

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4465121号

(P4465121)

(45) 発行日 平成22年5月19日(2010.5.19)

(24) 登録日 平成22年2月26日(2010.2.26)

(51) Int. Cl. F I  
**GO 1 N 33/533 (2006.01)** GO 1 N 33/533  
**CO 7 D 471/22 (2006.01)** CO 7 D 471/22  
**CO 7 D 491/052 (2006.01)** CO 7 D 491/052  
**CO 7 D 491/147 (2006.01)** CO 7 D 491/147  
**CO 7 D 491/22 (2006.01)** CO 7 D 491/22

請求項の数 15 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-614328 (P2000-614328)	(73) 特許権者	501414249
(86) (22) 出願日	平成12年4月19日 (2000.4.19)		カールーハインツ ドレクスハーゲ
(65) 公表番号	特表2002-543395 (P2002-543395A)		ドイツ連邦共和国 ジーゲン シャンツェ
(43) 公表日	平成14年12月17日 (2002.12.17)		ンヴェーク 50
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/003569	(74) 代理人	100061815
(87) 国際公開番号	W02000/064987		弁理士 矢野 敏雄
(87) 国際公開日	平成12年11月2日 (2000.11.2)	(74) 代理人	100094798
審査請求日	平成19年4月5日 (2007.4.5)		弁理士 山崎 利臣
(31) 優先権主張番号	199 19 120.4	(74) 代理人	100099483
(32) 優先日	平成11年4月27日 (1999.4.27)		弁理士 久野 琢也
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100114890
			弁理士 アイゼル・フェリックス＝ライ
			ンハルト
		(74) 代理人	230100044
			弁護士 ラインハルト・アイゼル
			最終頁に続く

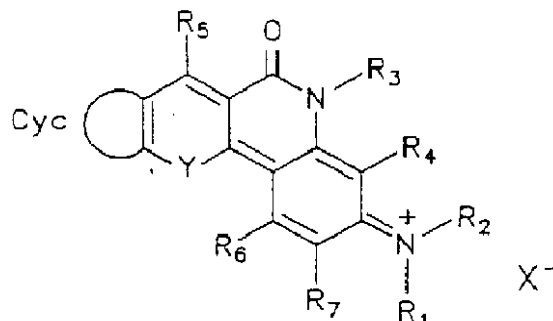
(54) 【発明の名称】 新規のアミドピリリウム蛍光染料

(57) 【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、

10

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、

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。

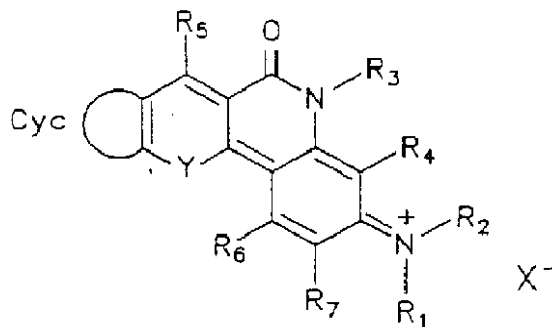
20

【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】

【化2】



I

30

〔式中、

Y、R<sub>1</sub>～R<sub>7</sub>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、

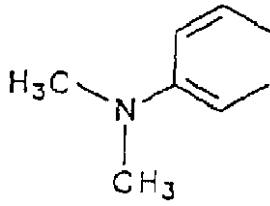
但し、Yが酸素である場合には、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>は、メチルであり、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、

40

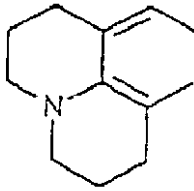
R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>は、水素であり、

Cycは、式I IまたはI I I

【化3】

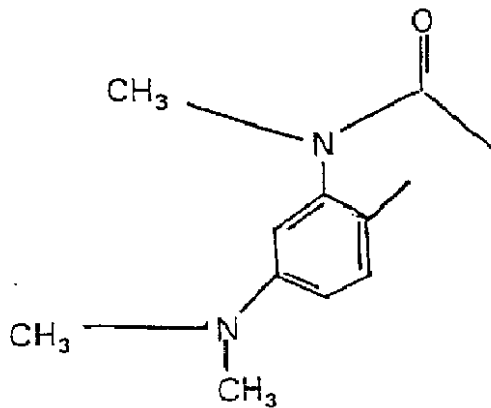


II



III

10



IIIa

20

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】

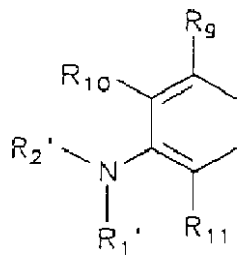
$R_1$ が $R_7$ と架橋しておりおよび/または $R_2$ が $R_4$ と架橋しており、1つの環系、殊に5または6員環を形成している、請求項4記載の化合物。

