

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3856463号
(P3856463)

(45) 発行日 平成18年12月13日(2006.12.13)

(24) 登録日 平成18年9月22日(2006.9.22)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 221/12 (2006.01)

C O 7 D 221/12

C O 9 K 11/06 (2006.01)

C O 9 K 11/06

請求項の数 6 (全 58 頁)

(21) 出願番号 特願平7-503565
 (86) (22) 出願日 平成6年6月23日(1994.6.23)
 (65) 公表番号 特表平9-500871
 (43) 公表日 平成9年1月28日(1997.1.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1994/007130
 (87) 国際公開番号 W01995/001341
 (87) 国際公開日 平成7年1月12日(1995.1.12)
 審査請求日 平成13年6月8日(2001.6.8)
 (31) 優先権主張番号 08/086, 285
 (32) 優先日 平成5年6月30日(1993.6.30)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

アボット・ラボラトリーズ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064—
 3500、アボット・パーク、アボット・
 パーク・ロード・100、チャド・037
 7/エイ・ピー・6・デュー2

(74) 代理人

弁理士 川口 義雄

(74) 代理人

弁理士 中村 至

(74) 代理人

弁理士 船山 武

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAに対して親和性を有するインターカラーターおよびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

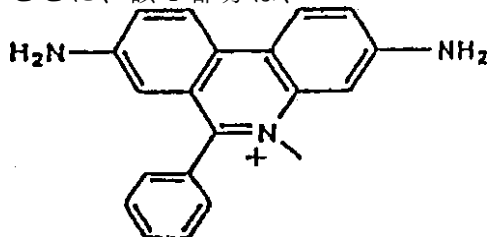
【請求項1】

T部分に結合したI部分よりなる化合物であって、該化合物は式：

I—T

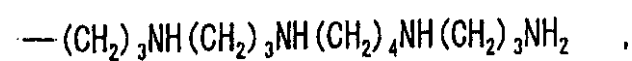
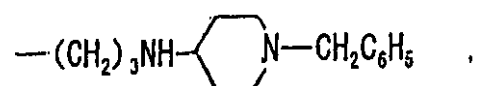
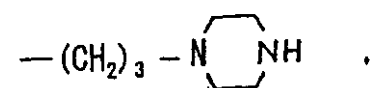
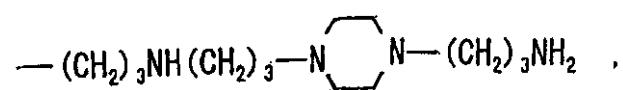
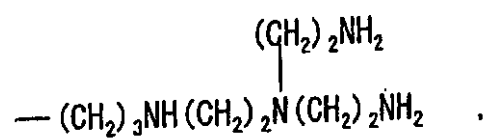
を有し、

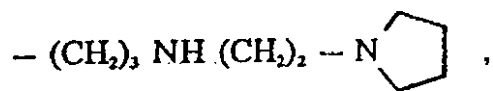
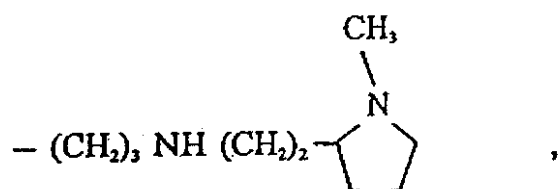
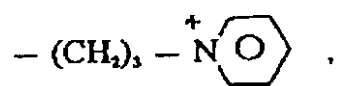
ここに、該I部分は、



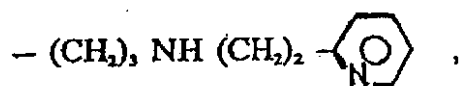
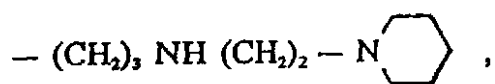
であり；

該T部分は：

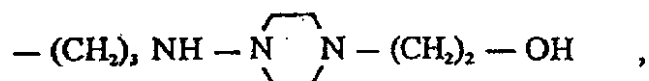
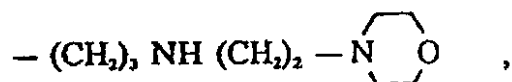
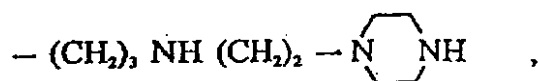




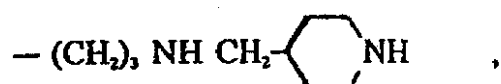
10



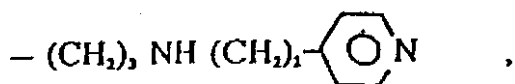
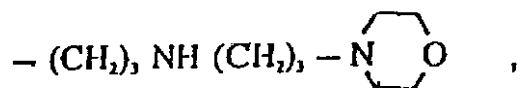
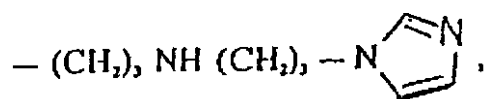
20



30



40

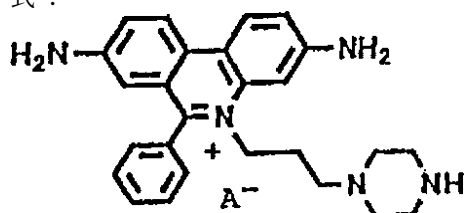


10

よりなる群から選択される該化合物。

【請求項 2】

式：



20

〔式中、 A^- は許容される一価対アニオンを意味する〕

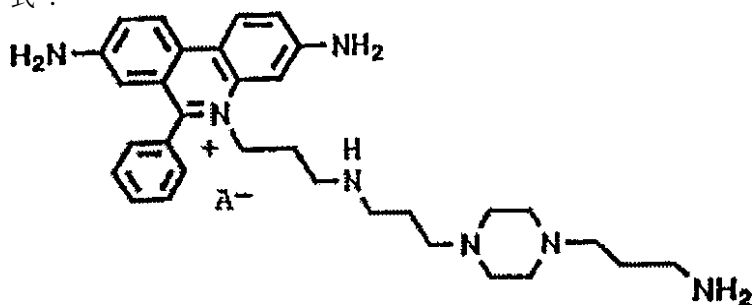
を有する化合物。

【請求項 3】

該 A^- がクロライド、ブロマイドおよびイオダイドよりなる群から選択される請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

式：



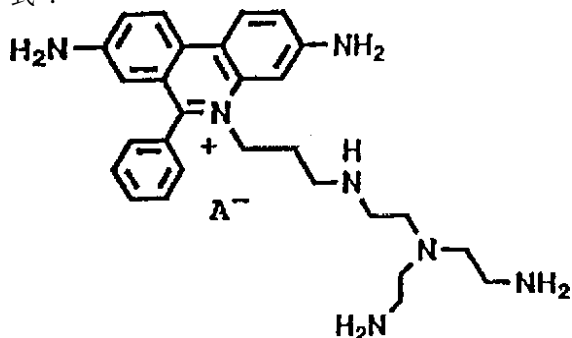
30

〔式中、 A^- は許容される一価対アニオンを意味する〕

を有する化合物。

【請求項 5】

式：



40

〔式中、 A^- は許容される一価対アニオンを意味する〕

を有する化合物。

50

【請求項6】

該A⁻がクロライド、ブロマイドおよびイオダイドよりなる群から選択される請求項5に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

背景

本発明は、各々が、1以上の官能性化された鎖もしくは部分で誘導体化されたインターカレーター部分または置換インターカレーター部分よりなるインターカレーター化合物、およびかかる化合物の使用に関し、該化合物はDNA分子への結合に対して高い親和性を有する。これらのインターカレーター化合物は、DNA分子へのインターカレーター挿入を要する公知の方法内でDNA分子への改良された結合を示す。さらに、本発明は、標識、捕獲、治療的挿入、アッセイ等で利用される、インターカレーターとして機能するセグメントによるDNA分子の促進された結合に関し、この結合では、化合物の利用効率の増大のためインターカレーターの能力が改善されている。

「インターカレーター」なる語は、二本鎖DNA (dsDNA) の隣接塩基対間への平面状の芳香族またはヘテロ芳香族化合物の挿入を記述するために、30年以上前に化学分野に導入された。多くのDNAインターカレーティング化合物は、生物学的に興味深い特性を引き出す。一般に、これらの特性はDNAに対するその反応性に関係することで意見の一致が見られている。より活性な化合物を求める研究において、DNAに対する最高の可能な親和性を持つ分子を設計するのが論理的である。1990年に、エチジウムホモダイマーとdsDNAとの複合体が4ないし5塩基対当たり1のダイマーの比率で起こり、アガロースゲルでの電気泳動で安定であったと報告された。これは、分離後のピコグラム感度でのDNA断片の蛍光、検出および定量ならびにバックグラウンド染色の完全な不存在を可能とした。かかる結果は、例えば、DNAインターカレーティング染料で作成された官能性化合物によって、インターカレーター化合物の種々の操作を通じて追求されてきた。これらの努力の結果、エチジウムブロマイドを利用するDNAインターカレーティング剤が種々のDNA分析法で用いられてきた。

エチジウムブロマイドを利用する種々の報告されたDNAインターカレーティング剤は、数多くのDNA分析法で用いられてきた：例えば、

Christenら [「cDNA合成の非放射性検出のためのエチジウムブロマイド-アガロースプレートアッセイ (An Ethidium Bromide-Agarose Plate Assay for the Nonradioactive Detection of cDNA Synthesis)」, *Anal. Biochem.*, 178(2), 1989年5月1日、269-272頁] は、エチジウムブロマイドがcDNA合成反応の成功を判断するのに用いられたことを報告している。アガロース中のエチジウムブロマイドはRNAおよびDNAを定量するのに使用できるので、mRNAからの二本鎖DNAの合成をアッセイするために、二本鎖DNAのより大きな蛍光が利用できる条件が工夫された。アガロース中5マイクログラム/mlのエチジウムブロマイドは、0.03ないし0.0015マイクログラムの範囲のcDNAの定量的検出を可能とする。ドデシル硫酸ナトリウムはcDNAの測定に対して逆効果を有していた。引き続いてアルカリゲル電気泳動および5マイクログラム/mlのエチジウムブロマイドでの染色によりcDNAを分析することにより、cDNAの正確で迅速なサイズ決定を可能とし、0.01~0.05マイクログラムのcDNAを要するに過ぎなかった。

Petersen, S.E. (「簡潔な一段階エチジウムブロマイド染色プロトコルを用いるフローサイトメトリ-DNA分析の正確性および信頼性 (Accuracy and Reliability of Flow Cytometry DNA Analysis Using a Simple, One-Step Ethidium Bromide Staining Protocol)」, *Cytometry*, 7(4), 1986年7月, 301-306頁) は、変動および誤差の源を、エチジウムブロマイドで染色した、洗剤で単離した核のDNA含量の簡潔なフローサイトメトリ分析について調べたことを報告している。

「二段階カウンター免疫電気泳動によるDNAに対する抗体および循環DNAの検出におけるエチジウムブロマイド (Ethidium Bromide in the Detection of Antibodies to DNA and of Circulating DNA by Two-Stage Counterimmunoelectrophoresis)」 (*J. Immuno*

10

20

30

40

50

l. Methods, 85(1), 1985年12月17日, 217-220頁)において、Riboldi, et al. は、沈殿抗-DNA抗体または循環DNAの検出においてカウンター免疫電気泳動の限界を克服しようとする試みにおいて、エチジウムブロマイドを用いて沈殿系の可視性を増加させ、その特異性を確認したことを報告している。

W. A. Dennyは、「抗癌剤としてのDNA-インターカレーティングリガンド：将来のデザインについての展望 (DNA-Intercalating Ligands as Anti-Cancer Drugs: Prospects for Future Design)」(Anticancer Drug Des., 4(4), 1989年, 12月, 241-263頁)において、ドキシソルビシン(doxorubicin)の臨床的成功以来、抗癌剤としてのDNA-インターカレーティングリガンドにおける興味が大きい湧いてきたことを報告している。

プローブまたは標的を問わず、標識核酸の検出を容易にするために、核酸を標識する多数の薬剤が記載されてきた。適当な標識は、蛍光、放射能、比色分析、X-線回折または吸収、磁性または酵素活性によって検出可能なシグナルを供し、例えば、蛍光団、発色団、放射性同位体、酵素、特異的結合パートナーを有するリガンドを包含する。

核酸を検出するには蛍光染料が適する。例えば、エチジウムブロマイドは、遊離溶液中に存在する場合よりも二本鎖DNAに結合した場合の方が増大した蛍光を示すインターカレーティング剤である。一本鎖核酸に対するエチジウムブロマイドの親和性は比較的低いにも拘わらず、エチジウムブロマイドは一本鎖および二本鎖核酸双方を検出するのに使用できる。エチジウムブロマイドはゲル電気泳動に続いて核酸を検出するのに慣例的に使用される。適当なゲルマトリックス、例えば、アガロースまたはアクリルアミドでのサイズ分画に続き、該ゲルをエチジウムブロマイドの希薄溶液に浸漬する。

蛍光標識ポリヌクレオチドプローブおよびポリヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイの使用が報告されている。これらの方法によると、特定のアブソーバーエミッター部分を核酸断片の3'末端および5'末端に連結させることによってプローブが調製される。該断片は、両断片がハイブリダイズしたときに該アブソーバーおよびエミッター部分が近接している結果検出可能なエミッター蛍光が生じるように、標的DNAの隣接部分にハイブリダイズすることができる。これらの方法によると、すべてのin vitro核酸重合が完結した後に、蛍光染料が標的DNAに導入される。多くの箇所で、インターカレーティング剤の核酸ポリメラーゼに対する阻害効果が記載されている。

DNA結合染料は、鋳型に結合することに起因する核酸複製過程の阻害効果のため、抗生物質として有用である。インフルエンザまたはヘルペスウイルスの感染性をブロックするためのインターカレーティング剤の使用が報告されている。また、多数のDNA結合剤(インターカレーターおよび非インターカレーターのどちらも)が核酸複製を阻害することが報告され記載されている。例えば、エチジウムブロマイドはDNA複製を阻害する。

試料中の標的核酸を検出する方法が提供されている。該方法は、(a) 試料、DNA結合剤および増幅用薬剤よりなる増幅された反応混合物を供し、ここに、該DNA結合剤は二本鎖核酸に結合した場合に検出可能なシグナルを供することを特徴とし、そのシグナルは該薬剤が結合しない場合に該薬剤によって供されるシグナルから区別可能であり；(b) 工程(a)の混合物によって生じるシグナル量を測定し、(c) 標的核酸を増幅する条件下で該混合物を処理し；(d) 工程(c)の混合物によって生じる該シグナルの量を測定し、次いで(e) 増幅が起こったか否かを判断する工程からなる。エチジウムブロマイドまたはエチジウムホモダイマーのごときこれらのDNA結合インターカレーティング剤は種々の分子のDNAとのインターカレーションの蛍光分析研究を可能とする。

DNA結合または増幅された核酸の検出に有用なインターカレーティング剤は、核酸二重らせん中の積み重ねられた塩基対間への挿入が可能な薬剤または部分である。エチジウムホモダイマーおよびエチジウムブロマイドのごときインターカレーティング剤は、一本鎖DNA、RNAに結合した場合または溶液中にある場合よりも、二本鎖DNAにインターカレートしたときの方が大きい強度で蛍光を発する。インターカレーターの他の用途は、複雑な生物学的または臨床的検体からの核酸の分離および単離または精製の分野におけるものであった。

液状の生物学的試料からデオキシリボ核酸(DNA)を分離する種々の方法が当該分野で

10

20

30

40

50

公知であるが、非常に時間を要するか、あるいは複雑で厄介なものである。DNAがニトロセルロースに付着することが知られている。DNAを含有する液状試料をニトロセルロースフィルターに通すと、該DNAは該フィルターに付着または結合する。

試料からDNAを分離するもう1つの方法は、ショ糖または塩化セシウム密度勾配での超遠心である。DNAは、この方法により、浮遊密度または沈降係数に従って、蛋白質のごとき他の高分子から分離される。生物学的試料を遠心管中の密度勾配上に載置し、DNAにつき非常に長時間非常な高速で回転させて、密度勾配中を進行させる。この方法は満足すべきものであるが、非常に時間がかかり労力を要する。遠心時間は試料当たり20時間またはそれ以上であろう。さらに、もし試料を余り長く回転させると、DNAが試料から分離されないのみならず、試料中の他の成分と共に勾配を完全に通過して遠心管のまさに底にまで至ってしまうであろう。従って、この方法は、複雑な試料からDNAを分離するための速くて容易な方法としては不適當である。

また、アガロースポリアクリルアミドゲル電気泳動が生物学的試料からDNAを分離するのに用いられる。この方法では、ゲルを含有するガラス製もしくはプラスチック製容器の一端に試料を適用し、該容器の長さ方向に電流を加える。負に荷電した核酸分子はアノードに向かって移動し、より大きな分子はよりゆっくりと移動する。分子の移動速度は、その分子量およびゲル物質中の架橋濃度および密度に依存する。次いで、当該DNAが位置するゲル部分を切断し、最後にDNAを抽出することによって該DNAをゲルから取り出す。この方法もまた、時間がかかり労力を要し、DNAは依然ゲルから分離しなければならない。DNAを電気泳動ゲル法または遠心によって分離する場合、DNAは何らかの方法で染色して可視化しなければならない。典型的には、エチジウムブロマイド(EtBr)が染色剤として用いられてきた。エチジウムブロマイドは、DNAの二重らせん構造の塩基対間へのインターカレーションによって当該DNAに付着する。

より最近では、かかる分子とDNAとのインターカレーションを含む蛍光実験を可能とするために、エチジウムホモダイマーが合成され、二官能性インターカレーターと共に導入されている。エチジウムホモダイマー(「EthD」)はエチジウムブロマイドよりも約2桁大きい強さで二本鎖DNA(「dsDNA」)に結合すると判断されている。EthDのdsDNAとの複合は、4ないし5塩基対あたり1のダイマーの比でなされ、アガローススペースでの電気泳動に対して安定であることが判明している。dsDNAへの結合に際し、ダイマーの蛍光量子収率はヌクレオチド配列とは独立して40倍増加する。

所望により、安定なdsDNA-蛍光団(fluoropore)複合体を形成して、各々数個ないし数千個の蛍光団を得ることができる。適当な制御条件下、これらの複合体は染料を他の核酸または蛋白質に移行させない。これらの複合体の重要な特性は、その蛍光発光強度がインターカレートした染料分子の数の直線関数であるという点にある。高感度の蛍光検出装置がより一般的に入手できるようになるに従い、例えば、DNAの高感度検出のための放射能に変えて染料を使用する可能性は、次第に価値あるものとなりつつある。

染料dsDNA複合体は、その組成、構造およびサイズが特定の適用にあつらえることができる広範囲の分光特性を持つ蛍光標識の新規なファミリーを表す。DNA分子は誘導体化されて、アビジンまたは抗体によって容易に認識できるビオチン、ジゴキシンゲンまたは多数の他の置換基に結合できる。染料を負荷されたかかる誘導体化DNA分子は、多数の応用、例えば、現在他の蛍光標識を使用するイムノアッセイ、蛍光、および染色体のin situハイブリダイゼーションにおいて、かなり高い感度の検出を可能とする。

インターカレーション部位および一本鎖領域を供して特異的標的配列のハイブリダイゼーションによる認識を可能とする二本鎖領域を持つプローブは、有用な蛍光標識を得るためのもう1つのアプローチを提供する。一本鎖および二本鎖核酸へのインターカレーターの結合の間の明瞭な区別を可能とする条件の開発は、かかるプローブの使用にとって必須の前提要件である。

蛍光プローブは、分子および細胞の分析および分離のための価値ある薬剤である。その適当なくつつかの特別の例は、蛍光、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分別、および蛍光顕微鏡法の技術による細胞の混合物中における細胞の亜集団(Subpopulation)からの

10

20

30

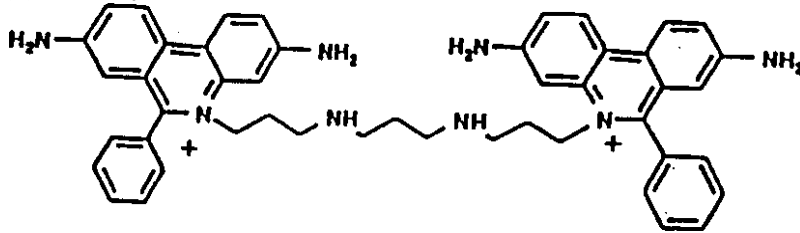
40

50

同定および分離である。他の適用は、第2の種に結合する特異的結合対の物質もしくはメンバー、または特異的結合対のメンバー、例えば、イムノ蛍光アッセイにおける抗原-抗体反応の濃度の測定を含む。さらにもう1つの適用は、蛍光染色の技術による、ゲルおよび他の不溶性支持体中における物質の位置決めである。

これらの目的用の蛍光物質の選択は、種々の障害によって妨げられている。その1つは蛍光物質の吸収および発光特性であるが、これは多くのリガンド、受容体および他の結合対メンバー、ならびに試料に随伴する関係のない混入物質、例えば、血液、尿および脳脊髄液が自己蛍光発光し、試料を適当な刺激剤に暴露した場合に蛍光標識によって生ずる蛍光シグナルの正確な測定または定量に干渉するからである。もう1つの考慮すべき点は、蛍光物質の量子効率である。さらにもう1つの考慮すべき点は自己クエンチングであり、これは、蛍光分子が相互に近接した場合に相互反応する時に起こり得る。更に考慮すべき点として、他の化合物とのまたはテスト容器との蛍光物質の非特異的結合がある。

dsDNAはビス-インターカレーターEthDとの高度に蛍光性の複合体を形成することが示されてきた。ビス-インターカレーターEthDに関する観察は、特有の特性を持つ高度に蛍光性で安定なdsDNA-染料複合体のファミリーを形成させるためにインターカレーターを利用できることを示唆している。かかる複合体はdsDNA断片の多重検出によって利用でき、また、異なる染料で非共有結合的に標識した適当に多様化したdsDNA断片を蛍光プローブのユニークなファミリーとして使用できる多くの分析用途に利用できる。



しかしながら、この化合物は、DNAに結合した場合に、自己クエンチングする傾向を有する。

フローサイトメトリー装置では、細胞または他の粒子を液体流動流にて流動させて、そのある特徴の調査を容易とする。一般に、フローサイトメトリー装置は、ある種の注目する細胞または粒子の存在を同定し、ある場合には、それらの細胞または粒子を計数し、また、それらの細胞または粒子のうち注目したものを収集できるように分別能を付与するのに有用である。典型的なフローサイトメトリー装置において、各細胞が検知領域を連続的にかつ一度に実質的に1個ずつ通過するような迅速移動液体流にて、細胞を含有する試料を装置に向かわせる。細胞容量は、各細胞が検知領域を通過するときの電気的インピーダンスの変化によって測定できる。同様に、もし入射光を検知領域に向けると、通過する細胞は、それを通過するときにかかる光を散乱する。この散乱光は、細胞の形状およびサイズ、屈折率、不透明度、粒度、粗さ等の関数として与えられる。さらに、入射光の励起エネルギーを通過した結果として励起された、標識細胞または自己蛍光性細胞によって発光する蛍光は、蛍光特性を有する細胞の同定用に検出可能である。フローサイトメトリー装置によって細胞分析を行った後、もし装置がかかる能力を持つものとして設計されていると、所望の特定を有するものとして同定された細胞を分別できる。

フローサイトメトリー装置のごとき器具は、免疫系の種々の応答、反応および機能を研究する研究者や実験者に特に有用である。免疫蛍光実験、ならびに蛍光イムノアッセイは、病気の状態、実態等が適切に特徴付けられるように、注目する選択細胞を同定し標的化する点において実験者を助する。免疫系の実験に加えて、蛍光分析は、細胞物質の基質の研究を含めた、細胞生物学および形態学的研究においてもかなり有益である。

細胞についてのデータおよび情報を得るために蛍光を用いる場合において、蛍光応答についてのテストを行うメカニズムは、得られる結果と同様器具の設計での主要な考慮事項である。特に、蛍光マーカーは、かかるマーカーが蛍光性の染色剤または染料であるかを問わず、典型的には光エネルギーによって励起される。通常、使用される蛍光発色マーカー

10

20

30

40

50

につき最大レベルの励起を生じる最適波長がある。一旦励起されると、蛍光発光は、典型的には、励起波長とは異なる波長で起こる。蛍光分析装置は、蛍光顕微鏡、イメージアナライザーまたはフローサイトメーターを問わず、一般に、蛍光シグナルが最強となる最大発光波長での蛍光発光を検出するように設計される。

