

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536900

(P2004-536900A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C09B 23/00	C09B 23/00	2G045
C12N 15/09	GO1N 33/58	4B024
GO1N 33/58	C12N 15/00	4B063
// C12Q 1/68	C12Q 1/68	4H056

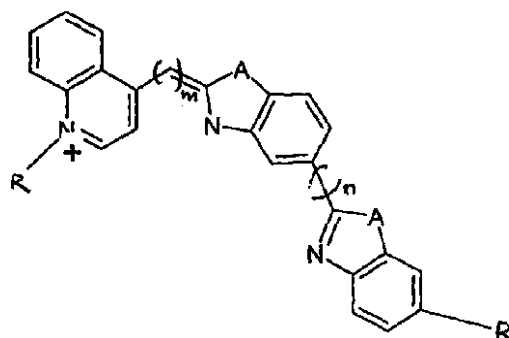
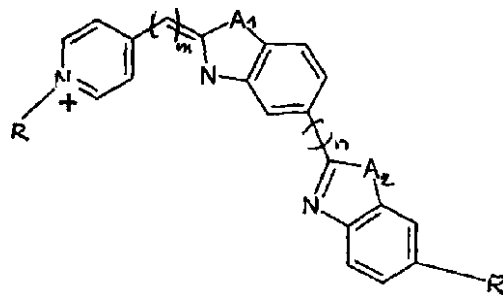
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 89 頁)

(21) 出願番号	特願2002-587511 (P2002-587511)	(71) 出願人	502020641 ライトアップ テクノロジーズ アーペー スウェーデン国 141 44 フッディ ンゲ ルナスティゲン 5
(86) (22) 出願日	平成14年5月10日 (2002.5.10)	(74) 代理人	100073128 弁理士 菅原 一郎
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月7日 (2003.11.7)	(72) 発明者	ウェストマン, ギュンナー スウェーデン国 エス-438 92 ハ リダ アスムンドトルプスヴァーゲン 6
(86) 国際出願番号	PCT/SE2002/000860	(72) 発明者	カールソン, ヨナス スウェーデン国 エス-411 03 イ ェーテボリ オディンスガタン 24 ビ ー 004
(87) 国際公開番号	W02002/090443	Fターム(参考)	2G045 DA12 DA13 DA14 FB02 FB07 FB12
(87) 国際公開日	平成14年11月14日 (2002.11.14)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	0101651-8		
(32) 優先日	平成13年5月10日 (2001.5.10)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		

(54) 【発明の名称】 [ポリ (dA-dT)] 2 バインダーの小溝としての新規なシアニン染料の合成と評価

(57) 【要約】

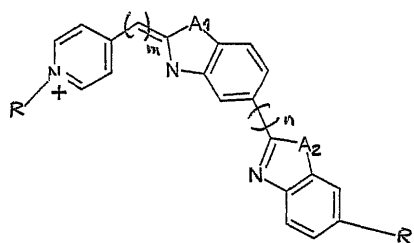
式 (I) による新規なシアニン染料であり、A₁とA₂とは各独立にO、SまたはNおよびRはHまたは炭化水素で、異種原子を含有し、mは0~5、nは0~5である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

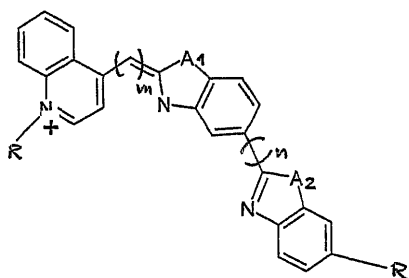
【化 1】



10

または

【化 2】



20

からなる群から選ばれ、かつ A_1 、 A_2 がそれぞれ独立に O、S または N であり、R が H または異種原子を含有する炭水化物であり、m が 0 ~ 5 であり、n が 0 ~ 5 であることを特徴とする DNA の溝に結合するシアニン染料。

【請求項 2】

R がメチルまたはエチルであり、m が 1 であり、n が 0 であることを特徴とする請求項 1 に記載のシアニン染料。

【請求項 3】

R がメチルまたはエチルであり、m が 1 であり、n が 0 であり、 A_1 、 A_2 が S であることを特徴とする請求項 1 に記載のシアニン染料。

30

【請求項 4】

R がメチルまたはエチルであり、m が 1 であり、n が 0 であり、 A_1 、 A_2 が O であることを特徴とする請求項 1 に記載のシアニン染料。

【請求項 5】

R がメチルまたはエチルであり、m が 1 であり、n が 0 であり、 A_1 が S であり、 A_2 が O であることを特徴とする請求項 1 に記載のシアニン染料。

【請求項 3】

2 - 位にピリジン/キノリン環を有していることを特徴とする請求項 1 に記載のシアニン染料。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 2 のシアニン染料を含有した核酸ハイブリダイゼーション用プローブ。

40

【請求項 5】

DNA テンプレートのリアルタイム PCR - 反応実施方法であって、二重鎖 DNA 中の小溝位置において見られたときに蛍光反応を増加する蛍光染料が用いられ、該染料がそれぞれ少なくとも 1 個の窒素原子を含有する少なくとも 2 個の芳香族環システムを含有しており、該芳香族環が 4 個までの炭素原子を有するアルキル基によって結合されて共役結合を形成しており、さらに該染料が、強固な共役システムを提供する単一結合またはアセチレン結合などの顕著な二重鎖特性を有する結合を介して、自身に結合された少なくとも 1 個の第 3 の芳香族システムを含有していることを特徴とする PCR - 反応実施方法。

【請求項 6】

50

染料が非対称シアニン染料であることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

シアニン残基のひとつが S および / または O を含有していることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

染料化合物が三日月形であることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

染料が請求項 1 ~ 2 の 1 以上による誘導体であることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNA 配列用、中でも [ポリ(dA - dT)]₂ 小溝バインダーに特に適する、新規シアニン染料に関するものである。

【背景技術】

【0002】

組み合わせ化学、人間のゲノム配列、微細化、つまりラボラトリーオンチップ、ナノ化学の導入によって、「新規化学的実体」の広範なライブラリを創ることが可能となった。数百万ものこれら「新規化学的実体」を、そのアクティブサイトと薬剤を識別するために、高処理量スクリーニングで迅速に試験しなければならない。

【0003】

DNA 小溝内で、DNA に可逆的に結合するための薬剤が、抗がん性と抗ウイルス性とを具える、新規リード化合物生成の助けを借りて、ついに合成された。以前は、放射性プローブが薬剤 - DNA 間の相互作用研究のために用いられたが、最近数年前から、別の蛍光遺伝子検定に置換えられ始めた。

【0004】

今日では、薬剤 - DNA 間相互作用は、主として次の方法で研究される。つまり、スペクトル吸収、蛍光染料遷移検定、フットプリンティング、あるいは NMR で主として研究される。蛍光マーカーの数は数種に限られるので、現存品の限界を回避できる、新規蛍光染料を発見すべく挑戦が行なわれている。

【0005】

小溝内で結合する新規蛍光遺伝子化合物は、次の両方で良く機能することができる。つまり、染料遷移検定においても機能し、置換物が小溝確認要素としていかに良く作用するかの見通しを得るためにも機能できる。

【0006】

蛍光遺伝子化合物は、励起すると大収量の量子を発するので、多大な感度を提供することができる。ひとつの限界は、ターゲットとハイブリダイゼーションしたり、反応したときに、多量の蛍光増加を与えるフルオロフォアが、それほど数多くないことである。

【0007】

非対称形シアニン染料は、その優れた核酸染色特性の故に、多大な関心を集めてきた。そのような染料を核酸に結合すると、通常蛍光強度が大幅に増加する¹ので、DNA 用蛍光マーカーとして、様々な場面²⁻⁴で幅広く使われている。

【0008】

二重鎖 DNA と、非対称形シアニン染料との相互作用、TO と YO (図 1) は、多くの研究においてスペクトル的に研究され、特別な形態ではなく⁸、層間挿入⁵⁻⁷により結合することが発見された。

【0009】

これらはまた、一重鎖 DNA とも強固に結合し、蛍光強度の大幅な増加を伴う⁹。二重鎖 DNA 信号だけが欲しい研究においては、このことは、かえって本染料の有用性を損なう

10

20

30

40

50

。

【0010】

しかし、一重鎖DNA、つまりDAPI¹⁰、およびHoechst（ヘキスト）-誘導体¹¹にではなく、選択的に二重鎖DNAに結合する、層間挿入の代わりに、小溝に結合する蛍光リガンド（配位子）が存在する。

【0011】

大部分のシアニン染料と対照的に、これらのリガンドは、むしろA/Tリッチセグメントに対して、選択的にDNA配列を有する¹²。その上、層間挿入染料に比較して、それらのリガンドは、結合したDNA-複数部位におよぼす動揺が少ない。

【0012】

このことは、例えばある種の蛍光顕微鏡試験¹³、¹⁴のような、DNAが引き伸ばされないことが肝要な、研究には貴重である。

【0013】

しかし、小溝バインダーは、非対称形シアニン染料がDNAに結合されたとき、1000倍以上も増加したのと同等には、劇的な蛍光増加を示すわけではない。¹

【0014】

BO（図1）については、400倍の蛍光増加が報告された¹⁵が、一方で、HoechstとDAPIはそれぞれ、~95倍¹⁶と~20倍¹⁷の蛍光増加を示した。

【0015】

DNA用ラベルとしての非対称形シアニン染料のもうひとつの利点は、吸収最大値波長が比較的長いことであり、これが生物的材料からのバックグラウンド吸収の問題を軽減してくれることである。

【0016】

DNAに結合したときの、図1で示す染料の吸収最大値波長は、概略435nm~510nmの範囲であり⁶、⁹、¹⁷、ちなみにHoechst 33258（Hoechst）とDAPIは約350nmである¹⁷。

【0017】

小溝結合リガンドの形態と、通常の非対称形シアニン染料の、光物理的特性とを結び付ける染料は、このように、DNAの検出と研究に多大な価値を有する。

【0018】

そのような染料を目指す最初の努力として、我々は非対称形シアニン染料BEBO（方式1）をデザインした。この染料は、層間挿入染料BOと同じシアニン発色団を有するが、その構造は第6位置にベンゾチアゾール（benzothiazole）で置換し、延長されている。

【0019】

ベンゾチアゾール部分の位置取りは、別の小溝バインダー、つまりHoechstと同様に、BEBOに三日月型形状を与える。市中で入手可能なアニリン1置換のベンゾチアゾールから出発するBEBO合成短距離ルートは、ベンゾチアゾール・グループ（方式1）選択を動機付けた。

【0020】

加えて、ふたつのベンゾチアゾール部分を含む対称形シアニン染料が、小溝内でモノマー¹⁸またはダイマー¹⁹のいずれかとして、結合することを示唆した。

【0021】

ここで我々は、BEBOとBO類似染料の合成とDNA結合研究について述べる。

【0022】

今日最も頻繁に使われるフルオロフォアは、フルオロセイン、BODIPY、DAPI、Hoechst、およびTO、YO、およびTOTOのような非対称形シアニン染料である。

【0023】

フルオロセイン、およびBODIPYは、タンパク質の標識用同位体として、一番良く知

10

20

30

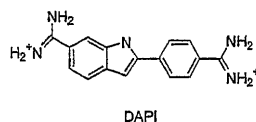
40

50

られた蛍光発生剤グループであり、一方、D A P I、H o e c h s t、およびシアニン染料は、一番良く知られた核酸検出用のフルオロフォアである。

【0024】

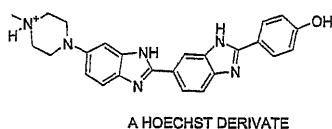
【化1】



D A P I

【0025】

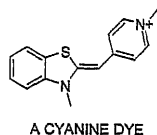
【化2】



H o e c h s t 誘導体のひとつ

【0026】

【化3】



シアニン染料のひとつ

【0027】

D A P I (吸収最大波長400nm)、およびH o e c h s t (吸収最大波長350nm)は、小溝内で結合し、DNAに結合すると20倍の蛍光増加を示す、DNA用ベース特定蛍光プローブとして使用される。

【0028】

これと対照的に、非対称形シアニン染料は、DNAに結合すると18000倍もの蛍光増加を示した。

【0029】

これらはまた、芳香族環間の二重結合数を変えることにより、吸収および発光が簡単に变化できるという利点を有する。しかしながら、非対称形シアニン染料の最大の問題点は、それらが通常DNA配列に対して非特定形態で結合することである。(つまり、層間挿入、または、DNAに対しイオン-ペアー配位化合物を形成し、その結果、複雑な、または弱い蛍光信号になってしまうことである。)

【0030】

従って、もっと組織的に結合するシアニン染料ならば、ハイブリダイゼーションすると、高度な蛍光増加が見られ、かくして一層高感度なフルオロフォアとなるであろう。

【0031】

小溝は攻撃に便利な部位(サイト)である。何故なら、それらの部位は通常、タンパク質のような細胞化合物で塞がれていないからである。それらはまた、マイナスの静電気電圧と、小溝が凹型フロアであるが故に、凹型カチオン染料に対し、完全な補体である。

【0032】

ある種の小溝バインダーは、DNA複数部位を安定化させ、DNA-タンパク質の制御機構として機能することができる。その結果、配列-特化小溝バインダーが作用すると、抗がん性、および/または、抗ウイルス性を具える新規化合物が生成される可能性があり、

10

20

30

40

50

かくして、アンチセンスオリゴヌクレオチド治療方針に対する、代替および補体的アプローチとして役立つ。

【0033】

その上、小溝バインダーのDNA複数部位上での安定化効果は、小溝リガンド-核酸共役を含むプローブ内で、プローブ-DNA複数部位の融点(T_m)を高めるために使うことができる。プローブの融点T_mを上昇させると、一層フレキシブルな検定デザインが可能になる。何故なら、プローブ内のオリゴは、一層短くでき、しかもなお、最適の融点T_mを有するからである。

【0034】

配列選択的小溝バインダーはまた、ミスマッチ識別もできる。リポーター・グループとしての、小溝バインダーによる核酸プローブは、マッチしたT_mと、シングル型ミスマッチ核酸のふたつの中で、リポーター・グループとしての、対応する層間挿入を有するプローブよりも、増大した差異を持つべきである。このようにして、ハイブリダイゼーション検定の識別力が強化される。

10

【0035】

小溝バインダーの有益な形態のひとつは、一重鎖DNAに対するよりも、二重鎖DNAに対する選択性があることであり、他方で、層間挿入は通常、一重鎖でも、二重鎖DNAでも特に選択性を持たない。

【0036】

この形態は、次のことに帰結する。つまり、小溝バインダー・プローブは、層間挿入によるプローブよりも、低いバックグラウンド蛍光を有し、その結果、ハイブリダイゼーション後には、一層大きな信号/雑音比を有することに帰結する。

20

【0037】

その上、複数部位-DNA用の特定染料は、RNA、または一重鎖DNAが混濁した、混合物中のDNA定量化にも使用することができる。

【発明の要約】

【0038】

ひとつの挑戦は、それぞれが別々の、良く分離された発光スペクトルを有する蛍光染料であって、正確に結合でき、かくして一連のターゲットの、高感度なマルチ検出を可能にするような、高感度な蛍光染料群を数多く開発することである。

30

【0039】

先に述べたように、シアニン染料は、ハイブリダイゼーションすると18000倍もの蛍光増加を示すことができ、これは今日使われている小溝バインダーに比べ、約1000倍の蛍光増加である。

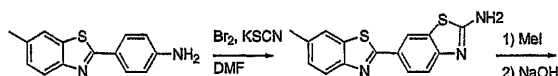
【0040】

また、光吸収、発光特性は、シアニン染料の共役システムを変化させることにより、容易に調整できる。かくして、小溝に結合することが主目的の、シアニン染料置換物ではあるが、しかし、保有できた公知シアニン染料群の、特別な蛍光発光特性により、これらは極めて興味有るターゲット化合物である。

【0041】

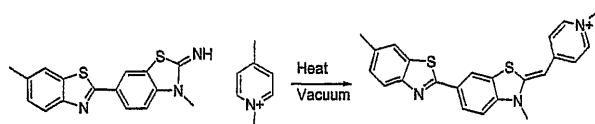
40

【化4】



【0042】

【化5】



50

【0043】

小溝バインダーの凹型構造で発想し、ベンゾチアゾール、および関連構造グループが、小溝の検知を支配することができるということを新発見したので、上述した方法により、ベンゾチアゾール・グループを付加した非対称形シアニン染料置換物を、設計し合成した。

【0044】

この新規染料とDNA間の相互作用について、例えばフローLD、およびCDのような、種々の分光分析的手法で研究した。

【0045】

これらふたつの技法は、薬剤が層間挿入によりDNAに結合しているか、小溝結合しているかについての、情報を提供する。CDの弱い誘起は通常、層間挿入に付随し、一方で、非対称誘起は、小溝結合によるものである。小溝結合は、フローLDにおいて強力な信号を与える。

10

【0046】

子牛胸腺DNAの存在下で、フローLDスペクトルにおいて弱いポジティブな信号が観察された。このことは、層間挿入された染料と、小溝結合染料との混合物内での、異種間結合による可能性が有る。

【0047】

他方、ポリ[(dA - dT)]₂の存在下では、小溝結合を強く示唆する、明確にポジティブなLDが示された。

【0048】

ポリ[(dG - dC)]₂だけの存在下では、弱いネガティブな信号が観察された。このことは、異種間結合、または、層間挿入された僅かな染料の存在を示唆する。

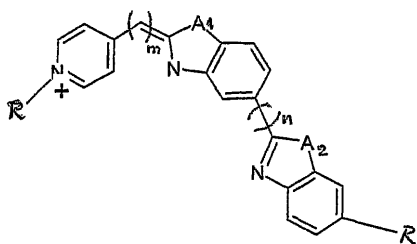
20

【0049】

以下の化合物が上記したような問題を解決することが明らかになり、この発明は以下のような新規な化合物を主たる特徴とするものである。DNAの溝に結合するシアニン染料であって

【0050】

【化6】

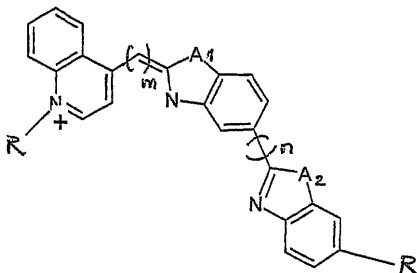


30

または

【0051】

【化7】



40

【0052】

からなる群から選ばれ、ここでA₁とA₂とはそれぞれ独立にO、SまたはNであり、RはHまたは異種原子を含有することのできる炭水化物であり、mは0～5であり、nは0～5である。

50

【0053】

一実施例のシアニン染料にあっては、Rはメチルまたはエチルで、mは1であり、nは0である。

【0054】

一実施例のシアニン染料にあっては、Rはメチルまたはエチルで、mは1であり、nは0であり、A₁、A₂はSである。

【0055】

一実施例のシアニン染料にあっては、Rはメチルまたはエチルで、mは1であり、nは0であり、A₁、A₂はOである。

【0056】

一実施例のシアニン染料にあっては、Rはメチルまたはエチルで、mは1であり、nは0であり、A₁はSであり、A₂はOである。一実施例のシアニン染料は2-位にピリジン/キノリン環を有している。

【0057】

この発明の核酸ハイブリダイゼーションのためのプローブは上記したようなシアニン染料を有している。

【0058】

またDNAテンプレートのリアルタイムPCR反応を実施するこの発明の方法にあっては、二重鎖DNA中のミラー溝位置において見たときに蛍光反応を増加させる蛍光染料が使われており、該染料が少なくとも1個の窒素原子を含有する少なくとも2個の芳香族環システムを有しており、該環が4個までの炭素原子を有したアルキン基により連結されて共役結合を形成しており、さらに該染料は、強い共役システムを提供する単一結合やアセチレン結合などの顕著な二重鎖特性を有した結合を介して、それに結合された少なくとも1個の第3の芳香族システムを含有している。

【0059】

この発明の方法の実施例においては、染料が非対称シアニン染料である。他の実施例ではシアニン残基のひとつはSおよび/またはOを含んでいる。他の実施例では染料化合物は三日月形である。他の実施例では染料は上記したような一般的構成の誘導体である。新規な染料は明らかに異なるやりかたで豊A-Tおよび豊G-C領域に結合する。CD測定の結果からこの新規な染料の溝結合が支持されている。

【0060】

ポリGCについては信号はほとんど見られず、これは層間挿入または外部結合に一致する。一方ポリATについては非常に強い非対称誘導が見られる。

【0061】

それは豊A-T領域の小さな溝に結合し、その故にDNAデュプレックス中のG-C結合よりも多くA-T結合を安定化する。したがって、豊A-T領域が小溝バインダーの下に配置されるようにプローブが設計されるならば、それをプローブ中に用いて食違い識別を改良することができる。

【0062】

興味あることに、ベンゾチアゾール基が小溝認識要素としての利用性を有しているという予備報告を我々の結果も際立たせているのである。もしそうならば、小溝中に結合する新規な薬剤を設計する可能性を開くことになるので、これは重要な発見である。

【0063】

我々の最初の結果によれば、小溝バインダーとして作用する非対称シアニン染料を設計提供することが可能である。

【0064】

さらにこの発明の観念を広げると、置換シアニン染料についてのより合成の道があるので、最初のステップはメチン置換基からのオルト位の窒素、2-BEBOである。

【0065】

【化8】

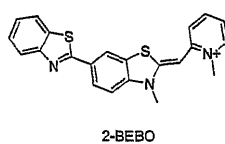
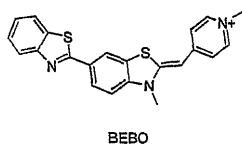
10

20

30

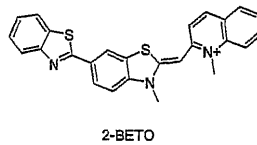
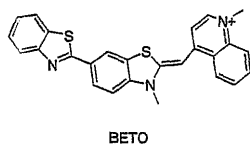
40

50



【 0 0 6 6 】

【 化 9 】



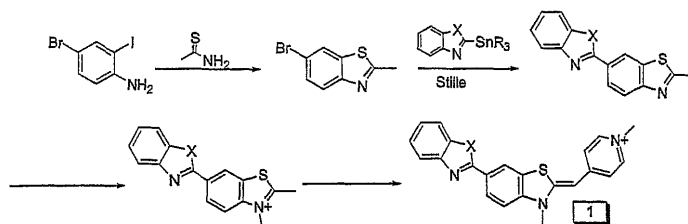
10

【 0 0 6 7 】

2種のキノリン誘導体、BETOおよび2-BETO、の合成と共にベンゾキサゾールとベンゾイミダゾール誘導体の合成も行える。これらの新規なベンゾキサゾールとベンゾイミダゾール置換染料の合成は若干異なる合成過程による。

【 0 0 6 8 】

【 化 1 0 】



20

【 0 0 6 9 】

同種の化合物のスチレ結合とベンゾキサゾール - とベンゾイミダゾール - スタナンの合成については文献がある。最後のステップである化合物1とピリジンまたはキノリン塩との縮合は非対称シアニン染料の合成に通常使用される。

【 0 0 7 0 】

合成。一般に非対称シアニン染料は、一方の塩に脱離基として作用するチオメチル基を有した2種の1/4複素環式塩の縮合により、調製される。しかしDeligeorgiev他²⁰により開発された代りの縮合方法は市販の4-置換アニリン1(方式1)から出発する4ステップだけでBEBOへの合成過程を提供する。チオシアン化カリウムとDMF中のプロミンによるアニリン1のチオシアン化により40%収量の2-アミノベンゾチアゾール2を与える^{21、22}。イオドメタンによる2のメチル化およびそれに続く全体で77%収量のデプロトネーション(deprotonation)により2-イミノ-3-メチルベンゾチアゾリン3が製造される。真空下160でピリジン塩4と一緒にベンゾチアゾリン3を単に溶解することにより、染料BEBOは24%で調製される²⁰。

30

【 0 0 7 1 】

比較DNA結合研究を可能とすべく、Zhou他(方式2)²³による変更処理を用いた従来の方法で、推定層間挿入染料BO(1-メチル-4-[(3-メチル-2(3H)ベンゾチアゾリジン)メチル]ピリジン-イオダイド)が合成された。トリエチルアミンを塩基として用いてのジクロロメタン中でのピリジン塩4とベンゾチアゾリウム塩5の縮合により46%収量で該染料が与えられた。

40

【 0 0 7 2 】

線型二色性測定。BEBO中のベンゾチアゾール置換基により引き起こされるそのDNAとの相互作用への効果を研究すべく、類似染料BOの結合研究も比較として行われた。図2に異なるDNAを有したBEBOとBOのフロー線型二色性(LD)スペクトルを示す。ここでLDは、配列の顕微鏡軸に対して平行および垂直に偏光された光の吸収の相違と

50

して、定義される。配列DNAリガンド錯体のLDスペクトルは角度で分析して結合構造についての情報を提供することができる。この角度はDNA螺旋軸とリガンドの電子転移モーメントがなす角度である²⁴。

【0073】

DNA錯体の配列は外回転シリンダーを用いたフロークエットセルで達成された。[ポリ(dA-dT)]₂(ポリ-AT)存在下BEBOについて明らかなポジティブLDが示されて、小溝結合の強い顕示を提供している(図2)。等方吸収によるLD分離で得られた還元LDから、BEBOの長波長転移モーメントとDNA螺旋との間の角度は44度であると計算された。これは既知の小溝バインダー、例えばDAPI²⁵についての角度と同じである。BEBOの主たる転移モーメントはピリジンと最も近いベンゾチアゾール環²⁶とを繋ぐ線にほぼ沿って偏光されるものと期待できる。

10

【0074】

子牛胸線DNA(ctDNA)の存在下でのBEBOについて示されたより弱い信号は、対称シアニン染料¹³についての従来の研究で提示されるように、多分小溝中での結合によるものでその角度は54度に近い。しかしポリ-ATへの結合角度44度にCD-滴定データ(下記参照)を加えるとctDNAへのより複雑な結合が結論され、結合モードの混合の結果平均して低いLD信号となる。ヘキストとDAPIとはAT-豊領域への小溝結合を好むものであるが、非古典的な層間挿入過程^{27、28}によってGC配列に結合するものと考えられる。[ポリ(dG-dC)]₂(ポリ-GC)を伴ったBEBOの還元LDスペクトルはDNA基表示層間挿入(データは示さず)についてと同じ振幅のネガティブ値を示すので、このモデルはここでも応用できるようである。

