

(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2007-527367

(P2007-527367A)

(43) 公表日 平成19年9月27日(2007.9.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C4OB 50/10</b> (2006.01)	C4OB 50/10	4B063
<b>GO1N 33/53</b> (2006.01)	GO1N 33/53 Z	4H006
<b>C12Q 1/46</b> (2006.01)	C12Q 1/46	
<b>CO7B 61/00</b> (2006.01)	CO7B 61/00 Z	
<b>CO7D 233/64</b> (2006.01)	CO7D 233/64 105	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2006-505875 (P2006-505875)	(71) 出願人	590000514
(86) (22) 出願日	平成16年4月13日 (2004.4.13)		コミツサリア タ レネルジー アトミーク
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月13日 (2005.12.13)		フランス国 パリ リュ ルブラン 25
(86) 国際出願番号	PCT/FR2004/050158		イムーブル “ル ポナン デ”
(87) 国際公開番号	W02004/092729	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成16年10月28日 (2004.10.28)		弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	0350106	(74) 代理人	100089037
(32) 優先日	平成15年4月15日 (2003.4.15)		弁理士 渡邊 隆
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学カップリング反応の操作条件のスクリーニング法およびこの方法を実行するためのキット

## (57) 【要約】

本発明は、少なくとも二つの官能基のカップリング反応の操作条件をスクリーニングするための方法、特に前記カップリング反応において有用な触媒、ならびに前記方法を実行するためのキットに関する。本発明は、基礎および応用研究へ、特に化学、アグロフード、薬学、および環境保護の領域において、合成反応の性能を開発および最適化するべく適用されることが可能である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも二つの官能基のカップリング反応の操作条件をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

i) 少なくとも二つの化合物：

・式  $E_1 - X_1 - G_1$

[ 式中、 $G_1$  は前記少なくとも二つの官能基の一番目を表し、 $X_1$  は共有結合または第一のスペーサー基を表しており、一方  $E_1$  は第一の分子  $M_1$  の残基を表し、それに対して第一の特異抗体  $AC_1$  が利用可能である ]

の第一の化合物、および

・式  $E_2 - X_2 - G_2$

[ 式中、 $G_2$  は前記少なくとも二つの官能基の二番目を表し、 $X_2$  は共有結合または第二のスペーサー基を表しており、 $X_1$  と同じかまたは異なってよく、一方  $E_2$  は、 $M_1$  とは異なる第二の分子  $M_2$  の残基であって且つこれに対しては第二の特異抗体  $AC_2$  が利用可能であるか、あるいはカップリング剤の存在下に抗体  $AC_1$  と少なくとも一つの共有結合を形成することができる基を表す ]

の第二の化合物、

を一緒に反応させる工程であって；

前記少なくとも二つの化合物が、一つの溶媒中の溶液中で、あらかじめ操作された条件下に反応させられており、少なくともその一つは、反応媒体および、鎖  $E_1 - X_1 - G_1 - G_2 - X_2 - E_2$  を含んでいる化合物  $Z$  のこの媒体における形成を得るための、候補操作条件であって、これにおいて  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $E_1$ 、および  $E_2$  は上記と同様の意味を有し、一方  $G_1 - G_2$  は、前記少なくとも二つの官能基のカップリングから結果として生じる原子団を表しており；

i i) 反応媒体中の化合物  $Z$  の濃度を、あらかじめ決められた反応時間  $t$  において、少なくとも抗体  $AC_1$  を用いた少なくとも一つのイムノアッセイによって測定する工程；および

i i i) そのようにして測定された化合物  $Z$  の濃度を用いて、前記カップリング反応に対する候補操作条件の影響を評価する工程、を含む方法。

## 【請求項 2】

前記カップリング反応が、エステル化反応、アミド反応、アルドール反応およびニトロアルドール反応、ヘック反応、ベイリス・ヒルマン反応、マイケル反応、メタセシス反応、ディールス・アルダー反応、ソノガシラ反応、スズキ反応、クマダ反応、スティール反応、ヒヤマ反応、リーベスキンド・スログル反応、マンニッヒ反応、ハンチュ反応、ボシオらの反応、ウギ反応、およびそれらの変形からなる群から選ばれる、請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

$E_1$  または  $E_2$  がヒスタミン残基を表す、請求項 1 または請求項 2 の方法。

## 【請求項 4】

$E_1$  または  $E_2$  がホモバニリン酸残基を表す、請求項 1 または請求項 2 の方法。

## 【請求項 5】

$E_1$  または  $E_2$  が、以下の式 ( I I I )：

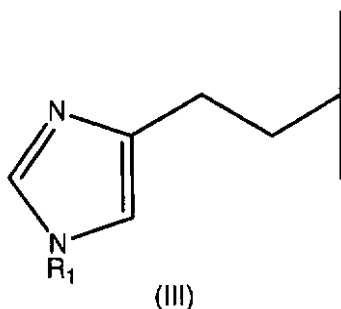
10

20

30

40

## 【化 1】



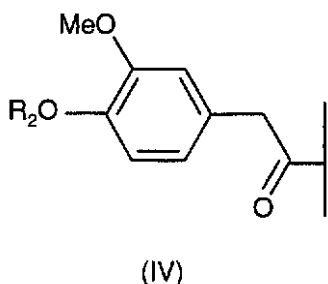
10

[ 式中、 $R_1$  は水素原子か、または保護基を表す ]  
に相当する、請求項 3 の方法。

## 【請求項 6】

$E_1$  または  $E_2$  が、以下の式 (IV) :

## 【化 2】



20

[ 式中、 $R_2$  は水素原子か、または保護基を表す ]  
に相当する、請求項 5 の方法。

## 【請求項 7】

$E_2$  が、アミン、カルボン酸、アルデヒド、チオール、フェノール、アルケニルおよびアジド基、および光活性化可能な基から選ばれる基を表す、請求項 1 または請求項 2 の方法。

## 【請求項 8】

30

$E_2$  が、アミンまたはチオール基を表す、請求項 7 の方法。

## 【請求項 9】

化合物 Z のための前記少なくとも一つのイムノアッセイが固相アッセイである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項の方法。

## 【請求項 10】

$E_2$  が、分子  $M_2$  の残基に相当することから、工程 i i ) が以下の工程 :

a<sub>1</sub>) 反応時間 t において得られた反応媒体を、その上に第一の抗体  $AC_1$  が固定されている固相と接触させ、この抗体とこの化合物の残基  $E_1$  との間の免疫結合により、この固相への化合物 Z の付着を得る工程 ;

b<sub>1</sub>) 固相を、標識へ結合された第二の抗体  $AC_2$  を含んでいるコンジュゲートと接触させ、前記第二の抗体  $AC_2$  と、前記固相へ付着された化合物 Z の残基  $E_2$  との間の免疫結合により、該コンジュゲートの、該固相への付着を得る工程 ;

40

c<sub>1</sub>) 抗体  $AC_2$  に結合された標識により、固相へ付着されたコンジュゲートの量を測定する工程 ; および

d<sub>1</sub>) そのようにして測定されたコンジュゲートの量から、前記時間 t における反応媒体中の化合物 Z の濃度を、基準範囲において測定する工程 ;

を含んでおり、

前記工程 i i ) がまた、工程 a<sub>1</sub>) と b<sub>1</sub>) の間、および工程 b<sub>1</sub>) と c<sub>1</sub>) の間に、固相を洗浄することからなる一以上の操作も含んでいる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項の方法。

50

## 【請求項 1 1】

$E_2$  が、第一の抗体  $AC_1$  と少なくとも一つの共有結合を形成することができる基に相当することから、工程  $i i$ ) が以下の工程：

$a_2$ ) 反応時間  $t$  において得られた反応媒体を、その上に第一の抗体  $AC_1$  が固定されている固相と接触させ、該抗体と該化合物の残基  $E_1$  との間の免疫結合により、該固相への化合物  $Z$  の付着を得る工程；

$b_2$ ) カップリング剤を、前記固相上に固定された第一の抗体  $AC_1$  および、該固相へ付着された化合物  $Z$  の基  $E_2$  と反応させ、該抗体と該基との間に一以上の共有結合の形成を得る工程；

$c_2$ ) 前記固相上に固定された第一の抗体  $AC_1$  と、前記固相へ付着された化合物  $Z$  の残基  $E_1$  との間に存在する免疫結合を変性させ、該固相から該残基を放出する工程； 10

$d_2$ ) 前記固相を、標識へ結合された第一の抗体  $AC_1$  を含んでいるコンジュゲートと接触させ、前記抗体と、そのように放出された化合物  $E_1 - X - G_1 - G_2 - Y - E_2$  の残基  $E_1$  との間の免疫結合により、該固相への該コンジュゲートの付着を得る工程；

$e_2$ ) 抗体  $AC_1$  に結合された標識により、前記固相へ付着されたコンジュゲートの量を測定する工程；および

$f_2$ ) そのようにして測定されたコンジュゲートの量から、前記時間  $t$  における反応媒体中の化合物  $Z$  の濃度を、基準範囲において測定する工程；

を含んでおり、

前記工程  $i i$ ) がまた、工程  $a_2$ ) と  $b_2$ ) の間、 $b_2$ ) と  $c_2$ ) の間、 $c_2$ ) と  $d_2$ ) の間、および  $d_2$ ) と  $e_2$ ) の間、に、固相を洗浄することからなる一以上の操作も含んでいる、請求項 1、2、7、または 8 のいずれか一項の方法。 20

## 【請求項 1 2】

前記第一の抗体  $AC_1$  がモノクローナル抗体である、先行する請求項のいずれか一項の方法。

## 【請求項 1 3】

前記第二の抗体  $AC_2$  がモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 6 または 10 のいずれか一項の方法。

## 【請求項 1 4】

前記固相が、その上に前記第一の抗体  $AC_1$  が吸着されている、マイクロタイトレーション用プレートのウェルの壁である、先行する請求項のいずれか一項の方法。 30

## 【請求項 1 5】

前記標識が酵素、好ましくはアセチルコリンエステラーゼである、請求項 10 または請求項 11 の方法。

## 【請求項 1 6】

前記工程  $i$ ) および  $i i$ ) の間に、反応媒体の希釈からなる操作を含んでいる、先行する請求項のいずれか一項の方法。

## 【請求項 1 7】

前記カップリング反応の収率が、反応媒体中の化合物  $Z$  の濃度から測定される、先行する請求項のいずれか一項の方法。 40

## 【請求項 1 8】

前記カップリング反応が、2、3、または 4 個の官能基のカップリングからなる、先行する請求項のいずれか一項の方法。

## 【請求項 1 9】

前記カップリング反応が二つの官能基  $G_1$  および  $G_2$  のカップリングからなり：

- 工程  $i$ ) において、式  $E_1 - X_1 - G_1$  および  $E_2 - X_2 - G_2$  の化合物は一緒に反応され、前記反応媒体中で、式  $E_1 - X_1 - G_1 - G_2 - X_2 - E_2$

[ 式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $E_1$ 、および  $E_2$  は上記と同様の意味を有し、 $G_1 - G_2$  は前記官能基  $G_1$  および  $G_2$  の間のカップリングから結果として生じる原子団を表す ]

に相当する化合物  $Z$  の形成が得られ、一方

- 工程 i i ) において、前記反応媒体中の化合物 Z の濃度は、単一のイムノアッセイによって測定される、  
請求項 18 の方法。

【請求項 20】

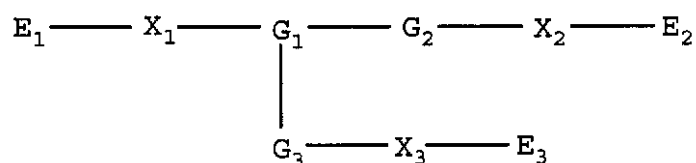
前記カップリング反応が三つの官能基  $G_1$ 、 $G_2$ 、および  $G_3$  のカップリングからなり：

- 工程 i ) においては、式  $E_1 - X_1 - G_1$  および  $E_2 - X_2 - G_2$  の化合物は、式  $E_3 - X_3 - G_3$

[ 式中、 $X_3$  は共有結合か、または第三のスペーサー基を表し、 $X_1$  および / または  $X_2$  と同じかまたは異なってよく、一方  $E_3$  は、 $M_1$  および  $M_2$  とは異なる第三の分子  $M_3$  の基であり、それに対して第三の特異抗体  $AC_3$  が利用可能であるか、あるいは、カップリング剤の存在下に抗体  $AC_1$  と共有結合を形成することが可能な基を表すが、 $E_2$  がすでにかかっている基を表していることはないという条件下である ]

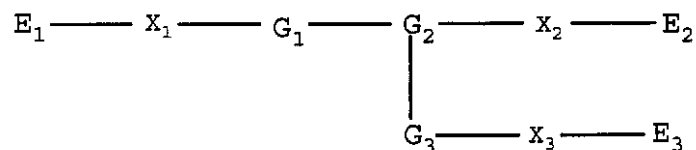
の第三の化合物と反応され、前記反応媒体中で、以下の式：

【化 3】

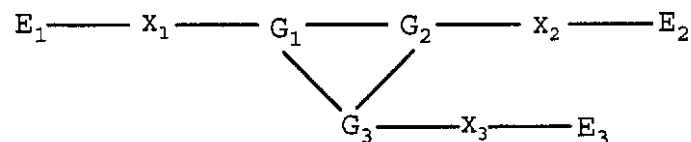


10

20

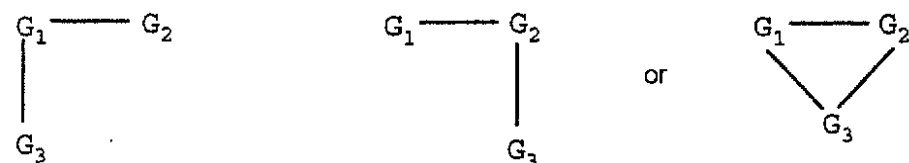


30



[ 式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $E_1$ 、 $E_2$ 、および  $E_3$  は、上記と同様の意味を有し、かつ

