



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 27 314 T2 2004.03.04**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 808 320 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 27 314.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE96/00096**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 902 039.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/023807**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.01.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **08.08.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.11.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.03.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C07H 19/10**

C07H 19/20, C12Q 1/68

(30) Unionspriorität:

9500342 31.01.1995 SE

(73) Patentinhaber:

Quiatech AB, Uppsala, SE

(74) Vertreter:

**WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

(72) Erfinder:

Kwiatkowski, Marek, 756 52 Uppsala, SE

(54) Bezeichnung: **KETTENABBRUCHGRUPPEN, IHRE VERWENDUNG ZUR SEQUENZIERUNG UND SYNTHESE
VON NUKLEINSÄUREN UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG**

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

- [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Kettenabbruchreagenzien für Nucleinsäuren, ihre Verwendung bei Nucleinsäuresequenzierung bzw. -synthese, sowie ein Verfahren zur Herstellung solcher Verbindungen.
- [0002] Es gibt heutzutage zwei vorherrschende Methoden zur Sequenzbestimmung von DNA: das Verfahren mittels chemischer Spaltung (Maxam und Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 560–564 (1977)) und die Dideoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463–5467 (1977)). Die meisten automatischen Sequenziergeräte basieren auf der Kettenabbruchmethode und weisen eine Produktbildung mittels Fluoreszenz nach. Bei diesen Systemen sind entweder die Primer, an die die Deoxynucleotide und Dideoxynucleotide angefügt werden, farbstoffmarkiert, oder die zugegebenen Dideoxynucleotide sind fluoreszenzmarkiert. Alternativ können farbstoffmarkierte Deoxynucleotide zusammen mit unmarkierten Dideoxynucleotiden verwendet werden. Diese Kettenabbruchmethode basiert auf der Fähigkeit eines Enzyms, spezifische Nucleotide an das 3'-Hydroxyende eines Primers anzufügen, der an ein Templat hybridisiert ist. Die Eigenschaft von Nucleinsäuren, Basenpaarung einzugehen, bestimmt die Spezifität des Nucleotideinbaus. Die Produkte der Verlängerung werden dann auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch ein optisches System unter Laseranregung detektiert.
- [0003] Obwohl sowohl das Verfahren mittels chemischer Spaltung als auch die Dideoxy-Kettenabbruchmethode weit verbreitet sind, sind viele Nachteile damit verbunden. Beispielsweise erfordern die Verfahren eine gelelektrophoretische Auftrennung. Üblicherweise können aus einem einzelnen Klon nur 400–800 Basenpaare sequenziert werden.
- [0004] In der Folge sind die Systeme sowohl zeit- als auch arbeitsaufwendig. In Versuchen, den Durchsatz bei der Sequenzierung zu erhöhen, wurden Methoden entwickelt, bei denen eine Auftrennung über Gele vermieden wird.
- [0005] Methoden der Sequenzierung durch Hybridisierung (SBH) wurden von Crkvenjakov (Drmanac et al., Genomics 4: 114 (1989)); Strezoska et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10089 (1991)), Bains und Smith (Bains and Smith, J. Theoretical Biol. 135: 303 (1988)) und in der US-A-5,202,231 vorgeschlagen. Diese Art System nützt die aus mehreren Hybridisierungen des interessierenden Polynucleotids gewonnenen Informationen, wobei kurze Oligonucleotide eingesetzt werden, um die Nucleinsäuresequenz zu bestimmen. Diese Methoden können den Durchsatz bei der Sequenzierung potentiell erhöhen, da mehrere Hybridisierungsreaktionen gleichzeitig durchgeführt werden. Um die Sequenz zu rekonstruieren, ist jedoch ein umfangreicher Computer-Suchalgorithmus erforderlich, um die wahrscheinlichste Reihenfolge aller mit Hilfe der Mehrfachhybridisierungen erhaltenen Fragmente zu bestimmen.
- [0006] Die SBH-Methoden sind in mehrfacher Hinsicht problematisch. Beispielsweise hängt die Hybridisierung von der Sequenzzusammensetzung der Duplex aus Oligonucleotid und interessierendem Polynucleotid ab, so daß GC-reiche Regionen stabiler sind als AT-reiche Regionen. In der Folge treten beim Hybridisierungsnachweis häufig falsche positive und falsche negative Signale auf und komplizieren die Sequenzbestimmung. Außerdem wird die Sequenz des Polynucleotids nicht direkt bestimmt, sondern aus der Sequenz der bekannten Sonde geschlossen, was die Fehlermöglichkeiten erhöht.
- [0007] Es wurden auch Methoden vorgeschlagen, die das Anfügen oder Abspalten einzelner Moleküle aus einem DNA-Strang detektieren.
- [0008] Beispielsweise offenbart Hyman E. D., Anal. Biochem., 174: 423 (1988), das Anfügen eines Nucleotids an einen immobilisierten DNA-Komplex aus Templat/Primer in Gegenwart einer Polymerase und das Feststellen einer Polymerisationsreaktion durch Detektion des als Folge der Polymerisation freigesetzten Pyrophosphats.
- [0009] Jett et al., J. Biomol. Struct. Dyn., I, S. 301, 1989, offenbaren eine Methode, bei der ein einzelsträngiges DNA- oder RNA-Molekül aus markierten Nucleotiden, das zu der zu bestimmenden Sequenz komplementär ist, in einer in Bewegung befindlichen Fließströmung suspendiert wird. Dann werden nacheinander einzelne Basen vom Ende der suspendierten Sequenz abgespalten und mittels eines Detektors, der von der Fließströmung passiert wird, bestimmt.
- [0010] Die EP-A-223 618 offenbart die Verwendung eines immobilisierten DNA-Templats, eines immobilisierten Primers und einer immobilisierten Polymerase, die einer Strömung ausgesetzt werden, die zu einer gegebenen Zeit nur eine Deoxynucleotidspezies enthält. Ein nachgeschaltetes Detektionssystem stellt dann fest, ob Deoxynucleotid in die Kopie eingebaut wurde oder nicht, indem es die Differenz zwischen den Deoxynucleotidkonzentrationen feststellt, die in die Durchflußzelle, die den Komplex aus DNA-Templat und Polymerase enthält, eintreten und aus ihr austreten.
- [0011] Die WO 90/13666 schlägt ein Verfahren zur direkten Messung des Wachstums der Templatkopie vor, anstatt es indirekt aus Zusammensetzungen im Strömungsmedium zu bestimmen. Zu einem gegebenen Zeitpunkt ist nur eines der vier Nucleotide vorhanden, und die Polymerisationsvorgänge, die widerspiegeln, ob der Einbau eines Nucleotids erfolgt ist oder nicht, werden spektroskopisch (transiente Wellenspektroskopie, Fluoreszenzdetektion, Absorptionsspektroskopie) oder mittels einzelner Nucleotide, die markiert sind, detektiert.

[0012] Ähnliche Verfahren, die markierte 3'-blockierte Deoxynukleotide verwenden, wobei die blockierende Gruppe abspaltbar ist, und die daher sequentielle Schritte von Anfügen und Detektion von Deoxynukleotiden ermöglichen, sind in WO 91/06678, US-A-5,302,509, DE-A-41 41 178 und WO 93/21340 offenbart. Die erforderlichen 3'-Schutzgruppen werden jedoch entweder nicht im einzelnen beschrieben oder werden von dem erforderlichen Enzym nicht akzeptiert oder erlauben nicht das gewünschte rasche Deblockieren des wachsenden Strangs der Templatkopie nach jedem Polymerisationsvorgang.

[0013] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, neue Nukleotidderivate bereitzustellen, die als Kettenabbruchreagenzien verwendet werden können und die durch Entfernung der Schutzgruppen (Entschützung) leicht in Nukleotide oder Nukleotidanalogue überführt werden können, die weiterverlängert werden können.

[0014] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Bestimmung von Nukleotidsequenzen unter Verwendung der neuen Kettenabbruchreagenzien bereitzustellen.

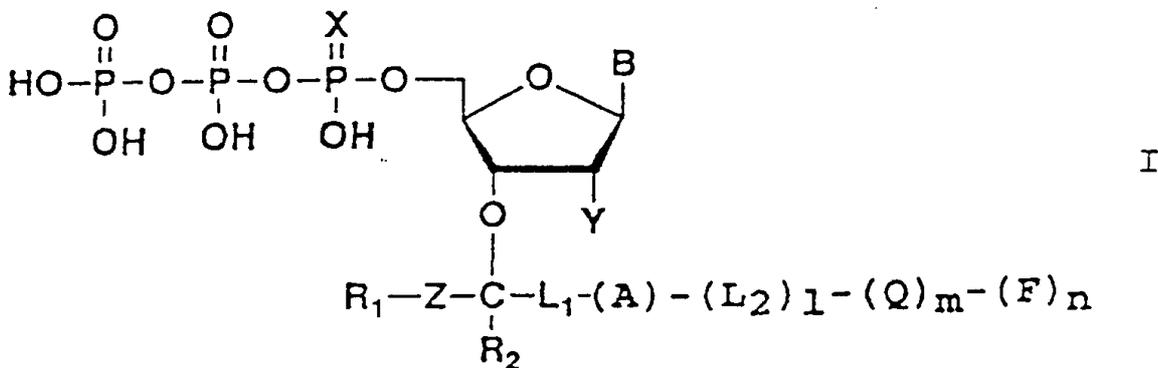
[0015] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Syntheseverfahren für Oligo- oder Polynukleotide mittels der neuen Kettenabbruchreagenzien bereitzustellen.

