

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2002 - 543395**

(P2002 - 543395A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/533		G 0 1 N 33/533	2 G 0 4 5
C 0 7 D471/22		C 0 7 D471/22	4 C 0 5 0
491/052		491/052	4 C 0 6 5
491/147		491/147	4 H 0 5 6
491/22		491/22	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 41数) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000 - 614328(P2000 - 614328)	(71)出願人	カール - ハインツ ドレクスハーゲ ドイツ連邦共和国 ジーゲン シャンツェンヴェーク 50
(86)(22)出願日	平成12年4月19日(2000.4.19)	(72)発明者	カール - ハインツ ドレクスハーゲ ドイツ連邦共和国 ジーゲン シャンツェンヴェーク 50
(85)翻訳文提出日	平成13年10月24日(2001.10.24)	(72)発明者	ユッタ アーデン - ヤーコブ ドイツ連邦共和国 ツィルンドルフ アムヒューゲル 25
(86)国際出願番号	PCT/EP00/03569	(72)発明者	ノルベルト ケムニツァー ドイツ連邦共和国 ネットフェン クローンプリンツェンシュトラッセ 106
(87)国際公開番号	W000/64987	(74)代理人	弁理士 矢野 敏雄 (外4名)
(87)国際公開日	平成12年11月2日(2000.11.2)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	199 19 120.4		
(32)優先日	平成11年4月27日(1999.4.27)		
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)		

(54)【発明の名称】 新規のアミドピリリウム蛍光染料

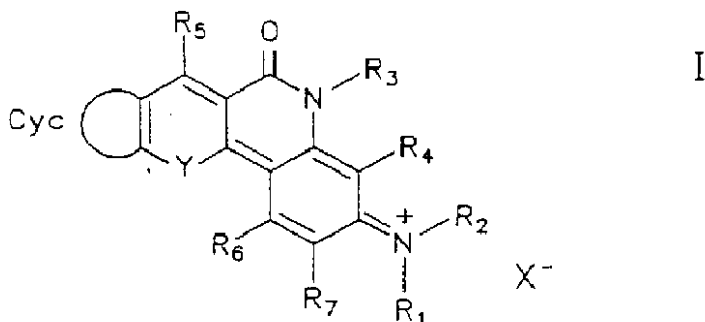
(57)【要約】

本発明は、検体を検出する方法における標識基としてのアミドピリリウム化合物の使用ならびに新規のアミドピリリウム化合物に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体を検出するための方法における標識基としての一般式I

【化1】



〔式中、

Yは、酸素またはN - R<sub>8</sub>を表わし、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>8</sub>は、それぞれが出現する際に無関係に水素、フェニル基、アルキル鎖中に1～3個のC原子を有するフェニルアルキル基、場合によっては有利にハロゲン、ヒドロキシ基、アミノ基、スルホ基、カルボキシ基、カルボニル基、アルコキシ基および/またはアルコキシカルボニル基から選択された1個以上の置換基を有することができる、20個までのC原子、有利に6個までのC原子を有するポリエーテル基もしくは炭化水素基を表わすか、またはR<sub>1</sub>基、R<sub>2</sub>基、R<sub>3</sub>基およびR<sub>8</sub>基の1個以上に1個の隣接した置換基で1つの環系を形成させ、

R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>は、それぞれ独立に水素、ハロゲン、フェニル、ヒドロキシ基、アミノ基、スルホ基もしくはカルボキシ基または15個までのC原子を有する炭化水素基を表わし、この場合炭化水素基は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基および/またはヘテロアリール基を含みかつ場合によってはそれぞれ有利にハロゲン、ヒドロキシ基、アミノ基、スルホ基、カルボキシ基、アルデヒド基、アルコキシ基および/またはアルコキシカルボニル基から選択された1個以上の置換基を有してよく、この場合R<sub>4</sub>基、R<sub>6</sub>基およびR<sub>7</sub>基の中の1個以上の基は、隣接した置換基で1つの環系を形成することができる、

Cycは、芳香環、ヘテロ芳香環、キノイド環および/または脂環式環から選択

された環系を含み、この環系が場合によっては有利にハロゲン、アミノ基、ヒドロキシ基、スルホ基、カルボキシ基、アルデヒド基、アルコキシ基および/またはアルコキシカルボニル基から選択された1個以上の置換基を有してよい有機基を表わし、

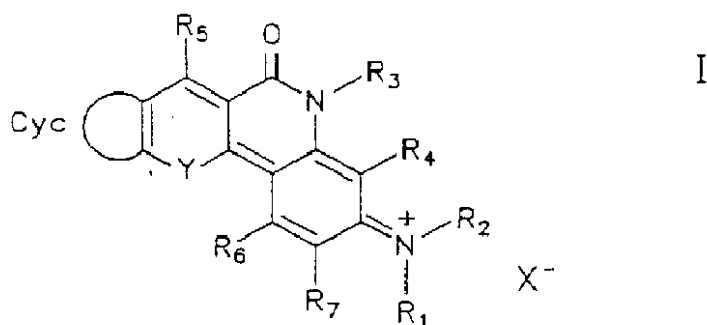
Xは、場合によっては電荷平衡のために存在する陰イオンを意味する]で示される化合物の使用。

【請求項2】 化合物Iを検出すべき検体に対して特異的なレセプターに共有結合する、請求項1記載の使用。

【請求項3】 検出法を核酸ハイブリダイゼーション法および免疫化学的方法から選択する、請求項1または2記載の使用。

【請求項4】 一般式I

【化2】



〔式中、

Y、 $R_1 \sim R_7$ およびCycは、請求項1記載の意味を有し、

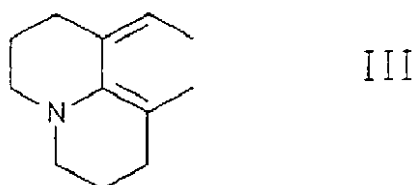
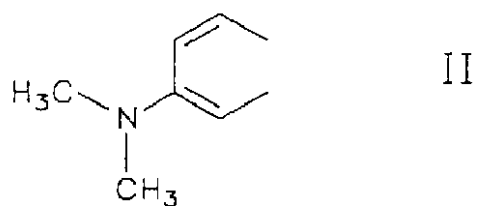
Xは、場合によっては電荷平衡のために存在する陰イオンを表わし、

但し、Yが酸素である場合には、 $R_1$ 、 $R_2$ および $R_3$ は、メチルであり、 $R_4$

、 $R_5$ 、 $R_6$ および $R_7$ は、水素であり、

Cycは、式IIまたはIII

【化3】

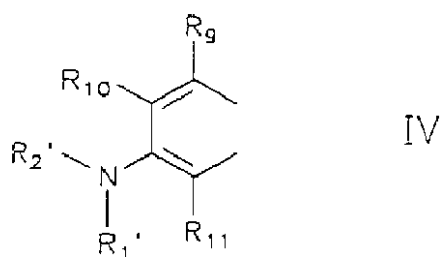


で示される構造を有していない)で示される化合物。

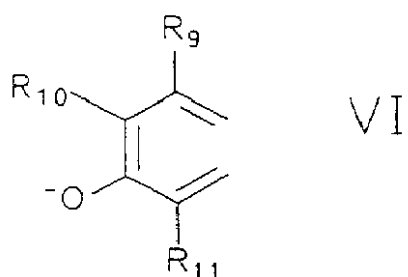
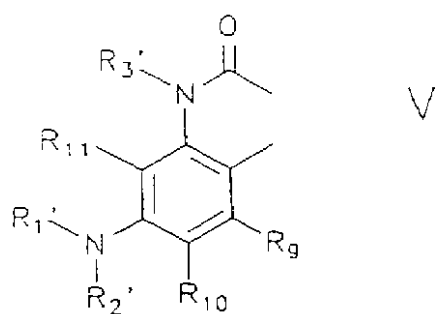
【請求項5】  $R_1$ が $R_7$ と架橋しておりおよび/または $R_2$ が $R_4$ と架橋しており、1つの環系、殊に5または6員環を形成している、請求項4記載の化合物。