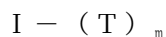
重要なインターカレーターとしてのエチジウムホモダイマーの用途の発見および公表の前においては、通常選択されるインターカレーターはエチジウムブロマイドであった。エチジウムブロマイドインターカレーターの使用は、蛍光法、アガロースゲル上におけるエチジウムブロマイドをインターカレートしたDNAの定量的蛍光、エチジウムブロマイド-アガロースプレートアッセイまたは偽DNA分析(false DNA analysis)の検出等を含む。エチジウムブロマイドおよびプロピジウムブロマイド(propidium bromide)は、さらにフ
ローサイトメトリ、ならびに直接電子イメージングのための適用、蛍光の直接的かつ迅速な定量およびエチジウムブロマイド-染色DNAとしての適用における電気泳動ゲルで用いられた。また、エチジウムブロマイドは、沈殿系の可視性を増大させるために、および関係している抗-DNA抗体または循環DNAの検出のための2段階カウンター免疫電気泳動における特異性を確認するためにも用いられてきた。種々の環境におけるインターカレーターとしてのエチジウムブロマイドの利用、ならびにエチジウムホモダイマーインターカレーターのより最近の利用は、文献によく記載されており、インターカレーター法および効率の最先端の情報を提供する。

エチジウムブロマイドの染色剤としてのいくぶん異なった適用において、エチジウムブロマイドは固体支持体に連結されてきた。1978年10月10日にChirikjianに発行された米国特許第4,119,521号は、活性化多糖の蛍光性DNAインターカレーティング剤の誘導体を開示している。該特許における誘導体は、短波長紫外光による励起で、DNAおよびその分画物が直接見えるようにするための蛍光染色剤として機能する。該特許で用いるインターカレーティング剤はエチジウムハライドであり、好ましい剤はエチジウムブロマイドである。この剤はアガロースのごとき活性化多糖と共有結合している。

種々の環境で用いるインターカレーターとしてのエチジウムブロマイドの利用、及びエチジウムホモダイマーインターカレーターのより最近の利用は文献によく記載されており、インターカレーター法および効率についての最先端の情報を提供する。しかしながら、現在、インターカレーターの利用およびDNAでのインターカレーターの活性を改良する要求、特に(1) DNA分子へのインターカレーターの結合のための高親和性；(2) 自己クエンチングの減少；および(3) 優れた輸送動態の提供に対する要求が依然として存在する。これらの特質を有するインターカレーターにより、前記方法に関係する多くの機能のうちの1つを実行するのに要求されるインターカレーターの量を減少し、これにより、方法はより有効なものとなる。加えて、注目する種々の使用の精度および信頼性の改良が継続する関心事である。

概要

広く、本発明は、1以上の「T」部分に結合した「I」部分を有する化合物を提供する。該化合物の一般式は：



[式中、該I部分は芳香族もしくはヘテロ芳香族セグメントを表し；該T部分は「テール」または「鎖」部分を表し；且つmは1ないし5の整数を表す]

によって表される。mが1を超える場合はTは相互に同一または異なり得る。

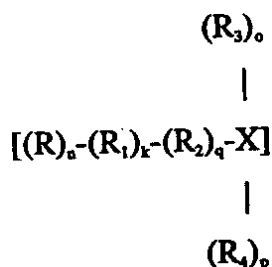
1の態様において、本発明は、1以上のT部分に結合したI部分を有する化合物を提供し、1より多いT部分が存在する場合、該T部分は相互に同一または異なり、該T部分は式：

10

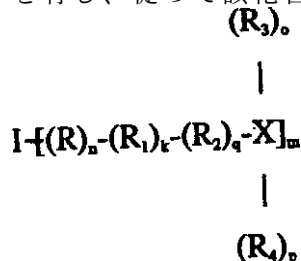
20

30

40



を有し、従って該化合物は式：



[式中、Iは芳香族またはヘテロ芳香族セグメント；

Xは、窒素および硫黄よりなる群から選択されるヘテロ原子；

R、R₁およびR₂は相互に同一または異なって、アルキル基、脂環式基、ヘテロ脂環式基、芳香族基またはヘテロ芳香族基；

R₃およびR₄はXが窒素である場合は水素；R₃およびR₄はXが硫黄である場合はメチル基、エチル基、またはフェニル基；

kはゼロまたは1ないし10の整数；

qはゼロまたは1ないし10の整数；

nは20ないし20の整数；

mは1ないし5の整数；

oはゼロまたは1；および

pはゼロまたは1；

但し、Xが窒素；R₃およびR₄が水素、R、R₁およびR₂がメチレン基；oが1；pが1；mが1；である場合、Iはフェナントリジウム(phenantridium)またはその酸付加塩ではなく；

Xが窒素；R₃およびR₄が水素；R、R₁およびR₂がメチレン基；oが1；pが1；mが2；第1のT部分がI部分に直接結合し、ここに、nは2、kは1であってqはゼロであり、第2のT部分が第1のT部分に直接結合し、ここに、nは2であってkおよびqはゼロである場合、I部分はフェナントリジウムまたはその酸付加塩ではなく；

Xが窒素；R₃およびR₄が水素；R、R₁およびR₂がメチレン基；oが1；pが1；mが2；第1のT部分が該I部分に直接結合し、ここに、nが2、kが1であってqがゼロであり、第2のT部分が第1のT部分に直接結合し、ここに、nが2、kが1であってqが1である場合は、I部分はフェナントリジウムまたはその酸付加塩ではなく；且つ

Xが窒素；R₃およびR₄が水素；oが1；pが1；mが3；nが2；kが1；qがゼロである場合はI部分はフェナントリジウムまたはその酸付加塩ではない]

を有する化合物またはその酸付加塩である。

本発明は、官能性化鎖を有するインターカレーター部分または置換されたインターカレーター部分よりなる化合物を提供し、その化合物は、DNA分子への結分につき高い親和性を提供し、優れた輸送動態を供しつつ自己クエンチングの減少を示す。本発明のインターカレーターは、フローサイトメトリー環境においてDNA分子と結合させたときに、同一のフローサイトメトリー環境において用いられるエチジウムホモダイマーよりも蛍光が約8ないし10倍明るくなるような、蛍光の増大を提供することが判明した。蛍光の増大のため、DNAハイブリダイゼーションの検出は、エチジウムホモダイマーまたはエチジウムブロマイドのごとき通常のインターカレーティング剤を用いるよりもかなり低濃度の本発明のインターカレーター化合物を用いて達成することができる。同一濃度を用いると、

10

20

30

40

50

本発明のインターカレーター化合物は、通常のインターカレーティング剤よりもかなり少量のDNAハイブリダイゼーションを検出することができる。かくして、本発明のインターカレーター化合物は、DNAハイブリダイゼーションの検出において、公知のインターカレーティング剤よりもはるかに高感度である。

フローサイトメトリー、蛍光in-situハイブリダイゼーションアッセイ、ゲル電気泳動、DNA検出、DNAについてのイムノアッセイ、および他のDNA実験における改良も大きなものである。DNAおよび多重方法でインターカレーターを使用すると、エチジウムホモダイマーが通常の染色方法、すなわち、エチジウムブロマイドを用いる方法よりも約2桁大きい明るさであることが示された。しかしながら、本発明のインターカレーター化合物は、例えば、同一環境においてEthDのそれよりも8ないし10倍増大した明るさ、あるいはより通常の染色方法よりも約1000倍の改良を示す染料である。プレ染色およびポスト電気泳動検出では、DNAのラジオイムノアッセイの感度レベルが今や蛍光体で達成可能である。本発明により提供される化合物は、検出限界をEthDを超えて10倍まで延ばし、それにより、DNA分析の研究、ならびに治療等のためのインターカレーターの適用における新しい用途の可能性を提供する。

図面の簡単な記載

図1は、側方散乱対前方散乱についてのFACScanTMである。

図2は、蛍光強度（横座標）対事象の頻度（縦座標）のヒストグラムである。

図3は、側方散乱（横座標のSSC）対蛍光強度（縦座標）についてのスキャターグラムである。

図4は、側方散乱対前方散乱についてのFACScanTMである。

図5は、蛍光強度（横座標）対事象の頻度（縦座標）のヒストグラムである。

図6は、側方散乱（横座標のSSC）対蛍光強度（縦座標）についてのスキャターグラムである。

図7は、酵素BamHでニック処理したpBR322プラスミドDNAについて行った、UV光照射アガロース電気泳動ゲルの写真である。

図8は、当量についてのハイブリダイゼーション飽和プロットである。

図9は、蛍光強度対当量についてのハイブリダイゼーション滴定曲線を示す。

図10Aは、溶解した白血球細胞(whitecells)の典型的分布のFACScanTM (SSC対FSC)である。

図10Bは、未染色ニワトリ赤血球核(「CEN」)を添加した図10Aと同一の血液試料のFACScanTMである。

図10Cは、白血球細胞希釈剤(「WBC DIL」)で溶解した同一試料のFACScanTMである。

図10Dは、図10Cに示したのと同じであるが、CENを含む試料のFACScanTMである。

図10Eは、図10Dと同一の希釈剤であるが、有核赤血球細胞(「NRBC」)染料の0.5 μg/mlを含む希釈剤に溶解させた同一試料のFACScanTMである。

図10Fは、図10Dと同一の希釈剤であるが、0.25 μg/mlのNRBC染料を含む希釈剤に溶解させた同一試料のFACScanTMである。

図11は、実施例6に記載したごとくに調製したフェナトリジニウム活性化ポリスチレン微粒子への³²P放射性同位体標識した制限酵素ニック処理プラスミドDNAの捕獲の効率のグラフである。

図12は、実施例6に記載したごとくに合成したフェナトリジニウム活性化カルボキシメチルセファロースビーズへの³²P放射性同位体標識プラスミドDNAの捕獲効率のグラフである。

図13A、13Bおよび13Cは、代表的なI部分の構造を示す。

図14は、化合物24およびその前駆体の合成の反応スキームである。

図15は、インターカレーター誘導体化固相微粒子の模式図である。

図16は、化合物25、26および27の構造式を示す。

10

20

30

40

50

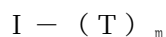
図 17 A、17 B および 17 C は、化合物 28 a - 42 a の合成の反応スキームを示す。
 図 18 は、化合物 50 およびその前駆体の合成の反応スキームを示す。
 図 19 は、化合物 55、55 a およびその前駆体の合成の反応スキームを示す。
 図 20 は、化合物 55 a - 55 p の構造式を示す。
 図 21 は、化合物 58、58 a およびその前駆体の合成の反応スキームを示す。
 図 22 は、化合物 58 a - 58 p の構造式を示す。
 図 23 は、化合物 64 およびその前駆体の合成の反応スキームである。
 図 24 は、化合物 68、68 a およびその前駆体の合成の反応スキームである。
 図 25 は、化合物 68 a - 68 p の構造式を示す。
 図 26 は、化合物 71、71 a およびその前駆体の合成の反応スキームである。
 図 27 は、化合物 71 a - 71 p の構造式を示す。
 図 28 は、化合物 80 およびその前駆体の合成の反応スキームである。
 図 29 は、化合物 85 およびその前駆体の合成の反応スキームである。
 図 30 は、化合物 90 およびその前駆体の合成の反応スキームである。
 図 31 は、化合物 24、エチジウムブロマイド、プロピジウムイオダイドおよびエチジウムホモダイマーによる DNA 染色で得られた相対的蛍光強度の比較である。
 図 32 は、化合物 24、25、26、27 およびエチジウムブロマイドによる DNA 染色から得られた相対的蛍光強度の比較である。

10

詳細な説明

広く、本発明は、1 以上の T 部分に結合した I 部分を有するインターカレーターを提供する。該化合物の一般式は：

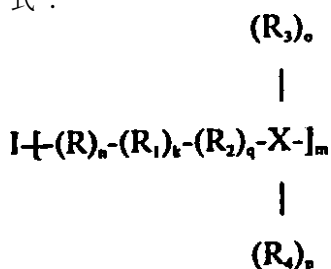
20



〔式中、I 部分は芳香族もしくはヘテロ芳香族セグメントを表し；T 部分は「テール」または「鎖」部分を表し；および m は 1 ないし 5、好ましくは 1 ないし 3 の整数を表す〕によって表される。

I 部分がモノー第四級アンモニウム官能基を含有する場合、一価対アニオン（「A⁻¹」）が同伴する。一価対アニオンの例は、クロライド、ブロマイド、イオダイド、ヒドロキシおよびハイドロジェンホスフェートを包含する。

式：



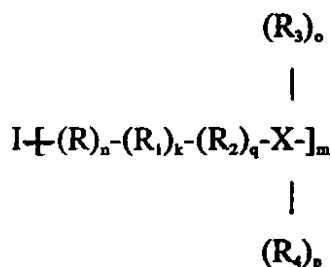
30

〔式中、I は芳香族またはヘテロ芳香族セグメント；X は窒素または硫黄；R、R₁ および R₂ はアルキル基、脂環式基、ヘテロ脂環式基、芳香族基またはヘテロ芳香族基；R₃ および R₄ は X が窒素である場合は水素であるか、あるいは X がリンまたは硫黄である場合はメチル基、エチル基またはフェニル基；k はゼロまたは 1 ないし 10 の整数；q はゼロまたは 1 ないし 10 の整数；m は 1 ないし 5 の整数；n は 2 ないし 20 の整数；o はゼロまたは 1；および p はゼロまたは 1 を意味する〕

40

を有する官能性化鎖形成化合物を持つインターカレーターセグメントを供することによって、特にエチジウムホモダイマーまたは他のビス-インターカレーターと比較した場合に、高い結合親和性、自己クエンチングの減少、および優れた輸送動態を示すインターカレーターおよび置換インターカレーターの DNA 分子への結合の改良が達成される。

ヘテロ原子および脂肪族、脂環式、シクロヘキシル、芳香族セグメントまたはその組合せを含有する鎖で官能性化したインターカレーターよりなる化合物は、式：

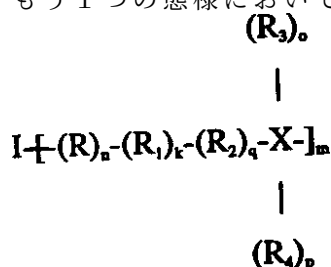


[式中、I はインターカレーターセグメント；X は、各々、ポリホスホニウムまたはポリスルホニウム部分を生じる主要な基元素のリンまたは硫黄；R、R₁およびR₂はアルキル基、脂環式基、ヘテロ脂環式基、芳香族基またはヘテロ芳香族基；R₃およびR₄はXがリンまたは硫黄である場合はメチル基、エチル基またはフェニル基であり；kはゼロまたは1ないし10の整数；qはゼロまたは1ないし10の整数；mは1ないし5の整数；nは2ないし20の整数；oはゼロまたは1；およびpはゼロまたは1；Xが硫黄である場合、oまたはpはゼロ；およびXがリンである場合、oおよびpは1を意味する]

10

を有する。

もう1つの態様において、一般構造式：



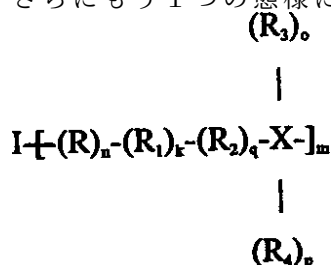
20

[式中、I は芳香族またはヘテロ芳香族セグメント；X は、窒素または硫黄；R、R₁およびR₂は同一または異なっており、1ないし4個の炭素のアルキル基、5ないし6個の炭素の脂環式基、3ないし5個の炭素および窒素、酸素または硫黄の1または2個のヘテロ原子のヘテロ脂環式基、ベンゼン、フェニルまたはナフチルの芳香族基、または1ないし5個の炭素および1ないし4個の窒素、酸素または硫黄のヘテロ原子のヘテロ芳香族基；R₃およびR₄はXが窒素である場合は水素であるか、またはXが硫黄である場合はメチル基、エチル基またはフェニル基；kはゼロまたは1ないし10の整数；qはゼロまたは1ないし10の整数；mは1ないし5の整数；nは2ないし20の整数；oはゼロまたは1；およびpはゼロまたは1を意味する]

30

を有する化合物が提供される。

さらにもう1つの態様において、式：



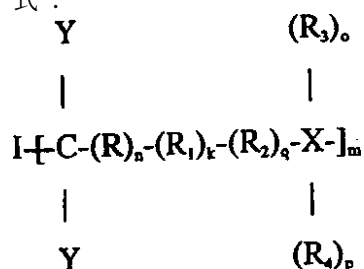
40

[式中、I は芳香族またはヘテロ芳香族セグメント；X はポリスルホニウム部分を生じる主要な基硫黄；R、R₁およびR₂は、同一でも異なってもよく、1ないし4個の炭素のアルキル基、5ないし6個の炭素の脂環式基、3ないし5個の炭素および1または2個の窒素、酸素または硫黄のヘテロ原子のヘテロ脂環式基、ベンゼン、フェニルもしくはナフチルの芳香族基または1ないし5個の炭素および1ないし4個の窒素、酸素または硫黄のヘテロ原子のヘテロ芳香族基；R₃およびR₄はXが窒素である場合は水素であるか、あるいはXが硫黄である場合はメチル基、エチル基またはフェニル基；kはゼロまたは1ないし10の整数；qはゼロまたは1ないし10の整数；mは1ないし5の整数；nは2ないし20の整数；oはゼロ；およびpはゼロを意味する]

50

を有する、ヘテロ原子および脂肪族、脂環式、シクロヘキシル、芳香族セグメントまたはそれらの組合せを含有する鎖で官能性化したインターカレーターよりなる化合物、

式：



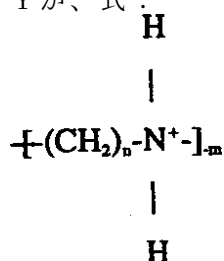
10

[式中、Yは脂肪族基、脂環式基、ヘテロ脂環式基、芳香族基またはヘテロ芳香族基またはそれらの組合せにおいて正に荷電したヘテロ原子または金属イオンを有する側鎖；Iは芳香族またはヘテロ芳香族セグメント；Xはヘテロ原子；R、R₁およびR₂はアルキル基、脂環式基、ヘテロ脂環式基、芳香族基またはヘテロ芳香族基；R₃およびR₄はXが窒素である場合は水素であるか、あるいはXがリンまたは硫黄である場合はメチル基、エチル基またはフェニル基；kはゼロまたは1ないし10の整数；qはゼロまたは1ないし10の整数；mは1ないし5の整数；nは2ないし20の整数；oはゼロまたは1；pはゼロまたは1；Xが硫黄である場合、oおよびpはゼロ；およびXがリンである場合、oおよびpは1を意味する]

を有する正に荷電した鎖で官能性化した芳香族またはヘテロ芳香族セグメントからなる化合物、

20

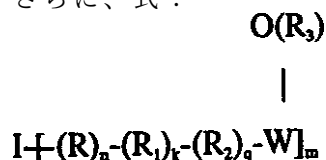
Yが、式：



を有する前記化合物、

30

さらに、式：

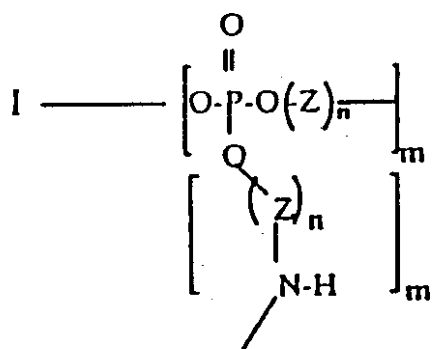


[式中、Wはアルミニウム、ホウ素またはルイス酸金属；Iはインターカレーターセグメント；R、R₁、R₂およびR₃はアルキル基、脂環式基、または芳香族基；kはゼロまたは1ないし10の整数；qはゼロまたは1ないし10の整数；mは1ないし5の整数；nは2ないし20の整数を意味する]

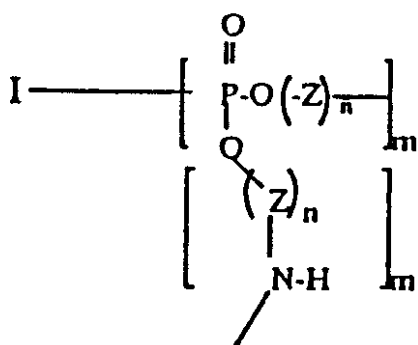
を有する金属原子およびアルキル、脂環式もしくは芳香族セグメントまたはそれらの組合せを含有する鎖で官能性化したインターカレーターからなる化合物、

40

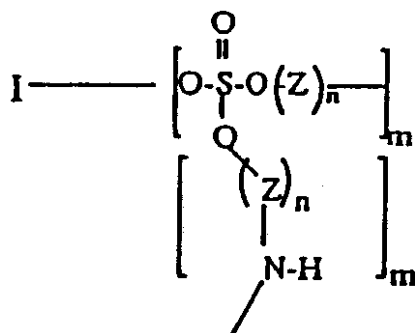
式：



または



または



[式中、Iは芳香族またはヘテロ芳香族セグメント；Pはリン原子；Sは硫黄原子；Zは脂肪族、脂環式または芳香族鎖またはそれらの組合せ；nは2ないし20、好ましくは、2または3；およびmは1ないし5、好ましくは3～10を意味する]を有する、主要鎖ポリホスフェート、ポリホスホネートまたはポリスルフェートのポリアミンエステル基を持つ脂肪族、脂環式、芳香族またはそれらの組合せに正の電荷が存在する正の電荷を有する鎖で官能性化したインターカレーター組成物が提供される。

広く、本発明は、官能性化鎖で誘導体化した、インターカレーター部分または置換インターカレーター部分からなる化合物に関するもので、該化合物はDNA分子への結合に対して高親和性を有する。1の態様において、本発明は、DNA分子へのインターカレーター挿入を要する公知の方法内で、DNA分子への結合の改良を示すこれらのインターカレーター化合物の使用に関する。さらに、本発明は、当該化合物の増大した利用効率によるインターカレーターの改良された効率を持つ、標識、捕獲、治療的挿入、アッセイ等で利用されるインターカレーター官能性化セグメントによるDNA分子の改良された結合に関する。特にエチジウムホモダイマーまたは他のビスインターカレーターと比較した場合、結合に対する高親和性、減少した自己クエンチング、および優れた輸送動態を示す、インターカレーターおよび置換インターカレーターのDNA分子への改良された結合が達成される。フェナントリジニウム

当該化合物の合成および該化合物の利用を含めた本発明の種々の具体例は、図1～9、10A～10F、11～30に示す。これらの図に示される情報は、特にエチジウムホモダイマーまたは他のビスインターカレーターと比較した場合、結合に対する高親和性、減少した自己クエンチング、および優れた輸送動態を明瞭に示す。

図1は、NRBC染料フェナトリジニウム(phenathridinium)トリアミン(PTA) 24 およびCENを含むWBC DIL希釈剤で溶解させた白血球細胞の典型的な分布につき側方散乱対前方散乱(横座標上のSSCおよび縦座標上のFSC)上のFACScanTMである。象限閾値はSSC対FSCドットプロット上で選別した(gated)リンパ球を排除するように設定した。

図2は、フェナトリジニウムトリアミン(PTA) 24の存在下における、染色したおよび未染色の細胞の集団についての蛍光強度(横座標)対事象の頻度(縦座標)のヒストグラムである。

図3は、蛍光強度による、PTA 24で染色した細胞(左上方隅、NW象限)の未染色細胞(残り)からの分離を示す、側方散乱(横座標のSSC)対蛍光強度(縦座標)についてのスキャターグラムである。

図4は、NRBC染料エチジウムホモダイマーおよびCENを含むWBC DIL希釈剤で溶解した白血球細胞の典型的な分布につき側方対前方散乱(横座標のSSCおよび縦座標のFSC)についてのFACScanTMである。象限閾値は、SSC対FSCドットプロット上で選別したリンパ球を排除するように設定した。

図5は、エチジウムホモダイマーの存在下における染色および未染色細胞の集団についての、蛍光強度(横座標)対事象の頻度(縦座標)のヒストグラムである。

図6は、蛍光強度による、エチジウムホモダイマー(上方左側隅、NW象限)で染色した細胞の、非染色細胞(残り)からの分離を示す、側方散乱(横座標上のSSC)対蛍光強度(縦座標)についてのスキャターグラムである。

図7は、BAMHニック処理したPBR322プラスミドDNAについて行った紫外線照射アガロース電気泳動ゲルの写真である。ストック溶液5 μ lをレーン3～14に負荷した。以下のDNAおよびインターカレーターのストック溶液をレーン1～14に負荷した。レーン1: マーカー; レーン2: ブランク; レーン3: エチジウムブロマイドで染色した20 ng/ml プラスミド; レーン5: エチジウムブロマイドで染色した160 pg/ml プラスミド; レーン6: エチジウムブロマイドで染色した40 pg/ml プラスミド; レーン7: エチジウムホモダイマーで染色した20 ng/ml プラスミド; レーン8: エチジウムホモダイマーで染色した800 pg/ml プラスミド; レーン9: エチジウムホモダイマーで染色した160 pg/ml プラスミド; レーン10: エチジウムホモダイマーで染色した40 pg/ml プラスミド; レーン11: PTA 24で染色した20 ng/ml プラスミド; レーン12: PTA 24で染色した800 pg/ml プラスミド; レーン13: PTA 24で染色した160 pg/ml プラスミド; レーン14: PTA 24で染色した40 pg/ml プラスミド。すべての場合において、染料/塩基対の比は1/20であった。すべての場合において、染料をDNAと共にプレインキュベートし、ポストゲル電気泳動染色は行わなかった。

