



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 03 005 T2 2006.05.11**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 390 433 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C09B 49/00 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 03 005.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE02/00860**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 731 046.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 02/090443**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.05.2002**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **14.11.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.02.2004**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **16.02.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.05.2006**

(30) Unionspriorität:  
**0101651 10.05.2001 SE**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(73) Patentinhaber:  
**Light Up Technologies AB, Huddinge, SE**

(72) Erfinder:  
**WESTMAN, Gunnar, S-438 92 Härryda, SE;  
KARLSSON, Jonas, S-411 03 Göteborg, SE;  
KUBISTA, Mikael, S-435 31 Mölnlycke, SE**

(74) Vertreter:  
**Meissner, Bolte & Partner, 90402 Nürnberg**

(54) Bezeichnung: **SYNTHESE UND AUSPRÜFUNG VON NEUEN CYANINFARBSTOFFEN ALS AN DIE KLEINE FUR-  
CHE VON POLY(DADT)2 BINDENDE STOFFE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

Technisches Gebiet

**[0001]** Die Erfindung betrifft neue Cyaninfarbstoffe, die für die Verwendung bei der DNA-Sequenzanalyse besonders geeignet sind, insbesondere Binder bzw. bindende Stoffe an die kleine Furche von  $[\text{poly}(\text{dA-dT})]_2$ .

## Einschlägiger Stand der Technik

**[0002]** Die Einführung der kombinatorischen Chemie, die Sequenzanalyse des Human-Genoms und die Miniaturisierung, z.B. das Labor auf einem Chip, die Nanochemie, haben die Schaffung unzähliger Banken von "neuen chemischen Dingen" ermöglicht, von denen Millionen durch Hochleistungs-Screening getestet werden müssen, um aktive Orte und Wirkstoffe zu identifizieren. Wirkstoffe, die in der kleinen Furche der DNA reversibel an die DNA binden, wurden mit dem Ziel synthetisiert, neue führende Verbindungen mit Antikrebs- und Antiviruseigenschaften zu schaffen. Früher wurden radioaktive Sonden bzw. Proben verwendet, um den Effekt der Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff-DNA zu untersuchen, in den letzten Jahren ist jedoch damit begonnen worden, diese durch verschiedene Fluorogen-Assays zu ersetzen. Gegenwärtig werden die Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff-DNA hauptsächlich durch Absorptionsspektroskopie, Assays mit der Verdrängung eines Fluoreszenzfarbstoffs, Footprinting oder NMR untersucht. Da die Anzahl der Fluoreszenz-Marker auf wenige begrenzt ist, besteht die Herausforderung, neue Fluoreszenzfarbstoffe zu entdecken, die die Grenzen umgehen, die den gegenwärtig verfügbaren auferlegt sind. Neue Fluorogenverbindungen, die in der kleinen Furche binden, können entweder bei Farbstoffverdrängungs-Assays arbeiten oder eine Einsicht darüber liefern, wie Substituenten als Erkennungselemente für die kleine Furche arbeiten könnten.

**[0003]** Fluorogenverbindungen können aufgrund der hohen Quantenemissionsausbeute bei der Anregung eine enorme Empfindlichkeit bieten. Eine Einschränkung besteht darin, daß es nicht viele Fluorophore gibt, die bei der Hybridisierung oder Reaktion mit Targets eine starke Zunahme der Fluoreszenz liefern.

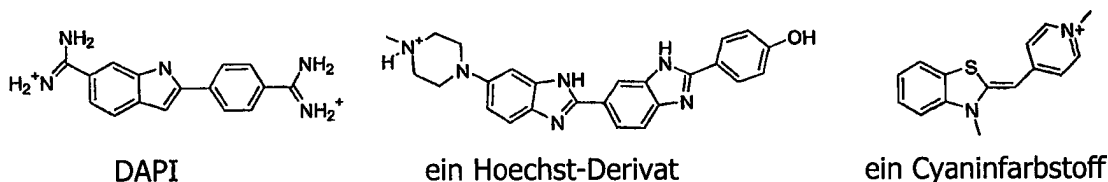
**[0004]** Asymmetrische Cyaninfarbstoffe haben aufgrund ihrer hervorragenden Färbereigenschaften bei Nucleinsäuren viel Interesse erzielt. Beim Binden mit Nucleinsäuren zeigen solche Farbstoffe gewöhnlich eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität<sup>1</sup> und werden in verschiedenen Zusammenhängen in großem Umfang als Fluoreszenz-Marker für DNA verwendet.<sup>2-4</sup> Die Wechselwirkung zwischen einer doppelsträngigen DNA und den asymmetrischen Cyaninfarbstoffen TO und YO (**Fig. 1**) wurden bei einigen Untersuchungen spektroskopisch erforscht, und es wurde festgestellt, daß sie in einer unspezifischen Art und Weise durch Interkalation<sup>5-7</sup> binden.<sup>8</sup> Sie binden auch stark an eine einzelsträngige DNA, was von einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität begleitet wird.<sup>9</sup> Das macht diese Farbstoffe bei Untersuchungen weniger vorteilhaft, bei denen nur ein Signal bei einer doppelsträngigen DNA erwünscht ist. Es gibt jedoch fluoreszierende Liganden, die anstelle einer Interkalation, die selektiv an doppel- und nicht an einzelsträngige DNA bindet, in der kleinen Furche binden, z.B. DAPI<sup>10</sup> und Hoechst-Derivate.<sup>11</sup> Im Gegensatz zu den meisten Cyaninfarbstoffen haben diese Liganden eine Selektivität für die DNA-Sequenz, vorzugsweise für A/T-reiche Segmente.<sup>12</sup> Außerdem üben sie im Vergleich mit Interkalationsfarbstoffen beim Binden einen geringeren Störeffekt des DNA-Doppelstranges aus. Das ist bei Untersuchungen wertvoll, bei denen es kritisch ist, daß die DNA nicht gestreckt wird, z.B. bei bestimmten Fluoreszenzmikroskopuntersuchungen.<sup>13,14</sup> Binder in der kleinen Furche zeigen jedoch beim Binden an die DNA keine genauso deutliche Zunahme der Fluoreszenz wie asymmetrische Cyaninfarbstoffe, die eine mehr als tausendfache Zunahme zeigen können.<sup>1</sup> Bei BO (**Fig. 1**) wurde von einer 400-fachen Zunahme der Fluoreszenz berichtet,<sup>15</sup> wohingegen Hoechst und DAPI eine  $\sim 95$ -facht<sup>16</sup> bzw. eine  $\sim 20$ -fache<sup>17</sup> Zunahme zeigten. Ein weiterer Vorteil der asymmetrischen Cyaninfarbstoffe als Marker für die DNA besteht in deren relativ langen Absorptionsmaxima, wodurch die Probleme einer Hintergrundabsorption vom biologischen Material vermindert werden. Die Absorptionsmaxima der Farbstoffe in **Fig. 1**, wenn sie an eine DNA gebunden sind, ändern sich von etwa 435 bis 510 nm<sup>6,9,17</sup>, im Vergleich mit etwa 350 nm für Hoechst 33258 (Hoechst) und DAPI.<sup>17</sup> Ein Farbstoff, der die Merkmale von in der kleinen Furche bindenden Liganden und die photophysikalischen Eigenschaften von üblichen asymmetrischen Cyaninfarbstoffen kombiniert, wäre folglich für den Nachweis und die Untersuchungen der DNA sehr wertvoll.

**[0005]** Als einen ersten Versuch im Hinblick auf einen solchen Farbstoff haben wir den asymmetrischen Cyaninfarbstoff BEBO gestaltet (Schema 1). Dieser Farbstoff hat das gleiche Cyanin-Chromophor wie der Interkalationsfarbstoff BO, die Struktur ist jedoch mit einem Benzothiazol-Substituenten in der 6-Position verlängert. Die Anordnung der Benzothiazol-Einheit verleiht dem BEBO eine Sichelform, die der anderer Binder in der kleinen Furche, z.B. Hoechst, ähnlich ist. Der kurze Syntheseweg zu BEBO, der beim handelsüblichen, mit Benzothiazol substituierten Anilin 1 beginnt, hat die Wahl der Benzothiazolgruppe angeregt (Schema 1). Außerdem

wurde nahegelegt, daß symmetrische Cyaninfarbstoffe, die zwei Benzothiazol-Einheiten enthalten, entweder als Monomere<sup>18</sup> oder als Dimere in der kleinen Furche binden.<sup>19</sup> Wir beschreiben hier die Synthese und Untersuchungen beim Binden der DNA von BEBO und dem analogen Farbstoff BO.

**[0006]** Die Fluorophore, die gegenwärtig am häufigsten verwendet werden, sind Fluorescein, BODIPY, DAPI, Hoechst und asymmetrische Cyaninfarbstoffe, wie TO, YO und TOTO.

**[0007]** Fluorescein und BODIPY sind die üblichsten fluoreszierenden Reportergruppen für das kovalente Markieren von Proteinen, wohingegen DAPI, Hoechst und Cyaninfarbstoffe die üblichsten Fluorophore für den Nachweis einer Nucleinsäure darstellen.



**[0008]** DAPI (Absorptionsmaximum 400 nm) und Hoechst (Absorptionsmaximum 350 nm) binden in der kleinen Furche und werden als basenspezifische fluoreszierende Sonden für DNA mit einer 20-fachen Zunahme der Fluoreszenz beim Binden an die DNA verwendet. Im Gegensatz dazu haben asymmetrische Cyaninfarbstoffe beim Binden an eine DNA eine bis zu 18.000-fache Zunahme der Fluoreszenz gezeigt. Sie haben auch den Vorteil, daß die Absorption und die Emission leicht geändert werden kann, wenn die Anzahl der Doppelbindungen zwischen den aromatischen Ringen geändert wird. Ein wesentlicher Nachteil bei asymmetrischen Cyaninfarbstoffen besteht jedoch darin, daß sie gegenüber DNA-Sequenzen gewöhnlich nichtspezifisch binden. (D.h. eine Interkalation vornehmen oder Ionenpaar-Komplexe mit der DNA bilden, was zu einem komplexen oder schwachen Fluoreszenzsignal führen kann.) Deshalb kann ein Cyaninfarbstoff, der in einer besser organisierten Art und Weise bindet, bei der Hybridisierung eine starke Zunahme der Fluoreszenz aufweisen und folglich empfindlichere Fluorophore darstellen.

**[0009]** Die kleine Furche ist ein geeigneter Angriffsort, da sie normalerweise nicht von Zellverbindungen, wie Proteinen, eingenommen wird. Sie stellt auch aufgrund des negativen elektrostatischen Potentials und des konvexen Untergrunds der kleinen Furche ein perfektes Komplement für die konkaven kationischen Farbstoffe dar. Bestimmte Binder in der kleinen Furche stabilisieren DNA-Doppelstränge und können als Regulatoren für die DNA-Proteinfunktion wirken. Als Folge kann die Entwicklung von sequenzspezifischen Bindern in der kleinen Furche neue Verbindungen mit Antikrebs- und/oder Antiviruseigenschaften schaffen und somit als alternativer und komplementärer Versuch zur unvernünftigen Oligonucleotid-Strategie dienen. Außerdem kann der stabilisierende Effekt der Binder in der kleinen Furche auf DNA-Doppelstränge bei Sonden verwendet werden, die aus einem Konjugat aus einem Liganden für die kleine Furche-Nucleinsäure bestehen, wodurch die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Sonden-DNA-Doppelstränge erhöht werden. Eine Zunahme der  $T_m$  der Sonden ermöglicht eine flexiblere Gestaltung des Assays, da das Oligo in der Sonde kürzer sein kann und noch die optimale  $T_m$  hat.

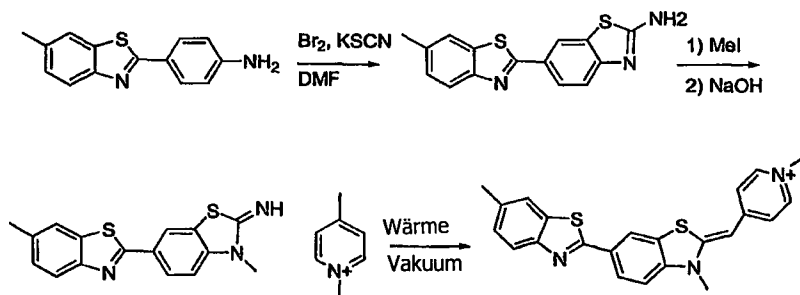
**[0010]** Sequenzselektive Binder in der kleinen Furche zeigen bei der Unterscheidung auch eine fehlende Übereinstimmung. Nucleinsäure-Sonden mit Bindern in der kleinen Furche als Reportergruppe sollten einen größeren Unterschied zwischen der  $T_m$  der übereinstimmenden und der einbasischen, nicht übereinstimmenden Nucleinsäuren als die entsprechende Sonde mit einer interkalierenden Substanz als Reportergruppe aufweisen. Dadurch wird die Unterscheidungsleistung von Hybridisierungs-Assays verbessert.

**[0011]** Ein vorteilhaftes Merkmal von Bindern in der kleinen Furche ist der Vorzug gegenüber doppelsträngiger DNA im Vergleich mit einsträngiger DNA, wohingegen interkalierende Substanzen gewöhnlich keine Bevorzugung von ein- oder doppelsträngiger DNA zeigen. Dieses Merkmal führt dazu, daß Sonden mit Bindern in der kleinen Furche bei der Hybridisierung eine geringere Hintergrundfluoreszenz als Sonden mit einer interkalierenden Substanz und als Folge ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis haben. Außerdem können für die Doppelstrang-DNA spezifische Farbstoffe für die mengenmäßige Erfassung der DNA in Gemischen verwendet werden, die mit RNA oder einsträngiger DNA verunreinigt sind.

#### Kurze Beschreibung der vorliegenden Erfindung

**[0012]** Eine Herausforderung besteht darin, eine Anzahl von hochempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen, ausreichend getrennten Emissionsspektren zu entwickeln, die in einer exakten Art und Wei-

se binden und somit den mehrfachen Nachweis einer Reihe von Targets mit hoher Empfindlichkeit ermöglichen. Wie bereits erwähnt, können Cyaninfarbstoffe bei der Hybridisierung eine bis zu 18.000-fache Zunahme der Fluoreszenz aufweisen, was fast 1.000 mal höher als bei den gegenwärtig verwendeten Bindern in der kleinen Furche ist. Auch die Absorption und Emission lassen sich leicht abstimmen, wenn das konjugierte System in Cyaninfarbstoffen geändert wird. Somit steht ein Cyaninfarbstoff, der so substituiert ist, daß das Binden in der kleinen Furche geregelt ist, bei dem jedoch die außergewöhnlichen Fluoreszenzeigenschaften der bekannten Cyaninfarbstoffe erhalten geblieben sind, anscheinend eine sehr interessante Zielverbindung dar.



**[0013]** Von der konkaven Struktur der Binder in der kleinen Furche und den neuen Erkenntnissen inspiriert, daß eine Benzothiazolgruppe und Gruppen mit verwandter Struktur die Erkennung der kleinen Furche regeln können, wurde entsprechend der vorangegangenen Erläuterung ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff gestaltet und synthetisiert, der mit einer zusätzlichen Benzothiazolgruppe substituiert ist.

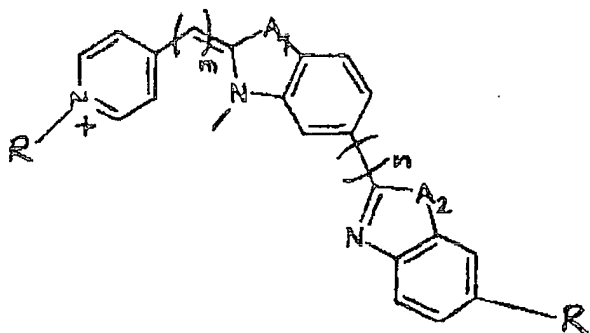
**[0014]** Die Wechselwirkung zwischen diesem neuen Farbstoff und der DNA wurde mit verschiedenen Spektroskopieverfahren, wie dem Verlauf des LD und der CD untersucht.

**[0015]** Diese beiden Verfahren können eine Information darüber liefern, ob sich ein Wirkstoff durch Interkalation oder Binden in der Furche an die DNA bindet. Eine schwache Induktion des CD ist gewöhnlich mit einer Interkalation verbunden, wohingegen eine asymmetrische Induktion auf der Bindung in der Furche beruht. Das Binden in der Furche ergibt ein deutliches Signal beim Verlauf des LD.

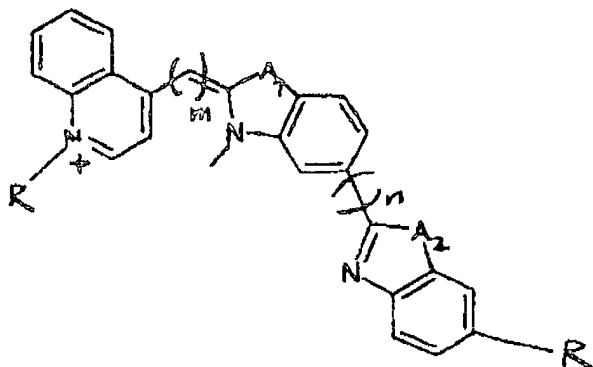
**[0016]** In Gegenwart der DNA vom Thymus vom Kalb wurde in den Spektren des Verlaufs des LD ein schwaches positives Signal beobachtet. Das kann auf dem heterogenen Binden mit einem Gemisch eines interkalierten und eines in der Furche bindenden Farbstoffs beruhen. Andererseits ist in Gegenwart von  $\text{poly}[(\text{dA-dT})]_2$  ein deutlicher positiver LD erkennbar, der einen starken Hinweis auf das Binden in der kleinen Furche liefert. Bei  $\text{poly}[(\text{dG-dC})]_2$  wurde nur ein schwaches negatives Signal beobachtet, was auf ein heterogenes Binden oder eine geringe Häufigkeit des interkalierten Farbstoffs hinweist.

#### Ausführliche Beschreibung der vorliegenden Erfindung

**[0017]** Es hat sich nunmehr gezeigt, daß die folgenden Verbindungen die vorstehend erläuterten Probleme lösen, und die vorliegende Erfindung ist wie folgt hauptsächlich durch neue Verbindungen gekennzeichnet: einen Cyaninfarbstoff, der in der Furche der DNA bindet, ausgewählt aus der Gruppe von



oder



wobei  $A_1$  und  $A_2$  jeweils unabhängig voneinander O, S oder N sind und R H oder ein Kohlehydrat ist, das ein Heteroatom enthalten kann, und  $m$  0 bis 5 und  $n$  0 bis 5 ist. Nach einer Ausführungsform hat der Cyaninfarbstoff einen Rest R, der Methyl oder Ethyl ist, und  $m$  ist 1 und  $n$  ist 0.

[0018] Nach einer Ausführungsform weist der Cyaninfarbstoff einen Rest R auf, der Methyl oder Ethyl ist, und  $m$  ist 1 und  $n$  ist 0 und  $A_1$  und  $A_2$  sind S.

[0019] Nach einer Ausführungsform hat der Cyaninfarbstoff einen Rest R, der Methyl oder Ethyl ist, und  $m$  ist 1 und  $n$  ist 0 und  $A_1$  und  $A_2$  sind O.

[0020] Nach einer Ausführungsform weist der Cyaninfarbstoff einen Rest R auf, der Methyl oder Ethyl ist, und  $m$  ist 1 und  $n$  ist 0 und  $A_1$  ist S und  $A_2$  ist O.

[0021] Nach einer Ausführungsform hat der Cyaninfarbstoff den Pyridin/Chinolin-Ring in der 2-Position.

[0022] Nach einem Gesichtspunkt stellt die vorliegende Erfindung eine Sonde für die Nucleinsäurehybridisierung bereit, die einen wie vorstehend beschriebenen Cyaninfarbstoff umfaßt.