20

【0075】

BEBOの結合とは対照的にLD測定によれば、層間挿入によりBOは研究された全ての3種の異なるポリヌクレオチド、つまりctDNA(図2)、ポリ-ATおよびポリ-GC(図3)に結合する。BO構造のベンゾチアゾール拡大により引き起こされる結合モードの変化は特にポリ-ATの場合に明白である。

【0076】

円形二色性測定。ポリ-AT(図4a)の存在下で誘発されたBEBOのためのポジティブCDは小溝中における結合により強い支持を与えるものである²⁹。図4aは結合比RでのBEBO中へのポリ-ATの滴定であって、塩基当たりの染料分子の総数として定義され、0.025~0.1と変化する。最大結合比におけるBEBOの大なるCD振幅は、密に結合された発色団間の励起子結合相互作用により、合理化される。これは図4a中でCスペクトル(R=0.1)からBスペクトル(R=0.05)を減算することにより示され、励起子結合(D、図4a)に独特なスペクトルを形成する。

30

【0077】

ctDNAが存在すると誘発されるCDは小さいが、それでも染料の層間挿入または外部積重ねが大きな振幅への上昇を与えないだろう。かくして小溝中には顕著な量の染料が残っていないなければならない。図4bに0.0125~0.10の結合比RでのBEBO中へのctDNAの滴定を示す。ポリ-ATへのBEBOの結合の場合のように、高い結合比における密に離間したリガンド間の励起子結合相互作用の兆しがある。振幅は小さくなるが、低い結合比では、信号は対応するポリ-ATスペクトルのそれと類似する。

40

【0078】

ポリ-GCにBEBOが結合すると非常に小さな誘発CD(図5a)が起き、GC領域への層間挿入結合モードを支持する。これがctDNAへの結合に際して得られる低CDの主な原因になるようである。しかし交互するGC-とAT-セグメントの単なる混合物よりもctDNAがより複雑であることは留意しなければならない。

【0079】

ctDNAの存在下におけるCDスペクトルの振幅はポリ-ATスペクトルの約1/4である。ctDNAへの結合がAT-領域への溝結合とGC-領域への層間挿入の混合であるならば、75%は層間挿入流で結合されるだろう。その場合LDは顕著によりネガティ

50

ブであるので、これは持ち応えられない。かくして交互 A T に結合される場合よりは、実質的な染料の量は低誘発 C D を与える位置に非層間挿入流で c t D N A に結合されなければならない。

【 0 0 8 0 】

c t D N A の存在下での B O についての C D 信号は若干ネガティブであり（データは示さず）、これが B O に比べての B E B O の結合モードの違いを示している。

【 0 0 8 1 】

ポリヌクレオチド結合嗜好。ポリ - G C およびポリ - A T 存在下での B E B O についての C D 信号振幅の顕著な相違の故に、簡単な実験で可能性のある A T 嗜好を調べることが可能である。ポリ - G C (R = 0 . 0 5) の存在下での B E B O の試料にポリ - A T が添加されると、C D 信号は劇的に増加されて、ポリ - A T (図 5 a) への著しい嗜好を示す。これらのスペクトルはポリ - G C (図 4 a) なしでのポリ - A T 存在下での B E B O の C D スペクトルと一致するが、信号の振幅は若干低い。

10

【 0 0 8 2 】

同様な実験が行われて、ポリ - A T と c t D N A に対する B E B O の結合親和性を比較した。再び c t D N A の存在下での B E B O の試料にポリ - A T が添加された。ポリ - A T の添加により C D 信号の増加があったが、試料が最初にポリ - G C (図 5 b) を含んでいた場合ほど大きくはなかった。かくしてそれらの比ではまだかなりの量の染料が c t D N A に結合したが、このことは B E B O を顕著に牽引する c t D N A 中の交互 A T 領域とは他の結合位置がなければならないことを示している。

20

【 0 0 8 3 】

蛍光性および吸光度測定。異なる核酸を伴った B E B O の蛍光性および吸光度を表 1 にまとめて示す。他の非対称シアニン染料と類似して B E B O は D N A に結合すると蛍光性が大きく増加する。B E B O のポリ - A T に対する明らかな小溝結合により、蛍光強度が 1 8 0 倍向上し、c t D N A とポリ - G C への結合の際の増加は若干より大である。緩衝液中では、結合染料の 4 9 2 n m に比べて自由染料の放射ピークは 5 4 2 n m である。溶液とした緩衝液の代わりにエタノールを用いると、自由染料放射は 4 9 2 n m に移行し、蛍光強度はほぼ 1 0 倍低くなる。最近 D N A の存在・非存在下での T O の集合が、吸光度と蛍光性の分光器により研究されて、集合形成による同様な徴候が観察された³⁰。かくして、緩衝液中におけるより長い放射最大量の 2 量体または高位の集合は染料の疎水性により形成されるのである。

30

【 0 0 8 4 】

水中における自由 B E B O の吸収スペクトルの形状からして二量体または集合 (図 6) の存在が示唆される。異なるメタノール - 水混合物中における B E B O の吸収測定によれば、実質的な増加が認められ、メタノール (図 6 b) の増量とともに吸収度における赤方偏位が認められた。染料分子は純粋メタノール中に単量体として存在するものと推定される。メタノール中の自由 B E B O の吸収スペクトルおよび D N A に完全に結合した B E B O のスペクトルは非常に類似した形状を有しており、これは染料が単量体として低結合比で結合していることを示している。

【 0 0 8 5 】

要約すると、B O の構造変化は、層間挿入から小溝結合への結合モードの移行、を誘発することが分かった。さらに我々の結果からすると、小溝認識部分としてのベンゾチアゾールの潜在能力が示唆される。染料は市販のアニリン 1 から 4 つのステップだけで合成できる。C D - および L D - スペクトルから推定されるように、ポリ - A T への B E B O の結合は小溝中であることが明らかである。D A P I およびヘキストのそれと同様に、ポリ - G C への B E B O の結合は主として層間挿入による。

40

【 0 0 8 6 】

他方ランダム配列 c t D N A では B E B O は混成的に相互作用する。しかし G C セグメントへの層間挿入および A T 領域への小溝結合は c t D N A について得られた L D - および C D - 結果の唯一の説明にはならない。B E B O のための c t D N A には他に好ましい結

50

合サイトがなければならず、該サイトはポリ - A Tではなくて低 C Dを誘発するものである。しかし C D信号の比較的大きな振幅からして、c t D N Aへの B E B Oの小溝結合の顕著な貢献があると言える。他の小溝バインダーと同じく、B E B Oはポリ - G Cに比べてポリ - A Tへの明らかな嗜好を有している。ポリ - A Tの小溝への結合に際しての蛍光増加はヘキストと D A P Iについてより大きい。B E B Oの結合性、特にそのポリ - A Tへの強い小溝結合は小溝結合への強い嗜好を具えた新規なクラスの非対称シアニン染料の開発と結合に際しての蛍光性の大きな増加を約束するものである。類似の染料の合成と研究とは進行中でありいずれ適切な機会に報告する。

【 0 0 8 7 】

実験例。反応様式による調製。市販のアニリン 1 から出発して 4 ステップで染料 1 を調製した。D M F中のチオシアン化カリウムおよびプロミンと 4 - 置換アニリン 1 とのチオシアン化により収量 4 0 %で 2 - アミノベンゾチアゾール 2 を得た。化合物 2 のメチル化と脱プロトン化収量 7 0 %で進み、2 - イミノ - 3 - メチルベンゾチアゾリン 3 を製造した。化合物 3 をピリジン塩 4 と一緒に真空下 1 6 0 で溶解して、染料 5 が 2 0 %中で調製された。

10

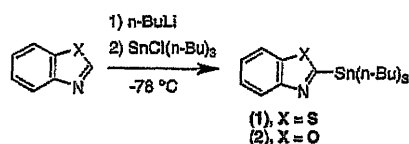
【 0 0 8 8 】

合成。ベンゾチアゾールとベンゾオキサゾールとをそれぞれ n - B u L i で - 7 8 で処理してから t i i - n - 塩化ブチルチンを添加することにより、2 - (T i i - n - ブチルスタニル) - ベンゾチウオール (1) および 2 - (T r i - n - ブチルスタニル) - ベンゾオキサオール (2) を調製した。

20

【 0 0 8 9 】

【 化 1 1 】



方式：有機スタナンの調製。

【 0 0 9 0 】

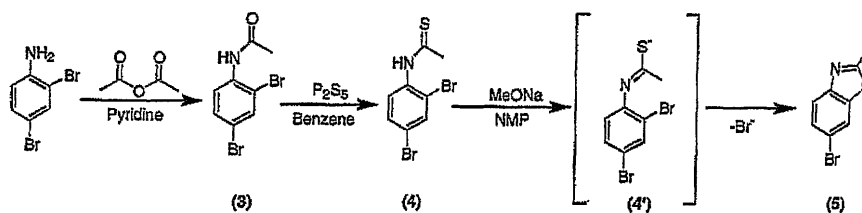
6 - プロモ - 2 - メチル - ベンゾチアゾール (5)。2 , 4 - ジブromo - ウイリンをピリジン中でアクチック (a c c t i c) 無水物で処理して、アセトアニリド (3) を得た。還流ベンゼン中で (3) をフォスフォラス・ペンタサルファイドと反応させて、スルファ- (s u l p h u r) 原子によりカルボニル酸素を置換して、チオアセトアニリド (4) を得た。(3) から (4) の分離は、水性 N a O H による抽出により、容易に達成された。スルファ- (s u l p h u r) 原子は酸素より大きくより偏光可能であり水溶性チオアセトウイリデアニオン (4 ') を形成することができるので、これが可能である。この (4 ') を形成する能力は最後のステップでも利用され、(4) がメトボオキサイド・ナトリウム処理され、2 - 位のプロミンの除去により閉環に至り、生成物 (5) を得た。バルブ - ツー - バルブ (b u l b - t o - b u l b) 蒸留による N M P の除去により、(5) が昇華により容易に純化されることが分かった。

30

40

【 0 0 9 1 】

【 化 1 2 】



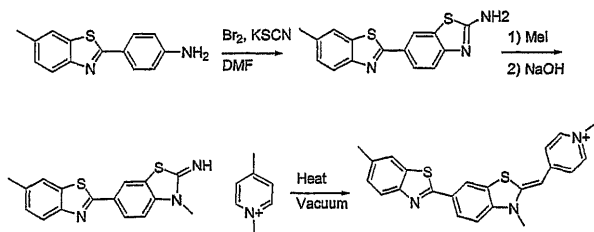
【 0 0 9 2 】

50

方式：2, 4 - ジブロモ - アニリンからの (5) の調製。

【0093】

【化13】



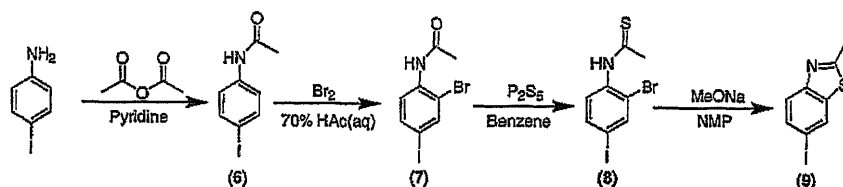
10

【0094】

6 - ロド - 2 - メチル - ベンゾチアゾール (9)。 (5) の合成とそのイオド類似物 (9) は非常に似ている。しかしこの場合、ジハロゲン化アセトアニリド (7) が 4 - イオド - アニリンのアシル化により達成されて続く臭素化により (6) を与える。この臭素化ステップにおいて 4 - 位のイオジンのあるものはプロミンで置換された。(7) からの形成された 2, 4 - ジブロモ - アセトアニリドの分離は成果がなかった。分子比 3 : 1 での (9) と (5) の混合物が結果された。これにも拘わらず混合物は以下の S t i l l e 結合反応に用いられた。

【0095】

【化14】



20

方式：4 - イオドアニリンからの (9) の調製。

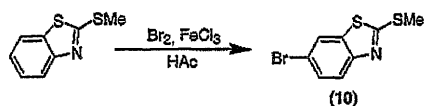
【0096】

6 - ブロモ - 2 - メチルチオ - ベンゾチアゾール (10)。後続の反応では使用されないが、他のハロゲン化電子物質、6 - ブロモ - 2 - メチルチオ - ベンゾチアゾール (10) が調製された。(10) の合成は、以下の方式に見られるように、全く複雑ではない。FeCl₃ を触媒として 2 - メチルチオ - ベンゾチアゾールが酢酸中でブロム化されるだけである。

30

【0097】

【化15】



方式：2 - メチルチオ - ベンゾチアゾールの 6 位でのブロム化。


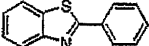

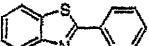

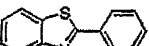
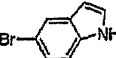
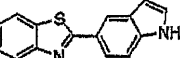
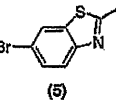
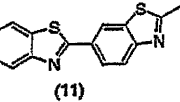
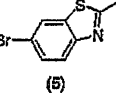
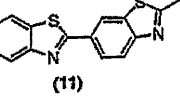
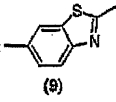
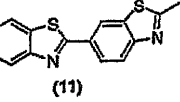
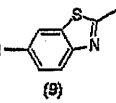
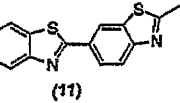
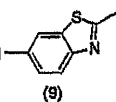
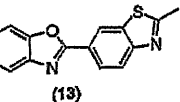
40

【0098】

S t i l l e 結合。パラジウムが触媒作用をする架橋反応を研究し最適化すべく、異なる出発物質および 2 種の異なる触媒上の中性リガンドを用いて多数の実験が行われた。しかし実験の部分において (11) と (13) の合成を示す過程は全て S t i l l e 結合に従った。CuI が結合への共触媒的効果の故に使用された。表 1 はこの作業で行われた S t i l l e 実験の要約である。

【0099】

【表1】

Entry	Organostannane	Arylhalide	Catalyst	Product	Yield
1	(1)		Pd(PPh ₃) ₄		Low
2	(1)		Pd(PPh ₃) ₄		72%
3	(1)		Pd(AsPh ₃) ₄		33%
4	(1)		Pd(PPh ₃) ₄		0%
5	(1)		Pd(PPh ₃) ₄		0%
6	(1)		Pd(AsPh ₃) ₄		0%
7	(1)		Pd(AsPh ₃) ₄		0%
8	(1)		Pd(PPh ₃) ₄		98%
9	(2)		Pd(PPh ₃) ₄		95%

10

20

表1：行われたStille反応の要約

【0100】

出発点1において、フラッシュクロマトグラフィー（シリカ上にクロロフォルム）にも拘わらず純生成物は分離できなかった。しかしマススペクトロメトリーにより少量の生成物は確認された。プロミンに比べて秀れた求電子剤へのイोजンの挙動については既に記載したところであり、したがって期待された。この性質は脱離基として作用するイोजンの大きな能力によるものである。出発点4～7における実験の失敗は、プロミンに対して4位の窒素がその自由電子対をアリル環へ与えるからであり、それにより求電子剤を不活性にするものと考えられる。いずれにせよブロム化された求電子剤を用いようと試みる理由はその容易な合成にある。出発点8～9におけるアリルハライドは(9)と(5)との3:1(モル-)混合物であり、表1の収量は(9)の量についてのみ計算したものである。これは出発点4～7におけるブロム化求電子剤の反応の鈍さによるものである。

30

【0101】

パラジウム-リガンドとしてのトリフェニルアルシンの使用が報告されており、トリフェニルフォスフィンに比べて、1100倍までの反応速度増加が見られる2"1。でも驚いたことに、実施された実験においてはトリフェニルアルシンはトリフェニルフォスフィンより効果が劣っていた。皮相的ではあるが、これはリガンドとしてのトリフェニルアルシンの優秀さによるのだろう。つまりPd(0)をより酸化し易くし触媒をトリフェニルフォスフィンに関してよりもより空気に敏感にするからだろう。反応槽に少量の空気/酸素汚染があると、トリフェニルアルシン配位パラジウムの触媒効果が低減され、フォスフィン-リガンドを含んだ触媒は影響が少ない。

40

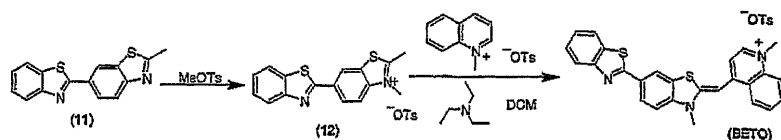
【0102】

BETOとBOXTO。方式8、9に示す反応により2種の新たな非対称シアニン染料BETOとBOXTOが調製された。

【0103】

50

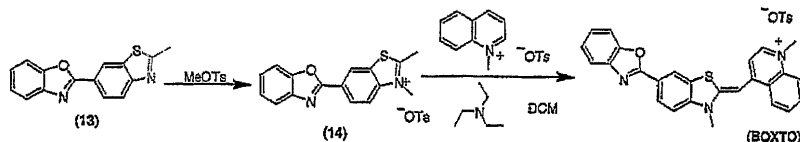
【化16】



方式8：BETOの合成における2つの最終ステップ。

【0104】

【化17】



方式9：BOXTOの合成における2つの最終ステップ。

【0105】

(11)と(13)とを過剰の熔融メチルトシレートで処理することにより、メチル化塩(12)と(14)が70%、56%の収量で形成された。これらの塩はジクロロメタン中で1-メチル-キノリニウムトシレートと反応して所望の染料を製造した。最終ステップでの収量は27%、30%であった。

【0106】

水の添加によりブロックマンIII級まで非活性化された酸化アルミニウム(活性化、中性、ほぼ150メッシュ)を用いてカラム・クロマトグラフィーが行われた。融点はメトラーフ82HTホットステージ顕微鏡上で決定された。Varian UNITY-400 NMRスペクトロメーターを用いて¹H(400 MHz)および¹³C(100.6 MHz) NMRスペクトルが記録された。化学シフトはppmで、溶融ピークに関してはDMSO(¹Hについては2.50、¹³C NMRについては39.51)。J値はHzで与えられた。VGZabSpec装置を用いて高解像度マススペクトルが記録された。

【0107】

Varian Cary 4分光光度計を用いてUV-visスペクトルが測定された。SPEX蛍光探索2スペクトロフルオロメーターを用いて蛍光スペクトルが記録された。JASCO 720分光偏光計上でLC、CDスペクトルが記録された。外側回転シリンダーを具えたフロー-Couetteセルを用いてDNA錯体の配列が達成された。全てのスペクトロスコピー的測定は25℃で25 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)中で行われた。BEOおよびBOの水性溶液は一般的にDMSO中の2 mMストック溶液から得られた。緩衝液中の溶液として[ポリ(dA-dT)]₂および[ポリ(dG-dC)]₂が薬局から購入された。子牛胸腺DNAはFlukaから購入された。試薬はSigma-Aldrichから購入され純化なしに使用された。ピリジン塩4およびベンゾチアゾリウム塩5は前記と同様に調製された^{2,3}。

【0108】

2-アミノ-6-(6-メチル-ベンゾチアゾール-2-yl)-ベンゾチアゾール(2)。2-(4-アミノフェニル)-6-メチル-ベンゾチアゾール1(4.0 g、16.6 mmol)とKSCN(2.6 g、26.7 mmol)がDMF(20 ml)中に溶解され氷槽中で冷却された。3 hでDMF(15 ml)中のBr₂(0.9 ml、17 mmol)が滴下添加された。混合物をさらに20 h攪拌された。水を添加し沈殿物を濾過乾燥により回収した。未精製の生成物を数部分の蒸留ジクロロメタンとともに沈殿物上で粉末にして、ライトグリーン-黄色の固体(1.97 g、40%)として2を得た。Mp 250-251℃; ¹H NMR(DMSO) 2.45(3H, s, Ar-CH₃)、7.34(1H, d, J=8.4, ArH)、7.50(1H, d, J=8.4, ArH)、7.89(1H, d, J=8.4, ArH)、7.91(1H, s, ArH)、7.99(

10

20

30

40

50

^1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 8.51 (^1H 、s、ArH)、 8.56 (2H 、s、 NH_2) ; ^{13}C NMR (DMSO) : 21.10 、 116.7 、 120.7 、 121.8 、 122.1 、 125.6 、 126.9 、 128.1 、 129.7 、 133.3 、 134.5 、 135.0 、 151.7 、 165.9 、 169.3 ; HR-FAB-MS m/z Found : 298.0521 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{S}_2$ ($\text{M} + \text{H}^+$) : requires M 、 298.0473 。

【0109】

2-アミノ-3-メチル-6-(6-メチル-ベンゾチアゾール-2-yl)-ベンゾチアゾリウムイオダイド。2-アミノベンゾチアゾール (0.3g 、 1.0mmol) を DMSO (2ml) 中に溶解した。メチルイオダイド (0.25ml 、 2.0mmol) を添加し、混合物を 110°C で 17 時間攪拌した。混合物を冷却して水中に滴下した。形成された沈殿物を濾過回収し、水で洗浄して黄色の固体状の生成物を得た (0.38g 、 86%)。Mp $267-269^\circ\text{C}$; ^1H NMR (DMSO) : 2.47 (3H 、s、Ar- CH_3)、 3.74 (3H 、s、N- CH_3)、 7.38 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 7.79 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 7.93 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 7.95 (1H 、s、ArH)、 8.22 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 8.75 (1H 、s、ArH)、 10.19 (2H 、s、 NH_2) ; ^{13}C NMR (DMSO) : 21.14 、 32.39 、 113.9 、 122.0 、 122.2 、 122.4 、 122.7 、 126.6 、 128.3 、 129.8 、 134.7 、 135.6 、 140.9 、 151.6 、 164.7 、 168.9 ; HR-FAB-MS m/z Found : 312.0638 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{S}_2$ (M^+) : requires M 、 312.0629 。

10

20

【0110】

2-イミノ-3-メチル-6-(6-メチル-ベンゾチアゾール-2-yl)-ベンゾチアゾリン (3)。2-アミノ-3-メチル-6-(6-メチル-ベンゾチアゾール-2-yl)-ベンゾチアゾリウムイオダイド (0.3g 、 0.68mmol) を DMSO (10ml) 中に得た。水を添加し (20ml)、水性 NaOH (20%) で混合物を pH 10 に塩基化し、沈殿物を濾過回収し、水で洗浄して生成物 3 をライトイエロー固体状 (0.19g 、 89%) で製造した。Mp $146-148^\circ\text{C}$; ^1H NMR (DMSO) : 2.45 (3H 、s、Ar- CH_3)、 3.38 (3H 、s、N- CH_3)、 7.16 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 7.33 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 7.87 (1H 、s、ArH)、 7.90 (1H 、s、ArH)、 7.93 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 8.16 (1H 、s、ArH)、 8.55 (1H 、s、NH) ; ^{13}C NMR 重水素化溶媒中への 4 の溶解性が乏しく分析不可能であった ; HR-FAB-MS m/z Found : 312.0619 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{S}_2$ ($\text{M} + \text{H}^+$) : requires M 、 312.0629 。

30

【0111】

4-[(3-メチル-6-(6-メチル-ベンゾチアゾール-2-yl)-2,3,4-ジヒドロ- (ベンゾ-1,3-チアゾール)-2-メチリデン)]-1-メチル-ピリジニウムイオダイド (BEBO)。ベンゾチアゾリン 3 (0.1g 、 0.32mmol) と 1,4-ジメチル-ピリジン・トシレート 4 を 160°C の真空下で一緒に 1 時間溶解した。DMSO (5ml) を添加して混合物を 30 分間還流加熱した。混合物を水性 KI (30%) に添加して、形成された沈殿物を濾過回収した。固体をメタノール-ジクロロメタン ($2:98$) で中性 Al_2O_3 上にフラッシュクロマトグラフィーで純化して、BEBO (0.04g 、 24%) を得た。Mp $280-281^\circ\text{C}$; ^1H NMR (DMSO) : 2.47 (3H 、s、Ar- CH_3)、 3.76 (3H 、s、N- CH_3)、 4.02 (3H 、s、N- CH_3)、 6.34 (1H 、s、=CH-)、 7.38 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 7.47 (1H 、d、 $J = 6.8$ 、PyH)、 7.70 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 7.93 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 7.95 (1H 、s、ArH)、 8.18 (1H 、d、 $J = 8.4$ 、ArH)、 8.39 (1H 、d、 $J = 6.8$ 、

40

50

P y H)、 8 . 6 5 (1 H、 s、 A r H) ; ¹³ C N M R (D M S O) : 2 1 . 1 3、 3 2 . 9 9、 4 5 . 1 1、 9 0 . 6 6、 1 1 2 . 0、 1 1 8 . 8、 1 2 0 . 9、 1 2 1 . 8、 1 2 2 . 2、 1 2 4 . 6、 1 2 6 . 7、 1 2 7 . 9、 1 2 8 . 1、 1 3 4 . 5、 1 3 5 . 2、 1 4 2 . 4、 1 4 2 . 5、 1 5 0 . 1、 1 5 1 . 6、 1 5 6 . 4、 1 6 4 . 9 ; H R - F A B - M S m / z F o u n d : 4 0 2 . 1 1 4 5 C₂₃H₂₀N₃S₂ (M⁺) : r e q u i r e s M、 4 0 2 . 1 1 0 5。