図8は、1:4の染料塩基対比にてエチジウムホモダイマーおよびPTA 24につきDNA 6.6 マイクロモルおよび染料3.08 マイクロモルにおいて、d(pA)9に添加したd(pT)9の当量についてのハイブリダイゼーション飽和プロットである。エチジウムホモダイマーおよびPTA 24を比較するために実施例2に記載したプロトコルを用いることによって得られた、d(pA)9に添加された横座標の相補的オリゴヌクレオチドd(pT)9の当量対縦座標の相対的蛍光強度のグラフである。双方の場合における蛍光体の濃度は、エチジウムホモダイマー1モル当たりフェナントリジニウム部分2.0モル当量についての2倍統計的補正を用いて、3.08 マイクロモルであった。両曲線を相対的蛍光についてのバックグラウンドに対して標準化した。励起はこの実験では488 nm (534 nmが励起最大)におけるものであり、発光は625 nmにおけるものであった。

10

20

30

40

50

図9は、6.6マイクロモルのDNAならびに3.08マイクロモルのエチジウムブロマイドおよびPTA 24における、蛍光強度対d (pA) 9に添加されたd (pT) 9の当量についてのハイブリダイゼーション滴定曲線を示す。相補的オリゴヌクレオチドd (pT) 9の当量 (横座標) 対相対的蛍光強度 (縦座標) のグラフは、エチジウムブロマイドおよびPTA 24を比較するために実施例2に記載されたプロトコルを用いることによって得られた。双方の場合における蛍光体の濃度は3.08マイクロモルであった。両曲線はバックグラウンドに対して標準化した。励起は488nm (534nmが最大励起) におけるものであり、発光は625nmにおけるものであって、強度は日立F-3010フルオロメーターを用いて測定した。

図10Aは、NRBC染料またはCENを含まないCD4000 WBC DILで溶解した白血球細胞の典型的な分布のFACScan™ (SSC対FSC) である。象限閾値は、SSC対FSCドットプロット上で選別したリンパ球を排除するように設定した。

図10Bは、未染色CENを添加した図10Aにおけるの同一の血液試料のFACScan™である。分かるごとく、未染色CENはいくらかのFRL3自己蛍光を示す。領域1は、テスト試料中の染色細胞が領域2で計数されるように、この未染色試料におけるすべてのFL3+事象を含むよう設定した。領域3は、集団の平均FL3を測定するだけのためにCEN集団を含めるよう設定した。

図10Cは、1.0μg/mlのNRBC染料を含有するWBC DILで溶解した同一試料のFACScan™である。FL2+事象の1.3%は選別したリンパ球からμLにて検出され、FL3+事象の1.08%は非選別合計白血球集団から検出された。

図10Dは、図10Cで示したとの同一であるがCENを含む試料のFACScan™である。非選別集団のFL3ヒストグラムの領域2は、3319.8の平均FL3を有する染色されたCEN集団を示す。

図10Eは、図10Dと同一の希釈剤であるが、0.5μg/mlのNRBC染料を含む希釈剤中で溶解した同一試料のFACScan™である。

図10Fは、図10Dと同一の希釈剤であるが、0.25μg/mlのNRBC染料を含む希釈剤中で溶解された同一試料のFACScan™である。分かるごとく、染色されたCENは白血球から依然十分に分離されている。

図11は、実施例6に記載したごとく合成したフォナントリジニウム活性化ポリスチレン微粒子への³²P放射性同位体標識プラスミドDNAの捕獲の効率のグラフ表示である。A : 合計DNA濃度を有する溶液中における初期放射能カウント ; B : 実施例6に記載したようにして遠心によりDNAを除去した後に溶液中に残存する放射能カウント ; C : NaOHによって放出が開始される前におけるフェナントリジン (phenthridine) 部位によって微粒子に結合したDNAについての初期放射能カウント ; D : NaOHでのDNAの除去後に固体上に残存する放射能カウント。

図12は、実施例6に記載したごとく合成されたフェナントリジニウム活性化カルボキシメチルセファロースビーズへの³²P放射性同位体標識プラスミドDNA捕獲の効率のグラフである。A : 合計DNA濃度を有する溶液中における初期放射能カウント ; B : 実施例6に記載したようにして遠心によりDNAを除去した後に溶液中に残存する放射能カウント ; C : NaOHによって放出が開始される前におけるフェナントリジン部位によって微粒子に結合したDNAについての初期放射能カウント ; D : NaOHでのDNAの除去後に固体上に残存する放射能カウント。

本発明のインターカレーター化合物は、多官能性 (ビス) インターカレーターに対し、実質的にモノインターカレーターである。本発明によるモノインターカレーターは、種々の「鎖またはテール」(T) [ここに、TはR、R₁、R₂、R₃、R₄、W、X、YおよびZよりなり、前記した式において括弧で囲った鎖である] と組み合わせられ、かつそれで官能性化された多重インターカレーターまたは置換インターカレーターを用いる用途に最も適し、これは、DNAおよびRNAへの高結合ならびに自己クエンチングの欠如および優れた輸送動態を提供する。代表的な「I」部分は図13に示す。

さらに、本発明はさらに実施例によって説明するが、これは図面の根拠を提供し、また、

10

20

30

40

50

例示的なものであって、限定的なものではない。

実施例 1

フェナントリジニウムトリアミン (PTA) 24 および 前駆体中間体 20~23 の合成
PTA 24、すなわち本発明の化合物は、図 14 に模式的に示す手順により合成した。生成物 24 を得るのに用いた実験手法を説明する。

中間体 21 出発中間体 20、3, 8 ジアミノ 6-フェニルフェナントリジン (25.0 g、0.0876 g モル) はアルドリッチ・ケミカル・カンパニー (Aldrich Chemical Company) (Milwaukee, WI) から入手し、アルゴン下、磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 3.0 リットルの一首丸底フラスコに添加した。この容器に、乾燥ピリジン 1.0 リットルを攪拌しつつ添加した。得られた懸濁液の攪拌は、すべての固体が溶解するまで 10 15 分間継続した。触媒量の N, N-ジメチルアミノピリジン (1.07 g、0.0086 モル) を攪拌しつつこの溶液に添加した。次いで、無水酢酸 (462 g、4.9 モル) を添加し、得られた反応混合物を 8~12 時間還流した。次いで、反応混合物を冷却し、溶媒を真空中で除去した。生成物 11 の精製には、2.0 リットルの 45/40/10/5 酢酸エチル/ヘキサン/ CH_2Cl_2 / CH_3OH 、続いて 1.0 リットルの 40/40/10/10 EtOAc/ヘキサン/ CH_2Cl_2 / CH_3OH を用いて、シリカゲルカラム勾配溶離を行った。10.0 ml ずつの画分を収集し、適当な画分を再度合し、真空中で溶媒を除去した。次いで、粘性ガム様残渣を熱 EtOH (220 ml) に溶解し、0℃に冷却することによって沈殿させた。母液をデカンテーションし、200 ml の新鮮な EtOH 200 ml を添加した。加熱することによって固体を再溶解し、-4℃で 48 時間結 20 晶化させた。結晶を母液と第 2 の再結晶の両方から収集し、少量の冷 EtOH で洗浄し、高真空中で数時間乾燥した。カラムクロマトグラフィーおよび 2 回の再結晶後の純粋生成物の単離した収率は 32% であった。 ^1NMR CD_3OD (300 MHz) 9.1 (d, 1H, 8.82 Hz)、9.0 (d, 1H, 8.75 Hz)、8.08 (s, 1H)、7.95 (s, 1H)、7.92 (d, 1H, 4.5 Hz)、7.8 (m, 3H)、7.65 (m, 3H)、2.45 (s, 6H)、2.35 (s, 6H); ^{13}NMR CD_3OD (75.45 MHz) 174.5、163.7、145.3、142.1、140.6、139.9、134.4、133.8、130.8、130.6、129.8、127.3、125.9、125.6、124.8、27.1、正確な分子量 (exact mass) $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ として、計算値 453.1688、正確な分子量、実測値: 453.168 30 3; CH 分析 $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ として計算値 C: 71.51 H: 5.11 N: 9.27 実測値 C: 71.77 H: 5.10 N: 9.20

中間体 22 中間体 22 は 3, 8 ジアミノ 6-フェニルフェナントリジンのジアミドの第四級化についての文献の方法 (Gaugain et al., *Biochemistry*, Vol.17, No.24, 1978, pp5071-5078) の変法により、ジアミド 21 から合成した。ジアミド 21 (10.5 g、0.023 モル) を、アルゴン下、磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 2.0 リットルの丸底フラスコに入れた。1, 3 ジブロモプロパン (1.0 リットル、9.86 モル) をこのフラスコに添加し、得られた混合物を 7 時間還流した。溶液を一晩冷却し、沈殿を濾過し、ジエチルエーテルで洗浄した。10.44 g (68.7%) の粗製物質 22 が得られた。この物質を CH_3OH から再結晶して 5.3 g のジアセチルブロマイド 22 が得られた。 ^1H NMR CD_3OD (300 MHz) デルタ 10.75 (s, 1H)、10.45 (s, 1H)、9.3 (s, 1H)、9.09 (d, 9.2 Hz, 1H)、9.04 (d, 9.2 Hz, 1H)、8.45 (d, 9.1 Hz, 2.2 Hz, 1H)、8.12 (s, 1H)、8.07 (d, 9.0 Hz, 1H)、7.95 (m, 3H)、7.85 (m, 3H)、5.0 (t, 9.0 Hz, 3H)、3.6 (t, 6.0 Hz, 2H)、2.65、2.38、7.75 ^{13}C $\text{NMR}_{26}\text{DMSO}$ [????] (75.45 MHz) デルタ 169.9、169.3、163.8、142.1、139.9、134.2、131.5、130.5、129.5、128.4、125.9、125.4、123.6、122.3、121.6、119.0、107.7、55.7、30.7、24.5、24.2; 正確な質量、計算値 $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2\text{Br}_2$ 遊離塩として (FAB+) 4 50

90. 1131 実測値490. 1139 ; CH分析計算値 $C_{26}H_{29}N_3O_2Br_2$ として
H : 4. 41 C : 54. 66 N : 7. 36 実測値H : 4. 25 C : 54. 65
N : 7. 30。

中間体23 中間体22 (5. 3 g、0. 0093モル) を磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した250ml丸底フラスコに添加した。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (150ml) をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつジエチレントリアミン (29. 2 g、0. 283モル) を添加した。得られた透明溶液を窒素下で一晩加熱還流した。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注いだ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮した。さらに水50~70mlを添加し、溶液を0℃まで冷却した。次いで、固体を濾過し、氷冷水で洗浄した。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させた。懸濁液の濾過の後、得られた固体を、熱エタノールから15分間で0℃まで冷却して再結晶した。また、第2濾液から放置によりまた、第1濾液からEtOHで沈殿させることによって、第2の結晶を収集した。次いで、これらの固体を合し、一晩の高真空後に最終生成物23 (2. 5 g) を得た。¹H NMR CD_3OD (300MHz) デルタ9. 2 (s, 1H)、9. 05 (d, 1H)、8. 95 (d, 1H)、8. 4 (ブロードs, 2H)、8. 3 (ブロードs, 1H)、7. 9 (ブロードm, 3H)、7. 7 (ブロードm, 2H)、5. 1 (ブロードm, 1H)、3. 9 (ブロードs, 3H)、3. 45 (ブロードm, 2H)、3. 85 (ブロードm, 2H)、2. 5 (ブロードm, 3H)、2. 3 (ブロードm, 3H) ; MS、計算値 遊離塩 $C_{30}H_{37}N_6O_2$ として (FAB+) 513 実測値 : 513。

生成物24 フェナントリジニウムトリアミン、PTA24の合成および精製は以下のプロトコルによって行った。トリアミン23 (2. 35 g、0. 0036モル) をメタノール75. 0mlに溶解し、4N HCl 75mlを添加した。混合物を2時間還流し、冷却した。エタノールをこの溶液に添加し、得られた沈殿を濾過し、最小量の冷エタノールで洗浄した。濾液を再度濃縮し、新鮮なエタノールおよび濃塩酸を添加した。この得られた沈殿も濾過した。次に、この濾液を乾固近くまで濃縮し、Et₂Oを添加し、固体を濾別した。次いで、最後に残存する濾過不能な残渣を濃塩酸に溶解し、EtOHで沈殿させた。この物質を濾過し、エタノールで洗浄し、前記手順からのすべての固体物質を合し、この物質を一晩高真空に付して合計2. 03 gの高親和性蛍光DNA染料PTA24を得た。¹H NMR d_6 -DMSO (300MHz)、デルタ10. 0 (ブロードs, 2H)、9. 65 (ブロードs, 2H)、8. 68 (d, 14. 2Hz, 2H)、8. 35 (ブロードs, 2H)、7. 75 (m, 4H)、7. 65 (s, 1H)、7. 55 (d, 9. 2Hz, 2H)、7. 35 (d, 9. 2Hz, 2H)、6. 28 (s, 1H)、4. 5 (ブロードs, 2H)、4. 0 (ブロードs, 8H)、3. 4 (ブロードs, 2H)、3. 0 (ブロードs, 2H)、2. 3 (ブロードm, 2H) ; ¹³C NMR d_6 -DMSO (75. 45MHz) δ 159. 7、151. 1、134. 6、131. 7、130. 9、129. 4、128. 8、128. 4、124. 9、122. 9、120. 1、117. 4、99. 6、51. 4、43. 8、42. 5、40. 3、34. 9、18. 5 ; 高分解能マスペクトル $C_{26}H_{33}N_6$ (FAB+) として 計算値429. 2767、実測値 : 429. 2766 ; CH分析 $C_{26}H_{37}N_6Cl_4 \cdot 3H_2O$ として 計算値H : 6. 89 C : 49. 61 N : 13. 35 実測値H : 6. 16 ; C : 49. 74 ; N : 13. 08

実施例2

ハイブリダイゼーションアッセイ

PTA24を用いて、標的オリゴヌクレオチドをその相補的パートナーで滴定する場合のハイブリダイゼーションを定量した。以下のプロトコルによる、このハイブリダイゼーションの検出についての、エチジウムブロマイド染色対PTA24の比較は図9に見い出すことができ、以下のプロトコルによる、エチジウムホモダイマー対PTA24の比較は図8に見い出すことができる。DNAの相補鎖 (オリゴデオキシチミジル酸、d (pT) , およびオリゴデオキシアデニル酸 (d (pA)) はシグマ・ケミカル・カンパニー (Sig

10

20

30

40

50

ma Chemical Co.) (St. Louis, MO)から入手した。d (pA) 9のストック溶液は0.05 M トリス、0.2 N NaCl、1 mM EDTA、pH 8.4で5ユニット/mlにて作成した。ポリAについては、 $\epsilon = 8.4 \text{ AU} / \text{mM} \cdot \text{cm}$ または $8400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ；従って、d (pA) 9についての9塩基対では、 ϵ は75,600 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。次いで、このストック溶液を10倍希釈して、 $6.61 \times 10^{-6} \text{ M}$ または $6.6 \mu\text{M}$ のストックを得た。d (pT)。ストックを25ユニット/5.0 mlにて作成し、同一緩衝液中でさらに希釈することなく滴定で用いた。ポリTについての ϵ は1塩基対につき $8.15 \text{ AU} / \text{mM} \cdot \text{cm}$ もしくは $8,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であるか、あるいはオリゴ当たり73,350 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であるので、オリゴストックの濃度はDNA分子中 $68 \mu\text{M}$ であった。0.5 mlのマイクロセルを装備した日立F-4010蛍光光度計を用いて滴定を行って、十分に補正されたスペクトルならびに488~550 nm (534あたりが最適)の励起波長および600~650 nm (625あたりが最適)の発光波長が得られた。以下の増分にて、当量のd (pT)を添加した：0.02、0.05、0.080、0.150、0.300、0.500、0.700、1.00、2.00、5.00当量。滴定曲線における各試料は、最初のd (pA) 9ストックを $10 \times 1.0 \text{ ml}$ アリコートに分けることによって個々に調製した。次いで、相補物の添加は、d (pT) 9ストックの適量 (各々、2、5、8、15、30、50、70、100、200および500 μl)を10アリコートのシリーズの各々にマイクロピペットで加えることによって達成した。2種の相補鎖の暫時増大するモル比を有する各アリコートを室温にて15分間インキュベートし、0.05 M トリス、0.2 N NaCl、1 mM EDTA、pH 8.4緩衝液中の染料の $154 \mu\text{M}$ 溶液の20.0 μl アリコートとして染料を添加した。これは、相補的オリゴでの飽和状態における1/20の染料/DNA b. p. 比に対応する。同一ストック溶液から種々の増分の添加を用いるため、染料およびオリゴの総濃度は飽和プロットにおいて変化する。さらに15分のインキュベーションの後、次いで、相対的蛍光強度を625 nmで読み、記録して、標準曲線を得たが、これは、これらの条件下でのdsDNAハイブリダイゼーションまたは標的配列の量に直接比例している。次いで、バックグラウンド蛍光、または最初の残存蛍光を、同一グラフ上の種々の滴定曲線の比較のためすべての曲線について定数として差し引いた。

実施例 3

ゲル電気泳動適用

アガロースゲルを泳動させて、エチジウムブロマイド (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI)、エチジウムホモダイマー-1 (Molecular Probes, Cat. # E 1169, Eugene, Oregon)、およびPTA 24染色剤の染色強度を比較した。7 mlのストック中2.1 mgのプラスミドpBR322を、 $10 \times \text{React} 2$ 緩衝液2 mlを含むBAMH制限酵素1 mlと共に 37°C で1時間インキュベートし、10 mlの水で合計20 mlまで希釈した。次いで、この混合物を用いて、各バイアルにつき6 ml当たり0.63 mgにて、ニック処理したpBR322プラスミドの3ストックを調製した。これらのストックの各々をさらに水および20%グリセロールで希釈して、全12ストックの各々につき、DNA塩基対に対する染料の比を1:4とし、20 ng/ml、800 pg/ml、160 pg/mlおよび40 pg/mlの最終DNAストックとした。各ストックの5 mlアリコートをアガロースゲルの12の別々のレーンに負荷し、0.01 mM EDTA緩衝液を含む4 mM トリス、pH 8.2にて電気泳動を30分間行った。次いで、該ゲルを取り出し、通常のゲルボックス中、紫外光に暴露して写真を取った。

実施例 4

インターカレーター活性化カルボキシメチルスチレン微粒子捕獲試薬の合成についてのプロトコル

インターカレーター誘導体化固相微粒子 (MP) 捕獲試薬の合成は、以下に記載したスキームにより達成され、以下の方法によって行った：

0.275 $\pm \mu\text{m}$ 微粒子 (Seradyne, Indianapolis, IN) の45アリコートを4 mlバイアルに入れ、Bio-Rex 501-Dイオン交換混合ベッド樹脂 (Bio-Rad, Richmond, CA) を用い

10

20

30

40

50

て、界面活性剤を交換した。2時間穏かに振盪した後、減圧捕集チャンバーを装備した粗フリットガラス漏斗を用いることによって樹脂を混合物から濾過して取り出した。試料を10重量%固形物のMP濃度まで希釈した。反応性カルボン酸の合計当量を販売業者の滴定仕様から計算した。

スルホN-ヒドロキシスクシンイミド (Pierce, Rockford, IL) のストック溶液は水中11mg/ml (20mM) にて作成し、EDAC (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) のストック溶液は水中10mg/ml (5mM) にて作成した。5当量のEDAC (290μlストック)、続いて5.0当量のスルホN-ヒドロキシスクシンイミド (330μl) をカルボキシ微粒子反応混合物に添加した。この混合物を室温で2時間インキュベートし、次いで、2.0モル当量のPTA 24 (4mg) を、pH 8.0 0.1N NaCl 0.1N ピリン酸緩衝液中8mg/400μl、即ち2.0mg/100μlの濃度にて添加した。N-ヒドロキシスクシンイミド (Pierce) は、もしそれをDMF (ジメチルホルムアミド) にまず溶解するのであれば、スルホN-ヒドロキシスクシンイミドの代わりに置き換えることができ、前記したごとくにアリコートできる。24時間で反応を完結させた後、次いで、溶液が清澄化し、もはや染料が試料から抽出されなくなるまで、遠心、母液の除去、および再懸濁の何回かの試行によって遊離染料を除去した。次いで、精製した捕獲試薬を水中2~4%固形物のストックまで希釈した。

本実施例の一般的模式的表示は図15に示す。

実施例 5

固相DNA捕獲

CM (カルボキシ修飾) Sepharoseは、エタノール/水の混合液中にて、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から入手した。溶液は、長時間放置した際に固体および液体部分によって占められる合計容量に基づいて固体50%と見積もられた。次いで、この懸濁液を均一に混合し、固体10%に希釈した。このストック200μlを取り出し、0.12meq/グラムと計算され、これは酸が全体で0.012meqであった。EDACおよびN-ヒドロキシスクシンイミドのストックを調製し、5.0当量の各活性化試薬をこの懸濁液に添加した。この調製には、13.2mg (1.32ml中) HOSucおよび11.25mg EDAC (1.02ml中) ならびに合計8.0mgのPTA 24インターカレーターを用いた。2~24時間のインキュベーションの後、次いで、もはや希釈に際して固体から着色物が取り出されなくなるまで、反復して洗浄および穏かな遠心工程を行うことによって該懸濁液を清浄化させた。水中固体10%にてストックを調製した。PTA 24修飾および非修飾固相と共に対照を泳動させ、非誘導体化物質に関しては起こったDNAの非特異的捕獲は最小限であったことに注意されたい。

実施例 6

インターカレーター修飾固相によるDNA捕獲についてのプロトコル

1. 50μlの活性化微粒子を1.5mlのエッペンドルフに入れる。
2. 150μlのPBSおよび³²Pで末端標識した1~20uの5.0kb線状化プラスミドを添加する。別法として、1~50μlの生物学的試料またはもう1つの精製したDNAを添加する。
3. 室温で1時間回転することによって混合する。
4. 5000rpmで5分間遠心することによって微粒子をペレット化する。
5. 200μlのPBSで1回または2回洗浄する。
6. 50μlの0.5M NaOHを添加し室温で15分間混合することによってDNAを放出させる。
7. 遠心し、上清を収集する。この上清は放出されたDNAを含有している。

DNA捕獲の効率は、前記したプロトコルにおける³²P放射性同位体標識プラスミドDNAを用いて測定した。結果は、実施例4で調製したインターカレーター修飾ポリスチレン微粒子を用いている図11、および実施例5で調製したインターカレーター修飾CM Sepharoseビーズを用いている図12で見い出される。データは、インターカレーター修飾固相へのDNA結合は特異的であって、インターカレーター 24の固相への共有結合によっ

て誘導されたことを示す。

実施例 7

ニワトリ赤血球核 (CEN) のフローサイトメトリー実験におけるエチジウムホモダイマーおよびフェナントリジニウムトリアミン 24 の相対的染色強度

プロトコル: NRBC 染料を含まないもの、及び $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で NRBC 染料を含むものであって 40°C で予備加温した WBC DIL 1.0 ml に、2 つのインーハウス (in-house) ドナーからの全血試料 $50 \mu\text{l}$ および $3 \mu\text{l}$ の CEN 懸濁液を添加し、混合し、FACSscanTM に導入し、20 " の読みを得た。ニワトリ赤血球核 (CEN) を用いて、FL3 染色の明るさを測定した (CEN の平均 FL3)。用いた全血試料は約 4 ~ 5 時間経過のものであった。この実験についてのデータは図 1 ~ 6 に示す。

10

実施例 8

エチジウムホモダイマーに対するフェナントリジニウムトリアミン 24 染料濃度を減少させたときの性能の比較

エチジウムホモダイマーに対する PTA 24 染料の濃度の減少の効果 (図 10 A - F) は以下のごとくに測定した:

方法: 染料の濃度と、FL1 対 FL2 ドットプロット上での UL 象限における FL2 + 事象のパーセントとの間の相関を示すように、実験を設計した。用いた WBC DIL は、1 リットル当たり、0.5 % 重量/容量の塩化アンモニウム、0.075 % 容量のホルムアルデヒド、0.01 % 重量/容量のサポニン、0.01 % 重量/容量の重炭酸カリウム、および pH 約 6.0 であって約 270 mOsm の重量オスモル濃度である 20 mM 酢酸緩衝液を含有するものであった。NRBC 染料を含まないもの及び種々の濃度 (0.25、0.50、0.75 および $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$) の NRBC 染料を含む 40°C で予備加温した WBC DIL 1.0 ml に、2 つのインーハウスのドナー各々からの全血試料 $50 \mu\text{l}$ を添加し、混合し、FACSscanTM に導入し、20 " の読みを得た。ニワトリ赤血球核 (CEN) 懸濁液を用いて、FL3 染色の明るさ (CEN の平均 FL3) を測定した。本実験で用いた全血試料は約 6 時間経過のものであった。

20

CEN DNA は PTA 24 無くしてバックグラウンドから実質的に区別できず (図 10 B)、染料濃度はエチジウムホモダイマーのその 75 % まで減少させることができ (図 5)、バックグラウンドからの許容できる分離をなお維持する (図 10 F) ことが観察された。かかる減少は、非特異的結合の有意な減少および染料使用における実質的節約に導くことができる。