[0016] Die WO 94/23064 betrifft Nukleotidtriphosphate, die an ihrer 3'-Hydroxygruppe mit einer Esterfunktion substituiert sind. Tatsächlich wurde später durch dieselben Autoren gezeigt, "Catalytic editing properties of DNA polymerases", B. Canard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92, S. 10859-10863, daß DNA-Polymerasen 3'-Esterbindungen vollständig und ausnahmslos hydrolysieren, wobei die freie 3'-Hydroxygruppe unter gleichzeitigem Verlust des Fluorophors freigesetzt wird. Folglich wird das Anfügen einer einzelnen Base unmöglich, kein Fluoreszenzsignal bleibt am Primer gebunden und die gesamte Strategie der DNA-Sequenzierung schlägt fehl.

[0017] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung neuer erfindungsgemäßer Kettenabbruchreagenzien bereitzustellen.

[0018] Erfindungsgemäß werden diese Aufgaben durch die Bereitstellung eines kettenabbruchenden Nukleotids oder Nukleotidanalogs gelöst, deren 3'-Hydroxygruppe durch eine Acetal- oder Thioacetalstruktur geschützt ist, die so aufgebaut ist, daß die 3'-Hydroxygruppe in relativ kurzer Zeit in verdünnter Säure, wie beispielsweise Salzsäure bei pH 2, entschützt werden kann.

[0019] Gemäß einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung daher eine Verbindung der allgemeinen Formel I:



oder ein Salz davon bereit, beispielsweise ein Trimethylammonium-, Ammonium-, Natrium- oder Kaliumsalz, worin

B eine Nukleobase ist,

X und Z unabhängig Sauerstoff oder Schwefel sind,

Y Wasserstoff, Hydroxy oder geschütztes Hydroxy ist, beispielsweise Methoxy, Ethoxy oder Allyloxy,

R₁ Hydrocarbyl ist, das gegebenenfalls mit einer funktionellen Gruppe substituiert ist,

R₂ Wasserstoff oder Hydrocarbyl ist, das gegebenenfalls mit einer funktionellen Gruppe substituiert ist,

A eine elektronenziehende oder elektronenschiebende Gruppe ist, die in der Lage ist, die Acetalstabilität der Verbindung I über L₁ zu moderieren,

L₁ und L₂ Kohlenwasserstofflinker sind, die gleich oder verschieden sein können, wobei L₂, wenn vorhanden, entweder (i) mit L₁ über die Gruppe A verknüpft ist oder (ii) direkt mit L₁ verknüpft ist, wobei die Gruppe A dann an einen der Linker L₁ und L₂ gebunden ist,

F ein Farbstoffmarker ist,

Q eine Kupplungsgruppe für F ist, und

l, m und n unabhängig 0 oder 1 sind, mit der Einschränkung, daß l 1 ist, wenn m 1 ist, und l 1 ist und m 1 ist, wenn n 1 ist.

[0020] In der obigen Formel I kann die Nukleobase B natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein. Natürliche Nukleobasen umfassen gewöhnliche Nukleobasen wie Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin und Uracil sowie

weniger übliche Nucleobasen wie Xanthin, Hypoxanthin oder 2-Aminopurin. Synthetische Nucleobasen B sind Analoge zu den natürlichen Nucleobasen und in der Lage, mit anderen Nucleobasen in einer spezifischen, durch Wasserstoffbindungen bestimmten Weise in Wechselwirkung zu treten.

[0021] Die durch R_1 und R_2 dargestellten Hydrocarbylgruppen umfassen zahlreiche verschiedene Gruppen, einschließlich linearem und verzweigtem Alkyl, Alkenyl, Aryl, Alkyl und Cycloalkyl, vorzugsweise mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen. Bevorzugte Hydrocarbylgruppen sind primäre, sekundäre oder tertiäre Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppen, insbesondere Niederalkylgruppen wie Methyl und Ethyl. Die optionalen funktionellen Substituentengruppen an R_1 und R_2 sind in der Lage, die Labilität der 3'-Acetalgruppe durch einen induktiven Effekt zu moderieren. Beispiele für solche funktionellen Gruppen sind tert-Amino, Nitro, Cyano und Halogen (Fluorid, Chlorid, Bromid, Iodid).

[0022] Eine detektierbare Einheit oder Markierung F kann aus einer großen Zahl solcher dem Fachmann bekannten Einheiten ausgewählt werden. Beispiele für solche Einheiten sind radioaktiv markierte Funktionen, lumineszierende, elektrolumineszierende oder fluoreszierende Marker und Marker, die charakteristisches sichtbares Licht oder Infrarotlicht absorbieren. Bevorzugt ist F ein Fluoreszenzmarker.

[0023] Die Kupplungsgruppe Q ist, wenn $n = 0$, eine reaktive Gruppe, an die ein Marker F gekuppelt werden kann, oder, wenn $n = 1$, ist der derivatisierte Rest einer reaktiven Gruppe, die zur Kupplung von Linker L_2 an Marker F verwendet wurde. Dem Fachmann ist eine große Zahl solcher Kupplungsgruppen bekannt, die in der Lage sind, mit dem Marker F zu reagieren und über eine reaktive Funktion daran zu binden. Beispiele für reaktive Gruppen sind Amino, Thio und Carboxy. In einigen Fällen stammt die Gruppe Q vollständig von der reaktiven Funktion am ungekuppelten F. Wenn die Kupplungsreaktion beispielsweise eine Substitutionsreaktion ist, wobei die mit F reagierende Gruppe beispielsweise ein Halogen (Fluorid, Chlorid, Bromid oder Iodid) ist, dann wird die Gruppe Q durch die reaktive Funktion an Marker F repräsentiert.

[0024] Für bestimmte Anwendungen der Verbindungen der Formel I wird, wie nachfolgend beschrieben, keine detektierbare Einheit benötigt, und der Marker F und gegebenenfalls auch die Gruppe Q können dann fehlen.

[0025] Die elektronenziehende oder -schiebende Gruppe A wird als Moderator für die Acetalstabilität in die Struktur eingebaut. Die Gruppe A kann einen Teil der Kette L_1 -A- L_2 darstellen. In diesem Fall sind repräsentative Gruppen A Amido-, Sulfoxy-, Sulfon-, Carbalkoxy(ester)-, Ether-, Thioether- und Aminogruppen. Alternativ kann A ein Seitensubstituent für die L_1 - L_2 -Kette sein, wobei dann repräsentative Gruppen beispielsweise Cyano, Nitro und Halogen (Halogen einschließlich Fluorid, Chlorid, Bromid und Iodid) sind. In letzterem Fall streckt der Linker L_1 die Struktur vom Acetalkohlenstoff bis zur Stelle der Substitution, und der Linker L_2 streckt die Struktur von dieser Substitution bis zur Gruppe A. Es ist hervorzuheben, daß die spezifischen oben erwähnten elektronenziehenden und elektronenschiebenden Gruppen nur Beispiele sind und daß weitaus mehr derartige Gruppen bekannt sind und für den Fachmann offensichtlich sind.

[0026] Die Struktur des Kohlenwasserstofflinkers L_1 wird im Hinblick auf die Funktion A ausgewählt, wobei induktive Effekte stark vom Abstand abhängen. Obwohl eine lineare aliphatische (gesättigte oder ungesättigte) Kohlenwasserstoffkette bevorzugt ist, kommen auch verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffe in Betracht. Vorzugsweise hat Linker L_1 bis zu 10 Kohlenstoffatome, besonders bevorzugt bis zu 6 Kohlenstoffatome.

[0027] Die Funktion des Kohlenwasserstofflinkers L_2 besteht darin, zusammen mit Linker L_1 , A und Kupplungsgruppe Q für einen genügend großen Abstand zwischen der Markereinheit F und dem Rest der Verbindung der Formel I zu sorgen. Dies machen die räumlichen Präferenzen der Enzyme (Polymerasen) erforderlich, für die die Verbindung der Formel I als Substrat agiert, oder die Notwendigkeit, eine Wechselwirkung zwischen dem Marker und der Nucleobase B zu vermeiden. Es ist leicht zu verstehen, daß die Struktur des Linkers L_2 stark vom jeweiligen Enzym, dem Marker F und gegebenenfalls auch der Nucleobase B abhängt, die eingesetzt werden. Für jede einzelne Situation wird der Fachmann daher eine zweckmäßige Länge und Struktur für den Linker L_2 wählen. Ähnlich wie für Linker L_1 ist auch für Linker L_2 eine lineare aliphatische (gesättigte oder ungesättigte) Kohlenwasserstoffkette bevorzugt, obwohl auch verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffe in Betracht kommen. Vorzugsweise besitzt Linker L_2 bis zu 10 Kohlenstoffatome, besonders bevorzugt bis zu 6 Kohlenstoffatome.

[0028] In Fällen, in denen der Marker F und die Kupplungsgruppe Q fehlen können, kann selbstverständlich auch der Linker L_2 fehlen.