【 0 1 1 2 】

2 - (トリ - n - ブチルスタニル) - ベンゾチアゾール (1)。 2 0 m l のフレッシュ蒸留 T H F を 3 0 分窒素流れで還流した後、ベンゾチアゾール (1 . 0 g、 7 . 4 m m o l) を添加した。さらに 3 0 分流し、不活性窒素雰囲気下で溶液を - 7 8 に冷却した。 0 . 9 当量の n - B u L i (ヘキサン中の 2 M 溶液、 2 . 6 6 m l、 6 . 6 6 m m o l) を 3 0 分間滴下添加し、これにより溶液は濃赤色に変わった。溶液を - 7 8 で 1 h 保持し、トリ - n - 塩化ブチルチン (2 . 0 m l、 7 . 4 m m o l) を 1 h 滴下添加した。この添加の間、溶液は濃赤色から茶黄色に変化し、ついで緑青になり最後にライトブラウンになった。 - 7 8 で 1 時間後溶液を室温にした。T H F を回転蒸発器で除き、生成物、黄色油を真空中で蒸留した。収量 : 2 . 4 7 g、 7 9 %。 ¹ H N M R (C D C l₃) : 0 . 9 0 (t、 J = 5、 9 H、 B u₃S n)、 1 . 2 9 (i n、 6 H、 B u₃S n)、 1 . 3 5 (m、 6 H、 B u₃S n)、 1 . 6 3 (t、 J = 8、 6 H、 B u₃S n)、 7 . 3 7 (t、 J = 8、 1 H、 A r H)、 7 . 4 6 (t、 J = 8、 1 H、 A r H)、 7 . 9 6 (d、 J = 8、 1 H、 A r H)、 8 . 1 7 (D、 J = 8、 1 H、 A r H)。

【 0 1 1 3 】

2 - (トリ - n - ブチルスタニル) - ベンゾオキサゾール (2)。 2 0 m l のフレッシュ蒸留 T H F を窒素流れとともに 3 0 分流し、爾後ベンゾオキサゾール (1 . 0 g、 8 . 3 m m o l) を添加した。さらに 3 0 分還流した後、溶液を - 7 8 に冷却し不活性窒素雰囲気下に置いた。 0 . 9 当量の n - B u L i (ヘキサン中の 2 M 溶液、 3 . 0 m l、 7 . 6 m m o l) を 1 h 滴下添加し、これにより溶液はピンクに変わった。溶液を - 7 8 で 3 0 分保持した後、塩化トリ - n - ブチルチン (2 . 3 m l、 8 . 3 m m o l) を 1 h 滴下添加した。この添加の間、溶液はピンクからブラウンに変化した。さらに - 7 8 で 1 時間後、溶液を室温にしたら、濃赤色に変わった。T H F を回転蒸発器で除き、生成物、オレンジ油を真空中で蒸留分離した。収量 : 1 . 3 7 g、 4 0 %。 ¹ H N M R (C D C l₃) : 0 . 9 0 (t、 J = 7、 9 H、 B u₃S n)、 1 . 3 0 (m、 6 H、 B u₃S n)、 1 . 3 5 (m、 6 H、 B u₃S n)、 1 . 6 2 (t、 J = 7、 6 H、 B u₃S n)、 7 . 2 9 (t、 2 H、 A r H)、 7 . 5 5 (d、 1 H、 A r H)、 7 . 7 7 (d、 1 H、 A r H)。

【 0 1 1 4 】

2 , 4 - ジブロモ - アセトアニリド (3)。 2 , 4 - ジブロモ - アニリン (3 . 0 g、 1 2 . 0 m m o l) の溶液、 1 . 1 当量の無水酢酸 (1 . 3 5 g、 1 3 . 2 m m o l) およびピリジン (0 . 9 5 g、 1 2 . 0 m m o l) を 1 0 0 に加熱した。数分後沈殿物が形成されピリジン (~ 3 m l) を添加して沈殿物を溶解した。溶液を 1 0 0 で 2 時間保った後、室温に冷却して水に滴下した。形成された沈殿物を濾過回収し水で洗浄して白粉状の生成物を収量 (3 . 9 g、若干湿っている) で得た。 ¹ H N M R (C D C l₃) : 2 . 2 4 (a、 3 H、 - C H₃)、 7 . 4 3 (d、 J₁ = 8 . 8、 J₂ = 2、 1 H、 A r H) 7 . 6 9 (s、 J = 2、 1 H、 A r H)、 8 . 2 7 (d、 J = 8 . 8、 1 H、 A r H)。

【 0 1 1 5 】

2 , 4 - ジブロモ - チオアセトアニリド (4)。 2 , 4 - ジブロモ - アセトアニリド (2 . 2 g、 7 . 5 1 m m o l) を 1 0 m l のベンゼン中で溶解し、フォスフォラス・ペンタサルファイド (3 . 3 4 g、 7 . 5 1 m m o l) を添加した。混合物を 8 0 で還流した。数分後ゴム状の固体がフラスコの底部に形成された。固体を懸濁させて可能な攪拌をすべく、ベンゼン 2 0 m l を追加添加し混合物を激しくかき回した。 5 . 5 h 還流した後、クロロフォルム中のシリカ上の薄膜クロマトグラフィー (T L C) が完全な反応を示唆し

、熱が除かれた。室温に冷却した後、茶色のスラリーを濾過して、沈殿物をジエチルエーテルで洗浄した。NaOH (10%) でベンゼン/エーテル濾過物が2回抽出された。濃HClで塩基性水性相をpH ~ 1に酸化した。ライトブラウンのミルク状スラリーが得られた。沈殿物は濾過により回収できず、したがってスラリーをジエチルエーテルで2回抽出した。これにより黄色有機相が得られ、乾燥蒸発させてブラウン黄色油としてチオアセトアニリドが得られた。収量1.33 g、57%。¹H NMR (CDCl₃): 2.78 (s, 3H, -CH₃), 7.50 (d, J₁ = 8.8, J₂ = 1.6, 1H, ArH) 7.90 (s, J = 1.6, 1H, ArH) 8.40 (d, J = 8.8, 1H, ArH)。

【0116】

6-ブロモ-2-メチル-ベンゾチアゾール(5)。2,4-ジブロモ-チオアセトアニリド(1.33 g、4.3 mmol)と1.2当量のメトキサイド・ナトリウム(0.513 g、5.2 mmol)を3 mlのNMPに溶解した。150 で2h後室温に冷却、バルブ-ツ-バルブ蒸留によりNMPを除去した。ブラウンの残留物を昇華により純化し、白結晶の生成物を得た。収量: 707 mg、72%。¹H NMR (CDCl₃): 2.83 (s, 3H, -CH₃), 7.55 (d, J₁ = 8.8, J₂ = 1.6, 1H, ArH) 7.80 (d, J = 8.8, 1H, ArH) 7.96 (s, J = 1.6, 1H, ArH)。

【0117】

4-イオド-アセトアニリド(6)。4-イオド-アニリン(5.0 g、22.8 mmol)と1.1当量の無水酢酸(2.56 g、25.1 mmol)を3 mlのピリジンに溶解した。100 で2h後、TLCが完全な反応を示唆し、熱が除かれた。溶液が室温に達したときに、水に滴下された。形成された沈殿物は濾過回収され水で洗浄して白粉として生成物を得た。収量: 5.86 g、98%。¹H NMR (DMSO): 2.03 (s, 3H, -CH₃) 7.41 (d, J = 8.8, 2H, ArH) 7.61 (d, J = 8.8, 2H, ArH) 10.03 (s, 1H, NH)。

【0118】

2-ブロモ-4-イオド-アセトアニリド(7)。20 ml HAc_{aq.} (70%) 中の4-イオド-アセトアニリド(3.74 g、14.3 mmol)の溶液に1.1当量のブロミン(2.53 g、15.7 mmol)を滴下添加した。70 で10分の反応の後、溶液を水に滴下し、形成された沈殿物を濾過回収(3.02 g)した。¹H NMRは所望の生成物の混合物および9:4モル比で2,4-ジブロモ-アセトアニリドを呈した。総収量: 3.02 g、65%。所望生成物の収量: 2.18 g、45%。¹H NMR (CDCl₃,) : 2.23 (s, 3H, -CH₃), 7.60 (d, J₁ = 8.8, J₂ = 1.6, 1H, ArH) 7.85 (s, J = 1.6, 1H, ArH) 8.13 (d, J = 8.8, 1H, ArH)。副産物の収量: 0.84 g、20%。¹H NMR (CDCl₃) : 上記したような2,4-ジブロモ-アセトアニリドのスペクトルと一致。

【0119】

2-ブロモ-4-イオド-チオアセトアニリド(8)。総量2.87 gの2-ブロモ-4-イオド-アセトウイリド(2.08 g、6.1 mmol)と2,4-ジブロモ-アセトアニリド(0.80 g、2.7 mmol)の混合物を~10 mlのベンゼンに溶解し、フオスフォラス・ペントサルファイド(3.75 g、8.4 mmol)を添加した。混合物を80 で2h還流した。室温に冷却後、ブラウンスラリーを濾過して沈殿物をジエチルエーテルで洗浄した。ベンゼン/エーテル濾過物をNaOH (10%) で2回抽出し、濃HClで塩基性水性相をpH ~ 1に酸化した。ライトブラウンのミルク状スラリーが得られ、ジエチルエーテルで2回抽出したら、黄色の有機相が得られた。この相を乾燥蒸発させて2-ブロモ-4-イオド-チオアセトアニリドと2,4-ジブロモ-チオアセトアニリドの混合物がブラウン油として得られた。総収量: 2.14 g、71%。所望生成物収量: 1.66 g、77%¹H NMR (CDCl₃): 2.78 (s, 3H, -CH₃), 7.68 (d, 1H, ArH) 7.96 (s, 1H, ArH) 8.29 (d, 1H, Ar

10

20

30

40

50

H)。副産物収量：480 mg、57%。¹H NMR (CDCl₃)：上記したような2,4-ジブromo-チオアセトアニリドのスペクトルと一致。

【0120】

6-イオド-2-メチル-ベンゾチアゾール(9)。総量2.02 gの2-ブromo-4-イオド-チオアセトアニリド(1.57 g、4.4 mmol)と2,4-ジブromo-チオアセトアニリド(454 mg、1.5 mmol)との混合物が15 mlのNMP中に溶解した。メトオキサイド・ナトリウム(0.677 g、6.9 mmol)を添加して、混合物を150 で2.5 h攪拌した。ブラウン溶液が室温に冷却されると、バルブ-ツ-バルブ蒸留によりNMPを除去した。ブラウン残留物を昇華により純化し6-イオド-2-メチル-ベンゾチアゾールと6-ブromo-2-メチル-ベンゾチアゾール(モル比3：1)の混合物を白結晶状で得た。総収量：1.33 g、86%。所望生成物の収量：1.04 g、86%。¹H NMR (CDCl₃)：2.82 (s、3H、-CH₃)、7.68 (d、J = 8.4、1H、ArH) 7.73 (d、J = 8.4、1H、ArH) 8.16 (a、1H、ArH)。副産物収量：289 mg、86%。¹H NMR (CDCl₃)上記したような6-ブromo-2-メチル-ベンゾチアゾールのスペクトルと一致。

10

【0121】

6-ブromo-2-メチルチオ-ベンゾチアゾール(10)。10 ml酢酸中の2-メチルチオ-ベンゾチアゾール(1.14 g、6.3 mmol)とブromin(1.24 g、7.7 mmol)の溶液にFeCl₃の触媒量を添加した。120 で4 h還流した後、オレンジ反応混合物を室温に冷却し酢酸エチル中に滴下した。形成された沈殿物を濾過回収して、酢酸エチルで洗浄し、酢酸エチル中で1 h還流した。スラリーを濾過し回転蒸発で酢酸エチルを濾過物から除いて、黄色結晶状の生成物(130 mg、0.50 mmol)を得た。還流スラリーから濾過回収された沈殿物をn-ペンタンついでジエチルエーテルでSoxhlet抽出した。溶媒を蒸発すると別の少量の所望の生成物(70 mg、2.7 mmol)を得た。総収量：200 mg、0.77 mmol、12%。¹H NMR (DMSO)：2.79 (s、3H、-SCH₃)、7.61 (d、J₁ = 8.8、J₂ = 2、1H、ArH) 7.77 (d、J = 8.8、1H、ArH) 8.32 (s、J = 2、1H、ArH)。

20

【0122】

2-メチル-6-(ベンゾチアゾール-2-yl)-ベンゾチアゾール(11)。6-イオド-2-メチル-ベンゾチアゾール(169 mg、0.61 mmol)と6-ブromo-2-メチル-ベンゾチアゾール(47 mg、0.20 mmol)の216 mg混合物を10 ml DMFに溶解した。窒素とPd₂dba₃(21 mg、0.02 mmol)で溶液を30分流し、ついでトリ-フェニルフォスフィン(46 mg、0.18 mmol)を添加した。さらに15分流した後で、CuI(45 mg、0.24 mmol)を添加し、混合物を15分還流し、不活性窒素雰囲気下に置いた。2-(トリ-n-ブチルスタニル)-ベンゾチアゾール(500 mg、1.18 mmol)を添加し、混合物を60 に加熱した。60 で6 h保った後、反応混合物を室温に冷却した。DMFをバルブ-ツ-バルブ蒸留で除いてダークイエロー油を得た。この油をクロロフォルムでシリカ上にフラッシュクロマトグラフィーにより純化し、ピンク結晶状の生成物を得た。収量：169 mg、74% (6-ハロゲン化2-メチル-ベンゾチアゾールの総量について計算した)、98% (6-イオド-2-メチル-ベンゾチアゾールの量について計算した)。¹H NMR (CDCl₃)：2.89 (a、3H、-CH₃)、7.41 (t、J = 7.6、1H、ArH)、7.52 (t、J = 7.6、1H、ArH)、7.93 (d、J = 7.6、1H、ArH)、8.03 (d、J = 8.4、1H、ArH) 8.09 (d、J = 8.8、1H、ArH)、8.15 (d、J = 8.4、1H、ArH) 8.64 (s、1H、ArH)。HR-FAB-MS m/z Found：283.038 C₁₅H₁₁N₂S₂(M+H⁺)：requires M、283.036。

30

40

【0123】

2-メチル-3-メチル-6-(ベンゾチアゾール-2-yl)-ベンゾチアゾリウム・

50

トシレート (12)。2-メチル-6-(ベンゾチアゾール-2-yl)-ベンゾチアゾール (44 mg、0.156 mmol) を溶融メチルトシレート (660 g、3.5 mmol) 中で 90 で 5 h 攪拌した。室温まで冷却した後、アセトンを追加して沈殿させ、濾過回収した。沈殿物をアセトンで洗浄し、一晚乾燥させた。これによりグリーン結晶状の生成物を得た。収量：51 mg、70%。¹H NMR (DMSO)： 2.28 (s、3 H、-CH₃)、3.20 (s、3 H、CH₃)、4.24 (s、3 H、-CH₃)、7.11 (d、J = 7.2、2 H、Ar H)、7.46 (d、J = 7.2、2 H、Ar H)、7.55 (t、J = 7.6、1 H、Ar H)、7.62 (t、J = 7.6、1 H、Ar H)、8.14 (d、J = 8、1 H、Ar H)、8.25 (d、J = 8、1 H、Ar H)、8.45 (d、J = 8.8、1 H、Ar H)、8.59 (d、J = 8.8、1 H、Ar H)、9.24 (s、1 H、Ar H)。HR-FAB-MS m/z Found：297.067 C₁₆H₁₃N₂S₂(M⁺)：requires M、297.052。

10

【0124】

4-[(3-メチル-6-(ベンゾチアゾール-2-yl)-2,3-ジヒドロ-(ベンゾ-1,3-チアゾール)-2-メチル-イデン)]-1メチル-キノリニウム・トシレート (BETO)。2 ml のジクロロメタンに 2-メチル-3-メチル-6-(ベンゾチアゾール-2-yl)-ベンゾチアゾリウム・トシレート (17 mg、36 μmol) と 1-メチル-キノリニウム・トシレート (12 mg、36 μmol) を溶解した。トリエチルアミンの 2 当量 (10 μl、72 μmol) を追加して、濃赤色溶液を室温において 48 h 反応させた。この間それはブラウンスラリーに変わった。メタノール-ジクロロメタン (2：98) を用いて中性 Al₂O₃ 上にフラッシュクロマトグラフィーで BETO を赤色固体で分離した。収量：6 mg、27%。¹H NMR (メタノール-D₄)： 3.64 (s、3 H、-CH₃)、3.83 (s、3 H、-CH₃)、6.14 (s、1 H、CH)、6.71 (d、J = 6.8、1 H、Ar H)、6.91 (t、J = 7.2、1 H、Ar H)、7.02 (t、J = 7.2、1 H、Ar H)、7.29 (m、3 H、Ar H)、7.50 (m、2 H、Ar H)、7.67 (t、J = 7.2、1 H、Ar H)、7.72 (d、J = 8.8、1 H、Ar H)、7.97 (s、1 H、Ar H)、8.02 (d、J = 6.4、1 H、Ar H)、8.09 (d、J = 8.4、1 H、Ar H)。HR-FAB-MS m/z Found：438.118 C₂₆H₂₀N₃S₂(M)：requires M、438.110。

20

30

【0125】

2-メチル-6-(ベンゾキサゾール-2-yl)-ベンゾチアゾール (13)。6-イオド-2-メチル-ベンゾチアゾール (169 mg、0.61 mmol) と 6-ブromo-2-メチル-ベンゾチアゾール (47 mg、0.20 mmol) の混合物 216 mg を 10 ml の DMF に溶解した。窒素と Pd₂dba₃ (21 mg、0.02 mmol) で溶液を 30 分間流し、トリフェニルフォスフィン (46 mg、0.18 mmol) と CuI (45 mg、0.24 mmol) を追加した。混合物を 15 分間流してから、不活性窒素雰囲気中に置いた。2-(トリ-n-ブチルスタニル)-ベンゾキサゾール (481 mg、1.18 mmol) を追加して、混合物を 60 に加熱した。60 で 7 h 保った後、反応混合物を室温に冷却した。DMF をバルブ-ツ-バルブ蒸留で除いた。残りの油をクロロフォルムによりシリカ上にフラッシュクロマトグラフィーで純化して、赤色結晶状の生成物を得た。収量：154 mg、71% (6-ハロゲン化 2-メチル-ベンゾチアゾールの総量について計算した)、95% (6-イオド-2-メチル-ベンゾチアゾールの量のみについて計算した)。¹H NMR (CDCl₃)： 2.89 (s、3 H、-CH₃)、7.37 (m、2 H、Ar H)、7.59 (m、1 H、Ar H)、7.78 (m、1 H、Ar H)、8.06 (d、J = 8.8、1 H、Ar H)、8.40 (d、J = 8.8、1 H、Ar H)、8.75 (s、1 H、Ar H)。HR-FAB-MS m/z Found：267.058 C₁₅H₁₁N₂OS (M+H⁺)：requires M、267.059。

40

【0126】

50

2 - メチル - 3 - メチル - 6 - (ベンゾキサゾール - 2 - yl) - ベンゾチアゾリウム・トシレート (14)。2 - メチル - 6 - (ベンゾキサゾール - 2 - yl) - ベンゾチアゾール (50 mg、0.22 mmol) を過剰の溶解メチルトシレート中 (900 mg、4.78 mmol) 中で 90 で 3 h 攪拌した。室温まで冷却した後、アセトンを添加して沈殿させ、濾過回収した。沈殿物をアセトンで洗浄し、一晚乾燥させた。これによりライトブラウン結晶状の生成物を得た。収量：56 mg、56%。¹H NMR (DMSO) : 2.27 (s、3 H、CH₃)、3.21 (s、3 H、-CH₃)、4.24 (s、3 H、-CH₃)、7.09 (d、J = 8、2 H、ArH)、7.47 (m、4 H、ArH)、7.88 (t、J = 8.8、2 H、ArH)、8.49 (d、J = 8.8、1 H、ArH)、8.64 (d、J = 8.8、1 H、ArH)、9.32 (a、1 H、ArH)。HR - FAB - MS m/z Found : 281.078 C₁₆H₁₃N₂O S (M⁺) : requires M、281.075。

【0127】

4 - [(3 - メチル - 6 - (ベンゾキサゾール - 2 - yl) - 2,3 - ジヒドロ - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール) - 2 - メチリデン)] - 1 - メチル - キノリニウム・トシレート (BOXTO)。2 ml のジクロロメタン中に 2 - イネチル - 3 - メチル - 6 - (ベンゾキサゾール - 2 - yl) - ベンゾチアゾリウム・トシレート (20 mg、44 μmol) とイメチル - キノリニウム・トシレート (14 mg、44 μmol) とを溶解した。トリエチルアミン (10 μl、72 μmol) を添加して、清明な赤色溶液を室温で週末間反応させた。この間それはブラウン赤スラリーに変わった。メタノール：ジクロロメタン (2 : 98) で中性 Al₂O₃ 上にフラッシュクロマトグラフィーで BOXTO を赤色固体として分離した。収量：8 mg、30%。¹H NMR (メタノール - D₄) : 3.74 (s、3 H、-CH₃)、3.97 (s、3 H、-CH₃)、6.33 (s、1 H、CH)、6.88 (d、J = 6.8、1 H、ArH)、7.01 (m、2 H、ArH)、7.11 (d、J = 7.2、1 H、ArH)、7.17 (d、J = 7.2、1 H、ArH)、7.42 (d、J = 7.2、1 H、ArH)、7.55 (t、J = 8、1 H、ArH)、7.63 (d、J = 8.4、1 H、ArH)、7.70 (t、J = 7.6、1 H、ArH)、7.91 (d、J = 8、1 H、ArH)、8.13 (a、1 H、ArH)、8.19 (d、J = 6.8、1 H、ArH)、8.23 (d、J = 8.4、1 H、ArH)。HR - FAB - MS m/z Found : 422.134 C₂₆H₂₀N₃O S (M⁺) : requires M、422.133。

【0128】

緩衝液中で自由で異なる DNA に結合した BEBO の蛍光性および吸収性^a。

【表 2】

	Abs. Peak (nm)	Em. Peak (nm)	ϕ_F^c	F_{bound} / F_{free}^d
Free BEBO	448	542	0.011	
BEBO-ctDNA ^b	467	492	0.18	245
BEBO-polyAT ^b	467	492	0.118	182
BEBO-polyGC ^b	471	492	0.226	264

^a 10 mM ナトリウム・フォスフェイト緩衝液 (7.0 pH) 中で 25 で測定。

^b 染料：塩基比 1 : 100

^c 蛍光量収量、 F_1 は 0.1 M NaOH 中のフルオレセインに対して定められた、0.93 の F_1 を仮定。

^d 467 nm で励起したときの 492 nm における蛍光強度の増加。

【0129】

上記したような小溝結合、非対称シアニン染料 BEBO はリアルタイム PCR を用いて評価され、SYBR グリーン I と比較された。BEBO は低濃度で PCR を抑制せず、dsDNA への結合に際しての蛍光性増加は使用した機器上でリアルタイム測定をするのに充分であった。背景蛍光は集合によって起因され最適濃度での SYBR グリーンのそののほぼ 2 倍であった。

【0130】

DNA 結合時での蛍光性の増加は SYBR グリーンについてより低く、曲線の遅延を結果し、 C_t は SYBR グリーンに比べてほぼ 4 サイクル遅れた。

【0131】

同様な染料 BETO と BOTO はともに少集合と DNA 結合時のより大なる蛍光性増加の故に低背景であった。それらの染料がリアルタイム PCR に適していればさらなるテストが証明するであろう。

【0132】

この研究ではリアルタイム PCR に BEBO が使用され、SYBR グリーン I と比較された。dsDNA の小溝に結合する染料は層間挿入染料のように DNA デュープレックスを混乱させない、このことは例えば蛍光性顕微鏡研究に有用である。

【0133】

BEBO は非対称シアニン染料であり、小溝の凹床に曲線状に相補される。BEBO のシアニン発色団は BO におけるそれと同じである。その形状はヘキストや DAPI などの他の小溝結合染料と類似である。しかし BEBO は DNA に結合したときにより高い蛍光性増加を呈し、より高いより便利な波長で吸収する。ほとんどの小溝バインダーは、恐らく BEBO も GC 豊領域中に層間挿入するが、AT 領域では明らかに小溝に結合する。この研究はなぜまたいかにして PCR 反応が BEBO の結合により影響されるか、およびいかにして検知試薬 SYBR グリーン I として一般に使用されるものに匹敵するかを研究する。

【0134】

材料と方法。BEBO は DMSO 中の 5.8 mM ストック溶液中に供給される。2 個のリアルタイム PCR 機器を用いて研究した。Roche 製の Light Cycler と Corbett Research 製の Rotorgene。従来から開発最適化された PCR システムが用いられた。純化 PCR 生成物のストックからの 240 bp テンプレートを増幅した。使用された試薬の濃度は $[Mg] = 3 \text{ mM}$ 、 $[dNTP] = 200 \mu\text{M}$ 、 $[primers] = 0.4 \mu\text{M}$ 、 $[BSA] = 0.2 \text{ mg/ml}$ 、Taq ポリメラーゼ 1 U。100 μM BEBO および 100 X SYBR グリーンストック溶液が DMSO 中に調製された。BEBO の最大吸収は 467 nm で放射は 492 nm であった。Rotorgene (チャンネル 1 Excit: 470、Detect: 510) であり Light Cycler (Excit: 470、Detect Ch1: 530) だった。両方とも適

【0135】

PCR の結果。添付したプロトコルおよびデータファイルの記載を表 1 に示す。Rotorgene (図 9) 上での BEBO (0.05 - 5 μM) の希釈シリーズによれば、0.2 μM が背景蛍光と信号増加の良好な釣合いで、この濃度が続いてテンプレート希釈に使用され SYBR グリーンと比較された。PCR 抑制のレベルが示すように、テンプレート希釈シリーズが行われて (図 10)、効率は 74% と定められた。図 11 ~ 12 に SYBR グリーン (0.1 X) との比較を示す。この結果によると、BEBO はより高い蛍光背

10

20

30

40

50

景と低い蛍光増加とを有している。

【0136】

希釈から計算された効率はBEBOについては66%で、SYBRグリーンについては72%であった。これはSYBRグリーンを用いたPCRシステムについて通常観察されるよりも低い。BEBO試料はSYBRグリーン均等物よりもほぼ4サイクル遅いように確実に思える。DMSOが高い背景蛍光を低減できるか否かをテストすべく、15% DMSOが6個の試料(データは示さず)中に存在した。20%までの濃度のDMSOが一般に使われてPCRにおける特異性を増加させるが、総抑制が観察された。BEBOとSYBRグリーンとの間の第2の比較がプロトコルに若干の変更を加えて行われた(図14)、 $[BEBO] = 0.4 \mu M$ 、 $[SYBRグリーン] = 0.2 X$ 、それぞれ80%と99%の効率を与えた。 10

