



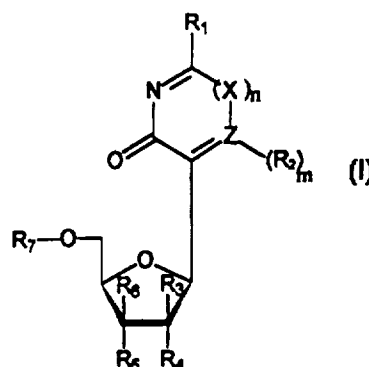
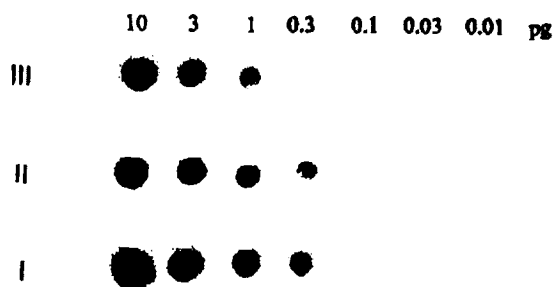
PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07D 405/04, 413/04, C07F 9/6558, C12Q 1/68, C07H 21/04	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/11104 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. März 1998 (19.03.98)
--	-----------	---

<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04972</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 11. September 1997 (11.09.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 37 042.6 12. September 1996 (12.09.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜHLEGGGER, Klaus [DE/DE]; Römerstrasse 7, D-82398 Polling (DE). VON DER ELTZ, Herbert [DE/DE]; In der Au 21, D-82362 Weilheim (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
---	---

(54) Title: HETEROCYCLIC COMPOUNDS AND THEIR USE FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: HETEROCYCLISCHE VERBINDUNGEN UND DEREN VERWENDUNG IN DER DETEKTION VON NUCLEINSÄUREN



(57) Abstract

The present invention pertains to compounds of general formula (I), where R₁ to R₇ have the notations given in the application, as well as preparation thereof. Compounds can be used as substrates for RNA and DNA polymerases and consequently incorporated to RNA our DNA oligonucleotides, including for the purpose of labelling and isolating nucleic acids and DNA sequencing.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wobei die Reste R₁ bis R₇ die in der Anmeldung angegebenen Bedeutungen haben sowie Verfahren zu deren Herstellung. Die Verbindungen sind insbesondere als Substrate für RNA- bzw. DNA-Polymerasen geeignet und somit in RNA-bzw. DNA-Oligonukleotide einbaubar und insbesondere zur Markierung und zum Nachweis von Nucleinsäuren bzw. zur DNA-Sequenzierung geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Heterocyclische Verbindungen und deren Verwendung in der Detektion von Nucleinsäuren

5

Die Erfindung betrifft heterocyclische Verbindungen, die zur Markierung, Detektion und Sequenzierung von Nucleinsäuren eingesetzt werden können.

10 Nucleinsäuren haben als Träger bzw. Überträger der genetischen Information eine zentrale Bedeutung in der belebten Natur. Sie haben deshalb seit ihrer Entdeckung durch F. Miescher das breite Interesse der Naturwissenschaften erregt und zur Aufklärung ihrer Funktion, Struktur und Wirkungsweise geführt.

Ein wesentliches Werkzeug zur Erklärung dieser Zusammenhänge und der Lösung der
15 Probleme war und ist der Nachweis der Nucleinsäuren und zwar sowohl was ihren spezifischen Nachweis betrifft, als auch was ihre Sequenz, also ihre Primärstruktur angeht.

Die spezifische Nachweisbarkeit von Nucleinsäuren beruht auf der Eigenschaft dieser
20 Moleküle, mit anderen Nucleinsäuren durch Ausbildung von Basenpaarungen über Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung zu treten, zu "hybridisieren". In geeigneter Weise markierte, d. h. mit Indikatorgruppen versehene Nucleinsäuren ("Sonden") können so zum Nachweis komplementärer Nucleinsäuren ("target") eingesetzt werden.

25 Die Ermittlung der Primärstruktur ("Sequenz"), also der Abfolge der heterocyclischen Basen einer Nucleinsäure geschieht mittels den Techniken der "Sequenzierung". Dieses Kenntnis der Sequenz ist wiederum die Grundvoraussetzung für einen gezielten und spezifischen Einsatz von Nucleinsäuren in molekularbiologischen Fragestellungen und Arbeitstechniken. Auch die Sequenzierung bedient sich letztlich des Prinzips der
30 spezifischen Hybridisierung von Nucleinsäuren untereinander. Dabei werden wie oben erwähnt ebenfalls markierte Nucleinsäure-Fragmente verwendet.

Die geeignete Markierung von Nucleinsäuren ist also eine unverzichtbare Voraussetzung jeglicher Nachweismethode.

Schon frühzeitig wurde dafür vor allem die radioaktive Markierung mit geeigneten Isotopen, wie ^{32}P oder ^{35}S eingesetzt. Die Nachteile der Verwendung radioaktiver Reagentien liegen jedoch klar auf der Hand: entsprechende Arbeiten bedürfen spezieller räumlicher Einrichtungen und Genehmigungen, sowie einer kontrollierten und aufwendigen Entsorgung des radioaktiven Abfalls. Die Reagentien zur radioaktiven Markierung sind teuer. Eine längere zeitliche Aufbewahrung derart markierter Proben ist wegen der kurzen Halbwertszeit obiger Nuklide nicht möglich.

Es hat daher in den letzten Jahren nicht an Versuchen gefehlt, diese gravierenden Nachteile zu umgehen, d. h. von einer radioaktiven Markierung wegzukommen. Dabei sollte die hohe Sensitivität dieser Markierungsart möglichst beibehalten werden.

Hier sind in der Tat bereits große Fortschritte erzielt worden [siehe z. B. "Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules" (Kessler, C., Hrsg.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1992].

