 N 9.66

測定値 : C 41.23 H 3.95 N 9.63

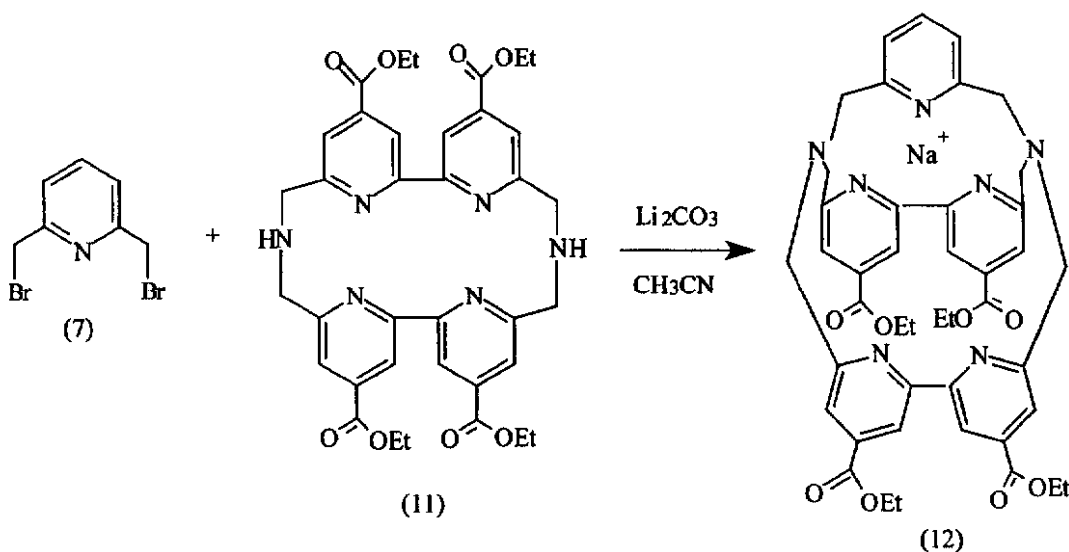
【0088】

実施例3 : 式(12)  $\text{Py} \cdot \text{Bpy}(\text{CO}_2\text{Et})_2 \cdot \text{Bpy}(\text{CO}_2\text{Et})_2$  のマクロ二環の調製

本化合物は、以下に示すスキームに従って調製される。

30

【化24】



40

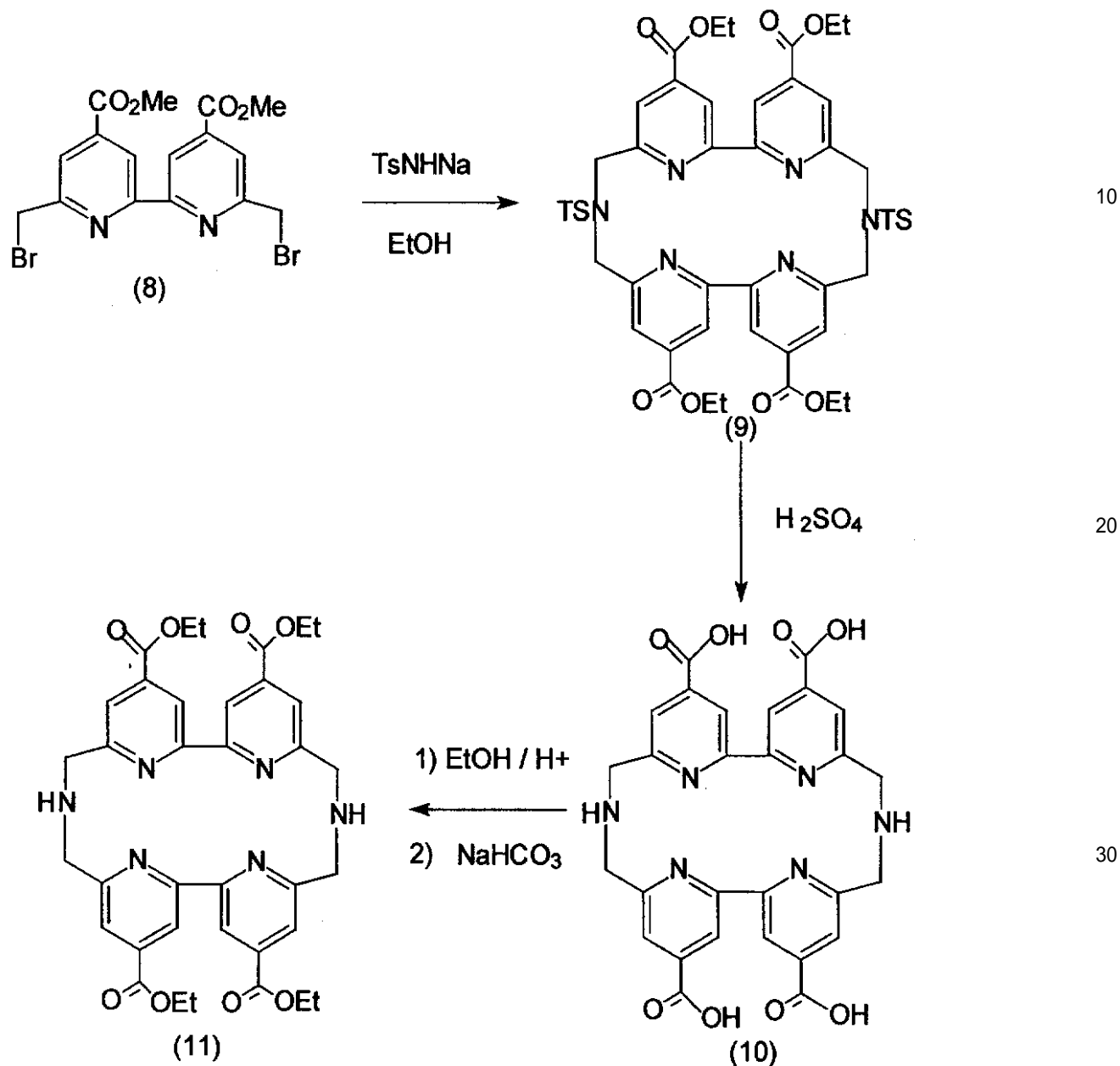
【0089】

a) 式(11)のマクロ環の調製

50

以下の反応系列によって、bpy・bpyジアミンテトラエステルマクロ環(11)が得られる。

【化25】



【0090】

トシルbpy・bpyテトラエステルマクロ環(9)  
 5.5 g (12 mmol) の 6,6'-ジメチル2,2'-ジブromoメチル4,4'-ピ  
 ピリジンジカルボキシレート(8) (Helv. Chim. Acta, 1988,  
 71, 1042に記載されている)、4.64 g の新たに調製したトシルアミド(24 m  
 mol) のナトリウム塩および900 ml の無水エタノールの混合物を窒素大気下で26  
 時間、還流する。次いで、この溶液を1時間、氷浴上で冷却し、その後、該溶液を濾過す  
 る。次いで、単離した沈殿物を、700 ml の水、500 ml のエタノールおよび20 m  
 l のクロロホルムで洗浄して、1.88 g (31.6%) の(9)を得る。

【0091】

TLC:  $R_f$ : 0.7 [ $\text{SiO}_2 / \text{CHCl}_3 - \text{MeOH} (99/1)$ ]  
 HPLC:  $T_r$ : 36.1

10

20

30

40

50

MS (FAB)<sup>+</sup> : MNBAマトリックス

991 (M<sup>+</sup>, 45%) ; 835 (L-Tos, 12%)。

MA : C<sub>50</sub>H<sub>50</sub>O<sub>12</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> NaBr . (1094)

計算値 : C 54 . 89 H 4 . 6 N 7 . 68 S 5 . 86 Na 2 . 1

測定値 : C 55 . 66 H 4 . 64 N 7 . 75 S 6 . 04 Na 3 . 19

【0092】

Bpy . Bpy . テトラ酸マクロ環 (10)

1 ml の濃 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中 0 . 15 g (0 . 15 mmol) の トシルマクロ環 (9) の 溶液を窒素大気下で 3 時間、100 で加熱する。次いで、反応媒体を氷浴上で冷却し、5 ml の水を添加することによって希釈し、次いで、7 ml の 5 N NaOH を添加することによって pH 3 . 0 とする。次いで、形成した沈殿物を濾過によって除去し、水 (50 ml) で徹底的に洗浄し、次いで乾燥する。このようにして単離したテトラ酸マクロ環 (10) (おそらくアミン塩の形態) は、次の工程では更なる精製を行うことなく使用する。

10

【0093】

Bpy . Bpy . ジアミンテトラエチルエステルマクロ環 (11)

100 ml の無水エタノールおよび 0 . 5 ml の濃 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中 53 mg の化合物 (10) の懸濁液を、窒素大気下で 28 時間、還流する。次いで、得られる均質な溶液を、順次、氷浴上で冷却し、飽和 NaCO<sub>3</sub> 溶液で中和し、80 ml の CHCl<sub>3</sub> で処理 (4 × 20) して、60 mg の化合物 (11) を得る (定量的)。

20

【0094】

TLC : Rf : 0 . 7 [ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - MeOH (80 / 20) ]

HPLC : Tr : 17 . 2

UV : CHCl<sub>3</sub> : 243 . 1 nm (24150) ; 303 . 2 nm (25210) 。

NMR : <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) ; 内部基準 TMS 。

1 . 44 (t, J = 7 . 0 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>) ; 2 . 29 (s, ブロード, NH) ;

4 . 17 (s, 8H, CH<sub>2</sub>)

4 . 39 (q, J = 6 . 9 Hz, 8H, CH<sub>2</sub> エステル) ; 7 . 43 (d, J = 1 . 4 Hz, 4H, BPy) ;

8 . 29 (d, J = 1 . 1 Hz, 4H, BPy) 。

<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) ; 内部基準 77 . 0 ppm 。

30

14 . 9 (CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 56 . 8 (CH<sub>2</sub>) ; 62 . 3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ;

Ct (119 ; 122 . 5) ; Cq (138 . 9 ; 158 . 9 ; 161 . 4) ; 165 . 7 (CO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)

MS (FAB<sup>+</sup>) : チオグリセロールマトリックス

683 (M<sup>+</sup>, 100)

MA : C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>, H<sub>2</sub>O (700 . 74)

計算値 : C 61 . 7 H 5 . 75 N 11 . 99

測定値 : C 62 . 2 H 6 . 01 N 11 . 48

【0095】

40

b) 式 (12) [ Na<sup>+</sup> Py . Bpy (CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub> . Bpy (CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub> ] Br<sup>-</sup> のアルカリ金属クリプテートの調製

360 ml の無水 CH<sub>3</sub>CN 中 180 . 7 mg (0 . 265 mmol) のマクロ環式ジアミン (11) および 195 . 5 mg (2 . 65 mmol) の Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> の混合物を窒素大気下で 35 分間、還流する。得られた懸濁液に、360 ml の無水 CH<sub>3</sub>CN 中 70 . 7 mg (0 . 267 mmol) の 2,6-ジプロモメチルピリジン (7) を徐々に (5 時間) 添加する。還流を 72 時間、維持し、次いで、反応媒体を氷浴上で冷却する。不溶性のカルボネートを濾過した後、濾液をエバポレートして乾固する。得られた残渣固体を、溶出液として CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / EtOH (99 / 1 ~ 85 / 15) を有するアルミナのカラム上でクロマトグラフィーし、78 mg の (12) (33%) を得る。

50

## 【0096】

TLC: Rf = 0.6 [Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / CHCl<sub>3</sub> - MeOH (90 / 10)]

HPLC: Tr = 20.8

UV: CHCl<sub>3</sub>: 250 nm (24900); 316 nm (18900)

NMR: <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>); 内部基準 TMS

1.45 (t, J = 7.1 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>); 4.07 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); 4.14

(d, J = 15.4 Hz, AB, 4H, CH<sub>2</sub>); 4.22 (d, J = 15.3 Hz, AB, 4H, CH<sub>2</sub>);

4.46 (q, J = 7 Hz, 8H, CH<sub>2</sub> エステル); 7.27 (d, J = 7.7 Hz, 2H, Py);

7.66 (t, j = 7.7 Hz, 1H, Py); 7.93 (s, 4H, Bpy); 8.42 (s, 4H, Bpy)。

<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>); 内部基準 77 ppm。

14.3 (CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> Et); 59.4 (CH<sub>2</sub>); 59.5 (CH<sub>2</sub>); 62.5 (CH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> Et);

Ct (119.3; 122.8; 123; 138.1); Cq (140.5; 155.1; 157.8; 160.1);

164.5 (CO<sub>2</sub> Et)。

MS: (FAB+ / NBAマトリックス)

808.4 (リガンド - Li<sup>+</sup> + Na<sup>+</sup>, 100%); 663.3 (リガンド + Na<sup>+</sup> - 2CO<sub>2</sub> Et, 5%)。

MA: C<sub>43</sub>H<sub>43</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>NaBr, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (972.68)

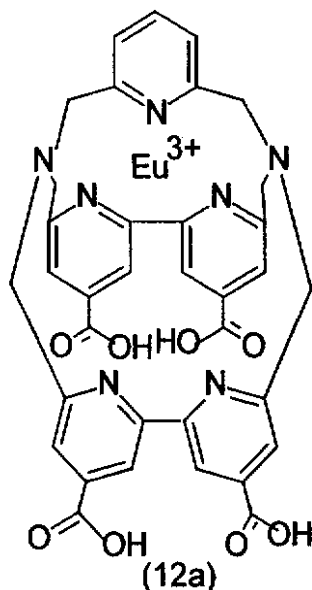
計算値: C 54.3 H 4.6 N 10

測定値: C 54.9 H 4.0 N 9.8

## 【0097】

実施例4: 式12a [Eu<sup>3+</sup> Py · Bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub> · Bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>] のユウロピウムクリプテートの調製

## 【化26】



## 【0098】

a) 実施例3のリガンド12のユウロピウム錯体の調製

[Eu<sup>3+</sup> Py · Bpy(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub> Bpy(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>]

32 ml の無水  $\text{CH}_3\text{CN}$  に含有される 69 mg ( $7.7 \times 10^{-5} \text{ mol}$ ) のナトリウムクリプテート (12) に 33 mg ( $9 \times 10^{-5} \text{ mol}$ ) の  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を添加する。得られる懸濁液を窒素大気下で 27 時間、還流し；冷却後、溶媒をエバポレートにより除去する。次に、得られた残渣の逆相クロマトグラフィーにより、25 mg のユウロピウムクリプテート [ $\text{Eu}^{3+}$  12] (25%) を得る。

【0099】

HPLC: Tr: 2.1

UV: EtOH / 330 nm (21000)

MS: (FAB<sup>+</sup>) チオグリセロールマトリックス

1164.2 [ $(\text{Eu}^{3+} 12 + 2\text{CF}_3\text{CO}_2^-)^+$ , 64%

1051.8 [ $\text{Eu}^{3+} 12 + \text{CF}_3\text{CO}_2^- + \text{H}$ ] 100%

937.4 [ $(\text{Eu}^{2+} 12 - 1\text{H})$  35%]