【0137】

この研究によると、BEBOはリアルタイムPCRに使用するのに適切な非特異性dsDNA結合染料である。使用された機器中でのリアルタイムPCRに使用するに最適な濃度範囲は $0.1 \sim 0.5 \mu M$ である。より高い濃度では好ましくない高背景蛍光となり、 $0.05 \mu M$ より低い濃度では十分な蛍光増加を齎し得ない。

【0138】

上記したような低濃度範囲ではBEBOはポリメラーゼ鎖反応への抑制を高めることはない。反応の主たる乱れは $1 \mu M$ を越える濃度で起き、そこではPCRがその特異性を失い、プライマー二量体に非常によく似た短く特異性のない生成物を形成するだけである。抑制は $0.4 \mu M$ で観察されるが、 $0.2 \mu M$ のBEBOはPCRをさほど抑制しないようである。 20

【0139】

BEBOをSYBRグリーンと比較すると、最も衝撃的な相違は増加した背景蛍光性と同じプレート濃度におけるCtの遅れである。効率はSYBRグリーンの方が高い： $[SYBR] = 0.1 X$ で $[BEBO] = 0.2 \mu M$ については72%対66%、そして $[SYBR] = 0.2 X$ で $[BEBO] = 0.4 \mu M$ については99%対80%である。最終的に達した蛍光性は同じであるが、BEBOの背景はほぼSYBRグリーンのその2倍である。

【0140】

背景蛍光性はBEBOの集合に起因するもので、自発的な蛍光を結果する。この集合はPCRが進むにつれ累積されるようであり、図9、11、13の背景信号の線型増加に示されている。高い染料濃度においては、この現象がSYBRグリーンについても見られる(データ示さず)。集合(エタノールまたはメタノール中には現実には非存在である)を低減するために、15% DMSOが反応に添加された。背景は顕著に低減したが、PCRの特異性は失われる結果となった。 30

【0141】

LightCyclerを使用すると、PCRの抑制に至るには非常に高いプローブ濃度が必要なことが観察された。LightCyclerを使用して $5 \mu M$ までのBEBOは特異な生成物を与えた。RotorGene上の $2 \mu M$ BEBOは生成物を与えなかった。これはLightCycler装置に用いられたガラス毛细管のガラス面への顕著な吸収によるものと結論される。 40

【0142】

現在SYBRグリーンIの構造、結合モード、モル濃度などについての情報は非常に少ない。この故にBEBOとの詳細な比較は難しく、ある種の応用に当たってはBEBOに現在使える染料についての情報が必要である。

【0143】

曲線分析。増幅曲線をさらに分析すべく、指数成長相の回帰が計算された(図8)。この分析はBEBOとSYBRグリーンとの第2の比較に焦点が当てられた。BEBOの平均効率は0.91であり、SYBRグリーンは0.97である。効率とともにこの比較は 50

希釈シリーズから計算され：0.80と0.99であった。

【0144】

同じテンプレート濃度でBEBOがしきい値に達するのがSYBRグリーンより約4サイクル遅い理由は多分dsDNAへの結合に際しての低い蛍光性増加にあるのだろう。低効率だけでは4サイクルの遅れは説明できず、これは曲線分析から引き出された効率によって確認される。PCR間にSYBRグリーンはDNAに効率的に結合し、早期の蛍光効果を呈している。しかしSYBRグリーンを用いた増倍中にPCR反応は遅延されるので、この効果は強すぎるようである。かくしてSYBRグリーンはいずれにしても好ましくない程度にDNA分子と干渉する。

【非特許文献1】

1. Rye, H. S.; Yue, S.; Wemmer, D. E.; Quesada, M. A.; Haugland, R. P.; Mathies, R. A.; Glazer, A. N. 「Nucleic Acids Res.」1992年、11、2803-2812。

10

【非特許文献2】

2. Lee, L. G.; Chen, C.-H.; Chiu, L. A. 「Cytometry」1986年、7、508-517。

【非特許文献3】

3. Svanvik, N.; Westman, G.; Wang, D.; Kubista, M. 「Anal. Biochem.」2000年、281、26-35。

【非特許文献4】

4. Gurrieri, S.; Wells, K. S.; Johnson, I. D.; Bustamante, C. 「Anal. Biochem.」1997年、249、44-53。

20

【非特許文献5】

5. Netzel, T. L.; Nafisi, K.; Zhao, M.; Lenhard, J. R.; Johnson, I. 「J. Phys. Chem.」1995年、99、17936-17947。

【非特許文献6】

6. Larsson, A.; Carlsson, C.; Jonsson, M.; Albinsson, B. 「J. Am. Chem.」1994年、116、8459~8465。

30

【非特許文献7】

7. Larsson, A.; Carlsson, C.; Jonsson, M. 「Biopolymers」1995年、36、153~167。

【非特許文献8】

8. Petty, J. T.; Bordelon, J. A.; Robertson, M. E. 「J. Phys. Chem. B」2000年、104、7221~7227。

【非特許文献9】

9. Nygren, J.; Svanvik, N.; Kubista, M. 「Biopolymers」1998年、46、39~51。

40

【非特許文献10】

10. Kapuscinski, J.; Skoczylas, B. 「Nucleic Acids Res.」1978年、5、3775~3799。

【非特許文献11】

11. Jorgenson, K. F.; Varshney, U.; van de Sande, J. H. 「J. Biomol. Struct. Dyn.」1988年、5、1005~1023。

【非特許文献12】

12. Neidle, S. 「Biopolymers」1997年、44、105~121。

50

【非特許文献13】

13. Yoshinaga, N.; Akitaya, T.; Yoshikawa, K. 「Biochem. Biophys. Res. Comm.」2001年、286、264~267。

【非特許文献14】

14. Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K. 「Nucleosid. Nucleotid.」1994年、13、1415~1423。

【非特許文献15】

15. Isacsson, J.; Westman, G. 「Tetrahedon Lett.」2001年、42、3207~3210。

【非特許文献16】

16. Singer, V.L.; Jones, L.J.; Yue, S.T.; Haugland, R.P. 「Anal. Biochem.」1997年、249、228~238。

【非特許文献17】

17. Haugland, R.P. 「Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals、第6編」、1996年、144~152。

【非特許文献18】

18. Mikheikin, A.L.; Zhuze, A.L.; Zasedatelev, A.S. 「J. Biomol. Struct. Dyn.」2000年、18、59~72。

【非特許文献19】

19. Seifert, J.L.; Connor, R.E.; Kushon, S.A.; Wang, M.; Armitage, B.A. 「J. Am. Chem.」1999年、121、2987~2995。

【非特許文献20】

20. Deligeorgiev, T.G.; Gadjev, N.I.; Drexhage, K.-H.; Sabnis, R.W. 「Dyes and Pigments」1995年、29、315~322。

【非特許文献21】

21. Mittal, R.L.; Jain, S.K. 「J. Chem. Soc. C」1969年、2148~2150。

【非特許文献22】

22. Naim, S.S.; Singh, S.K.; Sharma, S. 「Ind. J. Chem.」1991年、30B、494~498。

【非特許文献23】

23. Zhou, X.F.; Peng, Z.H.; Geise, H.J.; Peng, B.X.; Li, Z.X.; Yan, M.; Dommisse, R.; Carleer, R.; Claeyss, M. 「J. Imaging Sci. Technol.」1995年、39、244~252。

【非特許文献24】

24. Norden, B.; Kubista, M.; Kurucsev, T. 「Quart. Rev. Biophys.」1992年、25、51~170。

【非特許文献25】

25. Kubista, M.; Akerman, B.; Norden, B. 「Biochemistry」1987年、26、4545~4553。

【非特許文献26】

26. Carlsson, C.; Larsson, A.; Jonsson, M.; Albinsson, B.; Norden, B. 「J. Phys. Chem.」1994年

10

20

30

40

50

、98、10313~10321。

【非特許文献27】

27. Wilson, W. D.; Taniou, F. A.; Barton, H. J.; Streckowski, L.; Boykin, D. W.; Jones, R. L. 「J. Am. Chem.」1989年、111、5008~5010。

【非特許文献28】

28. Colson, P.; Bailly, C.; Houssier, C. 「Biophys. Chem.」1996年、58、125~140。

【非特許文献29】

29. Lyng, R.; Rodger, A.; Norden, B. 「Biopolymers」1992年、32、1201~1214。 10

【非特許文献30】

30. Ogul'chansky, T. Y.; Losytskiy, M. Y.; Kovalska, V. B.; Yashchuk, V. M.; Yarmoluk, S. M. 「Spectrochim. Acta A」2001年、57、1525~1532。

【図面の簡単な説明】

【0145】

【図1】層間挿入非対称シアニン染料。

【図2】A) [ポリ(dA-dT)]₂、B) ctDNAおよびC) ctDNAとともにBO錯体と錯体化したBEBOのフローLDスペクトル。DNA塩基転移において標準化 20

。結合比R(染料:塩基)は、全てのスペクトルにおいて0.05[染料]=11μM。

【図3】AT) [ポリ(dA-dT)]₂、GC) [ポリ(dG-dC)]₂。[BO]=11μM。R=0.025の存在下での標準化LDおよびBOの吸収スペクトル。

【図4a】(a) [ポリ(dA-dT)]₂、[R=0.025(A)、0.05(B)、0.10(C)、(D)=(C)-(B)]および(b) ctDNA(底から頂上までのR値が0.1、0.05、0.033、0.025および0.0125)。全てのスペクトルにおいて[染料]=11μMの存在下でのBEBOのCDスペクトル。

【図4b】(a) [ポリ(dA-dT)]₂、[R=0.025(A)、0.05(B)、0.10(C)、(D)=(C)-(B)]および(b) ctDNA(底から頂上までのR値が0.1、0.05、0.033、0.025および0.0125)。全てのスペクトルにおいて[染料]=11μMの存在下でのBEBOのCDスペクトル。 30

【図5a】(a) [ポリ(dG-dC)]₂と(b) ctDNA(両図においてR=0.05)。[ポリ(dA-dT)]₂を添加して混合比を与える、染料:AT-塩基の;(a)(B)0.1および(C)0.05、(b)底から上:0.1、0.05および0.025。全てのスペクトルにおいて[染料]=11μMの存在下での[ポリ(dA-dT)]₂のBEBO試料中への添加後のCDの変化。

【図5b】(a) [ポリ(dG-dC)]₂と(b) ctDNA(両図においてR=0.05)。[ポリ(dA-dT)]₂を添加して混合比を与える、染料:AT-塩基の;(a)(B)0.1および(C)0.05、(b)底から上:0.1、0.05および0.025。全てのスペクトルにおいて[染料]=11μMの存在下での[ポリ(dA-dT)]₂のBEBO試料中への添加後のCDの変化。 40

【図6a】(a):緩衝液(A)中で自由でかつ子牛胸腺DNA(B)に0.02R値で結合したBEBOの吸収スペクトル。(b):水-メタノール溶液中のフリーBEBOの吸収スペクトルで、その構成は0~100%メタノール(太線)。

【図6b】(a):緩衝液(A)中で自由でかつ子牛胸腺DNA(B)に0.02R値で結合したBEBOの吸収スペクトル。(b):水-メタノール溶液中のフリーBEBOの吸収スペクトルで、その構成は0~100%メタノール(太線)。

【図7a】錯体化したBEBOのフローLDスペクトル:子牛胸腺DNA(上左)、ポリ[dA-dT]₂(底左)、ポリ[dG-dC]₂(底右)および子牛胸腺で錯体化したBO(上右)。混合比(R=染料/DNA塩基)はポリ[dG-dC]₂(R=0.02) 50

を除いてすべて 0.05。

【図 7 b】錯体化した BEBO のフロー LD スペクトル：子牛胸腺 DNA (上左)、ポリ [dA - dT]₂ (底左)、ポリ [dG - dC]₂ (底右) および子牛胸腺で錯体化した BO (上右)。混合比 (R = 染料 / DNA 塩基) はポリ [dG - dC]₂ (R = 0.02) を除いてすべて 0.05。

【図 7 c】錯体化した BEBO のフロー LD スペクトル：子牛胸腺 DNA (上左)、ポリ [dA - dT]₂ (底左)、ポリ [dG - dC]₂ (底右) および子牛胸腺で錯体化した BO (上右)。混合比 (R = 染料 / DNA 塩基) はポリ [dG - dC]₂ (R = 0.02) を除いてすべて 0.05。

【図 7 d】錯体化した BEBO のフロー LD スペクトル：子牛胸腺 DNA (上左)、ポリ [dA - dT]₂ (底左)、ポリ [dG - dC]₂ (底右) および子牛胸腺で錯体化した BO (上右)。混合比 (R = 染料 / DNA 塩基) はポリ [dG - dC]₂ (R = 0.02) を除いてすべて 0.05。 10

【図 8】錯体化した BEBO の CD スペクトル：(- - -) ポリ [dA - dT]₂、() ポリ [dG - dC]₂、それぞれ R = 0.05 および R = 0.02。

【図 9】BEBO 希釈、生データ。5 個の異なる BEBO 濃度の三つ組、ポジティブおよび NTC。上から底まで (左軸)：5 μM (茶色)、2 μM (パープル)、0.8 μM (グリーン)、0.2 μM (青) および 0.05 μM (赤)。

【図 10】テンプレート希釈、標準化データと対応する標準曲線。[BEBO] = 0.2 μM。純化 PCR 生成物の 6 種類の 10 倍希釈、10⁹ ~ 10⁴ copies / rxn。E = 0.74。第 5 番目の試料 (10⁵ copies) は正しくなく希釈されてしきい値を 1 サイクル遅くクロスした。 20

【図 11】BEBO 対 SYBR グリーン、生データ。3 通りの 100 倍テンプレート希釈を伴った三つ組。BEBO についての高背景蛍光レベルおよび総蛍光増加を示す。BEBO 試料についての背景蛍光における線型増加に注目。

【図 12】BEBO 対 SYBR グリーン、標準化データ。同じテンプレート濃度について SYBR グリーンより BEBO がほぼ 4 サイクル遅い。

【図 13】BEBO 対 SYBR グリーン、生データ。三つ組 4 倍希釈。[BEBO] = 0.4 μM、[SYBR] = 0.2 X。BEBO について背景蛍光性の線型増加が見られるが、SYBR グリーンについてはなし。 30

【図 14】BEBO 対 SYBR グリーン。標準化データ。希釈の全範囲に互って 4.5 サイクル移行が見られた。

【図 15】熔融曲線。BEBO 試料は 87.9 で熔融ピーク平均を有し、SYBR グリーン試料の 88.9 での熔融ピーク平均。

【図 16】SYBR グリーン (上) の指数成長の一部の対数表示と BEBO (下) およびその対応する線型回帰。

【図 17】異なるタイプの DNA 結合モード。

【図 18】方式 1、試薬と条件：i、Br₂、KSCN、DMF、3 h；ii、1、Me I、DMSO、17 h、110、2。NaOH_{aq}、DMSO；iii、160、真空 1 h。方式 2、試薬と条件：トリエチルアミン、ジクロロメタン、rt 14 h。 40

【 図 1 】

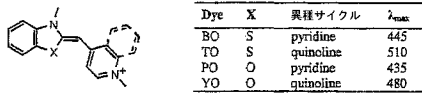


FIG.1

【 図 3 】

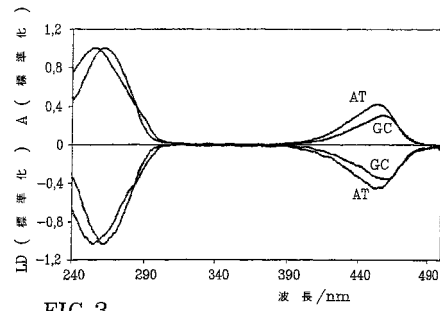


FIG.3

【 図 2 】

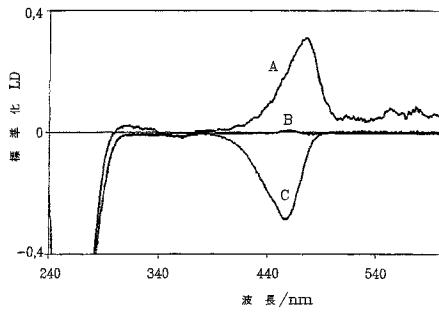


FIG.2

【 図 4 a 】

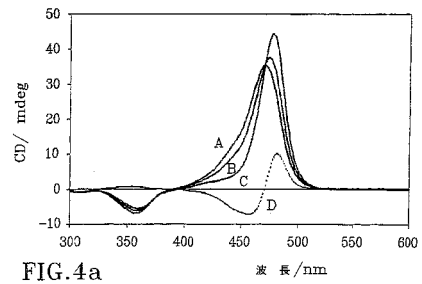


FIG.4a

【 図 4 b 】

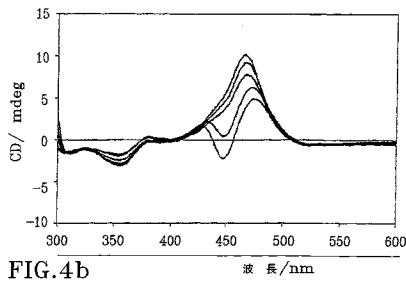


FIG.4b

【 図 5 b 】

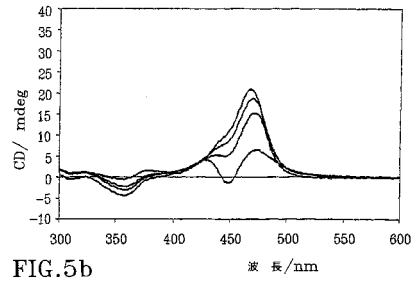


FIG.5b

【 図 5 a 】

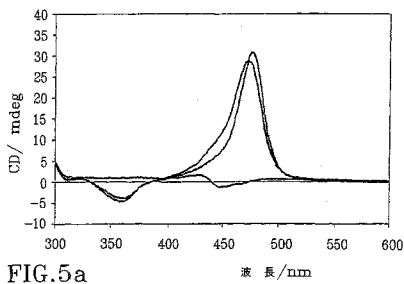


FIG.5a

【 図 6 a 】

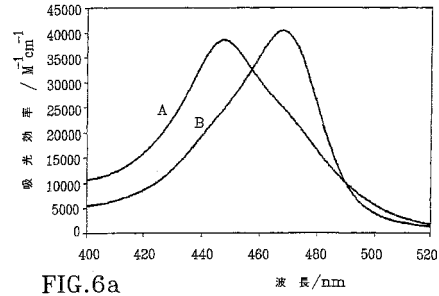


FIG.6a

【 図 6 b 】

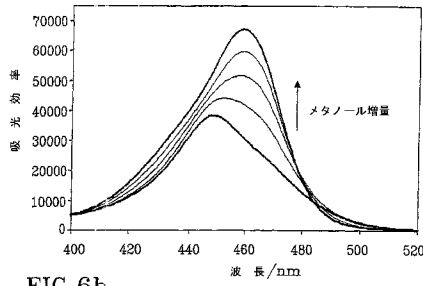


FIG.6b

【 図 7 b 】

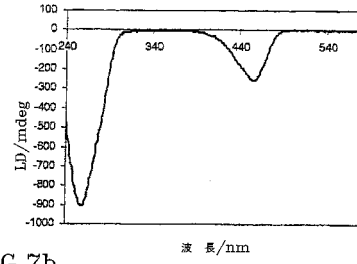


FIG.7b

【 図 7 a 】

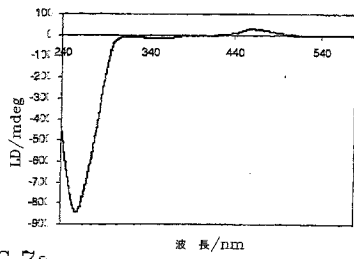


FIG.7a

【 図 7 c 】

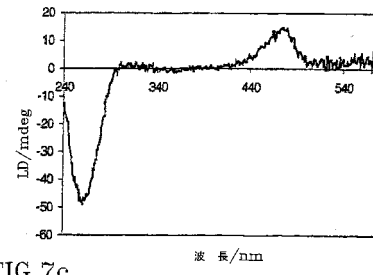


FIG.7c

【 図 7 d 】

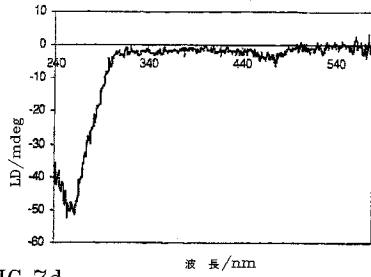


FIG.7d

【 図 9 】

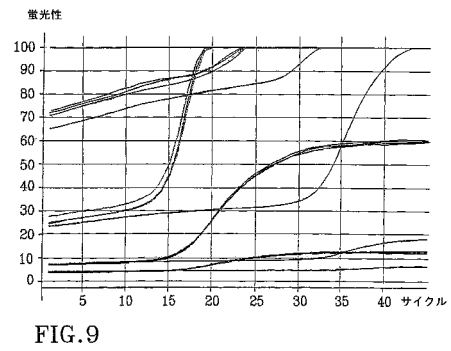


FIG.9

【 図 8 】

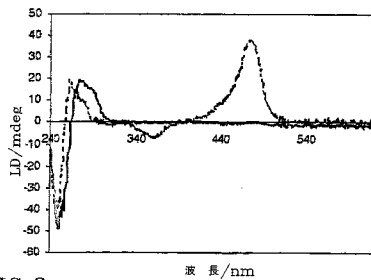


FIG.8

【 図 10 】

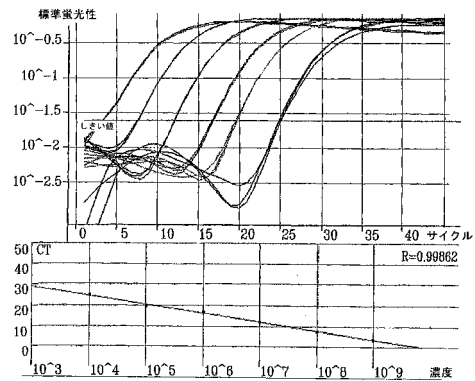


FIG.10

【 図 1 1 】

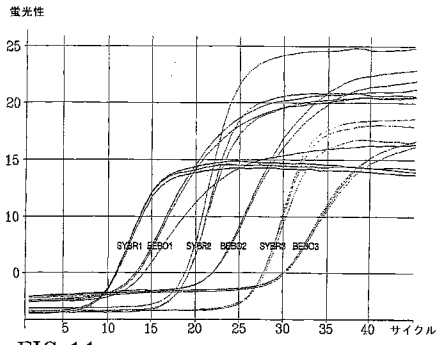


FIG.11

【 図 1 3 】

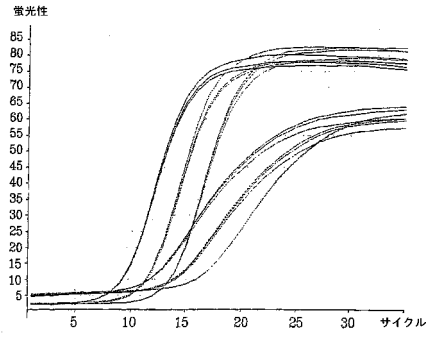


FIG.13

【 図 1 2 】

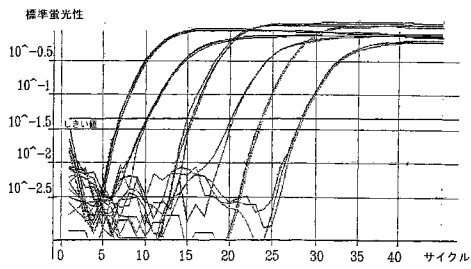


FIG.12

【 図 1 4 】

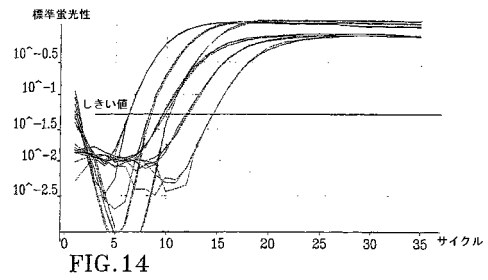


FIG.14

【 図 1 5 】

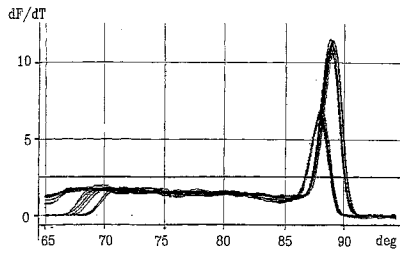


FIG.15

【 図 1 6 】

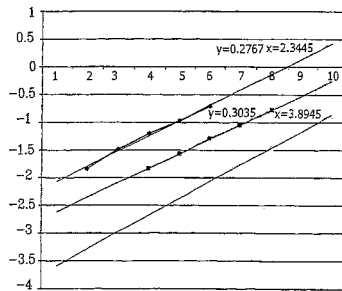
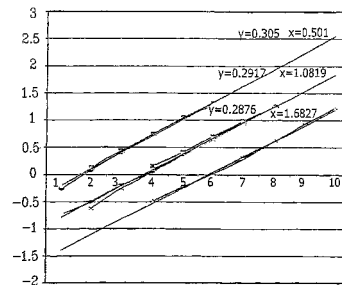


FIG.16

【 図 17 】

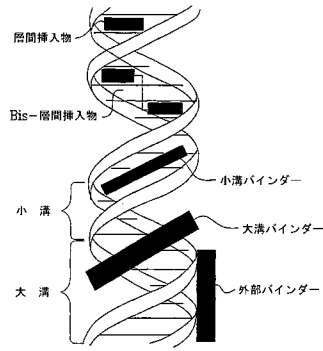
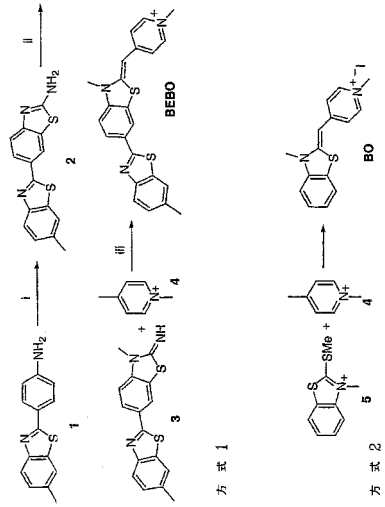


FIG.17

【 図 18 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 November 2002 (14.11.2002)

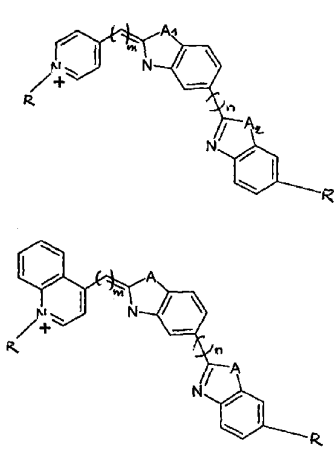
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/090443 A1

- (51) International Patent Classification⁷: C09B 49/00 (SE). KARLSSON, Jonas [SE/SE]; Odinsgatan 24 B 004, S-411 03 Göteborg (SE).
- (21) International Application Number: PCT/SE02/00860
- (22) International Filing Date: 10 May 2002 (10.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0101651-8 10 May 2001 (10.05.2001) SE
- (71) Applicant (for all designated States except US): LIGHT UP TECHNOLOGIES AB [SE/SE]; Lunnastigen 5, S-141 44 Huddinge (SE).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): WESTMAN, Gunnar [SE/SE]; Assmundtorpsvägen 6, S-438 92 Håryda
- (74) Agent: STRÖM & GULLIKSSON IP AB; Sjötorpen 4, S-417 64 Göteborg (SE).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,

[Continued on next page]

(54) Title: SYNTHESIS AND EVALUATION OF NEW CYANINE DYES AS MINOR GROOVES OF [POLY(DA-DT)]₂ BINDERS



(57) Abstract: The present invention relates to new cyanine dyes according to the formula (I), wherein A₁ and A₂ are each independently O, S, or N, and R is H or a carbohydrate that may contain a hetero atom, and m is 0 to 5, and n is 0 to 5.