[0023] Nach einem weiteren Gesichtspunkt gibt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Durchführung einer PCR-Echtzeitreaktion eines DNA-Templats an, bei dem ein Fluoreszenzfarbstoff der vorstehenden allgemeinen Formeln verwendet wird, der dessen Fluoreszenzreaktion verstärkt, wenn er an der Stelle einer kleinen Furche in einer doppelsträngigen DNA blockiert ist.

[0024] Nach einer Ausführungsform des Verfahrens ist der Farbstoff ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff.

[0025] Nach einer Ausführungsform des Verfahrens enthält einer der Cyaninreste S und/oder O.

[0026] Nach einer Ausführungsform des Verfahrens ist die Farbstoffverbindung sichelförmig.

[0027] Der neue Farbstoff bindet zweifellos unterschiedlich an A-T-reiche und G-C-reiche Regionen. Ergebnisse von CD-Messungen lieferten einen weiteren Beweis für das Binden dieses neuen Farbstoffs in der Furche.

[0028] Bei poly GC ist fast kein Signal zu erkennen, das mit dem interkalierenden oder externen Binden über-



bietet jedoch einen Syntheseweg für BEBO mit nur vier Schritten, wobei vom handelsüblichen 4-substituierten Anilin 1 ausgegangen wird (Schema 1). Die Thiocyanierung des Anilins 1 mit Kaliumthiocyanat und Brom in DMF ergab das 2-Aminobenzothiazol 2 mit einer Ausbeute von 40 %.<sup>21,22</sup> Das Methylieren der Verbindung 2 mit Iodmethan und das anschließende Deprotonieren verliefen mit einer Gesamtausbeute von 77 %, wodurch das 2-Imino-3-methylbenzothiazolin 3 hergestellt wurde. Der Farbstoff BEBO wurde mit 24 % hergestellt, indem das Benzothiazolin 3 bei 160 °C unter einem Vakuum einfach mit dem Pyridiniumsalz 4 geschmolzen wurde.<sup>20</sup>

**[0037]** Um vergleichende DNA-Bindungsuntersuchungen zu ermöglichen, wurde der angenommene interkalierende Farbstoff BO (1-Methyl-4-[(3-methyl-2(3H)-benzothiazolyliiden)methyl]-pyridiniumiodid) nach dem klassischen Verfahren synthetisiert, wobei ein von Zhou et al. modifiziertes Verfahren angewendet wurde (Schema 2).<sup>23</sup> Der Farbstoff wurde mit einer Ausbeute von 46 % erhalten, indem das Pyridiniumsalz 4 und das Benzothiazoliumsalz 5 unter Anwendung von Triethylamin als Base in Dichlormethan kondensierten.

#### Messungen des linearen Dichroismus

**[0038]** Um den Effekt zu untersuchen, der durch den Benzothiazol-Substituenten in BEBO bei dessen Wechselwirkung mit der DNA hervorgerufen wird, wurden als Vergleich auch Bindungsuntersuchungen des analogen Farbstoffs BO durchgeführt. [Fig. 2](#) zeigt den Verlauf der Spektren des linearen Dichroismus (LD) von BEBO und BO bei unterschiedlichen DNA. Der LD wird als Differenz bei der Absorption von Licht, das parallel und senkrecht zur makroskopischen Orientierungsachse polarisiert worden ist, definiert. LD-Spektren orientierter DNA-Liganden-Komplexe können in bezug auf die Winkel analysiert werden, die die Elektronenübergangsmomente der Liganden mit der Achse der DNA-Helix bilden, wodurch eine Information über die Bindungsgeometrie gewonnen wird.<sup>24</sup> Die Orientierung der DNA-Komplexe wurde mit einer Couette-Durchflußzelle mit einem äußeren rotierenden Zylinder erreicht. Bei BEBO in Gegenwart von [poly(dA-dT)]<sub>2</sub> (poly-AT) zeigt sich ein klarer positiver LD, der einen deutlichen Hinweis auf das Binden in der kleinen Furche gibt ([Fig. 2](#)). Anhand des geringeren LD, der durch Teilung des LD durch die isotrope Absorption erhalten wird, wurde der Winkel zwischen dem Übergangsmoment bei der langen Wellenlänge von BEBO und der DNA-Helix mit 44° berechnet. Das ist dem Winkel für bekannte Binder in der kleinen Furche, z.B. DAPI, sehr ähnlich.<sup>25</sup> Es kann erwartet werden, daß der hauptsächlichste Übergangsmoment von BEBO ungefähr entlang der Linie polarisiert ist, die das Pyridin mit dem nächsten Benzothiazolring verbindet.<sup>26</sup> Das schwächere positive Signal, das BEBO in Gegenwart der DNA vom Thymus vom Kalb (ctDNA) zeigt, beruht möglicherweise auf dem Binden in der kleinen Furche mit einem Winkel nahe 54°, wie es in früheren Untersuchungen von symmetrischen Cyaninfarbstoffen nahegelegt worden ist.<sup>13</sup> Der Bindungswinkel an poly-AT von 44° zusätzlich zu den CD-Titrationswerten (siehe nachstehend) schlägt eine kompliziertere Bindung an ctDNA mit gemischten Bindungsmodi vor, die zu einem durchschnittlich niedrigen LD-Signal führen. Obwohl Hoechst und DAPI für das Binden in der kleinen Furche an AT-reiche Regionen bevorzugt sind, wurde angeregt, daß sie sich durch einen nicht-klassischen Interkalationsprozeß an GC-Sequenzen binden.<sup>27,28</sup> Dieses Modell trifft hier anscheinend ebenfalls zu, da das reduzierte LD-Spektrum von BEBO bei [poly(dG-dC)]<sub>2</sub> (poly-GC) einen negativen Wert mit der gleichen Amplitude wie bei den DNA-Basen zeigt, was auf eine Interkalation hinweist (die Werte sind nicht gezeigt).

**[0039]** Im Gegensatz zum Binden von BEBO zeigen LD-Messungen, daß BO durch Interkalation an alle drei verschiedenen untersuchten Polynucleotide bindet: ctDNA ([Fig. 2](#)), poly-AT und poly-GC ([Fig. 3](#)). Die Änderung des Bindungsmodus, die durch die Verlängerung der BO-Struktur mit Benzothiazol hervorgerufen wird, ist im Falle von poly-AT besonders deutlich.

#### Messungen des zirkularen Dichroismus

**[0040]** Der hervorgerufene deutliche positive CD für BEBO in Gegenwart von poly-AT ([Fig. 4a](#)) liefert eine weitere starke Unterstützung für das Binden in der kleinen Furche.<sup>29</sup> [Fig. 4a](#) zeigt die Titration von poly-AT in BEBO bei Bindungsverhältnissen R, die als die Gesamtzahl der Farbstoffmoleküle pro Base definiert werden, die von 0,025 bis 0,1 variieren. Die höhere CD-Amplitude von BEBO beim höchsten Bindungsverhältnis wird durch einen Beitrag der Kupplungs-Wechselwirkungen bei der Anregung zwischen eng gebundenen Chromophoren erklärt. Das wird deutlich, wenn in [Fig. 4a](#) das Spektrum B (R = 0,05) vom Spektrum C (R = 0,1) abgezogen wird, wodurch ein Spektrum erzeugt wird, das für eine Kupplung bei der Anregung typisch ist (D, [Fig. 4a](#)).

**[0041]** In Gegenwart der ctDNA ist der induzierte CD geringer, die Interkalation oder externe Stapelung des Farbstoffs würde jedoch noch nicht zu dieser hohen Amplitude führen. Deshalb muß eine deutliche Menge Farbstoff vorliegen, die sich in der kleinen Furche befindet. Die Titration der ctDNA in BEBO bei Bindungsver-

hältnissen  $R$ , die von 0,0125 bis 0,10 variieren, ist in [Fig. 4b](#) gezeigt. Wie beim Binden von BEBO an poly-AT gibt es das Merkmal der Kopplungswechselwirkungen bei einer Anregung zwischen eng benachbarten Liganden bei höheren Bindungsverhältnissen. Bei einem niedrigeren Bindungsverhältnis ist das Signal dem der entsprechenden Spektren von poly-AT ähnlich, wenn auch mit einer niedrigeren Amplitude.

**[0042]** Das Binden von BEBO an poly-GC führt nur zu einem sehr geringen induzierten CD ([Fig. 5a](#)), was einen interkalierenden Bindungsmodus an GC-Regionen unterstützt. Das kann teilweise für den geringeren CD verantwortlich sein, der beim Binden an die ctDNA erhalten wird. Man muß jedoch bedenken, daß die ctDNA komplexer als nur ein Gemisch wechselnder GC- und AT-Segmente ist. Die Amplitude der CD-Spektren in Gegenwart der ctDNA beträgt etwa ein Viertel der Spektren von poly-AT. Wenn die Bindung an die ctDNA ein Gemisch aus Bindung an AT-Regionen und Interkalation an GC-Regionen ist, dann werden 75 % auf interkalierende Weise gebunden. Das gilt jedoch nicht, da der LD in diesem Fall deutlich negativer sein sollte. Somit muß eine wesentliche Menge des Farbstoffs in nicht interkalierender Art und Weise an Orten an die ctDNA gebunden sein, die einen niedrigeren induzierten CD ergeben, als wenn er an alternierendes AT gebunden wäre.

**[0043]** Das CD-Signal für BO in Gegenwart der ctDNA war nur schwach negativ (die Werte sind nicht gezeigt), und dies erläutert den unterschiedlichen Bindungsmodus von BEBO im Vergleich mit BO weiter.

#### Bevorzugung der Polynucleotidbindung

**[0044]** Der extensive Unterschied bei der Amplitude des CD-Signals für BEBO in Gegenwart von poly-GC und poly-AT ermöglichte ein einfaches Experiment, um die mögliche Bevorzugung von AT zu untersuchen. Wenn poly-AT einer Probe von BEBO in Gegenwart von poly-GC ( $R = 0,05$ ) zugesetzt wurde, nahm das CD-Signal drastisch zu, was eine beträchtliche Bevorzugung von poly-AT zeigt ([Fig. 5a](#)). Diese Spektren stimmten mit den CD-Spektren von BEBO in Gegenwart von poly-AT ohne poly-GC bei nur leicht niedrigeren Amplituden der Signale überein ([Fig. 4a](#)).

**[0045]** Es wurde ein ähnlicher Versuch durchgeführt, um die Bindungsaffinitäten von BEBO gegenüber poly-AT und ctDNA zu vergleichen. poly-AT wurde wiederum einer Probe von BEBO zugesetzt, nunmehr in Gegenwart von ctDNA. Bei der Zugabe von poly-AT gab es ein stärkeres CD-Signal, jedoch nicht so stark, als wenn die Probe schon am Anfang poly-GC enthalten hätte ([Fig. 5b](#)). Deshalb gibt es bei diesen Verhältnissen noch eine vernünftige Menge des Farbstoffs, die an ctDNA gebunden ist, womit deutlich wird, daß es andere Bindungsorte als die alternierenden AT-Regionen in der ctDNA geben muß, die BEBO signifikant anziehen.

#### Messungen der Fluoreszenz und der Absorption

**[0046]** Die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von BEBO bei unterschiedlichen Nucleinsäuren sind in Tabelle 1b zusammengefaßt. In Analogie zu anderen asymmetrischen Cyaninfarbstoffen zeigt BEBO eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz beim Binden an eine DNA. Das deutliche Binden von BEBO in der kleinen Furche an poly-AT ergibt eine 180-fache Verstärkung der Fluoreszenzintensität, wohingegen die Zunahmen beim Binden an ctDNA und poly-GC etwas höher sind. In einer Pufferlösung zeigt der ungebundene Farbstoff seinen Emissionspeak bei 542 nm, verglichen mit 492 nm für den gebundenen Farbstoff. Wenn Ethanol anstelle eines wäßrigen Puffers als Lösungsmittel verwendet wird, verschob sich die Emission des ungebundenen Farbstoffs zu 492 nm, und die Fluoreszenzintensität war ungefähr 10 mal kleiner. Kürzlich wurde die Aggregation von TO in Gegenwart und bei Abwesenheit von einer DNA durch Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht, und es waren ähnliche Anzeichen zu erkennen, die durch die Aggregatbildung hervorgerufen wurden.<sup>30</sup> Somit werden in einer Pufferlösung aufgrund der hydrophoben Natur des Farbstoffs wahrscheinlich Dimere oder höhere Aggregate mit einem höheren Maximum der Emission gebildet.

**[0047]** Die Form der Absorptionsspektren des ungebundenen BEBO in Wasser legt zudem das Vorhandensein von Dimeren oder Aggregaten nahe ([Fig. 6](#)). Die Absorptionsmessungen von BEBO in unterschiedlichen Methanol-Wasser-Gemischen zeigten bei zunehmender Methanolmenge eine wesentliche Zunahme und eine Rotverschiebung der Absorption ([Fig. 6b](#)). Die Farbstoffmoleküle sind vermutlich in reinem Methanol als Monomere vorhanden. Das Absorptionsspektrum des ungebundenen BEBO in Methanol und das Spektrum von BEBO, das vollständig an DNA gebunden ist, haben eine sehr ähnliche Form, was darauf hinweist, daß der Farbstoff bei niedrigen Bindungsverhältnissen als Monomere gebunden ist.

**[0048]** Zusammenfassend haben wir festgestellt, daß die Modifizierungen der Struktur von BO zu einer Verschiebung des Bindungsmodus von der Interkalation zur Bindung in der kleinen Furche geführt haben. Unsere Ergebnisse beinhalten ferner die Möglichkeit der Benzothiazolgruppe als Erkennungseinheit für die kleine Fur-

che. Der Farbstoff kann in nur vier Schritten aus dem handelsüblichen Anilin 1 synthetisiert werden. Das Binden von BEBO an poly-AT erfolgt klar in der kleinen Furche, wie es aus den CD- und LD-Spektren abgeleitet wird. Ähnlich dem von DAPI und Hoechst wird das Binden von BEBO an poly-GC von der Interkalation dominiert. Bei der ctDNA mit der regellosen Sequenz scheint BEBO andererseits in einer heterogenen Wechselwirkung zu stehen. Die Interkalation an GC-Segmente und das Binden in der kleinen Furche an AT-Regionen kann jedoch nicht die einzige Erklärung für die LD- und CD-Ergebnisse darstellen, die mit ctDNA erhalten wurden. Es muß andere bevorzugte Bindungsorte in der ctDNA für BEBO geben, die einen geringeren CD als poly-AT hervorrufen. Die relativ hohe Amplitude des CD-Signals zeigt jedoch, daß es einen signifikanten Beitrag des Bindens in der kleinen Furche von BEBO an die ctDNA gibt. In Übereinstimmung mit anderen Bindern in der kleinen Furche bevorzugt BEBO poly-AT deutlich gegenüber poly-GC. Die Zunahme der Fluoreszenz beim Binden in der kleinen Furche von poly-AT ist größer als bei Hoechst und DAPI. Die Bindungseigenschaften von BEBO, insbesondere seine strikte Bindung in der kleinen Furche an poly-AT, verspricht die Entwicklung einer neuen Klasse von asymmetrischen Cyaninfarbstoffen, die das Binden in der kleinen Furche stark bevorzugen und die beim Binden eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz aufweisen. Die Synthese und Untersuchungen analoger Farbstoffe sind im Gange und davon wird bald berichtet werden.

## Versuche

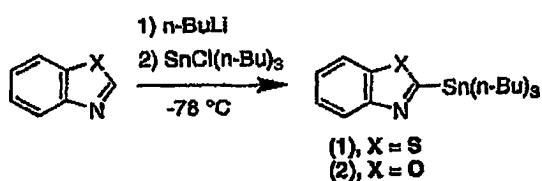
### Beispiel

#### Herstellung entsprechend des Reaktionsschemas

**[0049]** Der Farbstoff 1 wurde in vier Schritten hergestellt, wobei vom handelsüblichen Anilin 1 ausgegangen wurde. Die Thiocyanierung des 4-substituierten Anilins 1 mit Kaliumthiocyanat und Brom in DMF ergab das 2-Aminobenzothiazol 2 mit einer Ausbeute von 40 %. Das Methylieren und Deprotonieren der Verbindung 2 verlief mit einer Ausbeute von ins gesamt 70 %, wodurch das 2-Imino-3-methylbenzothiazonlin 3 hergestellt wurde. Der Farbstoff 5 wurde mit 20 % hergestellt, indem die Verbindung 3 bei 160 °C unter einem Vakuum zusammen mit dem Pyridiniumsalz 4 geschmolzen wurde.

## Synthese

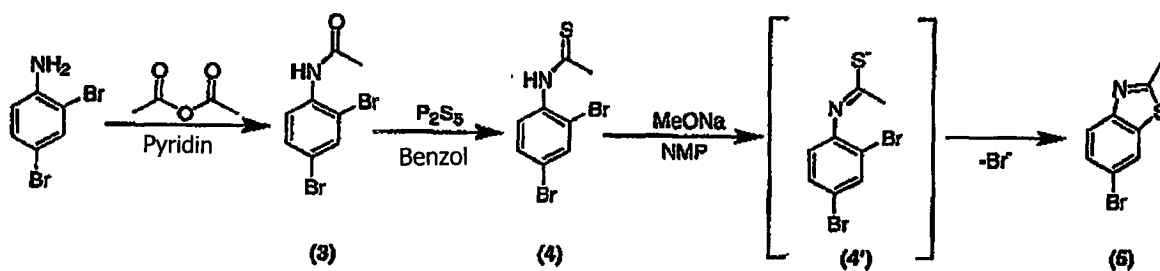
**[0050]** 2-(Tii-n-butylstannyl)-benzothiul (1) und 2-(Tri-n-butylstannyl)-benzoxuol (2) wurden hergestellt, indem Benzothiazol bzw. Benzoxazol bei -78 °C mit n-BuLi behandelt wurde, darauf folgte die Zugabe von Tii-n-butylzinnchlorid.



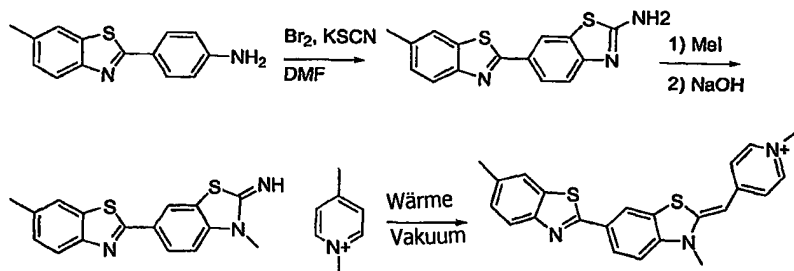
Schema: Herstellung der Organostannane.

#### 6-Brom-2-methylbenzothiazon (5)

**[0051]** 2,4-Dibromwillne wurde mit Essigsäureanhydrid in Pyridin behandelt, wodurch das Acetanilid (3) erhalten wurde. Durch die Reaktion von (3) mit Phosphorpentasulfid unter einem Benzolrückfluß wurde das Carbonyl-Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt, wodurch Thioacetanilid (4) erhalten wurde. Die Abtrennung von (4) von (3) wird leicht durch Extraktion mit wäßrigem NaOH erreicht. Das ist durch die Tatsache möglich, daß das Schwefelatom größer und stärker polarisierbar als das Sauerstoffatom ist und dadurch das wasserlösliche Thioacetwillde-Anion (4') bilden kann. Diese Fähigkeit der Bildung von (4') wird auch im letzten Schritt ausgenutzt, bei dem (4) mit Natriummethoxid behandelt wird, und die Beseitigung des Broms in der 2-Position führt zum Ringschluß, wodurch das Produkt (5) erhalten wird. Beim Entfernen von NMP durch eine Destillation von Kolben zu Kolben wurde festgestellt, daß (5) durch Sublimation leicht gereinigt wird.