【0100】

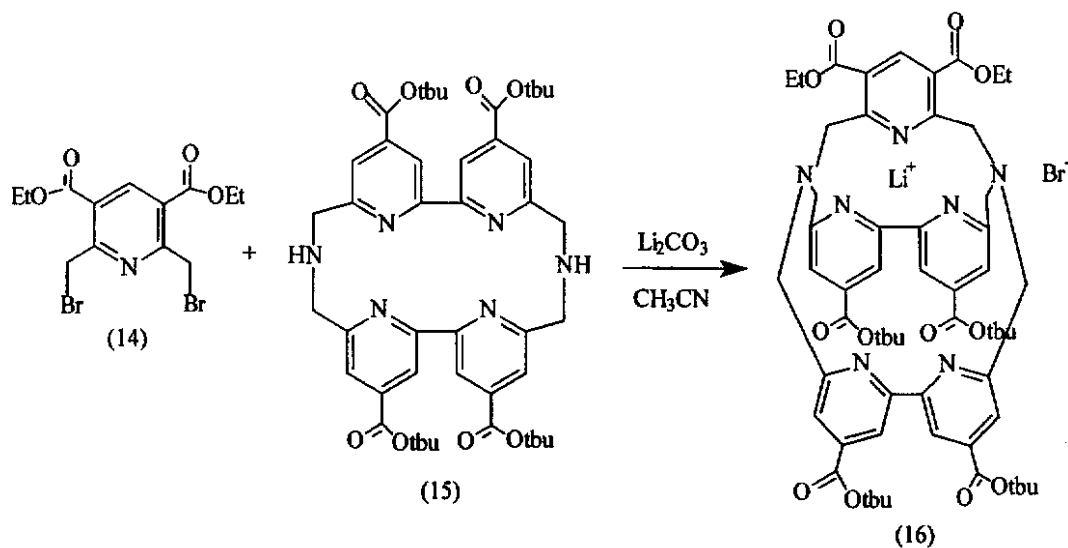
b) 式 12 a の酸クリプテートの調製

10 mg ( $7.83 \times 10^{-6} \text{ mol}$ ) のユウロピウムクリプテート [ $\text{Eu}^{3+}$  12] の水溶液に 100  $\mu\text{l}$  の 1.6 M 水酸化ナトリウム水溶液を添加する。得られる混合物を室温で 2 時間、撹拌し、次いで、乾固するまで蒸発させる。得られた残渣を、溶出液として 1% TFA /  $\text{CH}_3\text{CN}$  を含有する  $\text{H}_2\text{O}$  でクロマトグラフィーし、8 mg (定量的) の式 12 a のユウロピウムクリプテートを得る。

【0101】

実施例 5: 式 (16) のピリジンジエチルビスピリジンテトラ-tert-ブチルエステルマクロ二環の調製

【化 27】



【0102】

a) 式 (14) のジエチル 2,6-ジブromoメチル-3,5-ピリジンカルボキシレートの調製

本化合物は、市販のジエチル 2,6-ジメチル-3,5-ピリジンカルボキシレートから出発する従来のフリーラジカル臭素化手順によって合成する。

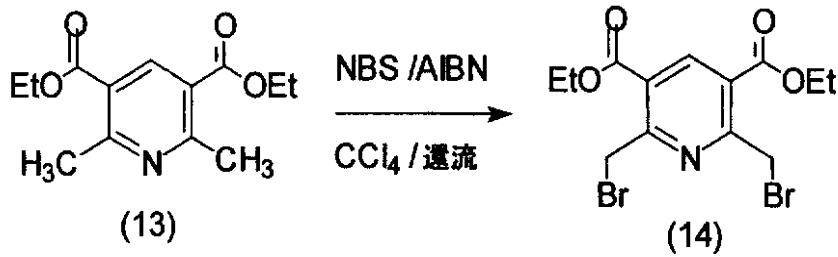
【化 28】

10

20

30

40



## 【0103】

20 ml の四塩化炭素中 0.5 mg (2 mmol) の 2,6-ジエチル 3,5-ジメチルピリジンカルボキシレート、0.89 mg (5 mmol) の NBS および 4 mg の AIBN の混合物を、100 W 可視ランプによる照射下で 2 時間還流する。次に、懸濁液を氷浴上で冷却し、次いで、形成したスクシンイミドを取り出すために濾過する。次いで、濾液を濃縮して乾固し；得られた残渣をシリカ上で溶出液としてヘキサン/クロロホルム混合液（勾配：50/50 ~ 30/70）によってクロマトグラフィーすることにより、195 mg の式 (14) のプロモ誘導体 (26%) を得る。

## 【0104】

TLC : R<sub>f</sub> = 0.4 (SiO<sub>2</sub> / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

HPLC : Tr = 25.5

UV : CHCl<sub>3</sub> / 245 nm (9400)

NMR : <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) ; 内部基準 TMS

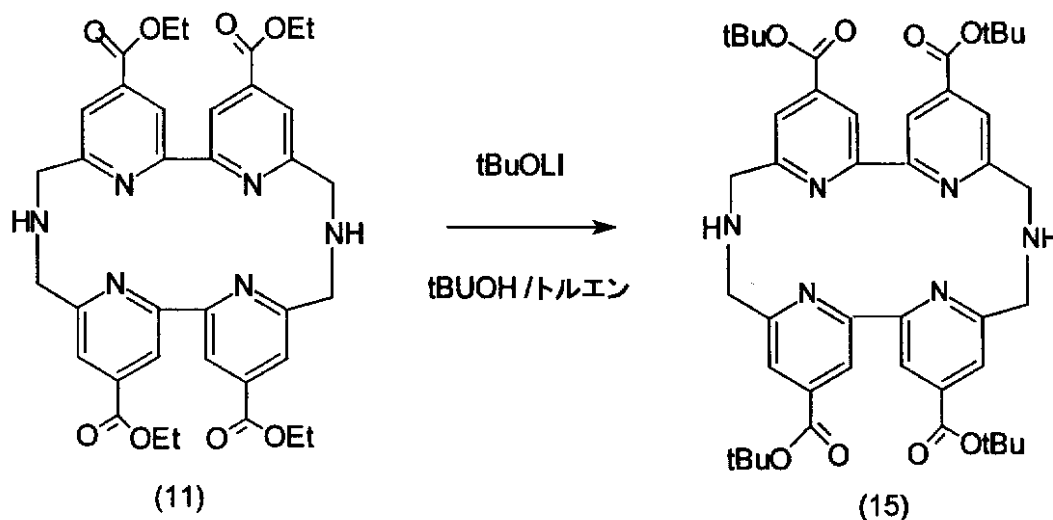
1.45 (t, J = 7.0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>) ; 4.47 (q, J = 7.2 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>) ;

5 (s, 4H, CH<sub>2</sub>Br) ; 8.80 (s, 1H, Py) .

## 【0105】

b) 式 (15) のジアミンビスピリジンテトラ-tert-ブチルエステルマクロ環の調製

## 【化29】



## 【0106】

本化合物は、リチウム tert-ブトキシドおよび実施例 3 のマクロ環 (11) から出発する簡単なエステル交換反応により合成する。

## 【0107】

10

20

30

40

50

251 mg のマクロ環 (11) (0.36 mmol)、363 mg (4.5 mmol) のリチウム tert - ブトキシド、35 mg の乾燥トルエンおよび 35 ml の乾燥 tert - ブタノールの混合物を、窒素流下、80 で約 3 時間、加熱する。冷却後、tert - ブタノールをエバポレーションにより取り出し、まず、残渣の有機相を水で洗浄して中性の pH とし (6 × 50 ml)、次いで、順次、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、濃縮して乾固する。得られた残渣を、溶出液として CH<sub>3</sub>CN および 1% TFA を含有する H<sub>2</sub>O による逆相クロマトグラフィーにかけることにより、117 mg のマクロ環 (15) (40%) を得る。

## 【0108】

HPLC: Tr = 22.4

10

UV: CHCl<sub>3</sub> / 311 nm (18000); 280 nm (8300);  
268 nm (7200)

NMR: <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>); 内部基準 TMS

1.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.69 (s, 8H, CH<sub>2</sub>);

7.97 (s, 4H, H, bpy);

8.51 (s, 4H, H bpy)。

MS: (ES) 796 (M+H)。

## 【0109】

c) 式 (16) [Li<sup>+</sup> bpy(CO<sub>2</sub>tbu)<sub>2</sub> · bpy(CO<sub>2</sub>tbu)<sub>2</sub> · Py(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>]Br<sup>-</sup> のアルカリ金属クリプテートの調製

20

25 ml の無水 CH<sub>3</sub>CN 中 25.3 mg (3.18 × 10<sup>-5</sup> mol) のマクロ環 (15) および 27 mg (3.65 × 10<sup>-4</sup> mol) の Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を、窒素流下で 15 分間、還流する。得られた懸濁液に、12 ml の無水 CH<sub>3</sub>CN 中 12.7 mg (3.1 × 10<sup>-5</sup> mol) の 2,6 - ジエチル 3,5 - ジブロモメチルピリジンカルボキシレート (14) の溶液を 10 分間に段階的に添加する。これらの条件下で 23 時間、攪拌を継続し、次いで、反応媒体を氷浴上で冷却し、その後、該媒体を濾過する。濾液をエバポレートして乾固した後、得られた残渣の逆相クロマトグラフィーにより、12 mg (35%) のマクロ二環 (16) を得る。

## 【0110】

HPLC: Tr = 28.5

30

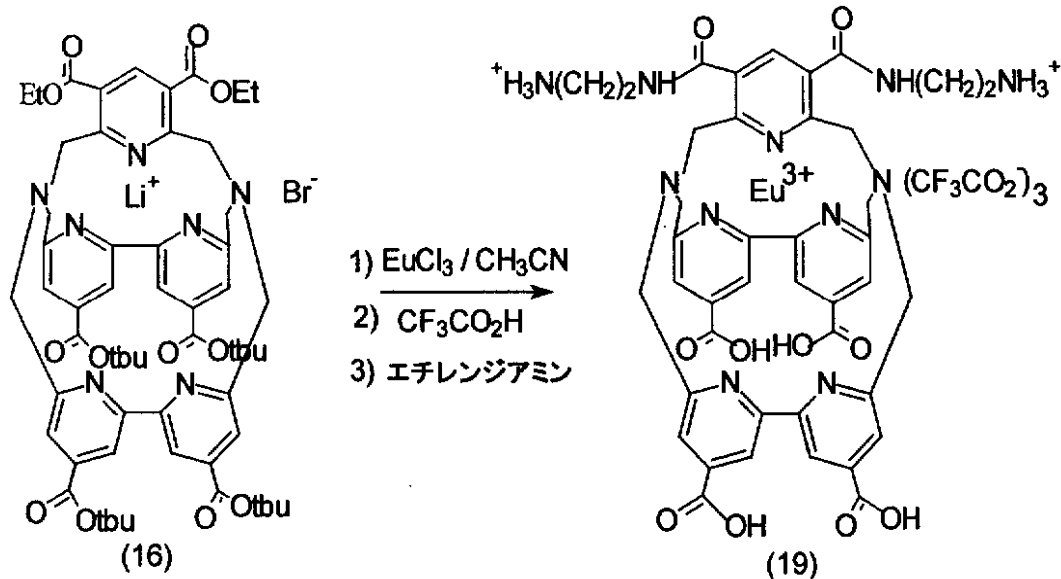
MS: (ES) 1042.3 [リガンド - Li<sup>+</sup> - Br<sup>-</sup> (100%)];

1064.3 [リガンド - Li<sup>+</sup> - Br<sup>-</sup> + Na<sup>+</sup> (30%)]

## 【0111】

実施例 (6): 式 (19) [Eu<sup>3+</sup> bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub> · bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub> · Py(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] のユウロピウムクリプテートの調製

## 【化30】



10

## 【0112】

a) 実施例(6)のリガンドのユウロピウム錯体  $[\text{Eu}^{3+} \text{ bpy}(\text{CO}_2\text{tbu})_2 \cdot \text{bpy} \cdot (\text{CO}_2\text{tbu})_2 \cdot \text{Py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]$  (16) のリチウムクリプテート(16)に12.8mg ( $3.5 \times 10^{-5} \text{ mol}$ )の  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を添加する。次いで、窒素流下で反応媒体を3時間、還流する。冷却後、溶媒をエバポレートにより除去し、得られた残渣 ( $m = 27.6 \text{ mg}$ ) は、以下の工程でさらなる精製を行うことなく使用する。

## 【0113】

b) 酸ユウロピウムクリプテート  $[\text{Eu}^{3+} \text{ bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{Py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]$  (19) の調製  
 本反応は、純トリフルオロ酢酸での処理によってピピリジンサブユニットにより tert-ブチルエステル骨格を選択的に加水分解することから成る。

## 【0114】

実施例6の段落a)で得られた残渣の27.6mgを14mlのトリフルオロ酢酸に溶解する。得られた均質な溶液を室温で4時間攪拌し、次いで、減圧下でエバポレートすることにより、乾固するまで濃縮する。溶出液として1% TFA /  $\text{CH}_3\text{CN}$  を含有する  $\text{H}_2\text{O}$  の混合物で逆相クロマトグラフィーを行うことにより、10.4mgのユウロピウムクリプテート  $[\text{Eu}^{3+} \text{ bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{Py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]$  (19) が得られる。

## 【0115】

HPLC: Tr = 13.7  
 UV: MeOH / 324.6 nm (16000); 337 nm (13300)

## 【0116】

c) 式(19)のユウロピウムクリプテートの調製  
 2mlの無水MeOH中10mg ( $8.03 \times 10^{-6} \text{ mol}$ )のユウロピウムクリプテート  $[\text{Eu}^{3+} \text{ bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{Py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]$  の溶液に、300  $\mu\text{l}$  の無水MeOH中300  $\mu\text{l}$  のエチレンジアミン ( $4.45 \times 10^{-3} \text{ mol}$ ) の溶液を5分間、氷浴上で冷却しながら窒素流下で添加する。次いで、媒体の温度を徐々に20℃まで上昇させ、続いて、これらの条件下で2.5時間、攪拌する。溶媒をエバポレートして除去した後、得られた残基を、溶出液として1% TFA /  $\text{CH}_3\text{CN}$  を含有する  $\text{H}_2\text{O}$  の混合物で逆相クロマトグラフィーにかけることにより、5.5