Eine unabdingbare Voraussetzung jeglicher Detektion einer Nucleinsäure ist die vorherige Markierung derselben. Wie oben angedeutet, ist es wünschenswert, dies in einer nicht-radioaktiven Art und Weise zu erreichen. Während die radioaktive Markierung der Nucleinsäuren in der Regel durch enzymatisch katalysierten Einbau entsprechender radioaktiver Nucleosidtriphosphate erfolgt, muß eine nicht-radioaktive Markierung über den Einbau einer geeigneten Signal- oder Reportergruppe geschehen.

Als nicht-radioaktive Indikatormoleküle haben sich u. a. hauptsächlich Haptene (wie Biotin oder Digoxigenin), Enzyme (wie alkalische Phosphatase oder Peroxidase) oder Fluoreszenz-farbstoffe (wie Fluorescein oder Rhodamine) bewährt. Diese Signalgruppen können nach verschiedenen Methoden an oder in Nucleinsäuren gebracht werden.

Eine relativ einfache Verfahrensweise z. B. ist die Markierung am 5'-Ende eines mit einer endständigen Aminofunktion versehenen Oligonucleotides mittels aktivierter Indikatormoleküle der oben genannten Art. Sie erlaubt aber nur das Einführen eines oder weniger Indikatormoleküle in ein nur niedermolekulares Oligomer, während eine dichtere Markierung längerer, hochmolekularer Nucleinsäuren mit dem Ziel einer hohen

Sensitivität in der Regel über den Einbau von mit Reportergruppen versehenen Nucleosid-triphosphaten mittels Polymerasen im Sinne einer *de novo* -Synthese erfolgen muß.

- 5 Solche gängigen Verfahren sind dem Fachmann als "nick translation" [Rigby, P. W. et al. (1977) J. Mol. Biol. 113, 237] und "random primed labeling" [Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1984) Anal. Biochem. 137, 266] bekannt. Eine weitere Methode ist die sogenannte 3' -tailing - Reaktion mit Hilfe des Enzyms "Terminale Transferase"[z. B. Schmitz, G. et al. (1991) Anal. Biochem. 192, 222].

10

Die bislang in diesen Verfahren eingesetzten Nucleosid-triphosphate sind nahezu ausschließlich entsprechend modifizierte Derivate der heterocyclischen Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin in der Desoxyribonucleotid-, bzw. Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil in der Ribonucleotid-Reihe. Solche Derivate sind z. B. von Langer et al. in
15 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6635 (1981), Mühlegger et al. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371, 953 (1990) und in EP 0 063 879 beschrieben. Hier werden die natürlicherweise in DNA und RNA vorkommenden Bausteine in markierter, d. h. mit Signalgruppen versehener Form eingesetzt.

- 20 Die wesentlichsten Nachteile dieser N-Nucleoside liegen in der Empfindlichkeit der N-glykosidischen Bindung gegenüber sauren pH-Bedingungen und der Abbaubarkeit durch Nucleasen.

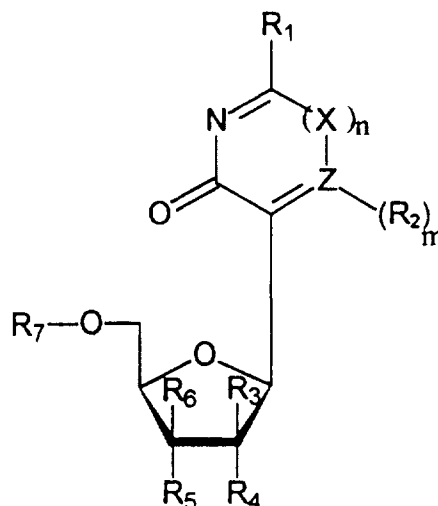
Ferner sind einzelne C-Nucleoside (siehe z. B. Suhadolnik, R.J. in "Nucleoside Antibiotics", Wiley-Interscience, New York 1970) und deren Verwendung im therapeutischen (antiviralen oder cancerostatischen) Bereich seit längerem bekannt.

Außerdem sind fluoreszierende C-Nucleosid-Derivate und deren Einbau in DNA- bzw. RNA-Oligonukleotide beschrieben (WO 93/16094). Die sogenannte Eigenfluoreszenz dieser C-Nucleoside ist jedoch bezüglich der Quantenausbeute um ein Vielfaches
30 geringer als die spezieller Fluorophore wie z. B. Fluorescein oder entsprechende Rhodaminderivate. Ein weiterer Nachteil der selbstfluoreszenten C-Nucleoside liegt in ihren vergleichsweise niedrigen Anregungs- und Emissionswellenlängen. Dies hat zur Folge, daß Detektionssysteme, welche auf solchen Derivaten beruhen, nur eine geringe Nach-

weisempfindlichkeit besitzen, zum anderen machen sich spektral störende Einflüsse der Meßumgebung (wie biologisches Material, Autofluoreszenz von Gelmatrices etc.) sehr stark bemerkbar.

Die bekannten Nukleoside bzw. Nukleosid-Derivate weisen somit eine Reihe von Nach-
 5 teilen auf, die sich insbesondere für den Nachweis von Nukleinsäuren negativ auswirken. Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde mit Signalgruppen modifizierte Nukleosid-Derivate für die Detektion von Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, die die genannten Nachteile nicht aufweisen, d. h. insbesondere stabiler sowie zugleich enzy-
 10 matisch prozessierbar und für den Nachweis von Nukleinsäuren bei einer praktikablen Wellenlänge geeignet sind.