30

実施例 9

Coulter EliteTM フローサイトメーターにおける染料に対する生存性

細胞単離プロトコル: フィコール単離した細胞の各試験管を以下のごとくに処理した: 0.1 % アジ化ナトリウムおよび 1.0 % アルブミンを含む PBS (Sigma catalogue #1000-3)、比重 1.119 のフィコール (Sigma Histopaque catalogue #1119-1)。

10 ml の全血 (EDTA 抗凝固剤) を 10 ml の PBSW で希釈した。4 つの 15 ml 円錐底試験管中にて、希釈血液 5 ml をフィコール 5 ml に載置した。該試験管を $400 \times G$ で 30 分間回転させた。リンパ球、単球、顆粒球および血小板を含有する界面層を吸引し、試験管を $300 \times G$ で 6 分間遠心することによって 5 ml PBS 中で 1 回洗浄した。細胞ペレットを PBS に再懸濁し、細胞を計数し、1 ml 当たり 8.5×10^6 細胞に調整した。

40

細胞染色プロトコル:

染料溶液:

PTA 24 を 0.1 % アジ化ナトリウムを含む PBS に溶解することによって作成した PTA 24-ストック溶液 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$

プロピジウムイオダイド (propidium iodide) (P. I.) を 0.1 % アジ化ナトリウムを含む PBS に溶解することによって作成した P. I.-ストック溶液 $0.5 \text{ mg}/\text{ml}$

P. I. 染色:

$12 \times 75 \text{ mm}$ 試験管において、 $117.6 \mu\text{l}$ の細胞を $14.7 \mu\text{l}$ の P. I. ストック

50

ク染料溶液と穏やかに混合した。20秒間後、該試験管をCoulter Elite™フローサイトメーターに取り付け、データを収集した。

Sakaiらによる「Discrimination of Viable and Non-Viable Cells Using Prodidium Iodide in Two Color Immunofluorescence」(Cytometry, Vol.8, 1987, pp.413-420)からの方法を用いた。

P T A 2 4 染色：

12×75mm試験管中、23.5μl細胞をP T A 2 4ストック染料溶液76μlと穏やかに混合した。20秒後、該試験管をCoulter Elite™フローサイトメーターに取り付け、データを収集した。

トリパンブルー (Trypan Blue) 染色：

12×75mm試験管中、トリパンブルーの作用溶液5μlおよび細胞5μlを穏やかに混合し、標準的な白色光照明を用いてメハサイトメーター (mehacytometer) で細胞を計数した。最小500細胞を染色から3分間以内に計数した。

Mishell and ShiigiによるSelected Methods Immunology, 1980, pp.16~17からの方法を用いた。

フローサイトメータープロトコル：Elite™フローサイトメーター (CoulterElectronics, Inc.) で分析した細胞

488nmにての出力15mWのアルゴンレーザーで試料を励起した。データは、赤血球細胞、血小板および夾雑物を排除するサイズおよび粒度をベースとして、選別した。未染色細胞を対照として用いて、選別した分布の直線染料蛍光 (linear dye fluorescence) を分析した。陽性事象 (死滅した細胞) のパーセントおよび死滅した細胞分布の平均蛍光を記録した。

表 1

Coulter Elite™サイトメーターにおける染料に対する生存性

時 間	試 料	% 陽 性 (死 滅 細 胞)
5 時 間	P . I .	2 . 5
	P T A	2 . 2
	ト リ パ ン ブ ル ー	1 . 4
2 7 時 間	P . I .	6 . 3
	P T A	7 . 7
	ト リ パ ン ブ ル ー	4 . 8
1 0 3 時 間	P . I .	2 6 . 8
	P T A	1 9 . 1
	ト リ パ ン ブ ル ー	1 0 . 2

実施例 10

化合物 25 の合成

磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した50mlの丸底フラスコに化合物 2 2 (0.075g、0.00013モル)を添加した。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (10ml)をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつトリス (2-アミノエチル) アミン (1.016g、0.00518モル)を添加した。得られた透明溶液を窒素下で一晩加熱還流した。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注いだ。次いで、この混

合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮した。さらに50～75 mlの水を添加し、溶液を0℃まで冷却した。次いで、固体を濾過し、氷冷水で洗浄した。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させた。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから0℃まで15分間で冷却して再結晶した。また、第2濾液から放置して、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって第2結晶を収集した。次いで、これらの固体を合し、一晩の高真空の後、最終生成物23 (2.5 g) が得られた。次いで、物質を次の工程である加水分解に送った。

前記からのアミン残渣を10.0 mlのメタノールに溶解し、4N HCl 15 mlを添加した。混合物を2時間還流し、冷却した。エタノールをこの溶液に添加し、得られた沈殿を濾過し、最小量の冷エタノールで洗浄した。濾液を再度濃縮し、新鮮なエタノールおよび濃塩酸を添加した。この得られた沈殿を濾過した。次に、この濾液を乾固近くまで濃縮し、Et₂Oを添加し、固体を濾別した。次いで、最後に残存する濾過不可能な残渣を濃塩酸に溶解させ、EtOHで沈殿させた。この物質を濾過し、エタノールで洗浄し、前記手順からの固体物質を合し、この物質を一晩の高真空に付して、高親和性蛍光DNA染色フェナントリジニウムアミン誘導体25を得た。高分解能質量分析C₂₈H₃₈N₇ (FAB+)として計算値472.3189、実測値：472.3191

化合物25の構造式は図16に示す。

実施例 1 1

化合物 2 6 の合成

磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した50 mlの丸底フラスコに中間体22 (0.2 g、0.406ミリモル)を添加した。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (10 ml)をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ1, 4ビスアミノ (3-アミノプロピル) ピペラジン (3.3 g、16.26ミリモル)を添加した。得られた透明溶液を窒素下で一晩加熱還流した。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注いだ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮した。さらに50～75 mlの水を添加し、溶液を0℃まで冷却した。次いで、固体を濾過し、氷冷水で洗浄した。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させた。懸濁液を濾過した後、得られた固体を熱エタノールから0℃まで15分間で冷却して再結晶した。また、第2濾液から放置により、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって第2の結晶を収集した。次いで、これらの固体を合し、一晩の高真空の後、ジアミンアミン生成物が得られた。次いで、物質を次の工程の加水分解に送った。

前記からのアミン残渣を10.0 mlのメタノールに溶解し、4N HCl 15 mlを添加した。混合物を2時間還流し、冷却した。エタノールをこの溶液に添加し、得られた沈殿を濾過し、最小量の冷エタノールで洗浄した。濾液を再度濃縮し、新鮮なエタノールおよび濃塩酸を添加した。この得られた沈殿を濾過した。次に、この濾過を乾固近くまで濃縮し、Et₂Oを添加し、固体を濾別した。次いで、最後に残存する濾過不可能な残渣を濃塩酸に溶解させ、EtOHで沈殿させた。この物質を濾過し、エタノールで洗浄し、前記手順からの固体物質を合し、この物質を一晩の高真空に付して、高親和性蛍光DNA染色フェナントリジニウムアミン誘導体26を得た。質量分析C₂₆H₃₀N₅ (FAB+)として計算値412、実測値：412

化合物26の構造式を図16に示す。

実施例 1 2

化合物 2 7 の合成

磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した50 mlの丸底フラスコに中間体22 (0.06 g、0.12ミリモル)を添加した。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (10 ml)をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつピペラジン-1-カルボキシアルデヒド (1.37 g、12.0ミリモル)を添加した。得られた透明溶液を窒素下で一晩加熱還流した。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注いだ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮した。さらに50～75 mlの水を添加し、溶液を0℃まで冷却した。次いで、固体を濾過し、氷冷水で洗浄した。次いで、この物質をEt

10

20

30

40

50

OHに再溶解し、10N HClで沈殿させた。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、0℃で15分間冷却するに際し、熱エタノールから再結晶した。また、第2濾液から放置により、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって第2の結晶を収集した。次いで、これらの固体を合し、一晩の高真空の後、ジアミンアミン生成物が得られた。次いで、物質を次の工程の加水分解に送った。

前記からのアミン残渣を10.0mlのメタノールに溶解し、4N HCl 15mlを添加した。混合物を2時間還流し、冷却した。エタノールをこの溶液に添加し、得られた沈殿を濾過し、最小量の冷エタノールで洗浄した。濾液を再度濃縮し、新鮮なエタノールおよび濃塩酸を添加した。この得られた沈殿を濾過した。次に、この濾液を乾固近くまで濃縮し、Et₂Oを添加し、固体を濾別した。次いで、最後に残存する濾過不可能な残渣を濃塩酸に溶解させ、EtOHで沈殿させた。この物質を濾過し、エタノールで洗浄し、前記手順からの固体物質を合し、この物質を一晩の高真空に付して、高親和性蛍光DNA染色フェナントリジニウムアミン誘導体27を得た。質量分析 C₃₂H₄₄N₇ (FAB+)として計算値526、実測値：526

10

化合物27の構造式を図16に示す。

実施例13

化合物28a - 42aおよびその関連化合物の合成

化合物28a - 42aおよびその関連化合物の一般的合成の反応スキームは図17に示す。

一般に、磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した250mlの丸底フラスコに中間体22 (0.0081モル)を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (150ml)をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ適当なアミン (0.283ミリモル)を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに50~75mlの水を添加し、反応混合物を0℃まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから15分間で0℃まで冷却して再結晶する。また、第2濾液から放置により、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって第2の結晶収集する。次いで、これらの固体を合し、反応を行うのに用いたアミンに応じた最終生成物が得られ、一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

20

30

それら対応する出発アミンから得ることができる生成物を以下にリストする。

化合物28aを得るための4-アミノ-1-ベンジルピペリジン

化合物29aを得るためのスペルミン

化合物30aを得るためのピリジン

化合物31aを得るための2-(2-アミノエチル)-1-メチルピロリジン

化合物32aを得るための1-(2-アミノエチル)ピロリジン

化合物33aを得るための1-(2-アミノエチル)ピペリジン

40

化合物34aを得るための2-(2-アミノエチル)ピリジン

化合物35aを得るための1-(2-アミノエチル)ピペラジン

化合物36aを得るための4-(2-アミノエチル)モルホリン

37aを得るための1-アミノ-4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン

38aを得るための4-(アミノメチル)ピペリジン

39aを得るための2-(アミノメチル)ピリジン

40aを得るためのアニリン

41aを得るための1-(3-アミノプロピル)イミダゾール

42aを得るための4-(3-アミノプロピル)モルホリン。

用いる出発アミド28a - 42aに応じて、最終生成物28b - 42bの合成および精製

50

は以下の一般的な方法によって行うことができる。適当なアミド（0.0036モル）を75.0mlのメタノールに溶解し、4N HCl 75mlを添加する。混合物を2時間還流し、冷却する。エタノールをこの溶液に添加し、得られた沈殿を濾過し、最小量の冷エタノールで洗浄する。濾液を再度濃縮し、新鮮なエタノールおよび濃塩酸を添加する。この得られた沈殿を濾過する。次に、この濾液を乾固近くまで濃縮し、Et₂Oを添加し、固体を濾別する。次いで、最後に残存する濾過不可能な残渣を濃塩酸に溶解させ、EtOHで沈殿させた。この物質を濾過し、エタノールで洗浄する。前記手順からのすべての固体物質を合し、一晚の高真空に付して、前記した用いるアミンに応じた高親和性蛍光DNA染料1b-15bを得る。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子

10

量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

その対応する出発アミンから得ることができる生成物を以下にリストする。

生成物 28b を得るためのアミド 28a

生成物 29b を得るためのアミド 29a

生成物 30b を得るためのアミド 30a

生成物 31b を得るためのアミド 31a

生成物 32b を得るためのアミド 32a

生成物 33b を得るためのアミド 33a

生成物 34b を得るためのアミド 34a

生成物 35b を得るためのアミド 35a

生成物 36b を得るためのアミド 36a

生成物 37b を得るためのアミド 37a

生成物 38b を得るためのアミド 38a

生成物 39b を得るためのアミド 39a

生成物 40b を得るためのアミド 40a

生成物 41b を得るためのアミド 41a

生成物 42b を得るためのアミド 42a

実施例 14

化合物 50 およびその関連化合物の合成

化合物 50 およびその前駆体の一般的合成の反応スキームは図 18 に示す。

P.L.Southwick and A.S. Waggoner et al. (米国特許第 4, 981, 977 号) または Ernst et al., Cytometry, 10, 1989, pp.3-10 に見い出されるごとき方法を適用することによって、アルドリッチ・ケミカル・カンパニー (Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)) からの 2-メチルベンザチアゾール 43 を、ヨウ化メチルを用いてアルキル化して化合物 44 を得る。化合物 45 はアルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られ、これを、Gaugain, et al., Biochemistry, Vol.17, No.24, 1978, pp.5071-5078 の方法を適用することにより、3-ブロモ-1-プロパノール (やはり、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られる) と反応させる。化合物 44 と 46 との縮合は、Hamer, Francis の “Heterocyclic Compounds, Cyanine Dyes and Related Compounds, Wiley, 1964, pg. 37” に見い出される方法を適用することによって行い、化合物 47 を得る。次いで、化合物 48 は、Wiberg et al., J. Am. Chem. Soc., 92(3), 1970, pp.553-564 に見い出される方法を用いることによって、アルコールをトシレートに変換することにより得ることができる。次いで、トシレート 48 を、Wilt, J., J. Org. Chem., 35(8), 1970, pp.2803-2806 の方法により、臭化ナトリウムでの求核置換反応によりブロマイドまで変換して、化合物 49 を得る。別法として、Hooz, J. et al., Can. J. Chem., 46, 1968, pp.86-87 で提供されているような一段階法が可能である。次いで、化合物 49 を以下の手法によってジエチレントリアミン (アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手可能) と反応させることができる。

磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 250ml の丸底フラスコに化合物 49 (

20

30

40

50

0.0081モル)を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール(150ml)をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できるジエチレントリアミン(0.283)を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに50~75mlの水を添加し、反応混合物を0℃まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから15分間で0℃に冷却して再結晶する。また、第2濾液から放置により、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって、第2の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物50が得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者

10

によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

化合物49のアミン誘導体は以下のごとくに合成できる。磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した250mlの丸底フラスコに化合物49(0.0081ミリモル)を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール(150ml)をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できる以下のリストから選択される適当なアミン(0.283モル)を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに50~75mlの水を添加し、反応混合物を0℃まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから0℃まで15分間で冷却して再結晶する。また、第2濾液から放置により、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって、第2の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物49a~49oが得られ、これを一晩の高真空に付す。

20

その対応するアミンから得られる生成物を以下にリストする。

49aを得るための4-アミノ-1-ベンジルピペリジン

49bを得るためのスペルミン

49cを得るためのピリジン

30

49dを得るための2-(2-アミノエチル)-1-メチルピロリジン

49eを得るための1-(2-アミノエチル)ピロリジン

49fを得るための1-(2-アミノエチル)ピペリジン

49gを得るための2-(2-アミノエチル)ピリジン

49hを得るための1-(2-アミノエチル)ピペラジン

49iを得るための4-(2-アミノエチル)モルホリン

49jを得るための1-アミノ-4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン

49kを得るための4-(アミノメチル)ピペリジン

49lを得るための2-(アミノメチル)ピリジン

49mを得るためのアニリン

40

49nを得るための1-(3-アミノプロピル)イミダゾール

49oを得るための4-(3-アミノプロピル)モルホリン

当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

化合物49a~49oの構造は前記した一般的方法から明確であるので、それらの構造は示さない。

実施例15

化合物55および55a-55bの合成

化合物55、55aおよびその前駆体の一般的合成の反応スキームは図19に示す。化合

50

物 5 5 a – 5 5 p の構造式は図 2 0 に示す。

2-メチルベンザチアゾール 4 3 はアルドリッチ・ケミカル・カンパニー (Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)) から得られる。Gaugain, et al., *Biochemistry*, 17(24), 1978, 5071-5078に見い出されるごとき方法を適用することにより、3-ブロモ-1-プロパノールを用いて、これをアルキル化して化合物 5 1 を得る。化合物 4 5 はアルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られ、これを、Gaugain, et al., *Biochemistry*, 17(24), 1978, 5071-5078に見い出されるごとき方法を適用することにより、3-ブロモ-1-プロパノール (やはり、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られる) と反応させる。化合物 5 1 と 5 2 との縮合は、Hamer, Francis, "Heterocyclic Compounds, Cyanine Dyes and Related Compounds, Wiley, 1964, pg.37" に見い出される方法を適用することによって行い、化合物 5 2 を得る。次いで、化合物 5 3 は、Wiberg, k. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 92(3), 1970, pp. 553-564に見い出されるごとき方法を用いることによって、アルコールをトシレートに変換することにより得られる。次いで、トシレート 5 3 を、Wilt, J., *J. Org. Chem.*, 35(8), 1970, pp.2803-2806の方法により、臭化ナトリウムでの求核置換反応を介してブロマイドまで変換して、化合物 5 4 を得る。別法として、Hooz, J. et al., *Can. J. Chem.*, 46, 1968, pp.86-87で提供されるような一段法が可能である。

次いで、化合物 5 4 を以下の方法によってジエチレントリアミンまたは他の適当なアミン (アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手可能) と反応させて、化合物 5 4 a – 5 4 p を得ることができる。

磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 250 ml の丸底フラスコに化合物 5 4 (0.0081 モル) を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (150 ml) をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できるジエチレントリアミンまたは他の適当な塩基 (0.283 モル) を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに 50~75 ml の水を添加し、反応混合物を 0℃まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質を EtOH に再溶解し、10N HCl で沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから 0℃まで 15 分間で冷却して再結晶する。また、第 2 濾液から放置により、また第 1 の濾液から EtOH で沈殿させることによって、第 2 の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物 9 a – p が得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

試薬および溶媒の比率を一定に保つ限り、当業者によく知られた比率および割合の方法を用いて、試薬量をスケールアップまたはスケールダウンすることができる。

その対応する出発アミンから得られる生成物を以下にリストする。

化合物 5 4 a を得るためのジエチレントリアミン

化合物 5 4 b を得るための 4-アミノ-1-ベンジルピペリジン

化合物 5 4 c を得るためのスペルミン

化合物 5 4 d を得るためのピリジン

化合物 5 4 e を得るための 2-(2-アミノエチル)-1-メチルピロリジン

化合物 5 4 f を得るための 1-(2-アミノエチル)ピロリジン

化合物 5 4 g を得るための 1-(2-アミノエチル)ピペリジン

化合物 5 4 h を得るための 2-(2-アミノエチル)ピリジン

化合物 5 4 i を得るための 1-(2-アミノエチル)ピペラジン

化合物 5 4 j を得るための 4-(2-アミノエチル)モルホリン

5 4 k を得るための 1-アミノ-4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン

5 4 l を得るための 4-(アミノメチル)ピペリジン

10

20

30

40

50

5 4 mを得るための 2- (アミノメチル) ピリジン

5 4 nを得るためのアニリン

5 4 oを得るための 1- (3-アミノプロピル) イミダゾール

5 4 pを得るための 4- (3-アミノプロピル) モルホリン

実施例 1 6

化合物 5 8 および 5 8 a - 5 8 p の合成

化合物 5 8、5 8 a およびその前駆体の一般的合成の反応スキームは図 2 1 に示す。化合物 5 8 a - 5 8 p の構造式は図 2 2 に示す。

2-メチルベンザチアゾール 4 3 はアルドリッチ・ケミカル・カンパニー (Aldrich Chemical Company) (Milwaukee, WI) から得られる。Gaugain, et al. Biochemistry, Vol 10, 17, No.24, 1978, pp.5071-5078の方法を適用することにより、3-プロモ-1-プロパノールを用いて、これをアルキル化して化合物 5 1 が得られる。化合物 4 5 はアルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られ、これを、Southwick et al. (米国特許第 4, 9 8 1, 9 7 7 号、1 9 9 1 年 1 月 1 日) または Ernst et al., Cytometry, 10, 1989, pp.3-10に見い出される方法を用いて、ヨウ化メチル (やはり、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られる) と反応させて、化合物 5 5 を得る。化合物 5 1 と 5 5 との縮合は、Hamer, Francis, "Heterocyclic Compounds, Cyanine Dyes and Related Compounds, Wiley, 1964, pg.37" に見い出されるごとき方法を適用することによって行い、化合物 5 6 を得る。次いで、化合物 5 7 は、Wiberg, k. et al., J. Am. Chem. Soc., 92(3), 1970, pp.553-564に見い出されるごとき方法を用いることによって、アルコールをトシレート 20 に変換することにより得られる。次いで、トシレート 5 7 を、Wilt, j., J. Org. Chem., 35(8), 1970, pp.2803-2806) の方法により、臭化ナトリウムでの求核置換反応を介してプロマイドまで変換して、化合物 5 8 を得る。

別法として、Hooz, J. et al. (Can. J. Chem., 46, 1968, pp.86-87) で提供されているような一段階法も可能である。

化合物 5 8 を以下の ようにしてジエチレントリアミンまたは他の適当なアミン (アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手可能) と反応させることができる。

磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 2 5 0 m l の丸底フラスコに化合物 5 8 (0. 0 0 8 1 モル) を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (1 5 0 m l) をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから 30 入手できるジエチレントリアミンまたは他の適当な塩基 (0. 2 8 3 モル) を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに 5 0 ~ 7 5 m l の水を添加し、反応混合物を 0 °C まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質を Et OH に再溶解し、1 0 N HCl で沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから 0 °C まで 1 5 分間で冷却して再結晶する。また、第 2 濾液から放置により、また第 1 の濾液から Et OH で沈殿させることによって、第 2 結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物 5 8 a - 5 8 p が得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量 40 決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。試薬および溶媒の比率を一定に保つ限り、当業者によく知られた比率および割合の方法を用いて、試薬量をスケールアップまたはスケールダウンすることができる。その対応するアミンから得られる生成物を以下にリストする。

化合物 5 8 a を得るためのジエチレントリアミン

化合物 5 8 b を得るための 4-アミノ-1-ベンジルピペリジン

化合物 5 8 c を得るためのスペルミン

化合物 5 8 d を得るためのピリジン

化合物 5 8 e を得るための 2- (2-アミノエチル) -1-メチルピロリジン

化合物 5 8 f を得るための 1- (2-アミノエチル) ピロリジン

化合物 58 g を得るための 1- (2-アミノエチル) ピペリジン

化合物 58 h を得るための 2- (2-アミノエチル) ピリジン

化合物 58 i を得るための 1- (2-アミノエチル) ピペラジン

化合物 58 j を得るための 4- (2-アミノエチル) モルホリン

58 k を得るための 1-アミノ-4- (2-ヒドロキシエチル) ピペラジン

58 l を得るための 4- (アミノメチル) ピペリジン

58 m を得るための 2- (アミノメチル) ピリジン

58 n を得るためのアニリン

58 o を得るための 1- (3-アミノプロピル) イミダゾール

58 p を得るための 4- (3-アミノプロピル) モルホリン

10

実施例 17

化合物 64 およびその関連化合物の合成

化合物 64 およびその前駆体の一般的合成の反応スキームは図 23 に示す。

2-メチルベンゾオキサゾール 59 はアルドリッチ・ケミカル・カンパニー (Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)) から得られる。Southwick et al. (米国特許第 4, 981, 977 号、1991 年 1 月 1 日) または Ernst et al., *Cytometry*, 10, 1989, pp.3-10 に見い出されるごとき方法を用い、ヨウ化メチルを用いて、これをアルキル化して化合物 60 が得られる。化合物 45 はアルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られ、これを、Gaugain, et al., *Biochemistry*, Vol.17, No.24, 1978, pp.5071-5078 の方法を適用することにより、3-ブロモ-1-プロパノール (やはり、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られる) と反応させる。化合物 60 と 46 との縮合は、Hamer, Francis, "Heterocyclic Compounds, Cyanine Dyes and Related Compounds, Wiley, 1964, p.g.37" に見い出される方法を適用することによって行い、化合物 61 を得る。次いで、化合物 62 は、Wiberg, k. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 92(3), 1970, pp.553-564 に見い出されるごとき方法を用いることによって、アルコールをトシレートに変換することにより得られる。次いで、トシレート 62 を、Wilt, J., *J. Org. Chem.*, 35(8), 1970, pp.2803-2806 によって記載されている方法により、臭化ナトリウムでの求核置換反応を介してブロマイドまで変換して、化合物 63 を得る。

20

別法として、Hooz, J. et al. *Can. J. Chem.*, 46, 1968, pp.86-87 に提供されているような一段階法も用い得る。

30

化合物 63 を以下の方法によってジエチレントリアミン (アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手可能) と反応させることができる。

磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 250 ml の丸底フラスコに化合物 63 (0.0081 モル) を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (150 ml) をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できるジエチレントリアミン (0.283 モル) を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに 50~75 ml の水を添加し、反応混合物を 0℃ まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質を EtOH に再溶解し、10N HCl で沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから 0℃ まで 15 分間で冷却して再結晶する。また、第 2 濾液から放置により、また第 1 の濾液から EtOH で沈殿させることによって、第 2 の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物 64 が得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

40

化合物 63 のアミン誘導体は以下のごとくに合成することができる。磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 250 ml の丸底フラスコに化合物 63 (0.0081 モル) を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (150 ml) をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できる以下のリ

