

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7419260号  
(P7419260)

(45)発行日 令和6年1月22日(2024.1.22)

(24)登録日 令和6年1月12日(2024.1.12)

(51)国際特許分類	F I
C 0 7 D 487/04 (2006.01)	C 0 7 D 487/04 1 4 4
C 0 7 D 519/00 (2006.01)	C 0 7 D 487/04 C S P
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 0 7 D 519/00 3 0 1
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26 Z N A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02
請求項の数 25 (全88頁) 最終頁に続く	

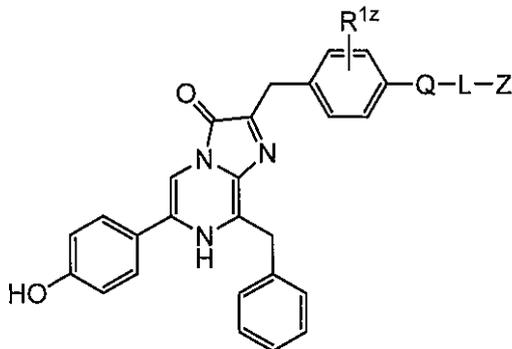
(21)出願番号	特願2020-561071(P2020-561071)	(73)特許権者	593089149 プロメガ コーポレーション Promega Corporation アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537 11-5399 マディソン ウッズ ホ ロー ロード 2800 番地
(86)(22)出願日	平成31年4月30日(2019.4.30)	(74)代理人	100094569 弁理士 田中 伸一郎
(65)公表番号	特表2021-523111(P2021-523111 A)	(74)代理人	100103610 弁理士 吉 田 和彦
(43)公表日	令和3年9月2日(2021.9.2)	(74)代理人	100109070 弁理士 須田 洋之
(86)国際出願番号	PCT/US2019/029975	(74)代理人	100119013 弁理士 山崎 一夫
(87)国際公開番号	WO2019/213119	(74)代理人	100123777
(87)国際公開日	令和1年11月7日(2019.11.7)		
審査請求日	令和4年5月2日(2022.5.2)		
(31)優先権主張番号	62/665,346		
(32)優先日	平成30年5月1日(2018.5.1)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 NanoLuc自殺基質としてのセレンテラジン化合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の式(I a)の化合物、



(I a)

またはその互変異性体もしくは塩であって、式中、  
R<sup>1z</sup>がハロゲンであり、

Qが、-O-、-NR<sup>Q</sup>-、-NR<sup>Q</sup>-CO-、-CO-NR<sup>Q</sup>-、-O-CO-NR<sup>Q</sup>  
-または-NR<sup>Q</sup>-CO-O-であり、

Lが、 $-(CR^{1a}R^{1b})_m-$ 、 $-(CR^{1x}R^{1y}-CR^{1x}R^{1y}-O)_{t1}$ 、 $-(CR^{1x}R^{1y})_{t2}-Q^1$  - または  $-(CR^{1x}R^{1y})_{t2}-A-(CR^{1x}R^{1y}-CR^{1x}R^{1y}-O)_{t1}-Q^1$  - であり、各 $Q^1$ が独立して、結合手、 $-O-$ または $-NR^{Q1}-$ であり、Aが、結合手、 $-O-$ 、 $-NR^Q-$ 、 $-NR^Q-CO-$ 、 $-CO-NR^Q-$ 、 $-O-CO-NR^Q-$ または $-NR^Q-CO-O-$ であり、

Zが、 $-COOR^2$ 、 $-SO_2-OR^3$ 、 $-PO(OR^4)(OR^5)$ 、ハロ、アジド、 $C_2-C_{10}$ アルキニル、ピオチン部分、 $-NR^6R^7$ または $-NR^8-CO-R^9$ であり、

$R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^8$ 及び $R^9$ が各出現ごとに独立して、水素、任意に置換された $C_1-C_8$ アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたヘテロアルキル、フルオロフォア又は検出可能な発色団であり、

10

$R^6$ 及び $R^7$ が各出現ごとに独立して、水素、任意に置換された $C_1-C_8$ アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたヘテロアルキル、フルオロフォア又は検出可能な発色団であるか、または $R^6$ 及び $R^7$ が、それらと結合している窒素原子と一体となって、任意に置換された環を形成し、

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^Q$ 、 $R^{Q1}$ 、 $R^{1x}$ 及び $R^{1y}$ が各出現ごとに独立して、水素、 $C_1-C_4$ アルキルまたは $C_1-C_4$ ハロアルキルであり、

mが各出現ごとに独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12であり、

20

$t_1$ が各出現ごとに独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10であり、及び

$t_2$ が、0～5の整数であり、

前記化合物が、4-[4-[ [ 8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-3-オキソ-7H-イミダゾ[1,2-a]ピラジン-2-イル]メチル]フェノキシ]ブタン酸ではない前記化合物、またはその互変異性体もしくは塩。

#### 【請求項2】

Qが、Oであり、

Lが、 $-(CR^{1a}R^{1b})_m-$ であり、

$R^{1a}$ 及び $R^{1b}$ が、水素であり、

mが、5、6、7、8、9または10であり、

Zが、 $-NR^8-CO-R^9$ であり、

$R^8$ が、水素であり、

$R^9$ が、フルオロフォア又は検出可能な発色団である、請求項1に記載の化合物。

30

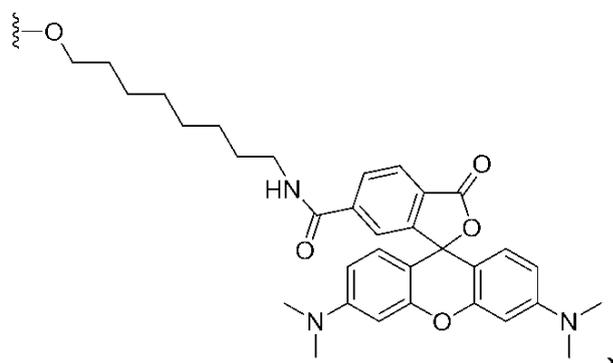
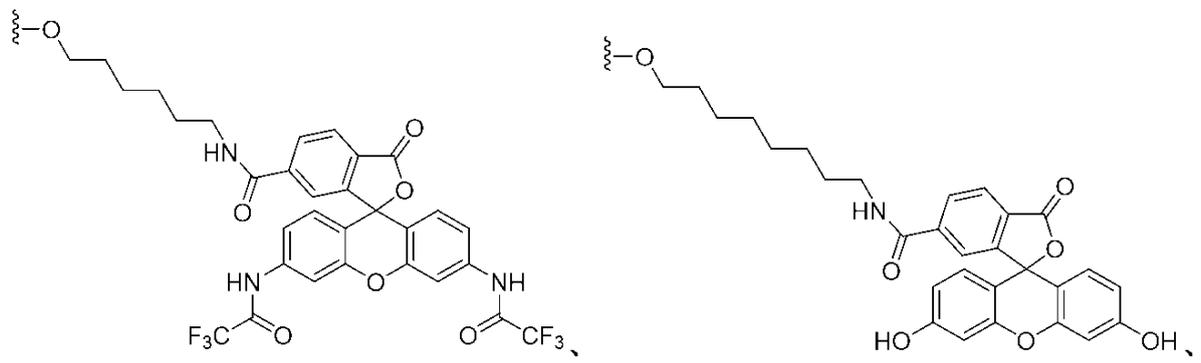
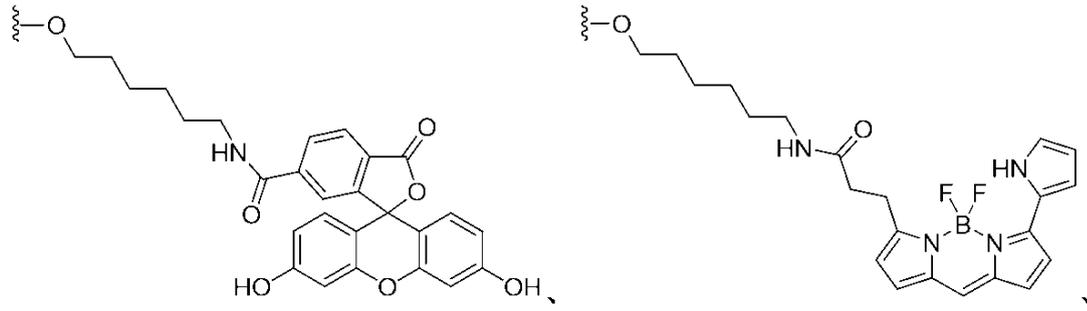
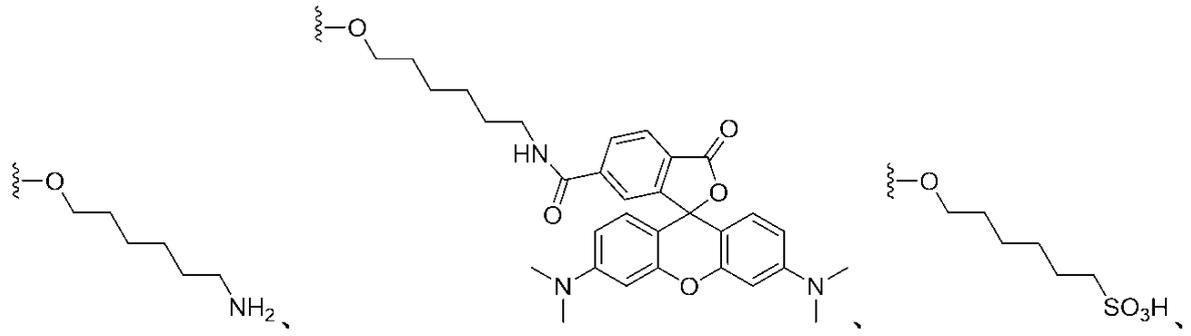
#### 【請求項3】

$R^9$ が、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、ピレン、シアニン、スクアライン及びホウ素-ジピロメテンから選択したフルオロフォアである、請求項1又は2に記載の化合物。

#### 【請求項4】

前記-Q-L-Zという基が、

40



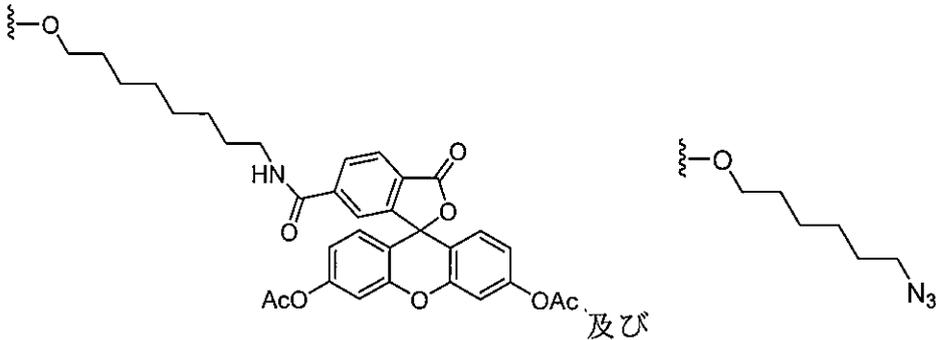
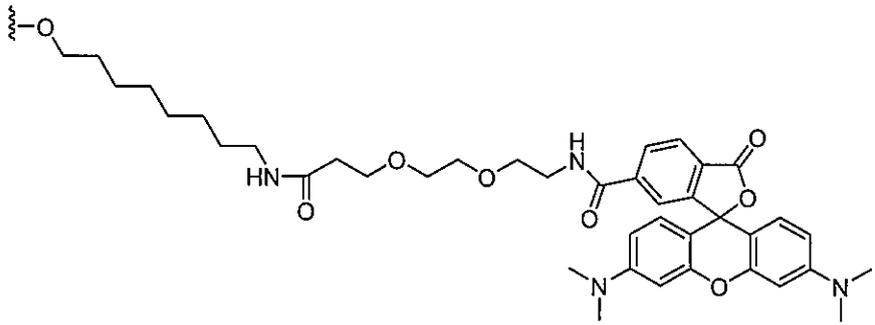
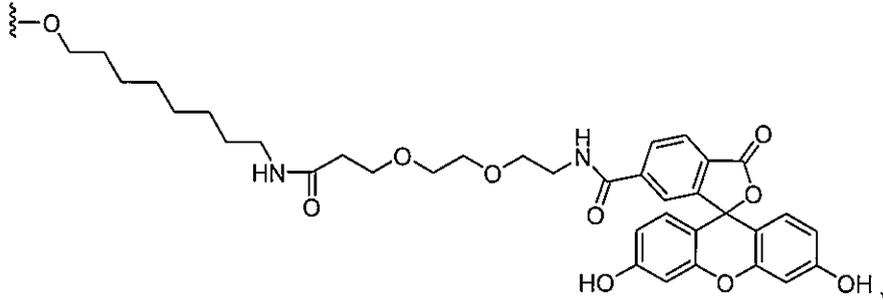
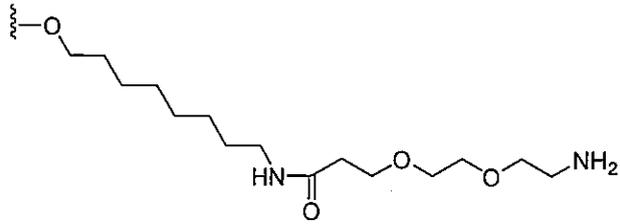
10

20

30

40

50



から選択した構造を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

2 - ( 4 - ( ( 6 - アミノヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン、

N - ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) - 3 ' , 6 ' - ビス ( ジメチルアミノ ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノ

10

20

30

40

50

キシ)ヘキサン - 1 - スルホン酸、

N - ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) - 3 ' , 6 ' - ジヒドロキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

N - ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) - 3 - ( 5 , 5 - ジフルオロ - 7 - ( 1 H - ピロール - 2 - イル ) - 5 H - 5 4 , 6 4 - ジピロロ [ 1 , 2 - c : 2 ' , 1 ' - f ] [ 1 , 3 , 2 ] ジアザボリニン - 3 - イル ) プロパンアミド、

10

N , N ' - ( 6 - ( ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) カルバモイル ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 3 ' , 6 ' - ジイル ) ビス ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド )、

N - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) - 3 ' , 6 ' - ジヒドロキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

N - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) - 3 ' , 6 ' - ビス ( ジメチルアミノ ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

20

3 - ( 2 - ( 2 - アミノエトキシ ) エトキシ ) - N - ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) プロパンアミド、

N - ( 2 - ( 2 - ( 3 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) アミノ ) - 3 - オキソプロポキシ ) エトキシ ) エチル ) - 3 ' , 6 ' - ジヒドロキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

30

N - ( 2 - ( 2 - ( 3 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) アミノ ) - 3 - オキソプロポキシ ) エトキシ ) エチル ) - 3 ' , 6 ' - ビス ( ジメチルアミノ ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

6 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバモイル ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 3 ' , 6 ' - ジイルジアセテート、

40

2 - ( 4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン、

5 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバモイル ) - 2 - ( 2 , 7 - ジフルオロ - 3 , 6 - ジヒドロキシキサンチリウム - 9 - イル ) ベンゾエート、

5 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバモイル ) - 2 - ( 3 , 11 - ジヒドロキシジベンゾ [ c

50

, h]キサンテン - 14 - イウム - 7 - イル)ベンゾエート、及び  
 N1 - (8 - (4 - ((8 - ベンジル - 6 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - オキソ  
 - 3, 7 - ジヒドロイミダゾ[1, 2 - a]ピラジン - 2 - イル)メチル) - 2 - フルオ  
 ロフェノキシ)オクチル) - N4 - (2 - (5, 5 - ジフルオロ - 1, 3 - ジメチル - 5  
 H - 5<sup>4</sup>, 6<sup>4</sup> - ジピロロ[1, 2 - c:2', 1' - f][1, 3, 2]ジアザポリリ  
 ン - 10 - イル)エチル)コハク酸アミド

からなる群から選択された、請求項1に記載の化合物。

【請求項6】

試料中のOplorphorus由来のルシフェラーゼの検出方法であって、前記試料と、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物を接触させる工程を含む前記方法。

10

【請求項7】

前記試料における発光を検出する工程をさらに含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

試料における発光の検出方法であって、

- (a) 前記試料と、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物を接触させる工程、
  - (b) Oplorphorus由来のルシフェラーゼが前記試料に存在しない場合には、前記試料と、Oplorphorus由来のルシフェラーゼを接触させる工程、及び
  - (c) 前記試料における発光を検出する工程、
- を含む前記方法。

【請求項9】

試料中の、Oplorphorus由来のルシフェラーゼの標識方法であって、前記試料と、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物を接触させる工程を含む前記方法。

20

【請求項10】

試料中の、Oplorphorus由来のルシフェラーゼの標識方法であって、

- (a) 前記試料と、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物を接触させる工程、ここで、前記化合物が、少なくとも1つの蛍光色素を含む、
  - (b) 前記接触工程後に、前記試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去する工程、及び
  - (c) 前記洗浄工程後に、前記試料における蛍光を検出する工程、
- を含む前記方法。

30

【請求項11】

試料中の、Oplorphorus由来のルシフェラーゼの標識方法であって、

- (a) 前記試料と、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物を接触させる工程、ここで、前記化合物が、第1の官能基を含む、
  - (b) 前記試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去する工程、
  - (c) 前記試料と、第2の官能基を含む蛍光色素とを接触させる工程、ここで、前記第2の官能基が、前記第1の官能基と反応するか、または前記第1の官能基に結合することができる、
  - (d) 前記試料を洗浄して、任意の未反応の蛍光色素を除去する工程、及び
  - (e) 前記試料における蛍光を検出する工程、
- を含む前記方法。

40

【請求項12】

- (i) 前記第1の官能基が、アジドであり、前記第2の官能基が、アルキンである、
- (ii) 前記第1の官能基が、アルキンであり、前記第2の官能基が、アジドである、又は
- (iii) 前記第1の官能基が、ピオチン部分であり、前記第2の官能基が、ストレプトアピジンである、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

試料からのOplorphorus由来のルシフェラーゼの単離方法であって、前記試料が、生細胞を含み、前記方法が、

50

(a) *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを含む生細胞試料と、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物を接触させる工程、ここで、前記化合物が、第 1 の官能基を有する、

(b) 前記試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去する工程、

(c) 前記試料と、1 つ以上の溶解試薬を接触させる工程、

(d) 前記第 1 の官能基に結合するか、または前記第 1 の官能基と反応する第 2 の官能基を有する捕捉剤を前記試料に加えて、前記 *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを捕捉する工程、

(e) 前記試料を洗浄して、捕捉されなかった *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを除去する工程、及び

(f) 工程 (e) で捕捉された前記 *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを単離する工程、

を含む前記方法。

【請求項 14】

試料からの *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼの単離方法であって、前記試料が、生細胞を含み、前記方法が、

(a) *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを含む試料と、1 つ以上の溶解試薬を接触させる工程、

(b) *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを含む生細胞試料と、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物を接触させる工程、ここで、前記化合物が、第 1 の官能基を有する、

(c) 前記試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去する工程、

(d) 前記第 1 の官能基に結合するか、または前記第 1 の官能基と反応する第 2 の官能基を有する捕捉剤を前記試料に加えて、前記 *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを捕捉する工程、

(e) 前記試料を洗浄して、捕捉されなかった *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを除去する工程、及び

(f) 工程 (e) で捕捉された前記 *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを単離する工程、

を含む前記方法。

【請求項 15】

試料中の、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼの阻害方法であって、前記 *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼと、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物を接触させる工程を含む前記方法。

【請求項 16】

前記 *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを不可逆的に阻害する又は部分的に阻害する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

試料中の、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼの発光の調節方法であって、

(a) 前記試料と、基質セレンテラジン及び請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物を接触させる工程、ならびに

(b) 前記試料における発光を検出する工程、

を含み、

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物により、前記 *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼによる発光が減少する前記方法。

【請求項 18】

前記試料と、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物を接触させる前に、前記試料と、前記基質セレンテラジンを接触させる工程を含む、請求項 17 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 19】

前記試料と、前記基質セレンテラジンを接触させる前に、前記試料と、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物を接触させる工程を含む、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 20】

試料中の、Oplophorus 由来のルシフェラーゼの発光の調節方法であって、

(a) 前記試料と、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物を接触させる工程、

(b) 前記試料と、基質セレンテラジンを接触させる工程、及び

(c) 前記試料における発光を検出する工程、

を含み、

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物により、前記基質セレンテラジンを加えたときに、前記 Oplophorus 由来のルシフェラーゼによる発光の増大が阻止される前記方法。

10

## 【請求項 21】

前記試料が、前記 Oplophorus 由来のルシフェラーゼを含む細胞を含み、

任意に、前記細胞が、前記 Oplophorus 由来のルシフェラーゼを発現する、

請求項 6 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記基質セレンテラジンが、セレンテラジン、セレンテラジン誘導体、セレンテラジン類似体、プロセレンテラジン、またはキノンでマスクされたセレンテラジンである、請求項 17 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 23】

前記 Oplophorus 由来のルシフェラーゼが、配列番号 2 のポリペプチド配列を含む、請求項 6 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 24】

(a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物、及び

(b) Oplophorus 由来のルシフェラーゼ、

を含み、

任意に、基質セレンテラジン及び / 又は発光アッセイを実施するための説明をさらに含む、キット。

## 【請求項 25】

前記 Oplophorus 由来のルシフェラーゼが、配列番号 2 のポリペプチド配列を含む、請求項 24 に記載のキット。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2018年5月1日に出願した米国特許仮出願第62/665,346号に基づく優先権の利益を主張するものであり、この仮出願は、参照により、その全体が本明細書に援用される。

## 【0002】

本開示は、Oplophorus 由来のルシフェラーゼを検出または阻害するのに使用し得る化合物に対するものである。

40

## 【背景技術】

## 【0003】

生物学、生化学、免疫学、細胞生物学及び分子生物学の分野において、分子イベントをモニタリングする目的で、レポーター分子が日常的に用いられている。深海エビ Oplophorus gracilirostris から分泌されるルシフェラーゼベースのルシフェラーゼは、レポーター分子として使用でき、広範な基質特異性、高い活性及び高い量子収率を含む有益な特徴を持つことが示されている。特定の用途では、Oplophorus ルシフェラーゼによる発光シグナルを標識または制御することがさらに有益な場合

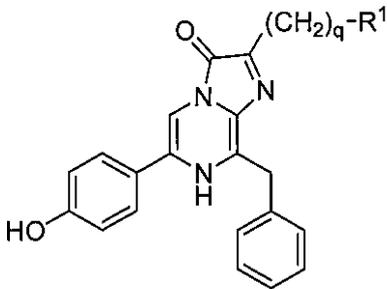
50

がある。

【発明の概要】

【0004】

一態様では、本開示は、下記の式(I)の化合物もしくはその塩、



10

(I)

またはその互変異性体もしくは塩であって、式中、

$R^1$ が、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環または任意に置換されたシクロアルキルであり、 $R^1$ が、 $-Q-L-Z$ である少なくとも1つの基で置換されており、

$Q$ が、 $-O-$ 、 $-NR^Q-$ 、 $-NR^Q-CO-$ 、 $-CO-NR^Q-$ 、 $-O-CO-NR^Q-$ または $-NR^Q-CO-O-$ であり、

20

$L$ が、 $-(CR^{1a}R^{1b})_m-$ 、 $-(CR^{1x}R^{1y}-CR^{1x}R^{1y}-O)_{t1}-(CR^{1x}R^{1y})_{t2}-Q^1-$ 、 $-(CR^{1x}R^{1y})_{t2}-A-(CR^{1x}R^{1y}-CR^{1x}R^{1y}-O)_{t1}-Q^1-$ 、 $-(CR^{1x}R^{1y})_{t3}-A-(CR^{1x}R^{1y}-CR^{1x}R^{1y}-O)_{t1}-(CR^{1x}R^{1y})_{t2}$ または $-(CR^{1x}R^{1y})_{t3}-A-(CR^{1x}R^{1y})_{t4}$ であり、各 $Q^1$ が独立して、結合手、 $-O-$ または $-NR^{Q1}-$ であり、各 $A$ が独立して、結合手、 $-O-$ 、 $-NR^Q-$ 、 $-NR^Q-CO-$ 、 $-CO-NR^Q-$ 、 $-O-CO-NR^Q-$ または $-NR^Q-CO-O-$ であり、

$Z$ が、 $-COOR^2$ 、 $-SO_2-OR^3$ 、 $-PO(OR^4)(OR^5)$ 、ハロ、アジド、 $C_2-C_{10}$ アルキニル、ピオチン部分、 $-NR^6R^7$ 、 $-NR^8-CO-R^9$ 、 $-CO-R^{10}$ または $-NR^{11}-CO-O-R^{12}$ であり、

30

$R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 及び $R^{12}$ が各出現ごとに独立して、水素、任意に置換された $C_1-C_8$ アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたヘテロアルキルまたはエネルギーアクセプターであり、

$R^6$ 及び $R^7$ が各出現ごとに独立して、水素、任意に置換された $C_1-C_8$ アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたヘテロアルキルもしくはエネルギーアクセプターであるか、または $R^6$ 及び $R^7$ が、それらと結合している窒素原子と一体となって、任意に置換された環を形成し、

40

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^Q$ 、 $R^{Q1}$ 、 $R^{1x}$ 及び $R^{1y}$ が各出現ごとに独立して、水素、 $C_1-C_4$ アルキルまたは $C_1-C_4$ ハロアルキルであり、

$q$ が、0、1または2であり、

$m$ が各出現ごとに独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12であり、

$t_1$ が各出現ごとに独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10であり、

$t_2$ が、0~5の整数であり、

$t_3$ が各出現ごとに、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10であり、

$t_4$ が、0~5の整数であり、

その化合物が、4-[4-[ [8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-3-

50

オキソ - 7H - イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ] メチル ] フェノキシ ] ブタン酸ではない化合物、またはその互変異性体もしくは塩を提供する。

【 0 0 0 5 】

一態様では、本開示は、試料中の、Oplophorus由来のルシフェラーゼの標識方法であって、そのOplophorus由来のルシフェラーゼと、本明細書に記載の化合物を接触させることを含む方法を提供する。

【 0 0 0 6 】

一態様では、本開示は、試料中の、Oplophorus由来のルシフェラーゼの標識方法であって、

( a ) その試料と、本発明で開示される化合物を接触させること、及び

( b ) その試料における発光を検出すること、

を含む方法を提供する。

10

【 0 0 0 7 】

一態様では、本開示は、試料中の、Oplophorus由来のルシフェラーゼの検出方法であって、その試料と、式 ( I ) の化合物のような、本明細書に記載の化合物を接触させることを含む方法を提供する。

【 0 0 0 8 】

一態様では、本開示は、試料における発光の検出方法であって、

( a ) その試料と、式 ( I ) の化合物のような、本明細書に記載の化合物を接触させること、

( b ) その試料にOplophorus由来のルシフェラーゼが存在しない場合に、その試料と、Oplophorus由来のルシフェラーゼを接触させること、及び

( c ) その試料における発光を検出すること、

を含む方法を提供する。

20

【 0 0 0 9 】

一態様では、本開示は、試料中の、Oplophorus由来のルシフェラーゼの標識方法であって、その試料と、式 ( I ) の化合物のような、本明細書に記載の化合物を接触させることを含む方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

一態様では、本開示は、試料中の、Oplophorus由来のルシフェラーゼの標識方法であって、

( a ) その試料と、式 ( I ) の化合物のような、本明細書に記載の化合物を接触させることであって、その化合物が、少なくとも1つの蛍光色素を含む接触させること、

( b ) その接触工程後に、その試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去すること、及び

( c ) その洗浄工程後に、その試料における蛍光を検出すること、

を含む方法を提供する。

30

【 0 0 1 1 】

一態様では、本開示は、試料中の、Oplophorus由来のルシフェラーゼの標識方法であって、

( a ) その試料と、式 ( I ) の化合物のような、本明細書に記載の化合物を接触させることであって、その化合物が、第1の官能基を含む接触させること、

( b ) その試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去すること、

( c ) その試料と、第2の官能基を含む蛍光色素を接触させることであって、その第2の官能基が、第1の官能基と反応するか、または第1の官能基に結合することができる接触させること、

( d ) その試料を洗浄して、任意の未反応の蛍光色素を除去すること、及び

( e ) その試料における蛍光を検出すること、

を含む方法を提供する。

40

50

## 【0012】

一態様では、本開示は、試料からのOplophorus由来のルシフェラーゼの単離方法であって、その試料が、生細胞を含み、その方法が、

(a) Oplophorus由来のルシフェラーゼを含む生細胞試料と、式(I)の化合物のような、本明細書に記載の化合物を接触させることであって、その化合物が、第1の官能基を有する接触させること、

(b) その試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去すること、

(c) その試料と、1つ以上の溶解試薬を接触させること、

(d) その試料に、第1の官能基に結合するか、または第1の官能基と反応する第2の官能基を有する捕捉剤を加えて、そのOplophorus由来のルシフェラーゼを捕捉すること、

(e) その試料を洗浄して、捕捉されなかった、Oplophorus由来のルシフェラーゼを除去すること、及び

(f) 工程(e)で捕捉された、Oplophorus由来のルシフェラーゼを単離すること、

を含む方法を提供する。

## 【0013】

一態様では、本開示は、試料からのOplophorus由来のルシフェラーゼの単離方法であって、その試料が、生細胞を含み、その方法が、

(a) Oplophorus由来のルシフェラーゼを含む試料と、1つ以上の溶解試薬を接触させること、

(b) Oplophorus由来のルシフェラーゼを含む生細胞試料と、式(I)の化合物のような、本明細書に記載の化合物を接触させることであって、その化合物が、第1の官能基を有する接触させること、

(c) その試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去すること、

(d) その試料に、第1の官能基に結合するか、または第1の官能基と反応する第2の官能基を有する捕捉剤を加えて、そのOplophorus由来のルシフェラーゼを捕捉すること、

(e) その試料を洗浄して、捕捉されなかった、Oplophorus由来のルシフェラーゼを除去すること、及び

(f) 工程(e)で捕捉された、Oplophorus由来のルシフェラーゼを単離すること、

を含む方法を提供する。

## 【0014】

一態様では、本開示は、Oplophorus由来のルシフェラーゼの阻害方法であって、そのOplophorus由来のルシフェラーゼと、式(I)の化合物のような、本明細書に記載の化合物を接触させることを含む方法を提供する。

## 【0015】

一態様では、本開示は、試料中の、Oplophorus由来のルシフェラーゼの発光の調節方法であって、

(a) その試料と、基質セレンテラジン及び式(I)の化合物のような、本明細書に記載の化合物を接触させること、ならびに

(b) その試料における発光を検出すること、

を含み、

その化合物により、そのOplophorus由来のルシフェラーゼによる発光が減少する方法を提供する。

## 【0016】

一態様では、本開示は、

10

20

30

40

50

- ( a ) 式 ( I ) の化合物のような、本明細書に記載の化合物、及び  
 ( b ) O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼ、を含むキットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1】例示的な化合物の生化学的な生物発光活性及び自己発光活性をフリマジン ( F z ) と比較したものを示している。

【図 2】N a n o G l o (登録商標) 緩衝液中の 1 0 μ M のフリマジン及びフリマジン - h を 2 n g / m L の N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) と合わせたものの動態的読み取り値を示している。

【図 3】A ~ B は、フリマジン - h で処理した N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) が、様々な濃度のフリマジンに応答しなくなることを示している。 10

【図 4 A】例示的な化合物の N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) に対する阻害活性をフリマジンと比較したものを示している。

【図 4 B】例示的な化合物の N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) に対する阻害活性をフリマジンと比較したものを示している。

【図 4 C】例示的な化合物の N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) に対する阻害活性をフリマジンと比較したものを示している。

【図 4 D】例示的な化合物の N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) に対する阻害活性をフリマジンと比較したものを示している。

【図 4 E】例示的な化合物の N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) に対する阻害活性をフリマジンと比較したものを示している。 20

【図 4 F】例示的な化合物の N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) に対する阻害活性をフリマジンと比較したものを示している。

【図 5 A】J R W - 0 8 5 5 の N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) に対する部分的阻害活性を示している。

【図 5 B】J R W - 1 0 8 8 の N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) に対する部分的阻害活性を示している。

【図 6 A】J R W - 0 8 5 7 が、N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) を阻害しないことを示している。

【図 6 B】J R W - 1 0 5 9 が、N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) を阻害しないことを示している。 30

【図 7】N a n o B i T (商標) 2 分子ルシフェラーゼのフリマジン - h による阻害を示している。

【図 8】A ~ B は、2 つの蛍光性 F A M - 基質セレンテラジン、J R W - 0 9 0 6 及び J R W - 0 9 2 6 で N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) が蛍光標識されることを示している。標識の効率は、グルタチオントランスフェラーゼ ( G S T ) または N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) のいずれかとの H a l o T a g (登録商標) 融合体を用いて、基質クロロアルカン - F A M の効率と比較した。

【図 9】最初に、N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ ( N l u c ) をフリマジンに暴露した後でも、フリマジン - h が N l u c を阻害する活性を示している。 40

【図 1 0】A ~ B は、付加されたアジドを有する基質を用いた後に、付加された F A M 色素を有するアルキン化合物と反応させた 2 段階標識プロセスの結果を示している。

【図 1 1】A ~ B は、付加されたアジドを有する基質を用いた後に、付加された F A M 色素を有するアルキン化合物と反応させた 2 段階標識プロセスの結果を示している。

【図 1 2】A ~ C は、アルケン - テトラジン対を用いた追加の 2 段階標識プロセスの結果を示している。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 8 】

本発明で開示するのは、セレンテラジン類似体である。開示されている化合物は、セレンテラジン類似体コア、共有結合鎖リンカー及び官能基を含んでよい。そのセレンテラジ 50

ン類似体コアは、ルシフェラーゼに、その酵素の結合部位で結合し得る。本発明の化合物は、自殺阻害剤のように、O p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼに対する標識試薬として有用である場合がある。本発明の化合物が、共有結合でテザリングされた官能基をさらに含むときには、その化合物はさらに、O p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼを検出するのに使用し得る。開示されている化合物は、配列番号2のルシフェラーゼ（本明細書では同義的に「N a n o L u c」、「N l u c」、「N l u cルシフェラーゼ」及び「N L u c酵素」ともいう）のような、O p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼの選択的基質であり得る。

#### 【0019】

開示されている化合物は、O p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼの阻害剤であり得る。開示されている化合物は、配列番号2のルシフェラーゼ（本明細書では同義的に「N a n o L u c」、「N l u c」、「N l u cルシフェラーゼ」及び「N L u c酵素」ともいう）のような、O p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼを選択的に阻害し得る。開示されている化合物は、そのO p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性を不可逆的に阻害する自殺阻害剤であり得る。開示されている化合物は、そのO p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性を部分的に低減する部分的阻害剤であり得る。開示されている化合物は、O p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼの自殺基質であって、初めに、そのルシフェラーゼと反応して生物発光シグナルを生成し、続いて、そのO p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼを不可逆的に阻害する自殺基質であり得る。開示されている化合物は、N a n o L u c及び相補的な酵素系N a n o B i Tを阻害し得る。

#### 【0020】

開示されている化合物は、生細胞イメージング、細胞選別またはヒストグラム染色で用いるために、蛍光色素または発色団に付加し得る。開示されている化合物は、対象とするN a n o L u c融合タンパク質を表面または固体に捕捉または固定化するのに使用し得る。開示されている化合物は、様々な生体分子に付加して、N a n o L u cまたはN a n o B i Tを適切な官能基でポストラベリングするのに使用し得る。開示されている化合物は、N a n o L u cを蛍光標識するための2段階式の方法で使用し得る。例えば、開示されている化合物を反応性官能基に付加してよく、相補的な反応性基を有する蛍光色素を、蛍光標識するN a n o L u cに付加することができる。例示的な実施形態では、開示されている化合物は、アジドを含んでよく、アルキンにコンジュゲートされた蛍光色素を、蛍光標識するN a n o L u cに付加することができる。

#### 【0021】

開示されている化合物を改変して、細胞透過性化合物及び細胞不透過性化合物の両方を作製し得る。その安定性と、細胞から排出される潜在性から、特定の用途では、選択的阻害剤を用いて、O p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼによる発光を抑制するのが有益である場合がある。例えば、複数の発光系の時間的マルチプレックス化を伴う用途では、1度に1つの発光シグナルのみを測定及び/または検出可能にするために、各系に対する選択的阻害剤があるのが有益であり得る。加えて、いくつかのプレートベースアッセイでは、特定量のルシフェラーゼが細胞から排出されることがある。細胞外阻害剤の化合物は、排出されたルシフェラーゼによる発光を選択的に抑制可能にするので、特定のアッセイにおけるシグナルノイズ比を向上させるのを助け得る。

#### 【0022】

##### 1. 定義

別段の定義のない限り、本明細書で用いられているすべての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。矛盾が生じた場合には、定義を含め、本書が優先されることになる。好ましい方法及び材料が下に記載されているが、本発明を実施または試験する際には、本明細書に記載の方法及び材料と類似または同等のものを使用することができる。本明細書で言及されているすべての刊行物、特許出願、特許及びその他の参考文献は、参照により、その全体が援用される。本明細書に開示され