Die Aufgabe wird durch heterocyclische Verbindungen der allgemeinen Formel I gelöst:



15

I

in der

R_1 und R_2 , die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, Sauerstoff, Halogen,
 20 Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, Carboxy-, Niederalkyl-, Niederalkenyl-, Niederalkinyl-, Aryl-, Niederalkyloxy-, Aryloxy-, Aralkyl-, Aralkyloxy-, oder eine Reportergruppe darstellen,

- R₃ und R₄ jeweils Wasserstoff, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, Niederalkyloxy-, Niederalkenoxy-, Niederalkinoxy-, eine Schutzgruppe oder eine Reportergruppe darstellen,
- R₅ Wasserstoff, Hydroxy, Thio- oder substituierte Thio-, Amino- oder substituierte Amino-Gruppe, reaktive 3- oder 5-bindige Phosphorgruppe wie z. B. eine Phosphoramidit- oder H-phosphonat-Funktion, einen in geeigneter Weise spaltbaren Ester- oder Amid-Rest oder eine Reportergruppe darstellt,
- R₄ und R₅ zusammen eine weitere Bindung zwischen C-2' und C-3' oder eine Acetal-funktion bilden,
- R₆ Wasserstoff oder eine Hydroxy-, Thio- oder substituierte Thio-, Amino- oder substituierte Amino-Gruppe darstellt,
- R₇ Wasserstoff, eine Mono-, Di- oder Triphosphatgruppe, oder die alpha-, beta- oder gamma- Thiophosphatanalogen dieser Phosphorsäureester oder eine Schutzgruppe darstellt,
- sowie mögliche Tautomere und Salze derselben.
- X mit Halogen, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, Carboxy-, Niederalkyl-, Niederalkenyl-, Niederalkinyl-, Aryl-, Niederalkyloxy-, Aryloxy-, Aralkyl-, Aralkyloxy- oder einer Reportergruppe substituiertes Methylen oder Methin oder Sauerstoff und n=0 oder 1 bedeuten,
- Z Stickstoff oder Kohlenstoff darstellen, mit der Maßgabe, daß wenn Z Stickstoff bedeutet, m null (0) ist, und wenn X Methylen, substituiertes Methylen oder substituiertes Methin darstellt, Z nicht Kohlenstoff sein kann, und wenn X Sauerstoff bedeutet, Z nicht Stickstoff sein kann.
- Als Reportergruppe kommen jegliche detektierbaren Gruppen, wie insbesondere Haptene, ein Fluorophor, eine Metall-chelatidierende Gruppe, ein Lumiphor, ein Protein- oder ein Interkalator in Frage.
- Bevorzugt sind solche Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen die Acetalfunktion der Reste R₄ und R₅ mit einer Reportergruppe substituiert ist. Die Reportergruppe kann direkt oder indirekt d.h. über Linkerfunktion gebunden sein.
- Des weiteren haben sich solche Verbindungen der allgemeinen Formel I als besonders geeignet erwiesen, in denen R₁ Sauerstoff, R₂ Wasserstoff oder eine Reportergruppe, R₃ und R₄ Wasserstoff, R₅ Hydroxy, Wasserstoff, eine reaktive 3- oder 5- bindige

Phosphorgruppe, R₆ Wasserstoff und R₇ Wasserstoff, Mono-, Di-, Triphosphat-Gruppen darstellen kann.

Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen die Reportergruppe über eine sogenannte Linkergruppe an den heterocyclischen- bzw. Tetrahydro-furan-Ring gebunden ist. Entsprechende Linkergruppen sind dem Fachmann
5 bekannt (siehe z. B. Mühlegger, K. et al. (1990) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371, 953-965 oder Livak, K. J. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20, 4831-4837).

Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen R₁ Wasserstoff, Hydroxy, eine Aminogruppe, eine gegebenenfalls substituierte
10 Aminogruppe oder eine Reportergruppe, R₂ eine gegebenenfalls substituierte Aminogruppe oder eine Reportergruppe, R₃ Wasserstoff, R₄ Wasserstoff, Hydroxy, Amino- oder substituiertes Amino-, Niederalkyloxy-, Niederalkenoxy-, Niederalkinoxy-, R₅ Wasserstoff, Hydroxy, Thio, eine gegebenenfalls substituierte Aminogruppe, ein Phosphoramidit oder eine Reportergruppe, R₄ und R₅ zusammen eine Acetalfunktion,
15 R₆ Wasserstoff und R₇ eine Triphosphat-Funktion darstellen.

Bevorzugt sind auch die Verbindungen nach Formel I, in denen X Sauerstoff bedeutet und gleichzeitig Z mit R₂ substituierten Kohlenstoff darstellt, oder Z Stickstoff bedeutet und gleichzeitig X mit Amino- oder substituiertem Amino-, Carboxy-, oder einer Reportergruppe substituiertes Methylen oder Methin darstellen.

20 Eine weiter bevorzugte Ausführungsform sind Verbindungen nach Formel I, in denen X = 0 ist und Z mit Amino- oder substituiertem Amino-, Carboxy-, oder einer Reportergruppe substituiertes Methin darstellen.

Die Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen kann auf verschiedene Weise erfolgen. Zum Teil kann von natürlich vorkommenden Vorstufen ausgegangen werden,
25 wie beispielsweise von 3-(3,4-Dihydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-pyrrol-2,5-dion oder 3-(3,4-Dihydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-oxazin-2,6-dion. Die Synthese der wichtigen 3-(3-Desoxy-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-Derivate erfolgt aus diesen Vorstufen durch Deoxigenierung, vorzugsweise nach Barton (Barton, D. H. R. & Motherwell, W. B. (1981) Pure Appl. Chem. 53, 15).

30 Des weiteren kann die chemische Synthese der neuen heterocyclischen Verbindungen wie beispielsweise von K. A. Watanabe in "Chemistry of Nucleosides and Nucleotides" 3, 421-535 (L. B. Townsend, Hrsg.), Plenum Press, New York and London, 1994 eingehend beschrieben, erfolgen.

Weitere Synthesen der genannten Ausgangsverbindungen wurden beispielsweise von Hosmane, R. S. et al. in *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 3, 2847 (1993) und von Townsend, L. B. et al. in *Tetrahedron Lett.* 36, 8363 (1995) beschrieben.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Markierung von Nukleinsäuren mit diversen, definierten Signalgruppen und damit die Detektion und Sequenzierung von Nukleinsäuren hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen.

Die erfindungsgemäßen Substanzen der allgemeinen Formeln I besitzen insbesondere gegenüber den klassischen Nucleosiden und Nucleotiden wie Adenosin, Guanosin, Cytidin, Thymidin, Uridin bzw. deren entsprechenden Phosphorsäureestern eine Reihe von Vorteilen.