【請求項6】

Cycが式IV、VまたはVI

30

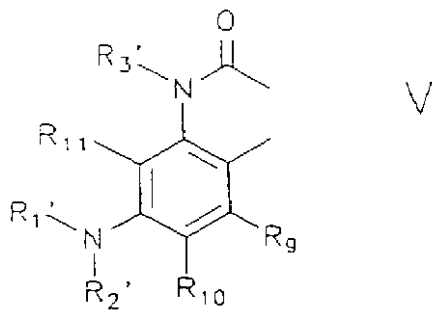
【化4】



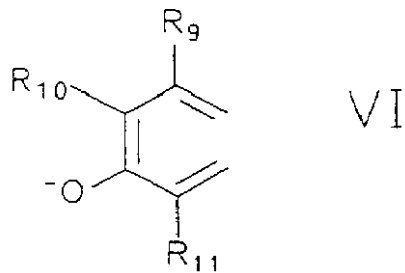
IV

40

## 【化5】



10



20

〔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】

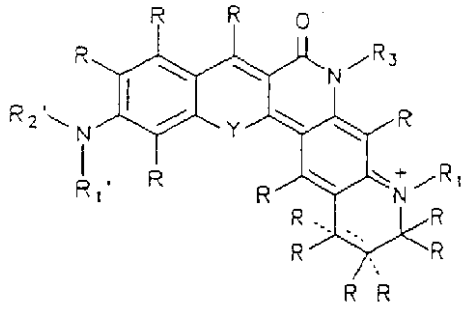
$R_1$  が  $R_{11}$  とおよび/または  $R_2$  が  $R_{10}$  と架橋しており、1つの環系、殊に5または6員環を形成している、請求項6記載の化合物。

【請求項8】

一般式VII a ~ VII f 中の1つが次式

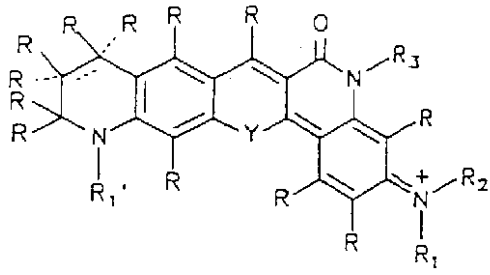
30

【化6】



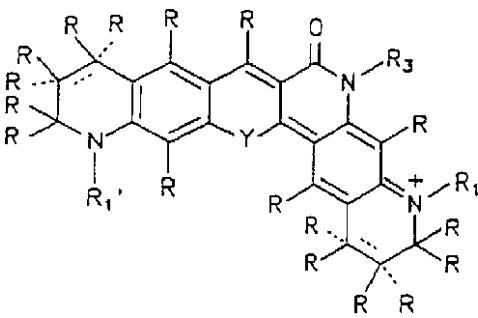
VIIa

10



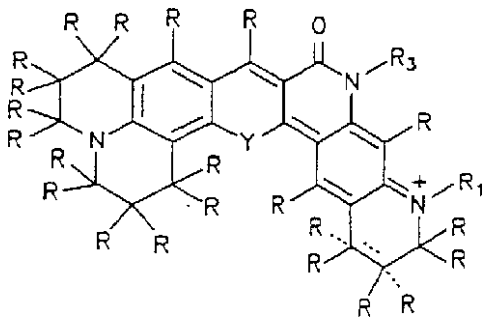
VIIb

20



VIIc

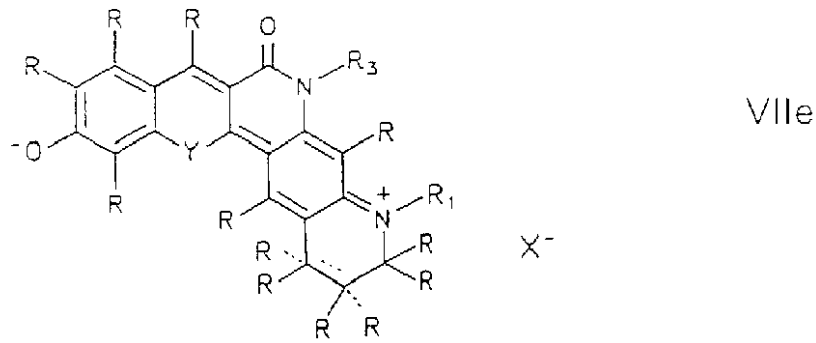
30



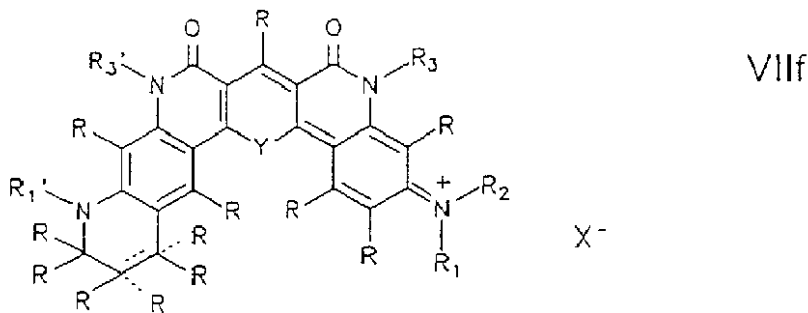
VIId

40

## 【化 7】



10



20

〔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。

30

## 【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  $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$  および / または  $-SH$  である、請求項 11 記載の化合物。

40

## 【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。

50

## 【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】

キサントンは、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, Liebig's 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】