10

20

30

40

50

ている材料、方法及び例は、例示的なものに過ぎず、限定するようには意図されていない。

【0023】

「含む (comprise(s))」、「含む (include(s))」、「有すること」、「有する」、「できる」、「含む (contain(s))」という用語、及びそれらの互換表現は、本明細書で使用する場合、追加の行為または構造の可能性を排除しないオープンエンドの移行句、用語または単語であることが意図されている。文脈によって明らかに別段に示されない限り、「a」、「an」及び「the」という単数形には、複数の指示対象が含まれる。本開示では、明示されているか否かにかかわらず、本明細書に示されている実施形態または要素を「含む」他の実施形態、本明細書に示されている実施形態または要素「からなる」他の実施形態、及び本明細書に示されている実施形態または要素「から本質的になる」他の実施形態も企図される。

10

【0024】

本明細書中の数値範囲の列举に関しては、同程度の精度である、その間の各数字が明示的に企図されている。例えば、6~9の範囲では、6及び9に加えて、7及び8という数字が企図されており、6.0~7.0の範囲では、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9及び7.0という数字が明示的に企図されている。

【0025】

具体的な官能基及び化学用語の定義は、下にさらに詳細に記載されている。本開示の目的では、化学元素は、CAS式の元素周期表 (Handbook of Chemistry and Physics, 75<sup>th</sup> Ed., 内表紙) に従って定められており、具体的な官能基は概して、本明細書に記載のように定義されている。加えて、有機化学の一般原理、ならびに具体的な機能性部分及び反応性は、Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999、Smith and March March's Advanced Organic Chemistry, 5<sup>th</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001、Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989、Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3<sup>rd</sup> Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987に記載されており、これらの各文献の内容全体は、参照により、本明細書に援用される。

20

30

【0026】

「アルコキシ」という用語は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されているようなアルキル基が、親分子部分に、酸素原子を介して付加されたものを指す。アルコキシの代表的な例としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、2-プロポキシ、ブトキシ及びtert-ブトキシが挙げられるが、これらに限らない。

【0027】

「アルキル」という用語は、本明細書で使用する場合、1~10個の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素鎖を意味する。「低級アルキル」または「C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル」という用語は、1~6個の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素を意味する。「C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル」という用語は、1~3個の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素を意味する。アルキルの代表的な例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、sec-ブチル、イソ-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、3-メチルヘキシル、2,2-ジメチルペンチル、2,3-ジメチルペンチル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニル及びn-デシルが挙げられるが、これらに限らない。

40

【0028】

「アルケニル」という用語は、本明細書で使用する場合、2~10個の炭素原子を含む

50

とともに、少なくとも1つの炭素 - 炭素二重結合を有する炭化水素鎖を意味する。アルケニル基は、置換または非置換であってよい。例えば、アルケニル基は、フェニルのようなアリール基で置換されていてよい。

## 【0029】

「アルキニル」という用語は、本明細書で使用する場合、2～10個の炭素原子を含むとともに、少なくとも1つの炭素 - 炭素三重結合を有する炭化水素鎖を意味する。アルキニル基は、置換または非置換であってよい。例えば、アルキニル基は、フェニルのようなアリール基で置換されていてよい。

## 【0030】

「アルコキシアルキル」という用語は、本明細書で使用する場合、本明細書で定義されているようなアルコキシ基が、親分子部分に、本明細書に定義されているようなアルキル基を介して付加されたものを指す。

## 【0031】

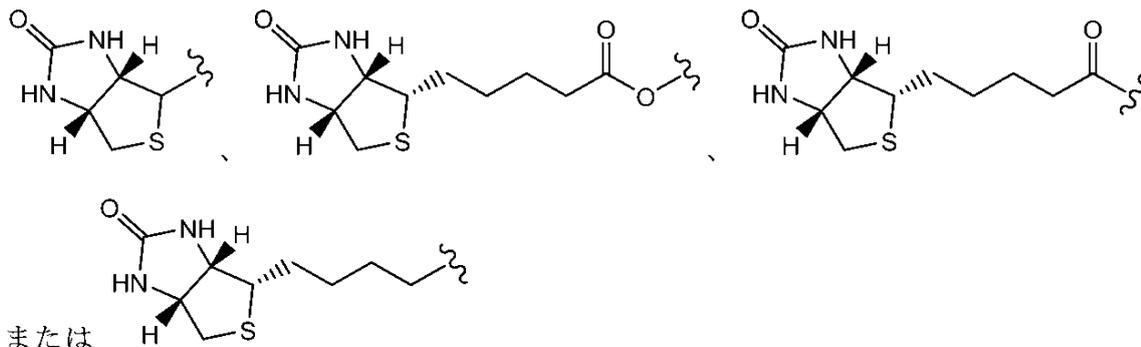
「アルキレン」という用語は、本明細書で使用する場合、1～10個の炭素原子、例えば2～5個の炭素原子の直鎖または分岐鎖の炭化水素から得られた2価の基を指す。アルキレンの代表的な例としては、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$  及び  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$  が挙げられるが、これらに限らない。

## 【0032】

「アリール」という用語は、本明細書で使用する場合、フェニル基、または二環式アリールもしくは三環式アリールの縮合環系を指す。二環式縮合環系は、親分子部分に付加され、フェニル基に縮合されたフェニル基によって例示される。三環式縮合環系は、親分子部分に付加され、2つの他のフェニル基に縮合されたフェニル基によって例示される。二環式アリールの代表的な例としては、ナフチルが挙げられるが、これに限らない。三環式アリールの代表的な例としては、アントラセニルが挙げられるが、これに限らない。単環式アリール、二環式アリール及び三環式アリールは、親分子部分に、その環内の任意の炭素原子を介して連結され、非置換または置換であることができる。

## 【0033】

「ビオチン部分」という用語は、本明細書で使用する場合、ビオチンのラジカルまたはその一部を指す。例えば、ビオチン部分は、その分子の残部に直接（例えば、その環系の4位で）結合された二環式複素環式環（(3aR, 6aS) - テトラヒドロ - 1H - チエノ[3,4-d]イミダゾール - 2(3H) - オン）を含んでよく、または、ビオチン部分は、ビオチンにおいて天然で見られる4つのメチレン基のうち、その二環式複素環式環の4位をビオチン - COOH基に連結する1つ以上のメチレン基を含んでよく、または、ビオチン部分は、その4つのメチレン基及び  $-C(O)-$  もしくは  $-CO(O)-$  基とともに、二環式複素環を含んでよい。いくつかの実施形態では、ビオチン部分は、



という式のうちのいずれかを有してよい。

## 【0034】

「シクロアルキル」という用語は、本明細書で使用する場合、3～10個の炭素原子を含み、ヘテロ原子を含まず、任意に1個または2個の二重結合を含む炭素環系を指す。シ

10

20

30

40

50

クロアルキルの代表的な例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル及びシクロデシルが挙げられるが、これらに限らない。

【 0 0 3 5 】

「シクロアルケニル」という用語は、本明細書で使用する場合、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含むとともに、好ましくは、1つの環当たり5～10個の炭素原子を有する非芳香族の単環式環系または多環式環系を意味する。例示的な単環式シクロアルケニル環としては、シクロペンテニル、シクロヘキセニルまたはシクロヘプテニルが挙げられる。

【 0 0 3 6 】

「フルオロアルキル」という用語は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されているようなアルキル基において、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個または8個の水素原子がフッ素によって置き換えられている基を意味する。フルオロアルキルの代表的な例としては、2-フルオロエチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、ペンタフルオロエチル、及び3, 3, 3-トリフルオロプロピルのようなトリフルオロプロピルが挙げられるが、これらに限らない。

【 0 0 3 7 】

「アルコキシフルオロアルキル」という用語は、本明細書で使用する場合、本明細書で定義されているようなアルコキシ基が、親分子部分に、本明細書に定義されているようなフルオロアルキル基を介して付加されたものを指す。

【 0 0 3 8 】

「フルオロアルコキシ」という用語は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されているような少なくとも1つのフルオロアルキル基が、親分子部分に、酸素原子を介して付加されたものを意味する。フルオロアルコキシの代表的な例としては、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ及び2, 2, 2-トリフルオロエトキシが挙げられるが、これらに限らない。

【 0 0 3 9 】

「ハロゲン」または「ハロ」という用語は、本明細書で使用する場合、Cl、Br、IまたはFを意味する。

【 0 0 4 0 】

「ハロアルキル」という用語は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されているようなアルキル基において、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個または8個の水素原子がハロゲンによって置き換えられている基を意味する。

【 0 0 4 1 】

「ハロアルコキシ」という用語は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されているような少なくとも1つのハロアルキル基が、親分子部分に、酸素原子を介して付加されているものを意味する。

【 0 0 4 2 】

「ヘテロアルキル」という用語は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されているようなアルキル基において、その炭素原子のうちの1つ以上が、S、Si、O、P及びNから選択したヘテロ原子によって置き換えられている基を意味する。そのヘテロ原子は、酸化されていてもよい。ヘテロアルキルの代表的な例としては、アルキルエーテル、第2級アルキルアミン、第3級アルキルアミン、アミド及び硫化アルキルが挙げられるが、これらに限らない。

【 0 0 4 3 】

「ヘテロアリール」という用語は、本明細書で使用する場合、芳香族単環式環、芳香族二環式環系または芳香族三環式環系を指す。芳香族単環式環は、N、O及びSからなる基から独立して選択した少なくとも1つのヘテロ原子（例えば、O、S及びNから独立して選択した1個、2個、3個または4個のヘテロ原子）を含む5員環または6員環である。5員の芳香族単環式環は、2つの二重結合を有し、6員の芳香族単環式環は、3つの二重

10

20

30

40

50

結合を有する。二環式ヘテロアリアル基は、単環式ヘテロアリアル環が、親分子部分に付加され、本明細書に定義されているような単環式シクロアルキル基、本明細書に定義されているような単環式アリアル基、本明細書に定義されているような単環式ヘテロアリアル基または本明細書に定義されているような単環式複素環に融合されたものによって例示される。三環式ヘテロアリアル基は、単環式ヘテロアリアル環が、親分子部分に付加され、本明細書に定義されているような単環式シクロアルキル基、本明細書に定義されているような単環式アリアル基、本明細書に定義されているような単環式ヘテロアリアル基または本明細書に定義されているような単環式複素環のうちの2つに融合されたものによって例示される。単環式ヘテロアリアル基の代表的な例としては、プリジニル(プリジン-2-イル、プリジン-3-イル、プリジン-4-イルを含む)、プリミジニル、ピラジニル、チエニル、フリル、チアゾリル、チアジアゾリル、イソオキサゾリル、ピラゾリル及び2-オキソ-1,2-ジヒドロプリジニルが挙げられるが、これらに限らない。二環式ヘテロアリアル基の代表的な例としては、クロメニル、ベンゾチエニル、ベンゾジオキサソリル、ベンゾトリアゾリル、キノリニル、チエノピロリル、チエノチエニル、イミダゾチアゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾフラニル、インドリル、キノリニル、イミダゾプリジニル、ベンゾオキサジアゾリル及びベンゾピラゾリルが挙げられるが、これらに限らない。三環式ヘテロアリアル基の代表的な例としては、ジベンゾフラニル及びジベンゾチエニルが挙げられるが、これらに限らない。単環式ヘテロアリアル基、二環式ヘテロアリアル基及び三環式ヘテロアリアル基は、親分子部分に、その環内に含まれる任意の炭素原子または任意の窒素原子を介して連結されているとともに、非置換または置換であることができる。

10

20

#### 【0044】

「複素環」または「複素環式」という用語は、本明細書で使用する場合、単環式複素環、二環式複素環または三環式複素環を意味する。単環式複素環は、O、N及びSからなる群から独立して選択した少なくとも1つのヘテロ原子を含む3員環、4員環、5員環、6員環、7員環または8員環である。その3員環または4員環は、二重結合を含まないかまたは1個の二重結合を含み、O、N及びSからなる群から選択した1個のヘテロ原子を含む。その5員環は、二重結合を含まないかまたは1個の二重結合を含み、O、N及びSからなる群から選択した1個、2個または3個のヘテロ原子を含む。その6員環は、二重結合を含まないか、または1個もしくは2個の二重結合を含み、O、N及びSからなる群から選択した1個、2個または3個のヘテロ原子を含む。その7員環及び8員環は、二重結合を含まないか、または1個、2個もしくは3個の二重結合を含み、O、N及びSからなる群から選択した1個、2個または3個のヘテロ原子を含む。単環式複素環の代表的な例としては、アゼチジニル、アゼパニル、アジリジニル、ジアゼパニル、1,3-ジオキサニル、1,3-ジオキサソラニル、1,3-ジチオラニル、1,3-ジチアニル、1,3-ジメチルプリミジン-2,4(1H,3H)-ジオン、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリニル、イソチアゾリジニル、イソオキサゾリニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、オキサジアゾリニル、オキサジアゾリジニル、オキサゾリニル、オキサゾリジニル、オキセタニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピラニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、ピロリニル、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロプリジニル、テトラヒドロチエニル、チアジアゾリニル、チアジアゾリジニル、1,2-チアジナニル、1,3-チアジナニル、チアゾリニル、チアゾリジニル、チオモルホリニル、1,1-ジオキシドチオモルホリニル(チオモルホリンスルホン)、チオピラニル及びトリチアニルが挙げられるが、これらに限らない。その二環式複素環は、フェニル基に融合された単環式複素環、単環式シクロアルキルに融合された単環式複素環、単環式シクロアルケニルに融合された単環式複素環、単環式複素環に融合された単環式複素環、スピロ複素環基、あるいはその環の2つの非隣接原子が、1個、2個、3個もしくは4個の炭素原子のアルキレン架橋または2個、3個もしくは4個の炭素原子のアルケニレン架橋によって連結されている架橋単環式複素環系である。二環式複素環の代表的な例としては、ベンゾピラニル、ベンゾチオピラニル、クロマニル、2,3-ジヒドロベンゾフラニル、2,3-ジヒドロベンゾチエニル、2,3-ジヒドロイソキノリン、

30

40

50

2 - アザスピロ [ 3 . 3 ] ヘプタン - 2 - イル、アザビシクロ [ 2 . 2 . 1 ] ヘプチル ( 2 - アザビシクロ [ 2 . 2 . 1 ] ヘプト - 2 - イルを含む)、2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インドリル、イソインドリニル、オクタヒドロシクロペンタ [ c ] ピロリル、オクタヒドロピロロピリジニル及びテトラヒドロイソキノリニルが挙げられるが、これらに限らない。三環式複素環は、フェニル基に融合された二環式複素環、単環式シクロアルキルに融合された二環式複素環、単環式シクロアルケニルに融合された二環式複素環、単環式複素環に融合された二環式複素環、あるいは、その二環式環の2つの非隣接原子が、1個、2個、3個もしくは4個の炭素原子のアルキレン架橋、または2個、3個もしくは4個の炭素原子のアルケニレン架橋によって連結されている二環式複素環によって例示される。三環式複素環の例としては、オクタヒドロ - 2, 5 - エポキシペンタレン、ヘキサヒドロ - 2 H - 2, 5 - メタノシクロペンタ [ b ] フラン、ヘキサヒドロ - 1 H - 1, 4 - メタノシクロペンタ [ c ] フラン、アザ - アダマンタン ( 1 - アザトリシクロ [ 3 . 3 . 1 . 1<sup>3,7</sup> ] デカン ) 及びオキサ - アダマンタン ( 2 - オキサトリシクロ [ 3 . 3 . 1 . 1<sup>3,7</sup> ] デカン ) が挙げられるが、これらに限らない。単環式複素環、二環式複素環及び三環式複素環は、親分子部分に、その環内に含まれる任意の炭素原子または任意の窒素原子を介して連結され、非置換または置換であることができる。

10

## 【 0 0 4 5 】

「ヒドロキシル」という用語は、本明細書で使用する場合、-OH基を意味する。

## 【 0 0 4 6 】

場合によっては、ヒドロカルビル置換基 (例えば、アルキルまたはシクロアルキル) 内の炭素原子の数は、「C<sub>x</sub>-C<sub>y</sub>-」という接頭句によって示されており、そのxは、その置換基内の炭素原子の最小数、yは、最大数である。したがって、例えば、「C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-アルキル」とは、1~3個の炭素原子を含むアルキル置換基を指す。

20

## 【 0 0 4 7 】

「置換基」という用語は、アリール基、ヘテロアリール基、フェニル基またはピリジニル基上で、その基の任意の原子において「置換された」基を指す。いずれの原子も置換することができる。

## 【 0 0 4 8 】

「置換された」という用語は、水素置換基以外の1つ以上の基でさらに置換されてよい基を指す。置換基としては、ハロゲン、=O、=S、シアノ、ニトロ、フルオロアルキル、アルコキシフルオロアルキル、フルオロアルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヘテロアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、アリールアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルキレン、アリールオキシ、フェノキシ、ベンジルオキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アミノアルキル、アリールアミノ、スルホニルアミノ、スルフィニルアミノ、スルホニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、アミノスルホニル、スルフィニル、-COOH、ケトン、アミド、カルバメート及びアシルが挙げられるが、これらに限らない。

30

## 【 0 0 4 9 】

本明細書に記載の化合物では、基及びその置換基は、その原子及び置換基の許容される原子価に従って選択して、その選択及び置換により、例えば、転位、環化、脱離などによるような変換が自動的に行われず安定な化合物が得られるようにしてよい。

40

## 【 0 0 5 0 】

本明細書で使用する場合、「ハロゲン」または「ハロ」という用語は、フルオロラジカル、クロロラジカル、プロモラジカルまたはヨードラジカルを指す。

## 【 0 0 5 1 】

本明細書で使用する場合、「生物発光」または「発光」という用語は、酵素と、光を発生させる基質との反応により生成される光を指してよい。このような酵素 (生物発光酵素) の例としては、O p l o p h o r u s ルシフェラーゼ、例えば、O p l o p h o r u s

50

gracilirostris ルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、例えば、Photinus pyralis または Photuris pennsylvanica ルシフェラーゼ、コメツクムシルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、ウミホタルルシフェラーゼ、発光タンパク質エクオリン、発光タンパク質オベリンなどが挙げられる。

#### 【0052】

本明細書で使用する場合、「生理活性剤」という用語は、生体分子（タンパク質及び核酸など）と相互作用でき、その生体分子の生物学的活性を変化させる分子または分子の機能性成分を指してよい。例えば、その生体分子は、細胞におけるシグナル伝達、代謝及びその他の生物学的プロセスを調節する酵素、輸送体または受容体として機能してよい。生理活性剤は、そのような生体分子の活性を増強または阻害し得る。生理活性剤としては、例えば、疾患もしくは障害に対する医薬剤、酵素阻害剤、または細胞受容体の阻害剤を挙げてよい。好適な生理活性剤としては、ダサチニブのようなキナーゼ阻害剤を挙げてよい。生理活性剤としては、生体分子と相互作用するタンパク質及び表面も挙げてよい。例えば、生理活性剤としては、Halotag（登録商標）タンパク質のようなタンパク質を挙げてよい。

10

#### 【0053】

本明細書で使用する場合、「捕捉剤」という用語は、試料からタンパク質を捕捉できる作用剤を指す。例えば、捕捉剤は、試料中の対象となるタンパク質の官能基に結合できるか、またはその官能基と反応できる官能基を含むビーズまたは表面であってよい。例示的な捕捉剤としては、ストレプトアビジンビーズまたはストレプトアビジン被覆表面が挙げられる。

20

#### 【0054】

本明細書で使用する場合、「基質セレンテラジン」という用語は、ルシフェラーゼ（例えば海洋性ルシフェラーゼ）のような広範な生物発光タンパク質の作用を受けると発光する種類のレポーター分子を指す。基質セレンテラジンには、セレンテラジン、ならびにその類似体及び誘導体が含まれる。

#### 【0055】

「エネルギーアクセプター」または「アクセプター分子」という用語は、エネルギーの吸収（例えば共鳴エネルギー移動）に応じて、容易に検出可能なシグナルを生成する任意の小分子（例えば発色団）、巨大分子（例えば、自己蛍光タンパク質、フィコビリタンパク質、ナノ粒子、表面など）、または分子複合体を指す。特定の実施形態では、エネルギーアクセプターは、フルオロフォアまたはその他の検出可能な発色団である。好適なフルオロフォアとしては、キサンテン誘導体（例えば、フルオレセイン、ローダミン、オレゴングリーン、エオシン、テキサスレッドなど）、シアニン誘導体（例えば、シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、メロシアニンなど）、ナフタレン誘導体（例えば、ダンシル誘導体及びプロダン誘導体）、オキサジアゾール誘導体（例えば、ピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾール、ベンゾオキサジアゾールなど）、ピレン誘導体（例えば、カスケードブルー）、オキサジン誘導体（例えば、ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン170など）、アクリジン誘導体（例えば、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエローなど）、アリールメチン誘導体（例えば、オーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーンなど）、テトラピロール誘導体（例えば、ポルフィン、フタロシアニン、ビリルピンなど）、CF色素（Biotium）、BODIPY（Invitrogen）、ALEXA FLUOR（Invitrogen）、DYLIGHT FLUOR（Thermo Scientific, Pierce）、ATTO及びTRACY（Sigma Aldrich）、FluoProbes（Interchim）、DY及びMEGASTOKES（Dyomics）、SULFO CY色素（CYANDYE, LLC）、SETAU及びSQUARE色素（SETA BioMedicals）、QUASAR及びCAL FLUOR色素（Biosearch Technologies）、SURE LIGHT色素（APC、RPE、PerCP、フィコビリソーム）（Columbia

30

40

50

Biosciences)、APC、APCXL、RPE、BPE(Phyco-Biotech)、自己蛍光タンパク質(例えば、YFP、RFP、mCherry、mKate)、量子ドットナノクリスタルなどが挙げられるが、これらに限らない。いくつかの実施形態では、フルオロフォアは、ローダミン類似体(例えば、カルボキシローダミン類似体)である。特定の実施形態では、エネルギーアクセプターとしては、NCTのような小分子蛍光色素、クエンチャー、量子ドットのような蛍光粒子、発光金属錯体、及び他の任意の既知のエネルギーアクセプターが挙げられるが、これらに限らない。

#### 【0056】

「発光酵素」、「生物発光酵素」または「ルシフェラーゼ」という用語は、本明細書において同義的に使用する場合、生物発光で用いられる種類の酸化酵素であって、基質が与えられると光を生成及び放出させる酵素を指す。ルシフェラーゼは、ルシフェラーゼ基質を用いる天然のルシフェラーゼ、組み換えルシフェラーゼまたは変異ルシフェラーゼであってよい。ルシフェラーゼの基質は、ルシフェリン、ルシフェリン誘導体、ルシフェリン類似体、プレルシフェリン誘導体、プレルシフェリン類似体、セレンテラジン、セレンテラジン誘導体またはセレンテラジン類似体であり得る。発光酵素は、天然のものである場合には、当業者が生物から容易に採取し得る。発光酵素が、天然の発光酵素、または組み換え発光酵素もしくは変異発光酵素、例えば、天然の発光酵素のルシフェラーゼ-セレンテラジン反応またはルシフェラーゼ-ルシフェリン反応における活性を保持する発光酵素である場合には、その発光酵素をコードする核酸を発現するようにトランスフォーメーションした細菌、酵母、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などの培養液から容易に得ることができる。さらに、その組み換え発光酵素または変異発光酵素は、そのルシフェラーゼをコードする核酸を用いて、*in vitro*の無細胞系から得ることができる。好適な発光酵素としては、Oplophoroideaのような生物発光性の十脚目動物から得られるルシフェラーゼ(例えばOplophorus由来のルシフェラーゼ)、甲虫ルシフェラーゼ(例えば、Photinus pyralis、Photuris pennsylvanicaなど)、刺胞動物のような海洋生物(例えばウミシイタケルシフェラーゼ)、十脚目のAristeidae科、Solenoceridae科、Luciferidae科、Sergestidae科、Pasipheidae科及びThalassocarididae科、カイアシルシフェラーゼ(Gaussia princepsルシフェラーゼのようなGaussialルシフェラーゼ、Metridia longaルシフェラーゼ及びMetridia pacificarlシフェラーゼのようなMetridialルシフェラーゼ、Vargula hilgendorfiilシフェラーゼのようなVargulalルシフェラーゼ、Pleuromamma xiphiasルシフェラーゼなど)、ならびにエクオリンのような発光タンパク質、そしてそれらのバリエーション、組み換え体及び変異体が挙げられる。

#### 【0057】

「発光反応混合物」は、発光酵素に光シグナルを生成させる、すなわち発光させる物質を含む。その混合物は、酵素、例えば、ルシフェラーゼ酵素またはルシフェラーゼも含んでよい。発光シグナルを生成するのに必要な物質、ならびに特定の濃度及び/または量は、使用する発光酵素、及び実施するアッセイの種類に応じて変動することになる。多くの場合、その溶液には、適正なpHでの反応を維持するための緩衝剤、酵素活性を保持するのを助けるPRIONEXまたはウシ血清アルブミン(BSA)のような添加剤、還元剤、洗浄剤などを含む他の物質を加えることになる。

#### 【0058】

本明細書で使用する場合、「Oplophorusルシフェラーゼ」及び「Oplophorus由来のルシフェラーゼ」という用語は、同義的に用いられており、その野生型、バリエーション及び変異体を含め、深海エビOplophorus gracilirostrisから分泌されるルシフェラーゼ(例えば配列番号1)を指す。例えば、好適なOplophorusルシフェラーゼバリエーションは、米国特許第8,557,970号及び同第8,669,103号に記載されており、これらはそれぞれ、参照により、その全体

10

20

30

40

50

が本明細書に援用される。例示的な *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼとしては、例えば、配列番号 2 のルシフェラーゼ（本明細書では同義的に「NanoLuc」、「NLuc」、「NLucルシフェラーゼ」及び「NLuc酵素」ともいう）が挙げられる。  
【0059】

本明細書で使用する場合、「レポーター部分」という用語は、適切な条件下で、検出可能なシグナルを直接または間接的に生成する部分を指してよい。例示的なレポーター部分としては、フルオロフォア、発光分子、色素、放射性標識、及びルシフェラーゼのような酵素に対する基質が挙げられるが、これらに限らない。いくつかの実施形態では、例えば、レポーター部分が、酵素に対する基質であるときには、そのレポーター部分は、検出可能なシグナルを間接的に生成し得る。そして、酵素と基質の反応により、蛍光または発光のような検出可能なシグナルが生成される。本明細書で使用する場合、「生物発光レポーター部分」という用語は、ルシフェラーゼの基質である部分を指してよい。例えば、その生物発光レポーター部分は、ルシフェリン、ルシフェリン誘導体、例えば、プレルシフェリン、アミノルシフェリン、キノリル-ルシフェリン、ナフチルルシフェリン、フルオロルシフェリン、クロロルシフェリン、ルシフェリン誘導体の前駆体、セレンテラジン、セレンテラジン誘導体またはセレンテラジン類似体、例えばフリマジンであることができる。生成された発光シグナルは、発光測定装置を用いて検出してよい。本明細書で使用する場合、「蛍光レポーター部分」という用語は、蛍光を発する部分を指してよい。例えば、蛍光レポーター部分は、クマリン、R110、フルオレセイン、DDAO、レゾルフィン、クレシルバイオレット、シリルキサンテンまたはカルボピロニンのようなフルオロフォアであってよい。蛍光は、蛍光光度計を用いて検出してよい。

10

20

【0060】

本明細書で使用する場合、「自殺基質」または「標識試薬」とは、*Oplophorus* ルシフェラーゼに結合し、触媒作用を受けて、光を放出し、その結果、その *Oplophorus* ルシフェラーゼを阻害する化合物を指す。その自殺基質は、*Oplophorus* ルシフェラーゼと共有結合付加体を形成することによって、その *Oplophorus* ルシフェラーゼを阻害し得る。

【0061】

特定の方法の工程（例えば、(a)、(b)、(c)など）を説明することによって、方法が説明されているときには、その方法の工程は、列挙されている順序で実施するものと理解する。例えば、方法において、工程(a)、(b)及び(c)が、その順序で列挙されている場合には、工程(a)、(b)及び(c)は、列挙されている順序で逐次実施するものと理解する。

30

【0062】

## 2. 化合物

本発明で提供するのは、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼ及び/または *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼの活性を標識/検出し得る化合物である。本発明で提供するのは、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼ及び/または *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼの活性を阻害し得る化合物である。開示されている化合物は、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼの阻害剤であり得る。開示されている化合物は、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性を不可逆的に阻害する自殺阻害剤であり得る。開示されている化合物は、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性を部分的に低減する部分的阻害剤であり得る。開示されている化合物は、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼの基質であり得る。開示されている化合物は、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼの基質であって、初めに、そのルシフェラーゼと反応して生物発光シグナルを生成し、続いて、その *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを阻害する基質であり得る。例えば、開示されている化合物は、初めに、そのルシフェラーゼと反応して生物発光シグナルを生成し、続いて、その *Oplophorus* 由来のルシフェラーゼに基質セレンテラジンを加えると生成される生物発光シグナルを阻害し得る。開示されている化合物は、*Oplophorus* 由

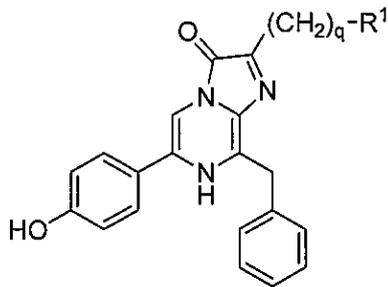
40

50

来のルシフェラーゼの自殺基質であって、初めに、そのルシフェラーゼと反応して生物発光シグナルを生成し、続いて、そのOp1ophorus由来のルシフェラーゼを不可逆的に阻害する自殺基質であり得る。開示されている化合物は、Op1ophorus由来のルシフェラーゼの基質であって、初めに、そのルシフェラーゼと反応して生物発光シグナルを生成し、続いて、そのOp1ophorus由来のルシフェラーゼを部分的に阻害する基質であり得る。開示されている化合物は、そのOp1ophorus由来のルシフェラーゼと共有結合付加体を形成することによって、そのOp1ophorus由来のルシフェラーゼを阻害し得る。開示されている化合物は、NanoLuc、及び相補的な酵素系NanoBiTを阻害し得る。

【0063】

本発明の化合物には、下記の式(I)の化合物、



(I)

またはその互変異性体もしくは塩が含まれ、式中、

R<sup>1</sup>は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環または任意に置換されたシクロアルキルであり、R<sup>1</sup>は、-Q-L-Zである少なくとも1つの基で置換されており、

Qは、-O-、-NR<sup>Q</sup>-、-NR<sup>Q</sup>-CO-、-CO-NR<sup>Q</sup>-、-O-CO-NR<sup>Q</sup>-または-NR<sup>Q</sup>-CO-O-であり、

Lは、-(CR<sup>1a</sup>R<sup>1b</sup>)<sub>m</sub>-、-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>-CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>-O)<sub>t1</sub>-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>)<sub>t2</sub>-Q<sup>1</sup>-、-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>)<sub>t2</sub>-A-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>-CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>-O)<sub>t1</sub>-Q<sup>1</sup>-、-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>)<sub>t3</sub>-A-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>-CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>-O)<sub>t1</sub>-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>)<sub>t2</sub>-または-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>)<sub>t3</sub>-A-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>)<sub>t4</sub>-であり、各Q<sup>1</sup>は独立して、結合手、-O-または-NR<sup>Q1</sup>-であり、各Aは独立して、結合手、-O-、-NR<sup>Q</sup>-、-NR<sup>Q</sup>-CO-、-CO-NR<sup>Q</sup>-、-O-CO-NR<sup>Q</sup>-または-NR<sup>Q</sup>-CO-O-であり、

Zは、-COOR<sup>2</sup>、-SO<sub>2</sub>-OR<sup>3</sup>、-PO(OR<sup>4</sup>)(OR<sup>5</sup>)、ハロ、アジド、-NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>、-NR<sup>8</sup>-CO-R<sup>9</sup>、-CO-R<sup>10</sup>または-NR<sup>11</sup>-CO-O-R<sup>12</sup>であり、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup>及びR<sup>12</sup>は各出現ごとに独立して、水素、任意に置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたヘテロアルキルまたはエネルギーアクセプターであり、

R<sup>6</sup>及びR<sup>7</sup>は各出現ごとに独立して、水素、任意に置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたヘテロアルキルもしくはエネルギーアクセプターであるか、またはR<sup>6</sup>及びR<sup>7</sup>は、それらと結合している窒素原子と一体となって、任意に置換された環を形成し、

R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>Q</sup>、R<sup>Q1</sup>、R<sup>1x</sup>及びR<sup>1y</sup>は各出現ごとに独立して、水素、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルまたはC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ハロアルキルであり、

qは、0、1または2であり、

mは各出現ごとに独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または

10

20

30

40

50

12であり、

t1は各出現ごとに独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10であり、

t2は、0～5の整数であり、

t3は各出現ごとに、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10であり、

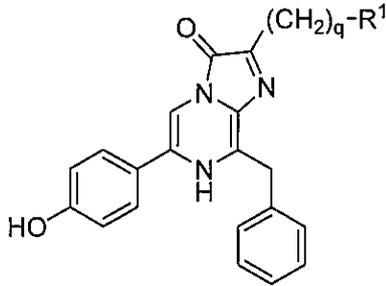
t4は、0～5の整数であり、

その化合物は、4-[4-[ [8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-3-オキソ-7H-イミダゾ[1,2-a]ピラジン-2-イル]メチル]フェノキシ]ブタン酸ではない。

【0064】

いくつかの実施形態では、その化合物は、下記の式(I')の化合物、

10



20

(I')

またはその互変異性体もしくは塩であり、式中、

R<sup>1</sup>は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環または任意に置換されたシクロアルキルであり、R<sup>1</sup>は、-Q-L-Zである少なくとも1つの基で置換されており、

Qは、-O-、-NR<sup>Q</sup>-、-NR<sup>Q</sup>-CO-、-CO-NR<sup>Q</sup>-、-O-CO-NR<sup>Q</sup>-または-NR<sup>Q</sup>-CO-O-であり、

Lは、-(CR<sup>1a</sup>R<sup>1b</sup>)<sub>m</sub>-、-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>-CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>-O)<sub>t1</sub>-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>)<sub>t2</sub>-Q<sup>1</sup>-または-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>)<sub>t2</sub>-A-(CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>-CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup>-O)<sub>t1</sub>-Q<sup>1</sup>-であり、各Q<sup>1</sup>は独立して、結合手、-O-または-NR<sup>Q1</sup>-であり、Aは、結合手、-O-、-NR<sup>Q</sup>-、-NR<sup>Q</sup>-CO-、-CO-NR<sup>Q</sup>-、-O-CO-NR<sup>Q</sup>-または-NR<sup>Q</sup>-CO-O-であり、

30

Zは、-COOR<sup>2</sup>、-SO<sub>2</sub>-OR<sup>3</sup>、-PO(OR<sup>4</sup>)(OR<sup>5</sup>)、ハロ、アジド、-NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>または-NR<sup>8</sup>-CO-R<sup>9</sup>であり、

R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>は各出現ごとに独立して、水素、任意に置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたヘテロアルキルまたはエネルギーアクセプターであり、

R<sup>6</sup>及びR<sup>7</sup>は各出現ごとに独立して、水素、任意に置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたヘテロアルキルもしくはエネルギーアクセプターであるか、またはR<sup>6</sup>及びR<sup>7</sup>は、それらと結合している窒素原子と一体となって、任意に置換された環を形成し、

40

R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>Q</sup>、R<sup>Q1</sup>、R<sup>1x</sup>及びR<sup>1y</sup>は各出現ごとに独立して、水素、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルまたはC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ハロアルキルであり、

qは、0、1または2であり、

mは各出現ごとに独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12であり、

t1は各出現ごとに独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10であり、

t2は、0～5の整数であり、

50

その化合物は、4 - [ 4 - [ [ 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 7H - イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ] メチル ] フェノキシ ] ブタン酸ではない。

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、q は、1 である。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、- Q - L - Z という 1 つの置換基で置換されたフェニルであり、任意に、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アシルアミノ、アミノアルキル、スルホニルアミノ、スルフィニルアミノ、スルホニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、アミノスルホニル、スルフィニル、- COOH、ケトン、アミド、カルバメート、シリル、置換シリル、t - ブチルジメチルシリル、アルキルスルファニル、スルファニル及びアシルから独立して選択した 1 個または 2 個の置換基でさらに置換されており、

Q は、- O -、- NR<sup>Q</sup> -、- NR<sup>Q</sup> - CO -、- CO - NR<sup>Q</sup> -、- O - CO - NR<sup>Q</sup> - または - NR<sup>Q</sup> - CO - O - であり、

L は、- ( CR<sup>1a</sup>R<sup>1b</sup> )<sub>m</sub> -、- ( CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup> )<sub>t3</sub> - A - ( CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup> - CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup> - O )<sub>t1</sub> - ( CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup> )<sub>t2</sub> - または - ( CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup> )<sub>t3</sub> - A - ( CR<sup>1x</sup>R<sup>1y</sup> )<sub>t4</sub> - であり、

各 A は独立して、- NR<sup>Q</sup> - CO - であり、

R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>Q</sup>、R<sup>1x</sup>及びR<sup>1y</sup>は各出現ごとに、水素であり、

m は、6、7 または 8 であり、

t<sub>1</sub> は、6、7 または 8 であり、

t<sub>2</sub> は、1、2 または 3 であり、

t<sub>3</sub> は、6、7 または 8 であり、

t<sub>4</sub> は、1、2 または 3 であり、

Z は、- SO<sub>2</sub> - OR<sup>3</sup>、アジド、- NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>、- NR<sup>8</sup> - CO - R<sup>9</sup>、- CO - R<sup>10</sup>、または - NR<sup>11</sup> - CO - OR<sup>12</sup> であり、