【請求項6】 Cycが式IV、VまたはVI

【化4】



【化5】



〔式中、

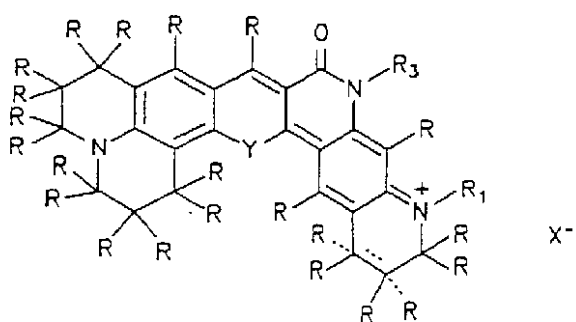
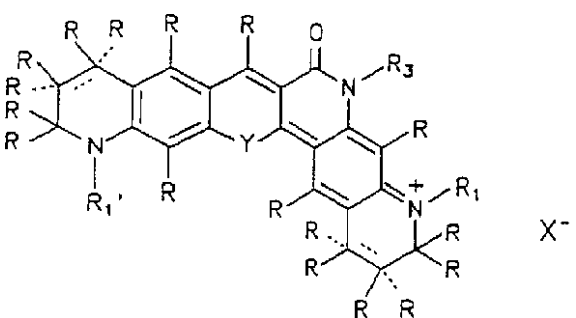
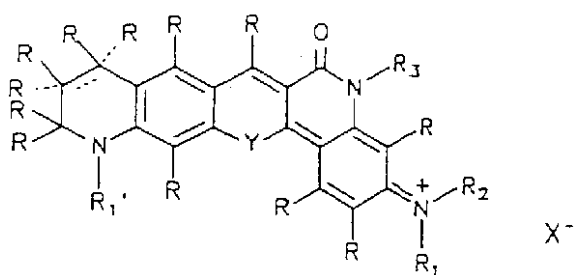
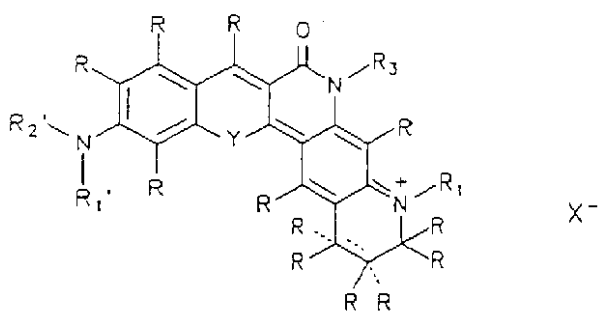
$R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  は、請求項1に記載の  $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  と同様に定義され、 $R_9 \sim R_{11}$  は、請求項1に記載の  $R_4 \sim R_7$  と同様に定義される〕で示される構造を有している、請求項4または5に記載の式Iの化合物。

【請求項7】  $R_1$  が  $R_{11}$  とおよび/または  $R_2$  が  $R_{10}$  と架橋しており、1つの環系、殊に5または6員環を形成している、請求項6に記載の化合物

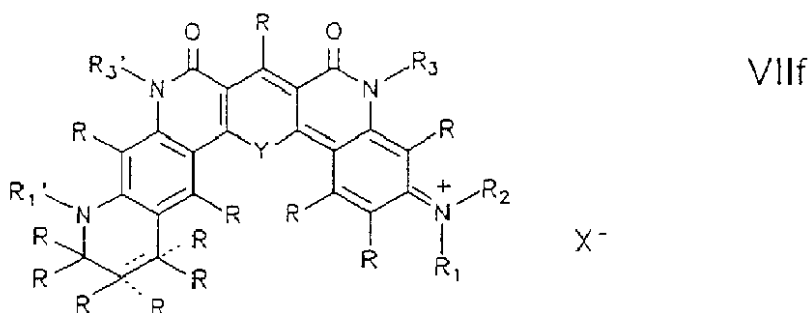
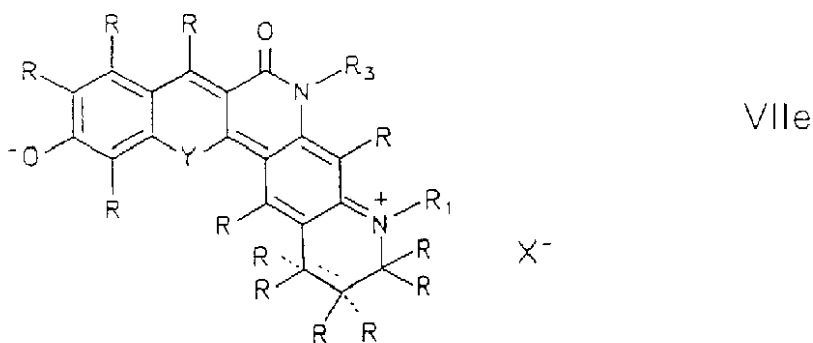
。

【請求項8】 一般式VII a ~ VII f の中の1つが次式

【化6】



【化7】



〔式中、

点線は、場合によっては二重結合を表わし、

二重結合が存在する場合には、点線により結合されたR基を欠き、

X、Y、 $R_1$ 、 $R_2$ および $R_3$ は、請求項4または5の記載と同様に定義され、

$R_1$ 、 $R_2$ および $R_3$ は、請求項6または7の記載と同様に定義され、R

は、それぞれ無関係に請求項4に記載の $R_4$ と同様に定義される〕に対応してい

る、請求項4から7までのいずれか1項に記載の化合物。

【請求項9】 Yが酸素である、請求項4から8までのいずれか1項に記載の化合物。

【請求項10】  $R_5$ が場合によっては置換された芳香族の環系を含む、請求項4から9までのいずれか1項に記載の化合物。

【請求項11】 共有結合の能力を有する基を有している、請求項4から10までのいずれか1項に記載の化合物。

【請求項12】 カップリング基が-COOH、-NH<sub>2</sub>、-OHおよび/または-SHである、請求項11に記載の化合物。

【請求項13】 カップリング基により担体および/または生体分子にカッ

プリングされている、請求項11または12記載の化合物。

【請求項14】 担体が多孔質ガラス、イオン交換樹脂、プラスチック、デキストラン、セルロース、セルロース誘導体および/または親水性ポリマーから選択されたものである、請求項13記載の化合物。

【請求項15】 生体分子がペプチド、ポリペプチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸、核酸類似物および/またはハプテンから選択されたものである、請求項13記載の化合物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、検体を検出する方法における標識基としてのアミドピリリウム化合物の使用ならびに新規のアミドピリリウム化合物に関する。

**【0002】**

キサンテンは、久しく公知で十分に研究された蛍光染料に数えられる。変換された基本骨格を有する使用された染料、3,10-ビス-(ジメチルアミノ)-5-メチル-6-オキソ-6H[1]-ベンゾピラノ[3,2-c]キノリニウム陽イオン、は、H. Harnisch, Liebigs Ann. Chem. 751, 155-158 (1971)によって記載された。

**【0003】**

この種の化合物は、ピランとの類似性のために、F.P. Schaefer, Topics in Applied Physics, Vol. 1, Dye Laser, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973 中のK.H. Drexhage, Structure and Properties of Laser Dyes によってアミドピリリウム化合物とも呼称されている。この刊行物中には、さらに染料140および141と呼称されるアミドピリリウム化合物が記載されている。分析学における蛍光-標識基としてのアミドピリリウム化合物の使用に対する指摘は、刊行物中には見出されない。

**【0004】**

これまで、化学的分析、医学的分析および生物学的分析において使用された蛍光染料は、多くの場合に600nm未満の範囲で吸収する。このことから標識基としての使用の場合、殊に生物学的系の場合には、重大な欠点が明らかになる：診断学的系のためには、安価な光源、例えばレーザーダイオード(635または680nm)またはヘリウム-ネオンレーザー(633nm)を使用することができることは、好ましい。蛍光染料の効果のある励起を保証するために、吸収最大は、できるだけ使用される光源の放出波長の付近にある。しかし、これは、公知の染料の場合には、しばしば定められていない。更に、多くの場合には、公知の染料の吸収スペクトルは、生物学的系からの蛍光物質の吸収と重なり合っている。従って、蛍光染料を記載された欠点なしに生物学的系中での検体の信頼でき

る正確な検出のために提供することは、望ましい。

【0005】

検体のための検出方法における標識基としての使用のために、信頼できる簡単な検出可能性と共に、種々の溶剤中、殊に水性系中での良好な溶解性が必要とされる。更に、この種の化合物は、簡単で安価に製造することができ、良好な保持可能性、即ち貯蔵能力を有するはずである。

【0006】

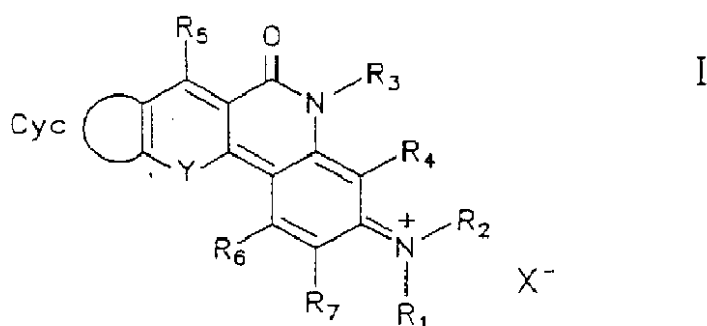
従って、本発明の課題は、公知技術水準の欠点を少なくとも部分的に回避するために、殊に吸収最大を有し、安価な光源の使用を許容し、生物学的試料中に含有されている物質の吸収範囲外で吸収し、良好な溶解性を示しおよび/または蛍光量子収率を示す、検体を検出するための方法に適した、標識基として使用するための蛍光染料を提供することであった。

【0007】

この課題は、検体を検出するための方法における標識基としての一般式 I

【0008】

【化8】



【0009】

〔式中、

Yは、酸素またはN - R<sub>8</sub>を表わし、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>8</sub>は、それぞれが出現する際に無関係に水素、フェニル基、アルキル鎖中に1～3個のC原子を有するフェニルアルキル基、場合によっては有利にハロゲン、ヒドロキシ基、アミノ基、スルホ基、カルボキシ基、カルボニル基、アルコキシ基および/またはアルコキシカルボニル基から選択され