Ein Vorteil ist die chemische Stabilität z. B. gegenüber sauren pH-Bedingungen. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist die Stabilität dieser Verbindungen gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Endo- und Exonucleasen. Diese Enzyme sind in biologischem Material enthalten und können den Nucleinsäure-Nachweis empfindlich stören. Andererseits ist es bekannt, daß DNA- und RNA-Polymerasen kritisch bezüglich der Akzeptanz mehr oder weniger modifizierter Nucleosid-5'-triphosphate sind, d. h. in der *de novo* Synthese solche Nucleotide als Substrate zu erkennen und einzubauen. Insbesondere das Anknüpfen von Signalgruppen an die Nucleotide beeinflusst erfahrungsgemäß Einbau und Einbaurrate.

Daß die erfindungsgemäßen Derivate in sehr effizienter Weise durch geeignete Polymerasen in Nucleinsäuren eingebaut werden, wie z. B. nach den oben geschilderten Methoden der "nick translation" oder des "random primed labelling", ist nicht aus dem Stand der Technik zu entnehmen und somit für den Fachmann als überraschend anzusehen.

Der genannten Verfahren bedient man sich ganz allgemein in der Nucleinsäure-Detektion, z. B. beim quantitativen Nachweis nach Blotting-Techniken auf Membranen oder auch in Mikrotiterplatten.

Bei der Sequenzierung, d. h. dem Nachweis der Sequenz einer Nucleinsäure, wird an der zu sequenzierenden Nucleinsäure unter Zuhilfenahme eines kurzen (Start)Oligonucleotides ("primer"), sowie der Zugabe markierter Nucleosid-triphosphate und einer Polymerase ein komplementärer Gegenstrang neusynthetisiert, anschließend sogenannte Terminationsreaktionen ausgeführt und die dabei erzeugten Nucleinsäurefragmente gelchromatographisch aufgetrennt.

In der *in situ* -Hybridisierung zur Detektion bestimmter Gene oder Genomabschnitte läuft in der Zelle im Prinzip das gleiche ab, nämlich der spezifische Einbau von markierten Nukleotiden.

Die oben erwähnten Primer, d. h. kurzkettige Oligonukleotide, sollen, um eine optimale
5 Funktion zu gewährleisten, sowohl stabile Basenpaarungen mit dem Matrizenstrang eingehen, als auch durch endogene Nukleasen nicht angegriffen werden.

Dies wird von Oligonukleotiden, welche anstatt der klassischen Nukleoside die erfindungsgemäßen Verbindungen als Bausteine enthalten, erfüllt.

Gleiches gilt für länger-kettige Polynukleotide und Nukleinsäuren, die solche Bausteine
10 beeinhalteten. Auch diese sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Entsprechende Oligonukleotide, sowie ihre präparativen Vorstufen in Form sogenannter Phosphoramidite und H-phosphonate sind daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Oligonukleotide werden heute in der Regel nach bekannten Methoden in automatisch arbeitenden DNA/RNA-Synthesegeräten im Sinne einer Festphasensynthese hergestellt.

15 Solche Syntheseverfahren basieren im wesentlichen auf der schrittweisen Umsetzung der o. a. Phosphoramidite oder H-Phosphonate und damit der fortlaufenden Verknüpfung dieser monomeren Bausteine zu Oligomeren (siehe z.B. T. Brown & D. J. S. Brown in "Oligonukleotides and Analogues-A Practical Approach" (1991) (Eckstein, F., Hrsg.), IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo).

20

Legende

Abbildung 1:

I und II bedeuten pBR 328-DNA, markiert durch DIG-dUTP-Einbau (Standard), und III
25 pBR 328-DNA, markiert durch die nach Beispiel 6 hergestellte Verbindung 3-(4-Hydroxy-5-triphosphoryl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-(digoxigeninyl-3-O-succinyl-aminocaproylamino-pentyl)-amino-pyrrol-2,5-dion. Die Auftragung auf das Gel erfolgte in Konzentrationen von 10 bis 0.01 pg.

30

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher:

Beispiel 1:

5 3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-pyrrol-2,5-dion

Die Verbindung wurde in einer *de novo* Synthese nach Hosmane, R. S. et al. Bioorg. & Med. Chem. Lett. 3, 2847 (1993) hergestellt.

Sie kann alternativ durch Barton-Deoxigenierung [Barton, D. H. R. & Motherwell, 10 W. B. (1981) Pure Appl. Chem. 53, 15] aus dem durch Fermentation gewonnenen 3,4-Dihydroxy-Derivat (Showdomycin) erhalten werden.

Beispiel 2:

15 3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-brom-pyrrol-2,5-dion

213 mg (1 mMol) 3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-pyrrol-2,5-dion nach Beispiel 1 gewonnen, werden in 25 ml mit Brom bei RT gesättigtem Wasser gelöst und 3 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Im DC beobachtet man danach nur noch 20 wenig Ausgangsmaterial. Die Lösung wird im Vakuum vom überschüssigen Brom befreit, auf pH 7 eingestellt und zum Öl eingedampft. Man nimmt in wenig Methanol auf und trennt an einer Kieselgel-Säule mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol 8:2. Nach Eindampfen der Fraktionen werden 140 mg (48 %) eines schwach gelben Öls erhalten.

25

Elementaranalyse f. $C_9H_{10}NO_5Br$ (MW 292,2): C_{ber} 36,9; H_{ber} 3,4; N_{ber} 4,8; Br_{ber} 27,4; C_{gef} 37,35; H_{gef} 3,6; N_{gef} 4,5; Br_{gef} 27,8.