R<sup>3</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup> 及び R<sup>12</sup> は独立して、水素、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたヘテロアリールまたは任意に置換された複素環である。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、- Q - L - Z という 1 つの置換基で置換されたフェニルであり、任意に、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アシルアミノ、アミノアルキル、スルホニルアミノ、スルフィニルアミノ、スルホニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、アミノスルホニル、スルフィニル、- COOH、ケトン、アミド、カルバメート、シリル、置換シリル、t - ブチルジメチルシリル、アルキルスルファニル、スルファニル及びアシルから独立して選択した 1 つまたは 2 つの置換基でさらに置換されており、

Q は、- O -、- NR<sup>Q</sup> -、- NR<sup>Q</sup> - CO -、- CO - NR<sup>Q</sup> -、- O - CO - NR<sup>Q</sup> - または - NR<sup>Q</sup> - CO - O - であり、

L は、- ( CR<sup>1a</sup>R<sup>1b</sup> )<sub>m</sub> - であり、

Z は、- SO<sub>2</sub> - OR<sup>3</sup>、アジド、- NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup> または - NR<sup>8</sup> - CO - R<sup>9</sup> であり、

R<sup>3</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup> 及び R<sup>8</sup> は独立して、水素、任意に置換された C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロアリールまたは任意に置換された複素環であり、

R<sup>9</sup> は、任意に置換されたヘテロアルキルまたはエネルギーアクセプターである。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態では、 $R^1$  は、- Q - L - Z という 1 つの置換基で置換されたフェニル

ルであり、任意に、1つのハロゲンでさらに置換されている。

【0069】

いくつかの実施形態では、Qは、Oである。

【0070】

いくつかの実施形態では、Lは、 $-(CR^{1a}R^{1b})_m-$ である。いくつかの実施形態では、各出現ごとに、 $R^{1a}$ 及び $R^{1b}$ は、水素である。いくつかの実施形態では、mは、6である。いくつかの実施形態では、mは、8である。

【0071】

いくつかの実施形態では、Lは、 $-(CR^{1x}R^{1y})_{t3}-A-(CR^{1x}R^{1y}-CR^{1x}R^{1y}-O)_{t1}-(CR^{1x}R^{1y})_{t2}-$ である。いくつかの実施形態では、各出現ごとに、 $R^{1x}$ 及び $R^{1y}$ は、水素である。いくつかの実施形態では、Aは、 $-NR^Q-CO-$ であり、 $R^Q$ は、Hである。いくつかの実施形態では、 $t1$ は2であり、 $t2$ は2であり、 $t3$ は8である。

10

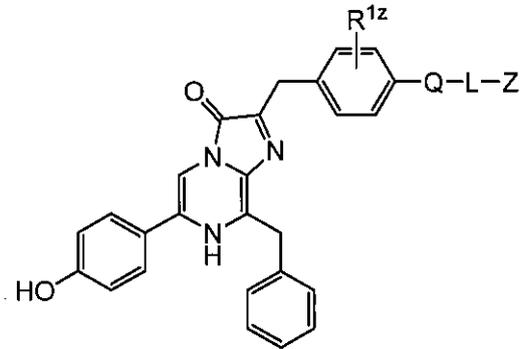
【0072】

いくつかの実施形態では、Lは、 $-(CR^{1x}R^{1y})_{t3}-A-(CR^{1x}R^{1y})_{t4}-$ である。いくつかの実施形態では、各出現ごとに、 $R^{1x}$ 及び $R^{1y}$ は、水素である。いくつかの実施形態では、Aは、 $-NR^Q-CO-$ であり、 $R^Q$ は、Hである。いくつかの実施形態では、 $t3$ は8であり、 $t4$ は2である。

【0073】

いくつかの実施形態では、その化合物は、下記の式(Ia)の化合物であり、

20



30

(Ia)

式中、 $R^{1z}$ は、ハロゲンである。

【0074】

いくつかの実施形態では、Qは、Oであり、Lは、 $-(CR^{1a}R^{1b})_m-$ であり、 $R^{1a}$ 及び $R^{1b}$ は、水素であり、mは、5、6、7、8、9または10であり、Zは、 $-NR^8-CO-R^9$ であり、 $R^8$ は、水素であり、 $R^9$ は、エネルギーアクセプターである。

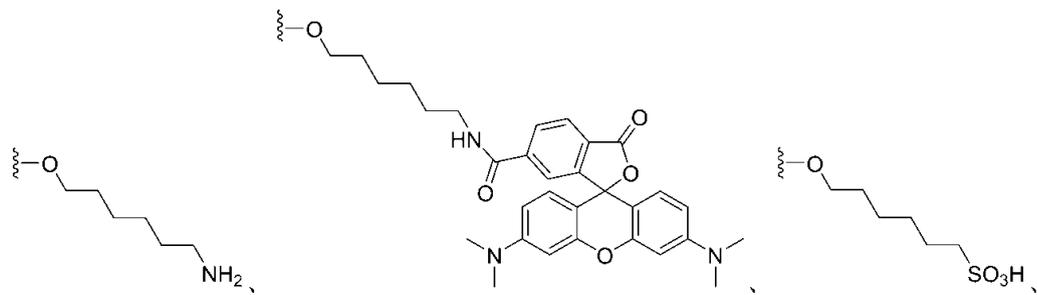
【0075】

いくつかの実施形態では、そのエネルギーアクセプターは、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、ピレン、シアニン、スクアライン及びホウ素-ジピロメテンから選択した蛍光色素である。

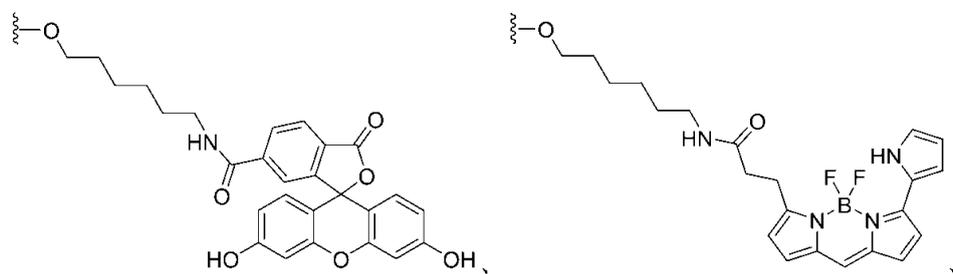
40

【0076】

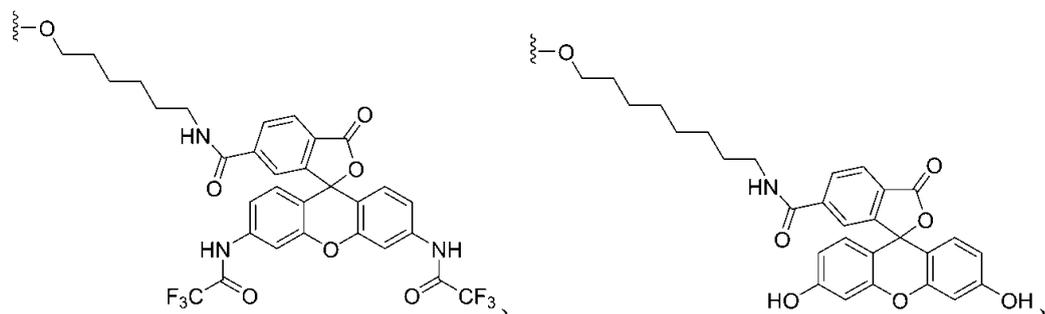
いくつかの実施形態では、 $-Q-L-Z$ という基は、



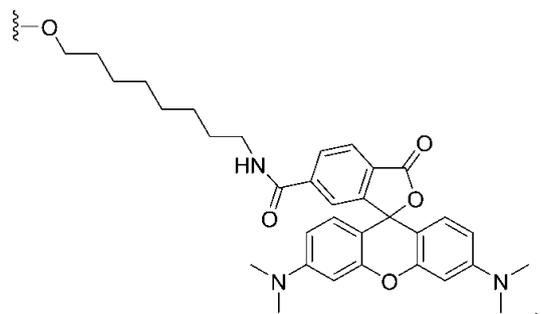
10



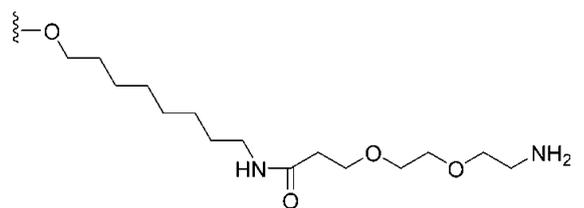
20



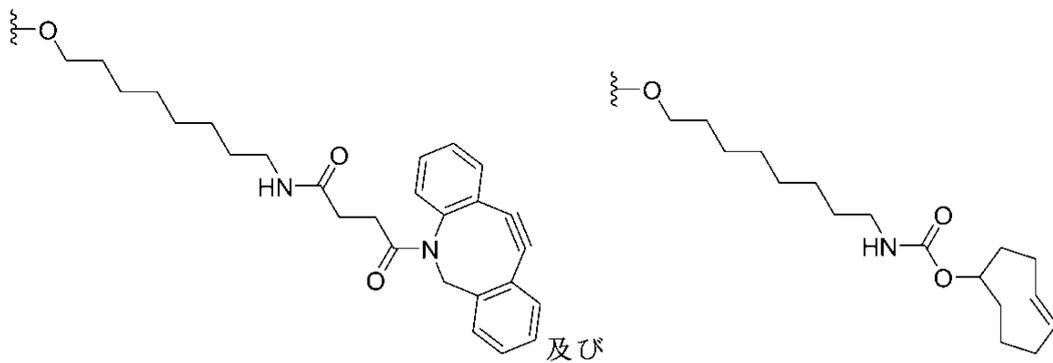
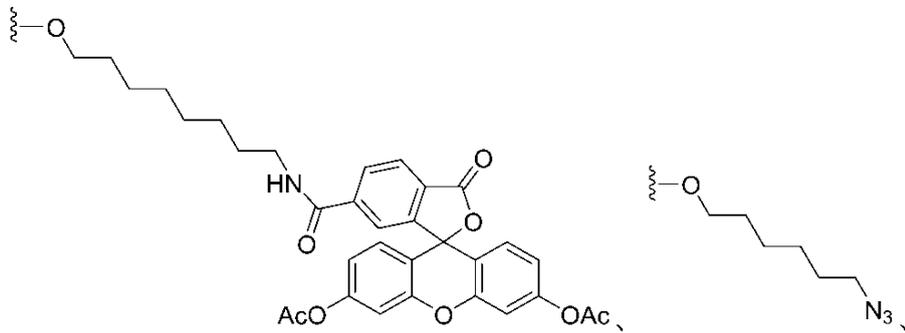
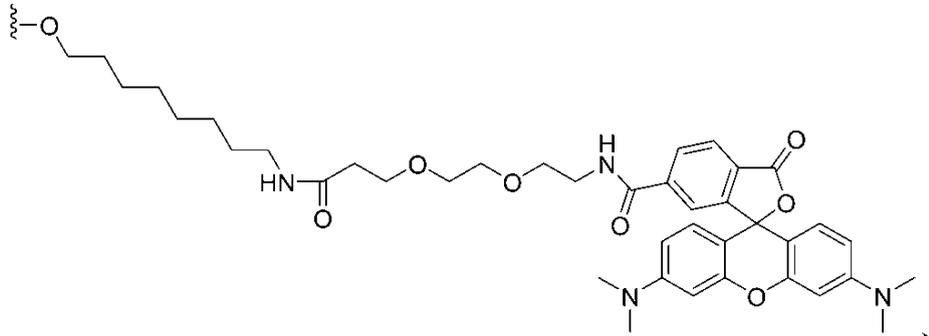
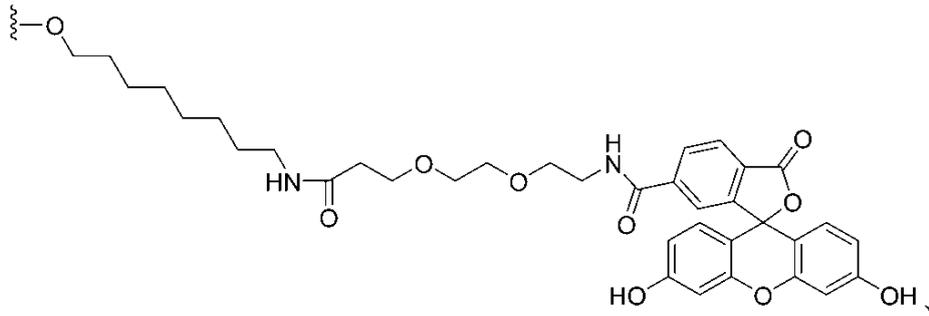
30



40



50



から選択した構造を有する。

【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態では、その化合物は、

2 - ( 4 - ( ( 6 - アミノヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジ  
ル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オ  
ン、

N - ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ -  
3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロ  
フェノキシ ) ヘキシル ) - 3 ' , 6 ' - ビス ( ジメチルアミノ ) - 3 - オキソ - 3 H - スピ  
ロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキサン - 1 - スルホン酸、

N - ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) - 3 ' , 6 ' - ジヒドロキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

N - ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) - 3 - ( 5 , 5 - ジフルオロ - 7 - ( 1 H - ピロール - 2 - イル ) - 5 H - 5 l 4 , 6 l 4 - ジピロロ [ 1 , 2 - c : 2 ' , 1 ' - f ] [ 1 , 3 , 2 ] ジアザボリニン - 3 - イル ) プロパンアミド、

10

N , N ' - ( 6 - ( ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) カルバモイル ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 3 ' , 6 ' - ジイル ) ビス ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド ) 、

N - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) - 3 ' , 6 ' - ジヒドロキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

20

N - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) - 3 ' , 6 ' - ビス ( ジメチルアミノ ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

3 - ( 2 - ( 2 - アミノエトキシ ) エトキシ ) - N - ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) プロパンアミド、

N - ( 2 - ( 2 - ( 3 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) アミノ ) - 3 - オキソプロポキシ ) エトキシ ) エチル ) - 3 ' , 6 ' - ジヒドロキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

30

N - ( 2 - ( 2 - ( 3 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) アミノ ) - 3 - オキソプロポキシ ) エトキシ ) エチル ) - 3 ' , 6 ' - ビス ( ジメチルアミノ ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

6 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバモイル ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 3 ' , 6 ' - ジイルジアセテート、

40

2 - ( 4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン、

5 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバモイル ) - 2 - ( 2 , 7 - ジフルオロ - 3 , 6 - ジヒドロキシキサンチリウム - 9 - イル ) ベンゾエート、

5 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ

50

- 3, 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 2 - イル) メチル) - 2 - フルオロフェノキシ) オクチル) カルバモイル) - 2 - ( 3, 11 - ジヒドロキシジベンゾ [ c, h ] キサンテン - 14 - イウム - 7 - イル) ベンゾエート、

N<sup>1</sup> - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - オキソ - 3, 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 2 - イル) メチル) - 2 - フルオロフェノキシ) オクチル) - N<sup>4</sup> - ( 2 - ( 5, 5 - ジフルオロ - 1, 3 - ジメチル - 5 H - 5<sup>4</sup>, 6<sup>4</sup> - ジピロロ [ 1, 2 - c : 2', 1' - f ] [ 1, 3, 2 ] ジアザポリリン - 10 - イル) エチル) コハク酸アミド、

N<sup>1</sup> - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - オキソ - 3, 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 2 - イル) メチル) - 2 - フルオロフェノキシ) オクチル) - N<sup>4</sup> - ( ジベンジルシクロオクテニル) - コハク酸アミド及び ( E ) - シクロオクト - 4 - エン - 1 - イル ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - オキソ - 3, 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 2 - イル) メチル) - 2 - フルオロフェノキシ) オクチル) カルバメート

からなる群から選択されている。

#### 【 0078 】

これらの化合物の構造は、実施例に示されている。化合物の名称は、CHEMDRAW (登録商標) ULTRA v. 12.0の一部としてのStruct = Nameという命名アルゴリズムを用いることによって割り当てることができる。

#### 【 0079 】

本発明の化合物は、不斉中心またはキラル中心が存在する立体異性体として存在し得る。立体異性体は、キラル炭素原子の周囲の置換基の配置に応じて、「R体」または「S体」となる。本明細書で使用する「R体」及び「S体」という用語は、IUPAC 1974 Recommendations for Section E, Fundamental Stereochemistry, in Pure Appl. Chem., 1976, 45: 13-30で定義されているような配置である。本開示では、様々な立体異性体及びその混合物が企図されており、これらは、本発明の範囲内に具体的に含まれる。立体異性体には、エナンチオマー及びジアステレオマー、ならびにエナンチオマーまたはジアステレオマーの混合物が含まれる。本発明の化合物の個々の立体異性体は、不斉中心もしくはキラル中心を含む市販の出発物質から合成によって、または、ラセミ混合物を調製してから、当業者に周知の分割方法によって調製してよい。これらの分割方法は、(1) Furniss, Hannaford, Smith, and Tatchell, "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry", 5<sup>th</sup> edition (1989), Longman Scientific & Technical, Essex CM20 2JE, Englandに記載されているように、エナンチオマー混合物をキラル補助剤に結合させ、得られたジアステレオマー混合物を再結晶またはクロマトグラフィーによって分離し、任意に、その光学的に純粋な生成物を補助剤から遊離させる方法か、(2) キラルクロマトグラフィーカラムで、光学エナンチオマー混合物を直接分離する方法か、または(3) 分別再結晶法によって例示される。

#### 【 0080 】

当然のことながら、本発明の化合物は、互変異性体及び幾何異性体を有することがあり、これらの異性体も、本発明の態様を構成する。

#### 【 0081 】

R<sup>9</sup>が、フルオレセインのような蛍光色素であるエネルギーアクセプターである化合物では、その蛍光色素を導入するための試薬は、異性体混合物として市販されていることがあるのは当業者には明らかであろう。例えば、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステルは、5 - 異性体、6 - 異性体及び異性体混合物として市販されている。本発明におけるいくつかの実施形態では、化合物は、それぞれ5 - 異性体または6 - 異性体として示されている。しかしながら、本開示は、使用する特定の出発物質に応じて、追加の異性体及びその混合物を網羅するように意図されている。

10

20

30

40

50

## 【0082】

本開示には、1つ以上の原子が、天然において通常見られる原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数である原子によって置き換えられている点を除き、式(I)で示されている化合物と同一である同位体標識化合物も含まれる。本発明の化合物に含めるのに適する同位体の例は、水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄、フッ素及び塩素であり、それぞれ、 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 及び $^{36}\text{Cl}$ などであるが、これらに限らない。重水素、すなわち $^2\text{H}$ のように、より重い同位体で置換すると、代謝安定性の上昇に起因する特定の治療上の利点(例えば、*in vivo*半減期の延長または必要用量の減少)を得ることができるので、このような置換は、状況によっては好ましいことがある。本発明の化合物には、医療用の撮像、及び受容体の分布を求めるための陽電子断層撮影(PET)試験のために、陽電子放出同位体を組み込んでよい。式(I)の化合物に組み込むことができる好適な陽電子放出同位体は、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 及び $^{18}\text{F}$ である。同位体標識した式(I)の化合物は概して、当業者に知られている従来の技法、または添付の実施例に記載されているプロセスと類似のプロセスであって、非同位体標識試薬の代わりに、適切な同位体標識試薬を用いるプロセスによって調製できる。

10

## 【0083】

## A. 式(I)の化合物の特性

式(I)の化合物は、発光を発生させるルシフェラーゼの基質であり得る。「発光」とは、適切な条件下、例えば、セレンテラジン類似体のような好適な基質の存在下におけるルシフェラーゼの光出力を指す。その光出力は、発光反応(基質セレンテラジンを加えると開始し得る)の開始時における瞬時またはほぼ瞬時の光出力測定値(「 $T=0$ 」の発光または「閃光」と称する場合もある)として測定し得る。様々な実施形態における発光反応は、溶液で行う。別の実施形態では、その発光反応は、固体支持体上で行う。その溶液は、例えば、細胞から得られた溶解液を原核生物または真核生物の発現系に含み得る。別の実施形態では、無細胞系で発現を行うか、またはルシフェラーゼタンパク質を細胞外の培地に分泌させ、後者の場合には、溶解液を作製する必要がなくなる。いくつかの実施形態では、その反応は、適切な材料、例えば、セレンテラジン類似体、緩衝剤などを、発光タンパク質の入った反応容器(例えば、96ウェルプレートのようなマルチウェルプレートのウェル)に注入することによって開始させる。さらに別の実施形態では、本発明の化合物(例えば、式(I)の化合物)を宿主に導入し、その宿主またはその一部(生物全体、またはその細胞、組織、外植片もしくは摘出物を挙げる)において、発光の測定を行う。特定の実施形態では、発光の測定は、細胞表面のような、宿主の表面で行う。さらに別の実施形態では、本発明の化合物(例えば、式(I)の化合物)を宿主に導入し、発光の測定を細胞外の空間で行う。例えば発光測定装置または光電子増倍管を用いて、光出力を測定できる読み取り装置に、反応容器を配置してよい。光出力または発光は、例えば、同じ反応容器で、数秒、数分、数時間などの期間にわたって経時的に測定してもよい。光出力または発光は、時間平均値、シグナル減衰半減期、ある期間にわたるシグナルの合計またはピーク出力として記録してもよい。発光は、相対発光値(RLU)で測定してもよい。

20

30

40

## 【0084】

式(I)の化合物は、セレンテラジンまたはフリマジンのような既知のセレンテラジン類似体に対して、RLUが1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上または100以上であることができる。

## 【0085】

「細胞透過性」、「細胞膜透過性」または「膜透過性」は、本明細書で同義的に使用する場合、化合物が細胞膜を透過できることを指す。この用語は、化合物が細胞膜内に部分的に埋め込まれることができることを指すこともある。この用語は、化合物が細胞膜を完全に通過して、細胞内空間に到達できることを指すこともある。本発明で開示するセレンテラジン類似体は、細胞透過性が低下していてもよい。

50

## 【0086】

「生体適合性」とは、細胞（例えば、原核細胞または真核細胞）のセレンテラジン類似体（例えば、式（I）の化合物）に対する耐性を指す。セレンテラジン類似体の生体適合性は、宿主細胞に対してそのセレンテラジン類似体が増えるストレスに関するものである。

## 【0087】

本発明のセレンテラジン類似体（例えば、式（I）の化合物）の生体適合性の向上は、細胞生存能及び/または細胞の増殖速度を測定することによって求め得る。例えば、本発明のセレンテラジン類似体の生体適合性の向上は、そのセレンテラジン類似体に暴露した細胞のルシフェラーゼ発現の非存在下における細胞生存能を、天然型のセレンテラジンまたは既知のセレンテラジンの場合と比較して測定し、そのセレンテラジン類似体のその細胞に対する適合性及び/または毒性の程度を求めることによって求め得る。

10

## 【0088】

特に、生体適合性の向上は、細胞生存能解析（例えば、CELLTITER-GLO（登録商標）Luminescent Cell Viabilityアッセイを用いるもの）、アポトーシスアッセイ（例えば、CASPASE-GLO（登録商標）アッセイ技術を用いるもの）、または当該技術分野において知られている別の方法を用いて求め得る。式（I）の化合物が細胞生存能またはアポトーシスに及ぼす作用と、天然型のセレンテラジン類似体または既知のセレンテラジン類似体が増殖またはアポトーシスに及ぼす作用を比較し得る。

## 【0089】

生体適合性の向上は、本発明のセレンテラジン類似体（例えば、式（I）の化合物）が細胞増殖または遺伝子発現に及ぼす作用を測定することによっても求め得る。例えば、式（I）の化合物の生体適合性の向上は、式（I）の化合物に暴露した細胞の試料において、天然型のセレンテラジンもしくは既知のセレンテラジンに暴露したか、またはセレンテラジンに暴露しなかった細胞と比較して、ある期間経過した後の細胞数を測定するか、またはストレス応答遺伝子の発現を求めることによって求め得る。式（I）の化合物が細胞増殖または遺伝子発現に及ぼす作用を、天然型のセレンテラジンまたは既知のセレンテラジンと比較してもよい。

20

## 【0090】

B. 式（I）の化合物の合成

式（I）の化合物は、合成プロセスまたは代謝プロセスによって調製し得る。その化合物の代謝プロセスによる調製には、ヒトもしくは動物の体内（*in vivo*）で行うプロセス、または*in vitro*で行うプロセスが含まれる。

30

## 【0091】

式（I）の化合物は、別段に述べられていない限り、R<sup>1</sup>基及びqが、本発明の概要の節に示されているような意味を有する場合、スキーム1～3及び一般的手順A～Gに示されているようにして合成できる。好適な合成方法としては、例えば、2017年2月14日に出願されたShakhminらの「COELENTERAZINE ANALOGUES」という標題の米国特許出願第15/431,961号（代理人整理番号016026-9574-US01）に開示されている方法も挙げることができ、この特許出願は、参照により、その全体が本明細書に援用される。

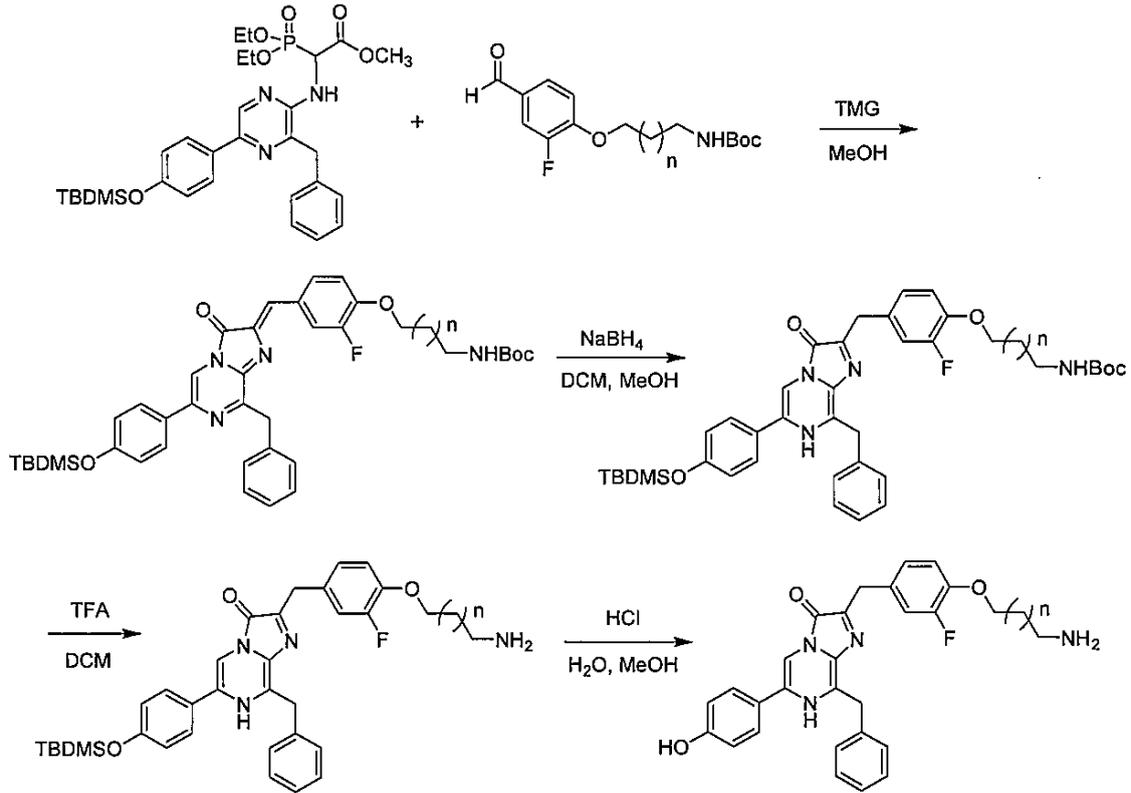
40

## 【0092】

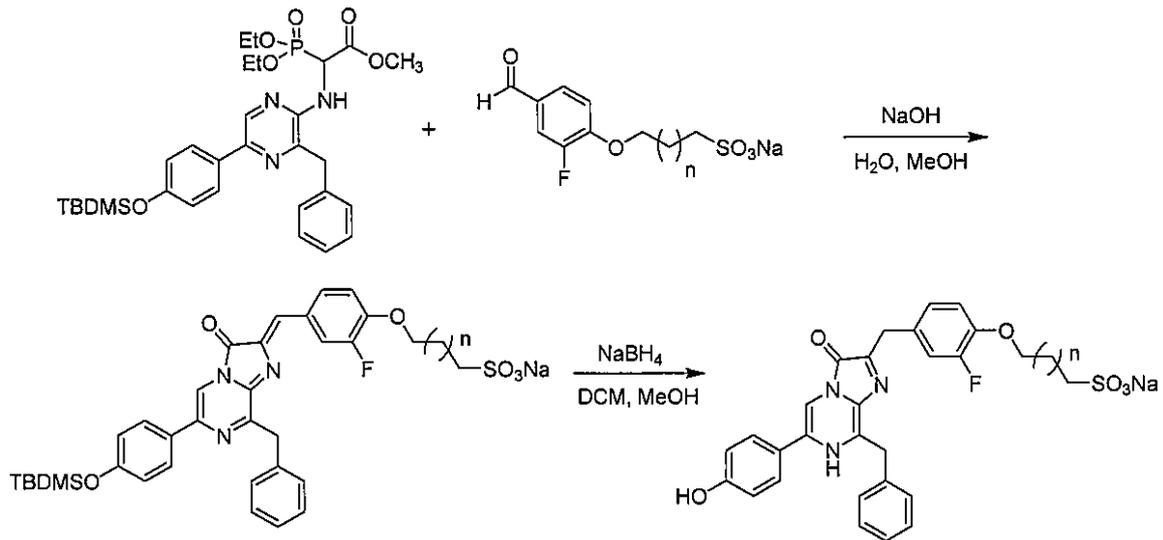
下記のスキームの説明で用いられている略称は、TBDMsがtert-ブチルジメチルシリルであり、TMGがテトラメチルグアニジンであり、MeOHがメタノールであり、DCMがジクロロメタンであり、TFAがトリフルオロ酢酸である。

スキーム1. パラ-ヒドロキシ6位フェニル基を有する化合物の合成

50



スキーム 2 . スルホネート含有化合物の合成



【 0 0 9 3 】

一般的手順 A (HWE 反応) : メタノール中のアルデヒド (1 eq) 及びメチル 2 - ( ( 3 - ベンジル - 5 - フェニルピラジン - 2 - イル ) アミノ ) - 2 - ( ジエトキシホスリル ) アセテート (1 eq) の溶液に、1, 1, 3, 3 - テトラメチルグアニジン (3 eq) を加えた。その溶液を室温で 0.5 ~ 2 時間撹拌した。その混合物をジクロロメタン及び約 0.1 M の HCl で希釈し、水層をジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製した。

【 0 0 9 4 】

一般的手順 B (還元) : ジクロロメタン及びメタノール (1 : 1) 中のデヒドロ - セレンテラジン (1 eq) の懸濁液を氷浴で冷やした。水素化ホウ素ナトリウム (5 eq) を加え、その混合物を 0.5 ~ 2 時間撹拌した。その混合物をジクロロメタン及び約 0.1 M の HCl で希釈し、水層をジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製した。

【0095】

一般的手順 C (TBDMS の脱保護) : メタノール (10 mL) 中のセレンテラジン類似体の溶液に、HCl (6 M、1 mL) を加えた。その溶液を 2 ~ 6 時間撹拌した。その混合物を DCM 及び水で希釈し、水層をジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製した。

10

【0096】

一般的手順 D (TFA の脱保護) : ジクロロメタン (10 mL) 中のセレンテラジン類似体の溶液に、トリフルオロ酢酸 (1 mL) を加えた。その溶液を 2 ~ 6 時間撹拌した。その混合物をトルエンで希釈し、濃縮し、トルエンに再懸濁させ、濃縮した。これを 2 回繰り返した。その粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィーで精製した。

【0097】

一般的手順 E (スルホネートによる HWE 反応) : メタノール中のスルホン化アルデヒド (1 eq) 及びメチル 2 - ((3 - ベンジル - 5 - フェニルピラジン - 2 - イル) アミノ) - 2 - (ジエトキシホスホリル) アセテート (1 eq) の溶液に、水酸化ナトリウム (2 M、3 eq) を加えた。その溶液を室温で 0.5 ~ 2 時間撹拌した。その混合物をエタノールで希釈し、セライトに加え、濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製した。

20

【0098】

一般的手順 F (スルホネートによる還元) : ジクロロメタン及びメタノール (1 : 1) 中のデヒドロ - セレンテラジン (1 eq) の懸濁液を氷浴で冷やした。水素化ホウ素ナトリウム (5 eq) を加え、その混合物を 0.5 ~ 2 時間撹拌した。その混合物をエタノールで希釈し、セライトに加え、濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製した。

【0099】

一般的手順 G (スクシンイミドエステルの反応) : ジクロロメタン及びメタノール (10 : 1) 中のアミノ - セレンテラジン (1 eq) の溶液に、ルチジン (5 eq) 及びスクシンイミドエステル (1 eq) を加えた。その混合物を 2 ~ 18 時間撹拌した。その混合物をメタノールで希釈し、セライトに加え、濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製した。

30

【0100】

個々の各工程の最適な反応条件及び反応時間は、採用した特定の反応物質及び使用したその反応物質に存在する置換基に応じて変動し得る。具体的な手順は、実施例の節に示されている。反応は、従来方式で、例えば、溶媒を残渣から除去し、当該技術分野において一般に知られている手法 (結晶化、蒸留、抽出、トリチュレーション及びクロマトグラフィーなどであるが、これらに限らない) に従ってさらに精製することによって後処理できる。別段の記載のない限り、その出発物質及び試薬は、市販ものであるか、または当業者が市販の材料から、化学文献に記載されている方法を用いて調製できるかのいずれかである。出発物質は、市販されていない場合、標準的な有機化学的技法、既知の合成技法と類似の技法、構造的に類似の化合物、または上記のスキームもしくは合成例の節に記載されている手順と類似の技法から選択した手順によって調製できる。

40

【0101】

反応条件、試薬及び一連の合成経路の適切な操作、反応条件と適合できない任意の化学官能基の保護、ならびにその方法の反応順序における好適な時点での脱保護を含め、常法的な実験が本発明の範囲に含まれる。好適な保護基、ならびにそのような好適な保護基を用いて、それぞれに異なる置換基を保護及び脱保護する方法は、当業者に周知であり、その例は、PGM Wuts and TW Greene による Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (4<sup>th</sup> ed.