WO 02/090443 A1

WO 02/090443 A1 

GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI patent
(BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).

*before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments*

Published:
with international search report

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

1

TITLE**SYNTHESIS AND EVALUATION OF NEW CYANINE DYES AS MINOR GROOVE OF [POLY(dA-dT)]₂ BINDERS**5 **DESCRIPTION**Technical field

The present invention relates to new cyanine dyes particularly suited for use in DNA sequencing in particular minor groove [poly(dA-dT)]₂ binders.

10

Background of the invention

The introduction of combinatorial chemistry, the sequencing of the human genome and miniaturisation, e.g. lab-on a chip, nanochemistry, has enabled the creation of vast libraries of "new chemical entities", millions of which must be quickly tested by high-throughput screening to identify active sites and drugs. Drugs that bind reversible to DNA in the minor groove of DNA has been synthesised with the aim to generate new lead compounds with anticancer and antiviral properties. Formerly, radioactive probes have been used to study the effect of drug-DNA interactions but during the last years they have started to be replaced by different fluorogenic assays. Today, drug-DNA interactions are mainly studied with absorbance spectroscopy, fluorescence dye displacements assays, footprinting or NMR. Since the numbers of fluorescence markers are limited to a few there is a challenge to discover new fluorescent dyes that circumvent the limitations on those that now are available. New fluorogenic compounds that bind in the minor groove can either work in dye displacement assays or give insight in how substituents may work as minor groove recognition elements.

25

Fluorogenic compounds can provide tremendous sensitivity due to large quantum emission yield upon excitation. A limitation is that there are not many fluorophores that give a high increase in fluorescence upon hybridisation or reaction with targets.

30

Asymmetric cyanine dyes have achieved much interest due to their excellent nucleic acid staining properties. Upon binding to nucleic acids such dyes usually exhibit a large enhancement in fluorescence intensity¹ and are widely used as fluorescent markers for DNA in various contexts.²⁻⁴ The interaction between double stranded DNA and the asymmetric cyanine dyes **TO** and **YO** (Figure 1) have been investigated spectroscopically in several studies and were found to bind by intercalation⁵⁻⁷ in a non-specific fashion.⁸ They also bind strongly to single stranded DNA with a large accompanying increase in fluorescence intensity.⁹ This makes the dyes less useful in

35

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

2

studies where only a signal from double stranded DNA is desirable. There are, however, fluorescent ligands binding in the minor groove instead of by intercalation that bind selectively to double and not to single stranded DNA, e.g. DAPI¹⁰ and Hoechst-derivatives.¹¹ In contrast to most cyanine dyes these ligands have a DNA sequence selectivity, preferably for A/T-rich segments.¹² Furthermore, compared to the intercalating dyes they exert a smaller perturbation of the DNA-duplex upon binding. This is valuable in studies where it is critical that the DNA is not stretched out, for example in certain fluorescence microscopy studies.^{13,14} Minor groove binders do not, however, exhibit an equally dramatic increase in fluorescence as the asymmetric cyanine dyes upon binding to DNA, who can display more than a thousand-fold increase.¹ For **BO** (Figure 1) a 400-fold enhancement in fluorescence has been reported,¹⁵ whereas Hoechst and DAPI exhibit a ~95-fold¹⁶ and a ~20-fold¹⁷ increase, respectively. Another advantage of the asymmetric cyanine dyes as labels for DNA is their relatively long absorption maxima, which reduces problems of background absorption from biological material. The absorption maxima of the dyes in figure 1 when bound to DNA varies from roughly 435 nm to 510 nm^{6,9,17} compared to around 350 nm for Hoechst 33258 (Hoechst) and DAPI.¹⁷ A dye that combines the features of the minor groove binding ligands and the photophysical properties of the ordinary asymmetric cyanine dyes would thus be of great value for detection and studies of DNA.

20

As an initial effort towards such a dye we designed the asymmetric cyanine dye **BEBO** (Scheme 1). This dye has the same cyanine chromophore as the intercalating dye **BO** but the structure is extended with a benzothiazole substituent in the 6-position. The positioning of the benzothiazole moiety gives **BEBO** a crescent-shape similar to that of other minor groove binders, e.g. Hoechst. The short synthetic route to **BEBO** starting from the commercially available benzothiazole substituted aniline **1** motivated the choice of the benzothiazole group (Scheme 1). In addition, symmetrical cyanine dyes containing two benzothiazole moieties have been suggested to bind in the minor groove either as monomers¹⁸ or as dimers.¹⁹ Herein we describe the synthesis and DNA binding studies of **BEBO** and the analogous dye **BO**.

25

The fluorophores that are most frequently used today are Fluorescein, BODIPY, DAPI, Hoechst and asymmetric cyanine dyes such as TO, YO and TOTO.

30

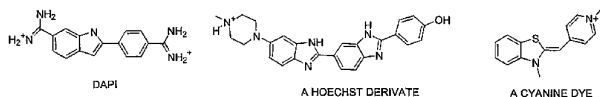
35

WO 02/090443

3

PCT/SE02/00860

Fluorescein and BODIPY are the most common fluorescent reporter groups for covalent labeling of proteins whereas DAPI, Hoechst and Cyanine dyes are the most common fluorophores for detection of nucleic acid.



- 5 DAPI (abs. max 400 nm) and Hoechst (abs. max 350 nm) bind in the minor groove and are used as base-specific fluorescent probes for DNA with a 20-fold increase in fluorescence upon binding to DNA. In contrast, asymmetric cyanine dyes have shown up to a 18,000-fold increase in fluorescence upon binding to DNA. They also have the advantage that the absorption and emission can be easily varied by changing the number of double bonds between the aromatic rings. However, a major drawback with asymmetric cyanine dyes is that they usually bind in a non-specific fashion towards DNA-sequences. (i.e. intercalate or form ion-pair complexes to DNA which may result in complex or weak fluorescence signal.) Therefore a cyanine dye that binds in a more organised way may have high fluorescence increase upon hybridisation and thus, be a more sensitive fluorophore.

- The minor groove is a convenient site for attack since it is normally unoccupied by cellular compounds such as proteins. It is also a perfect complement to concave cationic dyes due to the negative electrostatic potential and the convex floor of the minor groove. Certain minor groove binders stabilise DNA duplexes and can work as regulators of DNA-protein function. As a consequence, the development of sequence-specific minor groove binders may generate new compounds with anticancer and/or antiviral properties and thus, serve as an alternative and complementary approach to the antisense oligonucleotide strategy. Furthermore, the minor groove binders stabilising effect upon DNA duplexes can be used in probes, consisting of a minor-groove ligand-nucleic acid conjugate, to increase the melting temperatures (T_m) of probe-DNA duplexes. An increase of the T_m of probes will allow a more flexible assay design since the oligo in the probe can be shorter and still have an optimal T_m .
- 30 Sequence selective minor groove binders also have mismatch discrimination. Nucleic acid probes with minor groove binders as reporter groups should have an increased difference between the T_m of match and single-base mismatch nucleic acids than the corresponding probe with an intercalator as reporter group. Thereby increasing the discriminatory power of hybridisation assays.

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

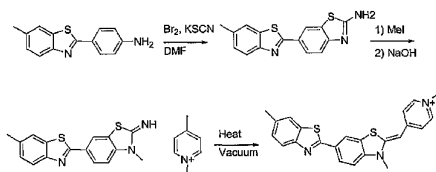
4

A useful feature of minor groove binders are a preference for double stranded DNA compared to single stranded DNA whereas intercalators usually has no preference for single or double stranded DNA. This feature results in that minor groove binder probes will have lower background fluorescence than probes with an intercalator and as a consequence, a greater signal-to-noise ratio upon hybridisation. Furthermore, dyes specific for duplex-DNA can be used for quantification of DNA in mixtures contaminated by RNA or single stranded DNA.

10 Summary of the present invention

One challenge is to develop numbers of highly sensitive fluorescent dyes with different well-separated emission spectra that bind in a precise way and thus allowing multidetection of a serie of targets with high sensitivity. As mentioned, cyanine dyes can have up to a 18.000-fold increase in fluorescence upon hybridisation which is almost 1000 times higher than the minor groove binders that are used today. Also the absorption and emission are easily tuned by varying the conjugated system in cyanine dyes. Thus, a cyanine dye substituted so that binding in the minor groove is govern but with the extraordinary fluorescence properties of the known cyanine dyes retained seems to be a highly interesting target compound.

20



Inspired by the concave structure of minor groove binders and the new findings that a benzothiazole and relatedly structured groups may govern minor groove recognition it has been designed and synthesised an asymmetric cyanine dye substituted with an extra benzothiazole group in accordance with above.

25

The interaction between this new dye and DNA were studied with various spectroscopic methods such as flow-LD and CD.

30 These two techniques can provide information on whether a drug is binding to DNA by intercalation or groove binding. Weak induction of CD is usually associated with

WO 02/090443

5

PCT/SE02/00860

intercalating whereas asymmetric induction is due to groove binding. Groove binding give a strong signal in Flow-LD.

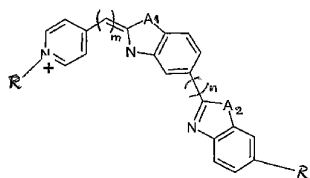
In the presence of calf thymus DNA a weak positive signal was observed in the flow LD-
 5 spectra. This can be due to heterogeneous binding with a mixture of intercalated and groove binding dye. On the other hand, in the presence of poly [(dA-dT)]₂ a clear positive LD is shown providing a strong indication of minor groove binding. For poly [(dG-dC)]₂ only a weak negative signal was observed indicating a heterogeneous binding or a low abundance of intercalated dye.

10

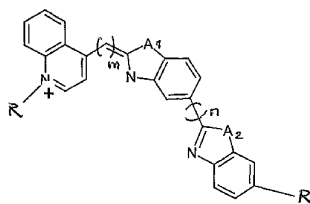
Detailed description of the present invention

It has now turned out that the following compounds solve the above discussed problems and the invention is mainly characterized by new compounds according to the following:
 A cyanine dye binding in the groove of DNA, selected from the group of

15



or



20

wherein A₁ and A₂ are each independently O, S, or N, and R is H or a carbohydrate that may contain a hetero atom, and m is 0 to 5, and n is 0 to 5.

In one embodiment the cyanine dye has R being methyl, or ethyl, and m being 1 and n being 0.
 25

WO 02/090443

6

PCT/SE02/00860

In one embodiment the cyanine dye has R being methyl, or ethyl, and m being 1 and n being 0 and A₁ and A₂ being S.

- 5 In one embodiment the cyanine dye has R being methyl, or ethyl, and m being 1 and n being 0 and A₁ and A₂ being O.

In one embodiment cyanine dye has R being methyl, or ethyl, and m being 1 and n being 0 and A₁ being S and A₂ being O.

10

In one embodiment the cyanine dye has the pyridine/quinoline ring in 2-position.

One aspect of the present invention provides a probe for nucleic acid hybridization comprising a cyanine dye according to the above.

15

A further aspect of the present invention provides a method for carrying out a real-time PCR-reaction of a DNA template, wherein a fluorescent dye increasing its fluorescent reaction when it is looked in a minor groove position in a double stranded DNA is used, whereby the dye comprises at least 2 aromatic ring systems both comprising at least one nitrogen atom, which rings are linked by a alkine group having up to four carbon atoms to form a conjugated bond, and the dye further comprises at least a third aromatic system linked thereto via a bond having a significant double bond character, such as a single bond or a ethin bond, to provide a stiff conjugated system.

20

- 25 In one embodiment of the method the dye is an asymmetric cyanine dye.

In one embodiment of the method, one of the cyanine residues contains S and/or O.

In one embodiment of the method the dye compound is crescent shaped.

30

In one embodiment the dye is a derivative according to the general formulas given above.

- 35 Clearly the new dye binds differently to A-T rich and G-C rich regions. Results from CD-measurements gave further support for groove binding of this new dye.

For poly GC almost no signal is seen which is consistent with intercalative or external binding, whereas for poly AT a very strong asymmetric induction is seen.

WO 02/090443

7

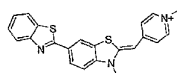
PCT/SE02/00860

It binds to the minor groove of A-T rich regions and thus it stabilises A-T bonds more than G-C bonds in a DNA duplex. Therefore, if a probe is designed so that an A-T rich region is placed under the minor groove binder it can be used in probes to improve mismatch discrimination.

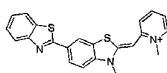
Interestingly, our results further accentuate the preliminary reports in the literature that the benzothiazole group has utility as a minor groove recognition element. If so, this is an important finding, since it opens possibilities for design of new drugs binding in the minor groove.

Our first results show that it is possible to design and prepare asymmetric cyanine dyes that work as minor groove binders.

Further, possibilities of broadening the present scope are: Since there is a well working synthetic route for the substituted cyanine dye the first step is the nitrogen in ortho position, **2-BEBO**, from the methine substituent.

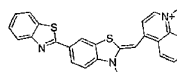


BEBO

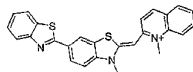


2-BEBO

20



BETO



2-BETO

Along with the synthesis of the two quinolinium derivatives, **BETO** and **2-BETO**, the synthesis of the benzoxazole and benzimidazole derivatives can be done.

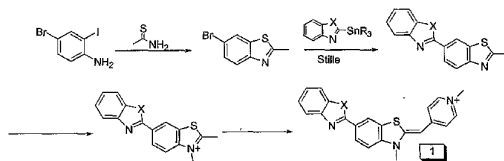
25

WO 02/090443

8

PCT/SE02/00860

The synthesis of these new benzoxazole and benzimidazole substituted dyes will follow a slightly different synthetic route.



- 5 The Stille coupling of similar compounds and the synthesis of the benzoxazole- and benzimidazole-stannanes can be found in the literature. The last step, the condensation of compound **1** with the pyridinium or quinolinium salt are routinely used in the synthesis of asymmetric cyanine dyes.

Synthesis

- 10 Typically asymmetric cyanine dyes are prepared by condensation of two quaternary heterocyclic salts with a thiomethyl group acting as leaving group on one of the salts. However, the use of an alternative condensation method developed by Deligeorgiev *et al.*²⁰ furnished a synthetic route to **BEBO** of only four steps starting from the commercially available 4-substituted aniline **1** (Scheme 1). Thiocyanation of the aniline **1** with potassium thiocyanate and bromine in DMF afforded the 2-aminobenzothiazole **2** in a 40 % yield.^{21,22} Methylation of **2** by iodomethane and subsequent deprotonation proceeded in a total 77 % yield to produce the 2-imino-3-methyl-benzothiazoline **3**. The dye **BEBO** was prepared in 24 % by simply melting the benzothiazoline **3** together with the pyridinium salt **4** at 160 °C under vacuum.²⁰
- 20 To enable comparative DNA binding studies the presumed intercalating dye **BO** (1-methyl-4-[(3-methyl-2(3H)-benzothiazolylidene)methyl]-pyridinium iodide) was synthesised according to the classical method using a modified procedure by Zhou *et al.* (Scheme 2).²³ The dye was afforded in 46 % yield by condensation of the pyridinium salt **4** and the benzothiazolium salt **5** in dichloromethane using triethyl amine as base.

Linear dichroism measurements

- To study the effect induced by the benzothiazole substituent in **BEBO** on its interaction with DNA, binding studies of the analogous dye **BO** were also performed as a comparison. Figure 2 shows the flow linear dichroism (LD) spectra of **BEBO** and **BO** with different DNA. LD is defined as the difference in absorption of light polarized parallel and

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

9

perpendicular to the macroscopic axis of orientation. The LD-spectra of oriented DNA-ligand complexes may be analysed in terms of angles that the electronic transition moments of the ligands make with the DNA-helix axis to provide information about binding geometries.²⁴ The orientation of the DNA complexes was achieved using a flow Couette cell with outer rotating cylinder. For **BEBO** in presence of [poly (dA-dT)]₂ (poly-AT) a clear positive LD is shown providing a strong indication of minor groove binding (Figure 2). From the reduced LD, obtained through division of the LD by the isotropic absorption, the angle between the long wavelength transition moment of **BEBO** and the DNA-helix was calculated to be 44°. This is very similar to the angle for known minor groove binders, e.g., DAPI.²⁵ The major transition moment of **BEBO** can be expected to be polarized roughly along the line connecting the pyridine with the closest benzothiazole ring.²⁶ The weaker positive signal shown for **BEBO** in presence of calf thymus DNA (ctDNA) is possibly due to binding in the minor groove with an angle close to 54°, as suggested in earlier studies of symmetrical cyanine dyes.¹³ However, the binding-angle to poly-AT of 44° in addition with CD-titration data (see below) proposes a more complicated binding to ctDNA with a mixture of binding modes resulting in an average low LD signal. Although Hoechst and DAPI have a preference for minor groove binding to AT-rich regions it has been suggested that they bind to GC sequences by a non-classical intercalation process.^{27,28} This model seems to be applicable here also, since the reduced LD spectrum of **BEBO** with [poly(dG-dC)]₂ (poly-GC) show a negative value of the same amplitude as for the DNA bases indicating intercalation (data not shown).

In contrast to the binding of **BEBO**, LD measurements indicate that **BO** binds by intercalation to all three different polynucleotides studied: ctDNA (Figure 2), poly-AT and poly-GC (Figure 3). The change in binding mode induced by the benzothiazole extension of the **BO** structure is particularly apparent in the case of poly-AT.

Circular dichroism measurements

The strong induced positive CD for **BEBO** in presence of poly-AT (Figure 4a) gives further strong support for binding in the minor groove.²⁹ Figure 4a shows the titration of poly-AT into **BEBO** with binding ratios R , defined as the total number of dye molecules per base, varying from 0.025 to 0.1. The larger CD amplitude of **BEBO** at the highest binding ratio is rationalized by a contribution of exciton coupling interactions between closely bound chromophores. This is illustrated by subtracting the B spectrum ($R = 0.05$) from the C spectrum ($R = 0.1$) in figure 4a to produce a spectrum typical of exciton coupling (D , Figure 4a).

WO 02/090443

10

PCT/SE02/00860

In presence of ctDNA the induced CD is smaller but still, intercalation or external stacking of the dye would not give rise to this large amplitude. Thus, there must be a significant amount of dye residing in the minor groove. The titration of ctDNA into **BEBO** with binding ratios R varying from 0.0125 to 0.10 is shown in figure 4b. As with the binding of **BEBO** to poly-AT, there is a feature of exciton coupling interactions between closely spaced ligands at higher binding ratios. At lower binding ratio the signal is similar to that of the corresponding poly-AT spectra, albeit with smaller amplitude.

The binding of **BEBO** to poly-GC give rise to only a very small induced CD (Figure 5a), which supports an intercalative binding mode to GC-regions. This might partly account for the lower CD obtained upon binding to ctDNA. However, one must bear in mind that ctDNA is more complex than just a mixture of alternating GC- and AT-segments. The amplitude of the CD spectra in presence of ctDNA is about one fourth of the poly-AT spectra. If the binding to ctDNA is a mixture of groove binding to AT- regions and intercalation to GC-regions then 75 percent would be bound in an intercalative fashion. This does not hold since the LD should be significantly more negative in that case. Hence, a substantial amount of dye must be bound in a non-intercalative fashion to ctDNA at sites affording a lower induced CD than when bound to alternating AT.

The CD signal for **BO** in presence of ctDNA was only weakly negative (data not shown) and this further illustrates the different binding mode of **BEBO** compared to **BO**.

Polynucleotide binding preferences

The extensive difference in amplitude of the CD signal for **BEBO** in presence of poly-GC and poly-AT allowed a simple experiment to investigate a possible AT preference. When poly-AT was added to a sample of **BEBO** in presence of poly-GC ($R = 0.05$) the CD signal increased drastically showing a considerable preference for poly-AT (Figure 5a). These spectra were consistent with the CD spectra of **BEBO** in presence of poly-AT without poly-GC (Figure 4a) with only slightly lower amplitudes of the signals.

A similar experiment was performed to compare the binding affinities of **BEBO** to poly-AT and ctDNA. Again poly-AT was added to a sample of **BEBO** now in presence of ctDNA. There was an increase in CD signal upon addition of poly-AT but not as large as when the sample initially contained poly-GC (Figure 5b). Hence, there is still a reasonable amount of dye bound to ctDNA at these ratios showing that there must be other binding sites than alternating AT-regions in ctDNA that attract **BEBO** significantly.

Fluorescence and absorbance measurements

WO 02/090443

11

PCT/SE02/00860

The absorption and fluorescence properties of BEBO with different nucleic acids are summarised in table 1. In analogy with other asymmetric cyanine dyes **BEBO** has a large increase in fluorescence upon binding to DNA. The clear minor groove binding of **BEBO** to poly-AT affords a 180-fold enhancement in fluorescence intensity, whereas the
5 increases upon binding to ctDNA and poly-GC are somewhat larger. In buffer solution, the free dye has its emission peak at 542 nm compared to 492 nm for the bound dye. Using ethanol instead of aqueous buffer as solvent the free dye emission was shifted to 492 nm, and the fluorescence intensity was roughly ten times lower. Recently aggregation of **TO** in presence and absence of DNA was studied by absorption and
10 fluorescence spectroscopy and similar manifestations caused by aggregate formation was seen.³⁰ Thus in buffer solution dimers or higher aggregates with longer emission maximum are probably formed due to the hydrophobic nature of the dye.

The shape of the absorption spectra of free **BEBO** in water further suggests the
15 presence of dimers or aggregates (Figure 6). Absorption measurements of **BEBO** in different methanol-water mixtures showed a substantial increase and a red shift in absorption with increasing amount of methanol (Figure 6b). The dye molecules are presumably present as monomers in pure methanol. The absorption spectrum of free **BEBO** in methanol and the spectrum of **BEBO** completely bound to DNA have a very
20 similar shape, which indicates that the dye is bound as monomers at low binding ratios.

In summary, we find that the structural modifications of **BO** have induced a shift in binding mode from intercalation towards minor groove binding. Our results further imply the potential of the benzothiazole group as a minor groove recognition moiety. The dye
25 could be synthesised in four steps only from the commercially available aniline **1**. The binding of **BEBO** to poly-AT is clearly in the minor groove as deduced from the CD- and LD-spectra. Similarly to that of DAPI and Hoechst, the binding of **BEBO** to poly-GC is dominated by intercalation. With the random sequence ctDNA on the other hand, **BEBO** seems to interact heterogeneously. However, intercalation to GC-segments and minor
30 groove binding to AT-regions cannot be the only explanation to the LD- and CD-results obtained with ctDNA. There must be other preferred binding sites in ctDNA for BEBO, which induce a lower CD than poly-AT. The relatively large amplitude of the CD signal show, however, that there is a significant contribution of minor groove binding of **BEBO** to ctDNA. Consistent with other minor groove binders **BEBO** has a distinct preference
35 for poly-AT compared to poly-GC. The fluorescence increase upon binding to the minor groove of poly-AT is larger than for Hoechst and DAPI. The binding properties of **BEBO**, in particular its strict minor groove binding to poly-AT, give promise for the development of a new class of asymmetric cyanine dyes with a strong preference for

WO 02/090443

12

PCT/SE02/00860

minor groove binding and a large increase in fluorescence upon binding. Synthesis and studies of analogous dyes are underway and will be reported in due time.

Experimental

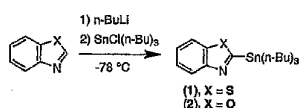
5 Example

Preparation according to the reaction scheme

The dye **1** was prepared in four steps starting from the commercially available aniline **1**. Thiocyanation of the 4-substituted aniline **1** with potassium thiocyanate and bromine in DMF afforded the 2-aminobenzothiazole **2** in a 40 % yield. Methylation and deprotonation of compound **2** proceeded in a total 70 % yield to produce the 2-imino-3-methylbenzothiazoline **3**. The dye **5** was prepared in 20 % by melting compound **3** together with the pyridinium salt **4** at 160 °C under vacuum.