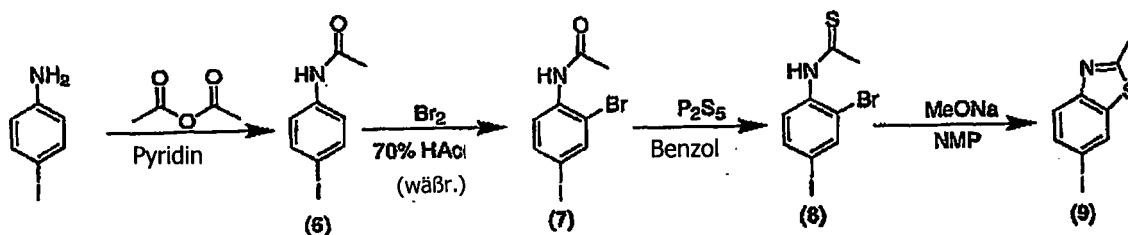


Schema: Herstellung von (5) aus 2,4-Dibromanilin.



6-Iod-2-methylbenzothiazol (9)

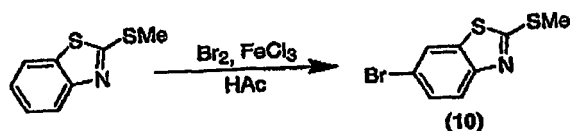
**[0052]** Die Synthese von (5) und von dessen Iod-Analog (9) ist sehr ähnlich. In diesem Fall wird jedoch das dihalogenierte Acetanilid (7) durch Acylierung von 4-Iodanilin erhalten, wodurch (6) erhalten wird, darauf folgt das Bromieren. Bei diesem Bromierungsschritt wurde ein Teil des Iods in der 4-Position durch Brom ersetzt. Versuche zur Abtrennung des erzeugten 2,4-Dibromacetanilids von (7) waren ergebnislos, sie führten zu einem Produktgemisch von (9) und (5) in einem Molverhältnis von 3:1. Trotz dessen wurde das Gemisch bei den folgenden Stille-Kupplungsreaktionen verwendet.



Schema: Herstellung von (9) aus 4-Iodanilin.

6-Brom-2-methylthiobenzothiazol (10)

**[0053]** Obwohl es bei meinen nachfolgenden Reaktionen nicht verwendet wurde, sollte erwähnt werden, daß noch ein anderes halogeniertes Elektrophil, 6-Brom-2-Methylthiobenzothiazol (10), hergestellt worden war. Die Synthese von (10) ist ziemlich unkompliziert, wie im folgenden Schema zu erkennen ist. 2-Methylthiobenzothiazol wird einfach in Essigsäure mit  $\text{FeCl}_3$  als Katalysator bromiert.



Schema: Bromieren von 2-Methylthiobenzthiazol in der 6-Position

## Stille-Kupplungen

**[0054]** Um die von Palladium katalysierte Querkupplungsreaktion zu untersuchen und zu optimieren, wurde eine Anzahl von Versuchen mit unterschiedlichen Ausgangsmaterialien und zwei verschiedenen neutralen Liganden am Katalysator durchgeführt. Dem Prozeß, der die Synthese von (11) und (13) im Abschnitt "Versuche" beschreibt, wurde jedoch bei allen Stille-Kupplungen gefolgt.  $\text{CuI}$  wird wegen seiner Cokatalysatorwirkung auf

die Kupplung verwendet. Die Tabelle 1 faßt die während dieser Diplomarbeit durchgeführten Stille-Versuche zusammen.

TABELLE 1a

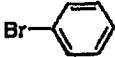
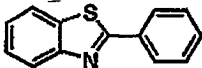
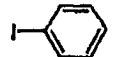
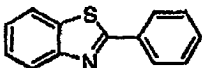
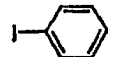
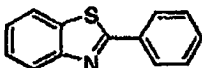
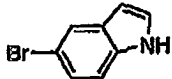
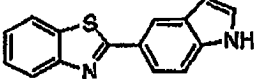
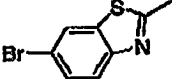
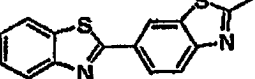
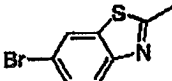
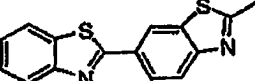
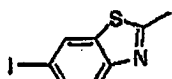
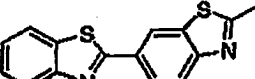
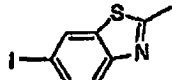
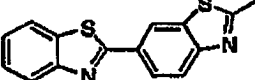
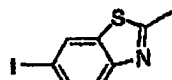
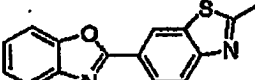
Eintrag	Organostannan	Arylhalogenid	Katalysator	Produkt	Ausbeute
1	(1)		$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$		Gering
2	(1)		$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$		72%
3	(1)		$\text{Pd}(\text{AsPh}_3)_4$		33%
4	(1)		$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$		0%
5	(1)		$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$		0%
6	(1)		$\text{Pd}(\text{AsPh}_3)_4$		0%
7	(1)		$\text{Pd}(\text{AsPh}_3)_4$		0%
8	(1)		$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$		98%
9	(2)		$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$		95%

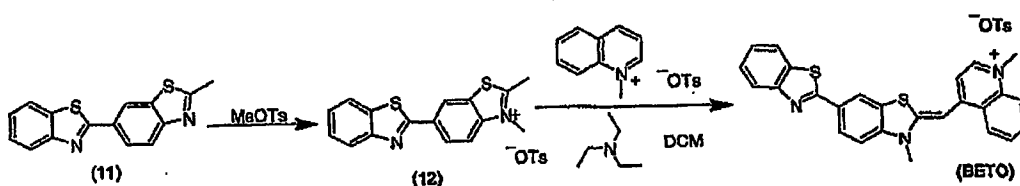
Tabelle 1a. Eine Zusammenfassung der durchgeführten Stille-Reaktionen

[0055] Beim Eintrag 1 konnte das reine Produkt trotz Flash-Chromatographie (Chloroform über Siliciumdioxid) nicht abgetrennt werden. Eine geringe Menge des Produktes wurde jedoch durch Massenspektrometrie bestätigt. Von der hervorragenden Leistung von Iod im Vergleich mit Brom ist bei den Elektrophilen bereits berichtet worden<sup>11</sup>, und sie wurde deshalb auch erwartet. Diese Eigenschaft wird durch die bessere Fähigkeit des Iods, als Abgangsgruppe zu wirken, verliehen. Ein weiterer Grund für die Fehlversuche bei den Einträgen 4 bis 7 kann sein, daß Stickstoff in der 4-Position zu Brom sein freies Elektronenpaar in den Arylring spendet, wodurch das Elektrophil deaktiviert wird. Der Grund für den Versuch, bromierte Elektrophile irgendwie zu verwenden, war deren leichtere Synthese. Obwohl das Arylhalogenid in den Einträgen 8 bis 9 tatsächlich ein Gemisch von (9) und (5) mit 3:1 (molar) war, haben wir die Ausbeuten in Tabelle 1 nur in bezug auf die Menge von (9) berechnet. Das beruht auf der vollständigen Reluktanz der bromierten Elektrophile in den Einträgen 4 bis 7 gegenüber der Reaktion.

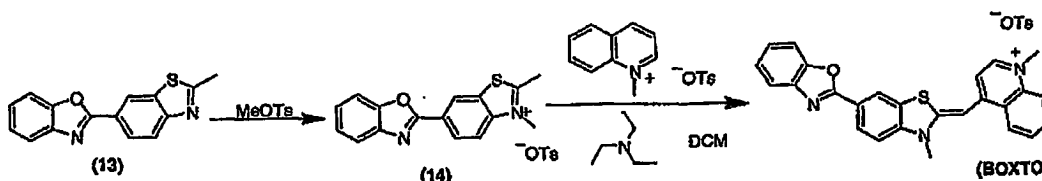
[0056] Es wurde berichtet, daß die Verwendung von Triphenylarsin als Palladium-Ligand eine bis zu 1100-fache Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeiten im Vergleich mit Triphenylphosphin zeigt. So überraschend es auch ist, Triphenylarsin war in den durchgeführten Versuchen weniger wirksam als Triphenylphosphin. Das kann, was ironisch genug ist, von der Überlegenheit des Triphenylarsins als Ligand abhängen, was Pd(O) für die Oxidation anfälliger und den Katalysator weit luftempfindlicher als einen mit Triphosphin macht. Eine geringfügige Verunreinigung mit Luftsauerstoff im Reaktionsgefäß kann hierdurch die katalytische Wirkung des mit Triphenylarsin koordinierten Palladiums wesentlich verringern, wohingegen der Katalysator mit dem Phosphin-Liganden weniger beeinflusst wird.

## BETO und BOXTO

[0057] Die zwei neuen asymmetrischen Cyaninfarbstoffe BETO und BOXTO wurden nach den in den Schemata 8 und 9 dargestellten Reaktionswegen hergestellt.



Schema 8. Die zwei letzten Schritte bei der Synthese von BETO



Schema 9. Die zwei letzten Schritte bei der Synthese von BOXTO.

[0058] Durch Behandeln von (11) und (13) mit einem Überschuß von geschmolzenem Methyltosylat wurden die methylierten Salze (12) und (14) mit einer Ausbeute von 70 bzw. 56 % erzeugt. Diese Salze ließ man mit 1-Methylcholiniumtosylat in Dichlormethan reagieren, wodurch die gewünschten Farbstoffe erzeugt wurden. Die Ausbeuten im letzten Schritt betrugen 27 bzw. 30 %.

[0059] Es wurde eine Säulenchromatographie mit Aluminiumoxid (aktiviert, neutral, etwa 150 mesh) durchgeführt, das durch die Zugabe von Wasser bis zur Brockman-Qualität III deaktiviert wurde. Die Schmelzpunkte wurden mit einem Heitzschmikroskop Mettler FP82HT bestimmt. Die Spektren der  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) und  $^{13}\text{C}$  NMR (100,6 MHz) wurden bei Raumtemperatur mit einem NMR-Spektrometer Varian UNITY-400 aufgezeichnet. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm, bezogen auf die Lösungsmittel-Peaks für DMSO angegeben ( $\delta$  2,50 für  $^1\text{H}$  und  $\delta_c$  39,51 für  $^{13}\text{C}$  NMR); die J-Werte sind in Hz angegeben. Die hochauflösenden Massenspektren wurden mit einem Gerät VG ZabSpec erfaßt. Die Spektren von UV-sichtbarem Licht wurden mit einem Spektrophotometer Varian Cary4 gemessen. Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Spektrofluorimeter SPEX fluorolog r2 erfaßt. Die LD- und CD-Spektren wurden mit einem Spektropolarimeter JASCO-720 aufgezeichnet. Die Orientierung der DNA-Komplexe wurde mit einer Couette-Durchflußzelle mit einem äußeren rotierenden Zylinder erreicht. Alle spektroskopischen Messungen wurden bei 25 °C in einem 25 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) durchgeführt. Die wäßrigen Lösungen von BEBO und BO wurden typischerweise von 2 mM Stammlösungen in DMSO erhalten. [poly(dA-dT)]<sub>2</sub> und [poly(dG-dC)]<sub>2</sub> wurden von Pharmacia als Lösungen in einem Puffer geliefert. Die DNA vom Thymus vom Kalb wurde von Fluka geliefert. Die handelsüblichen Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich geliefert und ohne weitere Reinigung verwendet. Das Pyridiniumsalz 4 und das Benzothiazolsalz 5 wurden wie bereits berichtet hergestellt.<sup>23</sup>

## 2-Amino-6-(6-methylbenzothiazol-2-yl)-benzothiazol (2)

[0060] 2-(4-Aminophenyl)-6-methylbenzothiazol 1 (4,0 g, 16,6 mMol) und KSCN (2,6 g, 26,7 mMol) wurden in DMF (20 ml) gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Innerhalb von 3 Stunden wurde tropfenweise Br<sub>2</sub> (0,9 ml, 17 mMol) in DMF (15 ml) zugesetzt. Das Gemisch wurde weitere 20 Stunden gerührt. Es wurde Wasser zugesetzt, und der gebildete Niederschlag wurde durch Filtration aufgefangen und getrocknet. Das unbehandelte Produkt wurde als Sinter mit einigen Portionen siedendem Dichlormethan zu einem Pulver zerrieben, wodurch

2 als hellgrün-gelber Feststoff erhalten wurde (1,97 g, 40 %), Schmelzpunkt 250–251 °C;

<sup>1</sup>H NMR (DMSO) δ 2,45 (3H, s, Ar-CH<sub>3</sub>), 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, NH<sub>2</sub>);

<sup>13</sup>C 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 gefunden: 298,0521 C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): erfordert M, 298,0473

#### 2-Amino-3-methyl-6-(6-methylbenzothiazol-2-yl)-benzothiazoliumiodid

**[0061]** Das 2-Aminobenzothiazol 2 (0,3 g, 1,0 mMol) wurde in DMSO (2 ml) gelöst. Es wurde Methyljodid (0,25 ml, 2,0 mMol) zugesetzt, und das Gemisch wurde 17 Stunden bei 110 °C gerührt. Das Gemisch wurde abgekühlt und in Wasser gegossen. Der gebildete Niederschlag wurde durch Filtration aufgefangen und mit Wasser gewaschen, wodurch das Produkt als gelber Feststoff erhalten wurde (0,38 g, 86 %). Schmelzpunkt 267–269 °C;

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 2,47 (3H, s, Ar-CH<sub>3</sub>), 3,74 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 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<sub>2</sub>);

<sup>13</sup>C 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 gefunden: 312,0638 C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (M<sup>+</sup>): erfordert M, 312,0629

#### 2-Imino-3-methyl-6-(6-methylbenzothiazol-2-yl)-benzothiazolin (3)

**[0062]** 2-Amino-3-methyl-6-(6-methylbenzothiazol-2-yl)-benzothiazoliumiodid (0,3 g, 0,68 mMol) wurde in DMSO (10 ml) aufgenommen. Es wurde Wasser (20 ml) zugesetzt, und das Gemisch wurde mit wässrigem NaOH (20 %) bis zu einem pH-Wert von 10 basisch gemacht. Der Niederschlag wurde durch Filtration aufgefangen und mit Wasser gewaschen, wodurch 3 als hellgelber Feststoff erzeugt wurde (0,19 g, 89 %). Schmelzpunkt 146–148 °C;

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): 2,45 (3H, s, Ar-CH<sub>3</sub>), 3,38 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 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);

<sup>13</sup>C NMR-Analyse war aufgrund der schlechten Löslichkeit von 4 in den verfügbaren deuterierten Lösungsmitteln nicht möglich;

HR-FAB-MS m/z gefunden: 312,0619 C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): erfordert M, 312,0629

#### 4-[(3-Methyl-6-(6-methylbenzothiazol-2-yl)-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazol)-2-methyliden)]-1-methylpyridiniumiodid (BEBO)

**[0063]** Das Benzothiazolin 3 (0,1 g, 0,32 mMol) und 1,4-Dimethylpyridiniumtosylat 4 wurden 1 Stunde unter einem Vakuum bei 160 °C miteinander geschmolzen. Es wurde DMSO (5 ml) zugesetzt, und das Gemisch wurde 30 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Das Gemisch wurde zu wässrigem KI (30 %) gegeben, und der gebildete Niederschlag wurde durch Filtration aufgefangen. Der Feststoff wurde durch Flash-Chromatographie über neutralem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mit Methanol-Dichlormethan (2:98) gereinigt, wodurch BEBO erhalten wurde (0,04 g, 24 %). Schmelzpunkt 280–281 °C;

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 2,47 (3H, s, Ar-CH<sub>3</sub>), 3,76 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 4,02 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 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, PyH), 8,65 (1H, s, ArH);

<sup>13</sup>C 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 gefunden: 402,1145 C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (M<sup>+</sup>): erfordert M, 402,1105

#### 2-(Tri-n-butylstannyl)-benzothiazol (1)

**[0064]** 20 ml frisch destilliertes THF wurden 30 Minuten mit einem Stickstoffstrom gespült, danach wurde Benzothiazol (1,0 g, 7,4 mMol) zugesetzt. Nachdem weitere 30 Minuten gespült worden war, wurde die Lösung auf -78 °C abgekühlt und in eine inerte Stickstoffatmosphäre gegeben. Innerhalb eines Zeitraum von 30 Minuten wurde tropfenweise 0,9 Äquivalent n-BuLi (2 ml Lösung in Hexan, 2,66 ml, 6,66 mMol) zugesetzt, während dieser Zeit wurde die Lösung tiefrot. Die Lösung wurde 1 Stunde bei -78 °C gehalten, und danach wurde innerhalb eines Zeitraums von 1 h tropfenweise Tri-n-butylzinnchlorid (2,0 ml, 7,4 mMol) zugesetzt. Bei dieser Zugabe veränderte sich die Lösung von tiefrot zu bräunlich-gelb, danach zu grünlich-blau und schließlich zu hellbraun. Nach einer weiteren Stunde bei -78 °C konnte die Lösung Raumtemperatur erreichen. Das THF wurde mit einem Rotationsverdampfer entfernt, und das Produkt, ein gelbes Öl, wurde durch Vakuumdestillation abge-

trennt. Ausbeute: 2,47 g, 79 %.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,90 (t, J=8, 9H,  $\text{Bu}_3\text{Sn}$ ), 1,29 (in, 6H,  $\text{Bu}_3\text{Sn}$ ), 1,35 (m, 6H,  $\text{Bu}_3\text{Sn}$ ), 1,63 (t, J=8, 6H,  $\text{Bu}_3\text{Sn}$ ), 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).

#### 2-(Tri-n-butylstannyl)-benzoxazol (2)

**[0065]** 20 ml frisch destilliertes THF wurden 30 Minuten mit einem Stickstoffstrom gespült, danach wurde Benzoxazol (1,0 g, 8,3 mMol) zugesetzt. Nachdem weitere 30 Minuten gespült worden war, wurde die Lösung auf  $-78^\circ\text{C}$  abgekühlt und in eine inerte Stickstoffatmosphäre gegeben. Innerhalb eines Zeitraum von 1 Stunde wurde tropfenweise 0,9 Äquivalent n-BuLi (2 m Lösung in Hexan, 3,0 ml, 7,6 mMol) zugesetzt, während dieser Zeit wurde die Lösung rosa. Die Lösung wurde 30 Minuten bei  $-78^\circ\text{C}$  gehalten, und danach wurde innerhalb eines Zeitraums von 1 h tropfenweise Tri-n-butylzinnchlorid (2,3 ml, 8,3 mMol) zugesetzt. Bei dieser Zugabe veränderte sich die Lösung von rosa zu braun. Nach einer weiteren Stunde bei  $-78^\circ\text{C}$  konnte die Lösung Raumtemperatur erreichen, dabei wurde sie tiefrot. Das THF wurde mit einem Rotationsverdampfer entfernt, und das Produkt, ein oranges Öl, wurde durch Vakuumdestillation abgetrennt. Ausbeute: 1,37 g, 40 %.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,90 (t, J=7, 9H,  $\text{Bu}_3\text{Sn}$ ), 1,30 (m, 6H,  $\text{Bu}_3\text{Sn}$ ), 1,35 (m, 6H,  $\text{Bu}_3\text{Sn}$ ), 1,62 (t, J=7, 6H,  $\text{Bu}_3\text{Sn}$ ), 7,29 (t, 2H, ArH), 7,55 (d, 1H, ArH), 7,77 (d, 1H, ArH).