50

) (John Wiley & Sons, NY (2006)) という標題の本に見ることができ、この文献は、参照により、その全体が本明細書に援用される。本発明の化合物の合成は、上記の合成スキーム及び具体例における方法と類似の方法によって行うことができる。

#### 【0102】

開示されている化合物の光学活性体が必要なときには、その光学活性体は、光活性出発物質（例えば、不斉誘導の好適な反応工程によって調製する）を用いて、本明細書に記載の手順のうちの1つを行うか、または標準的な手順（クロマトグラフ分離、再結晶もしくは酵素による分割など）を用いて、その化合物もしくは中間体の立体異性体の混合物を分割することによって得ることができる。

10

#### 【0103】

同様に、化合物の純粋な幾何異性体が必要なときには、その幾何異性体は、純粋な幾何異性体を出発物質として用いて、上記の手順のうちの1つを行うか、またはクロマトグラフ分離のような標準的な手順を用いて、その化合物もしくは中間体の幾何異性体の混合物を分割することによって得ることができる。

#### 【0104】

塩基付加塩は、開示されている化合物を最終的に単離及び精製する際に、カルボキシル基と、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムもしくはアルミニウムなどの金属のカチオンの水酸化物、炭酸塩もしくは重炭酸塩のような好適な塩基、または有機第1級アミン、第2級アミンもしくは第3級アミンを反応させることによって調製し得る。第4級アミン塩（メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ジエチルアミン、エチルアミン、トリブチルアミン、ピリジン、N, N - ジメチルアニリン、N - メチルピペリジン、N - メチルモルホリン、ジシクロヘキシルアミン、プロカイン、ジベンジルアミン、N, N - ジベンジルフエネチルアミン、1 - エフェタミン及びN, N' - ジベンジリエチレンジアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペリジン、ピペラジンなどに由来するようなもの）を調製できる。

20

#### 【0105】

記載されているような合成スキーム及び具体例は、例示的なものであり、本発明の範囲を限定するものとして解釈すべきではないことは認識し得る。本発明の範囲は、添付の請求項で定義されているからである。その合成方法及び具体例のあらゆる代替形態、改変形態及び等価物は、請求の範囲内に含まれる。

30

#### 【0106】

##### 3. *Oplophorus* ルシフェラーゼ

開示されている化合物は、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼの基質であり得る。開示されている化合物を用いて、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを標識/検出し得る。開示されている化合物を用いて、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを阻害し得る。開示されている化合物は、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼのルシフェラーゼ活性を阻害し得る。その*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼは、野生型*Oplophorus* ルシフェラーゼ、または配列番号2のルシフェラーゼのような、*Oplophorus* ルシフェラーゼのバリエーションであってよい。*Oplophorus* ルシフェラーゼバリエーションは、米国特許第8,557,970号及び同第8,669,103号に記載されており、それらの各特許は、参照により、その全体が本明細書に援用される。

40

#### 【0107】

天然型の*Oplophorus gracilirostris* ルシフェラーゼの成熟した19kDaのサブユニットのポリペプチド配列は、配列番号1に示されている。*Oplophorus* 由来の合成ルシフェラーゼのうち、本明細書に記載の方法で使用できる合成ルシフェラーゼの例示的なポリペプチド配列は、配列番号2に示されている（本明細書では同義的に「NanoLuc」、「NLuc」、「NLucルシフェラーゼ」及び「NLuc酵素」ともいう）。

50

## 【 0 1 0 8 】

## 4 . 基質セレンテラジン

開示されている化合物は、O p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼの基質であり得る。本発明の開示されている化合物を用いて、O p l o p h o r u s由来のルシフェラーゼを標識 / 検出し得る。開示されている化合物を用いて、ルシフェラーゼ活性を阻害し得る。開示されている化合物は、基質であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体がルシフェラーゼに結合するのと競合するか、またはその結合を妨げることによって、ルシフェラーゼ活性を阻害し得る。基質セレンテラジンは、ルシフェラーゼ及びその他の生物発光タンパク質の作用を受けると発光する種類のレポーター分子である。基質セレンテラジンの例としては、W O 2 0 0 3 / 0 4 0 1 0 0、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 2 4 8 5 1 1 号及び米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 1 7 6 6 7 号に記載されているものに加えて、セレンテラジン、セレンテラジン誘導体及び / または類似体 ( 2 - フラニルメチル - デオキシ - セレンテラジン ( フリマジン )、セレンテラジン - n、セレンテラジン - f、セレンテラジン - h、セレンテラジン - h c p、セレンテラジン - c p、セレンテラジン - c、セレンテラジン - e、セレンテラジン - f c p、ビス - デオキシセレンテラジン ( 「セレンテラジン - h h」 )、セレンテラジン - i、セレンテラジン - i c p、セレンテラジン - v 及び 2 - メチル - セレンテラジンなど)、プロセレンテラジン ( すなわち、その化合物をルシフェラーゼの基質に変換する非発光酵素の基質ではない化合物)、キノンでマスクされたセレンテラジンなどが挙げられるが、これらに限らない。基質セレンテラジンのさらなる例は、例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 0 7 8 4 9 号、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 3 0 2 8 9 号、米国特許出願第 1 4 / 6 0 8 , 9 1 0 号及び米国特許出願第 1 4 / 6 0 9 , 3 7 2 号に記載されており、これらの各特許は、参照により、本明細書に援用される。

10

20

## 【 0 1 0 9 】

## 5 . O p l o p h o r u sルシフェラーゼの検出方法、標識方法及び単離方法

本開示の化合物は、ルシフェラーゼ基質、例えばセレンテラジン類似体がいずれの方法でも使用し得る。例えば、本開示の化合物は、試料中の 1 つ以上の分子、例えば、酵素、酵素反応の補因子、酵素基質、酵素阻害剤、酵素活性化剤もしくは O H ラジカル、または 1 つ以上の状態、例えば酸化還元状態を検出するためにセレンテラジンの類似体を用いる生物発光方法で使用し得る。その試料としては、動物 ( 例えば脊椎動物 )、植物、真菌、生理液 ( 例えば、血液、血漿、尿、粘膜分泌物 )、細胞、細胞溶解液、細胞上清または細胞の精製画分 ( 例えば細胞内画分 ) を挙げてよい。このような分子の存在、量、スペクトル分布、発光キネティクスまたは比活性を検出または定量し得る。その分子は、多相溶液 ( 例えば、乳濁液もしくは懸濁液 ) を含む溶液中、または固体支持体 ( 例えば、粒子、毛細管もしくはアッセイ容器 ) 上で検出または定量し得る。

30

## 【 0 1 1 0 】

特定の実施形態では、式 ( I ) の化合物を用いて、小分子を定量し得る。いくつかの実施形態では、セレンテラジン ( 例えば、天然型のセレンテラジン、既知のセレンテラジンまたは式 ( I ) の化合物 ) は、所定の生化学的活性、例えば、アポトーシスまたは薬物代謝のプロブとして使用できる。いくつかの実施形態では、そのセレンテラジン濃度は、対象となるその特異的酵素の作用を受け得る「プロセレンテラジン」または「プロ基質」による特異的な酵素活性と結び付けられている。いくつかの実施形態では、プロセレンテラジンは、ルシフェラーゼと合わせたときには、発光を直接補佐することはできないが、対象となる特異的な酵素による触媒的な処理を通じて、セレンテラジンに変換されることができる分子である。いくつかの実施形態では、そのアプローチは、薬物代謝で使用されるような酵素、例えば、シトクロム P 4 5 0 酵素、モノアミンオキシダーゼ及びグルタチオン S - トランスフェラーゼ、ならびにアポトーシス、例えば、カスパーゼで使用できる。例えば、セレンテラジン ( 例えば、天然型のセレンテラジン、既知のセレンテラジンまたは式 ( I ) の化合物 ) を改変して、6' - O - メチルのような切断可能な基を含めることができる。いくつかの実施形態では、特異的なシトクロム P 4 5 0 酵素とともにインキュ

40

50

ベートすると、その6' O -メチルが切断されて、プロセレンテラジンがセレンテラジンに変換され、そのセレンテラジンをルシフェラーゼによって検出できる。いくつかの実施形態では、プロセレンテラジンと、発光を補佐するのに必要な他の成分、例えば、ルシフェラーゼのような発光タンパク質を組み合わせ、単一の試薬及びホモジニアスアッセイ系をもたらすことができる。例えば、その試薬を試料に加えると、プロセレンテラジンがセレンテラジンに変換されるのに応じて発光する。各種実施形態では、プロセレンテラジンからセレンテラジンが生成されることと関連付けることができる他の酵素、小分子または他の細胞プロセス用に、類似のアッセイ系を開発できる。

#### 【0111】

特定の実施形態では、式(I)の化合物は、生細胞における発光の検出に用いることができる。いくつかの実施形態では、ルシフェラーゼを細胞内で(レポーターとして、または別段の形で)発現させることができ、培養下で細胞を透過することになるセレンテラジン(例えば、式(I)の化合物)で処理したその細胞は、ルシフェラーゼと反応して発光する。式(I)の化合物は、細胞透過性であることに加えて、細胞生存能の点で、天然型のセレンテラジンに相当する生体適合性を示す。いくつかの実施形態では、培地中での天然型のセレンテラジンの安定性を向上させることが知られている化学修飾を含む式(I)の化合物を合成し、よりロバスト性の高い、生細胞ルシフェラーゼベースのレポーターアッセイに、その化合物を使用することができる。さらに別の実施形態では、様々な顕微鏡及びイメージング技法を用いて、ルシフェラーゼ及び式(I)の化合物を含む試料(細胞、組織、動物などを含む)をアッセイし得る。さらに別の実施形態では、分泌型ルシフェラーゼを細胞内で、生細胞レポーター系の一部として発現させる。

#### 【0112】

開示されている化合物は、O p l o p h o r u s ルシフェラーゼを用いて、酵素の存在または活性を検出する目的で使用されるアッセイで使用し得る。例えば、開示されている化合物は、試料中の1つ以上の分子、例えば、対象とするタンパク質(例えば、酵素、結合パートナー、リガンドなど)、酵素反応の補因子、酵素基質、酵素阻害剤、酵素活性化剤もしくはOHラジカル、または1つ以上の状態、例えば酸化還元状態を検出するために、O p l o p h o r u s ルシフェラーゼ、及び基質であるセレンテラジンまたはセレンテラジン誘導体を用いる生物発光方法で使用し得る。

#### 【0113】

開示されている化合物は、その活性部位で共有結合を形成することによって、O p l o p h o r u s ルシフェラーゼを標識する方法で使用し得る。その方法は、本発明で開示される化合物と、O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼを発現するかまたは含む細胞を接触させることを含んでよい。その方法は、本発明で開示される化合物と、O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼを発現するかまたは含む細胞を接触させることを含んでよく、その開示されている化合物は、そのO p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼと選択的に反応して、そのルシフェラーゼを不活化し得る。その方法は、その試料と、本発明で開示される化合物を接触させることを含んでよく、本発明で開示されるその化合物は、O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼから、速い減衰速度で発光させる。

#### 【0114】

その方法は、本発明で開示される化合物と、O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼ融合タンパク質における結合パートナーを接触させることを含んでよく、その融合タンパク質がインタクトな状態であると、開示されているその化合物は、そのO p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼを標識する。開示されている化合物は、O p l o p h o r u s ルシフェラーゼを用いて、酵素の存在または活性を検出する目的、そのルシフェラーゼと選択的に反応することによって、そのO p l o p h o r u s ルシフェラーゼからのシグナルを選択的に阻害する目的で使用されるアッセイで使用し得る。

#### 【0115】

開示されている化合物は、様々な官能基に付加し得る。開示されている化合物は、阻害効力に影響を及ぼさずに、酵素ポケットから溶媒中までに及ぶ官能基を含み得る。例えば

、 - Q - L - Z という基は、蛍光色素部分または蛍光源性色素部分のようなエネルギーアクセプターを含んでよく、そのアクセプターは、NanoLucベースの細胞選別及び標識用途で蛍光タグとして使用し得る。

【0116】

いくつかの実施形態では、開示されている化合物を用いて、タンパク質または表面を標識し得る。例えば、式(I)の化合物は、適切なリンカーによってその化合物に結合された反応性基または官能基(ハロゲンもしくは阻害剤など)を通じて、標的タンパク質(酵素または受容体など)と相互作用し得る。いくつかの実施形態では、開示されている化合物を用いて、Nluc融合タンパク質を捕捉したり、またはNlucの生物発光を消光し得る表面、樹脂もしくは生体分子を作製したりし得る。

10

【0117】

(1) 細胞の取り込み、選別及び標識

いくつかの実施形態では、開示されている化合物は、生細胞イメージング、細胞の取り込みまたは細胞の選別及び標識に用いるための薬物、ヌクレオチド、糖、タンパク質、ポリマー、固体表面、発色団、色素などのような様々な生体分子及び巨大分子に付加し得る。例えば、開示されている化合物を様々な官能基に付加して、NlucまたはNanoBITを所望の官能基でポストラベリング可能にし得る。

【0118】

開示されている化合物は、蛍光色素または蛍光源性色素のような発色団または色素に付加し得る。例えば、開示されている化合物は、NlucまたはNanoBITを蛍光標識するのに用いるための蛍光色素に付加し得る。例えば、開示されている化合物は、蛍光活性化細胞選別(FACS)で用いる蛍光色素に付加し得る。細胞に、Nluc-HT融合タンパク質のようなNluc融合タンパク質をトランスフェクションし、その細胞を、蛍光色素に付加された本開示の化合物に暴露し得る。細胞透過性化合物-色素コンジュゲートは、そのNluc融合タンパク質を発現している細胞において、Nlucを標識し、蛍光を発生させる。適切なインキュベーション工程及び洗浄工程の後、その蛍光細胞をFACSによって選別し、それを後の生化学的実験で使用することができる。別の例として、開示されている化合物は、生細胞イメージングで用いるための蛍光色素または発色団に付加し、それによって、細胞内イベント、細胞外イベント及び細胞表面イベントの生物発光イメージングを可能にし得る。

20

30

【0119】

開示されている化合物は、化学反応またはバイオ直交性反応のための様々な官能基に付加し得る。例えば、開示されている化合物は、様々な官能基に付加して、クリックケミストリー、シアノベンズチアゾール化学反応、トリアゼン化学反応などで使用し得る。例えば、開示されている化合物は、NanoLucを蛍光標識するための2段階式の方法で使用し得る。このような実施形態では、開示されている化合物を反応性官能基に付加してよく、相補的な反応性基を有する蛍光色素を加えて、NanoLucを蛍光標識できる。細胞に、Nluc融合タンパク質をトランスフェクションし、その細胞を、アジドに付加された本開示の化合物に暴露し得る。蛍光色素コンジュゲートを加えることができ、アジドに付加されたその化合物に結合したNluc融合タンパク質が、蛍光標識されることになる。

40

【0120】

(2) タンパク質の単離

いくつかの実施形態では、開示されている化合物は、Oplophorusルシフェラーゼ融合タンパク質を捕捉または単離するのに使用し得る。いくつかの実施形態では、開示されている化合物は、NanoLuc(登録商標)及びHaloTag(登録商標)ベースの技術を用いて、Oplophorusルシフェラーゼ融合タンパク質を単離するのに使用し得る。いくつかの実施形態では、開示されている化合物は、クリックケミストリーを用いて、Oplophorusルシフェラーゼ融合タンパク質を単離するのに使用し得る。例えば、開示されている化合物は、NanoLuc(登録商標)及びアジドまたは

50

アルキンで修飾されたビーズまたは表面を用いて、Oplophorus ルシフェラーゼ融合タンパク質を単離するのに使用し得る。別の実施形態では、開示されている化合物は、NanoLuc (登録商標) 及びストレプトアビジンで修飾されたビーズまたは表面を用いて、Oplophorus ルシフェラーゼ融合タンパク質を単離するのに使用し得る。いくつかの実施形態では、開示されている化合物は、NanoLuc (登録商標) 及びシアノベンゾチアゾールで修飾されたビーズまたは表面を用いて、Oplophorus ルシフェラーゼ融合タンパク質を単離するのに使用し得る。いくつかの実施形態では、開示されている化合物は、Oplophorus ルシフェラーゼ融合タンパク質の単離に用いるための薬物、ヌクレオチド、糖、タンパク質、ポリマー及び固体表面のような様々な生体分子及び巨大分子に付加し得る。例えば、細胞に、Nluc-HT 融合タンパク質のような Nluc 融合タンパク質をトランスフェクションし、その細胞を、官能基に付加された本開示の化合物に暴露し得る。その官能基は、固体支持体に結合して、それによって、その Nluc 融合タンパク質を単離可能にする分子であってよい。

10

#### 【0121】

##### 6. Oplophorus ルシフェラーゼ活性の阻害方法

開示されている化合物は、Oplophorus ルシフェラーゼを阻害する方法で使用し得る。開示されている化合物は、その活性部位で共有結合を形成することによって、Oplophorus ルシフェラーゼを阻害し得る。その方法は、本発明で開示される化合物と、Oplophorus 由来のルシフェラーゼを発現するかまたは含む細胞を接触させることを含んでよく、その際、開示されている化合物は、その Oplophorus 由来のルシフェラーゼと選択的に反応して、その Oplophorus 由来のルシフェラーゼを不活化し得る。その方法は、試料と、基質セレンテラジン及び本発明で開示される化合物を接触させることを含んでよく、その際、本発明で開示される化合物により、その Oplophorus 由来のルシフェラーゼによる発光が減少する。その方法は、試料と、本発明で開示される化合物を接触させる前に、試料と基質セレンテラジンを接触させることを含んでよい。その方法は、試料と基質セレンテラジンを接触させる前に、試料と、本発明で開示される化合物を接触させることを含んでよい。

20

#### 【0122】

その方法は、本発明で開示される化合物と、Oplophorus 由来のルシフェラーゼ融合タンパク質における結合パートナーを接触させることを含んでよく、その際、その融合タンパク質がインタクトな状態であると、開示されている化合物は、Oplophorus 由来のルシフェラーゼを阻害する。複数の生物発光系の時間的マルチプレックス化を伴う用途、またはいくつかのプレートベースの発光アッセイにおけるように、発光シグナルを抑制するのが望ましい場合のある実施形態において、開示されている化合物は、そのルシフェラーゼを阻害して、発光シグナルを選択的に抑制する役割を果たし得る。例えば、開示されている化合物を用いて、細胞内及び/または細胞外の Oplophorus ルシフェラーゼ活性を阻害し得る。

30

#### 【0123】

##### (1) 細胞不透過性化合物の使用

特定の実施形態では、本発明で開示する方法は、試料 (例えば細胞) と、細胞透過性基質のセレンテラジン、及び細胞不透過性となるように改変されている本明細書に記載の化合物の混合物とを接触させることを含む。このような実施形態では、開示されている化合物及び方法を用いて、ハイスループットスクリーニング作業のアッセイ形式の初期の輝度を確立した後に、細胞から排出され得るいずれのルシフェラーゼも選択的に阻害して、その細胞外で発生し得る発光を選択的に阻害し得る。このような方法は、細胞内で、より選択的なシグナルを提供し得る。

40

#### 【0124】

##### (2) 細胞透過性化合物の使用

特定の実施形態では、本発明で開示する方法は、試料 (例えば細胞) と、細胞透過性基質のセレンテラジン、及び細胞透過性である本明細書に記載の化合物の混合物とを接触さ

50

せることを含む。このような実施形態では、開示されている化合物は、細胞に侵入し、その細胞内の *Oplophorus* ルシフェラーゼを選択的に阻害することができる。このような方法は、2つ以上のルシフェラーゼの使用を伴うマルチプレックスアッセイにおいて有益なことがあり、細胞内の別のルシフェラーゼによる発光を選択的に観測する目的で、*Oplophorus* ルシフェラーゼによる発光を阻害可能にし得る。

#### 【0125】

##### (3) マルチプレックス化

開示されている化合物を使用して、他のルシフェラーゼ及びアッセイとの時間的マルチプレックス化に適用されているように、*Oplophorus* ルシフェラーゼを阻害し得る。いくつかの実施形態では、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼまたはそのバリエーションを、異なる波長の光を発する別の酵素（例えばルシフェラーゼ）、例えば、緑色ホタルルシフェラーゼ、例えば、*Photinus pyralis*（例えば、Promega CorpのLuc2）または赤色コメツキムシルシフェラーゼ（Promega Corp.のChroma-Luc（商標）ルシフェラーゼ）とマルチプレックス化し得る。例えば、*Oplophorus* ルシフェラーゼを機能的レポーターとして使用する場合、緑色ホタルルシフェラーゼまたは赤色Chroma-Luc（商標）ルシフェラーゼを使用して、遺伝子調節に対する非特異的な作用を制御したり、またはトランスフェクション効率を正規化したりできる。いくつかの実施形態では、*Oplophorus* ルシフェラーゼから生成される発光（約460nm）及び赤色Chroma-Lucから生成される発光（約610nm）は、波長識別フィルターを備えた発光測定装置を用いて容易に分解でき、同じ試料からの両方のシグナルを測定可能となる。このような実施形態では、本明細書に記載の化合物を使用して、*Oplophorus* ルシフェラーゼを選択的に阻害して、もう一方のルシフェラーゼからのシグナルを選択的に観測できるようにできる。

#### 【0126】

別の例では、*Oplophorus* ルシフェラーゼは、転写レポーターとして使用して、異なる波長の光を発するルシフェラーゼであって、アッセイ試薬に含まれるルシフェラーゼと対にすることができる。別の例では、*Oplophorus* ルシフェラーゼは、1つ以上の追加のルシフェラーゼとともに使用してよく、その場合、各ルシフェラーゼの発光は、選択的酵素阻害剤の使用を通じて、別々に測定し得る。例えば、適切な基質及び緩衝剤を加えて、*Oplophorus* ルシフェラーゼの発光を測定したら、適切な基質及び緩衝剤、ならびに*Oplophorus* ルシフェラーゼに対して選択的である本明細書に記載の化合物1つ以上を加えて、第2のルシフェラーゼを測定し得る。別の例では、アッセイ試薬に含まれる*Oplophorus* ルシフェラーゼは、細胞のアポトーシスを推定するために、細胞生存能またはカスパーゼ活性を推定する目的で、細胞生理の所定の側面、例えばATPを測定するのに使用し得る。

#### 【0127】

##### (4) 自殺阻害

いくつかの実施形態では、開示されている化合物は、*Oplophorus* ルシフェラーゼを不可逆的に阻害する自殺阻害剤として使用し得る。開示されている化合物は、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼの自殺基質であって、初めに、そのルシフェラーゼと反応して生物発光シグナルを生成し、続いて、その*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを不可逆的に阻害する自殺基質であり得る。開示されている化合物は、*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼと共有結合付加体を形成することによって、その*Oplophorus* 由来のルシフェラーゼを阻害し得る。開示されている化合物は、NanoLuc、及び相補的な酵素系NanoBitを阻害し得る。いくつかの実施形態では、開示されている化合物は、リガンド-受容体結合アッセイに適用される自殺基質として使用し得る。

#### 【0128】

##### 7. 試料

開示されている化合物は、生体成分を含む試料とともに使用し得る。その試料は、細胞

10

20

30

40

50

を含んでよい。その試料は、成分の不均一混合物（インタクト細胞、細胞抽出物、細胞溶解液、細菌、ウイルス、細胞小器官、エクソソーム及びそれらの混合物を含む）、または単一成分もしくは均一な成分群（例えば、天然アミノ酸、合成アミノ酸、核酸重合体、糖鎖重合体もしくは脂質膜複合体）を含んでよい。開示されている化合物は概して、使用濃度範囲内では、生細胞及びその他の生体成分に対して無毒であり得る。

#### 【0129】

その試料としては、動物（例えば脊椎動物）、植物、真菌、生理液（例えば、血液、血漿、尿、粘膜分泌物など）、細胞、細胞溶解液、細胞上清または細胞の精製画分（例えば細胞内画分）を挙げよう。特定の実施形態では、その試料は、細胞であってよい。いくつかの実施形態では、その試料は、生細胞であってよい。その細胞は、真核細胞、例えば、酵母細胞、トリ細胞、植物細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞（ヒト、サル、マウス、イヌ、ウシ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ヤギもしくはブタの細胞が挙げられるが、これらに限らない）、原核細胞、2つ以上の異なる生物に由来する細胞、あるいはその細胞溶解液または上清であってよい。その細胞は、組み換え技法によって遺伝子が改変されていなくてもよく（非組み換え細胞）、あるいは、組み換えDNA及び/または組み換えDNAとともに安定して増幅されるゲノム、遺伝子を破壊するように、例えば、プロモーター、イントロンもしくはオープンリーディングフレームを破壊するように、またはある1つのDNA断片を別のDNA断片と置き換えるように改変されたゲノムを一過性にトランスフェクションされた組み換え細胞であってよい。その組み換えDNAまたは置換DNA断片は、本発明の方法によって検出される分子、検出される分子のレベルもしくは活性を変化させる部分、及び/またはその分子のレベルもしくは活性を変化させる分子もしくは部分と無関係な遺伝子産物をコードしてよい。その細胞は、ルシフェラーゼを発現してもしなくてもよい。その細胞は、組み換え技法によって、遺伝子が改変されていてもよい。

#### 【0130】

##### 8. キット

開示するのは、1つ以上の酵素（例えば、Oplophorus ルシフェラーゼまたはOplophorus バリエントルシフェラーゼ）の存在または活性を判断するためのキットである。そのキットは、Oplophorus ルシフェラーゼまたはOplophorus バリエントルシフェラーゼを阻害し得る本発明の化合物または組成物、基質であるセレンテラジンまたは基質であるセレンテラジン誘導体、Oplophorus ルシフェラーゼまたはOplophorus バリエントルシフェラーゼ、発光アッセイを実施するための説明、及び反応緩衝液（複数可）のうちの1つ以上を含んでよい。その反応緩衝液は、ルシフェラーゼ以外の酵素反応及び発光酵素反応のための個々の調合物に存在しても、一段階式のアッセイ用の単一の調合物に存在してもよい。そのキットは、ルシフェラーゼ以外の酵素（複数可）に対する他の阻害剤、活性化剤及び/または促進剤も含んでよい。そのキットは、そのアッセイのためのポジティブコントロール及び/またはネガティブコントロールも含んでよい。

#### 【実施例】

#### 【0131】

##### 9. 実施例

下記の実施例では、「一般的手順」という場合には、発明を実施するための形態の節において、スキーム1~3に従って説明した手順を指す。

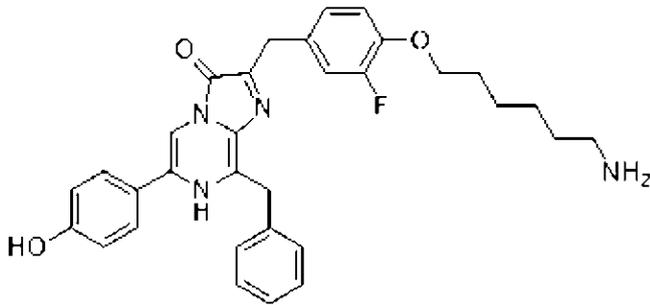
#### 【0132】

実施例で使用されている略称は、DBCOが、ジベンジルシクロオクチンであり、DCMが、ジクロロメタンであり、DMEMが、ダルベッコ改変イーグル培地であり、DMFが、N,N-ジメチルホルムアミドであり、DMSOが、ジメチルスルホキシドであり、FAMが、フルオレセインであり、JOEが、カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセインであり、SEが、スクシンイミジルエステルであり、R110が、ローダミン110であり、TCOが、トランス-シクロオクテンであり、TFAが、トリフルオロ酢酸である。

## 【0133】

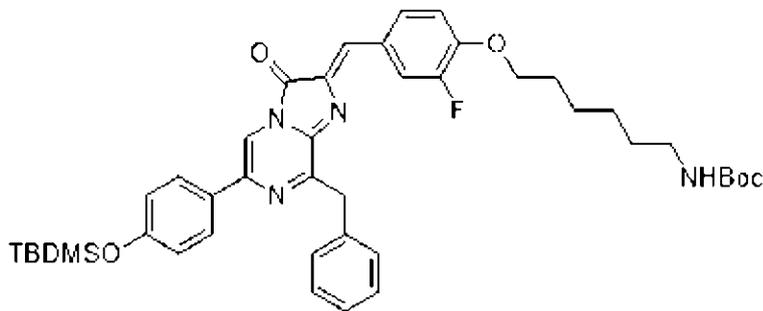
## 実施例 1

2 - ( 4 - ( ( 6 - アミノヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( J R W - 0 8 5 5 )



10

工程 1 . tert - ブチル ( Z ) - ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) - 3 - オキソイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 ( 3 H ) - イリデン ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) カルバメート ( J R W - 0 8 5 2 )



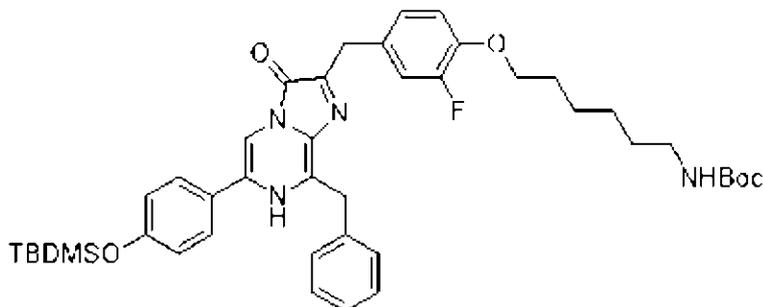
20

## 【0134】

一般的手順 A に従って、tert - ブチル ( 6 - ( 2 - フルオロ - 4 - ホルミルフェノキシ ) ヘキシル ) カルバメート ( 271 mg、0.80 mmol ) と、メチル 2 - ( ( 3 - ベンジル - 5 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) ピラジン - 2 - イル ) アミノ ) - 2 - ( ジエトキシホスホリル ) アセテート ( 400 mg、0.67 mmol ) を反応させて、粗生成物 ( 490 mg ) を黒色固体として得た。

## 【0135】

工程 2 . tert - ブチル ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) カルバメート ( J R W - 0 8 5 3 )



40

50

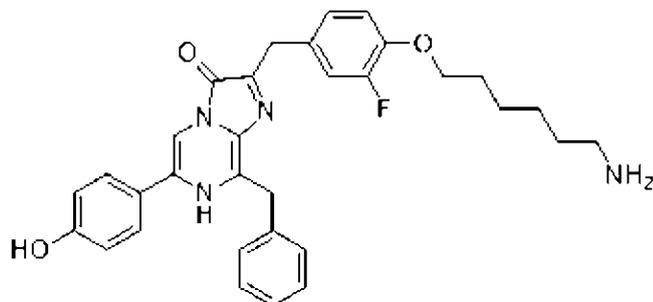
## 【0136】

一般的手順Bに従って、tert-ブチル(Z)-(6-(4-(8-ベンジル-6-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)-3-オキソイミダゾ[1,2-a]ピラジン-2(3H)-イリデン)メチル)-2-フルオロフェノキシ)ヘキシル)カルバメート(490mg、0.65mmol)と、水素化ホウ素ナトリウム(123mg、3.2mmol)を反応させて、粗生成物(220mg)をオレンジ色固体として得た。

## 【0137】

工程3.2-(4-(6-アミノヘキシル)オキシ)-3-フルオロベンジル)-8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン(JRW-0855)

10



20

## 【0138】

一般的手順Dに従って、tert-ブチル(6-(4-(8-ベンジル-6-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)-3-オキソ-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-2-イル)メチル)-2-フルオロフェノキシ)ヘキシル)カルバメート(220mg、0.29mmol)と、トリフルオロ酢酸(3mL)を反応させて、所望の生成物(3工程全体で60mg、16%)をオレンジ色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.67 - 7.52 (m, 1H), 7.52 - 7.44 (m, 2H), 7.44 - 7.38 (m, 2H), 7.36 - 7.29 (m, 2H), 7.29 - 7.22 (m, 1H), 7.17 - 7.04 (m, 2H), 7.00 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 6.95 - 6.86 (m, 2H), 4.43 (s, 2H), 4.12 (s, 2H), 4.04 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.01 - 2.87 (m, 2H), 1.87 - 1.77 (m, 2H), 1.75 - 1.64 (m, 2H), 1.61 - 1.43 (m, 4H); ESI MS m/z 541 [M+H]<sup>+</sup>; HPLC 84.4% (AUC), T<sub>R</sub> 4.42分; UV (MeOH) 264 nm, 11,027.

30

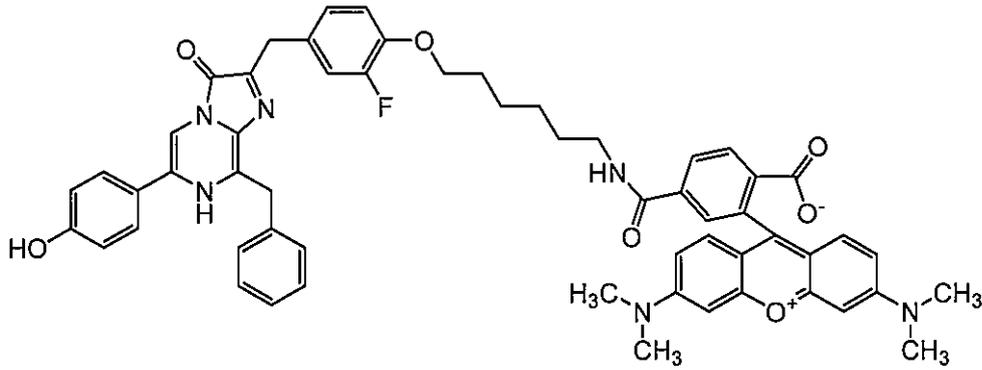
## 【0139】

## 実施例2

4-(6-(4-(8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-3-オキソ-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-2-イル)メチル)-2-フルオロフェノキシ)ヘキシル)カルバモイル)-2-(3,6-ビス(ジメチルアミノ)キサントリウム-9-イル)ベンゾエート(JRW-0857)

40

50



10

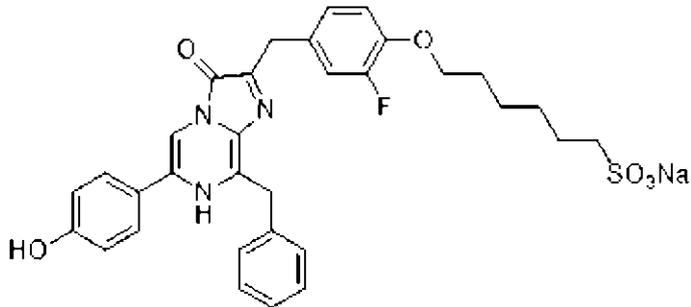
一般的手順 G に従って、2 - ( 4 - ( ( 6 - アミノヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( 60 mg、0 . 11 mmol ) と、2 - ( 3 , 6 - ビス ( ジメチルアミノ ) キサンチリウム - 9 - イル ) - 4 - ( ( ( 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル ) オキシ ) カルボニル ) ベンゾエート ( 29 mg、0 . 055 mmol ) を反応させて、所望の生成物 ( 9 mg、8 % ) を赤色固体として得た。注：化合物は、溶液において不安定であった。ESI MS  $m/z$  954 [  $M+H$  ]<sup>+</sup>; HPLC 60 . 7 % ( AUC ) ,  $T_R$  6 . 58 分; UV ( MeOH ) 542 nm , 73 , 359 .

20

【 0 1 4 0 】

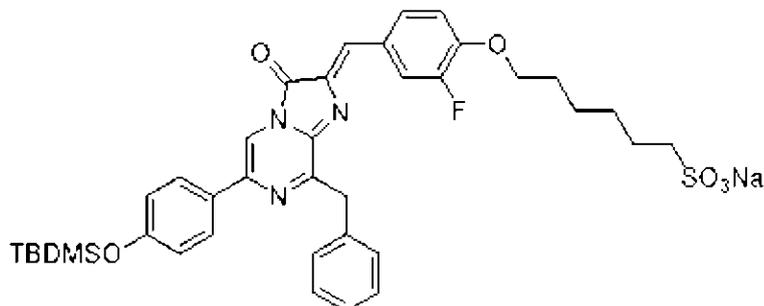
## 実施例 3

ナトリウム 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキサン - 1 - スルホネート ( JRW - 0892 - 2 )



30

工程 1 . ナトリウム ( Z ) - 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) - 3 - オキソイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 ( 3 H ) - イリデン ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキサン - 1 - スルホネート ( JRW - 0890 )



40

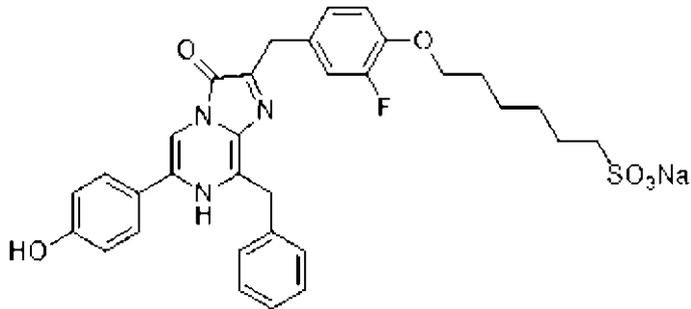
【 0 1 4 1 】

50

一般的手順 E に従って、ナトリウム 6 - ( 2 - フルオロ - 4 - ホルミルフェノキシ ) ヘキサン - 1 - スルホネート ( 108 mg、0.33 mmol ) と、メチル 2 - ( ( 3 - ベンジル - 5 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) ピラジン - 2 - イル ) アミノ ) - 2 - ( ジエトキシホスホリル ) アセテート ( 200 mg、0.33 mmol ) を反応させて、粗生成物を赤黒色固体として得た。

【 0142 】

工程 2 . ナトリウム 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキサン - 1 - スルホネート ( JRW - 0892 - 2 )



10

【 0143 】

一般的手順 F に従って、ナトリウム ( Z ) - 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) - 3 - オキソイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 ( 3 H ) - イリデン ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキサン - 1 - スルホネート ( 0.33 mmol ) と、水素化ホウ素ナトリウム ( 63 mg、1.7 mmol ) を反応させて、所望の生成物 ( 2 工程全体で 49 mg、23% ) をオレンジ色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR ( 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD ) 7.62 - 7.43 ( m, 2H ), 7.43 - 7.38 ( m, 2H ), 7.36 - 7.28 ( m, 2H ), 7.28 - 7.21 ( m, 1H ), 7.15 - 6.96 ( m, 3H ), 6.94 - 6.86 ( m, 2H ), 4.43 ( s, 2H ), 4.12 ( s, 2H ), 4.09 - 3.96 ( m, 2H ), 2.87 - 2.79 ( m, 2H ), 1.93 - 1.72 ( m, 4H ), 1.60 - 1.46 ( m, 4H ); ESI MS m/z 606 [ M + H - Na ]<sup>+</sup>; HPLC 97.6% ( AUC ), T<sub>R</sub> 4.33 分; UV ( MeOH ) 264 nm, 25, 559.