40

50

mg のクリプテート ( 19 ) ( 45% ) を得る。

【 0117 】

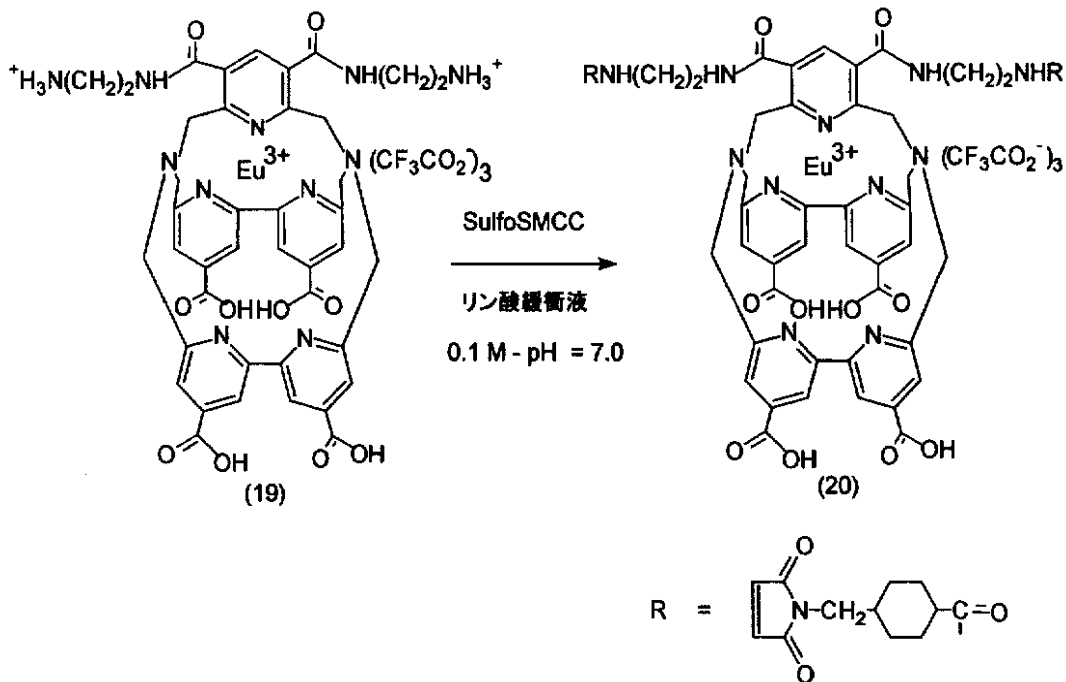
UV : MeOH / 325 nm ( 17000 )

【 0118 】

実施例 7 : 式 ( 20 ) のユウロピウムクリプテートの調製

本化合物は、以下に示すスキームに従って調製する。

【 化 31 】



10

20

【 0119 】

氷浴上で冷却した 200  $\mu$ l の 0.1 M pH 7.0 リン酸緩衝液中 0.2 mg (  $1.28 \times 10^{-7}$  mol ) の化合物 ( 19 ) の溶液に、168  $\mu$ l のリン酸緩衝液中 195  $\mu$ g (  $4.45 \times 10^{-7}$  mol ) の sulfoSMCC を 45 分間で段階的に添加する。添加の終了時に、媒体の温度を 20 ~ 25 に保持し、これらの条件下で 3 時間、反応を継続させる。次に、溶出液として 1% TFA / CH<sub>3</sub>CN を含有する H<sub>2</sub>O の混合物で逆相クロマトグラフィーにかけることにより直接精製し、100  $\mu$ g のクリプテート ( 20 ) ( 50% ) を得る。

30

【 0120 】

実施例 8 : 式 ( 20 ) の化合物とタンパク質との結合

a) タンパク質の活性化

2 mg / ml の SPDP エタノール溶液を 26.2  $\mu$ l 添加することにより ( 初期の試薬 / タンパク質のモル比 : 8 )、3.14 mg ( 4.43 mg / ml ) の抗体 ( PSA なし、クローン A455、CIS bio international, France ) を、0.1 M pH 7.0 リン酸緩衝液中、室温で 30 分間活性化する。この期間の終了時に、反応媒体に、0.1 M pH 7.0 リン酸緩衝液中 61.7 mg / ml のジチオスレイトール ( DTT ) 溶液を 37  $\mu$ l 添加し、室温で 15 分間、インキュベートすることによって、チオール基 ( SH ) を作製する。次に、活性化中に使用した緩衝液を溶出液として使用して Sephadex G25 HR10 - 10 カラム上で混合物を精製する。

40

【 0121 】

b) 活性化したタンパク質と式 ( 20 ) のクリプテートとの結合

0.1 M pH 7.0 リン酸緩衝液中 1 mg / ml を含有する式 ( 20 ) のクリプテート

50

の溶液の  $55 \mu\text{l}$  を、実施例 8 の段落 a ) に記載の手順によって活性化した  $386 \mu\text{l}$  の抗体 A 4 5 5 溶液 (同緩衝液中  $1.2 \text{ mg/ml}$ ) に添加し、続いて、4 で 20 時間、インキュベートし、この期間の終了時に、結合反応用の緩衝液を溶出液として使用して Sephadex G 25 HR 10 - 30 カラム上で反応混合物を精製する。280 nm および 325 nm での抗体 - クリプテート複合体の吸光度測定により、8.0 の標識化の程度および 80% の収率を得る。

## 【0122】

実施例 9 : 血清中における実施例 2、4 (b)、6 (c)、7 および 8 のピリジンクリプテートの消光の感度が低いことの実証

以下の決定は、Perkin-Elmer LS 50 分光光度計によって行った。

10

## 【0123】

試験したクリプテートの蛍光寿命の測定は、欧州特許 EP 0 601 113 号に開示されている手順に従って行った。

## 【0124】

化合物は、 $0.1 \text{ M}$  pH 7.0 リン酸緩衝液および仔ウシ血清 (NCS) 中で試験した。緩衝液のみかまたは 2/3 緩衝液 ~ 1/3 血清の混合物でストック溶液を 1/100 に希釈することによって、約  $10^{-6} \text{ M/I}$  のクリプテート濃度を測定するための溶液を調製した。

## 【0125】

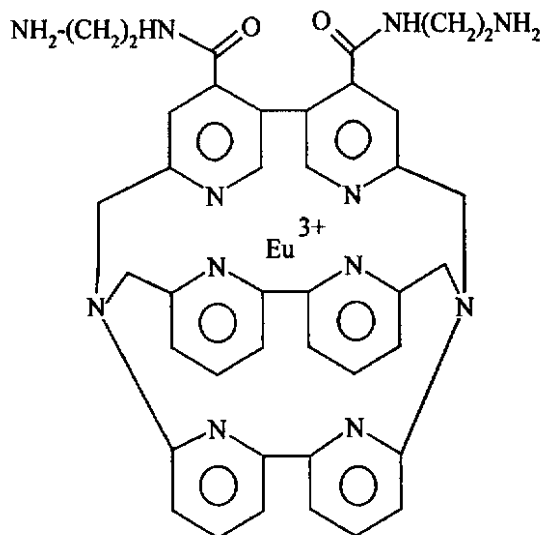
実施例 2、4 (b)、6 (c)、7 および 8 のピリジンクリプテートは、トリスビスピリジンジアミンクリプテート ( $\text{KNH}_2$ ) およびピリジン - ビスピリジンクリプテート [ $\text{Eu}^{3+} \text{Cpy} \cdot \text{Bpy} \cdot \text{Bpy}$ ] と比較して試験したが、それらの調製については、それぞれ欧州特許 EP 0 321 353 号および Helv. Chim. Acta, 1988, 71, 1042 に記載されている。

20

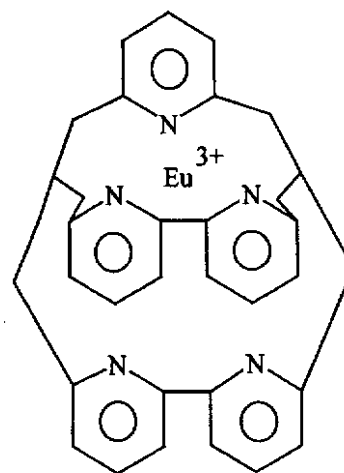
## 【0126】

これらの 2 つの分子の式を以下に示す：

## 【化 3 2】



KNH2

[Eu<sup>3+</sup>CPy.Bpy.Bpy]

30

40

## 【0127】

結果を以下の表 1 に示す。

## 【0128】

## 【表 1】

50

表1

試験錯体	$\tau_{\text{PO}_4^{3-}}$ 緩衝液 (ms)	$\tau_{\text{血清}}$ (ms)	消光 $1 - \left( \frac{\tau_{\text{血清}}}{\tau_{\text{PO}_4^{3-}}} \right) \%$
$\text{KNH}_2$	0.6	0.15	75 %
実施例 2 マクロ二環 6	1.06	0.80	25%
実施例 4(b) マクロ二環 12	1.03	0.90	13%
実施例 6 マクロ二環 19	1.03	0.90	13%
実施例 7 マクロ二環 20	1.01	0.89	12%
実施例 8 抗体-クリプテート複合体	0.95	0.86	9.5%
[Eu <sup>3+</sup> +C Bpy.Bpy.py]	0.66	0.54	18%

10

20

表 1

【 0 1 2 9 】

これらの結果は、トリスビスピリジンクリプテート構造において、ピピリジン単位をピリジン単位に置き換えると、血清により生じる蛍光消光を減少する効果をもたらすことを示す。これらの結果はまた、ピピリジン単位上にカルボン酸基が存在すると、消光の減少に好ましい影響を及ぼすことを実証する。

30

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/96877 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/58
- (21) International Application Number: PCT/EP01/06642
- (22) International Filing Date: 12 June 2001 (12.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00/07650 15 June 2000 (15.06.2000) FR
- (71) Applicant (for all designated States except US): CIS BIO INTERNATIONAL [FR/FR]; RN 306, F-91400 Saclay (FR).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): AUTIERO, Hervé [FR/FR]; 18 boulevard Gambetta, F-30400 Villeneuve les Avignon (FR). BAZIN, Hervé [FR/FR]; 14, allée de la Chemie, F-30400 Villeneuve Les Avignon (FR). MATHIS, Gérard [FR/FR]; 17, impasse Capelle des Ladres, F-30200 Bagnols sur Cèze (FR).
- (74) Agents: GILLARD, Marie-Louise et al.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/96877 A2

(54) Title: NOVEL RARE EARTH METAL CRYPTATES WHICH ARE NOT VERY SENSITIVE TO THE FLUORESCENCE QUENCHING

(57) Abstract: The invention relates to a process for reducing the fluorescence quenching caused by the measuring medium in a fluorescence assay, by introducing into said medium of rare earth metal cryptates comprising at least one pyridine radical which is substituted one or more times or unsubstituted. The invention also relates to novel rare metal cryptates which are not very sensitive to the fluorescence quenching caused by the measuring medium.

Novel rare earth metal cryptates which are not very sensitive to the fluorescence quenching.

The invention relates to a process for reducing the fluorescence quenching caused by the measuring medium in a fluorescence assay, by introducing into said  
5 medium rare earth metal cryptates which are not very sensitive to this fluorescence quenching.

The invention also relates to novel rare earth metal cryptates which are not very sensitive to the fluorescence quenching caused by the measuring medium.

The advancement of knowledge in biology is creating an increasing need  
10 for diagnostic methods enabling biomolecules to be monitored or quantified.

At the same time, there is disaffection toward the radioactive labels which are generally involved in reference assay methods. In general, efforts are currently directed toward replacing radioactive tracers with other labels and mainly with fluorescent labels. The use of fluorescent labels under ideal conditions makes it  
15 possible to obtain high sensitivities that are theoretically equivalent to those obtained with radioactive tracers.

Many fluorescent molecules which may be used as tracers in assays of this type have previously been described, among which rare earth metal complexes have advantageous properties.

The use of particular complexes, rare earth metal cryptates, is disclosed for  
20 example in patent applications EP 0 180 492 and EP 0 321 353.

In practice, the performance qualities of fluorescent tracers are limited firstly by the presence of a background noise which is often high, and secondly by the fact that they are generally very sensitive to changes in their environment. Small  
25 changes in the pH, the polarity, the presence of dissolved oxygen or the proximity of heavy atoms (for example iodine) or absorbing groups can modify their quantum yield (in the sense of an excitement or a quenching) or shift the emission wavelength.

The problems inherent in the methods of analysis by measuring the  
30 fluorescence are listed in a review article (I. Hemmiä, Clin. Chem. 31/3, 359-370 (1985)).

The problems inherent in the background noise arising from the intrinsic fluorescence of proteins and also of other biomolecules present in biological samples may be partially solved by using fluorescent labels formed from of rare  
35 earth metal complexes (mainly europium) which allow a temporal selection of the specific signal. The particularly long lifetimes (0.1 ms to 1 ms approximately) which

characterize europium complexes make it possible, by means of a resolved-time measurement, to be free of the background noise arising, for example, from the serum proteins, this noise being characterized by a relatively short lifetime (about 4 ns).

5 A format of homogeneous type has the considerable advantage of allowing real-time monitoring of the kinetics of formation of an immunological complex, but does not, however, make it possible to be free of any unfavorable interactions between the label and the molecules present in a biological medium (quenching of the fluorescence).

10 A restoration of the photophysical properties, and in particular the lifetime, may be obtained in a serum medium by adding fluoride ions to the medium, as disclosed in the patent application EP 0 539 435.

Nevertheless, the problems of interference caused by the molecules present in the measuring medium are not fully solved by any of these methods. The reason for this is that a major cause of limitation of the sensitivity of the measurement by fluorescence is the existence of quenching processes caused by molecules present in the medium which are capable of inhibiting the fluorescence of the fluorescent molecule used as label in the assay. In the case of rare earth metal complexes, the quenching may be the result of mechanisms of electron transfer by proximity, in which the inhibitor molecule occupies the free coordination sites in the complex. Mention may be made in particular of the redox reactions taking place between the fluorescent molecule in its ground state or in its excited state and molecules present in the medium. These mechanisms are capable of appreciably modifying the emitted fluorescence.

25 The inhibition of fluorescence by mechanisms involving electron transfer and in general by quenching mechanisms is a severe indisposition in practice since the inhibitory factors may either be naturally present as components in the measuring medium (for example uric acid in serum) or else be added thereto as additives or stabilizers for the assay.

30 These inhibitors greatly impair the fluorescence of the label molecule. In particular, in the case of interfering redox reactions, passage from the oxidized state to the reduced state of a rare earth metal ion by means of a redox mechanism entails a reduction in the lifetime and a change in the emission spectrum of the complex containing it, such that the sensitivity of the measurement is greatly impaired.

35

Novel rare earth metal cryptates consisting of a rare earth metal salt complexed with a macropolycyclic compound comprising at least one molecular unit consisting of a pyridine have now been found, and show novel and unexpected photophysical properties.

5 It has also been found that these advantageous properties are observed when this macropolycyclic compound also comprises a molecular unit having a triplet energy which is higher than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion which is substituted with an electron-donating group.

10 One mechanistic hypothesis in this regard is that the replacement of a molecular unit of greater steric bulk with a pyridine reduces the cavity of the macrocycle and has an influence on the redox equilibrium of the rare earth metal ion by promoting its oxidized state.

The presence of an electron-donating group is also capable of influencing the redox potential of the rare earth metal ion.

15 The rare earth metal cryptates according to the invention thus have the advantageous property of being less sensitive, compared with corresponding cryptates not comprising a pyridine unit and/or a substitution with an electron-donating group, to the phenomenon of fluorescence quenching resulting from an interaction with molecules present in the medium.

20 This observation is of great interest since it enables fluorescence measurements to be performed in biological media without using an adjuvant such as fluoride ions.

25 The compounds according to the invention thus constitute novel labels, which may be coupled to a biological molecule having a recognition role and which may bind to a partner, while at the same time retaining their quenching-resistance properties.