50

ストから選択される適当なアミン（0.283モル）を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに50～75mlの水を添加し、反応混合物を0℃まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから0℃まで15分間で冷却して再結晶する。また、第2濾液から放置により、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって、第2の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物30a-30oが得られ、これを一晩の高真空に付す。

その対応するアミンから得られる生成物を以下にリストする。

10

63aを得るための4-アミノ-1-ベンジルピペリジン

63bを得るためのスペルミン

63cを得るためのピリジン

63dを得るための2-(2-アミノエチル)-1-メチルピロリジン

63eを得るための1-(2-アミノエチル)ピロリジン

63fを得るための1-(2-アミノエチル)ピペリジン

63gを得るための2-(2-アミノエチル)ピリジン

63hを得るための1-(2-アミノエチル)ピペラジン

63iを得るための4-(2-アミノエチル)モルホリン

63jを得るための1-アミノ-4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン

20

63kを得るための4-(アミノメチル)ピペリジン

63lを得るための2-(アミノメチル)ピリジン

63mを得るためのアニリン

63nを得るための1-(3-アミノプロピル)イミダゾール

63oを得るための4-(3-アミノプロピル)モルホリン

当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。加水分解は必要ないことに注意されたい。

化合物63a-63oの構造は前記した一般的方法から明確であるので、その構造は示さない。

30

実施例 18

化合物 68 および 68a-68p の合成

化合物68、68aおよびその前駆体の一般的合成の反応スキームは図24に示す。化合物68a-68pの構造式は図25に示す。

2-メチルベンゾオキサゾール59はアルドリッチ・ケミカル・カンパニー (Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)) から得られる。Gaugain, et al., *Biochemistry*, Vol. 17, No. 24, 1978, pp.5071-5078の方法を適用することにより、3-ブロモ-1-プロパノールを用い、それをアルキル化して化合物65を得る。化合物45はアルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られ、これを、Gaugain, et al., *Biochemistry*, Vol. 17, No. 24, 1978, pp.5071-5078に見い出されるごとき方法を適用することにより、3-ブロモ-1-プロパノール（やはり、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られる）と反応させる。化合物65と46との縮合は、Hamer, Francis, "Heterocyclic Compounds, Cyanine Dyes and Related Compounds, Wiley, 1964, pg.37"に見い出される方法を適用することによって行い、化合物60を得る。次いで、化合物67は、Wiberg, K. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 92(3), 1970, pp.553-564に見い出されるごとき方法を用いることによって、アルコールをトシレートに変換することにより得られる。次いで、トシレート67を、Wilt, J., *J. Org. Chem.*, 35(8), 1970, pp.2803-2806の方法により、臭化ナトリウムでの求核置換反応を介してプロマイドまで変換して、化合物68を得る。

40

別法として、Hooz, J. et al., *Can. J. Chem.*, 46, 1968, pp.86-87で提供されているよ

50

うな一段階法も用いることができる。

次いで、化合物 6 8 を以下の手法によってジエチレントリアミンまたは他の適当なアミン（アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手可能）と反応させることができる。

磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 250 ml の丸底フラスコに化合物 6 8（0.0081 モル）を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール（150 ml）をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できるジエチレントリアミンまたは他の適当なアミン（0.283 モル）を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに 50 ~ 75 ml の水を添加し、反応混合物を 0 °C まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質を EtOH に再溶解し、10 N HCl で沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから 0 °C まで 15 分間で冷却して再結晶する。また、第 2 濾液から放置により、また第 1 の濾液から EtOH で沈殿させることによって、第 2 の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物 6 8 a が得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

10

試薬および溶媒の比率を一定に保持する限り、当業者によく知られた比率および割合の方法を用いて、試薬量のスケールアップまたはスケールダウンを行うことができる。

20

その対応するアミンから得られる生成物を以下にリストする。

化合物 6 8 a を得るためのジエチレントリアミン

化合物 6 8 b を得るための 4-アミノ-1-ベンジルピペリジン

化合物 6 8 c を得るためのスペルミン

化合物 6 8 d を得るためのピリジン

化合物 6 8 e を得るための 2-(2-アミノエチル)-1-メチルピロリジン

化合物 6 8 f を得るための 1-(2-アミノエチル)ピロリジン

化合物 6 8 g を得るための 1-(2-アミノエチル)ピペリジン

化合物 6 8 h を得るための 2-(2-アミノエチル)ピリジン

化合物 6 8 i を得るための 1-(2-アミノエチル)ピペラジン

30

化合物 6 8 j を得るための 4-(2-アミノエチル)モルホリン

6 8 k を得るための 1-アミノ-4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン

6 8 l を得るための 4-(アミノメチル)ピペリジン

6 8 m を得るための 2-(アミノメチル)ピリジン

6 8 n を得るためのアニリン

6 8 o を得るための 1-(3-アミノプロピル)イミダゾール

6 8 p を得るための 4-(3-アミノプロピル)モルホリン

実施例 19

化合物 7 1 および 7 1 a - 7 1 p の合成

化合物 7 1、7 1 a およびその前駆体の一般的合成の反応スキームは図 26 に示す。化合物 7 1 a - 7 1 p の構造式は図 27 に示す。

40

2-メチルベンゾオキサゾール 5 9 はアルドリッチ・ケミカル・カンパニー (Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)) から得られる。化合物 1 3 を得るための Gaugain, et al., *Biochemistry*, Vol.17, No.24, 1978, pp.5071-5078 に見い出されるとき方法を適用することにより、3-ブロモ-1-プロパノールを用い、それをアルキル化して化合物 6 5 を得る。化合物 4 5 はアルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られ、これを、Southwick et al. (米国特許第 4, 981, 977 号、1991 年 1 月 1 日) または Ernst et al., *Cytometry*, 10, 1989, pp.3-10 に見い出される方法を適用することにより、ヨウ化メチル（やはり、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから得られる）と反応させて、化合物 5 5 を得る。化合物 6 5 と 5 5 との縮合は、Hamer, Francis, "Heterocyclic Compo

50

unds, Cyanine Dyes and Related Compounds, Wiley, 1964, pg.37”に見い出される方法を適用することによって行い、化合物 6 9 を得る。次いで、化合物 7 0 は、Wiberg, K. et al., J. Am. Chem. Soc., 92(3), 1970, pp.553-564に見い出されるとき方法を用いることによって、アルコールをトシレートに変換することにより得られる。次いで、トシレート 7 0 を、Wilt, J., J. Org. Chem., 35(8), 1970, pp.2803-2806の方法により、臭化ナトリウムでの求核置換反応を介してブロマイドまで変換して、化合物 2 0 を得る。別法として、Hooz, J. et al., Can. J. Chem., 46, 1968, pp.86-87に提供されているような一段階法も用い得る。次いで、化合物 7 0 を以下の方法によってジエチレントリアミンまたは他の適当なアミン（アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手可能）と反応させることができる。

磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 250 ml の丸底フラスコに化合物 7 1 (0.0081 モル) を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (150 ml) をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できるジエチレントリアミンまたは他の適当なアミン (0.283 モル) を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに 50 ~ 75 ml の水を添加し、反応混合物を 0℃まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質を EtOH に再溶解し、10N HCl で沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから 0℃まで 15 分間で冷却することにより再結晶する。また、放置により第 2 濾液から、また第 1 の濾液から EtOH で沈殿させることによって、第 2 の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物 7 1 a - 7 1 p が得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

試薬および溶媒の比率を一定に保持する限り、当業者によく知られた比率および割合の方法を用いて、試薬量のスケールアップまたはスケールダウンを行うことができる。

その対応するアミンから得られる生成物を以下にリストする。

化合物 2 0 a を得るためのジエチレントリアミン

化合物 2 0 b を得るための 4-アミノ-1-ベンジルピペリジン

化合物 2 0 c を得るためのスペルミン

化合物 2 0 d を得るためのピリジン

化合物 2 0 e を得るための 2-(2-アミノエチル)-1-メチルピロリジン

化合物 2 0 f を得るための 1-(2-アミノエチル)ピロリジン

化合物 2 0 g を得るための 1-(2-アミノエチル)ピペリジン

化合物 2 0 h を得るための 2-(2-アミノエチル)ピリジン

化合物 2 0 i を得るための 1-(2-アミノエチル)ピペラジン

化合物 2 0 j を得るための 4-(2-アミノエチル)モルホリン

2 0 k を得るための 1-アミノ-4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン

2 0 l を得るための 4-(アミノメチル)ピペリジン

2 0 m を得るための 2-(アミノメチル)ピリジン

2 0 n を得るためのアニリン

2 0 o を得るための 1-(3-アミノプロピル)イミダゾール

2 0 p を得るための 4-(3-アミノプロピル)モルホリン

実施例 2 0

化合物 8 0 およびその関連化合物の合成

化合物 8 0 およびその前駆体の一般的合成の反応スキームは図 2 8 に示す。

化合物 7 2 はアルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手可能である。各々、Dervan et al., J. Am. Chem. Soc., Vol. 100, No.6, 1978, pp.1968-1970 またはそこで引用された二次文献の方法に準じて、化合物 7 3 は化合物 7 2 から合成でき、化合物 7 4 は化合物

10

20

30

40

50

7 3 から合成でき、化合物 7 5 は化合物 7 4 から合成できる。

化合物 7 6 は Gaugain, et al., *Biochemistry*, Vol.17, No. 24, 1978, pp.5071-5078 の方法によって化合物 7 5 から合成できる。化合物 7 7 は、Dervan, P.B., Becker, M.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, Vol.100, No.6, 1968-1970 またはそれに含まれる二次文献の方法によって化合物 7 6 から合成できる。化合物 7 8 は、Lee et al., *J. Am. Chem. Soc.*,

88(14), 1966, pp.3440-3441 またはそこに含まれる文献の方法によって化合物 7 7 から合成できる。化合物 7 9 は以下の方法によって合成できる。磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 250 ml の丸底フラスコに化合物 7 8 (0.0081 モル) を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (150 ml) をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できるジエチレントリアミン (0.283 モル) を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに 50 ~ 75 ml の水を添加し、反応混合物を 0 °C まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質を EtOH に再溶解し、10 N

HCl で沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから 0 °C まで 15 分間で冷却して再結晶する。放置により第 2 濾液から、また第 1 の濾液から EtOH で沈殿させることによって、第 2 の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物 7 9 が得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクター化を行うことができる。最終化合物 8 0 は Dervan, P.B., Becker, M.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, 100(6), 1968-1970 の還元方法を用いることによって得られる。すべての中間体のキャラクター化および精製は当業者によく知られた方法を用いて達成できる。

化合物 7 8 のアミン誘導体は以下のごとくに合成することができる。磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 250 ml の丸底フラスコに化合物 7 8 (0.0081 モル) を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール (150 ml) をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できる以下のリストから選択される適当なアミン (0.283 モル) を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに 50 ~ 75 ml の水を添加し、反応混合物を 0 °C まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質を EtOH に再溶解し、10 N HCl で沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから 0 °C まで 15 分間で冷却して再結晶する。放置により第 2 濾液から、また第 1 の濾液から EtOH で沈殿させることによって、第 2 の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物 7 8 a - 7 8 o が得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクター化を行うことができる。

その対応するアミンから得られる生成物を以下にリストする。

7 8 a を得るための 4 - アミノ - 1 - ベンジルピペリジン

7 8 b を得るためのスペルミン

7 8 c を得るためのピリジン

7 8 d を得るための 2 - (2 - アミノエチル) - 1 - メチルピロリジン

7 8 e を得るための 1 - (2 - アミノエチル) ピロリジン

7 8 f を得るための 1 - (2 - アミノエチル) ピペリジン

7 8 g を得るための 2 - (2 - アミノエチル) ピリジン

7 8 h を得るための 1 - (2 - アミノエチル) ピペラジン

7 8 i を得るための 4 - (2 - アミノエチル) モルホリン

7 8 j を得るための 1 - アミノ - 4 - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン

78kを得るための4-(アミノメチル)ピペリジン

78lを得るための2-(アミノメチル)ピリジン

78mを得るためのアニリン

78nを得るための1-(3-アミノプロピル)イミダゾール

78oを得るための4-(3-アミノプロピル)モルホリン

最終生成物78aa - 78ooの合成および精製は、以下に示す対応する最終生成物を得るための以下のプロトコルによって達成できる。ニトロ化合物78a - 78oは、Dervan et al., J. Am. Chem. Soc., 100(6), 1978, pp.1968-1970の方法を用いることによって適当なアミンに変換できる。

その対応する中間体前駆体から得られる生成物を以下にリストする。

10

78aaを得るための78a

78bbを得るための78b

78ccを得るための78c

78ddを得るための78d

78eeを得るための78e

78ffを得るための78f

78ggを得るための78g

78hhを得るための78h

78iiを得るための78i

78jjを得るための78j

20

78kkを得るための78k

78llを得るための78l

78mmを得るための78m

78nnを得るための78n

78ooを得るための78o

当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

化合物78a - 78oおよび78aa - 78ooの構造は前記した一般的方法から明確であるので、その構造は示さない。

30

実施例 21

化合物 85 およびその関連化合物の合成

化合物 85 およびその前駆体の一般的合成の反応スキームは図 29 に示す。

出発物質 81 (0.0876 モル) はアルドリッチ・ケミカル・カンパニー (Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)) から入手し、アルゴン下、磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した 3.0 リットルの一首丸底フラスコに添加する。この容器に、乾燥ピリジン 1.0 リットルを攪拌しつつ添加する。得られた懸濁液の攪拌は、すべての固体が溶解するまで 15 分間継続する。触媒量の N, N-ジメチルアミノピリジン (1.07 g, 0.00876 モル) を攪拌しつつこの溶液に添加する。次いで、無水酢酸 (462 g, 4.9 モル) を添加し、得られた反応混合物を 8 ~ 12 時間還流する。次いで、反応混合物を冷却し、溶媒を真空中で除去する。生成物 42 の精製には、薄層クロマトグラフィーのごとき当業者によく知られた方法を用いて決定した適当な溶媒系を用い、シリカゲルカラムの勾配溶離を行う。10.0 ml ずつの画分を収集し、適当な画分を再び合し、真空中で溶媒を除去する。次いで、残渣を熱 EtOH (220 ml) に溶解し、0 °C まで冷却することによって沈殿させる。母液をデカンテーションし、200 ml の新鮮な EtOH を添加する。加熱することによって固体を再溶解し、-4 °C で 48 時間結晶化させる。結晶を母液と 2 番目の再結晶の両方から収集し、少量の冷 EtOH で洗浄し、高真空下で数時間乾燥する。得られた化合物 82 は当業者によく知られた高分解能質量分析によってキャラクタリゼーションすることができる。

40

化合物 83 は、3, 8 ジアミノ-6-フェニルフェナントリジンのジアミドの第四級化に

50

ついで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに50～75 mlの水を添加し、反応混合物を0℃まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから0℃まで15分間で冷却して再結晶する。放置により第2濾液から、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって、第2の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、生成物84が得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

最終生成物85の合成および精製は以下のプロトコルによって達成できる。イミド(0.0036モル)84をメタノール75.0 mlに溶解させ、4N HCl 75 mlを添加する。混合物を約2時間還流し、冷却する。エタノールをこの溶液に添加し、得られた沈殿を濾過し、最小量の冷エタノールで洗浄する。濾液を再度濃縮し、新鮮なエタノールおよび濃塩酸を添加する。また、得られた沈殿を濾過する。次に、この濾液を乾固近くまで濃縮し、Et₂Oを添加し、固体を濾別する。次いで、最後に残存する濾過不可能な残渣を濃塩酸に溶解し、EtOHで沈殿させる。この物質を濾過し、エタノールで洗浄する。前記手順からのすべての固体物質を合し、一晩高真空に付して85を得る。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

化合物83のアミン誘導体は以下のごとくに合成することができる。磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した250 mlの丸底フラスコに化合物83(0.0081モル)を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール(150 ml)をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できる以下のリストから選択される適当なアミン(0.283モル)を添加する。得られた溶液を窒素下で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに50～75 mlの水を添加し、反応混合物を0℃まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから0℃まで15分間で冷却して再結晶する。放置によって第2濾液から、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって、第2の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物83a-83oが得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

その対応するアミンから得られる生成物を以下にリストする。

83aを得るための4-アミノ-1-ベンジルピペリジン

10

20

30

40

50

8 3 bを得るためのスペルミン

8 3 cを得るためのピリジン

8 3 dを得るための2-(2-アミノエチル)-1-メチルピロリジン

8 3 eを得るための1-(2-アミノエチル)ピロリジン

8 3 fを得るための1-(2-アミノエチル)ピペリジン

8 3 gを得るための2-(2-アミノエチル)ピリジン

8 3 hを得るための1-(2-アミノエチル)ピペラジン

8 3 iを得るための4-(2-アミノエチル)モルホリン

8 3 jを得るための1-アミノ-4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン

8 3 kを得るための4-(アミノメチル)ピペリジン

8 3 lを得るための2-(アミノメチル)ピリジン

8 3 mを得るためのアニリン

8 3 nを得るための1-(3-アミノプロピル)イミダゾール

8 3 oを得るための4-(3-アミノプロピル)モルホリン

最終生成物 8 3 a a - 8 3 o o の合成および精製は、以下に示す対応する最終生成物を得るための以下のプロトコルによって達成できる。イミド (0.0036モル) 8 3 a - 8 3 o をメタノール 75.0 ml に溶解させ、4N HCl 75 ml を添加する。混合物を約2時間還流し、冷却する。エタノールをこの溶液に添加し、得られた沈殿を濾過し、最小量の冷エタノールで洗浄する。濾液を再度濃縮し、新鮮なエタノールおよび濃塩酸を添加する。また、得られた沈殿を濾過する。次に、この濾液を乾固近くまで濃縮し、Et₂O を添加し、固体を濾別する。次いで、最後に残存する濾過不可能な残渣を濃塩酸に溶解し、EtOH で沈殿させる。この物質を濾過し、エタノールで洗浄する。前記手順からのすべての固体物質を合し、一晚高真空に付して 8 3 a a - 8 3 o o を得る。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

その対応する中間体出発物質から得られる生成物を以下にリストする。

8 3 a aを得るための 8 3 a

8 3 b bを得るための 8 3 b

8 3 c cを得るための 8 3 c

8 3 d dを得るための 8 3 d

8 3 e eを得るための 8 3 e

8 3 f fを得るための 8 3 f

8 3 g gを得るための 8 3 g

8 3 h hを得るための 8 3 h

8 3 i iを得るための 8 3 i

8 3 j jを得るための 8 3 j

8 3 k kを得るための 8 3 k

8 3 l lを得るための 8 3 l

8 3 m mを得るための 8 3 m

8 3 n nを得るための 8 3 n

8 3 o oを得るための 8 3 o

化合物 8 3 a - 8 3 o および 8 3 a a - 8 3 o o の構造は前記した一般的方法から明確であるので、その構造は示さない。

実施例 2 2

化合物 9 0 およびその関連化合物の合成

化合物 9 0 およびその前駆体の一般的合成の反応スキームは反応スキームは図 3 0 に示す。

出発物質 8 6 (0.0876モル) はアルドリッチ・ケミカル・カンパニー (Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)) から入手し、アルゴン下、磁気攪拌棒および還流コン

10

20

30

40

50

デンサーを装備した3.0リットルの一首丸底フラスコに添加する。次いで、無水酢酸(462g、4.9モル)を添加し、得られた反応混合物を8~12時間還流する。次いで、反応混合物を冷却し、溶媒を真空中で除去する。生成物87の精製には、当業者によく知られた方法を用いて決定した適当な溶媒系を用い、シリカゲルカラムの勾配溶離を行う。10.0mlずつの画分を収集し、適当な画分を再び合し、真空中で溶媒を除去する。次いで、残渣を熱EtOH(220ml)に溶解し、0℃に冷却することによって沈殿させる。母液をデカンテーションし、200mlの新鮮なEtOHを添加する。加熱することによって固体を再溶解し、-4℃で48時間結晶化させる。結晶を母液及び2回目の再結晶の両方から収集し、これらの結晶を少量の冷EtOHで洗浄し、高真空下で数時間乾燥する。得られた化合物87は当業者によく知られているように高分解能質量分析によってキャラクタリゼーションする。

10

化合物88は、3,8ジアミノ-6-フェニルフェナントリジンのジアミドの第四級化についての文献の方法(Gaugain et al., *Biochemistry*, Vol.17, No.24, 1978, pp5071-5078)の変法により、ジアミド87から合成する。ジアミド87(0.023モル)を、アルゴン下、磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した2.0リットルの丸底フラスコに入れる。1,3ジブロモプロパン(1.0リットル、9.86モル)をこのフラスコに添加し、得られた混合物を7時間還流する。溶液を一晩冷却し、沈殿を濾過し、Et₂Oで洗浄する。この物質をCH₃OHから再結晶してジアセチルプロマイド88が得られ、これは、質量分析および当業者に公知の他の方法によってキャラクタリゼーションすることができる。

20

磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した250mlの丸底フラスコに化合物88(0.0081モル)を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール(150ml)をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できるジエチレントリアミン(0.283モル)を添加する。得られた溶液を窒素下一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに50~75mlの水を添加し、反応混合物を0℃まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから0℃まで15分間で冷却して再結晶する。第2濾液の放置により、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって、第2の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、生成物89が得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

30

最終生成物90の合成および精製は以下のプロトコルによって達成できる。ジアミド(0.0036モル)89をメタノール75.0mlに溶解させ、4N HCl 75mlを添加する。混合物を約2時間還流し、冷却する。エタノールをこの溶液に添加し、得られた沈殿を濾過し、最小量の冷エタノールで洗浄する。濾液を再度濃縮し、新鮮なエタノールおよび濃塩酸を添加する。また、得られた沈殿を濾過する。次に、この濾液を乾固近くまで濃縮し、Et₂Oを添加し、固体を濾別する。次いで、最後に残存する濾過不可能な残渣を濃塩酸に溶解し、EtOHで沈殿させる。この物質を濾過し、エタノールで洗浄する。前記手順からのすべての固体物質を合し、一晩高真空に付して化合物90を得る。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

40

化合物88のアミン誘導体は以下のごとくに合成することができる。磁気攪拌棒および還流コンデンサーを装備した250mlの丸底フラスコに化合物88(0.0081モル)を添加する。次いで、窒素下で攪拌しつつメタノール(150ml)をこのフラスコに添加し、攪拌を継続しつつ、アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手できる以下のリストから選択される適当なアミン(0.283モル)を添加する。得られた溶液を窒素下

50

で一晩加熱還流する。次いで、この溶液を室温まで冷却し、蒸留水に注ぐ。次いで、この混合物を水のみが残存するまで真空中で濃縮する。さらに50～75mlの水を添加し、反応混合物を0℃まで冷却する。固体を濾過し、氷冷水で洗浄する。次いで、この物質をEtOHに再溶解し、10N HClで沈殿させる。懸濁液を濾過した後、得られた固体を、熱エタノールから0℃まで15分間で冷却して再結晶する。また、第2濾液から放置によって、また第1の濾液からEtOHで沈殿させることによって、第2の結晶を収集する。次いで、これらの固体を合し、最終生成物48a-48oが得られ、これを一晩の高真空に付す。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

10

フェナントリジニウム誘導体28a-42aおよび28b-42bの合成についての一般的方法を、プロマイド化合物88、83、78、63または49の合成についての前記方法と組み合わせることによって、化合物49および63の誘導体については、加水分解工程が必要でなく、従って、加水分解工程が除かれること以外は、既に述べたプロマイドのアミンでのアルキル化についての一般的方法を用いて、アミンテール-インターカレーター分子セグメントのいずれの組合せも合成することができる。化合物78の誘導体の場合において、加水分解工程は必要ではないが、Dervan et al., J. Am. Chem. Soc., 100(6), 1978, pp.1968-1970の方法に従った還元工程が必要である。

実施例 23

化合物の「マトリックス」を形成するための一般的方法

20

最終生成物88aa-88ooの合成および精製は、以下に示す対応する最終生成物を得るための以下のプロトコルによって達成できる。イミド(0.0036モル)88a-88oをメタノール75.0mlに溶解し、4N HCl 75mlを添加する。混合物を約2時間還流し、冷却する。エタノールをこの溶液に添加し、得られた沈殿を濾過し、最小量の冷エタノールで洗浄する。濾液を再度濃縮し、新鮮なエタノールおよび濃塩酸を添加する。また、得られた沈殿を濾過する。次に、この濾液を乾固近くまで濃縮し、Et₂Oを添加し、固体を濾別する。次いで、最後に残存する濾過不可能な残渣を濃塩酸に溶解し、EtOHで沈殿させる。この物質を濾過し、エタノールで洗浄する。前記手順からのすべての固体物質を合し、一晩高真空に付して88aa-88ooを得る。当業者によく知られた正確な原子質量式から遊離塩基アミンの分子質量を計算し、得られた質量を、当業者によく知られた高分解能質量分析分子量決定法によって得られたそれと比較することによって、キャラクタリゼーションを行うことができる。

