

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4038017号
(P4038017)

(45) 発行日 平成20年1月23日(2008.1.23)

(24) 登録日 平成19年11月9日(2007.11.9)

(51) Int. Cl. F I
C07D 311/94 (2006.01) C O 7 D 311/94 1 O 1
C12Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68

請求項の数 9 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2000-522168 (P2000-522168)	(73) 特許権者	500069057
(86) (22) 出願日	平成10年11月17日 (1998.11.17)		アプレラ コーポレーション
(65) 公表番号	特表2001-524493 (P2001-524493A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
(43) 公表日	平成13年12月4日 (2001.12.4)		04 フォスター シティ, リンカーン
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/024626		センター ドライブ 850
(87) 国際公開番号	W01999/027020		850 Lincoln Centre
(87) 国際公開日	平成11年6月3日 (1999.6.3)		Drive Foster City C
審査請求日	平成12年8月25日 (2000.8.25)		ALIFORNIA 94404 U. S
審査番号	不服2004-13352 (P2004-13352/J1)		. A.
審査請求日	平成16年6月28日 (2004.6.28)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	08/978, 775		弁理士 青山 稔
(32) 優先日	平成9年11月25日 (1997.11.25)	(74) 代理人	100067035
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 岩崎 光隆
		(74) 代理人	100064610
			弁理士 中嶋 正二

最終頁に続く

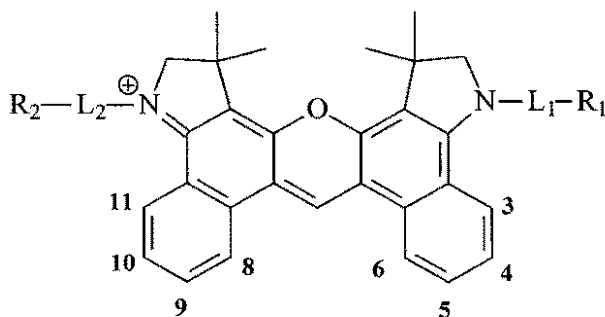
(54) 【発明の名称】 蛍光標識試薬として有用なジベンゾローダミン色素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の構造：

【化1】



[式中、

L₁ および L₂ は、それぞれ二置換フェニル、二置換ビフェニルおよび - (C H₂)_n - (ここで、n は 1 ~ 8 の範囲である) からなる群より選択され、

R₁ および R₂ は、それぞれ水素、カルボキシレート、スルホネートおよび N - ヒドロキシスクシンイミジルエステルから選択される] で表される化合物。

【請求項2】

C - 4 炭素と C - 5 炭素または C - 9 炭素と C - 10 炭素にわたって結合された縮合芳香族環を含む、請求項 1 に記載の化合物。

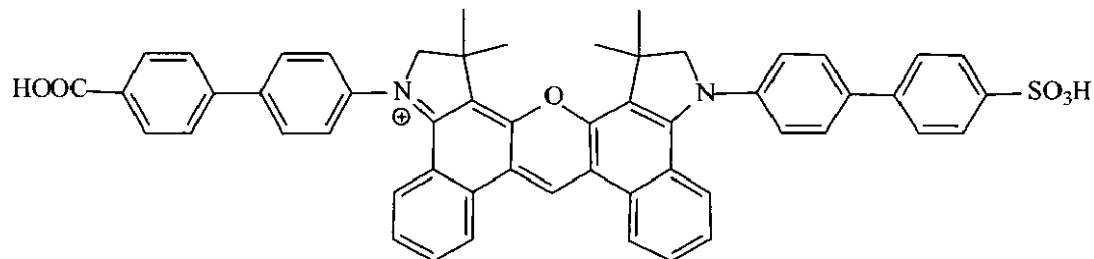
【請求項 3】

C - 4 炭素と C - 5 炭素にわたって結合された縮合芳香族環および C - 9 炭素と C - 10 炭素にわたって結合された縮合芳香族環を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

以下の構造：

【化 2】



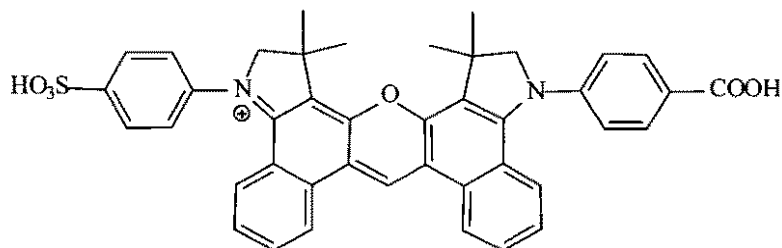
10

を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

以下の構造：

【化 3】



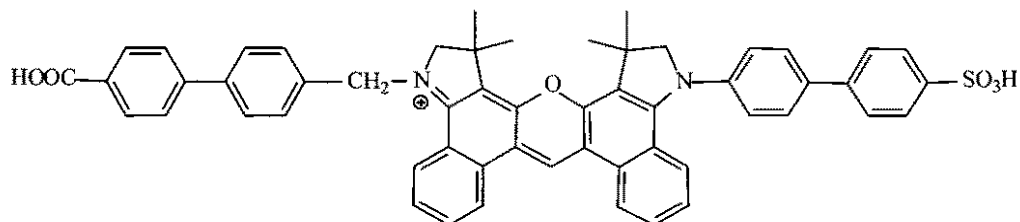
20

を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

以下の構造：

【化 4】



30

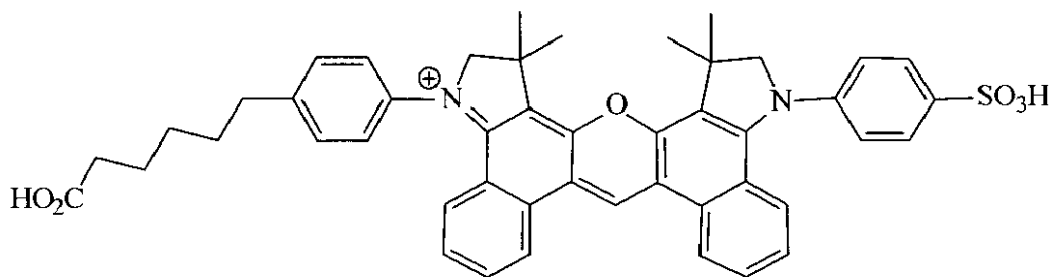
40

を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】

以下の構造：

【化 5】



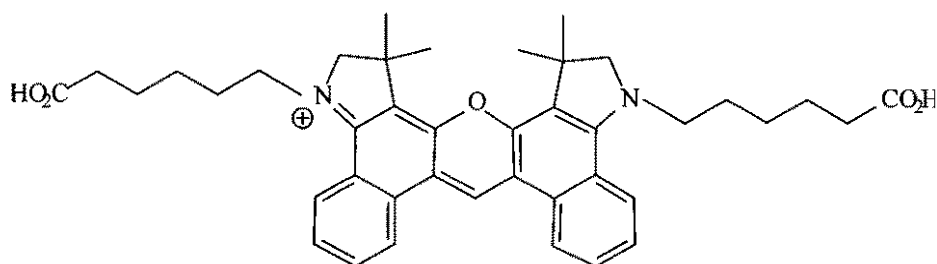
10

を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 8】

以下の構造：

【化 6】



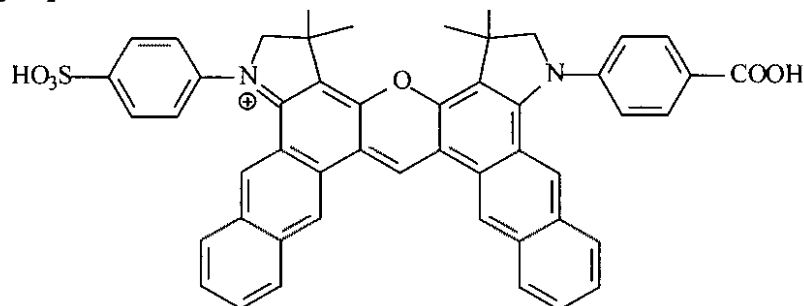
20

を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 9】

以下の構造：

【化 7】



30

を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

40

本発明は、一般的に、蛍光色素化合物に関する。より詳細には、本発明は、蛍光標識剤として有用な、修飾されたローダミン色素に関する。

【0002】

(背景)

蛍光標識を使用する、生物学的分析物の非放射性検出は、現代分子生物学において重要な技術である。放射性標識の必要を除去することによって、安全性が高められ、そして薬剤処分に関連する環境影響 (i m p a c t) および費用は、非常に軽減される。そのような非放射性蛍光検出を使用する方法の例として、4色自動DNA配列決定、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法、ポリメラーゼ連鎖反応産物の検出、イムノアッセイなどが挙げられる。

50

【0003】

多数の適用において、複数の空間的に重複する分析物の独立した検出（例えば、単管多重DNAプローブアッセイおよび4色自動DNA配列決定）を達成するために、複数のスペクトルで区別可能な蛍光標識を利用することは、有益である。単管多重DNAプローブアッセイの場合、空間的に区別可能な蛍光標識を利用することによって、反応管の数は減少され得、それによって、実験プロトコルを簡略化し、適用特異的試薬キットの製造を容易にする。4色自動DNA配列決定の場合、多色蛍光標識は、単一レーンにおいての複数の塩基の分析を可能にし、それによって、単色法を超えて処理量を増加させ、そして内部レーン電気泳動易動度変化と関連する不確定性を減少させる。

【0004】

複数のスペクトルで区別可能な蛍光標識のセットを集めることは、問題がある。多色蛍光検出は、特に単励起光源、電気泳動分離、および/または酵素による処理を必要とする適用（例えば、自動DNA配列決定）について、色素標識の選択において少なくとも6個の厳密な制約を賦課する。第一に、構造的に類似する色素のセット（その発光スペクトルはスペクトルで分解される）を見つけることは、有機蛍光色素についての典型的な発光バンド半値幅が約40～80ナノメートル（nm）であるので、困難である。第二に、たとえ重複しない発光スペクトルを有する色素が確認されても、それぞれの蛍光量子効率が低すぎる場合は、そのセットは適切でない。第三に、数個の蛍光色素が同時に使用される場合、色素の吸収バンドは通常広範囲に分離しているため、同時励起は困難である。第四に、色素の、電荷、分子のサイズ、およびコンホメーションは、分析物の電気泳動易動度に悪影響を与えてはならない。第五に、蛍光色素は、分析物（例えば、DNA合成溶媒および試薬、緩衝液、ポリメラーゼ酵素、リガーゼ酵素など）を生成または製造するために使用される化学物質と適合でなければならない。第六に、色素は、レーザー励起に耐えるに十分な光安定性（*photostability*）を有さなければならない。

【0005】

4色自動DNA配列決定適用に適切な、現在入手可能な複数の色素のセットは、セットを作る全色素からの蛍光発光を十分に励起する、ブルーまたはブルー-グリーンレーザー光（例えば、アルゴンイオンレーザー）を必要とする。市販の自動DNA配列決定システムにおけるブルーまたはブルー-グリーンレーザーの使用は、このようなレーザーの高コストおよび寿命制限のために、有益ではない。

【0006】

（要旨）

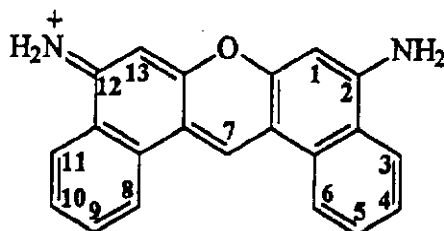
本発明は、多色蛍光検出について有用な、スペクトル分解可能な蛍光標識のセットの作製に適切な、ジベンゾローダミン色素化合物のクラスの本発明者らの発見に関する。表題色素化合物は、約630nmより高いの波長を有する励起光源（例えば、ヘリウム-ネオンガスレーザーまたは固体状ダイオードレーザー）を用いる、4色自動DNA配列決定システムにおける使用について、特によく適している。

【0007】

第一の局面において、本発明は、以下の構造を有するジベンゾローダミン色素化合物、ならびにその窒素およびアリール置換形態を包含する。

【0008】

【化29】



10

20

30

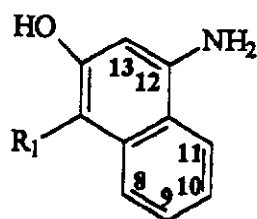
40

50

第二の局面において、本発明は、以下の構造を有するジベンゾローダミン色素化合物の合成について有用な中間体を包含する。

【0009】

【化30】

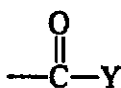


10

式 I において、R₁は、Hまたは

【0010】

【化31】



20

であり、ここで、Yは、H、低級アルキル、低級アルケン、低級アルキン、芳香族、フェニル、多環式芳香族、複素環、水可溶化基 (water-solubilizing group)、または結合基であり、そしてその置換形態を包含する。R₁がHである場合、C-12結合窒素ならびにC-12およびC-13炭素は、4~7員を有する第一環構造を形成し、そして/またはC-12結合窒素ならびにC-11およびC-12炭素は、5~7員を有する第二環構造を形成する。式 I の化合物は、さらに、そのアリールおよび窒素置換形態を包含する。

30

【0011】

第三の局面において、本発明は、エネルギー移動色素化合物 (ドナー色素、アクセプター色素、ならびにドナー色素およびアクセプター色素を結合するリンカーを包含する) を含む。ドナー色素は、第一波長で光を吸収し、そして応答で励起エネルギーを放出し得、そしてアクセプター色素は、ドナー色素によって放出された励起エネルギーを吸収し、そして応答で第二波長で蛍光を發し得る。リンカーは、ドナー色素とアクセプター色素との間のエネルギーの能率的な移動を容易にすることに役立つ。本発明によると、ドナーおよびアクセプター色素の少なくとも1つが、上記の構造のセットを有するジベンゾローダミン色素である。

【0012】

第四の局面において、本発明は、構造NUC-Dを有する、標識されたヌクレオシド/チドを包含し、ここで、NUCは、ヌクレオシド/チドまたはNUCはヌクレオシド/チドアナログであり、そしてDは上記の構造のセットを有するジベンゾローダミン色素化合物である。本発明によると、NUCおよびDは、そこで結合が置換位の1つでDに連結している結合によって連結される。さらに、NUCがプリン塩基を含む場合、この結合はこのプリンの8位に連結されており、NUCが7-デアザプリン塩基を含む場合、この結合はこの7-デアザプリンの7位に連結され、そしてNUCがピリミジン塩基を含む場合、この結合はこのピリミジンの5位に連結される。

40

【0013】

第五の局面において、本発明は、ポリヌクレオチド分析法を含み、そしてこれは、上記の

50

構造のセットを有するジベンゾローダミン色素で標識した標識ポリヌクレオチドフラグメントのセットを形成し、この標識ポリヌクレオチドフラグメントをサイズ依存分離プロセス(size-dependent separation process)(例えば、電気泳動)にかけ、そしてこの分離プロセス後の標識ポリヌクレオチドフラグメントを検出する、工程を含む。

【0014】

上述の本発明の種々の局面は、複数蛍光検出に有用な公知の蛍光色素化合物に対する、一個以上の下記の重要な利点を達成する：(1)表題色素化合物は、約630nm以上の波長を用いる低コストのレッドレーザーによって効率的に励起され得る；(2)表題色素化合物の発光スペクトルは、窒素および/またはアリ-ル置換基のタイプならびに位置における微小な変化によって調整され得、これは、スペクトルで分解可能な蛍光発光スペクトルを有するが、同様の吸収特性を有する色素セットの作製を可能にする；(3)表題色素化合物は、その有利な蛍光特性を妥協せずに、ヌクレオシド/チドまたはポリヌクレオチドに容易に結合し得る；(4)表題色素化合物は、狭い発光バンド幅を有する、すなわち、その発光バンド幅は、約70nmより小さい、最大発光強度の半分のところでの全幅を有する；(5)表題色素化合物は、高量子収量を維持するが、緩衝水溶液中に高溶解である；(6)表題色素化合物は、比較的安定である；および(7)表題化合物は、比較的大きな吸光係数(すなわち、約50,000より大きい)を有する。

10

【0015】

本発明のこれらおよび他の特色ならびに利点は、以下の説明、図、および添付の特許請求の範囲を参照することで、よりよく理解される。

20

【0016】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

本発明の好ましい実施態様の参照(添付の図面中に例示される実施例)は、ここで、詳細になされる。本発明は好ましい実施態様と組み合わせて説明されるが、それらが本発明を本実施態様に限定する意図はないということが理解される。それに対して、本発明は、添付の特許請求の範囲によって定義されるような、本発明内に含まれ得る、全ての代替物、改変物、および等価物を包含することを意図する。

【0017】

一般的に、本発明は、蛍光標識として有用なジベンゾローダミン色素化合物の新規のクラス、このような色素、このような色素を利用する試薬の合成のための方法および中間体、ならびに分析バイオテクノロジーの分野でのこのような色素および試薬を使用する方法を包含する。本発明の化合物は、蛍光核酸分析(例えば、自動DNA配列決定およびフラグメント分析、ハイブリダイゼーションアレイにおけるプローブハイブリダイゼーションの検出、核酸増幅産物の検出など)の分野における特定の適用を見出す。

30

【0018】

(I. 定義)