[0029] Die Verbindungen der Formel I können in relativ kurzer Zeit unter sauren Bedingungen, z. B. mit Salzsäure bei etwa pH 2, entschützt werden, so daß sie eine freie 3'-Hydroxygruppe aufweisen. Es versteht sich, daß die Zeit für die Entschütung durch eine aufeinander abgestimmte Wahl der Gruppen R_1 , R_2 , A, L_1 und L_2 auf einen gewünschten Bereich eingestellt werden kann. Unter den erwähnten sauren Bedingungen werden die ganz besonders bevorzugten Verbindungen der Formel I innerhalb von etwa 0,01 bis 15 Minuten entschützt.

[0030] Obwohl die Verbindungen der Formel I in dem Fachmann an sich bekannter, Weise als reine Kettenverlängerungsinhibitoren oder Kettenabbruchsreagenzien eingesetzt werden können, zum Beispiel bei der

DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchsmethode, profitiert man von den Vorteilen der Verbindungen natürlich besser, wenn die einfachen Möglichkeiten zum Entschützen der Verbindungen genutzt werden. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn die Verbindungen I bei Verfahren zur Nukleinsäuresequenzierung eingesetzt werden, die auf dem sequentiellen Einbau und der Bestimmung einzelner Nukleotide in einer wachsenden Kopie des Nukleinsäurestrangs basieren, wie sie beispielsweise in den oben erwähnten WO 91/06678, US-A-5,302,509, DE-A-41 41 178 und WO 93/21340 beschrieben sind.

[0031] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird daher ein Verfahren zur Bestimmung der Sequenz einer Nukleinsäure bereitgestellt, wobei das Verfahren das Bereitstellen eines einzelsträngigen Templats, das die zu bestimmende Nukleinsäure umfaßt, und wenigstens teilweises Synthetisieren eines komplementären Nukleinsäuremoleküls auf schrittweise sequentielle Art durch das Anfügen von Nukleotiden umfaßt, wobei die Identität eines jeden in das komplementäre Nukleinsäuremolekül eingebauten Nukleotids nach dessen Einbau bestimmt wird, wobei die Nukleotide Verbindungen der wie oben definierten Formel I sind und wobei die 3'-Schutzgruppe von dem Nukleotid nach dessen Einbau abgespalten wird, um die Weiterverlängerung des Nukleinsäuremoleküls zu ermöglichen.

[0032] In einer Ausführungsform umfaßt ein Verfahren zur Bestimmung der Sequenz einer Nukleinsäure die folgenden Schritte:

- (i) Bereitstellen eines einzelsträngigen Templats, das die zu sequenzierende Nukleinsäure umfaßt,
- (ii) Hybridisieren eines Primers an das Templat unter Bildung eines Templat/Primer-Komplexes,
- (iii) Unterwerfen des Primers einer Verlängerungsreaktion durch Anfügen von Verbindungen der Formel I mit verschiedenen Nukleobasen B, die den vier Basen A, C, T und G oder Analogenen davon entsprechen,
- (iv) Bestimmen des Typs der Verbindung der Formel I, die an den Primer angefügt wurde,
- (v) selektives Hydrolysieren der Acetalschutzgruppe, und
- (vi) sequentielles Wiederholen der Schritte (iii) bis (v) und Aufzeichnen der Reihenfolge des Einbaus von Verbindungen der Formel I.

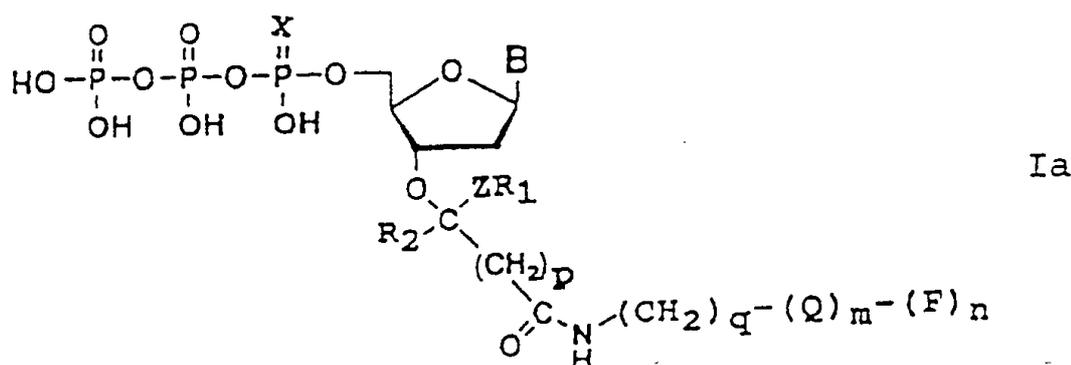
[0033] Die verschiedenen Verbindungen der Formel I in Schritt (iii) können hintereinander zugegeben werden, in welchem Fall die vier verschiedenen Verbindungen I den gleichen Marker F tragen können. Alternativ können die verschiedenen Verbindungen I verschiedene Marker F haben und werden gleichzeitig zugegeben.

[0034] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Templat/Primer-Komplex an einen Festphasenträger gebunden, beispielsweise einen Sequenzchip. Das Templat kann über einen Verbindungslinker an den festen Träger gebunden sein, der beispielsweise an das 5'-Ende des Templats ligiert ist oder mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) in eines der Enden des Templats eingebaut ist. Der Verbindungslinker kann dann mittels eines Streptavidin-Kupplungssystems an den festen Träger gebundene werden. Alternativ kann der Primer an den festen Träger gebunden sein.

[0035] Die Verbindungen der Formel I können selbstverständlich auch bequem bei der sogenannten Minisequenzierung (siehe z. B. Syvänen A-C et al., Genomics 8: 684–692 (1990)) verwendet werden.

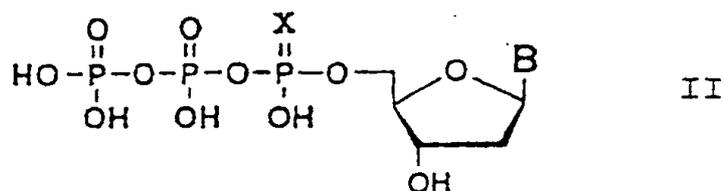
[0036] Wie sich für den Fachmann ohne weiteres ergibt, können die Verbindungen der Formel I auch bei der Synthese von Nukleotidketten verwendet werden, und ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine solche Verwendung. Beispielsweise können Oligonukleotide und Polynukleotide hergestellt werden, indem man die Verbindungen der Formel I in irgendeiner beliebigen Basenfolge unter zwischenzeitlichem Deblockieren und unter Verwendung einer nicht Templat-abhängigen Polymerase, wie terminale Transferase, sukzessiv miteinander kuppelt. Bei einer solchen Synthese können die Gruppen L₂, Q und F in der Formel I natürlich weggelassen werden.

[0037] Die Verbindungen der Formel I können nach an sich bekannten Verfahren hergestellt werden. Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung jedoch ein besonderes Verfahren zur Herstellung einer Untergruppe von Verbindungen der Formel I durch direkten Schutz des 3'-OH bereit, und insbesondere von Verbindungen der Formel Ia:

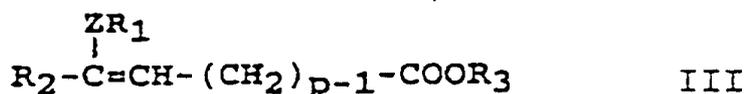


oder eines Salzes davon, worin B, X, Z, R₁, R₂, Q, F, m und n wie oben definiert sind und p und q unabhängig

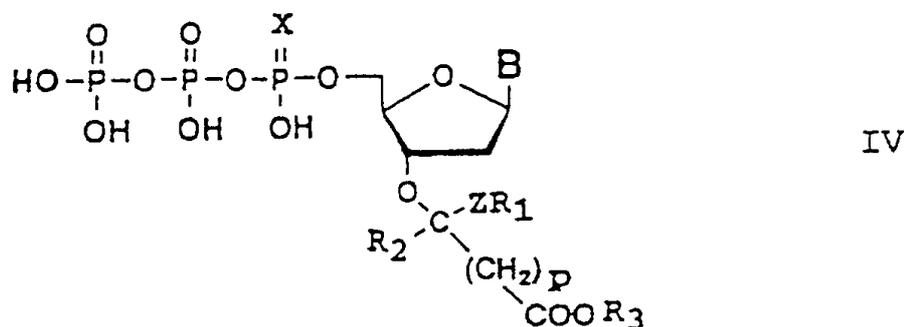
ganze Zahlen von 1 bis 10, vorzugsweise von 1 bis 6 sind, indem eine Verbindung der Formel II:



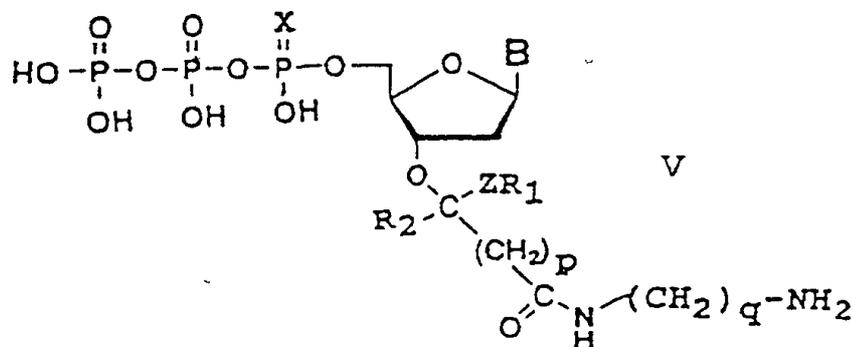
oder ein Salz davon, worin B und X wie oben definiert sind, mit einer Verbindung der Formel III:



worin R_1 , R_2 , Z und p wie oben definiert sind und R_3 Hydrocarbyl ist (beispielsweise wie oben für R_1 und R_2 definiert), unter Bildung einer Verbindung der Formel IV:



oder eines Salzes davon umgesetzt wird, worin B, X, Z, R_1 , R_2 , R_3 und p wie oben definiert sind, letztere gegebenenfalls mit einem Diamin $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_q-\text{NH}_2$, worin q wie oben definiert ist, zu einer Verbindung der Formel V:



umgesetzt wird, worin B, X, Z, R_1 , R_2 , p und q wie oben definiert sind und gegebenenfalls ein Farbstoffmarker F an die terminale Aminogruppe gekuppelt wird.