Beispiel 3:

3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-(1,5-diaminopentyl)-pyrrol-2,5-dion

5

140 mg (ca. 0,5 mMol) der Bromverbindung aus Bsp. 2 werden in 50 ml Ethanol gelöst, mit 1,75 g (ca 10 mMol) Diaminopentan-dihydrochlorid versetzt und während 5 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Danach ist die Umsetzung laut DC (Kieselgel, Chloroform/Methanol 8:2) nahezu quantitativ (im Vergleich zur Bromverbindung tieferlaufender Fleck, mit Ninhydrin positiv). Die Reaktionsmischung wird im Vakuum eingedampft und ohne weitere Reinigung in Beispiel 4 eingesetzt.

Beispiel 4:

15 3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-(N-trifluoracetamidopentyl)-amino-pyrrol-2,5-dion

Der ölige Rückstand aus Beispiel 3 (ca. 2 g) wird in 50 ml wasserfreiem Pyridin gelöst, von Ungelöstem abgesaugt und das Filtrat i. V. zur Trockene eingeeengt. Man nimmt in 50 ml absolutem Pyridin auf und versetzt mit 0,75 ml (ca. 5 mMol) Trifluoressigsäureanhydrid. Nach 5-stündigem Stehen bei RT ist die Acylierung lt. DC vollständig. Die Reaktionslösung wird danach im Vakuum eingedampft und dreimal mit Methanol coevaporiert. Man nimmt in ca. 20 ml Ethanol auf, filtriert und chromatographiert an Kieselgel mit einem Gemisch Chloroform/ Methanol (9:1). Die vereinigten Fraktionen werden eingedampft, der Rückstand in Dioxan aufgenommen und lyophilisiert. Man erhält 110 mg (53 % d. Th.) der gewünschten Verbindung.

25

Elementaranalyse f. $C_{16}H_{23}N_3O_6F_3$ (MW 410,4): C_{ber} 46,8; H_{ber} 5,6; N_{ber} 10,2; F_{ber} 13,9; C_{gef} 47,35; H_{gef} 5,9; N_{gef} 10,5; F_{gef} 13,8.

Beispiel 5:

3-(4-Hydroxy-5-triphosphoryl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-(N-trifluoracetamidopentyl)-amino-pyrrol-2,5-dion

5

40 mg (0,1 mMol) des geschützten Nucleosides aus Beispiel 4 werden nach der Methode von Yoshikawa et al. [Tetrahedron Lett. 50, 5065 (1967)] durch Phosphorylierung mit POCl_3 in das 5'-Monophosphat überführt; daraus wird entsprechend dem Verfahren von Hoard & Ott [J. Am. Chem. Soc. 87, (1965)] nach Aktivierung mit Carbonyldiimidazol und Umsetzung mit Pyrophosphorsäure und anschließender Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephadex das gewünschte Triphosphat in einer Ausbeute von 30 mg (46 %) erhalten.

10

15

^{31}P -NMR (0,1 M EDTA/ D_2O /Eth₃N): -5,2 (d, P- γ); -10,3 (d, P- α); -21,0 (t, P- β).

Beispiel 6:

3-(4-Hydroxy-5-triphosphoryl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-(N-fluoresceinyl-carboxamidopentyl)-amino-pyrrol-2,5-dion

20

25 mg (0,038 mMol) der trifluoracetyl-geschützten Verbindung aus Beispiel 5 werden in 5 ml konz. Ammoniaklösung 1 h bei RT stehen gelassen und anschließend i. V. eingedampft. Der Rückstand wird in 5 ml 0,1 M Boratpuffer, pH 8,5 aufgenommen und mit einer Lösung von 25 mg (0,05 mmol) 5(6)-Carboxy-fluorescein-N-hydroxy-succinimidester in 5 ml aminfreiem Dimethylformamid versetzt. Man lässt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Das Reaktionsgemisch wird auf eine DEAE-Sephadex-Säule (30 x 1 cm) gegeben und mit einem linearen LiCl-Gradient (je 200 ml H_2O auf 0,4 M LiCl) eluiert. Man erhält nach Vereinigen der entsprechenden Fraktionen, Eindampfen, Fällung des Konzentrates in Aceton/Ethanol (2:1) und Trocknung 25 mg (ca 50 %) der Titelsubstanz.

25

30

Spektrale Daten (0,1 M Phosphatpuffer, pH 9,0): Excitation_{max} [nm]: 495;

Emission_{max}: [nm]: 521

Entsprechend wurde durch Umsetzung der Verbindung aus Beispiel 5 mit Digoxigenin-3-O-succinyl-aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidester das 3-(4-Hydroxy-5-triphosphoryl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-(digoxigeninyl-3-O-succinyl-aminocaproylamino-pentyl)-amino-pyrrol-2,5-dion hergestellt.

5

Beispiel 7:

3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-1,3-oxazin-2,6-dion

- 10 Die Verbindung wurde durch Barton-Deoxigenierung [Barton, D. H. R. & Motherwell, W. B. (1981) Pure Appl. Chem. 53, 15] aus dem durch Fermentation gewonnenen 3,4-Dihydroxy-Derivat (Oxazinomycin) erhalten.

Beispiel 8:

15

3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-brom-1,3-oxazin-2,6-dion

Das Derivat wurde durch Bromierung der Ausgangsverbindung aus Beispiel 7 wie in Beispiel 2 beschrieben, gewonnen.

- 20 Beispiel 9:

3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-(1,5-diaminopentyl)-1,3-oxazin-2,6-dion

- 25 150 mg (0,5 mMol) der Bromverbindung aus Beispiel 8 wurden analog dem Verfahren aus Beispiel 3 in die Titelverbindung überführt. Diese wurde ohne weitere Reinigung entsprechend den Verfahren der Beispiele 4, 5 und 6 letztlich zum mit Fluorescein markierten Triphosphat umgesetzt.

Beispiel 10:

3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-2,6-diamino-5-chlor-pyrazin

Das Derivat wurde nach Townsend, L. B. et al. Tetrahedron Lett. 36, 8363 (1995)
5 synthetisiert.