他に述べない限り、本明細書中で使用される以下の用語およびフレーズは、以下の意味を有することを意図する：

色素のセットに関する「スペクトル分解」は、色素の蛍光発光バンドが十分に区別できる(すなわち、十分に非重複(non-overlapping)である)ということ、そこへ各色素が結合される試薬(例えば、ポリヌクレオチド)が、標準的な光検出システム(例えば、バンド通過フィルターおよび光電子増倍管、電荷結合素子および分光器などを用いる)を使用して、各色素によって発生した蛍光シグナルに基づいて区別され得るということ(米国特許第4,230,558号、同第4,811,218号、またはWhelessら、21~76頁、Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis(Academic Press, New York, 1985)に記載のシステムによって例示されるように)を意味する。

40

【0019】

「複素環」は、その中で一個以上の環原子が炭素でない(すなわち、ヘテロ原子である)

50

環式化合物を意味する。例示的な複素環は、ピロール、インドール、フラン、ベンゾフラン、チオフェン、ベンゾチオフェンおよび他の類似構造が挙げられるが、これらに限定されない。

【0020】

「結合基」は、試薬またはエネルギー移動色素対のメンバーと結合する「相補官能基 (complementary functionality)」と反応し得る部分のことを意味し、このような反応は、色素を試薬またはエネルギー移動色素対のメンバーと連結させる「結合」を形成する。好ましい結合基は、イソチオシアナート、塩化スルホニル、4,6-ジクロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、または相補官能基がアミンのときはいつでも他の活性化カルボキシレートである。好ましくは、結合基は、マレイミド、ハロアセチル、または相補官能基がスルフヒドリルのときはいつでもヨードアセトアミドである。R. Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular probes, Inc. (1992)を参照のこと。特に好ましい実施態様において、結合基はN-ヒドロキシスクシンイミジル (NHS) エステルであり、そして相補官能基はアミンであり、ここで、NHSエステルを形成するために、カルボキシレート基を含む本発明の色素は、ジシクロヘキシルカルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドと反応する。

10

【0021】

本明細書で使用されるような「置換 (された)」は、一個以上の水素原子が一個以上の非水素原子、官能基または部分と置き換えられる、分子をいう。例えば、非置換窒素は -NH₂であるが、置換窒素は -NHCH₃である。例示的な置換基には、ハロ (例えば、フッ素および塩素)、低級アルキル、低級アルケン、低級アルキン、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、芳香族、フェニル、多環芳香族、複素環、水可溶化基、および結合基が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0022】

「多環式芳香族」とは、複数の環構造を有する芳香族炭化水素 (ビアリールおよび縮合ベンゼノイド炭化水素を含む) を意味する。ビアリールは、2個以上の環が単結合によって共に結合されるベンゼノイド化合物である。このクラスの親 (parent) 系は、ビフェニルである。縮合ベンゼノイド化合物は、それぞれの環対が2個の炭素を共有するような様式で、オルト位で共に融合される2個以上のベンゼン環によって特徴づけられる。この基の最も単純なメンバーは、ナフタレン (2環を有する)、ならびにアントラセンおよびフェナントレン (3環を有する) である。

30

【0023】

「低級アルキル」とは、1~8個の炭素原子を含む直鎖および分枝炭化水素部分を示し、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、tert-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、ネオペンチル、tert-ペンチルなどである。

【0024】

「低級アルケン」とは、1~8個の炭素原子を含む炭化水素のことであって、ここで、1個以上の炭素-炭素結合が二重結合である、ということの意味する。

40

【0025】

「低級アルキン」とは、1~8個の炭素原子を含む炭化水素のことであって、ここで、1個以上の炭素が三重結合で結合される、ということの意味する。

【0026】

「ヌクレオシド」とは、プリン、デアザプリン、またはピリミジンヌクレオシド塩基 (例えば、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン、デアザアデニン、デアザグアノシンなど) から成り、1'位で五炭糖に結合する化合物のことである。ヌクレオシド塩基がプリンまたは7-デアザプリンである場合、糖部分はプリンまたはデアザプリンの9位に結合しており、そしてヌクレオシド塩基がピリミジンである場合、糖部分はピリミジ

50

ンの1位に結合している(例えばKornbergおよびBaker、DNA Replication、第2版(Freeman, San Francisco, 1992))。本明細書中で使用される用語「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドのリン酸エステル(例えば、三リン酸エステル)のことであり、ここでエステル化の最も典型的な部位は、五炭糖のC-5位に結合するヒドロキシ基である。本明細書中で使用される用語「ヌクレオシド/チド」は、ヌクレオシドおよびヌクレオチド両方を含む化合物の1セットのことである。ヌクレオシド/チドに関する「アナログ」は、修飾された塩基部分、修飾された糖部分および/または修飾されたリン酸エステル部分を有する合成的アナログを含み、例えば、Scheit Nucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980)によって一般的に記載されている。リン酸アナログは、リン(phosphorous)原子が+5酸化状態であり、そして1個以上の酸素原子が非酸素部分で置換されている、リン酸アナログを含む。例示的なアナログは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデート、ホスホルアミデート、ポロノホスフェート、(対イオンが存在する場合、関連する対イオン(例えば、 H^+ 、 NH_4^+ 、 Na^+)を含む)が、これらに限定されない。例示的な塩基アナログには、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、プソイドウリジン、C-5-プロピン、イソシトシン、イソグアニン、2-チオピリミジン、および多の同様のアナログが挙げられるが、これらに限定されない。例示的な糖アナログには、2'-または3'-修飾体(ここで、2'-または3'-位は、水素、ヒドロキシ、アルコキシ(例えば、メトキシ、エトキシ、アリルオキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシおよびフェノキシ)、アミノまたはアルキルアミノ、フルオロ、クロロおよびプロモである)が挙げられるが、これらに限定されない。用語「標識(された)ヌクレオシド/チド」は、結合を介して、式Iの色素化合物に共有結合しているヌクレオシド/チドのことである。

【0027】

「水可溶化基」とは、水溶液中の本発明の化合物の溶解度を増加させる置換基のことを意味する。例示的な水可溶化基には、第4級アミン、スルフェート、スルホネート、カルボキシレート、ホスフェート、ポリエーテル、ポリヒドロキシル、およびボロネート(boronate)が挙げられるが、これらに限定されない。

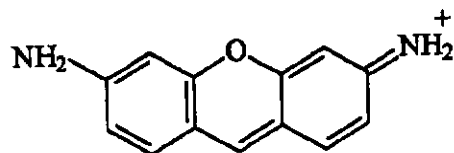
【0028】

「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」とは、天然ヌクレオチドモノマーのポリマーまたはそのアナログのことを意味し、これは二重および一重らせんデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、そのアノマー形態などを含む。通常、ヌクレオチドモノマーは、ホスホジエステル結合によって結合されており、ここで、本明細書中で使用されるように、用語「ホスホジエステル結合」とは、ホスホジエステル結合(単数または複数)(そのホスフェートアナログを含む)をいい、これは対イオンが存在する場合、このような関連する対イオン(例えば、 H^+ 、 NH_4^+ 、 Na^+)を含む。典型的には、ポリヌクレオチドは、大きさで、少数モノマー単位(たとえば、5~40)から数千モノマー単位の範囲である。ポリヌクレオチドが、「ATGCCCTG」のような文字の配列によって表される場合はいつも、ヌクレオチドは左から右への5' 3'順序であり、そして他に示されなければ、「A」はデオキシシアデノシンを表し、「C」はデオキシシチジンを表し、「G」はデオキシグアノシンを表し、「T」はデオキシチミジンを表すということが理解される。

【0029】

「ローダミン色素」は、一般的多環構造

【0030】**【化32】**



を含む色素であり、そしてこれは任意のおよび全てのその置換されたバージョンを包含する。

10

【0031】

(II. 1-アミノ-3-ヒドロキシナフタレン中間体)

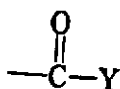
(A. 構造)

第一の局面では、本発明は、ジベンゾローダミン色素の合成における中間体として有用な1-アミノ-3-ヒドロキシナフタレン化合物の新規のクラスを含む。これらの化合物は、直下の式Iに示される一般構造(その置換体を包含する)を有する。式Iにおいて、R¹はHまたは

【0032】

【化33】

20

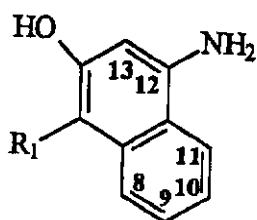


であり、ここで、Yは、H、低級アルキル、低級アルケン、低級アルキン、芳香族、フェニル、多環式芳香族、複素環、水可溶化基、または結合基であり、そしてこれはその置換体を含む。R¹がHである場合、C-12結合窒素ならびにC-12およびC-13炭素は、4~7員を有する第一環構造を形成し、そして/またはC-12結合窒素ならびにC-11およびC-12炭素は、5~7員を有する第二環構造を形成する。式Iの化合物はさらに、そのアリールおよび窒素置換形態を包含する。(本明細書中で提供される全ての分子構造は、示される正確な電子構造を含むだけでなく、全ての共鳴構造、プロトン化状態およびその関連する対イオンを包含することが意図されるということに注意する。)

30

【0033】

【化34】



40

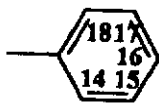
式 I

式Iの化合物の1つの好ましい実施態様において、Yはフェニルまたは置換されたフェニルであり、そしてこのフェニルは以下の構造を有する。

50

【 0 0 3 4 】

【 化 3 5 】



10

C - 1 4 ~ C - 1 8 位のいずれかひとつにおける置換基は、任意の適切な置換基であり得る。好ましくは、この置換基は、塩素、フッ素、低級アルキル、カルボン酸、スルホン酸、 $-CH_2OH$ 、アルコキシ、フェノキシ、結合基、水可溶化基、およびその置換形態である。特に好ましい実施態様において、C - 1 8 位での置換基は、カルボン酸およびスルホネートからなる群から選択され、最も好ましくはカルボン酸である。別の特に好ましい実施態様において、C - 1 4 および C - 1 7 位での置換基は、塩素である。別の好ましい実施態様において、C - 1 4 ~ C - 1 7 位での置換基は、塩素またはフッ素である。さら

20

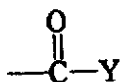
【 0 0 3 5 】

式 I の化合物の別の好ましい実施態様において、C - 1 2 結合窒素ならびに C - 1 2 および C - 1 3 炭素は、4 ~ 7 員を有する第一環構造を形成し、そして / または C - 1 2 結合窒素ならびに C - 1 1 および C - 1 2 炭素は、5 ~ 7 員を有する第二環構造を形成する。より好ましくは、第一および / または第二環構造は 5 員を有し、ここで、好ましくは、この 5 員環構造は、1 個のジェミナル (g e m) で二置換された炭素を含む。好ましくは、このジェミナル置換基は、低級アルキル (例えば、メチル) である。別の好ましい実施態様において、この 5 員環は、結合基で置換される。C - 1 2 結合窒素ならびに C - 1 2 および C - 1 3 炭素が、4 ~ 7 員を有する第一環構造を形成し、そして / または C - 1 2 結合窒素ならびに C - 1 1 および C - 1 2 炭素が、5 ~ 7 員を有する第二環構造を形成する本発明の好ましい実施態様において、 R_1 は H または

30

【 0 0 3 6 】

【 化 3 6 】



40

であり得、そしてここで、Y は、H、低級アルキル、低級アルケン、低級アルキン、芳香族、フェニル、多環式芳香族、複素環、水可溶化基、または結合基であり、そしてこれはその置換された形態を含む。

50

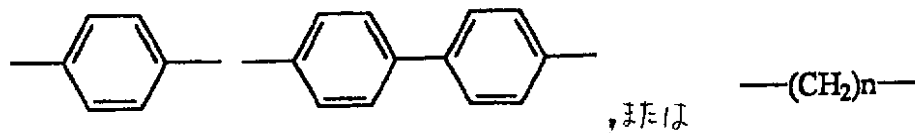
【0037】

式Iの化合物のさらに別の好ましい実施態様において、この化合物は置換窒素を含む。好ましい窒素置換基は、低級アルキル、低級アルケン、低級アルキン、フェニル、芳香族、複素環、多環式芳香族、水可溶化基、結合基、およびその置換形態を含む。より好ましくは、この窒素置換基は、低級アルキル、フェニル、またはその置換形態であり、ここで、好ましい置換基は、結合基、スルホネート、または水可溶化基である。例示的な水可溶化基には、カルボキシレート、スルホネート、ホスフェート、第4級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシル、および水溶性ポリマーが挙げられる。特に好ましい実施態様において、窒素置換基は、 $-L-R$ であり、ここで、Lは任意のリンカーであり得、そしてRは結合基または水可溶化基である。特に好ましい実施態様において、Lは、

10

【0038】

【化37】



であり、ここで、nは1～8の範囲である。別の特に好ましい実施態様において、この水可溶化基は、カルボキシレート、スルホネート、ホスフェート、第4級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシル、および水溶性ポリマーである。

20

【0039】

さらに別の好ましい実施態様において、式Iの化合物は、1個以上のC-8～C-11およびC-13位での1個以上の置換基を包含する。好ましい置換基には、フッ素、塩素、低級アルキル、低級アルケン、低級アルキン、スルフェート、スルホネート、スルホン、スルホンアミド、スルホキシド、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、芳香族、フェニル、多環式芳香族、水可溶化基、複素環、および結合基が挙げられ、これは、その置換形態を含む。特に好ましい実施態様において、この化合物は、C-9およびC-10炭素を介する、またはC-10およびC-11炭素を介する縮合芳香族環を含み、そしてこれは、その置換形態を含み、ここで、特に好ましい置換基は、スルホネートである。

30

【0040】

本発明の数個の代表的1-アミノ-3-ヒドロキシナフタレン化合物は、図1～3中に、すなわち、化合物4、9、15、17、22、27および29で、そして、図10～13中に、すなわち、化合物62、63、68、73および80で、示される。

【0041】

(B. 合成法)

数種の合成方法が、上述の1-アミノ-3-ヒドロキシナフタレン化合物の合成法について利用可能であり、合成される特定の化合物の環構造の性質および窒素置換体に依存して、異なる方法が好ましい。

40

【0042】

1-置換-アミノ-3-ヒドロキシナフタレン化合物(例えば、1-ジエチルアミノ-3-ヒドロキシナフタレン4)の合成に適切な第一の好ましい合成法は、図1に示される。この第一方法において、3-メトキシ-1-ヒドロキシナフタレン1は、乾燥トリエチルアミンおよびトリフルオロメタンスルホン酸無水物と反応されて、粗製の3-メトキシナフタレン-1-トリフレート2を形成する。次いで、トリフレート2は、パラジウム触媒のトリフレート/アミンカップリングを使用して、例えば第二級アミン(例えば、ジエチルアミン)と反応され、置換アミノ化合物3を形成する。次いで、化合物3は、三臭化ホウ素脱保護手順を使用して、脱保護され、1-アミノ-3-ヒドロキシナフタレン生成物

50

(例えば、1 - ジエチルアミノ - 3 - ヒドロキシナフタレン 4) を生成する。この合成の例は、以下の実施例 1 中で提供される。

【 0 0 4 3 】

ベンゾインドリン化合物 (例えば、N - フェニル - 3 , 3 - ジメチル - 4 - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 9) の合成について適切な第二の好ましい合成方法もまた、図 1 中に示される。この方法において、3 - メトキシナフタレン - 1 - トリフレート 2 は、パラジウム触媒トリフレートカップリング反応を使用して、第一級アミン (例えば、アニリン) で誘導され、第 2 級アミン (例えば、1 - アニリノ - 3 - メトキシナフタレン 5) を得る。第二級アミン 5 は、酸塩化物 (例えば、塩化ハロアセチルを使用して、アセチル化され、非置換アミド (例えば、1 - アミド - 3 - メトキシナフタレン 6) を得る。第三級アミド 6 は、L e w i s 酸触媒 F r i e d e l - C r a f t s 環化手順 (例えば、A l C l₃ を使用して) を使用して環化され、化合物 7 を得る。次いで、化合物 7 は、還元され (例えば、水素化リチウムアルミニウム (L A H) を用いて)、化合物 8 を得る。引き続き三臭素化ホウ素脱保護手順によるメトキシ基脱保護によって、ベンゾインドリン (例えば、N - フェニル - 3 , 3 - ジメチル - 4 - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 9) を得る。この合成の例は、以下の実施例 2 に提供される。

【 0 0 4 4 】

N - 置換 - 5 - ヒドロキシ - (テトラヒドロ) ベンゾキノリン化合物 (例えば、N - メチル - 5 - ヒドロキシ - (テトラヒドロ) ベンゾキノリン 15) の合成について適切な第三の好ましい合成法は、図 2 中に示される。この方法において、化合物 10 は、ピリジン中のピペリジン触媒を利用して、マレイン酸と共に濃縮することによって、メトキシ - ナフトアルデヒド (n a p t h a l d e h y d e) から合成される。次いで、化合物 10 は、水素によって還元され、L A H 還元が続き、そしてトリフルオロメタンスルホン酸無水物と反応し、トリフレート 11 を得る。トリフレート 11 は、N a N₃ と反応されて、化合物 12 を得る。化合物 12 は、L e w i s 酸 (例えば、A l C l₃) と共に複合体化され、そして還流され、環化ベンゾキノリン誘導体 13 を得る。次に、窒素置換体が添加され、例えば、窒素は、従来のアルキル化手順を利用してアルキル化され、例えば、ベンゾキノリン誘導体 13 は n - プチルリチウムおよびアルキル化剤 (例えば、化合物 14 またはプロパンスルトン (p r o p a n e s u l t o n e) を与える M e I) と共に反応され、化合物 16 を得る。次いで、このメトキシ基は、三臭化ホウ素手順によって除去され、N - アルキルベンゾキノリン誘導体 (例えば、化合物 15 または 17) を得る。この合成の例は、以下の実施例 3 中で提供される。