【化 4】



は、前記官能基  $G_1$ 、 $G_2$ 、および  $G_3$  のカップリングから結果として生じる原子団を表す ]

40

の一つに相当する化合物 Z の形成を得るようにし；一方

- 工程 i i ) においては、反応媒体中の化合物 Z の濃度が、二つの異なるイムノアッセイにより測定される、  
請求項 18 の方法。

【請求項 21】

前記カップリング反応が四つの官能基  $G_1$ 、 $G_2$ 、 $G_3$ 、および  $G_4$  のカップリングからなり：

- 工程 i ) においては、式  $E_1 - X_1 - G_1$  および  $E_2 - X_2 - G_2$  の化合物は、前文に定義された式  $E_3 - X_3 - G_3$  の第三の化合物と、および式  $E_4 - X_4 - G_4$

[ 式中、 $X_4$  は共有結合か、または第 4 のスペーサー基を表し、 $X_1$ 、 $X_2$  および / また

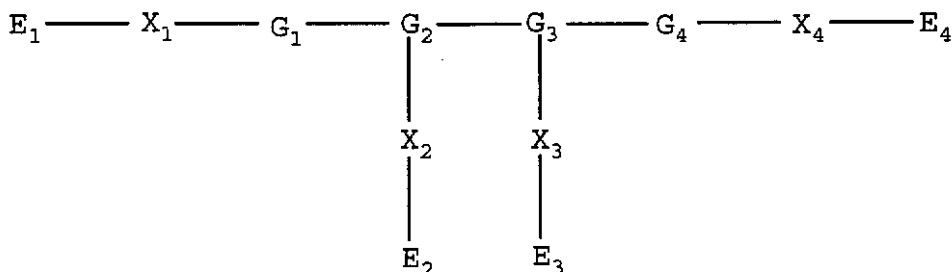
50

は  $X_3$  と同じかまたは異なってよく、一方  $E_4$  は、 $M_1$ 、 $M_2$ 、および  $M_3$  とは異なる第四の分子  $M_4$  の残基であり、それに対して第四の特異抗体  $AC_4$  が利用可能であるか、あるいは、カップリング剤の存在下に抗体  $AC_1$  と共有結合を形成することが可能な基を表すが、 $E_2$ 、および  $E_3$  がすでにかかる基を表していることはないという条件下である ]

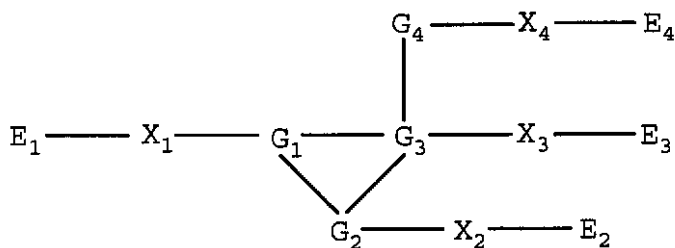
の第 4 の化合物と反応され、

前記反応媒体中で、以下の式：

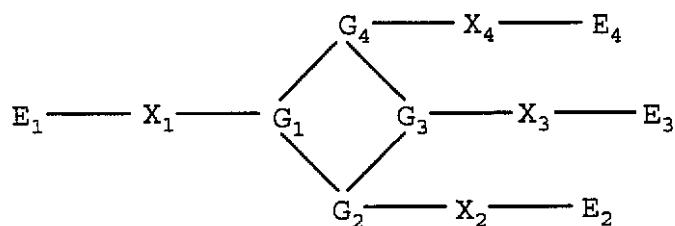
【化 5】



10



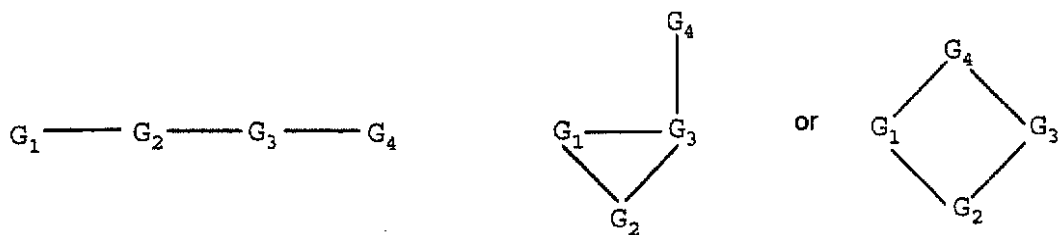
20



30

[ 式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $E_1$ 、 $E_2$ 、 $E_3$ 、および  $E_4$  は、上記と同様の意味を有し、かつ

【化 6】



40

は、前記官能基  $G_1$ 、 $G_2$ 、 $G_3$ 、および  $G_4$  のカップリングから結果として生じる原子団を表す ]

の一つに相当する化合物  $Z$  の形成を得るようにし；一方

- 工程  $i$  ) においては、前記反応媒体中の化合物  $Z$  の濃度が、三つの異なるイムノアッセイにより測定される、

請求項 18 の方法。

【請求項 22】

前記候補操作条件が、溶媒、触媒、温度レベル、圧力レベル、超音波の利用、濃度、化学量論比、反応時間、およびそれらの組合せからなる群より選ばれる、先行する請求項の

50

いずれか一項の方法。

【請求項 2 3】

前記候補操作条件が触媒である、先行する請求項のいずれか一項の方法。

【請求項 2 4】

少なくとも二つの官能基のカップリング反応の操作条件をスクリーンする方法を実行するためのキットであって、適当な量の：

- 一緒に反応することが意図された少なくとも二つの化合物、

・式  $E_1 - X_1 - G_1$

[ 式中、 $G_1$  は前記少なくとも二つの官能基の一番目を表し、 $X_1$  は共有結合または第一のスペーサー基を表しており、 $E_1$  は第一の分子  $M_1$  の残基を表す ]

10

の第一の化合物；および

・式  $E_2 - X_2 - G_2$

[ 式中、 $G_2$  は前記少なくとも二つの官能基の二番目を表し、 $X_2$  は共有結合または第二のスペーサー基を表し、 $X_1$  と同じかまたは異なってよく、 $E_2$  は、 $M_1$  とは異なる第二の分子  $M_2$  の残基である ]

の第二の化合物；

- 少なくとも二つの抗体：

・第一の分子  $M_1$  に特異的な第一の抗体  $AC_1$  であり、該抗体は任意に複数の固相へ付着されており；および

20

・第二の分子  $M_2$  に特異的な第二の抗体  $AC_2$  であり、該抗体は標識へ結合されており；

- 鎖  $E_1 - X_1 - G_1 - G_2 - X_2 - E_2$  を含んでいる化合物  $Z$  であり、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $E_1$ 、および  $E_2$  は上記と同様の意味を有し、一方  $G_1 - G_2$  は、前記少なくとも二つの官能基のカップリングから結果として生じる原子団を表しており；さらに、任意に：

- 標識を可視化するための試薬、たとえば標識が酵素であれば基質；および

- 適当に選ばれた緩衝液、

を含むキット。

【請求項 2 5】

少なくとも二つの官能基のカップリング反応の操作条件をスクリーンする方法を実行するためのキットであって、適当な量の：

- 一緒に反応することが意図された少なくとも二つの化合物、

30

・式  $E_1 - X_1 - G_1$

[ 式中、 $G_1$  は前記少なくとも二つの官能基の一番目を表し、 $X_1$  は共有結合または第一のスペーサー基を表しており、 $E_1$  は第一の分子  $M_1$  の残基を表す ]

の第一の化合物；および

・式  $E_2 - X_2 - G_2$

[ 式中、 $G_2$  は前記少なくとも二つの官能基の二番目を表し、 $X_2$  は共有結合または第二のスペーサー基を表し、 $X_1$  と同じかまたは異なってよく、 $E_2$  は、カップリング剤の存在下に、分子  $M_1$  に特異的な抗体と一以上の共有結合を形成することのできる基を表す ]

の第二の化合物；

- 少なくとも一つの抗体、この抗体は分子  $M_1$  に特異的な前記抗体であり；

40

- 標識へ結合された、分子  $M_1$  に特異的な前記抗体を含んでいるコンジュゲート；

- 鎖  $E_1 - X_1 - G_1 - G_2 - X_2 - E_2$  を含んでいる化合物  $Z$  であり、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $E_1$ 、および  $E_2$  は上記と同様の意味を有し、一方  $G_1 - G_2$  は、前記少なくとも二つの官能基のカップリングから結果として生じる原子団を表しており；さらに、任意に：

- 標識を可視化するための試薬、

- カップリング剤、

- 免疫結合を変性させることができる試薬、および

- 適当に選ばれた緩衝液、

を含むキット。

【請求項 2 6】

50

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項のスクリーニング法の、または、請求項 2 4 または請求項 2 5 のキットの、スクリーニングのための、特に、二つの官能基間のカップリング反応において有用な触媒の「ハイスループット」スクリーニングのための用途。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、参考として本明細書に含まれる、2003年4月15日出願のフランス特許出願番号第03 50106号の優先権を主張する。

【0002】

本発明は、化学カップリング反応の操作条件のスクリーニング法、およびこの方法が実行されることを可能にするための好適なキットに関する。 10

【0003】

さらに明確には、本発明は、種々の操作条件の影響を、反応の収率について同時に検査するための方法であって、たとえば、結果としてこの収率の最適化を生じる一つまたはいくつかの条件を選択する目的で、少なくとも二つの官能基をカップリングすることを含む方法に関する。

【0004】

このような操作条件は、定性的および定量的の双方であってよい。

【0005】

従って、この方法は、触媒または溶媒といった、特定のカップリング反応においてそれらが有用であり得るかどうかを決定することが所望される物質をスクリーンするべく使用されることが可能であり、また、反応媒体としてカップリング反応の収率に対するその影響を測定することが要求されるレベル、たとえば温度または圧力レベル、濃度、化学量論比、または、反応時間または反応媒体の攪拌時間のような時間を、スクリーニングするべく使用されてよい。 20

【0006】

本発明の方法は、それゆえ、基礎および応用の双方の研究の分野において、数多くの適用を見出しやすい。

【0007】

したがってそれは、たとえば、化学的であれ生物学的であれ、均一系または不均一系の触媒作用の機構のよりよい理解を目的とする基礎的研究において使用されることが可能である。 30

【0008】

それはまた、応用調査研究において、特に化学、アグロフード、薬学、および環境保護の領域において、より効果的でありかつ特定の制約に対し特異的に反応し得る触媒を開発すること、または、合成反応の収率または実験条件を、たとえばこれらの反応の実行の経費を低減するべく最適化すること、という目的で使用されることが可能である。

【0009】

それは特に、「野生型」酵素の触媒性能レベルを改善する目的で、突然変異した酵素のライブラリをスクリーンするべく、あるいは既知または未知の組成を有する生物学的媒体を、これらの媒体中の特定の触媒活性の存在を同定する目的でスクリーンするべく使用されることが可能である。 40

【背景技術】

【0010】

カップリング反応の操作条件をスクリーニンするという点においては、これらは本質的には、今日までに提案されてきた触媒をスクリーンするべく意図された方法である。

【0011】

こうした方法は、すべて、種々の候補触媒の存在下に、それについてカップリング反応が使用されやすい化合物のファミリーを代表する、二つの特定の化合物を反応させることからなる工程、およびその後の、前記反応に対するこれらの触媒の有効性を評価すること 50

からなる工程を含む。

【0012】

したがって、第一に、カップリング反応の終了時に、反応媒体の組成を分析することを目的とした、高圧力液体クロマトグラフィー（HPLC）による既知の方法があり、そのことは、たとえばシリカゲルカラム上での濾過により、それらがまず精製されねばならないことを意味している。

【0013】

これらはそれゆえ、実行するのに骨の折れる方法であり、一日あたり限られた数の検査しか行なうことができず、結果的にメディアム - またはハイ - スループットスクリーニングには完全に不相当である。

【0014】

第二に、カップリング反応の終了時に、このカップリング反応に関与する化合物の一つと、または前記反応から派生した産物または副産物と反応して、呈色、脱色、または蛍光または化学発光の放出といったシグナルを発生することができる、化学反応を使用することを目的とした方法がある。

【0015】

単なる例として、以下が参照される：

- ラバストル（Lavastre）およびモルケン（Morken）により *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999年、第38巻、第21号、p. 3163 - 3165、[1]において記述された、アシル位アルキル化において有用な触媒のスクリーニングのための方法であり、このアルキル化の過程で産生される1-ナフトールを、「ファーストレッドバイオレットLB」として知られるジアゾニウム塩と反応させ、明橙色化することによって検出することを目的とする；

- ベーム（Boehm）およびハーマン（Herrmann）により、*Eur. J. Org. Chem.* 2000年、p. 3679 - 3681、[2]において記述された、ソノガシラ（Sonogashira）反応において有用な触媒をスクリーンするためのものであって、この反応の産物を、 $\text{KMnO}_4$ で酸化して反応媒体の脱色を引き起こすことによって示すことからなる；