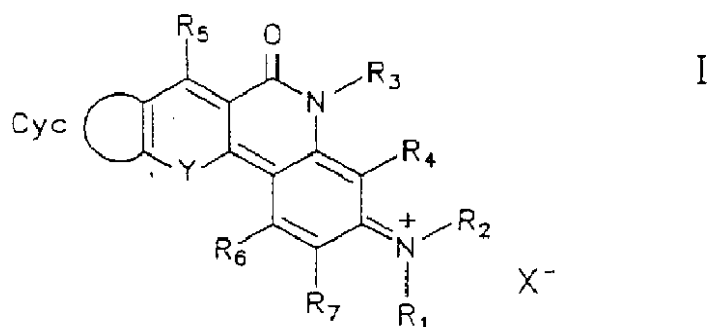
## 【化8】

10

20

30

40



I

## 【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。

10

20

30

40

50

## 【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】

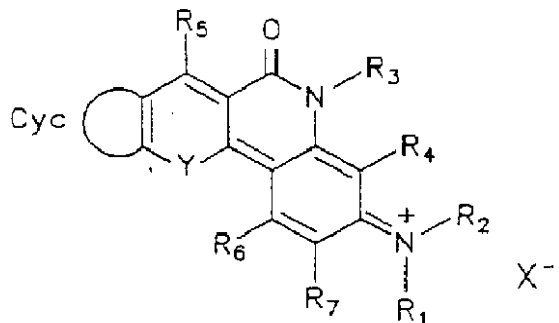
本発明のもう 1 つの課題は、殊に検体の検出法において標識基としての使用に適しておりかつ公知技術水準の欠点を少なくとも部分的に回避する新規のアミドピリリウム化合物を提供することにあつた。

## 【0015】

この課題は、一般式 I

## 【0016】

## 【化 9】



I

10

20

## 【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、

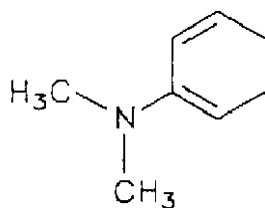
但し、Y が酸素である場合には、 $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  は、メチルであり、 $R_4$ 、 $R_5$ 、

$R_6$  および  $R_7$  は、水素であり、

Cyc は、式 I I または I I I

## 【0018】

## 【化 10】



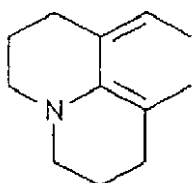
II

30

40

## 【0019】

## 【化 11】



III

## 【0020】

50

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かまた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。

10

【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。

20

【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。

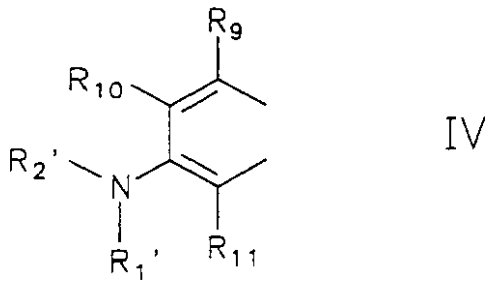
【0025】

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

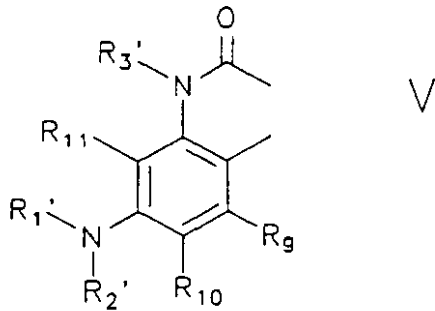
30

【0026】

【化12】



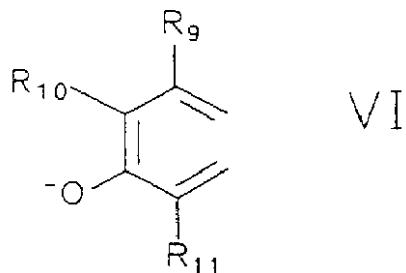
10



【 0 0 2 7 】

20

【 化 1 3 】



30

【 0 0 2 8 】

〔式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> および R<sub>3</sub> は、上記の R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> および R<sub>3</sub> と同様に定義され、R<sub>9</sub> ~ R<sub>11</sub> は、上記の R<sub>4</sub> ~ R<sub>7</sub> と同様に定義される〕で示される構造を有している。

【 0 0 2 9 】

他の好ましい化合物種において、R<sub>1</sub> は R<sub>11</sub> と架橋しておりおよび / または R<sub>2</sub> は R<sub>10</sub> 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。

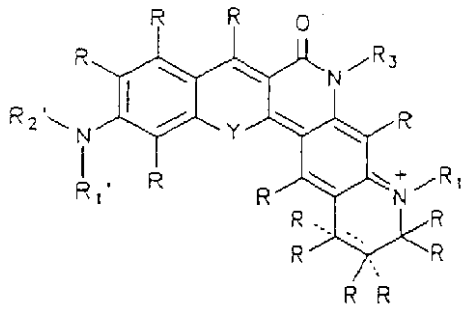
【 0 0 3 0 】

特に好ましい化合物種の例は、一般式 VII a ~ VII f :