【 0 0 4 5 】

N - 置換 - 2 , 2 , 4 - トリメチル - 5 - ヒドロキシ - ベンゾキノリン化合物 (例えば、N - メチル - 2 , 2 , 4 - トリメチル - 5 - ヒドロキシ - (テトラヒドロ) ベンゾキノリン 22) の合成について適切な第四の好ましい合成方法は、図 3 中に示される。この方法において、A . R o s o w s k y および E . J . M o d e s t (J . O . C . 3 0 1 8 3 2 1 9 6 5、およびその中の参考文献) の手順に続いて、1 - アミノ - 3 - メトキシナフタレン 18 は、ヨウ素によって触媒化されたアセトンと共に反応され、次いで飽和 N a₂S₂O₃ でクエンチされ、ベンゾキノリン化合物 19 を得る。次いで、一般的なアルキル化手順に従って、化合物 19 はアルキル化剤 (例えば、M e I) でアルキル化され、化合物 20 を得る。このアルキル化化合物 20 は、P d / C によって触媒化された H₂ と共に反応され、N - メチル - メトキシキノリン中間体 21 を得、一般的な三臭化ホウ素手順による引き続きメトキシ基脱保護により、N - 置換 - 2 , 2 , 4 - トリメチル - 5 - ヒドロキシ - ベンゾキノリン化合物 (例えば、N - メチル - 2 , 2 , 4 - トリメチル - 5 - ヒドロキシ - (テトラヒドロ) ベンゾキノリン 22) を得る。この合成の例は、以下の実施例 4 中に提供される。

【 0 0 4 6 】

N - 置換 - 3 , 3 - ジメチル - 4 - ヒドロキシ - ベンゾインドリン化合物 (例えば、N - メチル - 3 , 3 - ジメチル - 4 - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 27) の合成について適

10

20

30

40

50

切な第五の好ましい一般的な合成方法もまた、図3中に示される。この方法において、1-アミノ-3-メトキシナフタレン18は、酸塩化物(例えば、2-ブロモ-2-メチルプロピオニルクロリド)でアセチル化され、化合物23を得る。化合物23は、 $AlCl_3$ との反応によって環化され、化合物24を得る。次いで、化合物24はL A Hで還元され、3,3-ジメチル-4-メトキシベンゾインドリン25を得る。次いで、化合物25はアルキル化剤(例えば、ヨウ化メチル)でアルキル化され、N-メチル-3,3-ジメチル-4-メトキシベンゾインドリン(例えば、化合物26)を得る。三臭化ホウ素と共に用いることによる引き続くメトキシ基脱保護により、化合物27を得る。この合成の例は、以下の実施例5中で提供される。

【0047】

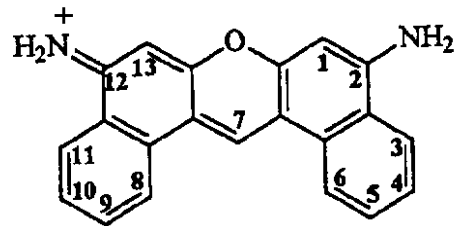
(III. ジベンゾローダミン色素化合物)

(A. 構造)

第二の局面において、本発明は、直下の式IIに示される一般構造を有する、分子標識として有用な、ジベンゾローダミン色素化合物の新規のクラス、ならびにそのアリ-ルおよび窒素置換形態を包含する。

【0048】

【化38】



式 II

式IIの化合物の好ましい1つの実施態様において、この化合物は、C-12結合窒素ならびにC-12およびC-13炭素が一緒になる場合に、4~7員を有する第一環構造を形成する第一架橋基、および/またはC-2結合窒素ならびにC-1およびC-2炭素が一緒になる場合に4~7員を有する第二環構造を形成する第二架橋基を含む。より好ましくは、第一および第二環構造の1つまたは両方が、5員を有する。さらにより好ましい実施態様において、5員環構造は、1つのジェミナルで二置換された炭素を含み、ここで、ジェミナル置換基は低級アルキル(例えば、メチル)である。代替の好ましい実施態様において、5員環は、結合基で置換される。別の好ましい実施態様において、5員環は、以下に示すように、一個以上の窒素置換基を含む。

【0049】

別の好ましい実施態様において、式IIの化合物は、アセチレン、低級アルキル、低級アルケン、シアノ、フェニル、複素環芳香族、複素環、およびその置換形態からなる群から選択される、C-7置換基を含む。さらにより好ましい実施態様において、C-7置換基は、以下の構造を有するフェニルまたは置換されたフェニルであり、

【0050】

【化39】



10

20

30

40

50

ここで、C - 14 ~ C - 18 位のアリ - ル置換基は、水素、塩素、フッ素、低級アルキル、カルボン酸、スルホン酸、 $-CH_2OH$ 、アルコキシ、フェノキシ、結合基、およびその置換形態からなる群から、別々に選択され得る。好ましくは、C - 18 でのフェニル置換基は、カルボン酸およびスルホネートからなる群から選択され、そして最も好ましくはカルボン酸である。別の好ましい実施態様において、C - 14 および C - 17 位の置換基は塩素である。さらに別の好ましい実施態様において、C - 14 ~ C - 17 位の置換基は全て塩素または全てフッ素である。特に好ましい実施態様において、C - 15 および C - 16 位の置換基の一方は、結合基であり、他方は水素であり、C - 14 および C - 17 位の置換基は塩素であり、そして C - 18 位の置換基はカルボキシである。

【0051】

さらなる好ましい実施態様において、式 I I の化合物は、C - 7 位で水素ラジカルを含む、すなわち、C - 7 位は置換されない。

【0052】

本発明のさらに別の好ましい実施態様において、式 I I の化合物は一個以上の窒素置換基を含む。好ましくは、このような置換基は、低級アルキル、低級アルケン、低級アルキン、フェニル、芳香族、複素環、多環式芳香族、水可溶化基、結合基、およびその置換形態からなる群から選択される。より好ましくは、この窒素置換基は、低級アルキル、フェニル、多環式芳香族、およびその置換形態からなる群から選択され、ここで、例示的置換基は、結合基および水可溶化基を含む。

【0053】

本発明の第二の局面の別の好ましい実施態様において、式 I I の化合物は、C - 12 結合窒素ならびに C - 11 および C - 12 炭素が一緒になる場合に、5 ~ 7 員を有する第三環構造を形成する第三架橋基、および/または C - 2 結合窒素ならびに C - 2 および C - 3 炭素が一緒になる場合に、5 ~ 7 員を有する第四環構造を形成する第四架橋基を含む。好ましくは、第三および第四環構造の1つまたは両方が、6 員を有する。さらに好ましくは、この6 員環構造が1つのジェミナルで二置換された炭素を含み、ここでは、このジェミナルは低級アルキル（例えば、メチル）である。

【0054】

本発明の別の好ましい実施態様において、式 I I の化合物は、一個以上の炭素 C - 1、C - 3 ~ C - 6、C - 8 ~ C 11、および C - 13 でのアリ - ル置換基を含む。例示的アリ - ル置換基は、フッ素、塩素、低級アルキル、低級アルケン、低級アルキン、スルフェート、スルホネート、スルホン、スルホンアミド、スルホキシド、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、芳香族、フェニル、多環式芳香族、水可溶化基、複素環、および結合基を含み、これはその置換形態を含む。特に好ましい実施態様において、少なくとも一個の置換基はスルホネートである。別の特に好ましい実施態様において、式 I I の化合物は、C - 3 および C - 4 炭素、C - 4 および C - 5 炭素、C - 9 および C - 10 炭素、または C - 10 および C - 11 炭素を介して結合する縮合芳香族環を含み、これはその置換形態を含む。最も好ましくは、この縮合芳香族環が、C - 3 および C - 4 炭素ならびに C - 10 および C - 11 炭素を介して、または C - 9 および C - 10 炭素ならびに C - 4 および C - 5 炭素を介して結合し、これはその置換形態を含む。

【0055】

本発明の第二の局面に従った数個の例示的色素化合物は、図7 および図10 ~ 13 中（すなわち、化合物 41 ~ 47 ならびに 67、72、76 および 81）に示される。

【0056】

(B. 合成法)

一般に、本発明のジベンゾローダミン色素は以下のように合成される。図4を参照のこと。無水物誘導体 30（例えば、無水フタル酸）を、1 - アミノ - 3 - メトキシ中間体 31 および 32、ならびに Lewis 酸（例えば、 $ZnCl_2$ ）と混合する。ここで化合物 30 の R - 置換基は同一または異なり得るが、同一であることが好ましい。典型的には、R

10

20

30

40

50

- 置換基は、アセチレン、低級アルキル、低級アルケン、フェニル、複素環、およびこれらの置換体を含むが、これらに限定されない。混合物を融解が観察されるまで短時間加熱する。溶媒（例えば、1, 2 - ジクロロベンゼン）を反応混合物に添加し、そして不均一な混合物を約 130 ~ 約 180 まで加熱する。粗反応混合物を冷却し、そして順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製して、色素化合物 33 を得る。無水物が一部が置換された無水フタル酸（例えば、化合物 34）である場合、2種の異性体が形成される。図5を参照のこと。異性体 35 および 36 は P T L C により分離する。純粋な異性体色素は、順相および逆相 T L C 上の単一スポットによって、ならびにそれらの U V / 可視吸収スペクトルならびにそれらの長波長の蛍光励起スペクトルおよび発光スペクトルによって同定される。

10

【 0 0 5 7 】

非対称の色素化合物を合成するための代替の手順を図6に示す。このプロセスにおいて、無水物誘導体（例えば、無水フタル酸 34）を乾燥ニトロベンゼンと混合し、加熱する。混合物を室温まで冷却し、そして無水 A l C l₃ を攪拌しながら添加する。続いて 1 - アミノ - 3 - メトキシ中間体 31 を攪拌しながら添加し、そして反応系を加熱する。反応系を冷却し E t O A c 中に懸濁する。有機層を飽和 N H₄ C l、ブラインで洗浄し、N a₂ S O₄ で乾燥し、濾過し、そして溶媒を減圧下で除去する。得られたケトン中間体 37 / 38 を精製し、そしてフラッシュクロマトグラフィーまたは再結晶によって個々の異性体 37 および 38 に分離する（C - 14 および C - 17 の置換基が同じであり、かつ C - 15 および C - 16 の置換基が同じである場合を除く）。純粋な異性体のケトン中間体 37 または 38 のメトキシ基を、一般的な三臭化ホウ素による脱保護の手順に従って脱離する。従って、化合物 38 はアミノ - ヒドロキシナフタレンケトン中間体 39 を与える。次いで、アミノ - ヒドロキシナフタレンケトン中間体 39 を 1 - アミノ - 3 - メトキシ中間体 32 と反応させる。反応系を冷却し、純粋な異性体であり非対称の置換生成物 40 を得、これは P T L C によってさらに精製され得る。

20

【 0 0 5 8 】

本発明のジベンゾロータミン色素を合成するため、特に C - 7 位が無置換の色素（すなわち、ピロニン色素）を合成するために適切な他の方法において、色素は、O - 保護 N - 置換 3 - ヒドロキシベンゾインドリジン化合物から生成するヒドロキシベンゾインドリジン中間体から合成され、続いて酸素保護基を脱保護し（例えば、脱メチル試薬（すなわち、塩化アルミニウム）によるメチル基の脱保護）、そして順相クロマトグラフィー精製によって単離される。この合成法に従って、色素分子の半分に相当するヒドロキシベンゾインドリジン中間体を、はじめにホルミル化試薬（例えば、メチルホルムアニリド / P O C l₃）と反応させ、次いでホルミル化したヒドロキシベンゾインドリジン中間体を、色素分子の別の半分に相当する異なる（または同じ）ヒドロキシベンゾインドリジン中間体と直接反応させる。酸性脱水条件下（すなわち、P O C l₃）で反応を続け、そして加熱（すなわち 120 ~ 160）し、カルボン酸エステルに誘導体化した粗ベンゾピロニン色素を得る。いくらかの場合、メトキシベンゾインドリジン中間体は、メチル基の脱保護より先にホルミル化され、次いでホルミル化したメトキシインドリジン誘導体のメチル基は脱保護され、2当量のヒドロキシインドリジンと反応し、ピロニン色素を与える前にホルミル化したヒドロキシベンゾインドリジン中間体を与える。純粋な色素は水性の後処理および順相クロマトグラフの後には単離される。次いで中間体色素のカルボン酸エステルを酸（すなわち、H B r）で加水分解し、水性の後処理をして、そして順相クロマトグラフィーの後には遊離酸色素誘導体を得る。続いて N - フェニル置換色素はスルホン化試薬（例えば、C l S O₃ H）によってスルホン化され得、水性の後処理および順相クロマトグラフィーの後、最終的に好ましい色素誘導体を与える。

30

40

【 0 0 5 9 】

（ V . ジベンゾローダミン色素を結合するエネルギー移動色素 ）

他の局面において、本発明は式 I のジベンゾローダミン色素化合物と結合したエネルギー移動色素化合物を包含する。一般に本発明のエネルギー移動色素は、第一波長の光を吸収

50

し、応答して励起エネルギーを放出するドナー色素、ドナー色素によって放出された励起エネルギーを吸収し、応答して第二波長を蛍光発光することが可能なアクセプター色素、およびドナー色素とアクセプター色素を結合するリンカーを包含し、リンカーはドナー色素とアクセプター色素との間の効率の良いエネルギー移動を促進するのに有効である。このようなエネルギー移動色素の構造、合成および使用についての一貫した議論は、Leeらによる米国特許第5,800,996号およびMathiesらによる米国特許第5,654,419号に記載される。

【0060】

好ましい実施態様において、リンカーは、そのリンカーにある程度の構造的な堅さを与える官能基（アルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合または縮合環構造を有する5員環および6員環など）を含む。

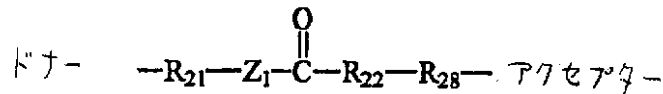
10

【0061】

エネルギー移動蛍光色素において、本発明に従うドナー色素とアクセプター色素を結合するための好ましいリンカーの一つは、一般構造

【0062】

【化40】



20

を有し、ここで R_{21} はドナー色素と結合する低級アルキルであり、 Z_1 はNH、硫黄または酸素のいずれかであり、 R_{22} はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合またはカルボニル炭素と結合した縮合環構造を有する5員または6員環を含む置換基であり、 R_{28} はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含む。

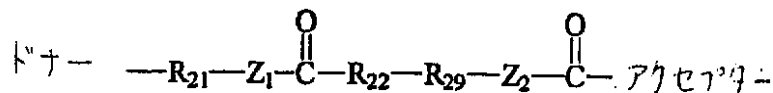
【0063】

このリンカーの1実施態様において、リンカーは以下に記載の一般構造を有し、

30

【0064】

【化41】



40

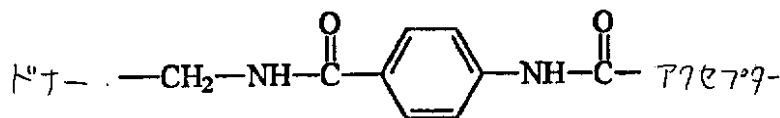
ここで R_{21} および R_{22} は上記に詳述され、 Z_1 および Z_2 はそれぞれ独立してNH、硫黄または酸素のいずれかであり、 R_{29} は低級アルキルであり、そして末端カルボニル基はアクセプター色素の環構造と結合している。 Z_2 が窒素である改変体の場合、 $C(O)R_{22}R_2$ 。 Z_2 サブユニットはアミノ酸サブユニットを形成する。リンカーの内の R_{22} として使用され得る5員環または6員環の特別な例として、シクロペンテン、シクロヘキセン、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエン、フラン、チオフラン、ピロール、ピラゾール、イソイミダゾール、ピラン、ピロン、ベンゼン、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、トリアジン、ピラジンおよびオキサジンが挙げられるが、これらに限定されない。縮合環構造の例として、インデン、ベンゾフラン、チオナフテン、インドールおよびナフタレンが挙げられるがこれらに限定されない。このリンカーの好ましい実施態様は、以下で示したよう