[0038] Im folgenden wird die Erfindung durch einige nicht einschränkende Beispiele erläutert. Hierbei wird auf die anliegenden Abbildungen Bezug genommen, wobei:

[0039] **Fig. 1** ist ein Reaktionsschema für die in nachfolgendem Beispiel 1 beschriebene Enolethersynthese. Zwischenprodukte und Endprodukte, die den verschiedenen Werten für die ganze Zahl "n" in den jeweiligen Strukturformeln entsprechen, werden durch Zahlen identifiziert, die in Klammern nach den n-Werten angegeben sind, die unter den jeweiligen Formeln aufgeführt sind.

[0040] **Fig. 2** ist ein Reaktionsschema für die Herstellung von 3'-Acetal-modifiziertem Thymidin, die in dem nachfolgenden Beispiel 2 beschrieben wird. Die hergestellten Endprodukte, die den verschiedenen Werten für die ganze Zahl "n" in den jeweiligen Strukturformeln entsprechen, werden durch Zahlen identifiziert, die in Klammern nach den n-Werten angegeben sind, die unter der Formel aufgeführt sind.

[0041] **Fig. 3** ist eine Kurve, die die Hydrolyse des Thymidin-3'-Acetals bei pH 4 als Log-% von restlichem Acetal gegen die Zeit in Minuten zeigt.

[0042] **Fig. 4** ist ein Reaktionsschema für die Eintopfsynthese von 3'-Acetal-geschütztem Deoxynucleotridriphosphat, die in dem nachfolgenden Beispiel 4 beschrieben wird. Zwischenprodukte und Endprodukte, die den verschiedenen Werten für die ganze Zahl "n" in den jeweiligen Strukturformeln entsprechen, werden durch

Zahlen identifiziert, die in Klammern nach den n-Werten angegeben sind, die unter den jeweiligen Formeln aufgeführt sind.

BEISPIEL 1

Synthese von Enolethern zur Derivatisierung von Nukleotidtriphosphaten (**Fig. 1**)

Schritt 1. Veresterung von Ketosäuren

[0043] Die geeignete Ketosäure (1 val) wurde auf einmal zu einem großen Überschuß an trockenem Methanol (20 val) gegeben, das zuvor mit Thionylchlorid (0,1 val) versetzt worden war. Die homogene Mischung wurde über Nacht unter Rückfluß erhitzt, unter reduziertem Druck eingedampft und zwischen gesättigtem Natriumhydrogencarbonat und Dichlormethan partitioniert. Die vereinten organischen Extrakte wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand wurde unter reduziertem Druck destilliert, was den entsprechenden Methylester in hoher Ausbeute (80% bis 95%) lieferte.

[0044] Die folgenden Ketosäuren wurden eingesetzt:

- 1) 4-Oxypentansäure (Levulinsäure) (Aldrich).
- 2) 5-Oxyhexansäure wurde nicht isoliert. Stattdessen wurde ein kommerziell erhältliches Ethylesterderivat dieser Säure (Merck) in einer zu dem obigen allgemeinen Verfahren analogen Reaktion umgeestert.
- 3) 6-Oxyheptansäure wurde aus 2-Methylcyclohexanol (Merck) entsprechend einem veröffentlichten Verfahren erhalten (Org. Synth. 31: 3–5, (1951)).
- 4) 7-Oxyoctansäure wurde wie beschrieben aus 2-Acetylcyclohexanon erhalten (J. Am. Chem. Soc. 70: 4023–4026 (1948)).

Schritt 2. Synthese der Dimethoxyacetalderivate (Verbindungen 1–4 in Fig. 1)

[0045] Zu jedem der obigen Methylester (1 val), die in Methanol (2 val) und Trimethylorthoformiat (3 val) gelöst waren, wurde Benzolsulfonsäure (0,01 val) zugegeben. Die dunkelbraune Mischung wurde 3 h unter Rückfluß erhitzt, durch Zugabe von trockenem Triethylamin (0,1 val) neutralisiert und eingedampft. Der Rückstand wurde unter reduziertem Druck destilliert, was ein reines Acetal lieferte.

[0046] Verbindung 1. Die physikalischen Daten und die NMR-Daten für dieses Acetal entsprechen gut den früher beschriebenen Daten.

[0047] Verbindung 2. Ausbeute 85%, Sp. 120° (15 mm Hg), ¹H-NMR (CDCl₃): 1,28 (s, 3H), 1,60–1,69 (m, 4H), 2,34 (t, 2H), 3,17 (s, 6H), 3,67 (s, 3H).

[0048] Verbindung 3. Ausbeute 92%, Sp. 130–133° (15 mm Hg), ¹H-NMR (CDCl₃): 1,25 (s, 3H), 1,29–1,35 (m, 2H), 1,60–1,70 (m, 4H), 2,33 (t, 2H), 3,17 (s, 6H), 3,67 (s, 3H).

[0049] Verbindung 4. Ausbeute 87%, Sp. 147–149° (15 mm Hg), ¹H-NMR (CDCl₃): 1,25 (s, 3H), 1,27–1,38 (m, 4H), 1,57–1,67 (m, 4H), 2,31 (t, 2H), 3,16 (s, 6H), 3,66 (s, 3H).

Schritt 3. Synthese von Enolethern (Verbindungen 5–8 in Fig. 1).

[0050] Eine Mischung aus dem geeigneten Acetal (1 val) und Trimethylorthoformiat (0,5 val) wurde in einem Destillationskolben, der mit einer 20 cm-Vigreux-Kolonne versehen war, vorgelegt. Es wurde Benzolsulfonsäure (0,02 val) zugegeben und die Mischung wurde unter Rückfluß erhitzt. Die Heizung wurde so reguliert, daß das freigesetzte Methanol langsam verdampfte. Nach 4 h wurde stärker erhitzt und die dunkle Mischung wurde unter reduziertem Druck ohne vorherige Neutralisierung des sauren Katalysators fraktioniert. Die Ausbeuten an isolierten farblosen Enolethern waren in allen Fällen sehr hoch (85–95%), GC- und NMR-Analysen zeigten jedoch, daß das Ausgangsacetal noch in Mengen von 10 bis 30% vorhanden war. Da nicht zu erwarten war, daß diese Verunreinigungen die Derivatisierung von Nukleotiden beeinflussen, wurden keine Versuche zur weiteren Reinigung unternommen. Die vollständige Zuordnung von NMR-Signalen war wegen der Anwesenheit von Ausgangsmaterial und angesichts der Tatsache, daß diese asymmetrischen Enolether in mehreren isomeren Formen vorkommen, schwierig. Nichtsdestotrotz konnte in allen Spektren ohne weiters ein CH₂-Vinylsignal aus einem Isomer bei etwa 4,4 bis 4,5 ppm und ein CH-Vinylsignal aus dem anderen Isomer bei 3,85 ppm beobachtet werden.

BEISPIEL 2

Synthese von 3'-Acetal-modifiziertem Thymidin (**Fig. 2**)

[0051] Das 5'-geschützte Thymidin, 5'-FMOC T (FMOC-Fluorenylmethoxycarbonyl), (116 mg, 0,25 mmol)

wurde durch Coverdampfung mit trockenem Acetonitril (10 ml) getrocknet und in trockenem Dioxan (5 ml) gelöst. Zu dieser magnetisch gerührten Lösung wurde ein in Beispiel 1 hergestellter zweckmäßiger Enolether (0,5 ml, \approx 10 val) gegeben, gefolgt von Trifluoressigsäure (20 ml, 1 val). Nach 45 min zeigte die DSC-Analyse (Silicagel 60 F254, 10% Methanol in Chloroform) den vollständigen Verbrauch des Ausgangsmaterials, und es wurde trockenes Triethylamin (2 ml) zugeführt, um die basenlabile Fmoc-Gruppe zu entfernen. Nachdem dieser Prozeß beendet war (60 min), wurde die gesamte Mischung unter reduziertem Druck eingedampft. Das Nucleosid wurde aus dem überschüssigen Enolether durch Ausfällen aus Petrolether abgetrennt, und der Niederschlag, gelöst in 5 ml trockenem Methanol, wurde 180 min bei 60°C mit 1,3-Diaminopropan (2 ml, 100 val) behandelt, um die Aminolyse der Esterfunktion an der Acetaleinheit zu bewirken. Schließlich wurde die Reaktionsmischung bei niedrigem Druck (Ölpumpe) eingedampft und das Rohmaterial wurde an einer Silicagelsäule, die in Ethanol äquilibriert war, und unter Verwendung eines Stufengradienten von konzentriertem Ammoniumhydroxid (0–10%) in Ethanol einer Flashchromatographie unterzogen. Das Material, das gemäß DSC (entwickelt in 1-Butanol/Ammoniumhydroxid 8 : 2) homogen war, wurde vereint, eingedampft und mit Toluol coverdampft, was das NMR-reine Produkt (Verbindungen 9–12 in **Fig. 2**) in hoher Ausbeute (72 bis 85%) lieferte. Das reine Material wurde nach Zugabe von drei Tropfen Ammoniak als Stammlösung in Methanol aufbewahrt.