30

その対応する中間体前駆体から得ることができる生成物を以下にリストする。

88aaを得るための88a

88bbを得るための88b

88ccを得るための88c

88ddを得るための88d

88eeを得るための88e

88ffを得るための88f

88ggを得るための88g

88hhを得るための88h

88iiを得るための88i

88jjを得るための88j

88kkを得るための88k

88llを得るための88l

88mmを得るための88m

88nnを得るための88n

88ooを得るための88o

40

化合物88a-88oおよび88aa-88ooの構造は一般的方法から明確であるので、その構造は示さない。

50

実施例 2 4

化合物 2 4 - 2 7 を用いるハイブリダイゼーションアッセイ

4つの別々の実験において、P T A 2 4、化合物 2 5、化合物 2 6 および化合物 2 7 を用いて、標的オリゴヌクレオチドをその相補的パートナーで滴定する場合のハイブリダイゼーションを定量した。また、3つの同時でしかし独立した実験を行うことによって、エチジウムブロマイド染色、プロピジウムイオダイド染色およびエチジウムホモダイマー染色対 P T A 2 4 の比較を行った。結果は図 3 1 に見い出すことができる。以下のプロトコルに従う、エチジウムブロマイド染色、化合物 2 4 (P T A) 染色、化合物 2 5 染色、化合物 2 6 染色および化合物 2 7 染色の比較結果は図 3 2 に見い出される。DNA オリゴデオキシチミジル酸の相補鎖、d (p T) ₉、およびオリゴデオキシアデニル酸の相補鎖、(d (p A) ₉) は、St. Louis, MO の Sigma Chemical Co. から得た。d (p A) ₉ のストック溶液は、0.004 M トリス、0.001 M EDTA、pH 8.2 緩衝液から 5.0 ユニット / 0.5 ml にて作成した。ポリ A については、 $\epsilon = 8.4 \text{ AU} / \text{mM cm}$ または $8400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; 従って、d (p A) ₉ についての 9 塩基対では、該 ϵ は $75600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。次いで、このストックを 100 倍希釈して、 $6.61 \times 10^{-7} \text{ M}$ または $0.66 \mu \text{M}$ のストックを得た。d (p T) ₉ ストックは 25 ユニット / 5.0 ml で作成し、同緩衝液での 10 倍希釈の後に滴定に使用した。ポリ T についての ϵ は塩基対当たり $8.15 \text{ AU} / \text{mM cm}$ または $8150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、あるいはオリゴ当たり $73350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であるので、オリゴストックの濃度は DNA 分子において $6.8 \mu \text{M}$ であった。ポリスチレンの使捨可能な 4.0 ml キュベットを用い、日立 F-4010 蛍光分光光度計を用いて滴定を行って、十分に補正されたスペクトルならびに 488-550 nm (この実験では 488 nm を使用) の励起波長および 600-650 nm (この実験では 625 nm を使用) の発光波長が得られた。以下の増分にて、d (p T) ₉ の当量を添加した : 0.020、0.080、0.150、0.300、0.500、0.700、1.000、2.000、5.000 当量。滴定曲線における各試料は、 $10 \times 1.0 \text{ ml}$ 増分にて最初の d (p A) ₉ ストックを分けることによって個々に調製した。次いで、相補物の添加は、マイクロピペットで、d (p T) ₉ ストックの適量 (各々、2、5、8、15、30、50、70、100、200 および $500 \mu \text{l}$) を、10 アリコートのシリーズの各々に加えることによって行った。暫時大きくなるモル比の 2 つの相補鎖を含有する各アリコート室温で 1 時間 45 分インキュベートし、対応する染料を、0.004 M トリス、0.001 M EDTA、pH 8.2 緩衝液中の対応する染料の $15 \mu \text{M}$ 溶液の $100.0 \mu \text{l}$ アリコートとして添加した。これは、相補オリゴでの飽和状態における 1/4 の染料 / DNA b. p. 比に対応する。染料およびオリゴの総濃度は、同一ストック溶液からの種々の増分の添加の使用のため、飽和状態プロットにおいて変化する。対応する適当な染料の添加後にさらに 45 分間インキュベートした後、625 nm で相対的蛍光強度を読み取り、記録して標準曲線が得られ、これは同一条件下での dsDNA ハイブリダイゼーションまたは標的配列の量に直接比例している。次いで、バックグラウンドまたは最初の残存する蛍光を、同一グラフの種々の滴定曲線の比較のためにすべての曲線につき一定値として差し引く。

本発明のインターカレーター化合物 2 4、2 5、2 6 または 2 7 の高結合親和性は、エチジウムブロマイドのごとき通常のインターカレーターに比して特に有用である (図 3 2)。図 3 2 (実施例 2 4) において、インターカレーター化合物 2 4、2 5、2 6 および 2 7 の存在下における ds-DNA 濃度に対する感度または応答をエチジウムブロマイドと比較して示す。オリゴヌクレオチドの濃度が 10^{-6} M 未満である場合、かかる高親和性インターカレーターの利点は特に明らかである。

エチジウムホモダイマーのごときホモ二官能性インターカレーターに対する P T A 2 4 の比較 (図 3 2) において、再度、明瞭な利点は感度であることが観察されている。この場合、感度の上昇は P T A 2 4 における自己クエンチングの減少ならびに DNA に対するその高親和性に関係し得る。

図 8 および図 9 において、ds-DNA の濃度はより高く、エチジウムブロマイドおよび

10

20

30

40

50

P T A 2 4 (図9) とエチジウムホモダイマーおよび P T A 2 4 (図8) との間の差異は、用いた DNA の高濃度のため有意ではなかった。

まとめると、本発明は、当該分野で現在利用可能なまたは知られている通常の染色方法よりも低い濃度で d s - DNA ハイブリダイゼーションの検出を可能とする明瞭な利点を提供する。

実施例 2 5

インターカレーター化合物 1、2、3、24、25、26、27、28b、29b、30b、31b、32b、33b、34b、35b、36b、37b、38、39b、40b、41b、42b または 80 を用いるハイブリダイゼーションアッセイ

DNA インターカレーター 1、2、3、24、25、26、27、28b、29b、30b、31b、32b、33b、34b、35b、36b、37b、38、39b、40b、41b、42b または 80 を用いて、標的オリゴヌクレオチドをその相補的パートナー

で滴定する場合のハイブリダイゼーションを定量することができる。また、DNA オリゴデオキシチミジル酸の相補鎖、d (p T)₉、およびオリゴデオキシシアデニル酸の相補鎖、

(d (p A)₉) は、St. Louis, MO の Sigma Chemical Co. から得ることができる。d (p A)₉ のストック溶液は、0.05 M トリス、0.2 N NaCl、1 mM EDTA、pH 8.4 または他の適当な緩衝液で 5 ユニット / ml にて作成する。ポリ A については、 $\epsilon = 8.4 \text{ AU} / \text{mM cm}$ または $8400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; 従って、d (p A)₉ につ

いての 9 塩基対では、該 ϵ は $75600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。次いで、このストックを希釈して、0.066 – 66 μM のストックを得る。d (p T)₉ ストックは 25 ユニット / 5

0 ml で作成し、同緩衝液でさらに希釈することなく滴定に使用する。ポリ T についての ϵ は塩基対当たり $8.15 \text{ AU} / \text{mM cm}$ または $8150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、あるいはオリゴ

当たり $73350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であるので、オリゴストックの濃度は DNA 分子において 0.0068 – 660 μM である。488 – 550 nm (534 あたりが最適) の励起波長

および 600 – 650 nm (625 あたりが最適) の発光波長を用い、蛍光分光光度計を用いて滴定を行うことができる。以下の増分にて、d (p T)₉ の当量を添加する：0.

02、0.05、0.080、0.150、0.300、0.500、0.700、1.00、2.00、5.00 当量。滴定曲線における各試料は、最初の d (p A)₉ ストックを 10 × 1.0 ml アリコートに分けることによって個々に調製される。次いで、相補

物の添加は、d (p T)₉ ストックが d (p A)₉ ストックの 10 倍希釈濃度である場合、マイクロピペットで、d (p T)₉ ストックの適量 (各々、2、5、8、15、30、

50、70、100、200 および 500 μl) を、10 アリコートのシリーズの各々に加えることによって行う。暫時大きくなるモル比の 2 の相補鎖を含有する各アリコートを

室温で 0.25 – 2.5 時間インキュベートし、0.05 M トリス、0.2 N NaCl、1 mM EDTA、pH 8.4 緩衝液または他の適当な緩衝液中の染料の 1 – 1000 μM 溶液の 1 – 500 μl アリコートとして染料を添加する。これは、相補オリゴでの飽

和状態における 1 / 1 – 1 / 1000 の染料 / DNA b. p. 比に対応する。染料およびオリゴの総濃度は、同一ストック溶液からの種々の増分の添加の使用のため、飽和プロットにおいて変化する。さらに 15 分間インキュベートした後、580 – 680 nm の間で

相対的蛍光強度を読み取り、記録して標準曲線が得られ、これは同一条件下で d s DNA ハイブリダイゼーションまたは標的配列の量に直接比例している。

実施例 2 6

インターカレーター化合物 1、2、3、24、25、26、27、28b、29b、30b、31b、32b、33b、34b、35b、36b、37b、38、39b、40b、41b、42b または 80 を用いる d (p T)₉ および d (d A)₉ 以外の相補的結合

対のハイブリダイゼーションの測定

実施例 2 5 に前記した方法を用いることにより、当業者に予測される相補性領域の程度に応じて当業者が決定する適当な濃度にて、d (p T)₉ を適当な相補的 DNA で置き換え、d (d A)₉ を適当な標的 DNA で置き換えることによって、インターカレーター化合物 1、2、3、24、25、26、27、28b、29b、30b、31b、32b、3

33b、34b、35b、36b、37b、38、39b、40b、41b、42b または 80 を用いる d (p T)₉ および d (d A)₉ 以外の相補的結合対のハイブリダイゼーションの測定

実施例 2 5 に前記した方法を用いることにより、当業者に予測される相補性領域の程度に応じて当業者が決定する適当な濃度にて、d (p T)₉ を適当な相補的 DNA で置き換え、d (d A)₉ を適当な標的 DNA で置き換えることによって、インターカレーター化合物 1、2、3、24、25、26、27、28b、29b、30b、31b、32b、3

33b、34b、35b、36b、37b、38、39b、40b、41b、42b または 80 を用いる d (p T)₉ および d (d A)₉ 以外の相補的結合対のハイブリダイゼーションの測定

実施例 2 5 に前記した方法を用いることにより、当業者に予測される相補性領域の程度に応じて当業者が決定する適当な濃度にて、d (p T)₉ を適当な相補的 DNA で置き換え、d (d A)₉ を適当な標的 DNA で置き換えることによって、インターカレーター化合物 1、2、3、24、25、26、27、28b、29b、30b、31b、32b、3

33b、34b、35b、36b、37b、38、39b、40b、41b、42b または 80 を用いる d (p T)₉ および d (d A)₉ 以外の相補的結合対のハイブリダイゼーションの測定

10

20

30

40

50

3 b、3 4 b、3 5 b、3 6 b、3 7 b、3 8、3 9 b、4 0 b、4 1 b、4 2 bまたは8 0を用いて、いずれの他の相補性DNA鎖のハイブリダイゼーションの量も測定することができる。各場合において、4 5 0－5 5 0 nm（5 3 4 nmにおいて最適）の励起波長を用いることができ、次いで、5 8 0－6 8 0 nmの間で相対的蛍光強度を読み取り、記録して標準曲線が得られ、これは同一条件下でのdsDNAハイブリダイゼーションまたは標的配列の量に直接比例している。

実施例 2 7

インターカレーター化合物 7、8、5 0、5 4 a、5 4 b、5 4 c、5 4 d、5 4 e、5 4 f、5 4 g、5 4 h、5 4 i、5 4 j、5 4 k、5 4 l、5 4 m、5 4 n、5 4 o、5 4 p、5 8 a、5 8 b、5 8 c、5 8 d、5 8 e、5 8 f、5 8 g、5 8 h、5 8 i、5 8 j、5 8 k、5 8 l、5 8 m、5 8 n、5 8 o、5 8 p、6 4、6 8 a、6 8 b、6 8 c、6 8 d、6 8 e、6 8 f、6 8 g、6 8 h、6 8 i、6 8 j、6 8 k、6 8 l、6 8 m、6 8 n、6 8 o、6 8 p、7 1 a、7 1 b、7 1 c、7 1 d、7 1 e、7 1 f、7 1 g、7 1 h、7 1 i、7 1 j、7 1 k、7 1 l、7 1 m、7 1 n、7 1 o、または7 1 pを用いるハイブリダイゼーションアッセイ

10

実施例 2 6 の前記手法を用いることにより、励起および発光の波長をアッセイを行う前に当業者によって決定されたごとくに最適化した以外は実施例 2 6 に記載したごとくに、インターカレーター化合物 7、8、5 0、5 4 a、5 4 b、5 4 c、5 4 d、5 4 e、5 4 f、5 4 g、5 4 h、5 4 i、5 4 j、5 4 k、5 4 l、5 4 m、5 4 n、5 4 o、5 4 p、5 8 a、5 8 b、5 8 c、5 8 d、5 8 e、5 8 f、5 8 g、5 8 h、5 8 i、5 8 j、5 8 k、5 8 l、5 8 m、5 8 n、5 8 o、5 8 p、6 4、6 8 a、6 8 b、6 8 c、6 8 d、6 8 e、6 8 f、6 8 g、6 8 h、6 8 i、6 8 j、6 8 k、6 8 l、6 8 m、6 8 n、6 8 o、6 8 p、7 1 a、7 1 b、7 1 c、7 1 d、7 1 e、7 1 f、7 1 g、7 1 h、7 1 i、7 1 j、7 1 k、7 1 l、7 1 m、7 1 n、7 1 o、または7 1 pを用いて、いずれの2の相補鎖のハイブリダイゼーションも測定することができる。各場合において、次いで、相対的蛍光強度を読み取り、記録して標準曲線が得られ、これは同一条件下でdsDNAハイブリダイゼーションまたは標的配列の量に直接比例している。

20

実施例 2 8

インターカレーター化合物 7、8、5 0、5 4 a、5 4 b、5 4 c、5 4 d、5 4 e、5 4 f、5 4 g、5 4 h、5 4 i、5 4 j、5 4 k、5 4 l、5 4 m、5 4 n、5 4 o、5 4 p、5 8 a、5 8 b、5 8 c、5 8 d、5 8 e、5 8 f、5 8 g、5 8 h、5 8 i、5 8 j、5 8 k、5 8 l、5 8 m、5 8 n、5 8 o、5 8 p、6 4、6 8 a、6 8 b、6 8 c、6 8 d、6 8 e、6 8 f、6 8 g、6 8 h、6 8 i、6 8 j、6 8 k、6 8 l、6 8 m、6 8 n、6 8 o、6 8 p、7 1 a、7 1 b、7 1 c、7 1 d、7 1 e、7 1 f、7 1 g、7 1 h、7 1 i、7 1 j、7 1 k、7 1 l、7 1 m、7 1 n、7 1 o、または7 1 pを用いるd（pT）9およびd（pA）9についてのハイブリダイゼーションアッセイ

30

当業者によって決定された各化合物についての最適波長に波長を置き換える以外は実施例 2 5 に記載した方法を用いることによって、相補的オリゴヌクレオチドd（pA）9およびd（pA）9ハイブリダイゼーションを測定することができる。

実施例 2 9

40

インターカレーター化合物 1、2、3、2 5、2 6、2 8 b、2 9 b、3 0 b、3 1 b、3 2 b、3 3 b、3 4 b、3 5 b、3 6 b、3 7 b、3 8 b、3 9 b、4 0 b、4 1 b、4 2 b、または8 0を用いるゲル電気泳動への適用

アガロースゲルで泳動させて、化合物1、2、3、2 5、2 6、2 7、2 8 b、2 9 b、3 0 b、3 1 b、3 2 b、3 3 b、3 4 b、2 7、3 5 b、3 6 b、3 7 b、3 8 b、3 9 b、4 0 b、4 1 b、4 2 b、または8 0を用いてDNAを検出することができる。7 mlストック中2.1 mgのプラスミドpBR322を、2 mlの10×React2緩衝液と1 mlのBAMH制限酵素と共に37℃で1時間インキュベートし、水10 mlで合計20 mlまで希釈する。別法として、いずれかの他の適当なDNA試料で前記した「ニック処理した」プラスミドが置き換えられる。次いで、この混合物を用いて、各バイアルにつ

50

き6ml当たり0.63mgにて、ニック処理したpBR322プラスミドの3ストックを調製する。これらのストックの各々をさらに水および20%グリセロールで希釈して、合計12ストックの各々においてDNA塩基対に対する染料の比1:4にて20ng/ml、800pg/ml、160pg/mlおよび40pg/mlの最終DNAストックとする。各ストックの5μlアリコートのアゲロースゲルの12の別々のレーンに負荷し、0.01mM EDTA緩衝液を含む4mMトリス、pH8.2にて、電気泳動を30分間行う。次いで、ゲルを取り出し、通常のゲルボックス中にて、紫外光へ暴露して写真を取る。別法として、蛍光検出または可視化方法として蛍光共焦点顕微鏡またはチャージカップルド(charge coupled)装置イメージングを用いてゲルを走査する。

実施例30

インターカレーター化合物25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90を用いるインターカレーター活性化カルボキシメチルスチレン微粒子捕獲試薬の合成についてのプロトコル

インターカレーター誘導体化固相微粒子(MP)捕獲試薬の合成は、以下の方法によって行うことができる：

0.275±μm微粒子(Seradyne, Indianapolis, IN)の45アリコートを4mlバイアルに入れ、Bio-Rex 501-Dイオン交換混合ベッド樹脂(Bio-Rad, Richmond, CA)を用いて、界面活性剤を交換する。2時間穏かに振盪した後、減圧収集チャンバーを装備した粗フリットガラス漏斗を用いることによって樹脂を混合物から濾過して取り出す。試料を10重量%固形物のMP濃度まで希釈する。反応性カルボン酸の合計当量を販売業者の滴定仕様から計算する。スルホN-ヒドロキシスクシンイミド(Pierce, Rockford, IL)のストック溶液は水中11mg/ml(20mM)にて作成し、EDAC(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)のストック溶液は水中10mg/ml(5mM)にて作成する。5当量のEDAC(290μlストック)、続いて5.0当量のスルホN-ヒドロキシスクシンイミド(330μl)をカルボキシ微粒子反応混合物に添加する。この混合物を室温で2時間インキュベートし、次いで、インターカレーター化合物25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90(4mg)の2モル当量を、pH8.0 0.1N NaCl 0.1Nピリン酸緩衝液中8mg/400μl、または2.0mg/100μlの濃度にて添加する。N-ヒドロキシスクシンイミド(Pierce)は、もしそれをDMF(ジメチルホルムアミド)のストックにまず溶解するのであれば、スルホN-ヒドロキシスクシンイミドの代わりに置き換えることができ、前記したごとくにアリコートできる。24時間で反応を完結させた後、次いで、溶液が清澄化し、もはや染料が試料から抽出されなくなるまで、遠心、母液の除去、および再懸濁の何回かの試行によって遊離染料を除去する。次いで、精製した捕獲試薬を水中固体2~4%のストックまで希釈する。

実施例31

化合物25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90に由来する固相を用いる固相DNA捕獲

実施例30に記載した各インターカレーター25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90から合成した適当な固相で置き換える以外は実施例5に記載した誘導体化方法を用いて、DNAの固相への捕獲を行うことができる。

また、カルボキシル化ポリスチレン微粒子またはカルボキシル化磁性微粒子のごとき他の適当な固相をCMセファロースの代わりに用いることもできる。

実施例32

化合物25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90によって修飾したインターカレーター修飾固相によるDNA捕獲のプロトコル

10

20

30

40

50

P T A 2 4 誘導体化インターカレーターよりもむしろインターカレーター化合物 2 5、2 6、2 7、2 9 b、3 5 b、3 8 b、5 0、5 4 a、5 4 c、5 8 a、5 8 c、6 4、6 8 a、6 8 c、7 1 a、7 1 c、8 0、8 5または9 0に由来する対応する固相を用いる以外は実施例 6 に記載したごとくに固相より DNA を放出させることができる。

実施例 3 3

ニワトリ赤血球核 (C E N) のフローサイトメトリー実験における蛍光染色

プロトコル：化合物 1、2、3、2 5、2 6、2 7、2 8 b、2 9 b、3 0 b、3 1 b、3 2 b、3 3 b、3 4 b、3 5 b、3 6 b、3 7 b、3 8、3 9 b、4 0 b、4 1 b、4 2 bまたは8 0を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含むもの及びこれらを含まないものであって 40°C で予備加温した W B C D I L 1.0 ml に、2 のインーハウズドナーからの全血試料 $50 \mu\text{l}$ および C E N 懸濁液 $3 \mu\text{l}$ を添加し、混合し、F A C S c a nTM に導入し、20 ” の読みを得る。ニワトリ赤血球核 (C E N) を用いて、F L 3 染色の明るさ (C E N の平均 F L 3) を測定する。用いた全血試料は約 4 ~ 5 時間経過のものである。

10

実施例 3 4

化合物 1、2、3、2 5、2 6、2 7、2 8 b、2 9 b、3 0 b、3 1 b、3 2 b、3 3 b、3 4 b、3 5 b、3 6 b、3 7 b、3 8、3 9 b、4 0 b、4 1 b、4 2 bまたは8 0を用いる Coulter Elite フローサイトメーターでの染料存在下での生存性

細胞単離プロトコル：フィコール単離した細胞の各試験管は以下のごとくに処理できる：0.1 % アジ化ナトリウムおよび 1.0 % アルブミンを含む P B S (Sigma catalogue #1000-3)、比重 1.119 のフィコール (Sigma Histopaque catalogue #1119-1)。

20

全血試料 (E D T A 抗凝固剤) 10 ml を P B S W 10 ml で希釈する。4 つの 15 ml 円錐底試験管に、 5 ml の希釈血液を 5 ml フィコールに載置する。該試験管を $400 \times G$ で 30 分間回転させる。リンパ球、単球、顆粒球および血小板を含有する界面層を吸引し、 $300 \times G$ で 6 分間試験管を遠心することによって 5 ml P B S で 1 回洗浄する。細胞ペレットを P B S に再懸濁し、細胞を計数し、 1 ml 当たり 8×10^6 細胞に調整する。

細胞染色プロトコル：

染料または化合物溶液：

0.1 % アジ化ナトリウムを含む P B S に染料を溶解させることによって作成した化合物 1、2、3、2 5、2 6、2 7、2 8 b、2 9 b、3 0 b、3 1 b、3 2 b、3 3 b、3 4 b、3 5 b、3 6 b、3 7 b、3 8、3 9 b、4 0 b、4 1 b、4 2 bまたは8 0ーストック溶液 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$

30

化合物 1、2、3、2 5、2 6、2 7、2 8 b、2 9 b、3 0 b、3 1 b、3 2 b、3 3 b、3 4 b、3 5 b、3 6 b、3 7 b、3 8、3 9 b、4 0 b、4 1 b、4 2 bまたは8 0の染色：

$12 \times 75 \text{ mm}$ 試験管中、 $23.5 \mu\text{l}$ の細胞を該化合物ストック溶液 $76 \mu\text{l}$ と穏やかに混合する。20 秒後、試験管を Elite フローサイトメーターにセットし、データを収集する。

フローサイトメータープロトコル：Elite フローサイトメーター (Coulter Electronics, Inc.) で分析した細胞

40

試料は 488 nm の出力 15 mW のアルゴンレーザーで励起することができる。データは、赤血球細胞、血小板および夾雑物を排除するために、サイズおよび粒度に基づいて選別した。対照として未染色細胞を用い、選別した分布の直線染料蛍光を分析する。パーセント陽性事象 (死滅した細胞) および死滅細胞分析の平均蛍光を記録する。

実施例 3 5

二本鎖核酸をコンジュゲーション鑄型として用いるインターカレーター誘導体化抗体およびインターカレーター誘導体化アルカリ性ホスファターゼのコンジュゲート

オリゴヌクレオチドの相補鎖、センスおよびアンチセンス 14 ないし 20 量体は、完全に自動化された DNA 合成器で合成でき、Bioconjugate Chemistry, 4, pp.94-102 (1993) に記載されているごとくに精製できる。酵素に仔ウシ腸アルカリ性ホスファターゼと I g

50

Gの間のコンジュゲートの合成は以下のごとくに達成できる。

a) 30原子ヘテロ二官能性リンカーアーム、4-[(N-マレイミドメチル)トリカプロアミド]シクロヘキサノール-1-カルボキシレート(SMTC C)でのインターカレートPTA 24の誘導体化

PTA 24、0.100 g (2.3×10^{-4} モル)を50%水性DMF(ジメチルホルムアミド)5 mlに溶解する。Bieniarz et al. (米国特許第4994385号、第5002883号、第5053520号および第5063109号)に記載されているごとくに合成した30原子ヘテロ二官能性リンカー、4-[(N-マレイミドメチル)トリカプロアミド]シクロヘキサノール-1-カルボキシレート(SMTC C)、0.157 g (2.3×10^{-4} モル)をDMF 3 mlに溶解し、1度に該溶液に添加し、室温で24時間にわたり攪拌する。得られたマレイミド誘導体化PTA 24を、溶離剤として10%メタノール性アセトンを用いるシリカゲルカラムで精製する。