50

に R_{21} および R_{29} がメチレンであり、 Z_1 および Z_2 が NH であり、 R_{22} がベンゼンである。

【0065】

【化42】



10

本発明のエネルギー移動色素の局面の他の好ましい実施態様において、リンカーは、エネルギー移動色素のジベンゾローダミン色素成分の C - 1 または C - 13 位で結合し、あるいは C - 7 置換基がフェニル基または置換フェニル基である場合は C - 15 位または C - 16 位の一方と結合する。特に好ましい実施態様において、エネルギー移動対の構成要素の両方が、ジベンゾローダミン色素であり、そして第 1 構成要素は C - 1 位で結合し、第 2 構成要素は C - 15 位または C - 16 位の一方で結合する。

【0066】

本発明のエネルギー移動色素の局面のさらに他の好ましい他の実施態様において、色素対の第 1 構成要素はジベンゾローダミン色素であり、色素対の第 2 構成要素はシアニン、フタロシアニン、スクアレン (squaraine)、bodipy、フルオレセインまたは第 1 構成要素と異なる置換基を有するジベンゾローダミン色素である。

20

【0067】

(VI. ジベンゾローダミン色素を結合する試薬)

別の局面において、本発明は式 I のジベンゾローダミン色素化合物で標識された試薬を含む。本発明の試薬は、実質的に本発明の色素が結合し得るものであり得る。好ましくは、色素は試薬と共有結合する。試薬は、タンパク質、ポリペプチド、多糖類、ヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリヌクレオチド、脂質、固体支持体、有機ポリマーおよび無機ポリマー、およびそれらの組み合わせおよびそれらの集合体 (染色体、核、生細胞 (細菌または他の微生物)、脊椎動物の細胞、組織など) を含み得るが、これらに限定されない。

30

【0068】

(A. ヌクレオシド/チド試薬)

好ましい種類の標識された試薬は、本発明のジベンゾローダミン色素を組み込むヌクレオシド/チドを含む。このヌクレオシド/チド試薬は酵素的合成によって生成したポリヌクレオチドを標識する状況において特に有用である (例えば PCR 増幅、Sanger 型ポリヌクレオチドの塩基配列決定、およびニクトランスレーション反応の状況において使用されるヌクレオチド三リン酸)。

【0069】

一般に、標識されたヌクレオシド/チド試薬の構造は

40

NUC - D

式 I I I

であり、ここで NUC はヌクレオシド/チドまたはヌクレオシド/チドアナログであり、かつ D は式 I I のジベンゾローダミン色素化合物である。

【0070】

ヌクレオシド/チドと色素を結合している結合は、置換位置 C - 1 ~ C - 18 のいずれか 1 つまたは窒素と結合している C - 2 もしくは窒素と結合している C - 12 で結合し得る。好ましくは、色素は C - 7 位にフェニル基または置換フェニル基を含み、C - 15 または C - 16 の置換位置のいずれか 1 つでヌクレオシド/チドと結合し、他の位置は水素原子と結合する。

50

【0071】

NUCがプリン塩基を含む場合、NUCとDとの間の結合はプリンのN⁸位と結合し、NUCが7-ジアザプリン塩基を含む場合、この結合は7-ジアザプリンのN⁷位と結合し、NUCがピリミジン塩基を含む場合、この結合はピリミジンのN⁵位と結合する。

【0072】

ヌクレオシドの標識は、公知の結合、結合基を用いるヌクレオシド/チドの多くの公知の標識技術の1つを使用して達成され得、補足的な機能性を付随し得る。一般に、色素とヌクレオチドを結合する結合は、(i)オリゴヌクレオチドを標的とするハイブリダイゼーションを妨害せず、(ii)適切な酵素(例えばポリメラーゼ、リガーゼなど)と適合し、(iii)色素の蛍光特性に悪影響を与えないべきである。本発明と関連して使用するのに適切な典型的な塩基標識手順を以下に示す。Nucleic Acids Research, 15: 6455-6467 (1987) (Gibsonら)、Nucleic Acids Research, 15: 4513-4535 (1987) (Gebeyehuら)、Nucleic Acids Research, 15: 4856-4876 (1987) (Haralambidisら)、Nucleosides and Nucleotides, 5(3): 233-241 (1986) (Nelsonら)、JACS, 111: 374-374 (1986) (Bergstromら)、および米国特許第4,855,225号、同第5,231,191号、同第5,449,767号。

10

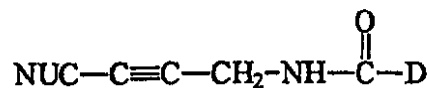
【0073】

好ましくは結合はアセチレンアミド結合またはアルケンアミド結合、色素の活性N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)をヌクレオシド/チドのアルキニルアミノ-またはアルケニルアミノ-誘導体化塩基と反応させることによって形成された色素とヌクレオシド/チド塩基との間の結合である。より好ましくは、得られた結合は構造

20

【0074】

【化43】



30

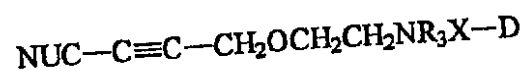
を有する3-(カルボキシ)アミノ-1-プロピル-1-イルである。

【0075】

代替の好ましい結合は、構造

【0076】

【化44】

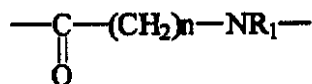


40

を有する置換プロパルギルエトキシアミド結合を含み、ここでXは、

【0077】

【化45】

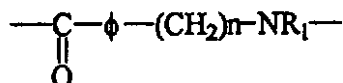


(ここで n は 1 ~ 5 の範囲である)

【 0 0 7 8 】

【 化 4 6 】

10

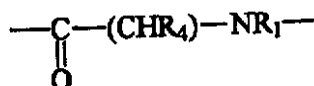


(ここで n は 1 ~ 5 の範囲である)

【 0 0 7 9 】

【 化 4 7 】

20

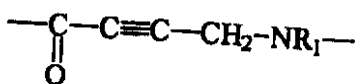


および

【 0 0 8 0 】

【 化 4 8 】

30



から成る群から選択され、R₁は、- H、低級アルキルおよび保護基から成る群から選択され；およびR₃は - Hおよび低級アルキルから成る群から選択される。1997年4月10日出願の米国特許出願第08/833,854号(Khanら)を参照のこと。

40

【 0 0 8 1 】

アルキニルアミノ誘導体化ヌクレオシドの合成は、Hobbsらによって、ヨーロッパ特許出願第87305844.0号およびJ. Org. Chem., 54:3420(1989)(Hobbsら)で教えられる。アルキニルアミノ誘導体化ヌクレオチド(Hobbsらによって教示されるように(上記で引用)通常は5-ヨードピリミジンおよび7-ヨード-7-デアザプリンジデオキシヌクレオチド)は、適切なハロジデオキシヌクレオチドおよびCu(I)をフラスコに入れ、空気を除去するためにアルゴンを流し、乾燥DMFを添加し、次いでアルキニルアミン、トリエチル-アミンおよびPd(0)を添加することによって生成する。この反応混合物を数時間、すなわち薄層クロマトグラフが、ハロジデオキシヌクレオチドの消費を示すまで、攪拌する。保護されていないアルキニルア

50

ミンを使用した場合、アルキニルアミノ - ヌクレオシドは、反応混合物を濃縮し、カップリング反応において生成したハロゲン化水素を中和するための水酸化アンモニウムを含む溶出溶液を用いるシリカゲルクロマトグラフによって単離され得る。保護されたアルキニルアミンを使用した場合、メタノール / 塩化メチレンがこの反応混合物に添加され得、次いで強塩基陰イオン交換樹脂の炭酸水素塩種が添加され得る。次いでスラリーは約 4 5 分間攪拌され得、濾過され、そして樹脂は追加のメタノール / 塩化メチレンで洗浄される。合わせた濾液は濃縮され、メタノール - 塩化メチレンの勾配を使用するシリカゲルフラッシュクロマトグラフによって精製され得る。トリホスフェートは標準的な技術によって得られる。

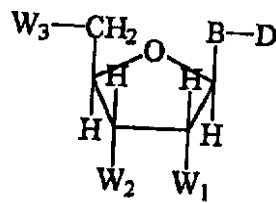
【 0 0 8 2 】

10

本発明の特に好ましいヌクレオシド / チドは以下の式 I V に示され、

【 0 0 8 3 】

【 化 4 9 】



式 IV

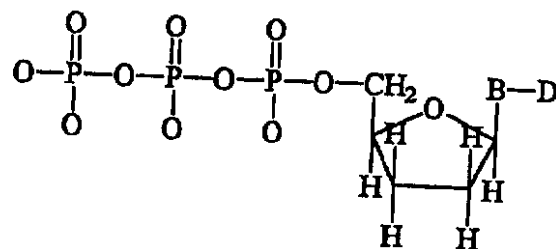
20

ここで B はヌクレオシド / チド塩基 (例えばウラシル、シトシン、デアザアデニンまたはデアザグアノシン) であり ; W_1 および W_2 は別々に OH またはポリメラーゼ媒介テンプレート指向型重合を避け得る基 (例えば H、フッ素など) であり ; W_3 は OH、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェートまたはホスフェートアナログであり ; D は式 I の色素化合物である。特に好ましい 1 実施態様において、本発明のヌクレオチドは以下の式 I V . 1 に示される構造を有するジデオキシヌクレオチド三リン酸であり、カウンターイオンがある場合それと会合している。

【 0 0 8 4 】

30

【 化 5 0 】



式 IV.1

40

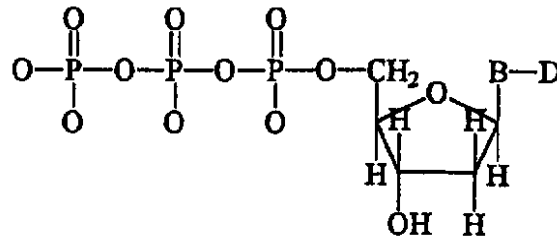
式 I V . 1 で示されるような標識されたジデオキシヌクレオチドは、蛍光検出を利用する Sanger 型 DNA 塩基配列決定の方法において、鎖の末端処理剤としての特定の使用が見出される。

【 0 0 8 5 】

第 2 の特に好ましい実施態様において、本発明のヌクレオチドは以下の式 I V . 2 で示される構造を有するデオキシヌクレオチド三リン酸である。

【 0 0 8 6 】

【 化 5 1 】



式 IV.2

式IV.2に示されたような標識されたデオキシヌクレオチドは、ポリメラーゼ伸長生成物を標識（例えばポリメラーゼ連鎖反応またはニックトランスレーションにおいて）するための試薬としての特定の使用が見出される。

【0087】

（B. ポリヌクレオチド試薬）

本発明のさらに別の好ましい試薬の種類は、本発明のジベンゾローダミン色素で標識されたポリヌクレオチドを含む。このような標識されたポリヌクレオチドは、DNA塩基配列決定プライマー、PCRプライマー、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブ、オリゴヌクレオチド連結プローブなどを含む多くの重要な状況において有用である。

【0088】

好ましい1実施態様において、本発明の標識されたポリヌクレオチドは、エネルギー移動がドナー色素とアクセプター色素との間で起こるように配置された多様な色素を包含する。このような多様な色素のエネルギー移動ポリヌクレオチドは分光学的に調整可能な塩基配列決定プライマーとして（例えばProc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4347-4351(1995)(Jurá）、およびハイブリダイゼーションプローブとして（Nucleic Acids Research, 21:3761-3766(1993)(Leeら））の適用が見出される

標識されたポリヌクレオチドは、例えばDNAポリメラーゼまたはリガーゼを使用する酵素的合成（Stryer, Biochemistry, Chapter 24, W.H. Freeman and Company(1981）、または例えばホスホラミダイト法、ホスファイトトリエステル法、など化学的合成（Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press(1990））のいずれかによって合成され得る。標識は、上記に記載されたように、標識されたヌクレオチド三リン酸モノマーを使用する酵素的合成に導入され得るか、または上記に記載されたように標識された無核ヌクレオチドまたはヌクレオチドホスホラミダイトを使用する化学的合成に導入され得るか、または合成の後に導入され得る。

【0089】

一般に、標識されたポリヌクレオチドが酵素的合成を使用して合成される場合、以下の手順が使用され得る。テンプレートDNAを変性し、そしてオリゴヌクレオチドプライマーをテンプレートDNAに添加する。デオキシヌクレオチド三リン酸を、dGTP、dATP、dCTPおよびdTTPを含む混合物に添加し、最後に、デオキシヌクレオチドの分画を本発明の色素化合物で上記に記載したように標識する。次いで、ポリメラーゼ酵素を、ポリメラーゼ酵素が活性である条件下で添加する。標識したポリヌクレオチドは、ポリメラーゼ媒介鎖合成中に標識されたデオキシヌクレオチドを組み込むことによって生成する。代替の酵素的合成法において、プラス鎖に補足的な一方の標的プライマーおよびマイナス鎖に補足的な他方の標的プライマーである2種のプライマーが、1種のプライマーの代わりに使用され、このポリメラーゼは熱安定性のポリメラーゼであり、そして反応温度は変性温度と伸長温度との間を循環し、PCR（例えば、PCR Protocols, Innisら編, Academic Press(1990））によって標識された相補体を目的の配列に飛躍的に合成する。

10

20

30

40

50

【0090】

標識されたポリヌクレオチドはホスホラミダイト法を使用して化学的に合成され得る。ホスホラミダイト法によってポリヌクレオチドを形成するために使用される化学薬品の詳細な説明は、米国特許第4,458,066、および同4,415,732 (Caruthersら); Genetic Engineering, 4:1-17 (1982) (Caruthersら); Users Manual Model 392 and 394 Polynucleotide Synthesizers, 6-1~6-22頁, Applied Biosystems, Part No. 901237 (1991)によって提供される。

【0091】

ポリヌクレオチドを合成するためのホスホラミダイト法は、その効果的かつ迅速な結合のため、および出発物質の安定性のため、好ましい方法である。この合成は固体担体に結合したポリヌクレオチド鎖の成長によって達成され、液相中の過剰な試薬は濾過により容易に除去され得、これにより合成サイクルの中で精製工程の必要が排除される。

【0092】

以下に、ホスホラミダイト法を用いるポリヌクレオチドの典型的な合成サイクルを簡単に示す。第1に、5'-ヒドロキシル保護基を除去するために保護されたヌクレオチドモノマーを包含する固体担体を、酸(例えば、トリクロロ酢酸)で処理し、次に続く結合反応のためにヒドロキシル基を遊離する。保護されたホスホラミダイトヌクレオチドモノマーおよび反応させるための弱酸(例えば、テトラゾール)を同時に添加することによって活性化した中間体が生成する。弱酸はホスホラミダイトの窒素をプロトン化し、反応性の中間体を形成する。ヌクレオチドの付加は30秒以内で完了する。次に、キャッピングの工程が実施され、ヌクレオチドが付加しなかったポリヌクレオチド鎖は終端する。キャッピングは、好ましくは、無水酢酸および1-メチルイミダゾールによって行われる。次いで、ヌクレオチド間の結合を、好ましい酸化剤としてヨウ素および酸素ドナーとして水を使用する酸化によって、ホスファイトからより安定なホスホトリエステルに変換する。酸化した後、ヒドロキシの保護基は、プロトン性酸(例えば、トリクロロ酢酸またはジクロロ酢酸)によって脱保護され、そしてこのサイクルは鎖の伸長が完了するまで繰り返される。合成後、ポリヌクレオチド鎖は、塩基(例えば、水酸化アンモニウムまたはt-ブチルアミン)を使用して担体から分割される。分割反応はまた、全てのホスフェートの保護基(例えば、シアノエチル)を除去する。最後に、ポリヌクレオチドの溶液を塩基中で高温(例えば、55℃)で処理して、色素中の塩基およびヒドロキシルの保護基の環外アミンについた保護基を除去する。

【0093】

任意のホスホラミダイトヌクレオチドモノマーは、上記に記載したように色素で標識されたホスホラミダイトであり得る。ヌクレオチドの5'-末端位が標識されている場合、本発明の標識された無核ヌクレオチドホスホラミダイトは最後の縮合工程に使用され得る。オリゴヌクレオチドの内部の位置が標識されている場合、本発明の標識されたヌクレオチドホスホラミダイトは任意の縮合工程に使用され得る。

【0094】

合成した後に、ポリヌクレオチドは、5'-末端位を含む多くの位置で標識され得る(例えば、Oligonucleotides and Analogs, Eckstein編, Chapter 8, IRL Press (1991)およびOrgelら, Nucleic Acids Research 11(18):6513 (1983); 米国特許第5,118,800号; ホスホジエステルバックボーン、例えばibid., Chapter 9; または3'-末端、例えば、Nelson, Nucleic Acids Research 20(23):6253-6259、および米国特許第5,401,837号および同5,141,813号)。オリゴヌクレオチドの標識を全体的に再検討するためには、R. Haugland in Excited States of Biopolymers, Steiner編, Plenum Press, NY (1