【 0 0 3 1 】

40

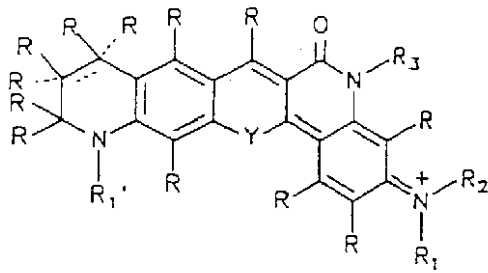
【 化 1 4 】



VIIa

X<sup>-</sup>

10



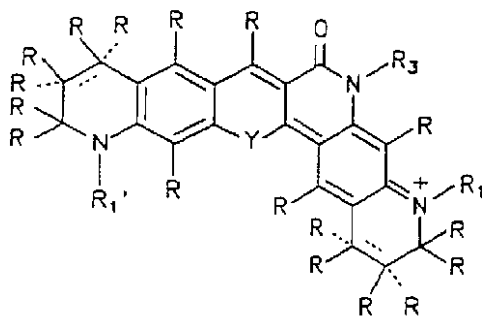
VIIb

X<sup>-</sup>

【0032】

【化15】

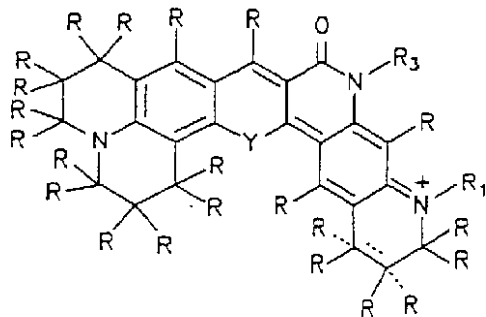
20



VIIc

X<sup>-</sup>

30



VIId

X<sup>-</sup>

40

【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<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> およびR<sub>3</sub> 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<sub>4</sub>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】

50

## 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

【 0 0 3 6 】

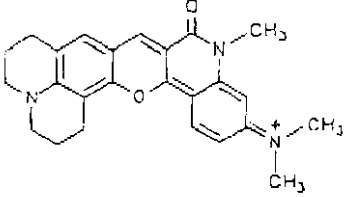
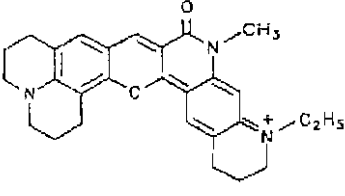
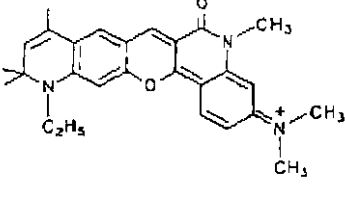
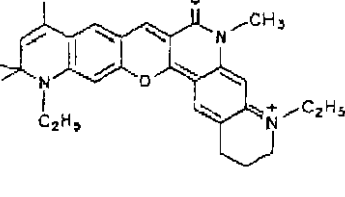
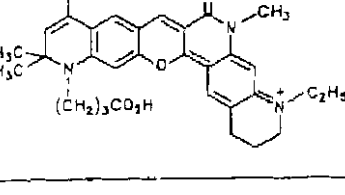
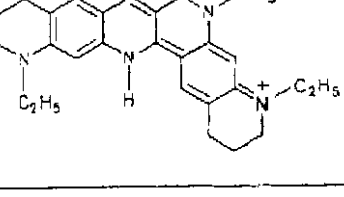
【 表 2 】

10

20

30

40

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

【 0 0 3 7 】

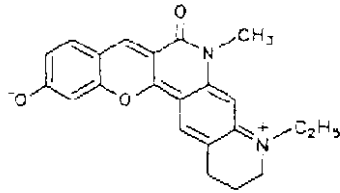
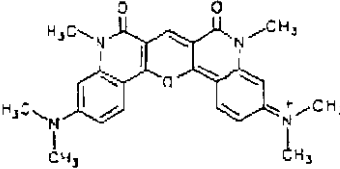
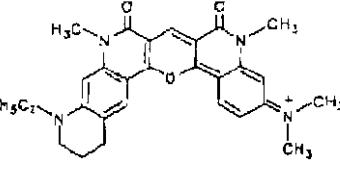
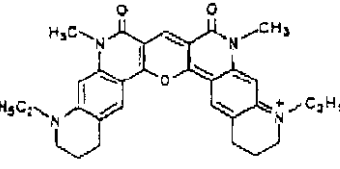
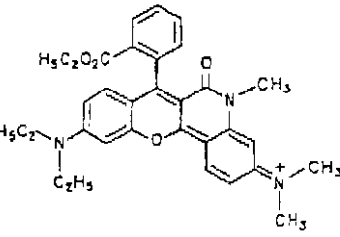
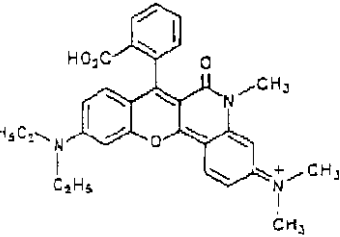
【 表 3 】