15 Synthesis

2-(Tri-n-butylstannyl)-benzothiazole (1) and 2-(Tri-n-butylstannyl)-benzoxazole (2) was prepared by treating benzothiazole and benzoxazole, respectively with n-BuLi at -78 °C, followed by addition of tri-n-butyltin chloride.



20

Scheme : Preparation of the organostannanes.

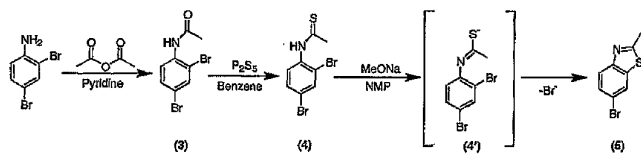
6-Bromo-2-methyl-benzothiazole (5)

2,4-Dibromo-aniline was treated with acetic anhydride in pyridine to give the acetanilide (3). Reaction of (3) with phosphorus pentasulfide in refluxing benzene replaced the carbonyl oxygen by a sulphur atom to give the thioacetanilide (4). Separation of (4) from (3) is readily achieved by extraction with aqueous NaOH. This is possible due to the fact that the sulphur atom is larger and more polarizable than the oxygen and thereby able to form the water-soluble thioacetanilide anion (4'). This ability to form (4') is also utilized in the final step, in which (4) is treated with sodium methoxide, and elimination of the bromine in 2-position leads to ring closure, giving the product (5). Upon removing the NMP by bulb-to-bulb distillation, it was discovered that (5) is easily purified by sublimation.

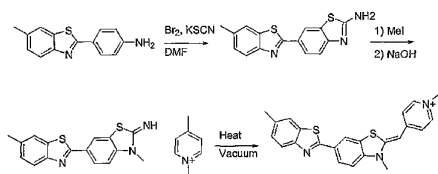
WO 02/090443

13

PCT/SE02/00860



Scheme: Preparation of (5) from 2,4-dibromo-aniline.



WO 02/090443

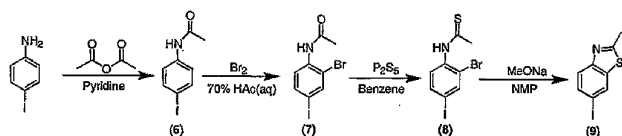
14

PCT/SE02/00860

6-Iodo-2-methyl-benzothiazole (9)

The synthesis of (5) and its iodo analogue (9) are very similar. However, in this case the dihalogenated acetanilide (7) is achieved by acylation of 4-iodo-aniline to give (6), followed by bromination. In this bromination step, some of the iodine in the 4-position was

- 5 substituted by bromine. Attempts to separate the formed 2,4-dibromo-acetanilide from (7) were fruitless, which resulted in a product mixture of (9) and (5) in a 3:1 molar ratio. In spite of this, the mixture was used in following Stille-coupling reactions.

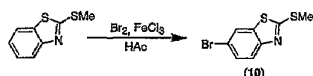


- 10 Scheme: Preparation of (9) from 4-iodoaniline.

6-Bromo-2-methylthio-benzothiazole (10)

Although not being used in my subsequent reactions, it should be mentioned that yet another halogenated electrophile, 6-Bromo-2-methylthio-benzothiazole (10), was prepared.

- 15 The synthesis of (10) is, as seen in the following scheme, quite uncomplicated. 2-Methylthio-benzothiazole is simply brominated in acetic acid with FeCl_3 as catalyst.



- 20 Scheme: Bromination in 6-position of 2-methylthio-benzothiazole

Stille-couplings

- 25 To study and optimise the palladium catalysed cross-coupling reaction, a number of experiments were carried out with different starting materials and two different neutral ligands on the catalyst. However, the procedure describing the synthesis of (11) and (13) in the experimental section was followed in all Stille-couplings. CuI is used for its co-catalytic effect on the coupling. Table 1 summarises the Stille-experiments carried out during this diploma work.

30

WO 02/090443

15

PCT/SE02/00860

TABLE 1


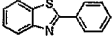

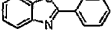

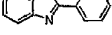

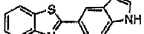

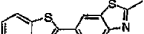



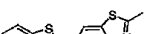

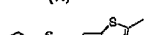

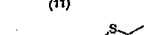
Entry	Organostannane	Arylhalide	Catalyst	Product	Yield
1	(1)		Pd(PPh ₃) ₄		Low
2	(1)		Pd(PPh ₃) ₄		72%
3	(1)		Pd(AsPh ₃) ₄		33%
4	(1)		Pd(PPh ₃) ₄		0%
5	(1)		Pd(PPh ₃) ₄		0%
		(5)		(11)	
6	(1)		Pd(AsPh ₃) ₄		0%
		(5)		(11)	
7	(1)		Pd(AsPh ₃) ₄		0%
		(9)		(11)	
8	(1)		Pd(PPh ₃) ₄		98%
		(9)		(11)	
9	(2)		Pd(PPh ₃) ₄		95%
		(9)		(13)	

Table 1. A summary of the Stille-reactions performed.

WO 02/090443

16

PCT/SE02/00860

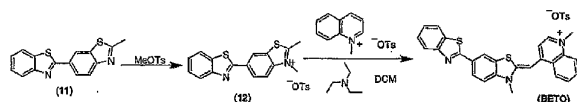
In entry 1, pure product could not be isolated despite flash chromatography (chloroform on silica). However, a small amount of product was confirmed by mass spectrometry. The superior performance of iodine in comparison with bromine on the electrophiles has been previously reported", and was therefore expected. This property is given by
 5 iodine's greater ability to act as a leaving group. Another reason for the failed experiments in entries 4-7 might be that the nitrogen in 4-position to bromine donates its free electron pair into the aryl ring, thereby deactivating the electrophile. The reason for trying to use brominated electrophiles anyway was their more facile synthesis. Although the arylhalide in entries 8-9 in reality was a 3:1 (molar-) mixture of (9) and
 10 (5), the yields in table 1 we calculated with respect only to the amount of (9). This is due to the total reluctance of the brominated electrophiles in entries 4-7 to react.

Using triphenylarsine as the palladium-ligand has been reported to show up to a 1100-fold increase in reaction rates, compared to triphenylphosphine.²¹ Surprisingly
 15 though, triphenylarsine was less effective than triphenylphosphine in the experiments performed. This may, ironically enough, depend on triphenylarsine's superiority as ligand, which makes Pd(O) more liable to oxidize and the catalyst far more air-sensitive than the one with triphenylphosphine. Hereby, a small contamination of air-oxygen in the reaction vessel might substantially decrease the catalytic effect of
 20 triphenylarsine-coordinated palladium, whereas the catalyst with phosphine-ligand is less affected.

BETO & BOXTO

25

The two new asymmetric cyanine dyes BETO and BOXTO were prepared by the reaction paths shown in schemes 8 and 9.

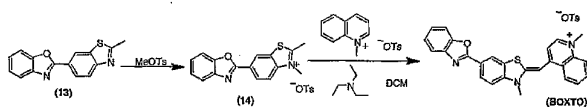


Scheme 8. The two final steps in the synthesis of BETO.

WO 02/090443

17

PCT/SE02/00860



Scheme 9. The two final steps in the synthesis of BOXTO.

- 5 By treating (11) and (13) with an excess of melted methyl tosylate, the methylated salts (12) and (14) were formed in 70% and 56% yields respectively. These salts were allowed to react with 1-methyl-quinolinium tosylate in dichloromethane to produce the desired dyes. The yields in the last step were 27% and 30% respectively.
- 10 Column chromatography was performed using aluminium oxide (activated, neutral, approx. 150 mesh) deactivated by addition of water to Brockman grade III. Melting points were determined on a Mettler FP82HT hot-stage microscope. ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100.6 MHz) NMR spectra were recorded at rt using a Varian UNITY-400 NMR spectrometer. Chemical shifts are in ppm, relative to solvent peaks for DMSO (δ 2.50 for ^1H and δ_{c} 39.51 for ^{13}C NMR); J values are given in Hz. High resolution mass spectra were recorded using a VG ZabSpec instrument. UV-vis spectra were measured on a Varian Cary4 spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded using a SPEX fluorolog τ 2 spectrofluorimeter. The LD and CD spectra were recorded on a JASCO-720 spectropolarimeter. The orientation of the DNA complexes was achieved using a flow
- 20 Couette cell with outer rotating cylinder. All spectroscopic measurements were performed at 25 °C in 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). Aqueous solutions of BEBO and BO were typically obtained from 2 mM stock solutions in DMSO. [Poly (dA-dT)]₂ and [poly (dG-dC)]₂ were purchased as solutions in buffer from Pharmacia. Calf thymus DNA was purchased from Fluka. Commercial reagents were purchased from
- 25 Sigma-Aldrich and used without further purification. The pyridinium salt **4** and the benzothiazolium salt **5** were prepared as previously reported.²³

2-amino-6-(6-methyl-benzothiazol-2-yl)-benzothiazole (**2**)

- 30 2-(4-aminophenyl)-6-methyl-benzothiazole **1** (4.0 g, 16.6 mmol) and KSCN (2.6 g, 26.7 mmol) were dissolved in DMF (20 ml) and cooled in an ice-bath. Br₂ (0.9 ml, 17 mmol) in DMF (15 ml) was added dropwise under 3 h. The mixture was stirred for another 20 h. Water was added and the precipitate formed was collected by filtration and dried. The crude product was triturated on the sinter with several portions of boiling dichloromethane to afford **2** as a light green-yellow solid (1.97 g, 40 %). Mp 250-251

WO 02/090443

18

PCT/SE02/00860

°C; ¹H NMR (DMSO) δ 2.45 (3H, s, Ar-CH₃), 7.34 (1H, d, J=8.4, ArH), 7.50 (1H, d, J=8.4, ArH), 7.89 (1H, d, J=8.4, ArH), 7.91 (1H, s, ArH), 7.99 (1H, d, J=8.4, ArH), 8.51 (1H, s, ArH), 8.56 (2H, s, NH₂); ¹³C NMR (DMSO): δ 21.10, 116.7, 120.7, 121.8, 122.1, 125.6, 126.9, 128.1, 129.7, 133.3, 134.5, 135.0, 151.7, 165.9, 169.3; HR-FAB-MS *m/z* Found: 298.0521 C₁₅H₁₂N₃S₂ (M+H⁺): requires *M*, 298.0473.

2-amino-3-methyl-6-(6-methyl-benzothiazol-2-yl)-benzothiazolium iodide

The 2-aminobenzothiazole **2** (0.3 g, 1.0 mmol) was dissolved in DMSO (2 ml). Methyl iodide (0.25 ml, 2.0 mmol) was added and the mixture was stirred at 110 °C for 17 hours. The mixture was cooled and poured into water. The precipitate formed was collected by filtration and washed with water to give the product as a yellow solid (0.38 g, 86 %). Mp 267-269 °C; ¹H NMR (DMSO): δ 2.47 (3H, s, Ar-CH₃), 3.74 (3H, s, N-CH₃), 7.38 (1H, d, J=8.4, ArH), 7.79 (1H, d, J=8.4, ArH), 7.93 (1H, d, J=8.4, ArH), 7.95 (1H, s, ArH), 8.22 (1H, d, J=8.4, ArH), 8.75 (1H, s, ArH), 10.19 (2H, s, NH₂); ¹³C NMR (DMSO): δ 21.14, 32.39, 113.9, 122.0, 122.2, 122.4, 122.7, 126.6, 128.3, 129.8, 134.7, 135.6, 140.9, 151.6, 164.7, 168.9; HR-FAB-MS *m/z* Found: 312.0638 C₁₆H₁₄N₃S₂ (M⁺): requires *M*, 312.0629.

2-imino-3-methyl-6-(6-methyl-benzothiazol-2-yl)-benzothiazoline (3)

2-amino-3-methyl-6-(6-methyl-benzothiazol-2-yl)-benzothiazolium iodide (0.3 g, 0.68 mmol) was taken up in DMSO (10 ml). Water was added (20 ml) and the mixture was basified to pH 10 with aqueous NaOH (20%). The precipitate was collected by filtration and washed with water to produce **3** as a light yellow solid (0.19 g, 89%). Mp 146-148 °C; ¹H NMR (DMSO): 2.45 (3H, s, Ar-CH₃), 3.38 (3H, s, N-CH₃), 7.16 (1H, d, J=8.4, ArH), 7.33 (1H, d, J=8.4, ArH), 7.87 (1H, s, ArH), 7.90 (1H, s, ArH), 7.93 (1H, d, J=8.4, ArH), 8.16 (1H, s, ArH), 8.55 (1H, s, NH); ¹³C NMR analysis was not possible due to poor solubility of **4** in available deuterated solvents; HR-FAB-MS *m/z* Found: 312.0619 C₁₆H₁₄N₃S₂ (M+H⁺): requires *M*, 312.0629

4-[(3-methyl-6-(6-methyl-benzothiazol-2-yl)-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazole)-2-methylidene)]-1-methyl-pyridinium iodide (BEBO)

The benzothiazoline **3** (0.1 g, 0.32 mmol) and 1,4-dimethyl-pyridinium tosylate **4** was melted together at 160 °C under vacuum for 1 hour. DMSO (5 ml) was added and the mixture was heated at reflux for 30 min. The mixture was added to aqueous KI (30%) and the precipitate formed was collected by filtration. The solid was purified by flash chromatography on neutral Al₂O₃ with methanol- dichloromethane (2:98) to give **BEBO** (0.04 g, 24%). Mp 280-281 °C; ¹H NMR (DMSO): δ 2.47 (3H, s, Ar-CH₃), 3.76 (3H, s, N-CH₃), 4.02 (3H, s, N-CH₃), 6.34 (1H, s, =CH-), 7.38 (1H, d, J=8.4, ArH), 7.47 (1H, d,

WO 02/090443

19

PCT/SE02/00860

J=6.8, PyH), 7.70 (1H, d, J=8.4, ArH) 7.93 (1H, d, J=8.4, ArH), 7.95 (1H, s, ArH), 8.18 (1H, d, J=8.4, ArH), 8.39 (1H, d, J=6.8, PyH), 8.65 (1H, s, ArH); ¹³C NMR (DMSO): 21.13, 32.99, 45.11, 90.66, 112.0, 118.8, 120.9, 121.8, 122.2, 124.6, 126.7, 127.9, 128.1, 134.5, 135.2, 142.4, 142.5, 150.1, 151.6, 156.4, 164.9; HR-FAB-MS *m/z* Found: 5 402.1145 C₂₃H₂₀N₃S₂ (M⁺): requires *M*, 402.1105.

2-(Tri-n-butylstannyl)-benzothiazole (1)

20 ml of freshly distilled THF was flushed for 30 min with a stream of nitrogen after which benzothiazole (1.0 g, 7.4 mmol) was added. After being flushed for another 30 min, the solution was cooled to -78°C and placed under inert nitrogen atmosphere. 0.9 equivalents of *n*-BuLi (2 M solution in hexane, 2.66 ml, 6.66 mmol) was added dropwise over a period of 30 min, during which the solution turned to deep red. The solution was kept at -78°C for 1 h and then tri-*n*-butyltin chloride (2.0 ml, 7.4 mmol) was added dropwise over a period of 1 h. During this addition, the solution shifted from deep red to brownish yellow, then to greenish blue and finally to light brown. After yet another hour at -78°C, the solution was allowed to reach room temperature. The THF was removed on a rotary evaporator and the product, a yellow oil, was isolated by distillation in vacuo. Yield: 2.47 g, 79%. ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.90 (t, J=8, 9H, Bu₃Sn), 1.29 (in, 6H, Bu₃Sn), 1.35 (m, 6H, Bu₃Sn), 1.63 (t, J=8, 6H, Bu₃Sn), 7.37 (t, J=8, 1H, ArH), 7.46 (t, J=8, 1H, ArH), 7.96 (d, J=8, 1H, ArH), 8.17 (d, J=8, 1H, ArH). 20

2-(Tri-n-butylstannyl)-benzoxazole (2)

20 ml of freshly distilled THF was flushed for 30 min with a stream of nitrogen after which benzoxazole (1.0 g, 8.3 mmol) was added. After being flushed for another 30 min, the solution was cooled to -78 °C and placed under inert nitrogen atmosphere. 0.9 equivalents of *n*-BuLi (2 M solution in hexane, 3.0 ml, 7.6 mmol) was added dropwise over a period of 1 h, during which the solution turned to pink. The solution was kept at -78°C for 30 min and then tri-*n*-butyltin chloride (2.3 ml, 8.3 mmol) was added dropwise over a period of 1 h. During this addition, the solution shifted from pink to brown. After yet another hour at -78°C, the solution was allowed to reach room temperature, at which it turned to deep red. The THF was removed on a rotary evaporator and the product, an orange oil, was isolated by distillation in vacuo. Yield: 1.37 g, 40%. ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.90 (t, J=7, 9H, Bu₃Sn), 1.30 (m, 6H, Bu₃Sn), 1.35 (m, 6H, Bu₃Sn), 1.62 (t, J=7, 6H, Bu₃Sn), 7.29 (t, 2H, ArH), 7.55 (d, 1H, ArH), 7.77 (d, 1H, ArH). 35

WO 02/090443

20

PCT/SE02/00860

2,4-Dibromo-acetanilide (3)

A solution of 2,4-Dibromo-aniline (3.0 g, 12.0 mmol), 1.1 equivalents of acetic anhydride (1.35 g, 13.2 mmol) and pyridine (0.95 g, 12.0 mmol) was heated to 100°C. After a few minutes, a precipitate had formed and pyridine (~3 ml) was added to dissolve the precipitate. The solution was kept at 100 °C for two hours after which it was allowed to cool to room temperature and was poured into water. The precipitate formed was collected by filtration and washed with water to give the product as a white powder in quantitative yield (3.9 g, slightly wet). ¹HNMR (CDCl₃): δ 2.24 (s, 3H, -CH₃), 7.43 (d, J₁=8.8, J₂=2, 1H, ArH) 7.69 (s, J=2, 1H, ArH) 8.27 (d, J=8.8, 1H, ArH).

2,4-Dibromo-thioacetanilide (4)

2,4-Dibromo-acetanilide (2.2 g, 7.51 mmol) was dissolved in 10 ml benzene and phosphorus pentasulfide (3.34 g, 7.51 mmol) was added. The mixture was refluxed at 80°C. After a few minutes, a gummy solid was formed at the bottom of the flask. To suspend the solid and make stirring possible, an additional 20 ml of benzene was added and the mixture was swirled vigorously. After refluxing for 5.5 h, thin layer chromatography (TLC) on silica in chloroform suggested complete reaction and the heating was removed. After cooling to room temperature, the brownish slurry was filtered and the precipitate washed with diethyl ether. The benzene/ether filtrate was extracted twice with NaOH, (10%). The basic, aqueous phase was acidified to pH ~1 with cone. HCl. This gave a light brown, milky slurry. The precipitate could not be collected by filtration and the slurry was therefore extracted twice with diethyl ether. This resulted in a yellow organic phase, which was dried and evaporated to give the thioacetanilide as a brown, yellowish oil. Yield: 1.33 g, 57%. ¹HNMR (CDCl₃): δ 2.78 (s, 3H, -CH₃), 7.50 (d, J₁=8.8, J₂=1.6, 1H, ArH) 7.90 (s, J=1.6, 1H, ArH) 8.40 (d, J=8.8, 1H, ArH).

6-Bromo-2-methyl-benzothiazole (5)

2,4-Dibromo-thioacetanilide (1.33 g, 4.3 mmol) and 1.2 equivalents of sodium methoxide (0.513 g, 5.2 mmol) was dissolved in 3 ml NMP. After 2 h at 150 °C and cooling to room temperature, the NMP was removed by bulb-to-bulb distillation. The brown remnants were purified by sublimation to give the product as white crystals. Yield: 707 mg, 72%. ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.83 (s, 3H, -CH₃), 7.55 (d, J₁=8.8, J₂=1.6, 1H, ArH) 7.80 (d, J=8.8, 1H, ArH) 7.96 (s, J=1.6, 1H, ArH).

4-Iodo-acetanilide (6)

4-Iodo-aniline (5.0 g, 22.8 mmol) and 1.1 equivalents of acetic anhydride (2.56 g, 25.1 mmol) was dissolved in 3 ml pyridine. After 2 h at 100 °C, TLC suggested complete

WO 02/090443

21

PCT/SE02/00860

reaction and the heating was removed. When the solution had reached room temperature, it was poured into water. The precipitate formed was collected by filtration and washed with water to give the product as a white powder. Yield: 5.86 g, 98%. ¹H NMR (DMSO): δ 2.03 (s, 3H, -CH₃) 7.41 (d, J=8.8, 2H, ArH) 7.61 (d, J=8.8, 2H, ArH) 10.03 (s, 1H, NH).

2-Bromo-4-iodo-acetanilide (7)

To a solution of 4-Iodo-acetanilide (3.74 g, 14.3 mmol) in 20 ml HAc_{ac} (70%), 1.1 equivalents of bromine (2.53 g, 15.7 mmol) was added dropwise. After being allowed to react at 70 °C for 10 min, the solution was poured into water and the formed precipitate was collected by filtration (3.02 g). ¹H NMR showed a mixture of the desired product and 2,4-dibromo-acetanilide in a 9:4 molar ratio. Total yield: 3.02 g, 65%. Yield of the desired product: 2.18 g, 45%. ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.23 (s, 3H, -CH₃), 7.60 (d, J₁=8.8, J₂=1.6, 1H, ArH) 7.85 (s, J=1.6, 1H, ArH) 8.13 (d, J=8.8, 1H, ArH). Yield of the by-product: 0.84 g, 20%. ¹H NMR (CDCl₃): Consistent with the spectrum of 2,4-dibromo-acetanilide described above.

2-Bromo-4-iodo-thioacetanilide (8)

A total amount of 2.87 g of the 2-Bromo-4-iodo-acetanilide (2.08 g, 6.1 mmol) and 2,4-dibromo-acetanilide (0.80 g, 2.7 mmol) mixture was dissolved in ~10 ml benzene and phosphorus pentasulfide (3.75 g, 8.4 mmol) was added. The mixture was refluxed at 80 °C over a period of 2 h. After being allowed to cool to room temperature, the brown slurry was filtered and the precipitate washed with diethyl ether. The benzene/ether filtrate was extracted twice with NaOH, (10%) and the basic, aqueous phase was acidified to pH ~1 with conc. HCl. This gave a light brown, milky slurry, which was extracted twice with diethyl ether and resulted in a yellow organic phase. This phase was dried and evaporated to give a mixture of 2-bromo-4-iodo-thioacetanilide and 2,4-dibromo-thioacetanilide as a brown oil. Total yield: 2.14 g, 71%. Yield of desired product: 1.66 g, 77% ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.78 (s, 3H, -CH₃), 7.68 (d, 1H, ArH) 7.96 (s, 1H, ArH) 8.29 (d, 1H, ArH). Yield of the by-product: 480 mg, 57%. ¹H NMR (CDCl₃): Consistent with the spectrum of 2,4-dibromo-thioacetanilide described above.

6-Iodo-2-methyl-benzothiazole (9)

A total amount of 2.02 g of the mixture of 2-bromo-4-iodo-thioacetanilide (1.57 g, 4.4 mmol) and 2,4-dibromo-thioacetanilide (454 mg, 1.5 mmol) was dissolved in 15 ml NMP. Sodium methoxide (0.677 g, 6.9 mmol) was added and the mixture was stirred at 150 °C for 2.5 h. When the brown solution had cooled to room temperature, the NMP was removed by bulb-to-bulb distillation. The brown remnants were purified by

WO 02/090443

22

PCT/SE02/00860

sublimation to give a mixture of 6-iodo-2-methyl-benzothiazole and 6-bromo-2-methyl-benzothiazole (molar ratio 3:1) as white crystals. Total yield: 1.33 g, 86%. Yield of desired product: 1.04 g, 86%. ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.82 (s, 3H, -CH₃), 7.68 (d, J=8.4, 1H, ArH) 7.73 (d, J=8.4, 1H, ArH) 8.16 (a, 1H, ArH). Yield of the by-product: 289 mg, 86%. ¹H NMR (CDCl₃) Consistent with the spectrum of 6-bromo-2-methyl-benzothiazole described above.

6-Bromo-2-methylthio-benzothiazole (10)

To a solution of 2-methylthio-benzothiazole (1.14 g, 6.3 mmol) and bromine (1.24 g, 7.7 mmol) in 10 ml acetic acid, a catalytic amount of FeCl₃ was added. After being refluxed at 120 °C over a period of 4 h the orange reaction mixture was allowed to cool to room temperature and was then poured into ethyl acetate. The precipitate formed was collected by filtration, washed with ethyl acetate and refluxed for 1 h in ethyl acetate. This slurry was filtered and ethyl acetate was removed from the filtrate by rotary evaporation to give the product as yellow crystals (130 mg, 0.50 mmol). The precipitate, collected by filtration from the refluxed slurry, was Soxhlett-extracted with n-pentane followed by diethyl ether. Evaporation of the solvents produced another small amount of the desired product (70 mg, 27 mmol). Total yield: 200 mg, 0.77 mmol, 12%. ¹H NMR (DMSO): δ 2.79 (s, 3H, -SCH₃), 7.61 (d, J₁=8.8, J₂=2, 1H, ArH) 7.77 (d, J=8.8, 1H, ArH) 8.32 (s, J=2, 1H, ArH).