10

20

30

40

50

983)を参照のこと。

【0095】

図14および15に示されるように、1つの好ましいポスト合成の化学的な標識方法で、オリゴヌクレオチドを以下のように標識する。カルボキシ結合基を包含する色素を、1当量の適切な1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドおよび3当量の適切なN-ヒドロキシスクシンイミドと室温で3時間、乾燥酢酸エステル中で反応させて、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルに変換する。反応混合物を5% HClで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、そして固体になるまで濃縮し、これをDMSOに再懸濁する。次いで、0.25Mピカルボネート/カルボネートのpH9.4の緩衝液中の、アミノヘキシル誘導体化オリゴヌクレオチドにDMSO色素のストックを過剰(10~20倍)に添加し、6時間反応させる(例えば、米国特許第4,757,141号)。この色素で標識されたオリゴヌクレオチドを、緩衝液(例えば、0.1molarのトリエチルアミンアセテート(TEAA))で溶出するサイズ排除カラムクロマトグラフィーを介する通過によって、未反応の色素と分離する。粗製の標識されたオリゴヌクレオチドを含むフラクションをさらに溶出勾配を用いる逆相HPLCによって精製する。

10

【0096】

(VII.ジベンゾローダミン色素を利用する方法)

本発明の色素および試薬は、蛍光の検出を利用する方法、特に多重の空間的に重なった分析物を同時に検出することが必要とされる任意の方法に有用である。本発明の色素および試薬は、特に電気泳動のような生化学的分離手順を受けたポリヌクレオチド、または空間的に位置付け可能なハイブリダイゼーションアレイ内の位置間に分散されたポリヌクレオチドの種類を同定するのに十分適している。

20

【0097】

本明細書中で「フラグメント分析」法または「遺伝分析」法と呼ばれる方法の好ましい範疇において、標識されたポリヌクレオチドフラグメントは、標識されたプライマーまたはヌクレオチドを使用するテンプレート指向型(template-directed)酵素的合成によって生成され(例えばライゲーションまたはポリメラーゼ指向型プライマー伸長)、そのフラグメントはサイズ依存選別分離のプロセス(例えば、電気泳動またはクロマトグラフィー)に供され、そして分離されたフラグメントは分離後に、例えば、レーザーによって誘導される蛍光によって検出される。特に好ましい実施態様において、多種のポリヌクレオチドが同時に分離され、そして異なる種類はスペクトル的に分解可能な標識によって識別される。

30

【0098】

増幅断片長多型検出(AmpFLP)として知られている1つのこのようなフラグメント分析方法は、増幅断片長多型、すなわちPCRによって増幅される制限断片長多型に基づく。これらの種々のサイズの増幅されたフラグメントは、科(families)を通して変異遺伝子を追跡するための連結したマーカーとしてはたらく。増幅されたフラグメントが染色体上の変異遺伝子に近づくにつれて、連鎖相関は高くなる。多くの遺伝子障害についての遺伝子が同定されていないため、これらの連鎖マーカーは、疾患危険性または父性の評価を助けるようにはたらく。AmpFLP技術において、ポリヌクレオチドは、標識されたポリヌクレオチドPCRプライマーを使用することによって、またはPCR中の標識されたヌクレオチド三リン酸を利用して標識される。

40

【0099】

ニックトランスレーションとして公知の別のこのようなフラグメントの分析方法において、反応は、二重鎖のDNA分子中の標識されていないヌクレオシド三リン酸を標識されたヌクレオシド三リン酸に置き換えるために使用される。遊離3'-ヒドロキシル基は、デオキシリボヌクレアーゼI(DNAaseI)の処理によってできた「ニック」によって、標識されていないDNA内に形成される。次いで、DNAポリメラーゼIは、ニックの3'-ヒドロキシル末端への標識されたヌクレオチドの付加を触媒する。同時に、この酵素の5'~3'-エキソヌクレアーゼ活性によりヌクレオチドユニットがニックの5'

50

- ホスホリル末端から脱離する。遊離の3'-OH基を有する新しいヌクレオチドは、元々の切除されたヌクレオチドの位置に組み込まれ、そしてニックは1つのヌクレオチドユニットだけ3'の方向に沿って移動する。この3'移動は、現存の標識されていないヌクレオチドの除去を伴う、新たな標識されたヌクレオチドのDNAへの連続的な付加をもたらす。次いで、ニックトランスレーションされたポリヌクレオチドは、分離プロセス(例えば、電気泳動)を使用して分析される。

【0100】

他の例示的なフラグメント分析法は、可変数の縦列反復配列、すなわちVNTRに基づく。VNTRは、特定の配列の隣接した複数のコピーを含み、反復ユニットの数は可変性である二重鎖のDNAの領域である。VNTR座の例には、pYNZ22, pMCT118 およびApobがある。VNTR法のサブセットは、それらのマイクロサテライト反復、または短い縦列反復(STRs)(すなわち、短い(2~4塩基)反復配列によって特徴付けられるDNAの縦列反復)の検出に基づく方法である。ヒトにもっとも多く点在している反復DNAの1つは、(dC-dA)_n-(dG-dT)_nジヌクレオチド反復のファミリーである((CA)_nジヌクレオチド反復ファミリーともよばれる)。ヒトゲノムには50,000~100,000個程多くの(CA)_n反復領域があると考えられており、代表的には1ブロックにつき15~30個の反復を有する。これらの反復領域の多くは、長さが多型性であり、従って、有用な遺伝子マーカーとして働き得る。好ましくは、VNTR法またはSTR法において、標識は、色素で標識されたPCRプライマーを使用してポリヌクレオチドフラグメントに導入される。

【0101】

特に好ましいフラグメントの分析方法において、本発明に従って同定されたクラスは、末端ヌクレオチドに関して定義され、そうして4つの可能な末端塩基とスペクトル的に分解可能な色素のセットのメンバーとの間で対応が確立される。このようなセットは、市販の分光硬度計を用いて発光および吸収のバンド幅を測定することによって、本発明の色素から容易に構成される。より好ましくは、このクラスは、DNA配列決定の化学的方法または鎖終結法の状況において生じ、もっとも好ましくは、このクラスは鎖終結法、すなわちジデオキシDNA配列決定またはSanger型配列決定の状況において生じる。

【0102】

Sanger型配列決定は、配列が決定されるべき1本鎖または2本鎖のDNAテンプレートを使用するインビトロでのDNAポリメラーゼによるDNA鎖合成を包含する。合成は、オリゴヌクレオチドプライマーがテンプレートにアニーリングする場所に基づく決められた部位で開始される。合成反応は、連続したDNAの延長を支持しないヌクレオチドアナログを組み込むことによって終結される。例示的な鎖終結ヌクレオチドアナログは、2',3'-ジデオキシヌクレオシド5'-トリホスフェート(ddNTP)を包含し、これは3'~5'DNA鎖の伸長に必要な3'-OH基を欠失する。dNTP(2'-デオキシヌクレオシド5'-トリホスフェート)の適切な割合および4個のddNTPの1個が使用される場合、酵素で触媒される重合化は、ddNTPが組み込まれているそれぞれの部位にある鎖の母集団のフラクション内で終結される。標識されたプライマーまたは標識されたddNTPがそれぞれの反応に使用される場合、配列情報は、高分解能電気泳動によって分離された後の蛍光によって検出され得る。鎖終結法において、本発明の色素は、配列決定プライマーまたはジデオキシヌクレオチドのいずれかに結合され得る。色素は、例えば、Fungら、米国特許第4,757,141号に示される教示に従って、プライマーの5'-末端で、プライマーの塩基上で;または、例えば、上記のHobbsらによって開示されるアルキニルアミノ結合基を介してジデオキシヌクレオチドの塩基上で相補的な機能性と連結し得る。

【0103】

上記のそれぞれのフラグメント分析方法において、標識されたポリヌクレオチドは、好ましくは電気泳動手順によって分離される(例えば、上記で引用されたGouldおよびMatthews;RickwoodおよびHames,編,Gel Electroph

10

20

30

40

50

oresis of Nucleic Acids: A Practical Approach, IRL Press Limited, London, 1981; Osterman, Methods of Protein and Nucleic Acid Research, Vol. 1 Springer-Verlag, Berlin, 1984; または米国特許第5,374,527号、同第5,624,800号および/または同第5,552,028号)。好ましくは、電気泳動基質のタイプは、約2~20重量パーセントの間の濃度(重量:容量)を有する架橋されたまたは架橋されていないポリアクリルアミドである。より好ましくは、ポリアクリルアミドの濃度は約4~8パーセントである。好ましくは、特にDNA塩基配列決定の状況において、電気泳動基質は変性物質(例えば、尿素、ホルムアミドなど)を包含する。このような基質を作製するための
10 詳述な手順は、Maniatisら、「Fractionation of Low Molecular Weight DNA and RNA in Polyacrylamide Gels Containing 98% Formamide or 7 M Urea」Methods in Enzymology, 65:299-305(1980); Maniatisら、「Chain Length Determination of Small Double- and Single-Stranded DNA Molecules by Polyacrylamide Gel Electrophoresis」Biochemistry, 14:3787-3794(1975); Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pgs. 179-185(1982); およびABI PRISM™ 377 DNA Sequencer User's Manual, Rev. A, January 1995, Chapter 2 (p/n 903433, The Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA)によ
20 って提供される。特定の分離において利用される、最適な電気泳動条件(例えば、ポリマーの濃度、pH、温度、変性物質の濃度)は、多くの要因に依存し、これらには、分離される核酸のサイズの範囲、それらの塩基組成、これらの核酸が1本鎖であるかまたは2本鎖であるか、および電気泳動によって情報が求められるクラスの性質が含まれる。従って、本発明の出願は、特に分離のための最適条件に対して標準的な予備試験をすることを必要
30 とし得る。

【0104】

電気泳動分離に続いて、色素-ポリヌクレオチド結合体が、色素で標識されたポリヌクレオチドからの蛍光発光を測定することによって検出される。そのような検出を実行するために、標識されたポリヌクレオチドは標準的な手段(例えば、高輝度水銀灯、レーザーなど)によって照射される。好ましくは照射手段は、約600nmを超える波長の照射ビームを有するレーザーである。より好ましくは、色素-ポリヌクレオチドは、He-Neガスレーザーまたは固体状態のダイオードレーザーによって発生したレーザー光によって照射される。次いでこの蛍光は光感知検出器(例えば、光電子増倍管、帯電した結合デバイスなど)によって検出される。例示的な電気泳動の検出システムは、他(例えば、米国特許第5,543,026号;同第5,274,240号;同第4,879,012号;同
40 第5,091,652号および同第4,811,218号)に記載される。

【0105】

(VII. 実施例)

本発明は、以下の実施例の考察によってさらに明らかにされ、この実施例は本発明が純粋に模範的でありそして請求の範囲を限定することを意図しない。

【0106】

(材料および方法)

全ての薬品は、他の記述がなければAldrich Chemical Companyから購入した。マルチウスイエローはFlukaから購入した。アセトンはCaSO₄で乾燥し、蒸留した。ジクロロメタン(CH₂Cl₂)およびニトロベンゼンはCaH₂で乾
50

燥し、蒸留した。テトラヒドロフラン (THF) は LAH で乾燥し、必要に応じて蒸留した。トリエチルアミン (Et₃N) はナトリウムで乾燥し、蒸留した。DMSO (99.9%) および N, N - ジイソプロピルエチルアミン (99.5%) は、乾燥し、活性化モレキュラーシーブにかけて保存した。VWR のシリカゲル (220 ~ 400 メッシュ) は、順相フラッシュクロマトグラフィーに使用した。逆相クロマトグラフィーを Aldrich のオクタデシル基のついたシリカゲル上で実施した。分離用の薄層クロマトグラフィー (PTLC) を EM Science (VWR) の 1 および 2 mm の既製のシリカゲルプレート上で実施した。TLC を EM Science (VWR) のアルミニウムバックシリカゲル 60 のプレート上で実施した。発色させたスポットは長波長および短波長 UV 照射によって可視化した。

10

【0107】

吸収分光法を Hewlett Packard モデル 8451A の UV/Vis ダイオードアレイ分光測定計で実施した。蛍光測定を Perkin-Elmer LS-50B 蛍光分光測定計で行った。NMR スペクトルを Varian 300 MHz NMR の CD₃Cl の 7.26 ppm または CD₃OD の 3.31 ppm の溶媒ピークを参照して決定した。オリゴマー標識色素フラグメントの HPLC による精製を、Perkin-Elmer Series 200 ポンプで、逆相 C-18 カラムを利用して、UV および蛍光検出を使用して実施した。蛍光検出を赤を感知する PMT を備えた Perkin-Elmer LC 240 蛍光検出器によって実施し、そして UV 検出を Model LC 295 UV/Vis 検出器によって実施した。ポンプおよび検出器はすべて、2チャンネル型の Perkin-Elmer Model 1022 コンピューターランに連結した。緩衝液を以下の濃縮されたストックから作成した：10 x TBE (0.89 M トリス - (ヒドロキシメチル) アミノメタン、0.89 M ホウ酸、0.02 M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩) および 0.1 M TEAA (トリエチルアミンアセテート)。

20

【0108】

全ての反応をオープン乾燥した丸底フラスコの中で、アルゴン下、ゴムのセプタムをかぶせて行った。無水溶媒をオープン乾燥したシリンジでアルゴン雰囲気下で扱った。本明細書中で使用される用語「水性後処理 (aqueous workup)」は以下の工程を含む精製方法を意味する：(i) 飽和 NH₄Cl 溶液、5% HCl 水溶液または飽和 Na₂S₂O₃ 溶液に反応混合物を添加する工程、(ii) この溶液を有機溶媒 (例えば、EtOAc または CH₂Cl₂) で三回抽出する工程、(iii) 合わせた有機層を飽和 NaCl で洗浄する工程、および (iv) その溶媒を Na₂SO₄ で乾燥する工程、(v) その乾燥剤を濾過する工程、および (vi) その溶媒を減圧下で除去する工程。3 - メトキシ - 1 - ヒドロキシナフタレン 1 を 1, 3 - ジヒドロキシナフタレン から K. H. Bell および L. F. McCaffery (Aust. J. Chem. 46: 731 (1993)) の方法によって合成した。1 - アミノ - 3 - メトキシナフタレン 18 を、G. T. Morgan および E. D. Evans (J. Chem. Soc. 115: 1126 (1919)) または以下の実施例 10 で記載されたような手順に従って合成した。

30

【0109】

(実施例 1)

1 - ジエチルアミノ - 3 - ヒドロキシナフタレン (hydroxynaphthalene) 4 の合成 (図 1)

40

3 - メトキシ - 1 - ヒドロキシナフタレン 1 (1 gm) を乾燥 CH₂Cl₂ (30 mL) 中で懸濁させた。乾燥トリエチルアミン (1.2 当量) を添加し、そして反応系を -5 °C まで冷却した。CH₂Cl₂ (15 mL) 中で懸濁させた無水トリフルオロメタンスルホン酸 (1.1 当量) を勢いよく攪拌しながら 2 時間に渡って滴下した。この反応系を室温まで昇温させ、そして 5% の HCl および CH₂Cl₂ を使用して水性の後処理をした。得られた粗 3 - メトキシナフタレン - 1 - トリフラート 2 を EtOAc / ヘキサン (1:10) の移動相を用いる順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。

【0110】

50

精製された 3 - メトキシナフタレン - 1 - トリフラート 2 を以下のような W o l f e のパラジウムが触媒するトリフラート / アミンカップリングの手順 (J . P . W o l f e a n d S . L . B u c h w a l d , J O C , 6 1 : 1 1 3 3 (1 9 9 6)) を使用して、1 - ジエチルアミノ - 3 - メトキシナフタレン 3 へ変換した。3 - メトキシナフタレン - 1 - トリフラート 2 (1 グラム) を (S) - (-) - 2 , 2 ' - ビス (ジフェニルホスフィン) - 1 , 1 ' - ビナフチル (b i n a p t h y l) (B I N A P) (0 . 0 1 5 当量) 、 トリス (ジベンジリデンアセトン) ジパラジウム (P d ₂ (d b a) ₃) (0 . 0 0 5 当量) 、 および乾燥ジエチルアミン (3 当量) と共に、乾燥トルエン (1 0 0 m L) 中で懸濁させた。この反応系をアルゴンでパージし、そして固体のナトリウム t - ブトキシド (3 . 3 当量) を攪拌しながら添加した。次いで、反応系を加熱して、そして油浴中 8 0

10

【 0 1 1 1 】

【 数 1 】

¹H N M R : C D ₃ C l d 8.20 (τ - d , 1 H , J = 9 H z) , 7.72 (τ - d , 1 H , J = 7.8 H z) , 7.43 (dt , 1 H , J = 7.2 , 1.2 H z) , 7.34 (dt , 1 H , J = 7.7 , 1.2 H z) , 6.88 (d , 1 H , J = 2.4 H z) , 6.82 (d , 1 H , J = 2.4 H z) , 3.93 (s , 3 H) , 3.21 (q , 4 H , J = 7.2 H z) , 1.08 (t , 6 H , J = 7.2 H z) .