10

20

30

40

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

【 0 0 3 8 】

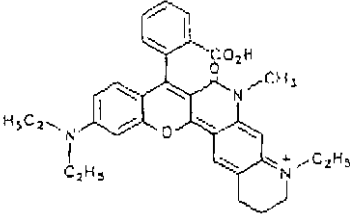
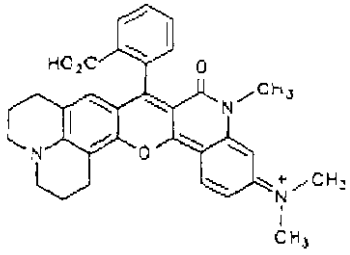
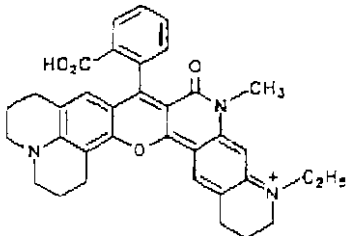
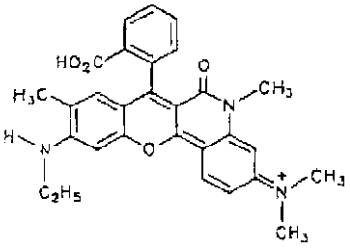
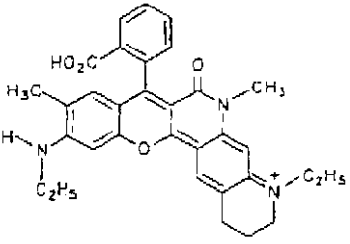
【 表 4 】

10

20

30

40

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

【 0 0 3 9 】

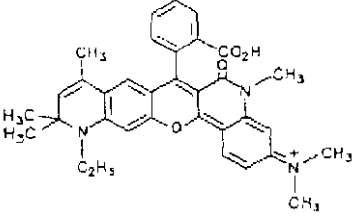
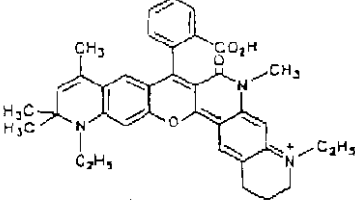
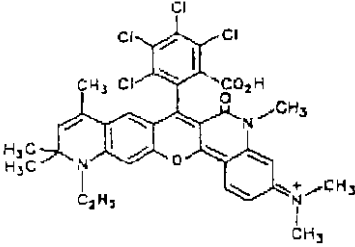
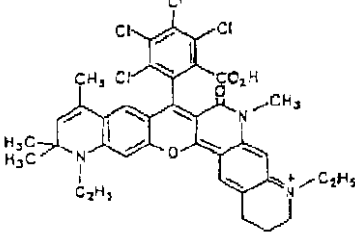
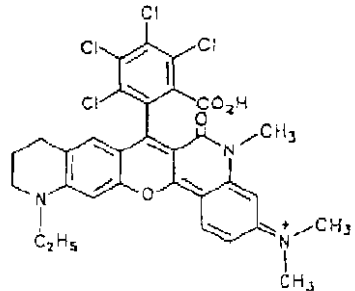
【 表 5 】

10

20

30

40

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

【 0 0 4 0 】

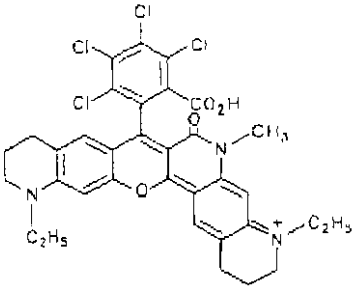
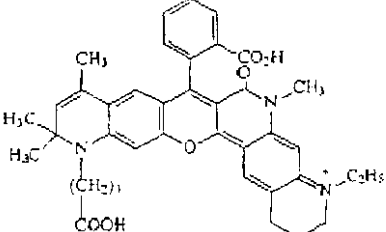
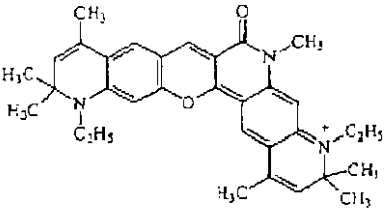
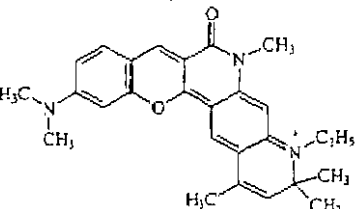
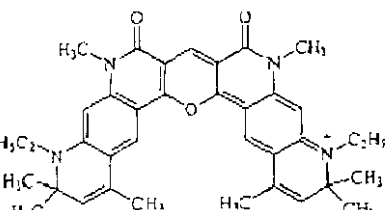
【 表 6 】