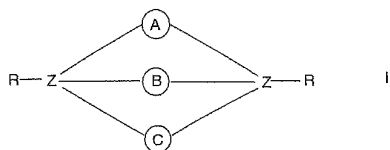
According to a first aspect, the invention thus relates to a process for reducing the fluorescence quenching caused by the measuring medium in a fluorescence assay of an analyte using at least one fluorescent label, characterized in that a rare earth metal macropolycyclic complex is introduced into the measuring medium, this complex consisting of at least one rare earth metal salt complexed with a macropolycyclic compound of formula

30

WO 01/96877

4

PCT/EP01/06642



in which Z is an atom with 3 or 4 valencies, R is nothing or represents hydrogen, a hydroxyl group, an amino group or a hydrocarbon radical, the divalent radicals (A), (B) and (C) are, independently of each other, hydrocarbon chains optionally  
 5 containing one or more hetero atoms and are optionally interrupted with a hetero macrocycle, at least one of the radicals (A), (B) and (C) also comprising at least one molecular unit or consisting essentially of a molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion, and at least one of the radicals (A), (B) and (C) which does not comprise or does  
 10 not consist essentially of said molecular unit comprises a pyridine radical which is substituted one or more times or unsubstituted.

When the macropolycyclic compound of formula (I) comprises a substituted pyridine radical, it may be substituted with one or more substituents, which may be identical or different, such as, for example, halogen, CN, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> carboxylic ester,  
 15 OH, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>NHCONH-aryl, -CH<sub>2</sub>NHCSNH-aryl, -NHCONH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, -NHCSNH-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl, -NHCONH-aryl, -NHCSNH-aryl, piperidyl, -N-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl-carboxypyridyl, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkylamino-alkylamine, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, alkenyl containing 2 to 10 carbon atoms, alkynyl containing 2 to 10 carbon atoms, cycloalkyl containing 3 to 8 carbon atoms, hydroxyalkyl containing 1 to 5 carbon atoms, alkoxy containing 1  
 20 to 10 carbon atoms, alkoxyalkyl containing 2 to 10 carbon atoms, alkoxyalkoxyalkyl containing 3 to 10 carbon atoms, alkoxyalkoxy containing 2 to 10 carbon atoms, alkenyloxy containing 2 to 10 carbon atoms, alkylthio containing 1 to 10 carbon atoms, alkylthioalkyl containing 2 to 10 carbon atoms, acylamino containing 1 to 7 carbon atoms, acylaminoalkyl containing 2 to 8 carbon atoms, carbamoylalkyl  
 25 containing 2 to 5 carbon atoms, alkylaminocarbonylalkyl containing 3 to 9 carbon atoms, amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkylcarboxamide, amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkylcarboxamido(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl and carboxy(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyl.

Preferably, a substituted pyridine will comprise one or 2 substituents. Substituents that are preferred for the purposes of the invention are, for example,  
 30 the following substituents: amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, in particular aminomethyl or aminoethyl; amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkylcarboxamide, in particular aminoethylcarboxamide,

phenylcarbamoyl; phenylthiocarbamoyl; nitrile; piperidyl; C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> carboxylic ester, in particular methylcarboxylate or ethylcarboxylate; amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkylcarboxamido(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, in particular aminocaproylamidomethyl and aminocaproylamidoethyl or carboxy (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyl.

5 In the present description, the term "analyte" means any substance or group of substances, as well as analogs thereof, which it is desired to detect and/or determine.

According to one preferred aspect of the process according to the invention, the two radicals  $\text{A}$ ,  $\text{B}$  or  $\text{C}$  which do not comprise or do not consist essentially of a molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion comprise a substituted or unsubstituted pyridine radical.

Advantageously, the molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion is substituted with an electron-donating group.

15 Preferably, the molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion is chosen from phenanthroline, anthracene, benzene, naphthalene, biphenyl, terphenyl, azobenzene, azopyridine, bipyridines and bisisoquinolines, bipyridines being preferred.

According to another preferred aspect of the process according to the invention, the bipyridine unit(s) is (are) substituted with an electron-donating group chosen in particular from the following groups: carboxylate, -NH<sub>2</sub>, -NHAlk, -N(Alk)<sub>2</sub>, OH, O<sup>-</sup>, -OAlk, Alk, -CH(Alk)<sub>2</sub>, -C(Alk)<sub>3</sub>, -NHCOAlk, substituted or unsubstituted phenyl; Alk being a (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl group.

When the phenyl is substituted, it may be substituted with one or more substituents, which may be identical or different, chosen, for example, from sulfonate, carboxylate, methylcarboxylate, N,N-dimethylamino, methoxyethylcarboxylate and carboxamide.

30 The carboxylate group is an electron-donating group which is particularly preferred for the purposes of the invention.

The term "carboxylate group" means the -COOH/-COO<sup>-</sup> couple: specifically, the macrocyclic complex may comprise during its synthesis a carboxylic acid group -COOH, this group being ionized, during its use in the measuring medium, to a carboxylate group -COO<sup>-</sup>.

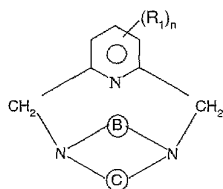
WO 01/96877

6

PCT/EP01/06642

According to one advantageous aspect of the process according to the invention, the macropolycyclic compound is composed of at least one rare earth metal salt complexed with a macrocyclic compound corresponding to formula (II) below:

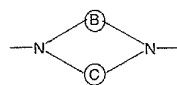
5



II

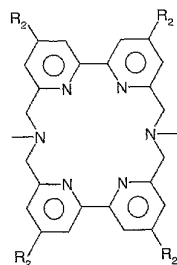
in which:

- the ring of formula



10

is the bis-bipyridine macrocycle of formula:



15

- n = 0, 1 or 2;

- A is a functional group capable of bonding covalently with a biological substance;

- R<sub>1</sub> is a group -COOR<sub>3</sub> in which R<sub>3</sub> is hydrogen or a C<sub>1</sub> to C<sub>10</sub> alkyl group and preferably represents a methyl, ethyl or tert-butyl group or R<sub>1</sub> is a group -CO-NH-Y-A or -Y-A;

5 - R<sub>2</sub> is hydrogen, an electron-donating group, in particular carboxylate, -NH<sub>2</sub>, -NHAlk, -N(Alk)<sub>2</sub>, OH, O<sup>-</sup>, -OAlk, Alk, -CH(Alk)<sub>2</sub>, -C(Alk)<sub>3</sub>, -NHCOAlk, substituted or unsubstituted phenyl; Alk being a (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl group or a group -CO-NH-Y-A or -Y-A, with the proviso that not more than one of the substituents R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> represents a group -CO-NH-Y-A or -Y-A and R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> do not simultaneously represent a group -CO-NH-YA or -Y-A;

10 - Y is a spacer group or spacer arm which consists of a divalent organic radical, chosen from linear or branched C<sub>1</sub> to C<sub>20</sub> alkylene groups optionally containing one or more double bonds and/or one or more heteroatoms such as oxygen, nitrogen, sulfur or phosphorus or one or more carbamoyl or carboxamido group(s); or else chosen from C<sub>5</sub> to C<sub>8</sub> cycloalkylene groups or from C<sub>6</sub> to C<sub>14</sub> 15 arylene groups, said alkylene, cycloalkylene or arylene groups being optionally substituted with alkyl, aryl or sulfonate groups.

In the present description, the expression "functional group capable of bonding covalently with a biological substance" denotes any functional group capable of bonding via a covalent bond, directly or after activation with at least one 20 of the functions naturally present or artificially introduced into said biological substance. Such functions are, in particular, NH<sub>2</sub>, COOH, SH and OH functions. Such groups and the activation processes are described in detail by P. Tijssen in "Practice and Theory of Enzyme immunoassays » Elsevier 1985.

25 As examples of functional groups that are suitable for the purposes of the invention, mention may be made in particular of amino, thio, cyano, isocyano, isothiocyano, thiocyano, carboxyl, hydroxyl, maleimido, succinimido, mercapto, phenol, imidazole, aldehyde, epoxide, halogen, thionyl, sulfonyl, nitrobenzyl, carbonyl, triazo, anhydride, haloacetate, hydrazino, acridine, etc. groups.

30 The groups that are particularly preferred are amino, thiol and carboxyl groups, which must be activated before the covalent coupling with the biological substance, and also maleimido, succinimido and isothiocyanate groups, which can bond directly with the biological substance.

The complexed rare earth metal ion is preferably a europium ion.

35 In the present description, the "cryptate" notion and the nomenclature of the macrocycles and polycycles are as defined by J.M. Lehn in Struct. Bonding (Berlin), 16, 1, 1973 and in Acc. Chem. Res. 11, 49, (1978).

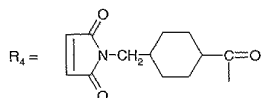
WO 01/96877

8

PCT/EP01/06642

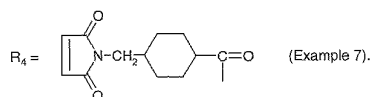
The following abbreviations have been used to denote the constituent molecular units of the macro(poly)cycles :

- 2,2'-bipyridine = bpy  
 pyridine = Py  
 4-methylisonicotinate = Py(CO<sub>2</sub>Me)  
 2,2'-bipyridine -4,4'-diethylcarboxylate = bpy(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>  
 2,2'-bipyridine -4,4'-di-tert-butylcarboxylate = bpy(CO<sub>2</sub>tbu)<sub>2</sub>  
 2,2'-bipyridine -4,4'-dicarboxylic acid = bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>  
 pyridine -3,5-diethylcarboxylate = Py(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>  
 3,5-bis[N-(2-aminoethyl)carboxamidyl]pyridine = Py(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>  
 3,5-bis[N-(4-maleimidomethylcyclohexylcarboxamido-2-ethyl)carboxamidyl]  
 pyridine = Py[CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHR<sub>4</sub>]<sub>2</sub>, in which



- 15 The rare earth metal macropolycyclic complexes that are particularly preferred for the purposes of the invention are the europium cryptates [Eu<sup>3+</sup>⊂ py.Bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.Bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>] (Example 4, b), [Eu<sup>3+</sup>⊂ bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.py(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] (Example 6) and [Eu<sup>3+</sup>⊂ bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.py(CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHR<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] in which

20



According to one preferred aspect of the process according to the invention, the rare earth metal macrocyclic complex is used as sole label or as one of the labels in the assay.

- 25 Advantageously, the measuring medium is a biological medium, in particular a serum medium.

The macro(poly)cyclic compounds which may be used in the process according to the invention are prepared according to known processes. The preparation of the bipyridine macrocycle passing via a tosyl intermediate is

WO 01/96877

9

PCT/EP01/06642

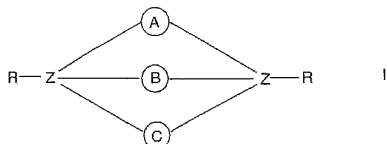
described in particular in J. Org. Chem. 1983, 48, 4848; the functionalized macrocyclic analogs of bpy.bpy.(R<sub>2</sub>)<sub>2</sub> type were obtained by the same approach.

In general, the macrobicyclic ligands are prepared according to the techniques disclosed, respectively, in patent EP 0 321 353 and in Helv. Chim. Acta, 1988, 71, 1042. In particular, these molecules were prepared by alkylating a macrocyclic diamine preformed in a polar aprotic solvent in the presence of an alkaline carbonate acting as base and template ion.

The rare earth metal macropolycyclic complexes which may be used according to the invention may be obtained by the conventional processes for preparing metal complexes, which consist in reacting the complexing compound with a compound which donates the cation to be complexed.

For example, the macropolycyclic complexes may be obtained by reacting a compound which donates a rare earth metal cation with the macropolycyclic compound having the characteristics defined above, each compound advantageously being in solution, preferably in the same solvent or in compatible solvents that are inert with respect to the complexation. In general, acetonitrile or methanol is used as solvent, with heating to reflux.

According to a further aspect, the invention also relates to rare earth metal macropolycyclic complexes, consisting of at least one rare earth metal salt complexed with a macropolycyclic compound of formula



in which Z is an atom with 3 or 4 valencies, R is nothing or represents hydrogen, a hydroxyl group, an amino group or a hydrocarbon radical, the divalent radicals A, B and C are, independently of each other, hydrocarbon chains which optionally contain one or more hetero atoms and are optionally interrupted with a heteromacrocyclic, at least one of the radicals A, B and C also comprising at least one molecular unit or consisting essentially of a molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion, characterized in that:

- either at least one of the radicals (A), (B) and (C) which does not comprise or does not consist essentially of said molecular unit comprises a pyridine radical substituted one or more times;

5 - or at least one of the radicals (A), (B) and (C) which does not comprise or does not consist essentially of said molecular unit comprises a pyridine radical which is substituted one or more times or unsubstituted and the radical(s) (A), (B) or (C) other than said radical is substituted with an electron-donating group.

The substituent(s) on the pyridine radical may be chosen, for example, from halogen, CN, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> carboxylic ester, OH, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>NHCONH-aryl, -CH<sub>2</sub>NHCSNH-aryl, -NHCONH-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, -NHCSNH-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl, NHCONH-aryl, -NHCSNH-aryl, piperidyl, -N-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkylcarboxypiperidyl, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkylamino-alkylamine, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, alkenyl containing 2 to 10 carbon atoms, alkynyl containing 2 to 10 carbon atoms, cycloalkyl containing 3 to 8 carbon atoms, hydroxyalkyl containing 1 to 5 carbon atoms, alkoxy containing 1 to 10 carbon atoms, alkoxyalkyl containing 2 to 10 carbon atoms, alkoxyalkoxyalkyl containing 3 to 10 carbon atoms, alkoxyalkoxy containing 2 to 10 carbon atoms, alkenyloxy containing 2 to 10 carbon atoms, alkylthio containing 1 to 10 carbon atoms, alkylthioalkyl containing 2 to 10 carbon atoms, acylamino containing 1 to 7 carbon atoms, acylaminoalkyl containing 2 to 8 carbon atoms, carbamoylalkyl containing 2 to 5 carbon atoms, alkylaminocarbonylalkyl containing 3 to 9 carbon atoms, amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkylcarboxamide, amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkylcarboxamido (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl and carboxy(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyl.

Preferably, a substituted pyridine will comprise one or 2 substituents. Substituents that are preferred for the purposes of the invention are, for example, 25 the following substituents: amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, in particular aminomethyl or aminoethyl; amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkylcarboxamide, in particular aminoethylcarboxamide, phenylcarbamoyl; phenylthiocarbamoyl; nitrile; piperidyl; C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> carboxylic ester, in particular methylcarboxylate or ethylcarboxylate; amino(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkylcarboxamido (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, in particular aminocaproylamidomethyl and aminocaproylamidoethyl or 30 carboxy (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyl.

Preferably, the complexed rare earth metal ion is a europium ion.

Advantageously, the two radicals (A), (B) or (C) which do not comprise or do not consist essentially of a molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion comprise a 35 pyridine radical which is substituted one or more times or unsubstituted.

According to one preferred aspect, the molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion is chosen from phenanthroline, anthracene, benzene, naphthalene, biphenyl, terphenyl, azobenzene, azopyridine, bipyridines and bisisoquinolines.

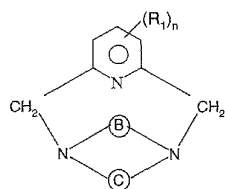
5 Advantageously, the molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion is a bipyridine group.