た1個以上の置換基を有することができる、20個までのC原子、有利に6個までのC原子を有するポリエーテル基もしくは炭化水素基を表わすか、またはR<sub>1</sub>基、R<sub>2</sub>基、R<sub>3</sub>基およびR<sub>8</sub>基の1個以上に1個の隣接した置換基で1つの環系を形成させ、

R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>は、それぞれ独立に水素、ハロゲン、フェニル、ヒドロキシ基、アミノ基、スルホ基もしくはカルボキシ基または15個までのC原子を有する炭化水素基を表わし、この場合炭化水素基は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基および/またはヘテロアリール基を含みかつ場合によってはそれぞれ有利にハロゲン、ヒドロキシ基、アミノ基、スルホ基、カルボキシ基、アルデヒド基、アルコキシ基および/またはアルコキシカルボニル基から選択された1個以上の置換基を有してよく、この場合R<sub>4</sub>基、R<sub>6</sub>基およびR<sub>7</sub>基の中の1個以上の基は、隣接した置換基で1つの環系を形成することができる、

Cycは、芳香環、ヘテロ芳香環、キノイド環および/または脂環式環から選択された環系を含み、この環系が場合によっては有利にハロゲン、アミノ基、ヒドロキシ基、スルホ基、カルボキシ基、アルデヒド基、アルコキシ基および/またはアルコキシカルボニル基から選択された1個以上の置換基を有してよい有機基を表わし、

Xは、場合によっては電荷平衡のために存在する陰イオンを意味する]で示される化合物の使用によって解決された。

#### 【0010】

一般式Iの化合物は、検体を定性的および/または定量的に測定するための方法における標識基として使用されることができる。これらの測定は、水性液体中、例えば体液、例えば血液、血清、血漿もしくは尿の試料中、廃水試料または食品中で実施されることができる。この方法は、例えばキュベット中での湿式試験として実施されることができるか、または相応する試薬担体上での乾式試験として実施されることができる。この場合、検体の測定は、唯一の反応により行なうことができるかまたは一連の反応によって行なうことができる。

#### 【0011】

意外なことに、一般式 I の化合物の使用は、検体を測定するための化学的検出法、殊に医学的検出法および生物学的検出法において極めて良好な結果を示した。

#### 【0012】

一般式 I の化合物は、蛍光染料が標識基として適しているような全ての公知の化学的検出法、医学的検出法および生物学的検出法において使用されることができる。この種の方法は、当業者に公知であり、したがってこれ以上記載する必要はない。

#### 【0013】

特に好ましい実施態様において、一般式 I の化合物は、検出すべき検体に対して特異的なレセプターに共有結合される。特異的なレセプターは、全ての適した化合物または全ての適した分子であり、有利には、ペプチド、ポリペプチドまたは核酸である。化合物 I またはこの化合物の共有結合は、例えば核酸ハイブリダイゼーション法または免役化学的方法で使用されることができる。この種の方法は、例えば Sambrook 他, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1998, Cold Spring Harbor に記載されている。

#### 【0014】

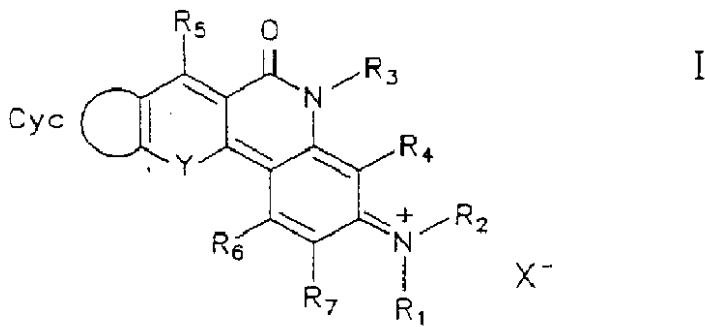
本発明のもう一つの課題は、殊に検体の検出法において標識基としての使用に適しておりかつ公知技術水準の欠点を少なくとも部分的に回避する新規のアミドピリリウム化合物を提供することにあった。

#### 【0015】

この課題は、一般式 I

#### 【0016】

#### 【化9】



## 【0017】

〔式中、

Y、 $R_1 \sim R_7$ およびCycは、請求項1記載の意味を有し、

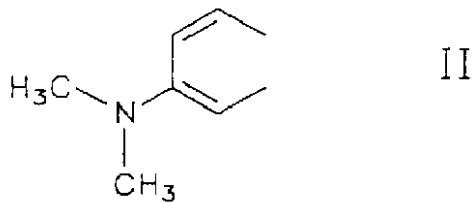
Xは、場合によっては電荷平衡のために存在する陰イオンを表わし、

但し、Yが酸素である場合には、 $R_1$ 、 $R_2$ および $R_3$ は、メチルであり、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ および $R_7$ は、水素であり、

Cycは、式IIまたはIII

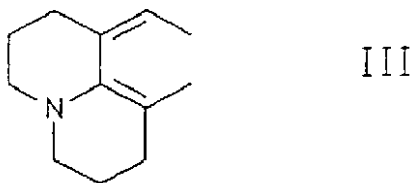
## 【0018】

## 【化10】



## 【0019】

## 【化11】



## 【0020】

で示される構造を有していない〕で示される化合物によって解決された。

## 【0021】

化合物Iの利点は、殆んど任意の置換基の変形によって個々の化合物の性質、

例えば吸湿性の性質、吸収最大の位置、溶解性の性質、蛍光減少時間および量子収率の高さが著しく変動し、それによって所望通りに選択されることができることにある。こうして、試料、例えば血清、血液または血漿等中での妨害物質での干渉は、減少されることができるとはむしろ全体的に回避されることができる。化合物Iの製造は、自体公知の方法により簡単で安価な方法で、次の実施例で詳説されているように行なうことができる。更に、この化合物は、問題なく取り扱うことができる。化合物Iのもう1つの利点は、蛍光の大きなストークスの移動にあり、それによって励起ビームの良好な分離が可能になる。更に、この化合物は、高い安定性を示し、このことは、殊に貯蔵能力に対してプラスの作用を示す。

#### 【0022】

好ましくは、Yは、酸素を表わしおよび/またはR<sub>5</sub>は、場合によっては置換された芳香族の環系を含む。

#### 【0023】

前記化合物は、有利に共有結合の能力を有する基、例えば-COOH、-NH<sub>2</sub>、-OHおよび/または-SHを有している。これらのカップリング基により、この化合物は、公知方法により担体および/または生体分子にカップリングされることができる。担体としては、全ての適当な材料、例えば多孔質ガラス、プラスチック、イオン交換樹脂、デキストラン、セルロース、セルロース誘導体および/または親水性ポリマーが使用されることができる。生体分子は、有利にペプチド、ポリペプチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸、核酸類似物および/またはハプテンから選択される。

#### 【0024】

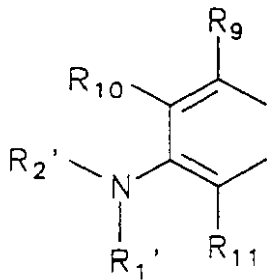
意外なことに、吸収最大および蛍光量子収率は、本発明による化合物を上記の担体および生体分子にカップリングすることによって本質的に変化しない。

#### 【0025】

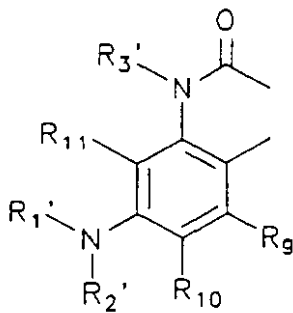
1つの好ましい化合物種において、R<sub>1</sub>はR<sub>7</sub>と架橋しておりおよび/またはR<sub>2</sub>はR<sub>4</sub>と架橋しており、殊に5または6員環を有する環系が形成される。特に好ましい物質種において、式I中のCycは、式IV、VまたはVI

【0026】

【化12】



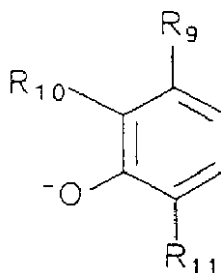
IV



V

【0027】

【化13】



VI

【0028】

〔式中、 $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  は、上記の  $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  と同様に定義され、 $R_9 \sim R_{11}$  は、上記の  $R_4 \sim R_7$  と同様に定義される〕で示される構造を有している。

【0029】

他の好ましい化合物種において、 $R_1$  は  $R_{11}$  と架橋しておりおよび/または  $R_2$  は  $R_{10}$  と架橋しており、環系、殊に5員環または6員環が形成される

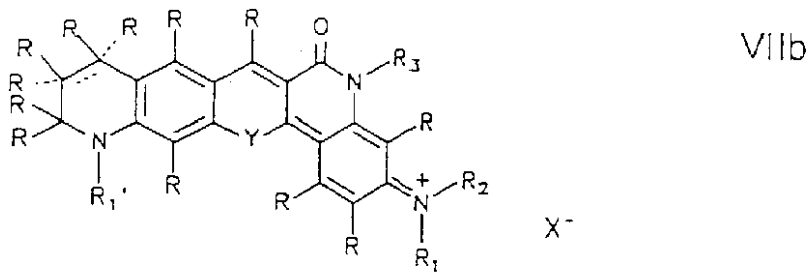
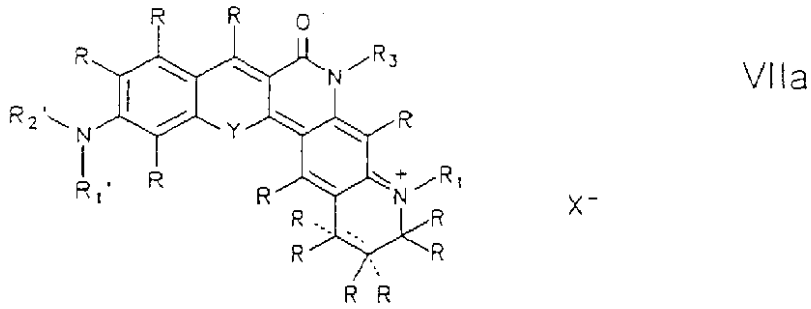
。