10

20

30

40

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

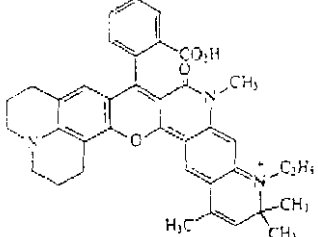
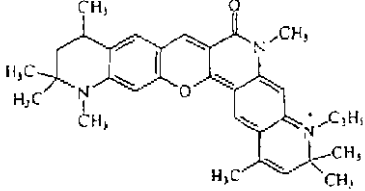
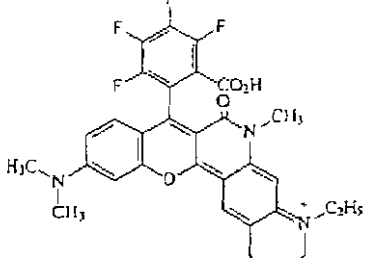
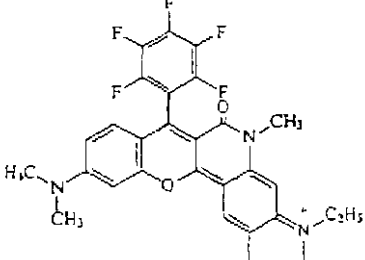
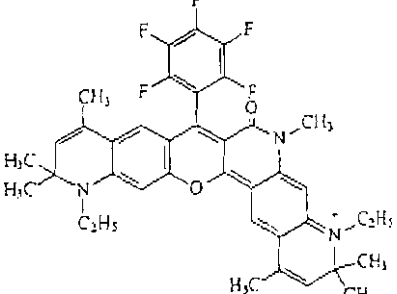
10

20

30

【 0 0 4 1 】

【 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

【 0 0 4 2 】

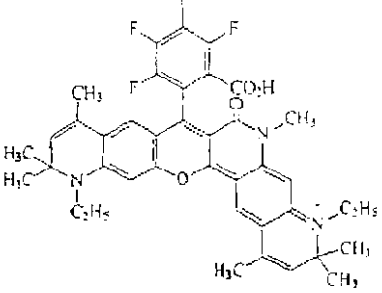
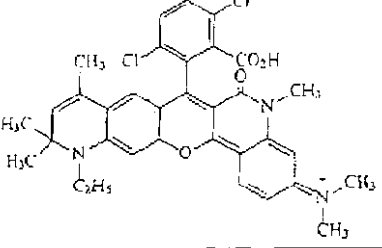
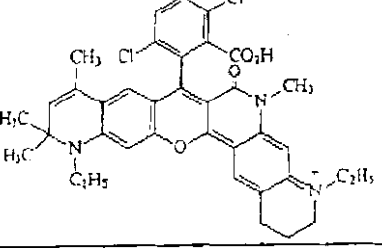
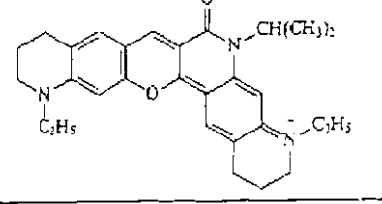
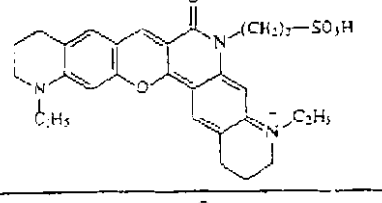
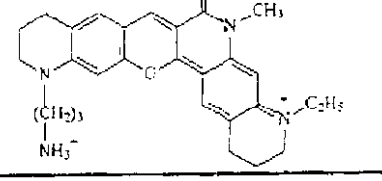
【 表 8 】

10

20

30

40

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

## 【 0 0 4 3 】

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 J A 2 2 7 ( 5 )、NK 1 3 ( 1 6 ) または NK 1 4 ( 1 8 ) の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを示す。

## 【 0 0 4 4 】

## 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) (Liebigs 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 ( J A 2 2 7 ) および構造 1 5

10

20

30

40

50

( J A 2 1 0 ) 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。

【 0 0 4 5 】

化合物 J A 2 1 0

第 1 工程：

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

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 1 8 0 ~ 1 9 0 に加熱する。カラム (長さ : 1 0 c m ; 直径 : 0 . 5 c m ) 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 3 0 m l 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。

10

【 0 0 4 6 】

収量 : 2 . 0 g

C D C l <sub>3</sub> 中での <sup>1</sup> H - N M R データ :

【 0 0 4 7 】

【 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)

20

【 0 0 4 8 】

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 2 5 m l 中に懸濁させ、水酸化カリウム 6 . 7 g ( 0 . 1 2 モル ) を添加する。そのために、最大 6 0 でジメチルスルフェート 8 . 6 g ( 0 . 0 7 モル ) を滴加する (氷 / 食塩浴での冷却)。この懸濁液を水 2 0 0 m l 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。

30

【 0 0 4 9 】

収量 : 1 . 8 g

融点 : 分解下に 2 0 8

C D C l <sub>3</sub> 中での <sup>1</sup> H - N M R データ :

【 0 0 5 0 】

【 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)

40

【 0 0 5 1 】

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 1 0 % の塩酸 5 m l 中で還流下に 2 時間加熱する。この懸濁液を 1 0 % の酢酸ナトリウム溶液で p H 5 に中和する。沈

50

殿物を吸引濾過し、デシケーター中で乾燥する。

【0052】

$d_6$  - DMSO 中での  $^1\text{H}$  - NMR データ :