Preferably, the bipyridine group(s) is (are) substituted with an electron-donating group chosen in particular from carboxylate,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHAlk}$ ,  $-\text{N(Alk)}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{O}^-$ ,  $-\text{OAlk}$ ,  $\text{Alk}$ ,  $-\text{CH(Alk)}_2$ ,  $-\text{C(Alk)}_3$ ,  $-\text{NHCOAlk}$ , and substituted or unsubstituted phenyl groups; Alk being a  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ alkyl group, the carboxylate group being particularly advantageous.

When the phenyl is substituted, it may be substituted with one or more substituents, which may be identical or different, chosen, for example, from sulfonate, carboxylate, methylcarboxylate,  $\text{N,N}$ -dimethylamino, methoxyethyl-carboxylate and carboxamide.

The invention relates in particular to macropolycyclic complexes consisting of at least one rare earth metal salt complexed with a macropolycyclic compound corresponding to formula II:

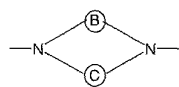
20



II

in which:

- the ring of formula



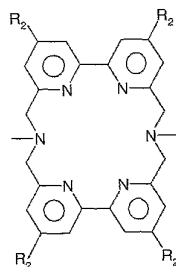
25

is the bis-bipyridine macrocycle of formula:

WO 01/96877

12

PCT/EP01/06642



- n = 0, 1 or 2;

- Y is a spacer group or spacer arm which consists of a divalent organic radical, chosen from linear or branched C<sub>1</sub> to C<sub>20</sub> alkylene groups optionally containing one or more double bonds and/or one or more heteroatoms such as oxygen, nitrogen, sulfur or phosphorus or one or more carbamoyl or carboxamido group(s); or else chosen from C<sub>5</sub> to C<sub>8</sub> cycloalkylene groups or from C<sub>6</sub> to C<sub>14</sub> arylene groups, said alkylene, cycloalkylene or arylene groups being optionally substituted with alkyl, aryl or sulfonate groups.

10 - A is a functional group which can bond covalently with a biological substance;

- R<sub>1</sub> is a group -COOR<sub>3</sub> in which R<sub>3</sub> is hydrogen or a C<sub>1</sub> to C<sub>10</sub> alkyl group and preferably represents a methyl, ethyl or tert-butyl group or R<sub>1</sub> is a group -CO-NH-Y-A or -Y-A;

15 - R<sub>2</sub> is hydrogen, an electron-donating group, in particular carboxylate, -NH<sub>2</sub>, -N(Alk), -N(Alk)<sub>2</sub>, OH, O<sup>-</sup>, -OAlk, Alk, -CH(Alk)<sub>2</sub>, -C(Alk)<sub>3</sub>, -NHCOAlk, substituted or unsubstituted phenyl; Alk being a (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl group or a group -CO-NH-Y-A or -Y-A,

with the proviso that not more than one of the substituents R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> represents a group -CO-NH-Y-A or -Y-A and R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> do not simultaneously represent a group -CO-NH-Y-A or -Y-A, and

with the proviso that when n = 0, R<sub>2</sub> is other than hydrogen.

Preferred complexes are those in which the macropolycyclic compound corresponds to formula II in which:

25 - n = 0,

- Y, A and R<sub>1</sub> are as defined above, and

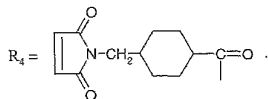
WO 01/96877

13

PCT/EP01/06642

-R<sub>2</sub> is as defined above and one of the substituents R<sub>2</sub> is a group -CO-NH-Y-A or -Y-A.

Complexes that are particularly advantageous are the europium cryptates [Eu<sup>3+</sup>⊂ Py.Bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.Bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>], [Eu<sup>3+</sup>⊂ bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.Py(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] and  
 5 [Eu<sup>3+</sup>⊂ bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.Py(CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHR<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] in which



The rare earth metal macropolycyclic complexes according to the invention are prepared by the processes mentioned above.

10 The invention also relates to fluorescent conjugates consisting of the rare earth metal macropolycyclic complexes as defined above, bonded covalently to one of the members of a pair of molecules capable of bonding together specifically, in particular a polypeptide, a protein, a cell receptor, an antigen, an antibody or a nucleic acid.

15 According to a further aspect, the invention also relates to the use of a rare earth metal macropolycyclic complex as defined above, for reducing the fluorescence quenching caused by the measuring medium, in a fluorescence assay of an analyte.

20 The invention is illustrated by the examples below, in which the techniques used to characterize and identify the compounds are as follows:

The melting points were determined using a capillary melting point apparatus: electrothermal IA8103; they are uncorrected.

25 The thin layer chromatographies (TLC) were carried out on Macherey-Nagel plates: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Polygram Alox N/UV254) and SiO<sub>2</sub> (Polygram SIL 6/UV254) containing a fluorescent indicator.

30 The liquid chromatographies (HPLC) were carried out using an LKB chromatographic system composed of the following components: 2152 microprocessor, 2150 pump, Uvicord 2158 detector; Merck 50734 Lichrosphes 100RP18 column; gradient applied [time (min)-flow rate/ml] proportion of the solvent B (%): 0-1-15; 5-1-15; 35-1-100]; solvent A = H<sub>2</sub>O containing 1% TFA, solvent B = CH<sub>3</sub>CN.

The retention times Tr are expressed in minutes.

WO 01/96877

14

PCT/EP01/06642

The NMR spectra were recorded using a Bruker AC 250 machine [250 (<sup>1</sup>H); 62.9 (<sup>13</sup>C)]. The chemical shifts are given in ppm relative to the corresponding internal reference.

For the measurements regarding (<sup>1</sup>H): CHCl<sub>3</sub> = 7.26; CH<sub>3</sub>OH = 3.34;  
5 tBuOH = 1.36. The following symbols were used:

s = singlet

d = doublet

t = triplet

m = multiplet

10 AB = coupling system

J = coupling constant

For the measurements regarding carbon (<sup>13</sup>C): CHCl = 77.0, the following symbols were used: Ct = tertiary carbon; Cq = quaternary carbon.

The ionization methods used for the mass spectra are FAB<sup>+</sup> = fast atom bombardment in positive mode (MNBA matrix: meta-nitrobenzyl alcohol or thioglycerol) and electron impact EI.

The absorption spectra (UV-visible) were recorded using a Perkin Elmer lambda15 spectrophotometer with 10<sup>-5</sup> M solutions.

The invention is illustrated by the examples below in which the following abbreviations are used:

AIBN: azobisisobutyronitrile

HPLC: high performance liquid chromatography

M.A.: microanalysis

m.p.: melting point

25 M.S.: mass spectrum

NBS: N-bromosuccinimide

<sup>1</sup>H NMR: proton nuclear magnetic resonance

<sup>13</sup>C NMR: carbon-13 nuclear magnetic resonance

SPDP: N-succinimidyl 3-(2-pyridylthio)propionate

30 Sulfo-SMCC = 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester of 4-(N-maleimido-methyl)cyclohexane-1-carboxylic acid

TFA: trifluoroacetic acid

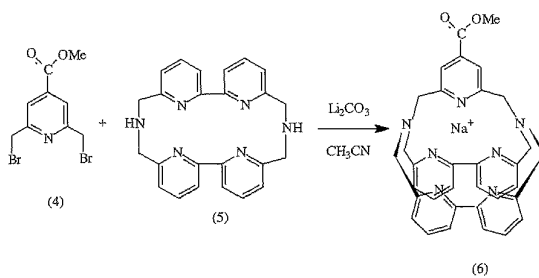
TLC: thin layer chromatography

TMS: tetramethylsilane

35

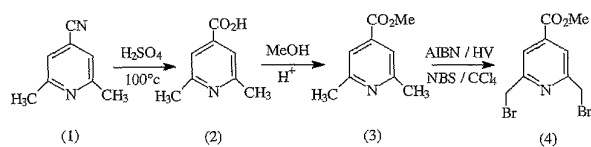
**Example 1: Preparation of the macrobicycle of formula (6)  
bpy.bpy.py(CO<sub>2</sub>Me)**

- Alkylation of the macrocyclic diamine (5) with the dibromomethyl derivative (4)  
5 gives the compound (6) represented below.



a) Preparation of 4-methyl 2,6-dibromomethylisonicotinate (4)

- 10 The sequence of reactions represented below allows compound (4) to be isolated.



- 15 - 4-Cyano-2,6-dimethylpyridine (1)

The studies by W.E. Feely and E.M. Beavers described in J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 4004 regarding the cyanation of amine oxide salts make it possible to obtain compound (1).

WO 01/96877

16

PCT/EP01/06642

- 2,6-Dimethylisonicotinic acid (2)

5 A mixture of 1 g (7.56 mmol) of (1) and 5 ml of concentrated sulfuric acid is heated at 100°C for 5 hours. The resulting solution is then cooled on an ice bath, brought to pH 3.5 with 10 N sodium hydroxide and then concentrated to dryness. Extraction with ether for 48 hours (soxhlet) of a portion of the residue obtained gives 50 mg of 2,6-dimethylisonicotinic acid (2) for analysis. The remaining crude reaction product, not treated with ether, is used in its present form in the esterification reaction without further purification.

10

NMR: <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O); internal reference tBuOH 1.29 ppm.  
2.82 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 8.05 (s, 2H, Py).

MS (EI): 151 (M<sup>+</sup>, 100); 134 (M<sup>+</sup>-OH, 7.2); 106 (M<sup>+</sup>-CO<sub>2</sub>H, 16.4)

MA: C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub> + 0.1 NaHSO<sub>4</sub> (163.16)

15

calculated: C 58.89 H 5.62 N 8.58 O 23.53

found: C 58.73 H 5.90 N 8.37 O 23.7

- 4-Methyl 2,6-dimethylisonicotinate (3)

20 A mixture of 2 g of 2,6-dimethylisonicotinic acid (2) (unpurified), 100 ml of methanol and 1 ml of 98% sulfuric acid is refluxed for 24 hours. After cooling, the reaction medium is neutralized with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and then extracted five times with 60 ml of CHCl<sub>3</sub>. The combined chloroform phases are then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and then concentrated. The resulting solid is then extracted four times with 50 ml of ether, after which the ether phase is concentrated. Chromatography on alumina [gradient: cyclohexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50/50) to pure CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] of the white residue obtained gives 1 g of 4-methyl-2,6-dimethylisonicotinate (3).

25

m.p.: 45-47°C

30

TLC: R<sub>f</sub> : 0.3 [SiO<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (97/3)]

HPLC: Tr: 2.4

UV: CHCl<sub>3</sub> : 290.6 nm (3650)

NMR: <sup>1</sup>H CDCl<sub>3</sub>; internal reference TMS

2.59 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 3.93 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 7.51 (s, 2H, Py)

35

<sup>13</sup>C CDCl<sub>3</sub>; internal reference 77.0 ppm

24.5 (CH<sub>3</sub>); 52.5 (OCH<sub>3</sub>); 119.5 (Ct); 137.9, 158.9 (Cq);

166.1 (C=O).

WO 01/96877

17

PCT/EP01/06642

MS (EI) : 165 (M<sup>+</sup>, 24); 134 (M<sup>+</sup>-OCH<sub>3</sub>, 13); 106 (M<sup>+</sup>-CO<sub>2</sub>Me)

- 4-Methyl-2,6-dibromomethyl isonicotinate (4)

5 A mixture of 1.372 g (8.3 mmol) of (3), 60 mg of AIBN and 2.866 g  
(16.1 mmol) of NBS in 120 ml of CCl<sub>4</sub> is refluxed under a nitrogen atmosphere and  
under irradiation with a 100 W lamp, for 8 hours. The reaction medium is then  
returned to room temperature, after which it is washed with 200 ml of saturated  
NaHCO<sub>3</sub> solution. After removing the lower phase (CCl<sub>4</sub>), the aqueous phase is  
10 extracted 4 times with 50 ml of CHCl<sub>3</sub>; the combined organic extracts are then  
washed with 100 ml of H<sub>2</sub>O, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and then concentrated to dryness.  
Purification of the residue obtained by chromatography on silica [gradient:  
cyclohexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80/20) to pure CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] makes it possible to separate out a  
15 first fraction of the bromo derivative (4), from the polybromo species, from a mixture  
of isomers of symmetrical and asymmetrical dibromo derivatives and from the  
monobromo species also formed.

In order to have available a larger amount of methyl 2,6-dibromomethyl  
isonicotinate, the monobromo compound isolated above [0.543 g (2.2 mmol)] is  
mixed with 0.4 g (2.2 mmol) of NBS, 23 mg of AIBN and 50 ml of CCl<sub>4</sub> and is then  
20 treated under the above bromination conditions to give a second fraction of (4).

Finally, a purification by chromatography on silica [gradient: pure cyclohexane  
to cyclohexane/EtOAc (85/15)] of the mixtures of dibromoisomers, isolated in the  
above two reactions, gives a final fraction of (4), i.e. 596 mg in total (22%).

25 m.p. : 90-92°C  
TLC : R<sub>f</sub> : 0.6 (SiO<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  
HPLC : Tr : 20 min 5 sec  
UV : CHCl<sub>3</sub> : 290.8 nm (4270); 240.3 nm (3010)  
NMR : <sup>1</sup>H CDCl<sub>3</sub>; internal reference TMS  
30 3.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.58 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); 7.92 (s, 2H, Py)  
<sup>13</sup>C CDCl<sub>3</sub>; internal reference 77.0 ppm  
32.8 (CH<sub>2</sub>); 52.9 (OCH<sub>3</sub>); 122.2 (Ct); 139.8, 157.9 (Cq);  
164.7 (C=O).  
MS (EI) : 322.9 (M<sup>+</sup>, 15); 243.9 (M<sup>+</sup>-Br, 100); 163 (M<sup>+</sup>-2Br, 15.7).  
35 MA : C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> (322.98)  
Calculated : C 33.47 H 2.80 N 4.33 O 9.90  
Found : C 33.69 H 2.81 N 4.29 O 10.17

WO 01/96877

18

PCT/EP01/06642

b) Preparation of the alkali metal cryptate  $[\text{Na}^+ \text{c bpy.bpy.pyCO}_2\text{Me}] \text{Br}^-$  of formula (6).

A mixture of 0.2 g (0.508 mmol) of bipyridine macrocyclic diamine (5) (described in J. Org. Chem., 1983, 48, 4848) and 0.376 g (5.08 mmol) of  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  in 400 ml of  $\text{CH}_3\text{CN}$  is refluxed for 40 min under a nitrogen atmosphere. A solution of 0.165 g (0.508 mmol) of 4-methyl 2,6-dibromomethylisonicotinate (4) in 100 ml of  $\text{CH}_3\text{CN}$  is added dropwise (2 hours) to the resulting suspension. At the end of the addition, stirring is continued under the same conditions for a further 22 hours and the reaction medium is then cooled on an ice bath. The carbonate is then filtered off and the filtrate is evaporated to dryness. A chromatography on silica [gradient :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  containing 10% MeOH] of the residue obtained gives 117.5 mg of compound (6) (35%).