20

次に、1 - ジエチルアミノ - 3 - メトキシ - ナフタレン 3 のメチル基を以下の三臭化ホウ素脱保護により除去した。1 - アミノ - 3 - メトキシナフタレン (1 0 0 m g) を乾燥 C H ₂ C l ₂ (5 m L) 中で懸濁させ、そしてこの混合物をドライアイス / アセトン浴中で - 7 0 に冷却した。三臭化ホウ素 (1 0 当量) を滴下し、そして反応系を 3 0 分間攪拌し、次いで、冷蔵庫 (0) に一晩置いた。反応を - 7 0 で M e O H (1 0 m L) を注意深く添加することで、停止させた。固体の N a H C O ₃ (3 0 当量) を添加し、そして反応系を室温に暖めて、次いで暫時加熱して還流した。この混合物を冷却し、そして濾過し、この濾液を A c O H で酸性化し、そして溶媒を真空中で除去して、粗 1 - ジエチルアミノ - 3 - ヒドロキシナフタレン 4 を得た。これを、移動相として E t O A c : ヘキサン (1 : 4) を用いる順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。

30

【 0 1 1 2 】

(実施例 2)

N - フェニル - 3 , 3 - ジメチル - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 9 の合成 (図 1)
3 - メトキシナフタレン - 1 - トリフラート 2 を、実施例 1 における上記のパラジウムが触媒するトリフラート / アミンカップリング反応に従い、アニリンを用いて誘導体化し、1 - アニリノ - 3 - メトキシナフタレン 5 を得た。

40

【 0 1 1 3 】

1 - アニリノ - 3 - メトキシナフタレン 5 を以下のアミノ基のアセチル化手順によりアセチル化した。1 - アミノ - 3 - メトキシナフタレン 5 (5 0 0 m g) および乾燥 E t ₃ N (1 . 2 当量) を乾燥 C H ₂ C l ₂ (1 0 m L) 中で懸濁させ、そして氷 / N a C l 浴を用いて - 5 に冷却した。2 - プロモ - 2 - メチルプロピオニルクロリド (1 . 1 当量) を滴下し、そして反応系を - 5 で 1 時間攪拌し、そして室温でさらに 1 時間攪拌した。この反応系を室温にし、そして 5 % の H C l および E t O A c を使用する水性の後処理をして、粗中間体 1 - (プロモアルキル) アミド - 3 - メトキシ - ナフタレン 6 を得た。これを、移動相として E t O A c : ヘキサン (1 : 9) を用いる順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。

50

【 0 1 1 4 】

1 - (プロモアルキル)アミド - 3 - メトキシ - ナフタレン 6 を以下のように、 $AlCl_3$ が触媒するフリーデル - クラフツ環化の手順を使用して環化した。ニトロベンゼン中の $AlCl_3$ (1 ~ 3 当量) を 1 - (プロモアルキル)アミド - 3 - ヒドロキシ - ナフタレン 6 へ添加した。この反応系を 130 に加熱し、1 時間反応させた。 NH_4Cl および $EtOAc$ を使用する水性の後処理によって粗 N - フェニル - ベンゾインドリン中間体 7 を得た。これを、移動相として $EtOAc$: ヘキサン (1 : 4) を用いる順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。次いで、 N - フェニル - ベンゾインドリン中間体 7 のアミドカルボニル基を LAH を用いて還元すると、化合物 8 を得た。

【 0 1 1 5 】

【 数 2 】

1H NMR: CD_2Cl_2 d 7.71 (d, 1 H, J =

7.8 Hz), 7.32 (m, 2 H), 7.24 (m, 2 H), 7.07 (bt, 1 H, J = 6.6 Hz), 6.96 (m, 3 H), 6.84

(s, 1 H), 3.97 (s, 3 H), 3.92 (s, 2 H), 1.44 (s, 6 H).

10

化合物 8 のメトキシ基の脱保護を実施例 1 に記載の三臭化ホウ素脱保護の手順を使用して成し遂げ、 N - フェニル - 3 , 3 - ジメチル - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 9 を得た。

20

【 0 1 1 6 】

(実施例 3)

N - メチル - 5 - ヒドロキシ - (テトラヒドロ)ベンゾキノリン 15 の合成 (図 2)
化合物 10 をピリジン中のピペリジン触媒作用を用いるマロン酸およびメトキシ - ナフトアルデヒドの縮合により合成した。化合物 10 を 10 % Pd / 炭素上の水素で、そして続いて LAH 還元で還元し、上で化合物 2 の合成について概略されたように、無水トリフルオロメタンスルホン酸と反応させて、トリフラート 11 を得た。次いで、トリフラート 11 を DMF 中で NaN_3 (3 当量) と 100 で 6 時間反応させた。次いで、この反応系を室温にし、そして純水および $EtOAc$ を使用する水性の後処理をして、純粋な化合物 12 を得た。化合物 12 を乾燥 CH_2Cl_2 中で懸濁させ、固体の $AlCl_3$ (3 ~ 5 当量) と複合し、そして 2 時間還流して化合物 13 を得た。

30

【 0 1 1 7 】

化合物 13 は、以下のような一般のアミノ基のアルキル化の手順に従い、 MeI でアルキル化した。3 - メトキシベンゾキノリン誘導体 13 (100 mg) を乾燥 THF (5 mL) 中で懸濁させ、そして - 5 (氷 / $NaCl$) に冷却した。1 . 1 当量の n - ブチルリチウム (1 M) を滴下し、そして反応系を 1 時間攪拌した。 MeI アルキル化試剤 (3 当量) をゆっくりと添加し、そして反応系を室温で 2 時間攪拌させた。 NH_4Cl および $EtOAc$ を使用する水性の後処理によって粗製のアルキル化された 3 - メトキシベンゾキノリン中間体 14 を得た。次いで、中間体 14 を、移動相として $EtOAc$: ヘキサン (1 : 19) を用いる順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。

40

【 0 1 1 8 】

【 数 3 】

$^1\text{H NMR}$: CD_3Cl δ 8.1 (7^b-d^a d, 1 H, $J = 8.1$ Hz), 7.68(dd, 1 H, $J = 8.1, 1.8$ Hz), 7.34 (m, 2 H), 6.8 (s, 1 H), 3.92 (s, 3 H), 3.21 (m, 2 H), 2.94 (s, 3 H), 2.77 (t, 2 H, $J = 6.6$ Hz), 1.92 (m, 2 H).

実施例 1 における上記の一般の三臭化ホウ素の手順による続くメトキシ基の脱保護によって N - メチル - ヒドロキシベンゾキノリン誘導体 15 を得た。

10

【 0 1 1 9 】

(実施例 4)

3 - (5 - ヒドロキシベンゾキノリン - 1 - イル) プロパンスルホン酸 17 の合成 (図 2)

化合物 13 を実施例 3 で N - メチル - ヒドロキシベンゾキノリン誘導体 15 の合成について概説された上記の手順に従い合成した。次いで、化合物 13 を実施例 3 における一般のアミノ基のアルキル化の上記の手順に従いアルキル化した。この時、アルキル化試剤として Me I よりはむしろ 1, 3 - プロパンスルホン酸を使用し、5 - メトキシベンゾキノリン - N - プロパンスルホン酸中間体 16 を得た。

【 0 1 2 0 】

20

【 数 4 】

$^1\text{H NMR}$: CD_3OD δ 7.94 (d, 1 H, $J = 8.7$ Hz), 7.65 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 7.32 (t, 1 H), 7.27 (t, 1 H), 6.85 (s, 1 H), 4.89 (s, 3 H), 3.20 (m, 2 H), 3.08 (bt, 2 H, $J = 6$ Hz), 2.91 (m, 2 H), 2.72 (t, 2 H, $J = 6.6$ Hz), 2.33 (m, 2 H), 1.89 (m, 2 H)

実施例 1 における上記の一般の三臭化ホウ素の手順による続く化合物 16 のメトキシ基の脱保護によって 3 - (5 - ヒドロキシベンゾキノリン - 1 - イル) プロパンスルホン酸 17 を得た。

30

【 0 1 2 1 】

(実施例 5)

N - メチル - 2, 2, 4 - トリメチル - 5 - ヒドロキシ - (テトラヒドロ) ベンゾキノリン 22 の合成 (図 3)

A . R o s o w s k y および E . J . M o d e s t の手順 (J . O . C . , 30 : 1832 (1965)) に従って、1 - アミノ - 3 - メトキシナフタレン 18 (1 g m) を乾燥アセトン (50 m L) 中で溶解させ、そしてヨウ素 (0 . 01 当量) をこの溶液に添加した。この反応系を加熱し、そして 16 時間攪拌し、冷却し、次いで飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を用いて停止させた。次いで、この反応混合物を飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ および EtOAc を使用する水性の後処理をして、粗メトキシベンゾキノリン 19 を得た。このメトキシベンゾキノリン 19 を EtOAc / ヘキサン 1 : 9 の移動相を使用するフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。次いで化合物 19 を実施例 3 における上記の一般のアミノ基のアルキル化の手順に従い Me I でアルキル化して、化合物 20 を得た。化合物 20 を Parr hydrogenator 中、70 psi で H_2 および 10 % の Pd / 炭素触媒作用を用いて還元して、N - メチル - 2, 2, 4 - トリメチル - 5 - メトキシベンゾキノリン中間体 21 を得た。

40

【 0 1 2 2 】

【 数 5 】

50

¹HNMR:

CD₃Cl d 8.20 (bd, 1 H, J = 7.5 Hz), 7.65 (bd, 1 H, J = 7.5 Hz), 7.33 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 3.94 (s, 3 H), 3.14 (b多重線, 1 H, J = 6.6 Hz), 2.80 (3, 3 H), 1.89 (d, 2 H, J = 8.7), 1.42 (d, 3 H, J = 6.9 Hz), 1.34 (s, 3 H), 1.05 (s, 3 H).

実施例 1 における上記の一般の三臭化ホウ素の手順によって、続く化合物 2 1 のメトキシ基の脱保護によって N - メチル - 5 - ヒドロキシ - (テトラヒドロ) ベンゾキノリン 2 2 を得た。 10

【 0 1 2 3 】

(実施例 6)

N - メチル - 3 , 3 - ジメチル - 4 - ヒドロキシベンゾインドリン 2 7 の合成 (図 3)
1 - アミノ - 3 - メトキシナフタレン 1 8 を実施例 2 における上記の一般のアミノ基のアセチル化手順に従い、2 - プロモ - 2 - メチルプロピオニルクロリドでアセチル化して化合物 2 3 を得た。化合物 2 3 を実施例 2 における上記のようなフリーデルクラフツ環化の手順で環化し、化合物 2 4 を得た。次に化合物 2 4 を THF 中で LAH (3 当量) を用いて還元し、4 - メトキシベンゾインドリン 2 5 を得た。アルキル化試剤としてヨウ化メチルを使用する実施例 3 における上記の一般のアミノ基のアルキル化の手順を使用して、化合物 2 5 をアルキル化し、N - メチル - 3 , 3 - ジメチル - 4 - メトキシベンゾインドリン 2 6 を得た。 20

【 0 1 2 4 】

【 数 6 】

¹HNMR: CD₃Cl d 8.07 (bd, 1 H, J = 8.4 Hz), 7.69 (bd, 1 H, J = 8.1 Hz), 7.33 (bt, 1 H, J = 7.8 Hz), 7.22 (bt, 1 H, J = 8.1 Hz), 6.70 (s, 1 H), 3.92 (s, 3 H), 3.32 (s, 2 H), 3.32 (s, 3 H), 1.44 (s, 6 H).

30

実施例 1 において上記の一般の三臭化ホウ素の手順によって、続く化合物 2 6 のメトキシ基の脱保護により N - メチル - 3 , 3 - ジメチル - 4 - ヒドロキシベンゾインドリン 2 7 を得た。

【 0 1 2 5 】

(実施例 7)

N - エチル - 3 , 3 - ジメチル - 4 - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 2 9 の合成 (図 3)
4 - メトキシベンゾインドリン 2 5 を上記の実施例 6 のように合成した。化合物 2 5 をアルキル化試剤としてヨウ化エチルを用いる実施例 3 において記載された一般のアミノ基のアルキル化の手順によってアルキル化し、N - エチル - 3 , 3 - ジメチル - 4 - メトキシベンゾインドリン 2 8 を得た。 40

【 0 1 2 6 】

【 数 7 】

¹H NMR:

CD₃Cl d 7.90 (d, 1 H, J = 8.7 Hz), 7.68 (d, 1 H, J = 8.1 Hz), 7.32 (bt, 1 H, J = 7.5 Hz),
 7.22 (bt, 1 H, J = 6.9 Hz), 6.69 (s, 1 H), 3.83 (s, 3 H), 3.52 (q, 2 H, J = 7.5 Hz), 3.38
 (s, 2 H), 1.46 (s, 6 H), 1.27 (t, 3 H, J = 7.5 Hz)

実施例 1 に記載された一般の三臭化ホウ素の手順により、続いて化合物 28 のメトキシ基を脱保護し、N - エチル - 3 , 3 - ジメチル - 4 - ヒドロキシ - ベンゾインドリ 29 を得た。

10

【 0 1 2 7 】

(実施例 8)

選択されたジベンゾローダミン色素化合物の合成

一般の手順 A (図 5) 。 固体の無水フタル酸誘導体 34 をアミノヒドロキシ中間体 31 (1 . 4 当量) および ZnCl₂ (2 . 8 当量) と混合した。オープンで乾燥された反応容器にラバーセプタムを取り付けて、そしてアルゴンでパージした。この固体の混合物を暫時 130 で融解が観測されるまで (例えば、約 15 分後) 加熱した。1, 2 - ジクロロベンゼン (約 10 当量) をこの反応混合物へシリンジにより添加し、そしてこの不均一な混合物を 130 ~ 170 に 4 時間加熱した。この粗反応混合物を冷却し、最小限の量の MeOH : CH₂Cl₂ (1 : 19) に懸濁させて、直接に、順相フラッシュクロマトグラフィーカラム上に充填し、そして粗色素を MeOH : CH₂Cl₂ (1 : 19) の移動相で溶出した。必要に応じて、この色素を MeOH : CH₂Cl₂ (1 : 9) で展開する P T L C によって、異なる異性体 35 および 36 を分離および精製した。異性体的に純粋な色素 (これは MeOH : CH₂Cl₂ (1 : 9) で溶出するシリカの T L C 上で単一の点として移動した) をその UV / 可視吸収スペクトルおよびその長波長蛍光励起および放射スペクトルにより同定した。

20

【 0 1 2 8 】

一般の手順 B (図 6) 。 図 6 に概説した一般の手順において、固体の無水フタル酸誘導体 34 (100 mg) をラバーセプタムが取り付けられた丸底フラスコに入れ、そして乾燥アルゴンでパージした。乾燥ニトロベンゼン (2 mL) を添加し、そしてこの無水物を溶解させるために加熱した。この混合物を室温まで冷却し、そして無水 AlCl₃ (3 ~ 6 当量) をこの固体を溶解させるために攪拌しながら添加した。続いて、1 当量の 1 - アミノ - 3 - メトキシナフタレン中間体 31 を攪拌しながら添加し、そしてこの反応系を 130 に 1 時間加熱した。次いで、反応系を冷却し、そして EtOAc 中で懸濁させた。この有機層を飽和 NH₄Cl およびブラインで洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濾過し、そして溶媒を真空中で除去した。必要に応じて、得られたケトン中間体 37 / 38 を、移動相として (MeOH : CH₂Cl₂、1 : 19) を使用する順相フラッシュクロマトグラフィーを使用し、または再結晶によって異なる異性体 37 および 38 を分離および精製した。異性体的に純粋な中間体 37 または 38 のメトキシ基を実施例 1 に記載された一般の三臭化ホウ素脱保護の手順に従い除去して、アミノ - ヒドロキシナフタレンケトン 39 を得た。次いで、アミノ - ヒドロキシナフタレンケトン 39 (100 mg) を 130 で、乾燥 1, 2 - ジクロロベンゼン (2 mL) 中の 1 - アミノ - 3 - ナフタレン中間体 32 (1 当量) と 2 時間反応させた。この反応系を冷却して、異性体的に純粋および不斉的に置換された生成物 40 (これは、上記の一般の手順 A のように精製された) を得た。

30

40

【 0 1 2 9 】

ジベンゾローダミン色素 41 の合成 (図 7) 。 無水フタル酸誘導体として無水ジクロロトリメリト酸 (すなわち、C - 14 および C - 17 での置換基が Cl であり、そして C - 15 での置換基が CO₂H である化合物 34) ならびにアミノヒドロキシ中間体 31 としては 1 - ジエチルアミノ - 3 - ヒドロキシナフタレン 4 を使用して、一般の手順 A に従った

50

。

【0130】

ジベンゾローダミン色素42の合成(図7)。無水フタル酸誘導体として無水ジクロロトリメリト酸(すなわち、C-14およびC-17での置換基がClであり、C-15での置換基がCO₂Hである化合物34)ならびにアミノヒドロキシ中間体31としてN-メチル-5-ヒドロキシ-ベンゾキノリン15を使用して、一般の手順Aに従った。

【0131】

ジベンゾローダミン色素43の合成(図7)。無水フタル酸誘導体として無水ジクロロトリメリト酸(すなわち、C-14およびC-17での置換基がClであり、C-15での置換基がCO₂Hである化合物34)ならびにアミノヒドロキシ中間体31として5-ヒドロキシ-ベンゾキノリン17を使用して、一般の手順Aに従った。

10

【0132】

ジベンゾローダミン色素44の合成(図7)。無水フタル酸誘導体として無水ジクロロトリメリト酸(すなわち、C-14およびC-17での置換基がClであり、C-15での置換基がCO₂Hである化合物34)ならびにアミノヒドロキシ中間体31としてN-メチル-2,2,4-トリメチル-5-ヒドロキシ-ベンゾキノリン22を使用して、一般の手順Aに従った。