BEISPIEL 3

Saure Hydrolyse (pH 4) von Thymidin, das an der 3'-Position mit verschiedenen Acetylgruppen substituiert ist

[0052] Bei allen Hydrolyseuntersuchungen wurde ein Acetatpuffer mit pH 4,0, der durch Mischen von Lösungen von Natriumacetat (0,20 M, 18,0 ml) und Essigsäure (0,20 M, 82,0 ml) hergestellt worden war, als Referenz verwendet. Zu diesem Puffer (10,0 ml) wurde eine ethanolische Lösung des geeigneten, in Beispiel 2 hergestellten 3'-Acetal-Thymidinderivats (Verbindungen 9–12 in **Fig. 2**) (100 ml) unter schwachem Rühren gegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe von 0,5 ml entnommen und in ein Reagenzglas mit 15 ml konzentriertem Ammoniak gegeben, um den pH auf 9 zu erhöhen. Die Proben wurden mittels FPLC getestet, wobei eine Anionenaustauschersäule (Mono Q – Pharmacia Biotech AB) und ein Tetraethylammoniumbicarbonat-Gradientensystem, pH 8,2 (0,05 bis 0,75 M), zur Elution verwendet wurde. Die Peakflächen des Ausgangsmaterials und von dessen Hydrolyseprodukt Thymidin wurden integriert und wie in **Fig. 3** gezeigt aufgetragen.

BEISPIEL 4

Eintopfsynthese von Deoxynucleotidtriphosphaten, die an ihrer 3'-OH-Position durch eine funktionalisierte Acetalgruppe geschützt sind (**Fig. 4**)

[0053] Ein kommerziell erhältliches Deoxynucleotidtriphosphat (pppT, pppC, pppG oder pppdA) wurde an einer präparativen Mono Q-Säule unter Verwendung eines Tetraethylammoniumbicarbonat-Gradientensystems, pH 8,2 (0,05 bis 1,3 M), chromatographiert, wobei das reine Triphosphat in Form eines Triethylammoniumsalzes erhalten wurde. Dieses Material wurde an einem Rotavapor eingedampft, mit trockenem Acetonitril (3 × 2 ml) coverdampft und in mit einem Molekularsieb getrocknetem Trimethylphosphat (0,5 ml) gelöst. Der geeignete Enolether (Verbindungen 5–8 in **Fig. 1**) (0,2 ml) und Trifluoressigsäure (10 val als 10%ige Lösung in trockenem Dioxan) wurden zugegeben. Die homogene Mischung wurde bei 20°C 60 min inkubiert, durch die Zugabe von Triethylamin (100 ml) neutralisiert und aus einer 1 : 1-Mischung aus Petrolether und Diethylether ausgefällt. Der ölige Niederschlag wurde in Methanol (2 ml) gelöst und es wurde 1,3-Diaminopropan (0,5 ml) oder ein anderes Diamin (1,4-Diaminobutan, 1,6-Diaminohexan) (0,5 ml) zugegeben. Die Esterfunktion wurde über Nacht bei 60°C einer Aminolyse unterzogen. Die Mischung wurde wiederum aus Petrolether und Diethylether, 1 : 1, ausgefällt, mit Diethylether gewaschen und in Wasser gelöst. Die wäßrige Lösung wurde getestet und präparativ an der beschriebenen Anionenaustauschersäule gereinigt. Die gut aufgelösten Produkte (Verbindungen 13–28 in **Fig. 4**) erscheinen immer vor dem ursprünglichen Deoxynucleotidtriphosphat und haben eine Retentionszeit, die mit der des entsprechenden Deoxynucleotiddiphosphats vergleichbar ist (wie in separaten Coinjektionsexperimenten gefunden wurde). Ein Aliquot des isolierten 3'-Acetal-modifizierten Derivats wurde eingedampft, 2 min mit 80%iger Essigsäure behandelt und nach Abdampfen von Säure wieder in das gleiche Chromatographiesystem eingespritzt. In allen Fällen wurde alles Ausgangsmaterial umgesetzt und ein einziges Produkt mit höherer Retentionszeit wurde gebildet, das dem ursprünglichen Deoxynucleotidtriphosphat entspricht. Thymidintriphosphat reagiert außer zu dem gewünschten 3'-modifizierten Derivat auch zu einem weiteren Produkt mit noch kürzerer Retentionszeit, dieses hydrolysiert jedoch bei der Säurebehandlung ebenfalls zum Ausgangstriphosphat. Es wird angenommen, daß es sich bei diesem Produkt um das Bis-3'-O,4-O-Acetal-Derivat des Thymidintriphosphats handelt. Diese Art von Nebenprodukten trat bei den Umsetzungen, bei denen andere Nucleotidtriphosphate verwendet wurden, nicht auf. Es ist ferner zu betonen, daß bei den Reaktionen, bei denen pppdG und pppdA verwendet wurden, sehr wenig Depurinierungsprodukte

gebildet wurden. Dies läßt sich durch die milde Säure, die als Katalysator eingesetzt wurde, den großen Überschuß des bei der Reaktion verwendeten Enoethers und die Tatsache erklären, daß die Basen in einer ungeschützten (säureresistenteren) Form vorlagen.

BEISPIEL 5

Kupplung eines Fluorophors an das 3'-funktionalisierte Deoxynukleotidtriphosphat (**Fig. 4**)

[0054] Diese Derivatisierung kann mit einer Vielzahl reaktiver Fluorophore erfolgen, die sich in ihrer Reaktivität und in ihren optimalen Reaktionsbedingungen unterscheiden können. Hier wird das Verfahren zur Markierung von 3'-funktionalisierten Deoxynukleotidtriphosphat mit Fluoresceinisothiocyanat beschrieben.

[0055] Das passende Nukleotidtriphosphat, das eine über eine Acetalfunktion an die 3'-Position des Zuckeres gebundene Aminogruppe besitzt (Verbindungen 13–28 in **Fig. 4**), wurde eingedampft und in 0,1 M Carbonatpuffer, pH 10 (0,5 ml), gelöst. Fluoresceinisothiocyanat (Einzelisomer) (10 μ l), gelöst in Dimethylformamid (0,25 ml), wurde zugegeben und die Mischung wurde über Nacht bei 20°C inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde auf eine Prototyp-Superdex® FPLC-Gelfiltrationssäule (Pharmacia Biotech AB) (Äquivalent zu Sephadex® G-10; Pharmacia Biotech AB) aufgebracht, äquilibriert und in TEAHCO₃-Puffer (0,1 M) laufen gelassen. Das fluoreszierende Material, das im Porenvolumen erschien, wurde gesammelt (Verbindungen 29–44 in **Fig. 4**). Wie erwartet wurde nach Einwirkung von Säure auf das Fluorescein-markierte Nukleotid das ursprüngliche Deoxynukleotidtriphosphat gebildet.

BEISPIEL 6

Schrittweiser enzymatischer Einbau von 3'-modifizierten Triphosphaten

[0056] Es wurden vier Oligonukleotide mit Sequenzen hergestellt, die dem M13-Sequenzierungsprimer entsprechen, und für einen Einbau der Basen T, G, A bzw. C an ihren 3'-Enden ausgelegt:

(T)	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	(23-mer)
(G)	CGACGTTGTAAAACGACGGCCA	(22-mer)
(A)	CGACGTTGTAAAACGACGGCC	(21-mer)
(C)	CGACGTTGTAAAACGACGGC	(20-mer)

[0057] Jedes von ihnen wurde mit T4-Polynukleotidkinase radipaktiv mit ³²P markiert.

[0058] Um zu untersuchen, ob die modifizierten Nukleotidtriphosphate von der T7-Polymerase effektiv und spezifisch erkannt werden, wurde jeder der markierten Primer den Bedingungen einer Ein-Stufen-Verlängerung unterworfen. Diese Reaktionsmischungen (20 ml) setzten sich aus dem jeweiligen Primer (0,1 pmol), dem M13-Templat (1 pmol) und dem 3'-modifizierten Thymidintriphosphat (Verbindung 16 in **Fig. 4**) in einem Puffersystem mit pH 7,5 zusammen, das Tris/HCl (40 mM), MnCl₂ (4 mM), Dithiothreitol (DTT) (11 mM), Natriumisocitrat (29 mM) und Natriumchlorid (23 mM) enthielt. Die Mischungen wurden bei 70°C denaturiert, abgekühlt und nach Zugabe von T7-DNA-Polymerase (10 U) 30 min bei 42°C inkubiert. Alle Ansätze wurden durch Zugabe von Formamid (20 ml) gestoppt, bei 70°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf einem 6%igen denaturierenden Sequenzgel aufgetrennt. Das entwickelte Autoradiogramm zeigte, daß nur in der Reaktion mit dem 23-mer-T (ausgelegt zum Primer des M13-Templats und zum Einbau von Thymidylsäure an seinem 3'-Ende) eine Verlängerung um eine Base stattgefunden hatte. Keine der anderen Reaktionen mit Primern, die für den Einbau von dG, dA bzw. dC ausgelegt waren, zeigten irgendein Zeichen für ein Primerverlängerung.