#### 2,4-Dibromacetanilid (3)

**[0066]** Eine Lösung von 2,4-Dibromanilin (3,0 g, 12,0 mMol), 1,1 Äquivalenten Essigsäureanhydrid (1,35 g, 13,2 mMol) und Pyridin (0,95 g, 12,0 mMol) wurde auf  $100^\circ\text{C}$  erwärmt. Nach wenigen Minuten war ein Niederschlag entstanden, und es wurde Pyridin ( $\sim$  3 ml) zugesetzt, um den Niederschlag zu lösen. Die Lösung wurde 2 Stunden bei  $100^\circ\text{C}$  gehalten, danach konnte sie auf Raumtemperatur abkühlen und wurde in Wasser gegossen. Der gebildete Niederschlag wurde durch Filtration aufgefangen und mit Wasser gewaschen, wodurch das Produkt als weißes Pulver in quantitativer Ausbeute erhalten wurde (3,9 g, leicht feucht).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,24 (a, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 7,43 (d,  $J_1=8,8$ ,  $J_2=2$ , 1H, ArH), 7,69 (s, J=2, 1H, ArH), 8,27 (d, J=8,8, 1H, ArH).

#### 2,4-Dibromthioacetanilid (4)

**[0067]** 2,4-Dibromacetanilid (2,2 g, 7,51 mMol) wurde in 10 ml Benzol gelöst, und es wurde Phosphorpentasulfid (3,34 g, 7,51 mMol) zugesetzt. Das Gemisch wurde bei  $80^\circ\text{C}$  unter Rückfluß erhitzt. Nach wenigen Minuten entstand am Boden des Kolbens ein gummiartiger Feststoff. Um den Feststoff zu suspendieren und das Rühren zu ermöglichen, wurden weitere 20 ml Benzol zugesetzt, und das Gemisch wurde kräftig verwirbelt. Nach 5,5-stündigem Erhitzen unter Rückfluß legte die Dünnschichtchromatographie (TLC) über Siliciumdioxid in Chloroform die vollständige Reaktion nahe, und das Erwärmen wurde beendet. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde eine bräunliche Suspension filtriert, und der Niederschlag wurde mit Diethylether gewaschen. Das Benzol/Ether-Filtrat wurde zweimal mit NaOH (10 %) extrahiert. Die basische wässrige Phase wurde mit konzentrierter HCl auf pH  $\sim$  1 angesäuert. Das ergab eine hellbraune milchige Suspension. Der Niederschlag konnte nicht durch Filtration aufgefangen werden, und die Suspension wurde deshalb zweimal mit Diethylether extrahiert. Das ergab eine gelbe organische Phase, die getrocknet und verdampft wurde, wodurch das Thioacetanilid als braunes, gelbliches Öl erhalten wurde. Ausbeute: 1,33 g, 57 %.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,78 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 7,50 (d,  $J_1=8,8$ ,  $J_2=1,6$ , 1H, ArH), 7,90 (s, J=1,6, 1H, ArH), 8,40 (d, J=8,8, 1H, ArH).

#### 6-Brom-2-methylbenzothiazol (5)

**[0068]** 2,4-Dibromthioacetanilid (1,33 g, 4,3 mMol) und 1,2 Äquivalente Natriummethoxid (0,513 g, 5,2 mMol) wurden in 3 ml NMP gelöst. Nach 2 Stunden nach  $150^\circ\text{C}$  und dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das NMP durch Destillation von Kolben zu Kolben entfernt. Die braunen Rückstände wurden durch Sublimation gereinigt, wodurch das Produkt als weiße Kristalle erhalten wurde. Ausbeute: 707 mg, 72 %.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,83 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 7,55 (d,  $J_1=8,8$ ,  $J_2=1,6$ , 1H, ArH), 7,80 (d, J=8,8, 1H, ArH), 7,96 (s, J=1,6, 1H, ArH).

#### 4-Iodacetanilid (6)

**[0069]** 4-Iodanilin (5,0 g, 22,8 mMol) und 1,1 Äquivalente Essigsäureanhydrid (2,56 g, 25,1 mMol) wurden in 3 ml Pyridin gelöst. Nach 2 Stunden bei  $100^\circ\text{C}$  legte die TLC die vollständige Reaktion nahe, und das Erwärmen wurde abgestellt. Als die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte, wurde sie in Wasser gegossen. Der ge-

bildete Niederschlag wurde durch Filtration aufgefangen und mit Wasser gewaschen, wodurch das Produkt als weißes Pulver erhalten wurde. Ausbeute: 5,86 g, 98 %.

$^1\text{H NMR}$  (DMSO):  $\delta$  2,03 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 7,41 (d,  $J=8,8$ , 2H, ArH), 7,61 (d,  $J=8,8$ , 2H, ArH), 10,03 (s, 1H, NH).

#### 2-Brom-4-Iodacetanilid (7)

**[0070]** Zu einer Lösung von 4-Iodacetanilid (3,74 g, 14,3 mMol) in 20 ml  $\text{HAc}_{\text{wässr.}}$  (70 %) wurden tropfenweise 1,1 Äquivalente Brom (2,53 g, 15,7 mMol) gegeben. Nachdem das Ganze 10 Minuten bei 70 °C reagieren konnte, wurde die Lösung in Wasser gegossen, und der gebildete Niederschlag wurde durch Filtration aufgefangen (3,02 g). Die  $^1\text{H NMR}$  zeigte ein Gemisch von dem gewünschten Produkt und 2,4-Dibromacetanilid in einem Molverhältnis von 9:4. Gesamtausbeute: 3,02 g, 65 %. Ausbeute des gewünschten Produktes: 2,18 g, 45 %.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,23 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 7,60 (d,  $J_1=8,8$ ,  $J_2=1,6$ , 1H, ArH), 7,85 (s,  $J=1,6$ , 1H, ArH), 8,13 (d,  $J=8,8$ , 1H, ArH).

**[0071]** Ausbeute des Nebenproduktes: 0,84 g, 20 %.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): Stimmt mit dem vorstehend angegebenen Spektrum von 2,4-Dibromacetanilid überein.

#### 2-Brom-4-iodthioacetanilid (8)

**[0072]** Die gesamte Menge von 2,87 g des Gemischs von 2-Brom-4-iodacetanilid (2,08 g, 6,1 mMol) und 2,4-Dibromacetanilid (0,80 g, 2,7 mMol) wurde in  $\sim$  10 ml Benzol gelöst, und es wurde Phosphorpentasulfid (3,75 g, 8,4 mMol) zugesetzt. Das Gemisch wurde während eines Zeitraums von 2 Stunden bei 80 °C unter Rückfluß erhitzt. Nachdem es auf Raumtemperatur abkühlen konnte, wurde die braune Suspension filtriert, und der Niederschlag wurde mit Diethylether gewaschen. Das Benzol/Ether-Filtrat wurde zweimal mit NaOH (10 %) extrahiert, und die basische wässrige Phase wurde mit konzentrierter HCl auf pH  $\sim$  1 angesäuert. Das ergab eine hellbraune milchige Suspension, die zweimal mit Diethylether extrahiert wurde und zu einer gelben organischen Phase führte. Diese Phase wurde getrocknet und verdampft, wodurch ein Gemisch von 2-Brom-4-iodthioacetanilid und 2,4-Dibromthioacetanilid als braunes Öl erhalten wurde. Gesamtausbeute: 2,14 g, 71 %. Ausbeute des gewünschten Produktes: 1,66 g, 77 %.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,78 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 7,68 (d, 1H, ArH), 7,96 (s, 1H, ArH), 8,29 (d, 1H, ArH).

**[0073]** Ausbeute des Nebenproduktes: 480 mg, 57 %.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): Stimmt mit dem vorstehend angegebenen Spektrum von 2,4-Dibromthioacetanilid überein.

#### 6-Iod-2-methylbenzothiazol (9)

**[0074]** Die gesamte Menge von 2,02 g des Gemischs von 2-Brom-4-iodthioacetanilid (1,57 g, 4,4 mMol) und 2,4-Dibromthioacetanilid (454 mg, 1,5 mMol) wurde in 15 ml NMP gelöst. Es wurde Natriummethoxid (0,677 g, 6,9 mMol) zugesetzt, und das Gemisch wurde 2,5 Stunden bei 150 °C gerührt. Nachdem sich die braune Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt hatte, wurde das NMP durch Destillation von Kolben zu Kolben entfernt. Die braunen Rückstände wurden durch Sublimation gereinigt, wodurch ein Gemisch von 6-Iod-2-methylbenzothiazol und 6-Brom-2-methylbenzothiazol (Molverhältnis 3:1) als weiße Kristalle erhalten wurde. Gesamtausbeute: 1,33 g, 86 %. Ausbeute des gewünschten Produktes: 1,04 g, 86 %.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,82 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 7,68 (d,  $J=8,4$ , 1H, ArH), 7,73 (s,  $J=8,4$ , 1H, ArH), 8,16 (a, 1H, ArH).

**[0075]** Ausbeute des Nebenproduktes: 289 mg, 86 %.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) stimmte mit dem vorstehend beschriebenen Spektrum von 6-Brom-2-methylbenzothiazol überein.

#### 6-Brom-2-methylthiobenzothiazol (10)

**[0076]** Zu einer Lösung von 2-Methylthiobenzothiazol (1,14 g, 6,3 mMol) und Brom (1,24 g, 7,7 mMol) in 10 ml Essigsäure wurde eine katalytische Menge von  $\text{FeCl}_3$  gegeben. Nachdem für einen Zeitraum von 4 Stunden bei 120 °C unter Rückfluß erhitzt worden war, konnte das orange Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abkühlen und wurde dann in Ethylacetat gegossen. Der gebildete Niederschlag wurde durch Filtration aufgefangen, mit Ethylacetat gewaschen und 1 Stunde in Ethylacetat unter Rückfluß erhitzt. Diese Suspension wurde filtriert, und Ethylacetat wurde durch Rotationsverdampfung vom Filtrat entfernt, wodurch das Produkt als gelbe Kristalle erhalten wurde (130 mg, 0,50 mMol). Der Niederschlag, der durch Filtration von der unter Rückfluß erhitzten Suspension aufgefangen worden war, wurde mit einer Soxhlett-Apparatur mit n-Pentan, gefolgt von Diethylether, extrahiert. Das Verdampfen der Lösungsmittel ergab eine weitere kleine Menge des gewünschten

Produktes (70 mg, 27 mMol). Gesamtausbeute: 200 mg, 0,77 mMol, 12 %.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 2,79 (s, 3H, -SCH<sub>3</sub>), 7,61 (d, J<sub>1</sub>=8,8, J<sub>2</sub>=2, 1H, ArH), 7,77 (d, J=8,8, 1H, ArH), 8,32 (s, J=2, 1H, ArH).

#### 2-Methyl-6-(benzothiazol-2-yl)-benzothiazol (11)

**[0077]** 216 mg des Gemischs von 6-Iod-2-methylbenzothiazol (169 mg, 0,61 mMol) und 6-Brom-2-methylbenzothiazol (47 mg, 0,20 mMol) wurden in 10 ml DMF gelöst. Die Lösung wurde 30 Minuten mit Stickstoff gespült, und es wurde Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (21 mg, 0,02 mMol), gefolgt von Triphenylphosphin (46 mg, 0,18 mMol) zugesetzt. Nach einem weiteren 15-minütigen Spülen wurde Cul (45 mg, 0,24 mMol) zugesetzt, und das Gemisch wurde weitere 15 Minuten gespült und unter eine inerte Stickstoffatmosphäre gegeben. 2-(Tri-n-butylstannyl)benzothiazol (500 mg, 1,18 mMol) wurde zugesetzt, und das Gemisch wurde auf 60 °C erwärmt. Nachdem es 6 Stunden bei 60 °C gehalten worden war, konnte das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abkühlen. Das DMF wurde durch Destillation von Kolben zu Kolben entfernt, wodurch ein dunkles, gelbes Öl erhalten wurde. Dieses Öl wurde durch Flash-Chromatographie über Siliciumdioxid mit Chloroform gereinigt, wodurch das Produkt als rosa Kristalle erhalten wurde. Ausbeute: 169 mg, 74 % (bezogen auf die Gesamtmenge des 6-halogenierten 2-Methylbenzothiazols berechnet), 98 % (nur auf die Menge des 6-Iod-2-methylbenzothiazols bezogen berechnet).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,89 (a, 3H, -CH<sub>3</sub>), 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<sup>+</sup>-MS m/z gefunden: 283,038 C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (M+H<sup>+</sup>): erfordert M, 283,036.

#### 2-Methyl-3-methyl-6-(benzothiazol-2-yl)-benzothiazoliumtosylat (12)

**[0078]** 2-Methyl-6-(benzothiazol-2-yl)-benzothiazol (44 mg, 0,156 mMol) wurde 5 Stunden bei 90 °C in geschmolzenem Methyltosylat (660 mg, 3,5 mMol) gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Produkt durch den Zusatz von Aceton gefällt und durch Filtration aufgefangen. Der Niederschlag wurde mit Aceton gewaschen und konnte über Nacht trocknen. Das ergab das Produkt als grüne Kristalle. Ausbeute: 51 mg, 70 %.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 2,28 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 3,20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,24 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 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 gefunden: 297,067 C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (M<sup>+</sup>): erfordert M, 297,052.

#### 4-[(3-Methyl-6-(benzothiazol-2-yl)-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazol)-2-methyliden)1-1-methylchinoliniumtosylat (BETO)

**[0079]** 2-Methyl-3-methyl-6-(benzothiazol-2-yl)-benzothiazoliumtosylat (17 mg, 36 μMol) und 1-Methylchinoliniumtosylat (12 mg, 36 μMol) wurden in 2 ml Dichlormethan gelöst. Es wurden 2 Äquivalente Triethylamin (10 μl, 72 μMol) zugesetzt, und die tiefrote Lösung konnte für 48 Stunden bei Raumtemperatur reagieren, während dieser Zeit veränderte sie sich in eine bräunliche Suspension. BETO wurde durch Flash-Chromatographie über neutralem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mit Methanol-Dichlormethan (2:98) als roter Feststoff abgetrennt. Ausbeute: 6 mg, 27 %.

<sup>1</sup>H NMR (Methanol-D<sub>4</sub>): δ 3,64 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 3,83 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 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 gefunden: 438,118 C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (M): erfordert M, 438,110.

#### 2-Methyl-6-(benzoxazol-2-yl)-benzothiazol (13)

**[0080]** 216 mg des Gemischs von 6-Iod-2-methylbenzothiazol (169 mg, 0,61 mMol) und 6-Brom-2-methylbenzothiazol (47 mg, 0,20 mMol) wurden in 10 ml DMF gelöst. Die Lösung wurde 30 Minuten mit Stickstoff gespült, und es wurden Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (21 mg, 0,02 mMol), Triphenylphosphin (46 mg, 0,18 mMol) und Cul (45 mg, 0,24 mMol) zugesetzt. Das Gemisch wurde weitere 15 Minuten gespült und unter eine inerte Stickstoffatmosphäre gegeben. 2-(Tri-n-butylstannyl)-benzoxazol (481 mg, 1,18 mMol) wurde zugegeben, und das Gemisch wurde auf 60 °C erwärmt. Nachdem es 7 Stunden bei 60 °C gehalten worden war, konnte sich das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abkühlen. Das DMF wurde durch Destillation von Kolben zu Kolben entfernt. Das verbleibende Öl wurde durch Flash-Chromatographie über Siliciumdioxid mit Chloroform gereinigt, wodurch das Produkt als rote Kristalle erzeugt wurde. Ausbeute: 154 mg, 71 % (bezogen auf die Gesamtmenge des 6-halogenierten 2-Methylbenzothiazols berechnet), 95 % (nur auf die Menge von 6-Iod-2-methylbenzothiazol bezogen berechnet).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,89 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 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 gefunden: 267,058 C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>OS (M+H<sup>+</sup>): erfordert M, 267,059.

#### 2-Methyl-3-methyl-6-(benzoxazol-2-yl)-benthiazoliumtosylat (14)

**[0081]** 2-Methyl-6-(benzoxazol-2-yl)-benzothiazol (50 mg, 0,22 mMol) wurde 3 Stunden bei 90 °C in m Überschuß von geschmolzenem Methyltosylat (900 mg, 4,78 mMol) gerührt. Nachdem es auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde das Produkt durch die Zugabe von Aceton gefällt und durch Filtration aufgefangen. Der Niederschlag wurde mit Aceton gewaschen und konnte über Nacht trocknen. Das ergab das Produkt als hellbraune Kristalle. Ausbeute: 56 mg, 56 %.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 2,27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,21 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 4,24 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 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, J=8,8, 1H, ArH), 9,32 (a, 1H, ArH).

HR-FAB-MS m/z gefunden: 281,078 C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>OS (M<sup>+</sup>): erfordert M, 281,075.

#### 4-[(3-Methyl-6-(benzoxazol-2-yl)-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazol)-2-methyliden)]-1-methylchinoliniumtosylat (BOXTO)

**[0082]** 2-Methyl-3-methyl-6-(benzoxazol-2-yl)-benzothiazoliumtosylat (20 mg, 44 µMol) und 1-methylchinoliniumtosylat (14 mg, 44 µMol) wurden in 2 ml Dichlormethan gelöst. Es wurde Triethylamin (10 µl, 72 µMol) zugesetzt, und die klare rote Lösung konnte über das Wochenende bei Raumtemperatur reagieren, während dieser Zeit wurde sie zu einer bräunlich-roten Suspension. BOXTO wurde durch Flash-Chromatographie über neutralem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mit Methanol:Dichlormethan (2:98) als roter Feststoff abgetrennt. Ausbeute: 8 mg, 30 %.

<sup>1</sup>H NMR (Methanol-D<sub>4</sub>): δ 3,74 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 3,97 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 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), 8,23 (d, J=8,4, 1H, ArH).

HR-FAB-MS m/z gefunden: 422,134 C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>OS (M<sup>+</sup>): erfordert M, 422,133.

Tabelle 1.

Fluoreszenz- und Absorptionseigenschaften von BEBO, das frei von Puffer und an verschiedene DNA gebunden ist.<sup>a</sup>

	Absorptions-Peak (nm)	Emissions-Peak (nm)	Ø <sub>F</sub> <sup>c</sup>	F <sub>gebunden</sub> / F <sub>ungebunden</sub> <sup>d</sup>
Ungebundenes BEBO	448	542	0,011	
BEBO-ctDNA <sup>b</sup>	467	492	0,18	245
BEBO-polyAT <sup>b</sup>	467	492	0,118	182
BEBO-polyGC <sup>b</sup>	471	492	0,226	264

<sup>a</sup> bei 25 °C in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gemessen

<sup>b</sup> Verhältnis Farbstoff:Basen 1:100

<sup>c</sup> die Fluoreszenzquantenausbeuten Ø<sub>F</sub> wurden in bezug auf Fluorescein in 0,1 m NaOH gemessen, wobei ein Ø<sub>F</sub> von 0,93 angenommen wurde

<sup>d</sup> Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 492 nm, wenn bei 467 nm angeregt wurde

**[0083]** Der vorstehend aufgeführte, in der kleinen Furche bindende, asymmetrische Cyaninfarbstoff BEBO wurde durch Echtzeit-PCR ausgewertet und mit SYBR Green I verglichen.

**[0084]** BEBO hemmte die PCR bei niedrigen Konzentrationen nicht, und die Zunahme der Fluoreszenz beim Binden an dsDNA war für die Echtzeitmessung mit den verwendeten Geräten ausreichend. Die Hintergrundfluoreszenz wurde durch Aggregation verursacht und betrug bei optimierten Konzentrationen etwa das Doppelte von der von SYBR Green.

**[0085]** Die Zunahme der Fluoreszenz beim Binden an DNA war geringer als bei SYBR Green und führte zu einer Verzögerung der Kurven, und Ct war im Vergleich mit SYBR Green um etwa 4 Zyklen verzögert.

**[0086]** Die ähnlichen Farbstoffe BETO und BOXTO haben beide anscheinend einen schwächeren Hintergrund aufgrund einer geringeren Aggregation und eine stärkere Zunahme der Fluoreszenz beim Binden an DNA. Weitere Tests werden Auskunft darüber geben, ob diese Farbstoffe für die Echtzeit-PCR gut geeignet sind.