2-methyl-6-(benzothiazol-2-yl)-benzothiazole (11)

216 mg of the mixture of 6-iodo-2-methyl-benzothiazole (169 mg, 0.61 mmol) and 6-bromo-2-methyl-benzothiazole (47 mg, 0.20 mmol) was dissolved in 10 ml DMF. The solution was flushed 30 min with nitrogen and Pd₂dba₃ (21 mg, 0.02 mmol) followed by tri-phenylphosphine (46 mg, 0.18 mmol) was added. After another 15 min of flushing, CuI (45 mg, 0.24 mmol) was added and the mixture was flushed for yet another 15 min and placed under inert nitrogen atmosphere. 2-(Tri-n-butylstannyl)-benzothiazole (500 mg, 1.18 mmol) was added and the mixture was heated to 60 °C. After being kept at 60 °C for 6 h, the reaction mixture was allowed to cool to room temperature. The DMF was removed by bulb-to-bulb distillation to give a dark, yellow oil. This oil was purified by flash chromatography on silica with chloroform to produce the product as pink crystals. Yield: 169 mg, 74% (calculated with respect to total amount of 6-halogenated 2-methyl-benzothiazole), 98% (calculated with respect only to the amount of 6-iodo-2-methyl-benzothiazole). ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.89 (a, 3H, -CH₃), 7.41 (t, J=7.6, 1H, ArH), 7.52 (t, J=7.6, 1H, ArH), 7.93 (d, J=7.6, 1H, ArH), 8.03 (d, J=8.4, 1H, ArH), 8.09 (d, J=8.8, 1H, ArH), 8.15 (d, J=8.4, 1H, ArH) 8.64 (s, 1H, ArH). HR-FAB-MS m/z Found: 283.038 C₁₅H₁₁N₂S₂ (M+H⁺): requires M, 283.036.

WO 02/090443

23

PCT/SE02/00860

2-methyl-3-methyl-6-(benzothiazol-2-yl)-benzothiazolium tosylate (12)

2-methyl-6-(benzothiazol-2-yl)-benzothiazole (44 mg, 0.156 mmol) was stirred for 5 h at 90 °C in melted methyl tosylate (660 mg, 3.5 mmol). After being allowed to cool to room temperature, the product was precipitated by addition of acetone and collected by filtration. The precipitate was washed with acetone and allowed to dry over night. This gave the product as green crystals. Yield: 51 mg, 70%. ¹H NMR (DMSO): δ 2.28 (s, 3H, -CH₃), 3.20 (s, 3H, CH₃), 4.24 (s, 3H, -CH₃), 7.11 (d, J=7.2, 2H, ArH), 7.46 (d, J=7.2, 2H, ArH), 7.55 (t, J=7.6, 1H, ArH), 7.62 (t, J=7.6, 1H, ArH), 8.14 (d, J=8, 1H, ArH), 8.25 (d, J=8, 1H, ArH), 8.45 (d, J=8.8, 1H, ArH), 8.59 (d, J=8.8, 1H, ArH), 9.24 (s, 1H, ArH). HR-FAB-MS *m/z* Found: 297.067 C₁₆H₁₃N₂S₂ (M⁺): requires *M*, 297.052.

4-[(3-methyl-6-(benzothiazol-2-yl)-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazole)-2-methylidene)]-1-methyl-**quinolinium tosylate (BETO)**

2-methyl-3-methyl-6-(benzothiazol-2-yl)-benzothiazolium tosylate (17 mg, 36 μmol) and 1-methyl-quinolinium tosylate (12 mg, 36 μmol) was dissolved in 2 ml dichloromethane. 2 equivalents of triethyl amine (10 μl, 72 μmol) was added and the deep red solution was allowed to react at room temperature over a period of 48 h, during which it turned to a brownish slurry. BETO was isolated as a red solid, by flash chromatography on neutral Al₂O₃ with methanol- dichloromethane (2:98). Yield: 6 mg, 27%. ¹H NMR (Methanol-D₂): δ 3.64 (s, 3H, -CH₃), 3.83 (s, 3H, -CH₃), 6.14 (s, 1H, CH), 6.71 (d, J=6.8, 1H, ArH), 6.91 (t, J=7.2, 1H, ArH), 7.02 (t, J=7.2, 1H, ArH), 7.29 (m, 3H, ArH), 7.50 (m, 2H, ArH), 7.67 (t, J=7.2, 1H, ArH), 7.72 (d, J=8.8, 1H, ArH), 7.97 (s, 1H, ArH), 8.02 (d, J=6.4, 1H, ArH), 8.09 (d, J=8.4, 1H, ArH). HR-FAB-MS *m/z* Found: 438.118 C₂₆H₂₀N₃S₂ (M): requires *M*, 438.110.

2-methyl-6-(benzoxazol-2-yl)-benzothiazole (13)

216 mg of the mixture of 6-iodo-2-methyl-benzothiazole (169 mg, 0.61 mmol) and 6-bromo-2methyl-benzothiazole (47 mg, 0.20 mmol) was dissolved in 10 ml DMF. The solution was flushed 30 min with nitrogen and Pd₂dba₃ (21 mg, 0.02 mmol), tri-phenyl-phosphine (46 mg, 0.18 mmol) and CuI (45 mg, 0.24 mmol) was added. The mixture was flushed for another 15 min and placed under inert nitrogen atmosphere. 2-(Tri-*n*-butylstannyl)-benzoxazole (481 mg, 1.18 mmol) was added and the mixture was heated to 60 °C. After being kept at 60 °C for 7 h, the reaction mixture was allowed to cool to room temperature. The DMF was removed by bulb-to-bulb distillation. The remaining oil was purified by flash chromatography on silica with chloroform to produce the product as red crystals. Yield: 154 mg, 71% (calculated with respect to total

WO 02/090443

24

PCT/SE02/00860

amount of 6-halogenated 2-methyl-benzothiazole), 95% (calculated with respect only to the amount of 6-iodo-2-methyl-benzothiazole). ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.89 (s, 3H, -CH₃), 7.37 (m, 2H, ArH), 7.59 (m, 1H, ArH), 7.78 (m, 1H, ArH), 8.06 (d, J=8.8, 1H, ArH), 8.40 (d, J=8.8, 1H, ArH), 8.75 (s, 1H, ArH). HR-FAB-MS *m/z* Found: 267.058

5 C₁₅H₁₁N₂O₂ (M+H⁺): requires *M*, 267.059.

2-methyl-3-methyl-6-(benzoxazol-2-yl)-benzothiazolium tosylate (14)

2-methyl-6-(benzoxazol-2-yl)-benzothiazole (50 mg, 0.22 mmol) was stirred for 3 h at 90 °C in m excess of melted methyl tosylate (900 mg, 4.78 mmol). After being allowed
10 to cool to room temperature, the product was precipitated by addition of acetone and collected by filtration. The precipitate was washed with acetone and allowed to dry over night. This gave the product as light brown crystals. Yield: 56 mg, 56%. ¹H NMR (DMSO): δ 2.27 (s, 3H, CH₃), 3.21 (s, 3H, -CH₃), 4.24 (s, 3H, -CH₃), 7.09 (d, J=8, 2H, ArH), 7.47 (m, 4H, ArH), 7.88 (t, J=8.8, 2H, ArH), 8.49 (d, J=8.8, 1H, ArH), 8.64 (d,
15 J=8.8, 1H, ArH), 9.32 (a, 1H, ArH). HR-FAB-MS *m/z* Found: 281.078 C₁₆H₁₃N₂O₂ (M⁺) requires *M*, 281.075.

4-[(3-methyl-6-(benzoxazol-2-yl)-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazole)-2-methylidene)]-1-methyl-quinolinium tosylate (BOXTO)

2-methyl-3-methyl-6-(benzoxazole-2-yl)-benzothiazolium tosylate (20 mg, 44 μmol) and 1-methyl-quinolinium tosylate (14 mg, 44 μmol) was dissolved in 2 ml dichloromethane. Triethyl amine (10 μl, 72 μmol) was added and the clear, red solution was allowed to react at room temperature over a weekend, during which it turned to a brownish red slurry. BOXTO was isolated as a red solid, by flash chromatography on
25 neutral Al₂O₃ with methanol:dichloromethane (2:98). Yield: 8 mg, 30%. ¹H NMR (Methanol-D₄): δ 3.74 (s, 3H, -CH₃), 3.97 (s, 3H, -CH₃), 6.33 (s, 1H, CH), 6.88 (d, J=6.8, 1H, ArH), 7.01 (m, 2H, ArH), 7.11 (d, J=7.2, 1H, ArH), 7.17 (d, J=7.2, 1H, ArH), 7.42 (d, J=7.2, 1H, ArH), 7.55 (t, J=8, 1H, ArH), 7.63 (d, J=8.4, 1H, ArH), 7.70 (t, J=7.6, 1H, ArH), 7.91 (d, J=8, 1H, ArH), 8.13 (a, 1H, ArH), 8.19 (d, J=6.8, 1H, ArH),
30 8.23 (d, J=8.4, 1H, ArH). HR-FAB-MS *m/z* Found: 422.134 C₂₆H₂₀N₃O₂ (M⁺): requires *M*, 422.133.

Table 1. Fluorescence and absorbance properties of BEBO free in
35 buffer and bound to different DNA.^a

Abs. Peak	Em. Peak	ϕ^c	$F_{\text{bound}} / F_{\text{free}}^d$
--------------	-------------	----------	--

WO 02/090443

25

PCT/SE02/00860

	(nm)	(nm)		
Free BEBO	448	542	0.011	
BEBO- ctDNA ^b	467	492	0.18	245
BEBO- polyAT ^b	467	492	0.118	182
BEBO- polyGC ^b	471	492	0.226	264

^a Measured at at 25 °C in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0).

^b Dye:bases ratio of 1:100.

^c Fluorescence quantum yields, ϕ_f , were determined relative to fluorescein in 0.1 M NaOH, assuming a ϕ_f of 0.93.

5 ^d Increase in fluorescence intensity at 492 nm when exciting at 467 nm.

The minor groove-binding, asymmetric cyanine dye BEBO above has been evaluated using real-time PCR and compared with SYBR Green I. BEBO did not inhibit the PCR at low concentrations and the fluorescence increase upon binding to dsDNA was sufficient for real-time measurement on the instruments used. Background fluorescence was caused by aggregation and it was approximately twice that of SYBR Green at optimized concentrations.

10

The fluorescence increase when binding to DNA was lower than for SYBR Green and caused a retardation of the curves and the Ct was delayed approximately 4 cycles compared to SYBR Green.

15

The similar dyes BETO and BOXTO both seem to have lower background due to less aggregation and larger fluorescence increase upon binding to DNA. Further testing will tell if these dyes are well suited for real-time PCR.

20

BEBO has been used in this study in real-time PCR and compared with SYBR Green I. A dye binding to the minor groove of dsDNA doesn't perturb the DNA duplex like intercalating dyes, which could be useful in for example fluorescence microscopy studies.

25

WO 02/090443

26

PCT/SE02/00860

BEBO is an asymmetric cyanine dye and is designed with a curve shape complementary to the convex floor of the minor groove. The cyanine chromophore of BEBO is the same as that of BO. The shape is similar to other minor groove binding dyes such as Hoechst and DAPI, but BEBO shows a higher fluorescence increase when bound to DNA and absorbs at a higher, more convenient wavelength. Most minor groove binders and possibly also BEBO still intercalate in GC-rich regions, while in AT-regions it clearly binds to the minor groove.

This study will analyze if and how the PCR-reaction is affected by the binding of BEBO and how it compares to the commonly used as detection reagent SYBR Green I.

10

Materials and Methods

BEBO was supplied in a 5.8 mM stock solution in DMSO. Two real-time PCR instruments were used for the investigation: LightCycler from Roche and the RotorGene from Corbett Research. A previously developed and optimized PCR-system was used, amplifying a 240 bp template from a stock of purified PCR-product. The concentrations for reagents used were [Mg] = 3 mM, [dNTP] = 200 μ M, [primers] = 0.4 μ M, [BSA] = 0.2 mg/ml and 1 U of Taq polymerase. 100 μ M BEBO and 100X SYBR Green stock solutions were prepared in DMSO. Absorption maximum for BEBO is 467 nm and emission at 492 nm. The RotorGene (Channel 1 Excit: 470, Detect: 510) and the LightCycler (Excit: 470, Detect Ch 1: 530) both offer appropriate detection conditions. Efficiency (E) is defined as $P_n = P_0(1+E)^n$, and is unless stated otherwise derived from a template dilution series as $E = 10^{-1/a} - 1$ where a is the slope of the corresponding standard curve. For further details the reader is referred to protocols and the laboratory notebook.

25 Results of PCR

A description of attached protocols and data-files is given in Table 1. Dilution series of BEBO (0.05 – 5 μ M) on the RotorGene (fig 9) indicated that 0.2 μ M is a good balance between background fluorescence and signal increase and this concentration was subsequently used in template dilutions and in comparison with SYBR Green. As an indication of the level of PCR inhibition a template dilution series was performed (fig 10) and the efficiency was determined to 74 %. Figure 11-12 shows a comparison with SYBR Green (0.1X) and the results indicate that BEBO has higher fluorescence background and lower fluorescence increase. Efficiencies calculated from the dilutions were 66 % for BEBO and 72 % for SYBR Green. This is lower than usually observed for this PCR-system using SYBR Green. BEBO-samples are consistently seen approximately 4 cycles later than the SYBR Green equivalent. To test whether DMSO could decrease the high background fluorescence, 15 % DMSO was present in six samples (data not shown). Although DMSO in concentrations of up to 20 % is commonly used to increase

35

WO 02/090443

27

PCT/SE02/00860

specificity in PCR, total inhibition was observed. A second comparison between BEBO and SYBR Green was performed with minor modifications to the protocol (Fig 14), [BEBO] = 0.4 μ M, [SYBR Green] = 0.2X, giving 80 % and 99 % efficiency respectively.

5 This study indicates that BEBO is an appropriate non-specific dsDNA-binding dye for use in real-time PCR. The concentration range of optimal use for real-time PCR in the instruments used is 0.1-0.5 μ M. Higher concentrations result in high unwanted background fluorescence while lower concentration than 0.05 μ M does not give enough fluorescence increase.

10

BEBO does not give rise to large inhibition the polymerase chain reaction in the lower range of the concentration interval mentioned above. A major disturbance of the reaction occurs at concentrations above 1 μ M, where the PCR loses its specificity and only forms short, unspecific products, most likely primer dimers. Inhibition is observed at 0.4 μ M, while 0.2 μ M BEBO doesn't seem to inhibit the PCR to any great extent.

15

When comparing BEBO with SYBR Green the most striking differences are the increased background fluorescence and the delay in Ct at the same template concentration. The efficiencies are higher for SYBR Green: 72 % vs 66 % for [SYBR] = 0.1X and [BEBO] = 0.2 μ M, and 99 % vs 80 % for [SYBR] = 0.2X and [BEBO] = 0.4 μ M. The final fluorescence reached is similar, while the background of BEBO is approximately twice that of SYBR Green.

20

The background fluorescence is caused by aggregation of BEBO, resulting in spontaneous fluorescence. This aggregation seems to accumulate as the PCR is running, indicated by a linear increase in background signal seen in figures 9, 11 and 13. At high dye concentrations, this phenomenon is also seen with SYBR Green (data not shown). To decrease the aggregation, which is virtually non-existent in ethanol or methanol, 15 % DMSO was added to the reaction. The background decreased significantly, but also resulted in loss of specificity in the PCR.

30

When using the LightCycler it was observed that much higher probe concentrations were needed to reach inhibition of the PCR. Up to 5 μ M BEBO gave specific product using the LightCycler while 2 μ M BEBO on the RotorGene gave no product. We conclude that this is due to significant adsorption to the glass surface of the glass capillaries used in the LightCycler instrument.

35

WO 02/090443

28

PCT/SE02/00860

Presently, the information about structure, binding mode, molar concentration, etc. of SYBR Green I is very scarce. This makes a detailed comparison with BEBO difficult and some applications may require information about the dye used currently only available for BEBO.

5

Curve analysis

To further analyze the amplification curves, regression of the exponential growth phase was calculated (fig 8). The analysis was focused on the data from the second comparison between BEBO and SYBR Green. BEBO had an average efficiency of 0.91 and SYBR Green 0.97. This compares with the efficiency calculated from the dilution series: 0.80 and 0.99 respectively.

The reason for BEBO to reach threshold approximately 4 cycles later than SYBR Green at the same template concentration is probably the lower fluorescence increase upon binding to dsDNA. Lower efficiency alone cannot explain the whole delay of 4 cycles, and this is confirmed by the efficiency derived from the curve analysis. SYBR Green binds effectively to the DNA during PCR and shows an early fluorescence effect. However, this effect seems to be too strong, as the PCR reaction is delayed during multiplication using SYBR Green, which is a disadvantage. Thus the SYBR Green interferes with the DNA molecule to an extent that may not be desirable in any way.

20

REFERENCES AND NOTES

1. Rye, H. S.; Yue, S.; Wemmer, D. E.; Quesada, M. A.; Haugland, R. P.; Mathies, R. A.; Glazer, A. N. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *11*, 2803-2812.
- 5 2. Lee, L. G.; Chen, C.-H.; Chiu, L. A. *Cytometry* **1986**, *7*, 508-517.
3. Svanvik, N.; Westman, G.; Wang, D.; Kubista, M. *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26-35.
4. Gurrieri, S.; Wells, K. S.; Johnson, I. D.; Bustamante, C. *Anal. Biochem.* **1997**, *249*, 44-53.
- 10 5. Netzel, T. L.; Nafisi, K.; Zhao, M.; Lenhard, J. R.; Johnson, I. J. *Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17936-17947.
6. Larsson, A.; Carlsson, C.; Jonsson, M.; Albinsson, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8459-8465.
7. Larsson, A.; Carlsson, C.; Jonsson, M. *Biopolymers* **1995**, *36*, 153-167.
- 15 8. Petty, J. T.; Bordelon, J. A.; Robertson, M. E. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 7221-7227.
9. Nygren, J.; Svanvik, N.; Kubista, M. *Biopolymers* **1998**, *46*, 39-51.
10. Kapuscinski, J.; Skoczylas, B. *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 3775-3799.
11. Jorgenson, K. F.; Varshney, U.; van de Sande, J. H. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1988**, *5*, 1005-1023.
- 20 12. Neidle, S. *Biopolymers* **1997**, *44*, 105-121.
13. Yoshinaga, N.; Akitaya, T.; Yoshikawa, K. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2001**, *286*, 264-267.
14. Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K. *Nucleosid. Nucleotid.* **1994**, *13*, 1415-1423.
- 25 15. Isacsson, J.; Westman, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3207-3210.
16. Singer, V. L.; Jones, L. J.; Yue, S. T.; Haugland, R. P. *Anal. Biochem.* **1997**, *249*, 228-238.
17. Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6th Edition **1996**, 144-152.
- 30 18. Mikhelkin, A. L.; Zhuze, A. L.; Zasedatelev, A. S. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2000**, *18*, 59-72.
19. Seifert, J. L.; Connor, R. E.; Kushon, S. A.; Wang, M.; Armitage, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2987-2995.
20. Deligeorgiev, T. G.; Gadjev, N. I.; Drexhage, K.-H.; Sabnis, R. W. *Dyes and Pigments* **1995**, *29*, 315-322.
- 35 21. Mital, R. L.; Jain, S. K. *J. Chem. Soc. C* **1969**, 2148-2150.
22. Naim, S. S.; Singh, S. K.; Sharma, S. *Ind. J. Chem.* **1991**, *30B*, 494-498.

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

30

23. Zhou, X. F.; Peng, Z. H.; Geise, H. J.; Peng, B. X.; Li, Z. X.; Yan, M.; Dommissie, R.; Carleer, R.; Claeys, M. *J. Imaging Sci. Technol.* **1995**, *39*, 244-252.
24. Nordén, B.; Kubista, M.; Kurucsev, T. *Quart. Rev. Biophys.* **1992**, *25*, 51-170.
25. Kubista, M.; Åkerman, B.; Nordén, B. *Biochemistry* **1987**, *26*, 4545-4553.
- 5 26. Carlsson, C.; Larsson, A.; Jonsson, M.; Albinsson, B.; Nordén, B. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 10313-10321.
27. Wilson, W. D.; Tanlous, F. A.; Barton, H. J.; Strekowski, L.; Boykin, D. W.; Jones, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5008-5010.
28. Colson, P.; Bailly, C.; Houssier, C. *Biophys. Chem.* **1996**, *58*, 125-140.
- 10 29. Lyng, R.; Rodger, A.; Nordén, B. *Biopolymers* **1992**, *32*, 1201-1214.
30. Ogul'chansky, T. Y.; Losytsky, M. Y.; Kovalska, V. B.; Yashchuk, V. M.; Yarmoluk, S. M. *Spectrochim. Acta A* **2001**, *57*, 1525-1532.

15

WO 02/090443

31

PCT/SE02/00860

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Intercalating asymmetric cyanine dyes

5

Figure 2. Flow LD spectra of BEBO complexed with: A) [poly(dA-dT)]₂, B) ctDNA and C) BO complexed with ctDNA, normalised at the DNA base transition. Binding ratio R , dye:bases, were 0.05. [dye] = 11 μ M in all spectra.

10 **Figure 3.** Normalised LD and absorption spectra of BO in presence of: A) [poly (dA-dT)]₂, GC) [poly (dG-dC)]₂. [BO] = 11 μ M. $R = 0.025$.

Figure 4a-b. CD spectra of BEBO in presence of (a) [poly (dA-dT)]₂, [$R = 0.025$ (A), 0.05 (B), 0.10 (C), (D) = (C) - (B)] and (b) ctDNA (R values from bottom to top are 15 0.1, 0.05, 0.033, 0.025 and 0.0125). [dye] = 11 μ M in all spectra.

Figure 5a-b. Change in CD after addition of [poly (dA-dT)]₂ into samples of BEBO in presence of (a) [poly (dG-dC)]₂ and (b) ctDNA ($R = 0.05$ in both figures). [poly (dA-dT)]₂ was added to give mixing ratios, dye:AT-bases of; (a) (B) 0.1 and (C) 0.05, (b) 20 from bottom to top: 0.1, 0.05 and 0.025. [dye] = 11 μ M in all spectra.

Figure 6a-b. (a): Absorption spectra of BEBO free in buffer (A) and bound to calf thymus DNA (B) at R value of 0.02. **(b):** Absorption spectra of free BEBO in water-methanol solutions with different compositions ranging from 0 to 100 % methanol (thickened lines). 25

Figure 7. Flow LD spectra of BEBO complexed with: calf thymus DNA (top left), poly[dA-dT]₂ (bottom left), poly [dG-dC]₂ (bottom right), and BO complexed with calf thymus (top right). Mixing ratios ($R = \text{dye} / \text{DNA bases}$) were 0.05 in all cases except 30 for poly [dG-dC]₂ ($R = 0.02$).

Figure 8. CD spectra of BEBO complexed with: (---) poly[dA-dT]₂, (—) poly [dG-dC]₂, at $R = 0.05$ and $R = 0.02$, respectively.

35 **Figure 9.** BEBO dilution, raw data. Triplicates of five different concentrations of BEBO, positive and NTC. From top to bottom (left axis): 5 μ M (brown), 2 μ M (purple), 0.8 μ M (green), 0.2 μ M (blue) and 0.05 μ M (red).

WO 02/090443

32

PCT/SE02/00860

Figure 10. Template dilution, normalized data, and the corresponding standard curve. [BEBO] = 0.2 μ M. Six 10-fold dilutions of purified PCR-product, from 10^9 to 10^4 copies/rxn. $E = 0.74$. The fifth sample (10^5 copies) was shown to be incorrectly diluted and should cross threshold approximately one cycle later.

5

Figure 11. BEBO vs SYBR Green, raw data. Triplicates with three 100-fold template dilutions. This figure shows the higher background fluorescence level for BEBO and the total fluorescence increase. Note the linear increase in background fluorescence for the BEBO samples.

10

Figure 12. BEBO vs SYBR Green, normalized data. BEBO crosses approximately four cycles later than SYBR Green for the same template concentration.

15

Figure 13. BEBO vs SYBR Green, raw data, triplicate 4-fold dilutions. [BEBO] = 0.4 μ M, [SYBR] = 0.2X. The linear increase in background fluorescence is seen for BEBO but not for SYBR Green.

20

Figure 14. BEBO vs SYBR Green. Normalized data. A 4.5-cycle shift is observed across the whole range of dilutions.

25

Figure 15. Melt curve. BEBO samples have melting peak average at 87.9°C, SYBR Green samples melting peak average at 88.9 °C.

30

Figure 16. Logarithmic display of a part of the exponential growth phase of SYBR Green (upper) and BEBO (lower) and its corresponding linear regression.

Figure 17. Different types of DNA binding modes.

35

Scheme 1. Reagents and conditions: i, Br₂, KSCN, DMF, 3 h; ii, 1. MeI, DMSO, 17 h, 110 °C; 2. NaOH_{aq}, DMSO; iii, 160 °C, vacuum 1 h.

Scheme 2. Reagents and conditions: Triethylamine, dichloromethane, rt 14 h.

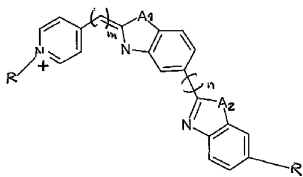
WO 02/090443

33

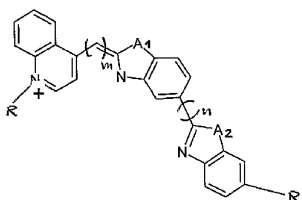
PCT/SE02/00860

CLAIMS.

1. A cyanine dye binding in the groove of DNA, selected from the group of



5 or



10 wherein A_1 and A_2 are each independently O, S, or N, and R is H or a carbohydrate that may contain a hetero atom, and m is 0 to 5, and n is 0 to 5.

2. A cyanine dye according to claim 1, wherein R is methyl, or ethyl, and m is 1 and n is 0.
- 15 3. A cyanine dye according to claim 1, wherein R is methyl, or ethyl, and m is 1 and n is 0 and A_1 and A_2 is S.
4. A cyanine dye according to claim 1, wherein R is methyl, or ethyl, and m is 1 and n is 0 and A_1 and A_2 is O.
- 20 5. A cyanine dye according to claim 1, wherein R is methyl, or ethyl, and m is 1 and n is 0 and A_1 is S and A_2 is O.