BEISPIEL 7

Sequenzierungsreaktion mit modifiziertem Kettenabbruchreagens

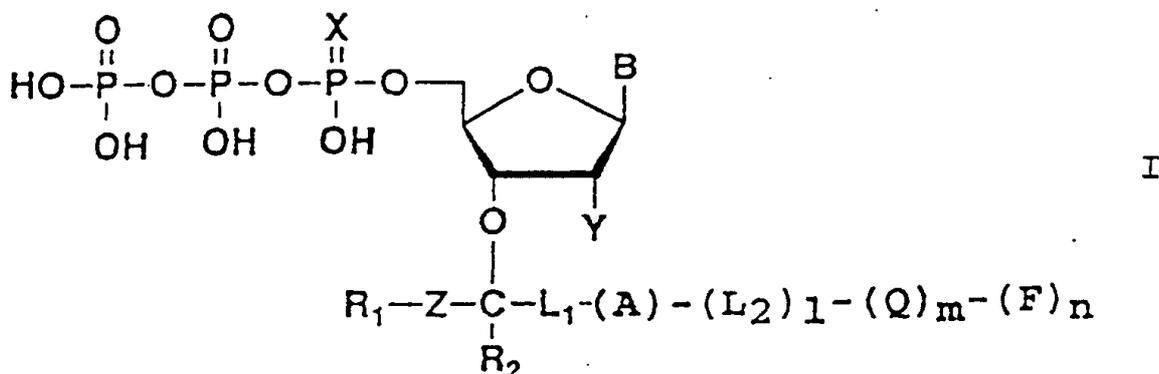
[0059] Alle Sequenzierungsreaktionen wurden gemäß dem Standard ABI®-Protokoll durchgeführt (Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit – Protokoll 901482).

[0060] Die Sequenzierungsreaktionen bestanden aus den folgenden Komponenten: M13 mp 18 ssDNA-Templat (1 pmol), 5'-fluoresceinmarkierter Universalprimer (1 pmol, Pharmacia Biotech AB), Ampli Taq-DNA-Polymerase (4U) und T-Abbruchmischung in "Cycle Sequencing"-Puffer (Tris-HCl, pH 8,9, 80 mM, Ammoniumsulfat 20 mM, Magnesiumchlorid 5 mM). Anstelle des Standard-ddT-Triphosphats wurde Verbindung 16 von **Fig. 4** in verschiedenen Mengenverhältnissen mit TTP als Kettenabbruchreagens eingesetzt. Nachdem der Zyklus beendet war, wurde ein gleiches Volumen Formamid zugegeben und die Mischung wurde 2 min bei

90°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und auf ein 6%iges Acrylamid-Harnstoffgel aufgetragen. Auftrennung und Analyse der Produkte erfolgte auf einem A.L.F.-DNA-Sequenziergerät (Pharmacia Biotech AB). [0061] Als Ergebnis wurde ein Muster fluoreszenzmarkierter Sequenzen erhalten. Dieses elektrophoretische Bild war für das eingesetzte Abbruchreagens spezifisch.

Patentansprüche

1. Verbindung der allgemeinen Formel I:



oder ein Salz davon, worin

B eine Nucleobase ist,

X und Z unabhängig Sauerstoff oder Schwefel sind,

Y Wasserstoff oder Hydroxy ist, das gegebenenfalls geschützt sein kann,

R₁ lineares und verzweigtes Alkyl, Alkenyl, Aryl, Aralkyl und Cycloalkyl mit vorzugsweise bis zu 10 Kohlenstoffatomen ist, welches gegebenenfalls mit einer funktionellen Gruppe substituiert ist,

R₂ Wasserstoff oder lineares und verzweigtes Alkyl, Alkenyl, Aryl, Aralkyl und Cycloalkyl mit vorzugsweise bis zu 10 Kohlenstoffatomen ist, welches gegebenenfalls mit einer funktionellen Gruppe substituiert ist,

A (i) Amido, Sulfoxy, Sulfon, Carbalkoxy, Ether, Thioether oder Amino ist, wenn die Gruppe A einen Teil der Kette L₁-A-L₂ darstellt; (ii) Cyan, Nitro und Halogen ist, wenn die Gruppe A ein Seitensubstituent der L₁-L₂-Kette ist,

L₁ und L₂, die gleich oder verschieden sein können, ausgewählt sind aus linearem und verzweigtem Alkyl, Alkenyl, Aryl, Aralkyl und Cycloalkyl mit vorzugsweise bis zu 10 Kohlenstoffatomen, wobei L₂, wenn vorhanden, entweder (i) mit L₁ über die Gruppe A verknüpft ist oder (ii) direkt mit L₁ verknüpft ist, wobei dann die Gruppe A mit einem der Linker L₁ und L₂ verknüpft ist,

F für radioaktiv markierte Funktionen, Lumineszenz-, Elektrolumineszenz- oder Fluoreszenzmarker und Marker steht, die charakteristisches sichtbares Licht oder Infrarot-Licht absorbieren,

Q eine Kupplungsgruppe für F ist; und wenn n = 0, Q eine reaktive Gruppe ist, an die ein Marker F gekuppelt werden kann, oder, wenn n = 1, Q der derivatisierte Rest einer zur Kupplung von Linker L₂ an Marker F eingesetzten reaktiven Gruppe ist, beispielsweise Amino, Thio und Carboxy oder eine Funktion, die bei einer Substitutionsreaktion reagiert und an F vorliegt, und

l, m und n unabhängig 0 oder 1 sind, mit der Einschränkung, daß l 1 ist, wenn m 1 ist, und l 1 ist und m 1 ist, wenn n 1 ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R₁ und R₂ unabhängig ausgewählt sind aus primärem, sekundärem und tertiärem Alkyl mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen, welches gegebenenfalls mit ein oder mehreren funktionellen Gruppen substituiert ist.

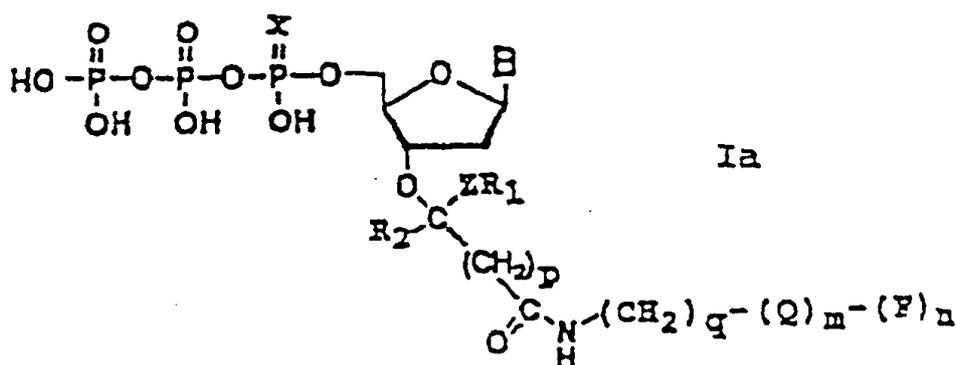
3. Verbindung nach Anspruch 2, wobei R₁ und R₂ aus Methyl und Ethyl ausgewählt sind.

4. Verbindung nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei A ein Teil einer L₁-A-L₂-Kette ist und ausgewählt ist aus Amido, Sulfoxy, Sulfon, Carbalkoxy, Ether, Thioether und Amino.

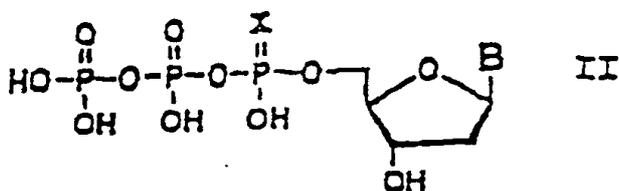
5. Verbindung nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei A ein Substituent einer L₁-L₂-Kette ist und ausgewählt ist aus Cyan, Nitro und Halogen.

6. Verbindung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, wobei L₁ eine lineare Alkylgruppe mit vorzugsweise bis zu 10 Kohlenstoffatomen ist.