**[0087]** Bei dieser Untersuchung wurde BEBO bei der Echtzeit-PCR verwendet und mit SYBR Green I verglichen. Ein Farbstoff, der an die kleine Furche der dsDNA bindet, stört den DNA-Doppelstrang nicht wie interkalierende Farbstoffe, die zum Beispiel bei Fluoreszenzmikroskopieuntersuchungen vorteilhaft sein können.

**[0088]** BEBO ist ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff und ist mit einer Kurvenform gestaltet, die zum konvexen Untergrund der kleinen Furche komplementär ist. Das Cyanin-Chromophor von BEBO ist das gleiche wie das von BO. Die Form ist der anderer in der kleinen Furche bindenden Farbstoffen, wie Hoechst und DAPI, ähnlich, BEBO zeigt jedoch eine stärkere Zunahme der Fluoreszenz bei der Bindung an DNA und absorbiert eine höhere, besser geeignete Wellenlänge. Die meisten Binder an die kleine Furche und möglicherweise auch BEBO interkalieren noch in den GC-reichen Regionen, wohingegen sie in AT-Regionen klar an die kleine Furche binden.

**[0089]** Diese Untersuchung wird analysieren, ob und wie die PCR-Reaktion durch das Binden des BEBO beeinflusst wird und wie das mit dem gewöhnlich als Nachweisreagenz verwendeten SYBR Green I vergleichbar ist.

#### Materialien und Methoden

**[0090]** BEBO wurde als 5,8 mM Vorratslösung in DMSO geliefert. Für die Untersuchung wurden zwei Echtzeit-PCR-Geräte verwendet: LightCycler von Roche und Rotorgene von Corbett Research. Es wurde ein bereits entwickeltes und optimiertes PCR-System verwendet, das ein 240 bp Templat von einem Vorrat eines gereinigten PCR-Produktes amplifiziert. Die Konzentrationen der verwendeten Reagenzien lauteten [Mg] = 3 mM, [dNTP] = 200 µM, [Primer] = 0,4 µM, [BSA] = 0,2 mg/ml und 1 E Taq-Polymerase. Es wurden 100 µM Vorratslösungen von BEBO und 100X SYBR Green in DMSO hergestellt. Das Absorptionsmaximum von BEBO beträgt 467 nm und die Emission liegt bei 492 nm. Das Rotorgene (Kanal 1 Anregung: 470, Erfassung: 510) und das LightCycler (Anregung: 470, Erfassung Ch 1: 530) bieten beide geeignete Nachweisbedingungen. Die Effizienz (E) wird als  $P_n = P_0(1+E)^n$  definiert und ist wenn nicht anders angegeben von einer Templatverdünnungsreihe als  $E = 10^{-1/a} - 1$  abgeleitet, wobei a die Steigung der entsprechenden Standardkurve ist. Für weitere Einzelheiten wird auf Protokolle und das Notebook des Labors Bezug genommen.

#### Ergebnisse der PCR

**[0091]** Die Verdünnungsreihen von BEBO (0,05–5 µM) bei dem RotorGene ([Fig. 9](#)) zeigten, daß 0,2 µM ein gutes Gleichgewicht zwischen der Hintergrundfluoreszenz und der Zunahme des Signals darstellt, und diese Konzentration wurde anschließend bei Templatverdünnungen und beim Vergleich mit SYBR Green verwendet. Als Hinweis auf den Wert der PCR-Hemmung wurde eine Templatverdünnungsreihe durchgeführt ([Fig. 10](#)), und die Effizienz wurde mit 74 % bestimmt. Die [Fig. 11](#) bis [Fig. 12](#) zeigen einen Vergleich mit SYBR Green (0,1X), und die Ergebnisse zeigen, daß BEBO einen stärkeren Fluoreszenzhintergrund und eine geringere Zunahme der Fluoreszenz aufweist. Die aus diesen Verdünnungen berechnete Effizienz betrug für BEBO 66 % und für SYBR Green 72 %. Das ist weniger als gewöhnlich bei diesem PCR-System beobachtet wird, das SYBR Green verwendet. Die BEBO-Proben sind durchweg etwa 4 Zyklen später als das Äquivalent SYBR Green zu sehen. Um zu testen, ob DMSO die starke Hintergrundfluoreszenz verringern kann, waren in sechs Proben 15 % DMSO vorhanden (die Werte sind nicht gezeigt). Obwohl DMSO gewöhnlich in Konzentrationen von bis zu 20 % verwendet wird, um die Spezifität bei der PCR zu verbessern, wurde eine völlige Hemmung beobachtet. Es wurde ein zweiter Vergleich zwischen BEBO und SYBR mit geringen Modifikationen des Protokolls durchgeführt ([Fig. 14](#)), [BEBO] = 0,4 µM, [SYBR Green] = 0,2X, was eine Effizienz von 80 bzw. 99 % ergibt.

**[0092]** Diese Untersuchung zeigt, daß BEBO ein geeigneter dsDNA nicht spezifisch bindender Farbstoff für die Verwendung bei der Echtzeit-PCR ist. Der Konzentrationsbereich der optimalen Verwendung für die Echtzeit-PCR bei den verwendeten Geräten beträgt 0,1 bis 0,5 µM. Höhere Konzentrationen führen zu einer unerwünschten starken Hintergrundfluoreszenz, wohingegen niedrigere Konzentrationen als 0,05 µM nicht zu einer

ausreichenden Zunahme der Fluoreszenz führen.

**[0093]** BEBO führt im unteren Bereich des vorstehend genannten Konzentrationsintervalls nicht zu einer starken Hemmung der Polymerasekettenreaktion. Bei Konzentrationen von mehr als 1  $\mu\text{M}$  tritt eine starke Störung der Reaktion auf, wobei die PCR ihre Spezifität verliert und nur kurze unspezifische Produkte, am wahrscheinlichsten Dimere des Primers, bildet. Bei 0,4  $\mu\text{M}$  wird eine Hemmung beobachtet, wohingegen 0,2  $\mu\text{M}$  BEBO die PCR anscheinend nicht deutlich hemmen.

**[0094]** Wenn BEBO mit SYBR Green verglichen wird, sind die deutlichsten Unterschiede die stärkere Hintergrundfluoreszenz und die Verzögerung von Ct bei der gleichen Konzentration der Templatprobe. Die Effizienzen sind bei SYBR Green höher: 72 % gegenüber 66 % für [SYBR] = 0,1X und [BEBO] = 0,2  $\mu\text{M}$ , und 99 % gegenüber 80 % für [SYBR] = 0,2X und [BEBO] = 0,4  $\mu\text{M}$ . Die erreichte abschließende Fluoreszenz ist ähnlich, wohingegen der Hintergrund bei BEBO ungefähr das Doppelte von dem von SYBR Green beträgt.

**[0095]** Die Hintergrundfluoreszenz wird durch die Aggregation von BEBO hervorgerufen, was zu einer spontanen Fluoreszenz führt. Diese Aggregation scheint zuzunehmen, wenn die PCR abläuft, das wird durch eine lineare Zunahme des Hintergrundsignals deutlich, das in den [Fig. 9](#), [Fig. 11](#) und [Fig. 13](#) zu erkennen ist. Bei hohen Farbstoffkonzentrationen ist dieses Phänomen auch bei SYBR Green zu erkennen (die Werte sind nicht gezeigt). Um die Aggregation zu vermindern, die in Ethanol oder Methanol praktisch nicht existiert, wurden der Reaktion 15 % DMSO zugesetzt. Der Hintergrund nimmt deutlich ab, das führte jedoch auch zu einem Verlust der Spezifität bei der PCR.

**[0096]** Wenn der LightCycler verwendet wurde, wurde beobachtet, daß viel höhere Konzentrationen der Probe erforderlich waren, um eine Hemmung der PCR zu erreichen. Bis zu 5  $\mu\text{M}$  BEBO ergaben ein spezifisches Produkt, wenn der LightCycler verwendet wurde, wohingegen bei dem RotorGene 2  $\mu\text{M}$  BEBO kein Produkt ergaben. Wir schließen daraus, daß dies auf der deutlichen Adsorption an der Glasoberfläche der Glaskapillaren beruht, die bei dem Gerät LightCycler verwendet werden.

**[0097]** Gegenwärtig ist die Information zur Struktur, zum Bindungsmodus, zur molaren Konzentration usw. von SYBR Green I sehr spärlich. Das macht einen detaillierten Vergleich BEBO schwierig, und einige Anwendungen können eine Information über den verwendeten Farbstoff erfordern, die gegenwärtig nur für BEBO zur Verfügung stehen.

#### Analyse der Kurven

**[0098]** Um die Amplifikationskurven weiter zu analysieren, wurde die Regression der exponentiellen Wachstumsphase berechnet ([Fig. 8](#)). Die Analyse konzentrierte sich auf die Daten vom zweiten Vergleich zwischen BEBO und SYBR Green. BEBO hatte eine durchschnittliche Effizienz von 0,91 und SYBR Green von 0,97. Das läßt sich mit der Effizienz vergleichen, die aus den Verdünnungsreihen berechnet worden ist: 0,80 bzw. 0,99.

**[0099]** Der Grund dafür, daß BEBO den Schwellenwert bei der gleichen Templatkonzentration etwa 4 Zyklen später als SYBR Green erreicht, ist möglicherweise die geringere Zunahme der Fluoreszenz beim Binden an dsDNA. Eine geringere Effizienz allein kann die gesamte Verzögerung von 4 Zyklen nicht erklären, und das wird durch die mit der Analyse der Kurven abgeleiteten Effizienz bestätigt. SYBR Green bindet während der PCR effektiv an die DNA und zeigt einen frühen Fluoreszenzeffekt. Dieser Effekt erscheint jedoch so stark, da die PCR-Reaktion während der Multiplikation mit SYBR Green verzögert wird, was einen Nachteil darstellt. Folglich stört das SYBR Green das DNA-Molekül so stark, wie es keineswegs erwünscht sein kann.

#### Dokumente und Bemerkungen

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.
2. Lee, L. G.; Chen, C.-H.; Chlu, 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.
5. Netzels, T. L.; Nafisli, 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.
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.
12. Neidie, 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.
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*, 6. Edition 1996, 144-152.
18. Mikheikin, 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. Dellgeorgiev, T. G.; Gadjev, N. I.; Drexhage, K.-H.; Sabnis, R. W. *Dyes and Pigments* 1995, 29, 315-322.
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, 308, 494-498.
23. Zhou, X. F.; Peng, Z. H.; Geise, H. J.; Peng, B. X.; Li, Z. X.; Yan, M.; Dommissse, 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.
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.
29. Lyng, R.; Rodger, A.; Nordén, B. *Biopolymers* 1992, 32, 1201-1214.
30. Ogul'chansky, T. Y.; Losytskyy, M. Y.; Kovalska, V. B.; Yashchuk, V. M.; Yarmoluk, S. M. *Spectrochim. Acta A* 2001, 57, 1525-1532.

#### Figurenbeschreibungen

**[0100] Fig. 1.** Interkalierende asymmetrische Cyaninfarbstoffe

**[0101] Fig. 2.** Spektren des Verlaufs des LD von BEBO, das im Komplex gebunden ist mit: A) [poly(dA-dT)]<sub>2</sub>, B) ctDNA und C) BO, das mit ctDNA im Komplex gebunden ist, beim DNA-Basenübergang normiert. Das Bindungsverhältnis R, Farbstoff:Basen, betrug 0,05. In allen Spektren [Farbstoff] = 11 µM.

**[0102] Fig. 3.** Normierte LD- und Absorptionsspektren von BO in Gegenwart von AT) [poly(dA-dT)]<sub>2</sub>, GC) [poly(dG-dC)]<sub>2</sub>. [BO] = 11 µM, R = 0,025.

**[0103] Fig. 4a-b.** CD-Spektren von BEBO in Gegenwart von (a) [poly(dA-dT)]<sub>2</sub>, [R = 0,025 (A), 0,05 (B), 0,10 (C), (D) = (C)-(B)] und (b) ctDNA (die R-Werte von unten nach oben lauten 0,1, 0,05, 0,033, 0,025 und 0,0125). In allen Spektren [Farbstoff] = 11 µM.

**[0104] Fig. 5a-b.** Änderung des CD nach der Zugabe von [poly(dA-dT)]<sub>2</sub> in Proben von BEBO in Gegenwart von (a) [poly(dG-dC)]<sub>2</sub> und (b) ctDNA (R = 0,05 in beiden Figuren). [poly(dA-dT)]<sub>2</sub> wurde zugesetzt, um Mischungsverhältnisse von Farbstoff:AT-Basen von (a) (B) 0,1 und (C) 0,05 zu erhalten, (b) von unten nach oben: 0,1, 0,05 und 0,025. In allen Spektren [Farbstoff] = 11 µM.

**[0105] Fig. 6a-b.** (a): Absorptionsspektren von BEBO ohne Puffer (A) und an die DNA vom Thymus vom Kalb gebunden (B) mit einem R-Wert von 0,02. (b): Absorptionsspektren von ungebundenem BEBO in Wasser-Methanol-Lösungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen im Bereich von 0 bis 100 % Methanol (dickere Linien).

**[0106] Fig. 7.** Spektren des Verlaufs des LD von BEBO, das im Komplex gebunden ist mit: DNA vom Thymus vom Kalb (oben links), poly[dA-dT]<sub>2</sub> (unten links), poly[dG-dC]<sub>2</sub> (unten rechts) und BO, das im Komplex mit dem Thymus vom Kalb gebunden ist (oben rechts). Die Mischungsverhältnisse (R = Farbstoff/DNA-Basen) betragen in allen Fällen 0,05, außer bei poly[dG-dC]<sub>2</sub> (R = 0,02).

**[0107] Fig. 8.** CD-Spektren von BEBO, das im Komplex gebunden ist mit: (- - -) poly[dA-dT]<sub>2</sub>, (-) poly[dG-dC]<sub>2</sub>, bei R = 0,05 bzw. R = 0,02.

**[0108] Fig. 9.** BEBO-Verdünnung, ungefähre Werte: Triplikate von fünf verschiedenen Konzentrationen von

BEBO, positiv und NTC. Von oben nach unten (linke Achse): 5  $\mu\text{M}$  (braun), 2  $\mu\text{M}$  (purpur), 0,8  $\mu\text{M}$  (grün), 0,2  $\mu\text{M}$  (blau) und 0,05  $\mu\text{M}$  (rot).

[0109] [Fig. 10](#). Templatverdünnung, normierte Werte, und entsprechende Standardkurve. [BEBO] = 0,2  $\mu\text{M}$ . Sechs zehnfache Verdünnungen des gereinigten PCR-Produktes von  $10^9$  bis  $10^4$  Kopien/rxn.  $E = 0,74$ . Die fünfte Probe (105 Kopien) zeigte sich als ungenau verdünnt und sollte den Schwellenwert etwa einen Zyklus später kreuzen.

[0110] [Fig. 11](#). BEBO gegenüber SYBR Green, ungefähre Werte. Triplikate mit drei 100-fachen Templatverdünnungen. Diese Figur zeigt den höheren Wert der Hintergrundfluoreszenz für BEBO und die gesamte Zunahme der Fluoreszenz. Es wird auf die lineare Zunahme der Hintergrundfluoreszenz für die BEBO-Proben hingewiesen.

[0111] [Fig. 12](#). BEBO gegenüber SYBR Green, normierte Werte. BEBO kreuzt bei der gleichen Templatkonzentration etwa vier Zyklen später als SYBR Green.

[0112] [Fig. 13](#). BEBO gegenüber SYBR Green, ungefähre Werte, drei 4-fache Verdünnungen. [BEBO] = 0,4  $\mu\text{M}$ , [SYBR] = 0,2X. Die lineare Zunahme der Hintergrundfluoreszenz ist bei BEBO, jedoch nicht bei SYBR Green zu erkennen.

[0113] [Fig. 14](#). BEBO gegenüber SYBR Green. Normierte Werte. Über den gesamten Bereich der Verdünnungen wird eine Verschiebung von 4,5 Zyklen beobachtet.

[0114] [Fig. 15](#). Schmelzkurve. BEBO-Proben haben den durchschnittlichen Peak beim Schmelzen bei 87,9 °C, Proben von SYBR Green haben den durchschnittlichen Peak beim Schmelzen bei 88,9 °C.

[0115] [Fig. 16](#) Logarithmische Darstellung eines Teils der exponentiellen Wachstumsphase von SYBR Green (oben) und BEBO (unten) und deren entsprechende lineare Regression.

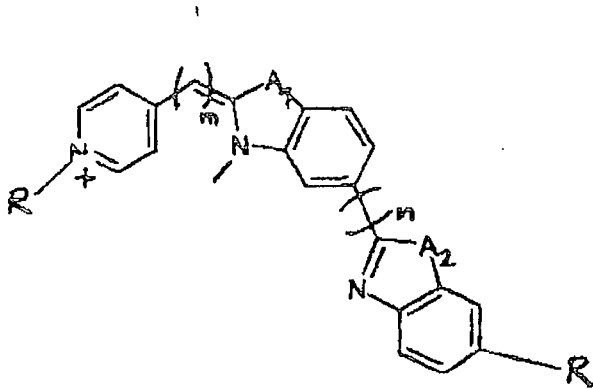
[0116] [Fig. 17](#). Unterschiedliche Arten der DNA-Bindungsmodi.

[0117] Schema 1. Reagenzien und Bedingungen: i,  $\text{Br}_2$ , KSCN, DMF, 3 h; ii, 1. MeI, DMSO, 17 h, 110 °C, 2.  $\text{NaOH}_{\text{wässr.}}$ , DMSO; iii, 160 °C, Vakuum 1 h.

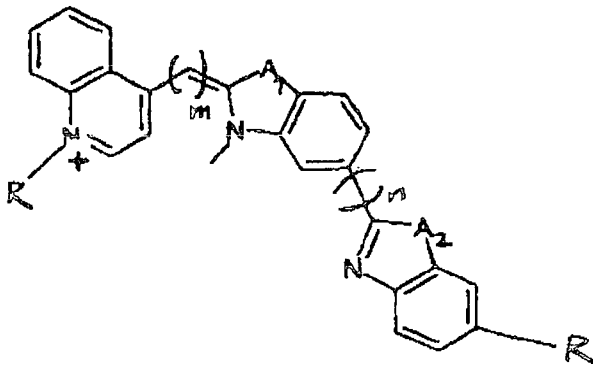
[0118] Schema 2. Reagenzien und Bedingungen: Triethylamin, Dichlormethan, Raumtemperatur 14 h.

### Patentansprüche

1. Cyaninfarbstoff, der in der Furche der DNA bindet, ausgewählt aus der Gruppe von



oder

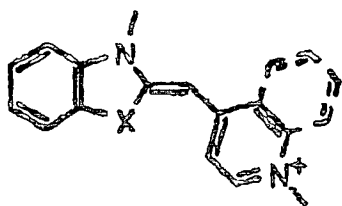


wobei  $A_1$  und  $A_2$  jeweils unabhängig voneinander O, S oder N sind und R H oder ein Kohlehydrat ist, das ein Heteroatom enthalten kann, und m 0 bis 5 und n 0 bis 5 ist.