10

b) 仔ウシ腸アルカリ性ホスファターゼのイミノチオランでの誘導体化

PBS緩衝液1 ml中の仔ウシ腸アルカリ性ホスファターゼ、6 mg (4×10^{-9} モル)を、室温における30分間の、450倍モル過剰のイミノチオラン(PBS緩衝液中15 mg/ml溶液164 ml)での処理によってチオール化する。PBS緩衝液で平衡化したSephadex G-25カラム(1×45 cm)でのゲル濾過によって過剰の試薬を除去する。誘導体化酵素を含有する画分をプールし、該プール中の該酵素の濃度を280 nmにおける吸光度によって計算する。

c) b)からのチオール化仔ウシ腸アルカリ性ホスファターゼに対するSMTC C誘導体化PTA 24のコンジュゲーション パートb)からのチオール化仔ウシ腸アルカリ性ホスファターゼおよびパートa)からのマレイミド誘導体化PTA 24を1:1の比率で合し、5℃で18時間インキュベートする。5 mM N-エチルマレイミドを0.3 mMの最終濃度まで添加することによって未反応チオール基をキャッピングし、続いて、室温で1時間インキュベートする。

20

d) IgGのFc領域の部位特異的官能性化を用いるチオレートでのIgGの誘導体化チオレートのIgGのFc領域への部位特異的導入は、Bieniarz et al. (米国特許第5191066号)に記載されているごとくに行う。この方法では、4および10の間のチオレートをIgGのFc領域に導入する。

e) パートa)からのマレイミド誘導体化PTA 24でのパートd)からのFcチオール化IgGの誘導体化

30

パートd)からのFcチオール化IgGおよびパートa)からのマレイミド誘導体化PTA 24を、SMTC C誘導体化PTA 24に対するチオール化IgGの1:5のモル比で合する。溶液を5℃で18時間、リン酸緩衝液pH 7.0中でインキュベートし、コンジュゲートをゲル濾過カラムセファデックスG-25で精製する。蛋白質を含有する画分をプールし、Amicon濃縮器を用いて濃縮する。最終溶液の蛋白質含量は、Pierce Companyからのクーマシー染料結合アッセイを用いて確認する。

f) オリゴの相補鎖よりなる二本鎖20量体オリゴヌクレオチドを用いるパートc)からのPTA 24誘導体化仔ウシ腸アルカリ性ホスファターゼに対するパートe)からのPTA 24誘導体化IgGのコンジュゲーション

40

オリゴヌクレオチドの相補鎖を、Bioconjugate Chemistry, 4, pp.94-102, (1993)に記載されているごとくにハイブリダイズさせ調べる。パートe)からのPTA 24誘導体化IgG、PTA 24仔ウシ腸アルカリ性ホスファターゼおよびコンジュゲーション鑄型として用いる二本鎖オリゴヌクレオチド20量体を、室温にて1:1:1のモル比にて、pH 7.0で18時間一晩インキュベートする。コンジュゲートをゲル濾過カラムG-25を通して濾過する。蛍光原(fluorogenic)基質4-メチルウンベリフェリルホスフェートを用いて画分をアルカリ性ホスファターゼ活性についてアッセイし、フルオレセインで標識した抗イディオタイプIgGを用いて抗体活性についてアッセイする。

また、ゲル濾過HPLCカラムによってコンジュゲートを調べる。

実施例 36

50

二本鎖DNAへのインターカレーター誘導体化リポソームのコンジュゲーション

リポソームの調製はFiechtner et al. (米国特許第4, 912, 208号)に記載されているごとくに行う。これらのリポソームはジホスファチジルエタノールアミン脂質から調製するので、その表面に第一級アミンを呈する。リポソームの調製は、米国特許第4, 912, 208号に開示されている膜不透過性蛍光染料の存在下で行う。かくして、蛍光染料の分子はリポソーム内にて実質的に非常に高い自己クエンチング濃度であり、その結果、それらは非蛍光性である。リポソームの表面アミンは、チオレートを実施例35で記載したアルカリ性ホスファターゼに導入するのに用いたのと実質的に同一の方法によってチオレートで誘導体化する。これまでの実施例で開示したPTA 24および他のインターカレーターは、実施例35に記載したごとくにSMTCC試薬を用いてマレイミドで誘導体

10

化する。チオレート誘導体化リポソームおよびマレイミド誘導体化PTA 24または他のインターカレーターを、実施例35で記載したのと実質的に同一の条件下で容器中で一括にインキュベートする。多重インターカレーターで誘導体化したリポソームを含有する蛍光染料を、固相に被覆したまたは固定化した低濃度の二本鎖DNAを含有する試料と共に、5ないし9の範囲のpHにて、好ましくはpH7.0にてインキュベートする。インキュベーションに続いて、洗浄し、洗剤を添加する。これに伴うリポソーム膜の溶解の結果、蛍光原染料がこぼれ出て、蛍光が脱クエンチングされ、シグナルが出現する。別法として、プローブ多量体一本鎖DNAを固相に固定化することができ、相補的一本鎖DNAを含有することが疑われる患者の試料を該プローブの存在下でインキュベートし、

20

実施例37

インターカレーター化合物24、25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90に由来する蛍光インターカレーターコンジュゲートを用いるDNAの検出

インターカレーター化合物25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90をPTA 24の代わりに用いる以外は実施例35に既に記載した手法によって、インターカレーターマレイミド官能性化インターカレーターの合成を行うことができる。実施例35に記載したごとくに調製したチオール化蛋白質上のチオレートを介して、フィコエリトリンまたはアロフィコシアニンのごとき適当なシグナル発生体をこのマレイミド誘導体化インターカレーターに共有結合させる。コンジュゲートのインターカレーター部分が固定化ds-DNA分子に複合する時間放置し、未結合コンジュゲートを洗い流した後、次いで、二本鎖DNA分子へのインターカレーター部分の結合によって局所化されたフィコエリトリンの蛍光を用い、二本鎖DNA分子が固相または他の固定化物上で検出される。当業者によって決定された効果的な励起に適する波長で蛍光性蛋白質を励起しつつ、当業者

30

40

実施例38

インターカレーター化合物24、25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90に由来する酵素インターカレーターコンジュゲートを用いるDNAの検出

インターカレーター化合物25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90をPTA 24の代わりに用いる以外は実施例35に既に記載した手法によって、インターカレーターマレイミド官能性化インターカレーターの合成を行うことができる。実施例35に記載したごとくに調製したチオール化蛋白質のチオレートを介して、アルカリ性ホ

50

スファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、エステラーゼ、または β -ラクタマーゼのごとき適当なシグナル発生体をこのマレイミド誘導体化インターカレーターに共有結合にて結合させる。コンジュゲートのインターカレーター部分が固定化ds-DNAに結合する時間放置し、未結合コンジュゲートを洗い流した後、適当な酵素の非蛍光または非化学ルミネッセンス基質の当業者によって各々決定された蛍光または化学ルミネッセンス体への代謝回転により供された蛍光または化学ルミネッセンスによって、固相またはコロイドもしくは微粒子のごとき他の固定化物上で二本鎖DNAが検出される。次いで、当業者に各々知られている蛍光励起または化学ルミネッセンスの検出の標準的な方法を用いることによって、蛍光発光または化学ルミネッセンスを適当な波長で読み取る。

実施例 39

インターカレーター化合物 24、25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90に由来するインターカレーター-ケミルミノホア (Chemilumino phore) コンジュゲートを用いるDNAの検出

インターカレーター化合物 25、26、27、29b、35b、38b、50、54a、54c、58a、58c、64、68a、68c、71a、71c、80、85または90をPTA 24の代わりに用いる以外は実施例 35に既に記載した手法によって、インターカレーターマレイミド官能性化インターカレーターの合成を行うことができる。当業者によって設計できるとくマレイミドに対して反応性となるように調製された化学ルミネッセンス性のチオレートによって、アクリジニウムスルホンアミドのごとき適当な活性化可能な化学ルミネッセンスシグナル発生体をこのインターカレーターに共有結合により結合させることができる。ds-DNAのインターカレーター-ケミルミノホアコンジュゲートとの結合の後、過剰のまたは未結合のコンジュゲートを洗い去り、次いで、化学ルミネッセンス体に導く過酸化水素のごとき適当な活性化試薬の添加によってトリガーされた直接的化学ルミネッセンスによって、いずれの二本鎖DNAも固相または他の固定化体上で検出され、次いで、当業者に知られた化学ルミネッセンスの標準的検出方法を用いることによって、化学ルミネッセンスを適当な波長にて読み取る。

実施例 40

インターカレーター誘導体化デンドリマーの合成

インターカレーター誘導体化デンドリマー (dendrimer) は、PolySciencesから得られる樹状ポリマーから合成することができる。ジメチルホルムアミドまたは他の適当な有機溶媒中で0.25-72時間、30-90℃まで加熱することによって、インターカレーターブロマイド中間体 22、49、58、63、71、83または88を用いて、3、4、5、6、7、8、9または10番目の発生デンドリマー上 (generation dendrimer) のアミンをアルキル化する。次いで、インターカレーター化合物 58、63または71を用いる場合は、水または適当な水性緩衝液にてG-25セファデックスTMカラム上のサイズ排除クロマトグラフィーを用いることによって、生成物を精製し、インターカレーター誘導体化デンドリマーが得られる。インターカレーター化合物 22、83または88の場合は、G-25カラムを水で溶離し、次いで、保護されたインターカレーター誘導体化デンドリマーを単離する。次いで、この物質を4N HCl中における90℃での2-4時間の加熱に付して、芳香族アミン保護基を加水分解し、次いで、溶液をpH 4-10に中和し、G-25カラムを最終生成物につき適当な緩衝液で溶離して、純粋なインターカレーター誘導体化デンドリマーが得られる。

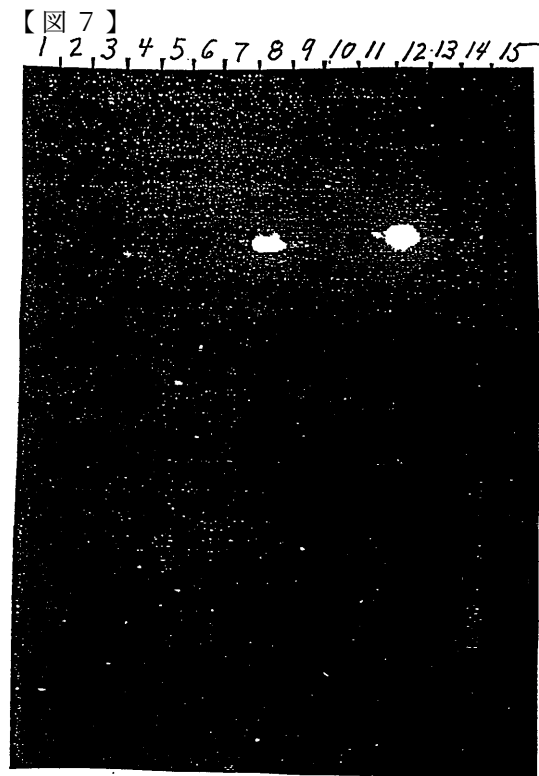
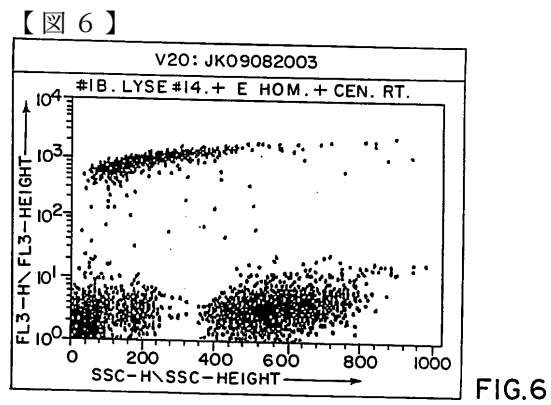
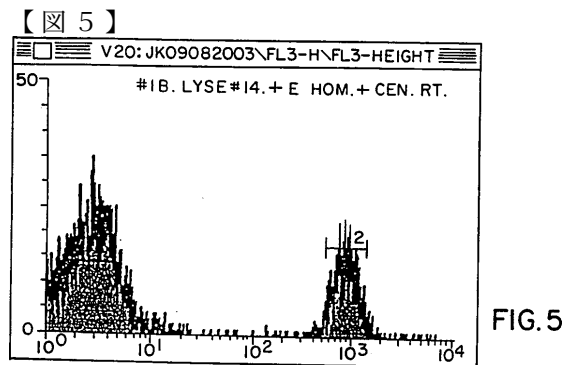
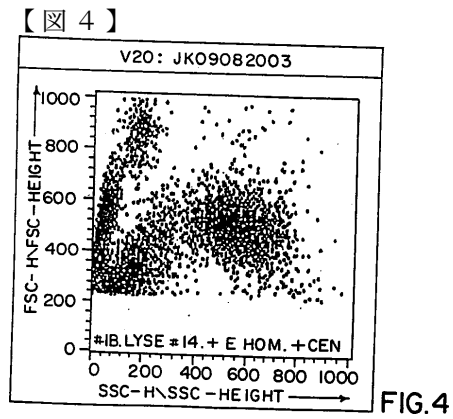
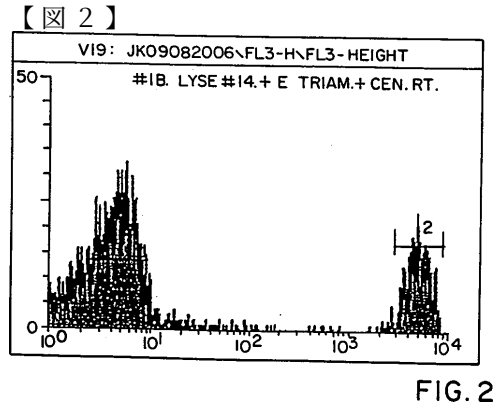
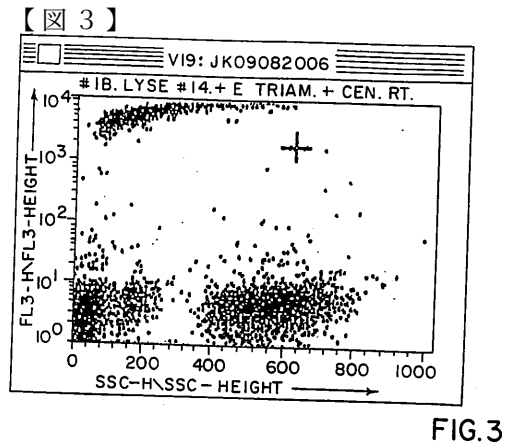
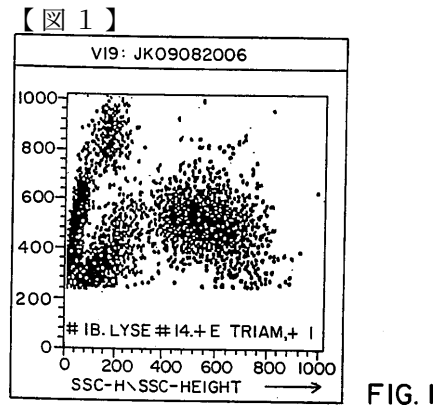
本発明およびその利点を詳細に記載してきたが、当業者ならば、添付の請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲を逸脱することなく種々の変形、置換および改変をなすことができることを理解されたい。

10

20

30

40



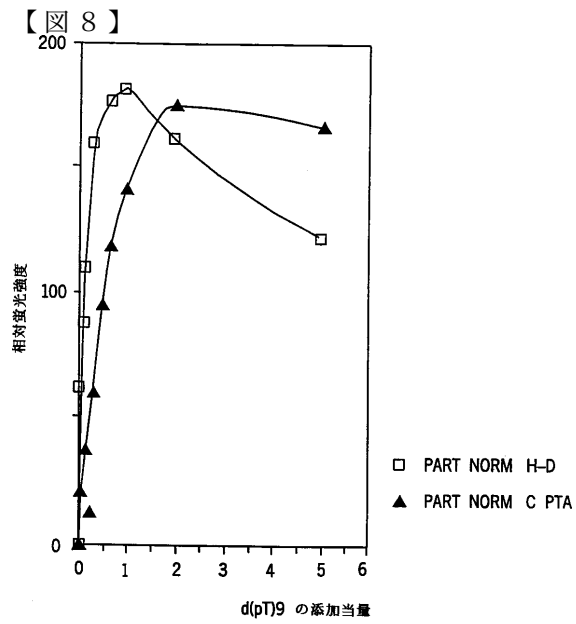


FIG. 8

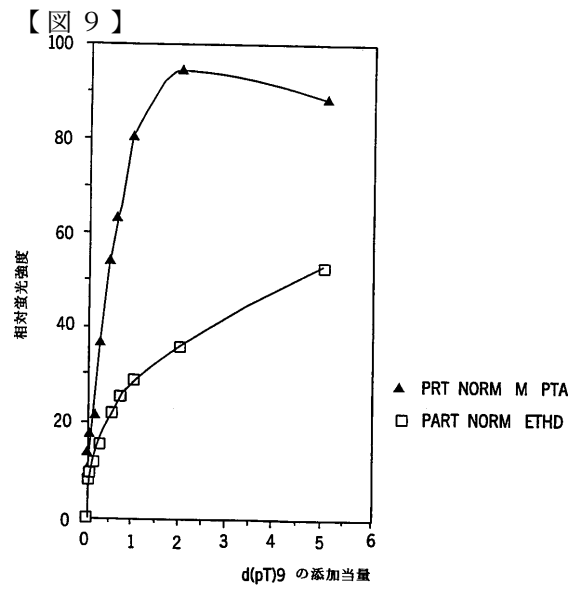


FIG. 9

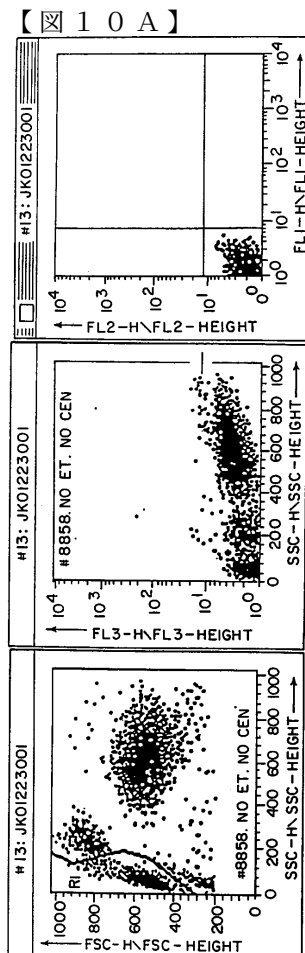


FIG. 10A

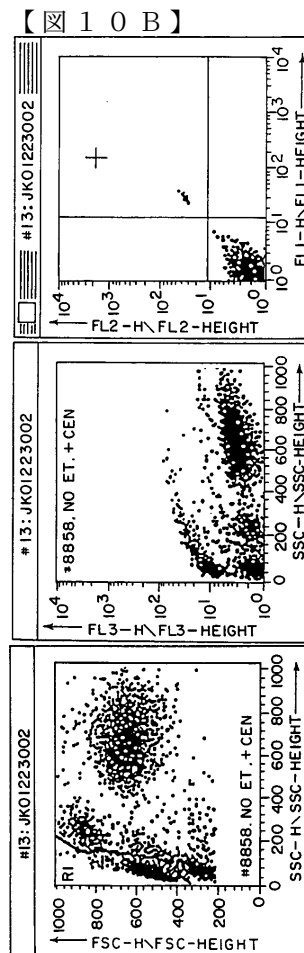


FIG. 10B

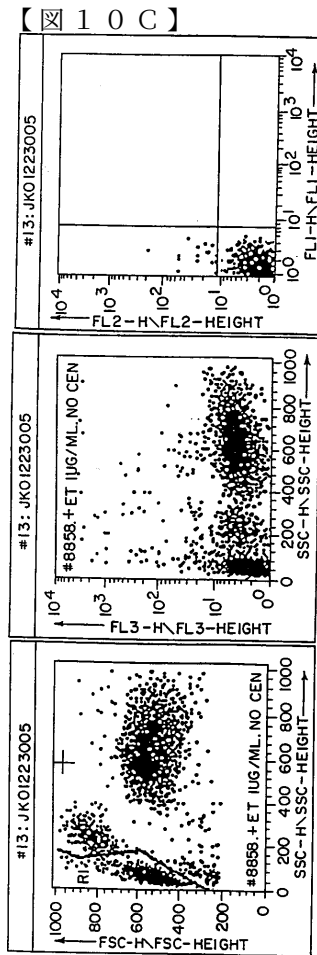


FIG. 10C

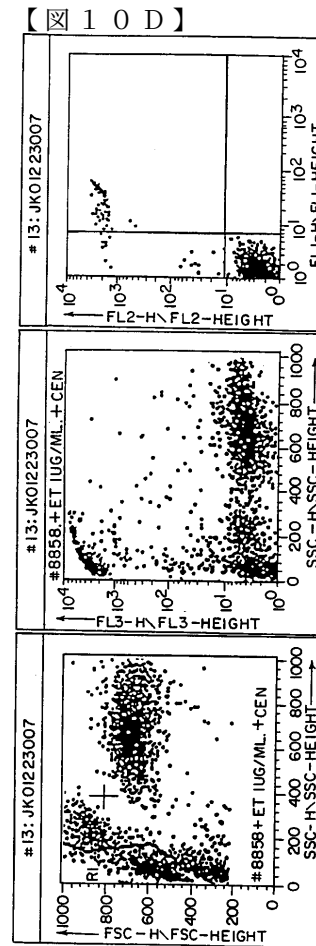


FIG. 10D

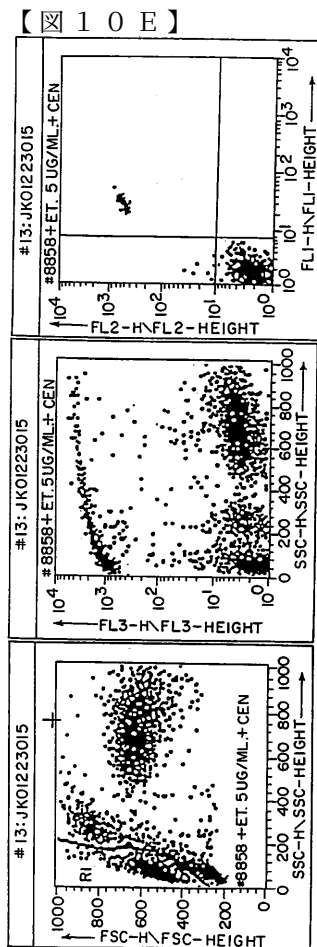


FIG. 10E

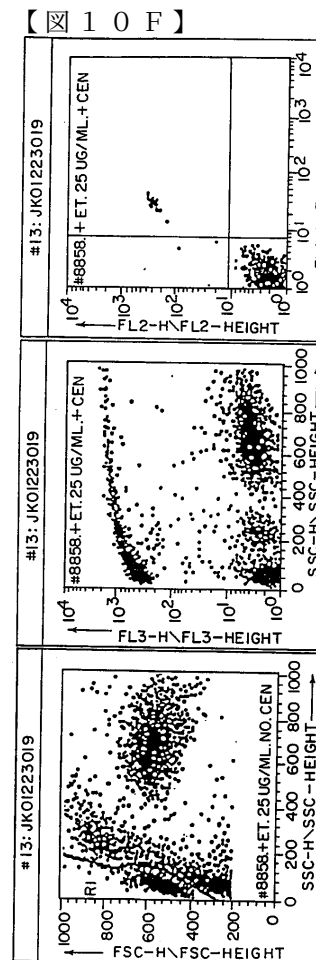


FIG. 10F

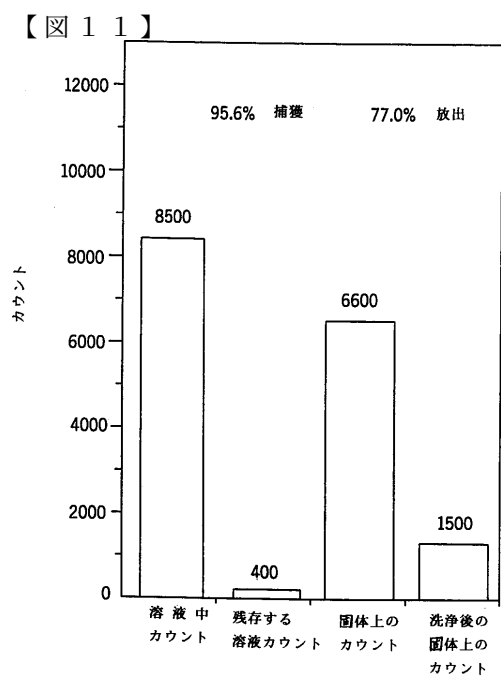


FIG. 11

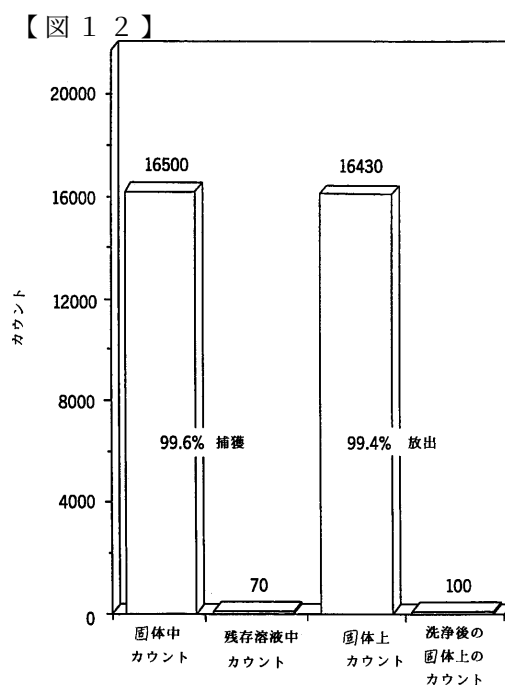
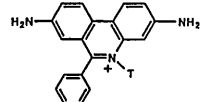
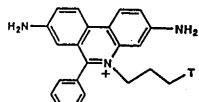