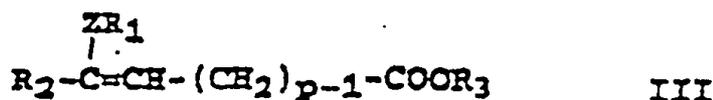
7. Verbindung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, wobei L_2 eine lineare Alkylgruppe mit vorzugsweise bis zu 10 Kohlenstoffatomen ist.
8. Verbindung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, wobei Y Methoxy, Ethoxy oder Allyloxy ist.
9. Verwendung von Verbindungen nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8 bei Reaktionen zur Nucleinsäuresynthese, insbesondere zur Herstellung von Oligo- oder Polynucleotiden.
10. Verwendung von Verbindungen nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8 zur Minisequenzierung.
11. Verfahren zur Bestimmung der Sequenz einer Nucleinsäure, umfassend das Bereitstellen eines einzelsträngigen Templates, das die zu bestimmende Nucleinsäure umfaßt, und wenigstens teilweises Synthetisieren eines komplementären Nucleinsäuremoleküls auf schrittweise sequentielle Art durch das Anfügen von Nucleotiden, wobei die Identität eines jeden in das komplementäre Nucleinsäuremolekül eingebauten Nucleotids nach dessen Einbau bestimmt wird, wobei die Nucleotide Verbindungen der Formel I sind, wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8 definiert, und wobei die 3'-Schutzgruppe von dem Nucleotid nach dessen Einbau abgespalten wird, um die Weiterverlängerung des Nucleinsäuremoleküls zu ermöglichen.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die 3'-Schutzgruppe durch saure Hydrolyse abgespalten wird.
13. verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei F in Formel I ein Fluoreszenzmarker ist.
14. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 11 bis 13, wobei das einzelsträngige Template an einen festen Träger gebunden ist.
15. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel Ia:



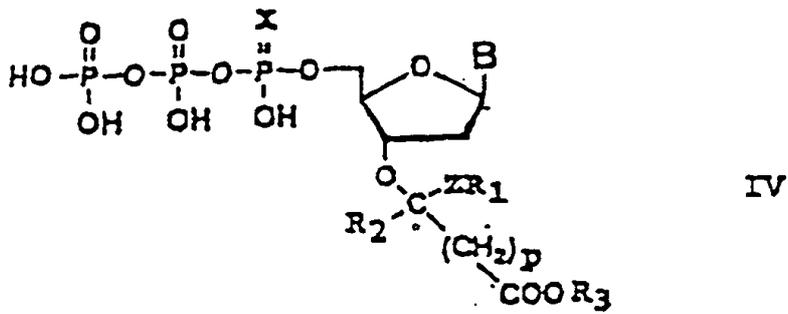
oder einem Salz davon, worin B, X, Z, R_1 , R_2 , Q, F, m und n wie in Anspruch 1 definiert sind und p und q unabhängig ganze Zahlen von 1 bis 10 sind, indem eine Verbindung der Formel II:



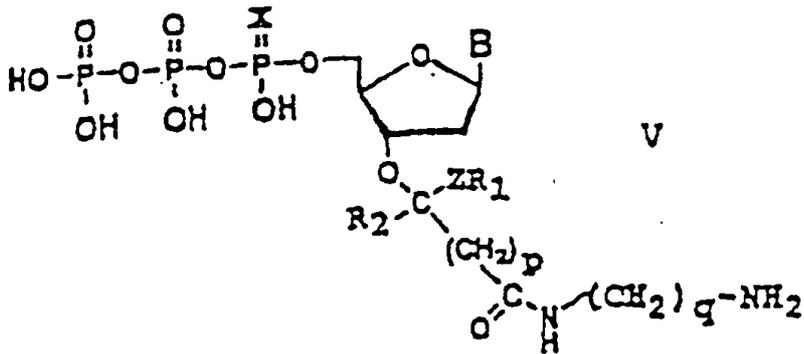
oder ein Salz davon, worin B und X wie oben definiert sind, mit einer Verbindung der Formel III:



worin R_1 , R_2 , Z und p wie oben definiert sind und R_3 lineares und verzweigtes Alkyl, Alkenyl, Aryl, Aralkyl und Cycloalkyl mit vorzugsweise bis zu 10 Kohlenstoffatomen ist, zu einer Verbindung der Formel IV:



oder einem Salz davon umgesetzt wird, worin B, X, Z, R₁, R₂, R₃ und p wie oben definiert sind, letzteres gegebenenfalls mit einem Diamin H₂N-(CH₂)_q-NH₂, worin q wie oben definiert ist, zu einer Verbindung der Formel V:



umgesetzt wird, worin B, X, Z, R₁, R₂, p und q wie oben definiert sind, und gegebenenfalls ein Farbmarker F an die terminale Aminogruppe gekuppelt wird.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