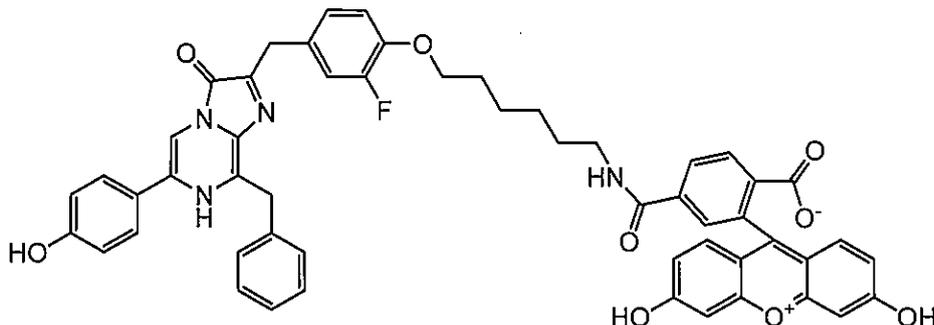
20

30

【 0144 】

実施例 4

4 - ( ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) カルバモイル ) - 2 - ( 3 , 6 - ジヒドロキシキサンチリウム - 9 - イル ) ベンゾエート ( JRW - 0893 )



40

50

一般的手順 G に従って、2 - ( 4 - ( ( 6 - アミノヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( 53 mg、0 . 10 mmol ) と、2 - ( 3 , 6 - ジヒドロキシキサンチリウム - 9 - イル ) - 4 - ( ( ( 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル ) オキシ ) カルボニル ) ベンゾエート ( 55 mg、0 . 12 mmol ) を反応させて [ 注 : F A M - S E は、5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物であった ]、所望の生成物 ( 26 mg、30% ) をオレンジ色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR ( 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD ) 8 . 54 - 8 . 42 ( m, 2 H ), 8 . 35 - 8 . 27 ( m, 1 H ), 7 . 92 - 7 . 88 ( m, 1 H ), 7 . 82 - 7 . 76 ( m, 2 H ), 7 . 60 - 7 . 49 ( m, 3 H ), 7 . 49 - 7 . 36 ( m, 4 H ), 7 . 36 - 7 . 15 ( m, 5 H ), 7 . 13 - 7 . 00 ( m, 2 H ), 6 . 96 - 6 . 90 ( m, 2 H ), 4 . 62 ( s, 2 H ), 4 . 26 ( s, 2 H ), 4 . 11 - 3 . 96 ( m, 2 H ), 3 . 42 ( t, J = 7 . 0 Hz, 2 H ), 1 . 89 - 1 . 61 ( m, 4 H ), 1 . 61 - 1 . 41 ( m, 4 H ); E S I M S m / z 899 [ M + H ]<sup>+</sup>; H P L C 73 . 4 % ( AUC ), T<sub>R</sub> 5 . 22 分; UV ( MeOH ) 444 nm, 23, 843 .

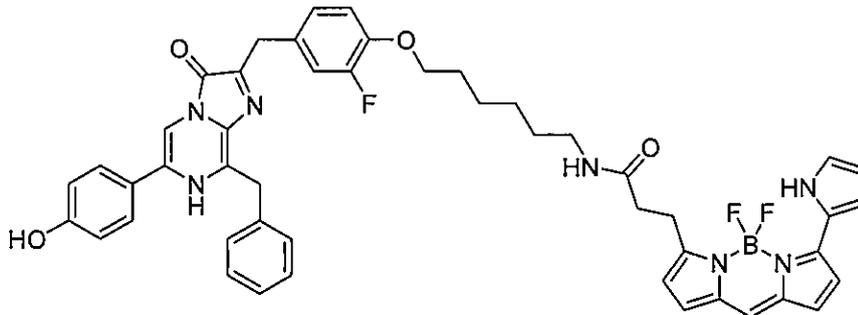
10

## 【 0145 】

## 実施例 5

N - ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) - 3 - ( 5 , 5 - ジフルオロ - 7 - ( 1 H - ピロール - 2 - イル ) - 5 H - 514, 614 - ジピロロ [ 1 , 2 - c : 2' , 1' - f ] [ 1 , 3 , 2 ] ジアザボリニン - 3 - イル ) プロパンアミド ( J R W - 0900 )

20



30

一般的手順 G に従って、2 - ( 4 - ( ( 6 - アミノヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( 20 mg、0 . 037 mmol ) と、2,5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 3 - ( 5 , 5 - ジフルオロ - 7 - ( 1 H - ピロール - 2 - イル ) - 5 H - 514, 614 - ジピロロ [ 1 , 2 - c : 2' , 1' - f ] [ 1 , 3 , 2 ] ジアザボリニン - 3 - イル ) プロパノエート ( 15 mg、0 . 037 mmol ) を反応させて、所望の生成物 ( 10 mg、32% ) を黒色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR ( 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD ) 8 . 37 ( s, 1 H ), 7 . 73 ( d, J = 8 . 7 Hz, 2 H ), 7 . 49 - 7 . 44 ( m, 2 H ), 7 . 37 - 7 . 29 ( m, 2 H ), 7 . 29 - 7 . 22 ( m, 1 H ), 7 . 22 - 6 . 89 ( m, 9 H ), 6 . 82 ( s, 1 H ), 6 . 37 - 6 . 26 ( m, 1 H ), 5 . 53 - 5 . 41 ( m, 1 H ), 4 . 58 ( s, 2 H ), 4 . 26 ( s, 2 H ), 4 . 02 ( t, J = 6 . 3 Hz, 2 H ), 3 . 32 - 3 . 27 ( m, 2 H ), 3 . 24 ( t, J = 6 . 9 Hz, 2 H ), 2 . 80 - 2 . 70 ( m, 2 H ), 1 . 81 - 1 . 67 ( m, 2 H ), 1 . 56 - 1 . 40 ( m, 4 H ), 1 . 36 - 1 . 25 ( m, 4 H ); E S I M S m / z 852 [ M + H ]<sup>+</sup>; H P L C 97 . 1 % ( AUC ), T<sub>R</sub> 5 . 74 分; UV ( Me

40

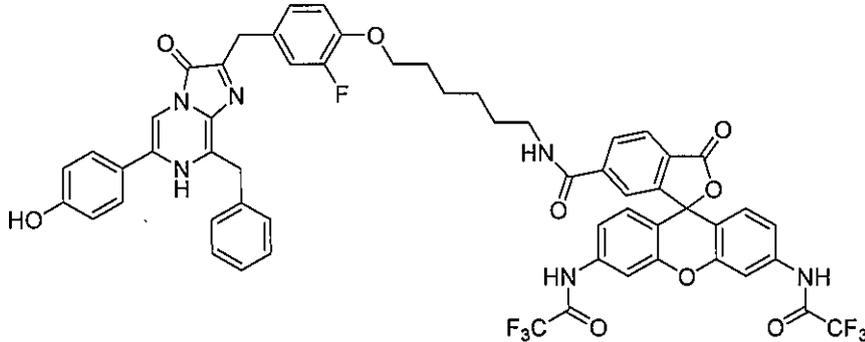
50

OH) 578 nm, 72, 280.

【0146】

実施例 6

N, N' - (6 - ((6 - (4 - ((8 - ベンジル - 6 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - オキソ - 3, 7 - ジヒドロイミダゾ[1, 2 - a]ピラジン - 2 - イル)メチル) - 2 - フルオロフェノキシ)ヘキシル)カルバモイル) - 3 - オキソ - 3H - スピロ[イソベンゾフラン - 1, 9' - キサンテン] - 3', 6' - ジイル)ビス(2, 2, 2 - トリフルオロアセトアミド) (JRW - 0905)



10

20

一般的手順 G に従って、2 - (4 - ((6 - アミノヘキシル)オキシ) - 3 - フルオロベンジル) - 8 - ベンジル - 6 - (4 - ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1, 2 - a]ピラジン - 3 (7H) - オン (50 mg、0.092 mmol) と、2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 3 - オキソ - 3', 6' - ビス(2, 2, 2 - トリフルオロアセトアミド) - 3H - スピロ[イソベンゾフラン - 1, 9' - キサンテン] - 6 - カルボキシレート (67 mg、0.10 mmol) を反応させて [注: R110 - SE は、5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物であった]、所望の生成物 (35 mg、35%) をオレンジ色固体として得た。6 - 異性体が例示及び命名されているが、この実施例における生成物は、5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物である。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 8.50 - 8.44 (m, 1H), 8.23 - 8.09 (m, 2H), 7.92 - 7.84 (m, 2H), 7.66 - 7.55 (m, 2H), 7.52 - 7.44 (m, 2H), 7.43 - 7.17 (m, 10H), 7.13 - 6.82 (m, 10H), 4.44 - 4.37 (m, 2H), 4.13 - 4.07 (m, 2H), 4.06 - 3.93 (m, 2H), 3.46 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.89 - 1.64 (m, 4H), 1.62 - 1.45 (m, 4H); ESI MS m/z 1089 [M+H]<sup>+</sup>; HPLC 61.4% (AUC), T<sub>R</sub> 5.97 分; UV (MeOH) 434 nm, 8, 791.

30

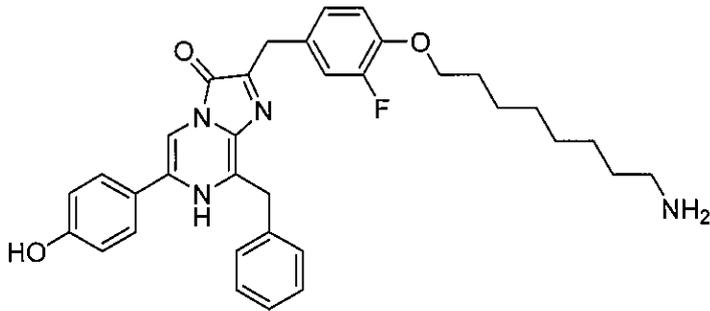
【0147】

実施例 7

2 - (4 - ((8 - アミノオクチル)オキシ) - 3 - フルオロベンジル) - 8 - ベンジル - 6 - (4 - ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1, 2 - a]ピラジン - 3 (7H) - オン (JRW - 0904)

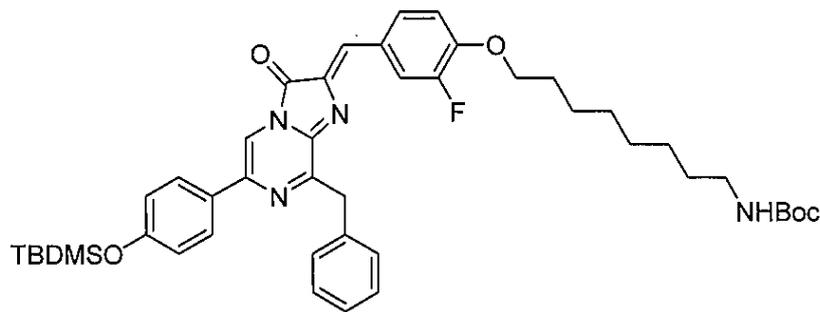
40

50



10

工程 1 . tert - ブチル ( Z ) - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) - 3 - オキソイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 ( 3 H ) - イリデン ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバメート ( J R W - 0 9 0 1 )



20

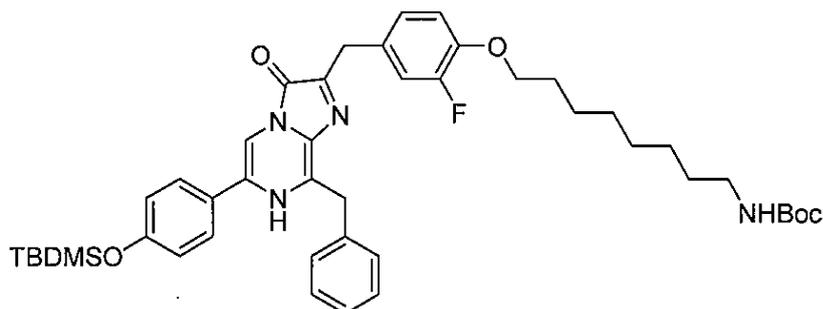
【 0 1 4 8 】

一般的手順 A に従って、tert - ブチル ( 8 - ( 2 - フルオロ - 4 - ホルミルフェノキシ ) オクチル ) カルバメート ( 3 5 7 m g 、 0 . 9 7 m m o l ) と、メチル 2 - ( ( 3 - ベンジル - 5 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) ピラジン - 2 - イル ) アミノ ) - 2 - ( ジエトキシホスホリル ) アセテート ( 5 3 0 m g 、 0 . 8 8 m m o l ) を反応させて、粗生成物 ( 3 6 0 m g ) を黒色固体として得た。

30

【 0 1 4 9 】

工程 2 . tert - ブチル ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバメート ( J R W - 0 9 0 2 )



40

【 0 1 5 0 】

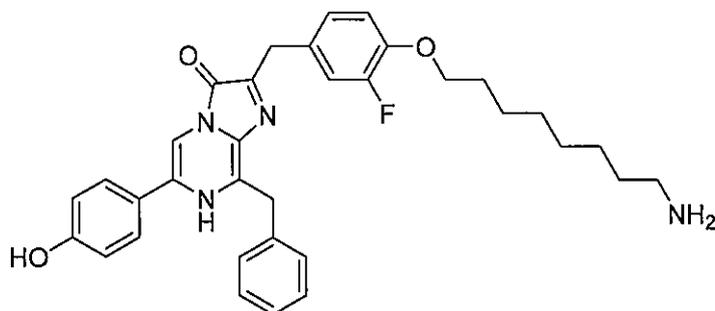
一般的手順 B に従って、tert - ブチル ( Z ) - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6

50

- (4 - (tert - ブチルジメチルシリル) オキシ) フェニル) - 3 - オキソイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 ( 3 H ) - イリデン) メチル) - 2 - フルオロフェノキシ) オクチル) カルバメート ( 3 6 0 m g , 0 . 4 6 m m o l ) と、水素化ホウ素ナトリウム ( 8 7 m g , 2 . 3 m m o l ) を反応させて、粗生成物をオレンジ色固体として得た。

【 0 1 5 1 】

工程 3 . 2 - ( 4 - ( ( 8 - アミノオクチル) オキシ) - 3 - フルオロベンジル) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( J R W - 0 9 0 4 )



10

【 0 1 5 2 】

一般的手順 C 及び D に従って、tert - ブチル ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( tert - ブチルジメチルシリル) オキシ) フェニル) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル) メチル) - 2 - フルオロフェノキシ) オクチル) カルバメートと、HCl / MeOH 及び TFA / DCM を反応させて、所望の生成物 ( 3 工程全体で 1 9 2 m g , 7 3 % ) をオレンジ色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR ( 4 0 0 M H z , C D <sub>3</sub> O D ) 7 . 6 7 - 7 . 3 8 ( m , 4 H ) , 7 . 3 2 ( t , J = 7 . 4 H z , 2 H ) , 7 . 2 8 - 7 . 2 3 ( m , 1 H ) , 7 . 1 5 - 7 . 0 2 ( m , 2 H ) , 7 . 0 3 - 6 . 9 6 ( m , 1 H ) , 6 . 9 5 - 6 . 8 6 ( m , 2 H ) , 4 . 4 3 ( s , 2 H ) , 4 . 1 2 ( s , 2 H ) , 4 . 0 2 ( t , J = 6 . 3 H z , 2 H ) , 2 . 9 2 ( t , J = 7 . 6 H z , 2 H ) , 1 . 8 7 - 1 . 7 4 ( m , 2 H ) , 1 . 7 4 - 1 . 6 0 ( m , 2 H ) , 1 . 5 7 - 1 . 4 7 ( m , 2 H ) , 1 . 4 6 - 1 . 3 8 ( m , 6 H ) ; ESI MS m / z 5 6 9 [ M + H ] <sup>+</sup> ; HPLC 9 7 . 0 % ( AUC ) , T<sub>R</sub> 4 . 4 7 分 ; UV ( MeOH ) 4 3 8 n m , 5 , 7 8 7 .

20

30

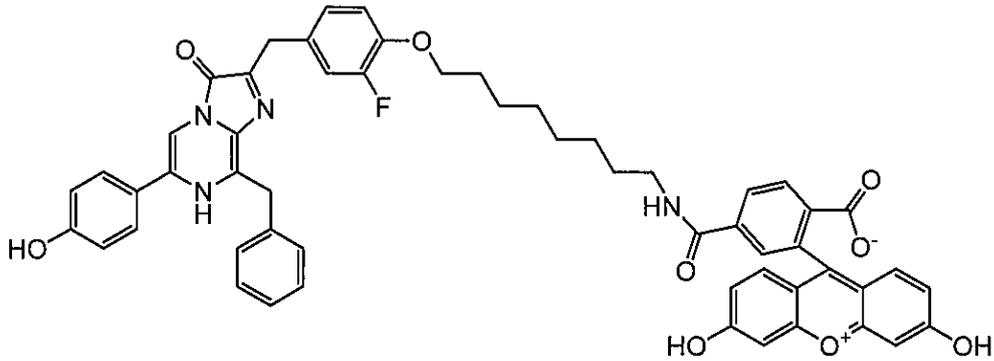
【 0 1 5 3 】

実施例 8

4 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル) メチル) - 2 - フルオロフェノキシ) オクチル) カルバモイル) - 2 - ( 3 , 6 - ジヒドロキシキサンチリウム - 9 - イル) ベンゾエート ( J R W - 0 9 0 6 )

40

50



10

一般的手順 G に従って、2 - ( 4 - ( ( 8 - アミノオクチル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( 30 mg、0.053 mmol ) と、2 - ( 3 , 6 - ジヒドロキシキサンチリウム - 9 - イル ) - 4 - ( ( 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル ) オキシ ) カルボニル ) ベンゾエート ( 30 mg、0.063 mmol ) を反応させて [ 注 : F A M - S E は、5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物であった ]、所望の生成物 ( 25 mg、52% ) をオレンジ色固体として得た。6 - 異性体が例示及び命名されているが、この実施例における生成物は、5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物である。<sup>1</sup>H NMR ( 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD ) 8.84 ( d, J = 1.7 Hz, 0.5 H, 異性体 A ), 8.52 - 8.44 ( m, 1.5 H ), 8.31 ( ddd, J = 21.2, 8.1, 1.7 Hz, 1 H ), 7.89 ( d, J = 1.7 Hz, 0.5 H, 異性体 B ), 7.82 - 7.76 ( m, 2 H ), 7.64 - 7.49 ( m, 3 H ), 7.48 - 7.37 ( m, 4 H ), 7.37 - 7.17 ( m, 5 H ), 7.14 - 6.99 ( m, 3 H ), 6.98 - 6.89 ( m, 2 H ), 4.62 ( s, 2 H ), 4.26 ( s, 2 H ), 4.02 - 3.99 ( m, 2 H ), 3.51 - 3.38 ( m, 2 H ), 1.87 - 1.59 ( m, 4 H ), 1.59 - 1.36 ( m, 8 H ); ESI MS m/z 927 [ M + H ]<sup>+</sup>; HPLC 89.5% ( AUC ) , T<sub>R</sub> 5.57 分; UV ( MeOH ) 444 nm, 24,071.

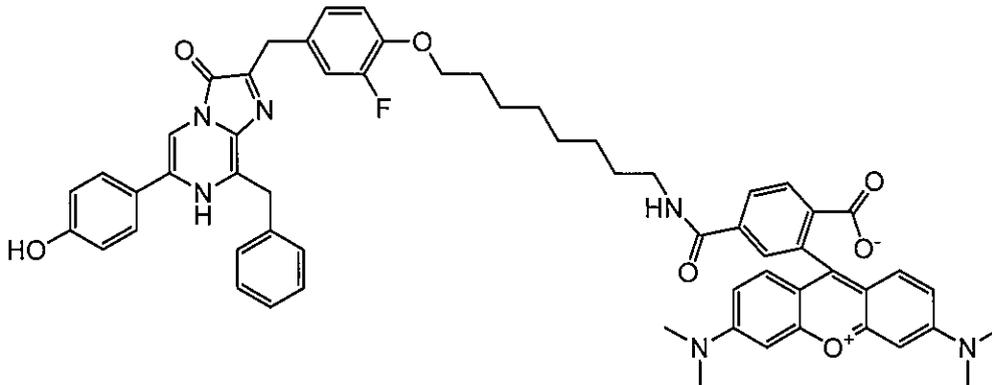
20

30

【 0154 】

## 実施例 9

4 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバモイル ) - 2 - ( 3 , 6 - ビス ( ジメチルアミノ ) キサンチリウム - 9 - イル ) ベンゾエート ( J R W - 0912 )



40

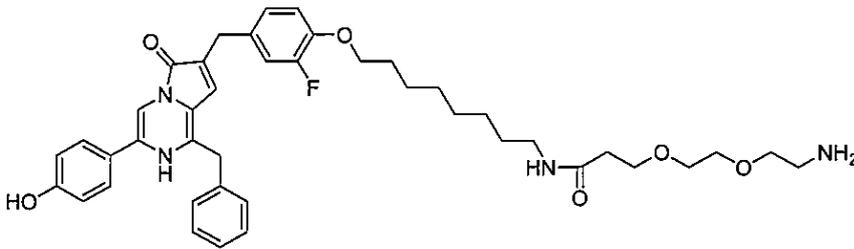
50

一般的手順 G に従って、2 - ( 4 - ( ( 8 - アミノオクチル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( 50 mg、0 . 088 mmol ) と、2 - ( 3 , 6 - ビス ( ジメチルアミノ ) キサンチリウム - 9 - イル ) - 4 - ( ( ( 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル ) オキシ ) カルボニル ) ベンゾエート ( 46 mg、0 . 088 mmol ) を反応させて、所望の生成物 ( 18 mg、20% ) を黒赤色固体として得た。注：化合物は、溶液において不安定であった。ESI MS  $m/z$  981 [ M + H ]<sup>+</sup>; HPLC 64 . 8% ( AUC ) , T<sub>R</sub> 5 . 09 分; UV ( MeOH ) 552 nm , 125 , 445 .

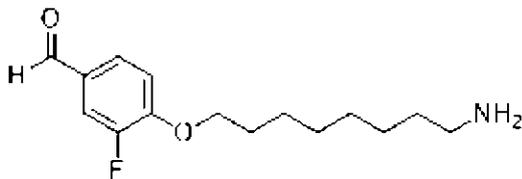
【 0155 】

実施例 10

3 - ( 2 - ( 2 - アミノエトキシ ) エトキシ ) - N - ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) プロパンアミド ( JRW - 0925 )



工程 1 . 4 - ( ( 8 - アミノオクチル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンズアルデヒド ( JRW - 0918 )

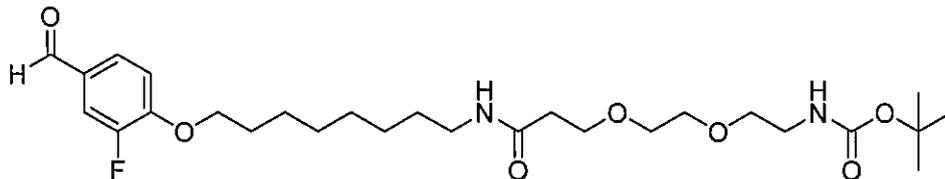


【 0156 】

一般的手順 D に従って、tert - ブチル ( 8 - ( 2 - フルオロ - 4 - ホルミルフェノキシ ) オクチル ) カルバメート ( 250 mg、0 . 68 mmol ) と、トリフルオロ酢酸 ( 1 mL ) を反応させて、粗生成物を無色油として得た。

【 0157 】

工程 2 . tert - ブチル ( 2 - ( 2 - ( 3 - ( ( 8 - ( 2 - フルオロ - 4 - ホルミルフェノキシ ) オクチル ) アミノ ) - 3 - オキソプロポキシ ) エトキシ ) エチル ) カルバメート ( JRW - 0919 )



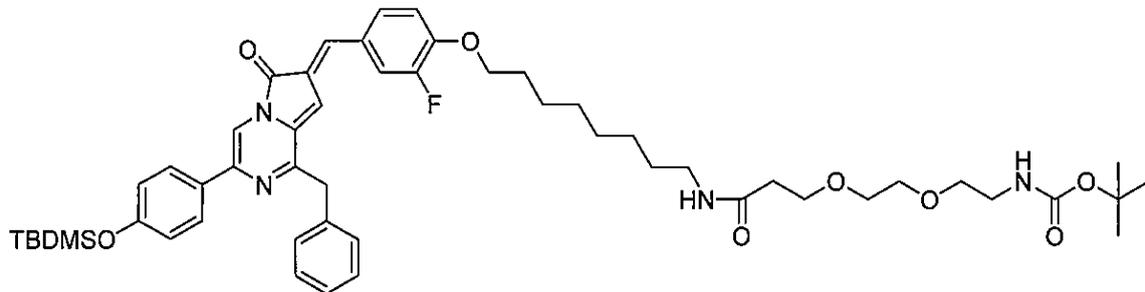
【 0158 】

DMF ( 5 mL ) 中の 2 , 2 - ジメチル - 4 - オキソ - 3 , 8 , 11 - トリオキサ - 5 - アザテトラデカン - 14 - オイックアシッド ( 226 mg、0 . 82 mmol ) の溶液

に、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(208 mg、1.4 mmol)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N-エチルカルボジイミド塩酸塩(260 mg、1.4 mmol)及びジイソプロピルエチルアミン(263 mg、2.0 mmol)を加えた。DMF(5 mL)中の4-(8-アミノオクチル)オキシ-3-フルオロベンズアルデヒド(0.68 mmol)を加え、その混合物を60℃まで30分加熱した。その反応物を酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィー(DCM/MeOH)で精製して、所望の生成物(300 mg、83%)を無色油として得た。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.87(d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.73 - 7.53(m, 2H), 7.11 - 7.04(m, 1H), 6.31(s, 1H), 5.00(s, 1H), 4.13(t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.76(t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.63(s, 4H), 3.56(dd, J = 5.6, 4.9 Hz, 2H), 3.40 - 3.18(m, 4H), 2.49(t, J = 5.8 Hz, 2H), 1.94 - 1.81(m, 2H), 1.47(s, 13H), 1.43 - 1.31(m, 6H); ESI MS m/z 527 [M+H]<sup>+</sup>.

## 【0159】

工程3. tert-ブチル(E)-(2-(2-(3-(8-(4-(1-ベンジル-3-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)-6-オキソピロロ[1,2-a]ピラジン-7(6H)-イリデン)メチル)-2-フルオロフェノキシ)オクチル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)エトキシ)エチル)カルバメート(JRW-0922)



## 【0160】

一般的手順Aに従って、tert-ブチル(2-(2-(3-(8-(2-フルオロ-4-ホルミルフェノキシ)オクチル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)エトキシ)エチル)カルバメート(285 mg、0.54 mmol)と、メチル2-(3-ベンジル-5-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)ピラジン-2-イル)アミノ)-2-(ジエトキシホスホリル)アセテート(325 mg、0.54 mmol)を反応させて、粗生成物(430 mg)を黒色固体として得た。

## 【0161】

工程4. tert-ブチル(2-(2-(3-(8-(4-(1-ベンジル-3-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)-6-オキソ-2,6-ジヒドロピロロ[1,2-a]ピラジン-7-イル)メチル)-2-フルオロフェノキシ)オクチル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)エトキシ)エチル)カルバメート(JRW-0923)

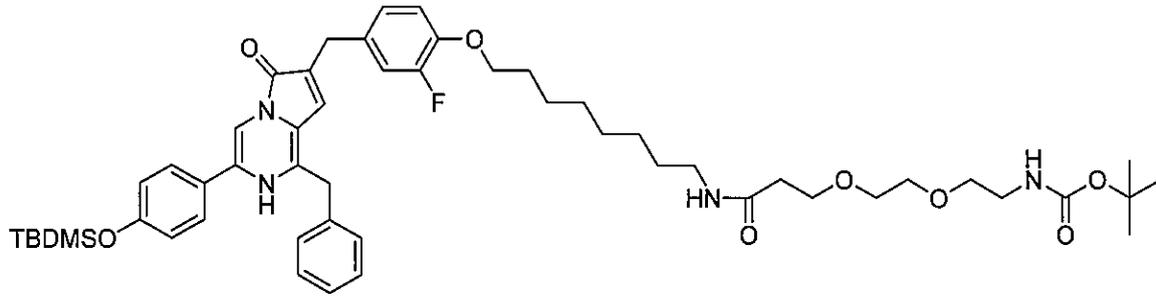
10

20

30

40

50



10

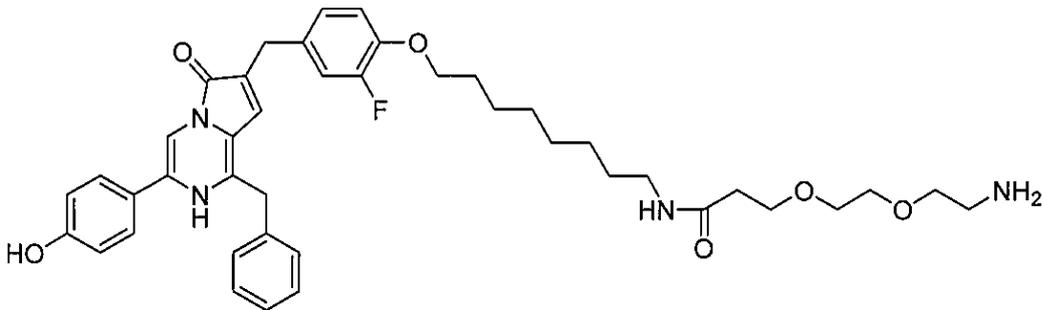
## 【0162】

一般的手順Bに従って、tert-ブチル(E)-(2-(2-(3-(8-(4-(1-ベンジル-3-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)-6-オキソピロロ[1,2-a]ピラジン-7(6H)-イリデン)メチル)-2-フルオロフェノキシ)オクチル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)エトキシ)エチル)カルバメート(430mg、0.46mmol)と、水素化ホウ素ナトリウム(86mg、2.3mmol)を反応させて、粗生成物(370mg)をオレンジ色固体として得た。

## 【0163】

工程5-(2-(2-アミノエトキシ)エトキシ)-N-(8-(4-(1-ベンジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)-6-オキソ-2,6-ジヒドロピロロ[1,2-a]ピラジン-7-イル)メチル)-2-フルオロフェノキシ)オクチル)プロパンアミド(JRW-0925)

20



30

## 【0164】

一般的手順C及びDに従って、tert-ブチル(2-(2-(3-(8-(4-(1-ベンジル-3-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)-6-オキソ-2,6-ジヒドロピロロ[1,2-a]ピラジン-7-イル)メチル)-2-フルオロフェノキシ)オクチル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)エトキシ)エチル)カルバメート(370mg、0.39mmol)と、HCl/MeOH及びTFA/DCMを反応させて、所望の生成物(3工程全体で180mg、46%)をオレンジ色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.70-7.38(m, 5H), 7.36-7.21(m, 3H), 7.16-6.96(m, 3H), 6.94-6.87(m, 2H), 4.43(s, 2H), 4.12(s, 2H), 4.02(t, J=6.4Hz, 2H), 3.80-3.59(m, 8H), 3.19(t, J=7.0Hz, 2H), 3.15-3.07(m, 2H), 2.45(t, J=6.1Hz, 2H), 1.84-1.71(m, 2H), 1.56-1.45(m, 4H), 1.45-1.29(m, 6H); ESI MS m/z 727 [M+H]<sup>+</sup>; HPLC 95.3%(AUC), T<sub>R</sub> 4.36分; UV(MeOH) 436nm, 6, 426.

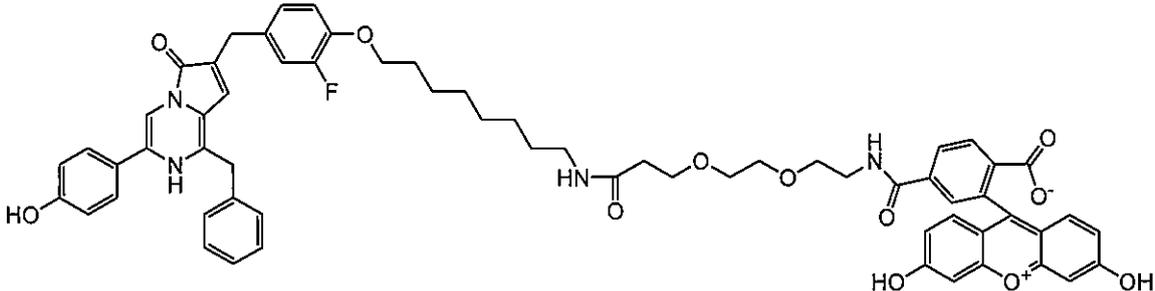
40

## 【0165】

50

## 実施例 1 1

4 - ( ( 2 - ( 2 - ( 3 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) アミノ ) - 3 - オキソプロポキシ ) エトキシ ) エチル ) カルバモイル ) - 2 - ( 3 , 6 - ジヒドロキシキサンチリウム - 9 - イル ) ベンゾエート ( J R W - 0 9 2 6 )

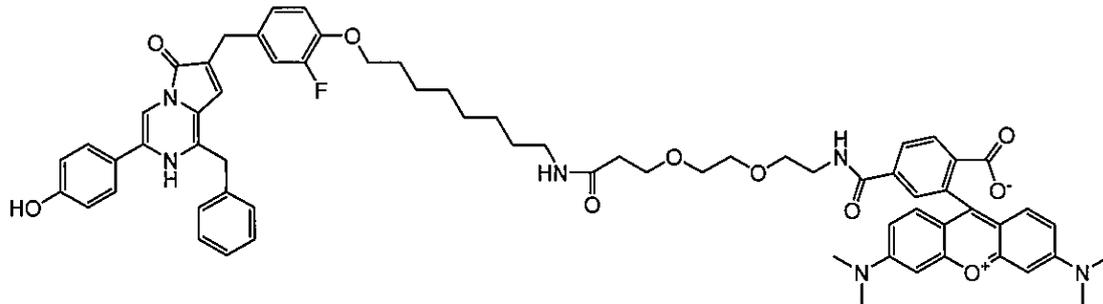


一般的手順 G に従って、 - ( 2 - ( 2 - アミノエトキシ ) エトキシ ) - N - ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) プロパンアミド ( 5 0 m g 、 0 . 0 6 9 m m o l ) と、 2 - ( 3 , 6 - ジヒドロキシキサンチリウム - 9 - イル ) - 4 - ( ( ( 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル ) オキシ ) カルボニル ) ベンゾエート ( 3 2 m g 、 0 . 0 6 9 m m o l ) を反応させて [ 注 : F A M - S E は、 5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物であった ]、 所望の生成物 ( 3 5 m g 、 4 7 % ) を橙褐色固体として得た。 6 - 異性体が例示及び命名されているが、 この実施例における生成物は、 5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物である。  $^1\text{H NMR}$  ( 4 0 0 M H z ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  ) 8 . 8 5 ( d ,  $J = 1 . 7 \text{ Hz}$  , 0 . 5 H , 異性体 A ) , 8 . 5 3 - 8 . 4 4 ( m , 1 . 5 H ) , 8 . 4 0 - 8 . 2 6 ( m , 1 H ) , 7 . 9 6 - 7 . 8 8 ( m , 0 . 5 H , 異性体 B ) , 7 . 8 2 - 7 . 7 6 ( m , 2 H ) , 7 . 6 4 - 7 . 4 8 ( m , 4 H ) , 7 . 4 8 - 7 . 4 2 ( m , 2 H ) , 7 . 4 2 - 7 . 3 7 ( m , 2 H ) , 7 . 3 6 - 7 . 2 8 ( m , 2 H ) , 7 . 2 8 - 7 . 1 8 ( m , 3 H ) , 7 . 1 3 - 6 . 9 7 ( m , 3 H ) , 6 . 9 7 - 6 . 8 9 ( m , 2 H ) , 4 . 6 3 ( s , 2 H ) , 4 . 2 7 ( s , 2 H ) , 4 . 0 2 - 3 . 9 8 ( m , 2 H ) , 3 . 8 2 - 3 . 5 3 ( m , 1 0 H ) , 3 . 2 8 - 3 . 1 3 ( m , 2 H ) , 2 . 5 9 - 2 . 5 2 ( m , 1 H ) , 2 . 5 1 - 2 . 4 3 ( m , 1 H ) , 1 . 8 2 - 1 . 6 8 ( m , 2 H ) , 1 . 5 8 - 1 . 4 1 ( m , 4 H ) , 1 . 4 2 - 1 . 2 7 ( m , 8 H ) ; E S I M S  $m/z$  1 0 8 6 [  $\text{M} + \text{H}$  ]  $^+$  ; H P L C 7 4 . 9 % ( A U C ) ,  $T_R$  5 . 0 8 分 ; U V ( M e O H ) 4 4 4 n m , 2 3 , 6 1 4 .

【 0 1 6 6 】

## 実施例 1 2

4 - ( ( 2 - ( 2 - ( 3 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) アミノ ) - 3 - オキソプロポキシ ) エトキシ ) エチル ) カルバモイル ) - 2 - ( 3 , 6 - ビス ( ジメチルアミノ ) キサンチリウム - 9 - イル ) ベンゾエート ( J R W - 0 9 2 7 )



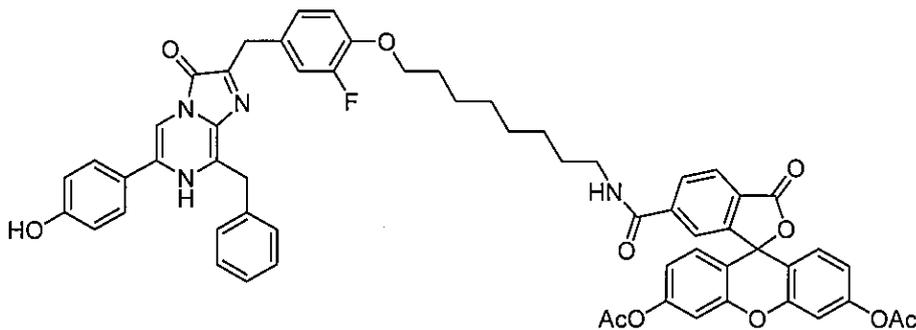
10

一般的手順 G に従って、- ( 2 - ( 2 - アミノエトキシ ) エトキシ ) - N - ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) プロパンアミド ( 50 mg、0.068 mmol ) と、2 - ( 3 , 6 - ビス ( ジメチルアミノ ) キサンチリウム - 9 - イル ) - 4 - ( ( ( 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル ) オキシ ) カルボニル ) ベンゾエート ( 36 mg、0.068 mmol ) を反応させて、所望の生成物 ( 18 mg、23% ) を黒赤色固体として得た。注：化合物は、溶液において不安定であった。ESI MS  $m/z$  1140 [M+H]<sup>+</sup>; HPLC 37.6% (AUC),  $T_R$  4.79 分; UV (MeOH) 552 nm, 89, 415. 【0167】

20

#### 実施例 13

6 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバモイル ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9' - キサンテン ] - 3' , 6' - ジイルジアセテート ( JRW - 0972 )



30

一般的手順 G に従って、2 - ( 4 - ( ( 8 - アミノオクチル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( 50 mg、0.068 mmol ) と、6 - ( ( ( 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル ) オキシ ) カルボニル ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9' - キサンテン ] - 3' , 6' - ジイルジアセテート ( 58 mg、0.10 mmol ) を反応させて [ 注：FAM-SEは、5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物であった ]、所望の生成物 ( 42 mg、47% ) をオレンジ色固体として得た。6 - 異性体が例示及び命名されているが、この実施例における生成物は、5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物である。注：化合物は、溶液において不安定であった。ESI MS  $m/z$  1011 [M+H]<sup>+</sup>; HPLC 45.7% (AUC),  $T_R$  5.83 分; UV (MeOH) 444 nm, 32, 826.