## 【0030】

特に好ましい化合物種の例は、一般式VIIa～VIIf：

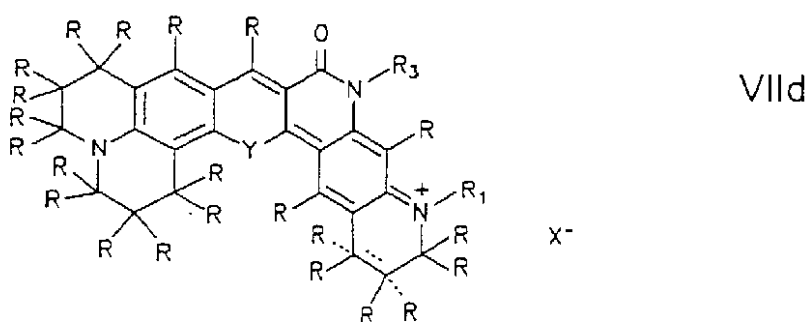
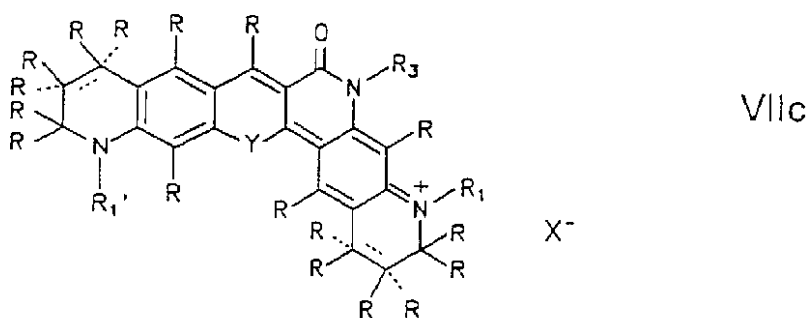
## 【0031】

## 【化14】



## 【0032】

## 【化15】



## 【0033】

〔式中、

点線は、場合によっては二重結合を表わし、この二重結合が存在する場合には、点線により結合されたR基を欠き、

X、Y、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および $R_5$  は、上記と同様に定義され、Rは、それぞれ無関係に上記の $R_4$ と同様に定義される〕に表わされている。

## 【0034】

本発明による化合物の具体的な例は、次の第1表に表わされている。

## 【0035】

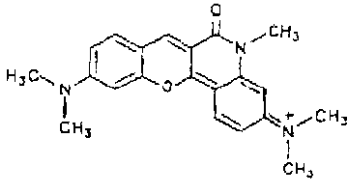
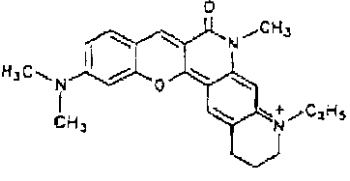
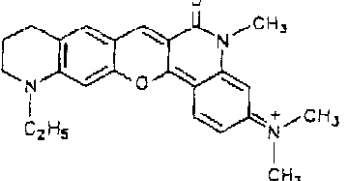
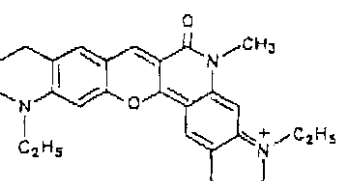
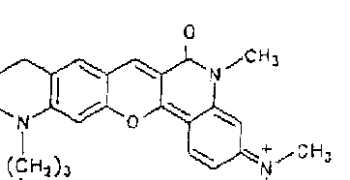
## 【表1】

第1表 本発明によるアミドピリリウム化合物  
エタノール中のスペクトルデータ

$\lambda_A$  : 吸収最大

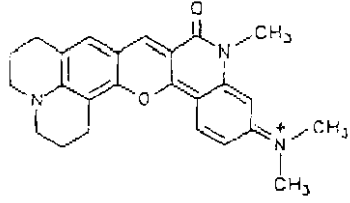
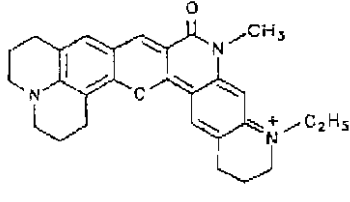
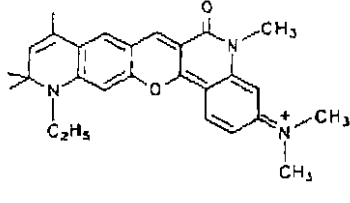
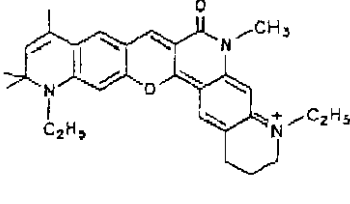
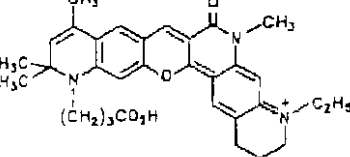
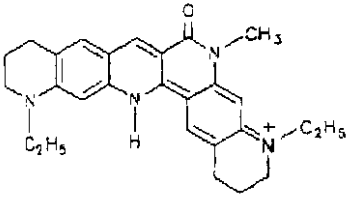
$\lambda_F$  : 蛍光最大

$Q_F$  : 蛍光量子収率

	構造式	$\lambda_A$ / nm	$\lambda_F$ / nm	$Q_F$ / %
1 NK 9		595	650	21
2 NK 1		609	668	11
3 NK 8		595	650	34
4 NK 5		609	663	19
5 JA 227		596	651	31

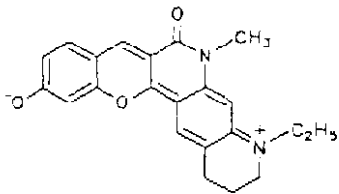
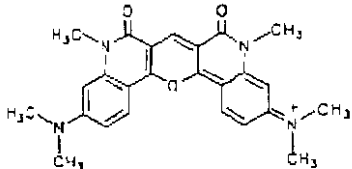
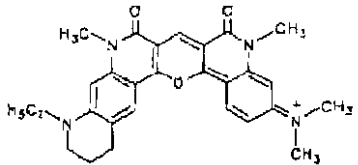
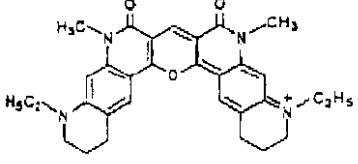
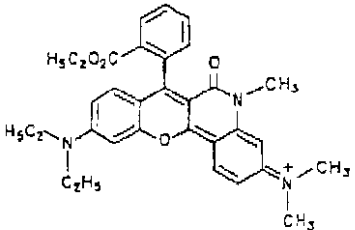
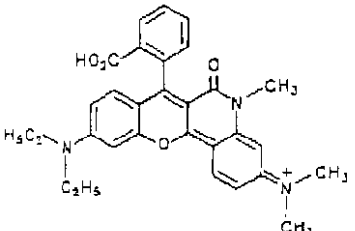
【0036】

【表2】

6 染料 141		602	646	47
7 JA 230		613	665	31
8 JA 226		613	664	37
9 JA 228		628	675	24
10 NK 5		628	680	21
11 NK 4		522	605	21

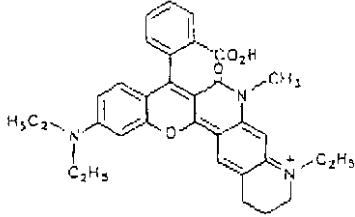
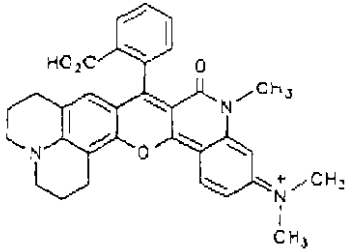
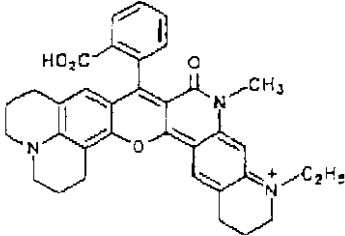
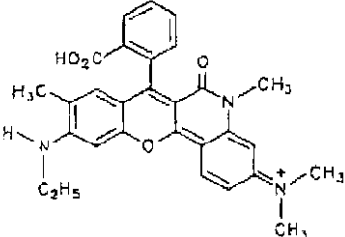
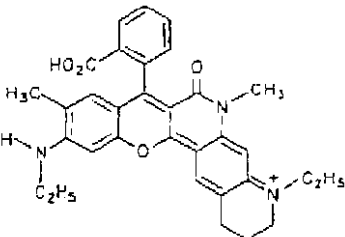
【0037】