TLC : Rf : 0.4 ( $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (90/10))  
 HPLC : Tr : 4 min 1 sec  
 UV :  $\text{CHCl}_3$  : 246 nm (27950); 291 nm (27410).  
 NMR :  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ); internal reference TMS.  
 3.94 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 4.00 (d, J = 15 Hz, AB, 4H,  $\text{CH}_2$ );  
 4.08 (d, J = 14.7 Hz, AB, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 4.09 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ );  
 7.39-7.42 (m, 4H, BPy); 7.77 (s, 2H, Py); 7.85-7.89 (m, 8H, BPy).  
 $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ); internal reference 77 ppm.  
 52.9 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ); 59.4 ( $\text{CH}_2$ ); 59.5 ( $\text{CH}_2$ );  
 $\text{C}_t$  (119.9; 122.1; 123.4; 138.8)  
 $\text{C}_q$  (139.2; 154.6; 158.5; 159.6); 165.3 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ).  
 MS(FAB<sup>+</sup>): Thioglycerol matrix.  
 578.2 (Ligand- $\text{Li}^+\text{+Na}^+$ , 100%); 556.2 (Ligand- $\text{Li}^+\text{+H}$ , 10%).  
 Thioglycerol matrix + 1% TFA  
 578 (Ligand- $\text{Li}^+\text{+Na}^+$ , 20%); 556.1 (Ligand- $\text{Li}^+\text{+H}$ , 100%).  
 MA :  $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_2\text{NaBr}$ ,  $3\text{H}_2\text{O}$  (712.53).  
 Calculated : C 55.62 H 4.95 N 13.76  
 Found : C 55.93 H 4.73 N 13.61

**Example 2 : Preparation of the europium cryptate**

$[\text{Eu}^{3+} \text{c bpy.bpy.pyCO}_2\text{Me}]\text{Cl}_3$  of ligand (6) of Example (1).

11.8 mg of  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $3.22 \times 10^{-5}$  mol) are added to 20.2 mg ( $2.84 \times 10^{-5}$  mol) of the macrobicyclic (6) contained in 5 ml of anhydrous methanol.

WO 01/96877

19

PCT/EP01/06642

The resulting homogeneous mixture is refluxed under a nitrogen atmosphere for 23 hours. Next, addition to this solution, cooled to room temperature, of 4 ml of ether causes the crystallization of 14.2 mg (52%) of the europium cryptate.

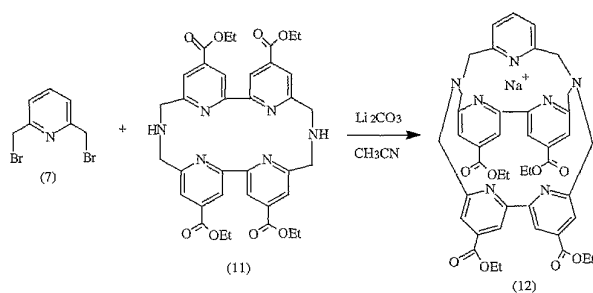
- HPLC : Tr : 14.1  
 5 UV : H<sub>2</sub>O : 250 nm (18270); 309 nm (24400).  
 MS(FAB<sup>+</sup>): Nitrobenzyl alcohol matrix  
 778 [(Eu<sup>3+</sup>⊂ L+2Cl)<sup>+</sup>, 40%]; 743 [(Eu<sup>2+</sup>⊂ L+Cl)<sup>+</sup>, 90%];  
 707 [(Eu<sup>3+</sup>⊂ L-2H)<sup>+</sup>, 100%]  
 10 MA : C<sub>33</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>EuCl<sub>3</sub>, 0.13 EuCl<sub>3</sub>, NaBr, 2 CH<sub>3</sub>OH (1014.51)  
 Calculated : C 41.43 H 3.67 N 9.66  
 Found : C 41.23 H 3.95 N 9.63

**Example 3 : Preparation of the macrobicyclic compound of formula (12)**

**Py.Bpy(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>.Bpy(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>**

15

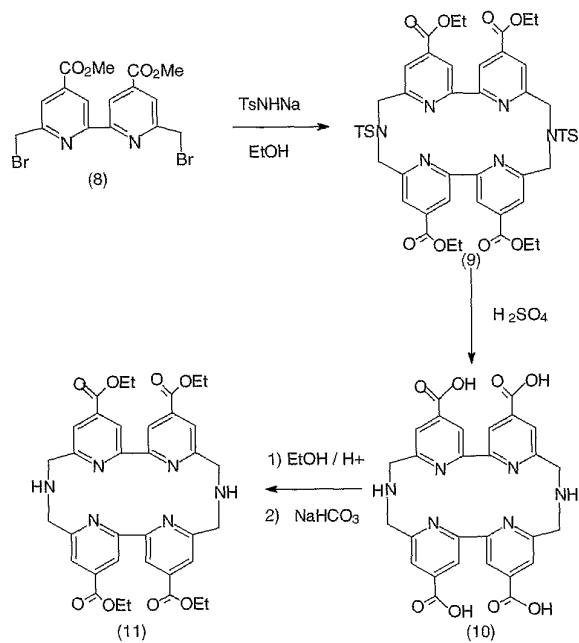
This compound is prepared according to the scheme represented below.



a) Preparation of the macrocycle of formula (11)

20

The following reaction sequence gives the bpy.bpy diamine tetraester macrocycle (11).



-Tosyl bpy.bpy tetraester macrocycle (9)

- 5 A mixture of 5.5 g (12 mmol) of 6,6'-dimethyl 2,2'-dibromomethyl-4,4'-bipyridinedicarboxylate (8) (described in *Helv. Chim. Acta*, 1988,71,1042), 4.64 g of freshly prepared sodium salt of tosylamide (24 mmol) and 900 ml of absolute ethanol is refluxed under a nitrogen atmosphere for 26 hours. This suspension is then cooled for 1 hour on an ice bath, after which it is filtered. The isolated precipitate is then washed with 700 ml of water, 500 ml of ethanol and 20 ml of chloroform to give 1.88 g (31.6%) of (9).

WO 01/96877

21

PCT/EP01/06642

TLC : Rf : 0.7 [SiO<sub>2</sub>/CHCl<sub>3</sub> - MeOH (99/1)]

HPLC : Tr : 36.1

MS (FAB)<sup>+</sup>: MNBA matrix

991 (M+, 45%); 835 (L-Tos, 12%).

5 MA : C<sub>50</sub>H<sub>50</sub>O<sub>12</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub> NaBr. (1094)  
 Calculated : C 54.89 H 4.6 N 7.68 S 5.86 Na 2.1  
 Found : C 55.66 H 4.64 N 7.75 S 6.04 Na 3.19

Bpy.Bpy. tetraacid macrocycle (10)

10

A solution of 0.15 g (0.15 mmol) of the tosyl macrocycle (9) in 1 ml of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> is heated at 100°C for 3 hours under a nitrogen atmosphere. The reaction medium is then cooled on an ice bath, diluted by addition of 5 ml of water and then brought to pH 3.0 by adding 7 ml of 5N NaOH. The precipitate  
 15 formed is then filtered off, washed thoroughly with water (50 ml) and then dried. The tetraacid macrocycle (10) thus isolated (probably in the form of the amine salt) is used without further purification in the next step.

Bpy.Bpy.diamine tetraethylester macrocycle (11)

20

A suspension of 53 mg of compound (10) in 100 ml of absolute ethanol and 0.5 ml of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> is refluxed under a nitrogen atmosphere for 28 hours. The resulting homogeneous solution is then successively cooled on an ice bath, neutralized with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and treated with 80 ml of CHCl<sub>3</sub>  
 25 (4x20) to give 60 mg of compound (11) (quantitative).

TLC : Rf : 0.7 [Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.MeOH (80/20)]

HPLC : Tr : 17.2

UV : CHCl<sub>3</sub> : 243.1 nm (24150); 303.2 nm (25210).

30 NMR : <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>); internal reference TMS.  
 1.44 (t, J = 7.0 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>); 2.29 (s, broad, NH); 4.17 (s, 8H, CH<sub>2</sub>)  
 4.39 (q, J = 6.9 Hz, 8H, CH<sub>2</sub> ester); 7.43 (d, J = 1.4 Hz, 4H, BPy);  
 8.29 (d, J = 1.1 Hz, 4H, BPy).  
<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>); internal reference 77.0 ppm.  
 35 14.9 (CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 56.8 (CH<sub>2</sub>); 62.3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  
 Ct (119; 122.5); Cq (138.9; 158.9; 161.4); 165.7 (CO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)

WO 01/96877

22

PCT/EP01/06642

MS(FAB<sup>+</sup>): Thioglycerol matrix  
683 (M<sup>+</sup>, 100)

MA : C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>, H<sub>2</sub>O (700.74)

Calculated : C 61.7 H 5.75 N 11.99

5 Found : C 62.2 H 6.01 N 11.48

b) Preparation of the alkali metal cryptate of formula (12) [Na<sup>+</sup>c  
Py.Bpy(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>.Bpy(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>]Br<sup>-</sup>

10 A mixture of 180.7 mg (0.265 mmol) of macrocyclic diamine (11) and  
195.5 mg (2.65 mmol) of Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 360 ml of anhydrous CH<sub>3</sub>CN is refluxed for  
35 min under a nitrogen atmosphere. A solution of 70.7 mg (0.267 mmol) of  
2,6-dibromomethylpyridine (7) [the preparation of this compound has been  
described by Vogtle, starting with lutidine : Synthesis, 1977, 273] in 360 ml of  
15 anhydrous CH<sub>3</sub>CN is added slowly (5 hours) to the resulting suspension. Reflux is  
maintained for 72 hours and the reaction medium is then cooled on an ice bath.  
After filtration of the insoluble carbonates, the filtrate is evaporated to dryness. The  
residual solid obtained is chromatographed on a column of alumina with  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH as eluent (99/1 to 85/15) to give 78 mg of (12) (33%).

20 TLC : Rf = 0.6 [Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / CHCl<sub>3</sub>-MeOH (90/10)]

HPLC : Tr = 20.8

UV : CHCl<sub>3</sub> : 250 nm (24900); 316 nm (18900)

NMR : <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>); internal reference TMS

25 1.45(t, J = 7.1 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>); 4.07 (s, 4H, CH<sub>2</sub>); 4.14  
(d, J = 15.4 Hz, AB, 4H, CH<sub>2</sub>); 4.22 (d, J = 15.3 Hz, AB,  
4H, CH<sub>2</sub>); 4.46 (q, J = 7Hz, 8H, CH<sub>2</sub> ester); 7.27(d, J = 7.7  
Hz, 2H, Py); 7.66 (t, j = 7.7 Hz, 1H, Py); 7.93(s, 4H, Bpy);  
8.42(s, 4H, Bpy).

<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>); internal reference 77 ppm.

30 14.3 (CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>Et); 59.4 (CH<sub>2</sub>); 59.5 (CH<sub>2</sub>); 62.5 (CH<sub>2</sub>,  
CO<sub>2</sub>Et); Ct (119.3; 122.8; 123; 138.1); Cq (140.5; 155.1;  
157.8; 160.1); 164.5 (CO<sub>2</sub>Et).

MS : (FAB<sup>+</sup> / NBA matrix)

808.4 (ligand- Li<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup>, 100%); 663.3 (ligand+Na<sup>+</sup>-

35 2CO<sub>2</sub>Et, 5%).

MA : C<sub>43</sub>H<sub>43</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>NaBr, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (972.66)

WO 01/96877

23

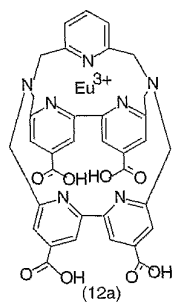
PCT/EP01/06642

Calculated : C 54.3 H 4.6 N 10  
 Found : C 54.9 H 4.0 N 9.8

Example 4 : Preparation of the europium cryptate of formula 12a [Eu<sup>3+</sup>⊂  
 5 Py.Bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.Bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>]

10

15



20 a) Preparation of the europium complex of ligand 12 of Example 3  
 [Eu<sup>3+</sup>⊂ Py.Bpy(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>Bpy(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>]

25 33 mg ( $9 \times 10^{-5}$  mol) of EuCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O are added to 69 mg ( $7.7 \times 10^{-5}$  mol) of the sodium cryptate (12) contained in 32 ml of anhydrous CH<sub>3</sub>CN. The resulting suspension is refluxed under a nitrogen atmosphere for 27 hours; after cooling, the solvent is evaporated off. Next, a reverse-phase chromatography of the residue obtained gives 25 mg of the europium cryptate [Eu<sup>3+</sup>⊂ 12] (25%).

HPLC : Tr : 21

UV : EtOH / 330 nm (21000)

30

MS : (FAB<sup>+</sup>) thioglycerol matrix

1164.2 [(Eu<sup>3+</sup>⊂ 12 + 2CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>], 64%

1051.8 [Eu<sup>3+</sup>⊂ 12 + CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>+</sup> + H] 100%

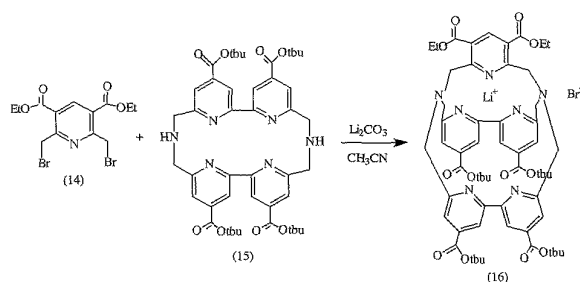
937.4 [(Eu<sup>2+</sup>⊂ 12 - 1H) 35%]

35 b) Preparation of the acid cryptate of formula 12a

100 μl of aqueous 1.6 M sodium hydroxide solution are added to an aqueous

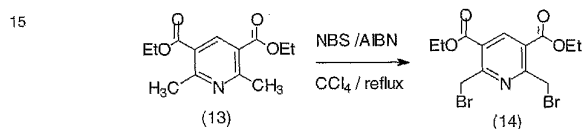
solution of 10 mg ( $7.83 \times 10^{-6}$  mol) of europium cryptate [ $\text{Eu}^{3+} \subset 12$ ]. The resulting mixture is stirred for 2 hours at room temperature and is then evaporated to dryness. Purification by (reverse-phase) chromatography with a mixture of  $\text{H}_2\text{O}$  containing 1% TFA/ $\text{CH}_3\text{CN}$  as eluent, of the residue obtained, gives 8 mg (quantitative) of the europium cryptate of formula 12a.

**Example 5 : preparation of the pyridine diethyl ester bispyridine tetra-tert-butyl ester macrobicyclic of formula (16)**



a) Preparation of diethyl 2,6-dibromomethyl-3,5-pyridinecarboxylate of formula (14)

This compound is synthesized according to a conventional free-radical bromination procedure starting with commercial diethyl 2,6-dimethyl-3,5-pyridinecarboxylate.



A mixture of 0.5 g (2 mmol) of 2,6-diethyl 3,5-dimethylpyridinecarboxylate, 0.89 g (5 mmol) of NBS and 4 mg of AIBN in 20 ml of carbon tetrachloride is refluxed for two hours under irradiation with a 100 W visible lamp. Next, the

WO 01/96877

25

PCT/EP01/06642

suspension is cooled on an ice bath and then filtered in order to remove the succinimide formed. The filtrate is then concentrated to dryness; chromatography on silica of the residue obtained, with a hexane/chloroform mixture as eluent (gradient: 50/50 to 30/70) gives 195 mg of bromo derivative of formula (14) (26%).