Beispiel 11:

3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-2,6-dihydroxy-5-chlor-pyrazin 264
10 mg (1 mMol) 3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-2,6-diamino-5-
chlor-pyrazin aus Beispiel 10 wurden einer Desaminierungsreaktion in einem Gemisch
aus 50 ml 80 %iger Essigsäure und 700 mg (10 mMol) NaNO₂ unterzogen. Nach 5-
stündigem Stehen bei RT war die Umsetzung laut DC nahezu vollständig. Dem
Reaktionsansatz wurden zur Zerstörung überschüssigen Nitrits 2 g Harnstoff zugefügt
15 und weitere 3 Stunden bei RT gerührt. Danach wurde die Lösung auf eine Aktivkohle-
Säule gegeben (Carboraffin C, ca. 50 ml Volumen), ausreichend gewaschen und das
gewünschte Produkt mit Ethanol/Wasser/ Ammoniak eluiert. Nach Eindampfen
resultierten 230 mg (ca. 87 %) eines viskosen Öls, das ohne weitere Reinigung in die
nächste Stufe eingesetzt wurde.

20

Beispiel 12:

3-(4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-2-yl)-2,6-dihydroxy-5-(1,8-diamino-
3,6-dioxa-octyl)-pyrazin

25

200 mg (0,75 mMol) des Öls aus Beispiel 11 wurden in 30 ml Ethanol gelöst, mit 555
mg (3,75 mMol) 1,8-Diamino-3,6-dioxa-octan versetzt und 3 Stunden auf ca. 60 °C
erwärmt.

Danach wurden Lösungsmittel und Amin im Ölpumpenvakuum entfernt und der
30 Rückstand ohne weitere Reinigung durch Umsetzung mit Trifluoressigsäureanhydrid in
Pyridin wie unter Beispiel 4 beschrieben weiter umgesetzt.

Beispiel 13:

3-(4-Hydroxy-5-triphosphoryl-tetrahydrofuran-2-yl)-2,6-dihydroxy-5-[N-trifluoracetamido-(3,6-dioxa)-octyl]-amino-pyrazin

5

150 mg des trifluoracetylierten Derivates aus Beispiel 12 wurden nach Yohikawa und Hoard & Ott wie unter Beispiel 5 beschrieben in die Titelverbindung überführt. Nach Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephadex resultierte das gewünschte Triphosphat in einer Ausbeute von 120 mg (40 %).

10

^{31}P -NMR (0,1 M EDTA/D₂O/Eth₃N): -5,1 (d, P- γ); -10,6 (d, P- α); -20,8 (t, P- β).

Beispiel 14:

15 3-(4-Hydroxy-5-triphosphoryl-tetrahydrofuran-2-yl)-2,6-dihydroxy-5-[N-tetramethylrhodaminyl-5,6-carboxamido-(3,6-dioxa)-octyl]-amino-pyrazin

20 mg des Triphosphates aus Beispiel 13 wurden - nach Abspalten der Trifluoracetyl-Schutzgruppe mit Ammoniaklösung (wie in Beispiel 6 beschrieben) - mit 20 mg Tetramethylrhodamin-5(6)-carbonsäure-N-hydroxy-succinimidester in 0,1 M Naboratpuffer, pH 8,5/DMF wie unter Beispiel 6 beschrieben umgesetzt und aufgereinigt. Es wurden 12 mg des TMR-markierten Produktes erhalten.

Spektrale Daten (0,1 M Na-boratpuffer, pH 8,5): Excitation_{max} [nm]: 551;

Emission_{max}: [nm]: 575

25 Beispiel 15:

Nichtradioaktive DNA-Markierung und -Nachweis durch Einbau von

3-(4-Hydroxy-5-triphosphoryl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-(digoxigeninyl-3-O-succinylaminocaproylamino-pentyl)-amino-pyrrol-2,5-dion

30 Die DNA-Markierung und der DNA-Nachweis wurden mit dem kommerziell erhältlichen Kit der Firma Boehringer Mannheim (Best. Nr. 1093 657) durchgeführt. Die Arbeitsvorschrift gibt alle wesentlichen Arbeitsschritte wieder.

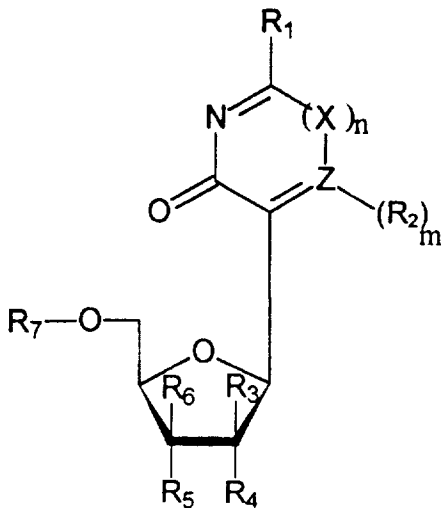
Zur Markierungsreaktion wurde in dem dNTP-Gemisch des Kits das DIG-dUTP gegen ein 3-(4-Hydroxy-5-triphosphoryl-tetrahydrofuran-2-yl)-4-(digoxigeninyl-3-O-succinyl-aminocaproylamino-pentyl)-amino-pyrrol-2,5-dion (wie unter Beispiel 6 beschrieben hergestellt) ausgetauscht.

- 5 Die immunologische Nachweisreaktion ergab, daß der Einbau der erfindungsgemäßen Verbindung nach Beispiel 6 eine Nachweissensitivität der markierten DNA analog der Verwendung von DIG-dUTP zeigt.

Das Ergebnis, den Nachweis und die erreichte Sensitivität des Systems demonstrierend, ist Abbildung 1 zu entnehmen.