2. Cyaninfarbstoff nach Anspruch 1, wobei R Methyl oder Ethyl ist und m 1 und n 0 ist.
3. Cyaninfarbstoff nach Anspruch 1, wobei R Methyl oder Ethyl ist und m 1 und n 0 ist und  $A_1$  und  $A_2$  S sind.
4. Cyaninfarbstoff nach Anspruch 1, wobei R Methyl oder Ethyl ist und m 1 und n 0 ist und  $A_1$  und  $A_2$  O sind.
5. Cyaninfarbstoff nach Anspruch 1, wobei R Methyl oder Ethyl ist und m 1 und n 0 ist und  $A_1$  S und  $A_2$  O ist.
6. Cyaninfarbstoff nach Anspruch 1 mit einem Pyridin/Chinolin-Ring in der 2-Position.
7. Sonde für die Nucleinsäure-Hybridisierung, die einen Cyaninfarbstoff nach den Ansprüchen 1 bis 6 umfaßt.
8. Verfahren zur Durchführung einer PCR-Echtzeitreaktion eines DNA-Templats, wobei ein Fluoreszenzfarbstoff nach den Ansprüchen 1 bis 6 verwendet wird, womit dessen Fluoreszenzreaktion verstärkt wird, wenn er an der Stelle einer kleinen Furche in einer doppelsträngigen DNA blockiert ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Farbstoff ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff ist.
10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei einer der Cyaninreste S und/oder O enthält.
11. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Farbstoffverbindung sichelförmig ist.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



Farbstoff	X	heterocycl. Verbindg.	$\lambda_{\max}$
BO	S	Pyridin	445
TO	S	Chinolin	510
PO	O	Pyridin	435
YO	O	Chinolin	480

FIG. 1

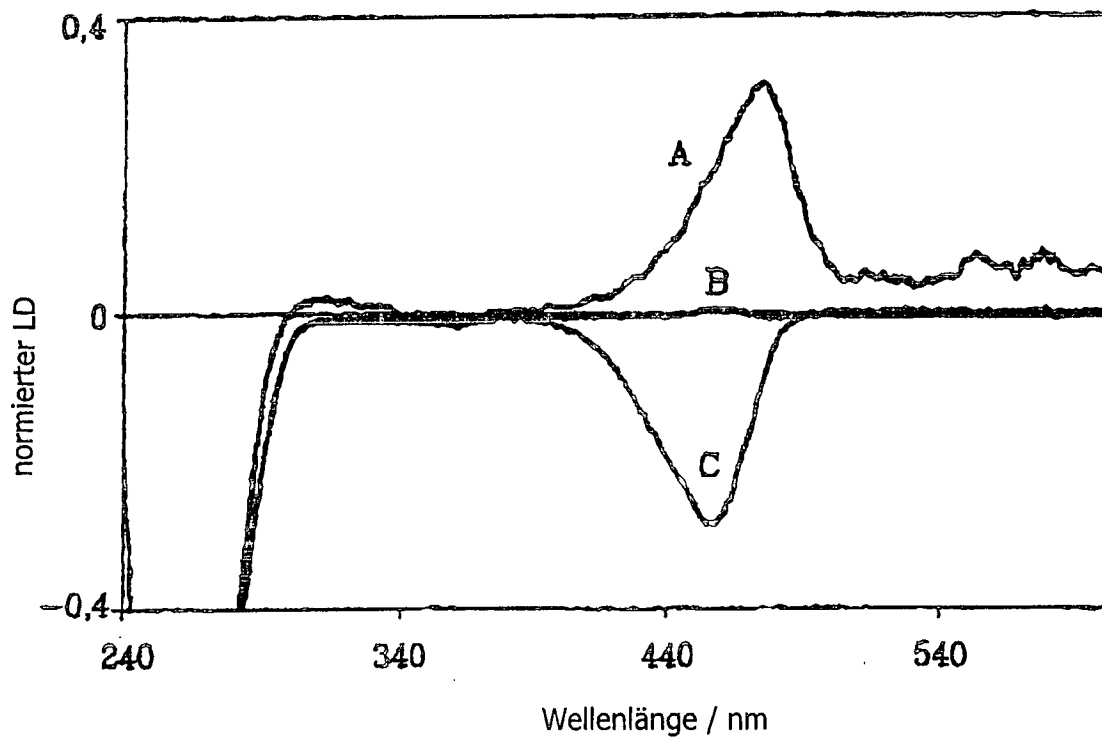


FIG. 2

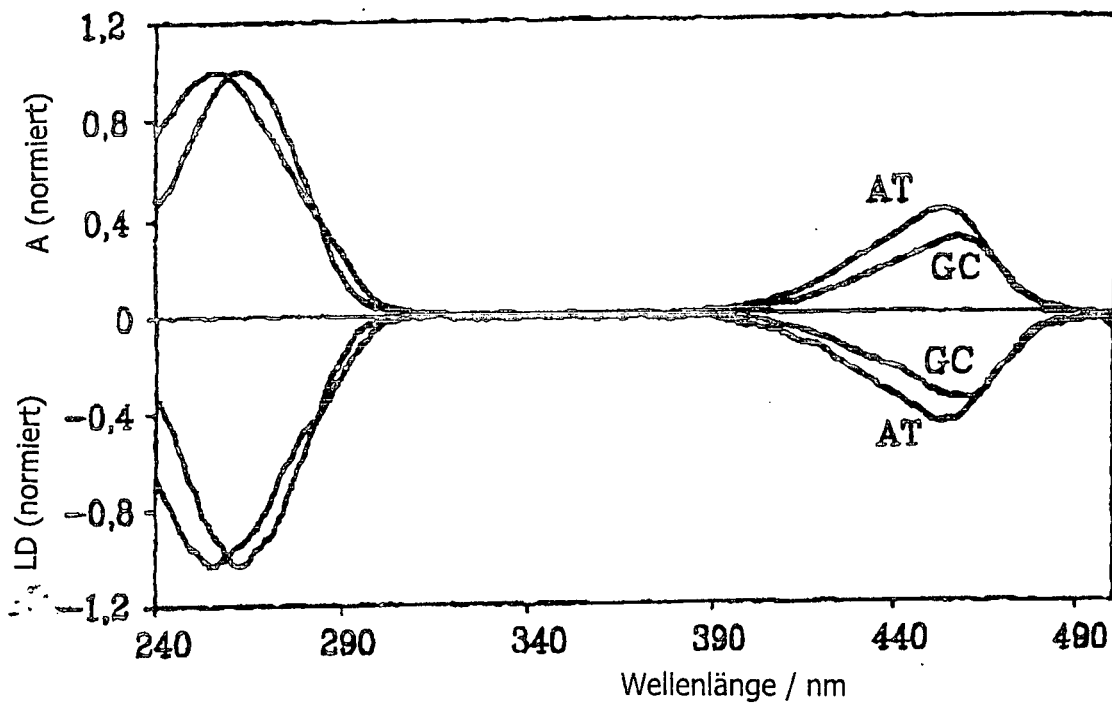


FIG.3

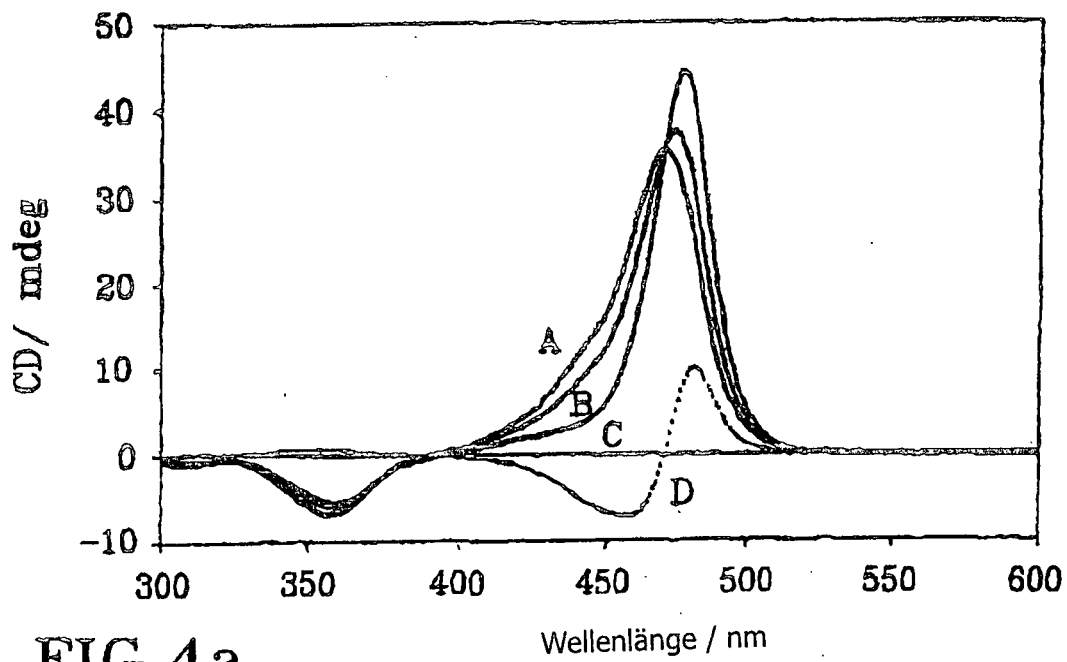
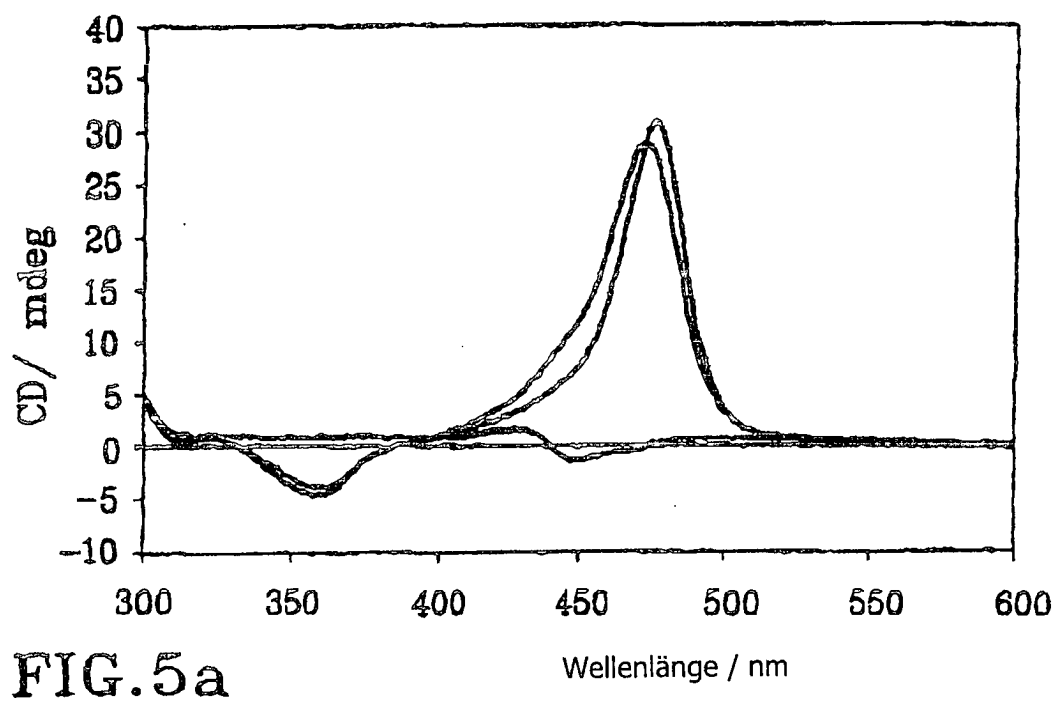
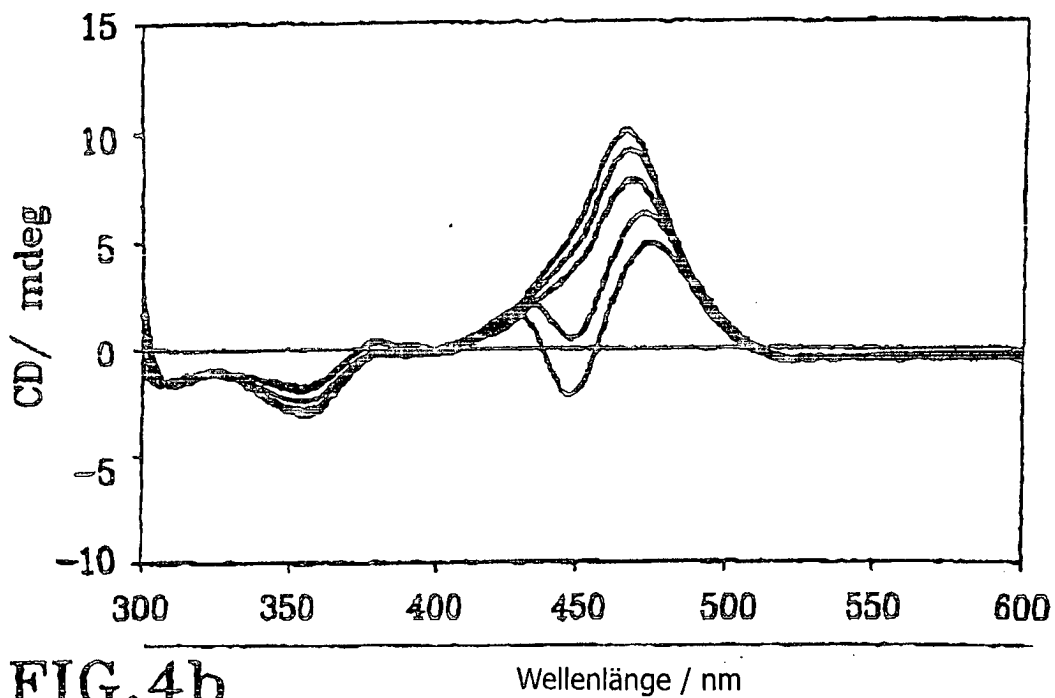