- レーバー（Loeber）らにより、*J. Am. Chem. Soc.* 2001年、第123巻、p. 4366 - 4367、[3]において提唱された、アニリンのようなアリアルアミンによる1,3-ジエンのヒドロアミネーションにおいて有用な触媒をスクリーンするためのものであって、残存するアニリンを、その効果が反応媒体を赤色に着色することである、酸の存在下にフルフラールと反応させることによって示すことからなる。

【0016】

この第二のタイプの方法は、それ自身、カップリング反応に関与する化合物の一つに、あるいはこの反応によって形成される産物に、特異的な反応物を必要とするという欠点を示しており、そのことが、化合物に関連するかまたは、かかる反応物をそれに利用することができる産物を結果として生じる、反応のスクリーニングへの、その使用を制限している。

【0017】

また、カップリング反応に関係する化合物の一方が固形担体へ付着されており、他方が蛍光プローブで標識されている方法も存在する。二つの化合物は反応されるため、触媒の有効性は、結果として固形担体上に反応由来の産物の形成を生じる。この担体は次に、反応していない化合物の分画を除去し、かつ反応に由来する産物を前記担体上に存在する蛍光を読取ることによって検出する目的で、洗浄されねばならない。

【0018】

このような方法の実例は、ショーネシー（Shaugnessy）らによる文献（*J. Am. Chem. Soc.* 1999年、第121巻、p. 2123 - 2132、[4]）において、ヘック（Heck）反応において有用な触媒のスクリーニングについて例示されている。この実例においては、第一の化合物は架橋されたポリスチレン樹脂（ワング（wang）樹脂）へ付着されているハロゲン化アリアルであり、一方第二の化合物はクマリンで標識されたアクリレート

である。

【0019】

後者のタイプの方法は、二つの主要な欠点を示す。まず、触媒作用は不均一媒体中で行なわれる。現在、不均一媒体中で高い触媒活性を示す触媒が、均一媒体中では完全に無効であることを証明することが可能であることが知られている。さらに、触媒作用の査定は本質的に定性的であって、カップリング反応の収率を計算することは、この計算が固形担体上の第一の化合物のグラフティングの度合いについての知識を必要とすることから困難である。

【0020】

もう一つのタイプの方法は、有効な触媒の存在下では、無効な触媒の存在下よりも、反応による熱の放出がより迅速に起こるという事実に基づいている。したがって、熱量測定法によるか、または前記反応媒体の上に固定された超高感度赤外線カメラを使用したサーモグラフィーによって、反応媒体の温度変異を測定することにより、触媒の有効性を査定することが可能である。

10

【0021】

このタイプの方法の一つの態様の事例は、ブラックモンド (Blackmond) らによる刊行物 (Organic Process Research & Development、1999年、第3巻、第4号、p. 275 - 280、[5]) において、ヘック反応において有用な触媒のスクリーニングについて例示されている。

【0022】

熱分析スクリーニング法は、相当な、かつ費用のかかる材料を必要とするという欠陥を有する。さらに、それは反応収率の計算を可能にはしない。最後に、それはゆっくりと起こる反応には適用可能ではなく、その結果として、検出不能または十分に有意ではない熱の量を出してしまう。

20

【0023】

最後に、ヒンダーリング (Hinderling) およびチャン (Chen) により、Angew. Chem. Int. Ed.、1999年、第38巻、第15号、p. 2253 - 2256、[6] において、オレフィン重合触媒のスクリーニングを行なうための、エレクトロスプレー質量分析法の使用が提唱されている。ここでもまた、相当な、かつ費用のかかる材料を必要とする方法が含まれている。

30

【非特許文献1】Lavastre and Morken, Angew. Chem. Int. Ed. 1999, 38(21), 3163-3165

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0024】

それゆえ、カップリング反応に対する種々の操作条件の影響、およびさらに詳細にはこの反応における触媒の潜在的な有用性、を検査することを可能にする方法、および全般的に、今日までに提案されたスクリーニング法によって示されたすべての欠点がない方法に対し、真の必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

40

【0025】

本発明は、少なくとも二つの官能基のカップリング反応の操作条件をスクリーニングする方法を提供することにより、この必要性を的確に満たすものであり、以下の工程：

i) 少なくとも二つの化合物：

・式  $E_1 - X_1 - G_1$

[ 式中、 $G_1$  は前記少なくとも二つの官能基の一番目を表し、 $X_1$  は共有結合または第一のスペーサー基を表しており、一方  $E_1$  は第一の分子  $M_1$  の残基を表し、それに対し第一の特異抗体  $AC_1$  が利用可能である ]

の第一の化合物、および

・式  $E_2 - X_2 - G_2$

50

[ 式中、 $G_2$  は前記少なくとも二つの官能基の二番目を表し、 $X_2$  は共有結合または第二のスペーサー基を表しており、 $X_1$  と同じかまたは異なってよく、一方  $E_2$  は、 $M_1$  とは異なる第二の分子  $M_2$  の残基でありかつ第二の特異抗体  $AC_2$  がそれに対して利用可能であるか、あるいはカップリング剤の存在下に抗体  $AC_1$  と少なくとも一つの共有結合を形成することができる基を表す ]

の第二の化合物、

を一緒に反応させることであって；

前記少なくとも二つの化合物は、一つの溶媒において溶液中で、あらかじめ操作された条件下に反応されており、少なくともその一つは、反応媒体および、鎖  $E_1 - X_1 - G_1 - G_2 - X_2 - E_2$  を含んでいる化合物  $Z$  のこの媒体における形成を得るための、候補操作条件であって、これにおいて  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $E_1$ 、および  $E_2$  は上記と同様の意味を有し、一方  $G_1 - G_2$  は、前記少なくとも二つの官能基のカップリングから結果として生じる原子団を表しており；

i i) 反応媒体中の化合物  $Z$  の濃度を、あらかじめ決められた反応時間  $t$  において、少なくとも抗体  $AC_1$  を用いた少なくとも一つのイムノアッセイによって測定する工程；および

i i i) そのようにして測定された化合物  $Z$  の濃度を用いて、前記カップリング反応に対する候補操作条件の影響を評価すること、を含む。

#### 【0026】

したがって、本発明の方法においては、それについて操作条件をスクリーンすることが所望されかつ、この適例では  $G_1$  および  $G_2$  の少なくとも二つの官能基を含むカップリング反応は、反応物として、各々が一端にこれらの官能基のうちの一つを、他端には、それに対して特異抗体、各々  $AC_1$  および  $AC_2$  が利用可能である各々分子  $M_1$  および  $M_2$  の残基、を、あるいは第二の化合物の場合には、分子  $M_1$  に特異的な抗体  $AC_1$  と一以上の共有結合を形成することの可能な基を含んでいる、少なくとも二つの化合物を使用して、カップリング剤の存在下に行なわれる。

#### 【0027】

カップリング反応によって産生される化合物  $Z$  の反応媒体中の濃度は、したがって、選択された反応時間  $t$  において、少なくとも一つのイムノアッセイによって容易に測定されることが可能であり、このアッセイは抗体  $AC_1$  のみか、または二つの抗体  $AC_1$  および  $AC_2$  を使用する。

#### 【0028】

ひとたび化合物  $Z$  の濃度がわかれば、次に、カップリング反応の収率を計算によって測定すること、およびその下にそれが行なわれた操作条件の影響を査定することが可能である。これらの影響はまた、しかしながら、前記濃度を、異なる操作条件下にあらかじめ得られていた一以上の濃度と比較すること、および基準値としての役割を果たすことによっても査定されることが可能である。

#### 【0029】

上記のおよび以下の本文において：

- 用語「候補操作条件」は、それについて、カップリング反応に対する影響が検査される、操作条件を意味することが意図される；

- 用語、分子  $M_1$  の「残基」は、前記分子が、 $X_1$  が共有結合またはスペーサー基を表すかに依存して官能基  $G_1$  またはスペーサー基へ、共有結合によって付着された場合、式  $E_1 - X_1 - G_1$  の化合物中に残っているこの分子部分を意味することが意図される；同様に、用語、各々  $M_2$ 、 $M_3$ 、または  $M_4$  の分子の「残基」は、前記分子が、 $X_2$ 、 $X_3$ 、または  $X_4$  が共有結合またはスペーサー基を表すかに依存して各々官能基  $G_2$ 、 $G_3$ 、または  $G_4$  か、またはスペーサー基へ、共有結合によって付着された場合、式  $E_2 - X_2 - G_2$ 、 $E_3 - X_3 - G_3$ 、または  $E_4 - X_4 - G_4$  の化合物中に残っているこの分子部分を意味することが意図される。

10

20

30

40

50

## 【0030】

さらに、用語、分子に「特異的な抗体」は、この分子を特異的に認識すること、および抗原-抗体免疫反応によりそれと結合することのできる抗体を意味することが意図される。

## 【0031】

前文に示したように、化合物  $E_1 - X_1 - G_1$  および  $E_2 - X_2 - G_2$  において、 $G_1$  および  $G_2$  は、操作条件をスクリーンすることが所望されるカップリング反応に少なくとも関与している二つの官能基に相当し、それゆえこの反応によって選ばれる。

## 【0032】

二つの官能基を含み、かつ本発明による方法がそれに使用可能であるカップリング反応は、特に以下の分子間カップリング反応である： 10

- エステル化反応、カルボン酸 ( $R - COOH$ ) または、たとえば、酸ハロゲン化物 ( $R - CO - Hal$ ) のようなカルボン酸誘導体と、アルコール ( $R - OH$ ) とのカップリングからなるような、エステル基 ( $R - CO_2 R$ ) を得るようにする反応；

- アミド反応、カルボン酸 ( $R - COOH$ ) またはカルボン酸誘導体と、第一級 ( $R - NH_2$ ) または第二級 ( $R - NH - R$ ) アミンとのカップリングからなるような、アミド ( $R - CONH - R$  または  $R - CONR - R$ ) を得るようにする反応；

- アルドール反応、二つのアルデヒド ( $R - CHO$ ) または二つのケトン ( $R - CO - R$ ) のカップリングか、またはアルデヒドとケトンのカップリングからなるような、アルドールまたはケトールを得るようにする反応、およびニトロアルドール反応のようなその変形で、アルデヒドが窒素化合物 ( $R - CH_2 - NO_2$ ) とカップリングされてニトロアルコール ( $R - CH(OH) - CH(NO_2) - R$ ) を得るようにするような反応； 20

- ヘック反応、オレフィン ( $R - CH = CH_2$ ) と有機ハロゲン化物 ( $R - Hal$ ) とのカップリングからなり、アルケン ( $R - CH = CH - R$ ) を得るようにする反応、およびその変形；

- ベイリス・ヒルマン (Baylis-Hillman) 反応、アルケン ( $R - CH = CH_2$ ) とアルデヒド ( $R - CHO$ ) とのカップリングからなり、アリルアルコール ( $R - C(CH_2) - CH(OH) - R$ ) を得るようにする反応、およびその変形；

- マイケル (Michael) 反応、求核性化合物と不飽和電子受容体化合物 (たとえば、 $R - CH = CH_2$ ) との間の付加反応からなる反応、およびその変形； 30

- メタセシス反応、二つのオレフィン (たとえば、 $R - CH = CH_2$  および  $R - CH = CH_2$ ) のカップリングからなり、第三のオレフィン ( $R - CH = CH - R$ ) を得るようにするような反応；

- ディールス・アルダー (Diels-Alder) 反応であり、ジエンとジエノフィルとの間の環付加化からなる反応；

- ソノガシラ反応、アルキン ( $R - C \equiv CH$ ) とハロゲン化アリール ( $Ar - Hal$ ) とのカップリングからなる反応、およびその変形；

- スズキ (Suzuki) 反応、アリールボロン酸 ( $Ar - B(OH)_2$ ) とハロゲン化アリール ( $Ar - Hal$ ) とのカップリングからなり、ジアリール ( $Ar - Ar$ ) を得る 40

ようにする反応、およびその変形；

- クマダ (Kumada) 反応、グリニャール試薬 ( $R - Mg - Hal$ ) とハロゲン化アルキル、ハロゲン化ビニル、またはハロゲン化アリールとのカップリングからなる反応、およびその変形；

- スティール (Stille) 反応、有機スズ化合物 (たとえば、 $Ar - SnBu_3$ ) と有機ハロゲン化物 (たとえば、 $Ar - Br$ ) とのカップリングからなる反応、およびその変形；

- ヒヤマ (Hiyama) 反応、有機シラン (たとえば、 $Ar - SiR_3$ ) と有機ハロゲン化物 (たとえば、 $Ar - Br$ ) とのカップリングからなる反応、およびその変形；

- リーベスキンド・スログル (Liebeskind-Srogl) 反応、ボロン酸 (たとえば、 $Ar -$  50

B(OH)<sub>2</sub>)とチオールエステル(R-CO-S-R)のカップリングからなり、ケトンを得るようにする反応、および変形。

【0033】

三つの官能基を含むカップリング反応は、特に、活性水素を有する化合物と、エノール化不能なアルデヒドおよび、第一級または第二級アミンとのカップリングからなり、アミノメチル化合物を得るようにするマンニヒ(Mannich)反応、アミンと、アルデヒドおよび、 $\alpha$ -プロモケトンとのカップリングからなり、ピロールを得るようにするハンチュ(Hantzsch)反応、および $\alpha$ -ケトアルデヒドと、カルボン酸および、イソニトリルとのカップリングからなり、オキサゾールを得るようにするボシオ(Bossio)らの反応であり、一方4つの官能基を含むカップリング反応は、たとえば、カルボン酸、第一級アミン、カルボニル化合物、およびイソシアニドのカップリングからなり、 $\alpha$ -アミノカルボキサミドを得るようにするウギ(Ugi)反応である。