【表3】

12 NK 7		587	650	15
13 染料 140		664	715	2
14 NK 2		666	720	1
15 JA 210		682	725	4
16 NK 13		593	650	23
17 NK 13 A		588	645	26

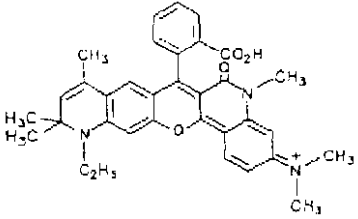
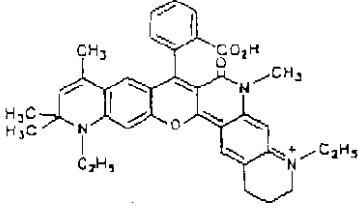
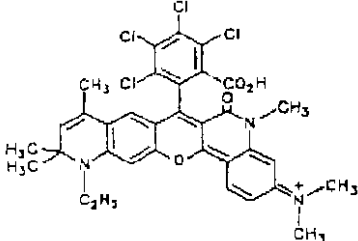
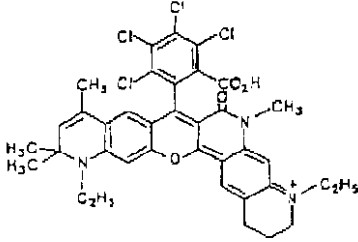
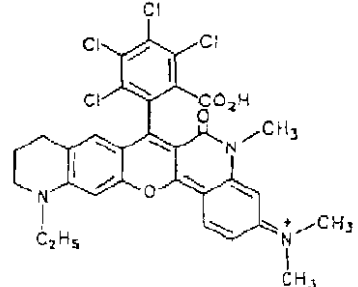
【0038】

【表4】

18 NK 14		603	665	14
19 NK 15		597	642	51
20 NK 16		608	660	30
21 NK 19		573	635	17
22 NK 20		589	665	9

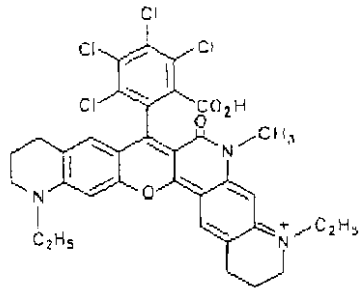
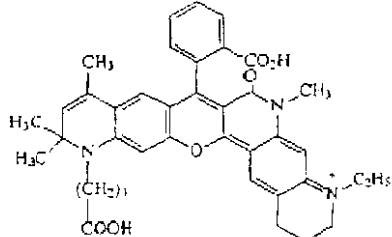
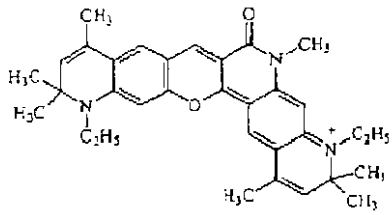
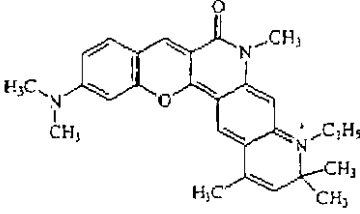
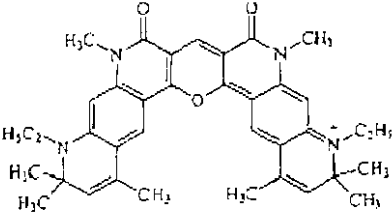
【0039】

【表5】

23 NK 21		608	655	44
24 NK 22		622	675	25
25 NK 10		640	695	15
26 NK 26		661	716	10
27 NK 17		617	672	20

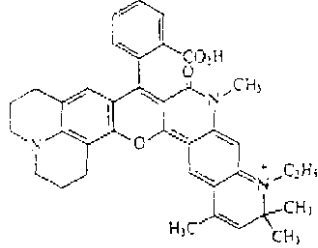
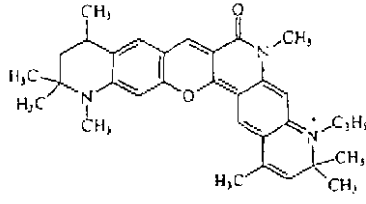
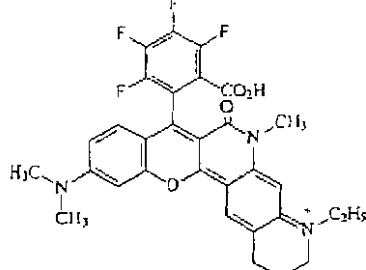
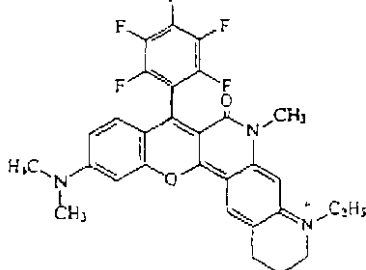
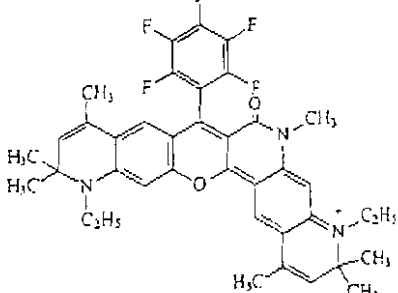
【0040】

【表6】

28 NK 18		631	686	15
29 NK 27		623	678	25
30 NK 28		635	690	30
31 NK 29		622	677	21
32 NK 30		718	770	2

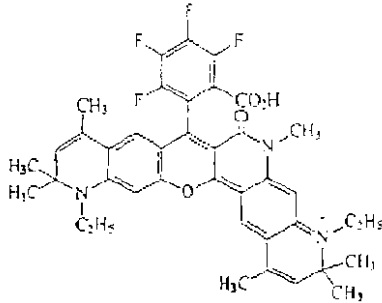
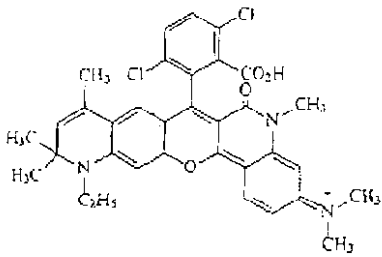
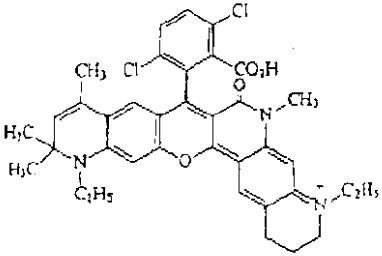
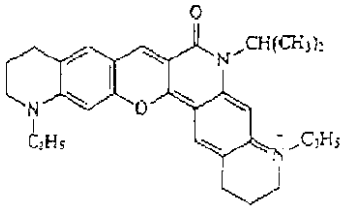
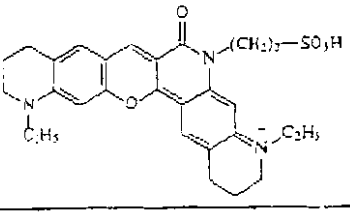
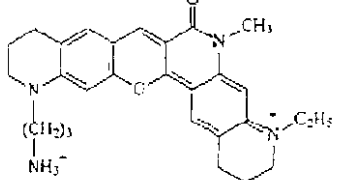
【0041】

【表7】

33 NK 31		622	675	35
34 NK 33		611	666	25
35 NK 35		631	686	13
36 NK 36		635	690	15
37 NK 37		677	733	14

【0042】

【表8】

38 NK 38		673	725	11
39 NK 24		629	684	30
40 NK 25		643	698	35
41 NK 39		610	664	18
42 NK 40		610	663	20
43 NK 41		609, s	663	18

## 【0043】

本発明は、次の実施例によって詳説される。図1、図2および図3は、本発明による化合物JA227(5)、NK13(16)またはNK14(18)の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを示す。

## 【0044】

## 実施例

## アミドピリリウム化合物の製造

A . R<sub>5</sub> = Hを有する染料

前駆生成物の合成は、ハルニッシュ (Harnisch) およびブラク (Brack) (Liebig's Ann. Chem. 740 (1970), 164-168) の合成法と同様に行なわれる。染料合成は、100 に減少された反応温度で実施される。この染料合成は、構造5 (JA227) および構造15 (JA210) について例示的に記載される。エダクトの製出は、次の実施例に含まれているかまたは刊行物に公知である。

## 【0045】

## 化合物JA210

## 第1工程：

9 - エチル - 4 - ヒドロキシ - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 1H - ピリド [ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン

7 - アミノ - 1 - エチル - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロキノリン 3 . 5 g およびマロン酸ジエチルエステル 3 . 7 g を 180 ~ 190 に加熱する。カラム (長さ : 10 cm ; 直径 : 0 . 5 cm) を介して、フラスコ中で固体が形成されるまでエタノールを留去する。固体をアセトン 30 ml 中で希釈し、吸引濾過し、沈殿物をメタノールで洗浄する。沈殿物を五酸化燐上で乾燥する。

## 【0046】

収量 : 20 g

CDC1<sub>3</sub> 中での<sup>1</sup>H - NMR データ :