5

TLC : Rf = 0.4 (SiO<sub>2</sub> / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

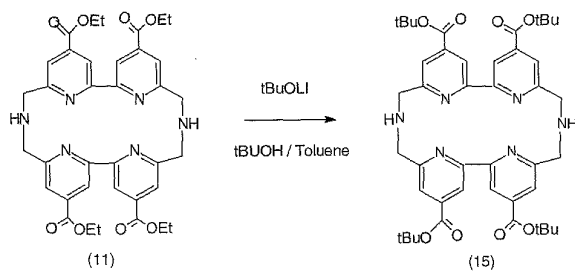
HPLC : Tr = 25.5

UV : CHCl<sub>3</sub> / 245 nm (9400)NMR : <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>); internal reference TMS

10

1.45 (t, J = 7.0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>); 4.47 (q, J = 7.2 Hz, 4H  
CH<sub>2</sub>); 5 (s, 4H, CH<sub>2</sub>Br); 8.80 (s, 1H, Py).

b) Preparation of the diamine bispyridine tetra-tert-butyl ester macrocycle of formula (15).



15

This compound is synthesized by simple transesterification starting with lithium tert-butoxide and the macrocycle (11) of Example 3.

A mixture of 251 mg of macrocycle (11) (0.36 mmol), 363 mg (4.5 mmol) of lithium tert-butoxide, 35 ml of dry toluene and 35 ml of dry tert-butanol is heated at 80°C under a stream of nitrogen for about 3 hours. After cooling, the tert-butanol is removed by evaporation; the residual organic phase is first washed with water to neutral pH (6 x 50 ml) and then successively dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to dryness. Reverse-phase chromatography of the residue obtained with CH<sub>3</sub>CN and H<sub>2</sub>O containing 1% TFA as eluents gives 117 mg of the macrocycle (15) (40%).

25

WO 01/96877

26

PCT/EP01/06642

HPLC : Tr = 22.4

UV : CHCl<sub>3</sub> / 311 nm (18000); 280 nm (8300); 268 nm (7200)NMR : <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>); internal reference TMS1.65 (s, 36H, CH<sub>3</sub>); 4.69 (s, 8H, CH<sub>2</sub>); 7.97 (s, 4H, H

5 bpy); 8.51 (s, 4H, Hbpy).

MS : (ES) 796 (M+H).

c) Preparation of the alkali metal cryptate of formula (16)

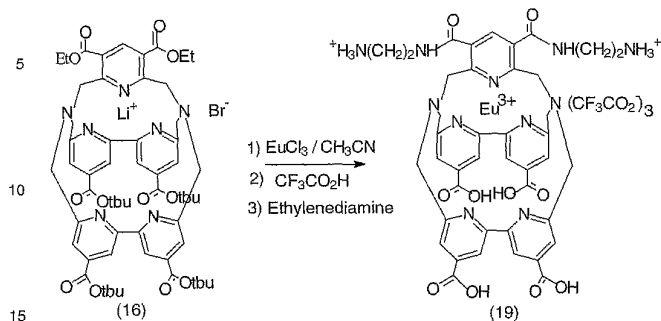
10 [Li<sup>+</sup>c bpy(CO<sub>2</sub>tbu)<sub>2</sub>bpy(CO<sub>2</sub>tbu)<sub>2</sub>Py(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>]Br<sup>-</sup>

15 A mixture of 25.3 mg ( $3.18 \times 10^{-5}$  mol) of macrocycle (15) and 27 mg ( $3.65 \times 10^{-4}$  mol) of Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 25 ml of anhydrous CH<sub>3</sub>CN is refluxed for 15 min under a stream of nitrogen. A solution of 12.7 mg ( $3.1 \times 10^{-5}$  mol) of 2,6-diethyl 3,5-dibromomethylpyridinecarboxylate (14) in 12 ml of anhydrous CH<sub>3</sub>CN is added dropwise over 10 min to the resulting suspension. Stirring is continued under these conditions for 23 hours and the reaction medium is then cooled on an ice bath, after which it is filtered. After evaporating the filtrate to dryness, reverse-phase chromatography of the residue obtained gives 12 mg (35%) of macrobicyclic (16).

20 HPLC : Tr = 28.5

MS : (ES) 1042.3 [(ligand-Li<sup>+</sup>-Br<sup>-</sup> (100%)); 1064.3 [(ligand-Li<sup>+</sup>-Br<sup>-</sup>+Na<sup>+</sup>(30%)]

Example (6) : Preparation of the europium cryptate of formula (19)  $[\text{Eu}^{3+} \subset \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{Py}(\text{NH}_2)_2]$



a) Preparation of the europium complex of the ligand (16) of Example (6)  $[\text{Eu}^{3+} \subset \text{bpy}(\text{CO}_2\text{tBu})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{tBu})_2 \cdot \text{Py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]$

12.8 mg ( $3.5 \times 10^{-5}$  mol) of  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  are added to a solution of 17.1 mg ( $1.51 \times 10^{-5}$  mol) of lithium cryptate (16) in 10 ml of anhydrous acetonitrile. The reaction mixture is then refluxed under a stream of nitrogen for 3 hours. After cooling, the solvent is evaporated off and the residue obtained (m = 27.6 mg) is used without further purification in the following step.

b) Preparation of the acid europium cryptate

$[\text{Eu}^{3+} \subset \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{Py}(\text{CO}_2\text{Et})_2](\text{CF}_3\text{CO}_2)_3$

This reaction consists in selectively hydrolyzing the tert-butyl esters borne by the bipyridine subunits by treatment with pure trifluoroacetic acid.

27.6 mg of the residue obtained in paragraph a) of Example 6 are dissolved in 14 ml of trifluoroacetic acid. The resulting homogeneous solution is stirred for 4 hours at room temperature and then concentrated to dryness by evaporating the acid under vacuum. Reverse-phase chromatography with a mixture of  $\text{H}_2\text{O}$  containing 1% TFA/ $\text{CH}_3\text{CN}$  as eluents gives 10.4 mg of the europium cryptate  $[\text{Eu}^{3+} \subset \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{Py}(\text{CO}_2\text{Et})_2](\text{CF}_3\text{CO}_2)_3$

HPLC : Tr = 13.7

UV : MeOH / 324.6 nm (16000); 337 nm (13300)

WO 01/96877

28

PCT/EP01/06642

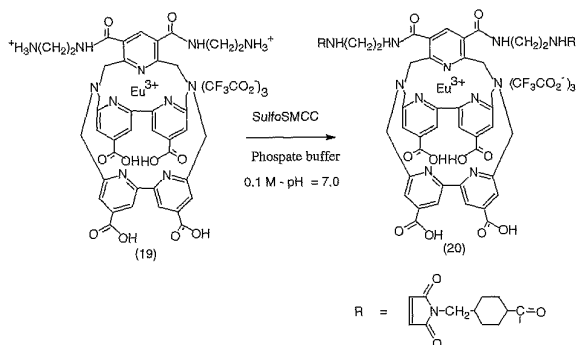
## c) Preparation of the europium cryptate of formula (19)

A solution of 300  $\mu\text{l}$  of ethylenediamine ( $4.45 \times 10^{-3}$  mol) in 300  $\mu\text{l}$  of anhydrous MeOH is added over 5 min, while cooling on an ice bath and under a stream of nitrogen, to a solution of 10 mg ( $8.03 \times 10^{-6}$  mol) of europium cryptate [Eu<sup>3+</sup>-bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>-bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>-Py(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>] in 2 ml of anhydrous MeOH. The temperature of the medium is then raised gradually to 20°C, followed by stirring for 2.5 hours under these conditions. After evaporating off the solvent, reverse-phase chromatography of the resulting residue with a mixture of H<sub>2</sub>O containing 1% TFA/CH<sub>3</sub>CN as eluents gives 5.5 mg of cryptate (19) (45%).

UV : MeOH / 325 nm (17000)

**Example 7 : Preparation of the europium cryptate of formula (20)**

This compound is prepared according to the scheme represented below.



A solution of 195  $\mu\text{g}$  ( $4.45 \times 10^{-7}$  mol) of sulfoSMCC in 168  $\mu\text{l}$  of phosphate buffer is added dropwise over 45 min to a solution, cooled on an ice bath, of 0.2 mg ( $1.28 \times 10^{-7}$  mol) of compound (19) in 200  $\mu\text{l}$  of 0.1 M pH 7.0 phosphate buffer. At the end of the addition, the temperature of the medium is returned to 20-25°C and the reaction is continued under these conditions for 3 hours. Next, direct purification by reverse-phase chromatography with a mixture of H<sub>2</sub>O containing 1% TFA/CH<sub>3</sub>CN as eluent gives 100  $\mu\text{g}$  of cryptate (20) (50%).

**Example 8 : Coupling of the compound of formula (20) with protein**

## a) Activation of the protein

5 3.14 mg (4.43 mg/ml) of antibody (free PSA, cloneA455, CIS bio international, France) are activated for 30 min at room temperature, in 0.1 M pH 7.0 phosphate buffer, by adding 26.2  $\mu$ l of an ethanolic solution of SPDP at 2 mg/ml (initial reagent/protein molar ratio: 8). At the end of this period, thiol functions (SH) are generated by adding to the reaction medium 37  $\mu$ l of a dithiothreitol (DTT) solution  
10 at 61.7 mg/ml in 0.1 M pH 7.0 phosphate buffer and incubating for 15 min at room temperature; next, the mixture is purified on a Sephadex G25 HR10-10 column with the buffer used during the activation as eluent.

## b) Coupling of the activated protein and the cryptate of formula (20)

15 55  $\mu$ l of a solution containing 1 mg/ml in 0.1M pH 7.0 phosphate buffer of cryptate of formula (20) are added to 386  $\mu$ l of a solution of antibody A455 (1.2 mg/ml in the same buffer) activated according to the procedure described in paragraph a) of Example 8, followed by incubation for 20 hours at 4°C; at the end of  
20 this period, the reaction mixture is purified on a Sephadex G25 HR10-30 column with the buffer for the coupling reaction as eluent. Absorbance measurements of the antibody-cryptate conjugate at 280 nm and 325 nm give a degree of labeling of 8.0 and a yield of 80%.

**25 Example 9 : Demonstration of the low sensitivity to quenching of the pyridine cryptates of Examples 2, 4(b), 6(c), 7 and 8 in serum.**

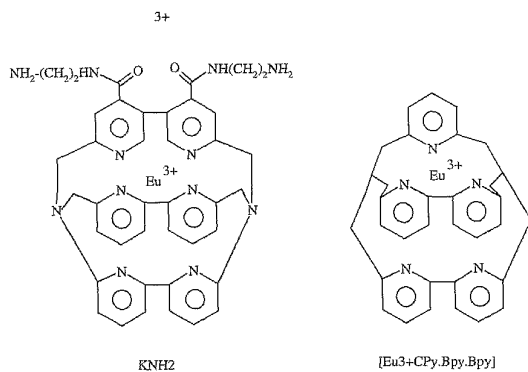
The determinations below were carried out with a Perkin-Elmer LS50 spectrofluorimeter.

30 The fluorescence lifetime measurements for the cryptates tested were carried out according to the procedure disclosed in EP 0 601 113.

The compounds were tested in a 0.1 M pH 7.0 phosphate buffer and in newborn calf serum (NCS). The solutions for measuring cryptate concentration of about  $10^{-6}$  M/l were prepared by diluting the stock solution to 1/100 either with the  
35 buffer alone or with a mixture of 2/3 buffer to 1/3 serum.

The pyridine cryptates of Examples 2, 4(b), 6(c), 7 and 8 were tested in comparison with the trisbipyridinediamine cryptate (KNH<sub>2</sub>) and the pyridine-bispyridine cryptate [Eu<sup>3+</sup>+Cpy.Bpy.Bpy], the preparations of which have been described, respectively, in EP 0 321 353 and in Helv. Chim. Acta 1988, 71, 1042.

5 The formulae of these two molecules are given below:



The results are given in Table 1 below:

10

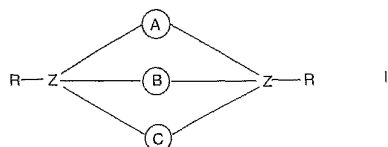
Table 1

Complexes tested	$\tau_{\text{PO}_4^{3-}}$ buffer (ms)	$\tau_{\text{serum}}$ (ms)	Quenching $1 - \left( \frac{\tau_{\text{serum}}}{\tau_{\text{PO}_4^{3-}}} \right) \%$
KNH2	0.6	0.15	75 %
Example 2 macrobicycle 6	1.06	0.80	25%
Example 4(b) macrobicycle 12	1.03	0.90	13%
Example 6 macrobicycle 19	1.03	0.90	13%
Example 7 macrobicycle 20	1.01	0.89	12%
Example 8 antibody-cryptate conjugate	0.95	0.86	9.5%
[Eu3+ cBpy.Bpy.py]	0.66	0.54	18%

5 These results show that, in a trisbipyridine cryptate structure, replacing a bipyridine unit with a pyridine unit has the effect of reducing the fluorescence quenching caused by the serum. These results also demonstrate that the presence of carboxylate groups on the bipyridine units has a favorable influence on reducing the quenching.

## CLAIMS

1. A process for reducing the fluorescence quenching caused by the measuring medium in a fluorescence assay of an analyte using at least one fluorescent label, characterized in that a rare earth metal macropolycyclic complex is introduced into the measuring medium, this complex consisting of at least one rare earth metal salt complexed with a macropolycyclic compound of formula



- 10 in which Z is an atom with 3 or 4 valencies, R is nothing or represents hydrogen, a hydroxyl group, an amino group or a hydrocarbon radical, the divalent radicals  $\text{A}$ ,  $\text{B}$  and  $\text{C}$  are, independently of each other, hydrocarbon chains optionally containing one or more heteroatoms and are optionally interrupted with a heteromacrocyclic, at least one of the radicals  $\text{A}$ ,  $\text{B}$  and  $\text{C}$  also comprising at least one molecular unit or consisting essentially of a molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion, and at least one of the radicals  $\text{A}$ ,  $\text{B}$  and  $\text{C}$  which does not comprise or does not consist essentially of said molecular unit comprises a pyridine radical which is substituted one or more times or unsubstituted.
- 15 2. The process as claimed in claim 1, characterized in that the two radicals  $\text{A}$ ,  $\text{B}$  or  $\text{C}$  which do not comprise or do not consist essentially of a molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion comprise a pyridine radical which is substituted one or more times or unsubstituted.
- 20 3. The process as claimed in either of claims 1 and 2, characterized in that the molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion is substituted with an electron-donating group.
- 25 4. The process as claimed in any one of claims 1 to 3, characterized in that the molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion is chosen from phenanthroline, anthracene,
- 30

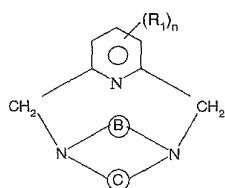
benzene, naphthalene, biphenyl, terphenyl, azobenzene, azopyridine, bipyridines and bisisoquinolines.

5 The process as claimed in any one of claims 1 to 4, characterized in that the molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion is a bipyridine group.