【0133】

ジベンゾローダミン色素45の合成(図7)。無水フタル酸誘導体として無水ジクロロトリメリト酸(すなわち、C-14およびC-17での置換基がClであり、C-15での置換基がCO₂Hである化合物34)ならびにアミノヒドロキシ中間体31としてN-メチル-3,3-ジメチル-4-ヒドロキシ-ベンゾインドリリン27を使用して、一般の手順Aに従った。

20

【0134】

ジベンゾローダミン色素46の合成(図7)。無水フタル酸誘導体として無水テトラフルオロフタル酸(すなわち、C-14およびC-17での置換基がFである化合物34)およびアミノヒドロキシ中間体31としてN-エチル-3,3-ジメチル-4-ヒドロキシ-ベンゾインドリリン29を使用して、一般の手順Aに従った。

【0135】

ジベンゾローダミン色素47の合成(図7)。無水フタル酸誘導体として無水ジクロロトリメリト酸(すなわち、C-14およびC-17での置換基がClであり、C-15での置換基がCO₂Hである化合物34)ならびにアミノヒドロキシ中間体31としてN-フェニル-3,3-ジメチル-4-ヒドロキシ-ベンゾインドリリン9を使用して、一般の手順Aに従った。

30

【0136】

(実施例9)

選択されたジベンゾローダミン色素化合物のスペクトル特性

以下の表は種々の代表的な本発明のジベンゾローダミン色素化合物の重要なスペクトル特性を表す。遊離した色素(色素の $\epsilon_{\max, \text{abs}}$ で0.05の吸収を有する)に対する全スペクトルを1×TBE緩衝液および8Mの尿素中、室温で記録した。色素の濃度は約10⁻⁶ Mであった。

40

【0137】

【表1】

色素	吸収極大 (nm)	発光極大 (nm)	半値全幅 (nm)
41	585	614	59
42	609	634	42
43	597	637	47
44	598	640	50
45	639	650	31
46	639	652	33
47	632	676	66

10

(実施例10)

3,3-ジメチル-ヒドロキシ-ベンゾインドリン25の合成(図8および9)
以下のパラジウムが触媒するトリフラート/イミンカップリングおよびBuchwald
の加水分解の手順(Buchwald, S. L. & Tetrahedron Letters, 1997, 38/36, 6367-6370)を使用して化合物2を1-アミノ-
3-メトキシナフタレン18へ変換した(図8)。

20

【0138】

3-メトキシ-ナフタレン-1-トリフラート2(25g)をトリス(ジベンジリデンアセトン)-ジパラジウム($Pd_2(dba)_3$)(0.013当量)、ラセミ体の2,2'-ビス(ジフェニルホスフィノ)-1,1'-ビナフチル(\pm BINAP)(0.04当量)、炭酸カリウム(1.3当量)、炭酸セシウム(1.3当量)、およびベンゾフェノンイミン(1.5当量)と混合した。あるいは、カリウムまたはナトリウムt-ブトキシド(2.6当量)をこの反応の置換塩基として使用し得る。この反応混合物を乾燥トルエン(75mL)および乾燥テトラヒドロフラン(75mL)中で懸濁させ、そして油浴中
120で24時間攪拌した。75mLのヘキサン/酢酸エチル(9:1)の混合物をこの反応混合物に添加し、そしてこの混合物をヘキサン/酢酸エチル(3:2)を用いてシリカゲルを通して溶出した。この溶出液を回収し、次いで減圧下で濃縮した。濃縮した油状物にヘキサン/酢酸エチル(9:1)を添加して、1-ベンゾフェノンイミノ-3-メトキシナフタレン49を黄色の結晶として晶出させた(20.0g、72.6%)。この母液を濃縮し、そしてヘキサン/酢酸エチル(9:1)を添加して、黄色の結晶として49の第2の収穫を晶出させた(3.0g、10.9%)。(全収率:83.5%)。

30

【0139】

化合物49を酸性条件下で加水分解して以下のように18を得た。化合物49(27gm)を1,4-ジオキサン(150mL)および5%の硫酸(H_2SO_4 , 100mL)中で懸濁させた。次いで反応系を油浴中、50で1時間加熱および攪拌した。この反応混合物を室温に冷却し、そして150mLのヘキサン/酢酸エチル(3:2)で洗浄した。次いで、この溶液を氷冷した水性NaOHでpH10~pH11に塩基性化し、そして酢酸エチルで3回抽出した。この合わせた有機の抽出液を硫酸ナトリウム(Na_2SO_4)で乾燥させて、そして減圧下でエバポレートすると、淡褐色の油状物(これは放置したときに結晶となる)として18を得た(13.9g、100%)。

40

【0140】

化合物25(3,3-ジメチル-ヒドロキシ-ベンゾインドリン)を実施例6に記載の手順に従い18から合成した。

【0141】

50

(実施例 11)

N - 置換メトキシベンゾインドリン中間体 57 ~ 61 の合成 (図 9)

化合物 25 を共通の中間体として用い、N - 置換された誘導体 57 ~ 61 をアルキル化的置換 (alkylative substitution) またはパラジウムが触媒する二級アミン基へのカップリングにより合成した (図 9)。

【0142】

N - (6 - ヘキサン酸) - 3, 3 - ジメチル - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 57 の合成。化合物 25 (2.3 g) を市販のメチル - 6 - インドヘキサン酸 52 (3 当量) およびジイソプロピルエチルアミン (3 当量) での処理で、アルキル化した。この混合物を乾燥トルエン (23 mL) 中で懸濁させ、そして油浴中 130 で攪拌しながら 18 時間加熱した。この溶媒を減圧下で除去し、粗 N - (6 - ヘキサン酸) - 3, 3 - ジメチル - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 57 を得た。粗 57 をジクロロメタン中に溶解させ、そしてヘキサン / 酢酸エチル (99 : 1) で溶出する順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製した (収量 2.25 g、74%)。

10

【0143】

N - (ピフェニル) - 3, 3 - ジメチル - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 58 の合成。化合物 25 (2.3 g) を、以下のような確立された手順 (Buchwaldら、J. Org., 1997, 62, 6066 ~ 6068) に従うパラジウムが触媒するカップリングにより N - アリール化した: 化合物 25 (2 g) を 4 - ブロモ - ピフェニル 7 (1.4 当量)、ナトリウム t - ブトキシド (1.3 当量)、トリス (ジベンジリデンアセトン) ジパラジウム ($Pd_2(dba)_3$) (0.013 当量)、ラセミ体の 2, 2' - ビス (ジフェニルホスフィノ) - 1, 1' - ビナフチル (\pm BINAP) (0.04 当量) と混合した。この反応混合物を乾燥トルエン (100 mL) 中で懸濁させ、十分攪拌し、そして油浴中 130 で一晩 (16 時間) 加熱した。この反応混合物を水性塩化アンモニウム (NH_4Cl) でクエンチし、そして酢酸エチルで抽出 (3x) した。この有機の抽出液を無水 Na_2SO_4 で乾燥させた。ヘキサン (等容量) を粗反応混合物に添加し、そしてそれをヘキサン / 酢酸エチル (1 : 1) を用いてシリカゲルを通して溶出した。この溶媒を減圧下でエバポレートし、そしてその残渣をヘキサン / 酢酸エチル (98 : 2) で溶出する順相フラッシュクロマトグラフィーで精製し、N - (ピフェニル) - 3, 3 - ジメチル - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 58 を白色の粉末として得た (収率 85%)。

20

30

【0144】

N - (カルボキシピフェニル) - 3, 3 - ジメチル - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 59 の合成。化合物 54 を市販のプロモ - ピフェニル - メチルケトンからハロホルム反応により合成し、プロモ - ピフェニル酸を得、続いて確立された手順を用いてエステル化した。化合物 25 を 54 と、以下のような確立された手順 (Buchwaldら Tetrahedron Letters, 1997, 38 / 36, 6359 ~ 6362) に従って N - アリール化した: 化合物 25 (0.4 g) を化合物 54 (1.4 当量)、トリス (ジベンジリデンアセトン) ジパラジウム ($Pd_2(dba)_3$) (0.013 当量)、ラセミ体の 2, 2' - ビス (ジフェニルホスフィノ) - 1, 1' - ビナフチル (\pm BINAP) (0.04 当量) および炭酸セシウム (3 当量) と混合した。この反応混合物を乾燥トルエン (100 mL) および乾燥テトラヒドロフラン (100 mL) 中で懸濁させ、次いで油浴中 130 で加熱し、18 時間攪拌した。この反応系を冷却し、そしてヘキサン (30 mL) をこの粗混合物に添加した。この粗生成物をヘキサン / 酢酸エチル (3 : 2) を用いてシリカゲルを通して溶出した。この溶媒を減圧下で除去し、そして N - (カルボキシピフェニル) - 3, 3 - ジメチル - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 59 をヘキサン / 酢酸エチル: (95 : 5) で溶出する順相フラッシュクロマトグラフィーで精製した (明るい黄色の固体、収量 0.25 g、32%)。

40

【0145】

N - フェニル - 3, 3 - ジメチル - ヒドロキシ - ベンゾインドリン 60 の合成。化合物 25 を、化合物 25 からの化合物 58 の合成について上記のように、ヨードベンゼンまたは

50

プロモベンゼンでN-アリール化した。純粋なN-フェニル-3,3-ジメチル-ヒドロキシ-ベンゾインドリノンをヘキサン/酢酸エチル(98:2)を用いる順相フラッシュクロマトグラフィーで単離した。

【0146】

N-カルボキシフェニル-3,3-ジメチル-ヒドロキシ-ベンゾインドリノンの合成。化合物25を、化合物59の合成について上記のように、メチルヨードベンゾエートまたはメチルプロモベンゾエートでN-アリール化した。純粋なN-カルボキシフェニル-3,3-ジメチル-ヒドロキシ-ベンゾインドリノンをヘキサン/酢酸エチル(95:5)を用いる順相フラッシュクロマトグラフィーで単離した。

【0147】

(実施例12)

ジベンゾローダミン色素67、72、76および81の合成(図10~13) Joda-4-色素67の合成(図10)。ヒドロキシインドリン62を以下の手順に従い、塩化アルミニウム($AlCl_3$)を使用し、化合物58の脱メチル化によって得た:化合物58(2g)および塩化アルミニウム(6g)をアルゴンの強気流下で完全に混合し、そしてこの反応混合物を10分間アルゴンでパージした。この固体の混合物をアルゴン下で、オイルバス中90~120に20分に渡り加熱した。この反応混合物を冷却し、そしてこの固体をジクロロメタン中で懸濁させて、そして氷および希 H_2SO_4 の溶液へ移した。この水層を5回抽出し、合わせた有機の抽出液を飽和塩化ナトリウムで洗浄し、そして硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、この溶媒を減圧下でエバポレートし、そして純粋な62(0.13g)をジクロロメタン/メタノール(99:1)で溶出する順相フラッシュクロマトグラフィーで単離した。ヒドロキシインドリン63を、化合物58の化合物62への変換の手順と同一の手順を用いて化合物59から得た。

【0148】

次に、乾燥ジクロロメタン中のN-メチルホルムアニリドとオキシ塩化リンの1:1錯体(1当量)を、小さいナス型フラスコ中の62(1当量)(5mLフラスコ中100mg)に添加した。この反応混合物をアルゴン気流下、油浴中80で加熱し、最終的にジクロロメタンが蒸発して暗赤色の油状物が残った。ニトロベンゼン(300 μ L)を添加し、続いて $POCl_3$ (2当量)添加した。上記の溶液にニトロベンゼン(500 μ L)中で懸濁した63(1当量)を添加した。この反応混合物を80~155に25分間加熱し、次いで155で15分間保った。この反応系を冷却し、そしてジクロロメタンと共に5%のHClへ移した。その水層をブラインで飽和化し、そしてジクロロメタンで抽出($\times 3$)した。合わせた有機の抽出液を分離し、そして減圧下でエバポレートして粗色素誘導体64を得た。粗製の64を酢酸(3mL)および5%のHCl(3mL)中で懸濁させ、60で1時間加熱した。次いで反応混合物を氷を入れた飽和塩化ナトリウム水溶液に注ぎ、ジクロロメタンで3回抽出した。合わせた有機層のエバポレート後、次いで純粋なモノ-カルボキシル化された不斉の色素誘導体65を他の2個の対称的な色素生成物(ビス-ビフェニルおよびビス-カルボキシビフェニル色素)からジクロロメタン/メタノール(9:1)で溶出する順相フラッシュクロマトグラフィーで精製した。

【0149】

最終的に、この精製された色素誘導体65を以下のようにスルホン化してJoda-4色素67を得た。色素誘導体65(30mg)および無水硫酸ナトリウム(3当量)をアルゴン下0で乾燥ジクロロメタン(50mL)中に懸濁させた。上記の溶液に5当量のクロロスルホン酸($ClSO_3H$)を添加し、そしてこの反応混合物を室温で18時間攪拌した。この反応混合物を飽和水性塩化ナトリウム/5%塩酸で停止し、そして水層を3回ジクロロメタンで抽出した。その有機抽出液を減圧下でエバポレートして粗Joda-4色素66を得た。粗色素66をジオキサンおよび5%のHCl(2:1)の溶液中で懸濁させ、そして室温で20時間攪拌した。次いでこの溶液を減圧下で濃縮し、飽和水性塩化ナトリウム中で懸濁させ、そしてジクロロメタンで3回抽出した。この溶媒をエバポレートして粗Joda-4色素67を得た。純粋なJoda-4色素67をメタノール/ジクロロ

10

20

30

40

50

メタン(1:4)で展開する順相分取薄層クロマトグラフィー(PTLC)またはメタノール/ジクロロメタン(1:9)で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより単離した。

【0150】

Joda-3色素72の合成(図11)。いずれも化合物58の化合物62への変換について上記の塩化アルミニウム脱保護の手順を使用することで、化合物61を脱メチル化して化合物68を得、そして化合物8を脱メチル化して化合物9を得た。化合物68をメチルホルムアニリド/POCl₃錯体と反応させ、連続して化合物9と反応させて、化合物62および63からの色素誘導体64の合成で記載したような色素誘導体70を得た。上記の64からの色素誘導体65の生成に関する手順に従い、粗色素誘導体70を酸で加水分解して色素誘導体71を得た。この純粋な不斉の色素誘導体71を2つの対称的なビス-フェニルおよびビス-カルボキシフェニル色素生成物からPTLCで精製した。次いで、色素誘導体65からのJoda-4色素67の生成について上記のように、この精製された色素71をスルホン化および加水分解して粗Joda-3色素72を得た。純粋なJoda-3色素72を、メタノール/ジクロロメタン(1:4)で展開する順相分取薄層クロマトグラフィー(PTLC)またはメタノール/ジクロロメタン(1:9)で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより単離した。

10

【0151】

Joda-2色素76の合成(図12)。三臭化ホウ素脱保護により化合物57を脱メチル化して化合物73を得、そして化合物8を脱メチル化して9を得た(化合物58の化合物62への変換について上記の塩化アルミニウム脱保護手順を用いる)。化合物57をメチルホルムアニリド/POCl₃錯体と標準の条件下で反応させ、そして続けて化合物9と標準の条件下で反応させて、上記の実施例7に記載されているような色素誘導体74を得た。粗色素誘導体74を標準の酸加水分解で加水分解して色素誘導体75を得た。この純粋な不斉の色素誘導体75を2つの対称的なビスフェニルおよびビス-ヘキサン酸色素生成物からPTLCで精製した。次いで、65から67の形成について記載された標準の手順により、精製された色素75をスルホン化して、粗Joda-3色素76を得た。純粋なJoda-2色素76を、メタノール/ジクロロメタン(1:4)で展開する順相分取薄層クロマトグラフィー(PTLC)またはメタノール/ジクロロメタン(1:9)で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより単離した。

20

30

【0152】

Joda-1色素81の合成(図13)。化合物57(0.313g)を、メタノール中、室温で3時間にわたり1MのKOH(7当量)との処理でけん化した。この溶液を乾固するまで濃縮し、そしてその油状物を酢酸エチルおよび5%の塩酸溶液で十分に抽出した。この有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、そして無色油状物まで濃縮した。純粋な77を5%のメタノール/ジクロロメタン/0.1%の酢酸で溶出する順相クロマトグラフィーにより単離した(収量0.243g; 84%)。

【0153】

次に、化合物77(0.360gm)を乾燥ジクロロメタン(2ml)ならびにジクロロメチルメチルエーテル(2.6当量)および四塩化スズ(4当量)の溶液に溶解させた。この溶液を1.5時間還流した。この混合物を酢酸エチルおよび3Mの塩酸溶液で抽出した。この有機層を水およびブラインで洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥し、油状物まで濃縮し、そして精製をしないで使用した。薄層クロマトグラフィーに基づいて、この時点において、化合物77および78の約等モルの混合物が存在した。この油状物を乾燥ジクロロメタン(8ml)中に溶解させてそして-78に冷却した。混合物の脱メチル化を確立された三臭化ホウ素の手段により実行して化合物79および80の混合物を得た。この得られた粗油状物を乾燥ジクロロメタン(5ml)に溶解させ、そしてオキシ塩化リン(2当量)を添加した。次いでニトロベンゼン(5ml)を添加した。この混合物を45分間に渡って80~150に加熱し、そして即座に熱から除去した。後処理および単離を、化合物67の合成に関する実施例12に記載されたように行なって粗Joda1色素8