## 【0047】

## 【外1】

δ 1,1 (T, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1,8 (M, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,7 (T, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-); 3,2 - 3,4 (M, 4H, 2 x N-CH<sub>2</sub>-); 5,4 (S, 1H, =CH-); 6,4 (S, 1H, ArH); 7,3 (S, 1H, ArH); 10,5 (S, 1H, -NH); 10,6 (S, 1H, -OH)

## 【0048】

## 第2工程：

9 - エチル - 4 - メトキシ - 1 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - ピリ  
ド [ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン

9 - エチル - 4 - ヒドロキシ - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 1 H - ピリド  
[ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン 2 g ( 8 . 2 ミリモル ) をジメチルホルムア  
ミド 25 ml 中に懸濁させ、水酸化カリウム 6 . 7 g ( 0 . 12 モル ) を添加す  
る。そのために、最大 60 でジメチルスルフェート 8 . 6 g ( 0 . 07 モル )  
を滴加する ( 氷 / 食塩浴での冷却 ) 。この懸濁液を水 200 ml 中に搬送する。  
良好に濾過可能な沈殿物が形成され、この沈殿物を吸引濾過し、かつ乾燥する。

【 0049 】

収量 : 1 . 8 g

融点 : 分解下に 208

CDCI<sub>3</sub> 中での<sup>1</sup>H - NMR データ :

【 0050 】

【 外 2 】

δ 1,2 (T, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1,9 (M, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,8 (T, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-); 3,2 - 3,4 (M, 4H, 2  
x N-CH<sub>2</sub>-); 3,6 (S, 3H, -CH<sub>3</sub>); 3,8 (S, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 5,8 (S, 1H, =CH-); 6,3 (S, 1H,  
ArH); 7,4 (S, 1H, ArH)

【 0051 】

第 3 工程 :

9 - エチル - 4 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - ピ  
リド [ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン

9 - エチル - 4 - メトキシ - 1 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - ピ  
リド [ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン 0 . 5 g ( 1 . 8 ミリモル ) を 10 % の  
塩酸 5 ml 中で還流下に 2 時間加熱する。この懸濁液を 10 % の酢酸ナトリウム  
溶液で pH 5 に中和する。沈殿物を吸引濾過し、デシケーター中で乾燥する。

【 0052 】

d<sub>6</sub> - DMSO 中での<sup>1</sup>H - NMR データ :

【 0053 】

## 【外3】

$\delta$  1,1 (T, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1,9 (M, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,7 (T, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-); 3,3 - 3,5 (M, 7H, N-CH<sub>3</sub>, 2 x N-CH<sub>2</sub>-); 5,5 (S, 1H, =CH-); 6,3 (S, 1H, ArH); 7,4 (S, 1H, ArH); 10,8 (S, 1H, -OH)

## 【0054】

第4工程：

4 - クロル - 9 - エチル - 1 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - ピリド [ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン - 3 - カルボアルデヒド

ジメチルホルムアミド 3 ml に 50 ~ 55 でオキシ塩化リン 0.4 g を滴加する。この溶液をなお 50 で1時間、攪拌する。引続き、同じ温度で攪拌しながらジメチルホルムアミド 6 ml 中に溶解した 9 - エチル - 4 - メトキシ - 1 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - ピリド [ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン 0.5 g ( 1.8 ミリモル ) を添加する。なお、80 ~ 90 で5時間攪拌する。濃く黄色に呈色した溶液を水 50 ml および氷 10 g 上に搬送し、室温で12時間攪拌する。明黄色の沈殿物を濾別し、乾燥する。

## 【0055】

CDCI<sub>3</sub> 中での<sup>1</sup>H - NMR データ：

## 【0056】

## 【外4】

$\delta$  1,3 (T, 3H, -CH<sub>3</sub>); 2,0 (M, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,8 (T, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-); 3,5 (M, 4H, 2 x N-CH<sub>2</sub>-); 3,6 (S, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 6,1 (S, 1H, ArH); 7,7 (S, 1H, ArH); 10,4 (S, 1H, -CH=O)

## 【0057】

第5工程：

JA210

9 - エチル - 4 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - ピリド [ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン 0.18 g ( 1.69 ミリモル ) およ

び4 - クロル - 9 - エチル - 1 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - ピリ  
ド [ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン - 3 - カルボアルデヒド 0 . 2 g ( 0 . 6  
9 ミリモル ) を氷酢酸 2 0 m l 中に溶解し、 1 0 0 の熱い油浴中で 2 0 分間加  
熱する。この溶液を水 1 0 0 m l 中に注入し、沈殿物を濾別する。染料をクロマ  
トグラフィー処理により精製する。

## 【 0 0 5 8 】

DMSO - d<sub>6</sub> 中での<sup>1</sup>H - NMR データ :

## 【 0 0 5 9 】

## 【 外 5 】

δ 1,3 (T, 6H, -CH<sub>3</sub>); 1,9 (S, 4H, -CH<sub>2</sub>-); 2,7 (S, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-); 3,4 (S, 6H, N-CH<sub>3</sub>);  
3,6 (M, 8H, 2 x N-CH<sub>2</sub>-); 6,2 (S, 2H, ArH); 7,6 (S, 2H, ArH); 8,5 (S, 1H, -CH=)

## 【 0 0 6 0 】

化合物 J A 2 2 7

4 - ( 7 - ヒドロキシ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロキノール - 1 - イル )  
- 酪酸エチルエステル 1 . 2 g ( 4 . 5 ミリモル ) および 4 - クロル - 7 - ジメ  
チルアミノ - 1 - メチル - キノール - 2 - オン - 3 - カルボアルデヒド 1 . 2 g  
( 4 . 5 ミリモル ) を氷酢酸 5 0 m l 中に溶解し、 1 0 0 の熱い油浴中で 5 分  
間加熱する。この溶液を 1 5 % の塩化ナトリウム溶液 5 0 0 m l 中に滴加し、沈  
殿物を濾別する。染料をクロマトグラフィー処理により精製する。

## 【 0 0 6 1 】

B . R<sub>5</sub> = ( 置換 ) フェニル環を有する染料

化合物の好ましい製出を構造 1 8 ( NK 1 4 )、構造 2 0 ( NK 1 6 ) および  
構造 2 3 ( NK 2 1 ) につき例示する。エダクトの合成を、これが刊行物に公知  
でない限り、前記部分 A に記載の例と同様に実施する。ベンゾイル - 安息香酸誘  
導体の合成を、 6 - ( 2 - カルボキシ - 3 , 4 , 5 , 6 - テトラクロルベンゾイ  
ル ) - 1 - エチル - 7 - ヒドロキシ - 2 , 2 , 4 - トリメチル - 1 , 2 - ジヒド  
ロキノリンの刊行物に公知の製出と同様に行なう。

## 【 0 0 6 2 】

## 化合物NK14

2 - ( 4 - ジメチルアミノ - 2 - ヒドロキシ ) - ベンゾイル - 安息香酸 1 . 2 g ( 3 . 9 ミリモル ) および 9 - エチル - 4 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - ピリド [ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン 1 . 0 g ( 3 . 9 ミリモル ) を 1 , 1 , 2 , 2 - テトラクロロエタン 4 0 m l 中で物質が完全に溶解するまで、還流下に加熱する。次に、全部で五酸化燐 5 g を少量ずつ添加し、反応混合物をさらに 3 時間還流下に煮沸する。冷却後、前記混合物をフラスコからのそれぞれ水 5 0 m l およびクロロホルム 5 0 m l で溶解し、有機相の分離後に水相をなお 3 回、クロロホルムそれぞれ 5 0 m l で抽出する。合わせた有機相をロータリーエバポレーターにより処理して乾燥物にし、引続き染料をカラムクロマトグラフィー処理により精製する。

## 【 0 0 6 3 】

染料の画分をロータリーエバポレーターにより処理し、残留物をエタノール 5 0 m l 中に溶解し、( 6 0 % の ) 過塩素酸 1 0 m l の添加後に水の滴加によって沈殿させる。吸引濾過後、染料の過塩素酸塩を注意深く水で洗浄し、デシケーター中で五酸化燐上で乾燥させる。

## 【 0 0 6 4 】

収量 : 7 0 0 m g

## 化合物NK16

9 - ( 2 - カルボキシベンゾイル ) - 8 - ヒドロキシ - 2 , 3 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H , 5 H - ベンゾ [ i j ] キノリジン 0 . 7 5 g ( 2 . 2 2 ミリモル ) および 9 - エチル - 4 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - ピリド [ 2 , 3 - g ] キノール - 2 - オン 0 . 5 7 g ( 2 . 2 2 ミリモル ) を 1 , 1 , 2 , 2 - テトラクロロエタン 4 0 m l 中で物質が完全に溶解するまで、還流下に加熱する。次に、全部で五酸化燐 5 g を少量ずつ添加し、反応混合物をさらに 3 時間還流下に煮沸する。冷却後、前記混合物をフラスコからのそれぞれ水 5 0 m l およびクロロホルム 5 0 m l で溶解し、有機相の分離後に水相をなお 3 回、クロロホルムそれぞれ 5 0 m l で抽出する。合わせた有機相をロータリーエバポレーターにより処理して乾燥物にし、引続き染料をカラムクロマト