6 The process as claimed in claim 5, characterized in that the bipyridine group(s) is (are) substituted with an electron-donating group chosen in particular from carboxylate,  $-NH_2$ ,  $-NHAlk$ ,  $-N(Alk)_2$ ,  $OH$ ,  $O^-$ ,  $-OAlk$ ,  $Alk$ ,  $-CH(Alk)_2$ ,  $-C(Alk)_3$ ,  $-NHCOAlk$ , and substituted or unsubstituted phenyl groups;  $Alk$  being a  $(C_1-C_4)$ alkyl group.

7 The process as claimed in any one of claims 4 to 6, characterized in that the bipyridine unit(s) is (are) substituted with a carboxylate group.

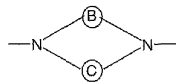
8 The process as claimed in any one of claims 1 to 6, characterized in that the macropolycyclic complex consists of at least one rare earth metal salt complexed with a macropolycyclic compound corresponding to formula II:



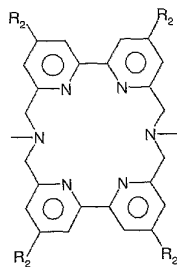
in which:

- the ring of formula

20



is the bis-bipyridine macrocycle of formula:



- n = 0, 1 or 2;

- A is a functional group capable of bonding covalently with a biological substance;

- R<sub>1</sub> is a group -COOR<sub>3</sub> in which R<sub>3</sub> is hydrogen or a C<sub>1</sub> to C<sub>10</sub> alkyl group and preferably represents a methyl, ethyl or tert-butyl group or R<sub>1</sub> is a group -CO-NH-Y-A or -Y-A;

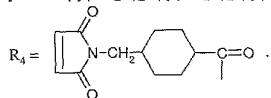
- R<sub>2</sub> is hydrogen, an electron-donating group, in particular carboxylate, -NH<sub>2</sub>, -NHAlk, -N(Alk)<sub>2</sub>, OH, O<sup>-</sup>, -OAlk, Alk, -CH(Alk)<sub>2</sub>, -C(Alk)<sub>3</sub>, -NHCOAlk, substituted or unsubstituted phenyl; Alk being a (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl group or a group -CO-NH-Y-A or -Y-A, with the proviso that not more than one of the substituents R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> represents a group -CO-NH-Y-A or -Y-A and R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> do not simultaneously represent a group -CO-NH-YA or -Y-A;

- Y is a spacer group or spacer arm which consists of a divalent organic radical, chosen from linear or branched C<sub>1</sub> to C<sub>20</sub> alkylene groups optionally containing one or more double bonds and/or one or more heteroatoms such as oxygen, nitrogen, sulfur or phosphorus or one or more carbonyl or carboxamido group(s); or else chosen from C<sub>5</sub> to C<sub>8</sub> cycloalkylene groups or from C<sub>6</sub> to C<sub>14</sub> arylene groups, said alkylene, cycloalkylene or arylene groups being optionally substituted with alkyl, aryl or sulfonate groups.

9. The process as claimed in any one of claims 1 to 8, characterized in that the complexed rare earth metal ion is a europium ion.

10. The process as claimed in any one of claims 1 to 7 and 9, characterized in that the rare earth metal macropolycyclic complex is chosen from the europium cryptates [Eu<sup>3+</sup> - py.bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.bpy(CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>],

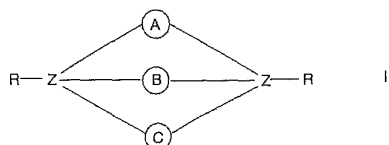
$[\text{Eu}^{3+} \text{c} \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{py}(\text{NH}_2)_2]$  and  
 $[\text{Eu}^{3+} \text{c} \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{py}(\text{CONH}(\text{CH}_2)_2 \text{NHR}_4)_2]$  in which



11. The process as claimed in any one of claims 1 to 10, characterized in that  
 5 said rare earth metal macropolycyclic complex is used as sole label or as one of the labels in the assay.

12. The process as claimed in any one of claims 1 to 11, characterized in that the measuring medium is a biological medium, in particular a serum medium.

13. A rare earth metal macropolycyclic complex consisting of at least one rare  
 10 earth metal salt complexed with a macropolycyclic compound of formula



15 in which Z is an atom with 3 or 4 valencies, R is nothing or represents hydrogen, a hydroxyl group, an amino group or a hydrocarbon radical, the divalent radicals  
 (A), (B) and (C) are, independently of each other, hydrocarbon chains which optionally contain one or more heteroatoms and are optionally interrupted with a heteromacrocyclic, at least one of the radicals (A), (B) and (C) also comprising at  
 20 least one molecular unit or consisting essentially of a molecular unit having a triplet energy which is greater than that of the emission level of the complexed rare earth metal ion, characterized in that:

- either at least one of the radicals (A), (B) and (C) which does not comprise or does not consist essentially of said molecular unit comprises a pyridine radical substituted one or more times;

25 - or at least one of the radicals (A), (B) and (C) which does not comprise or does not consist essentially of said molecular unit comprises a pyridine radical which is substituted one or more times or unsubstituted and the radical(s)

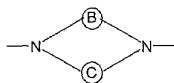


WO 01/96877

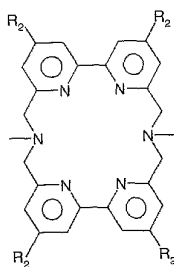
37

PCT/EP01/06642

- the ring of formula



5 is the bis-bipyridine macrocycle of formula:



-  $n = 0, 1$  or  $2$ ;

- 10 - Y is a spacer group or spacer arm which consists of a divalent organic radical, chosen from linear or branched  $C_1$  to  $C_{20}$  alkylene groups optionally containing one or more double bonds and/or one or more heteroatoms such as oxygen, nitrogen, sulfur or phosphorus or one or more carbamoyl or carboxamido group(s); or else chosen from  $C_5$  to  $C_8$  cycloalkylene groups or from  $C_6$  to  $C_{14}$  arylene groups, said alkylene, cycloalkylene or arylene groups being optionally
- 15 substituted with alkyl, aryl or sulfonate groups.

- A is a functional group which can bond covalently with a biological substance;

-  $R_1$  is a group  $-COOR_3$  in which  $R_3$  is hydrogen or a  $C_1$  to  $C_{10}$  alkyl group and preferably represents a methyl, ethyl or tert-butyl group or  $R_1$  is a group

- 20  $-CO-NH-Y-A$  or  $-Y-A$ ;

-  $R_2$  is hydrogen, an electron-donating group, in particular carboxylate,  $-NH_2$ ,  $-NHAlk$ ,  $-N(Alk)_2$ ,  $OH$ ,  $O^-$ ,  $-OAlk$ ,  $Alk$ ,  $-CH(Alk)_2$ ,  $-C(Alk)_3$ ,  $-NHCOAlk$ , substituted or unsubstituted phenyl;  $Alk$  being a  $(C_1-C_4)$ alkyl group or a group  $-CO-NH-Y-A$  or  $-Y-A$ ,

with the proviso that not more than one of the substituents  $R_1$  and  $R_2$  represents a group  $-\text{CO}-\text{NH}-\text{Y}-\text{A}$  or  $-\text{Y}-\text{A}$  and  $R_1$  and  $R_2$  do not simultaneously represent a group  $-\text{CO}-\text{NH}-\text{Y}-\text{A}$  or  $-\text{Y}-\text{A}$ , and

with the proviso that when  $n = 0$ ,  $R_2$  is other than hydrogen.

- 5 21. The complex as claimed in claim 20, characterized in that it consists of at least one rare earth metal salt complexed with a macropolycyclic compound corresponding to formula II in which:

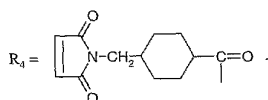
-  $n = 0$ ,

-  $\text{Y}$ ,  $\text{A}$  and  $R_1$  are as defined in claim 20, and

- 10 -  $R_2$  is as defined in claim 20 and one of the substituents  $R_2$  is a group  $-\text{CO}-\text{NH}-\text{Y}-\text{A}$  or  $-\text{Y}-\text{A}$ .

22. The complex as claimed in claims 20 or 21, characterized in that it is chosen from the europium cryptates  $[\text{Eu}^{3+} \cdot \text{py} \cdot \text{Bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{Bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2]$ ,  $[\text{Eu}^{3+} \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{py}(\text{NH}_2)_2]$  and

- 15  $[\text{Eu}^{3+} \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{bpy}(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot \text{py}(\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}_4)_2]$  in which



23. A fluorescent conjugate, consisting of a complex as claimed in any one of claims 13 to 22 bonded covalently to one of the members of a pair of molecules capable of bonding together specifically, in particular a polypeptide, a protein, a cell

- 20 receptor, an antigen, an antibody or a nucleic acid.

24. The use of a macropolycyclic complex as claimed in any one of claims 13 to 22 for reducing the fluorescence quenching caused by the measuring medium in a fluorescence assay of an analyte.

## 【 国際公開パンフレット ( コレクション ) 】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/96877 A3

- (51) International Patent Classification<sup>7</sup>: G01N 33/58, C07D 471/22
- (21) International Application Number: PCT/EP01/06642
- (22) International Filing Date: 12 June 2001 (12.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00/07650 15 June 2000 (15.06.2000) FR
- (71) Applicant (for all designated States except US): CIS BIO INTERNATIONAL [FR/FR], RN 306, F-91400 Saclay (FR).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report

- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): AUTIERO, Hervé [FR/FR], 18 boulevard Gambetta, F-30400 Villeneuve les Avignon (FR). BAZIN, Hervé [FR/FR], 14, allée de la Chenaie, F-30400 Villeneuve Les Avignon (FR). MATHIS, Gérard [FR/FR], 17, impasse Capelle des Ladres, F-30200 Bagnols sur Cèze (FR).
- (88) Date of publication of the international search report:  
11 April 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

- (74) Agents: GILLARD, Marie-Louise et al.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).



WO 01/96877 A3

(54) Title: RARE EARTH METAL CRYPTATES SHOWING REDUCED FLUORESCENCE QUENCHING

(57) Abstract: The invention relates to a process for reducing the fluorescence quenching caused by the measuring medium in a fluorescence assay, by introducing into said medium of rare earth metal cryptates comprising at least one pyridine radical which is substituted one or more times or unsubstituted. The invention also relates to novel rare metal cryptates which are not very sensitive to the fluorescence quenching caused by the measuring medium.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PLT/EP 01/06642
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 601N33/58 C07D471/22		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N C07H C12Q C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BEILSTEIN Data, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	G MATHIS: "Rare Earth Cryptates and Homogeneous Fluoroimmunoassays with Human Sera" CLINICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON, vol. 39, no. 9, 1993, pages 1953-1959, XP002125039 ISSN: 0009-9147 the whole document	1-24
A	WO 99 18114 A (BAZIN HERVE ; CIS BIO INT (FR); MATHIS GERARD (FR)) 15 April 1999 (1999-04-15) abstract; figure 2	1-24
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<b>* Special categories of cited documents:</b> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. *E* earlier document 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. *Z* document member of the same patent family.		
Date of the actual completion of the international search 29 November 2001	Date of mailing of the international search report 07/12/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patenlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3010	Authorized officer Hart-Davis, J	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PLT/EP 01/06642

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	E LOPEZ ET AL: "Europium(III) Trisbipyridine Cryptate Label for the Time-Resolved Fluorescence Detection of Polymerase Chain Reaction Products Fixed on a Solid Support" CLINICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON, vol. 39, no. 2, 1993, pages 196-201, XP002125037 ISSN: 0009-9147 page 197; figure 1 ---	1-24
A	ALPHA, BEATRICE; ANKLAM, ELKE; DESCHENAUX, ROBERT; LEHN, JEAN-MARIE; PIETRASKIEWICZ, MAREK: "Synthesis and Characterisation of the Sodium and Lithium Cryptates of Macrobicyclic Ligands Incorporating Pyridine, Bipyridine, and Bisoquinoline Units" HELV. CHIM. ACTA, vol. 71, 1988, pages 1042-1052, XP002165652 cited in the application page 1044 ---	1-24
A	US 5 696 240 A (VALLARINO LIDIA M ET AL) 9 December 1997 (1997-12-09) column 17 -column 22 ---	1-24
A	US 5 925 744 A (HAENER ROBERT ET AL) 20 July 1999 (1999-07-20) column 2, line 5 - line 22 ---	1-24

1

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/06642

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9918114 A	15-04-1999	FR 2769315 A1	09-04-1999
		AU 9355698 A	27-04-1999
		EP 1025115 A1	09-08-2000
		WO 9918114 A1	15-04-1999
US 5696240 A	09-12-1997	US 5373093 A	13-12-1994
US 5925744 A	20-07-1999	AU 695749 B2	20-08-1998
		AU 3474495 A	27-03-1996
		CA 2197788 A1	14-03-1996
		WO 9607668 A1	14-03-1996
		EP 0778844 A1	18-06-1997
		FI 970740 A	21-02-1997
		HU 77933 A2	30-11-1998
		JP 10505354 T	26-05-1998
		NO 970886 A	25-04-1997

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/58

Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 オティエロ, エルベ

フランス国, エフ - 3 0 4 0 0 ビルヌーブ レ アビニョン, プールパール ガンベッタ 1 8

(72) 発明者 バザン, エルベ

フランス国, エフ - 3 0 4 0 0 ビルヌーブ レ アビニョン, アレ ドゥ ラ シュネ, 1 4

(72) 発明者 マティ, ジェラルール

フランス国, エフ - 3 0 2 0 0 バニョル スル セズ, アンパース カペル デ ラドル, 1 7

Fターム(参考) 2G045 CA25 CA26 DA12 DA13 DA14 DA36 FB03 FB07 FB08 FB12

GC15

2G054 AA07 CA21 CA22 CA23 CE02 EA03

4C065 AA09 BB09 CC10 DD05 EE05 HH01 KK08 PP01

专利名称(译)	新型稀土金属穴状物对荧光猝灭不是很敏感		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004509075A</a>	公开(公告)日	2004-03-25
申请号	JP2002510955	申请日	2001-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	谢伊毕安妮电话全国		
申请(专利权)人(译)	谢伊毕安妮电话全国		
[标]发明人	オテイエロエルベ バザンエルベ マティジェラール		
发明人	オテイエロ,エルベ バザン,エルベ マティ,ジェラール		
IPC分类号	G01N33/533 C07D471/22 G01N21/76 G01N21/78 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/582 C07D471/22 G01N2458/40		
FI分类号	C07D471/22 G01N21/76 G01N21/78.C G01N33/533 G01N33/58.A G01N33/58.Z		
F-TERM分类号	2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA07 2G054/CA21 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 4C065/AA09 4C065/BB09 4C065/CC10 4C065/DD05 4C065/EE05 4C065/HH01 4C065/KK08 4C065/PP01		
代理人(译)	石田 敬 吉井一夫 西山雅也		
优先权	2000007650 2000-06-15 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种稀土金属穴状物的测定方法，该稀土金属穴状物通过引入含有至少一个被取代一次或多次的吡啶基的稀土金属穴状物对荧光猝灭不是很敏感，一种减少由测量介质引起的荧光猝灭的方法。本发明还涉及一种新型稀土金属穴状物，其对由测量介质引起的荧光猝灭不太敏感。