40

50

1を得た。純粋な色素81を化合物67の合成に関する実施例12に記載されているようにPTLCにより単離して32mgを得た。

【0154】

(実施例13)

化合物67、72、76、および81の色素カルボキシN-ヒドロキシスクシンイミド誘導体の合成ならびにこれらの誘導体のヌクレオチドおよびポリヌクレオチドへのカップリング(図14および15)

カルボン酸の色素67、72、76および81のN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)誘導体を2つの方法の内一つの方法で成し遂げた。Joda4色素NHS82、Joda3色素NHS83、およびJoda2色素NHS84の合成に関して、O-(N-スクシンイミジル(succinimidyl))-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム(tetramethyluronium)テトラフルオロボレート試薬を用いる方法(方法A)が好ましいが、Joda1色素85に関してはジクロロヘキシルカルボジイミド(DCC)およびN-ヒドロキシスクシンイミドを用いる方法(方法B)が好ましい。

10

【0155】

方法A:この色素を乾燥DMF中で(5mg色素:300 μ lDMF)ジイソプロピルエチルアミン(6当量)と懸濁させた。この色素の溶液にO-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート(15当量)を添加し、そして反応系を室温で15分間攪拌した。この反応系をジクロロメタンと共に5%のHCl(20ml)に移した。この水層を飽和されたNaClを添加することで塩を多くし、ジクロロメタンで3回抽出した。合わせた有機層を乾固するまで濃縮し、そして粗色素-NHSをMeOH/CH₂Cl₂(1:9)で溶出する順相のフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。

20

【0156】

方法B:この色素およびN-ヒドロキシスクシンイミド(20当量)を乾燥ジクロロメタン(5mg:500 μ lCH₂Cl₂)中で懸濁させた。ジクロロヘキシルカルボジイミド(9当量)を添加し、そして反応系を室温で1時間攪拌した。この反応を停止させ、そして純粋な色素-NHSを方法Aのように単離した。

【0157】

ヌクレオチドおよびポリヌクレオチドへのNHS誘導体の結合を以下のように行なった。アミノ基で置換されたオリゴマーまたはターミネーターをホルムアミド(5 \times 10⁻⁴M)中で懸濁し、そしてジイソプロピルエチルアミン(15当量)を添加した。DMSO(5mg/60 μ l)中で懸濁させた過剰の色素-NHS(5~10当量)を室温で攪拌しながら添加した。この反応系を室温で4時間攪拌した。この反応混合物に3MのNaOAcを添加して0.5MのNaOAcを得た。反応容量の4倍のEtOHを添加し、そしてこの混合物を冷却した。沈殿した、色素で標識されたオリゴマー(oligomer)を遠心分離によって単離し、そして30%のAcCN/0.1 \times TEEA緩衝液で溶出する逆相HPLCによって精製した。

30

【0158】

本明細書で示される全ての刊行物、特許、および特許出願は、各それぞれの刊行物、特許または特許出願が、ここで参考として援用されることが特に、および個々として示されたと同程度に、参考として援用される。

40

【0159】

少数の実施態様のみが上記で詳細に記載されているが、化学当業者は多くの改変がこれらの実施態様においてそれらの教示から逸脱することなく可能であることを明らかに理解する。このような改変の全ては、上記の請求項の範囲内に含まれることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明の1-アミノ-3-ヒドロキシナフタレン中間体の合成のための、例示的な合成経路を表す。

50

【図2】 図2は、本発明の1-アミノ-3-ヒドロキシナフタレン中間体の合成のための、例示的な合成経路を表す。

【図3】 図3は、本発明の1-アミノ-3-ヒドロキシナフタレン中間体の合成のための、例示的な合成経路を表す。

【図4】 図4は、本発明のジベンゾローダミン色素化合物の合成のための、一般化した合成経路を表す。

【図5】 図5は、本発明のジベンゾローダミン色素化合物の合成のための、例示的な合成経路を表す。

【図6】 図6は、本発明のジベンゾローダミン色素化合物の合成のための、例示的な合成経路を表す。

【図7】 図7は、本発明の数個の例示的ジベンゾローダミン色素化合物の構造を表す。

【図8】 図8は、化合物18の合成を表す。

【図9】 図9は、化合物57～61の合成を表す。

【図10】 図10は、化合物67の合成を表す。

【図11】 図11は、化合物72の合成を表す。

【図12】 図12は、化合物76の合成を表す。

【図13】 図13は、化合物81の合成を表す。

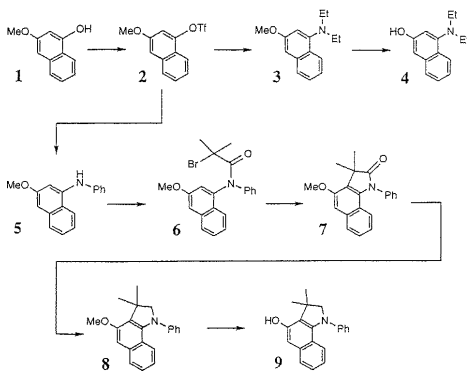
【図14】 図14は、化合物82～84の合成を表す。

【図15】 図15は、化合物85の合成を表す。

10

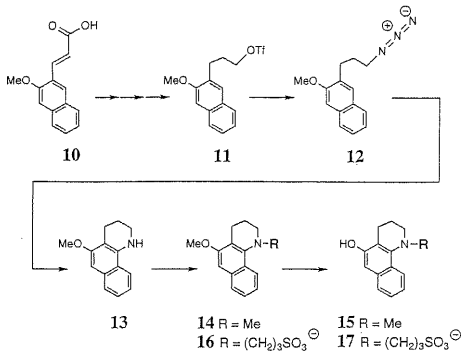
【図1】

Fig. 1



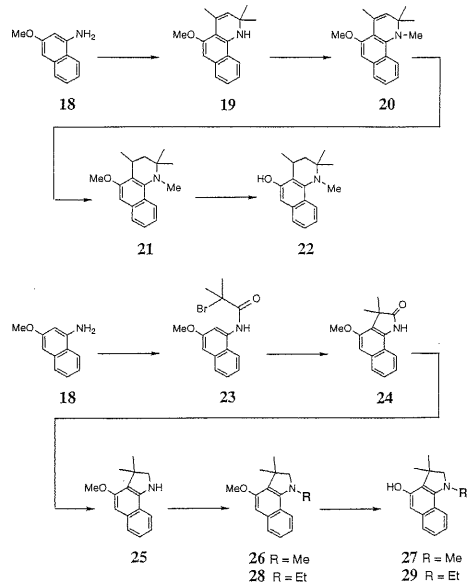
【図2】

Fig. 2



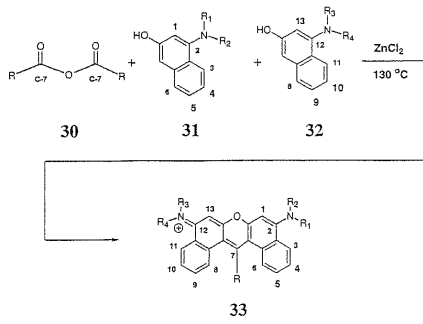
【図3】

Fig. 3



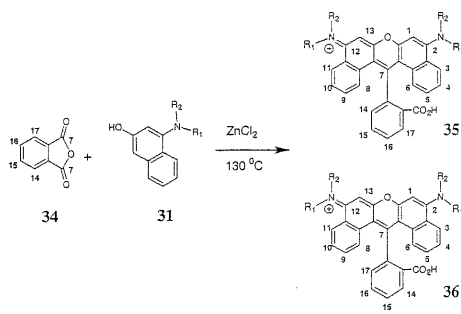
【 図 4 】

Fig. 4



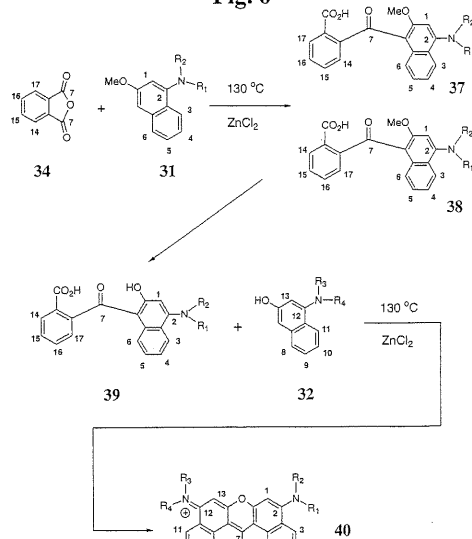
【 図 5 】

Fig. 5



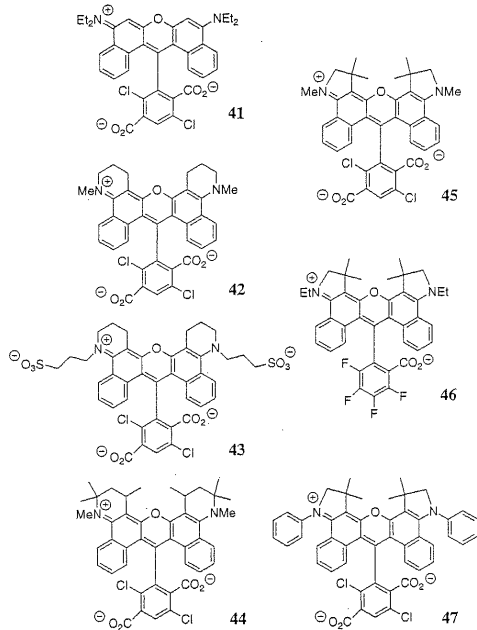
【 図 6 】

Fig. 6



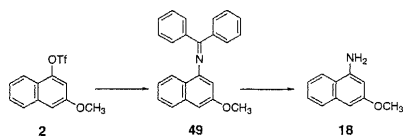
【 図 7 】

Fig. 7



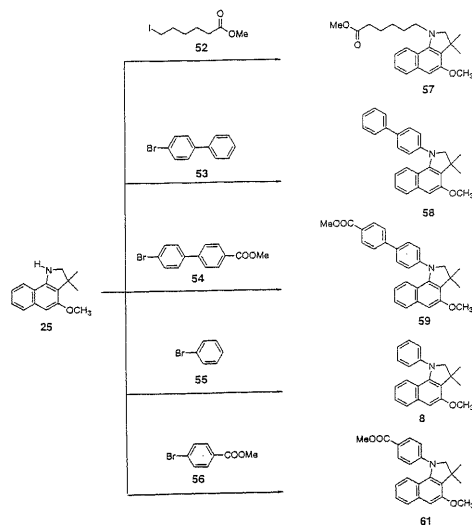
【 図 8 】

FIG. 8



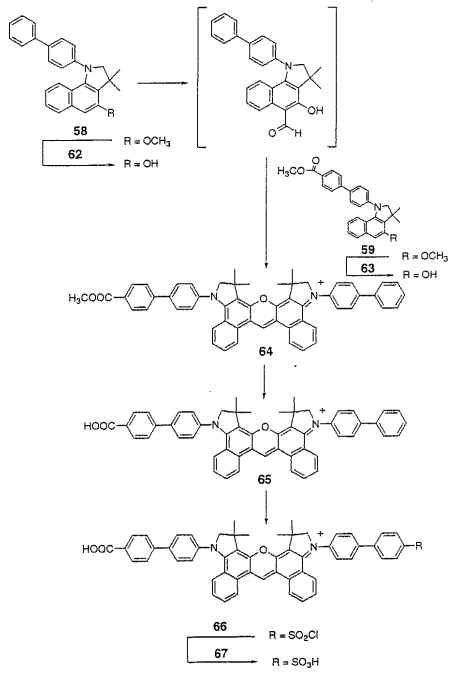
【 図 9 】

FIG. 9



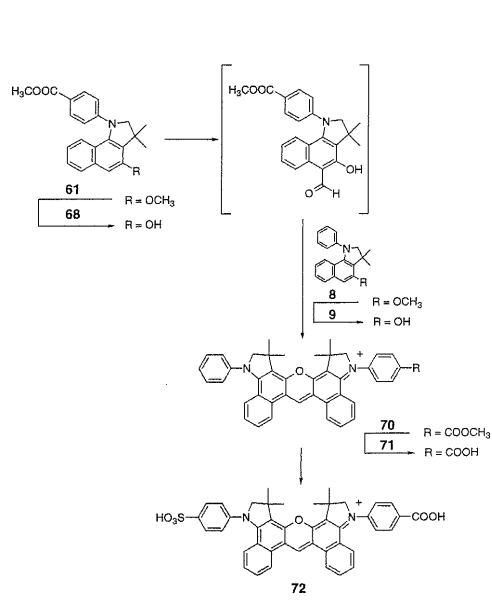
【 図 1 0 】

FIG. 10



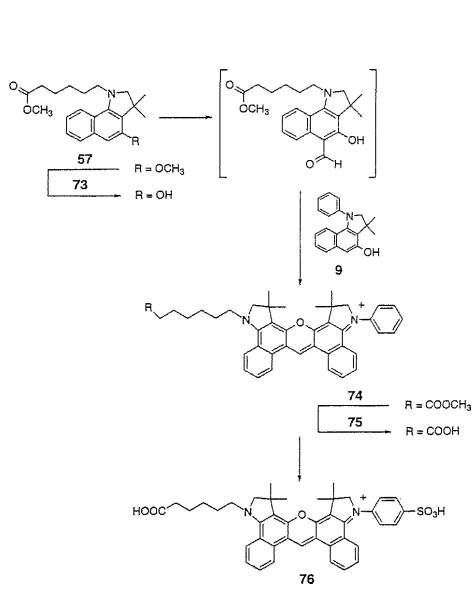
【 図 1 1 】

FIG. 11



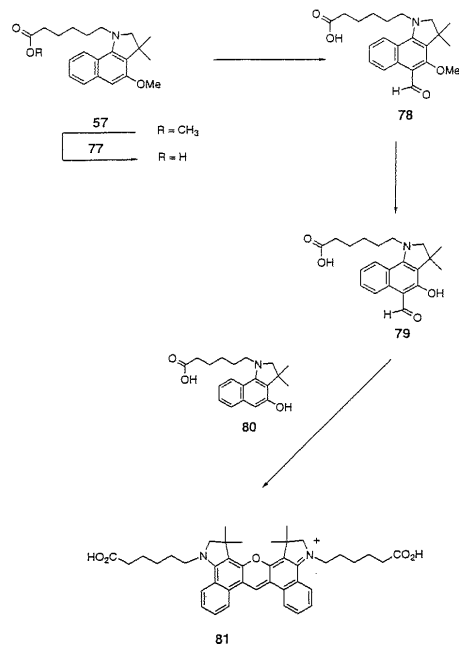
【 図 1 2 】

FIG. 12

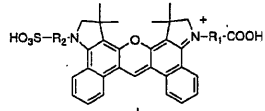


【 図 1 3 】

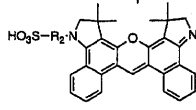
FIG. 13



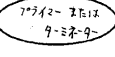
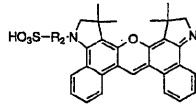
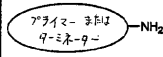
【 図 1 4 】



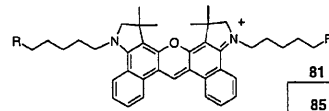
- 67 R₁ = R₂ = -Ph-Ph-
- 72 R₁ = R₂ = -Ph-
- 76 R₁ = -(CH₂)₅ -
R₂ = -Ph-



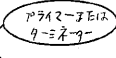
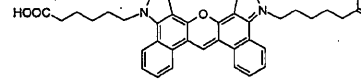
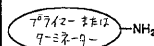
- 82 R₁ = R₂ = -Ph-Ph-
- 83 R₁ = R₂ = -Ph-
- 84 R₁ = -(CH₂)₅ -
R₂ = -Ph-



【 図 1 5 】



- 81 R = COOH
- 85 R =



フロントページの続き

- (74)代理人 100072730
弁理士 小島 一晃
- (72)発明者 ベンソン, スコット コンラド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94611, オークランド, ファラロン ウェイ 649
0
- (72)発明者 ラム, ジョー ワイ. エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94552-5301, カストロ パリー, パインビル
サークル 7867
- (72)発明者 アパダヤ, クリシュナ ガジャナン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94587, ユニオン シティ, ホルト ストリート
4437
- (72)発明者 ラデル, ベギー アン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94702, バークレイ, ホプキンス ストリート 13
20
- (72)発明者 ゼン, ウェイグオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォスター シティ, フォアフェイル コー
ト 350
- (72)発明者 メンチェン, スティーブン マイケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94536, フレモント, バンダ ウェイ 768

合議体

審判長 塚中 哲雄

審判官 福井 悟

審判官 穴吹 智子

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第805190(EP, A1)
特表2001-508494(JP, A)
特表2000-505503(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D311/78
C07D209/60
C07D221/10
C07D491/147
C07H19/06
C07H19/14
C07H19/16
C09K11/06
C12Q1/68
CA(STN)
REGISTRY(STN)
C07D311/94