【0053】

【外3】

$\delta$  1,1 (T, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 1,9 (M, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 2,7 (T, 2H, Ar- $\text{CH}_2-$ ); 3,3 - 3,5 (M, 7H, N- $\text{CH}_3$ , 2 x N- $\text{CH}_2-$ ); 5,5 (S, 1H,  $=\text{CH}-$ ); 6,3 (S, 1H, ArH); 7,4 (S, 1H, ArH); 10.8 (S, 1H,  $-\text{OH}$ )

10

【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。

20

【0055】

$\text{CDCl}_3$  中での  $^1\text{H}$  - NMR データ :

【0056】

【外4】

$\delta$  1,3 (T, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 2,0 (M, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 2,8 (T, 2H, Ar- $\text{CH}_2-$ ); 3,5 (M, 4H, 2 x N- $\text{CH}_2-$ ); 3,6 (S, 3H, N- $\text{CH}_3$ ); 6,1 (S, 1H, ArH); 7,7 (S, 1H, ArH); 10,4 (S, 1H,  $-\text{CH}=\text{O}$ )

30

【0057】

第5工程 :

J A 2 1 0

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 ( 0.69 ミリモル ) を氷酢酸 20 ml 中に溶解し、100 の熱い油浴中で 20 分間加熱する。この溶液を水 100 ml 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。

【0058】

DMSO -  $d_6$  中での  $^1\text{H}$  - NMR データ :

40

【0059】

【外5】

$\delta$  1,3 (T, 6H,  $-\text{CH}_3$ ); 1,9 (S, 4H,  $-\text{CH}_2-$ ); 2,7 (S, 4H, Ar- $\text{CH}_2-$ ); 3,4 (S, 6H, N- $\text{CH}_3$ ); 3,6 (M, 8H, 2 x N- $\text{CH}_2-$ ); 6,2 (S, 2H, ArH); 7,6 (S, 2H, ArH); 8,5 (S, 1H,  $-\text{CH}=\text{O}$ )

【0060】

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

50

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 ( N K 1 4 )、構造 2 0 ( N K 1 6 ) および構造 2 3 ( N K 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 - テトラクロロベンゾイル ) - 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。

10

【 0 0 6 2 】

化合物 N K 1 4

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。

20

【 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

30

化合物 N K 1 6

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。

40

【 0 0 6 5 】

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 6 】

収量 : 1 6 0 m g

化合物 N K 2 1

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

50

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%) 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。

10

【0068】

収量: 50 mg

C. 共役形成に関する例

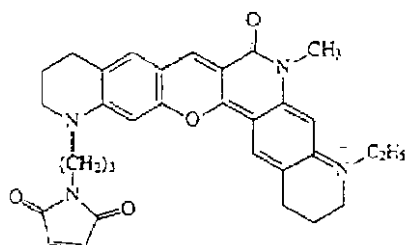
NK41 - マレインイミド

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 100 mg (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 50 ml 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 25 mg と一緒に無水酢酸 5 ml 中に懸濁させ、30 分間約 80 °C に加熱する。冷却後、10% の過塩素酸ナトリウム 30 ml を添加し、濾過し、固体を乾燥させる。

20

【0069】

【化16】



30

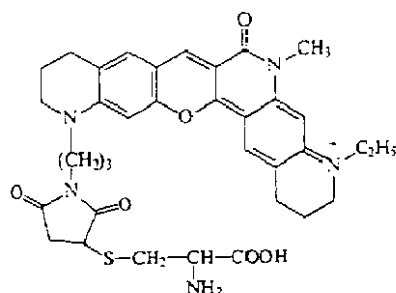
【0070】

NK41 - マレインイミド - システイン共役

MK41 - マレインイミド 70 mg (0.16ミリモル) をエタノール 20 ml 中に溶解し、システイン 22 mg (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 50 ml を滴加する。沈殿した固体を濾別し、乾燥させる。

【0071】

【化17】



40

50

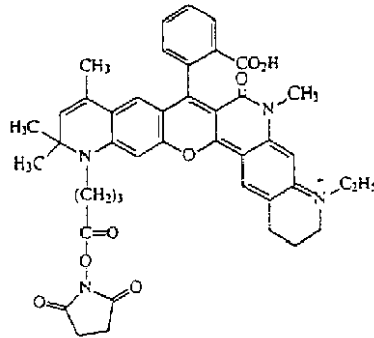
## 【 0 0 7 2 】

NK 2 7 - 活性エステル

NK 2 7 5 0 m g ( 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 2 0 m l 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。