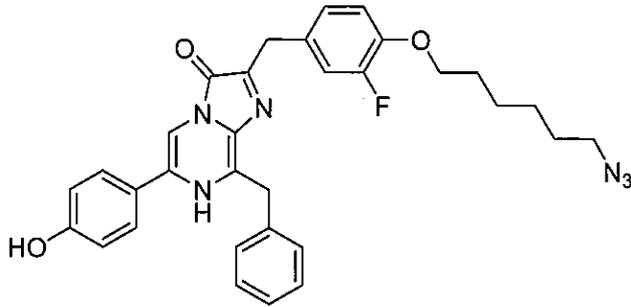
40

【0168】

#### 実施例 14

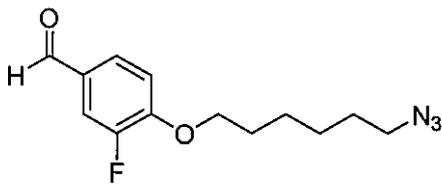
50

2 - ( 4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( J R W - 0 9 7 5 )



10

工程 1 . 4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンズアルデヒド ( J R W - 0 8 9 1 )



20

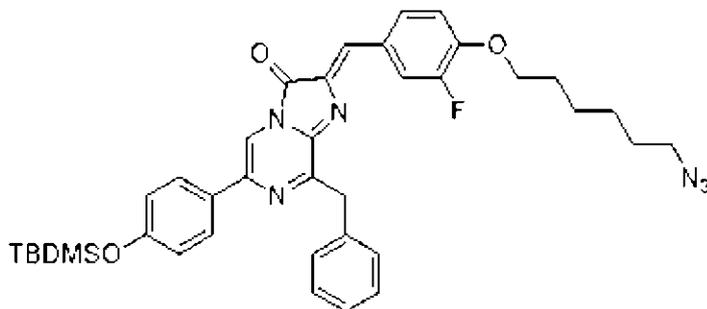
【 0 1 6 9 】

DMF ( 5 mL ) 中の 4 - ( ( 6 - ブロモヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンズアルデヒド ( 2 5 0 mg 、 0 . 0 8 2 mmol ) の溶液に、ナトリウムアジド ( 1 0 7 mg 、 1 . 6 mmol ) を加えた。その反応物を 6 0 まで 1 8 時間加熱した。その反応物を酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮して、粗生成物 ( 2 2 0 mg ) を無色油として得た。<sup>1</sup>H NMR ( 4 0 0 MHz , CDCl<sub>3</sub> ) 9 . 8 8 ( d , J = 2 . 1 Hz , 1 H ) , 7 . 7 3 - 7 . 5 3 ( m , 2 H ) , 7 . 0 8 ( t , J = 8 . 2 Hz , 1 H ) , 4 . 1 5 ( t , J = 6 . 4 Hz , 2 H ) , 3 . 3 2 ( t , J = 6 . 8 Hz , 2 H ) , 1 . 9 0 ( d t , J = 8 . 0 , 6 . 4 Hz , 2 H ) , 1 . 8 1 - 1 . 4 0 ( m , 6 H ) .

30

【 0 1 7 0 】

工程 2 . 2 - ( 4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジリデン ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 2 H ) - オン ( J R W - 0 9 6 9 )



40

【 0 1 7 1 】

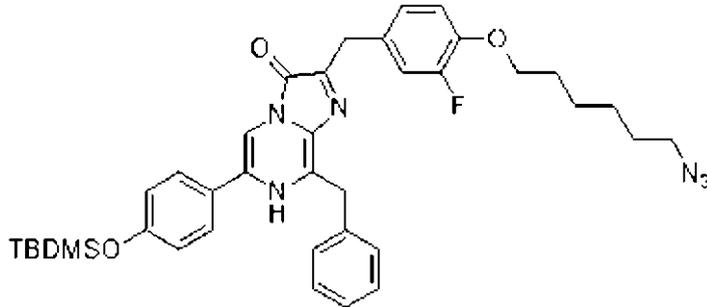
一般的手順 A に従って、4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンズアルデヒド ( 1 0 6 mg 、 0 . 4 0 mmol ) と、メチル 2 - ( ( 3 - ベンジル - 5 - (

50

4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) ピラジン - 2 - イル ) アミノ ) - 2 - ( ジエトキシホスホリル ) アセテート ( 200 mg、0.33 mmol ) を反応させて、粗生成物 ( 120 mg ) を黒色固体として得た。

【 0172 】

工程 3.2 - ( 4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) イミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( J R W - 0974 )



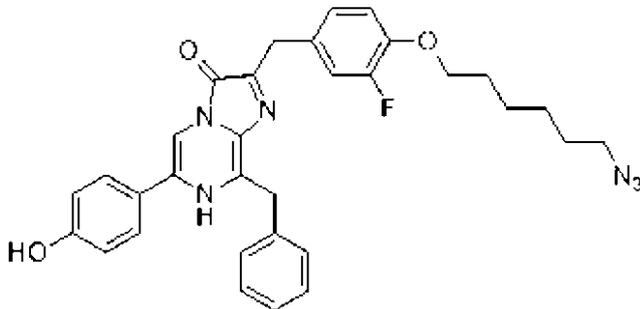
10

【 0173 】

一般的手順 B に従って、2 - ( 4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジリデン ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) イミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 3 ( 2 H ) - オン ( 120 mg、0.18 mmol ) と、水素化ホウ素ナトリウム ( 20 mg、0.53 mmol ) を反応させて、粗生成物を黄色固体として得た。

【 0174 】

工程 4.2 - ( 4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( J R W - 0975 )



30

【 0175 】

一般的手順 C に従って、2 - ( 4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) イミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( 0.18 mmol ) と、HCl / MeOH を反応させて、所望の生成物 ( 3 工程全体で 67 mg、36% ) をオレンジ色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR ( 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD ) 7.67 - 7.43 ( m, 3 H ), 7.43 - 7.37 ( m, 2 H ), 7.35 - 7.20 ( m, 3 H ), 7.15 - 7.03 ( m, 2 H ), 6.98 ( t, J = 8.5 Hz, 1 H ), 6.92 - 6.86 ( m, 2 H ), 4.41 ( s, 2 H ), 4.11 ( s, 2 H ), 4.01 ( t, J = 6.3 Hz, 2 H ), 3.29 ( t, J = 6.8 Hz, 2 H ), 1.77 ( dt, J = 8.0, 6.3 Hz, 2 H ), 1.70 - 1.38 ( m, 6 H ); ESI MS m/z 567 [ M + H ]<sup>+</sup>; HPLC 99.0% ( AUC ), T<sub>R</sub> 5.85 分; UV ( MeOH ) 438 nm, 10,

40

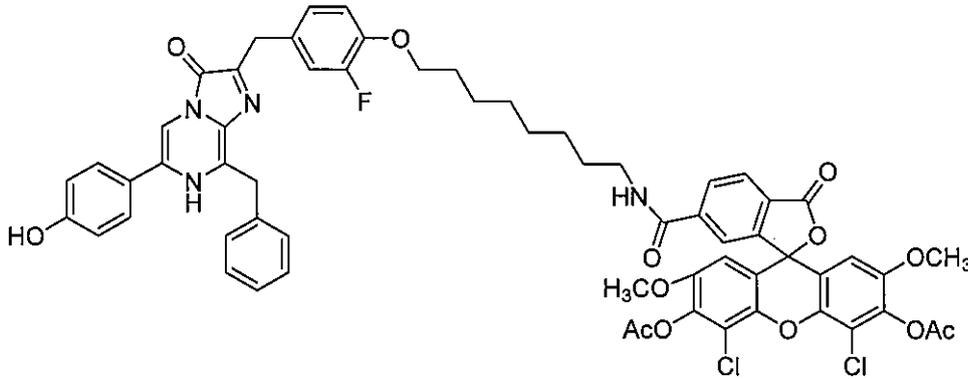
50

4 1 9 .

【 0 1 7 6 】

## 実施例 1 5

6 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバモイル ) - 4 ' , 5 ' - ジクロロ - 2 ' , 7 ' - ジメトキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 3 ' , 6 ' - ジイルジアセテート ( J R W - 0 9 8 6 )



10

20

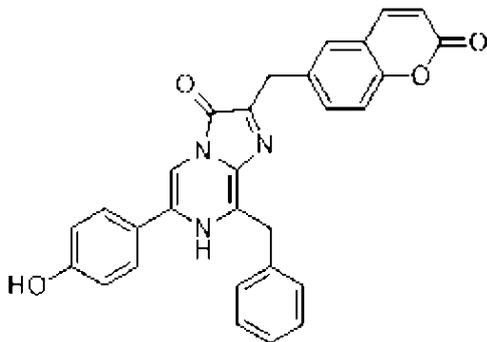
一般的手順 G に従って、2 - ( 4 - ( ( 8 - アミノオクチル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( 4 2 m g , 0 . 0 7 4 m m o l ) と、4 ' , 5 ' - ジクロロ - 6 - ( ( ( 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル ) オキシ ) カルボニル ) - 2 ' , 7 ' - ジメトキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 3 ' , 6 ' - ジイルジアセテート ( 5 5 m g , 0 . 0 8 1 m m o l ) を反応させて [ 注 : J O E - S E は、5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物であった ]、所望の生成物 ( 4 0 m g , 4 7 % ) を赤色固体として得た。6 - 異性体が例示及び命名されているが、この実施例における生成物は、5 - 異性体と 6 - 異性体の混合物である。注：化合物は、溶液において不安定であった。E S I M S m / z 1 1 4 1 [ M + H ] + ; H P L C 7 3 . 4 % ( A U C ) , T R 6 . 4 5 分 ; U V ( M e O H ) 4 7 2 n m , 4 , 4 3 3 .

30

【 0 1 7 7 】

## 実施例 1 6

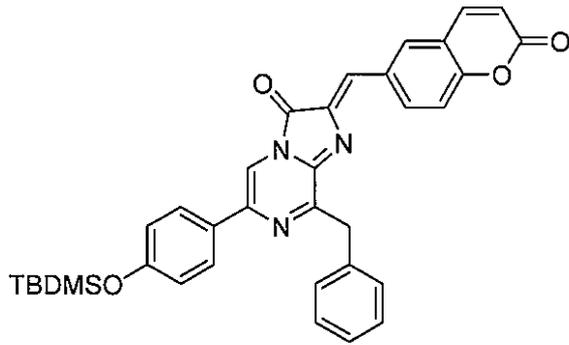
8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 2 - ( ( 2 - オキソ - 2 H - クロメン - 6 - イル ) メチル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( J R W - 0 9 9 5 )



40

工程 1 . 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( t e r t - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) - 2 - ( ( 2 - オキソ - 2 H - クロメン - 6 - イル ) メチレン ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 2 H ) - オン ( J R W - 0 9 9 2 )

50



10

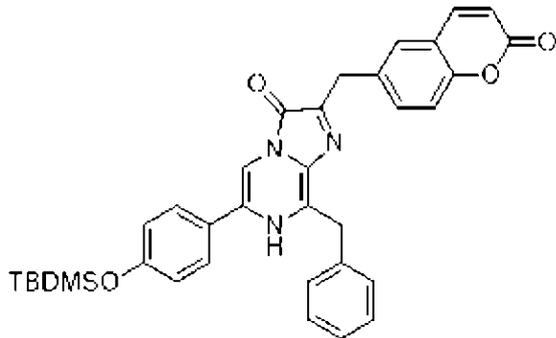
## 【0178】

一般的手順Aに従って、2-オキソ-2H-クロメン-6-カルバルデヒド(52mg、0.30mmol)と、メチル2-((3-ベンジル-5-(4-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)ピラジン-2-イル)アミノ)-2-(ジエトキシホスホリル)アセテート(150mg、0.25mmol)を反応させて、粗生成物を黒色固体として得た。

## 【0179】

工程2.8-ベンジル-6-(4-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)-2-((2-オキソ-2H-クロメン-6-イル)メチル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン(JRW-0993)

20



30

## 【0180】

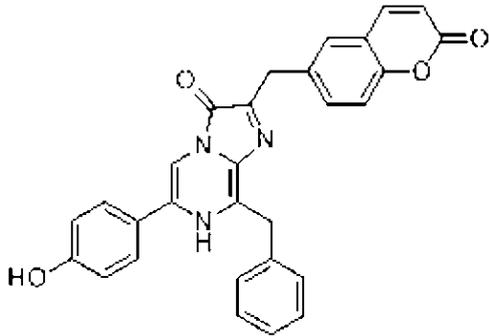
一般的手順Bに従って、8-ベンジル-6-(4-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)-2-((2-オキソ-2H-クロメン-6-イル)メチレン)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(2H)-オン(0.25mmol)と、水素化ホウ素ナトリウム(47mg、1.2mmol)を反応させて、粗生成物(45mg)をオレンジ色固体として得た。

## 【0181】

工程3.8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-2-((2-オキソ-2H-クロメン-6-イル)メチル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン(JRW-0995)

40

50



10

## 【0182】

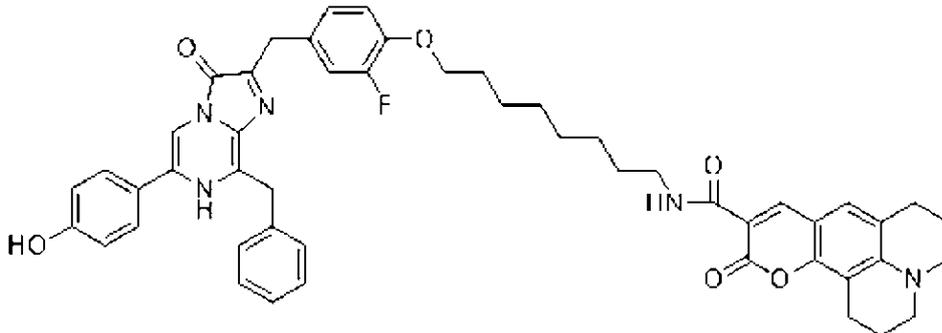
一般的手順Cに従って、8-ベンジル-6-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)-2-(2-オキソ-2H-クロメン-6-イル)メチル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン(45mg、0.076mmol)と、HCl/MeOHを反応させて、所望の生成物(3工程全体で32mg、27%)をオレンジ色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.90(d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.68 - 7.53(m, 3H), 7.51 - 7.35(m, 4H), 7.35 - 7.18(m, 4H), 6.93 - 6.86(m, 2H), 6.41(d, J = 9.5 Hz, 1H), 4.41(s, 2H), 4.25(s, 2H); ESI MS m/z 476 [M+H]<sup>+</sup>; HPLC 85.3% (AUC), T<sub>R</sub> 4.47分; UV (MeOH) 439nm, 8214.

20

## 【0183】

## 実施例17

N-(8-(4-(8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-3-オキソ-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-2-イル)メチル)-2-フルオロフェノキシ)オクチル)-11-オキソ-2,3,6,7-テトラヒドロ-1H,5H,11H-ピラノ[2,3-f]ピリド[3,2,1-ij]キノリン-10-カルボキサミド(JRW-1023)



30

一般的手順Gに従って、2-(4-(8-アミノオクチル)オキシ)-3-フルオロベンジル)-8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン(50mg、0.088mmol)と、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル11-オキソ-2,3,6,7-テトラヒドロ-1H,5H,11H-ピラノ[2,3-f]ピリド[3,2,1-ij]キノリン-10-カルボキシレート(67mg、0.17mmol)を反応させて、所望の生成物(24mg、33%)をオレンジ色固体として得た。ESI MS m/z 836 [M+H]<sup>+</sup>; HPLC 76.0% (AUC), T<sub>R</sub> 6.43分.

40

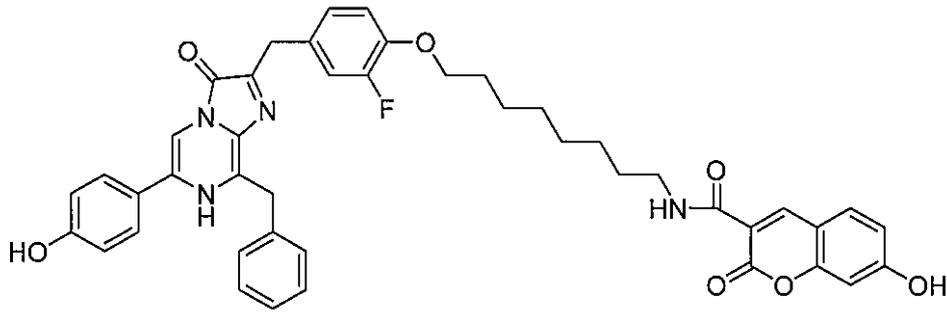
## 【0184】

## 実施例18

N-(8-(4-(8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-3-オキソ-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-2-イル)メチル)-2-フルオロ

50

フェノキシ)オクチル)-7-ヒドロキシ-2-オキソ-2H-クロメン-3-カルボキサミド(JRW-1018)



10

一般的手順Gに従って、2-(4-(8-アミノオクチル)オキシ)-3-フルオロベンジル)-8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン(41mg、0.072mmol)と、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル7-ヒドロキシ-2-オキソ-2H-クロメン-3-カルボキシレート(43mg、0.14mmol)を反応させて、所望の生成物(36mg、67%)を褐色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 8.71(s, 1H), 8.45(s, 1H), 7.84-7.69(m, 2H), 7.63(d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.53(s, 1H), 7.48-7.39(m, 2H), 7.35-7.18(m, 3H), 7.12-6.96(m, 3H), 6.96-6.85(m, 3H), 6.75(d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.61(s, 2H), 4.24(s, 2H), 4.00(t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.40-3.35(m, 2H), 1.81-1.69(m, 2H), 1.66-1.53(m, 2H), 1.53-1.33(m, 8H); ESI MS m/z 757 [M+H]<sup>+</sup>; HPLC 91.2% (AUC), T<sub>R</sub> 5.69分; UV (MeOH) 350nm, 23646.

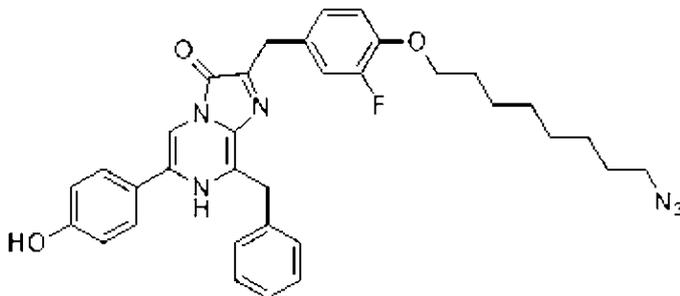
20

【0185】

実施例19

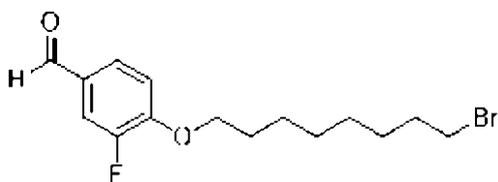
2-(4-(8-アジドオクチル)オキシ)-3-フルオロベンジル)-8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン(JRW-1022)

30



40

工程1.4-(8-ブロモオクチル)オキシ)-3-フルオロベンズアルデヒド(JRW-1016)



【0186】

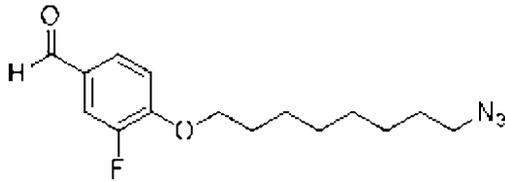
50

アセトニトリル (20 mL) 中の 3 - フルオロ - 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (1.1 g、7.9 mmol) の溶液に、1, 8 - ジブromoオクタン (2.8 g、10 mmol) 及び炭酸セシウム (3.1 g、9.4 mmol) を加えた。その反応物を 60 °C まで 18 時間加熱した。その反応物を酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮して、所望の生成物 (1.56 g、60%) を無色油として得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.87 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.85 - 7.48 (m, 2H), 7.08 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 4.13 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.43 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.00 - 1.73 (m, 4H), 1.73 - 1.20 (m, 8H) .

10

【0187】

工程 2.4 - ((8 - アジドオクチル) オキシ) - 3 - フルオロベンズアルデヒド (JRW - 1017)



【0188】

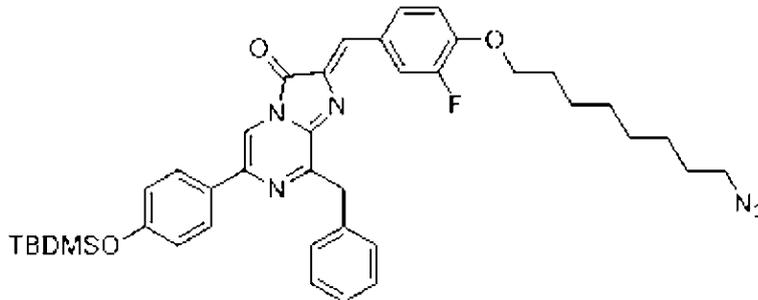
20

DMF (5 mL) 中の 4 - ((8 - ブromoオクチル) オキシ) - 3 - フルオロベンズアルデヒド (250 mg、0.075 mmol) の溶液に、ナトリウムアジド (98 mg、1.5 mmol) を加えた。その反応物を 60 °C まで 18 時間加熱した。その反応物を酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮して、粗生成物 (220 mg) を無色油として得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.87 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.80 - 7.48 (m, 2H), 7.25 - 6.87 (m, 1H), 4.13 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.29 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.00 - 1.75 (m, 2H), 1.75 - 1.24 (m, 10H) .

【0189】

30

工程 3.2 - (4 - ((8 - アジドオクチル) オキシ) - 3 - フルオロベンジリデン) - 8 - ベンジル - 6 - ((tert - ブチルジメチルシリル) オキシ) フェニル) イミダゾ [1, 2 - a] ピラジン - 3 (2H) - オン (JRW - 1020)



40

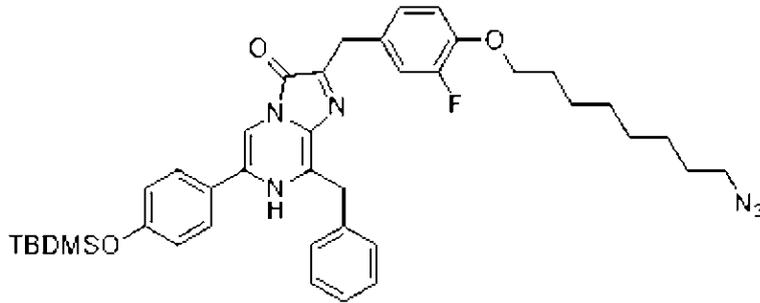
【0190】

一般的手順 A に従って、4 - ((8 - アジドオクチル) オキシ) - 3 - フルオロベンズアルデヒド (64 mg、0.22 mmol) と、メチル 2 - ((3 - ベンジル - 5 - ((tert - ブチルジメチルシリル) オキシ) フェニル) ピラジン - 2 - イル) アミノ) - 2 - (ジエトキシホスホリル) アセテート (110 mg、0.18 mmol) を反応させて、粗生成物を黒色固体として得た。

【0191】

50

工程 4 . 2 - ( 4 - ( ( 8 - アジドオクチル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( J R W - 1 0 2 1 )



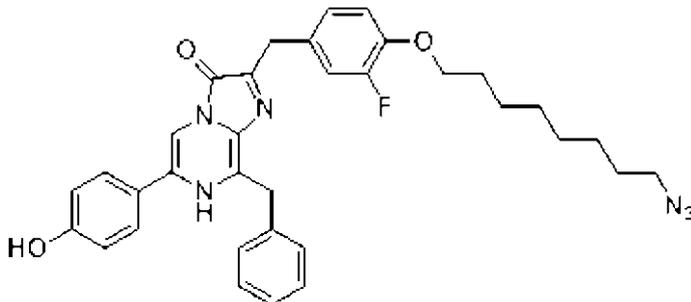
10

## 【 0 1 9 2 】

一般的手順 B に従って、2 - ( 4 - ( ( 8 - アジドオクチル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジリデン ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 2 H ) - オン ( 0 . 1 8 m m o l ) と、水素化ホウ素ナトリウム ( 2 0 m g 、 0 . 5 4 m m o l ) を反応させて、粗生成物を黄色固体として得た。

## 【 0 1 9 3 】

工程 5 . 2 - ( 4 - ( ( 8 - アジドオクチル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( J R W - 1 0 2 2 )



30

## 【 0 1 9 4 】

一般的手順 C に従って、2 - ( 4 - ( ( 8 - アジドオクチル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ( ( tert - ブチルジメチルシリル ) オキシ ) フェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン ( 0 . 1 8 m m o l ) と、HCl / MeOH を反応させて、所望の生成物 ( 3 工程全体で 6 4 m g 、 6 0 % ) をオレンジ色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR ( 4 0 0 M H z , C D <sub>3</sub> O D ) 7 . 6 9 - 7 . 3 7 ( m , 5 H ) , 7 . 3 5 - 7 . 2 0 ( m , 3 H ) , 7 . 1 6 - 7 . 0 3 ( m , 2 H ) , 6 . 9 8 ( t , J = 8 . 5 H z , 1 H ) , 6 . 9 3 - 6 . 8 7 ( m , 2 H ) , 4 . 4 2 ( s , 2 H ) , 4 . 1 1 ( s , 2 H ) , 4 . 0 1 ( t , J = 6 . 4 H z , 2 H ) , 3 . 2 7 ( t , J = 6 . 9 H z , 2 H ) , 1 . 8 5 - 1 . 7 1 ( m , 2 H ) , 1 . 6 7 - 1 . 3 0 ( m , 1 0 H ) ; E S I M S m / z 5 9 5 [ M + H ] <sup>+</sup> ; H P L C 9 9 . 2 % ( A U C ) , T <sub>R</sub> 6 . 2 5 分 ; U V ( M e O H ) 4 3 8 n m , 1 0 , 5 3 6 .

40

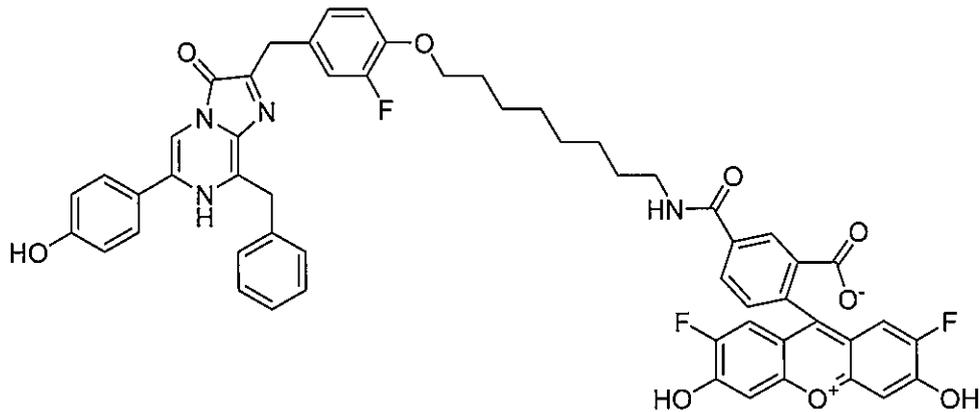
## 【 0 1 9 5 】

## 実施例 2 0

5 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキシ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオ

50

ロフェノキシ)オクチル)カルバモイル)-2-(2,7-ジフルオロ-3,6-ジヒドロキシキサンチリウム-9-イル)ベンゾエート(JRW-1058)



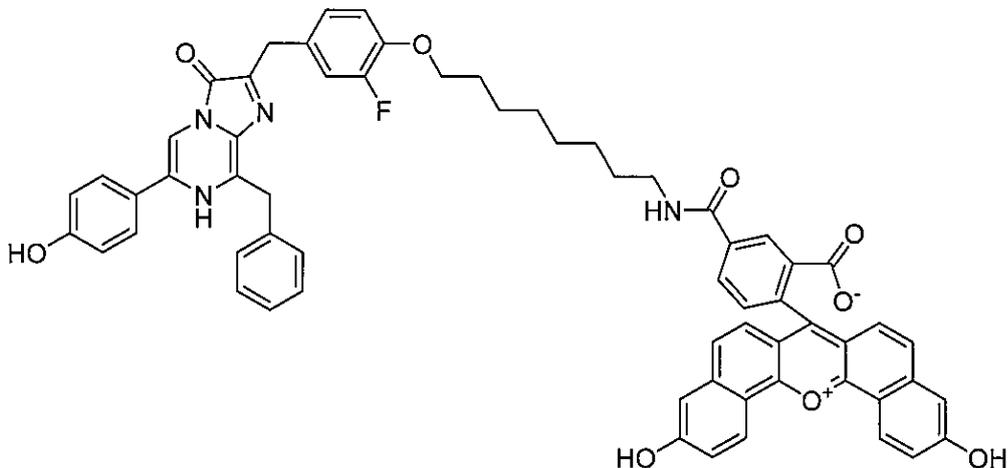
10

一般的手順Gに従って、2-(4-((8-アミノオクチル)オキシ)-3-フルオロベンジル)-8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン(15mg、0.026mmol)と、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル2',7'-ジフルオロ-3',6'-ジヒドロキシ-3-オキソ-3H-スピロ[イソベンゾフラン-1,9'-キサンテン]-5-カルボキシレート(13mg、0.026mmol)を反応させて、所望の生成物(12mg、48%)を赤色固体として得た。ESI MS m/z 963 [M+H]<sup>+</sup>; HPLC 58.1% (AUC), T<sub>R</sub> 5.50分; UV (MeOH) 280nm, 21,600.

【0196】

#### 実施例21

5-((8-(4-((8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-3-オキソ-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-2-イル)メチル)-2-フルオロフェノキシ)オクチル)カルバモイル)-2-(3,11-ジヒドロキシジベンゾ[c,h]キサンテン-7,1'-イソベンゾフラン)-5'-カルボキシレート(JRW-1059)



30

40

一般的手順Gに従って、2-(4-((8-アミノオクチル)オキシ)-3-フルオロベンジル)-8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン(25mg、0.044mmol)と、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル3,11-ジヒドロキシ-3'-オキソ-3'H-スピロ[ジベンゾ[c,h]キサンテン-7,1'-イソベンゾフラン]-5'-カルボキシレート(25mg、0.044mmol)を反応させて、所望の生成物(13mg、28%)を褐色固体とし

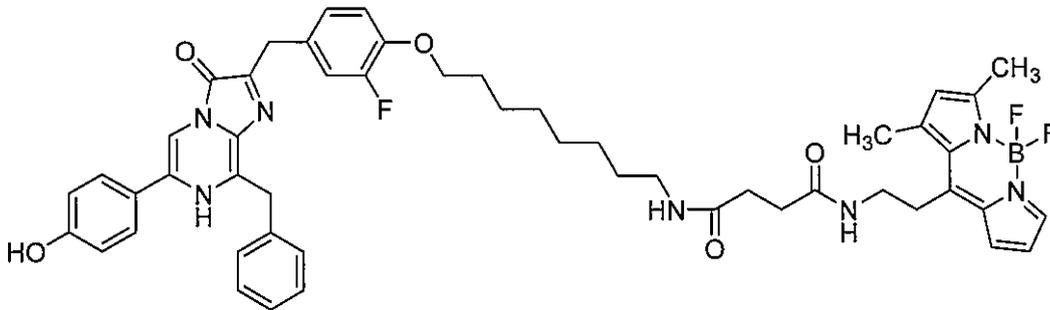
50

て得た。ESI MS  $m/z$  1028  $[M+H]^+$ ; HPLC 82.3% (AUC),  $T_R$  5.71分; UV (MeOH) 528nm, 11,800.

【0197】

実施例22

N1-(8-(4-(8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-3-オキソ-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-2-イル)メチル)-2-フルオロフェノキシ)オクチル)-N4-(2-(5,5-ジフルオロ-1,3-ジメチル-5H-5<sup>4</sup>,6<sup>4</sup>-ジピロロ[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]ジアザポリニン-10-イル)エチル)コハク酸アミド(JRW-1088)



10

【0198】

一般的手順Gに従って、2-(4-(8-アミノオクチル)オキシ)-3-フルオロベンジル)-8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン(30mg、0.052mmol)と、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル4-(2-(5,5-ジフルオロ-1,3-ジメチル-5H-5<sup>4</sup>,6<sup>4</sup>-ジピロロ[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]ジアザポリニン-10-イル)エチル)アミノ)-4-オキソブタノエート(48mg、0.10mmol)を反応させて、所望の生成物(16mg、33%)を褐色固体として得た。ESI MS  $m/z$  914  $[M+H]^+$ ; HPLC 75.6% (AUC),  $T_R$  5.63分; UV (MeOH) 490nm, 48,754.