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel



in der

10 R_1 und R_2 , die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, Sauerstoff, Halogen, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, Carboxy-, Niederalkyl-, Niederalkenyl-, Niederalkinyl-, Aryl-, Niederalkyloxy-, Aryloxy-, Aralkyl-, Aralkyloxy-, oder eine Reportergruppe darstellen,

15 R_3 und R_4 jeweils Wasserstoff, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, Niederalkyloxy-, Niederalkenoxy-, Niederalkinoxy-, eine Schutzgruppe oder eine Reportergruppe darstellen,

R_5 Wasserstoff, Hydroxy, Thio- oder substituierte Thio-, Amino- oder substituierte Amino-Gruppe, eine reaktive 3- oder 5- bindige Phosphorgruppe wie z.B. eine
20 Phosphoramidit- oder H-phosphonat-Funktion, einen in geeigneter Weise spaltbaren Ester- oder Amid-Rest oder eine Reportergruppe darstellt,

R_4 und R_5 zusammen eine weitere Bindung zwischen C-2' und C-3' oder eine Acetalfunktion bilden,

R₆ Wasserstoff oder eine Hydroxy-, Thio- oder substituierte Thio-, Amino- oder substituierte Amino-Gruppe darstellt,

R₇ Wasserstoff, eine Mono-, Di- oder Triphosphatgruppe, oder die alpha-, beta- oder gamma- Thiophosphatanalogen dieser Phosphorsäureester oder eine
5 Schutzgruppe darstellt,
sowie mögliche Tautomere und Salze derselben.

X mit Halogen, Hydroxy, Thio- oder substituiertes Thio-, Amino- oder substituiertes Amino-, Carboxy-, Niederalkyl-, Niederalkenyl-, Niederalkinyl-, Aryl-,
10 Niederalkyloxy-, Aryloxy-, Aralkyl-, Aralkyloxy- oder einer Reportergruppe
substituiertes Methylen oder Methin oder Sauerstoff und n=0 oder 1 bedeuten,

Z Stickstoff oder Kohlenstoff darstellen, mit der Maßgabe, daß wenn Z Stickstoff bedeutet, m null (0) ist, und wenn X Methylen, substituiertes Methylen oder substituiertes Methin darstellt, Z nicht Kohlenstoff sein kann, und wenn X Sauerstoff bedeutet, Z nicht Stickstoff sein kann.

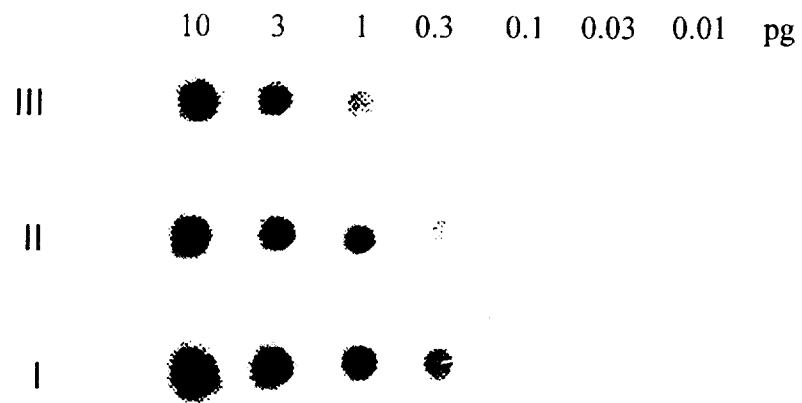
15 2. Verbindungen nach Anspruch 1, in denen R₁ Sauerstoff, R₂ Wasserstoff oder eine Reportergruppe, R₃ und R₄ Wasserstoff, R₅ Hydroxy, Wasserstoff, eine reaktive 3- oder 5- bindige Phosphorgruppe, R₆ Wasserstoff und R₇ Wasserstoff, Mono-, Di-, Triphosphat-Gruppen darstellen kann.

3. Verbindungen nach Anspruch 1, in denen R₁ Wasserstoff, Hydroxy, eine
20 Aminogruppe, eine gegebenenfalls substituierte Aminogruppe oder eine Reportergruppe, R₂ eine gegebenenfalls substituierte Aminogruppe oder eine Reportergruppe, R₃ Wasserstoff, R₄ Wasserstoff, Hydroxy, Amino- oder substituiertes Amino-, Niederalkyloxy-, Niederalkenoxy-, Niederalkinoxy-, R₅ Wasserstoff, Hydroxy, Thio, eine gegebenenfalls substituierte Aminogruppe, ein
25 Phosphoramidit oder eine Reportergruppe, R₄ und R₅ zusammen eine Acetalfunktion, R₆ Wasserstoff und R₇ eine Triphosphat-Funktion darstellen.

4. Bevorzugt sind auch die Verbindungen nach Formel I, in denen X Sauerstoff bedeutet und gleichzeitig Z mit R₂ substituierten Kohlenstoff darstellt, oder Z Stickstoff bedeutet und gleichzeitig X mit Amino- oder substituiertem Amino-,
30 Carboxy-, oder einer Reportergruppe substituiertes Methylen oder Methin darstellen.

5. Eine weiter bevorzugte Ausführungsform sind Verbindungen nach Formel I, in denen $X = 0$ ist und Z mit Amino- oder substituiertem Amino-, Carboxy-, oder einer Reportergruppe substituiertes Methin darstellen.
6. Verbindungen nach Anspruch 1, in denen die Acetalfunktion der Reste R_4 und R_5 mit einer Reportergruppe substituiert ist.
7. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, in denen die Reportergruppe ein Hapten, ein Fluorophor, eine Metall-chelatbildende Gruppe, ein Luminophor, ein Protein oder ein Interkalator bedeuten.
8. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, in denen die Reportergruppe über eine Linkergruppe verknüpft ist.
9. Verwendung der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 8 als Substrate für DNA- und RNA-Polymerasen.
10. Verwendung der Verbindungen nach den Ansprüchen 1 bis 8 zur Markierung von Nucleinsäuren.
11. Verwendung der Verbindungen nach den Ansprüchen 1 bis 8 zum Nachweis von Nucleinsäuren.
12. Verwendung der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in der DNA-Sequenzierung.
13. Verwendung der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in der *in situ* Hybridisierung.
14. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 1 - 8, in denen R_7 ein Phosphoramidit oder ein H-Phosphonat darstellt, zur chemischen Synthese von Oligonucleotiden.
15. Oligonucleotide, die eine oder mehrere der in den Ansprüchen 1 bis 8 genannten Verbindungen enthalten.
16. Nucleinsäuren, die eine oder mehrere der in den Ansprüchen 1 bis 8 genannten Verbindungen enthalten.