FIG.4a



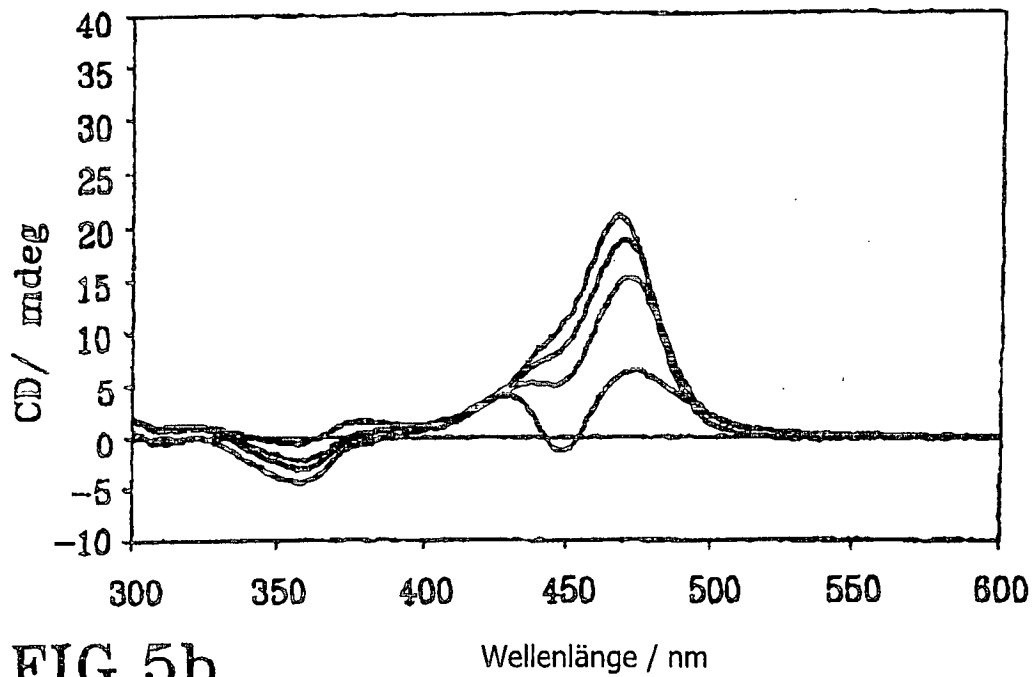


FIG.5b

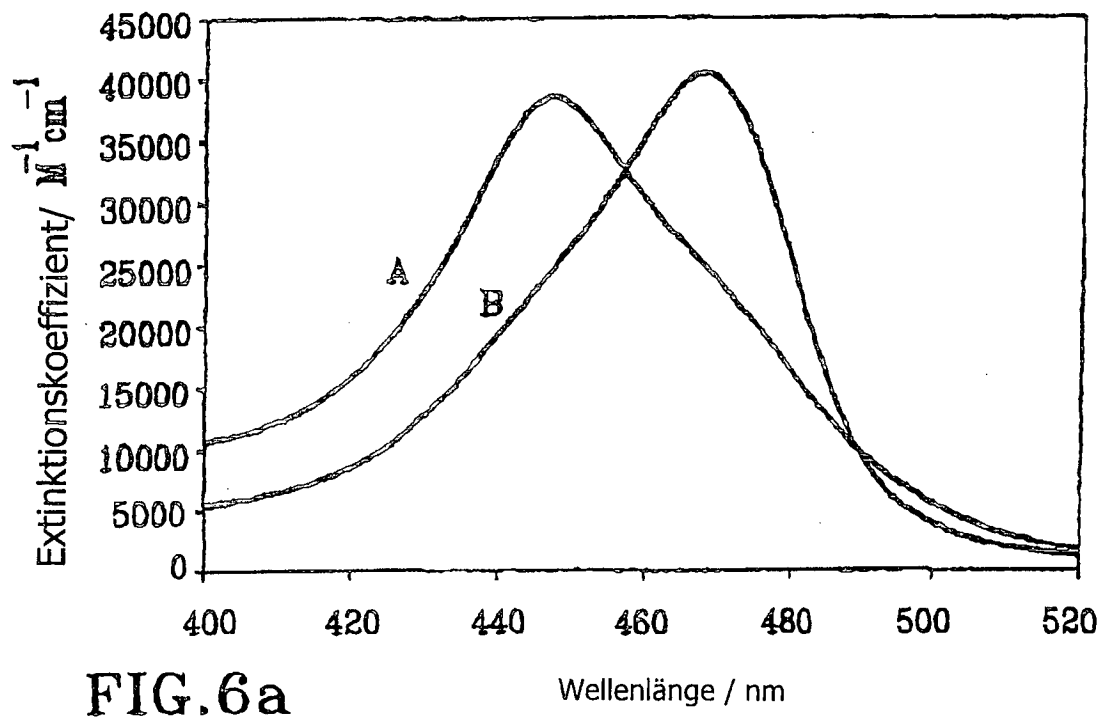


FIG.6a

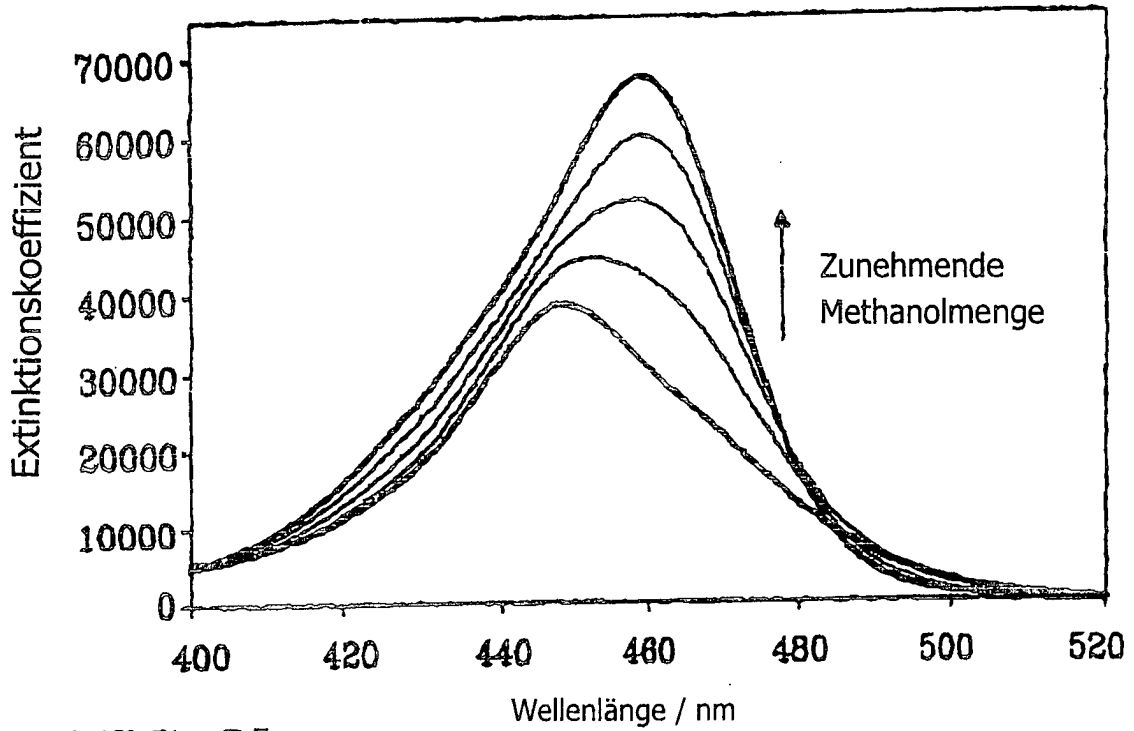


FIG.6b

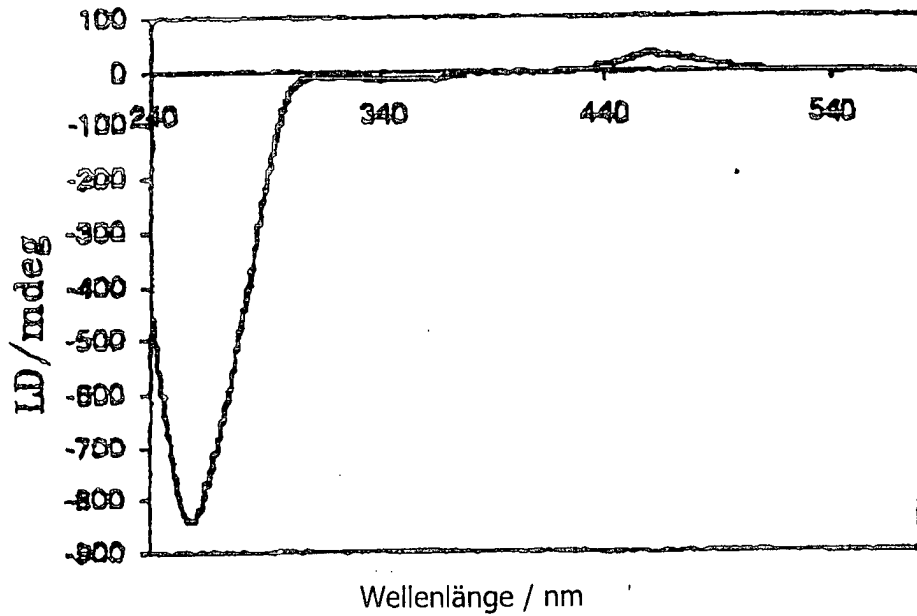


FIG.7a

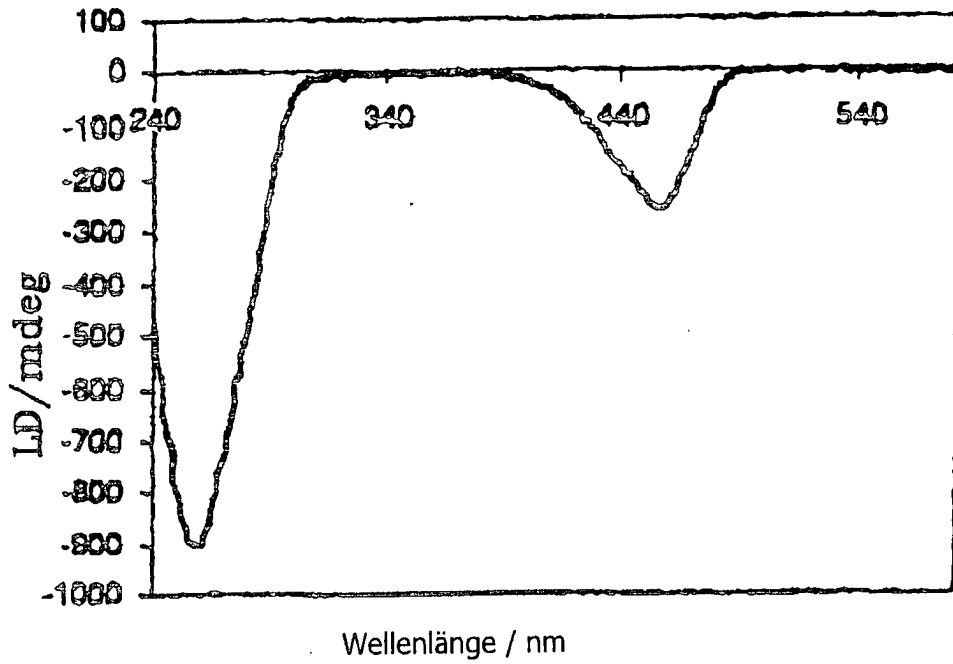


FIG. 7b

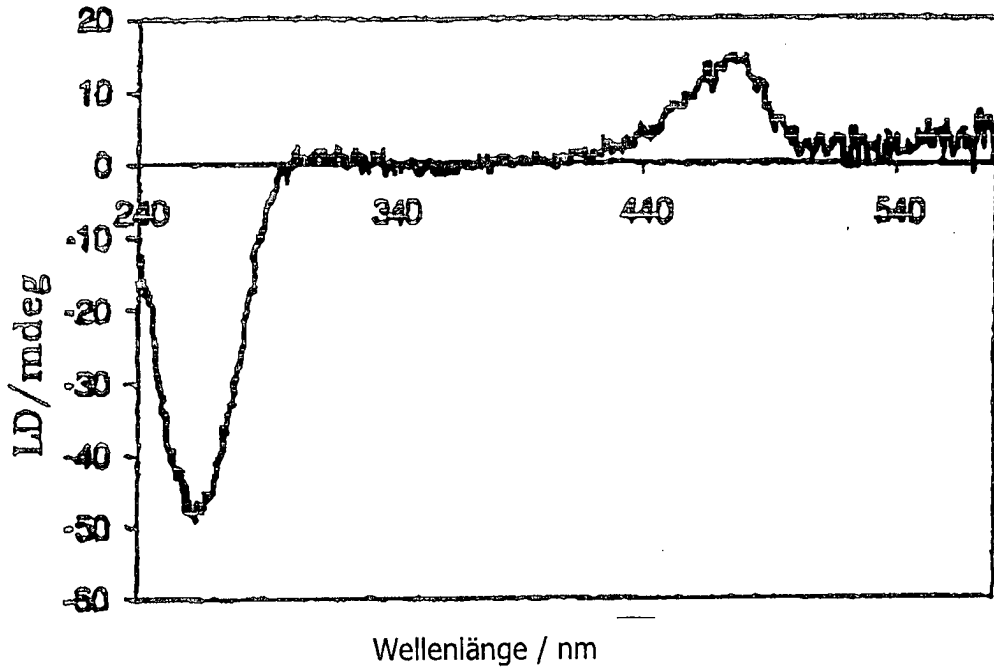


FIG. 7c

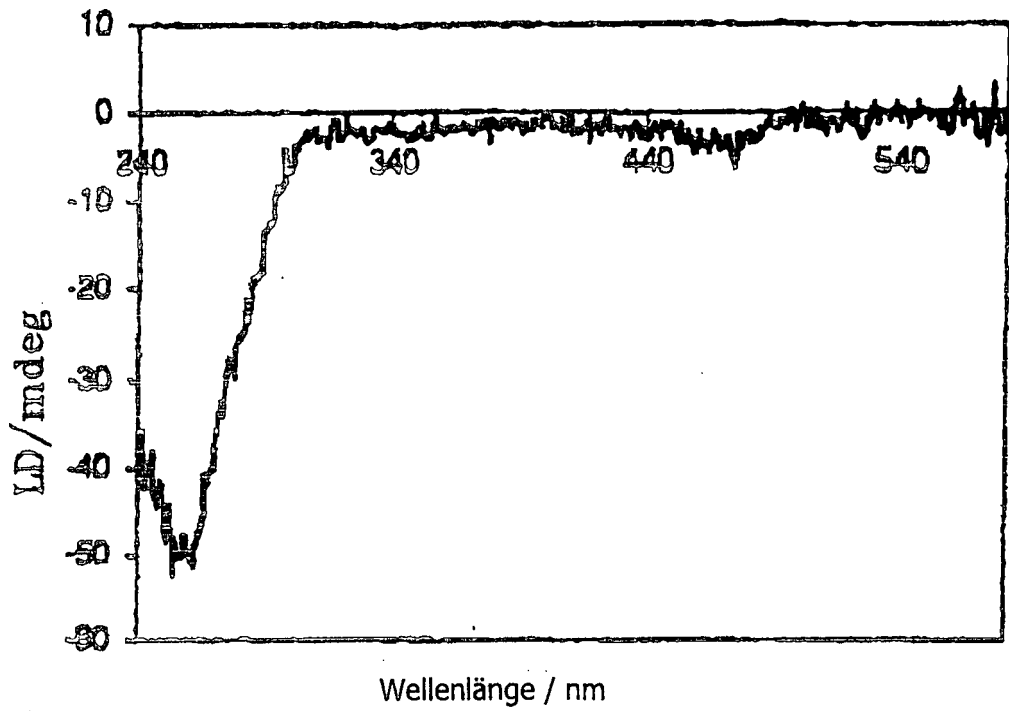


FIG. 7d

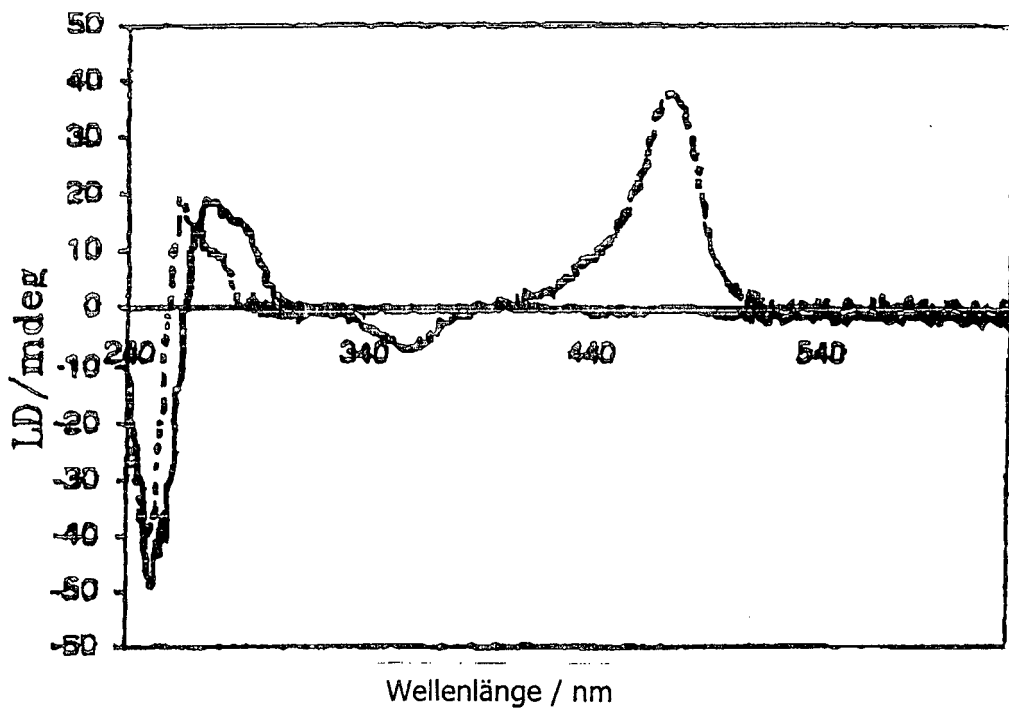


FIG. 8

Fluoreszenz

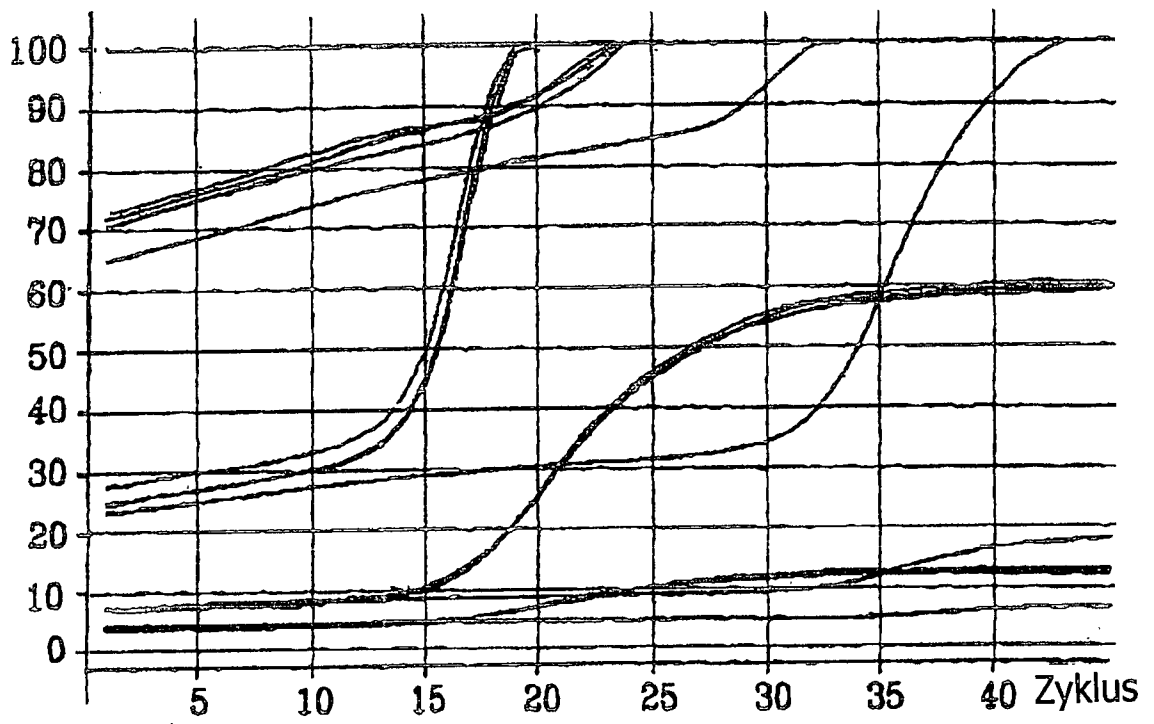


FIG.9

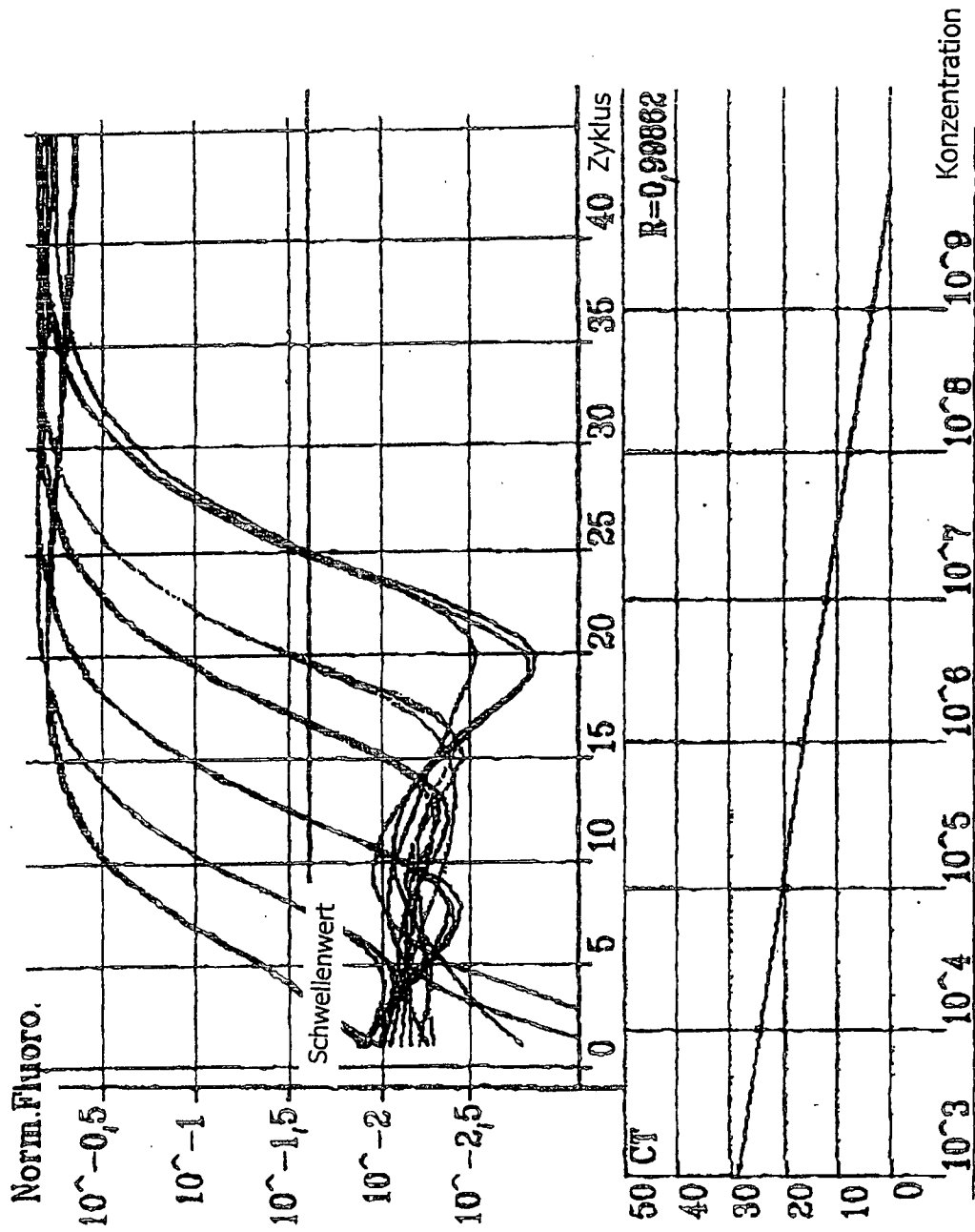


FIG.10

Fluoreszenz

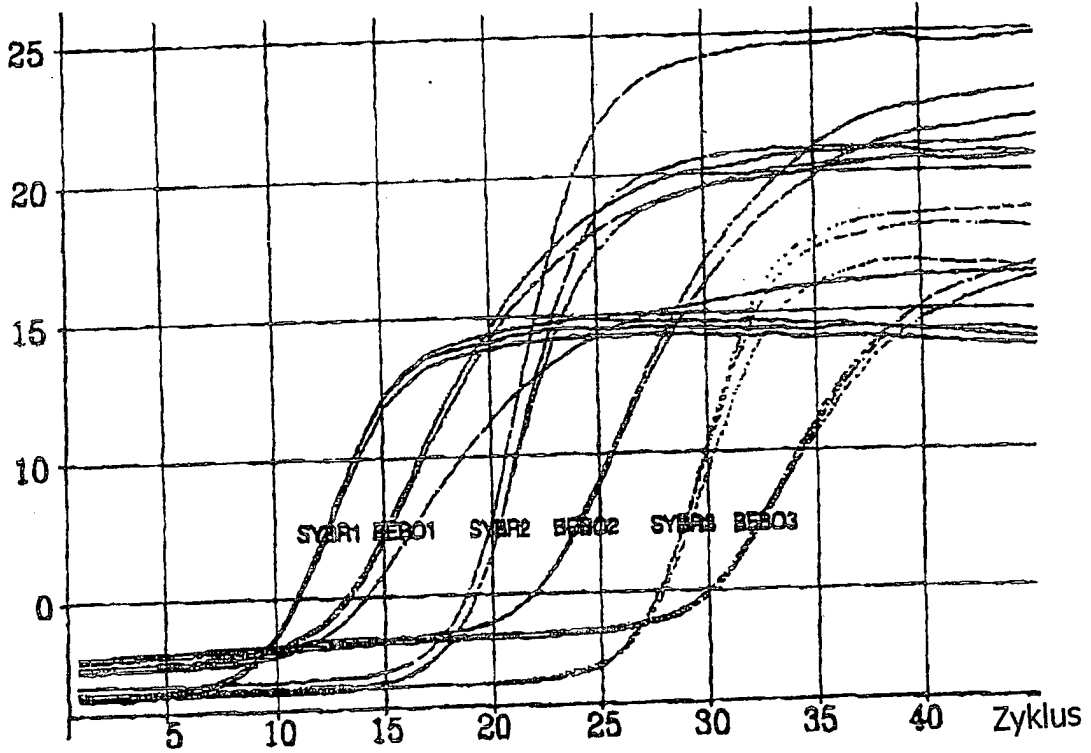


FIG. 11

Norm. Fluoro.