10

【0034】

さらに、式E<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-G<sub>1</sub>、およびE<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>-G<sub>2</sub>の化合物においては、E<sub>1</sub>は分子M<sub>1</sub>の残基を表し、それに対し第一の特異抗体AC<sub>1</sub>が利用可能であり、一方E<sub>2</sub>は分子M<sub>2</sub>の残基を表し、それに対し第二の特異抗体AC<sub>2</sub>が利用可能である。

【0035】

これら二つの残基は、それらが由来した分子M<sub>1</sub>およびM<sub>2</sub>のものと同様の抗原性を示さねばならず、各々、抗体AC<sub>1</sub>および抗体AC<sub>2</sub>によって認識されて、それらと免疫結合を形成するが、しかしカップリング反応の進行を、特に立体障害によって損なうことも、この反応を妨害することもあってはならない。

20

【0036】

したがって、分子M<sub>1</sub>およびM<sub>2</sub>は好ましくはハプテン、すなわち低分子であって、タンパク質(ウシ血清アルブミン、 $\gamma$ -免疫グロブリンなど)または多糖のようなベクター上へのグラフティングの後、それらに対して特異的に指示された抗体の産生を動物に誘発することができる。

【0037】

これらのハプテンは、特に、まずにそれらがベクター上にグラフトされ、二番目に官能基G<sub>1</sub>およびG<sub>2</sub>か、または、X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>がそのような基である場合にはスパーサー基へ付着されるようにすることができる反応性の基、好ましくはカルボン酸、アミン、またはチオールで置換された、ナフタレン、アントラセン、フェナントレン、ビシクロ[2.2.2]オクタン、ビシクロ[2.2.2]ヘプタン、2,2-ジメチル-3-メチル-4,4-ジメチルペンタン、アダマンタン、パーヒドロフェナレン、およびパーヒドロアントラセンといった、炭化水素であることが可能である。かかる炭化水素は、事実上、化学的にかなり不活性であるという利点をもつ。

30

【0038】

しかしながら、これらのハプテンはまた、炭化水素以外の分子であることも可能であり、その場合、もし化合物E<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-G<sub>1</sub>、およびE<sub>2</sub>-X<sub>2</sub>-G<sub>2</sub>において、これらの分子の残基が、カップリング反応が行なわれる条件下に反応することが可能な一以上の遊離の官能基を含む場合には、この、またはこれらの官能基は、カップリング反応が行なわれる前、すなわちこの方法の工程i)に先立ち選択された、適当な保護基で保護されるべきであり、次に、工程i)と工程ii)との間で脱保護される。

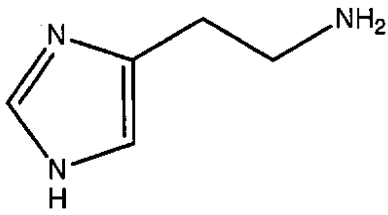
40

【0039】

二つの分子が、本発明の方法を実行するために特に有利なハプテンを構築するために見出されている。これらは、第一にヒスタミンであって、以下の式(I)：

【0040】

## 【化 1】



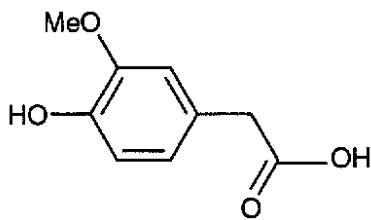
(I)

## 【0041】

に相当し、これに対しては、少なくとも  $10^{-8}$  M に等しい  $K_d$  を示すいくつかのモノクローナル抗体を得ることが可能になっており、第二にはホモバニリン酸であって、以下の式 (II) :

## 【0042】

## 【化 2】



(II)

## 【0043】

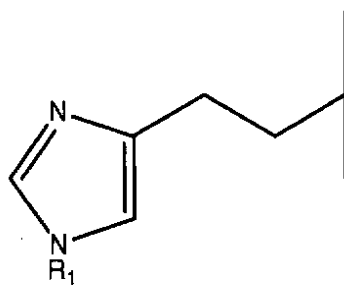
に相当し、これに対しては、少なくとも  $10^{-6}$  M に等しい  $K_d$  を示すいくつかのモノクローナル抗体を得ることが可能になっている。

## 【0044】

したがって、本発明の方法の第一の好ましいアレンジメントによれば、化合物  $E_1 - X_1 - G_1$  における  $E_1$ 、または  $E_2 - X_2 - G_2$  における  $E_2$  は、以下の式 (III) :

## 【0045】

## 【化 3】



(III)

## 【0046】

[式中、 $R_1$  は水素原子か、または、たとえば、tert-ブチルオキシカルボニル (BOC) 基またはベンジル基のような、アミン官能基 - 保護基を表す] に相当する。

## 【0047】

したがって、本発明の方法のもう一つの好ましいアレンジメントによれば、化合物  $E_1 - X_1 - G_1$  における  $E_1$ 、または  $E_2 - X_2 - G_2$  における  $E_2$  は、以下の式 (IV) :

## 【0048】

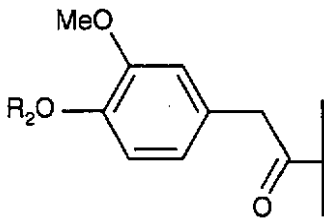
10

20

30

40

## 【化 4】



(IV)

## 【0049】

[式中、 $R_2$  は水素原子か、または、たとえば、ジメチル *tert*-ブチルシリルタイプのシリル化された基、ジヒドロピラン、さもなければベンジル、アリル、またはアセタール基といったアルコール官能基 - 保護基を表す] に相当する。

10

## 【0050】

化合物  $E_2 - X_2 - G_2$  においては、 $E_2$  が分子  $M_2$  の残基ではなく、カップリング剤の存在下に抗体  $AC_1$  と少なくとも一つの共有結合を形成することができる基を表すことが可能であり、その場合、この基はアミン、カルボン酸、アルデヒド、チオール、フェノール、アルケニル、およびアジド基、およびたとえば、ベンゾフェノンおよびアリールアジド基のような光活性化可能な基から都合よく選ばれる。

## 【0051】

好ましくは、 $E_2$  はアミンまたはチオール基である。前文に示したように、 $E_1 - X_1 - G_1$  および  $E_2 - X_2 - G_2$  の化合物において、 $E_1$  および  $E_2$  は、官能基  $G_1$  および  $G_2$  に対し、直接的に、またはスペーサー基を介して付着されてよい。

20

## 【0052】

これらのスペーサー基は、その機能は、第一に  $E_1$  と官能基  $G_1$  との間に、第二に  $E_2$  と官能基  $G_2$  との間に、ただブリッジを形成することのみであり、エチレン ( $-(CH_2)_2-$ )、プロピレン ( $-(CH_2)_3-$ )、またはブチレン ( $-(CH_2)_4-$ ) タイプなどの飽和炭化水素基のような任意の官能基を欠いている基か、またはカップリング反応が実行される操作条件下では反応することができない一以上の官能基を含む基か、さもなければカップリング反応が実行される前に、適当な保護基で保護されている一以上の官能基を含む基である。

30

## 【0053】

本発明によれば、化合物  $Z$  のための前記少なくとも一つのイムノアッセイは、実現の単純さを理由に、好ましくは固相アッセイである。

## 【0054】

本発明による方法の第一の好ましい態様によれば、 $E_2$  は、化合物  $E_2 - X_2 - G_2$  において分子  $M_2$  の残基に相当することから、化合物  $Z$  のための前記少なくとも一つのイムノアッセイは、「サンドイッチ」タイプ (または 2 サイト) のアッセイであり、工程  $i i$ ) は以下の工程：

$a_1$ ) 反応時間  $t$  において得られた反応媒体を、その上に抗体  $AC_1$  が固定されている固相と接触させ、この抗体とこの化合物の残基  $E_1$  との間の免疫結合により、この固体上への化合物  $Z$  の付着を得る工程；

40

$b_1$ ) 固相を、標識へ結合された抗体  $AC_2$  を含んでいるコンジュゲートと接触させ、この抗体と、前記固相へ付着された化合物  $Z$  の残基  $E_2$  との間の免疫結合により、該コンジュゲートの、該固相への付着を得る工程；

$c_1$ ) 抗体  $AC_2$  に結合された標識により、固相へ付着されたコンジュゲートの量を測定する工程；および

$d_1$ ) そのようにして測定されたコンジュゲートの量から、前記時間  $t$  における反応媒体中の化合物  $Z$  の濃度を、基準範囲において測定する工程；

を含んでおり、

50

前記工程 i i ) はまた、工程 a<sub>1</sub> ) と b<sub>1</sub> ) の間、および工程 b<sub>1</sub> ) と c<sub>1</sub> ) の間に、固相を洗浄することからなる一以上の操作も含む。

【 0 0 5 5 】

このアッセイは、それゆえ二つの抗体 A C<sub>1</sub> および A C<sub>2</sub> を使用しており、抗体 A C<sub>1</sub> は固相上に固定され、抗体 A C<sub>2</sub> は標識へ結合される。

【 0 0 5 6 】

本発明による方法のもう一つの好ましい態様によれば、E<sub>2</sub> は、化合物 E<sub>2</sub> - X<sub>2</sub> - G<sub>2</sub> において、抗体 A C<sub>1</sub> と少なくとも一つの共有結合を形成することができる基に相当することから、化合物 Z のための前記少なくとも一つのイムノアッセイは、US - A - 5, 476, 770 [ 7 ] において記述された、「S P I E - I A」タイプ ( 固相エピトープイムノアッセイ ( Solid-Phase Epitope ImmunoAssey ) ) のアッセイであり、工程 i i ) は以下の工程：

a<sub>2</sub> ) 反応時間 t において得られた反応媒体を、その上に抗体 A C<sub>1</sub> が固定されている固相と接触させ、この抗体とこの化合物の残基 E<sub>1</sub> との間の免疫結合により、この固相への化合物 Z の付着を得る工程；

b<sub>2</sub> ) カップリング剤を、固相上に固定された抗体 A C<sub>1</sub> および、この固相へ付着された化合物 Z の基 E<sub>2</sub> と反応させ、該抗体と該基との間に一以上の共有結合の形成を得る工程；

c<sub>2</sub> ) 固相上に固定された抗体 A C<sub>1</sub> と、前記固相へ付着された化合物 Z の残基 E<sub>1</sub> との間に存在する免疫結合を変性させ、該固相から該残基を放出する工程；

d<sub>2</sub> ) 固相を、標識へ結合された抗体 A C<sub>1</sub> を含んでいるコンジュゲートと接触させ、前記抗体と、そのように放出された化合物 Z の残基 E<sub>1</sub> との間の免疫結合により、該コンジュゲートの付着を得る工程；

e<sub>2</sub> ) 抗体 A C<sub>1</sub> に結合された標識により、固相へ付着されたコンジュゲートの量を測定する工程；および

f<sub>2</sub> ) そのようにして測定されたコンジュゲートの量から、前記時間 t における反応媒体中の化合物 Z の濃度を、基準範囲において測定する工程；

を含んでおり、

前記工程 i i ) はまた、工程 a<sub>2</sub> ) と b<sub>2</sub> ) の間、b<sub>2</sub> ) と c<sub>2</sub> ) の間、c<sub>2</sub> ) と d<sub>2</sub> ) の間、および d<sub>2</sub> ) と e<sub>2</sub> ) の間、に、固相を洗浄することからなる一以上の操作も含む

【 0 0 5 7 】

このアッセイ自体は、抗体 A C<sub>1</sub> のみを使用するが、二つの異なる形状：固相上に固定されている第一の形状、および標識へ結合されている第二の形状、においてである。

【 0 0 5 8 】

工程 b<sub>2</sub> ) において使用されるカップリング剤は化学的反応物でよく、その場合、それはバイファンクショナルであるべきであり、すなわち、それは化合物 E<sub>2</sub> - X<sub>2</sub> - G<sub>2</sub> の基 E<sub>2</sub> と反応することができる第一の官能基と、抗体 A C<sub>1</sub> と反応することができる、第一のものと同じかまたは異なる第二の官能基を含むべきである。

【 0 0 5 9 】

これらの官能基が同じかまたは異なることにより、それらはグルタルアルデヒド、ジフルオロジニトロベンゼン、ビス ( マレイミド ) ヘキサン、またはスベリン酸スクシンイミジルのような、ホモバイファンクショナル試薬か、または N - スクシンイミジル - 3 - 3 - ( 2 - ピリジルジチオ ) プロピオネートまたはスクシンイミジル - 4 - ( N - マレイミドメチル ) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレートのような、ヘテロバイファンクショナル試薬でよい。

【 0 0 6 0 】

グルタルアルデヒドまたは、スベリン酸ジスクシンイミジルが、好ましくは使用される。

10

20

30

40

50

## 【0061】

変形として、カップリング剤は、 $E_2$  が光活性化可能な基である場合には、照射、たとえば紫外線照射でよい。

## 【0062】

工程  $c_2$  ) において、抗体  $AC_1$  と、化合物 Z の残基  $E_1$  との間に存在する免疫結合の変性は、適当な試薬により、さもなければ超音波または熱の反応を通して、慣例的に行なわれることが可能である。

## 【0063】

この試薬は、 $HCl$  のような酸、 $NaOH$  のような塩基、たとえば、メタノールタイプのアルコールのような有機溶媒、界面活性剤、および無機塩から選ばれてよい。

10

## 【0064】

化合物 Z をアッセイするために選ばれた技術が何であれ：

- 抗体  $AC_1$  および、適切な場合には抗体  $AC_2$  は、一般的には、その特異性がより大きいことを理由にモノクローナル抗体を使用することが好ましいが、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体でよく；