Abbildung 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/04972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D405/04 C07D413/04 C07F9/6558 C12Q1/68 C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	WO 93 16094 A (CHROMAGEN INC) 19 August 1993 cited in the application see abstract; claim 1 ---	1-3,9-16
A	EP 0 063 879 A (UNIV YALE) 3 November 1982 cited in the application see abstract; claims ---	1-16
A	GRIERSON J R ET AL: "RADIOSYNTHESSES OF LABELED 2PSEUDOTHYIMIDINE* (C-11- AND H-3METHYL) AND ITS BIODISTRIBUTION AND METABOLISM IN NORMAL AND TUMORED MICE" NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY, vol. 22, no. 5, 1 July 1995, pages 671-678, XP000512448 see page 671 - page 627, column 1; figure 1 ---	1-16
-/--		

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 January 1998	30/01/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Paisdor, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 97/04972

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 359 225 A (DU PONT) 21 March 1990 see page 4, line 30 - page 5, line 28; claims -----	1-16
A	EP 0 399 330 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 28 November 1990 see abstract; claims -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/04972

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9316094 A	19-08-93	CA 2129105 A	19-08-93
		EP 0628051 A	14-12-94
		JP 7504087 T	11-05-95
		US 5652099 A	29-07-97
EP 0063879 A	03-11-82	AU 560651 B	16-04-87
		AU 8257382 A	21-10-82
		CA 1219824 A	31-03-87
		DK 46797 A	28-04-97
		DK 160591 A	16-09-91
		DK 171382 A, B	18-10-82
		EP 0329198 A	23-08-89
		JP 3261798 A	21-11-91
		JP 1720891 C	24-12-92
		JP 3075559 B	02-12-91
		JP 57209297 A	22-12-82
		JP 1972288 C	27-09-95
		JP 6094474 B	24-11-94
		JP 63099093 A	30-04-88
		JP 7107998 A	25-04-95
		JP 8000080 B	10-01-96
		US 5328824 A	12-07-94
		US 4711955 A	08-12-87
		US 5476928 A	19-12-95
		US 5449767 A	12-09-95
EP 0359225 A	21-03-90	US 4997928 A	05-03-91
		CA 1338597 A	17-09-96
		DE 68925446 D	29-02-96
		DE 68925446 T	04-07-96
		DK 453689 A	16-03-90
		JP 2174792 A	06-07-90
US 5262536 A	16-11-93		
EP 0399330 A	28-11-90	DE 3916871 A	29-11-90
		AT 116327 T	15-01-95
		CA 2017369 A	24-11-90
		DE 59008105 D	09-02-95
		ES 2068279 T	16-04-95
		JP 2000676 C	20-12-95

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/04972

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0399330 A		JP 3005495 A	11-01-91
		JP 7030108 B	05-04-95
		JP 7233188 A	05-09-95
		US 5700919 A	23-12-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04972

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07D405/04 C07D413/04 C07F9/6558 C12Q1/68 C07H21/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07D C07F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 16094 A (CHROMAGEN INC) 19. August 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung; Anspruch 1 ---	1-3,9-16
A	EP 0 063 879 A (UNIV YALE) 3. November 1982 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-16
A	GRIERSON J R ET AL: "RADIOSYNTHESES OF LABELED 2PSEUDOTHYMININE* (C-11- AND H-3METHYL) AND ITS BIODISTRIBUTION AND METABOLISM IN NORMAL AND TUMORED MICE" NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY, Bd. 22, Nr. 5, 1. Juli 1995, Seiten 671-678, XP000512448 siehe Seite 671 - Seite 627, Spalte 1; Abbildung 1 ---	1-16
-/--		

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Januar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/01/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Paisdor, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/04972

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 359 225 A (DU PONT) 21.März 1990 siehe Seite 4, Zeile 30 - Seite 5, Zeile 28; Ansprüche ---	1-16
A	EP 0 399 330 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 28.November 1990 siehe Zusammenfassung; Ansprüche -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04972

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9316094 A	19-08-93	CA 2129105 A	19-08-93
		EP 0628051 A	14-12-94
		JP 7504087 T	11-05-95
		US 5652099 A	29-07-97
EP 0063879 A	03-11-82	AU 560651 B	16-04-87
		AU 8257382 A	21-10-82
		CA 1219824 A	31-03-87
		DK 46797 A	28-04-97
		DK 160591 A	16-09-91
		DK 171382 A, B	18-10-82
		EP 0329198 A	23-08-89
		JP 3261798 A	21-11-91
		JP 1720891 C	24-12-92
		JP 3075559 B	02-12-91
		JP 57209297 A	22-12-82
		JP 1972288 C	27-09-95
		JP 6094474 B	24-11-94
		JP 63099093 A	30-04-88
		JP 7107998 A	25-04-95
		JP 8000080 B	10-01-96
		US 5328824 A	12-07-94
US 4711955 A	08-12-87		
US 5476928 A	19-12-95		
US 5449767 A	12-09-95		
EP 0359225 A	21-03-90	US 4997928 A	05-03-91
		CA 1338597 A	17-09-96
		DE 68925446 D	29-02-96
		DE 68925446 T	04-07-96
		DK 453689 A	16-03-90
		JP 2174792 A	06-07-90
		US 5262536 A	16-11-93
EP 0399330 A	28-11-90	DE 3916871 A	29-11-90
		AT 116327 T	15-01-95
		CA 2017369 A	24-11-90
		DE 59008105 D	09-02-95
		ES 2068279 T	16-04-95
		JP 2000676 C	20-12-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04972

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0399330 A		JP 3005495 A	11-01-91
		JP 7030108 B	05-04-95
		JP 7233188 A	05-09-95
		US 5700919 A	23-12-97