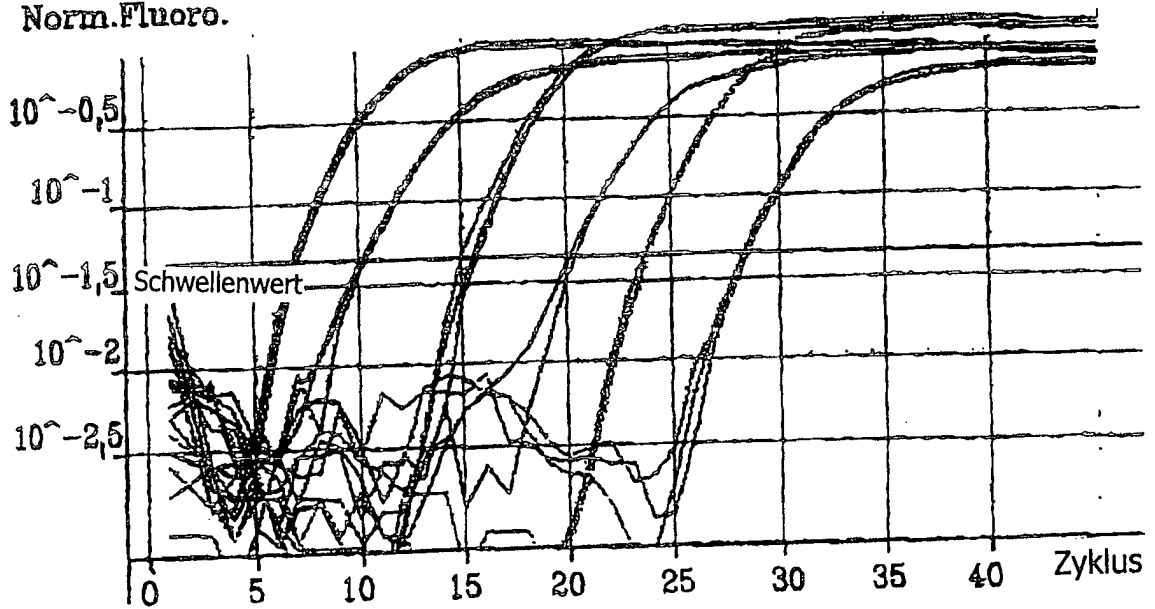


FIG. 12

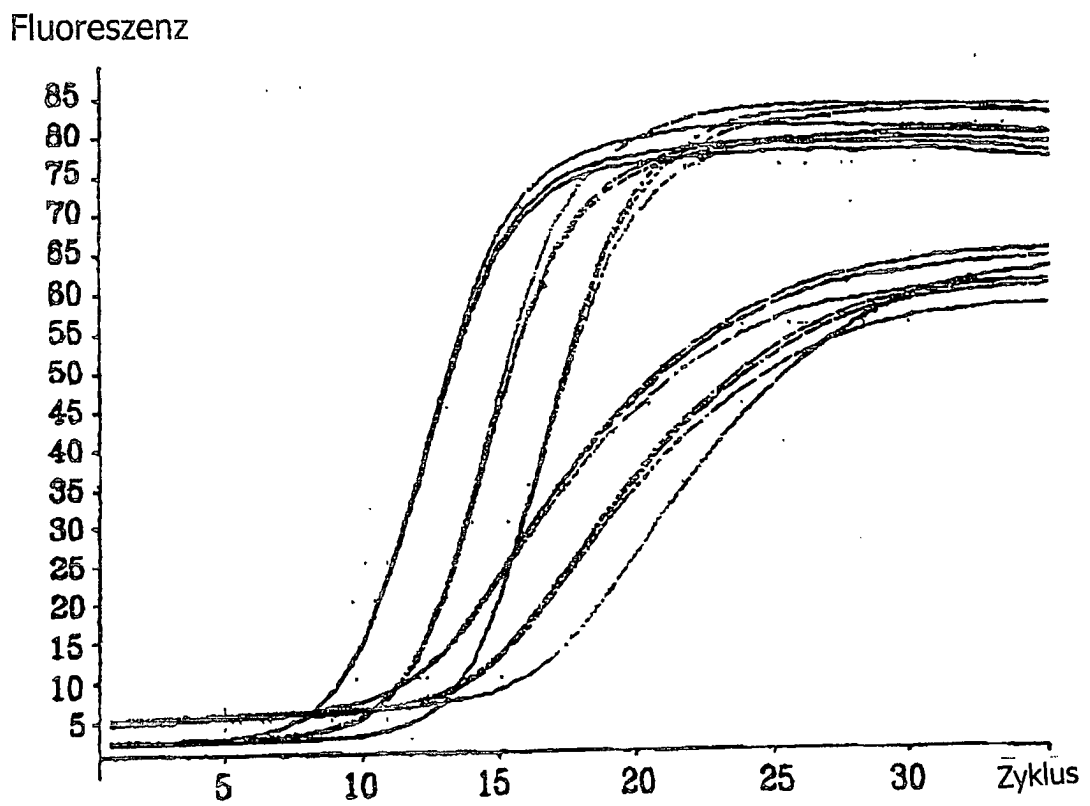


FIG. 13

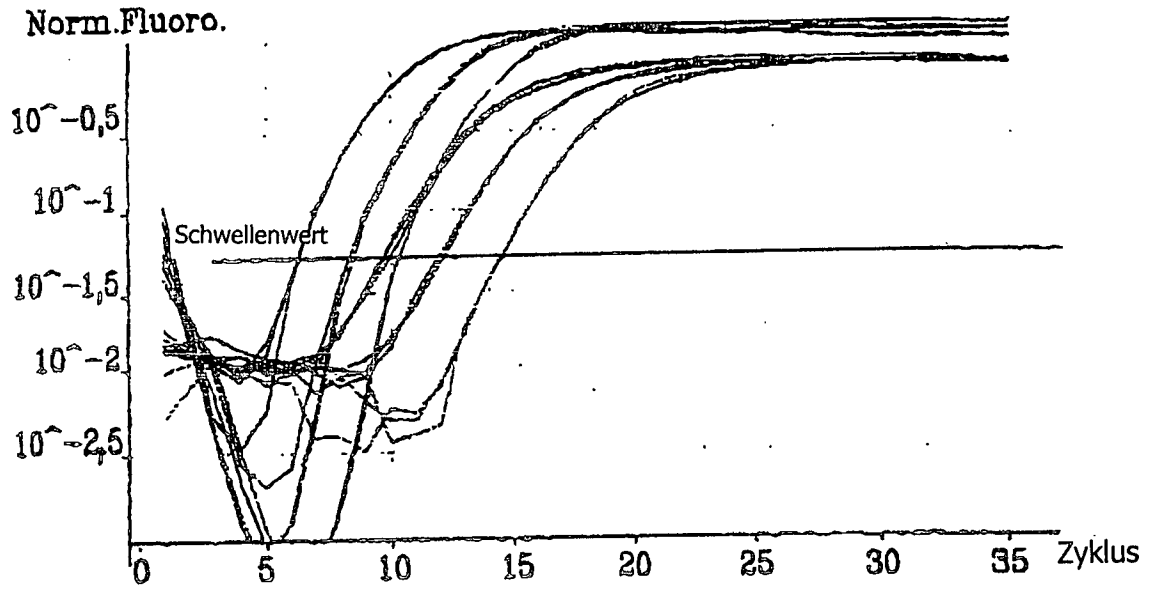


FIG. 14

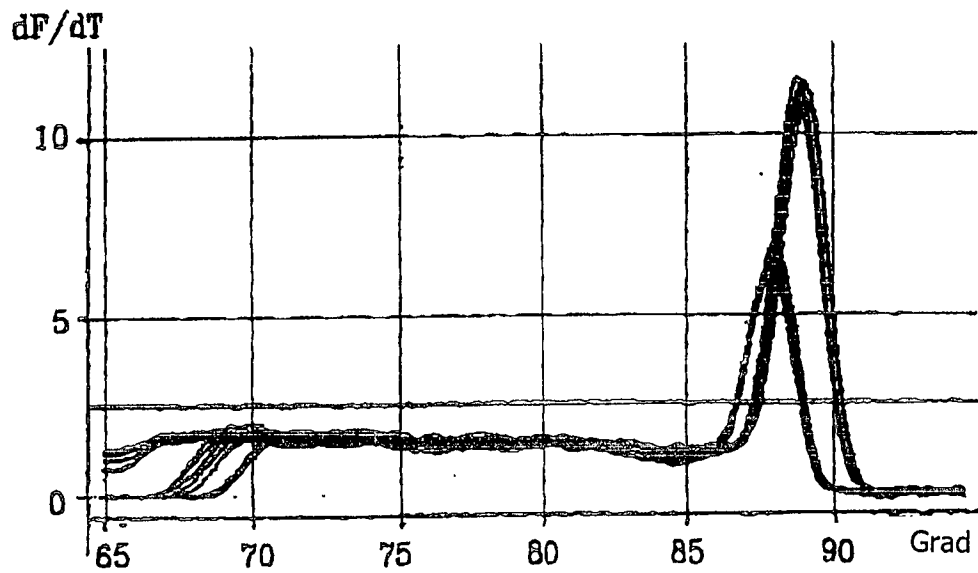


FIG. 15

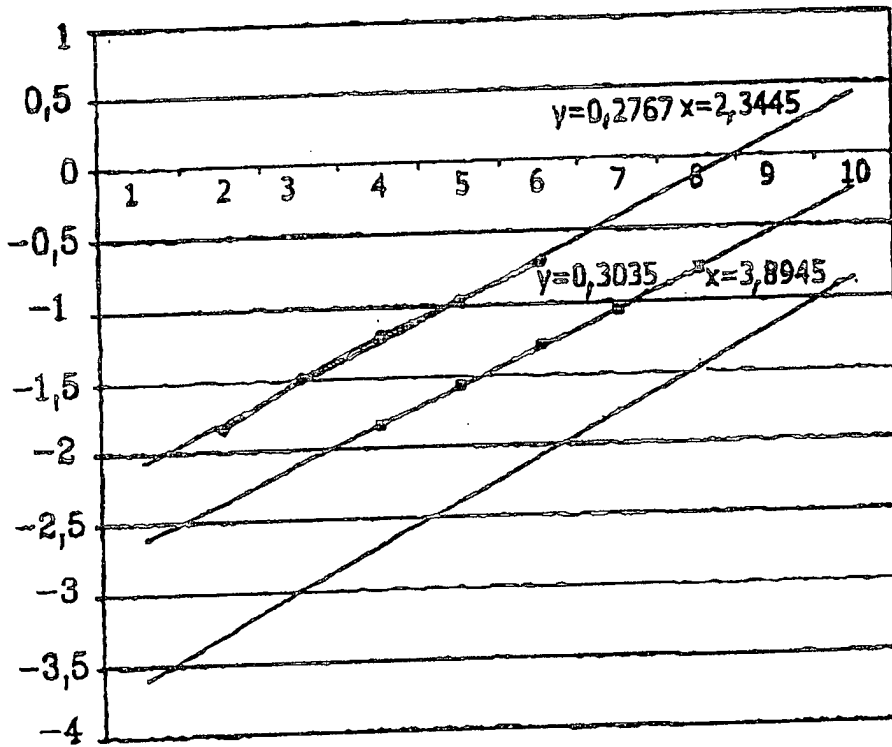
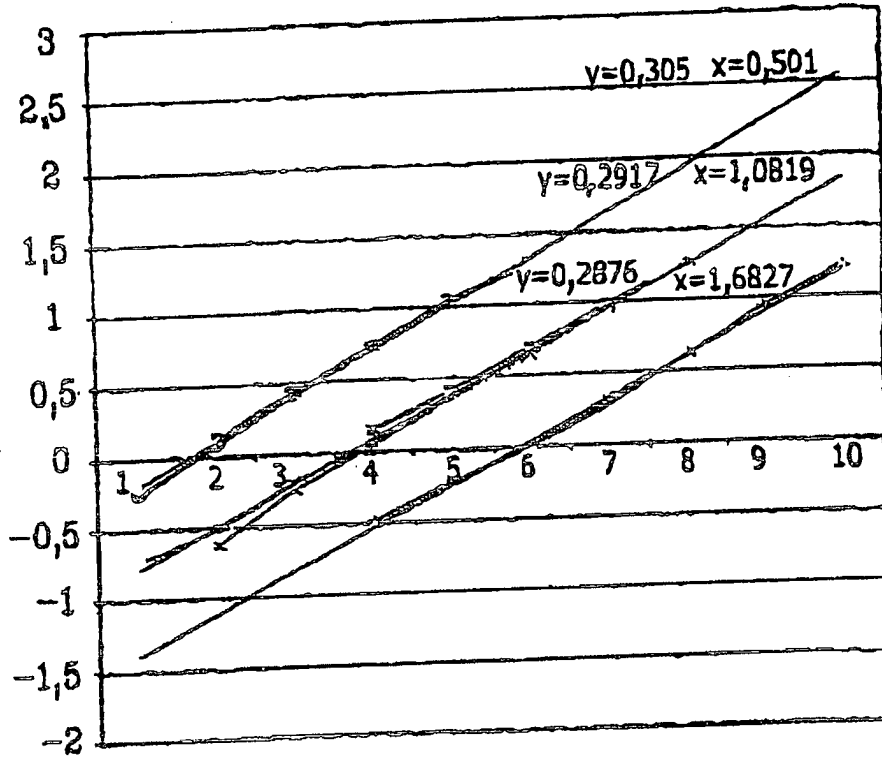


FIG. 16

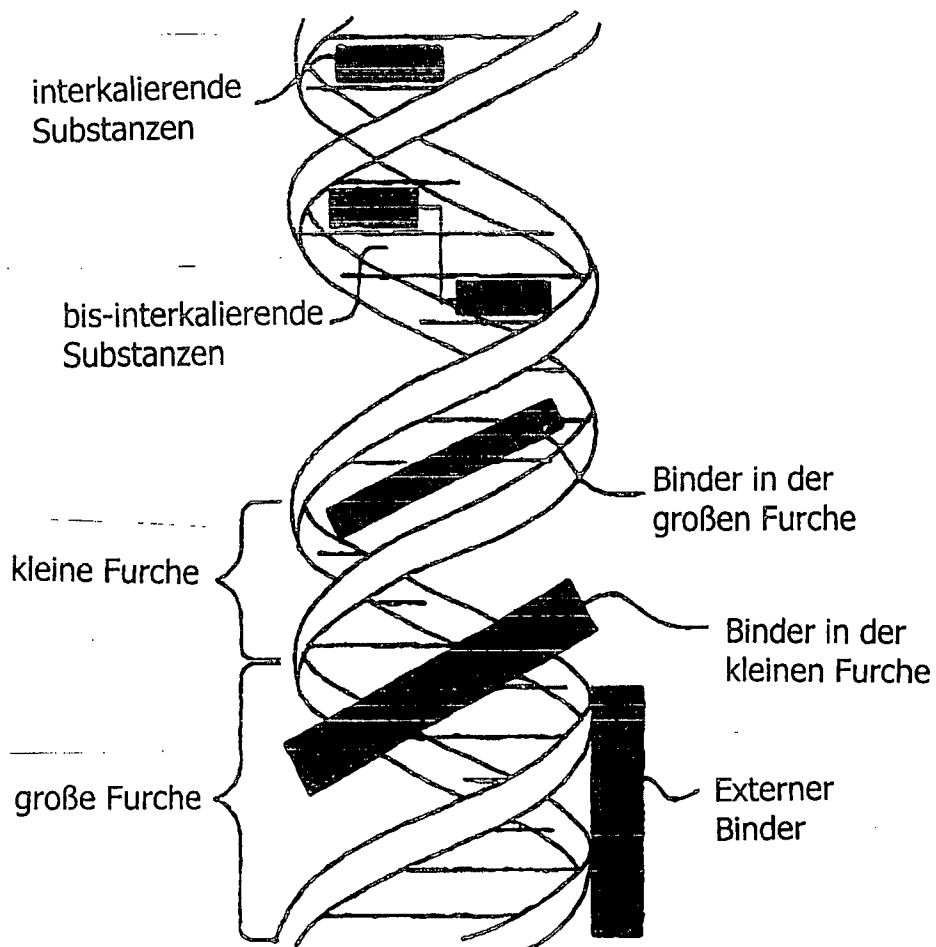
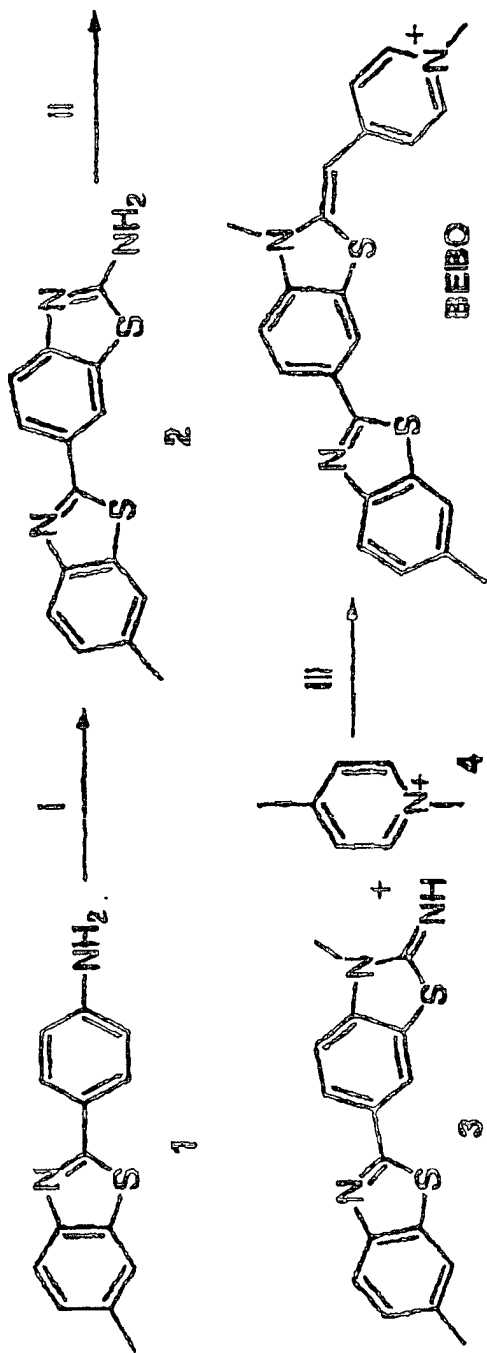
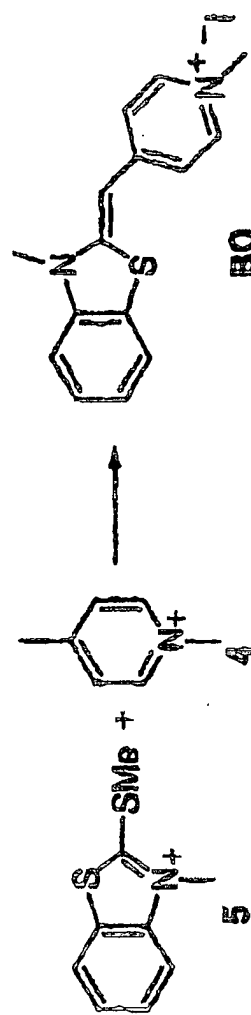


FIG. 17



Schema 1



Schema 2