グラフィー処理により精製する。

【0065】

染料の画分をロータリーエバポレーターにより処理し、残留物をエタノール50 ml中に溶解し、(60%の)過塩素酸10 mlの添加後に水の滴加によって沈殿させる。吸引濾過後、染料の過塩素酸塩を注意深く水で洗浄し、デシケーター中で五酸化燐上で乾燥させる。

【0066】

収量：160 mg

化合物NK21

6-(2-カルボキシベンゾイル)-1-エチル-7-ヒドロキシ-2,2,4-トリメチル-1,2-ジヒドロ-キノリン1.13 g(3.1ミリモル)および7-ジメチルアミノ-4-ヒドロキシ-1-メチル-キノール-2-オン0.68 g(3.1ミリモル)を1,1,2,2-テトラクロロエタン60 ml中で物質が完全に溶解するまで、還流下に加熱する。次に、全部で五酸化燐4 gを少量ずつ添加し、反応混合物をさらに3時間還流下に煮沸する。冷却後、前記混合物をフラスコからのそれぞれ水50 mlおよびクロロホルム50 mlで溶解し、有機相の分離後に水相をなお3回、クロロホルムそれぞれ50 mlで抽出する。合わせた有機相をロータリーエバポレーターにより処理して乾燥物にし、引き続き染料をカラムクロマトグラフィー処理により精製する。

【0067】

染料の画分をロータリーエバポレーターにより処理し、残留物をエタノール25 ml中に溶解し、(60%の)過塩素酸8 mlの添加後に水の滴加によって沈殿させる。吸引濾過後、染料の過塩素酸塩を注意深く水で洗浄し、デシケーター中で五酸化燐上で乾燥させる。

【0068】

収量：50 mg

C. 共役形成に関する例

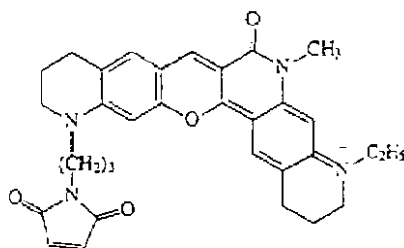
NK41 - マレインイミド

NK41 100 mg(0.2ミリモル)を無水DMSO 10 ml中に溶解

し、無水マレイン酸100mg(1ミリモル)を添加する。この溶液を室温で約24時間攪拌する。10%の過塩素酸ナトリウム水溶液50mlを滴加し、沈殿した固体を濾別する。固体を酢酸ナトリウム25mgと一緒に無水酢酸5ml中に懸濁させ、30分間約80℃に加熱する。冷却後、10%の過塩素酸ナトリウム30mlを添加し、濾過し、固体を乾燥させる。

【0069】

【化16】



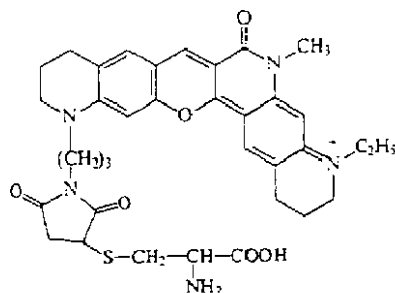
【0070】

NK41 - マレインイミド - システイン共役

MK41 - マレインイミド70mg(0.16ミリモル)をエタノール20ml中に溶解し、システイン22mg(0.16ミリモル)を少量ずつ添加する。室温で攪拌し、30分後に10%の過塩素酸ナトリウム溶液約50mlを滴加する。沈殿した固体を濾別し、乾燥させる。

【0071】

【化17】



【0072】

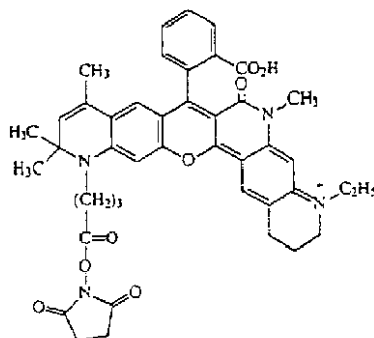
NK27 - 活性エステル

NK27 50mg(0.1ミリモル)をN - ヒドロキシスクシンイミド0 .

2ミリモルおよびジシクロヘキシルカルボジイミド0.2ミリモルと共にアセトニトリル20ml中に溶解する。室温で5時間攪拌し、生成物混合物をロータリーエバポレーターにより処理する。生成は、クロマトグラフィーにより行なう。

【0073】

【化18】



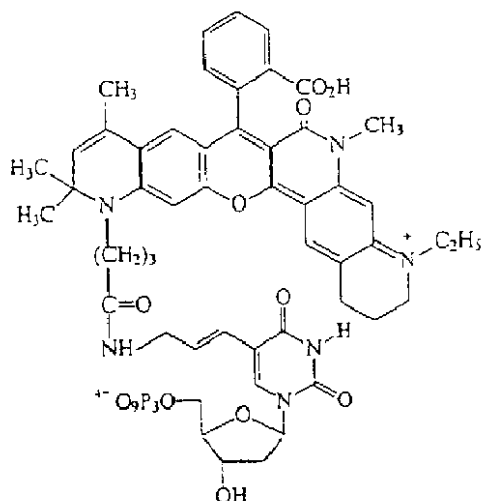
【0074】

NK27-dUTP共役

5-(3-アミノアリル)-dUTP 10モルを0.1Mの硼酸ナトリウム緩衝液0.5ml (pH8)中に溶解し、アミン不含のジメチルホルムアミド1ml中のNK27-活性エステル5モルからなる溶液を添加する。この溶液を室温で15時間攪拌する。溶剤を真空中で留去し、残留物をクロマトグラフィーにより精製する。

【0075】

【化19】



## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

本発明による化合物JA227(5)のエタノール中での吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを示す線図。

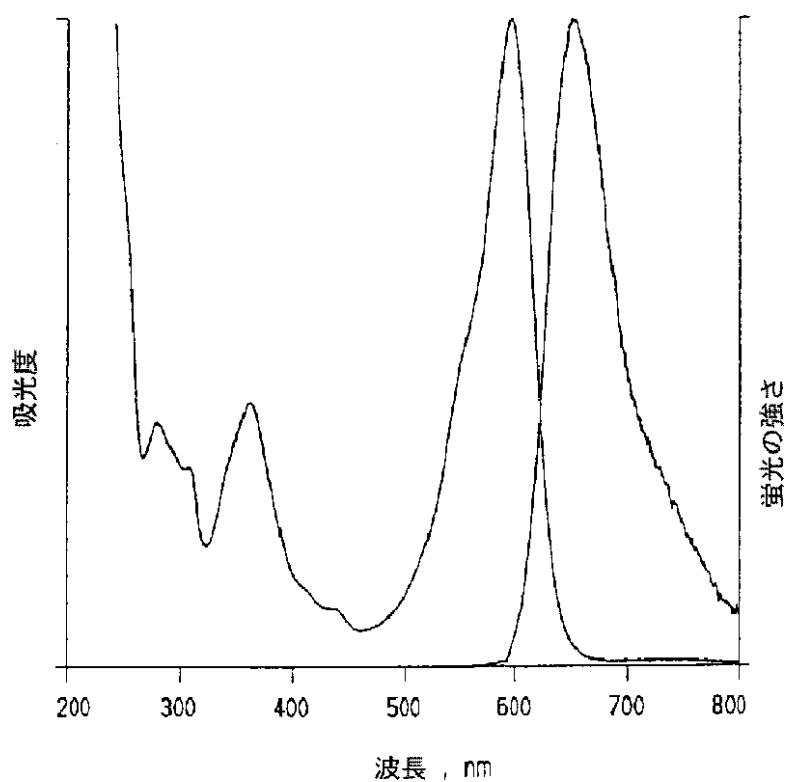
## 【図2】

本発明による化合物NK13(16)のエタノール中での吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを示す線図。

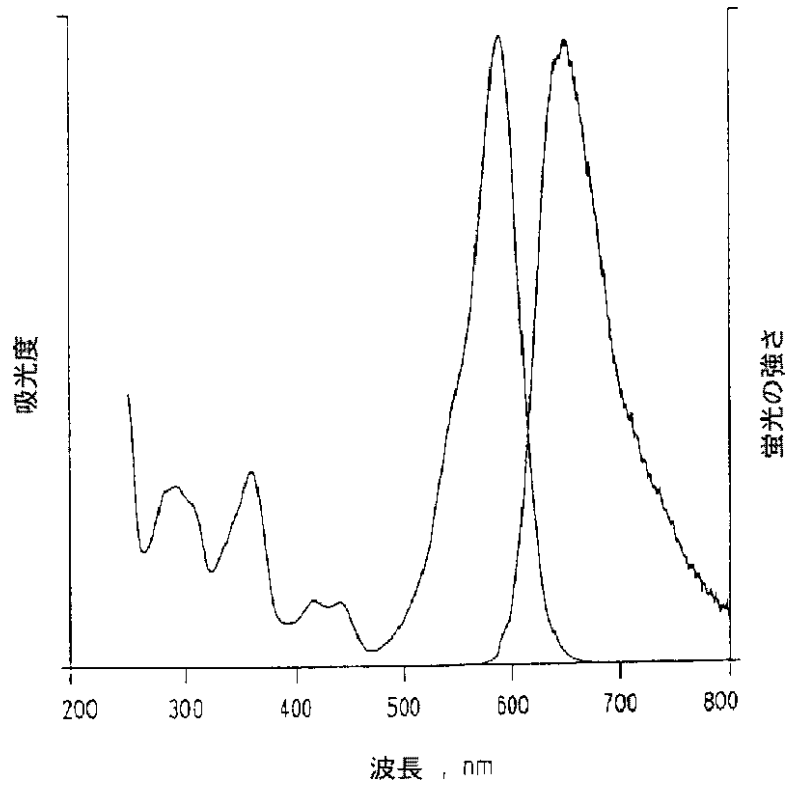
## 【図3】

本発明による化合物NK14(18)のエタノール中での吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを示す線図。