- 固相上への抗体  $AC_1$  の固定は、受動的または能動的な固定であることが可能であり；したがって、この固定は、固相の表面への前記抗体の単純な吸着により、共有結合により、アビジン・ビオチン系のような結合分子により、さもなければニッケルまたは銅/NTA (ニトリロ三酢酸) 複合体と結合したポリヒスチジンタグによって得られることが可能であり；抗体  $AC_1$  がモノクローナル抗体であるとき、その固相上への固定はまた、この固相の表面にあらかじめ吸着されたポリクローナル抗体によっても得られることが可能であり；

20

- 固相は、チューブの壁、マイクロタイトレーション用プレートのウェル、ポリスチレンまたはニトロセルロースのようなプラスチックからなる膜、ガラスビーズ、磁気ビーズ、および、一般に、受動的または能動的に、そこへ抗体を付着させることができる任意の表面のような、イムノアッセイに通常使用される固相の任意の一つであることが可能であり；さらに

- 標識は、ヨウ素 125、クロム 51、またはトリチウムのような同位元素、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ、またはグルコースオキシダーゼのような酵素、ピロガロールミノールまたはイソルミノールのような発光標識、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、またはシアニンのような蛍光標識、さもなければ、ビオチンおよびその構造上の類似体のような、アビジンまたはストレプトアビジンと反応することができる物質であることが可能であり；後者の場合には、アビジンまたはストレプトアビジンは、たとえば酵素または蛍光色素によってそれ自体が標識されている。

30

## 【0065】

好ましくは、抗体  $AC_1$  および、適切な場合には抗体  $AC_2$  は、モノクローナル抗体であり；固相はマイクロタイトレーション用プレートのウェルの壁であり；抗体  $AC_1$  の固定は、この相の表面におけるこの抗体の受動的な吸着によって実行され、標識は酵素、特に、その代謝回転 (秒当たり、および部位当たり、16000 分子の基質を加水分解) の故に、アセチルコリンエステラーゼであり、それを含むコンジュゲートに高い比活性を与える。

40

## 【0066】

本発明によれば、方法は工程  $i$  ) と  $ii$  ) との間に、反応媒体の希釈からなる操作を都合よく含む。

## 【0067】

さらに、カップリング反応に対する候補操作条件の影響は、好ましくは、工程  $iii$  ) において、工程  $ii$  ) で測定された反応媒体中の化合物 Z の濃度から、この反応の収率を測定することにより評価される。

## 【0068】

50

この収率は、たとえば、以下の式：

【 0 0 6 9 】

【 数 1 】

$$\text{Yield (\%)} = \left( \frac{[Z] \times f}{[E_1 - X_1 - G_1]} \right) \times 100$$

【 0 0 7 0 】

[ 式中：

・ [ Z ] は、工程 i i ) において測定された反応媒体中の化合物 Z の濃度であり、 f は、後者が工程 i ) と i i ) との間に希釈を受けた場合の該媒体についての希釈比であり、一方

10

・ [ E<sub>1</sub> - X<sub>1</sub> - G<sub>1</sub> ] は、反応媒体中の化合物 E<sub>1</sub> - X<sub>1</sub> - G<sub>1</sub> の初濃度である ] を適用することにより計算されることが可能である。

【 0 0 7 1 】

前文に示したように、その操作条件をスクリーンすることが所望されるカップリング反応は、二つまたは二つより多い官能基のカップリングからなることが可能であり、この反応に関与する官能基の数は、好ましくは 2、3、または 4 に等しい。

【 0 0 7 2 】

カップリング反応が二つの官能基 G<sub>1</sub> および G<sub>2</sub> のカップリングからなるとき：

- 工程 i ) においては、式 E<sub>1</sub> - X<sub>1</sub> - G<sub>1</sub> および E<sub>2</sub> - X<sub>2</sub> - G<sub>2</sub> の化合物は一緒に反応され、反応媒体中で、式 E<sub>1</sub> - X<sub>1</sub> - G<sub>1</sub> - G<sub>2</sub> - X<sub>2</sub> - E<sub>2</sub> [ 式中、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、E<sub>1</sub>、および E<sub>2</sub> は上記と同様の意味を有し、G<sub>1</sub> - G<sub>2</sub> は前記官能基 G<sub>1</sub> および G<sub>2</sub> の間のカップリングから結果として生じる原子団を表す ] に相当する化合物 Z の形成が得られ、一方

20

- 工程 i i ) においては、反応媒体中の化合物 Z の濃度は、単一のイムノアッセイによって測定され、それは好ましくは上述の「サンドイッチ」タイプまたは「S P I E - I A」タイプの固相アッセイである。

【 0 0 7 3 】

カップリング反応が三つの官能基 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、および G<sub>3</sub> のカップリングからなるとき：

30

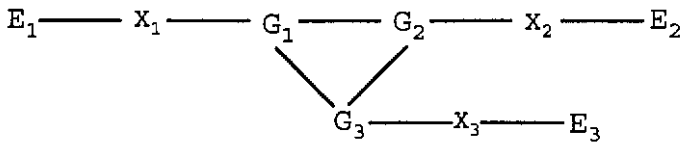
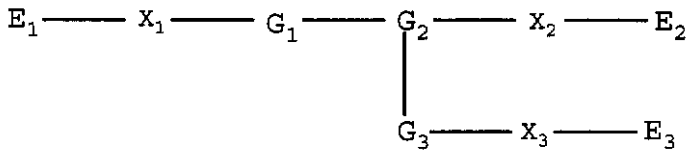
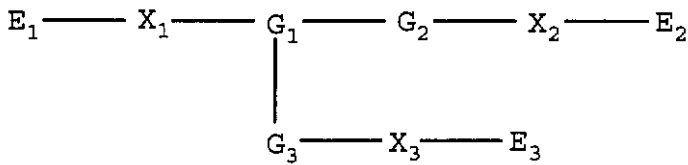
- 工程 i ) においては、式 E<sub>1</sub> - X<sub>1</sub> - G<sub>1</sub> および E<sub>2</sub> - X<sub>2</sub> - G<sub>2</sub> の化合物は、式 E<sub>3</sub> - X<sub>3</sub> - G<sub>3</sub>

[ 式中、X<sub>3</sub> は共有結合か、または第三のスペーサー基を表し、X<sub>1</sub> および / または X<sub>2</sub> と同じかまたは異なってよく、一方 E<sub>3</sub> は、M<sub>1</sub> および M<sub>2</sub> とは異なる第三の分子 M<sub>3</sub> の残基であり、それに対して第三の特異抗体 A C<sub>3</sub> が利用可能であるか、あるいは、カップリング剤の存在下に抗体 A C<sub>1</sub> と共有結合を形成することが可能な基を表すが、E<sub>2</sub> がすでにかかる基を表していることはないという条件下である ]

の第三の化合物と反応され、反応媒体中で、以下の式：

【 0 0 7 4 】

## 【化5】

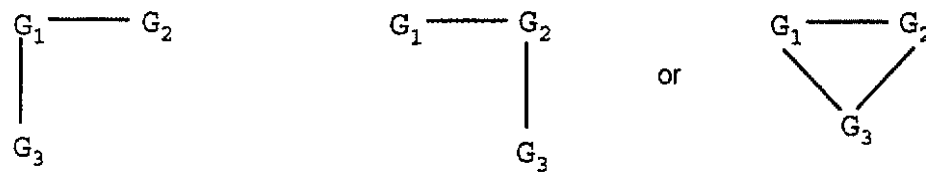


## 【0075】

[式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $E_1$ 、 $E_2$ 、および $E_3$ は、上記と同様の意味を有し、かつ

## 【0076】

## 【化6】



## 【0077】

は、前記官能基 $G_1$ 、 $G_2$ 、および $G_3$ のカップリングから結果として生じる原子団を表す]

の一つに相当する化合物 $Z$ の形成を得るようにし；一方

- 工程*ii*)においては、反応媒体中の化合物 $Z$ の濃度は、二つの異なるイムノアッセイにより測定される。

## 【0078】

これらのアッセイは、平行に、すなわち、反応媒体の二つの異なるサンプルについて、または反応媒体の同一のサンプルについて交互に、行なわれてよく、好ましくは固相において両方行なわれる。

## 【0079】

したがって、それらは二つの「サンドイッチ」タイプのアッセイでよく、以下：

- 第一のアッセイ用には、固相上に固定された抗体 $AC_1$ および、第一の標識へ結合された抗体 $AC_2$ 、および

- 第二のアッセイ用には、固相上に固定された抗体 $AC_1$ および、第二の標識へ結合された抗体 $AC_3$ 、

を用いて行なわれ、第一および第二の標識は、二つのアッセイが平行して行なわれる場合にはおそらくは同一であるが、それらが交互に行なわれる場合には異なるべきである。

## 【0080】

変形として、第一のアッセイは、上記のような抗体 $AC_1$ を用いて行なわれる「SPIE-IA」タイプのアッセイでよく、この場合、第二のアッセイは、化合物 $E_2 - X_2 - G_2$ および $E_3 - X_3 - G_3$ において、「SPIE-IA」アッセイを通じて抗体 $AC_1$ と一以上の共有結合を形成することができる基を表すものが $E_2$ であるか、または $E_3$ であるかに依存して、標識へ結合された抗体 $AC_2$ または抗体 $AC_3$ を用いて行なわれる「

10

20

30

40

50

サンドイッチ」タイプアッセイである。

【0081】

全ての場合に、反応媒体中の化合物Zの形成は、二つのアッセイによって測定された該化合物の濃度の類似性によって保証される。

【0082】

カップリング反応が4つの官能基G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、G<sub>3</sub>、およびG<sub>4</sub>のカップリングからなるとき：

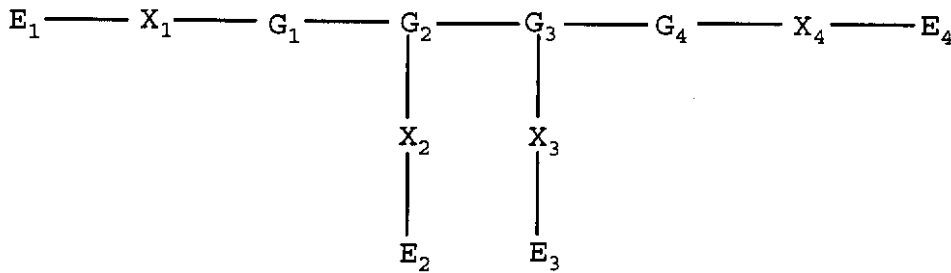
- 工程i)においては、式E<sub>1</sub> - X<sub>1</sub> - G<sub>1</sub>およびE<sub>2</sub> - X<sub>2</sub> - G<sub>2</sub>の化合物は、前文に定義された式E<sub>3</sub> - X<sub>3</sub> - G<sub>3</sub>の第三の化合物と、および式E<sub>4</sub> - X<sub>4</sub> - G<sub>4</sub>

[式中、X<sub>4</sub>は共有結合か、または第4のスペーサー基を表し、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>および/またはX<sub>3</sub>と同じかまたは異なってよく、一方E<sub>4</sub>は、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、およびM<sub>3</sub>とは異なる第四の分子M<sub>4</sub>の残基であり、それに対して第四の特異抗体AC<sub>4</sub>が利用可能であるか、あるいは、カップリング剤の存在下に抗体AC<sub>1</sub>と共有結合を形成することが可能な基を表すが、E<sub>2</sub>、およびE<sub>3</sub>がすでにかかる基を表していることはないという条件下である]

の第4の化合物と反応され、  
反応媒体中で、以下の式：

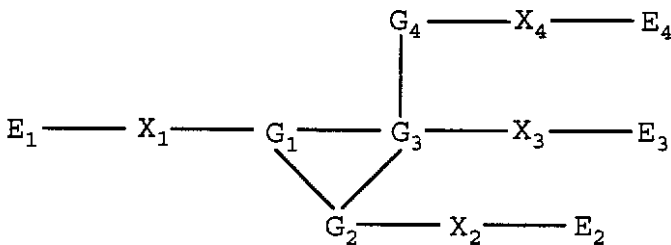
【0083】

【化7】

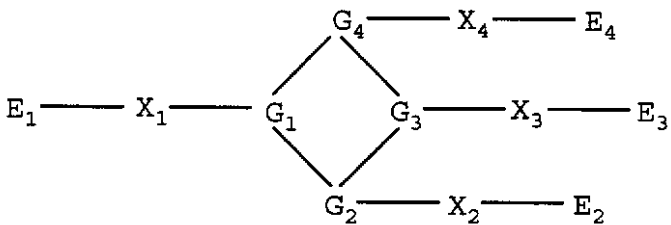


10

20



30



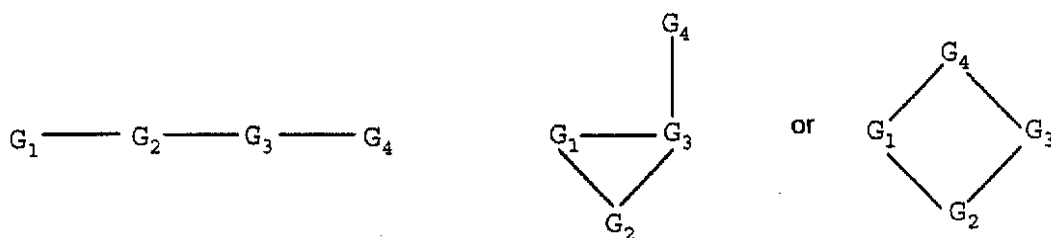
40

【0084】

[式中、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>、およびE<sub>4</sub>は、上記と同様の意味を有し、かつ