## 【 0 0 7 3 】

【化 1 8 】



10

## 【 0 0 7 4 】

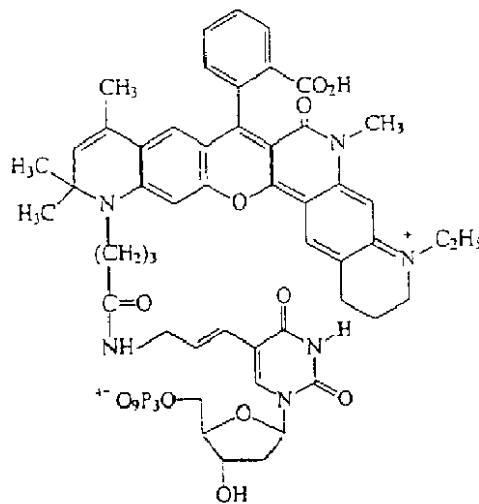
NK 2 7 - d U T P 共役

5 - ( 3 - アミノアリル ) - d U T P 1 0 モルを 0 . 1 M の硼酸ナトリウム緩衝液 0 . 5  
 m l ( p H 8 ) 中に溶解し、アミン不含のジメチルホルムアミド 1 m l 中の NK 2 7 - 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 1 5 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。

20

## 【 0 0 7 5 】

【化 1 9 】



30

40

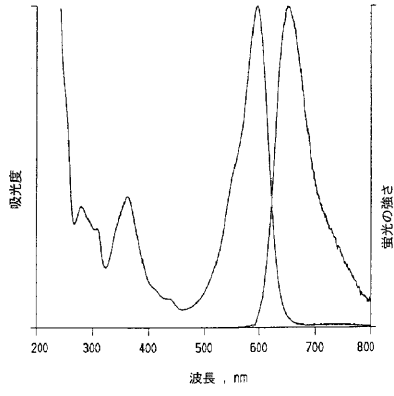
## 【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 本発明による化合物 J A 2 2 7 ( 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。

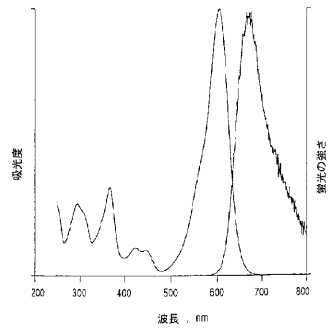
【 図 2 】 本発明による化合物 NK 1 3 ( 1 6 ) のエタノール中での吸収スペクトルおよ  
 び蛍光スペクトルを示す線図。

【 図 3 】 本発明による化合物 NK 1 4 ( 1 8 ) 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。

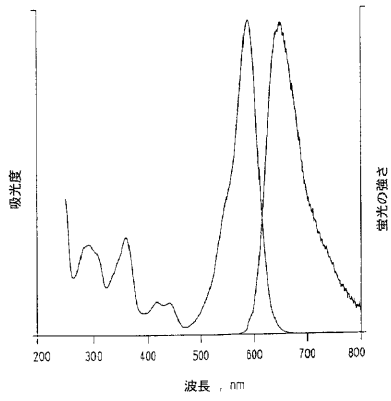
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>C 0 9 B 57/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 9 B 57/00	Z
<b>C 0 9 K 11/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 9 K 11/06	
<b>G 0 1 N 33/58</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/58	A
		G 0 1 N 33/58	Z

- (72)発明者 カール - ハイנט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 5 0
- (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 2 5
- (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 1 0 6

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 米国特許第 0 3 7 8 6 3 6 9 ( U S , A )  
米国特許第 0 5 1 0 2 4 6 1 ( U S , A )  
特開平 1 0 - 2 2 6 6 8 8 ( J P , A )  
特開平 1 1 - 0 2 9 5 5 6 ( J P , A )  
H HARNISCH, LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE, ドイツ, VERLAG CHEMIE GMBH, 1 9 7 1 年, V751,  
P155-158  
Indian J Chem Sect A, 1 9 7 9 年, Vol.18A, No.2, Page.106-108  
Spectrochim Acta Pt A, 2 0 0 1 年, Vol.57A, No.11, Page.2271-2283

## (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

G01N 33/533  
C07D 471/22  
C07D 491/052  
C07D 491/147  
C07D 491/22  
C09B 57/00  
C09K 11/06  
G01N 33/58  
CA/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	新型酰胺吡喃荧光染料		
公开(公告)号	<a href="#">JP4465121B2</a>	公开(公告)日	2010-05-19
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		
当前申请(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 C09B57/00 C09K11/06 G01N33/58 C09B11/24		
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		
代理人(译)	矢野俊夫		
审查员(译)	三木隆		
优先权	19919120 1999-04-27 DE		
其他公开文献	JP2002543395A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了一类可用作荧光染料的不对称单苯并ox吨化合物，其具有结构 (I)，其中Y 1和Y 2各自为羟基，氨基，亚胺基或氧基，R 1-R 8为氢，氟，氯，烷基，烯基，炔基，磺酸盐，氨基，酰氨基，腈基，烷氧基，连接基团和它们的组合，R9是乙炔，烷基，烯基，氰基，取代的苯基，以及它们的组合。本发明还包括可用于合成具有通式结构 (II) 的不对称苯并ox吨化合物的新型中间体化合物，其中取代基R3-R7对应于上述结构中相同参考的取代基，Y2是羟基或胺。另一方面，本发明包括合成上述染料化合物和中间体的方法。在另一方面，本发明包括用不对称苯并ox吨染料化合物标记的试剂，包括脱氧核苷酸，双脱氧核苷酸，亚磷酰胺和多核苷酸。另一方面，本发明包括利用这种染料化合物和试剂的方法，包括双脱氧核苷酸测序和片段分析方法。