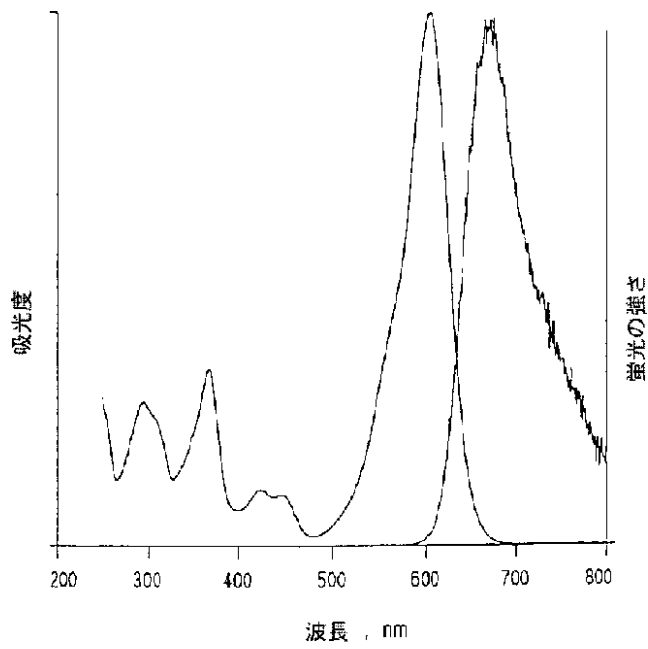
## 【図1】



【図2】



【図3】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年4月30日(2001.4.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

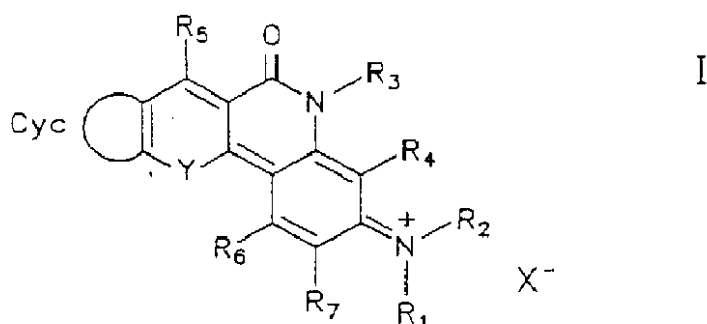
【補正対象項目名】請求項4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項4】

【化2】



〔式中、

Y、 $R_1 \sim R_7$ およびCycは、請求項1記載の意味を有し、

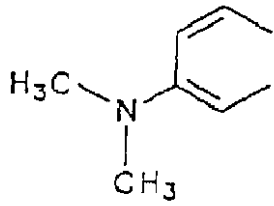
Xは、場合によっては電荷平衡のために存在する陰イオンを表わし、

但し、Yが酸素である場合には、 $R_1$ 、 $R_2$ および $R_3$ は、メチルであり、 $R_4$

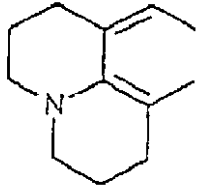
、 $R_5$ 、 $R_6$ および $R_7$ は、水素であり、

Cycは、式IIまたはIII

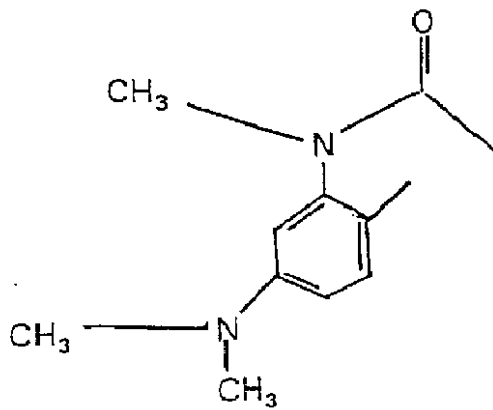
【化3】



II



III



IIIa

で示される構造を有していない)で示される化合物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

収量：2.0g

CDC1<sub>3</sub>中での<sup>1</sup>H-NMRデータ：

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int'l Application No PCT/EP 00/03569
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C09B11/02 C09B11/26 G01N33/533 G01N33/58 C07H21/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C09B G01N C07H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H.HARNISCH: "Über 4-Chlor-7-dimethylamino-1-methyl-chinolon- (2)-aldehyd-(3), II." LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE., vol. 751, 1971, pages 155-158, XP002145601 VERLAG CHEMIE GMBH. WEINHEIM., DE ISSN: 0170-2041 cited in the application page 155 page 157, paragraph 2 - paragraph 3 --- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 24 August 2000		Date of mailing of the international search report 15/09/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3018		Authorized officer Ginoux, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/03569
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	F.P.SCHÄFER: "Topics in Applied Physics, Vol I, Dye Lasers" 1973, SPRINGER-VERLAG, BERLIN, HEIDELBERG, NEW YORK XPO02145602 006001 cited in the application K.H.Drexhage, Structure and Properties of Laser Dyes; Page 176, Paragraphs 4.8.3. Naphthofluorescein and Related Dyes	1-15
A	EP 0 543 333 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 26 May 1993 (1993-05-26) claims; examples	1-15
A	WO 97 36960 A (PERKIN ELMER CORP) 9 October 1997 (1997-10-09) claims 1,17,30,35	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/03569

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0543333 A	26-05-1993	DE 4137934 A	19-05-1993
		AT 137253 T	15-05-1996
		DE 59206119 D	30-05-1996
		DK 567622 T	12-08-1996
		WO 9310189 A	27-05-1993
		EP 0567622 A	03-11-1993
		ES 2087560 T	16-07-1996
		JP 9077982 A	25-03-1997
		JP 9067523 A	11-03-1997
		JP 2634950 B	30-07-1997
		JP 5509131 T	16-12-1993
		US 5750409 A	12-05-1998
		WO 9736960 A	09-10-1997
AT 181741 T	15-07-1999		
AU 707242 B	08-07-1999		
AU 2432397 A	22-10-1997		
CA 2250014 A	09-10-1997		
DE 69700303 D	05-08-1999		
DE 69700303 T	17-02-2000		
EP 0891393 A	20-01-1999		
JP 2000500183 T	11-01-2000		
US 5840999 A	24-11-1998		

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト(参考)	
C 0 9 B	57/00	C 0 9 B	57/00	Z
C 0 9 K	11/06	C 0 9 K	11/06	
G 0 1 N	33/58	G 0 1 N	33/58	A
				Z
Fターム(参考)	2G045 CA25 CA26 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 FB07 FB12 GC10 GC15 4C050 AA01 AA07 AA08 BB07 CC07 CC18 DD02 EE01 EE02 EE03 EE04 FF01 GG03 GG04 HH01 4C065 AA04 BB09 CC05 DD04 EE04 HH09 JJ04 KK01 KK09 LL01 4H056 EA13 FA08			

专利名称(译)	新型酰胺吡喃荧光染料		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002543395A</a>	公开(公告)日	2002-12-17
申请号	JP2000614328	申请日	2000-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	卡尔 - 海因茨·德复哈格		
申请(专利权)人(译)	卡尔 - 海因茨·Dorekusuhage		
[标]发明人	カールハインツドレクスハーゲ ユッタアーデンヤーコブ ノルベルトケムニツァー		
发明人	カール-ハインツ ドレクスハーゲ ユッタ アーデン-ヤーコブ ノルベルト ケムニツァー		
IPC分类号	G01N33/533 C07D471/22 C07D491/052 C07D491/147 C07D491/22 C09B11/24 C09B57/00 C09K11/06 G01N33/58		
CPC分类号	C09B11/24 C09B57/00 Y10S436/80		
FI分类号	G01N33/533 C07D471/22 C07D491/052 C07D491/147 C07D491/22 C09B57/00.Z C09K11/06 G01N33/58.A G01N33/58.Z		
F-TERM分类号	2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC10 2G045/GC15 4C050/AA01 4C050/AA07 4C050/AA08 4C050/BB07 4C050/CC07 4C050/CC18 4C050/DD02 4C050/EE01 4C050/EE02 4C050/EE03 4C050/EE04 4C050/FF01 4C050/GG03 4C050/GG04 4C050/HH01 4C065/AA04 4C065/BB09 4C065/CC05 4C065/DD04 4C065/EE04 4C065/HH09 4C065/JJ04 4C065/KK01 4C065/KK09 4C065/LL01 4H056/EA13 4H056/FA08		
优先权	19919120 1999-04-27 DE		
其他公开文献	JP4465121B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及酰胺基吡喃鎓化合物作为标记基团在检测分析物以及新型酰胺基吡喃鎓化合物的方法中的用途。