25

WO 02/090443

34

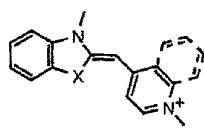
PCT/SE02/00860

3. A cyanine dye according to claim 1, having the pyridine/quinoline ring in 2-position.
- 5 4. Probe for nucleic acid hybridization comprising a cyanine dye according to claims 1-2.
- 10 5. Method for carrying out a real-time PCR-reaction of a DNA template, wherein a fluorescent dye increasing its fluorescent reaction when it is locked in a minor groove position in a double stranded DNA is used, whereby the dye comprises at least 2 aromatic ring systems both comprising at least one nitrogen atom, which rings are linked by a alkine group having up to four carbon atoms to form a conjugated bond, and the dye further comprises at least a third aromatic system linked thereto via a bond having a significant double bond character, such as a single bond or a ethin bond, to provide a stiff conjugated system.
- 15 6. Method according to claim 4, wherein the dye is an asymmetric cyanine dye.
- 20 7. Method according to claim 4, wherein one of the cyanine residues contains S and/or O.
8. Method according to claim 4, wherein the dye compound is crescent shaped.
- 25 9. Method according to claim 4, wherein the dye is a derivative according to one or more of claims 1-2.

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

1/15



Dye	X	Heterocycle	λ_{max}
BO	S	pyridine	445
TO	S	quinoline	510
PO	O	pyridine	435
YO	O	quinoline	480

FIG. 1

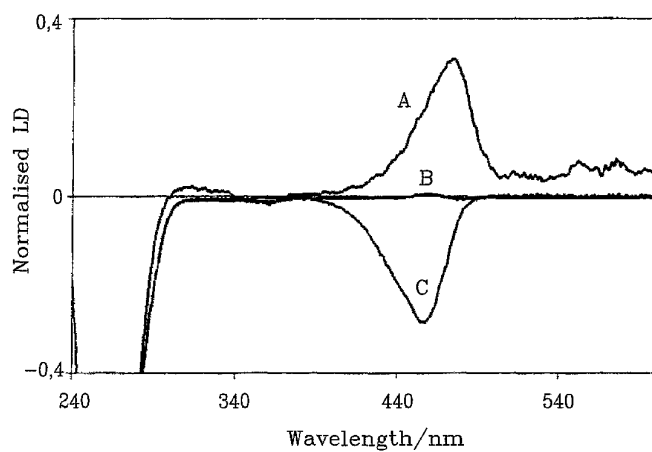


FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

2/15

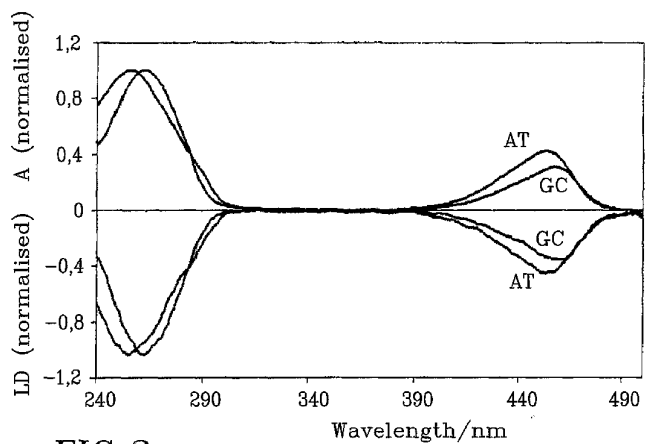


FIG.3

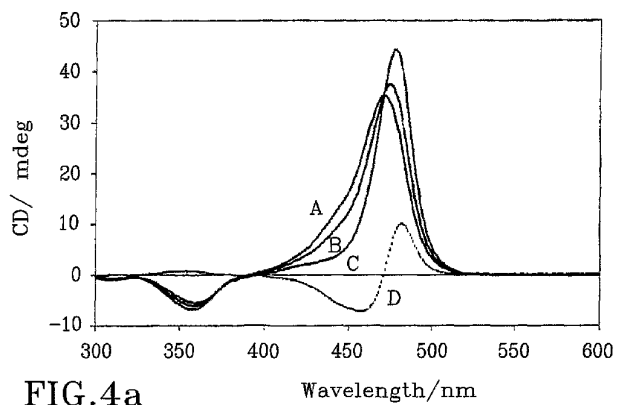


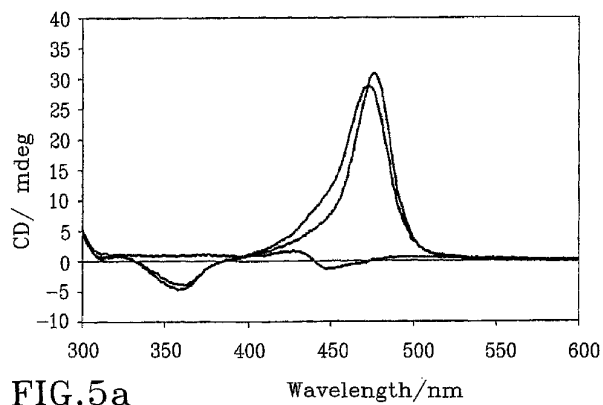
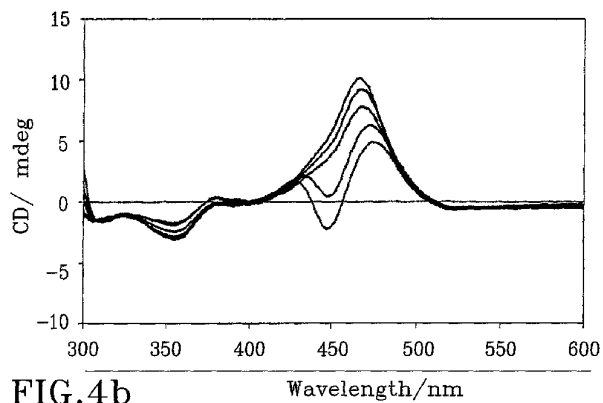
FIG.4a

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

3/15



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

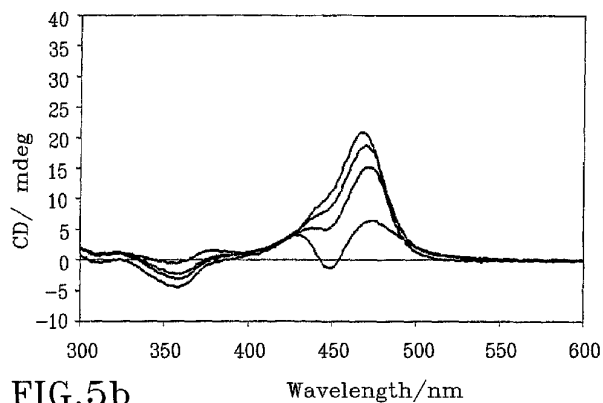


FIG.5b

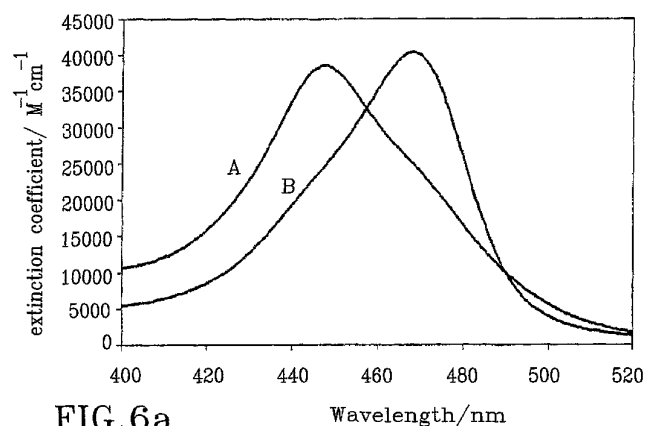


FIG.6a

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

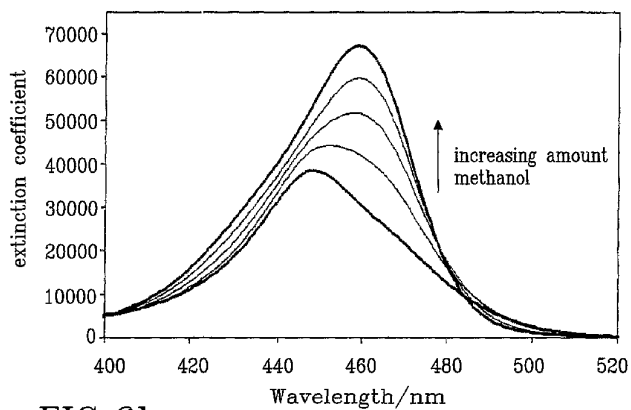


FIG.6b

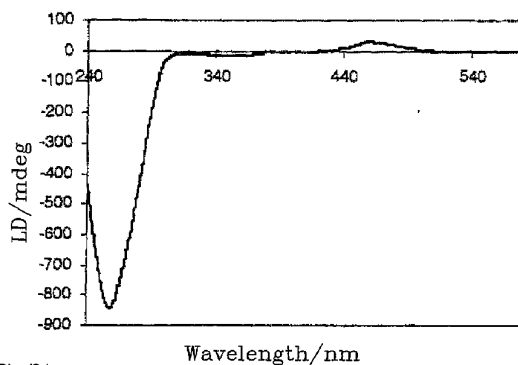


FIG.7a

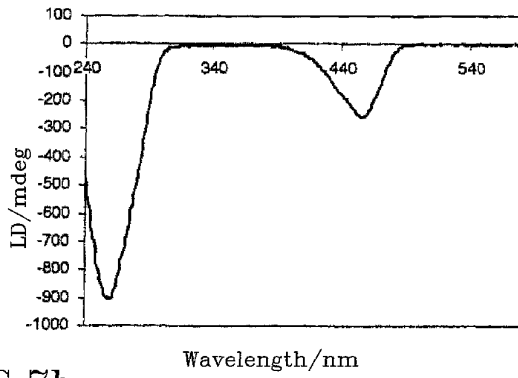


FIG. 7b

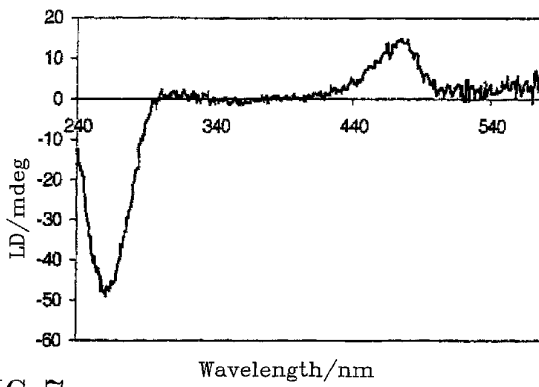


FIG. 7c

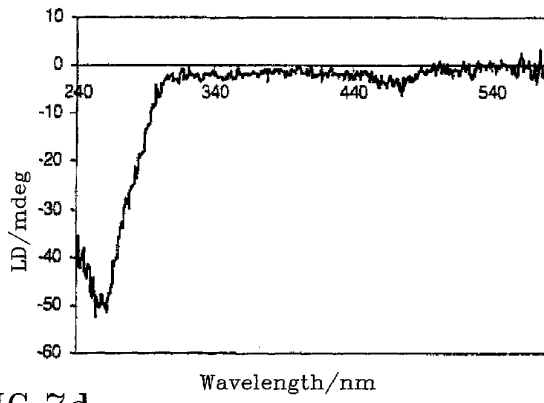


FIG.7d

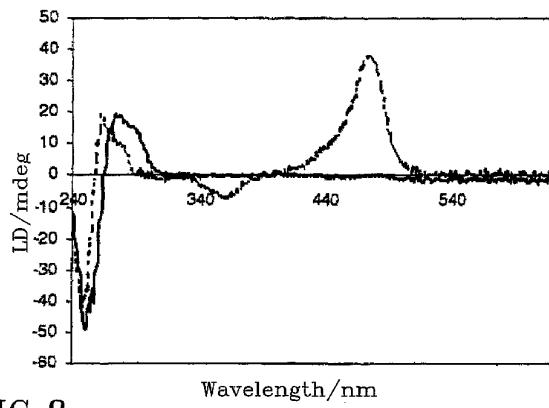


FIG.8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

8/15

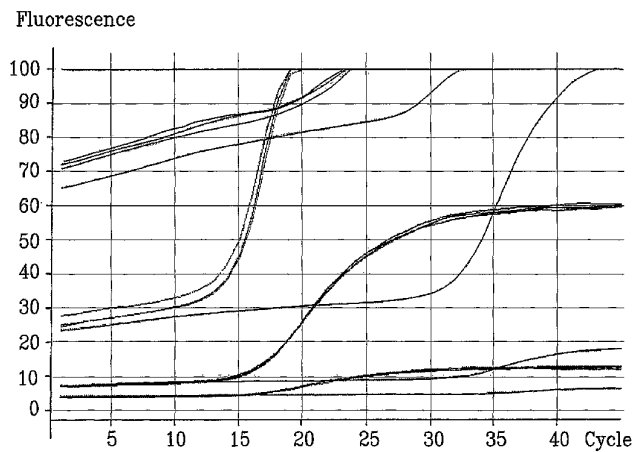


FIG. 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

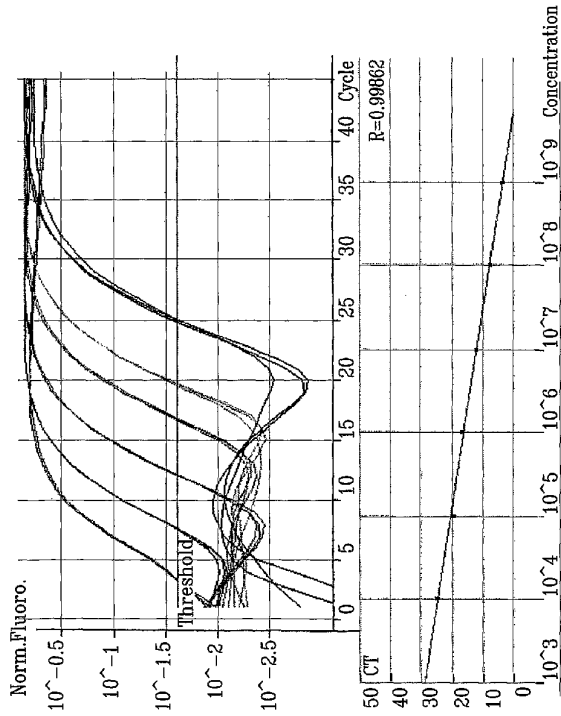


FIG.10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

10/15

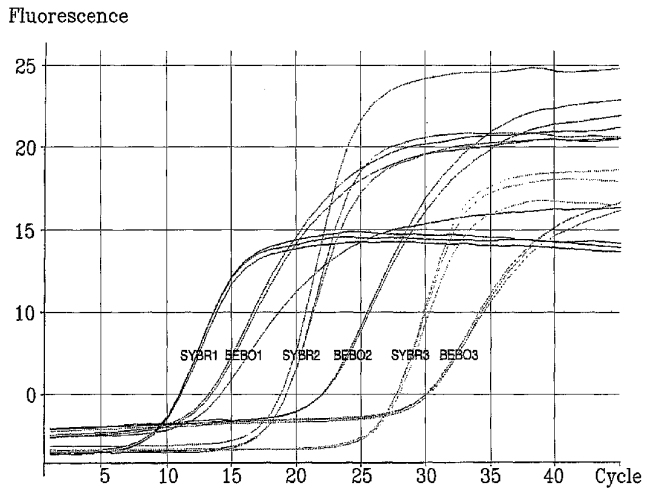


FIG.11

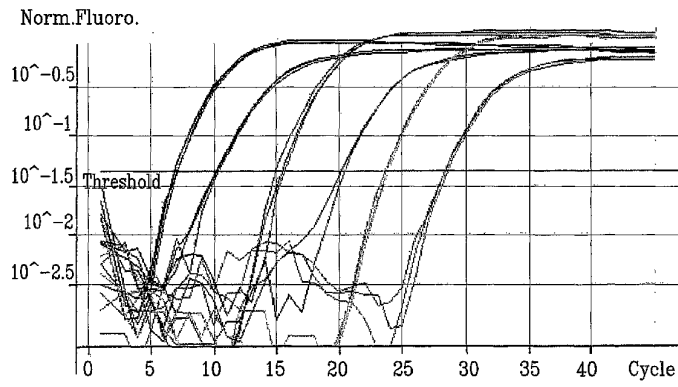


FIG.12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

11/15

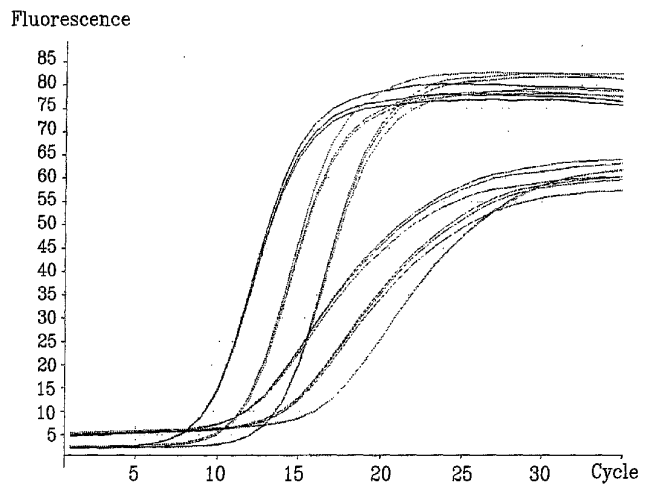


FIG.13

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/090443

PCT/SE02/00860

12/15

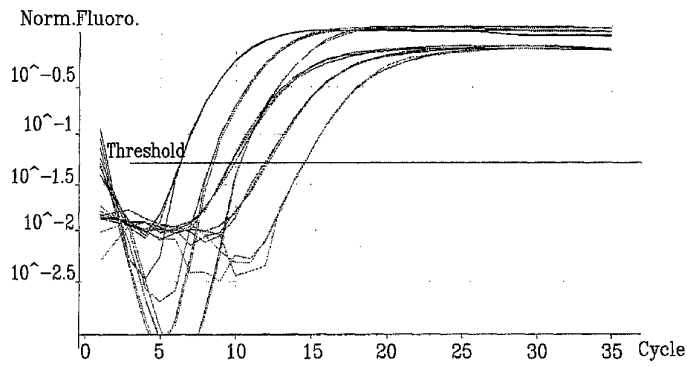


FIG.14

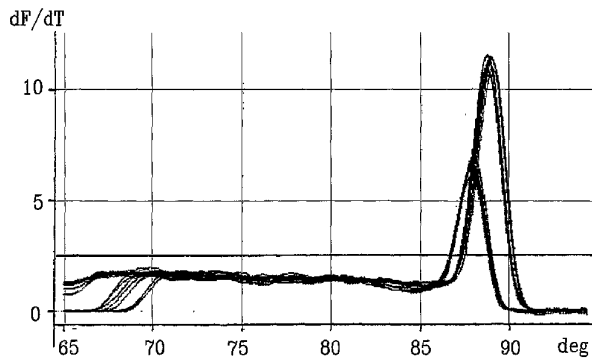


FIG.15

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

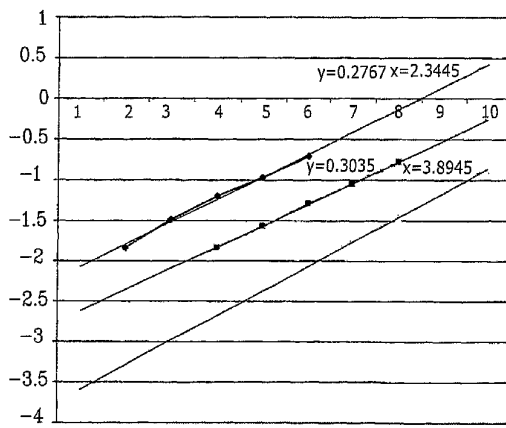
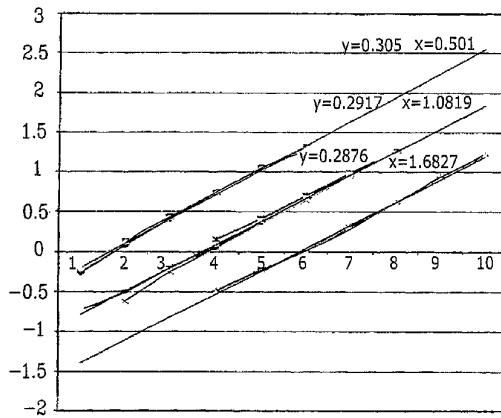


FIG. 16

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

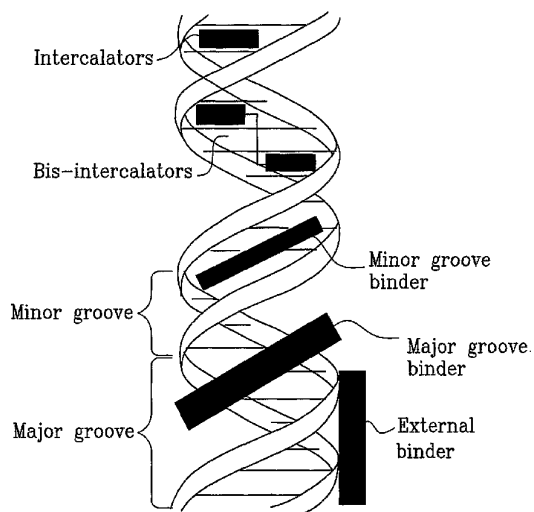
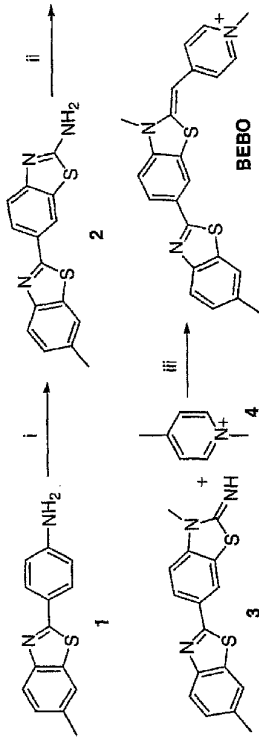


FIG. 17

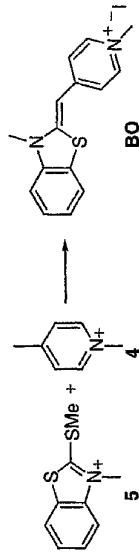
WO 02/090443

PCT/SE02/00860

15/15



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



【手続補正書】

【提出日】平成15年6月13日(2003.6.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

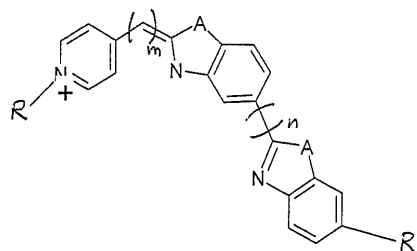
【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

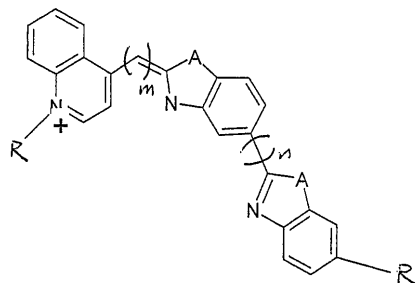
【請求項1】

【化1】



または

【化2】



からなる群から選ばれ、かつこれらの構造式において、 A_1 、 A_2 が独立にそれぞれO、SまたはNであり、RがHまたは異種原子を含む炭水化物であり、mが0～5であり、nが0～5であることを特徴とするDNAの溝中に結合したシアニン染料。

【請求項2】

Rがメチルまたはエチルであり、mが1であり、nが0であることを特徴とする請求項1に記載のシアニン染料。

【請求項3】

Rがメチルまたはエチルであり、mが1であり、nが0であり、 A_1 、 A_2 がSであることを特徴とする請求項1に記載のシアニン染料。

【請求項4】

Rがメチルまたはエチルであり、mが1であり、nが0であり、 A_1 、 A_2 がOであることを特徴とする請求項1に記載のシアニン染料。

【請求項5】

Rがメチルまたはエチルであり、mが1であり、nが0であり、 A_1 がS、 A_2 がOであることを特徴とする請求項1に記載のシアニン染料。

【請求項6】

ピリジン/キノリン環を2-位に有することを特徴とする請求項1に記載のシアニン染料。

【請求項7】

請求項1～6のシアニン染料を含んだ核酸ハイブリダイゼーション用プローブ。

【請求項8】

DNAテンプレートのリアルタイムPCR反応を実施する方法であって、二重鎖DNA中

の小溝位置中に見られたときに蛍光反応を増加させる請求項 1 ~ 6 の蛍光染料が使用され、ともに少なくとも 1 個の窒素原子を含有する少なくとも 2 個の芳香族環システムを染料が有しており、該芳香族環が 4 個までの炭素原子を有するアルキン基により連結されて共役結合を形成しており、該染料がさらに単一結合またはアセチレン結合などの顕著な二重鎖特性を具えた結合を介して自身に連結されて強固な共役システムを形成する少なくとも 1 個の第 3 芳香族システムを含有していることを特徴とする方法。

【請求項 9】

染料が非対称シアニン染料であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

シアニン残基のひとつが S および / または O を含んでいることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

染料化合物が三日月形であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

染料が請求項 1 ~ 6 の 1 以上の誘導体であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE 02/00860		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C09B 49/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: C09B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CHEM. ABS DATA, WPI DATA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5656449 A (STEPHEN T. YUE), 12 August 1997 (12.08.97)	1-9
A	Chemical Abstracts, Volume 83, No 22, 1 December 1975 (01.12.75), (Columbus, Ohio, USA), Zubarovskii, V.M. et al, "Asymmetric imidacarbocyanines with hetaryls as substituents", page 115, THE ABSTRACT No 181080h, Ukr. Khim. Zh. (Russ. Ed.) 1975, 41 (8), 851-854	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
7 October 2002	10-10-2002	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Carolina Gómez Lagerlöf/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE02/00860**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **5-8**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see next sheet

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE02/00860

Present claims 5-8 relate to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claim contains so many options, that a lack of clarity and conciseness within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which appear to be clear and concise, namely the compounds claimed in claim 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International application No.
			30/09/02	PCT/SE 02/00860
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5656449 A	12/08/97	NONE		

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 HA13
4B063 QA18 QQ42 QR56 QR62 QS25 QX02
4H056 CA01 CC02 CC08 CE03 DD19 FA01 FA05 FA08