【0085】

## 【化 8】



## 【0086】

は、前記官能基 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、G<sub>3</sub>、および G<sub>4</sub> のカップリングから結果として生じる原子団を表す] 10

の一つに相当する化合物 Z の形成を得るようにし；一方

- 工程 i i ) においては、反応媒体中の化合物 Z の濃度は、三つの異なるイムノアッセイにより測定される。

## 【0087】

ここではまた、これらのアッセイは、平行して、または交互に行なわれることが可能であり、三つはすべて好ましくは固相において行なわれる。それらは三つの「サンドイッチ」タイプのアッセイか、または「S P I E - I A」タイプのアッセイとそれに続く二つの「サンドイッチ」タイプのアッセイでよく、反応媒体中の化合物 Z の形成は、ここで再び、得られた結果の類似性によって保証される。 20

## 【0088】

本発明によれば、候補操作条件は、好ましくは、溶媒、触媒、温度レベル、圧力レベル、超音波の利用、濃度（反応された物質および/または触媒の）、化学量論比（これらの物質間の）、反応時間、およびそれらの組合せからなる群より選ばれる。

## 【0089】

したがって、本発明の方法は、たとえば、触媒または温度レベル、または圧力レベルといった単一タイプの操作条件のスクリーニングのため、および、溶媒/触媒、溶媒/触媒/反応時間、温度/圧力、または触媒/温度/圧力の組合せなどといった、異なるタイプの操作条件の組合せのスクリーニングのための双方に使用されることが可能である。

## 【0090】

上記のおよび下記の本文において、用語「触媒」は、反応媒体中にそれが存在することだけで、反応のカイネティクスを加速することができる、任意の薬剤を意味することが意図される。 30

## 【0091】

この触媒は、たとえば、有機化合物、無機塩基、金属、金属塩、金属酸化物またはハイブリッド、有機金属化合物、金属-リガンド複合体、ハロゲン化物、さもなくばそれらの組合せなどといった、化学的触媒、および生物学的触媒の双方でよく、後者については非常に多様な形状にあることが可能であり、特に、臓器、組織、細胞、細胞の分画、細胞オルガネラ、酵素抽出物、分子複合体、さもなくば単純な分子、たとえば単離および精製された酵素の形状にある。 40

## 【0092】

本発明の方法は、多くの利点を有する。特に：

- 直接的にまたはスペーサー基を介して官能基上へグラフトされることが可能な少なくとも一つの分子と、この分子を特異的に認識することおよび、それと結合することが可能な少なくとも一つの抗体とが利用可能である限り、二つの官能基のカップリングから結果として生じる化合物を、後者の如何を問わず、アッセイすることを可能にし；結果として、本発明の方法により、非常に多くのカップリング反応の操作条件をスクリーンすることを可能にするためには、利用可能なくつかのグラフト可能な分子および、これらの分子に特異的なくつかの抗体をもつことで充分である；

- 種々のタイプの操作条件を、それらが定性的条件であろうと定量的条件であろうと、 50

平行して、または組合せて、同時に検査することを可能にし；

- すべての触媒系と、それらが化学的であろうと生物学的であろうと、適合性であり；
- カップリング反応の最後に、得られた反応媒体を精製することからなる操作を何ら必要とせず；

- カップリング反応の収率を得ることを可能にすることにより、操作条件の影響を定性的に評価することを可能にし；

- $10^{-9}$  Mまでの低濃度の化合物Zの検出を可能にすることが見出されていることから、非常に感度がよく、微量の試薬および溶媒を用いてそれを実現することを可能にし；

- 再現性があり；

- 実行することが単純であり、費用のかかるおよび/または容易に入手できない装置を何ら必要とせず；

- 高速でスクリーニングを実行することが可能であり；したがって、比較的単純な自動化された装置、すなわち固相の洗浄、酵素標識用の基質の分布、酵素/基質反応の読取りを提供するが、他の試薬の分布は提供しない、自動化された装置は、単回の実験で一日に約千回の検査を行なうことを可能にする。それゆえこの速度は、本発明による方法の完全な自動化を可能にする装置を使用することにより、10倍（すなわち1日10,000回のテスト）まで増大されることが可能である。

#### 【0093】

本発明の方法は、それゆえ「ハイスルーアウト」スクリーニングを実行するために特に好適である。

#### 【0094】

本発明の主題はまた、少なくとも二つの官能基のカップリング反応の操作条件をスクリーニングする方法を実行するためのキットであって、適当な量の：

- 一緒に反応することが意図された少なくとも二つの化合物、

- ・式  $E_1 - X_1 - G_1$

[式中、 $G_1$  は前記少なくとも二つの官能基の一番目を表し、 $X_1$  は共有結合または第一のスペーサー基を表しており、 $E_1$  は第一の分子  $M_1$  の残基を表す]

の第一の化合物；および

- ・式  $E_2 - X_2 - G_2$

[式中、 $G_2$  は前記少なくとも二つの官能基の二番目を表し、 $X_2$  は共有結合または第二のスペーサー基を表し、 $X_1$  と同じかまたは異なってよく、 $E_2$  は、 $M_1$  とは異なる第二の分子  $M_2$  の残基である]

の第二の化合物；

- 少なくとも二つの抗体：

- ・第一の分子  $M_1$  に特異的な第一の抗体  $AC_1$  であり、この抗体は任意に複数の固相へ付着されており；および

- ・第二の分子  $M_2$  に特異的な第二の抗体  $AC_2$  であり、この抗体は標識へ結合されており；

- 鎖  $E_1 - X_1 - G_1 - G_2 - X_2 - E_2$  を含んでいる化合物Zであり、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $E_1$ 、および  $E_2$  は上記と同様の意味を有し、一方  $G_1 - G_2$  は、前記少なくとも二つの官能基のカップリングから結果として生じる原子団を表しており；さらに、任意に：

- 標識を可視化するための試薬、たとえば標識が酵素であれば基質；および

- 適当に選ばれた緩衝液（希釈液、洗浄緩衝液など）

を含む。

#### 【0095】

本発明の主題はまた、少なくとも二つの官能基のカップリング反応の操作条件をスクリーニングする方法を実行するためのキットであって、適当な量の：

- 一緒に反応することが意図された少なくとも二つの化合物、

- ・式  $E_1 - X_1 - G_1$

[式中、 $G_1$  は前記少なくとも二つの官能基の一番目を表し、 $X_1$  は共有結合または第一

10

20

30

40

50

のスペーサー基を表しており、 $E_1$  は第一の分子  $M_1$  の残基を表す]

の第一の化合物；および

・式  $E_2 - X_2 - G_2$

[ 式中、 $G_2$  は前記少なくとも二つの官能基の二番目を表し、 $X_2$  は共有結合または第二のスペーサー基を表し、 $X_1$  と同じかまたは異なってよく、 $E_2$  は、カップリング剤の存在下に、分子  $M_1$  に特異的な抗体と一以上の共有結合を形成することのできる基を表す]

の第二の化合物；

- 少なくとも一つの抗体、この抗体は分子  $M_1$  に特異的な前記抗体であり；
- 標識へ結合された、分子  $M_1$  に特異的な前記抗体を含んでいるコンジュゲート；
- 鎖  $E_1 - X_1 - G_1 - G_2 - X_2 - E_2$  を含んでいる化合物  $Z$  であり、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $E_1$ 、および  $E_2$  は上記と同様の意味を有し、一方  $G_1 - G_2$  は、前記少なくとも二つの官能基のカップリングから結果として生じる原子団を表しており；さらに、任意に：
  - 標識を可視化するための試薬、
  - カップリング剤、
  - 免疫結合を変性させることができる試薬、および
  - 適当に選ばれた緩衝液を含む。

【0096】

本発明の主題はまた、スクリーニングのための、特に、二つの官能基間のカップリング反応において有用な触媒の「ハイスループット」スクリーニングのための、前文に定義されたスクリーニング法またはキットの用途である。

【0097】

上記のアレンジメントの他に、本発明はまた、以下の付加的な記述から現れるであろう、他のアレンジメントも含んでおり、それは操作条件の「ハイスループット」スクリーニングのための、その実現性および利点の双方を実証することを可能にした、本発明の方法の態様の実施例に関する。

【0098】

この付加的な記述は、何ら制限するものではない単なる例証として示されており、添付の図面について言及している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0099】

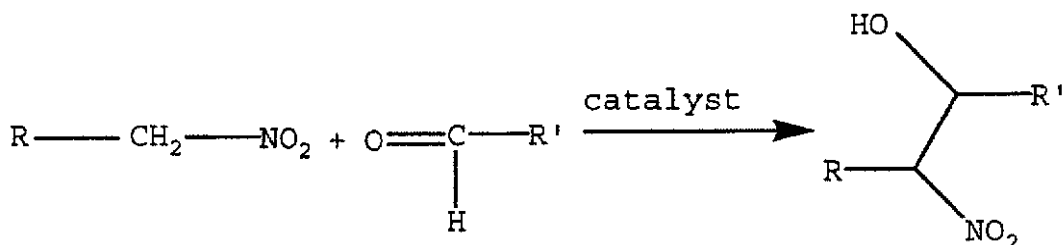
(実施例1)

本実施例は、本発明の方法の第一の態様を例示しており、これにおいて：

- カップリング反応は、

【0100】

【化9】



【0101】

によって表されるニトロアルドール反応であり：

- スクリーニングは、組合わされた三つのタイプの操作条件、すなわち溶媒のタイプ、触媒のタイプ、および反応時間、に関係しており；かつ
- 反応媒体中の化合物  $Z$  の濃度は、「サンドイッチ」タイプの固相 ELISA アッセイにより測定される。

【0102】

化合物  $E_1 - X_1 - G_1$  は、以下の式 (V)：

10

20

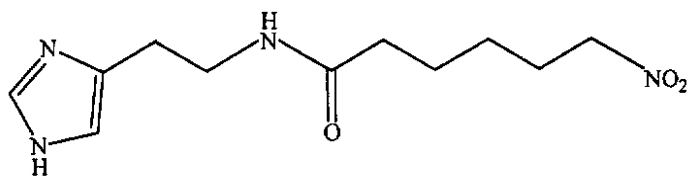
30

40

50

【0103】

【化10】



(V)

【0104】

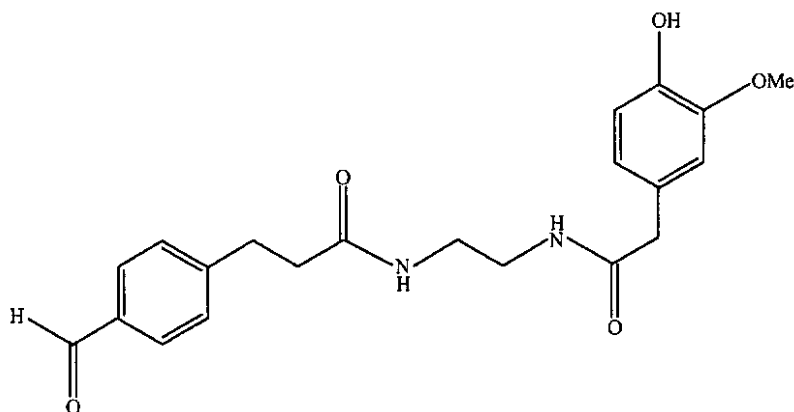
に相当し、6-ニトロカプロン酸とヒスタミンとのカップリングからの結果として生じる。

【0105】

化合物  $E_2 - X_2 - G_2$  自体は、以下の式 (VI) に相当し：

【0106】

【化11】



(VI)

【0107】

かつ、N-(2-アミノエチル)-3-(4-ホルミルフェニル)プロピオンアミドとホモバニリン酸とのカップリングからの結果として生じる。

【0108】

化合物  $E_1 - X_1 - G_1$  および  $E_2 - X_2 - G_2$  のカップリング反応は：

- 二つの候補溶媒：テトラヒドロフラン (THF) および塩化メチレン ( $CH_2Cl_2$ ) )：

- 12の候補触媒：フッ化テトラブチルアンモニウム (TBAF)、フッ化カリウム (KF)、トリエチルアミン (TEA)、ピリジン (PYR)、ジイソプロピルアミン (DIPA)、ジアザビスクロオクタン (DABCO)、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)、ジアザビスクロウンデセン (DBU)、ジメチルアミノピリジン (DMAP)、ナトリウムメトキシド (NaOMe)、水酸化ナトリウム (NaOH)、および炭酸カリウム ( $K_2CO_3$ )、および

- 4つの候補反応時間：30分、1時間、4時間、および12時間、を用いて行なわれる。

【0109】

このカップリング反応によって生成された化合物 Z (式  $E_1 - X_1 - G_1 - G_2 - X_2 - E_2$  の) の免疫酵素アッセイは：

- ヒスタミンに向けられたモノクローナル抗体 (抗体 His-31;  $K_d: 10^{-9} M$ )、ポリスチレン・マイクロタイトレーション用プレート (300  $\mu l$  / ウェルに等しい容量の) のウェルの壁上に、コーティングにより、すなわちポリスチレン表面における該

10

20

30

40

50

抗体の受動的な吸着によって固定されている；

- アセチルコリンエステラーゼ (AChE) へ結合された、ホモバニリン酸に向けられたモノクローナル抗体 (抗体 H 6 - 9 2 ;  $K_d : 10^{-7} M$ ) を含んでいるコンジュゲート、

このコンジュゲートは、タラン (Taran) らにより、Clin. Chem. 1997年、第43巻、第2号、p. 363 - 368、[8]において記述されたように調製および貯蔵され；さらに

- 可視化剤、固相へ付着された抗体 H 6 - 9 2 / AChE のコンジュゲート量を測定するための、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中の、 $7.5 \times 10^{-4} M$  のヨウ化アセチルチオコリン、および  $2.5 \times 10^{-4} M$  の 5,5 - ジチオビス - (2 - ニトロ) 安息香酸 (エルマン (Ellman) 試薬) の混合物、  
を用いて行なわれる。 10

#### 【0110】

マイクロタイトレーション用プレートのウエルの壁の表面への抗体 His - 31 の吸着は、100  $\mu l$  のこの抗体溶液 (0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、5  $\mu l / ml$ ) を、これらの各ウエル内へ入れ、プレートを周囲温度において18時間静置することによって得られた。これに続き、ウエルは300  $\mu l$  の EIA 緩衝液で洗浄および飽和され、プレートはスコッチテープで覆われ、その使用まで4 において貯蔵された。

#### 【0111】

そのいくつかの工程が図1に図示されたこの方法は、以下の方法に従って行なわれた。 20

#### 【0112】

1) 方法：

\* カップリング反応 (図1の工程A)：

化合物  $E_1 - X_1 - G_1$  に存在するヒスタミン残基 (残基  $E_1$ ) の含窒素環によって保持された第二級アミン官能基を、BOC基 (図1の  $GP_1$ ) により、また化合物  $E_2 - X_2 - G_2$  に存在するホモバニリン酸の環 (残基  $E_2$ ) によって保持されたヒドロキシル官能基を、ジメチルtert-ブチルシリル基 (図1の  $GP_2$ ) によって保護した後、ポリプロピレン・マイクロタイトレーション用プレートの各ウエル (容量：300  $\mu l /$  ウエル) へ、以下のもの：

- 50  $\mu l$  の化合物  $E_1 - X - G_1$  の 5 mM 有機溶液、
- 50  $\mu l$  の化合物  $G_2 - Y - E_2$  の 5 mM 有機溶液、および
- 25  $\mu l$  の候補触媒の 1 mM 有機溶液、

が連続して入れられ、

単一かつ同一の溶媒 (THF または  $CH_2Cl_2$ ) が各ウエルにおいて使用される。

#### 【0113】

マイクロタイトレーション用プレートは、40 の温度において、インキュベーターシェイカー内に置かれ、そこで所望の反応時間にわたって保持される。

#### 【0114】

\* カップリング反応の停止および脱保護 (図1の工程B)：

125  $\mu l$  の純粋なトリフルオロ酢酸 (TFA) のウエルへの添加により、カップリング反応は停止され、保護基は除去される。プレートは、周囲温度において15分間振盪される。 40

#### 【0115】

\* 反応媒体の希釈 (図1の工程C)：

各反応媒体は、10  $\mu l$  の該媒体を移し、それをディープウエルプレートのウエル (容量：2 ml / ウエル) に収容された 1 ml の EIA 緩衝液 (0.1 M リン酸緩衝液；0.15 M NaCl；0.1% BSA；0.01% アジ化ナトリウム；pH 7.4) へ添加することにより希釈される。

#### 【0116】

この操作は2回繰返され、各反応媒体が  $10^6$  倍に希釈されるようにする。 50

【0117】

\*化合物Zのアッセイ

50  $\mu$ lの各々の希釈された反応媒体は、ウエルの壁が抗体His-31でコートされたマイクロタイトレーション用プレートのウエルに入れられる(図1の工程D)。

【0118】

プレートは、周囲温度において1時間振盪され、次いで、0.05%のツイーン(Tween) (登録商標) 20を含む0.01Mのリン酸緩衝液、pH7.4からなる洗浄緩衝液で5回洗浄される(図1の工程E)。

【0119】

次に、50  $\mu$ lのH6-92/AChEコンジュゲートが、5エルマン(Elman)単位/ml (EU) (1エルマン単位は、25において1cmの光路に対し、1単位の吸光度の増加をエルマン試薬に1mlを1分で生じることが出来る酵素の量として定義される)で、各ウエルへ入れられる(図1の工程F)。

10

【0120】

プレートは周囲温度において3時間振盪され、次いで洗浄緩衝液で5回洗浄される(図1の工程G)。

【0121】

200  $\mu$ lの可視化試薬(RV)が次に各ウエルへ投入される。プレートは周囲温度において1時間振盪され、その時間の終わりに、各ウエルに含まれる媒体の414nmにおける光学密度(OD)が自動読取り装置によって測定される。

20

【0122】

そのようにして得られたOD値から、各反応媒体について化合物Zの濃度が基準範囲(吸光度値を化合物Zの濃度へ対応させることを可能にする)を参照して測定され、次いでニトロアルドール反応の収率が、収率を計算するための上記の式によって測定される。

【0123】

2) 結果:

結果は、図2において、反応収率(%として表される)が、0と10%の間か、10と30%の間か、30と50%の間か、または50と70%の間であるかによって、白色、ライトグレー、ミディアムグレー、またはダークグレーの円によって記号化された、マトリックスの形状で示されている。

30

【0124】

このような円は、各々候補反応時間に対応して8行にわたり、また候補触媒に対応して12列にわたって分布され、上の4行はTHF中で行なわれた反応の収率を示しており、下の4行はCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中に行なわれた反応の収率を示している。

【0125】

図2は、たとえば、ニトロアルドール反応がTHF中で4時間行なわれる場合、ジアザピシクロオクタン(DABCO)およびジメチルアミノピリジン(DMAP)のみが50%より高い収率を得ることを可能にするのに対し、それがCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中で同じ時間行なわれる場合には、フッ化テトラブチルアンモニウム(TBAF)の存在下でのみ、かかる収率が得られることを示している。

40

【0126】

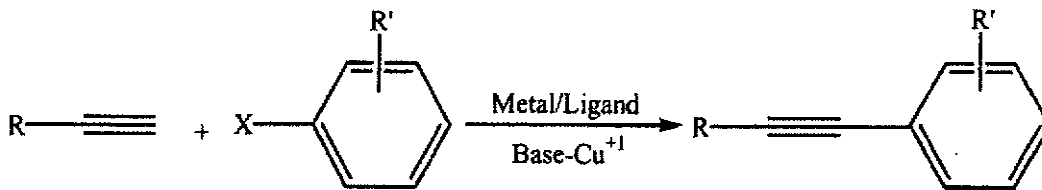
(実施例2)

この実施例は、本発明による方法の第二の態様を例示しており:

- カップリング反応は:

【0127】

## 【化12】



金属ノリガンド  
塩基 -  $\text{Cu}^{+1}$

## 【0128】

によって表されるソノガシラ反応であり；

- スクリーニングは、組合わされた二つのタイプの操作条件、すなわち、溶媒のタイプおよび触媒のタイプに関係しており；かつ

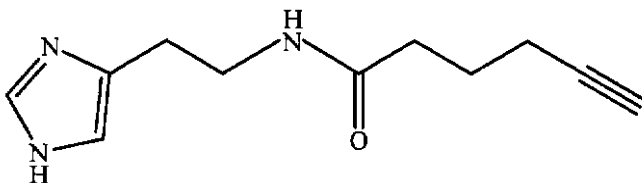
- 反応媒体中の化合物Zの濃度は、「SPIE-IA」タイプの固相免疫酵素アッセイによって測定される。

## 【0129】

この実施例においては、化合物  $\text{E}_1 - \text{X}_1 - \text{G}_1$  は以下の式 (VII)：

## 【0130】

## 【化13】



(VII)

## 【0131】

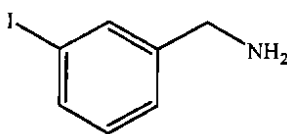
に相当し、5-ヘキシン酸とヒスタミンのカップリングからの結果として生じる。

## 【0132】

化合物  $\text{E}_2 - \text{X}_2 - \text{G}_2$  自体は、以下の式 (VIII)：

## 【0133】

## 【化14】



(VIII)

## 【0134】

に相当する。

## 【0135】

化合物  $\text{E}_1 - \text{X}_1 - \text{G}_1$  および  $\text{E}_2 - \text{X}_2 - \text{G}_2$  のカップリングからなる反応は以下を用いて行われる：

- 三つの候補溶媒：ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキサイド (DMSO)、および THF；

- in situ で調製された触媒のライブラリであり、各触媒は：

(1) 以下の複合体 M1 ~ M7 から選ばれた、金属複合体 M：

M1 :  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$

M2 :  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$

M3 :  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$

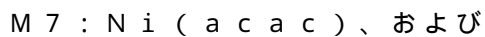
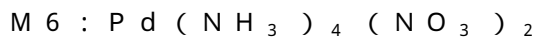
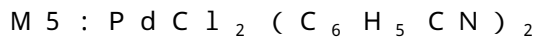
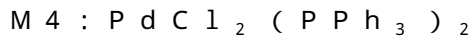
10

20

30

40

50



(2) 以下の23リガンドから選ばれるリガンドL:

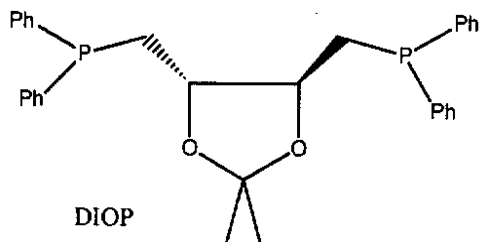
・式  $PR_3$  [式中、Rは各々n-ブチル、n-オクチル、t-ブチル、 $-CH_2-CH=CH_2$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-N(CH_3)_2$ 、フェニル、o-トリル、 $-CH=CH_2$ 、o, p-ジ- $OCH_3C_6H_3$ 、またはo-フリル基である]に相当するリガンドL1~L12;

・式  $R_2P(CH_2)_nPR_2$  [式中、Rはメチル基であり、かつnは1または2に等しい(L13, L14)か、またはRはフェニル基であり、かつnは1, 2, または4に等しい(L15, L16, L17)]に相当するリガンドL13~L17;

・リガンド18または式:

【0136】

【化15】



20

【0137】

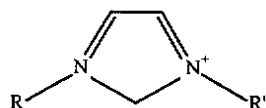
のリガンドDIOP;

・式  $AsPh_3$ 、および  $(Ph_2)As(CH_2)_2As(Ph_2)$  のヒ素複合体L19およびL20;

・式:

【0138】

【化16】



30

【0139】

[式中、Rはエチル基であり、R'はメチル基であり(L21); RおよびR'はt-ブチル基であり(L22); RおよびR'は2,6-ジイソプロピルベンゼン基である]に相当するイミダゾリウム、L21~L23、

(3) ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)およびカリウムt-ブトキシド(tBuOK)から選ばれる塩基、ヨウ化銅(CuI)および銅トリフラート(CuOTf)から選ばれる銅塩の存在下、  
の間の組合せに相当する。

40

【0140】

カップリング反応によって生成された化合物Z(式  $E_1-X_1-G_1-G_2-X_2-E_2$  の)の免疫酵素アッセイは:

- ヒスタミンに向けられたモノクローナル抗体(抗体His-76;  $Kd: 10^{-8} M$ )であり、ポリスチレン・マイクロタイトレーション用プレート(容量:  $300 \mu l$ /ウエル)のウエルの壁上に、コーティングにより、実施例1に記述されたものと同様の技術によって固定されている;

- アセチルコリンエステラーゼ(ACHE)へ結合された、該抗体を含んでいるコンジュゲート; および

50

- 実施例 1 で記述された、固相へ付着された H i s - 7 6 / A C h E コンジュゲートの量を測定するための可視化剤、  
を用いて行なわれる。

図 3 に図式的に示された方法の様々な工程は、以下の手続きに従って実行される。

【 0 1 4 1 】

1) 方法

\* カップリング反応 ( 図 3 の工程 A ) :

化合物  $E_1 - X_1 - G_1$  に存在するヒスタミン残基 A ( 残基  $E_1$  ) の含窒素環によって保持されたアミン官能基、および化合物  $E_2 - X_2 - G_2$  のアミン官能基を、B O C 基で保護した後 ( 図 3 の G P )、ポリプロピレン・マイクロタイトレーション用プレートの各ウエル ( 等しい容量 :  $300 \mu\text{l}$  / ウエル ) へ、不活性雰囲気下に、以下のもの :

-  $5 \mu\text{l}$  の溶媒または、金属複合体 M の  $16 \text{ mM}$  有機溶液、  
-  $5 \mu\text{l}$  の溶媒または、リガンド L の  $32 \text{ mM}$  有機溶液、  
-  $25 \mu\text{l}$  の、 $160 \text{ mM}$  の化合物  $E_2 - X_2 - G_2$ 、 $6.4 \text{ mM}$  の銅塩、 $480 \text{ mM}$  の塩基を含む有機溶液、および

-  $5 \mu\text{l}$  の、化合物  $E_1 - X_1 - G_1$  の  $800 \text{ mM}$  有機溶液、

が連続的に入れられ、

単一かつ同一の溶媒 ( D M F、D M S O、または T H F ) が各ウエルにおいて使用される。

【 0 1 4 2 】

プレートは、 $25^\circ\text{C}$  の温度において、インキュベーターシェイカー内に置かれ、そこで  $24$  時間保持される。

【 0 1 4 3 】

\* カップリング反応の停止および脱保護 ( 図 3 の工程 B ) :

$40 \mu\text{l}$  の純粋なトリフルオロ酢酸 ( T F A ) の各ウエルへの添加により、カップリング反応は停止され、B O C 基は除去される。プレートは、周囲温度において  $1$  時間振盪される。

【 0 1 4 4 】

\* 反応媒体の希釈 ( 図 3 の工程 C ) :

各反応媒体は、 $10 \mu\text{l}$  の該媒体を移し、それをディープウエルプレートのウエル ( 容量 :  $2 \text{ ml}$  / ウエル ) に収容された  $1 \text{ ml}$  の E I A 緩衝液へ添加することにより希釈される。

【 0 1 4 5 】

この操作は  $2$  回繰返され、各反応媒体が  $10^6$  倍に希釈されるようにする。

【 0 1 4 6 】

\* 化合物 Z のアッセイ

$100 \mu\text{l}$  の各々の希釈された反応媒体は、ウエルの壁が抗体 H i s - 7 6 でコートされたマイクロタイトレーション用プレートのウエルに入れられる。

【 0 1 4 7 】

プレートは、周囲温度において  $1$  時間振盪され、次いで、 $0.05\%$  のツイーン ( Tween n ) ( 登録商標 )  $20$  を含む  $0.01 \text{ M}$  のリン酸緩衝液、 $\text{pH} 7.4$  からなる洗浄緩衝液で  $5$  回洗浄される ( 図 3 の工程 D ) 。

【 0 1 4 8 】

次に、 $100 \mu\text{l}$  の  $0.1 \text{ M}$  ホウ酸緩衝液 (  $\text{pH} 9$  )、および  $10 \mu\text{l}$  の、D M F 中  $10 \text{ mg/ml}$  のスベリン酸ジスクシンイミジル ( D S S ) が各ウエルへ入れられる。

【 0 1 4 9 】

プレートは周囲温度において  $15$  分間振盪され、次いで洗浄緩衝液で  $5$  回洗浄される ( 図 3 の工程 E ) 。

【 0 1 5 0 】

$150 \mu\text{l}$  の  $1 \text{ N}$  N a O H が次に各ウエルへ投入され、反応を見るために周囲温度に

10

20

30

40

50

において5分間放置される。この時間の終わりに、プレートは洗浄緩衝液で5回洗浄される(図3の工程F)。

【0151】

100  $\mu$ lの、1エルマン単位/mlのHis-76/AChEコンジュゲート溶液が各ウエルへ投入され、プレートは周囲温度において1時間振盪され、次いで洗浄緩衝液で5回洗浄される(図3の工程G)。

【0152】

固相へ付着されたコンジュゲートの量を測定するため、方法は実施例1と同様に行なわれ、414nmにおける光学密度(OD)の測定は、酵素反応の30分または1時間後に行なわれる。

10

【0153】

そのようにして得られたOD値から、各反応媒体について化合物Zの濃度が基準範囲を参照して測定され、次いでソノガシラ反応の収率が、上記の実施例1において使用されたものと同様の式によって測定される。

【0154】

2) 結果:

単なる例として、結果のいくつかは図4において、反応収率(%として表される)が、0と10%の間か、10と20%の間か、20と30%の間か、30と40%の間か、または40と50%の間であるかによって、白色からダークグレーまでの円によって記号化された、マトリックスの形状で示されている。

20

【0155】

これらの円は、8行にわたり、1番目は金属複合体Mの不在(M0の行)に、他の7つ金属複合体M1~M7のうちの一つに相当して、また24列にわたり、1番目はリガンドLの不在(L0の列)に、他の23列はリガンドL1~L23に相当して分布されている。

【0156】

図4に示された結果は、溶媒としてDMFを、塩基としてDIEAを、銅塩としてヨウ化銅を、2%の金属M、および4%のリガンドLを用いて得られたものである。

【0157】

これらの結果を考慮すれば、パラジウムと組合わされた場合、二つのリガンド(L12 およびL19)が最も有効であるとわかることが注目されてよい。

30

【0158】

(参考文献)

- [1] Lavastre and Morken, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38(21), 3163-3165
- [2] Böhm and Herrmann, *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 3679-3681
- [3] Löber et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 4366-4367
- [4] Shaugnessy et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 2123-2132
- [5] Blackmond et al., *Organic Process Research & Development*, 1999, 3(4), 275-280
- [6] Hinderling and Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38(15), 2253-2256
- [7] US-A-5,476,770
- [8] Taran et al., *Clin. Chem.*, 1997, 43(2), 363-368

10

20

## 【図面の簡単な説明】

【0159】

【図1】本発明のスクリーニング法の第一の態様の種々の工程を、図式的に表した図である。

【図2】図1に例示された本発明の方法の第一の態様によって行なわれた操作条件のスクリーニングの結果を、%として表された反応収率で示す図である。

【図3】本発明の方法の第二の態様の種々の工程を、図式的に表した図である。

【図4】図3に例示された本発明の方法の第二の態様によって行なわれた操作条件のスクリーニングの結果を、%として表された反応収率で示す図である。

30

【 図 1 】

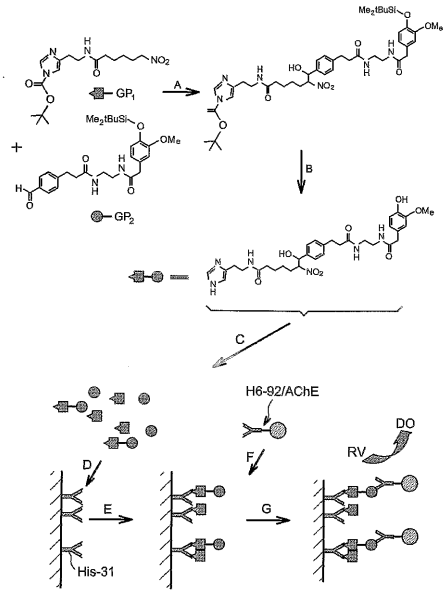


FIG. 1

【 図 2 】

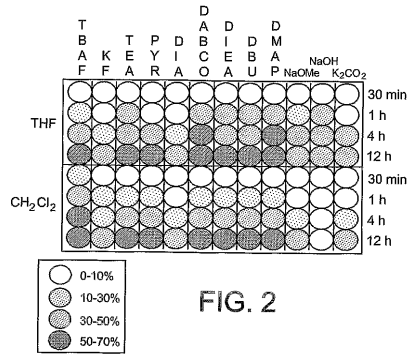


FIG. 2

【 図 4 】

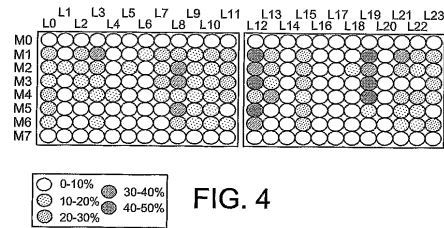


FIG. 4

【 図 3 】

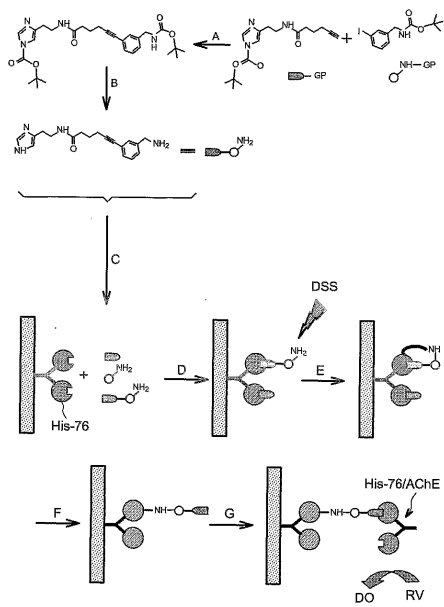


FIG. 3

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/050158

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/53 G01N33/543		
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 G01N		
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, BIOSIS, MEDLINE		
<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	HIROSE KENJI ET AL: "Syntheses of antigens conjugated with 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol by Mannich reaction for enzyme immunoassay" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 365, no. 1-3, 5 June 1998 (1998-06-05), pages 137-145, XP001157318 ISSN: 0003-2670 the whole document  ----- -/--	1-26
<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.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier 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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
13 December 2004	21/12/2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Lüdemann, S	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/FR2004/050158

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TARAN FRÉDÉRIC ET AL: "High-throughput screening of enantioselective catalysts by immunoassay."            ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL ED. IN ENGLISH) GERMANY 4 JAN 2002,            vol. 41, no. 1,            4 January 2002 (2002-01-04), pages            124-127, XP002266704            ISSN: 0570-0833            the whole document</p>	1-26
A	<p>LÖBER O ET AL: "Palladium-catalyzed hydroamination of 1,3-dienes: a colorimetric assay and enantioselective additions."            JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. UNITED STATES 9 MAY 2001,            vol. 123, no. 18, 9 May 2001 (2001-05-09),            pages 4366-4367, XP002266705            ISSN: 0002-7863            the whole document</p>	1-26
A	<p>TARAN FREDERIC ET AL: "Competitive enzyme immunoassay for urinary vanillylmandelic acid"            CLINICA CHIMICA ACTA,            vol. 264, no. 2, 1997, pages 177-192,            XP002266706            ISSN: 0009-8981            the whole document</p>	1-26
A	<p>US 5 476 770 A (PRADELLES PHILIPPE)            19 December 1995 (1995-12-19)            the whole document</p>	1-26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR2004/050158

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5476770	A	FR 2700855 A1	29-07-1994
		CA 2113383 A1	29-07-1994
		DE 69418501 D1	24-06-1999
		DE 69418501 T2	16-12-1999
		EP 0609144 A1	03-08-1994
		ES 2133503 T3	16-09-1999
		JP 3310090 B2	29-07-2002
		JP 6273416 A	30-09-1994

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No  
 PCT/FR2004/050158

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 G01N33/53 G01N33/543		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HIROSE KENJI ET AL: "Syntheses of antigens conjugated with 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol by Mannich reaction for enzyme immunoassay" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 365, no. 1-3, 5 juin 1998 (1998-06-05), pages 137-145, XP001157318 ISSN: 0003-2670 le document en entier ----- -/--	1-26
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée ** document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
13 décembre 2004		21/12/2004
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Lüdemann, S

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (Janvier 2004)

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Document de l'Organisation Mondiale de la Propriété Industrielle  
 de l'Organisation Mondiale de la Propriété Industrielle No  
 PCT/FR2004/050158

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>TARAN FRÉDÉRIC ET AL: "High-throughput screening of enantioselective catalysts by immunoassay."            ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL ED. IN ENGLISH) GERMANY 4 JAN 2002,            vol. 41, no. 1,            4 janvier 2002 (2002-01-04), pages            124-127, XP002266704            ISSN: 0570-0833            le document en entier</p> <p>-----</p>	1-26
A	<p>LÖBER O ET AL: "Palladium-catalyzed hydroamination of 1,3-dienes: a colorimetric assay and enantioselective additions."            JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. UNITED STATES 9 MAY 2001,            vol. 123, no. 18, 9 mai 2001 (2001-05-09),            pages 4366-4367, XP002266705            ISSN: 0002-7863            le document en entier</p> <p>-----</p>	1-26
A	<p>TARAN FREDERIC ET AL: "Competitive enzyme immunoassay for urinary vanillylmandelic acid"            CLINICA CHIMICA ACTA,            vol. 264, no. 2, 1997, pages 177-192,            XP002266706            ISSN: 0009-8981            le document en entier</p> <p>-----</p>	1-26
A	<p>US 5 476 770 A (PRADELLES PHILIPPE)            19 décembre 1995 (1995-12-19)            le document en entier</p> <p>-----</p>	1-26

1

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No  
PCT/FR2004/050158

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5476770	A	FR 2700855 A1	29-07-1994
		CA 2113383 A1	29-07-1994
		DE 69418501 D1	24-06-1999
		DE 69418501 T2	16-12-1999
		EP 0609144 A1	03-08-1994
		ES 2133503 T3	16-09-1999
		JP 3310090 B2	29-07-2002
		JP 6273416 A	30-09-1994

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 フレデリク・タラン

フランス・F - 9 1 1 9 0 ・ジフ・シュール・イヴェット・アレ・デュ・プレ・クレア・7

(72) 発明者 クリストフ・クレミノン

フランス・F - 9 1 4 0 0 ・オルセー・パティメン・C 2 ・アヴニュ・サン・ローレン・3 0

(72) 発明者 ピエール・イヴ・レナール

フランス・F - 7 5 0 0 4 ・パリ・リュ・ドゥ・リヴォリ・3 0

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ32 QR12 QR82 QS33 QX02

4H006 AA02 AA04 AC24 AC25 AC41

专利名称(译)	筛选化学偶联反应的操作条件的方法和实施该方法的试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007527367A</a>	公开(公告)日	2007-09-27
申请号	JP2006505875	申请日	2004-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	原子能委员会		
申请(专利权)人(译)	コミツサリア タレネルジー アトミック		
[标]发明人	フレデリク タラン クリストフ クレミノン ピエール イヴ レナール		
发明人	フレデリク タラン クリストフ クレミノン ピエール イヴ レナール		
IPC分类号	C40B50/10 G01N33/53 C12Q1/46 C07B61/00 C07D233/64 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54306		
FI分类号	C40B50/10 G01N33/53.Z C12Q1/46 C07B61/00.Z C07D233/64.105		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ32 4B063/QR12 4B063/QR82 4B063/QS33 4B063/QX02 4H006/AA02 4H006/AA04 4H006/AC24 4H006/AC25 4H006/AC41		
代理人(译)	渡边 隆 村山 彦		
优先权	2003050106 2003-04-15 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及筛选至少两个官能团的偶联反应的操作条件的方法，特别是用于偶联反应的催化剂，和用于实施所述方法的试剂盒。本发明可以应用于基础和应用研究，特别是在化学，农业食品，药理学和环境保护领域，以开发和优化合成反应的性能。