FIG. 12

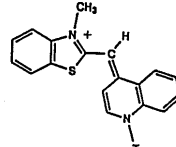
【図 1 3 A】



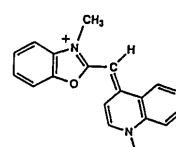
フェナトリジニウム

12

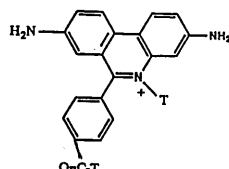
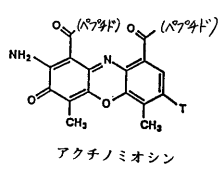
【図 1 3 B】



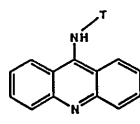
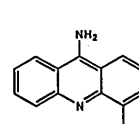
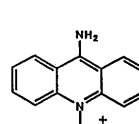
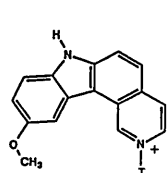
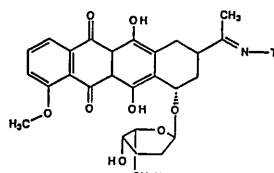
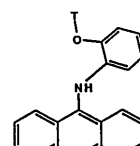
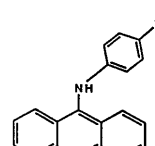
チアゾールオレンジ

7

オキサゾールイエロー

83

アクチノミオシン

491011561213

9-アミノアクリジン類

FIGURE 13A

FIGURE 13B

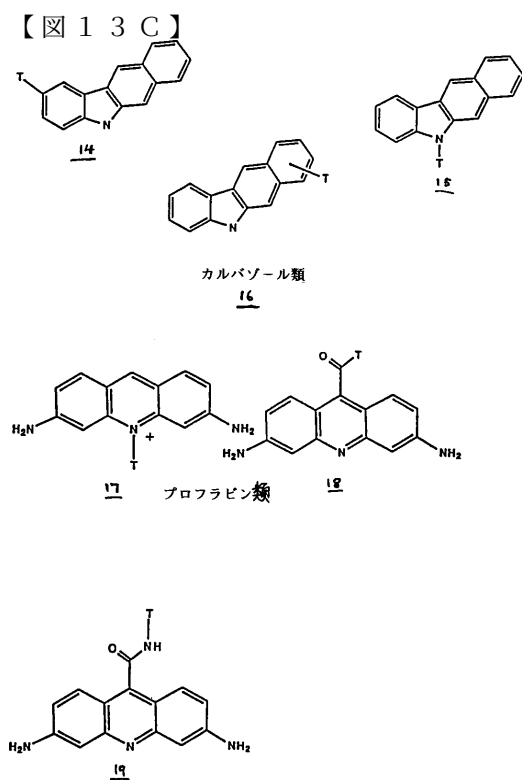


FIGURE 13C

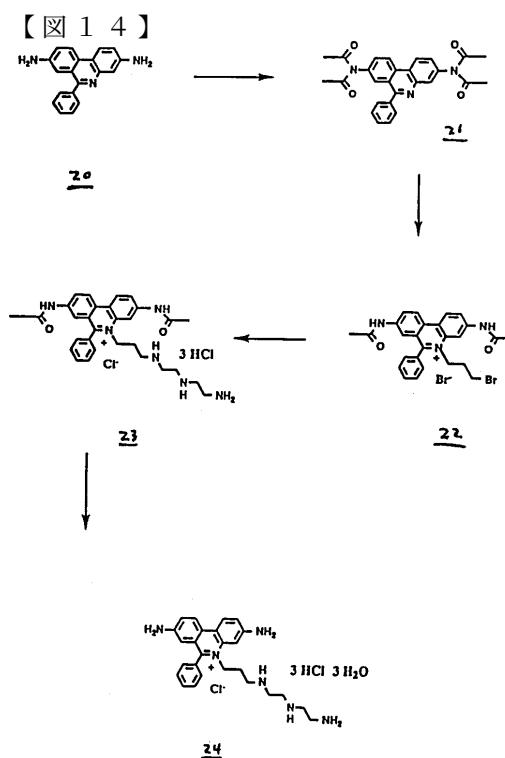


FIGURE 14

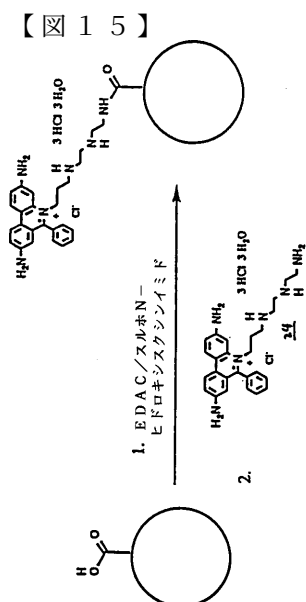


FIGURE 15

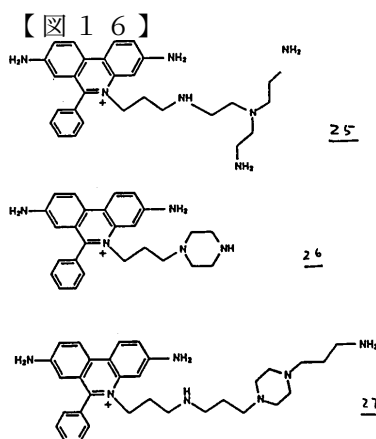


FIGURE 16

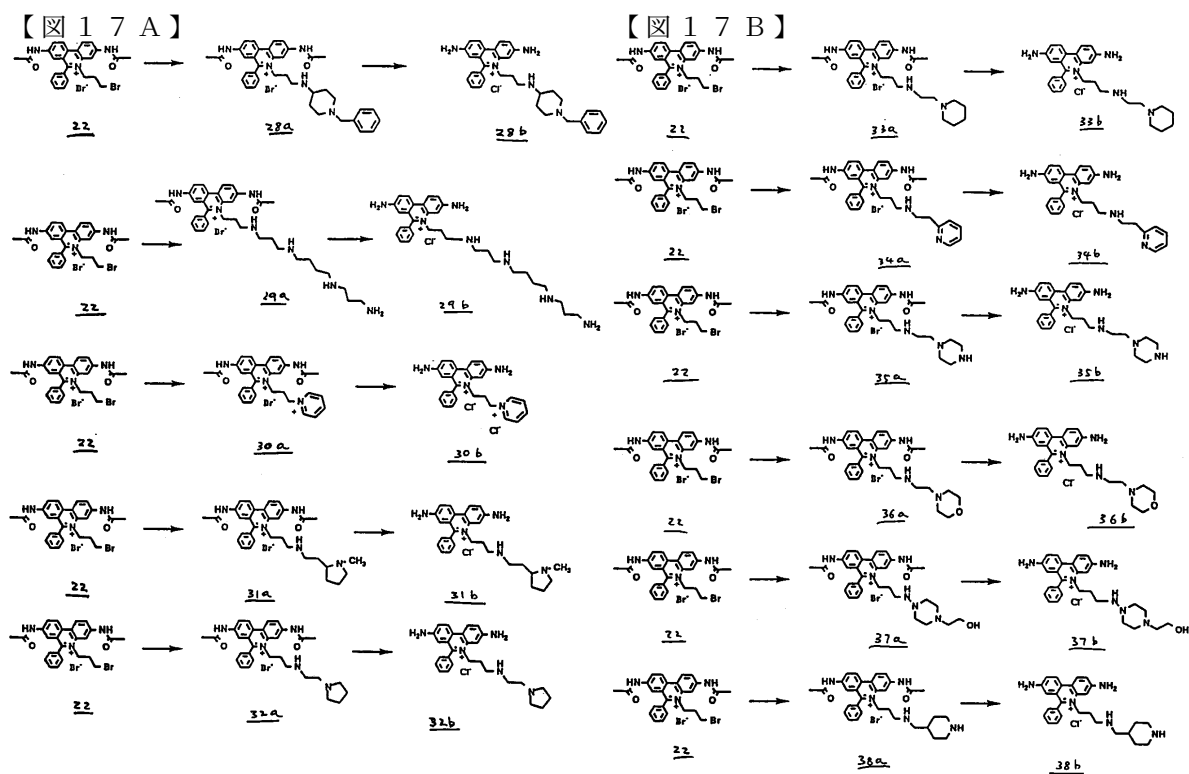


FIGURE 17A

FIGURE 17B

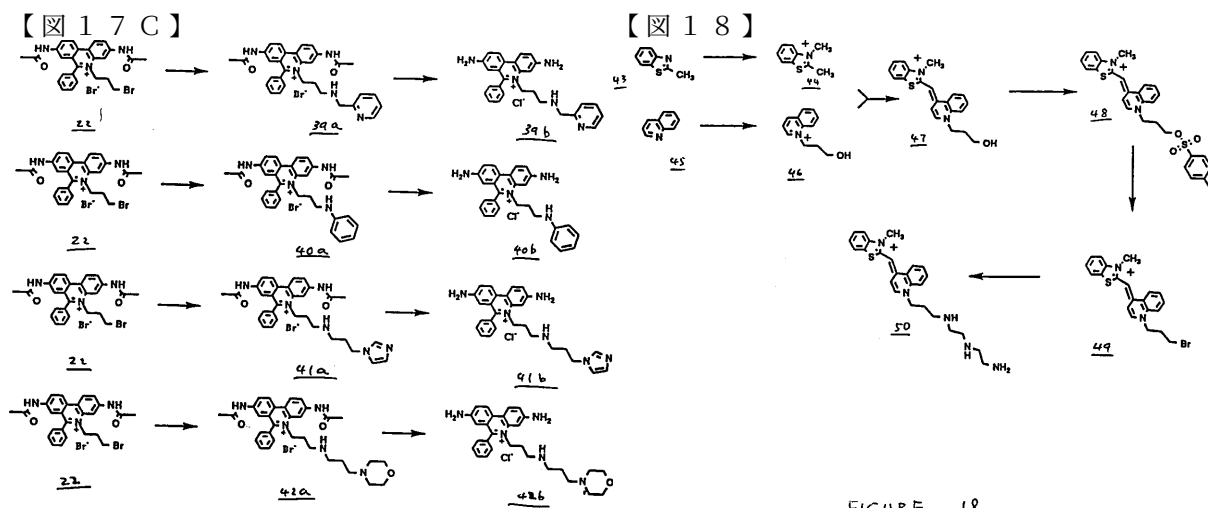


FIGURE 17C

FIGURE 18

【図 19】

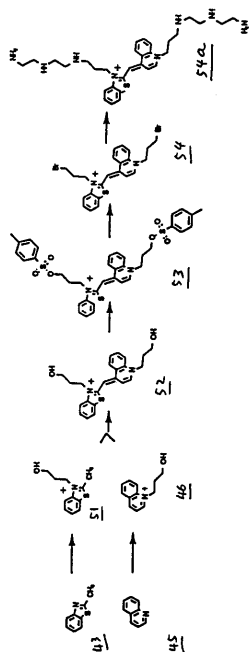


FIGURE 19

【図 20】

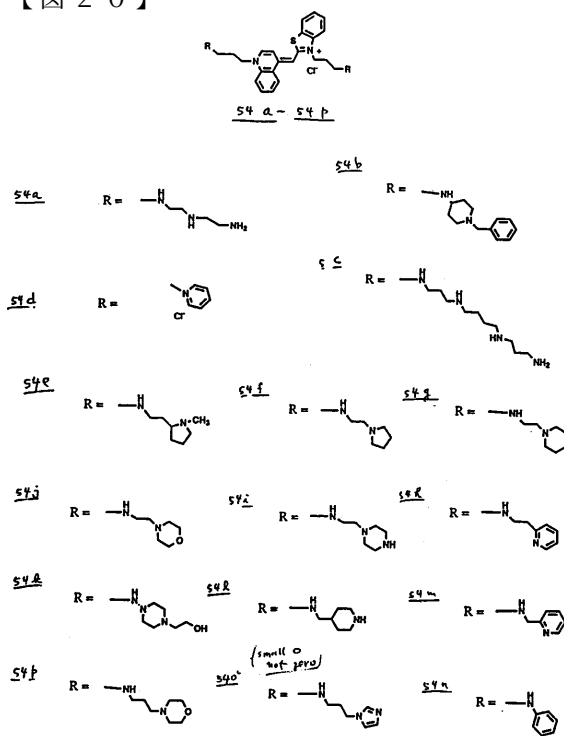


FIGURE 20

【図 21】

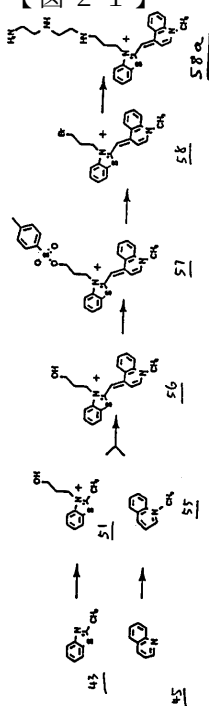


FIGURE 21

【図 22】

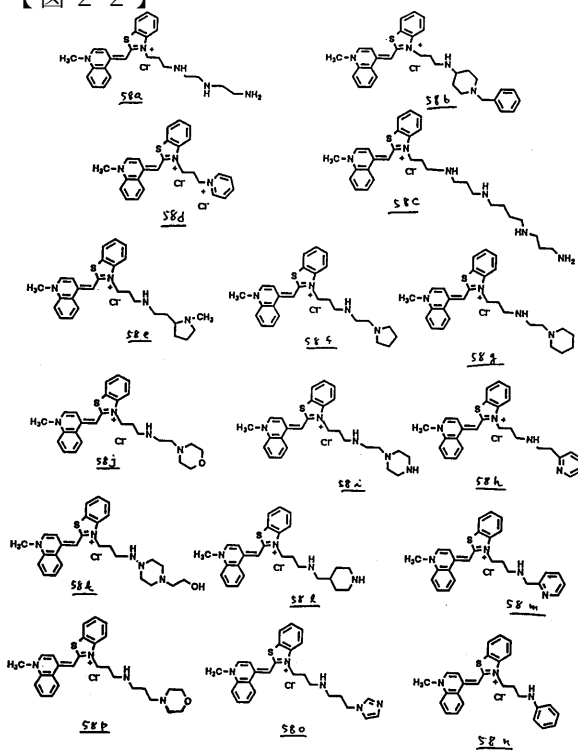


FIGURE 22

【図 23】

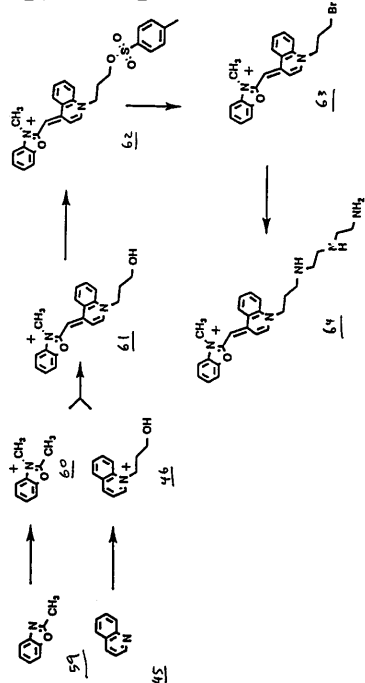


FIGURE 23

【図 24】

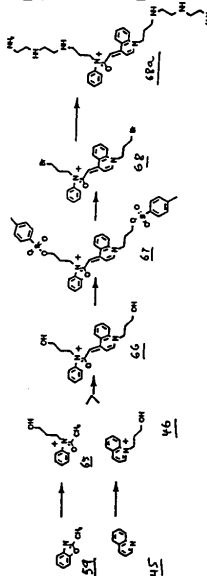


FIGURE 24

【図 25】

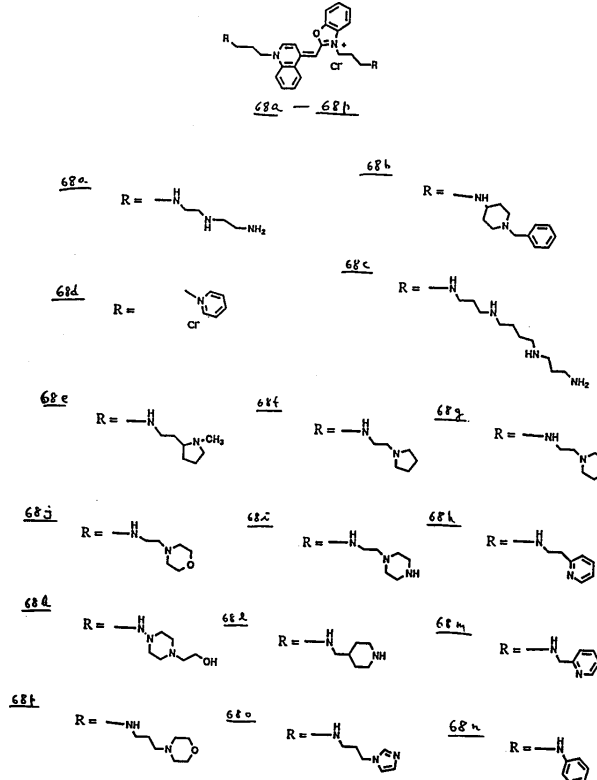


FIGURE 25

【図 26】

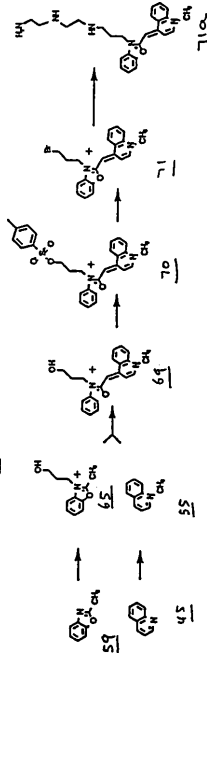


FIGURE 26

【図 27】

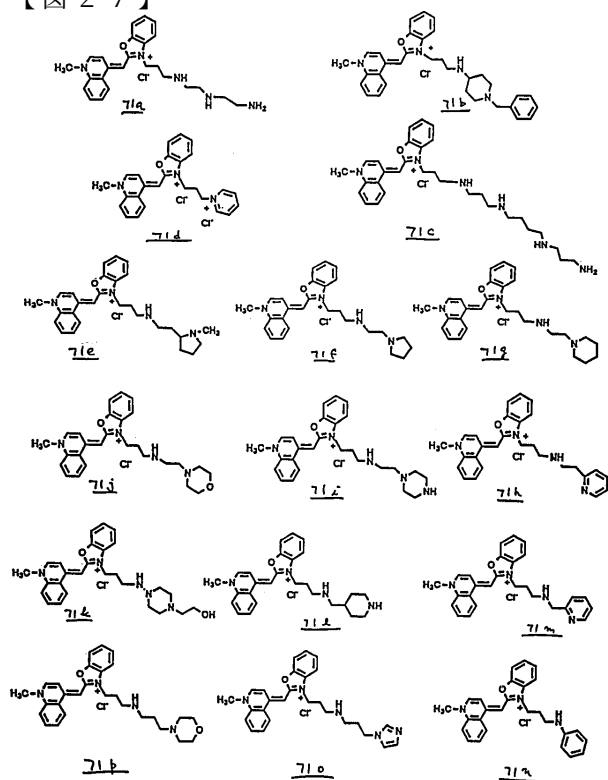


FIGURE 27

【図 29】

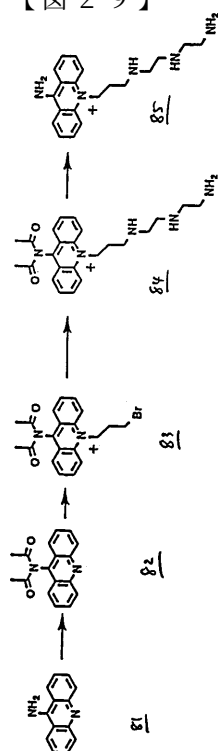


FIGURE 29

【図 28】

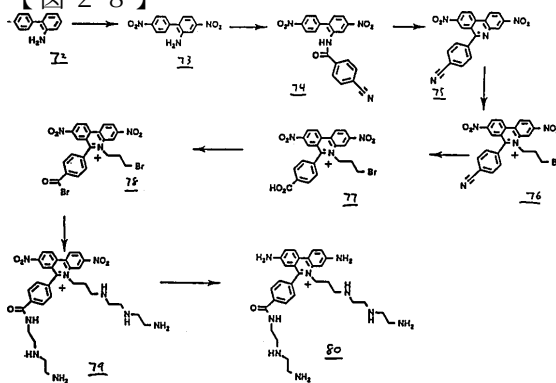


FIGURE 28

【図 30】

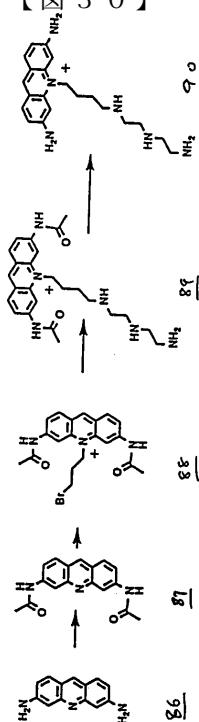


FIGURE 30

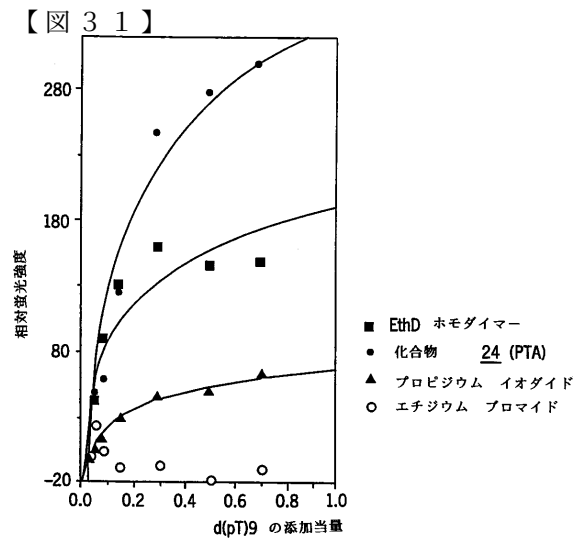


FIG. 31

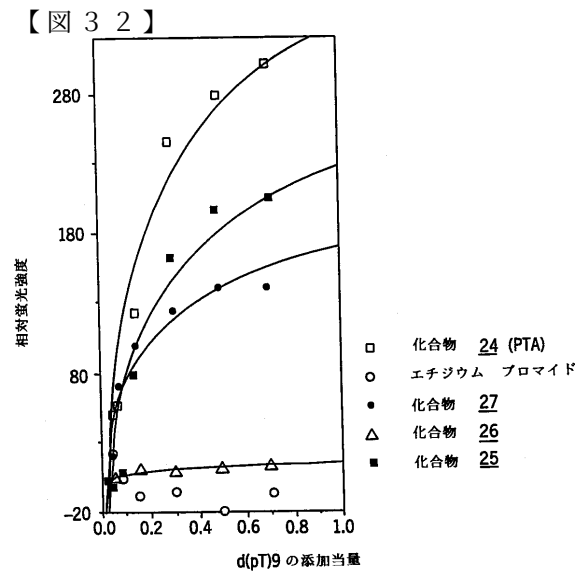


FIG. 32

フロントページの続き

- (72)発明者 ビーニアーズ, クリストファー
アメリカ合衆国、イリノイ・60035、ハイランド・パーク、オールド・トレイル・718
- (72)発明者 ハフ, ジェフリー・ブルース
アメリカ合衆国、イリノイ・60068、パーク・リッジ、ノース・リンカーン・アベニュー・837
- (72)発明者 ヘンラード, デニス・アール
アメリカ合衆国、イリノイ・60045、レイク・フオレスト、イースト・チェリー・アベニュー・700

審査官 新留 素子

- (56)参考文献 特表平09-500403 (JP, A)
特表平08-505776 (JP, A)
Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences, Serie D: Sciences Naturelles,
1976年, Vol.283, No.11, pp.1365-1367
Biochemistry, 1978年, Vol.17, No.24, pp.5071-5078
J. Am. Chem. Soc., 1989年, Vol.111, pp.1299-1306
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07D221/12
C09K 11/06
CA(STN)
CAOLD(STN)
REGISTRY(STN)