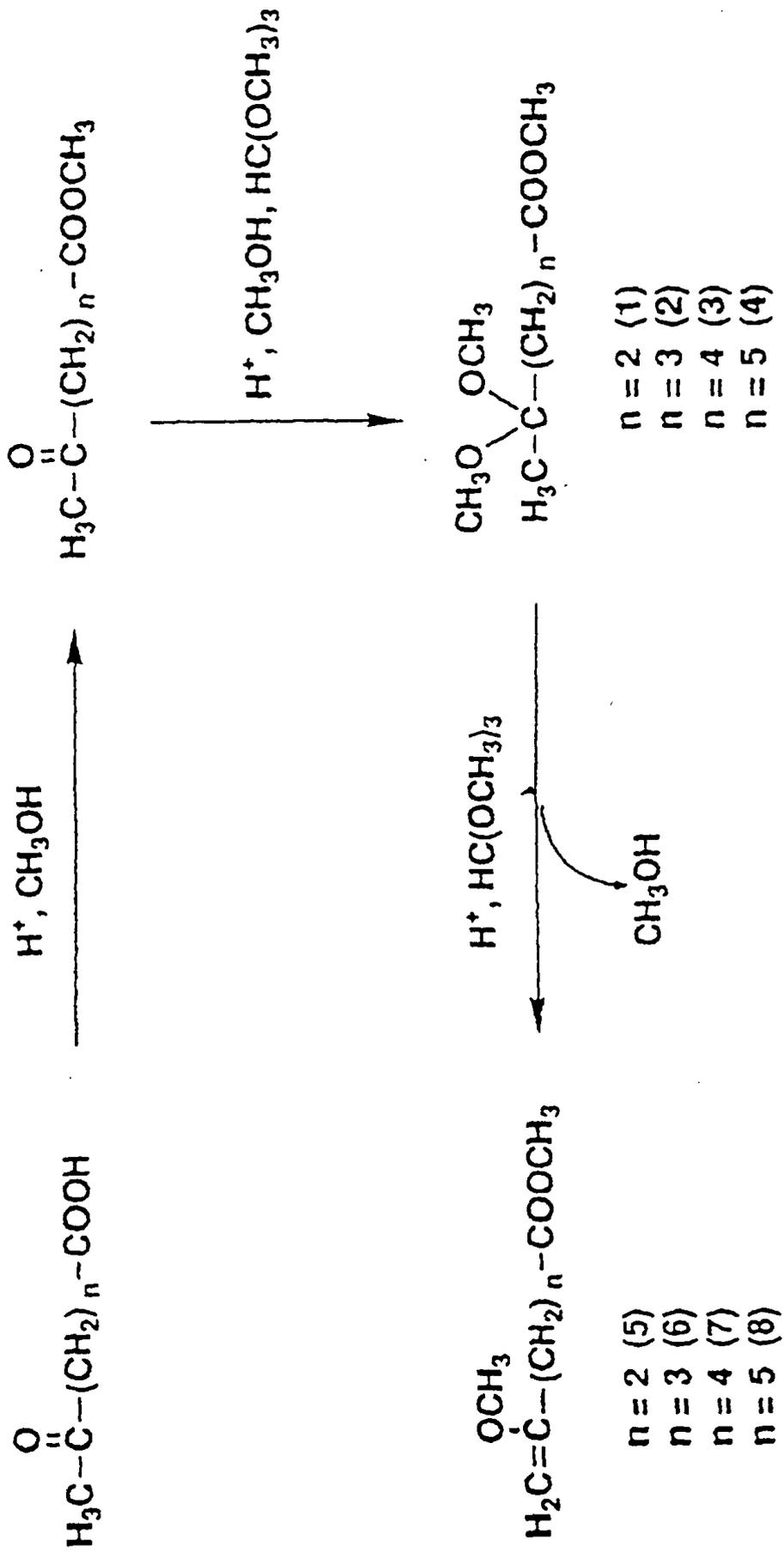


FIG. 1

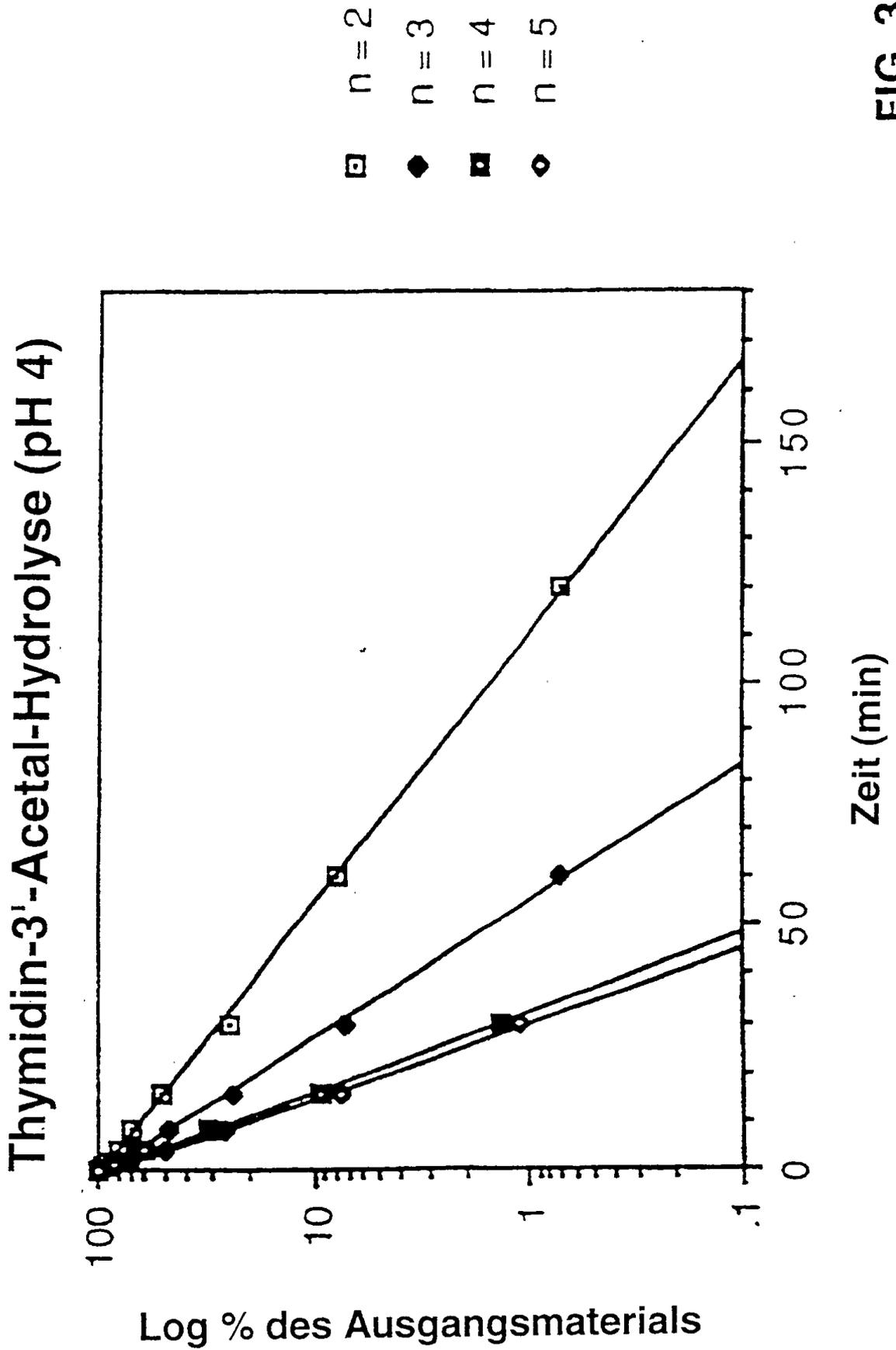


FIG. 3

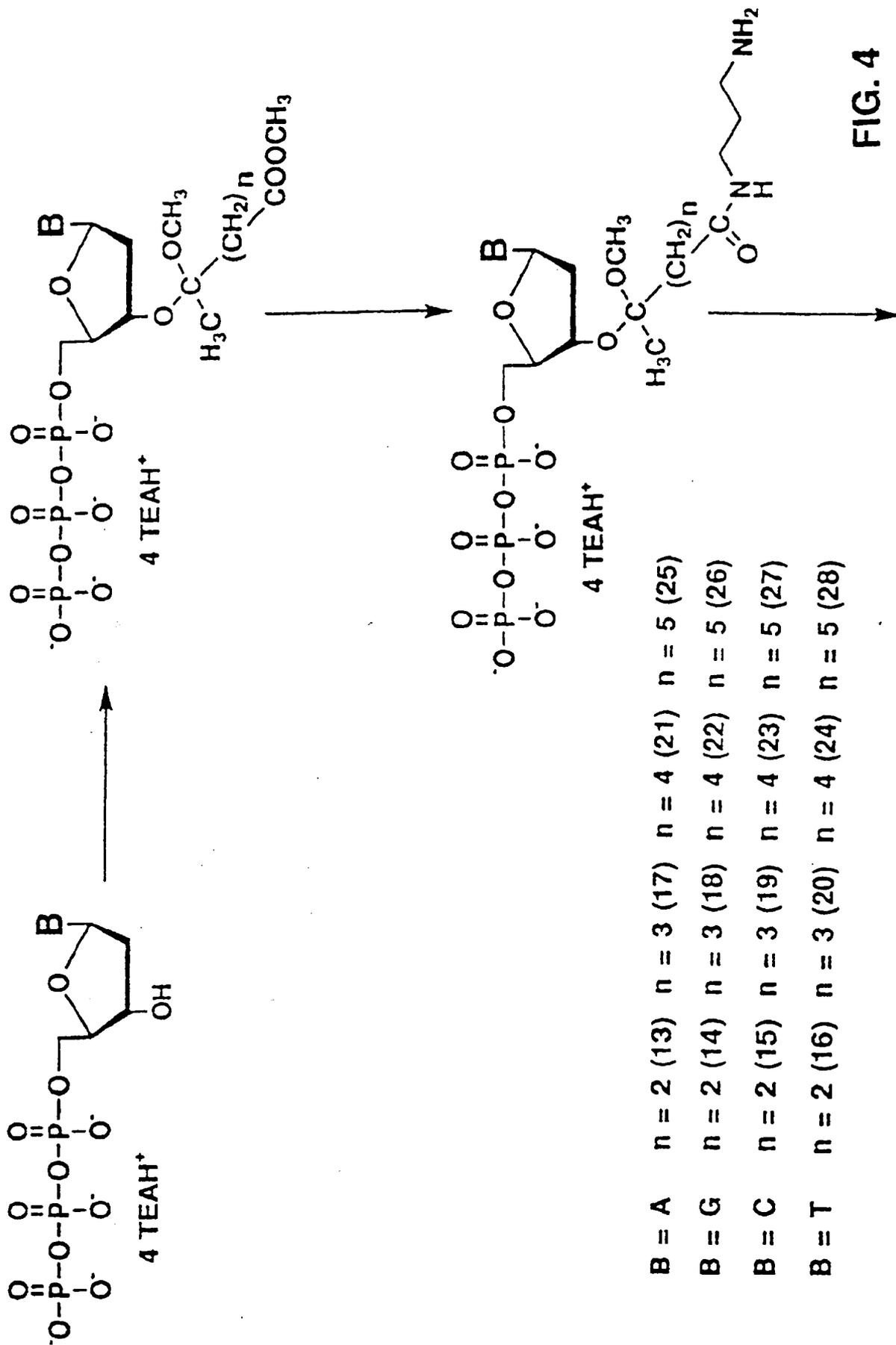
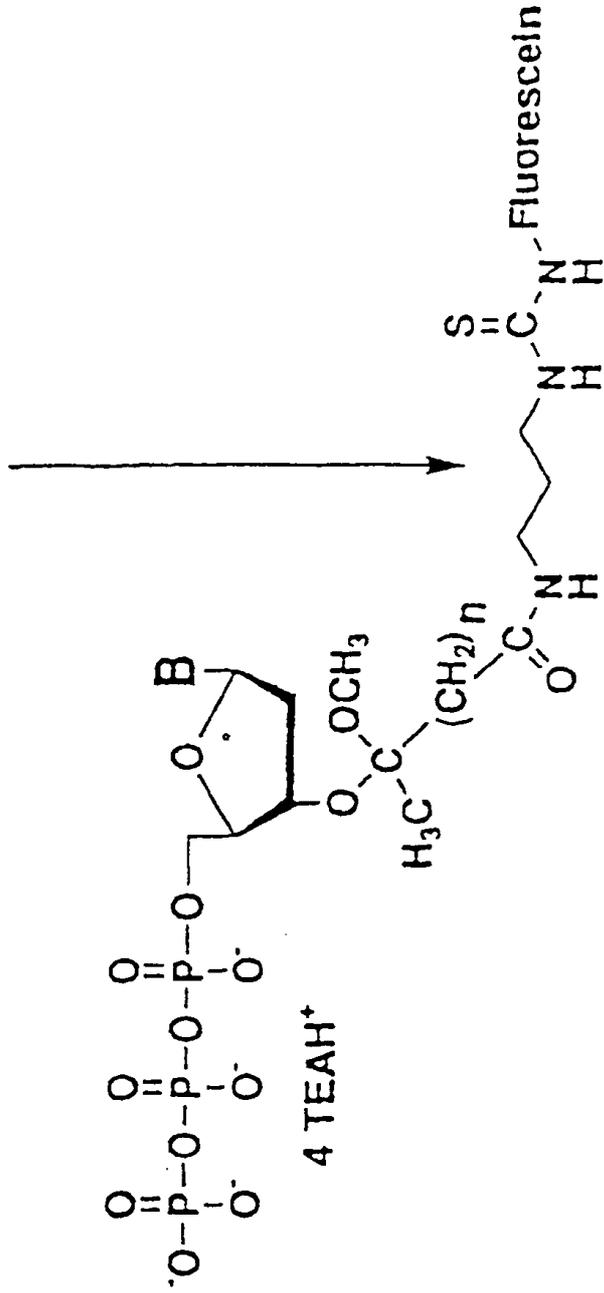


FIG. 4



- B = A n = 2 (29) n = 3 (33) n = 4 (37) n = 5 (41)
- B = G n = 2 (30) n = 3 (34) n = 4 (38) n = 5 (42)
- B = C n = 2 (31) n = 3 (35) n = 4 (39) n = 5 (43)
- B = T n = 2 (32) n = 3 (36) n = 4 (40) n = 5 (44)

FIG. 4 Forts.