20

【0199】

実施例23

発光特性

発光アッセイ手順:スクリーニングする各化合物をDMSO(5mM)に溶解してから、NANO-GLO(登録商標)Luciferase Assay Bufferにおいて100 $\mu$ Mまでさらに希釈した。最初に、基質をNANO-GLO(登録商標)Luciferase Assay Buffer中に2倍段階希釈することによって、Km値を求めた。続いて、基質希釈液と、TBS+0.01%BSAにおいて4ng/mlまで希釈した当量のNanoLucを合わせた。基質の100 $\mu$ M希釈液とTBS+0.01%BSAを合わせることによって、自己発光を測定した。発光値及び自己発光値は、基質を加えてから3分後に、GloMax(登録商標)-Multi+という発光測定装置で測定した。TBS+0.01%BSAにおいて、当量の100 $\mu$ M基質と、4ng/mlのNanoLucを合わせることによって、シグナルの減衰を測定してから、GloMax(登録商標)-Multi+を用いて、試料を5分間隔で2時間、読み取った。100 $\mu$ Mにおける発光値及び自己発光値が図1に示されている。Kmは、非線形のカールスメンテンの回帰を用いたGraphPad Prismを用いて算出した。GraphPad Prismの非線形減衰(プラトーを0に設定した)を用いて、シグナル半減期の値を算出した。光出力、シグナル半減期及びKmの値は、表1にまとめられている。値は、各カテゴリーにおいて、フリマジン(1とした場合)の相対値として表されている(2ng/mlのNanoLucにおいて約 $2.0 \times 10^7$ のRLU)。

30

40

表1

50

化合物	RLU (100 $\mu$ M における 値)	シグナル半減期	Km
フリマジン	1	1	1
フリマジン-h	1	0.04	NT
JRW-0855	0.004	1.2	10
JRW-0857	0.00000029	0.8	NC
JRW-0892-2	0.04	0.3	1.4
JRW-0893	0.05	2.2	5.7
JRW-0900	0.00094	3.1	2.2
JRW-0905	NT	NT	NT
JRW-0906	0.036	2.6	16
JRW-0912	0.000061	NC	NC
JRW-0925	0.02	0.12	2.3

10

20

30

40

50

JRW-0926	0.04	1.2	17
JRW-0927	0.0000024	NC	NC
JRW-0972	0.00005	NC	2.2
JRW-0975	0.005	NC	4.8
JRW-0986	0.00005	NC	4.3
JRW-0995	0.009	NC	2.3
JRW-1018	NT	NT	NT
JRW-1022	NT	NT	NT
JRW-1023	NT	NT	NT
JRW-1058	NT	NT	NT
JRW-1059	NT	NT	NT
JRW-1088	NT	NT	NT
JRW-1549	NT	NT	NT
JRW-1566	NT	NT	NT

10

20

30

NT - 未試験

NC - 算出不能

## 【0200】

動態的読み取り手順：フリマジン（8 - ベンジル - 2 - （フラン - 2 - イルメチル） - 6 - フェニルイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 （7H） - オン）またはフリマジン - h（8 - ベンジル - 2 - （フラン - 2 - イルメチル） - 6 - （4 - ヒドロキシフェニル）イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 （7H） - オン）をエタノール：プロピレングリコール（85：15）（5mM）に溶解してから、NANO - GLO（登録商標）Luciferase Assay Bufferにおいて様々な濃度までさらに希釈した。続いて、各希釈基質を当量で、pH 6.8のリン酸緩衝生理食塩水中に希釈した精製NanoLuc（登録商標）ルシフェラーゼと合わせた。各基質の光出力をGloMax（登録商標） - Multi + という発光測定装置で、様々な長さの時間にわたって測定した。フリマジン及びフリマジン - hのシグナル半減期の動態的読み取り値が図2に示されている。

40

50

## 【0201】

## 実施例24

NanoLuc (登録商標) ルシフェラーゼ (Nluc) の阻害

化合物は、NanoLucによるフリマジンの発光をブロックする能力についても試験した。典型的には、DMEM中のNanoLuc ( $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を、フリマジンまたは試験化合物 ( $50 \mu\text{M}$ ) のいずれかとともにインキュベートしながら、RLUを発光測定装置GloMax (登録商標) で10~60分モニタリングした。設定時間の経過後、プレートをその装置から取り出し、試験化合物の入ったウェルに、ある用量のフリマジン ( $10 \mu\text{M}$ ) を加え、10~60分モニタリングした。

## 【0202】

自殺阻害：図3A~Bには、Nlucルシフェラーゼのフリマジン-hによる阻害が示されている。フリマジン-h ( $10 \mu\text{M}$ ) をNanoLucとともに、NanoGlo中で15分、またはDMEM中で10分インキュベートした。この明るいシグナルは速やかに、フリマジンのポジティブコントロールウェルで観察されるシグナルの数分の1まで低下する。インキュベーション期間後、フリマジン-hの入ったウェルに、様々な濃度のフリマジンを加え、これらのフリマジンを追加しても、生物発光は増大せず、NanoLucが阻害されることが示されている。

## 【0203】

例示的なNluc自殺基質の他の例が、図4A~Fに示されている。勘案すると、これらの結果から、フリマジン-h、JRW-0893、JRW-0892-2、JRW-0906、JRW-0926、JRW-0975及びJRW-1058が、NanoLucの例示的な自殺基質であることが示されている。

## 【0204】

図9には、Nlucルシフェラーゼのフリマジン-hによる阻害が示されている。これは、図3と比較すると、逆添加実験である。フリマジン ( $10 \mu\text{M}$ ) をNanoLucとともに、NanoGlo (登録商標) 緩衝液中で15分インキュベートした。インキュベーション期間後、フリマジンの入ったウェルに、様々な濃度のフリマジン-hを加え、これらのフリマジン-hの添加により、シグナルが急速に減衰する。これにより、フリマジン-hが、フリマジンと競合してNlucから排除することができ、生物発光反応が起きる際に、Nlucが、その自殺基質によって阻害されることが示されている。

## 【0205】

部分的阻害：Nlucに対する非常に弱い基質である試験化合物では、フリマジンを加えたところ、生物発光は部分的にしか阻害されなかった。これらの部分的阻害剤では典型的には、NanoLucとインキュベートした場合、フリマジンの生物発光活性の約1%未満になった。図5A~Bには、JRW-0855及びJRW-1088の部分的阻害活性が示されている。JRW-0855及びJRW-1088は、NanoLucとともに、DMEM中で12分インキュベートした。図に示されているように、JRW-0855及びJRW-1088とNanoLucとの反応における初期発光シグナルは、フリマジンとNanoLucとの反応における初期発光シグナルよりも有意に低かった。インキュベーション期間後、 $10 \mu\text{M}$ のフリマジンをウェルに加えた。フリマジンを加えたところ、生物発光が部分的に回復し、Nlucが、JRW-0855及びJRW-1088によって部分的にしか阻害されないことが示された。他の例示的な部分的Nluc阻害剤としては、JRW-0904、JRW-0925、JRW-0995、JRW-1018及びJRW-1022が挙げられた。

## 【0206】

阻害の欠如：NanoLucの基質ではない試験化合物では、フリマジンを加えたところ、生物発光は阻害されなかった。図6A~Bには、JRW-0857及びJRW-1059が、NanoLucを阻害できないことが示されている。フリマジンを加えたところ、生物発光が大きく増大したことから、NanoLucが阻害されないことが示された。NanoLucを阻害しなかった試験化合物の例としては、JRW-0857、JRW-

10

20

30

40

50

0900、JRW-0912、JRW-0927、JRW-0972、JRW-0986  
及びJRW-1023が挙げられる。

【0207】

勘案すると、これらの試験の結果から、NanoLucの阻害は、開示されている化合物をNanoLucとインキュベートすると生じる初期生物発光反応の結果であることが示唆されている。したがって、阻害活性を有する化合物は、自殺基質と称する。これらの基質の作用機序を理解するためには、さらなる試験が必要である。

【0208】

実施例25

NanoBit (商標) 2分子ルシフェラーゼ系の阻害

化合物は、NanoBit (商標) 2分子ルシフェラーゼを阻害する能力についても試験した。HiBit (配列番号3) 及びLgBit (配列番号4) (NanoBit (商標) ルシフェラーゼの2つのサブユニット) をフリマジンまたはフリマジン-hとともに15分インキュベートした。インキュベーション期間後、10 $\mu$ Mのフリマジンを加えた。図7に示されているように、フリマジン-hは、Nlucとインキュベーション後、初めに、フリマジンの発光シグナルに匹敵する発光シグナルを生成する。このシグナルは、フリマジンのポジティブコントロールウェルで観察されるシグナルの数分の1まで速やかに低下する。フリマジンのポジティブコントロールウェルにフリマジンを加えると、生物発光が増大する。対照的に、フリマジンをフリマジン-hのウェルに加えると、生物発光は増大しないことから、NanoBit (商標) ルシフェラーゼが、フリマジン-hによって効果的に阻害されることが示されている。

【0209】

実施例26

蛍光イメージング

自殺基質がNanoLucを標識するのをさらに示すために、NanoLucを2つの蛍光性FAM-基質セレンテラジン、JRW-0906及びJRW-0926とともにインキュベートした。それらのNanoLuc自殺基質の効率、HaloTagタンパク質 (配列番号5) がグルタチオントランスフェラーゼ (GST) またはNanoLucのいずれかに融合されている融合タンパク質によって、クロロアルカン-FAMという基質と比較した。

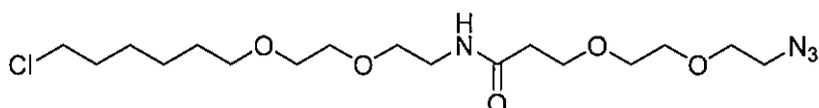
【0210】

FAMクロロアルカンまたはセレンテラジンFAMという基質のいずれかをグルタチオントランスフェラーゼ-HaloTag (GST-HT) またはNanoLuc-HaloTag (Nluc-HT) 融合体のいずれかとともにインキュベートした。その反応物は、0.5 $\mu$ Mのタンパク質 (GST-HTまたはNluc-HT) 及び50 $\mu$ Mの標識 (100 $\times$ 過剰の標識) を有するものであり、30分、室温でインキュベートした。続いて、各試料の試料漸増量をSDS/PAGEゲルに流した。蛍光 (473ex) (Cy2フィルターセット) を読み取り、定量した。図8Aに示されているように、基質であるクロロアルカン及びセレンテラジンのいずれでも、用量依存的な標識が見られる。結果は、図8Bに定量化されている。図8Bに示されているように、FAMが付加された自殺基質 (JRW-0906) は、クロロアルカン-HT系の約50%の効率で、NanoLucを標識できる。

【0211】

実施例27

3-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)-N-(2-(2-(6-クロロヘキシル)オキシ)エトキシ)エチル)プロパンアミド (JRW-1505)



10

20

30

40

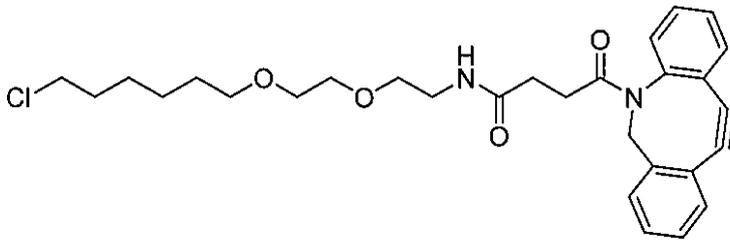
50

DMF (5 mL) 中の 2 - ( 2 - ( ( 6 - クロロヘキシル ) オキシ ) エトキシ ) エタン - 1 - アミン ( 60 mg, 0.27 mmol ) 及び 2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 3 - ( 2 - ( 2 - アジドエトキシ ) エトキシ ) プロパノエート ( 80 mg, 0.27 mmol ) の溶液に、トリメチルアミン ( 54 mg, 0.54 mmol ) を加えた。その反応物を室温で 3 時間撹拌した。その反応物を酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮し、クロマトグラフにかけて、所望の生成物 ( 38 mg, 34% ) を無色油として得た。ESI MS  $m/z$  409 [M+H]<sup>+</sup>.

【0212】

実施例 28

( 2 - ( 2 - ( ( 6 - クロロヘキシル ) オキシ ) エトキシ ) エチル ) コハク酸アミド - DBCO ( JRW - 1550 )



10

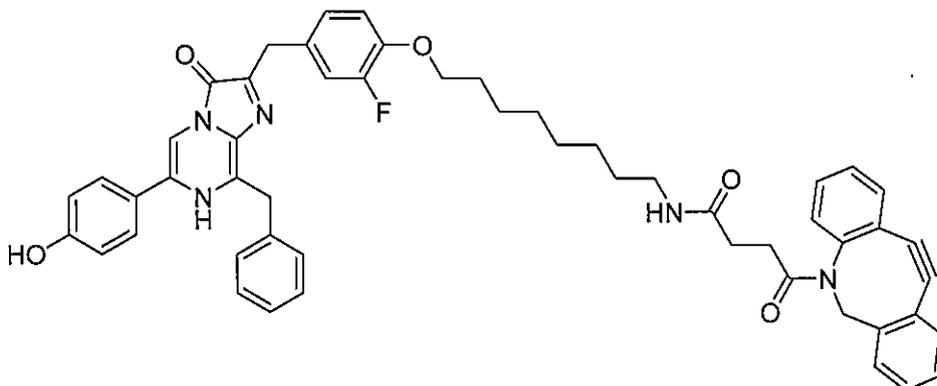
20

DMF (5 mL) 中の 2 - ( 2 - ( ( 6 - クロロヘキシル ) オキシ ) エトキシ ) エタン - 1 - アミン ( 20 mg, 0.090 mmol ) 及び 2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 4 - DBCO - アミノ - 4 - オキソブタノエート ( 36 mg, 0.090 mmol ) の溶液に、トリメチルアミン ( 18 mg, 0.18 mmol ) を加えた。その反応物を室温で 4 時間撹拌した。その反応物を酢酸エチルで希釈し、有機層を水で洗浄した。その有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮し、クロマトグラフにかけて、所望の生成物 ( 37 mg, 80% ) を淡褐色油として得た。ESI MS  $m/z$  512 [M+H]<sup>+</sup>.

【0213】

実施例 29

N<sup>1</sup> - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3, 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) - N<sup>4</sup> - DBCO - コハク酸アミド ( JRW - 1549 )



30

40

一般的手順 G に従って、2 - ( 4 - ( ( 8 - アミノオクチル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7H ) - オン ( 25 mg, 0.044 mmol ) と、2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 4 - DBCO - アミノ - 4 - オキソブタノエート ( 21 mg, 0.053 mmol ) を反応させて、所望の生成物 ( 23 mg, 62% ) をオレンジ色固体として

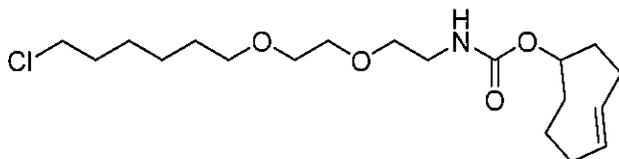
50

得た。ESI MS  $m/z$  857  $[M+H]^+$ .

【0214】

実施例 30

(E)-シクロオクト-4-エン-1-イル(2-(2-(6-クロロヘキシル)オキシ)エトキシ)エチル)カルバメート(JRW-1567)



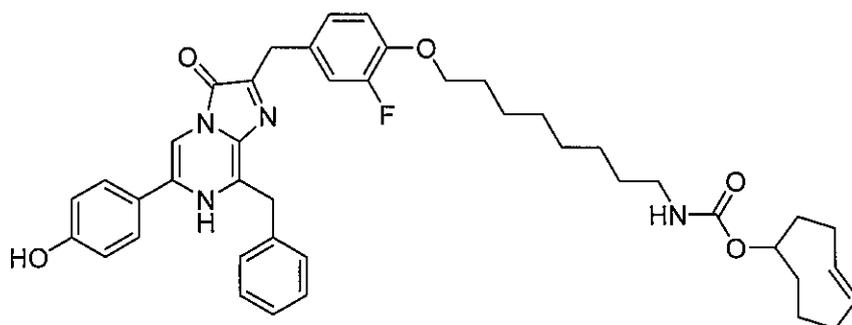
10

DCM (5 mL) 中の 2-(2-(6-クロロヘキシル)オキシ)エタン-1-アミン (20 mg、0.090 mmol) 及び (E)-シクロオクト-4-エン-1-イル(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)カーボネート (24 mg、0.090 mmol) の溶液に、トリメチルアミン (18 mg、0.18 mmol) を加えた。その反応物を室温で3時間攪拌した。その反応物をDCMで希釈し、セライトを加えた。その混合物を濃縮し、クロマトグラフにかけて、所望の生成物 (27 mg、81%) を無色油として得た。ESI MS  $m/z$  376  $[M+H]^+$ .

【0215】

実施例 31

(E)-シクロオクト-4-エン-1-イル(8-(4-(8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル))-3-オキソ-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-2-イル)メチル)-2-フルオロフェノキシ)オクチル)カルバメート(JRW-1566)



30

一般的手順 G に従って、2-(4-(8-アミノオクチル)オキシ)-3-フルオロベンジル)-8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ピラジン-3(7H)-オン (25 mg、0.044 mmol) と、(E)-シクロオクト-4-エン-1-イル(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)カーボネート (14 mg、0.053 mmol) を反応させて、所望の生成物 (13 mg、40%) をオレンジ色固体として得た。ESI MS  $m/z$  721  $[M+H]^+$ .

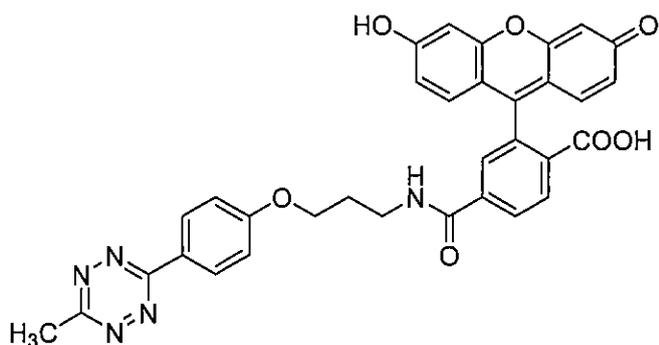
【0216】

実施例 32

2-(6-ヒドロキシ-3-オキソ-3H-キサンテン-9-イル)-4-(3-(4-(6-メチル-1,2,4,5-テトラジン-3-イル)フェノキシ)プロピル)カルバモイル)安息香酸(JRW-1577)

40

50



10

DMF (5 mL) 中の 3 - ( 4 - ( 6 - メチル - 1 , 2 , 4 , 5 - テトラジン - 3 - イル ) フェノキシ ) プロパン - 1 - アミン塩酸塩 ( 25 mg , 0 . 089 mmol ) 及び 4 - ( ( ( 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル ) オキシ ) カルボニル ) - 2 - ( 6 - ヒドロキシ - 3 - オキソ - 3 H - キサンテン - 9 - イル ) 安息香酸 ( 31 mg , 0 . 066 mmol ) の溶液に、ジイソプロピルエチルアミン ( 34 mg , 0 . 27 mmol ) を加えた。その反応物を室温で 2 時間攪拌した。その反応物を酢酸エチルで希釈し、有機層を NH<sub>4</sub>Cl の溶液で洗浄した。その有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮し、クロマトグラフにかけて、所望の生成物 ( 16 mg , 30 % ) を赤色固体として得た。E S I M S m / z 604 [ M + H ]<sup>+</sup> .

20

【 0 2 1 7 】

## 実施例 3 3

アジド - DBCO 対での直接標識及び 2 段階標識の蛍光イメージングによる比較

実施例 26 では、色素が付加された自殺基質が、NanoLuc を標識することが蛍光イメージングによって示されている。この実施例では、アジドが付加された自殺基質が、2 段階式の手順 ( その第 2 の工程は、DBCO が付加された FAM 色素との銅フリーのクリックケミストリーである ) で、NanoLuc - HaloTag タンパク質を標識することが示されている。この実施例では、NanoLuc を JRW - 0926 で直接標識する方法、NanoLuc を JRW - 0975 及び DBCO - FAM で 2 段階標識する方法、NanoLuc を JRW - 1022 及び DBCO - FAM で 2 段階標識する方法、HaloTag を FAM - HT リガンドで直接標識する方法、ならびにアジドが付加された SE で 2 段階標識する方法という 5 つの方法を比較した。この実施例で使用した化合物の構造は、図 10A に示されている。

30

【 0 2 1 8 】

100 mM のトリス ( pH 8 . 0 ) 中の 0 . 5 uM の NanoLuc - HaloTag を 1 時間、50 uM のチューブ 1 ( JRW - 1505 )、チューブ 2 ( FAM - HaloTag リガンド )、チューブ 3 ( JRW - 0926 )、チューブ 4 ( JRW - 0975 )、チューブ 5 ( JRW - 1022 ) 及びチューブ 6 ( SE - アジド ) とともにインキュベートした。第 2 の工程では、100 uM の DBCO - FAM を 4 時間、チューブ 1、4、5 及び 6 においてインキュベートしてから、すべての試料について SDS / PAGE ゲルで解析した ( 図 10B )。NanoLuc - HaloTag のサイズに対応するバンドの蛍光 ( 473 ex ) ( Cy2 フィルターセット ) を読み取り、定量した。

40

【 0 2 1 9 】

チューブ 1 では、2 段階標識が HaloTag リガンド - アジド及び DBCO - FAM で行われることが示されている。チューブ 2 及び 3 では、HaloTag または NanoLuc がクロロアルカンまたは自殺基質で直接標識されることが示されている。チューブ 4 及び 5 では、アジドが付加された自殺基質で 2 段階標識が行われることが示されている。チューブ 6 では、そのタンパク質上の利用可能なリシンでの 2 段階標識が示されている。

【 0 2 2 0 】

50

第2の実験では、100mMのトリス（またはDPBS緩衝液）（pH8.0）中の1.5μMのNanoLuc-HaloTagを50μMのJRW-0975、FAM-HaloTagリガンド、JRW-0926、JRW-1022またはSE-アジドとともに、1時間インキュベートした。第2の工程では、100μMのDBCO-FAMを4時間、チューブ3、4及び5とともにインキュベートしてから、SDS/PAGEゲルで分析した（図11A）。NanoLuc-HaloTagのサイズに対応するバンドの蛍光（473ex）（Cy2フィルターセット）を読み取り、定量した（図11B）。

#### 【0221】

両方の実験から得られたデータによって、アジド付加されたリガンド及びDBCO-FAMでの2段階標識が示されている。しかしながら、この構成では、直接標識の方が効率的であると見られる。

10

#### 【0222】

##### 実施例34

TCO-テトラジン対での直接標識及び2段階標識の蛍光イメージングによる比較

実施例33と同様に、NanoLuc-HaloTagタンパク質を化合物とともにインキュベートして、直接標識するか、FAMを用いる2段階プロセスによって標識するかした。この実施例で使用した追加の化合物の構造は、図12Aに示されている。化合物をNanoLuc-HaloTag融合タンパク質とともにインキュベートし、SDS/PAGEゲル上での蛍光イメージングによって解析した。

#### 【0223】

チューブ1.1では、2段階標識がDBCO-HaloTagリガンド（JRW-1550）及びアジド-FAMで行われることが示されている。チューブ1.2では、HaloTagがFAM-HaloTagリガンド（図10Aに示されている構造）で直接標識されることが示されている。チューブ1.3では、2段階標識が、アジドの付加された自殺基質（JRW-1022）及びDBCO-FAM（図10Aに示されている構造）で行われることが示されている。チューブ1.4では、DBCOの付加された自殺基質（JRW-1549）及びアジド-FAMで標識がほぼ行われなことが示されている。チューブ1.5では、SE-DBCO及びアジド-FAMによって、そのタンパク質上の利用可能なリシンの標識がほぼ行われなことが示されている。チューブ2.1では、2段階標識がTCO-HaloTagリガンド（JRW-1567）及びテトラジン-FAM（JRW-1577）で行われることが示されている。チューブ2.2では、HaloTagがFAM-HaloTagリガンドで直接標識されることが示されている。チューブ2.3では、NanoLucが、TCOの付加された自殺基質（JRW-1566）及びテトラジン-FAM（JRW-1577）で2段階標識されることが示されている。チューブ2.4では、そのタンパク質上において、利用可能なリシンで、SE-TCO及びテトラジン-FAM（JRW-1577）によって2段階標識されることが示されている。SDS-PAGEゲルが図12Bに示されており、バンド量解析の結果が図12Cに示されている。

20

30

#### 【0224】

両方の実施例から得られたデータによって、アジドの付加されたリガンド及びDBCO-FAMでの2段階標識が示されている。DBCOが付加されたリガンドによる実験では、アジドが付加されたリガンドでの標識は示されていない。TCOが付加されたリガンドでの2段階標識は、テトラジンが付加されたリガンドで示されている。これらの構成では、直接標識の方が効率的であると見られるが、TCO及びテトラジン-FAMを有する自殺基質は、直接標識の場合とほぼ同等であり、アジド-FAMを有するDCBOリガンド、アジドリガンド、及びDBCO-FAMよりもかなり効率的である。

40

#### 【0225】

上記の詳細な説明及び添付の実施例は、例示的なものに過ぎず、本発明の範囲を限定するものとして解釈すべきではなく、本発明の範囲は、添付の請求項及びそれらの均等物によってのみ定義されることは理解される。

50

## 【0226】

開示されている実施形態に対する様々な変更及び修正は、当業者には明らかであろう。このような変更及び修正は、化学構造、置換基、誘導体、中間体、合成、組成物、調合物または本発明の使用方法に関するものを含め（ただし、これらに限らない）、本発明の趣旨及び範囲から逸脱せずに行ってもよい。

## 【0227】

付録

配列番号1 - 天然型の成熟 *Oplophorus* ルシフェラーゼのアミノ酸配列

F T L A D F V G D W Q Q T A G Y N Q D Q V L E Q G G L S S L F Q A L G V S V T  
P I Q K V V L S G E N G L K A D I H V I I P Y E G L S G F Q M G L I E M I F K V  
V Y P V D D H H F K I I L H Y G T L V I D G V T P N M I D Y F G R P Y P G I A V  
F D G K Q I T V T G T L W N G N K I Y D E R L I N P D G S L L F R V T I N G V T  
G W R L C E N I L A

10

## 【0228】

配列番号2 - NanoLuc (Nluc) のアミノ酸配列

M V F T L E D F V G D W R Q T A G Y N L D Q V L E Q G G V S S L F Q N L G V S  
V T P I Q R I V L S G E N G L K I D I H V I I P Y E G L S G D Q M G Q I E K I F  
K V V Y P V D D H H F K V I L H Y G T L V I D G V T P N M I D Y F G R P Y E G I  
A V F D G K K I T V T G T L W N G N K I I D E R L I N P D G S L L F R V T I N G  
V T G W R L C E R I L A

20

## 【0229】

配列番号3 - HiBiT

V S G W R L F K K I S

## 【0230】

配列番号4 - LgBiT

M V F T L E D F V G D W R Q T A G Y N L D Q V L E Q G G V S S L F Q N L G V S  
V T P I Q R I V L S G E N G L K I D I H V I I P Y E G L S G D Q M G Q I E K I F  
K V V Y P V D D H H F K V I L H Y G T L V I D G V T P N M I D Y F G R P Y E G I  
A V F D G K K I T V T G T L W N G N K I I D E R L I N P D G S L L F R V T I N

30

## 【0231】

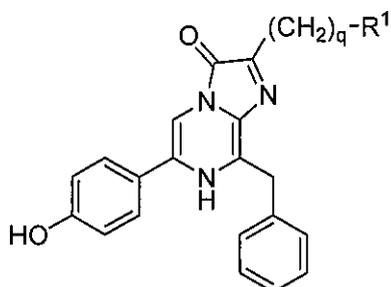
配列番号5 - HaloTag タンパク質

M A E I G T G F P F D P H Y V E V L G E R M H Y V D V G P R D G T P V L F L H  
G N P T S S Y V W R N I I P H V A P T H R C I A P D L I G M G K S D K P D L G Y  
F F D D H V R F M D A F I E A L G L E E V V L V I H D W G S A L G F H W A K R N  
P E R V K G I A F M E F I R P I P T W D E W P E F A R E T F Q A F R T T D V G R  
K L I I D Q N V F I E G T L P M G V V R P L T E V E M D H Y R E P F L N P V D R  
E P L W R F P N E L P I A G E P A N I V A L V E E Y M D W L H Q S P V P K L L F  
W G T P G V L I P P A E A A R L A K S L P N C K A V D I G P G L N L L Q E D N P  
D L I G S E I A R W L S T L E I S G

40

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕下記の式(I)の化合物、



50

## ( I )

またはその互変異性体もしくは塩であって、式中、

$R^1$ が、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環または任意に置換されたシクロアルキルであり、 $R^1$ が、 $-Q-L-Z$ である少なくとも1つの基で置換されており、

$Q$ が、 $-O-$ 、 $-NR^Q-$ 、 $-NR^Q-CO-$ 、 $-CO-NR^Q-$ 、 $-O-CO-NR^Q-$ または $-NR^Q-CO-O-$ であり、

$L$ が、 $-(CR^{1a}R^{1b})_m-$ 、 $-(CR^{1x}R^{1y}-CR^{1x}R^{1y}-O)_{t1}-$ 、 $(CR^{1x}R^{1y})_{t2}-Q^1-$ 、 $-(CR^{1x}R^{1y})_{t2}-A-$ 、 $(CR^{1x}R^{1y}-CR^{1x}R^{1y}-O)_{t1}-Q^1-$ 、 $-(CR^{1x}R^{1y})_{t3}-A-$ 、 $(CR^{1x}R^{1y}-CR^{1x}R^{1y}-O)_{t1}-$ 、 $(CR^{1x}R^{1y})_{t2}$  - または  $-(CR^{1x}R^{1y})_{t3}-A-$ 、 $(CR^{1x}R^{1y})_{t4}$  - であり、各  $Q^1$  が独立して、結合手、 $-O-$  または  $-NR^{Q1}-$  であり、各  $A$  が独立して、結合手、 $-O-$ 、 $-NR^Q-$ 、 $-NR^Q-CO-$ 、 $-CO-NR^Q-$ 、 $-O-CO-NR^Q-$  または  $-NR^Q-CO-O-$  であり、

$Z$ が、 $-COOR^2$ 、 $-SO_2-OR^3$ 、 $-PO(OR^4)(OR^5)$ 、ハロ、アジド、 $C_2-C_{10}$ アルキニル、ピオチン部分、 $-NR^6R^7$ 、 $-NR^8-CO-R^9$ 、 $-CO-R^{10}$  または  $-NR^{11}-CO-O-R^{12}$  であり、

$R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$  及び  $R^{12}$  が各出現ごとに独立して、水素、任意に置換された  $C_1-C_8$  アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたヘテロアルキルまたはエネルギーアクセプターであり、

$R^6$  及び  $R^7$  が各出現ごとに独立して、水素、任意に置換された  $C_1-C_8$  アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたヘテロアルキルもしくはエネルギーアクセプターであるか、または  $R^6$  及び  $R^7$  が、それらと結合している窒素原子と一体となって、任意に置換された環を形成し、

$R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^Q$ 、 $R^{Q1}$ 、 $R^{1x}$  及び  $R^{1y}$  が各出現ごとに独立して、水素、 $C_1-C_4$  アルキルまたは  $C_1-C_4$  ハロアルキルであり、

$q$  が、0、1 または 2 であり、

$m$  が各出現ごとに独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 であり、

$t_1$  が各出現ごとに独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 であり、

$t_2$  が、0 ~ 5 の整数であり、

$t_3$  が各出現ごとに、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 であり、

$t_4$  が、0 ~ 5 の整数であり、

前記化合物が、4 - [ 4 - [ [ 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 7H - イミダゾ [ 1, 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ] メチル ] フェノキシ ] ブタン酸ではない前記化合物、またはその互変異性体もしくは塩。

[ 2 ]  $q$  が 1 である、前記 [ 1 ] に記載の化合物。

[ 3 ]  $R^1$  が、 $-Q-L-Z$  という 1 つの置換基で置換されたフェニルであり、任意に、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アシルアミノ、アミノアルキル、スルホニルアミノ、スルフィニルアミノ、スルホニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、アミノスルホニル、スルフィニル、 $-COOH$ 、ケトン、アミド、カルバメート、シリル、置換シリル、 $t$ -ブチルジメチルシリル、アルキルスルファニル、スルファニル及びアシルから独立して選択した 1 つまたは 2 つの置換基でさらに置換されており、

$Q$  が、 $-O-$ 、 $-NR^Q-$ 、 $-NR^Q-CO-$ 、 $-CO-NR^Q-$ 、 $-O-CO-NR^Q-$  または  $-NR^Q-CO-O-$  であり、

$L$  が、 $-(CR^{1a}R^{1b})_m-$  であり、

10

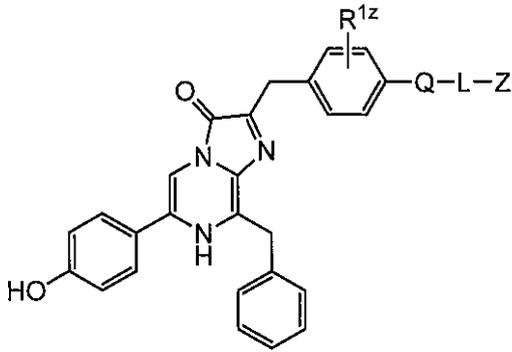
20

30

40

50

Zが、 $-SO_2-OR^3$ 、アジド、 $-NR^6R^7$ または $-NR^8-CO-R^9$ であり、  
 $R^3$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 及び $R^8$ が独立して、水素、任意に置換された $C_1-C_8$ アルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたヘテロアリールまたは任意に置換された複素環であり、  
 $R^9$ が、任意に置換されたヘテロアルキルまたはエネルギーアクセプターである、前記〔1〕～〔2〕のいずれかに記載の化合物。  
〔4〕 $R^1$ が、 $-Q-L-Z$ という1つの置換基で置換されたフェニルであり、任意に、1つのハロゲンでさらに置換されている、前記〔3〕に記載の化合物。  
〔5〕下記の式(I a)の化合物であって、



( I a )

式中、

$R^{1z}$ がハロゲンである、前記〔1〕に記載の化合物。

〔6〕Qが、Oであり、

Lが、 $-(CR^{1a}R^{1b})_m-$ であり、

$R^{1a}$ 及び $R^{1b}$ が、水素であり、

mが、5、6、7、8、9または10であり、

Zが、 $-NR^8-CO-R^9$ であり、

$R^8$ が、水素であり、

$R^9$ が、エネルギーアクセプターである、前記〔4〕～〔5〕のいずれかに記載の化合物。

〔7〕前記エネルギーアクセプターが、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、ピレン、シアニン、スクアライン及びホウ素-ジピロメテンから選択した蛍光色素である、前記〔1〕～〔6〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔8〕前記 $-Q-L-Z$ という基が、

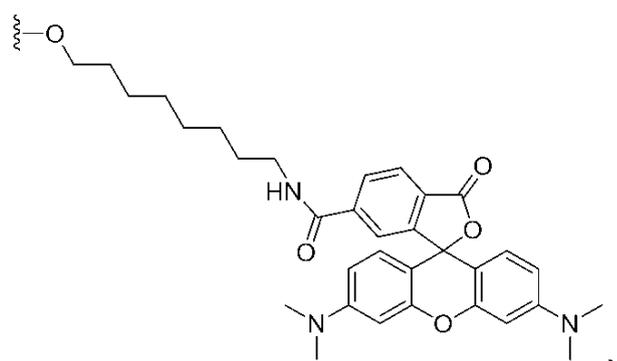
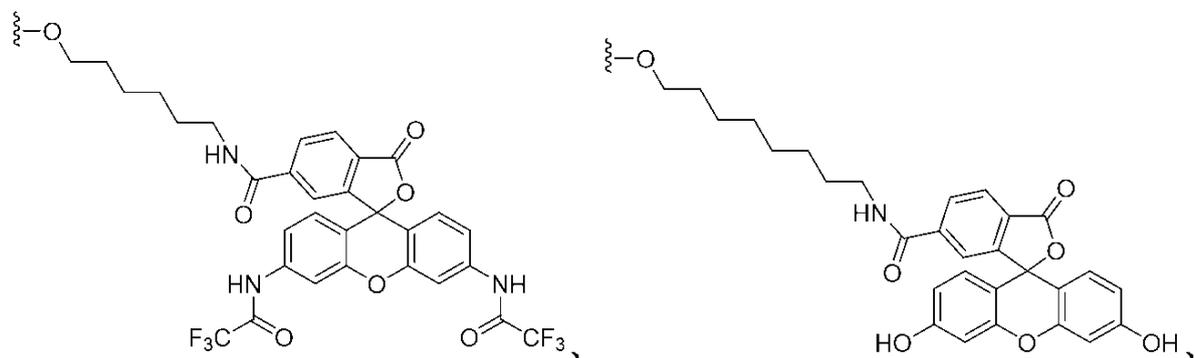
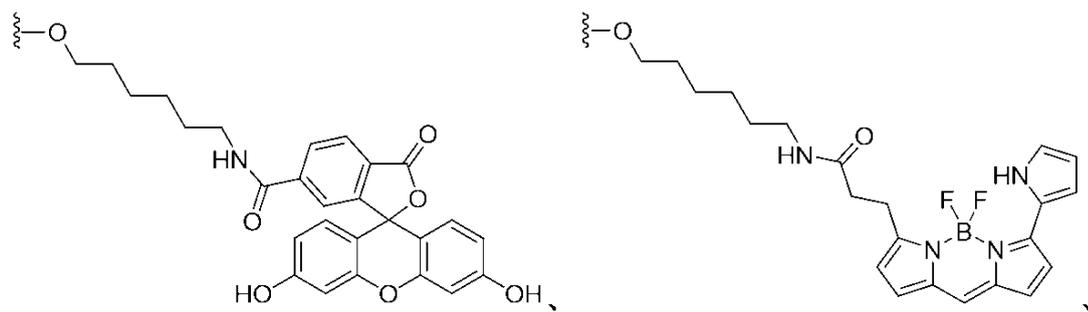
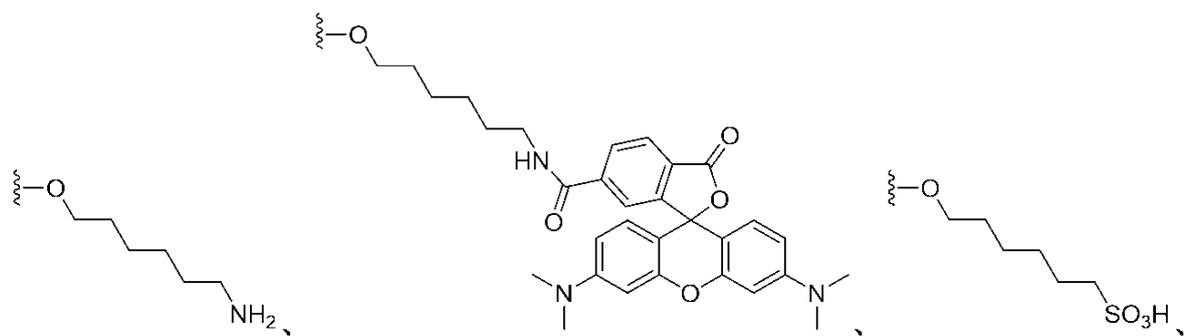
10

20

30

40

50



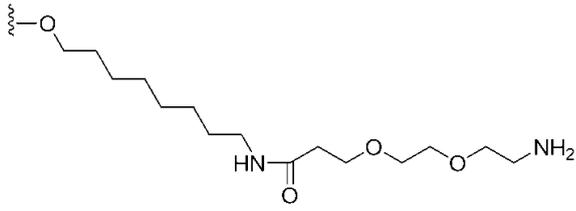
10

20

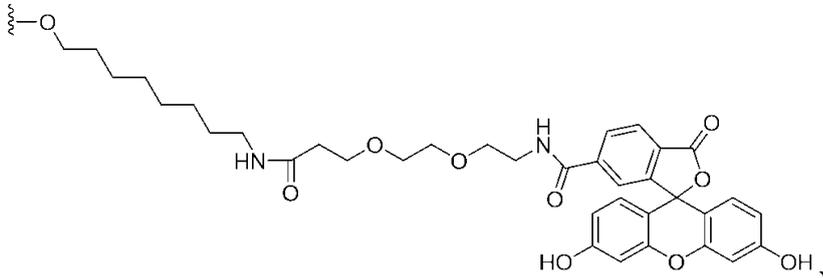
30

40

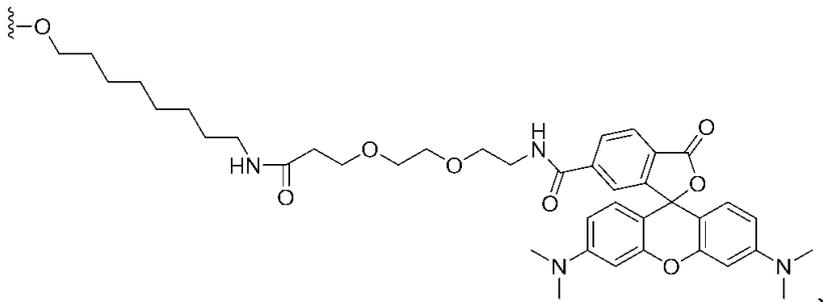
50



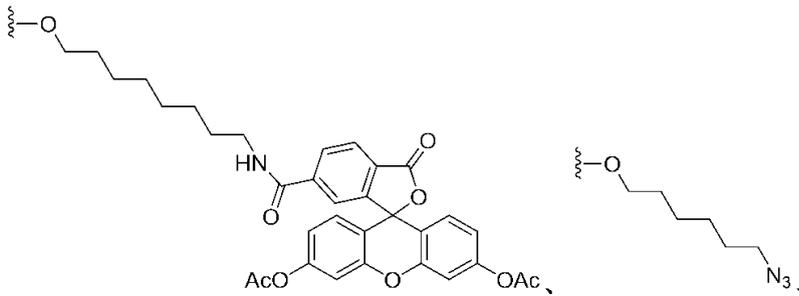
10



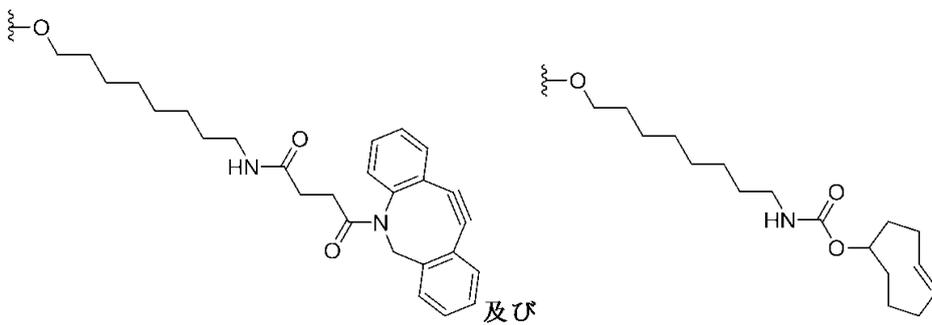
20



30



40



から選択した構造を有する、前記〔1〕～〔5〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔9〕2-(4-(6-アミノヘキシル)オキシ)-3-フルオロベンジル)-8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)イミダゾ〔1,2-a〕ピラジン-3(7H)-オン、

N-(6-(4-(8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-3-オキシ-3,7-ジヒドロイミダゾ〔1,2-a〕ピラジン-2-イル)メチル)-2-フルオロフェノキシ)ヘキシル)-3',6'-ビス(ジメチルアミノ)-3-オキシ-3H-スピロ〔イソベンゾフラン-1,9'-キサンテン〕-6-カルボキサミド、

6-(4-(8-ベンジル-6-(4-ヒドロキシフェニル)-3-オキシ-3,7-

50

- ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキサン - 1 - スルホン酸、

N - ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) - 3 ' , 6 ' - ジヒドロキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

N - ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) - 3 - ( 5 , 5 - ジフルオロ - 7 - ( 1 H - ピロール - 2 - イル ) - 5 H - 5 l 4 , 6 l 4 - ジピロロ [ 1 , 2 - c : 2 ' , 1 ' - f ] [ 1 , 3 , 2 ] ジアザボリニン - 3 - イル ) プロパンアミド、

10

N , N ' - ( 6 - ( ( 6 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) ヘキシル ) カルバモイル ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 3 ' , 6 ' - ジイル ) ビス ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド )、

N - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) - 3 ' , 6 ' - ジヒドロキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

20

N - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) - 3 ' , 6 ' - ビス ( ジメチルアミノ ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

3 - ( 2 - ( 2 - アミノエトキシ ) エトキシ ) - N - ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) プロパンアミド、

N - ( 2 - ( 2 - ( 3 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) アミノ ) - 3 - オキソプロポキシ ) エトキシ ) エチル ) - 3 ' , 6 ' - ジヒドロキシ - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

30

N - ( 2 - ( 2 - ( 3 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 1 - ベンジル - 3 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 6 - オキソ - 2 , 6 - ジヒドロピロロ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 7 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) アミノ ) - 3 - オキソプロポキシ ) エトキシ ) エチル ) - 3 ' , 6 ' - ビス ( ジメチルアミノ ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 6 - カルボキサミド、

6 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバモイル ) - 3 - オキソ - 3 H - スピロ [ イソベンゾフラン - 1 , 9 ' - キサンテン ] - 3 ' , 6 ' - ジイルジアセテート、

40

2 - ( 4 - ( ( 6 - アジドヘキシル ) オキシ ) - 3 - フルオロベンジル ) - 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) イミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 3 ( 7 H ) - オン、

5 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオロフェノキシ ) オクチル ) カルバモイル ) - 2 - ( 2 , 7 - ジフルオロ - 3 , 6 - ジヒドロキシキサンチリウム - 9 - イル ) ベンゾエート、

5 - ( ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル ) メチル ) - 2 - フルオ

50

ロフェノキシ)オクチル)カルバモイル) - 2 - ( 3 , 1 1 - ジヒドロキシジベンゾ [ c , h ] キサンテン - 1 4 - イウム - 7 - イル) ベンゾエート、  
N 1 - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル) メチル) - 2 - フルオロフェノキシ)オクチル) - N 4 - ( 2 - ( 5 , 5 - ジフルオロ - 1 , 3 - ジメチル - 5 - H - 5 <sup>4</sup> , 6 <sup>4</sup> - ジピロロ [ 1 , 2 - c : 2 ' , 1 ' - f ] [ 1 , 3 , 2 ] ジアザボリニン - 1 0 - イル) エチル) コハク酸アミド、  
N<sup>1</sup> - ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル) メチル) - 2 - フルオロフェノキシ)オクチル) - N<sup>4</sup> - ( ジベンジルシクロオクテニル) - コハク酸アミド及び 10  
( E ) - シクロオクト - 4 - エン - 1 - イル ( 8 - ( 4 - ( ( 8 - ベンジル - 6 - ( 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - オキソ - 3 , 7 - ジヒドロイミダゾ [ 1 , 2 - a ] ピラジン - 2 - イル) メチル) - 2 - フルオロフェノキシ)オクチル)カルバメート  
からなる群から選択された、前記 [ 1 ] に記載の化合物。  
[ 1 0 ] 試料中の O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼの検出方法であって、前記試料と、前記 [ 1 ] ~ [ 9 ] のいずれか 1 項に記載の化合物を接触させる工程を含む前記方法。  
[ 1 1 ] 前記試料における発光を検出する工程をさらに含む、前記 [ 1 0 ] に記載の方法。  
[ 1 2 ] 試料における発光の検出方法であって、  
( a ) 前記試料と、前記 [ 1 ] ~ [ 9 ] のいずれか 1 項に記載の化合物を接触させる工程、 20  
( b ) O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼが前記試料に存在しない場合には、前記試料と、O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼを接触させる工程、及び  
( c ) 前記試料における発光を検出する工程、  
を含む前記方法。  
[ 1 3 ] 試料中の、O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼの標識方法であって、前記試料と、前記 [ 1 ] ~ [ 9 ] のいずれか 1 項に記載の化合物を接触させる工程を含む前記方法。  
[ 1 4 ] 試料中の、O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼの標識方法であって、  
( a ) 前記試料と、前記 [ 1 ] ~ [ 9 ] のいずれか 1 項に記載の化合物を接触させる工程、ここで、前記化合物が、少なくとも 1 つの蛍光色素を含む、 30  
( b ) 前記接触工程後に、前記試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去する工程、及び  
( c ) 前記洗浄工程後に、前記試料における蛍光を検出する工程、  
を含む前記方法。  
[ 1 5 ] 試料中の、O p l o p h o r u s 由来のルシフェラーゼの標識方法であって、  
( a ) 前記試料と、前記 [ 1 ] ~ [ 9 ] のいずれか 1 項に記載の化合物を接触させる工程、ここで、前記化合物が、第 1 の官能基を含む、  
( b ) 前記試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去する工程、 40  
( c ) 前記試料と、第 2 の官能基を含む蛍光色素とを接触させる工程、ここで、前記第 2 の官能基が、前記第 1 の官能基と反応するか、または前記第 1 の官能基に結合することができる、  
( d ) 前記試料を洗浄して、任意の未反応の蛍光色素を除去する工程、及び  
( e ) 前記試料における蛍光を検出する工程、  
を含む前記方法。  
[ 1 6 ] 前記第 1 の官能基が、アジドであり、前記第 2 の官能基が、アルキンである、前記 [ 1 5 ] に記載の方法。  
[ 1 7 ] 前記第 1 の官能基が、アルキンであり、前記第 2 の官能基が、アジドである、前記 [ 1 5 ] に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔18〕前記第1の官能基が、ビオチン部分であり、前記第2の官能基が、ストレプトアビジンである、前記〔15〕に記載の方法。

〔19〕試料からのOplophorus由来のルシフェラーゼの単離方法であって、前記試料が、生細胞を含み、前記方法が、

（a）Oplophorus由来のルシフェラーゼを含む生細胞試料と、前記〔1〕～〔9〕のいずれか1項に記載の化合物を接触させる工程、ここで、前記化合物が、第1の官能基を有する、

（b）前記試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去する工程、

（c）前記試料と、1つ以上の溶解試薬を接触させる工程、

（d）前記第1の官能基に結合するか、または前記第1の官能基と反応する第2の官能基を有する捕捉剤を前記試料に加えて、前記Oplophorus由来のルシフェラーゼを捕捉する工程、

（e）前記試料を洗浄して、捕捉されなかったOplophorus由来のルシフェラーゼを除去する工程、及び

（f）工程（e）で捕捉された前記Oplophorus由来のルシフェラーゼを単離する工程、

を含む前記方法。

〔20〕試料からのOplophorus由来のルシフェラーゼの単離方法であって、前記試料が、生細胞を含み、前記方法が、

（a）Oplophorus由来のルシフェラーゼを含む試料と、1つ以上の溶解試薬を接触させる工程、

（b）Oplophorus由来のルシフェラーゼを含む生細胞試料と、前記〔1〕～〔9〕のいずれか1項に記載の化合物を接触させる工程、ここで、前記化合物が、第1の官能基を有する、

（c）前記試料を洗浄して、任意の未反応であるかまたは分解された化合物を除去する工程、

（d）前記第1の官能基に結合するか、または前記第1の官能基と反応する第2の官能基を有する捕捉剤を前記試料に加えて、前記Oplophorus由来のルシフェラーゼを捕捉する工程、

（e）前記試料を洗浄して、捕捉されなかったOplophorus由来のルシフェラーゼを除去する工程、及び

（f）工程（e）で捕捉された前記Oplophorus由来のルシフェラーゼを単離する工程、

を含む前記方法。

〔21〕前記Oplophorus由来のルシフェラーゼが、配列番号2のポリペプチド配列を含む、前記〔10〕～〔20〕のいずれか1項に記載の方法。

〔22〕試料中の、Oplophorus由来のルシフェラーゼの阻害方法であって、前記Oplophorus由来のルシフェラーゼと、前記〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の化合物を接触させる工程を含む前記方法。

〔23〕前記Oplophorus由来のルシフェラーゼが、配列番号2のポリペプチド配列を含む、前記〔22〕に記載の方法。

〔24〕前記Oplophorus由来のルシフェラーゼを不可逆的に阻害する、前記〔22〕に記載の方法。

〔25〕前記Oplophorus由来のルシフェラーゼを部分的に阻害する、前記〔22〕に記載の方法。

〔26〕試料中の、Oplophorus由来のルシフェラーゼの発光の調節方法であって、

（a）前記試料と、基質セレンテラジン及び前記〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の化合物を接触させる工程、ならびに

10

20

30

40

50

- (b) 前記試料における発光を検出する工程、  
を含み、  
前記〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の化合物により、前記Op1ophorus由来のルシフェラーゼによる発光が減少する前記方法。  
〔27〕前記試料と、前記〔1〕～〔10〕のいずれか1項に記載の化合物を接触させる前に、前記試料と、前記基質セレンテラジンを接触させる工程を含む、前記〔26〕に記載の方法。  
〔28〕前記試料と、前記基質セレンテラジンを接触させる前に、前記試料と、前記〔1〕～〔10〕のいずれか1項に記載の化合物を接触させる工程を含む、前記〔26〕に記載の方法。  
〔29〕試料中の、Op1ophorus由来のルシフェラーゼの発光の調節方法であって、  
(a) 前記試料と、前記〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の化合物を接触させる工程、  
(b) 前記試料と、基質セレンテラジンを接触させる工程、及び  
(c) 前記試料における発光を検出する工程、  
を含み、  
前記〔1〕～〔9〕のいずれかに記載の化合物により、前記基質セレンテラジンを加えたときに、前記Op1ophorus由来のルシフェラーゼによる発光の増大が阻止される前記方法。  
〔30〕前記試料が、細胞を含む、前記〔10〕～〔29〕のいずれか1項に記載の方法。  
〔31〕前記細胞が、前記Op1ophorus由来のルシフェラーゼを含む、前記〔30〕に記載の方法。  
〔32〕  
前記細胞が、前記Op1ophorus由来のルシフェラーゼを発現する、前記〔31〕に記載の方法。  
〔33〕前記基質セレンテラジンが、セレンテラジン、セレンテラジン誘導体、セレンテラジン類似体、プロセレンテラジン、またはキノンでマスクされたセレンテラジンである、前記〔26〕～〔29〕のいずれか1項に記載の方法。  
〔34〕(a) 前記〔1〕～〔9〕のいずれか1項に記載の化合物、及び  
(b) Op1ophorus由来のルシフェラーゼ、  
を含むキット。  
〔35〕前記Op1ophorus由来のルシフェラーゼが、配列番号2のポリペプチド配列を含む、前記〔34〕に記載のキット。  
〔36〕基質セレンテラジンをさらに含む、前記〔34〕に記載のキット。  
〔37〕発光アッセイを実施するための説明をさらに含む、前記〔34〕～〔36〕のいずれか1項に記載のキット。

10

20

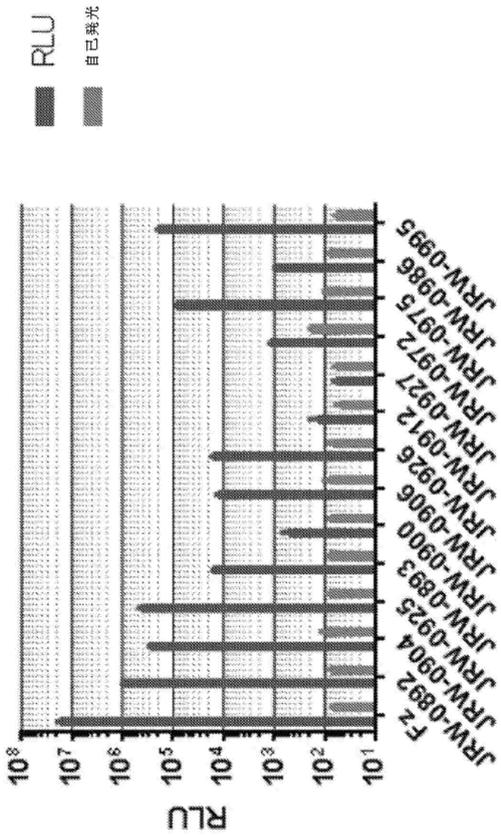
30

40

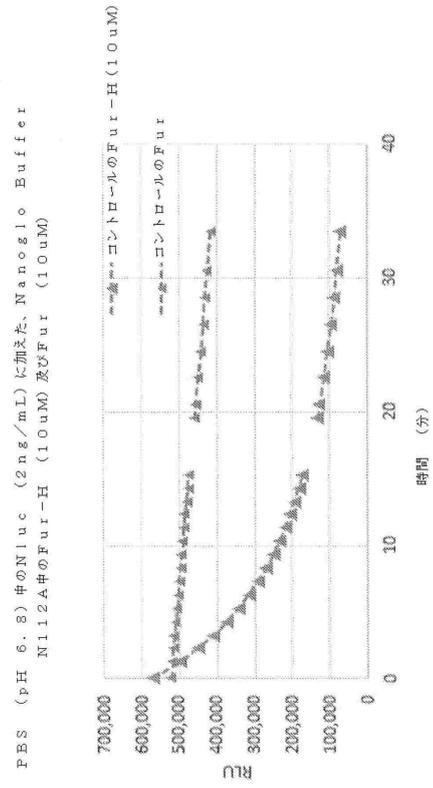
50

【図面】

【図 1】



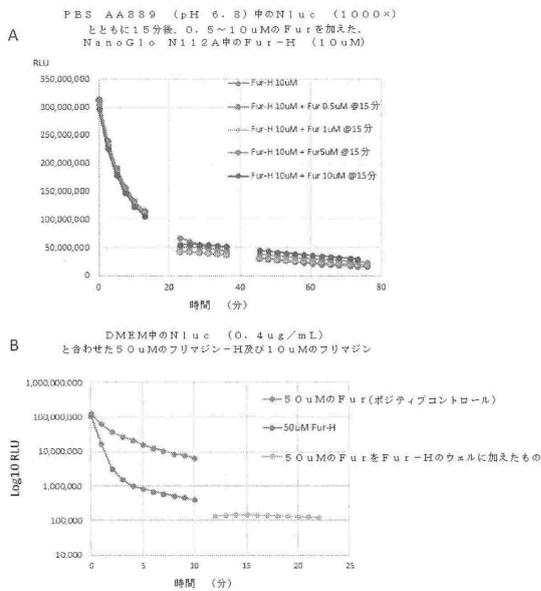
【図 2】



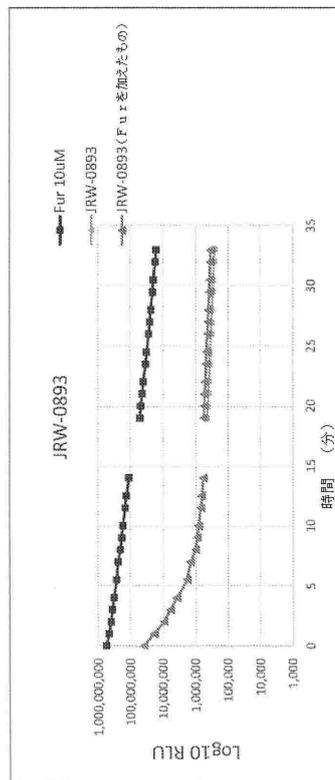
10

20

【図 3】



【図 4 A】

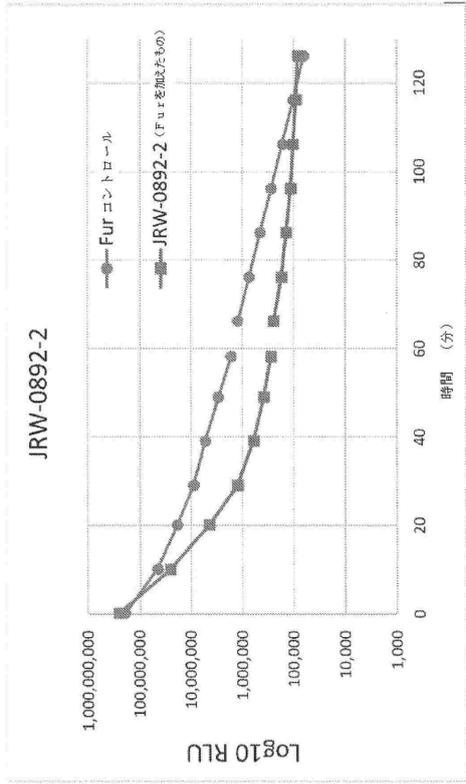


30

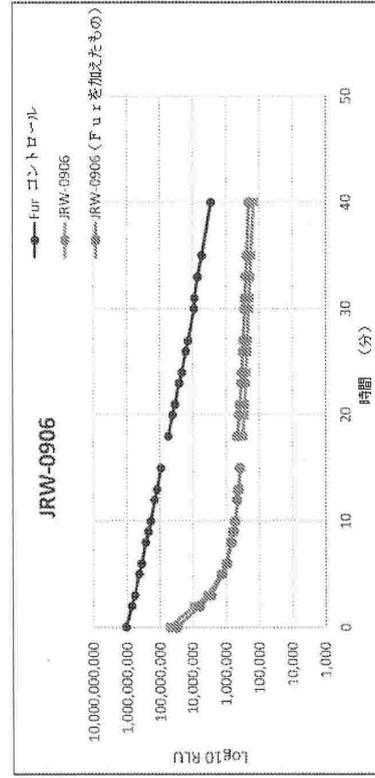
40

50

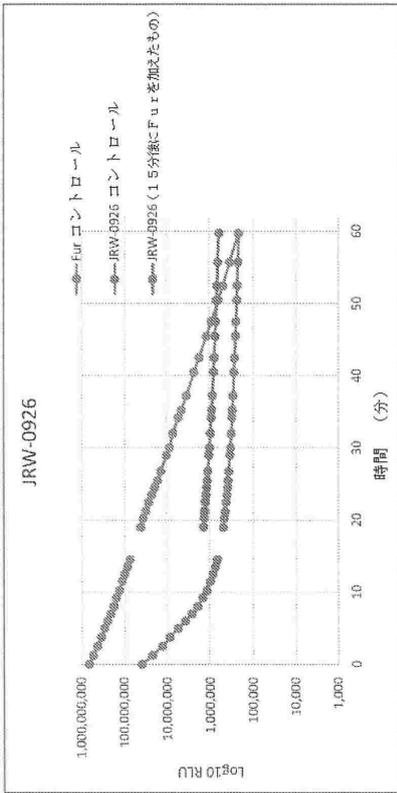
【 図 4 B 】



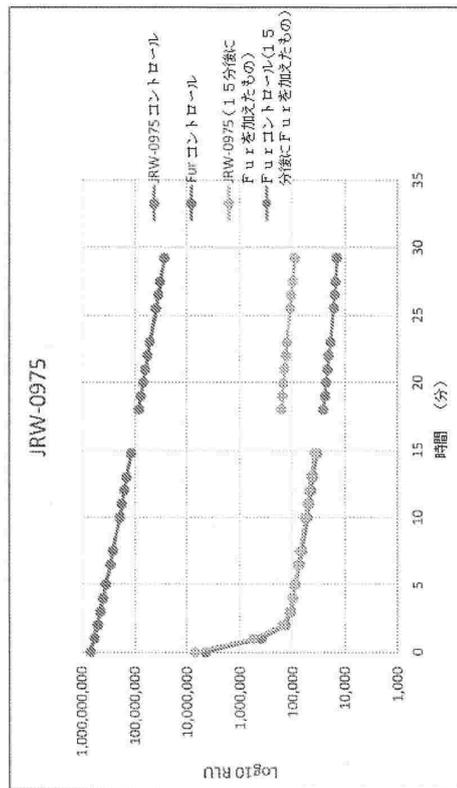
【 図 4 C 】



【 図 4 D 】



【 図 4 E 】



10

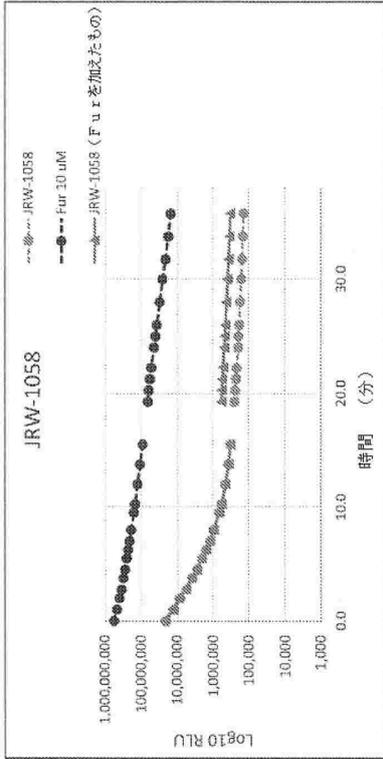
20

30

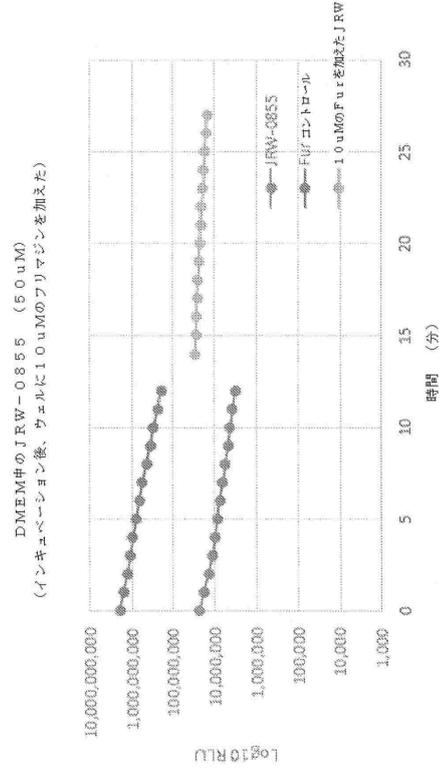
40

50

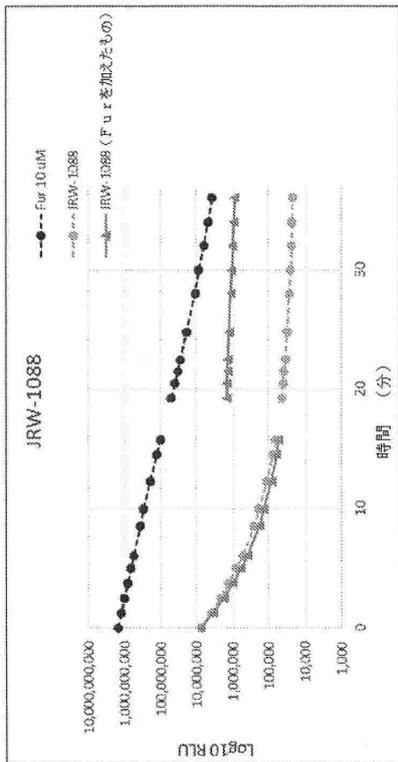
【 図 4 F 】



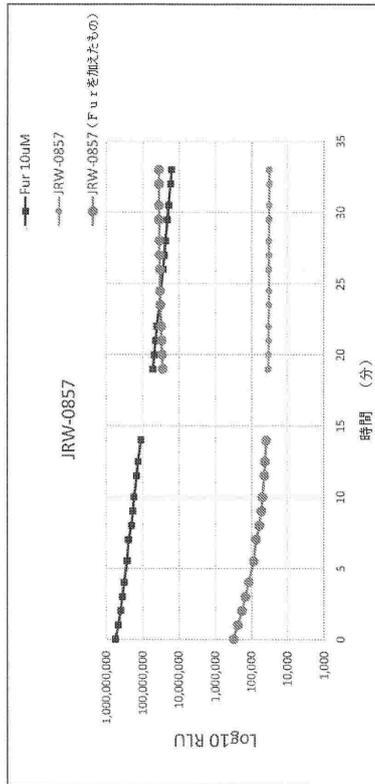
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 A 】



10

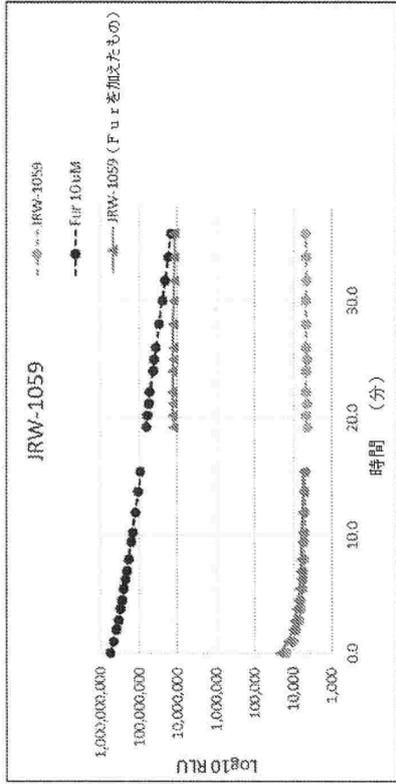
20

30

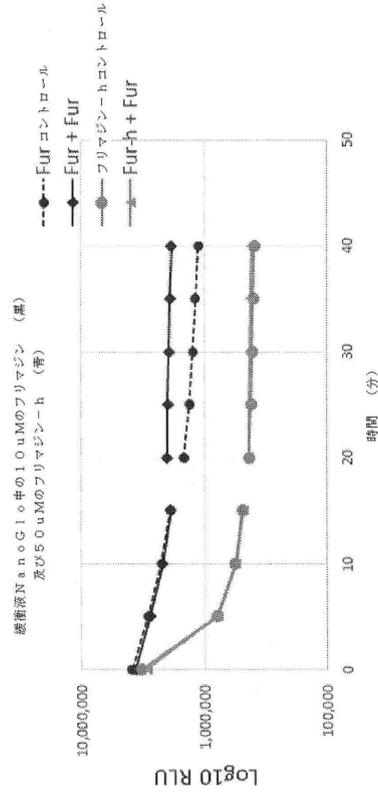
40

50

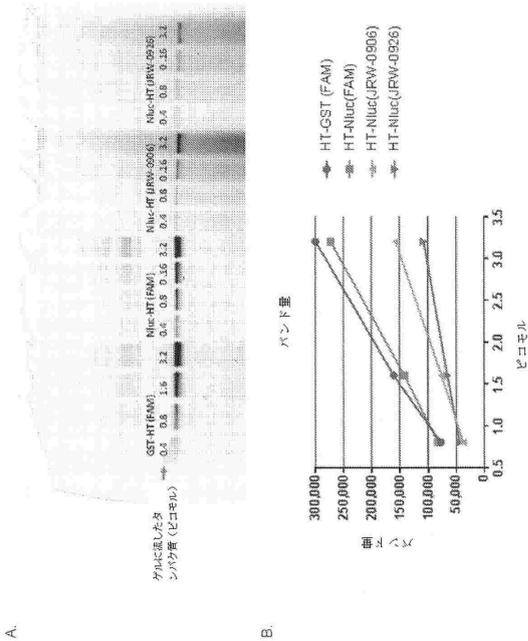
【図6B】



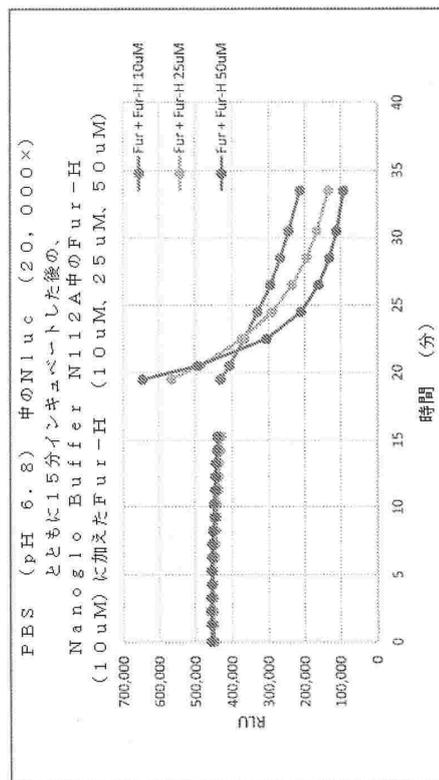
【図7】



【図8】



【図9】



10

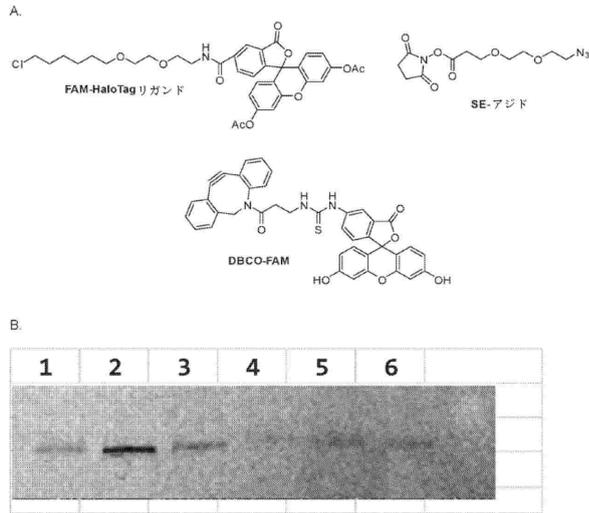
20

30

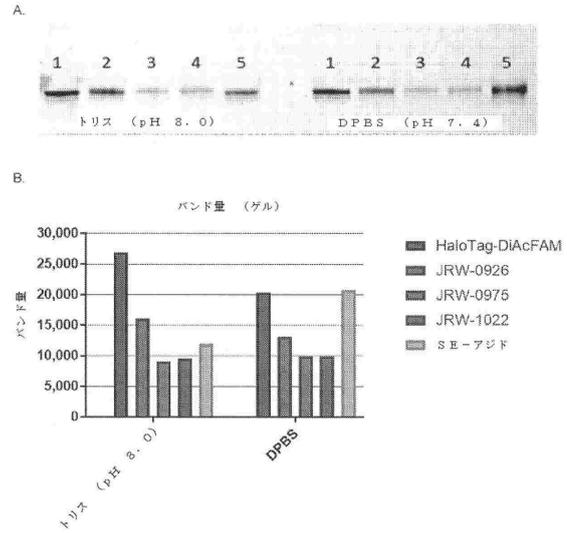
40

50

【図 10】

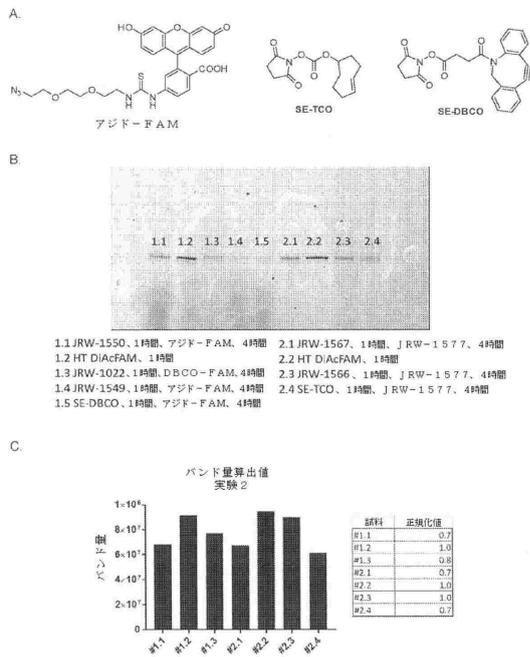


【図 11】



10

【図 12】



20

30

【配列表】

0007419260000001.app

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

G 0 1 N 33/68 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/58 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)

## F I

C 1 2 Q 1/02  
 G 0 1 N 33/68  
 G 0 1 N 33/58  
 C 1 2 N 1/15  
 C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 N 5/10

Z

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100136249

弁理士 星野 貴光

(72)発明者 ビンコウスキー ブロック

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 5 8 3 ソーク シティー ステイト ロード 6 0 イー 9 1 2 1

(72)発明者 ホール メアリー ピー

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 5 9 7 ワウナキー スカイビュー ドライブ 5 0 4

(72)発明者 マクライト トーマス

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 5 0 5 マディソン ランドフォール ドライブ 6 4 0 1

(72)発明者 ウォーカー ジョエル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 0 5 サン ルイス オビスポ プレフモ キャニオン ロード 1 4 4 5 ユニット 3

(72)発明者 チョウ ウェンファイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 0 1 サン ルイス オビスポ ホーリーホック ウェイ 3 9 3 6

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 4 2 8 5 2 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 2 / 0 6 1 5 2 9 ( W O , A 1 )

特許第 7 1 3 9 3 3 0 ( J P , B 2 )

特許第 7 2 0 0 1 0 2 ( J P , B 2 )

Bioconjugate Chemistry , 2018年05月16日 , 29(6) , 1922-1931, Supplementary Information

MACIEJ ADAMCZYK; ET AL , SYNTHESIS OF 3,7-DIHYDROIMIDAZO[1,2[ALPHA]]PYRAZINE-3-ONES AND THEIR CHEMILUMINESCENT PROPERTIES , TETRAHEDRON , NL , ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS , 2003年10月06日 , VOL:59,NR:41 , PAGE(S):8129 - 8142 , https://doi.org/10.1002/chin.200405126

ERIC LINDBERG; ET AL , DEVELOPMENT OF CELL-IMPERMEABLE COELENTERAZINE DERIVATIVES , CHEMICAL SCIENCE , 2013年 , VOL:4, NR:12 , PAGE(S):4395 - 4400 , http://dx.doi.org/10.1039/c3sc51985f

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 D 4 8 7 / 0 4

C 0 7 D 5 1 9 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 2 6

C 1 2 N 9 / 0 2

C 1 2 Q 1 / 0 2

G 0 1 N 3 3 / 6 8

G 0 1 N 3 3 / 5 8

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 5 / 1 0  
C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )