



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 32 596 T2** 2009.02.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 307 469 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 32 596.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP01/08850**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 956 576.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/012263**

(86) PCT-Anmeldetag: **31.07.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **14.02.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.05.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **23.01.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.02.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C07H 19/16** (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

00116816	03.08.2000	EP
01109438	24.04.2001	EP

(73) Patentinhaber:

**Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE;
F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH**

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**SEELA, Frank, 49076 Osnabrueck, DE;
BERGMANN, Frank, 82393 Iffeldorf, DE; VON DER
ELTZ, Herbert, 82362 Weilheim, DE; HEINDL,
Dieter, 82327 Tutzing, DE; SEIDEL, Christoph,
82362 Weilheim, DE; BECHER, Georg,
Greensboro, NC 27409, US**

(54) Bezeichnung: **NUKLEINSÄUREBINDENDE VERBINDUNGEN MIT PYRAZOLO[3,4-D]PYRIMIDINANALOGEN
VON PURIN-2,6-DIAMIN UND IHRE VERWENDUNG**

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 das Gebiet der nukleinsäurebindenden Verbindungen, umfassend 7-substituierte 7-Desaza-8-aza-2,6-diamino-purin-Basen, Verbindungen, die sich zur Herstellung dieser Verbindungen eignen, verschiedene Verwendungen davon und Verfahren zur Bestimmung von Nukleinsäuren mit den Verbindungen in dem Gebiet der Diagnostik.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Nukleinsäuren haben sich als nützliche Analyten bei der Bestimmung des Vorhandenseins oder der Abwesenheit von Genen oder Mikroorganismen in menschlichen Körperflüssigkeiten, Nahrungsmitteln oder in der Umgebung auf dem Gebiet des Gesundheitswesens. Die Nukleinsäureanalyse wird seit der Einführung der Nukleinsäureamplifikation, wie der Polymerasekettenreaktion (PCR, siehe US-A-4 683 202) weithin verwendet. Somit werden hinreichende Mengen Nukleinsäuren von jeder Matrice verfügbar. Die Nukleinsäuren können aus dieser vorbehandelten Probe bestimmt werden, wobei je nach dem entsprechenden Zweck eine Reihe verschiedener Techniken verwendet wird. Bei den meisten Tests muss eine Sonde verwendet werden, die entweder immobilisiert oder immobilisierbar ist oder durch Bindung von einer oder mehreren Reportergruppen markiert wird.

[0003] Eine Reportergruppe hat die Eigenschaften, dass sie selbst bestimmt werden kann oder sie mit Reagenzien umgesetzt werden kann, die die Sonde über die Reportergruppe bestimmbar machen. Somit lassen sich beispielsweise Sonden bestimmen, die durch Reportergruppen markiert sind, da sie Hybride sein können, die die Sonde und eine zu bestimmende Nukleinsäure enthalten. Bei immobilisierten Sonden wird das Hybrid zwischen der Sonde und der zu bestimmenden Nukleinsäure an der Festphase bestimmt, an die die Sonde gebunden ist. Bei einer bestimmten Form von Tests wird nicht nur eine Nukleinsäure mit einer spezifischen Sequenz, sondern eine große Anzahl von Nukleinsäuren unterschiedlicher Sequenz bestimmt. Für diesen Zweck werden die Sonden in kleinen Punkten in einem Array auf einer flachen Oberfläche, wie einem Glas-Chip immobilisiert (EP-A-0 476 014) und TIBTECH (1997), Bd. 15, 465–469, WO 89/10977, WO 89/11548, US 5 202 231, US 5 002 867, WO 93/17126). Eine weitere Entwicklung ergab Verfahren zur Herstellung sehr großer Arrays von Oligonukleotid-Sonden in sehr kleinen Bereichen (US 5 143 854, WO 90/15070, WO 92/10092). Mikrogefertigte Arrays großer Mengen von Oligonukleotid-Sonden, die als "DNA-Chips" bezeichnet werden, sind für eine große Reihe von Anwendungen viel versprechend (siehe zum Beispiel US 6 156 501 und US 6 022 963).

[0004] Nukleinsäure-Bestimmungen leiden jedoch oft an dem Problem, dass die Basenpaarungsmöglichkeiten zwischen den natürlichen Basen A und T und C und G unterschiedlich stabil sind. Dies beruht unter anderem auf der unterschiedlichen Fähigkeit dieser Basen zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Demnach hat das dA-dT-Basenpaar zwei Wasserstoffbrückenbindungen, wohingegen das dG-dC-Basenpaar drei Wasserstoffbrückenbindungen aufweist. Dadurch ergeben sich je nach dem GC-Gehalt verschiedene Schmelztemperaturen (T_m) der Hybride [1–3]. Je höher der GC-Gehalt, desto höher ist die T_m . Die Hybridisierungsstärke oder der Grad der Hybridisierung kann durch die Messung der T_m des resultierenden Duplex untersucht werden. Dies erfolgt durch Aussetzen eines Duplex in Lösung einer allmählich ansteigenden Temperatur und durch Überwachen der Denaturierung des Doppelstrangs, beispielsweise durch Absorption von Ultraviolettlicht, die mit der Entstapelung der Basenpaare steigt, welche die Denaturierung begleitet. Die T_m ist in der Regel definiert als Temperatur-Mittelpunkt des Übergangs von einer vollständigen Duplex-Struktur zur vollständigen Denaturierung, d. h. zur Bildung von zwei isolierten Einzelsträngen.

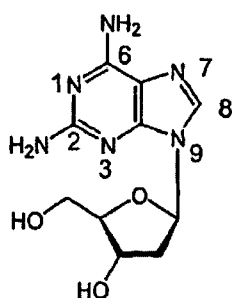
[0005] Bei der Routine-Nukleinsäure-Analyse möchte man oft die T_m eines Nukleinsäuremoleküls ändern. Für bestimmte Zwecke kann es beispielsweise vorteilhaft sein, die T_m von Nukleinsäuren der gleichen Länge anzugleichen oder zu harmonisieren oder sie sogar unabhängig von der Länge der Nukleinsäure oder des Bindungsbereichs zu machen, damit man ähnliche Hybridisierungsbedingungen für alle Tests anwenden kann. Dies ist besonders notwendig für Tests, die Arrays verwenden, da auf solchen Arrays die Hybridisierungsbedingungen für die Sonden jeweils identisch sein müssen. Eine Lösung war die Verwendung niedriger Hybridisierungstemperaturen. Unter solchen Bedingungen binden viele Nukleinsäuren mit einem niedrigen Grad an Basensequenz-Komplementarität an die Sonde. Dies bezeichnet man als unspezifische Bindung, die keine Unterscheidung zwischen ähnlichen Sequenzen gestattet. Ein weiterer Vorschlag betraf die Verwendung chemischer Reagenzien in dem Hybridisierungsgemisch, beispielsweise die Zugabe von Tetramethylammoniumchlorid (TMAC). Dieses Reagens reduziert den Unterschied zwischen der Stabilität von dG-dC und dA-dT-Basenpaaren, aber die Wirkung ist für kurze Oligonukleotide nicht ausreichend. Weiterhin wird die Zugabe von Salzen, wie TMAC, nicht erwogen, da es die Optimierung des Tests erschwert. Ein weiterer Vorschlag betraf

die Verwendung verschiedener Konzentrationen von jeweils verschiedenen (immobilisierten) Sonden in einem Test. Dies erwies sich auf einer Chip-Oberfläche als technisch komplex, wenn nicht sogar unmöglich. Als weitere Option wurde die Substitution von Ribonukleotiden in einem Oligonukleotid, bestehend aus Desoxyribonukleotiden, und umgekehrt zur Anpassung der DNA-Stabilität angewendet, Hoheisel (1996), *Nucleic Acids Res.* 24, 430–432.

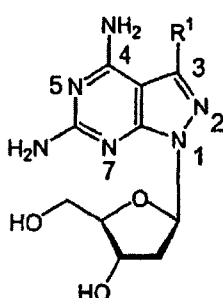
[0006] Es kann aber auch vorteilhaft sein, die T_m einer gegebenen Nukleinsäure zu steigern. Dies ist auf dem Gebiet der Nukleinsäuren interessant, die für eine Antisense-Therapie verwendet werden, zur Fehlpaarungs-Unterscheidung und für Nukleinsäuren, die bei der Diagnostik verwendet werden. Die Nukleinsäuren können als Primer oder Sonden verwendet werden. Das Ziel ist die Ermöglichung eines einfacheren Designs von Primern und Sonden, die bei Multiplex-Reaktionen verwendet werden und zur Synthese kürzerer Fängersonden, die auf Chips verwendet werden, da die chemische Synthese von Oligonukleotiden auf einer Chip-Oberfläche, die für Arrays verwendet wird, nicht so effizient ist, wie bei der Routine-Oligonukleotid-Synthese. Der relative Beitrag jedes Basenpaars zur Schmelztemperatur eines Hybrids ist um so höher je kürzer das Oligonukleotid ist. Folglich ist der Stabilitätsunterschied zwischen einer Fehlpaarung und einer perfekten Basenpaarung bei kürzeren Oligonukleotiden höher. Kurze Oligonukleotide hybridisieren schwach, und daher muss die Hybridisierungsreaktion bei niedriger Stringenz durchgeführt werden. Folglich kann die potentiell höhere Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen verschiedenen Sequenzen durch kürzere Oligonukleotide nur unter Bedingungen niedriger Stringenz verwendet werden. Es ist ein erheblicher Vorteil, Basen bereitzustellen, die die Erzielung eines hohen Niveaus an Fehlpaarungs-Diskriminierung unter stringenten Bedingungen ermöglichen, insbesondere für kurze Oligonukleotide bei Temperaturen, die beispielsweise bei Amplifikationsreaktionen verwendet werden. Zudem möchte man im Stand der Technik kurze Oligonukleotide mit hoher Unterscheidungsleistung in Arrays verwenden, da die chemische Synthese von Oligonukleotiden auf festen Trägern, die für Arrays verwendet werden, nicht so effizient wie in der Routinesynthese ist. Daher ist die Fähigkeit zur Verwendung kürzerer Oligonukleotide unter stringenten Bedingungen von erheblichem Vorteil. Werden Basen gefunden, die zu einem Anstieg der T_m eines Oligonukleotids führen, das an seinen komplementären Strang hybridisiert ist, können dann andere Basen im gleichen Oligonukleotid verwendet werden, die die T_m gemäß den Vorlieben des zu verwendenden Testsystems weiter einstellen.

[0007] Theoretisch sollten Oligonukleotid-Duplicates, die andere Basenpaare mit drei Wasserstoffbrückenbindungen bilden, eine ähnliche oder höhere Stabilität aufweisen, beispielsweise solche mit 2-Aminoadenin gegenüber dem Thymin. Trotzdem wurde gezeigt, dass 2-Aminoadenin-Thymin/Uracil-Basenpaare nur eine niedrige thermische Stabilität aufweisen [4–10]. Aus den bisher veröffentlichten Daten kann man schließen, dass die zusätzliche NH_2 -Gruppe von 2'-Desoxyadenosin-2-amin (Molekül 1 (siehe unten); n^2A_d) sehr wenig zur Basenpaarungsstabilität des DNA-Duplex beiträgt. Der T_m -Anstieg ist im Bereich von nur 1 bis 2°C. Zudem entspricht diese Stabilisierung nicht der Gesamtanzahl der n^2A_d -Reste, die in dem Duplex statt dA eingebaut sind [11]. Eine stärkere Stabilisierung als für Duplex-DNA wird für Duplex-RNA oder für DNA-RNA-Hybride gefunden [9] [10] [12]. Eine ziemlich hohe Basenpaarungsstabilität wird beobachtet, wenn 2-Aminoadenin in PNA [13] oder Hexitol-Nukleinsäuren [14] eingeführt wird. Andere modifizierte Gerüste als von DNA oder RNA scheinen die Stabilität des 2-Aminoadenin-Thymin/Uracil-Paars zu steigern.

[0008] Das ungewöhnliche Verhalten von Oligonukleotid-Duplicates, die n^2A_d -dT-Reste enthalten, ist für die Entwicklung eines Adenin-Thymin-Erkennungsmotivs interessant, das die gleiche oder sogar höhere Stabilität als ein Guanin-Cytosin-Basenpaar aufweist. In den folgenden Verbindungen wird die Puringruppierung der Verbindung 1 durch ein 8-Aza-7-desazapurin (Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin) oder ein 7-Desazapurin (Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin) ersetzt, was zu den Nukleosiden (2a [15], 2b, 2c oder 3 [16], [17] siehe unten) führt.



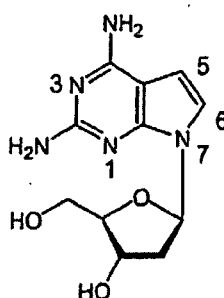
1



2a: R = H

2b: R = Br

2c: R = I



3

Purin-Nummerierung

systematische Nummerierung

systematische Nummerierung

[0009] Verbindungen mit ähnlicher chemischer Architektur wurden im Stand der Technik untersucht. Die Synthese der 7-substituierten 7-Desaza- und 8-Aza-7-desazapurin-2'-desoxyribonukleotide, ihr Einbau in Oligonukleotide, und die Stabilität der entsprechenden Duplices wurde untersucht (Seela et al. (1997) *Nucleosides & Nucleotides* 16, 963–966). Dieses Dokument offenbart keine 7-substituierten 7-Desaza-8-aza-diamino-purine. Die Stabilisierung von Duplices durch Pyrazolopyrimidin-Basenanaloga wurde beschrieben (Seela et al. (1988) *Helv. Chim. Acta* 71, 1191–1198; Seela et al. (1988) *Helv. Chim. Acta* 71, 1813–1823; und Seela et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 901–910).

[0010] Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-Reste in Oligonukleotiden sind ebenfalls als Bindungsstellen für verschiedene Gruppen (WO90/14353) geeignet. Oligonukleotide mit einem oder mehreren eingebauten Pyrazolo[3,4-d]pyrimidinen haben eine gesteigerte Tendenz zur Bildung von Triplices (Belousov et al. (1998) *Nucleic Acids Res.* 26, 1324–1328).

[0011] Die Verbindungen 7-Iod-, 7-Cyano- und 7-Propinyl-7-desaza-2-amino-2'-desoxyadenosin wurden von Balow et al. (1997, *Nucleosides & Nucleotides* 16, 941–944) synthetisiert und in Oligonukleotid-Sequenzen eingebracht. Diese Oligonukleotide weisen verstärkte Bindungsaffinitäten an RNA-Komplemente relativ zu unmodifizierten Sequenzen auf. Es wurden jedoch keine entsprechenden 8-Aza-Verbindungen hergestellt und untersucht. Seela et al. (1999, *Nucleosides & Nucleotides* 18, 1399–1400) offenbaren 7-substituierte 8-Aza-7-desazapurin-DNA, ihre Synthese und Duplex-Stabilität. Die Autoren behandeln nicht die möglichen Verwendungen der offenbarten Verbindungen.

[0012] WO 90/03370 offenbart 3,4-disubstituierte und 3,4,6-trisubstituierte Pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidine, insbesondere 4,6-Diamino-pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidine mit einem Linker an der C3-Position, woran ein Interkalator, ein elektrophiler Vernetzer oder eine Reportergruppe gebunden ist. Diese Verbindungen können an Zucker gebunden werden oder in Oligonukleotide eingebaut werden und dadurch zur Identifikation, Isolation und/oder zum Nachweis von interessierenden komplementären Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. US 5 594 121 offenbart neue Oligomere mit verstärkten Möglichkeiten zur Bildung von Duplices oder Triplices. Die Oligomere können 7-substituierte 8-Aza-7-desazadiamino-purine mit Propinyl und Arylen als Substituenten an der 7-Position enthalten. Zusammensetzungen, die diese Oligomere enthalten, können für Diagnosezwecke verwendet werden.

[0013] Es gibt noch einen Bedarf an der Bereitstellung von Sonden mit einer hohen Unterscheidungsleistung und mit einer kurzen Länge, deren T_m unter stringenten Bedingungen hoch ist, und die in verschiedenen Verfahren verwendet werden können, die auf dem Gebiet der Diagnostik geeignet sind, wie beispielsweise in dem Lightcycler®-System (Roche, Mannheim, Deutschland), TaqMan® (WO 92/02638 und entsprechende US-Patente US 5 210 015, US 5 804 375, US 5 487 972) oder anderen Anwendungen, die die Übertragung der Fluoreszenzenergie beinhalten.

Ausdrücke und Definitionen

[0014] Herkömmliche Techniken der Molekularbiologie und Nukleinsäure-Chemie, die dem Fachmann geläufig sind, sind vollständig in der Literatur erklärt. Siehe beispielsweise Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; *Oligonucleotide Syn-*

thesis (M. J. Gait, Hrsg., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames und S. J. Higgins, Hrsg., 1984); und eine Reihe, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.), die jeweils hier durch Bezugnahme aufgenommen sind. Alle hier erwähnten oben stehenden und nachfolgenden Patente, Patentanmeldungen und Veröffentlichungen sind hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0015] Die Begriffe "Nukleinsäure" und "Oligonukleotid" betreffen Polydesoxyribonukleotide (mit 2-Desoxy-D-ribose), Polyribonukleotide (mit D-Ribose) und jeden anderen Typ von Polynukleotid, das ein N-Glycosid einer Purin- oder Pyrimidin-Base ist, oder eine modifizierte Purin- oder Pyrimidinbase. Es gibt keine beabsichtigte Unterscheidung der Länge zwischen den Begriffen "Nukleinsäure" und "Oligonukleotid", und diese Begriffe werden untereinander austauschbar verwendet. Diese Begriffe betreffen nur die Primärstruktur des Moleküls. Somit umfassen diese Begriffe doppel- und einzelsträngige DNA, sowie doppel- und einzelsträngige RNA. Der Begriff "Polynukleotid" soll austauschbar für "Nukleinsäure" verwendet werden.

[0016] Der Begriff "Gerüst" (bzw. "Rückgrat") oder "Nukleinsäure-Gerüst" (bzw. "Nukleinsäure-Rückgrat") für eine erfindungsgemäße nukleinsäurebindende Verbindung betrifft die Struktur der chemischen Gruppierung, die die Nukleobasen in einer nukleinsäurebindenden Verbindung verbindet. Die Basen sind am Rückgrat befestigt und nehmen an der Basenpaarung an eine komplementäre nukleinsäurebindende Verbindung über Wasserstoffbrückenbindungen teil. Diese können Strukturen umfassen, die auf jedem Fall aus chemisch bindenden Nukleotiden gebildet wird, beispielsweise das natürlich vorkommende Phosphodiester-Ribose-Rückgrat oder unnatürliche Bindungen wie beispielsweise Phosphorthioate, Methylphosphonate, Phosphoramidate und Phosphortriester. Peptid-Nukleinsäuren haben unnatürliche Bindungen. Daher umfasst ein "modifiziertes Gerüst", wie es hier verwendet wird, Modifikationen der chemischen Bindung zwischen Nukleotiden, wie oben beschrieben, sowie andere Modifikationen, die zur Steigerung der Stabilität und Affinität verwendet werden, wie Modifikationen an der Zuckerstruktur. Ein α -Anomer der Desoxyribose kann verwendet werden, wobei die Base in Bezug auf das natürliche β -Anomer invertiert wird. Bei einer Ausführungsform kann die 2'-OH-Gruppe der Zuckergruppe zu 2'-O-Alkyl oder 2'-O-Alkyl-n(O-alkyl) verändert werden, die eine Resistenz gegenüber Abbau ohne Beeinträchtigung der Affinität bereitstellt. Eine unmodifizierte Nukleotidsequenz mit einem Phosphodiester-Gerüst ist "vergleichbar" mit einer eine Nukleobase enthaltenden Sequenz mit einem modifizierten Gerüst, wenn die beiden Sequenzen identische Basensequenzierung haben. Somit sind die Gerüste dieser Sequenzen ebenfalls vergleichbar.

[0017] Der Begriff "nukleinsäurebindende Verbindung" betrifft Substanzen, die sich mit Nukleinsäuren einer beliebigen Sequenz assoziieren, und die als Bindungspartner an eine im Wesentlichen komplementäre Nukleinsäure wirken. Die Bindung erfolgt vorzugsweise über Wasserstoffbrückenbindung zwischen komplementären Basenpaaren, wenn die nukleinsäurebindende Verbindung in einer einzelsträngigen Form ist. Vorzugsweise können nicht-natürliche Basen, das Thema der Erfindung, die an das Gerüst der nukleinsäurebindenden Verbindung gebunden sind, an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sein, jedoch können diese ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen nur an einigen oder allen natürlich vorkommenden Basen, beispielsweise Inosin, bilden. Der Fachmann erkennt, dass die meisten bekannten "nukleinsäurebindenden Verbindungen" Nukleinsäuren, wie DNA oder RNA, sind.

[0018] Der Begriff "Sonde" betrifft synthetische oder biologisch produzierte Nukleinsäuren (DNA oder RNA), die durch Konstruktion oder Selektion spezifische Nukleotidsequenzen enthalten, die es ermöglichen, dass sie unter definierten festgelegten Stringenzen, spezifisch (d. h. bevorzugt) an Ziel-Nukleinsäuren binden. Eine "Sonde" kann als "Fängersonde" identifiziert werden, was bedeutet, dass sie die Ziel-Nukleinsäure "einfängt", so dass diese aus ungewünschten Materialien getrennt werden kann, die ihren Nachweis verdecken könnten. Nach der Trennung kann der Nachweis der eingefangenen Ziel-Nukleinsäure mit einem geeigneten Verfahren erzielt werden. "Fängersonden" sind oft bereits an eine Festphase gebunden.

[0019] Der Begriff "Hybridisierung" betrifft die Bildung einer Duplexstruktur aus zwei einzelsträngigen Nukleinsäuren, aufgrund komplementärer Basenpaarung. Die Hybridisierung kann zwischen vollständig komplementären Nukleinsäuresträngen oder zwischen "im Wesentlichen komplementären" Nukleinsäuresträngen erfolgen, die kleinere Fehlpaarungsbereiche enthalten. Bedingungen, unter denen nur vollständig komplementäre Nukleinsäurestränge hybridisieren, werden als "stringente Hybridisierungsbedingungen" oder "sequenz-spezifische Hybridisierungsbedingungen" bezeichnet. Stabile Duplices von im Wesentlichen komplementären Sequenzen können unter weniger stringenten Hybridisierungsbedingungen erzielt werden, wobei der Grad der tolerierten Fehlpaarung durch geeignetes Einstellen der Hybridisierungsbedingungen eingestellt werden kann. Der Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäure-Technologie kann die Duplexstabilität empirisch ermitteln, wobei eine Anzahl von Variablen in Betracht gezogen wird, einschließlich beispielsweise der Länge und der Basenpaar-Konzentration der Oligonukleotide, Ionenstärke, und Anzeichen fehlgepaarter Basenpaare, nach der

Anleitung des Standes der Technik (siehe beispielsweise Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.; und Wetmur, 1991, Critical Review in Biochem. and Mol. Biol. 26 (3/4): 227–259, die jeweils durch Bezugnahme hier aufgenommen sind).

[0020] Der Begriff "Primer" betrifft ein Oligonukleotid, das als Initialisierungspunkt der DNA-Synthese unter Bedingungen wirkt, in denen die Synthese eines Primerextensionsprodukts, das komplementär zu einem Nukleinsäurestrang ist, induziert wird, d. h. entweder in der Anwesenheit von vier verschiedenen Nukleosid-Triphosphaten und einem Mittel zur Extension (beispielsweise einer DNA-Polymerase oder reversen Transkriptase) in einem geeigneten Puffer und bei einer geeigneten Temperatur. Wie hier verwendet betrifft der Begriff "Primer" Oligonukleotide, die in ligierungsvermittelten Amplifikationsprozessen verwendet werden, in denen ein Oligonukleotid durch Ligation an ein zweites Oligonukleotid "extendiert" bzw. "verlängert" wird, das an einer benachbarten Position hybridisiert. Somit betrifft der Begriff "Primerextension", wie er hier verwendet wird, die Polymerisation einzelner Nukleosidtriphosphate mit dem Primer als Initialisierungsstelle der DNA-Synthese und die Ligation der beiden Primer, so dass ein extendiertes Produkt erhalten wird. Ein Primer ist vorzugsweise eine einzelsträngige DNA.

[0021] Die geeignete Länge eines Primers hängt von der beabsichtigten Verwendung des Primers ab, reicht aber gewöhnlich von 6 bis 50 Nukleotiden. Kurze Primermoleküle erfordern in der Regel kühlere Temperaturen, so dass hinreichend stabile Hybridkomplexe mit der Matrize erhalten werden. Ein Primer braucht nicht die genaue Sequenz der Matrizen-Nukleinsäure wider zu spiegeln, muss aber hinreichend komplementär sein, damit er mit der Matrize hybridisiert. Die Konstruktion geeigneter Primer zur Amplifikation einer gegebenen Zielsequenz ist im Stand der Technik bekannt und in der hier zitierten Literatur beschrieben. Die Primer können zusätzliche Eigenschaften beinhalten, die den Nachweis oder die Immobilisierung des Primers ermöglichen, aber die die grundlegende Eigenschaft des Primers nicht verändern, nämlich diejenige, als Initialisierungspunkt der DNA-Synthese zu wirken. Primer können beispielsweise eine zusätzliche Nukleinsäuresequenz am 5'-Ende enthalten, die nicht an die Zielnukleinsäure hybridisiert, die aber die Klonierung des amplifizierten Produkts erleichtert. Der Bereich des Primers, der hinreichend komplementär zur Matrize zur Hybridisierung ist, wird hier als hybridisierender Bereich bezeichnet.

[0022] Die Begriffe "Ziel", "Zielsequenz", "Zielsegment", "Zielbereich", und "Zielnukleinsäure" betreffen einen Bereich oder eine Subsequenz einer Nukleinsäure, die amplifiziert oder untersucht werden soll.

[0023] Wie hier verwendet ist ein Primer "spezifisch" für eine Zielsequenz, wenn die Anzahl der Fehlpaarungen zwischen der Primersequenz und der Zielsequenz kleiner als die Anzahl der Fehlpaarungen ist, die zwischen der Primersequenz und den Nicht-Zielsequenzen vorhanden ist, die sich in der Probe befinden können. Die Hybridisierungsbedingungen können so ausgewählt werden, dass stabile Duplices nur dann gebildet werden, wenn die Anzahl der vorhandenen Fehlpaarungen nicht größer als die Anzahl der Fehlpaarungen ist, die sich zwischen der Primersequenz und der Zielsequenz befinden. Unter solchen Bedingungen kann der Primer einen stabilen Duplex nur mit einer Zielsequenz bilden. Somit ermöglicht die Verwendung von zielspezifischen Primern und geeignet stringenten Amplifikationsbedingungen die spezifische Amplifikation solcher Zielsequenzen, die die Bindungsstellen für den Zielprimer enthalten. Die Verwendung sequenzspezifischer Amplifikationsbedingungen ermöglicht die spezifische Amplifikation solcher Zielsequenzen, die die genauen komplementären Primer-Bindungsstellen enthalten.

[0024] Halogen bedeutet eine Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodgruppe. Die am stärksten bevorzugten Halogengruppen sind -I und -Br.

[0025] Alkylgruppen werden vorzugsweise aus Alkylgruppen ausgewählt, die 1 bis 10 Kohlenstoffatome enthalten, welche jeweils in linearer, verzweigter oder cyclischer Form angeordnet sind. Die tatsächliche Länge der Alkylgruppe hängt von der sterischen Situation an der bestimmten Position ab, an der sich die Alkylgruppe befindet. Bei sterischen Einschränkungen ist die Alkylgruppe gewöhnlich kleiner, wobei die Methyl- und Ethylgruppe am stärksten bevorzugt sind. Alle Alkyl-, Alkenyl- und Alkynylgruppen können entweder unsubstituiert oder substituiert sein. Substitution durch Heteroatome wie oben aufgeführt, unterstützt die Steigerung der Löslichkeit in wässriger Lösung.

[0026] Alkenylgruppen sind vorzugsweise aus Alkenylgruppen ausgewählt, die 2 bis 10 Kohlenstoffatome enthalten. Für die Auswahlen gelten ähnliche Überlegungen wie für Alkylgruppen. Sie können ebenfalls linear, verzweigt und cyclisch sein. Die am stärksten bevorzugte Alkenylgruppe ist die Ethylengruppe.

[0027] Alkynylgruppen haben vorzugsweise 2 bis 10 Kohlenstoffatome. Wieder können solche Kohlenstoff-

tome in linearer, verzweigter und cyclischer Weise angeordnet sein. Zudem kann mehr als eine Dreifachbindung in der Alkinylgruppe zugegen sein. Die am stärksten bevorzugte Alkinylgruppe ist die 3-Propargylgruppe.

[0028] Alkoxygruppen enthalten vorzugsweise 1 bis 6 Kohlenstoffatome und sind am Rest der Einheit über das Sauerstoffatom gebunden. Für die in den Alkoxygruppen enthaltene Alkylgruppe gelten die gleichen Überlegungen wie für Alkylgruppen. Die am stärksten bevorzugte Alkoxygruppe ist die Methoxygruppe.

[0029] Die Begriffe "Aryl" und "Heteroaryl" (oder "Heteroaromat") stehen für eine carbocyclische oder heterocyclische Gruppe, die wenigstens einen Ring mit physikalischen und chemischen Eigenschaften aufweist, die den Verbindungen ähneln, wie eine aromatische Gruppe mit 5 bis 6 Ringatomen und mit 4 bis 20 Kohlenstoffatomen, gewöhnlich 4 bis 9 oder 4 bis 12 Kohlenstoffatomen, in denen ein bis drei Ringatome N, S oder O sind, vorausgesetzt, dass keines der benachbarten Ringatome O-O, S-S, O-S oder S-O ist. Aryl- und Heteroarylgruppen umfassen Phenyl, 2-, 4- und 5-Pyrimidinyl, 2-, 4- und 5-Thiazolyl, 2-s-Triazinyl, 2-, 4-Imidazolyl, 2-, 4- und 5-Oxazolyl, 2-, 3- und 4-Pyridyl, 2- und 3-Thienyl, 2- und 3-Furanyl, 2- und 3-Pyrrolyl, das gegebenenfalls vorzugsweise an einem Ring-C durch Sauerstoff, Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen oder Halogen substituiert ist. Heteroarylgruppen umfassen auch die wahlfreie Substitution an einem Ring-N durch Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen oder Halogenalkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen und 1 bis 4 Halogenatomen. Beispielhafte Substituenten an der Aryl- oder Heteroarylgruppe umfassen Methyl, Ethyl, Trifluormethyl und Brom. Solche substituierten Aryl- und Heteroarylgruppen umfassen Benzyl und dergleichen. "Heteroaryl" steht auch für Systeme, die zwei oder mehr Ringe aufweisen, einschließlich bicyclischer Gruppierungen, wie Benzimidazol, Benzotriazol, Benzoxazol und Indol. Arylgruppen sind die Phenyl- oder Naphthylgruppierung, und zwar entweder unsubstituiert oder substituiert durch ein oder mehrere Amino-, -Cyano-, -Aminoalkyl-, -O-(C₁-C₁₀)-Alkyl-, -S-(C₁-C₁₀)-Alkyl-, -(C₁-C₁₀)-Alkyl-, Sulfonyl-, Sulfenyl-, Sulfinyl-, Nitro- und Nitroso-Gruppen. Die am stärksten bevorzugte Arylgruppe ist die Phenylgruppe. Die bevorzugte Arylalkylgruppe ist die Benzylgruppe. Die bevorzugte Alkylaminogruppe ist die Ethylaminogruppe. Die bevorzugte -COO(C₁-C₄)-Alkylgruppe enthält ein oder zwei Kohlenstoffatome in der Alkyleinheit (Methyl- oder Ethylester). Andere Arylgruppen sind Heteroarylgruppen, wie beispielsweise Pyrimidin, Purin, Pyrrol, oder Pyrazol, Aryl und Heteroaryl. Gemäß der vorliegenden Erfindung soll der Begriff Aryl auch alle Heteroaryle umfassen.

[0030] Aryloxygruppen enthalten vorzugsweise 6 bis 20 Kohlenstoffatome. Solche Kohlenstoffatome können in einem oder mehreren aromatischen Ringen und zudem in Seitenketten zugegen sein (beispielsweise Alkylketten), die an der aromatischen Einheit gebunden sind. Bevorzugte Aryloxygruppen sind die Phenoxy- und die Benzoxygruppe.

[0031] Eine "Schutzgruppe" ist eine chemische Gruppe, die an eine funktionelle Einheit gebunden ist (beispielsweise an Sauerstoff in einer Hydroxylgruppe oder Stickstoff in einer Aminogruppe, wodurch der Wasserstoff ersetzt wird), so dass die funktionelle Gruppe vor der Umsetzung in einer ungewünschten Weise bewahrt wird. Eine Schutzgruppe ist weiter durch die Tatsache definiert, dass sie ohne Zerstörung der biologischen Aktivität des gebildeten Moleküls entfernt werden kann, und zwar hier die Bindung der nukleinsäurebindenden Verbindung an eine Nukleinsäure. Geeignete Schutzgruppen sind dem Fachmann bekannt. Besonders bevorzugte Schutzgruppen, beispielsweise für Hydroxylgruppen am 5'-Ende einer Nukleotids oder Oligonukleotids, werden aus Tritylgruppen ausgewählt, beispielsweise Dimethoxytrityl. Bevorzugte Schutzgruppen an den exocyclischen Aminogruppen in der Formel I sind Acylgruppen, am stärksten bevorzugt die Benzoylgruppe (Bz), Phenoxyacetyl oder Acetyl oder Formyl, und die Amidin-Schutzgruppen, wie beispielsweise die N,N-Dialkylformamidin-Gruppe, vorzugsweise die Dimethyl-, Diisobutyl-, Diisobutyryl- und die Di-n-butylformamidin-Gruppe. Bevorzugte O-Schutzgruppen sind die Aroyl-Gruppen, die Diphenylcarbamoyl-Gruppe, die Acyl-Gruppen, und die Silyl-Gruppen. Von diesen ist die Benzoyl-Gruppe am stärksten bevorzugt. Bevorzugte Silyl-Gruppen sind die Trialkylsilyl-Gruppen, wie Trimethylsilyl, Triethylsilyl und tert. Butyl-dimethyl-silyl. Eine weitere bevorzugte Silyl-Gruppe ist die Trimethylsilyloxy-methyl-Gruppe (TOM) (Schweizer Patentanmeldung 01931/97). Weitere bevorzugte Schutzgruppen sind Gruppen wie ortho-Nitrobenzyl-Schutzgruppen, wie 2-(4-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl (NPEOC) oder photoaktivierbare Verbindungen, wie 2-Nitrophenylpropyloxycarbonyl (NPPOC) (Giegrich et al., Nucleosides & Nucleotides 1998, 17, 1987). Erfindungsgemäß kann auch die Phthaloyl-Gruppe als Schutzgruppe verwendet werden.

[0032] Jedes Atom in den Definitionen in den hier aufgeführten Formeln ist nicht auf ein spezifisches Isotop eingeschränkt. Somit kann ein Phosphoratom (P) entweder das normale ³¹P oder das radioaktive ³²P oder ein Gemisch davon bedeuten. Das Gleiche gilt für Wasserstoff (H/D/T), Kohlenstoff (C), Iod (Cl, Br, I) und Stickstoff (N).

[0033] Während der chemischen Synthese sollten sämtliche reaktiven Gruppe, wie -OH, -SH, -NH₂, -NH-Al-

kyl, -NH-Alkenylen-, -NH-Alkinylen oder -NH-Aryl (einschließlich solcher Gruppen, die sich in den Reportergruppen befinden) durch geeignete Schutzgruppen geschützt werden, d. h. die vorliegende Erfindung schlägt Verbindungen für die Synthese von Oligonukleotiden vor, wobei die Formeln oder Substituenten mit der Maßgabe ausgewählt sind, dass ein oder zwei Wasserstoffatome von einer beliebigen -OH-, -SH-, -NH₂-, -NH-Alkyl-, -NH-Alkenylen-, -NH-Alkinylen-, oder -NH-Aryl-Gruppe durch eine Schutzgruppe substituiert sind. Bei der chemischen Synthese wird die Verbindung der Einfachheit halber an eine feste Phase gebunden. In diesen Fällen werden die Definitionen der oben angegebenen Substituenten folglich angegeben.

[0034] Reportergruppen sind in der Regel Gruppen, die die nukleinsäurebindende Verbindung sowie beliebige daran gebundene Nukleinsäuren vom Rest der Flüssigkeit unterscheidbar machen, d. h. von der Probe (nukleinsäurebindende Verbindungen, an denen eine Reportergruppe gebunden ist, können auch als markierte nukleinsäurebindende Verbindungen, markierte Sonden oder nur als Sonden bezeichnet werden). Der Begriff Reportergruppe und die spezifischen Ausführungsformen umfassen vorzugsweise einen Linker, der zur Bindung der zu verwendenden Gruppierung (die eigentliche feste Phase oder die Fluorophorgruppierung) an die Bindungsstelle als Reportergruppe verwendet wird. Der Linker stellt vorzugsweise eine Flexibilität bereit, so dass die nukleinsäurebindende Verbindung an die Nukleinsäuresequenz binden kann, die ohne größere Behinderung durch die feste Phase bestimmt werden soll. Linker, insbesondere solche, die nicht hydrophob sind, beispielsweise auf der Basis konsekutiver Ethylenoxy-Einheiten, beispielsweise wie in DE 39 43 522 offenbart, sind dem Fachmann bekannt.

[0035] Der Begriff "Array", steht für eine Anordnung adressierbarer Stellen auf einer Vorrichtung. Die Stellen können in zweidimensionalen Arrays, dreidimensionalen Arrays oder anderen Matrixformaten angeordnet sein. Die Anzahl der Stellen kann von mehreren bis wenigstens einigen Hunderttausenden reichen. Am bedeutsamsten veranschaulicht jede Stelle eine vollkommen unabhängige Reaktionsstelle. Jede Stelle trägt eine nukleinsäurebindende Verbindung, die als Bindungspartner für eine zweite nukleinsäurebindende Verbindung, eine Nukleinsäure, insbesondere eine Ziel-Nukleinsäure, dienen kann.

[0036] Der Begriff "Baustein" oder "Untereinheit" betrifft eine Verbindung, die in der Oligonukleotid-Synthese verwendet werden kann, wobei nacheinander einzelne Bausteine chemisch gebunden werden, so dass eine komplexere Struktur, d. h. eine Oligonukleotid-Vorstufe, erhalten wird. Beispiele für Bausteine sind Phosphoramidite oder Phosphonate.

[0037] Der Begriff "substituierte Verbindung" soll bedeuten, dass eine Verbindung weitere chemische Gruppen, Gruppierungen oder Substituenten trägt, die nicht die Verbindung selbst sind. Diese Substituenten sollen im Prinzip Halogene oder Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- oder Aryl-Verbindungen, die gegebenenfalls mit weiteren Heteroatomen substituiert sind, umfassen, sind aber nicht darauf eingeschränkt.

Figurlegenden

[0038] Es zeigt:

[0039] **Fig. 1a:** Ultravioletspektren der Desaminierung der Verbindung 2a

[0040] **Fig. 1b:** Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Profil der Verbindungen 1, 2a, und 2b

[0041] **Fig. 2a:** Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Profil eines Hydrolysates von Schlangengift-Diesterase und alkalischer Phosphatase eines Oligonukleotids mit 2a

[0042] **Fig. 2b:** Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Profil eines Hydrolysates von Schlangengift-Diesterase und alkalischer Phosphatase eines Oligonukleotids mit 2b

[0043] **Fig. 3:** Circular dichroismus-Spektren antiparalleler DNA/DNA-Duplices (**Fig. 3a**) und antiparalleler DNA/RNA-Duplices (**Fig. 3b**)

[0044] **Fig. 4:** Circular dichroismus-Spektren paralleler DNA/DNA-Duplices (**Fig. 4a**) und paralleler DNA/RNA-Duplices (**Fig. 4b**)

[0045] **Fig. 5:** HPLC-Profile der Nukleoside 1, 2a-c(a) und 3a-c und dT (b). Die Gemische der Nukleoside wurden auf Umkehrphasen-HPLC bei 260 nm (RP-18, Gradient: 0–30 min in 0,1 M (Et₃NH)OAc (pH-Wert 7,0)/MeCN (95:5), 0,7 ml/min) analysiert. HPLC-Profil der Oligonukleotide 100 (c) und 304 (d) nach der enzy-

matischen Hydrolyse mit Schlangengift-Phosphodiesterase gefolgt von alkalischer Phosphatase in 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 8,3) bei 37°C. Die HPLC erfolgte auf einer RP-18-Säule (200 × 10 mm), 0–30 min in 0,1 M (Et₃NH)OAc (pH-Wert 7,0)/MeCN (95:5), 0,7 ml/min). Peak-Erfassung: 260 nm.

[0046] [Fig. 6](#): Die Tendenz des T_m-Anstiegs vs Anzahl der 2b-Reste.

[0047] **Fig. 7:** (a) CD-Spektren der Duplices 102·103, 108·109, 110·111, 104·105 (in 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂ und 60 mM Na-Cacodylat (pH-Wert 7,0)). (b) CD-Spektren der Doppelstränge 102·403, 108·403, 110·403, 104·403 in 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂ und 60 mM Na-Cacodylat (pH-Wert 7,0), wobei die Konzentration der Oligonukleotide 5 µM + 5 µM (Einzelstrangkonzentration) ist.

Beschreibung der Erfindung

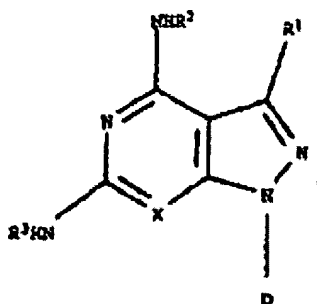
[0048] Das vorstehend genannte Problem kann durch die Befunde der vorliegenden Erfindung gelöst werden, welche Zusammensetzungen offenbart, umfassend: ein Array aus mehreren nukleinsäurebindenden Verbindungen, wobei 7-Halogen- oder 7-Cyano-substituierte 8-Aza-7-desaza-2,6-diamino-purine eingebaut werden. Die vorliegende Erfindung betrifft zudem Verfahren, wobei nukleinsäurebindende Verbindungen verwendet werden können.

[0049] Ein Oligonukleotid mit eingebautem 7-Iod- oder 7-Brom-8-aza-7-desaza-2,6-diamino-purin statt eines Adeninrests zeigt einen unerwarteten Anstieg der Schmelztemperatur. Dieser Befund steht dem Verhalten von 5-Halogen-substituierten Pyrimidinen entgegen. Diese Wirkung kann für parallele und antiparallele Duplices beobachtet werden. Diese Befunde konnten auf der Grundlage des Standes der Technik nicht vorhergesagt werden. Die 7-Stellung ermöglicht, dass sich die Substituenten in die große Furche der DNA erstrecken, wo sie genug Platz finden, und die DNA-Doppelhelix nicht stören. Eine mögliche Erklärung dieser Wirkung könnte die Entfernung von Wasser aus der großen Furche und die begleitende Hydrophobisierung der großen Furche sein, wodurch die Stapelung der DNA-Basen zunimmt. Substituenten, die diese Anforderungen erfüllen, können auch andere funktionelle Gruppen tragen, wie beispielsweise Reportergruppen.

[0050] Zusammengefasst offenbart die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen, umfassend ein Array aus mehreren nukleinsäurebindenden Verbindungen, umfassend 7-Halogen- oder 7-Cyano-substituierte 8-Aza-7-desaza-2,6-diamino-Purinbasen, verschiedene Verwendungen davon und Verfahren zur Bestimmung der Nukleinsäuren mit den Verbindungen auf dem Gebiet der Diagnostik.

[0051] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der nukleinsäurebindenden Verbindungen auf dem Gebiet von Arrays von nukleinsäurebindenden Verbindungen, die an eine feste Oberfläche gebunden sind (siehe beispielsweise US 5 143 854, US 6 022 963, US 6 156 501, WO 90/15070, WO 92/10092), und die die beschriebenen Eigenschaften wie in diesen Literaturstellen beschrieben haben und die wie dort oder von Niemeyer und Blohm (Angew. Chem. Int. Ed. 1999, 38, 2865–2869) beschrieben, hergestellt werden können. Daher betrifft die Erfindung in einer Ausführungsform eine Zusammensetzung zur Analyse der Wechselwirkungen zwischen nukleinsäurebindenden Verbindungen, umfassend ein Array aus mehreren nukleinsäurebindenden Verbindungen mit unterschiedlichen Sequenzen, wobei die mehreren nukleinsäurebindenden Verbindungen an ein festes Substrat an bekannten Orten gebunden und für die Bindung an komplementäre nukleinsäurebindende Verbindungen ausgewählt sind, wobei es sich nur bei den nukleinsäurebindenden Verbindungen oder den nukleinsäurebindenden Verbindungen und den komplementären nukleinsäurebindenden Verbindungen (oder Ziel-Nukleinsäuren) um ein Rückgrat umfassende nukleinsäurebindende Verbindungen handelt, wobei das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



handelt, wobei

R^1 unabhängig von X , R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X , R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
- (2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,
- (3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
- (4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
- (5) (C_6-C_{22}) -Aryl,
- (6) -Z- (C_1-C_{10}) -Alkyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkenyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkynyl, -Z- (C_6-C_{22}) -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$ -, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,
- (7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$ -NR⁵R⁶, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s, wobei R¹¹ aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist, wobei R⁵, R⁶ und R¹² jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$ -NR⁵R⁶ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, und beliebige Salze davon.

[0052] Die Nukleobasen, an die die nukleinsäurebindenden Verbindungen in der vorliegenden Erfindung binden können, können Nukleobasen sein, die in der Natur vorkommen, beispielsweise als Adenosin, Guanosin, Uridin, oder Cytidin oder deren 2'-Desoxyderivate, oder Nukleobasen, die nicht in der Natur vorkommen, wie beispielsweise Nukleobasen mit heterocyclischen Gruppen der nukleinsäurebindenden Verbindungen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, heterocyclischen Gruppen, wie Pyrrolo-[2,3-d]-pyrimidin oder Pyrazolo[3,4-d]-pyridin oder deren Analoga, vorzugsweise die Analoga von Guanin oder Adenin oder 7-Desazaguanin. Andere nicht-natürliche heterocyclische Gruppen sind dem Fachmann bekannt und müssen hier nicht ausführlich erläutert werden.

[0053] Die komplementären nukleinsäurebindenden Verbindungen (oder die Ziel-Nukleinsäure) können eine heterocyclische Gruppe gemäß Formel I, wie oben beschrieben enthalten, wenn sie beispielsweise mit der Polymerasekettenreaktion in der Anwesenheit eines Triphosphates amplifiziert werden, das eine heterocyclische Gruppe der Formel I, wie oben beschrieben, enthält.

[0054] Verschiedene Arten von Trägern sind möglich, beispielsweise nichtporöse Träger oder andere feste Träger, die weniger porös sind als die üblichen Peptid-Synthese-Träger; für bestimmte Anwendungen der Erfindung, arbeiten jedoch oft recht poröse Kügelchen, Harze, oder andere Träger gut und sind bevorzugt. Ein solcher Träger ist ein Harz in der Form von Kügelchen. Im Allgemeinen ist die Größe der Kügelchen im Bereich von 1 nm bis 100 µm, aber ein massiverer fester Träger von bis zu 1 mm Größe kann gelegentlich verwendet

werden. Besonders bevorzugte Harze umfassen Sasrin-Harz (ein Polystyrol-Harz, das von Bachem Bioscience, Schweiz, erhältlich ist) und TentaGel S AC-, TentaGel PHB- oder TentaGel S-NH₂-Harz (Polystyrol-Polyethylen-Glycol-Copolymer-Harze, erhältlich von Rappe Polymere, Tübingen, Deutschland). Andere bevorzugte Träger sind kommerziell erhältlich und beschrieben von Novabiochem, La Jolla, Kalif. In anderen Ausführungsformen ist das feste Substrat flach oder kann alternative Oberflächenkonfigurationen annehmen. Das feste Substrat kann beispielsweise erhabene oder eingedrückte Bereiche aufweisen, auf denen die Synthese erfolgen kann, oder es ist mit porösem SiO₂/Glas beschichtet. Bei einigen Ausführungsformen wird das feste Substrat so ausgewählt, dass geeignete lichtabsorbierende Eigenschaften bereitgestellt werden. Das Substrat kann beispielsweise ein polymerisierter Langmuir-Blodgett-Film, funktionalisiertes Glas, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO₂, SiN₄, modifiziertes Silizium, oder ein Element aus einer Reihe von Gelen oder Polymeren sein, wie (Poly)tetrafluorethylen, (Poly)vinylidendifluorid, Polystyrol, Polycarbonat oder Kombinationen davon. Ein anderes geeignetes festes Substratmaterial ist dem Fachmann leicht ersichtlich. Die Oberfläche des festen Substrates enthält reaktive Gruppen, wie beispielsweise Carboxyl, Amino, Hydroxyl, Thiol oder dergleichen. Stärker bevorzugt ist die Oberfläche optisch durchsichtig und hat Oberflächen-Si-OH-Funktionalitäten, wie man sie auf Siliciumdioxid-Oberflächen vorfindet. Besonders bevorzugt ist daher eine Zusammensetzung, wobei das feste Substrat ausgewählt ist aus der Gruppe Siliciumdioxid, Polymermaterialien, Glas, poröses Glas, Kügelchen, Chips und Objektträger.

[0055] Bei einer sehr bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung eine erfindungsgemäß verwendete nukleinsäurebindende Verbindung, vorzugsweise R¹ = Br oder R¹ = I. Weiter bevorzugt ist eine Zusammensetzung, umfassend ein Array von nukleinsäurebindenden Verbindungen mit 5 bis 20 Nukleotiden Länge.

[0056] Bei dem Bindungsprodukt einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung mit einer zweiten nukleinsäurebindenden Verbindung können die Zusammensetzung und die zweite nukleinsäurebindende Verbindung aneinander durch Basenpaarung in paralleler oder antiparalleler Orientierung gebunden sein.

[0057] In der am stärksten bevorzugten Ausführungsform ist die heterocyclische Gruppe 7-Brom-7-desaza-8-aza-2,6-diamino-purin oder 7-Iod-7-desaza-8-aza-2,6-diamino-purin. Die erfindungsgemäß verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindungen besitzen zudem den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu 2-Aminoadenosin, das eine äußerst säurelabile glycosidische Bindung aufweist und das nicht in der Oligonukleotid-Synthese verwendet wird, wenn spezifische Bedingungen eingesetzt werden, eine sehr stabile glycosidische Bindung aufweisen. Bei einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform können die Halogenide der 7-Position des erfindungsgemäß eingesetzten 7-Desaza-8-aza-2,6-diamino-purins durch Pseudohalogenide substituiert werden, wie beispielsweise -SCN oder -CN.

[0058] Die oben genannten bevorzugten Substituenten sind ebenfalls in den Verfahren und Verwendungen gemäß der vorliegenden Erfindung bevorzugt.

[0059] Die heterocyclischen Gruppen der Formel I werden hauptsächlich charakterisiert durch die folgenden Eigenschaften:

- Die Base ist über die 9-Position (Purin-Nummerierung) an das Rückgrat, vorzugsweise an eine Zucker-Gruppierung, gebunden.
- Die Base enthält ein aromatisches n-Elektronensystem, das Stapelwechselwirkungen mit anderen Nukleinsäure-Bestandteilen bilden kann.
- Die Base enthält eine oder mehrere Donor- und/oder Akzeptor-Stelle(n) für die Wasserstoffbrückenbindung an das natürliche Nukleosid T.

[0060] Zur Steigerung der T_m in einer nukleinsäurebindenden Verbindung können ein oder mehrere A in einem zu einem T komplementären Strang in der zu bestimmenden Nukleinsäure durch die erfindungsgemäßen heterocyclischen Gruppen ersetzt werden. Das Oligonukleotid bindet dann spezifisch an die Zielsequenz, die T enthält, gegenüber den erfindungsgemäßen Basen, mit einer Bindungsenergie in der Größenordnung eines G-C-Paars, aber mit einer höheren Stabilität als ein A-T-Basenpaar. Dieses arbeitet bei antiparallelen oder parallelen Duplices gleichermaßen gut, wobei die natürlichen A-T-Basenpaare die gleichen Bindungsqualitäten in parallelen oder antiparallelen Duplices, aber mit einer niedrigeren Bindungsenergie in dem parallelen Duplex, aufweisen.

[0061] Die heterocyclische Gruppe der erfindungsgemäß verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindung bindet bei Einführung in eine nukleinsäurebindende Verbindung an ein T in dem gegenüberliegenden Strang in parallelen oder in einem antiparallelen Duplex gleich gut. Zur Herbeiführung einer antiparallelen Bindung in

einem Duplex, müssen natürliche G- oder C-Basen, die normalerweise G-C-Basenpaare in antiparallelen Duplices bilden, durch nicht-natürliche Basenpaare ersetzt werden, wie beispielsweise G-iC (Isocytosin) oder besser G-me_iC (methyliertes Isocytosin) oder C-iG (Isoguanosin) wie oben offenbart. Eine Zusammenfassung von parallelen und antiparallelen Duplices findet sich in EP 0 624 161 oder Seela et al. (Tetrahedron 55 (1999), 9481–9500) und ist schematisch in Schema 11 und 12 in Beispiel 4 gezeigt.

[0062] Dieses allgemeine Prinzip ist natürlich nicht eingeschränkt, da Basen, die die gleichen Eigenschaften in dem sechsgliedrigen Ring aufweisen, erwartungsgemäß die gleichen Eigenschaften auf der Basis der vorstehenden Erklärung aufgrund ihrer vorhandenen erfindungsgemäßen Struktur haben. Je weiter der Teil der heterocyclischen Gruppe insbesondere von dem Teil entfernt ist, der an der Basenpaarung beteiligt ist, desto toleranter ist das Oligomer gegenüber Modifikationen der chemischen Struktur, beispielsweise die Bindung von Gruppen an diesem Teil der heterocyclischen Ringe. Wird im Folgenden auf die heterocyclische Gruppe der erfindungsgemäß verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindung Bezug genommen, wird auf eine heterocyclische Gruppe der allgemeinen Formel I Bezug genommen.

[0063] Die vorliegende Erfindung betrifft auch tautomere Formen und Salze heterocyclischer Gruppen der Formel I.

[0064] Die erfindungsgemäß verwendete nukleinsäurebindende Verbindung hat vorzugsweise eine Länge von weniger als 100 Untereinheiten, stärker bevorzugt 10 bis 30 Untereinheiten. Die Substituenten sollten, damit sie als nukleinsäurebindende Verbindung aktiv sind, derart ausgewählt werden, dass die Wasserstoffbrückenbindungen an den heterocyclischen Gruppen an der zu bindenden Nukleinsäure ermöglicht werden, und zwar vorzugsweise durch Basenpaarung beispielsweise durch Watson-Crick- oder Hoogsten-Basenpaarung. Verbindungen, in denen die Substituenten keine dieser bevorzugten Wasserstoffbrückenbindungen ermöglichen, können als Zwischenprodukte zur Herstellung von nukleinsäurebindenden Verbindungen geeignet sein. Bevorzugte nukleinsäurebindende Verbindungen, die erfindungsgemäß verwendet werden, werden chemisch synthetisiert.

[0065] Die nukleinsäurebindende Verbindung wird derart konstruiert, dass sie eine Nukleobasensequenz enthält, die zu der nachzuweisenden Nukleinsäure oder der Nukleinsäure, an die sie durch Basenpaarung binden soll, je nach der Bildung eines parallelen oder antiparallelen Duplex im Wesentlichen komplementär ist. Da diese Nukleinsäuren gewöhnlich wenigstens einmal eine der natürlich vorkommenden Nukleobasen Ade, Cyt, Gua und Thy oder Ura enthalten, enthält die erfindungsgemäße nukleinsäurebindende Verbindung auch eine dieser vier Basen. Wenigstens eine der heterocyclischen Gruppen wird jedoch durch die heterocyclische Base der Formel I ersetzt.

[0066] Soll die nukleinsäurebindende Verbindung als Sonde zum Bestimmen einer Nukleinsäure verwendet werden, oder ist eine andere Identifikation der Verbindung oder Nukleinsäure vorgesehen, werden die Substituenten jeweils so ausgewählt, dass sie eine Reportergruppe enthalten. Es können zwar so viele Reportergruppen gebunden werden, damit die nukleinsäurebindende Verbindung ausreichend markiert wird, jedoch wird vorzugsweise nur eine begrenzte Zahl von Reportergruppen an eine einzelne Untereinheit gebunden, so dass die Erkennung der Nukleinsäuren, Affinitäten an Nukleinsäuren und Löslichkeit nicht betroffen sind, so dass sich die Sonde nicht in Hybridisierungstests eignet. In einem sehr bevorzugten Fall, gibt es nur 1 bis 4, stärker bevorzugt 1 oder 2, oder am stärksten bevorzugt nur eine Reportergruppe in jeder nukleinsäurebindenden Verbindung. Es existieren Formate für die Nukleinsäure-Bestimmung, bei denen mehr als eine Reportergruppe an die Sonde gebunden sein muss. Ein Beispiel für solche Formate ist in WO92/02638 offenbart. In diesem Fall ist eine der Reportergruppen ein Fluoreszenzemitter, wohingegen der andere ein Fluoreszenz-Quencher ist. Die Reportergruppe kann auch an eine heterocyclische Base gebunden sein, die nicht der Formel I entspricht.

[0067] Reportergruppen sind in der Regel Gruppen, die die nukleinsäurebindende Verbindung sowie eine beliebige daran gebundene Nukleinsäure, von dem Rest der Flüssigkeit, d. h. der Probe (nukleinsäurebindende Verbindungen mit einer gebundenen Reportergruppe können auch als markierte nukleinsäurebindende Verbindungen, markierte Sonden oder einfach als Sonden bezeichnet werden), unterscheidbar machen. Diese Unterscheidung kann entweder durch Auswahl der Reportergruppe aus der Gruppe der direkt oder indirekt nachweisbaren Gruppen oder aus den Gruppen der immobilisierten oder immobilisierbaren Gruppen vorgenommen werden. Direkt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise fluoreszierende Verbindungen, wie Fluorescein und seine Derivate, wie Hexachlorfluorescein und Hexafluorfluorescein, Rhodamine, Psoralene, Squaraine, Porphyrine, fluoreszierende Partikel, biolumineszierende Verbindungen, wie Acridiniumester und Luminol oder die Cyanin-Farbstoffe, wie Cy-5. Beispiele für solche Verbindungen sind in EP 0 680 969 offen-

bart. Zudem sind Spin-Markierungen, wie TEMPO, elektrochemisch nachweisbare Gruppen, Ferrocen, Viologen, Schwermetall-Chelate und elektrochemilumineszierende Markierungen, wie Ruthenium-Bispyridyl-Komplexe, und Naphthochinone, Quencher-Farbstoffe, wie Dabcyl, und Nuklease-aktive Komplexe, beispielsweise Fe und Cu, geeignete nachweisbare Gruppen. Andere Beispiele für solche Verbindungen sind Europium-Komplexe. Indirekt nachweisbare Gruppen können durch eine andere Gruppierung erkannt werden, die direkt oder indirekt markiert ist. Beispiele für solche indirekt nachweisbare Gruppen sind Haptene, wie Digoxigenin oder Biotin. Digoxigenin kann beispielsweise durch Antikörper gegen Digoxigenin erkannt werden. Diese Antikörper können entweder direkt markiert werden oder können durch markierte Antikörper erkannt werden, die gegen die (Antidigoxigenin)-Antikörper gerichtet sind.

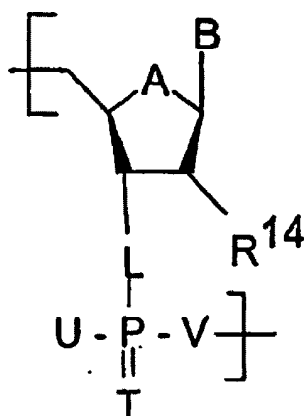
[0068] Formate auf der Basis der Erkennung von Digoxigenin sind in EP-B-0 324 474 offenbart. Biotin kann durch Avidin und ähnliche Verbindungen, wie Streptavidin und andere biotinbindende Verbindungen, erkannt werden. Die Verbindungen können wiederum direkt oder indirekt markiert werden. Weitere interessante Markierungen sind solche, die direkt durch Rasterkraftmikroskopie (AFM) oder Rastertunnelmikroskopie (STM) nachweisbar sind. Die Reportergruppe kann weiter eine Nukleotidsequenz sein, die andere Nukleotidsequenzen in der Probe nicht stört. Die Sequenz kann daher durch ein Nukleotid spezifisch erkannt werden, das eine komplementäre Sequenz enthält. Diese Nukleotidsequenz kann direkt oder indirekt markiert werden, oder kann immobilisierbar sein oder ist immobilisiert. Eine Reportergruppe kann zudem eine Festphase sein. Die Bindung der nukleinsäurebindenden Verbindung an eine Festphase kann entweder direkt oder indirekt erfolgen, wie es oben für die nachweisbare Gruppe hervorgehoben wurde. Beispiele für solche Festphasen sind Latex-Kügelchen oder Gold-Partikel. Bei einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform kann eine weitere Reportergruppe, die an der nukleinsäurebindenden Verbindung gebunden ist, eine positiv oder negativ geladene Gruppe sein, vorzugsweise eine Carboxylat-Gruppe oder ein Ammonium- $\text{N}^+\text{R}^5\text{R}^6\text{R}^{12}$ mit Substituenten, wie sie unter der oben beschriebenen Formel I angegeben sind. Diese können beispielsweise über einen Propargylen-Linker an der Base befestigt sein und können die Empfindlichkeit der MALDI-TOF-Massenspektroskopie (MALDI-TOF: Matrix unterstützte Laserdesorption/Time-of-flight-Ionisation) im positiven oder negativen Modus verstärken. Die Substituenten der Ammoniumgruppe werden vorzugsweise über Nach-Markierung in das Oligonukleotid eingebracht, d. h. bindende Verbindungen können mit Reportergruppen nachmarkiert werden, wenn eine geeignete reaktive Gruppe während der Oligonukleotidsynthese eingebracht wird, beispielsweise eine Aminogruppe, die in der Oligonukleotid-Synthese-Vorstufe mit einer Phthaloyl-Gruppe geschützt ist.

[0069] Die direkte Markierung kann durch kovalente Kopplung einer nukleinsäurebindenden Verbindung an eine reaktive Gruppe auf der festen Phase erfolgen, d. h. vorzugsweise über einen Linker. Die indirekte Markierung kann ähnlich vorgenommen werden, wie oben für die nachweisbaren Gruppen offenbart. Vorzugsweise ist die indirekte Bindung nicht-kovalent durch biospezifische Wechselwirkungen, beispielsweise solche, die aus der Gruppe Hapten-Antikörper, Vitamin-Rezeptor und Nukleinsäure-komplementärer Nukleinsäure ausgewählt sind. Wiederum sind diese Wechselwirkungen und ihre Verwendung in Nukleinsäuretests dem Fachmann geläufig.

[0070] Feste Phasen, die sich zur Immobilisierung der erfindungsgemäßen Sonde eignen, sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen, Glas, SiO_2 und TiO_2 . Die Formate für solche festen Phasen können entsprechend den Bedürfnissen der Gerätschaft und des Testformats ausgewählt werden. Beispielsweise kann eine Festphase die Form eines Kügelchens oder eines Vehikels annehmen.

[0071] Das bekannteste Rückgrat ist das natürlich vorkommende Zucker-Phosphatgerüst der Nukleinsäuren, die entweder Ribonukleosid-Untereinheiten (RNA) oder Desoxyribonukleosid-Untereinheiten (DNA) enthalten. Daher umfasst das Rückgrat der nukleinsäurebindenden Verbindung in einer bevorzugten Ausführungsform Phosphodiester-Bindungen und Ribose. In den letzten Jahren wurden nukleinsäurebindende Verbindungen beschrieben, die ähnliche Eigenschaften wie Oligonukleotide haben, aber ein anderes Rückgrat aufweisen, welche Strukturen besitzen, die im Gegensatz zu dem natürlich vorkommenden Phosphodiester-Ribose-Rückgrat auf jeden Fall von chemisch verbindenden Nukleotiden gebildet werden. Daher ist es ersichtlich, dass die Erfindung immer noch arbeitet, selbst wenn das Rückgrat der nukleinsäurebindenden Verbindung kein Oligonukleotid im strengen Sinne ist, d. h. wenn es ein modifiziertes Rückgrat aufweist. Das Rückgrat kann beispielsweise Phosphorthioate, Methylphosphonate, Phosphoramidate und Phosphortriester-Bindungen aufweisen. Peptid-Nukleinsäuren haben auch unnatürliche Bindungen. Die Modifikationen im Rückgrat können die Eigenschaften der nukleinsäurebindenden Verbindung variieren, d. h. sie können die Stabilität und Affinität steigern. Daher kann bei der erfindungsgemäß verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindung das Rückgrat eine oder mehrere Gruppierungen der allgemeinen Formel II

Formel II



umfassen, wobei:

A ausgewählt ist aus der Gruppe O, S, CH₂, N-CO-(C₁-C₁₀)-Alkyl,

L ausgewählt ist aus der Gruppe Oxy, Sulfandiyl, -CH₂- und -NR²²-,

T ausgewählt ist aus der Gruppe Oxo, Thioxo und Selenoxo,

U ausgewählt ist aus der Gruppe -OH, O⁻, -O-Reportergruppe, -SH, -S-Reportergruppe -SeH, -(C₁-C₁₀)-Alkoxy, -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₆-C₂₂)-Aryl, -(C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₁₀)-alkyl, -NR²³R²⁴ und -(O-(C₁-C₁₀)-Alkyl)_n-R²⁵, wobei n eine ganze Zahl zwischen 1 und 6 ist, oder wobei -NR²³R²⁴ zusammen mit N ein 5- bis 6-gliedriger heterocyclischer Ring ist.

V ausgewählt ist aus der Gruppe Oxy, Sulfandiyl, -CH₂- oder -NR²²-,

R¹⁴ ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -OH, -(C₁-C₆)-Alkyl, -(C₁-C₁₀)-Alkoxy, -(C₂-C₁₀)-Alkenyloxy, -Halogen, -Azido, -O-Allyl, -O-Alkynyl und -NH₂,

R²² unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe -H und -(C₁-C₁₀)-Alkyl,

R²³ und R²⁴ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₁-C₂₀)-Aryl, -(C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₁₀)-alkyl, -(C₁-C₆)-Alkyl-[NH(CH₂)_c]_d-NR²⁶R²⁷ und einer Reportergruppe,

R²⁵ ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -OH, -Halogen, -Amino, -(C₁-C₁₈)-Alkylamino, -COOH, -CONH₂ und -COO(C₁-C₄)-Alkyl und einer Reportergruppe,

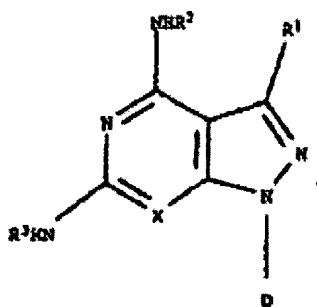
R²⁶ und R²⁷ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe -H, -(C₁-C₆)-Alkyl, und -(C₁-C₄)-Alkoxy-(C₁-C₆)-Alkyl und einer Reportergruppe,

c eine ganze Zahl von 2 bis 6 ist,

d eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, und

B eine Gruppierung der Formel I

Formel I



ist, wobei

R¹ unabhängig von X, R² oder R³ ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R², R³ unabhängig von X, R¹, R² und R³ ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) -H,

(2) (C₁-C₁₀)-Alkyl,

(3) (C₂-C₁₀)-Alkenyl,

(4) (C₂-C₁₀)-Alkynyl,

(5) (C₆-C₂₂)-Aryl,

(6) -Z-(C₁-C₁₀)-Alkyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkynyl, -Z-(C₆-C₂₂)-Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_s]-, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen

Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-\text{NO}_2$, $-\text{OR}^{12}$, $-\text{CN}$, $-\text{SH}$, $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkyl}$, $-\text{NR}^5\text{R}^6$, $-\text{N}^+\text{R}^5\text{R}^6\text{R}^{12}$, $-\text{COR}^{11}$, $-\text{NH-CONR}^5\text{R}^6$, $-\text{NH-CSNR}^5\text{R}^6$ und $-(\text{CH}_2)_n\text{-[O-(CH}_2\text{)]}_r\text{-NR}^5\text{R}^6$, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R^{11} aus der Gruppe $-\text{NHR}^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe $-\text{H}$, $-(\text{C}_1-\text{C}_{10})\text{-Alkyl}$, $-(\text{C}_2-\text{C}_{10})\text{-Alkenyl}$, $-(\text{C}_2-\text{C}_{10})\text{-Alkynyl}$, $-(\text{C}_6-\text{C}_{22})\text{-Aryl}$ und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-\text{SH}$, $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkyl}$, $-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkoxy}$, $-\text{OH}$, $-\text{NR}^5\text{R}^6$, $-\text{COR}^{11}$, $-\text{NH-CONR}^5\text{R}^6$, $-\text{NH-CSNR}^5\text{R}^6$ und $-(\text{CH}_2)_n\text{-[O-(CH}_2\text{)]}_r\text{-NR}^5\text{R}^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist; und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon.

[0072] Die bevorzugten Definitionen der Gruppen der Formel I gelten wenn nicht anders angegeben für die Formel II und die folgenden Formeln.

[0073] In den Verbindungen der Formel II ist R^{14} vorzugsweise Wasserstoff. Die bevorzugte Definition von L ist Oxy. Die bevorzugte Definition von U ist $-\text{OH}$ und die $-\text{O}$ -Reportergruppe. Die bevorzugte Definition von V ist Oxy. Die bevorzugte Definition von c ist eine ganze Zahl von 2 bis 4, und von d eine ganze Zahl von 0 bis 2. Verbindungen der Formel II sind besonders geeignet zur Aufnahme der heterocyclischen Gruppierung als integrierten Teil (vorzugsweise nicht an einem der Enden) der nukleinsäurebindenden Verbindung. Die Gruppe $\text{NR}^{23}\text{R}^{24}$ ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Dialkylaminogruppen. Im Fall dieser Gruppe, zusammen mit der Bildung des 5- oder 6-gliedrigen heterocyclischen Rings, nimmt diese vorzugsweise die Definitionen von Morpholinyl, Pyrrolidinyl oder Piperidinyl an.

[0074] Die Zucker-Konfiguration kann ausgewählt werden aus der Gruppe der $\alpha\text{-D-}$, $\beta\text{-D-}$, $\alpha\text{-L-}$ und $\beta\text{-L-}$ Konfigurationen, am stärksten bevorzugt enthält die Verbindung wenigstens eine 2'-Desoxy- $\beta\text{-D-erythropyranosyl-}$ Gruppierung oder eine $\beta\text{-D-Ribofuranosyl-}$ Gruppierung. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist D das Glycosid C-1 einer Zuckergruppierung der erfindungsgemäßen Verbindung.

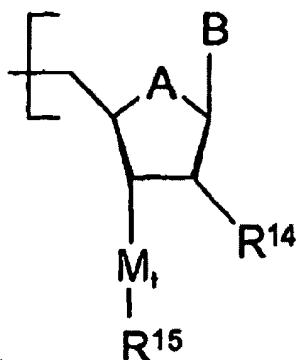
[0075] Der Zucker kann eine verschlossene Konfiguration aufweisen. LNA (Locked Nucleic Acid, verschlossene Nukleinsäure) ist eine neue Klasse von Nukleinsäure-Analoga. LNA-Oligomere gehorchen den Watson-Crick-Basenpaarungsregeln und hybridisieren an komplementäre Oligonukleotide. Verglichen mit DNA und anderen Nukleinsäure-Derivaten, liefert LNA erheblich verbesserte Hybridisierungsleistung. LNA/DNA- oder LNA/RNA-Duplexe sind thermisch viel stabiler als ähnliche Duplexe, die durch DNA oder RNA gebildet werden. Tatsächlich hat LNA die höchste Affinität gegenüber komplementärer DNA und RNA, die jemals beschrieben wurde. Im Allgemeinen ist die thermische Stabilität eines LNA/DNA-Duplex um 3°C auf 8°C pro modifizierte Base in dem Oligo erhöht. Auf den Gebieten der allgemeinen Molekularbiologie und der molekularen Diagnostik, wurden fünf Hauptgebiete für die Anwendung von LNA identifiziert, welche Fängersonden sind, nämlich Probenpräparation, Nachweis von SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismus), allelspezifische PCR, und Hybridisierungssonden, Molecular Beacons, Padlock-Sonden, Taqman-Sonden (WO92/02638 und entsprechende US-Patente US 5 210 015, US 5 804 375, US 5 487 972) und Sonden für In-situ-Hybridisierungen. In meiste Hinsicht kann die LNA wie DNA behandelt werden. LNA ist zumindest so stabil wie DNA und ist in wässrigen Puffern löslich. LNA kann mit Ethanol gefällt, getrocknet und resuspendiert werden, und kann auf Gelen, HPLC und MALDI-TOF analysiert werden. LNAs sind neue Nukleinsäure-Analoga, die die Leistung erheblich steigern können, und zwar nicht nur von Diagnostik-Tests, die die genetische Information prüfen und bewerten, sondern auch von Antisense- und anderen genetischen Medizin-Ansätzen. Diese Analoga, die genau wie ihre natürlichen Gegenstücke in den meisten Anwendungen verwendet werden können, verschließen die Nukleinsäure zur produktivsten Konformation für die Hybridisierung. Hybridisierung oder komplementäres Andocken genetischer Sonden ist die überwiegende Form der Bewertung von genetischer Information in der Diagnostik. Eine große Vielzahl von Anwendungen für LNA wurde entwickelt, einschließlich einer Anzahl von äußerst empfindlichen und spezifischen Tests, die spezifische krankheitsverursachende Einzelbasenmutationen in den Genen eines Individuums nachweisen können. Bei dem Nachweis von SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismen), welches die kleinen Variationen in unseren Genen sind, die eine Prädisposition gegenüber

Krankheit verursachen können, existieren Daten, die zeigen, dass LNA-Fängersonden von nur 8 Nukleotiden Länge zwischen mutierten und Wild-Typ-Genen in einer Probe effizienter unterscheiden können als viel längere herkömmliche Nukleinsäure-Fängersonden. Die Erfindung schlägt daher auch erfindungsgemäße Verbindungen vor, wobei beispielsweise mindestens ein Atom der Zuckereinheit, beispielsweise ein Kohlenstoffatom oder ein Sauerstoffatom an wenigstens ein anderes Atom der Zuckereinheit über wenigstens eine Brücken-gruppierung gebunden ist, die wenigstens ein Atom enthält, wodurch ein in der Konformation eingeschränkter Zucker wie oben erläutert gebildet wird. Dadurch wird der Zucker in einer verschlossenen Konfiguration fixiert.

[0076] Zur Synthese der in der vorliegenden Erfindung verwendeten Verbindungen bezieht sich der Leser auf Chemistry of Nucleosides and Nucleotides Part 1, hrsg. von L. B. Townsend, Plenum Press New York (1988), Kapitel 2: Synthesis and Properties of Purine Nucleosides and Nucleotides, S. 113–281 oder auf US-Patent 5 594 121. Es wird jedoch mehr Information nachstehend bereitgestellt.

[0077] Verschiedene chemische Strukturen können in dem Rückgrat der nukleinsäurebindenden Verbindung verwendet werden. Der Fachmann schätzt die Tatsache, dass die nukleinsäurebindende Verbindung auch ein modifiziertes 3'-Ende besitzen kann. Daher kann bei der nukleinsäurebindenden Verbindung, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, das Gerüst eine oder mehrere Gruppierungen der allgemeinen Formel III umfassen, wobei t gleich 0 oder 1 ist

Formel III



wobei für den Fall, dass t = 1 gilt:

A ausgewählt ist aus der Gruppe O, S, CH₂ und N-(C₁-C₆)-Alkyl,

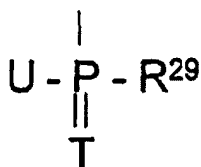
M ausgewählt ist aus der Gruppe Oxy, Sulfandiyl, -NR²²-, -(C₁-C₁₀)-Alkyl- oder -O-(C₁-C₁₀)-Alkyl-O- und -S-(C₁-C₁₀)-Alkyl-O- und -NR²²-(C₁-C₆)-Alkyl-O-,

R²² ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -(C₁-C₁₀)-Alkyl, einer Schutzgruppe und einer Reportergruppe,

R¹⁴ ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -OH, -(C₁-C₃)-Alkyl, -(C₁-C₆)-Allyl, -(C₁-C₁₀)-Alkoxy, -(C₂-C₁₀)-Alkenyloxy, -(C₂-C₁₀)-Alkinyloxy, -(O-CH₂)_n-, wobei n eine ganze Zahl von 1 bis 18 sein kann, -Halogen, -Azido, SH, -(C₁-C₁₀)-Alkylmercapto, O-Reportergruppe, O-Festphase und -NH₂,

R¹⁵ ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -(C₁-C₆)-Alkyl, -(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -(C₂-C₁₀)-Alkynyl, -(C₂-C₁₀)-Alkylcarbonyl, -(C₃-C₁₉)-Alkenylcarbonyl, -(C₃-C₁₉)-Alkylcarbonyl, -(C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₁₀)-alkyl, einer festen Phase und einer Gruppe der Formel IV

Formel IV



wobei:

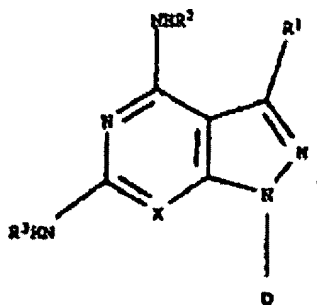
T ausgewählt ist aus der Gruppe Oxo, Thioxo und Selenoxo,

U ausgewählt ist aus der Gruppe -OH, O⁻, -O-Reportergruppe, -SH, -SeH, -(C₁-C₁₀)-Alkoxy, -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₆-C₂₂)-Aryl, -(C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₁₀)-alkyl, -NR²³R²⁴ und -(O-(C₁-C₁₀)-Alkyl)-R²⁵, wobei N eine ganze Zahl zwischen 1 und 6 ist, oder wobei -NR²³R²⁴ zusammen mit N ein 5- bis 6-gliedriger heterocyclischer Ring ist,

R²³ und R²⁴ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₁-C₂₀)-Aryl, -(C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₁₀)-alkyl, -(C₁-C₆)-Alkyl-[NH(CH₂)_c]-NR²⁶R²⁷,

R^{25} ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -OH, -Halogen, -Amino, $-(C_1-C_{18})$ -Alkylamino, -COOH, -CONH₂ und $-COO(C_1-C_4)$ -Alkyl,
 R^{26} und R^{27} unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_6)$ -Alkyl, und $-(C_1-C_4)$ -Alkoxy- $-(C_1-C_6)$ -alkyl,
 R^{29} ausgewählt ist aus der Gruppe -OR³⁰ und -SR³⁰,
 R^{30} ausgewählt ist aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl, einer Schutzgruppe, einer Festphase und einer Reportergruppe,
c eine ganze Zahl von 2 bis 6 ist,
d eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, und
B eine Gruppierung der Formel I

Formel I



ist, wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,
 R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
 - (2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,
 - (3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
 - (4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
 - (5) (C_6-C_{22}) -Aryl,
 - (6) -Z- (C_1-C_{10}) -Alkyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkenyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkynyl, -Z- (C_6-C_{22}) -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,
 - (7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,
- wobei R^{11} aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist,
wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, und wobei für den Fall, dass t = 0 gilt:

R^{15} gleich -H ist.

oder beliebige Salze davon.

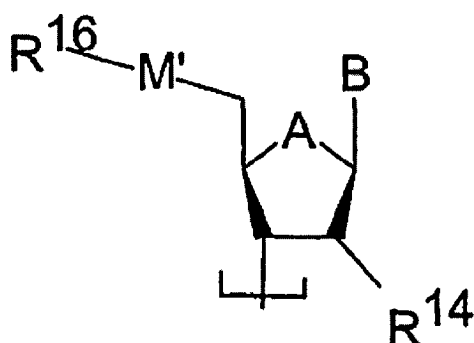
[0078] Für die Definitionen und Präferenzen gelten wenn nicht anders für Formel III spezifisch angegeben die Einzelheiten, wie sie für die Substituenten unter den Formeln I und II hervorgehoben sind. Das 3'-Ende kann 2',3'-Dideoxyribose sein, d. h. wobei t = 0, R^{15} gleich -H und R^{14} gleich -H ist oder ein Analogon davon. Dies ist von Interesse, wenn eine enzymatische Termination notwendig ist, wenn die erfindungsgemäß verwendete nukleinsäurebindende Verbindung mit Triphosphat-Verbindungen verlängert wird, die auch in der Natur als Triphosphate von Adenosin, Guanosin, Uridin, Cytidin oder Thymin vorkommen, oder mit Desoxyderivaten der

Triphosphate von Adenosin, Guanosin, Cytidin oder Thymidin. Die Erfindung betrifft jedoch auch die Verlängerung von Primern, die nur Nukleotide enthalten, welche in der Natur vorkommen, oder erfindungsgemäße nukleinsäurebindende Verbindungen mit den erfindungsgemäßen Triphosphat-Verbindungen der allgemeinen Formel VIII.

[0079] Nukleinsäurebindende Verbindungen, bei denen die Gruppe der Formel I an Untereinheiten gebunden ist, beispielsweise das Nukleotid am 3'-Ende der Verbindung, eignen sich entweder als Ausgangsverbindung zur Synthese längerer Verbindungen oder/und als endmarkierte Sonden. Diese Gruppe von Verbindungen ist besonders bevorzugt, weil die endständige Position der Sonden im allgemeinen hinsichtlich der chemischen Gruppierungen am tolerantesten ist.

[0080] Hinsichtlich der Modifikationen des 3'-Endes der nukleinsäurebindenden Verbindung ist es ersichtlich, dass auch das 5'-Ende der nukleinsäurebindenden Verbindung modifiziert sein kann. Daher kann eine nukleinsäurebindende Verbindung, wie oben aufgeführt, eine Rückgratgruppierung der Formel V

Formel V



umfassen, wobei

A ausgewählt ist aus der Gruppe O, S, CH₂ und N-(C₁-C₆)-Alkyl,

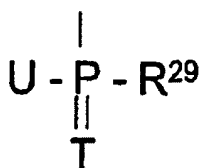
M' ausgewählt ist aus der Gruppe Oxy, Sulfandiyl, -NR²²-, -(C₁-C₁₀)-Alkyl- oder -O-(C₁-C₁₀)-Alkyl-O- und -S-(C₁-C₁₀)-Alkyl-O-, und -NR²²-(C₁-C₆)-Alkyl-O-,

R²² ausgewählt ist aus der Gruppe -H, einer Schutzgruppe, einer Reportergruppe und -(C₁-C₁₀)-Alkyl,

R¹⁴ ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -OH, -(C₁-C₁₀)-Alkoxy, -(C₂-C₁₀)-Alkenyloxy, -(C₂-C₁₀)-Alkinyloxy, -Halogen, -Azido, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkylmercapto, O-Reportergruppe, O-Festphase und -NH₂,

R¹⁶ ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -(C₁-C₈)-Alkyl, -(C₂-C₁₈)-Alkenyl, -(C₂-C₁₈)-Alkynyl, -(C₂-C₁₈)-Alkylcarbonyl, -(C₃-C₁₉)-Alkenylcarbonyl, -(C₃-C₁₉)-Alkylcarbonyl, -(C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₈)-alkyl, einer Schutzgruppe oder einer Verbindung der Formel IV

Formel IV



wobei:

T ausgewählt ist aus der Gruppe Oxo, Thioxo und Selenoxo,

U ausgewählt ist aus der Gruppe -OH, -SH, -SeH, -(C₁-C₁₀)-Alkoxy, -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₆-C₂₂)-Aryl, -(C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₁₀)-alkyl, -NR²³R²⁴ und -(O-(C₁-C₁₀)-Alkyl)-R²⁵, wobei n eine ganze Zahl zwischen 1 und 6 ist, wobei -NR²³R²⁴ zusammen mit N ein 5- bis 6-gliedriger heterocyclischer Ring ist.

R²³ und R²⁴ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₁-C₂₀)-Aryl, -(C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₁₀)-alkyl, -(C₁-C₆)-Alkyl-[NH(CH₂)_n]-NR²⁶R²⁷,

R²⁵ ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -OH, -Halogen, -Amino, -(C₁-C₁₈)-Alkylamino, -COOH, -CONH₂ und -COO(C₁-C₄)-Alkyl,

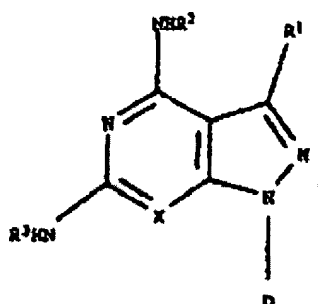
R²⁶ und R²⁷ unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, -(C₁-C₆)-Alkyl, und -(C₁-C₄)-Alkoxy-(C₁-C₆)-alkyl,

R²⁹ ausgewählt ist aus der Gruppe -OR³⁰ und -SR³⁰,

R³⁰ ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -(C₆-C₂₂)-Aryl, einer Schutzgruppe, einer Festphase und einer Reportergruppe, und

c eine ganze Zahl von 2 bis 6 ist,
d eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, und
B eine Gruppierung der Formel I

Formel I



ist, wobei

R¹ unabhängig von X, R² oder R³ ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,
R², R³ unabhängig von X, R¹, R² und R³ ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
 - (2) (C₁-C₁₀)-Alkyl,
 - (3) (C₂-C₁₀)-Alkenyl,
 - (4) (C₂-C₁₀)-Alkynyl,
 - (5) (C₆-C₂₂)-Aryl,
 - (6) -Z-(C₁-C₁₀)-Alkyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkynyl, -Z-(C₆-C₂₂)-Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,
 - (7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,
- wobei R¹¹ aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist,
wobei R⁵, R⁶ und R¹² jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -(C₂-C₁₀)-Alkynyl, -(C₆-C₂₂)-Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -(C₁-C₆)-Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R¹, R² oder R³ ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, und beliebige Salze davon.

[0081] Eine sehr bevorzugte Verbindung ist eine Verbindung der Formel V, wobei M' gleich O, R¹⁶ gleich H und R¹⁴ aus der Gruppe Wasserstoff und Hydroxyl ausgewählt ist.

[0082] Diese Verbindungen können beispielsweise als 5'-terminal markierte Sonden verwendet werden. Hinsichtlich der Definitionen der Substituenten gelten wenn nicht anders angegeben die wie oben angegebenen Definitionen.

[0083] Das Rückgrat der nukleinsäurebindenden Verbindung trägt die basenpaarenden Heterocyklen, so dass die Verbindung an eine Nukleinsäure mit einer komplementären Sequenz binden kann. Der Grad der Komplementarität in den natürlich vorkommenden Basen reicht vorzugsweise von 70% bis zu 100% in einer Folge von Basen in einem Bereich, der die Bindung vollzieht, verglichen mit der Folge der gleichen Länge in dem Bereich der Nukleinsäure, der gebunden werden soll. Deletionen und Insertionen von Untereinheiten in der gleichen Sequenz werden daher in dieser Berechnung als Lücken bis zur nächsten passenden Base gezählt, und reduzieren somit die Komplementarität über so viele Basen, wie die Lücke enthält.

[0084] Bevorzugte Gerüste enthalten Zucker-Phosphat-Gruppierungen. Von diesen sind die Gerüste, die Desoxy-Zucker enthalten, weiter bevorzugt.

[0085] Jede Gruppierung in dem Gerüst mit einer Gruppierung, die mit einer Nukleinsäure komplementärer Sequenz Basenpaare bilden kann, einschließlich der erfindungsgemäßen Gruppierungen, wird als Untereinheit bezeichnet.

[0086] Man kennt Verbindungen, deren Gerüste aus verschiedenen Arten von Untereinheiten gemischt sind. Vor kurzem wurde eine neue Art von nicht-natürlichen nukleinsäurebindenden Verbindungen beschrieben. Sie werden als Peptid-Nukleinsäure (PNA) bezeichnet, da sie wenigstens eine Peptidbindung zwischen den Untereinheiten enthalten (WO 92/20702). Die erfindungsgemäß verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindungen können beliebig lang sein. Aufgrund der Einfachheit der chemischen Synthese sind jedoch Verbindungen mit weniger als 100, stärker bevorzugt 10 bis 30 Untereinheiten, beispielsweise Nukleosiden, bevorzugt.

[0087] Die Veränderung der thermischen Stabilität (T_m) eines Duplex, der zwischen einer erfindungsgemäß verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindung, die beispielsweise als Sonde verwendet wird, und einer zweiten nukleinsäurebindenden Verbindung gebildet wird, mit den heterocyclischen Gruppen der erfindungsgemäß verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindungen und anderen Analoga ermöglicht die Optimierung der Duplex-Stabilität und Unterscheidung der Fehlpaarung (siehe beispielsweise Kwok, Shirley; Chang, Sheng Yung; Sninsky, John J.; Wang, Alice. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. PCR Methods Appl. (1994), 3(4), 39–47). Ein geeigneter Aspekt der Veränderung von T_m beruht auf der Tatsache, dass Adenin-Thymin-(A-T)-Duplices eine niedrigere T_m als Guanin-Cytosin-(G-C)-Duplices haben, und zwar zum Teil aufgrund der Tatsache, dass die A-T-Duplices 2 Wasserstoffbrückenbindungen pro Basenpaar haben, wohingegen die G-C-Duplices 3 Wasserstoffbrückenbindungen pro Basenpaar haben. Bei heterogenen Oligonukleotid-Arrays, in denen die Basen nicht-gleichförmig verteilt sind, kann es beispielsweise oft schwierig sein, die Hybridisierungsbedingungen für alle Sonden gleichzeitig zu optimieren. Somit ist es in einigen Ausführungsformen erwünscht, die G-C-reichen Duplices zu destabilisieren und/oder die Stabilität A-T-reicher Duplices zu steigern, während die Sequenzspezifität der Hybridisierung aufrechterhalten wird. Dies führt zu einer Harmonisierung oder Egalisierung des Beitrags jedes Basenpaars zur Schmelztemperatur eines Duplex. Dies erfolgt beispielsweise durch Austausch von einer oder mehreren heterocyclischen Gruppen in der nukleinsäurebindenden Verbindung, die als Sonde (oder als Ziel-Nukleinsäure) verwendet wird, gegen bestimmte modifizierte Nicht-Standard-Basen. Daher kann die Erfindung nukleinsäurebindende Verbindungen betreffen, die erfindungsgemäß verwendet werden, wobei die nukleinsäurebindenden Verbindungen zusätzlich zu einer heterocyclischen Gruppe der Formel I noch eine heterocyclische Gruppe enthalten, die sich von der allgemeinen Formel I unterscheidet, d. h. wenigstens eine andere heterocyclische Gruppe. Die Substitution von Guaninresten mit 7-Desazaguanin destabilisiert beispielsweise in der Regel Duplices, wohingegen der Austausch von Adenin-Resten gegen 2,6-Diaminopurin die Duplex-Stabilität erhöht. Eine Reihe anderer modifizierter Basen wird ebenfalls in die Nukleinsäuren eingeführt, um die Gesamt-Duplexstabilität zu steigern oder zu senken, während die Spezifität der Hybridisierung aufrecht erhalten bleibt. Dieser Einbau von 6-Azapyrimidin-Analoga in Oligonukleotid-Sonden senkt in der Regel ihre Bindungsaffinität für komplementäre Nukleinsäuren. Viele 5-substituierte Pyrimidine steigern im Wesentlichen die Stabilität von Hybriden, in denen sie statt der nativen Pyrimidine in der Sequenz eingesetzt wurden. Beispiele umfassen 5-Brom-, 5-Methyl-, 5-Propinyl-, 5-(Imidazol-2-yl) und 5-(Thiazol-2-yl)-Derivate von Cytosin und Uracil. Die zusätzliche heterocyclische Gruppe ist vorzugsweise ein Pyrrolo-[2,3-d]-pyrimidin oder ein Pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidin oder ein Analogon davon, insbesondere die Analoga von Adenin oder Guanin. Man beachte, dass die Erfindung auch den Fall betrifft, bei dem alle anderen heterocyclischen Gruppen solche sind, die in der Natur als Adenin, Guanin, Uracil, Cytosin oder Thymin vorkommen. Viele modifizierte Nukleoside, Nukleotide und verschiedene Basen, die sich zum Einbau in Nukleoside eignen, sind kommerziell erhältlich von den Herstellern, einschließlich der Chemiefabrik SIGMA (Saint Louis, Mo.), R&D Systems (Minneapolis, Minn.), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, N. J.), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Kalif.), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Md.), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz), Invitrogen, San Diego, Kalif., und Applied Biosystems (Foster City, Kalif.), sowie viele andere kommerzielle Quellen, die dem Fachmann bekannt sind. Verfahren zum Anbinden von Basen an Zuckergruppierungen zur Bildung von Nukleosiden sind bekannt. Siehe beispielsweise Lukevics und Zablocka (1991), Nucleoside Synthesis: Organosilicon Methods Ellis Horwood Limited Chichester, West Sussex, England und die dort zitierten Literaturstellen. Verfahren zur Phosphorylierung von Nukleosiden unter Bildung von Nukleotiden und zum Einbau von Nukleotiden in Oligonukleotide sind ebenfalls bekannt. Siehe Agrawal (Hrsg.) (1993) Protocols for Oligonucleotides and Analogues, Synthesis and Properties, Methods in Molecular Biology Bd. 20, Humana Press, Towota, N. J. und die dort zitierten Literaturstellen. Siehe ebenfalls Crooke und Lebleu, und Sanghvi and Cook, und die dort zitierten Literaturstellen, siehe

beide oben.

[0088] Bei einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung erfindungsgemäß verwendete nukleinsäurebindende Verbindungen, wobei die nukleinsäurebindende Verbindung zudem am 3'-Ende neben einer heterocyclischen Gruppe der Formel I eine heterocyclische Gruppe enthält, die sich von der Gruppe der allgemeinen Formel I unterscheidet, d. h. wenigstens eine weitere heterocyclische Gruppe. Die nukleinsäurebindende Verbindung umfasst zudem eine heterocyclische Gruppe, die ein Pyrrolo-[2,3-d]-pyrimidin oder ein Pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidin oder ein Analogon davon ist, vorzugsweise das Analogon von Guanin oder Adenin.

[0089] Die erfindungsgemäß verwendete nukleinsäurebindende Verbindung kann an eine zweite nukleinsäurebindende Verbindung binden, wobei die erfindungsgemäß verwendete nukleinsäurebindende Verbindung und die zweite nukleinsäurebindende Verbindung durch Basenpaarung in paralleler oder antiparalleler Orientierung aneinander gebunden sind. Neben den heterocyclischen Gruppen der Formel I mit Substituenten, wie sie oben definiert sind, kann die erfindungsgemäß verwendete nukleinsäurebindende Verbindung eine oder mehrere andere natürliche Nukleobasen enthalten, die nicht in der Natur vorkommen, wie beispielsweise Nukleobasen mit den erfindungsgemäßen heterocyclischen Gruppen, heterocyclischen Gruppen wie Pyrrolo-[2,3-d]-pyrimidin oder Pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidin oder Analoga davon, vorzugsweise die Analoga von Guanin oder Adenin oder 7-Desazaguanin. Weitere nicht-natürliche heterocyclische Gruppen sind dem Fachmann bekannt.

[0090] Eine erfindungsgemäß verwendete nukleinsäurebindende Verbindung, bei der die heterocyclische Gruppe der Formel I wie oben definiert ist, kann eingebaut werden, damit ein durch die Anbindung der Reportergruppen erzeugtes Absinken des Schmelzpunktes kompensiert wird, und zwar vorzugsweise 1 bis 5 Nukleotide von dem Nukleotid getrennt, an dem die Reportergruppe gebunden ist. Dies beruht darauf, dass eine Reportergruppe zu Störungen der Hybridisierungseffizienz einer nukleinsäurebindenden Verbindung nahe dem Punkt oder Nukleotid, an dem die Reportergruppe gebunden ist führt.

[0091] Eine erfindungsgemäß verwendete nukleinsäurebindende Verbindung, bei der die heterocyclische Gruppe der Formel I wie vorstehend definiert ist, kann eingebaut werden, damit ein Absinken des Schmelzpunktes kompensiert wird, der durch Fehlpaarungs-Unterscheidung erzeugt wird. Dieses Problem wurde von Kwok, Shirley; Chang, Sheng Yung; Sninsky, John J.; Wang, Alice. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. PCR Methods Appl. (1994), 3(4), 39–47, erörtert. Dies eignet sich besonders zur Amplifikation von viralen Subtypen, bei denen die Hybridisierungsfolge keine komplementären Basen über die Gesamtlänge der Folge hat.

[0092] Eine erfindungsgemäß verwendete nukleinsäurebindende Verbindung, in der eine Schutzgruppe ein oder zwei Wasserstoffatome einer -OH-, -SH-, -NH₂-, -NH-Alkyl-, -NH-Alkenylen-, -NH-Alkinylen- oder einer NH-Arylgruppe ersetzt, obschon die erfindungsgemäß verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindungen vorzugsweise nur wenige oder sogar keine Schutzgruppen enthalten.

[0093] Die nukleinsäurebindende Verbindung kann hergestellt werden in Lösung oder vorzugsweise auf einer festen Phase, wobei man geeigneterweise eine Automatiksynthesevorrichtung einsetzt. Die Oligomere können durch aufeinander folgendes Kondensieren eines Mononukleotids, das in jedem Fall eine Nukleotid-Base besitzt, an einen geeignet derivatisierten Träger oder an eine wachsende Oligomerkette schrittweise zusammengebaut werden. Alternativ können die nukleinsäurebindenden Verbindungen zusammengebaut werden durch Verbinden der Dinukleotide oder Trinukleotide [S. Beaucage et al., Tetrahedron, 48 (12), 2223–2311, (1992); und Tetrahedron, 48 (28), 6123–6194, (1993)]. Dies ist besonders vorteilhaft bei der Synthese von Oligonukleotiden, die modifizierte Phosphatbrücken enthalten.

[0094] Die Oligonukleotide werden mit Verfahren zusammengebaut, die dem Fachmann bekannt sind, wie das Triester-Verfahren und, das H-Phosphonat-Verfahren oder das Phosphoramidit-Verfahren [E. Sonveaux, (1986), Bioorganic Chemistry, 14, 274–325; S. L. Beaucage et al., (1992), Tetrahedron, 48, 2223–2311].

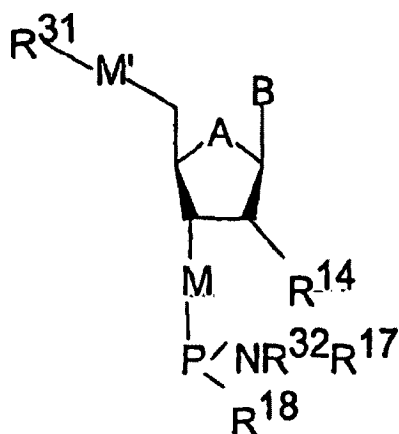
[0095] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können vorteilhaft bei der Oligonukleotid-Synthese verwendet werden, da die Ammoniak-Hydrolyse der Schutzgruppen der Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-Nukleoside schneller erfolgt als die langsame Ammoniakhydrolyse von 2-Amino-Adenosin, das mehrere Tage in Anspruch nimmt.

[0096] Verfahren zur chemischen Synthese der erfindungsgemäßen nukleinsäurebindenden Verbindungen aktivierter Untereinheiten, wobei die Untereinheit eine Gruppe der Formel I enthält. Das am stärksten bevorzugte Verfahren der chemischen Synthese verwendet den Phosphoramiditansatz. Ein besonders bevorzugtes

Verfahren verwendet eine aktivierte Untereinheit von einer oder mehreren Verbindungen der allgemeinen Formel VII. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass es sehr geeignet ist, und dass die Reagenzien, beispielsweise ein Phosphoramidit, das eine Verbindung einer Gruppe der Formel I enthält, möglicherweise leicht aufgenommen werden können.

[0097] Verbindungen der allgemeinen Formel VII sind Verbindungen

Formel VII



wobei:

A ausgewählt ist aus der Gruppe O, S, CH₂, und N-(C₁-C₆)-Alkyl,

M und M unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe Oxy, Sulfandiyl, -NR²²-, -(C₁-C₁₀)-Alkyl- oder -O-(C₁-C₁₀)-Alkyl-O- und -S-(C₁-C₁₀)-Alkyl-O- und -NR²²-(C₁-C₆)-Alkyl-O-,

R²² ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -(C₁-C₁₀)-Alkyl,

R¹⁴ ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -OR³¹, -(C₁-C₁₀)-Alkoxy, -(C₂-C₁₀)-Alkenyloxy, -(C₂-C₁₀)-Alkinyloxy, -Halogen, -Azido, -NHR³¹, -SR³¹,

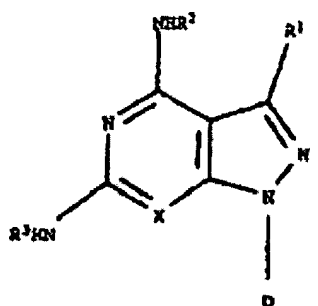
R³¹ eine Schutzgruppe oder eine Reportergruppe ist,

R³² und R¹⁷ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe -H, -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -(C₆-C₂₂)-Aryl oder wobei NR³²R¹⁷ zusammen mit N einen 5- bis 6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden können.

R¹⁸ ausgewählt ist aus der Gruppe -(C₂-C₆)-Alkenyloxy, substituiertem oder unsubstituiertem -(C₁-C₆)-Alkyl, unsubstituiertem -(C₁-C₆)-Alkoxy oder -(C₁-C₆)-Alkoxy, das ein oder mehrmals mit einer Gruppe substituiert ist, ausgewählt aus -Halogen, p-Nitroaryloxy und -Cyano, und

B eine Gruppe der Formel I

Formel I



ist, wobei

R¹ unabhängig von X, R² oder R³ ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R², R³ unabhängig von X, R¹, R² und R³ ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
- (2) (C₁-C₁₀)-Alkyl,
- (3) (C₂-C₁₀)-Alkenyl,
- (4) (C₂-C₁₀)-Alkinyl,
- (5) (C₆-C₂₂)-Aryl,
- (6) -Z-(C₁-C₁₀)-Alkyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkinyl, -Z-(C₆-C₂₂)-Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-,

-CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-NO_2$, $-OR^{12}$, $-CN$, $-SH$, $-S-(C_1-C_6)-Alkyl$, $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R^{11} aus der Gruppe $-NHR^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})-Alkyl$, $-(C_2-C_{10})-Alkenyl$, $-(C_2-C_{10})-Alkynyl$, $-(C_6-C_{22})-Aryl$ und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-SH$, $-S-(C_1-C_6)-Alkyl$, $-(C_1-C_6)-Alkoxy$, $-OH$, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

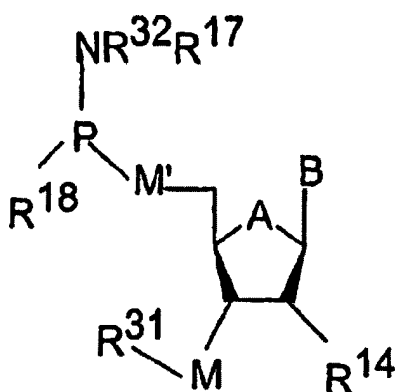
X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, mit der Maßgabe, dass eine oder zwei Wasserstoffatome von einer beliebigen $-OH$ -, $-SH$ -, $-NH_2$ -, $-NH-Alkyl$ -, $-NH-Alkenyl$ -, $-NH-Alkynyl$ - oder $-NH-Aryl$ gruppe durch eine Schutzgruppe substituiert sind, und beliebige Salze davon.

[0098] Nach dem Einbringen geeigneter Schutzgruppen für die Aminogruppen an Position 2 und 6 und für die freie 5'-Hydroxylgruppe der Zuckereinheit, werden die Monomere in die entsprechenden Phosphonat- oder Phosphoramidit-Derivate umgewandelt. Geeignete Amino-Schutzgruppen, beispielsweise in der Form der Acyl-Schutzgruppen (beispielsweise Isobutyryl, Acetyl oder Phenoxyacetyl), werden mittels bekannter Verfahren eingebracht [J. C. Schulhof, D. Molko, R. Teoule, (1987), Nucleic Acids Res., 15, 397–416]. Ein Beispiel für eine geeignete Schutzgruppe für die freie 5'-OH-Gruppe des Zuckers ist der 4,4'-Dimethoxytrityl-Rest, der mit bekannten Verfahren eingefügt wird [C. B. Reese (1978), Tetrahedron, 34, 3143; D. Flockerzi et al., (1981), Liebigs Ann. Chem., 1568]. Die Monomere, die derart geschützt wurden, können gemäß einem Protokoll von Froehler et al. [B. C. Froehler et al., (1986), Nucleic Acids Res., 14, 5399] in die entsprechenden Phosphonate umgewandelt werden. Cyanoethylphosphoramidit-Derivate können beispielsweise hergestellt werden durch Umsetzen der Monomere mit Chlor- β -cyanoethoxy-(N,N-diisopropylamio)phosphan in wasserfreiem Dichlormethan [N. D. Sinha et al., (1984), Nucleic Acids Res., 12, 4539].

[0099] Verbindungen, die wie diejenigen der Formel VII in der chemischen Synthese verwendet werden können, sind Verbindungen der allgemeinen Formel IX

Formel IX



wobei:

A ausgewählt ist aus der Gruppe O, S, CH_2 , und $N-(C_1-C_6)-Alkyl$,

M und M' unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe Oxy, Sulfandiyl, $-NR^{22}$ -, $-(C_1-C_{10})-Alkyl$ - oder $-O-(C_1-C_{10})-Alkyl-O$ - und $-S-(C_1-C_{10})-Alkyl-O$ - und $-NR^{22}-(C_1-C_6)-Alkyl-O$ -,

R^{22} ausgewählt ist aus der Gruppe -H, und $-(C_1-C_{10})-Alkyl$,

R^{14} ausgewählt ist aus der Gruppe -H, $-OR^{31}$, $-(C_1-C_{10})-Alkoxy$, $-(C_2-C_{10})-Alkenyloxy$, $-(C_2-C_{10})-Alkenyloxy$, -Halogen, -Azido, $-NHR^{31}$, $-SR^{31}$, oder einer O-Reportergruppe

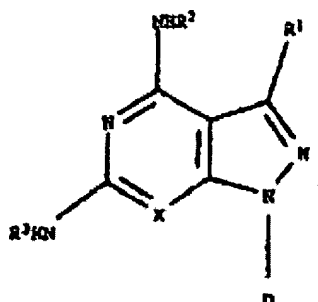
R^{31} eine Schutzgruppe oder eine Reportergruppe ist,

R^{32} und R^{17} unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -alkenyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl oder wobei $NR^{32}R^{17}$ zusammen mit N einen 5- bis 6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden können.

R^{18} ausgewählt ist aus der Gruppe $-(C_2-C_6)$ -Alkenyloxy, substituiertem oder unsubstituiertem $-(C_1-C_6)$ -Alkyl, unsubstituiertem $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy oder $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, das ein oder mehrmals mit einer Gruppe substituiert ist, ausgewählt aus -Halogen, p-Nitroaryloxy und -Cyano, und

B eine Gruppe der Formel I

Formel I



ist, wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
- (2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,
- (3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
- (4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
- (5) (C_6-C_{22}) -Aryl,
- (6) $-Z-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-Z-(C_6-C_{22})$ -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,
- (7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-NO_2$, $-OR^{12}$, -CN, -SH, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R^{11} aus der Gruppe $-NHR^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

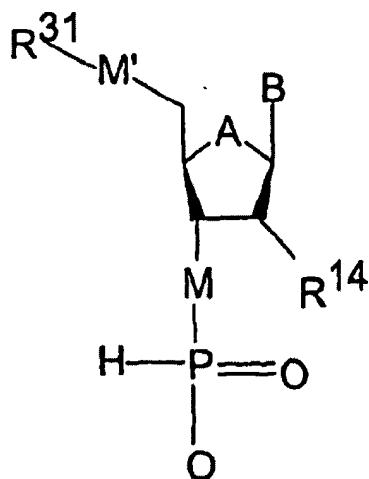
X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt,

mit der Maßgabe, dass eine oder zwei Wasserstoffatome von einer beliebigen -OH-, -SH-, $-NH_2$ -, $-NH$ -Alkyl-, $-NH$ -Alkenyl-, $-NH$ -Alkynyl- oder $-NH$ -Arylgruppe durch eine Schutzgruppe substituiert sind, und beliebige Salze davon.

[0100] Verbindungen, die sich zur chemischen Synthese der nukleinsäurebindenden Verbindungen wie oben erwähnt und deren Vorstufen eignen, sind Verbindungen der allgemeinen Formel X

Formel X



wobei:

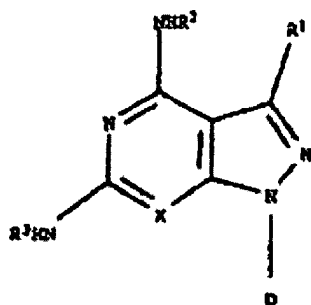
M und M' unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe Oxy, Sulfandiyl, $-NR^{22}$ -, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl- oder $-O-(C_1-C_{10})$ -Alkyl-O- und $-S-(C_1-C_{10})$ -Alkyl-O-, und $-NR^{22}-(C_1-C_6)$ -Alkyl-O-,

R^{22} ausgewählt ist aus der Gruppe -H, und $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl,

R^{14} ausgewählt ist aus der Gruppe -H, $-OR^{31}$, $-(C_1-C_{10})$ -Alkoxy, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyloxy, $-(C_2-C_{10})$ -Alkinyloxy, -Halogen, -Azido, $-NHR^{31}$, $-SR^{31}$, oder O-Reportergruppe,

R^{31} eine Schutzgruppe oder eine Reportergruppe,

Formel I



ist, wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) -H,

(2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,

(3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,

(4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,

(5) (C_6-C_{22}) -Aryl,

(6) $-Z-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-Z-(C_6-C_{22})$ -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-NO_2$, $-OR^{12}$, -CN, -SH, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R^{11} aus der Gruppe $-NHR^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH,

$-\text{NR}^5\text{R}^6$, $-\text{COR}^{11}$, $-\text{NH}-\text{CONR}^5\text{R}^6$, $-\text{NH}-\text{CSNR}^5\text{R}^6$ und $-(\text{CH}_2)_n[\text{O}-(\text{CH}_2)_r]_s-\text{NR}^5\text{R}^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

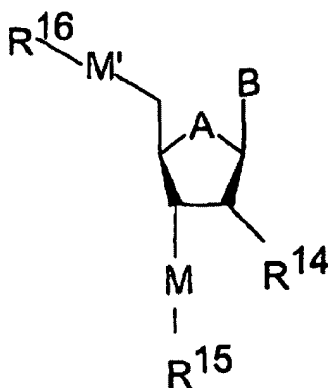
D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, mit der Maßgabe, dass eine oder zwei Wasserstoffatome von einer beliebigen $-\text{OH}-$, $-\text{SH}-$, $-\text{NH}_2-$, $-\text{NH}-\text{Alkyl}-$, $-\text{NH}-\text{Alkenylen}-$, $-\text{NH}-\text{Alkinylen}-$ oder $-\text{NH}-\text{Arylgruppe}$ durch eine Schutzgruppe substituiert sind, und beliebige Salze davon.

[0101] Bei einer anderen Option, die sich stärker für lange Oligomere und für solche, die auf neutralen Gerüsten beruhen, eignet, werden die Oligomere enzymatisch hergestellt. In diesem Fall wird ein Ausgangs-Oligomer mit einer Polymerase und einem Triphosphat oder einem modifizierten Triphosphat umgesetzt, so dass ein Monophosphat oder ein modifiziertes Monophosphat an einem Ende des Oligomers gebunden wird, so dass das Oligomer verlängert wird. Für dieses Verfahren kennt der Fachmann auch mehrere mögliche Formate, wie den Nick-Translations-Ansatz oder die einfache Primerextension (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning – A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989).

[0102] Ein Verfahren für die enzymatische Synthese einer erfindungsgemäß verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindung, kann das Umsetzen einer Triphosphat-Untereinheit mit einem Primer umfassen, mit einer Nukleinsäure als Matrice zur Verlängerung des Primers, wobei die Triphosphat-Untereinheit eine heterocyclische Gruppe der Formel I enthält. Die Triphosphat-Untereinheit kann die Formel VI haben. Es können beispielsweise 7- oder 8-substituierte 7-Desaza-2'-desoxyadenosin- und Guanosin-Triphosphate leicht enzymatisch durch verschiedene DNA-Polymerasen in DNA eingebracht werden (WO 00/68422).

[0103] Verbindungen der allgemeinen Formel VI sind Verbindungen, wobei

Formel VI



wobei

A ausgewählt ist aus der Gruppe O, S, CH_2 , und $\text{N}-(\text{C}_1-\text{C}_6)-\text{Alkyl}$,

M und M' unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe Oxy, Sulfandiyl, $-\text{NR}^{22}-$, $-(\text{C}_1-\text{C}_{10})-\text{Alkyl}-$ oder $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_{10})-\text{Alkyl}-\text{O}-$ und $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_{10})-\text{Alkyl}-\text{O}-$, und $-\text{NR}^{22}-(\text{C}_1-\text{C}_6)-\text{Alkyl}-\text{O}-$,

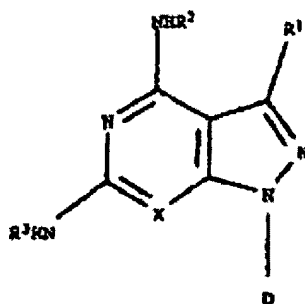
R^{22} ausgewählt ist aus der Gruppe $-\text{H}$, $-(\text{C}_1-\text{C}_{10})-\text{Alkyl}$, einer Schutzgruppe und einer Reportergruppe,

R^{14} ausgewählt ist aus der Gruppe $-\text{H}$, $-\text{OR}^{31}$, $-(\text{C}_1-\text{C}_{10})-\text{Alkoxy}$, O-Schutzgruppe, S-Schutzgruppe, NH_2 -Schutzgruppe, $-(\text{C}_2-\text{C}_{10})-\text{Alkenyloxy}$, $-(\text{C}_2-\text{C}_{10})-\text{Alkinyloxy}$, $-\text{Halogen}$, $-\text{Azido}$, SH , $-(\text{C}_1-\text{C}_{10})-\text{Alkylmercapto}$ und $-\text{O-Festphase}$,

R^{15} und R^{16} unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe $-\text{H}$, $-(\text{C}_1-\text{C}_6)-\text{Alkyl}$, $-(\text{C}_2-\text{C}_{10})-\text{Alkenyl}$, $-(\text{C}_2-\text{C}_{10})-\text{Alkinyl}$, $-(\text{C}_2-\text{C}_{10})-\text{Alkylcarbonyl}$, $-(\text{C}_3-\text{C}_{19})-\text{Alkenylcarbonyl}$, $-(\text{C}_3-\text{C}_{19})-\text{Alkinylcarbonyl}$, $-(\text{C}_6-\text{C}_{14})-\text{Aryl}-(\text{C}_1-\text{C}_{10})-\text{alkyl}$, einer Schutzgruppe und einer Festphase

B die Bindung zu einer Gruppierung der Formel I

Formel I



ist, wobei

R^1 unabhängig von X , R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X , R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
- (2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,
- (3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
- (4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
- (5) (C_6-C_{22}) -Aryl,
- (6) -Z- (C_1-C_{10}) -Alkyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkenyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkynyl, -Z- (C_6-C_{22}) -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,
- (7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s, wobei R¹¹ aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist, wobei R⁵, R⁶ und R¹² jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

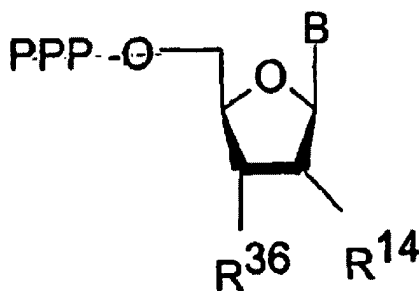
D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt,

wobei gegebenenfalls wenigstens eine Schutzgruppe eine oder zwei Wasserstoffatome einer beliebigen -OH, -SH-, -NH₂-, -NH-Alkyl-, -NH-Alkenyl-, -NH-Alkynyl- oder -NH-Arylgruppe ersetzt, und beliebige Salze davon.

[0104] In diesen Verbindungen ist -M'R¹⁶ vorzugsweise eine Triphosphat-Gruppe, und -MR¹⁵ ist OH, am stärksten bevorzugt ist R¹⁴ gleich -H.

[0105] Verbindungen für die Enzymsynthese einer erfindungsgemäß verwendeten Nukleinsäurebindenden Verbindung können die Formel VIII

Formel VIII



haben, wobei

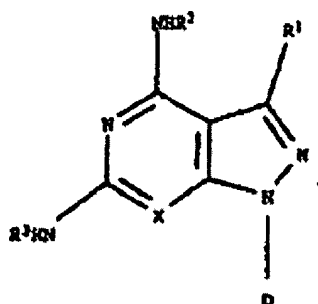
PPP eine Triphosphatgruppe, eine Thiotriphosphatgruppe oder ein Analogon davon ist,

R^{14} ausgewählt ist aus der Gruppe -H, -OH, $-(C_1-C_{10})$ -Alkoxy, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyloxy, $-(C_2-C_{10})$ -Alkinyloxyhalogen, -Azido und NH_2 ,

R^{36} ausgewählt ist aus der Gruppe -H und -OH, und

B eine Gruppe der Formel I

Formel I



ist, wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) -H,

(2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,

(3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,

(4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,

(5) (C_6-C_{22}) -Aryl,

(6) $-Z-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-Z-(C_6-C_{22})$ -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-NO_2$, $-OR^{12}$, -CN, -SH, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R^{11} aus der Gruppe $-NHR^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt,

wobei gegebenenfalls wenigstens eine Schutzgruppe eine oder zwei Wasserstoffatome von einer beliebigen -OH-, -SH-, $-NH_2$ -, -NH-Alkyl-, -NH-Alkenylen-, -NH-Alkinylen- oder -NH-Arylgruppe ersetzt,

und beliebige Salze davon.

[0106] 3'-Desoxy- und 2'-3'-Didesoxytriphosphat-Untereinheiten gemäß der Formel VIII können beispielsweise als Terminationsnukleotide bei Sequenzierverfahren verwendet werden.

[0107] Das vorstehend genannte Verfahren für die Enzymsynthese verwendet stärker bevorzugt als Triphosphat-Untereinheit eine Verbindung der Formel VIII wie oben definiert.

[0108] Durch die vorstehenden Verfahren kann man prinzipiell nur ein Monomer, das die erfindungsgemäße Gruppierung enthält, in eine nukleinsäurebindende Komponente einführen, aber bei Bedarf auch mehr als eine. Dies ist besonders möglich mit chemischen Verfahren für die Synthese der nukleinsäurebindenden Verbindungen.

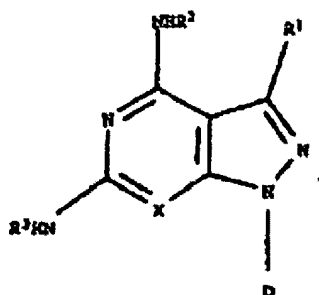
[0109] Die erfindungsgemäß verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindungen können geeignet bei Hybridisierungsverfahren angewendet werden. Daher ist eine weitere Aufgabe der Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung einer Nukleinsäure, bei dem man in den folgenden Schritten: eine Probe bereitstellt, von der man annimmt, dass sie eine Nukleinsäure enthält, eine nukleinsäurebindende Verbindung bereitstellt, die im Wesentlichen komplementär ist zu einem Teil oder allen Nukleinsäuren, die Probe mit der nukleinsäurebindenden Verbindung unter Bedingungen zum Binden der nukleinsäurebindenden Verbindung an die Nukleinsäure zusammenbringt, und den Hybridisierungsgrad oder das Bindungsprodukt bestimmt, das aus der Nukleinsäure und der nukleinsäurebindenden Verbindung gebildet wird, als Maß für die Anwesenheit der Nukleinsäure.

[0110] Verfahren zur Bestimmung der Nukleinsäuren durch Hybridisierung sind im Allgemeinen bekannt, beispielsweise aus Sambrook et al. (vorstehend zitiert). Sie können leicht für die Verwendung der erfindungsgemäßen Sonden angepasst werden.

[0111] Die erfindungsgemäßen Sonden ermöglichen auch die Bestimmung von Pathogenen, wie Bakterien oder Viren, beispielsweise Hepatitis A-, B- oder C-Virus (HBV, HCV), Immunschwächevirus beim Menschen (HIV), Papilloma-Virus beim Menschen oder Parvovirus B19. Es sind aber jegliche anderen Viren möglich.

[0112] In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine nukleinsäurebindende Verbindung als Fängersonde verwendet, wodurch die nukleinsäurebindende Verbindung ein Rückgrat enthält, woran die heterocyclischen Gruppen, die an Nukleobasen Basenpaare ausbilden können, gebunden werden, dadurch gekennzeichnet, dass eine heterocyclische Gruppe die allgemeine Formel I

Formel I



hat, wobei

R¹ unabhängig von X, R² oder R³ ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R², R³ unabhängig von X, R¹, R² und R³ ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) -H,

(2) (C₁-C₁₀)-Alkyl,

(3) (C₂-C₁₀)-Alkenyl,

(4) (C₂-C₁₀)-Alkynyl,

(5) (C₆-C₂₂)-Aryl,

(6) -Z-(C₁-C₁₀)-Alkyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkynyl, -Z-(C₆-C₂₂)-Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R¹¹ aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist,

wobei R⁵, R⁶ und R¹² jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -(C₂-C₁₀)-Alkynyl, -(C₆-C₂₂)-Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -(C₁-C₆)-Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R¹, R² oder R³ ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon.

[0113] In der am stärksten bevorzugten Ausführungsform ist die nukleinsäurebindende Verbindung eine erfindungsgemäße nukleinsäurebindende Verbindung, wobei vorzugsweise $R^1 = \text{Br}$ oder $R^1 = \text{I}$. Sämtliche oben beschriebenen Verwendungen werden vorzugsweise in der Form von Multiplex-Hybridisierungsreaktionen durchgeführt, d. h. es sind mehrfache Ziel-Nukleinsäuren als zweite nukleinsäurebindende Verbindungen und mehrere erste nukleinsäurebindende Verbindungen zugegen. Dies erfolgt vorzugsweise in der Form eines Arrays, d. h. die erste nukleinsäurebindende Verbindung umfasst eine Vielzahl verschiedener nukleinsäurebindender Verbindungen mit unterschiedlichen Sequenzen und ist in der Form eines Arrays an einer Festphase an verschiedenen adressierbaren Stellen gebunden.

[0114] Bei der vorliegenden Erfindung verwendete nukleinsäurebindende Verbindungen können auch bei Nukleinsäurebestimmungsverfahren angewendet werden, wenn die zu bestimmende Nukleinsäure amplifiziert wird. Seit der ursprünglichen Veröffentlichung der Nukleinsäureamplifikation sind verschiedene auf Primer basierende Nukleinsäureamplifikationsverfahren beschrieben worden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Ligase-Kettenreaktion (Ligase Chain Reaction, LCR, Wu und Wallace, 1989, Genomics 4: 560–569 und Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189–193); Polymerase-Ligase-Kettenreaktion (Barany, 1991, PCR Methods and Applic. 1: 5–16); Gap-LCR (PCT-Patentveröffentlichung Nr. WO 90/01069); Reparatur-Kettenreaktion (europäische Patentveröffentlichung Nr. 439,182 A2), 3SR (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173–1177; Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874–1878; PCT-Patentveröffentlichung Nr. WO9210880A) und NASBA (U.S.-Pat. Nr. 5,130,238). Weiterhin gibt es die Strangverdrängungsamplifikation (Strand Displacement Amplification, SDA), die transkriptionsvermittelte Amplifikation (Transcription Mediated Amplification, TMA), und die Q β -Amplifikation (eine Übersicht siehe z. B. bei Whelen und Persing (1996). Annu. Rev. Microbiol. 50, 349–373; Abramson und Myers, 1993, Current Opinion in Biotechnology 4: 41–47). Ein bevorzugtes Verfahren ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Erfindung betrifft auch die Amplifikation der Zielnukleinsäure in Gegenwart der Triphosphate erfindungsgemäßer heterocyclischer Gruppen, wie Pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidinen, substituierten Varianten oder Analoga davon, besonders bevorzugt sind 7-substituierte Varianten davon. Am stärksten bevorzugt sind die Triphosphate der heterocyclischen Gruppen der Formel I mit den Substituenten, wie vorstehend definiert.

[0115] Die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindungen können als Primer und Sonden, z. B. als Fangsonde, verwendet werden. Falls die nukleinsäurebindende Verbindung als Sonde verwendet werden sollte, enthält sie vorzugsweise eine nachweisbare Reportergruppe. Alle Hybride, die sich aus der nukleinsäurebindenden Verbindung und einer Nukleinsäure bilden, können dann über die nachweisbare Reportergruppe nachgewiesen werden. Diese Assaygruppe kann weiterhin in zwei Gruppen unterteilt werden, von denen eine die Gruppe der homogenen Assays ist und die andere die heterogenen Assays sind. In heterogenen Assays wird das Hybrid (Bindungsprodukt) vorzugsweise bestimmt, wenn es an eine feste Phase gebunden ist. Diese Ausführungsform hat den Vorteil, dass jeglicher Überschuss an Sonde und anderen Komponenten leicht von dem Hybrid entfernt werden kann, so dass die Bestimmung leichter wird. Das gebildete Hybrid kann entweder kovalent, nicht-kovalent, spezifisch oder unspezifisch an einer festen Phase eingefangen werden. Es gibt mehrere Ausführungsformen, die dem Fachmann bekannt sind.

[0116] Bei den so genannten homogenen Assays wird das gebildete Hybrid nicht an eine feste Phase gebunden, sondern entweder direkt oder indirekt in Lösung bestimmt. Ein bevorzugtes Beispiel für diese Assays ist in PCT/US 91/05571 offenbart, das hier durch Bezugnahme aufgenommen ist.

[0117] Insbesondere wenn mehrere nukleinsäurebindende Verbindungen verwendet werden, zum Beispiel wenn PCR-, Multiplex-PCR- oder Multiplex-Hybridisierungsverfahren durchgeführt werden, ist es oft schwierig, geeignete Hybridisierungsbedingungen zu finden, die eine gute Spezifität gewährleisten, ohne dass einige spezifische Hybridisierungskomplexe verloren werden, die sich aus einer niedrigeren T_m ergeben, was auch eine kleinere Stabilität bedeutet. Im Falle diagnostischer Verfahren kann dies zu falsch-negativen Ergebnissen führen, die vermieden werden sollten. Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Komplexität von biologischen Proben, zum Beispiel Blut oder Sputum. Solche Proben haben oft Hintergrund-Nukleinsäuren, die das Bestimmungsverfahren stören können, was zum Beispiel zu falsch-positiven Ergebnissen führt.

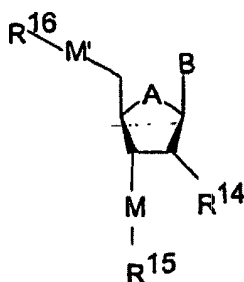
[0118] Deshalb können die heterocyclischen Gruppen der Formel I bei Multiplex-Hybridisierungsverfahren auch dazu verwendet werden, die T_m eines oder mehrerer Hybridisierungskomplexe zu erhöhen, die sich in einem Assay bilden. Durch Einführen einer heterocyclischen Gruppe der Formel I anstelle einer natürlichen Base, die in einer nukleinsäurebindenden Verbindung enthalten ist, die in dem Assay eingesetzt wird, kann die

T_m des Hybridisierungskomplexes, den sie mit ihrer Zielnukleinsäure bildet, erhöht werden. Solche Veränderungen der T_m ermöglichen immer noch eine spezifische Hybridisierung der Nukleinsäureverbindung mit ihrer Zielnukleinsäure bei einer anderen Temperatur. Ein bevorzugtes Anwendungsgebiet sind Multiplex-Hybridisierungsverfahren auf Chips, die oft Hunderte bis Tausende an Hybridisierungssonden verwenden.

[0119] Zwischenprodukte und Vorläuferverbindungen für die chemische Synthese der beschriebenen nukleinsäurebindenden Verbindungen sind nachstehend beschrieben.

[0120] Ein an eine feste Phase gebundener Vorläufer für die Synthese einer bei der vorliegenden Erfindung verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindung umfasst ein Rückgrat, wobei das Rückgrat eine Gruppierung der allgemeinen Formel VI umfasst

Formel VI



wobei

A ausgewählt ist aus der Gruppe O, S, CH_2 und N- $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ -Alkyl,

M und M' unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe Oxy, Sulfandiyl, NR^{22} -, $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ -Alkyl- oder $-\text{O}-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ -Alkyl-O- und $-\text{S}-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ -Alkyl-O- und $-\text{NR}^{22}-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ -Alkyl-O-,

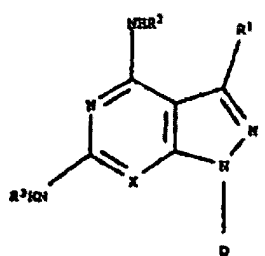
R^{22} ausgewählt ist aus der Gruppe -H, $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ -Alkyl, einer Schutzgruppe und einer Reportergruppe,

R^{14} ausgewählt ist aus der Gruppe -H, $-\text{OR}^{31}$, $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ -Alkoxy, O-Schutzgruppe, S-Schutzgruppe, NH_2 -Schutzgruppe, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ -Alkenyloxy, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ -Alkinyloxy, -Halogen, -Azido, SH, $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ -Alkylmercapto und -O-Festphase,

R^{15} und R^{16} unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus -H, $-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ -Alkyl, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ -Alkenyl, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ -Alkynyl, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ -Alkylcarbonyl, $-(\text{C}_3\text{-C}_{19})$ -Alkenylcarbonyl, $-(\text{C}_3\text{-C}_{19})$ -Alkynylcarbonyl, $-(\text{C}_6\text{-C}_{14})$ -Aryl- $(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ -alkyl, Schutzgruppe und einer festen Phase

B die Anbindung an eine Gruppierung der Formel I darstellt

Formel I



wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) -H,

(2) $(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ -Alkyl,

(3) $(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ -Alkenyl,

(4) $(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ -Alkynyl,

(5) $(\text{C}_6\text{-C}_{22})$ -Aryl,

(6) $-\text{Z}-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ -Alkyl, $-\text{Z}-(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ -Alkenyl, $-\text{Z}-(\text{C}_2\text{-C}_{10})$ -Alkynyl, $-\text{Z}-(\text{C}_6\text{-C}_{22})$ -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(\text{CH}_2)_n\text{-[O-(CH}_2)_r\text{]}_s$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-\text{NO}_2$, $-\text{OR}^{12}$, -CN, -SH, $-\text{S}-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ -Alkyl, $-\text{NR}^6\text{R}^6$,

$-N^+R^5R^6R^{12}$, $-\text{COR}^{11}$, $-\text{NH-CONR}^5R^6$, $-\text{NH-CSNR}^5R^6$ und $-(\text{CH}_2)_n\text{-[O-(CH}_2)_r\text{]}_s\text{-NR}^5R^6$, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s, wobei R^{11} aus der Gruppe $-\text{NHR}^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist, wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe $-\text{H}$, $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkyl}$, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkenyl}$, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkinyl}$, $-(\text{C}_6\text{-C}_{22})\text{-Aryl}$ und einer Reportergruppe,

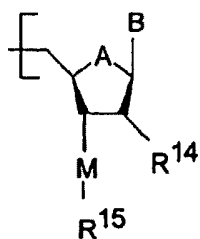
wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkinyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe $-\text{Halogen}$, $-\text{SH}$, $-\text{S-(C}_1\text{-C}_6\text{)-Alkyl}$, $-(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)-Alkoxy}$, $-\text{OH}$, $-\text{NR}^5R^6$, $-\text{COR}^{11}$, $-\text{NH-CONR}^5R^6$, $-\text{NH-CSNR}^5R^6$ und $-(\text{CH}_2)_n\text{-[O-(CH}_2)_r\text{]}_s\text{-NR}^5R^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, mit der Maßgabe, dass ein oder zwei Wasserstoffatome einer beliebigen Gruppe $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH-Alkyl}$, $-\text{NH-Alkenyl}$, $-\text{NH-Alkinyl}$ oder $-\text{NH-Aryl}$ durch eine Schutzgruppe substituiert sind, und beliebige Salze davon. Solche Verbindungen der Formel VI können als Vorläufer zur chemischen Synthese der erfindungsgemäßen nukleinsäurebindenden Verbindungen verwendet werden. In diesem Fall werden die Verbindungen an eine feste Phase gebunden, vorzugsweise ist R^{14} , R^{15} oder R^{16} O-Festphase, am stärksten bevorzugt ist R^{15} feste Phase. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass reaktive Gruppen durch Schutzgruppen geschützt werden.

[0121] Vorläufer und Zwischenprodukte einer bei der vorliegenden Erfindung verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindung sind Verbindungen, wobei das Rückgrat eine Gruppierung der allgemeinen Formel III umfasst

Formel III



wobei

A ausgewählt ist aus der Gruppe O, S, CH_2 und $\text{N-(C}_1\text{-C}_6\text{)-Alkyl}$,

M ausgewählt ist aus der Gruppe Oxy, Sulfandiyl,

NR^{22} -, $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkyl-}$ oder $-\text{O-(C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkyl-O-}$ und $-\text{S-(C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkyl-O-}$, O-CO- , $-\text{NR}^{22}\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)-Alkyl-O-}$,

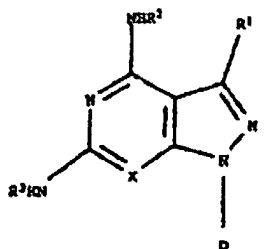
R^{22} ausgewählt ist aus der Gruppe $-\text{H}$, $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkyl}$, einer Schutzgruppe und einer Reportergruppe,

R^{14} ausgewählt ist aus der Gruppe $-\text{H}$, $-\text{OH}$, $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkoxy}$, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkenyloxy}$, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkinylloxy}$, $-\text{Halogen}$, $-\text{Azido}$, SH , $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})\text{-Alkylmercapto}$, O-Reportergruppe, O-Festphase und an eine Schutzgruppe gebundenes $-\text{NH}_2$,

R^{15} ausgewählt ist aus der Gruppe $-\text{H}$, $-(\text{C}_1\text{-C}_6\text{)-Alkyl}$, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkenyl}$, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkinyl}$, $-(\text{C}_2\text{-C}_{10})\text{-Alkylcarbonyl}$, $-(\text{C}_3\text{-C}_{19})\text{-Alkenylcarbonyl}$, $-(\text{C}_3\text{-C}_{19})\text{-Alkinylcarbonyl}$, $-(\text{C}_6\text{-C}_{14})\text{-Aryl-(C}_1\text{-C}_{10})\text{-alkyl}$ und einer festen Phase

B die Anbindung an eine Gruppierung der Formel I darstellt

Formel I



wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$ oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
- (2) (C₁-C₁₀)-Alkyl,
- (3) (C₂-C₁₀)-Alkenyl,
- (4) (C₂-C₁₀)-Alkynyl,
- (5) (C₆-C₂₂)-Aryl,
- (6) -Z-(C₁-C₁₀)-Alkyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkynyl, -Z-(C₆-C₂₂)-Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,
- (7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s, wobei R¹¹ aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist, wobei R⁵, R⁶ und R¹² jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -(C₂-C₁₀)-Alkynyl, -(C₆-C₂₂)-Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -(C₁-C₆)-Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

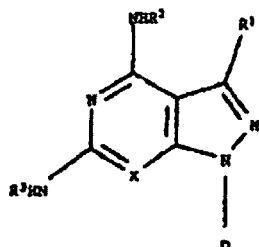
X unabhängig von R¹, R² oder R³ ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, mit der Maßgabe, dass ein oder zwei Wasserstoffatome einer beliebigen Gruppe -OH, -SH, -NH₂, -NH-Alkyl, -NH-Alkenyl, -NH-Alkynyl oder -NH-Aryl durch eine Schutzgruppe substituiert sind, und beliebige Salze davon, wobei R¹⁴ O-Festphase ist oder R¹⁵ feste Phase ist.

[0122] Feste Phasen für die chemische Synthese einer bei der vorliegenden Erfindung verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindung beinhalten vorzugsweise auch Linker zum Fixieren der wachsenden nukleinsäurebindenden Verbindung. Solche Linker sind im Stand der Technik bekannt. Vorzugsweise werden solche Linker nach der Synthese gespalten, um die nukleinsäurebindende Verbindung freizusetzen, und können zum Beispiel auch zur Erzeugung einer freien 3'-Hydroxygruppe in der nukleinsäurebindenden Verbindung verwendet werden. Solche Linker sind im Stand der Technik bekannt, zum Beispiel Bernsteinsäure, die über eine Aminbindung an die feste Phase und über einen Ester an den Vorläufer oder das Zwischenprodukt gebunden ist. Vorzugsweise ist R¹⁵ feste Phase, aber in dem Vorläufer für die chemische Synthese der nukleinsäurebindenden Verbindung der Formel III kann alternativ auch R¹⁴ feste Phase sein. Reaktive Gruppen der Verbindung werden vorzugsweise durch eine Schutzgruppe geschützt.

[0123] Eine allgemeinere Formel bevorzugter Vorläufer und Zwischenprodukte sind Verbindungen, die ein Rückgrat umfassen, wobei das Rückgrat gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass eine heterocyclische Gruppe eine Gruppe der allgemeinen Formel I ist

Formel I



wobei

R¹ unabhängig von X, R² oder R³ ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,
R², R³ unabhängig von X, R¹, R² und R³ ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
- (2) (C₁-C₁₀)-Alkyl,
- (3) (C₂-C₁₀)-Alkenyl,
- (4) (C₂-C₁₀)-Alkynyl,

(5) (C_6-C_{22}) -Aryl,

(6) $-Z-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-Z-(C_6-C_{22})$ -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$ -, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R¹¹ aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist,

wobei R⁵, R⁶ und R¹² jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

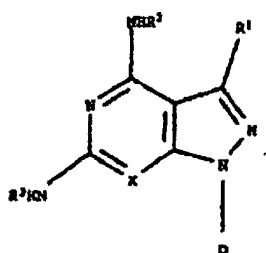
X unabhängig von R¹, R² oder R³ ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, mit der Maßgabe, dass ein oder zwei Wasserstoffatome einer beliebigen Gruppe -OH, -SH, -NH₂, -NH-Alkyl, -NH-Alkenyl, -NH-Alkynyl oder -NH-Aryl durch eine Schutzgruppe substituiert sind, und beliebige Salze davon.

[0124] Neben der Möglichkeit, dass die Vorläuferverbindung oder das Zwischenprodukt am Rückgrat an den festen Träger gekoppelt ist, kann er auch an der in der Verbindung enthaltenen heterocyclischen Gruppe der Formel I gebunden sein, wobei zum Beispiel eine Gruppe -OH, -SH oder -NH₂ als Anbindungsstelle verwendet wird. Vorzugsweise werden die anderen reaktiven Gruppen der Verbindung durch Schutzgruppen geschützt.

[0125] Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins, der Abwesenheit oder der Menge einer Nukleinsäure, bei dem man eine Probe bereitstellt, von der vermutet wird, dass sie die Nukleinsäure enthält, eine nukleinsäurebindende Verbindung bereitstellt, wobei die Verbindung ein Rückgrat umfasst, wobei das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



wobei

R¹ unabhängig von X, R² oder R³ ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R², R³ unabhängig von X, R¹, R² und R³ ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) -H,

(2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,

(3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,

(4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,

(5) (C_6-C_{22}) -Aryl,

(6) $-Z-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-Z-(C_6-C_{22})$ -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$ -, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein kann, r

und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,
 wobei R^{11} aus der Gruppe $-NHR^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist,
 wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe $-H$, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkinyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkinyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe $-Halogen$, $-SH$, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, $-OH$, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon handelt,

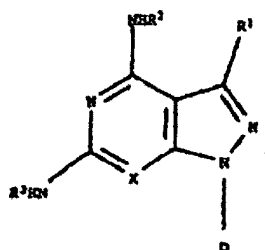
wobei die nukleinsäurebindende Verbindung im Wesentlichen zu der Nukleinsäure teilweise oder vollständig komplementär ist, man die Probe mit der nukleinsäurebindenden Verbindung unter Bedingungen für die Bindung der nukleinsäurebindenden Verbindung an die Nukleinsäure in Kontakt bringt und das Bindungsprodukt oder den Grad der Hybridisierung zwischen der Nukleinsäure und der nukleinsäurebindenden Verbindung als Maß für das Vorhandensein, die Abwesenheit oder die Menge der Nukleinsäure bestimmt.

[0126] Bei einer sehr stark bevorzugten Ausführungsform werden bei den erfindungsgemäßen Verfahren die Nukleinsäuren aus biologischem Material, vorzugsweise aus einem Menschen oder Tier, isoliert. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Verfahren auf dem diagnostischen Gebiet eingesetzt.

[0127] Bei noch einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren, wie vorstehend beschrieben, in Betracht gezogen, wobei die erfindungsgemäße nukleinsäurebindende Verbindung eine Reportergruppe umfasst, bei der es sich um eine Fluoreszenzmarkierung, vorzugsweise um Fluoreszein, handelt. Vorzugsweise umfasst die erfindungsgemäße nukleinsäurebindende Verbindung mehrere Fluoreszenzmarkierungen, wobei die Emissionswellenlängen einer der Fluoreszenzmarkierungen die Absorptionswellenlängen einer anderen der Fluoreszenzmarkierungen überlappen. Die nukleinsäurebindende Verbindung kann ferner einen Quencher umfassen, der die Fluoreszenzemission der Fluoreszenzmarkierung, bei der es sich um Fluoreszein handeln kann, löscht. Vorzugsweise ist der Quencher ein fluoreszierendes Rhodamin oder Cyanin. Vorzugsweise wird bei dem Verfahren in einem weiteren Schritt die räumliche Beziehung zwischen der Fluoreszenzmarkierung und dem Quencher im Anschluss an die Hybridisierung, vorzugsweise durch Exonuklease-Hydrolyse der nukleinsäurebindenden Verbindung, verändert, wobei die Freisetzung der Markierung als Ergebnis der Exonuklease-Hydrolyse erfolgt. Bei einer bevorzugten Ausführungsform bestimmt man den Grad der Hybridisierung zwischen der nukleinsäurebindenden Verbindung und der Nukleinsäure über die Menge an von der nukleinsäurebindenden Verbindung im Anschluss an die Hybridisierung freigesetzter Markierung.

[0128] Bei noch einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren zur Primerverlängerung offenbart, bei dem man in den folgenden Schritten eine Zielsequenz enthaltende Nukleinsäure bereitstellt, eine oder mehrere zur Zielsequenz komplementäre nukleinsäurebindende Verbindungen bereitstellt, wobei die nukleinsäurebindende Verbindung ein Rückgrat umfasst, wobei das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$ oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) $-H$,

- (2) (C₁-C₁₀)-Alkyl,
 (3) (C₂-C₁₀)-Alkenyl,
 (4) (C₂-C₁₀)-Alkynyl,
 (5) (C₆-C₂₂)-Aryl,
 (6) -Z-(C₁-C₁₀)-Alkyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -Z-(C₂-C₁₀)-Alkynyl, -Z-(C₆-C₂₂)-Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,
 (7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,
 wobei R¹¹ aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist,
 wobei R⁵, R⁶ und R¹² jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, -(C₁-C₁₀)-Alkyl, -(C₂-C₁₀)-Alkenyl, -(C₂-C₁₀)-Alkynyl, -(C₆-C₂₂)-Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -(C₁-C₆)-Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R¹, R² oder R³ ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

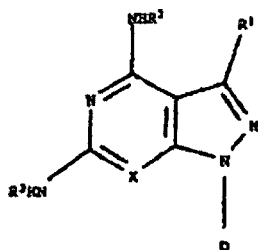
D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon handelt,

man ein Polymerisierungsenzym und Nukleotidsubstrate bereitstellt sowie die Nukleinsäure, die nukleinsäurebindenden Verbindungen, das Enzym und die Substrate unter die Polymerisation begünstigenden Bedingungen inkubiert.

[0129] Vorzugsweise ist das Verfahren Teil einer Amplifikationsreaktion, am stärksten bevorzugt einer Polymerase-Kettenreaktion. Das Verfahren kann bei der Synthese eines cDNA-Moleküls verwendet werden.

[0130] Noch eine andere Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung der Nukleotidsequenz einer Zielsequenz, bei dem man in den folgenden Schritten eine die Zielsequenz umfassende Nukleinsäure bereitstellt, wenigstens zwei nukleinsäurebindende Verbindungen mit bekannter Sequenz bereitstellt und wobei eine der wenigstens zwei nukleinsäurebindenden Verbindungen eine Sequenz aufweist, die zur Zielsequenz vollkommen komplementär ist, und wenigstens eine weitere der nukleinsäurebindenden Verbindungen eine verwandte Zielsequenz aufweist, die nukleinsäurebindenden Verbindungen mit der Nukleinsäure unter Hybridisierungsbedingungen inkubiert und den Grad der Hybridisierung zwischen jeder der nukleinsäurebindenden Verbindungen und der Nukleinsäure bestimmt, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der nukleinsäurebindenden Verbindung um eine ein Rückgrat umfassende nukleinsäurebindende Verbindung handelt, wobei das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



wobei

R¹ unabhängig von X, R² oder R³ ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R², R³ unabhängig von X, R¹, R² und R³ ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
 (2) (C₁-C₁₀)-Alkyl,
 (3) (C₂-C₁₀)-Alkenyl,

(4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,

(5) (C_6-C_{22}) -Aryl,

(6) $-Z-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-Z-(C_6-C_{22})$ -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-NO_2$, $-OR^{12}$, -CN, -SH, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein kann, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R^{11} aus der Gruppe $-NHR^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

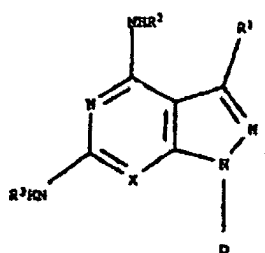
X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon handelt.

[0131] Vorzugsweise weist die wenigstens eine weitere nukleinsäurebindende Verbindung eine Einzelnukleotidfehlpaarung mit der Zielsequenz auf.

[0132] Die Erfindung betrifft weiterhin eine bei der vorliegenden Erfindung verwendete nukleinsäurebindende Verbindung zur Verwendung in der Medizin. Ganz allgemein gesagt, erstreckt sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung solcher nukleinsäurebindenden Verbindungen in therapeutisch wirksamen Zusammensetzungen. Es sollte selbstverständlich sein, dass gemeint ist, dass solche Zusammensetzungen die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten nukleinsäurebindenden Verbindungen als Antisense-Oligonukleotide, Triplexhelix-bildende Oligonukleotide, Aptamere oder Ribozyme, insbesondere Antisense-Oligonukleotide, enthalten, wobei die Nukleinsäure ein Rückgrat umfasst, wobei das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) -H,

(2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,

(3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,

(4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,

(5) (C_6-C_{22}) -Aryl,

(6) $-Z-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-Z-(C_6-C_{22})$ -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-NO_2$, $-OR^{12}$, -CN, -SH, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein kann, r

und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s, wobei R^{11} aus der Gruppe $-NHR^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist, wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe $-H$, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe $-Halogen$, $-SH$, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, $-OH$, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$ substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon handelt.

[0133] Diese Beispiele sollen mögliche Anwendungen veranschaulichen und den Umfang der Erfindung nicht beschränken.

[0134] Die vorliegende Erfindung wird detaillierter durch die folgenden Beispiele erläutert:

Beispiele

Beispiel 1: Synthese und Daten zu den 7-Brom-8-aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleosiden

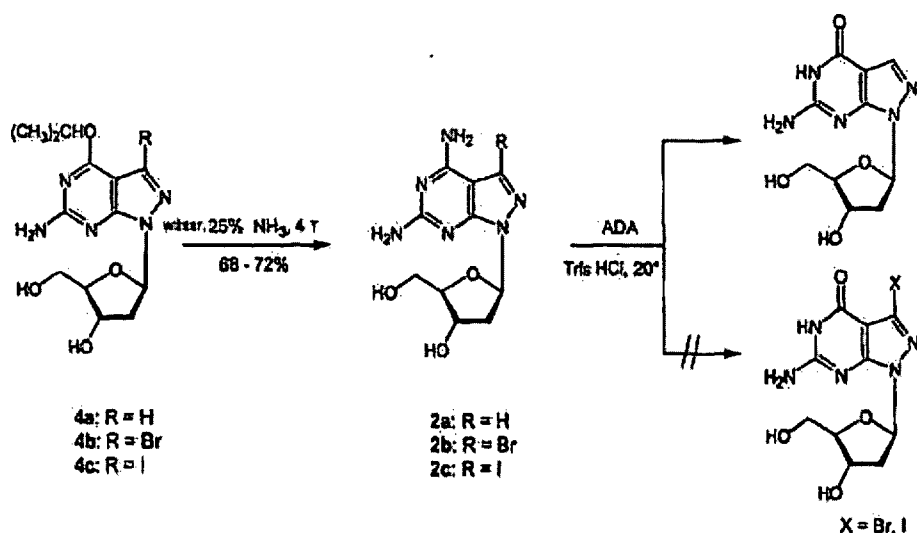
1.1. Synthese und Eigenschaften von Monomeren

[0135] – Die Alkoxy-Nukleoside 4a, b [18] dienten als Vorläufer für die Synthese der 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-(Pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin)-Nukleoside 2a, b (die Purin-Nummerierung wird im gesamten Diskussionsabschnitt verwendet). Die Aminierung erfolgte in einer Stahlbombe (4 Tage, 25%iges wässr. NH_3 , 70°). Beide Nukleoside (2a, b) wurden kristallin isoliert. Einige wenige verwandte 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleoside sind bereits früher hergestellt worden [19–22].

[0136] Die Behandlung der Verbindung 2a mit Adenosindesaminase (ADA) führte zur Bildung von 8-Aza-7-desaza-2'-desoxyguanosin [18]. Die Umsetzung wurde spektralphotometrisch verfolgt (**Fig. 1a**).

[0137] Die zeitabhängigen Spektren zeigen zwei isosbestische Punkte ($\lambda = 234$ nm und 267 nm), was auf die Umwandlung des Ausgangsmaterials in nur ein Reaktionsprodukt hindeutet. Die Desaminierung von 2a findet viel langsamer statt als diejenige des Purin-Nukleosids 1. Das 7-Brom-Derivat 2b [18] wurde unter diesen Bedingungen sogar bei hohen Enzymkonzentrationen nicht desaminiert, wie bereits früher beobachtet wurde [20].

Schema 1



[0138] Als nächstes wurden die Halbwertszeiten der N-Glycosyl-Bindungen der Verbindungen 2a, b in saurem Medium gemessen und mit denjenigen der Verbindung 1 verglichen. Die Umsetzung erfolgte in 0,5 N HCl bei Raumtemperatur und wurde spektralphotometrisch sowie mittels HPLC-Analyse verfolgt (Tabelle 1).

Tabelle 1. Werte für die Halbwertszeiten (τ) von 2'-Desoxadenosin-Derivaten in HCl bei 25°.

Verbindung	τ [min] ^{a)}	λ (nm)	Verbindung	τ [min] ^{a)}	λ (nm)
1	6	252	2b	stabil ^{b)}	242
2a	91	255	2b	87 ^{c)}	242
^{a)} gemessen in 0,5 N HCl. ^{b)} Innerhalb von 4 Std.					
^{c)} gemessen in 2 N HCl. ^{d)} Durch HPLC bestimmt.					

[0139] Aus den Daten der Tabelle ergibt sich, dass das 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleosid (2a) eine etwa 15-fach höhere Stabilität der Glycosyl-Bindungen als das Ausgangs-2-Amino-2'-desoxyadenosin (1) hat. Die Glycosyl-Bindung von 2b ist unter diesen Bedingungen stabil. Die Hydrolyse erfolgt, wenn die Umsetzung in 2 N HCl durchgeführt wird (Tabelle 1). Ferner erhöht der 7-Brom-Substituent den lipophilen Charakter des Moleküls und senkt dadurch die chromatographische Beweglichkeit der Verbindung 2b im Vergleich zu den Verbindungen 2a oder 1 bei der Umkehrphasen-HPLC (Fig. 1b).

[0140] Um den Einfluss der Nukleobasen auf das N $\leftrightarrow$ S-Pseudorotationsgleichgewicht der Zuckereinheit zu untersuchen, wurden die ¹H-NMR-Spektren der Nukleoside 1–3 in D₂O gemessen. Die Analyse erfolgte auf Basis von fünf vicinalen ¹H, ¹H-Kopplungskonstanten unter Verwendung des PSEUROT-Programms [23]. Gemäß Tabelle 2 zeigt das 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleosid 2a eine ausgeprägtere N-Konformer-Population als das entsprechende Purin-Nukleosid 1, während die N-Typ-Population des verwandten 7-Desaza-Purin-Nukleosids 3 abnimmt. Dies stimmt mit einer Zunahme des π -Elektronenmangels des 8-Aza-7-desazapurin-Systems überein. Eine zusätzliche Wirkung des elektronenentziehenden 7-Brom-Substituenten wird nicht gefunden (2b), wurde aber für die stärker elektronenanziehende Cyanogruppe gefunden, die an der 7-Position von 8-Aza-7-desaza-2'-desoxyguanosin eingeführt wurde [24]. Die Konformation um die C(4')-C(5')-Bindung weist darauf hin, dass die 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleoside 2a und b wie die 8-Aza-7-desaza-2'-desoxyguanosine [24] die γ^t -(-sc)-Rotamer-Population bevorzugen, während bei den regulären Purin-Nukleosiden die $\gamma^{(+)}g$ -(+sc)- oder die $\gamma^{(-)}g$ -(ap)-Konformation vorherrscht [25].

Tabelle 2. ³J-(H,H)-Kopplungskonstanten der Zuckereinheiten und N/S-Konformer-Populationen der 2'-Desoxyribonukleoside 1–3 bei 303 K. ^{a)}

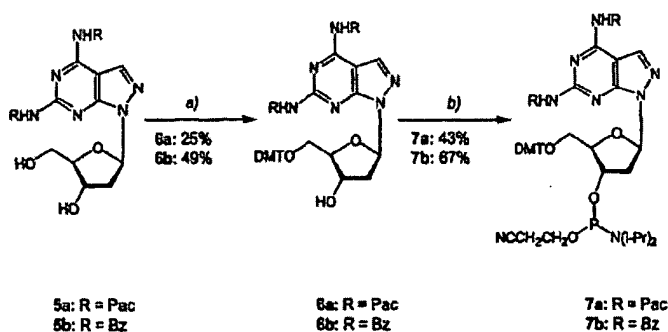
	³ J _{H,H} /Hz							Konformation				
	1',2'	1',2''	2',3'	2'',3'	3',4'	4',5'	4',5''	%N	%S	$\gamma^{(+)}g$	γ^t	$\gamma^{(-)}g$
1	7.30	6.10	7.00	3.10	3.40	3.20	4.30	31	69	62	25	13
2a	6.60	6.80	6.90	3.70	3.60	4.00	5.80	37	63	36	42	22
2b	6.60	6.70	6.80	3.70	3.90	4.30	5.90	37	63	32	43	25
3	7.90	6.40	6.20	3.10	3.00	3.87	4.82	25	75	48	32	20

^{a)} Lösungsmittel D₂O; r. m. s. < 0,4 Hz; $|\Delta J_{\max}| < 0,4$ Hz.

[0141] In der Vergangenheit haben mehrere Labors über ein unkompliziertes Schutzprotokoll für 2-Amino-2'-desoxyadenosin (1) berichtet. Drastische Hydrolysebedingungen sind zur vollständigen Entfernung von Benzoylschutzgruppen notwendig [4], während labilere Phenoxyacetyl-(pac-)Reste ohne Schwierigkeit entfernt wurden [26], [27]. Trotzdem trifft man bei der Bildung der N-bis-acylierten Derivate auf Schwierigkeiten aufgrund des einfachen Schutzes des Moleküls [28] und einer erhöhten Neigung der acylierten Derivate, einer Depurinierung zu unterliegen [4]. Entsprechend der Beobachtung, dass die Nukleoside 2a, b signifikant stabiler sind als das Purin-Nukleosid 1 (Tabelle 1) sollten die N-Acyl-Derivate von 2a, b ähnliche Eigenschaften zeigen. Deshalb wurden das Phenoxyacetyl-Derivat 5a sowie die Benzoyl-Verbindung 5b unter Verwendung des transienten Schutzprotokolls hergestellt [29]. 2,4,5-Trichlorphenylphenoxyacetat [27] oder Benzoylchlorid [30] wurden als Acylierungsreagenzien verwendet. Das bis-phenoxyacylierte Derivat 5a wurde hergestellt, wie für die Purin-Verbindung 1 beschrieben [19]. Die Ausbeute von 5a war jedoch sehr niedrig (30%). Das bis-benzoylier-

te Nukleosid 5b wurde in viel besserer Ausbeute isoliert (63%) (Schema 2; a) 6a: Pyridin; Me_3SiCl , 2,4,5-Trichlorphenylphenoxyacetat, 40° , 12 Std. 6b: Pyridin, Me_3SiCl , PhCOCl , R. T., 12 Std. b) Pyridin/ $(\text{MeO})_2\text{Tr-Cl}$, R. T., 4 Std. c) THF, 2-Cyanoethyldiisopropylphosphoramidochloridit, R. T., 30 min). Beide Verbindungen (5a, b) wurden in die DMT-Derivate 6a, b unter Verwendung der Standardreaktionsbedingungen umgewandelt [31]. Eine Phosphitylierung in Anwesenheit von 2-Cyanoethyldiisopropylphosphoramidochloridit und $(^1\text{Pr})_2\text{EtN}$ lieferte die Phosphoramidite 7a, b [32]. Weil das benzoyleierte Derivat 6b jedoch in THF-Lösung schlecht löslich ist, musste ein großes Volumen verwendet werden. Dementsprechend war die Phosphitylierung weniger effizient und die Ausbeute des Phosphoramidits, die gewöhnlich im Bereich von 80% liegt, war auf 67% verringert (Schema 2).

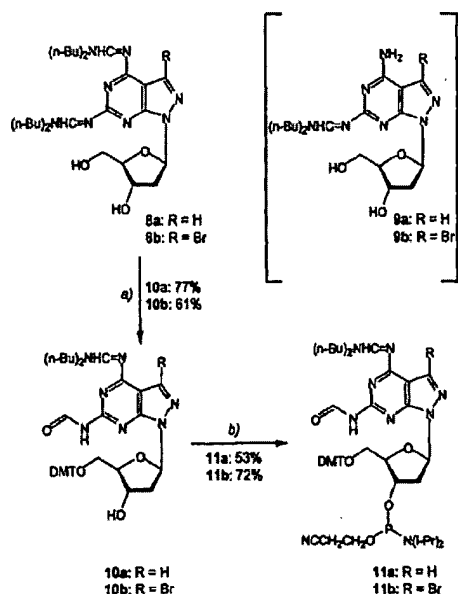
Schema 2



[0142] Die Entfernung der Schutzgruppen von Verbindung 5a (25%iges wässr. NH_3 , 40° , HPLC-Überwachung) zeigte, dass die erste pac-Gruppe innerhalb von 5 min entfernt wird, während die Entfernung der zweiten pac-Gruppe 20 min benötigte. Bei R. T. findet eine vollständige Entfernung der Schutzgruppen in weniger als einer Stunde statt. Die vollständige Entfernung der zwei Benzoylgruppen von Verbindung 5b (25%iges wässr. NH_3 , 40° , HPLC-Überwachung) benötigt 8–9 Std., während die Entfernung der Schutzgruppen des bis-benzylierten Purin-Nukleosids 1 mehrere Tage dauerte [4], [7]. Unter diesem Gesichtspunkt stellt das Benzoyl-geschützte Phosphoramidit 7b einen geeigneten Baustein für den Einbau von Verbindung 2a in Oligonukleotide dar. Trotzdem stellt die niedrige Löslichkeit des Zwischenprodukts 6b ein Problem dar.

[0143] Trotzdem wurde die Synthese der N,N'-Dialkylmethyliden-Derivate 8a, b durchgeführt. Ursprüngliche Versuche, N,N'-Dimethylaminomethyliden-Reste in das Purin-Nukleosid 1 einzuführen, versagten aufgrund der Instabilität der Schutzgruppen [28]. Die N,N'-Dibutylaminomethyliden-Gruppe [33] zum Schutz der exocyclischen Aminofunktion eines 8-Aza-7-desazapurin-Analogons von 2'-Desoxyisoguanosin wurde früher verwendet [34]. Die gleiche Gruppe wurde jetzt in die Nukleoside 2a, b eingeführt. Die Bis-Amidine 8a, b wurden als Hauptprodukte erhalten (50%ige Ausbeute), während die Monoaddukte (9a, b) als Nebenkomponenten gebildet wurden (17%). Die Bildung des Monoaddukts kann umgangen werden, wenn striktere Bedingungen verwendet werden. Für das geschützte Nukleosid 8a, b wurde bestimmt, dass die Zeit bis zur vollständigen Entfernung der Schutzgruppen (konz. Ammoniak, 40° , HPLC-Überwachung bei 260 nm) 440 min für 8a und 450 min für 8b betrug. Eine Halbwertszeit kann nicht angegeben werden, da sich ein monogeschütztes Zwischenprodukt bildet.

Schema 3



[0144] Anschließend wurden die 4,4'-Dimethoxytrityl-Reste eingeführt. Nach der Aufarbeitung der Reaktion, gefolgt von Silicagel-Flashchromatographie, wurde ein N,N'-Dibutylaminomethyliden-Rest unter Bildung einer Formylgruppe hydrolysiert (Schema 3; a) Pyridin/(MeO)₂Tr-Cl, R. T., 4 Std. b) THF, 2-Cyanoethyldiisopropylphosphoramidochloridit, R. T., 30 min). Diese Gruppe schützt jetzt die 2-Aminofunktion, während die 6-Aminogruppe immer noch den Dibutylaminomethyliden-Rest trägt. Die Struktur der Verbindungen 10a, b wurde auf der Basis von NMR-Spektren bestätigt. Die Aminogruppe (10,77 ppm) und das Proton des Formylrestes (9,56 ppm) werden in Dubletts mit J = 9,88 Hz aufgespalten. Dieses charakteristische Kopplungsmuster wurde bereits für die Formylderivate von 5-Aza-7-desaza-2'-desoxyguanosin [35] und des 2-Amino-8-aza-7-desazapurin-2'-desoxynukleosids [36] beobachtet. Eine Phosphitylierung der DMT-Derivate 10a, b erfolgte in THF in Anwesenheit von Chlor-(2-cyanoethyl)-(diisopropylamino)phosphin, was die Phosphoramidite 11a, b liefert (Schema 3). Diese Phosphoramidite sowie der entsprechende Baustein 7b, der Benzoyl-Schutzgruppen trägt, können effizient bei der Festphasen-Oligonukleotidsynthese verwendet werden, die zu hohen Kopplungsausbeuten führt. Alle Verbindungen wurden durch ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektren und Elementaranalyse charakterisiert (Tabelle 3 und experimenteller Teil).

Tabelle 3. Chemische Verschiebungen bei ^{13}C -NMR von Pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidin-2'-desoxyribonukleosiden^{a)}

	C(2) ^{b, d)} C(6) ^{c)}	C(4) ^{d)} C(7a)	C(5) C(3a)	C(6) ^{d)} C(4)	C(7) C(3)	C=O/ =CH	C=O/ =CH	C(1')	C(2')	C(3')	C(4')	C(5')
2 a	156.9	158.3	95.5	162.7	133.3	-	-	83.3	38.0	71.3	87.4	62.7
2 b	157.4	157.6	94.5	162.7	119.2	-	-	83.0	37.5	70.9	87.3	62.4
5 a	152.2	154.8	100.5	156.1	136.1	168.5	169.1	83.6	37.7	71.1	87.7	62.5
5 b	153.3	155.2	102.2	156.1	134.0	165.6	166.3	83.5	37.6	70.9	87.5	62.3
6 a	152.2	154.8	100.5	155.9	135.9	168.5	169.2	83.7	38.1	70.8	85.6	64.3
6 b	153.3	155.3	102.3	156.1	132.2	165.7	166.4	83.7	38.0	70.9	85.6	64.4
8 a ^{f)}	157.1	157.6	106.0	158.9	134.9	164.1	166.2	86.1	41.2	73.7	89.1	64.3
8 b	156.1	156.1	103.6	157.9	121.4	162.1	164.4	83.3	37.5	70.8	87.5	62.2
8 b ^{f)}	157.1	157.7	104.7	159.2	122.9	163.	166.7	86.2	41.0	73.8	89.0	64.2
9 °	156.6	157.3	102.4	162.3	133.7	162.9	- ^{e)}	83.1	37.8	71.2	87.3	62.6
1 0 a ^{f)}	155.5	155.5	107.1	156.8	134.9	161.8	163.7	84.2	38.3	73.6	86.7	64.9
1 0 b	156.0	156.1	103.8	157.8	121.3	162.1	164.4	83.5	°)	70.5	85.3	64.1

a) Gemessen in (D_6) DMSO bei 298 K. b) Purin-Nummerierung. c) Systematische Nummerierung. d) versuchsweise. e) Durch (D_6) DMSO überlagert. f) In CDCl_3 gemessen.

1.2. Oligonukleotide

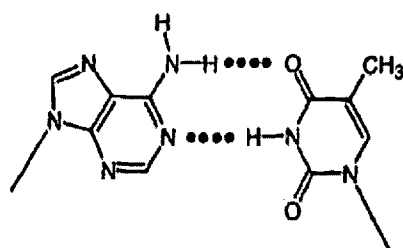
[0145] 1.2.1 Synthese und Charakterisierung. – Die automatische Festphasensynthese der Oligonukleotide 102–116 (Tabellen 4–6) wurde unter Verwendung der Phosphoramidite 7b und 11b sowie von Standard-Phosphoramiditen durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden detrityliert und an Oligonukleotid-Reinigungskartuschen oder mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt (die Bedingungen für die Reinigung siehe im experimentellen Teil). Die Homogenität der Verbindungen wurden mittels Ionenaustauschchromatographie an einer 4 × 250 mm NucleoPac PA-100-Säule (DIONEX, P/N 043018, USA) nachgewiesen. Die Zusammensetzung der Oligonukleotide wurde mittels Tandemhydrolyse mit Schlangengift-Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase bestimmt, wie beschrieben (siehe **Fig. 2a, b**) [2].

[0146] Das 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleosid 2a wandert etwas langsamer als dA. Die Brom-Verbindung 2b ist sehr viel hydrophober als aus **Fig. 2b** ersichtlich. Von den modifizierten Oligonukleotiden wurden die MALDITOF-Massenspektren aufgenommen (Tabelle 6, experimenteller Teil). In allen Fällen wurde die korrekte Masse gefunden, was unterstützt, dass alle Schutzgruppen während einer 10-stündigen Ammoniakbehandlung bei 60° abgespalten wurden.

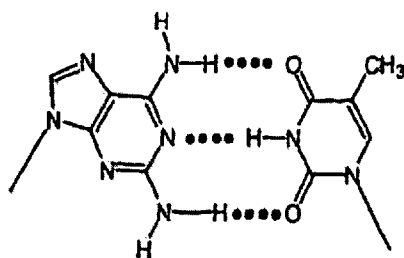
1.2.2 Duplexstabilität

[0147] Aufgrund der Anwesenheit von drei Wasserstoffbrückenbindungen wird erwartet, dass das n^2A_d -dT-Basenpaar (II) die gleiche oder eine ähnliche Stabilität zeigt wie das dG-dC-Paar (III). Experimentelle Daten, die aus DNA-Schmelzexperimenten erhalten wurden, zeigen, dass die thermodynamische Stabilität von Duplices, die ein n^2A_d -dT-Basenpaar enthalten, etwas höher ist als die von denjenigen mit dA-dT-Paaren, aber immer noch weit unter derjenigen eines dG-dC-Paares bleibt. Es wurden verschiedene Studien durchgeführt, um dieses Dilemma zu erklären, aber es wurde keine überzeugende Antwort erhalten. Eine recht detaillierte Untersuchung dieses Problems wurde von Sagy et al. durchgeführt [11]. Dieser Autor verglich die thermischen Stabilitäten eines durch die Motive dA-dU, dI-dC, dA-dT und dI-m⁵C_d wiedergegebenen zweizähligen Basenpaares mit denjenigen dreizähligen Paaren, wie n^2A_d -dT, dG-dC, dG-m⁵C_d und anderen. Die Experimente wurden mit enzymatisch synthetisierten abwechselnden Polynukleotiden durchgeführt. Solange eine 2-Aminogruppe fehlte (zweizählige Basenpaare), zeigten die verschiedenen Duplices unabhängig von der besonderen Basenstruktur alle eine sehr ähnliche Stabilität. Durch Einführen einer 2-Aminogruppe, was zu dem dreizähligen Paar führt, verschwindet diese Ähnlichkeit. Das dG-dC-Basenpaar ist jetzt sehr viel stabiler als das n^2A_d -dT-Paar. Die Autoren stellten auch eine signifikante Wirkung der an die Pyrimidin-Einheit gebundenen 5-Substituenten fest; während die Anwesenheit einer 5-Methylgruppe zu einer recht kleinen Stabilisierung führt, destabilisieren große Alkylgruppen die DNA.

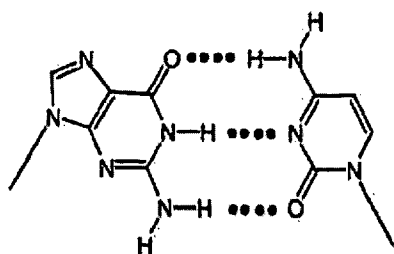
Schema 4



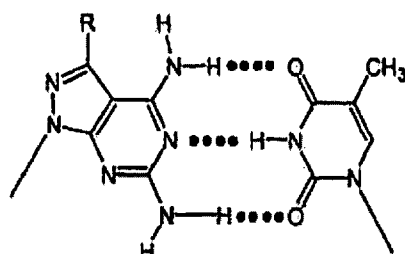
Watson-Crick-Basenpaar I



Watson-Crick-Basenpaar II



Watson-Crick-Basenpaar III



Watson-Crick-Basenpaar IV

R = H, Br

[0148] Um den Einfluss der 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleoside 2a, b auf die Basenpaarstabilität im Vergleich zu dem Purin-Nukleosid 1 zu untersuchen, wurden alle drei Verbindungen in den nicht selbstkomplementären Duplex 5'-d(TAGGTCAATACT) (102) und 5'-d(AGTATTGACCTA) (103) eingebaut. Dieser Duplex wird in unserem Labor als Standard zur Untersuchung des Einflusses modifizierter Nukleoside auf die thermische Stabilität und das Strukturverhalten der Helixbildung eingesetzt. Der T_m -Wert von (102·103) beträgt 46° in 0,1 M NaCl in Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ und 10 mM Na-Cacodylat-Puffer. Der Einbau von sechs n^2A_d -Resten anstelle von sechs dA-Resten erhöhte den T_m -Wert nur um 4° (siehe Duplex 104·105, Tabelle 4). Dies entspricht einer Zunahme der T_m um 0,7° pro Rest. Ähnliche Befunde wurden von Experimenten berichtet, die in anderen Labors durchgeführt wurden [5–12]. Wenn vier 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleoside 2a dA ersetzen, wurde bereits eine Zunahme des T_m -Werts von 46° auf 52° gemessen, was einer Zunahme von 1,5° pro modifiziertem Rest entspricht (vergleiche Duplices 102·103 gegenüber 108·109). Weil die durch einen n^2A_d -Rest verursachte Stabilitätszunahme nur 0,7° betrug, bildet das 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin stabile dreizählige Basenpaare mit dT als diejenigen des Purin-2,6-diamins.

Tabelle 4. T_m -Wert und thermodynamische Daten von Oligonukleotiden mit antiparallelen Strängen, die Purin-2,6-diamin-2'-desoxyribonukleosid und verwandte Pyrazolo-[3,4-d]pyrimidin-Analoga enthalten. ^{a)}

	T_m [°C]	ΔH^0 [kcal/mol]	ΔS^0 [cal/mol • K]	ΔG^0_{310} [kcal/mol]
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA)	46	-86	-230	-10.3
5'-d(TIG GTC IIT ICT) (104) • (105) 3'-d(ATC CIG TTI TGA)	50	-58	-155	-11.2
5'-d(TAG GCC GGC ACT) (106) • (107) 3'-d(ATC CGG CCG TGA)	65	-92	-247	-16.0
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) • (109) 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA)	52	-105	-299	-12.7
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) • (111) 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA)	68	-110	-297	-17.9
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA)	56	-85	-232	-12.9
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) • (111) 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA)	58	-88	-239	-13.4

^{a)} Gemessen bei 260 nm in 0,1 M NaCl, 0,1 M MgCl₂ und 10 mM Na-Cacodylat-Puffer, pH 7,0, mit einer Oligomerkonzentration von 5 + 5 μ M.

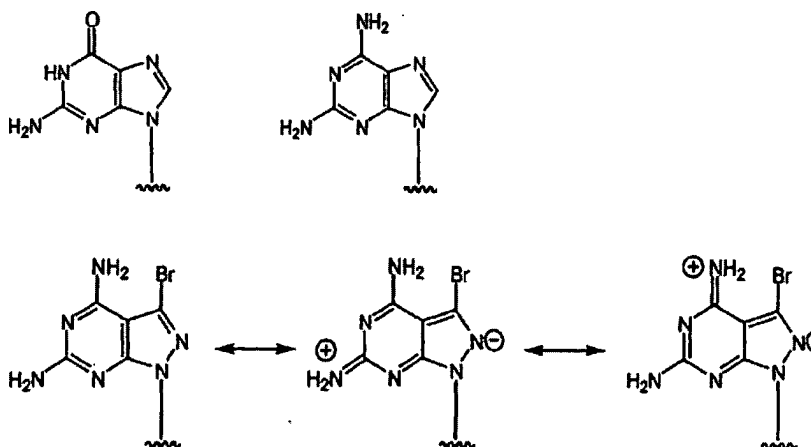
[0149] Es wurde gezeigt, dass 7-Substituenten von 7-Desazapurinen sowie von 8-Aza-7-desazapurin in der großen Furche von DNA gut aufgenommen werden [1–3].

[0150] Insbesondere Halogensubstituenten zeigen sehr günstige Eigenschaften im Hinblick auf die Duplexstabilität. Dies brachte uns dazu, dA-Reste jetzt durch das 7-Brom-Derivat 2b zu ersetzen. Tabelle 4 zufolge zeigt der Duplex (20-21) eine bemerkenswerte Stabilität. Der T_m -Wert betrug 68° verglichen mit 46° bei dem Duplex mit dA-dT-Paaren. Die Duplexstabilität wird um 5,5° pro modifizierte Base verstärkt. Der Duplex (106-107), der vier dG-Reste an den gleichen Positionen enthält, führt zu einem T_m -Wert von 65°, was einer T_m -Zunahme von 5° entspricht. Somit ist die Stabilität eines Basenpaarmotivs IV (Schema 4), das auf ein dA-dT-Erkennungsmotiv folgt, jetzt genauso stabil wie ein dG-dC-Paar (Basenpaar III).

[0151] Eine Erklärung für diese unerwartete Beobachtung kann auf Basis der Basizitätsunterschiede der Aminogruppen der 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleoside 2a, b verglichen mit denjenigen des Purin-2,6-diamin-Nukleosids 1 gegeben werden. Wie vorstehend erläutert, trägt die dritte Wasserstoffbindung von Verbindung 1 sehr wenig zu der n^2A_d -dT-Basenpaarstabilität bei (Schema 4, Basenpaar II), während die 2-Aminogruppe von dG einen großen Beitrag zur Stabilität eines dG-dC-Paares liefert. Im Hinblick auf die chemische Struktur des Moleküls sind sowohl die Aminogruppe von dG als auch isoG_d Teil einer acylierten Guanidin-Einheit, von der erwartet wird, dass sie erheblich weniger basisch ist als die 2-Aminogruppe von n^2A_d , die ebenfalls Teil eines Guanidinsystems ist, das jetzt aromatisch ist, aber nicht an eine elektronenanziehende Einheit gebunden ist. Diese Unterschiede bewirken die niedrige Azidität der 2-Aminogruppe von 1 verglichen mit dG oder isoG_d. Diese Eigenschaft zeigt sich bereits in der außerordentlichen Resistenz der acylierten 2-Aminogruppe von 1 gegen alkalische Entfernung der Schutzgruppe (siehe oben). Als nächstes muss die Frage beantwortet werden, warum die Verbindungen 1 und 2a, b verschieden sind. Im Gegensatz zu Verbindung 1 kann man mesomere Strukturen der Base der Verbindungen 2a, b mit einer positiven Ladung entweder an der 2- oder der 6-Aminogruppe und einer negativen Ladung am Pyrazol-Stickstoff-2 zeichnen.

[0152] Diese mesomeren Formeln erklären die Azidität (verringerte Basizität) der 2-Aminogruppe von 2a gegenüber derjenigen von 1. Wenn ein Brom- oder andere elektronenanziehende Substituenten an der 7-Position eingeführt werden, wird dieser Effekt noch verstärkt. So wird die 2-Aminogruppe von 2a ein besserer Donor für Wasserstoffbindungen mit dT als die 2-Aminogruppe von 1. Der zusätzliche Bromsubstituent kann mehrere günstige Wirkungen hervorrufen: (i) Er macht die 2-Aminogruppe noch saurer; (ii) er stellt eine hydrophobe Gruppe in der großen Furche des DNA-Duplex dar; (iii) er kann eine Wasserstoffbindung mit der 2-Aminogruppe bilden. Abgesehen von diesen Eigenschaften der monomeren Einheiten müssen die Umgebungsbedingungen der Base innerhalb der Nukleinsäure-Duplices die Stabilität der n^2A -dT-Basenpaare modulieren. Ansonsten kann nicht erklärt werden, warum die Stabilität eines solchen Basenpaares in DNA-Duplices, DNA-RNA-Hybriden oder PNA-Duplices unterschiedlich ist.

Schema 5



[0153] Es ist trotzdem noch nicht gezeigt worden, ob der T_m -Wert mit der Anzahl der eingebauten 8-Aza-7-desazapurin-Reste linear zunimmt. Im Fall von Verbindung 1 wurde eine solche Studie durchgeführt, die zeigte, dass es in poly(dA-dT) eine lineare Beziehung gibt, wenn der Ersatz von dA durch die n^2A_d -Reste 50% nicht überstieg. Es gab jedoch keine weitere T_m -Zunahme bei höherem n^2A_d -Einbau, wenn die T_m -Werte bei niedriger Salzkonzentration gemessen wurden. Eine ähnliche Beobachtung wie an synthetischen Oligonukleotiden wurde für DNA des Cyanophagen S-2L gemacht, der n^2A_d anstelle von dA enthält [38].

[0154] Um die Helixstruktur der Duplices zu identifizieren, wurden CD-Spektren der Duplices 102·103 bis 110·111 gemessen [39]. Die CD-Spektren aller Duplices zeigen eine B-artige DNA-Struktur mit einem positiven Cotton-Effekt um 270 nm bis 290 nm und einen negativen Lappen um 250 nm (siehe **Fig. 3a**).

[0155] Es ist berichtet worden, dass das Purin-Nukleosid 1 stabilere Duplices mit komplementärer RNA als mit DNA bildet [40]. Daher wurden Oligonukleotide, die 1 oder 2a, b enthielten, mit einem komplementären Oligoribonukleotid 114 hybridisiert (Tabelle 5). Tabelle 5 zufolge zeigt das DNA-RNA-Hybrid 104·114 eine T_m -Zunahme gegenüber derjenigen des Ausgangs-102·114. Der 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Rest 2a zeigt eine ähnliche Wirkung wie derjenige von 1. Eine zusätzliche Stabilisierung wird beobachtet, wenn die Bromverbindung 2b eingebaut wurde. Alle CD-Spektren der DNA-RNA-Hybride (siehe **Fig. 3b**) nehmen die Form einer A-DNA an.

Tabelle 5. T_m -Wert und thermodynamische Daten von RNA-DNA- und DNA-DNA-Hybriden. ^{a)}

	T_m [°C]	ΔH^0 [kcal/mol]	ΔS^0 [cal/mol • K]	ΔG^0_{310} [kcal/mol]
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) • (114) 3'-(AUC CAG UUA UGA)	45	-92	-264	-10.2
5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) • (114) 3'-(AUC CAG UUA UGA)	48	-60	-162	-11.0
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) • (114) 3'-(AUC CAG UUA UGA)	48	-89	-263	-11.0
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) • (114) 3'-(AUC CAG UUA UGA)	53	-93	-258	-12.4

^{a)} Siehe Tabelle 4.

[0156] Schließlich wurden die Basenpaarungseigenschaften der Nukleoside 1 und 2a, b in parallelsträngiger DNA (ps-DNA) untersucht [37], [42]. Zu diesem Zweck war es notwendig, das dCdG-Paar durch ein m^5iC_d -dG- und/oder dC- iG_d -Paar auszutauschen. Als Standardduplicates wurden die Hybride (102·115) oder (116·103) gewählt. In beiden Reihen von Experimenten destabilisierte das Purin-2,6-diamin (1) die ps-Hybride (104·115 und 116·105). Das Nukleosid 2a führte bereits zu etwas stabileren Duplicates (siehe Tabelle 6). Wie im Falle der antiparallelen DNA führte das Bromderivat 2b zu einer signifikanten Zunahme des T_m -Wertes (110·115 und 116·111). Die beiden Sätze von CD-Spektren (**Fig. 4a, b**) der ps-Duplicates sind recht verschieden von denjenigen von aps-Hybriden (siehe **Fig. 4a**).

[0157] Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die 2-Aminogruppe zu einer Destabilisierung in der Reihe von Purinverbindungen führt und die in aps-DNA beobachtete stabilisierende Wirkung signifikant verringert. Dieses Verhalten ist nicht überraschend, weil bereits beobachtet worden war, dass das monosubstituierte Purin-2-amin oder 8-Aza-7-desazapurin-2-amin einen recht ungünstigen Einfluss auf die Stabilität der ps-DNA hat [36], [42].

Tabelle 6. T_m -Wert, thermodynamische Daten parallelsträngiger Oligonukleotide, die aus iG_d und m^5iC_d enthaltenden Oligonukleotiden hergestellt wurden. ^{a,b)}

	T_m [°C]	ΔH^0 [kcal/mol]	ΔS^0 [cal/mol • K]	ΔG^0_{310} [kcal/mol]
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102)•(115) [37] 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA)	39	-74	-211	-8.8
5'-d(TiG GTC iIT iCT) (104) • (115) 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA)	36	-76	-200	-7.9
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) • (115) 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA)	41	-62	-171	-9.0
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) • (115) 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA)	45	-67	-184	-10.2
5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) • (103)[37] 5'-d(AGT ATT GAC CTA)	44	-85	-242	-10.3
5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) • (105) 5'-d(AGT iTT GiC CTA)	39	-61	-170	-8.4
5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) • (109) 5'-d(AGT 2aTT G2aC CTA)	45	-80	-230	-10.3
5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) • (111) 5'-d(AGT 2bTT G2bC CTA)	48	-68	-186	-10.9

^{a)} Gemessen bei 260 nm in 1 M NaCl, 0,1 M 12, 60 mM Na-Cacodylat-Puffer, pH 7,0 mit einer Oligomerkonzentration von 5 + 5 μ M. ^{b)} d(iC) = m^5iC_d = 2'-Desoxy-5-methylisocytidin.

[0158] Die beiden Aminogruppen der 8-Aza-7-desaza-Purin-Nukleoside 2a, b können entweder mit Benzoylresten oder Dibutylaminomethylen-Gruppen geschützt werden, ohne dass es zu Depurinierungsproblemen während der sauren Detritylierung oder der Entfernung der Schutzgruppen unter Standardbedingungen in Ammoniak kommt. Die Probleme mit der Depurinierung und einer außergewöhnlich hohen Stabilität der 2-Amino-Schutzgruppen des Purin-2,6-diamin-Nukleosids 1 werden nicht beobachtet.

1.3 Experimenteller Teil

[0159] Monomere: Allgemein. Siehe [2]. Flashchromatographie (PC): 0,4 bar an Silicagel 60 H (Merck, Darmstadt, Deutschland). Dünnschichtchromatographie (DC): Aluminiumplatten Silicagel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck, Deutschland). DC-Scanning: CS-930 TLC-Scanner (Shimadzu, Japan). Lösungsmittelsysteme für die Flashchromatographie (FC) und DC: CH₂Cl₂/MeOH 98:2 (A), CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (B), CH₂Cl₂/MeOH 9:1 (C), CH₂Cl₂/Aceton 95:5 (D), CH₂Cl₂/Aceton 9:1 (E), CH₂Cl₂/EtOAc 85:15 (F). Schmp.: Büchi-SMP-20-Apparatur (Büchi, Schweiz); unkorrigiert. NMR-Spektren: Avance-DPX-250- und AMX-500-Spektrometer (Bruker, Deutschland); die δ -Werte sind in ppm feldabwärts des internen SiMe₄ (¹H, ¹³C) angegeben. Mikroanalysen wurden durch das Mikroanalytische Labor Beller (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Oligonukleotide:

[0160] Synthese und Reinigung der Oligonukleotide 102–116. Die Synthese wurde an einem automatischen DNA-Synthesegerät (Applied Biosystems, Modell ABI 392-08 für die Phosphoramiditchemie) in einem Maßstab von 1 μ mol mit 3'-Phosphoramiditen von [(MeO)₂Tr]ib²G_d, [(MeO)₂Tr]bz⁶A_d, [(MeO)₂Tr]bz⁴C_d und [(MeO)₂Tr]T_d zusammen mit den Phosphoramiditen der Derivate 7b und 11b durchgeführt. Die Synthese der Oligomere folgte dem üblichen Protokoll des DNA-Synthesegerätes für Phosphoramidite. Nach der Abspaltung von dem festen Träger wurden die Schutzgruppen von den Oligonukleotiden in 25%igem NH₃/H₂O (12–15 Std. bei 60°) abgespalten. Die Reinigung der 5'-(Dimethoxytrityl)-Oligomere wurde mit OPC-Kartuschen sowie mit Umkehrphasen-HPLC (RP-18) durchgeführt. Der folgende Lösungsmittelgradient wurde verwendet (A, MeCN; B, 0,1 M (Et₃NH)OAc (pH 7,0)/MeCN 95:5): 3 min 20% A in B, 12 min 15–40% A in B mit einer Flussrate von 1,0 ml/min. Um die 4,4'-Dimethoxytrityl-Reste zu entfernen, wurden sie mit 2,5%igem CHCl₂COOH/CH₂Cl₂ für 5 min bei R. T. behandelt. Die detritylierten Oligomere wurden durch Umkehrphasen-HPLC mit dem Gradienten: 20 min 0–20% A in B mit einer Flussrate von 1 ml/min gereinigt. Die Oligomere wurden an einer kurzen Säule (RP-18, Silicagel) unter Verwendung von H₂O für die Elution des Salzes entsalzt, während die Oligomere mit MeOH/H₂O 3:2 eluiert wurden. Die Oligomere wurden an einem Speed-Vac-Verdampfer lyophilisiert, so dass farblose Feststoffe erhalten wurden, die bei –24° eingefroren wurden.

Tabelle 7. Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmte Molekülmassen M⁺ der Oligonukleotide 12, 13 und 18–21

Oligomer	M ⁺ (ber.)	M ⁺ (gefunden)
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102)	3644.4	3645
5'-d(AGT ATT GAC CTA) (103)	3644.4	3645
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108)	3674.4	3677
5'-d(AGT 2aTT G2aC CTA) (109)	3674.4	3675
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110)	3832.5	3830
5'-d(AGT 2bTT G2bC CTA) (111)	3832.5	3832

[0161] Die MALDI-TOF-Spektren wurden an einem Biflex III durch Dr. T. Wenzel (Bruker Saxonia, Deutschland) gemessen. Analyse der Nukleosidzusammensetzung. Die Analysen wurden durchgeführt, wie in [37] beschrieben. Extinktionskoeffizienten der Nukleosidbestandteile: ϵ_{260} : dA 15400, dT 8800, dG 11700, dC 7600, iG_d 7400, m⁵iC_d 6300, 2a 8800, 2b 8700. Schlangengift-Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1., Crotallus durissus) und alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1., E. coli) wurden von Roche Diagnostics GmbH, Deutschland, bezogen.

[0162] Bestimmung von T_m-Werten und thermodynamischen Daten. Profile der Extinktion gegen die Temperatur wurden an einem Cary-1/1E-UV/VIS-Spektralphotometer (Varian, Australien) gemessen, das mit einem thermoelektrischen Regler von Cary ausgestattet war. Die T_m-Werte wurden in der Referenzzelle mit einem Pt-100-Widerstand bestimmt, und die thermodynamischen Daten wurden unter Verwendung des Meltwin-3.0-Programms berechnet [43].

[0163] Zirkulardichroismus-Spektren. Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco-600-(Jasco, Japan)Spektropolarimeter mit thermostatisch (Lauda-RCS-6-Bad) geregelten 1-cm-Küvetten aufgezeichnet. UV-Spektren: 150-20-Spektralphotometer (Hitachi, Japan).

[0164] 3-Brom-1-[2-desoxy- β -D-erythropentofuranosyl]-1H-pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin (2b). Eine Lsg. von Verb. 4b [18] (1,0 g, 2,6 mmol) in wässr. 25%igem NH₃ (80 ml) wurde bei 70° für 4 T in einem Stahlbehälter erhitzt. Das Lösungsmittel wurde verdampft, und der Rückstand wurde in heißem H₂O gelöst. Die Kristallisation trat beim Abkühlen auf. Farblose Nadeln (646 mg, 72%). Schmp. 155°. DC (C): R_f 0,2. UV (MeOH): 260 (8700), 278 (9000). ¹H-NMR ((D₆)DMSO): 2,16, 2,68 (2m, H₂-C(2')); 3,38, 3,48 (2m, H₂-C(5')); 3,77 (m, H-C(4')); 4,36 (m, H-C(3')); 4,72 (t, J = 4,9, HO-C(5')); 5,19 (d, J = 4,1, HO-C(3')); 6,32 (t, J = 6,5, H-C(1')); 6,39 (s, NH₂); 6,77 (br, NH₂). Anal. berech. für C₁₀H₁₃BrN₆O₃ (345,2): C 34,80, H 3,80, N 24,35; gefunden: C 34,97, H 3,97, N 24,21.

[0165] N⁴,N⁶-Bis(phenoxyacetyl)-1-[2-desoxy-β-D-erythropentofuranosyl]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin (5a). Verb. 2a [15] (1,5 g, 5,6 mmol) wurde durch gemeinsame Verdampfung mit Pyridin getrocknet. Der Rückstand wurde in Pyridin (25 ml) gelöst, und Trimethylsilylchlorid (3,3 ml, 26 mmol) wurde bei R. T. unter Rühren zugegeben. Das Rühren wurde für 15 min fortgesetzt, und eine Lösg. von 2,4,5-Trichlorphenylphenoxyacetat (5,4 g, 16,4 mmol) [27] in Pyridin (15 ml) wurde in einer Portion zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 Std. bei 40° gerührt. Es wurde abgekühlt (Eisbad), und H₂O (4,2 ml) wurde zugegeben. Nach 5 min wurde wässr. 25%iges NH₃ (6 ml) hinzugefügt, und das Gemisch wurde bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde auf FC aufgetragen (Elutionsmittel: A→C), was einen farblosen Schaum ergab (900 mg, 30%). DC (C): R_f 0,4. UV (MeOH): 266 (9100). ¹H-NMR ((D₆)DMSO): 2,26, 2,82 (2m, H₂-C(2')); 3,34, 3,48 (2m, H₂-C(5')); 3,82 (m, H-C(4')); 4,44 (m, H-C(3')); 4,73 (t, J = 5,5, HO-C(5')); 5,14 (s, OCH₂); 5,17 (d, J = 4,3, HO-C(3')); 6,60 (t, J = 6,3, H-C(1')); 6,92–7,32 (m, arom. H); 8,41 (s, H-C(3)); 10,77 (s, NH); 11,30 (s, NH). Anal. berech. für C₂₆H₂₆N₆O₇ (534,5): C 58,42, H 4,90, N 15,72; gefunden: C 58,68, H 4,78, N 15,20.

[0166]

N⁴,N⁶-Bis(phenoxyacetyl)-1-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-erythropentofuranosyl]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin (6a). Verb. 5a (0,8 g, 1,5 mmol) wurde zweimal gemeinsam mit Pyridin verdampft. Der Rückstand wurde in Pyridin (2 ml) gelöst, und 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (0,6 g, 1,77 mmol) wurde zugegeben. Das Rühren bei R. T. wurde für 4 Std. fortgesetzt, dann wurde die Lösg. mit MeOH (5 ml) verdünnt und mit 5% wässr. Natriumbicarbonat (3 × 20 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde getrocknet (Na₂SO₄) und bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde durch FC gereinigt (Elutionsmittel: D→E), was einen farblosen Schaum (310 mg, 25%) ergab. DC (E): R_f 0,3. UV (MeOH): 266 (8900). ¹H-NMR ((D₆)DMSO): 2,32, 2,81 (2m, H₂-C(2')); 2,99 (2m, H₂-C(5')); 3,67 (2s, OCH₃); 3,95 (m, H-C(4')); 4,53 (m, H-C(3')); 5,15 (s, OCH₂); 5,33 (d, J = 4,7, HO-C(3')); 6,62 (t, J = 6,3, H-C(1')); 6,69–7,31 (m, arom. H); 8,36 (s, H-C(3)); 10,83 (s, NH); 11,56 (s, NH). Anal. berech. für C₄₇H₄₄N₆O₉ (836,9): C 67,45, H 5,30, N 10,04; gefunden: C 66,95, H 5,41, N 10,15.

[0167]

N⁴,N⁶-Bis(phenoxyacetyl)-1-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-erythropentofuranosyl]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (7a). Zu einer Lösg. von Verb. 7a (0,15 g, 0,18 mmol) in THF (0,5 ml) wurden (¹Pr)₂EtN (0,12 ml, 0,71 mmol) und 2-Cyanoethyl-diisopropylphosphoramidochloridit (64 mg, 0,27 mmol) zugegeben. Das Rühren unter einer Argonatmosphäre bei R. T. wurde für 30 min fortgesetzt. Dann wurde das Gemisch mit CH₂Cl₂ (20 ml) und 5%igem wässr. NaHCO₃ verdünnt. Das Gemisch wurde mit CH₂Cl₂ (3 × 15 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Schichten wurden getrocknet (Na₂SO₄) und unter Bildung eines Öls eingedampft. Der Rückstand wurde einer FC unterworfen (Elutionsmittel: F), was (80 mg, 43%) eines farblosen Schaums ergab. DC (F): R_f 0,8. ³¹P-NMR (CDCl₃): 149,2, 149,4.

[0168] N⁴,N⁶-Bis(benzoyl)-1-[2-desoxy-β-D-erythropentofuranosyl]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin (5b). Verb. 2a [17] (1 g, 3,8 mmol) wurde zweimal gemeinsam mit Toluol verdampft und in Pyridin (40 ml) und TMS-Cl (4,0 g, 36,8 mmol) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde unter einer Argonatmosphäre gerührt, auf 0° abgekühlt, und PhCOCl (6,6 ml, 57 mmol) wurden tropfenweise über einen Zeitraum von 30 min zu der Lösg. zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei R. T. wurde das Gemisch in EtOAc (200 ml) verdünnt und mit einer gesätt. Natriumbicarbonat-Lösg. (200 ml) und eiskaltem H₂O (200 ml) gewaschen. Die wässr. Schicht wurde mit EtOAc (2 × 400 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Schichten wurden bis zur Trockne verdampft und in THF/MeOH/H₂O 5:4:1 (250 ml) gelöst. Die dunkelorange Lösg. wurde auf 0° abgekühlt, und 2 N NaOH (25 ml) wurde zugegeben, während das Rühren für 40 min fortgesetzt wurde. Der Rückstand wurde mittels FC gereinigt (Elutionsmittel: A→B), was 1,1 g (61%) eines amorphen Feststoffs ergab. DC (B): R_f 0,3. UV (MeOH): 245 (16400), 274 (15200). ¹H-NMR ((D₆)DMSO): 2,13, 2,67 (2m, H₂-C(2')); 3,38, 3,52 (2m, H₂-C(5')); 3,84 (m, H-C(4')); 4,46 (m, H-C(3')); 4,72 (t, J = 5,7, HO-C(5')); 5,29 (d, J = 4,4, HO-C(3')); 6,66 (t, J = 6,5, H-C(1')); 7,51–8,11 (m, arom. H); 8,40 (s, H-C(3)); 10,95 (s, NH); 11,49 (s, NH). Anal. berech. für C₂₄H₂₂N₆O₅ (474,5): C 60,75, H 4,67, N 17,71; gefunden: C 61,03, H 4,70, N 17,58.

[0169] N⁴,N⁶-Bis(benzoyl)-1-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-erythropentofuranosyl]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin (6a). Wie für 6a beschrieben mit 5a (500 mg, 1,05 mmol) und DMT-Cl (460 mg, 1,35 mmol) in Pyridin (3 ml). Der Rückstand wurde durch FC (Elutionsmittel: D→E) gereinigt, was 400 mg (49%) eines farblosen Schaums ergab. DC (E): R_f 0,4. UV (MeOH): 244 (16400), 275 (15200). ¹H-NMR ((D₆)DMSO): 2,35, 2,67 (2m, H₂-C(2')); 3,07, 3,10 (2m, H₂-C(5')); 3,68, 3,69 (2s, OCH₃); 3,97 (m, H-C(4')); 4,56 (m, H-C(3')); 5,35 (d, J = 4,8, HO-C(3')); 6,72–8,11 (m, arom. H); 8,36 (s, H-C(3)); 11,01 (s, NH); 11,54 (s, NH).

[0170]

N⁴,N⁶-Bis(benzoyl)-1-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-erythropentofuranosyl]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (7b). Wie für 7a beschrieben mit 6b (110

mg, 0,14 mmol), (¹Pr)₂EtN (75 µl, 0,43 mmol) und 2-Cyanoethyl-diisopropylphosphoramidochloridit (38 µl, 0,17 mmol) in THF (3 ml) bei 30°. Der ölige Rückstand wurde einer FC unterworfen (Elutionsmittel: F), was 92 mg (67%) eines farblosen Schaums ergab. DC (F): R_f 0,8. ³¹P-NMR (CDCl₃): 149,82, 149,63.

[0171] N⁴,N⁶-Bis((di-n-butylamino)methylen)-1-[2-desoxy-β-D-erythropentofuranosyl]-1H-pyrazolo[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin (8a). Zu einer gerührten Suspension von 2a (300 mg, 1,13 mmol) in MeOH (5 ml) wurde N,N-Di-n-butylformamidmethylacetal (790 µl, 3,39 mmol) zugegeben. Das Rühren wurde für 2 Std. bei 40° fortgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur Trockne verdampft und der Rückstand an Silicagel adsorbiert. FC (Elutionsmittel: A→B) lieferte zwei Hauptprodukte. Aus der schneller wandernden Zone wurde ein farbloser Schaum von 8a (330 mg, 53%) isoliert. DC (B): R_f 0,4. UV (MeOH): 235 (22800), 274 (13800), 322 (25700). ¹H-NMR (CDCl₃): 0,87-0,95 (m, CH₂CH₃); 1,26-1,38 (m, CH₂CH₃); 1,57-1,60 (m, CH₂CH₂); 2,42-2,92 (m, H₂-C(2')); 3,26-3,72 (2m, H₂-C(5'), NCH₂); 3,88 (m, H-C(4')); 4,39 (m, H-C(3')); 4,78 (t, J = 5,8, HO-C(5')), 5,21 (d, J = 4,8, HO-C(3')); 6,55 (t, J = 6,9, H-C(1')); 7,93 (s, H-C(3)); 8,66 (s, N=CH); 8,88 (s, N=CH). Anal. berech. für C₂₈H₄₉N₈O₃ (544,7): C 61,74, H 8,88, N 20,57; gefunden: C 61,71, H 8,91, N 20,57. Aus der langsamer wandernden Zone wurde 1-[2-Desoxy-β-D-erythropentofuranosyl]-N⁶-((di-n-butylamino)-methylen)-1H-pyrazolo[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin (9a) (80 mg, 17%) erhalten. DC (B): R_f 0,3. UV (MeOH): 235 (23000), 275 (14900), 320 (22100). ¹H-NMR ((D₆)DMSO): 0,88-0,95 (m, CH₂CH₃); 1,27-1,36 (m, CH₂CH₃); 1,53-1,62 (m, CH₂CH₂); 2,21 (m, H-C(2')); 2,91 (m, H-C(2')); 3,38-3,59 (2m, H₂-C(5'), NCH₂); 3,79 (m, H-C(4')); 4,40 (m, H-C(3)); 4,78 (t, J = 5,8, HO-C(5')); 5,19 (d, J = 4,4, HO-C(3')); 6,36 (s, NH₂); 6,40 (t, J = 6,5, H-C(1')); 7,77 (s, H-C(3)); 8,69 (s, N=CH). Anal. berech. für C₁₉H₃₁N₇O₃ (405,5): C 56,28, H 7,71, N 24,18; gefunden: C 55,98, H 7,52, N 24,05.

[0172] N⁴,N⁶-Bis((di-n-butylamino)methylen)-3-brom-1-[2-desoxyβ-D-erythropentofuranosyl]-1H-pyrazolo[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin (8b). Wie für 8a beschrieben mit 2b (350 mg, 1 mmol) und N,N-Di-n-butylformamidmethylacetal (720 µl, 3,1 mmol) in MeOH (7 ml) für 2 Std. bei 40°. Nach FC (Elutionsmittel: A→B) wurden zwei Hauptprodukte isoliert. Die schneller wandernde Zone ergab 8b als Schaum (310 mg, 50%). DC (B): R_f 0,3. UV (MeOH): 235 (22500), 275 (14500), 320 (22100). ¹H-NMR ((D₆)DMSO): 0,94-0,99 (m, CH₂CH₃); 1,32-1,44 (m, CH₂CH₃); 1,59-1,73 (m, CH₂CH₂); 2,21 (m, H-C(2')); 2,91 (m, H-C(2')); 3,32-3,78 (2m, H₂-C(5'), NCH₂); 3,89 (m, H-C(4')); 4,40 (m, H-C(3)); 4,78 (t, J = 5,8, HO-C(5')); 5,19 (d, J = 4,4, HO-C(3')); 6,81 (t, J = 6,5, H-C(1')); 8,69 (s, N=CH); 8,94 (s, N=CH). Anal. berech. für C₂₈H₄₇BrN₈O₃ (623,6): C 53,93, H 7,60, N 17,97; gefunden: C 54,01, H 7,52, N 18,05. Die langsamere Zone lieferte 3-Brom-1-[2-desoxy-β-D-erythropentofuranosyl]-N⁶-((di-n-butylamino)-methylen)-1H-pyrazolo[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin (9b) (75 mg, 16%). DC (B): R_f 0,3. UV (MeOH): 236 (21600), 276 (14000), 320 (21900). ¹H-NMR ((D₆)DMSO): 0,90-0,96 (m, C₂CH₃); 1,30-1,39 (m, CH₂CH₃); 1,59-1,73 (m, CH₂CH₂); 2,23 (m, H-C(2')); 2,89 (m, H-C(2')); 3,35-3,78 (2m, H₂-C(5'), NCH₂); 3,84 (m, H-C(4')); 4,43 (m, H-C(3)); 4,80 (t, J = 5,7, HO-C(5')); 5,23 (d, J = 4,6, HO-C(3')); 6,40 (s, NH₂); 6,81 (t, J = 6,4, H-C(1')); 8,65 (s, N=CH). Anal. berech. für C₁₉H₃₀BrN₇O₃ (484,4): C 47,11, H 6,24, N 20,24; gefunden: C 47,23, H 6,52, N 20,35.

[0173]

1-[2-Desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-erythropentofuranosyl]-N⁴-((di-n-butylamino)methylen)-N⁶-formyl-1H-pyrazolo[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin (10a). Wie für 6a beschrieben mit 8a (80 mg, 0,15 mmol), DMT-Cl (60 mg, 0,18 mmol) in Pyridin (0,5 ml). Der Rückstand wurde mittels FC (Elutionsmittel: D→E) gereinigt, was 85 mg (77%) eines farblosen Schaums ergab. DC (E): R_f 0,3. UV (MeOH): 235 (22800), 276 (20000), 320 (24800). ¹H-NMR (CDCl₃): 0,98-1,05 (m, CH₂CH₃); 1,14-1,48 (m, CH₂CH₃); 1,65-1,78 (m, CH₂CH₂); 2,42-2,92 (m, H₂-C(2')); 3,35-3,70 (2m, H₂-C(5'), NCH₂); 3,71 (s, OCH₃); 4,06 (m, H-C(4')); 4,39 (m, H-C(3')); 5,21 (d, J = 4,8, HO-C(3')); 6,55 (t, J = 6,6, H-C(1')); 6,76-7,96 (m, arom. H); 7,94 (d, J = 10,5, NH); 7,96 (s, H-C(3)); 8,81 (s, N=CH); 9,57 (d, J = 10,5, CHO). Anal. berech. für C₄₁H₄₉N₇O₆ (735,9): C 66,92, H 6,71, N 13,32; gefunden: C 66,85, H 6,56, N 13,40.

[0174]

3-Brom-1-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-erythropentofuranosyl]-N⁴-((di-n-butylamino)methylen)-N⁶-formyl-1H-pyrazolo[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin (10b). Wie für 6a beschrieben mit 8b (310 mg, 0,5 mmol), DMT-Cl (202 mg, 0,6 mmol) in Pyridin (2 ml). Der Rückstand wurde zweimal durch FC gereinigt (Elutionsmittel: D→E), was 250 mg (61%) eines farblosen Schaums ergab. DC (E): R_f 0,3. UV (MeOH): 235 (22900), 276 (21100), 320 (25300). ¹H-NMR ((D₆)DMSO): 0,90-0,96 (m, CH₂CH₃); 1,28-1,37 (m, CH₂CH₃); 1,61-1,68 (m, CH₂CH₂); 2,21 (m, H-C(2')); 2,91 (m, H-C(2')); 3,03 (2m, H₂-C(5')); 3,35-3,52 (m, NCH₂); 3,69 (s, OCH₃); 3,90 (m, H-C(4')); 4,48 (m, H-C(3)); 5,32 (d, J = 4,7, HO-C(3')); 6,46 (t, J = 6,2, H-C(1')); 6,73-7,31 (m, arom. H); 8,99 (s, N=CH); 9,56 (d, J = 9,89, NH); 10,77 (d, J = 9,88, CHO). Anal. berech. für C₄₁H₄₈BrN₇O₆ (814,8): C 60,44, H 5,94, N 12,03; gefunden: C 60,36, H 5,73, N 11,85.

[0175]

1-[2-Desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythropentofuranosyl]-N⁴-((di-n-butylamino)methylen)-N⁶-formyl-1H-pyrazolo[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (11a). Wie für 7a beschrieben mit 10a (110 mg, 0,15 mmol), (ⁱPr)₂EtN (78 μ l, 45 mmol) und 2-Cyanoethyldiisopropylphosphoramidochloridit (47 μ l, 0,2 mmol) in THF (2 ml). Der ölige Rückstand wurde einer FC (Elutionsmittel: F) unterworfen, was 75 mg (53%) eines farblosen Schaums ergab. DC (F): R_f 0,8. ³¹P-NMR (CDCl₃): 149,58, 149,52.

[0176]

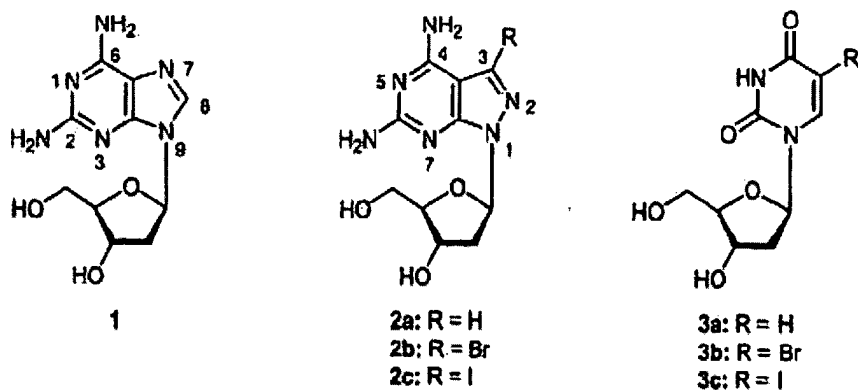
3-Brom-1-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythropentofuranosyl]-N⁴-((di-n-butylamino)-methylen)-N⁶-formyl-1H-pyrazolo[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (11b). Wie für 7a beschrieben mit 10b (90 mg, 0,11 mmol), (ⁱPr)₂EtN (63 μ l, 0,36 mmol) und 2-Cyanoethyldiisopropylphosphoramidochloridit (31 μ l, 0,14 mmol) in THF (1 ml). Der ölige Rückstand wurde einer FC unterworfen (Elutionsmittel: F), was 80 mg (72%) eines farblosen Schaums ergab. DC (F): R_f 0,8. ³¹P-NMR (CDCl₃): 149,58, 149,53.

Beispiel 2: Synthese der 7-Iod-Derivate

[0177] Es wurden Oligonukleotide synthetisiert, die halogenierte "Purin-" und Pyrimidinbasen enthielten. Brom- und Iodsubstituenten wurden an der 7-Position von 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin- (2b, c) oder an der 5-Position von Uracilresten (3b, c) eingebracht. Phosphoramidite wurden unter Verwendung des Isobutyrylrests zum Schutz von 2b und der Benzoylgruppe für 2c synthetisiert. Duplices, die die Reste 2b oder 2c enthielten, ergaben immer höhere T_m-Werte als diejenigen der unmodifizierten Gegenstücke, die 2'-Desoxyadenosin, das Purin-2,6-diamin-2'-desoxyribonukleosid (1) oder 2a an den gleichen Positionen enthielten. Sechs 2b-Reste, die in dem Duplex 5'-d(TAGGTCAATACT) (102)-5'-d(AGTATTGACCTA) (103) dA ersetzen, erhöhen den T_m-Wert von 48° auf 75° (4,5° pro Modifikation). Im Gegensatz dazu zeigt der Einbau der 5-halogenierten 2'-Desoxyuridine 3b oder 3c in Oligonukleotid-Duplices einen sehr geringen Einfluss auf die thermische Stabilität, gleich welches "Purin"-Nukleosid sich gegenüber davon befindet. Die in DNA beobachteten positiven Wirkungen auf die thermische Stabilität von Duplices wurden auch bei DNA-RNA-Hybriden oder DNA mit paralleler Kettenausrichtung gefunden.

[0178] Die folgenden Daten vergleichen die Wirkungen von Halogensubstituenten, wie Brom und Iod, die an der 7-Position der 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-2'-desoxyribonukleoside 2b, c und der 2'-Desoxyuridin-Derivate 3b, c eingebracht werden (es wird die Purin-Nummerierung verwendet; siehe Schema 6). Diese Nukleoside werden an verschiedenen Positionen von Duplex-DNA eingeführt, und die Anzahl der Einführungen wird schrittweise erhöht. Weil die Halogensubstituenten in die große Furche gelenkt werden, war es bei beiden Reihen, den "Purin"- und den Pyrimidinnukleosiden, interessant, die Wirkungen zu quantifizieren. Ferner wird die Wirkung mehrfacher Einführungen untersucht, weil von anderen Duplex-stabilisierenden Nukleosiden bekannt ist, dass sich die stabilisierenden Wirkungen mit zunehmender Anzahl an Einführungen modifizierter Nukleoside abschwächen (C. Bailly, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 4309 und Bezugsstellen darin; J. Sági, E. Szakonyi, M. Vorlickova, J. Kypr, *J. Biomolec. Struct. Dyn.* 1996, 13, 1035.). Oligonukleotid-Duplices, die 7-halogenierte 7-Desazapurine (= Pyrrolo-[2,3d]pyrimidine) enthalten, zeigen Unterschiede in den Reihen der 7-Iod- und 7-Bromverbindungen (F. Seela, M. Zulauf, *Chem. Eur. J.* 1998, 4, 1781), die sich aus den räumlichen Anforderungen der Halogene (van der Waals-Radien: Br = 1,85 Å; I = 1,98 Å (A. Bondi, *J. Phys. Chem.* 1964, 68, 441)) und/oder aus dem hydrophoberen Charakter der Iodsubstituenten verglichen mit den Bromresten ergeben. So wurde das 7-Iod-Derivat des 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleosids (2c) synthetisiert, in ein Phosphoramidit umgewandelt, und eine Reihe von Oligonukleotiden wurde synthetisiert, die das 7-iodierte 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleosid 2c enthielten. Ein Vergleich der thermischen Stabilität dieser Duplices veranschaulicht die deutlichen Unterschiede in der Duplexstabilisierung zwischen in Pyrimidin- oder 8-Aza-7-desazapurin-Reste eingeführten Halogenen, die sich in einer ähnlichen Umgebung in der großen Furche einer B-DNA befinden.

Schema 6



Purin-Nummerierung

systematische Nummerierung

2.1. Synthese und Eigenschaften von Monomeren

[0179] Das 7-iodierte 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-2'-desoxyribonukleosid 2c wurde aus der 6-Isopropoxy-Verbindung 4 (F. Seela, G. Becher, *Synthesis* 1998, 2, 207) nach Behandlung mit 25%igem wässr. NH_3 bei 70°C für 4 Tage in einem Autoklaven hergestellt. Die halogenierten Nukleoside 2a, b (F. Seela, G. Becher, *Synthesis* 1998, 2, 207) sowie die 2'-Desoxyuridin-Derivate 3a–c sind an anderer Stelle beschrieben (J. Asakua, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* 1990, 55, 4928). Die Halogensubstituenten verändern die Beweglichkeit der Nukleoside an einer RP-HPLC-Säule, wobei iodiertes 2c und 3c die am langsamsten wandernden Verbindungen sind ([Fig. 5a](#), b). Die Retentionszeiten beziehen sich auf den hydrophoben Charakter der Nukleoside; die Daten wurden später für die Analyse der Zusammensetzung der basenmodifizierten Oligonukleotide verwendet.

Daten der Todverbindung – Tabelle 8. Halbwertszeiten (τ) von 2c bei 25° .

Verbindung	τ [min] ^{a)}	λ (nm)
$\text{I}^7\text{NH}_2^2\text{c}^7\text{z}^8\text{A}_d$ (2c)	stabil ^{b)}	242
$\text{I}^7\text{NH}_2^2\text{c}^7\text{z}^8\text{A}_d$ (2c)	61 ^{c)}	242

^{a)} gemessen in 0,5 N HCl. ^{b)} Innerhalb von 3 Std.

^{c)} gemessen in 2 N HCl.

[0180] Die Nukleobasen der modifizierten Nukleoside 2a–c und 3a–c beeinflussen das $\text{N} \leftrightarrow \text{S}$ -Pseudorotationsgleichgewicht der Zuckereinheit. Dies beeinflusst die Konformation des Zucker-Phosphat-Rückgrats von DNA. Aus diesem Grund wurden die ^1H -NMR-Spektren des Pyrazolo-[3,4-d]pyrimidin-Nukleosids 2c sowie der Pyrimidin-Nukleoside 3a–c in D_2O gemessen und $^3\text{J}[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NMR-Kopplungskonstanten bestimmt. Die Konformationsanalyse wurde auf Basis der $^3\text{J}[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NMR-Kopplungen unter Verwendung des PSEUROT-Programms (Van J. Wijk, C. Altona, 'PSEUROT 6.2 – A Program for the Conformational Analysis of the Five-Membered Rings', Universität Leiden, Juli 1993) durchgeführt. Tabelle 9 zufolge zeigt das 8-Aza-7-desazapurin-2,6-diamin-Nukleosid 2a eine höhere N-Konformer-Population als das entsprechende Purin-Nukleosid 1. Die Konformation um die $\text{C}(4')\text{-C}(5')$ -Bindung deutet darauf hin, dass das 8-Aza-7-desaza-2'-desoxyguanosine (F. Seela, G. Becher, H. Rosemeyer, H. Reuter, G. Kastner, I. A. Mikhailopulo, *Helv. Chim. Acta* 1999, 82, 105) die $\psi^{\text{I}}(-\text{sc})$ -Rotamer-Population bevorzugt, während für die regulären Purin-Nukleoside die $\psi^{(+)\text{g}}(+\text{sc})$ - oder die $\psi^{(-)\text{g}}(-\text{ap})$ -Konformation vorherrscht (G. Blackburn, M. J. Gait, 'Nucleic Acids in Chemistry and Biology', IRL Press, Oxford University Press 1990, S. 28) Die Konformation der Zuckereinheiten der Pyrimidin-Nukleoside 3a–c wird ebenfalls durch die Substitution an der 5-Position beeinflusst (Tabelle 9). Die hauptsächliche Veränderung wird zwischen 3a ohne einen 5-Substituenten und den Derivaten 3b, c mit Me- oder Halogen-Substituenten beobachtet.

Tabelle 9. $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ -Kopplungskonstanten der Zuckereinheiten und N/S-Konformer-Populationen der 2'-Desoxy-ribonukleoside 1–3 bei 303 K ^{a)}

	$^3\text{J}_{\text{H,H}}/\text{Hz}$							Konformation				
	1',2'	1',2''	2',3'	2'',3'	3',4'	4',5'	4',5''	%N	%S	$\gamma^{(+)\text{g}}$	γ^{t}	$\gamma^{(-)\text{g}}$
1	7.30	6.10	7.00	3.10	3.40	3.20	4.30	31	69	62	25	13
2a	6.60	6.80	6.90	3.70	3.60	4.00	5.80	37	63	36	42	22
2c	6.60	6.70	6.85	3.90	3.85	4.30	5.90	38	62	31	43	26
dT [16]	-	-	-	-	-	-	-	36	64	-	-	-
3a	6.70	6.60	6.50	4.30	4.10	3.60	5.20	30	70	47	35	18
3b	6.45	6.50	6.50	4.70	4.50	3.40	4.70	34	66	55	30	15
3c	6.50	6.50	6.50	4.50	4.40	3.40	4.80	33	67	54	31	15

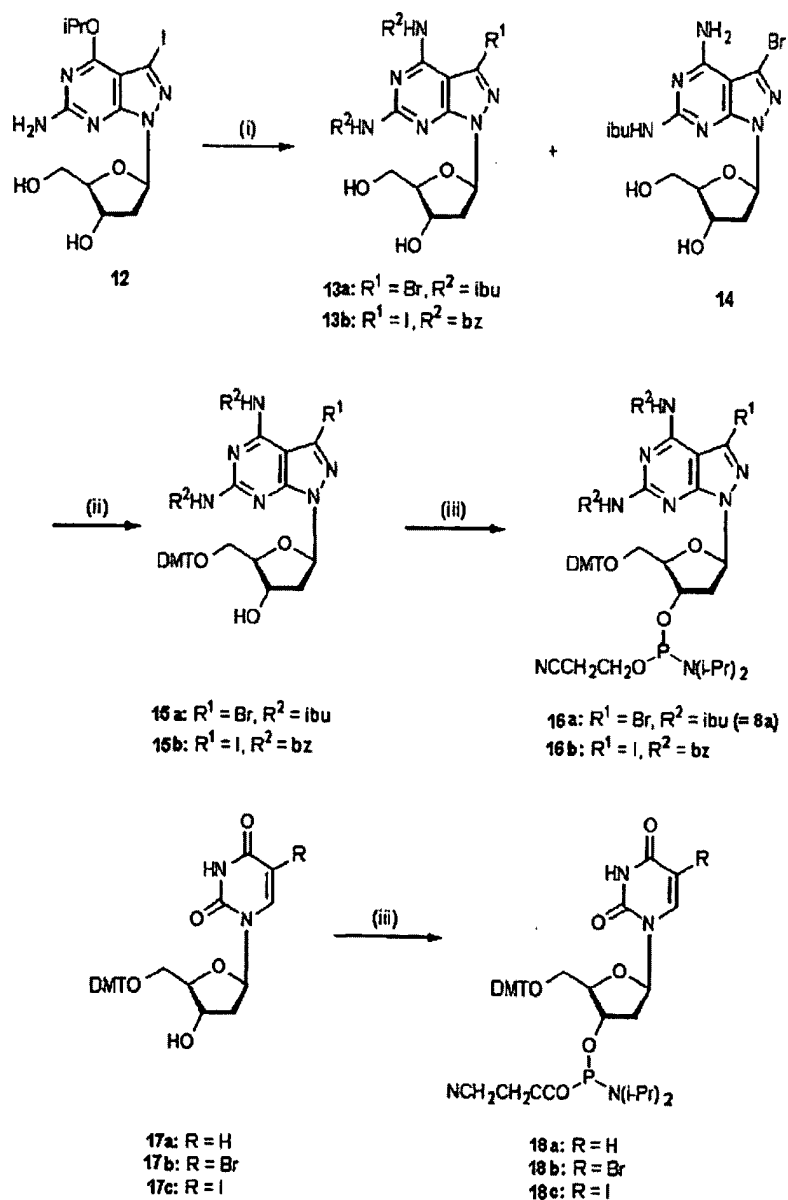
^{a)} Lösungsmittel D_2O ; r. m. s. < 0,4 Hz; $|\Delta J_{\text{max}}| < 0,4$ Hz.

[16] C. Thibaudeau, J. Plavec, J. Chattopadhyaya, J. Org. Chem. 1996, 61, 266.

[0181] Weil die Reaktivität der Aminogruppen des Nukleosids 2b recht unterschiedlich von derjenigen von 1 ist, wurden verschiedene Reste für den Basenschutz untersucht. Zuvor wurde das Nukleosid 2b mit einem N,N-Di(n-butyl)formamidin-(dnb-)Rest geschützt. Jetzt wurde die Isobutyrylgruppe eingebracht, wobei das Protokoll zum transienten Schutz (2b→13a) eingesetzt wurde (G. S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones, J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 1316). Als Nebenprodukt wurde das monogeschützte Nukleosid 14 isoliert (22%). Die Bildung monoacylierter Verbindungen wurde im Fall anderer 2,6-Diaminopurin-Nukleoside beobachtet (I. Luyten, A. V. Aerschot, J. Rozenski, R. Busson und P. Herdewijn, Nucleosides Nucleotides 1997, 16, 1649). Wenn die alkalische Hydrolyse der Verbindungen 13a oder 14 in 25%igem wässr. NH_3 bei 40° durchgeführt wurde, wurde eine schnelle Entfernung der Schutzgruppen beobachtet (siehe Schema 7). Die Halbwertszeiten für 13a und 14 wurden bestimmt, und es wurde gefunden, dass sie 4,5 min bzw. 20,5 min betrugen. Das zeigt, dass diese Schutzgruppe für die Festphasen-Oligonukleotidsynthese geeignet ist. Zum Schutz des Iod-Nukleosids 2c wurde wie bei 2b das Protokoll zum transienten Schutz verwendet, aber in diesem Fall wurde eine Benzoylgruppe gewählt (2c→13b). Die Zeit für die vollständige Entfernung der Schutzgruppen von 13b (25%iges wässr. NH_3 , 40°C, HPLC-Überwachung bei 260 nm) betrug 450 min. Aufgrund der schrittweisen Reaktion wurde keine Halbwertszeit bestimmt.

[0182] Die basengeschützten Nukleoside 13a, b sowie die Pyrimidin-Nukleoside 3a–c wurden unter Verwendung von Standardreaktionsbedingungen (Y. S. Sanghvi, G. D. Hoke, S. M. Freier, M. C. Zounes, C. Gonzalez, L. Cummins, H. Sasmor, P. D. Cook, Nucleic Acids Res. 1993, 21, 3197) in die DMT-Derivate 15a, b, und 17a–c umgewandelt. Die Phosphitylierung der DMT-Derivate 15a, b erfolgte in THF in Anwesenheit von 2-Cyanoethyldiisopropylphosphoramidochloridit, was die Phosphoramidite 16a, b lieferte (Schema 7); die Pyrimidin-Bausteine 18a–c wurden aus 17a–c in Dichlormethan hergestellt (Y. S. Sanghvi, G. D. Hoke, S. M. Freier, M. C. Zounes, C. Gonzalez, L. Cummins, H. Sasmor, P. D. Cook, Nucleic Acids Res. 1993, 21, 3197). Diese Phosphoramidite (16a, b und 18a–c) wurden bei der Festphasen-Oligonukleotidsynthese eingesetzt. Alle Verbindungen wurden mittels ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektren und durch Elementaranalyse charakterisiert (Tabelle 10). Tabelle 11 fasst die ^{13}C -NMR-Daten von 8-Aza-7-desazapurin sowie diejenigen der Pyrimidin-Nukleoside zusammen. Die Zuweisung erfolgte gemäß Gated-Decoupling-Spektren. Die NMR-Daten von 3a–c wurden eingeschlossen, da eine Suche in der Literatur wenig Information zu diesem Thema lieferte.

Schema 7



(i) **13a:** Me_3SiCl , Pyridin, Isobuttersäureanhydrid, R. T., 4 Std.; **13b:** Me_3SiCl , Pyridin, Benzoylchlorid, R. T., 24 Std.; (ii) $(\text{MeO})_2\text{TrCl}$, Pyridin, R. T., 4 Std.; (iii) 2-Cyanoethyldiisopropylphosphoramidochloridit, CH_2Cl_2 , R. T., 30 min.

Tabelle 10. Chemische Verschiebungen bei der ^{13}C -NMR von Pyrazolo[3,4-d]-pyrimidin-4,6-diamin-2-desoxy-ribouklesiden ^{a)}

	C(2) ^c) C(6) ^d)	C(4) ^c) C(7) ^e d)	C(5) ^c C(3) ^e d)	C(6) ^e) C(4) ^d)	C(7) ^d) C(3) ^d)	C=O/ =CH	C=O/ =CH	C(1')	C(2')	C(3')	C(4')	C(5')
2b	157.6	157.4	94.5	162.7	119.2			83.0	37.5	70.9	87.3	62.4
2c	157.0	157.6	91.2	162.2	98.3			83.1	37.6	70.9	87.3	62.4
3a	163.2	150.5	101.8	140.6				84.2	38.5	70.5	87.4	61.3
3b	159.1	149.7	95.6	140.6				84.7	38.4	69.9	87.5	60.7
3c	160.4	150.0	69.9	145.0				84.6	^{f)}	69.2	87.4	60.7
13a	155.8	153.8	104.7	156.2	121.4	175.2	176.5	83.6	37.5	70.7	87.7	62.2
13b	149.6	152.1	105.7	153.4	96.3	169.4	177.5	84.4	38.7	71.6	88.6	63.1
14	156.0	156.5	97.4	157.5	119.1	175.3		83.3	37.5	70.8	87.5	62.2
15a	155.6	154.9	98.5	157.5	117.2	174.7	175.2	83.5	37.6	72.2	85.4	63.6
15b	149.5	152.1	105.8	153.2	96.2	-	177.5	84.8	^{f)}	71.6	86.7	65.3
17a	163.0	158.0	101.5	144.7				84.1	f)	69.9	85.3	63.4
17b	158.0	159.1	96.0	144.7				84.9	38.4	70.3	85.7	63.6
17c	158.0	160.5	69.8	144.2				84.8	38.4	70.4	85.8	63.7

a) Gemessen in (D_6)DMSO bei 303 K. ^{c)} Purin-Nummerierung. ^{d)} Systematische Nummerierung. ^{e)} versuchsweise. f) Durch (D_6)DMSO überlagert.

2.2. Oligonukleotide

2. 2.1 Synthese und Charakterisierung

[0183] Die automatisierte Festphasensynthese der Oligonukleotide (Tabellen 11–17) wurde unter Verwendung der Phosphoramidite 16a, b und 18a–c sowie der Standard-Bausteine durchgeführt. Die Synthesen wurden nach dem Standardprotokoll (S. L. Beauge, M. Caruthers, Tetrahedron Lett. 1981, 22, 1859) durchgeführt, und die Kupplungsausbeuten waren immer höher als 97%. Oligonukleotide, die halogenierte dU-Reste enthalten, erfordern die Verwendung von 4-tert.-Butylphenoxyacetyl-(tac-)Gruppen zum Schutz der kanonischen Phosphoramidite (E. Ferrer, C. Fàbrega, R. G. Garcia, F. Azorín, R. Eritja, Nucleosides Nucleotides 1996, 15, 907; J. C. Schulhof, D. Molko und R. Teoule, Nucleic Acids Res. 1987, 15, 397; R. D. Sheardy und N. C. Seeman, J. Org Chem. 1986, 51, 4301). In diesen Fällen wurde die Entfernung der Schutzgruppen mit konz. Ammoniak bei Raumtemperatur durchgeführt, während in allen anderen Fällen die Entfernung der Schutzgruppen bei 60°C durchgeführt wurde. Die Oligonukleotide wurden detrityliert und an Reinigungskartuschen (Applied Biosystems, 'User's Manual for Oligonucleotide Purification Cartridges') oder durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt (Bedingungen für die Reinigung siehe Exper. Teil). Die Homogenität der Verbindungen wurde durch Ionenaustauschchromatographie nachgewiesen (siehe Exper. Teil). Die Zusammensetzung der Oligonukleotide wurde durch Tandemhydrolyse mit Schlangengift-Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase, gefolgt von RP-18 HPLC durchgeführt, wie beschrieben (F. Seela, C. Wei, Helv. Chim. Acta 1999, 82, 726). Typische Beispiele sind in [Fig. 5c](#), d dargestellt. Die neu eingebauten Iod-Nukleoside 2c oder 3c wandern langsamer als die kanonischen DNA-Bestandteile. Die Oligonukleotide wurden außerdem durch MALDI-TOF-Massenspektren charakterisiert. Die ermittelten Massen stimmten gut mit den berechneten Werten überein (Tabelle 18).

Tabelle 18. Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie gemessene Molekülmassen (MH^+) von Oligonukleotiden.

Oligomer	MH^+ (ber.)	MH^+ (gefunden)
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102)	3644.4	3645
5'-d(AGT ATT GAC CTA) (103)	3644.4	3645
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108)	3674.4	3677
5'-d(AGT 2aTT G2aC CTA) (109)	3674.4	3675
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110)	3832.5	3830
5'-d(AGT 2bTT G2bC CTA) (111)	3832.5	3832
5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT) (201)	4020	4021
5'-d(AGT ATT G2cC CTA) (202)	3786.7	3787
5'-d(AGT 2cTT GAC CTA) (203)	3786.7	3792
5'-d(AGT 2cTT G2cC CTA) (100)	3926.5	3927
5'-d(TAG GTC 2c2cT ACT) (204)	3927	3931
5'-d(T2cG GTC 2c2cT 2cCT) (205)	4208.3	4210
5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300)	3613.1	3616
5'-d(AGT A3a3a GAC CTA) (301)	3613.1	3615
5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302)	3774.1	3775
5'-d(AGT A3b3b GAC CTA) (303)	3774.1	3772
5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304)	3868.1	3871
5'-d(AGT A3c3c GAC CTA) (305)	3868.1	3871

2.2.2 Basenpaarstabilitäten der Oligonukleotid-Duplices

[0184] Es wurde gefunden, dass das 7-Brom-Nukleosid 2b DNA-Duplices stark stabilisiert, während die nicht-halogenierte Verbindung 2a wenig zur Duplexstabilität beiträgt (siehe auch F. Seela, G. Becher, *Helv. Chim. Acta* 2000, 83, 928; F. Seela, G. Becher, M. Zulauf, *Nucleosides Nucleotides* 1999, 18, 1399). Der Beitrag des Purin-2,6-diamin-Nukleosids 1 zur Duplexstabilität ist noch kleiner (C. Cheong, I. J. Tinoco, A. Chollet, *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 5115; J. D. Hoheisel, H. Lehrach, *FERS Lett.* 1990, 274, 103). Somit sind DNA Duplices, die Verbindung-1-Thymin-Basenpaare enthalten, nur wenig stabiler als diejenigen mit dA-dT-Paaren. Weil unbekannt ist, ob die stabilisierende Wirkung des Brom-Nukleosids 2b mit zunehmender Anzahl an Einführungen kontinuierlich zunimmt oder sich mit mehrfachen Einführungen abschwächt – wie es für andere modifizierte Nukleoside berichtet wurde (C. Bailly, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 4309 und Literaturstellen darin) – wurde eine Reihe von Oligonukleotiden synthetisiert, die die halogenierte Verbindung 2b aufeinander folgend oder an entfernter Position enthielten. Die modifizierten Reste wurden in einen oder beide Stränge einer Doppelstrang-DNA eingebaut. Die Gesamtanzahl an Einführungen nahm in Duplices von 1 bis 6 zu. Die nicht-halogenierten Duplices, die Verbindung 2a enthielten, wurden zum Vergleich hergestellt. Neben

dem Einbau des Brom-Nukleosids 2b wurde auch die Iod-Verbindung 2c untersucht. Für alle Experimente wurde der nicht-selbstkomplementäre Duplex 5'-d(TAGGTCAATACT) (102)·5'-d(AGTATTGACCTA) (103) gewählt.

[0185] Das nicht-halogenierte Nukleosid 2a erhöht den T_m -Wert des Standardduplex 102·103 nur um 1° pro modifiziertem Rest (Tabelle 11 und F. Seela, G. Becher, 2001, eingereicht). Im Gegensatz dazu trägt die Brom-Verbindung 2b eine Stabilisierung von $4\text{--}5^\circ$ pro modifiziertem Rest bei, was eine außerordentliche Stabilisierung darstellt, die durch eine nicht-kanonische Base induziert wird. Die Stärke dieser Wirkung ist sequenzabhängig, aber die Stabilität der Duplices nimmt mit steigender Anzahl an 2b-Einführungen zu, wie in [Fig. 6](#) dargestellt. Wenn das Iod-Nukleosid 2c die Brom-Verbindung 2b ersetzte, wird eine ähnliche Wirkung auf die Duplexstabilisierung beobachtet (Tabelle 11). Die Wirkung von Halogensubstituenten, die in die Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-Derivate von dG (F. Seela, G. Becher, *Helv. Chim. Acta* 1999, 82, 1640) oder dA (F. Seela, M. Zulauf, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1999, 479) eingebaut werden, macht nur 2° pro modifiziertem Rest aus.

[0186] Ein ähnlicher Satz von Experimenten, wie für die Duplices beschrieben wurde, die die halogenierten 8-Aza-7-desaza-Purin-Nukleoside 2b oder 2c enthalten, wurde mit den halogenierten 2'-Desoxyuridin-Derivaten 3b oder 3c durchgeführt (Tabelle 12). Weder das Brom-Nukleosid 3b noch das Iod-Nukleosid 3c erhöhen die Stabilität der Duplices signifikant verglichen mit nicht-halogeniertem 3a oder dT. Somit werden nur die Basenpaare des Typs I (Schema 8) mit Halogensubstituenten an der 7-Position der 8-Aza7-desazapurin-(pyrazolo[3,4-d]pyrimidin)-Einheit durch die Halogensubstituenten stabilisiert, während diejenigen des Typs II (Schema 8), bei denen die Halogene an die 5-Positionen der Pyrimidin-Basen gebunden sind, wenig Einfluss verglichen mit denjenigen mit dA-dT-Paaren ausüben.

Schema 8

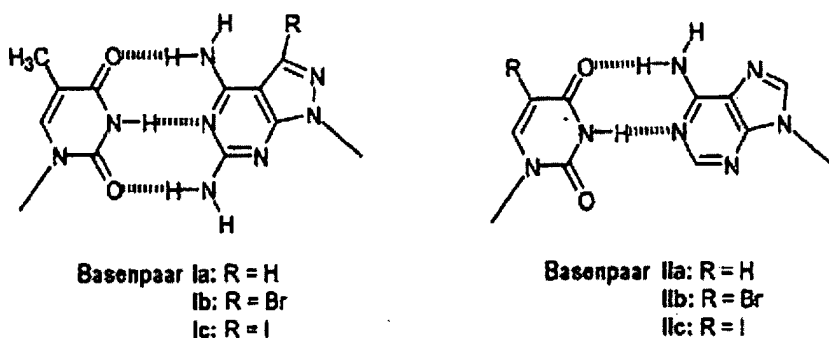


Tabelle 11. T_m -Werte und thermodynamische Daten der Duplexbildung von Oligonukleotiden, die die Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-Nukleoside 2a–c gegenüber von dT enthalten ^{a)}

Verbindung	T_m [°C]	ΔH° [kcal/mol]	ΔS° [cal/mol K]	ΔG°_{310} [kcal/mol]
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)	47	-83.8	-235.9	-10.6
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)	50	-93.3	-263.09	-11.7
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) (109)	50	-98.79	-279.63	-12.06
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) (109)	51	-98.66	-278.58	-12.26
	54	-99.96	-280.74	-12.89
5'-d(TAG GTC 2bAT ACT) (200) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)				
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)	56	-91.42	-251.68	-13.37
5'-d(TAG GTC AT ACT) (102) 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111)	59	-91.85	-251.25	-13.92
5'-d(TAG GTC 2bAT ACT) (200) 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111)	63	-100.70	-274.04	-15.70
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111)	67	-105.40	-285.02	-17.00
5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT)(201) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)	64	-99.08	-288.47	-15.81
5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT)(201) 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111)	75	-107.43	-283.41	-19.53
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-d(ATC C2cG TTA TGA) (202)	51	-90.65	-254.58	-11.69
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-d(ATC CAG TT2c TGA) (203)	54	-93.22	-260.43	-12.45
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100)	57	-95.09	-263.29	-13.43
5'-d(TAG GTC 2c2cT ACT)(204) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (102)	55	-96.46	-268.72	-13.12
5'-d(TAG GTC 2c2cT ACT)(204) 3'-d(ATC C2cGT T A TGA) (202)	59	-102.95	-284.63	-14.67
5'-d(TAG GTC 2c2cT ACT)(204) 3'-d(ATC C2cGT T2c TGA) (100)	66	-104.93	-284.73	-16.62
5'-d(T2cG GTC2c2cT 2cCT) (205) 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100)	72	—	—	—

^{a)} Thermodynamische Parameter stammen aus der Anpassung von Schmelzkurven, die bei 260 nm in 0,1 M NaCl, 10 mM MgCl₂ und 10 mM Na-Cacodylat-Puffer, pH 7,0, mit einer Einzelstrangkonzentration von 5 μ M + 5 μ M gemessen wurden. Die ΔG° stammen direkt aus dem Programm Meltwin 3.0 in Bezug auf 310°. Frühere Veröffentlichungen unseres Labors unter Verwendung des Anpassungsprogramms betreffen die gleiche Temperatur und nicht 298°, wie angegeben. Die aus den van't Hoff-Plots unter Verwendung der Konzentrationsabhängigkeit der T_m -Werte bestimmten thermodynamischen Daten stimmen mit den aus der Kurvenanpassung erhaltenen innerhalb von 15% überein. Die van't Hoff-Daten der Bildung des Duplex 102·103 sind wie folgt: $\Delta H^\circ = 86,8$ kcal/mol; $\Delta S^\circ = 243,7$ cal/K mol; $\Delta G^\circ_{310} = 11,3$ kcal/mol.

Tabelle 12. T_m -Werte und thermodynamische Daten der Duplexbildung von Oligonukleotiden, die die Pyrimidin-Nukleoside 3a–c gegenüber von dA enthalten ^{a)}

Verbindung	T_m [°C]	ΔH° [kcal/mol]	ΔS° [cal/mol K]	ΔG°_{310} [kcal/mol]
5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)	47	-86.35	-244.74	-10.45
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301)	48	-92.11	-261.95	-10.86
5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301)	46	-86.37	-245.42	-10.25
5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)	48	-95.76	-271.88	-11.44
5'-d(TAG GTC A A T ACT) (102) 3'-d(ATC CAG 3b3bA TGA) (303)	49	-97.43	-276.95	-11.53
5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) 3'-d(ATC CAG 3b3bA TGA) (303)	49	-94.25	-267.57	-11.26
5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)	49	-96.38	-273.73	-11.48
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305)	50	-94.99	-269.20	-11.50
5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) 3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305)	50	-99.14	-281.47	-11.85

^{a)} Siehe Tabelle 11.

[0187] Weil die Stabilität der Basenpaare der halogenierten Pyrimidin-Nukleoside 3b oder 3c mit dA klein war, verglichen mit den gegenüber von dT eingebauten halogenierten Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-Verbindungen 2b oder 2c, wurden dreizählige Basenpaare hergestellt, in denen sich die halogenierten Pyrimidin-Nukleoside 3a–c gegenüber dem Purin-2,6-diamin-Nukleosid 1 anstelle von dA befinden (Schema 9, bp-Typ III). In diesem Fall kann eine Verstärkung des Basenpaars erwartet werden, wenn die Bildung einer dritten Wasserstoffbindung möglich ist. Die T_m -Werte dieser Duplices wurden jedoch durch den Ersatz von dA-Resten durch das Nukleosid 1 nicht signifikant beeinflusst (Tabelle 13). Dies deutet darauf hin, dass die 2-Aminogruppe nicht an möglichen Basenpaaren, wie in IIIa–c (Schema 9) gezeigt, teilnimmt, ein Befund ähnlich demjenigen, der für ein Basenpaar zwischen 1 und dT beobachtet wird (F. Seela, G. Becher, 2001, eingereicht; C. Cheong, I. J. Tinoco, A. Chollet, Nucleic Acids Res. 1988, 16, 5115; J. D. Hoheisel, H. Lehrach, FERS Lett. 1990, 274, 103). Ein ähnliches Verhalten wurde im Fall von Duplices gefunden, die das zwischen dem Nukleosid 2a und den Pyrimidin-Nukleosiden 3a–c gebildete Basenpaar IVa (Schema 9) enthalten (Tabelle 13). Trotzdem sind die Duplices, die die Basenpaare IVb, c enthalten, etwas stabiler als diejenigen, die die Basenpaare IIIb, c enthalten.

Schema 9

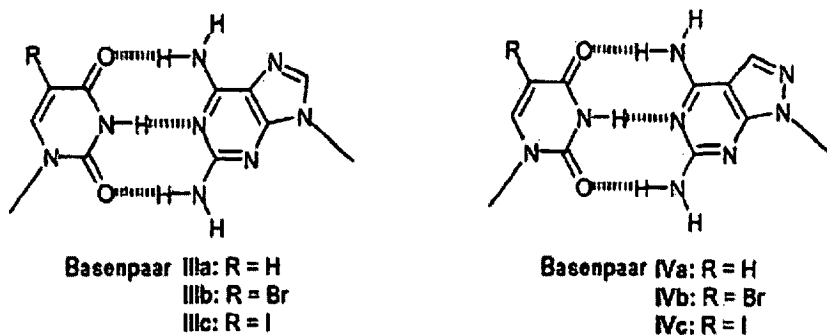


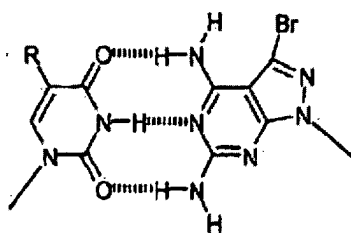
Tabelle 13. T_m -Werte und thermodynamische Daten von Oligonukleotid-Duplices, die die halogenierten Pyrimidin-Nukleoside 3a–c gegenüber dem Purin-2,6-diamin-Nukleosid 1 oder dem Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin-Nukleosid 2a enthalten ^{a)}

	T_m [°C]	ΔH° [kcal/mol]	ΔS° [cal/mol K]	ΔG°_{310} [kcal/mol]
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-d(ATC C1G TT1 TGA) (105)	49	-83.15	-232.81	-10.94
5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) 3'-d(ATC C1G TT1 TGA) (105)	48	-73.03	-202.44	-10.25
5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) 3'-d(ATC C1G TT1 TGA) (105)	49	-73.84	-203.94	-10.59
5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) 3'-d(ATC C1G TT1 TGA) (105)	49	-77.60	-215.48	-10.76
5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)	48	-54.74	-144.65	-9.88
5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301)	48	-60.03	-161.49	-9.94
5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) 3'-d(ATC CAG 3b3b TGA) (303)	48	-60.09	-160.37	-10.35
5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) 3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305)	48	-62.35	-167.33	-10.45
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301)	49	-87.32	-245.54	-11.16
5'-d(T1G GTC 2a2aT ACT) (108) 3'-d(ATC CAG 3b3b TGA) (303)	50	-89.11	-250.34	-11.47
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) 3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305)	51	-81.32	-225.60	-11.35
5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) (109)	49	-90.30	-253.96	-11.53
5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) (109)	51	-93.05	-261.91	-11.82
5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) (109)	50	-90.58	-254.11	-11.77

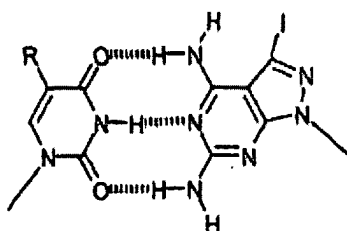
^{a)} Siehe Tabelle 11.

[0188] Eine signifikante Duplexstabilisierung wurde beobachtet, wenn die halogenierten 8-Aza-7-desazapurin-Nukleoside 2b oder 2c gegenüber den Pyrimidin-Nukleosiden 3a–c eingebaut wurden (Tabelle 14 und Schema 10, bp des Typs V und VI). Die T_m -Zunahme macht etwa 4–5° pro eingebautem Rest der halogenierten Nukleoside 2b oder 2c aus. Alle Duplices, die die halogenierten Nukleoside 2b oder 2c enthalten (Schema 10), ergeben sehr ähnliche T_m -Werte ungeachtet des Pyrimidin-Monomers, das sich gegenüber befindet. Somit führen nur Halogensubstituenten, die an die modifizierten Purin-Reste gebunden sind, zu einer Duplexstabilisierung, wogegen an der 5-Position der 2'-Desoxyuridin-Einheit gebundene Halogene sehr wenig zur Duplexstabilität beitragen (S. M. Freier und K.-H. Altman, *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 4429; F. Seela, Y. He, *Helv. Chim. Acta* 2000, 83, 2527; S. Wang, E. T. Kool, *Biochemistry* 1995, 34, 4125)

Schema 10



Basenpaar Va: R = H
 Vb: R = Br
 Vc: R = I



Basenpaar Vla: R = H
 Vlb: R = Br
 Vlc: R = I

Tabelle 14. T_m -Werte und thermodynamische Daten von Oligonukleotiden, die die Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin-Nukleoside 2b–c gegenüber von dT und 3a–c enthalten ^{a)}

Duplex	T_m [°C]	ΔH° [kcal/mol]	ΔS° [cal/mol K]	ΔG°_{310} [kcal/mol]
5'-d(TAG GTC 2bAT ACT) (200)	52	-92.88	-260.97	-11.94
3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301)				
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110)	55	-96.78	-269.67	-13.14
3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301)				
5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT) (201)	64	-101.57	-276.51	-15.82
3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301)				
5'-d(TAG GTC 2bAT ACT) (200)	54	-98.06	-275.03	-12.76
3'-d(ATC CAG 3b3bA TGA) (303)				
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110)	55	-95.42	-266.68	-12.71
3'-d(ATC CAG 3b3b TGA) (303)				
5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT) (201)	65	-106.49	-290.34	-16.44
3'-d(ATC CAG 3b3bA TGA) (303)				
5'-d(TAG GTC 2bAT ACT) (200)	54	-87.97	-244.29	-12.20
3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305)				
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110)	55	-89.17	-246.44	-12.74
3'-d(ATC CAG 3c3cTGA) (305)				
5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT) (201)	65	-101.57	-275.34	-16.18
3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305)				
5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300)	56	-95.76	-265.45	-13.43
3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111)				
5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302)	56	-96.53	-268.70	-13.20
3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111)				
5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304)	57	-97.07	-269.07	-13.62
3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111)				
5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300)	55	-96.93	-270.69	-12.98
3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100)				
5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302)	55	-100.82	-282.19	-13.29
3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100)				
5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304)	55	-98.00	-273.26	-13.25
3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100)				

^{a)} Siehe Tabelle 11.

2.2.3 Basendiskriminierung

[0189] Um die Diskriminierung der Iod-Nukleoside 2c gegenüber den vier kanonischen DNA-Bestandteilen zu untersuchen, wurden Hybridisierungsexperimente gemäß Tabelle 15 durchgeführt. Wie erwartet, ist das Basenpaar 2c-dT das stärkste (102·100, $T_m = 59^\circ$), während diejenigen der Duplices, die Fehlpaarungen bilden, bei signifikant niedrigerer Temperatur schmelzen (Tabelle 15). Die Diskriminierung des Iod-Nukleosids 2c ist ähnlich derjenigen der kanonischen Nukleoside, ausgenommen dass der Duplex 401·100 ($T_m = 52^\circ$) einen um 7° niedrigeren T_m -Wert zeigt als der Duplex 102·100 ($T_m = 59^\circ$), während der Duplex 401·103 ($T_m = 46^\circ$) fast die gleiche Stabilität hat wie der Ausgangs-Duplex 102·103 ($T_m = 48^\circ$). Der hohe T_m -Wert von 401·103 ist das Ergebnis der Bildung des dG-dA-Hoogsteen-Paars, das offensichtlich nicht zwischen dG und Verbindung 2c gebildet wird.

Tabelle 15. T_m -Werte von Oligonukleotiden, die das Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin-Nucleosid 2c gegenüber den vier kanonischen Nucleosiden enthalten ^{a)}

Duplex	T_m [°C]	T_m [°C]
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100)	57	5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)
5'-d(TAG GAC AAT ACT) (400) 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100)	45	5'-d(TAG GAC AAT ACT) (400) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)
5'-d(TAG GGC AAT ACT) (401) 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100)	50	5'-d(TAG GGC AAT ACT) (401) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)
5'-d(TAG GCC AATACT) (402) 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100)	45	5'-d(TAG GCC AATACT) (402) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103)

^{a)} siehe Tabelle 11.

[0190] Als nächstes wurden die CD-Spektren der Duplices gemessen, die die 2-Amino-8-aza-7-desazaadenin-Derivate 2a, b enthielten. Eine B-artige DNA-Struktur kann aus den in [Fig. 7a](#) dargestellten Kurven abgeleitet werden. Ein positiver Cotton-Effekt um 270 bis 290 nm und ein negativer Lappen bei 250 nm werden für den Standardduplex (102·103) erhalten. Das CD-Spektrum des Duplex 104·105, der 1 enthält, zeigt signifikante Unterschiede ähnlich derjenigen von 110·111, während der Duplex 108·109 einen stärker negativen Cotton-Effekt bei 260 nm und einen positiven bei 235 nm zeigt. Ähnliche Unterschiede wurden für das Oligonukleotid berichtet, das 7-substituiertes 8-Aza-7-desaza-7-iodguanin enthält (N. Ramzaeva, F. Seela, *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1549).

2.4 DNA-RNA Hybride

[0191] Um den Einfluss der 2,6-Diamino-Nukleoside 1 und 2a, b auf die Stabilität von DNA-RNA-Hybriden zu untersuchen, wurden die Oligodesoxyribonukleotide 110, 300, 302, 304, 104 und 102 mit dem Oligoribonukleotid 403 hybridisiert. Tabelle 16 zeigt, dass die verschiedenen Modifikationen einen signifikanten Einfluss auf die Duplexstabilität der DNA-RNA-Hybride ausüben. Während der Einbau der nicht-halogenierten Nukleoside 1 oder 2a die DNA-RNA Struktur sehr wenig stabilisiert, zeigt die Hybridisierung des Oligonukleotids, das 2b enthält, mit 403 (110·403) wie in DNA eine signifikante Zunahme der Duplexstabilität. Die Verbindungen 3b und 3c verstärken die thermische Stabilität von DNA-RNA in kleinem Ausmaß, das auch für andere Modifikationen von 2'-Desoxyuridin beobachtet wird (B. C. Froehler, S. Wadwani, T. J. Terhorst, S. R. Gerrard, *Tetrahedron* 1992, 33, 5307; J. Sági, A. Szemző, K. Ébinger, A. Szabolcs, G. Sági, É. Ruff, L. Ötvös, *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 2191). Die Hypochromizitäten der chimären Hybride sind gegenüber denjenigen der DNA-DNA-Duplices leicht verringert (Daten nicht gezeigt). Aus den CD-Spektren von [Fig. 7b](#) ist ersichtlich, dass die DNA-RNA-Hybride die A-Form annehmen (N. Ramzaeva, C. Mittelbach, F. Seela, *Helv. Chim. Acta* 1997, 80, 1809).

Tabelle 16. T_m -Werte und thermodynamische Daten von DNA-RNA-Hybriden ^{a)}

Duplex	T_m [°C]	ΔH° [kcal/mol]	ΔS° [cal/mol • K]	ΔG°_{310} [kcal/mol]
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403)	45	-92.1	-264.0	-10.2
5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403)	48	-60.46	-162.12	-10.18
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403)	48	-	-	-
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403)	53	-98.64	-276.97	-12.74
5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403)	44	-74.43	-208.26	-9.84
5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403)	48	-77.19	-215.13	-10.47
5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403)	47	-78.77	-220.52	-10.37

^{a)} Siehe Tabelle 11.

2.5 Duplices mit paralleler Kettenorientierung

[0192] Die Basenpaarung der Nukleoside 1, 2a–c sowie 3b, c wurde auch in DNA mit parallelen Strängen untersucht [29]. Zu diesem Zweck war es notwendig, das dC–dG-Paar durch ein m^5iC_d – iG_d -Paar zu ersetzen. Die Duplices 102–115 und 116–103 dienten als Standards (F. Seela, C. Wei, G. Becher, M. Zulauf, P. Leonard, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000, 10, 289). Ein Ersatz von dA-Resten durch das Diamino-Nukleosid 1 führte zu einer leichten Stabilitätsabnahme der ps-Duplices 104–115 und 116–105 (Tabelle 17). Der Einbau von 2a–c in die ps-DNA führte zu einer signifikanten Zunahme der T_m -Werte. Der Einbau der substituierten Pyrimidin-Nukleoside 3b, c anstelle von dT führt nur zu kleinen Veränderungen der T_m -Werte. Daraus kann geschlossen werden, dass ähnlich wie bei DNA mit antiparalleler Kettenorientierung die Halogensubstituenten der "Purin"-Nukleoside 2b, c diese Duplices stabilisieren, wogegen die Halogensubstituenten der Pyrimidin-Nukleoside sehr wenig zur Duplexstabilität beitragen.

Tabelle 17. T_m -Werte und thermodynamische Daten von Oligonukleotidduplexes mit parallelen Strängen, die die Nukleoside 1, 2a–c und 3a–c enthalten ^{a,b)}

Duplex	T_m [°C]	ΔH^0 [kcal/mol]	ΔS^0 [cal/mol • K]	ΔG^0_{310} [kcal/mol]
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102)	39	-74.4	-212.3	-8.5
5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115)				
5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104)	36	-48.12	-129.68	-7.90
5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115)				
5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108)	41	-61.77	-170.95	-8.75
5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115)				
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110)	45	-66.59	-183.94	-9.54
5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115)				
5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302)	37	-50.64	-137.87	-7.88
5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115)				
5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304)	36	-55.09	-152.14	-7.90
5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115)				
5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116)	44	-85.0	-242.0	-10.0
5'-d(AGT ATT GAC CTA) (103)				
5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116)	39	-61.00	-169.68	-8.38
5'-d(AGT 1TT G1C CTA) (105)				
5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116)	45	-80	-230	-10.3
5'-d(AGT 2aTT G2aC CTA) (109)				
5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116)	48	-68.34	-186.29	-10.56
5'-d(AGT 2bTT G2bC CTA) (111)				
5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116)	43	-76.03	-215.51	-9.19
5'-d(AGT A3b3b GAC CTA) (303)				
5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116)	42	-67.15	-187.02	-9.15
5'-d(AGT A3c3c GAC CTA) (305)				

^{a)} Gemessen bei 260 nm in 1 M NaCl, 100 M MgCl₂, 60 mM Na-Cacodylat-Puffer, pH 7,0 mit einer Oligomerkonzentration von 5 + 5 μ M. ^{b)} d(iC) = m⁵iC_d = 2'-Desoxy-5-methylisocytidin.

2.3. Schlussfolgerung

[0193] Die an der 7-Position der 8-Aza-7-desazapurin-2'-desoxy-Nukleoside (2b, c) oder der 5-Position von 2'-Desoxyuridin-Resten (3a–c) eingebrachten Halogensubstituenten üben ganz unterschiedliche Einflüsse auf die Stabilität von Nukleinsäureduplexes aus. Im Fall der 7-halogenierten 8-Aza-7-desazapurin-2'-desoxy-Nukleoside 2b, c trägt jedes Monomer etwa 4°–5° zur Duplexstabilisierung bei, während die Pyrimidin-Nukleoside 3a–c einen sehr kleinen Einfluss oder sogar gar keine Wirkung zeigen. Dies ist überraschend, weil die Halogene in beiden Reihen von Nukleobasen in die große Furche von B-DNA gesteuert werden, wo sie sich nicht in einer identischen, aber einer sehr ähnlichen Umgebung befinden. Wenn sowohl die halogenierten Pyrimidine als auch die halogenierten 8-Aza-7-desazapurin-Nukleoside in einem DNA-Duplex vorliegen, leisten nur die letzteren einen Beitrag zur Duplexstabilisierung. Folglich ist die durch die lipophilen Halogensubstituenten induzierte Zunahme des hydrophoben Charakters der großen Furche und das Austreiben von Wassermolekülen nicht die hauptsächliche Wirkung, die durch die Halogenierung der großen Furche ausgelöst wird. Anscheinend wird die Stapelwechselwirkung zwischen den nächsten Nachbarn im Fall von 2b, c, aber nicht mit 3b, c verstärkt.

2.4. Experimenteller Teil

[0194] Monomere: Allgemein. Siehe frühere Manuskripte (F. Seela, G. Becher, *Helv. Chim. Acta* 2000, 83, 928; F. Seela, G. Becher, M. Zulauf, *Nucleosides Nucleotides* 1999, 18, 1399; F. Seela, M. Zulauf, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1999, 479.) Flashchromatographie (FC): 0,4 bar auf Silicagel 60 H (Merck, Darmstadt, Deutschland). Dünnschichtchromatographie (DC): Aluminiumplatten, Silicagel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck, Deutschland). Lösungsmittelsysteme für FC und DC: CH₂Cl₂/MeOH 9:1 (A) CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (B), CH₂Cl₂/MeOH 9:1 (C), CH₂Cl₂/EtOAc 85:15 (D), CH₂Cl₂/Aceton 95:5 (E). Schmp.: Büchi-SMP-20-Apparatur

(Büchi, Schweiz); unkorrigiert. NMR-Spektren: Avance-DPX-250- und AMX-500-Spektrometer (Bruker, Deutschland); die δ -Werte sind in ppm feldabwärts des internen SiMe_4 (^1H , ^{13}C) angegeben. Mikroanalysen wurden durch das Mikroanalytische Labor Beller (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

[0195] Oligonukleotide. – Die Oligonukleotidsynthese erfolgte an einem DNA-Synthesegerät, Modell 392 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Schmelzkurven wurden mit einem Cary-1/3-UV/VIS-Spektralphotometer (Varian, Australien) gemessen, das mit einem thermoelektrischen Regler von Cary ausgestattet war. Die Temperatur wurde in der Referenzzelle mit einem Pt-100-Widerstand kontinuierlich gemessen, und die thermodynamischen Daten der Duplexbildung wurden unter Verwendung des Meltwin-3.0-Programms (J. A. McDowell, D. H. Turner, *Biochemistry* 1996, 35, 14077) berechnet. Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco-600-(Jasco, Japan) Spektropolarimeter mit thermostatisch (Lauda-RCS-6-Bad) geregelten 1-cm-Küvetten aufgezeichnet. UV-Spektren: 150-20-Spektrometer (Hitachi, Japan). Die enzymatische Hydrolyse der Oligomere wurden durchgeführt, wie beschrieben a) (F. Seela, G. Becher, *Helv. Chim. Acta* 2000, 83, 928; F. Seela, G. Becher, M. Zulauf, *Nucleosides Nucleotides* 1999, 18, 1399) unter Verwendung folgender Extinktionskoeffizienten: ϵ_{260} $^7\text{G}_d$ 2700, dT 8800, dC 7300, dA 15400, dG 11700, $2a$ 8800, $2b$ 8700, $2c$ 8700, $3a$ 10000, $3b$ 4800, $3c$ 3700. Schlangengift-Phosphodiesterase (EC 3.1.15.1, *Crotallus durissus*) und alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1, *E. coli*) waren großzügige Geschenke der Roche Diagnostics GmbH, Deutschland. Die MALDI-TOF-Spektren wurden an einem Biflex III-Spektrometer (Bruker Saxonia, Leipzig, Deutschland) gemessen.

[0196] Synthese und Reinigung der Oligonukleotide. – Die Synthese wurde in einem Maßstab von 1 μmol mit 3'-Phosphoramiditen von $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{ib}^2\text{G}_d$, $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{bz}^6\text{A}_d$, $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{bz}^4\text{C}_d$ und $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{T}_d$ für die Synthese von Oligonukleotiden, die $2a$ – c enthielten, und $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{tac}^2\text{G}_d$, $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{tac}^6\text{A}_d$, $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{tac}^4\text{C}_d$ und $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{T}_d$ für die Synthese von Oligonukleotiden, die $3a$ – c enthielten, durchgeführt. Nach der Abspaltung der Oligonukleotide von dem festen Träger wurden die Schutzgruppen von den ersten in 25%igem NH_3 für 12–15 Std. bei 60° abgespalten. Die letzteren wurden zur Entfernung der Schutzgruppen für 1,5–2 Std. bei Raumtemperatur in 25%igem wässr. NH_3 inkubiert. Die Reinigung der 5'-(Dimethoxytrityl)-Oligomere wurde mittels Umkehrphasen-HPLC (RP-18) durchgeführt. Der folgende Lösungsmittelgradient wurde verwendet (A, 0,1 M $(\text{Et}_3\text{NH})\text{OAc}$ (pH 7,0)/MeCN 95:5; B, MeCN): 3 min 20% B in A, 12 min 20–40% B in A mit einer Flussrate von 1,0 ml/min. Die konzentrierten Oligonukleotide wurden mit 2,5%igem $\text{CHCl}_2\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ für 5 min bei Raumtemperatur behandelt, um die 4,4'-Dimethoxytrityl-Reste zu entfernen. Die detritylierten Oligomere wurden durch Umkehrphasen-HPLC mit dem Gradienten: 20 min 0–20% B in A mit einer Flussrate von 1 ml/min gereinigt. Die Oligomere wurden an einer kurzen Säule (RP-18, Silicagel) entsalzt und dann an einem Speed-Vac-Verdampfer lyophilisiert, so dass farblose Feststoffe erhalten wurden, die bei -24° eingefroren wurden. Die gereinigten Oligomere wurden in 100 μl doppelt destilliertem H_2O gelöst, und die Reinheit wurde mittels Ionenaustauschchromatographie an einer Dionex-Nucleopac-PA-100-HPLC-Säule (4 $\times$ 250 mm, P/N 043010; Dionex, Idstein, Deutschland) überprüft.

[0197] Analyse der Nukleosid-Zusammensetzung. – Die Oligonukleotide wurden in 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,3, 200 μl) gelöst und mit Schlangengift-Phosphodiesterase (3 μl) bei 37° für 45 min und dann mit alkalischer Phosphatase (3 μl) bei 37° weitere 30 min behandelt. Die Reaktionsgemische wurden an Umkehrphasen-HPLC (RP-18, bei 260 nm, Gradient A, 0,7 ml/min) analysiert. Die Retentionszeiten von $2a$ – c und $3a$ – c wurden als Standards verwendet (**Fig. 5**). Die Extinktionskoeffizienten der Nukleoside und die Maximabereiche wurden zur Quantifizierung der Zusammensetzung der Oligonukleotide verwendet (**Fig. 5a**–**d**).

[0198] 1-(2-Desoxy- β -D-erythropentofuranosyl)-3-iod-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin ($2c$). Eine Lösg. der Verb. 6-Amino-1-[2-desoxy- β -D-erythropentofuranosyl]-3-iod-4-isopropoxy-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin 12 (F. Seela, G. Becher, *Synthesis* 1998, 2, 207) (1 g, 2,3 mmol) in einer wässr. 25%igen NH_3 -Lösg. (80 ml) wurde bei 70°C für 4 T erhitzt. Das Lösungsmittel wurde bis zur Trockne verdampft, der Rückstand in heißem Wasser gelöst und kristallisiert. Farblose Nadeln (640 mg, 71%). Schmp. 154° . DC (A): R_f 0,2. UV (MeOH): 223 (31800), 260 (8700), 278 (9100). $^1\text{H-NMR}$ ((D_6) DMSO): 2,12 (m, $\text{H}_\alpha\text{-C}(2'')$); 2,67 (m, $\text{H}_\beta\text{-C}(2'')$); 3,38, 3,44 (m, $\text{H}_2\text{-C}(5'')$); 3,73 (m, $\text{H-C}(4'')$); 4,33 (m, $\text{H-C}(3'')$); 4,73 (t, $J = 5,7$, $\text{OH-C}(5'')$); 5,17 (d, $J = 4,3$, $\text{OH-C}(3'')$); 6,27 (t, $J = 6,5$, $\text{H-C}(1'')$); 6,34 (br, NH_2); 6,62 (br, NH_2). Anal. berech. für $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{IN}_6\text{O}_3$ (392,2): C 30,63, H 3,34, N 21,43; gefunden: C 30,91, H 3,61, N 21,27.

[0199] 3-Brom-1-(2-desoxy- β -D-erythropentofuranosyl)-4,6-[(2-methylpropanoyl)amino]-1-pyrazolo(3,4-d)pyrimidin ($12a$). Verb. $2b$ (F. Seela, G. Becher, *Synthesis* 1998, 2, 207) (0,74 g, 2,14 mmol) wurde mit wasserfr. Pyridin dreimal verdampft und in wasserfr. Pyridin (5 ml) unter Rühren bei R. T. gelöst. Me_3SiCl (1,37 ml, 10,8 mmol), und nach 15 min Isobuttersäureanhydrid (3,56 ml, 21,5 mmol) wurden zugegeben. Das Rühren wurde für 3 Std. fortgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Eisbad abgekühlt und mit H_2O (2,5 ml) verdünnt, 5 min später wurde wässr. 25%iges NH_3 (4,3 ml) zugegeben. Nach 30-minütigem Rühren wurde das Reakti-

onsgemisch bis zur Trockne verdampft und gemeinsam mit Toluol (dreimal) verdampft. Der Rückstand wurde mittels FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) gereinigt, was zwei Zonen ergab. Aus der schnell wandernden Zone wurde Verbindung 13a als farbloser amorpher Feststoff erhalten (500 mg, 48%). R_f (A) 0,4. UV (MeOH): 284 (9500), 239 (33900). $^1\text{H-NMR}$ ($(\text{D}_6)\text{DMSO}$): 1,15 (m, $2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,25 (m, $\text{H}_\alpha\text{-C}(2')$); 2,75 (m, $\text{H}_\beta\text{-C}(2')$); 2,86 (m, $2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 3,47 (m, $\text{H}_2\text{-C}(5')$); 3,81 (m, $\text{H-C}(4')$); 4,44 (m, $\text{H-C}(3')$); 4,73 (t, $J = 5,5$, $\text{OH-C}(5')$); 5,32 (d, $J = 4,3$, $\text{OH-C}(3')$); 6,54 (t, $J = 6,6$, $\text{H-C}(1')$); 10,59, 10,72 (2s, 2NH). Anal. berech. für $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{BrN}_6\text{O}_5$ (485,3): C 44,55, H 5,19, N 17,32, gefunden C 44,90, H 5,28, N 16,81.

[0200] 4-Amino-3-brom-1-(2-desoxy- β -D-erythropentofuranosyl)-6-[(2-methylpropanyl)amino]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin (14). Die langsamer wandernde Zone aus der obigen Umsetzung lieferte Verbindung 14 als einen farblosen amorphen Feststoff (0,2 g, 22%). R_f (A) 0,36. UV (MeOH): 282 (10900), 237 (49500). $^1\text{H-NMR}$ ($(\text{D}_6)\text{DMSO}$): 1,04, 1,07 (m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,21 (m, $\text{H}_\alpha\text{-C}(2')$); 2,71 (m, $\text{H}_\beta\text{-C}(2')$); 2,90 (m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 3,46 (m, $\text{H}_2\text{-C}(5')$); 3,78 (m, $\text{H-C}(4')$); 4,38 (m, $\text{H-C}(3')$); 4,72 (t, $J = 5,6$, $\text{OH-C}(5')$); 5,28 (d, $J = 4,3$, $\text{OH-C}(3')$); 6,42 (t, $J = 6,4$, $\text{H-C}(1')$); 6,96, 7,76 (br, NH_2); 10,08 (br, NH). Anal. berech. für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{BrN}_6\text{O}_4$ (415,2): C 40,49, H 4,61, N 20,24, gefunden C 40,58, H 4,72, N 19,93.

[0201] 1-[2-Desoxy- β -D-erythropentofuranosyl]-4,6-dibenzamido-3-iod-1H-pyrazolo[3,4-d]-pyrimidin (13b). Verbindung 2c (1,0 g, 2,55 mmol) wurde zweimal zusammen mit Toluol verdampft. Sie wurde in wasserfr. Pyridin (40 ml) gelöst, und TMS-Cl (3,25 ml, 25,5 mmol) wurde unter Rühren zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter einer Argonatmosphäre gerührt, auf 0° abgekühlt, und PhCOCl (3,0 ml, 25,8 mmol) wurde tropfenweise innerhalb von 30 min zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei R. T. wurde das Gemisch mit EtOAc (200 ml) verdünnt, mit einer gesätt. wässr. NaHCO_3 -Lösung (200 ml) und eiskaltem H_2O (200 ml) gewaschen. Die wässr. Phase wurde mit EtOAc (2×400 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden bis zur Trockne verdampft und der Rückstand in THF/MeOH/ H_2O (250 ml, 5:4:1) gelöst. Die dunkelorange Lösung wurde auf 0°C abgekühlt, dann wurde 2 N NaOH (25 ml) zugegeben, und das Rühren wurde für weitere 40 min fortgesetzt. Der Rückstand wurde durch FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98:2 $\rightarrow$ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5) gereinigt, so dass ein amorpher Feststoff erhalten wurde (1,15 g, 75%). DC (B): R_f 0,4. UV (MeOH): 244 (17400), 276 (14200). $^1\text{H-NMR}$ ($(\text{D}_6)\text{DMSO}$): 2,13 (m, $\text{H}_\alpha\text{-C}(2')$); 2,67 (m, $\text{H}_\beta\text{-C}(2')$); 3,38, 3,52 (m, $\text{H}_2\text{-C}(5')$); 3,84 (m, $\text{H-C}(4')$); 4,46 (m, $\text{H-C}(3')$); 4,72 (t, $J = 5,7$, $\text{OH-C}(5')$); 5,29 (d, $J = 4,4$, $\text{OH-C}(3')$); 6,66 (t, $J = 6,5$, $\text{H-C}(1')$); 7,51-8,11 (m, arom. H); 10,54, 10,78 (s, 2NH). Anal. berech. für $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{IN}_6\text{O}_5$ (586,4): C 48,01, H 3,53, N 14,00; gefunden: C 47,93, H 3,53, N 14,05.

[0202] 3-Brom-1-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythropentofuranosyl]-4,6-diisobutyrylamin-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin (15a). Verbindung 13a (0,5 g, 1,03 mmol) wurde dreimal zusammen mit wasserfr. Pyridin verdampft und in Pyridin (1,5 ml) gelöst. DMT-Cl (0,45 g, 1,33 mmol) wurde zugegeben, und das Gemisch wurde bei R. T. für 3 Std. gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeOH gequench und das Gemisch bis zur Trockne verdampft und dreimal zusammen mit Toluol verdampft. FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1) ergab 15a als einen farblosen Schaum (0,57 g, 70%). R_f (B) 0,3. UV (MeOH): 237 (52000), 283 (10500). $^1\text{H-NMR}$ ($(\text{D}_6)\text{DMSO}$): 1,04-1,17 (m, $2(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 2,29 (m, $\text{H}_\alpha\text{-C}(2')$); 2,85 (m, $\text{H}_\beta\text{-C}(2')$); 2,89 (m, $2(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 3,07 (m, $\text{H}_2\text{-C}(5')$); 3,71 (s, 2 MeO); 3,94 (m, $\text{H-C}(4')$); 4,46 (m, $\text{H-C}(3')$); 5,35 (m, $\text{OH-C}(3')$); 6,57 (m, $\text{H-C}(1')$); 10,57, 10,74 (s, 2NH). Anal. berech. für $\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{BrN}_6\text{O}_7$ (787,2): C 59,47, H 5,46, N 10,67; gefunden: C 59,08, H 5,37, N 10,39.

[0203]

3-Brom-1-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)- β -D-erythropentofuranosyl]-4,6-diisobutyrylamino-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit (16a). Zu einer Lösung von Verbindung 15a (0,24 g, 0,3 mmol) in wasserfr. CH_2Cl_2 (3 ml) wurden $(\text{Ar})(\text{iPr})_2\text{EtN}$ (0,16 ml, 0,9 mmol) und 2-Cyanoethyl-diisopropylphosphoramidochloridit (91 μl , 0,41 mmol) zugegeben, und das Gemisch wurde für 30 min bei R. T. gerührt. Die Umsetzung wurde mittels DC verfolgt. Dann wurde das Reaktionsgemisch mit CH_2Cl_2 verdünnt und die Lösung zweimal mit einer 5%igen wässr. NaHCO_3 -Lösung und mit Salzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (Na_2SO_4), eingedampft, und das Produkt wurde durch FC aufgetrennt, so dass ein farbloser Schaum (0,25 g, 84%) erhalten wurde. R_f (E), 0,63, 0,69. UV (MeOH): 282 (10000), 237 (49500). $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3), 149,61, 149,65. $^1\text{H-NMR}$ ($(\text{D}_6)\text{DMSO}$): 1,11-1,35 (m, $4\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,51 (m, $\text{H}_\alpha\text{-C}(2')$); 2,66 (m, $\text{H}_\beta\text{-C}(2')$); 2,95-3,91 (m, $\text{H}_2\text{-C}(5')$); $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; CH_2CH_2 ; 3,80 (s, MeO), 4,26 (m, $\text{H-C}(4')$); 4,82 (m, $\text{H-C}(3')$); 6,71 (m, $\text{H-C}(1')$); 6,75-7,44 (m, arom. H); 8,39, 8,59 (br, 2NH). Anal. berech. für $\text{C}_{48}\text{H}_{60}\text{BrN}_8\text{O}_8\text{P}$ (921,2): C 58,36, H 6,08, N 11,35; gefunden: C 58,86, H 6,18, N 11,55.

[0204] 1-[2-Desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-erythropentofuranosyl]-4,6-dibenzamido-3-iod-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin (15b). Verbindung 13b (450 mg, 0,75 mmol) wurde zweimal zusammen mit wasserfr. Pyridin verdampft. Der Rückstand wurde in Pyridin (2 ml) gelöst, und Dimethoxytritylchlorid (305 mg, 0,9 mmol) wurde

zugegeben. Nach 4-stündigem Rühren wurde die Lösg. mit 5 ml MeOH verdünnt und mit einer 5%igen wässr. NaHCO_3 -Lösg. (3×20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (Na_2SO_4) und bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde durch FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$, 95:5 $\rightarrow$ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$, 9:1) gereinigt, was 375 mg (55%) eines farblosen Schaums ergab. DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$ 9:1): R_f (B) 0,4. UV (MeOH): 244 (16900), 276 (16200). $^1\text{H-NMR}$ ((D_6) DMSO): 2,35 (m, $\text{H}_\alpha\text{-C}(2')$); 2,67 (m, $\text{H}_\beta\text{-C}(2')$); 3,07, 3,09 (2m, $\text{H}_2\text{-C}(5')$); 3,70 (s, 2OCH_3); 3,96 (m, $\text{H-C}(4')$); 4,56 (m, $\text{H-C}(3')$); (d, $J = 4,8$, $\text{OHC}(3')$); 6,72-8,11 (m, arom. H); 10,54, 10,78 (2s, 2NH). Anal. berech. für $\text{C}_{45}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_7$ (902,73): C 59,87, H 4,35, N 9,31; gefunden: C 59,93, H 4,33, N 9,39.

[0205]

1-[2-Desoxy-5-O-(dimethoxytrityl)- β -D-erythropentofuranosyl]-4,6-dibenzamido-3-iod-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3'-[2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit] (16b). Verbindung 15b (330 mg, 0,37 mmol) wurde in THF (5 ml) gelöst. $(i\text{Pr})_2\text{EtN}$ (186 μl , 1,07 mmol) und 2-Cyanoethyldiisopropylphosphoramidochloridit (108 μl , 0,48 mmol) wurden unter einer Argonatmosphäre zugegeben. Nach 30 min wurde das Gemisch mit CH_2Cl_2 (20 ml) und einer 5%igen wässr. NaHCO_3 -Lösg. (2×20 ml) verdünnt. Das Gemisch wurde mit CH_2Cl_2 (3×15 ml) extrahiert. Die vereinigte organische Schicht wurde getrocknet (Na_2SO_4) und zu einem Öl verdampft. Der Rückstand wurde einer FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$, 85:15) unterworfen, was 280 mg (69%) eines farblosen Schaums ergab. DC (D): R_f 0,8. $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3): 149,37, 149,38.

Beispiel 3 – Untersuchung von Arrayvorläuferverbindungen

[0206] Gemäß Standardmethodik wurden die in Tabelle 19 dargestellten Oligonukleotide aus den erfindungsgemäßen Phosphoramiditen 19 (= 8a und 16a) bis 23 in Schema 11 und Standard-A-, -G-, -C- und -T-Phosphoramiditen, wie bereits vorstehend beschrieben, synthetisiert. Die Phosphoramidite sind auch von Glen Research erhältlich und wurden gemäß den Anleitungen des Herstellers verwendet (Bestellnummern: 10-1906-02 (20), 10-1964-02 (21), 10-1056-02 (22), 10-1067-02 (23)). Das Hybridisierungsverhalten wurde unter Verwendung von UV/VIS-Spektrometrie untersucht, wie beschrieben, wobei die temperaturabhängige Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde.

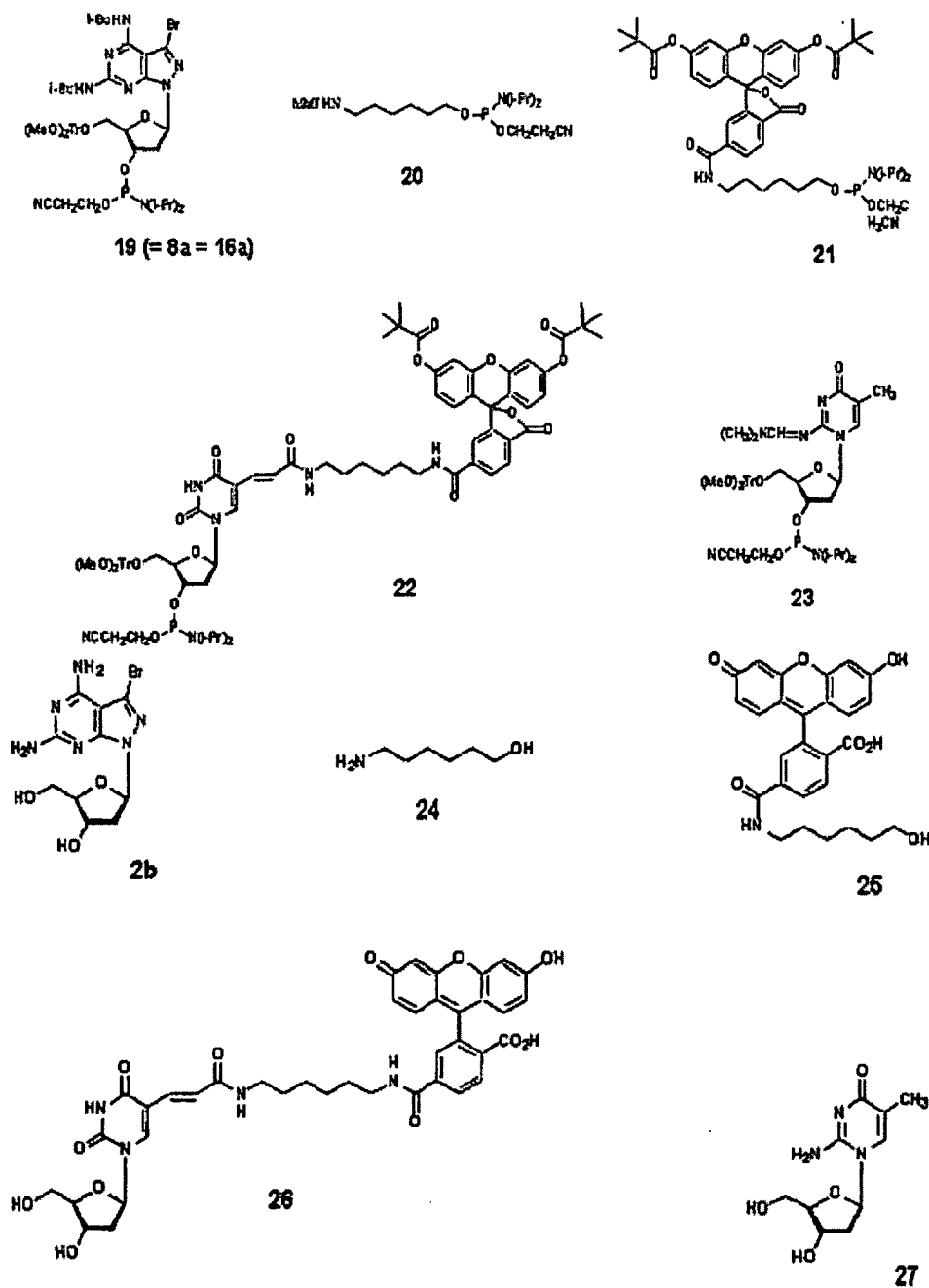


Tabelle 19. T_m -Werte und thermodynamische Daten der Duplexbildung von antiparallelen oder parallelen Oligonukleotid-Duplices, die fluoreszierende Reportergruppen und/oder Aminoalkyl-Linker tragen, für die Immobilisierung an Arrays ^{a)}.

Oligonukleotid	T_m	ΔH°	ΔS°	ΔG°_{310}
----------------	-------	------------------	------------------	------------------------

	[°C]	[kcal/mol]	[cal/K mol]	[kcal/mol]
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA)	47	-86.8	-243.7	-11.3
5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA)	56	-91.4	-251.7	-13.4
5'-d(24 TAG GTC AAT ACT) (500) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA)	49	-90.0	-254.4	-11.1
5'-d(24 TAG GTC 2b2bT ACT) (501) • (103) 3'-d(ATC CAG T T A TGA)	56	-87.2	-239.3	-13.0
5'-d(24 TAG GTC AAT ACT) (500) • (502) 3'-d(ATC CAG TTA TGA 25)	49	-95.2	-270.8	-11.2
5'-d(24 TAG GTC 2b2bT ACT) (501) • (502) 3'-d(ATC CAG T T A TGA 25)	56	-92.7	-256.6	-13.1
5'-d(24 TAG GTC AAT ACT) (500) • (503) 3'-d(ATC CAG TTA TGA 26)	50	-86.5	-242.7	-11.2
5'-d(24 TAG GTC 2b2bT ACT) (501) • (503) 3'-d(ATC CAG T T A TGA 26)	58	-95.1	-262.1	-13.8
5'-d(T 27 A TAA 27 T 27 27 TA) (504)•(505) 5'-d(AG T ATT G A G G AT)	42	-77.1	-220.6	-8.7
5'-d(24 T 27 A TAA 27 T 27 27 TA)(506)•(507) 5'-d(AG T ATT GA G G AT 26)	43	-71.9	-201.8	-9.3
5'-d(24 T 27 A T2b2b 27 T 27 27 TA) (508)•(507) 5'-d(AG T AT T G A G G AT 26)	48	-93.7	-265.4	-11.3

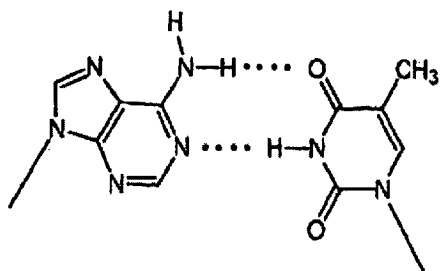
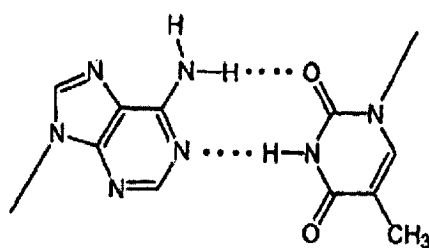
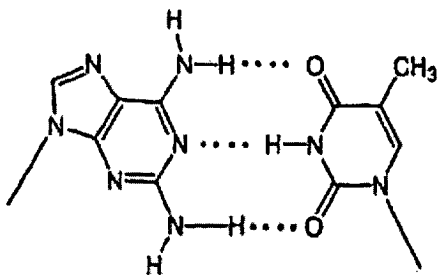
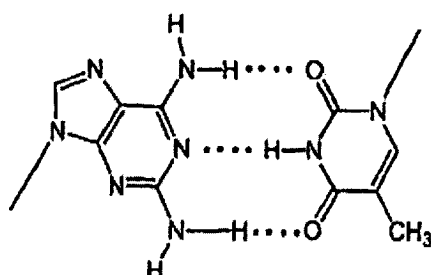
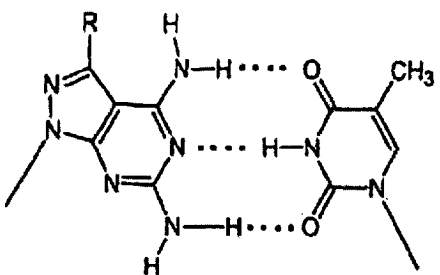
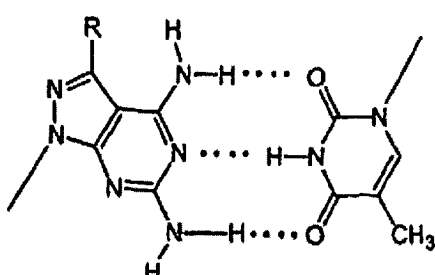
^{a)} UV-spektralphotometrisch bei 260 nm in 10 mM Na-Cacodylat, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl (pH 7) bei einer Einzelstrangkonzentration von 5 µM + 5 µM gemessen. Die thermodynamischen Daten wurden unter Verwendung des Programms MeltWin (3.0) berechnet.

[0207] Es konnte gezeigt werden, dass das Schmelzverhalten im parallelen und antiparallelen Modus sogar bei einer Markierung mit Reportergruppen sehr ähnlich ist. Die Situation ist ähnlich zu der Situation, wenn die erfindungsgemäße nukleinsäurebindende Verbindung an eine Oberfläche gebunden ist oder einen Array aufbaut oder wenn sie an einen Array aus natürlichen oder nicht-natürlichen nukleinsäurebindenden Verbindungen bindet, was die Nützlichkeit der vorliegenden Erfindung veranschaulicht. Dies wird durch das Oligonukleotid 501 veranschaulicht, das einen Linker enthält, durch den es an eine Festphase gebunden werden kann, und mit einer markierten Nukleinsäure, wie dem Oligonukleotid 503, hybridisiert.

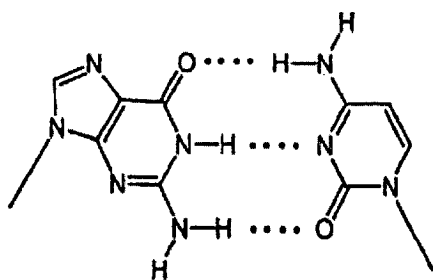
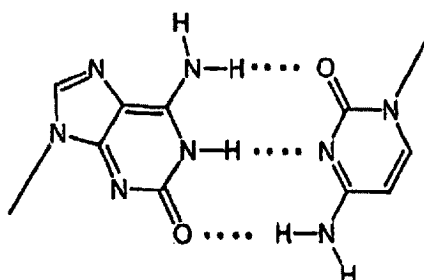
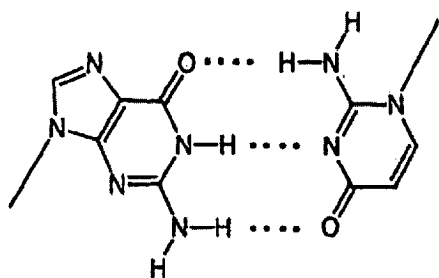
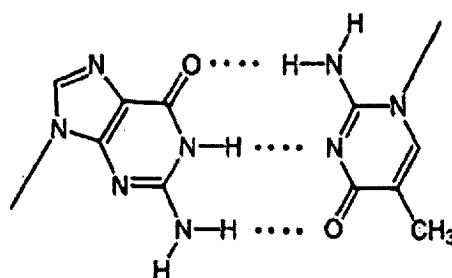
Beispiel 4 – Darstellung von antiparalleler und paralleler Hybridisierung

[0208] Das Wasserstoffbrückenbindungs-Wechselwirkungsmuster in parallelen oder antiparallelen Duplices ist in den Schemata 12 und 13 dargestellt.

Schema 12

Watson-Crick-AT-Basenpaar I
antiparallelReverses Watson-Crick-AT-Basenpaar II
parallelWatson-Crick- n^2 AT-Basenpaar III
antiparallelReverses Watson-Crick- n^2 AT-Basenpaar IV
parallelWatson-Crick-PT-Basenpaar V
R = H, Br, I
parallelReverses Watson-Crick-PT-Basenpaar VI
R = H, Br, I
parallel

Schema 13

Watson-Crick-GC-Basenpaar VII
antiparallelReverses Watson-Crick-GC-Basenpaar VIII
parallelReverses Watson-Crick-GC-Basenpaar IX
parallelReverses Watson-Crick-G^{m9}C-Basenpaar X
parallel

Literatur

- [1] N. Ramzaeva, F. Seela, *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1549.
- [2] F. Seela, M. Zulauf, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1999, 479.
- [3] F. Seela, G. Becher, *Helv. Chim. Acta* 1999, 82, 94.
- [4] B. L. Gaffney, L. A. Marky, R. A. Jones, *Tetrahedron* 1984, 40, 3.
- [5] C. Bailly, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 4309.
- [6] A. Chollet, E. H. Kawashima, *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 305.
- [7] A. Chollet, A. Chollet-Damerius, E. H. Kawashima, *Chem. Scri.* 1986, 26, 37.
- [8] F. B. Howard, H. T. Miles, *Biochemistry* 1983, 22, 597.
- [9] G. M. Lamm, B. J. Blencowe, B. S. Sproat, A. M. Iribarren, U. Ryder, A. I. Lamond, *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 3193.
- [10] J. D. Hoheisel, H. Lehrach, *FEBS Lett.* 1990, 274, 103.
- [11] J. Sági, E. Szakonyi, M. Vorlicková, J. Kypr, *J. Biomolec. Struct. Dyn.* 1996, 13, 1035.
- [12] S. Gryaznov, R. . Schultz, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 2489.
- [13] G. Haaima, H. F. Hansen, L. Christensen, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 4639.
- [14] V. Boudou, L. Kerremans, B. De Bouvere, E. Lescrinier, G. Schepers, R. Busson, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Nucleic Acids Res.* 1999, 27, 1450.
- [15] F. Seela, H. Driller, *Helv. Chim. Acta* 1988, 71, 757.
- [16] G. Balow, V. Mohan, E. A. Lesnik, J. F. Johnston, B. P. Monia, O. L. Acevedo, *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 3350.
- [17] F. Seela, H. Steker, H. Driller, U. Bindig, *Liebigs Ann. Chem.* 1987, 15.
- [18] F. Seela, G. Becher, *Synthesis* 1998, 207.
- [19] L. D. Garaeva, I. V. Yartseva, S. Y. Melnik, *Nucleosides Nucleotides* 1991, 10, 1295.
- [20] F. Oertel, H. Winter, Z. Kazimierzuk, J. A. Vilpo, P. Richter, F. Seela, *Liebigs Ann. Chem.* 1992, 1165.
- [21] J. Davoll, K. A. Kerridge, *J. Chem. Soc.* 1961, 2589.
- [22] L. D. Garaeva, I. A. Korbukh, Y. V. Dobrynin, T. G. Nikolaeva, M. N. Preobrazhenskaya, *Pharm. Chem. J.* (engl. Übers.) 1988, 22, 523.
- [23] J. van Wijk, C. Altona, 'PSEUROT 6.2 – A Program for the Conformational Analysis of the Five-Membered Rings', Universität Leiden, Juli 1993; C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. de Leeuw, C. Altona, *Tetrahedron* 1980, 86, 2783.
- [24] F. Seela, G. Becher, H. Rosemeyer, H. Reuter, G. Kastner, I. A. Mikhailopulo, *Helv. Chim. Acta* 1999, 82, 105.

- [25] G. Blackburn, M. J. Gait, in 'Nucleic Acids in Chemistry and Biology', IRL Press, Oxford University Press 1990, S. 28.
- [26] B. S. Sproat, A. M. Iribarren, R. G. Garcia, B. Beijer, Nucleic Acids Res. 1991, 19, 733.
- [27] A. Cano, M. F. Goodman, R. Eritja, Nucleosides Nucleotides 1994, 13, 501.
- [28] I. Luyten, A. Van Aerschot, J. Rozenski, R. Busson, P. Herdewijn, Nucleosides Nucleotides 1997, 16, 1649.
- [29] G. S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones, J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 1316.
- [30] K. Groebke, J. Hunzicker, W. Fraser, L. Peng, U. Diederichsen, K. Zimmerman, A. Holzner, Ch. Leumann, A. Eschenmoser, Helv. Chim. Acta 1998, 81, 175.
- [31] B. C. Froehler, P. G. Ng, M. D. Matteucci, Nucleic Acids Res. 1986, 14, 5399.
- [32] N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster, Nucleic Acids Res. 1984, 12, 4539.
- [33] L. J. McBride, R. Kierzek, S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 2040.
- [34] F. Seela, C. Wei, A. Melenewski, Y. He, R. Kröschel, E. Feiling, Nucleosides Nucleotides 1999, 18, 1543.
- [35] F. Seela, A. Melenewski, Eur. J. Org. Chem. 1999, 485.
- [36] F. Seela, G. Becher, Helv. Chim. Acta 2000, 83, 928.
- [37] F. Seela, C. Wei, Helv. Chim. Acta 1999, 82, 726.
- [38] M. D. Kirnos, I. Y. Khudyakov, N. I. Alexandrushkina, B. F. Vanyushin, Nature 1977, 270, 369.
- [39] F. B. Howard, C. Chef, J. S. Cohen, H. T. Miles, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984, 118, 848.
- [40] E. A. Lesnik, S. M. Freier, Biochemistry, 1995, 34, 10807.
- [41] Ribozyme Pharmaceuticals Inc., 2950 Wilderness Place, Boulder, CO 80301, USA.
- [42] F. Seela, C. Wei, G. Becher, M. Zulauf, P. Leonard, Bio. Org. Med. Chem. Lett. 2000, 10, 289.
- [43] J. A. McDowell, D. H. Turner, Biochemistry, 1996, 35, 14077.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Roche Diagnostics GmbH
P. HOFFMANN-LA ROCHE AG

<120> Oligonukleotide, die Pyrazolo(3,4-d)pyrimidin-
Analoge von Purin-2,6-diamin enthalten, und ihre
Verwendungen

<130> 5419/0A/

<140>

<141>

<150> EP00116816.0

<151> 2000-08-03

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(100)

<220>

<223> n an Positionen 4 und 8 bedeutet Verbindung 2c

<400> 1

agttttgccc ta

12

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(102)

<400> 2

taggtcaata ct

12

<210> 3

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(103)

<400> 3

agtattgacc ta

12

<210> 4
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (104)

 <220>
 <223> n an Positionen 2, 7, 8 und 10 bedeutet Verbindung 1

 <400> 4
 tnggtcnnnn ct 12

 <210> 5
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (105)

 <220>
 <223> n an Positionen 4 und 8 bedeutet Verbindung 1

 <400> 5
 agntttgncc ta 12

 <210> 6
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (106)

 <400> 6
 taggcgggca ct 12

 <210> 7
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (107)

 <400> 7
 agtgccggcc ta 12

 <210> 8
 <211> 12

<212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (108)

<220>
 <223> n an Positionen 7 und 8 bedeutet Verbindung 2a

<400> 8
 taggtcnnta ct

12

<210> 9
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (109)

<220>
 <223> n an Positionen 4 und 8 bedeutet Verbindung 2a

<400> 9
 agtnttgncc ta

12

<210> 10
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (110)

<220>
 <223> n an Positionen 7 und 8 bedeutet Verbindung 2b

<400> 10
 taggtcnnta ct

12

<210> 11
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (111)

<220>
 <223> n an Positionen 4 und 8 bedeutet Verbindung 2b

<400> 11
 agtnttgncc ta

12

<210> 12
 <211> 12
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (114)

 <400> 12
 aguauugacc ua 12

 <210> 13
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (115)

 <220>
 <223> n an folgenden Positionen bedeutet : 3 + 4 = isoC, 6
 + 11 = isoG

 <400> 13
 atnnanttat na 12

 <210> 14
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (116)

 <220>
 <223> n an folgenden Positionen bedeutet : 2 + 7 = isoC, 9
 + 10 = isoG

 <400> 14
 tnataantnn at 12

 <210> 15
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (200)

 <220>
 <223> n an Position 7 bedeutet Verbindung 2b

 <400> 15
 taggtcnata ct 12

<210> 16

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(201)

<220>

<223> n an Positionen 2, 7, 8 und 10 bedeutet Verbindung 2b

<400> 16

tnggtcmtn ct

12

<210> 17

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(202)

<220>

<223> n an Position 8 bedeutet Verbindung 2c

<400> 17

agtattgncc ta

12

<210> 18

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(203)

<220>

<223> n an Position 4 bedeutet Verbindung 2c

<400> 18

agtnttgacc ta

12

<210> 19

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(204)

<220>

<223> n an Positionen 7 und 8 bedeutet Verbindung 2c

<400> 19

taggtcnnta ct 12

<210> 20
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (205)
 <220>
 <223> n an Positionen 2, 7, 8 und 10 bedeutet Verbindung 2c

<400> 20
 taggtcnnta ct 12

<210> 21
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (300)
 <220>
 <223> n an Positionen 5 und 9 bedeutet Verbindung 3a

<400> 21
 taggncaana ct 12

<210> 22
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (301)
 <220>
 <223> n an Positionen 5 und 6 bedeutet Verbindung 3a

<400> 22
 agtanngacc ta 12

<210> 23
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (302)
 <220>
 <223> n an Positionen 5 und 9 bedeutet Verbindung 3b

<400> 23
taggncana ct 12

<210> 24
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(303)

<220>
<223> n an Positionen 5 und 6 bedeutet Verbindung 3b.

<400> 24
agtanngacc ta 12

<210> 25
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(304)

<220>
<223> n an Positionen 5 und 9 bedeutet Verbindung 3c

<400> 25
taggncana ct 12

<210> 26
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(305)

<220>
<223> n an Positionen 5 und 6 bedeutet Verbindung 3c

<400> 26
agtanngacc ta 12

<210> 27
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(400)

<400> 27
taggacaata ct

12

<210> 28
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(401)

<400> 28
tagggcaata ct

12

<210> 29
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(402)

<400> 29
taggccaata ct

12

<210> 30
<211> 12
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(403)

<400> 30
agaaugacc ua

12

<210> 31
<211> 13
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(500)

<220>
<223> n an Position . 1 bedeutet Verbindung 24

<400> 31
ntaggtcaat act

13

<210> 32
<211> 13
<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(501)

<220>

<223> n an Position 1 bedeutet Verbindung 24 und n an
Positionen 8 und 9 bedeutet Verbindung 2b

<400> 32

ntaggctcnnct act

13

<210> 33

<211> 13

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(502)

<220>

<223> n an Position 1 bedeutet Verbindung 25

<400> 33

nagtattgac cta

13

<210> 34

<211> 13

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(503)

<220>

<223> n an Position 1 bedeutet Verbindung 26

<400> 34

nagtattgac cta

13

<210> 35

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
(504)

<220>

<223> n an Positionen 2, 7, 9 und 10 bedeutet Verbindung 27

<400> 35

tnataantnn ta

12

<210> 36
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (505)

 <400> 36
 agtattgagg at 12

 <210> 37
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (506)

 <220>
 <223> n an Positionen 3, 8, 10 und 11 bedeutet Verbindung 27
 und n an Position 1 bedeutet Verbindung 24

 <400> 37
 ntnataantn nta 13

 <210> 38
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (507)

 <220>
 <223> n an Position 13 bedeutet Verbindung 26

 <400> 38
 agtattgagg atn 13

 <210> 39
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid
 (508)

 <220>
 <223> n an Positionen 3, 8, 10 und 11 bedeutet Verbindung
 27, n an Positionen 6 und 7 bedeutet Verbindung 2b und
 n an Position 1 bedeutet Verbindung 24

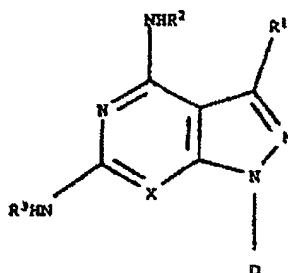
 <400> 39
 ntnatnnnta nta 13

Patentansprüche

1. Zusammensetzung zur Analyse von Wechselwirkungen zwischen nukleinsäurebindenden Verbindungen, umfassend ein Array aus mehreren nukleinsäurebindenden Verbindungen mit unterschiedlichen Sequenzen, wobei die mehreren nukleinsäurebindenden Verbindungen an ein festes Substrat an bekannten Orten gebunden und für die Bindung an komplementäre nukleinsäurebindende Verbindungen ausgewählt sind, wobei es sich entweder nur bei den nukleinsäurebindenden Verbindungen oder bei den nukleinsäurebindenden Ver-

bindungen und den komplementären nukleinsäurebindenden Verbindungen um ein Rückgrat umfassende nukleinsäurebindende Verbindungen handelt, wobei das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



handelt, wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,
 R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
- (2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,
- (3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
- (4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
- (5) (C_6-C_{22}) -Aryl,
- (6) -Z- (C_1-C_{10}) -Alkyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkenyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkynyl, -Z- (C_6-C_{22}) -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,
- (7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein können, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R^{11} aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

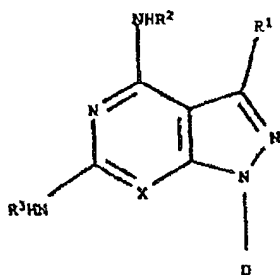
D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das feste Substrat aus der Gruppe Siliciumdioxid, Polymermaterialien, Glas, poröses Glas, Kügelchen, Chips und Objektträger ausgewählt ist.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei R^1 für -Br oder -I steht.

4. Verwendung einer nukleinsäurebindenden Verbindung mit einem Rückgrat als Fängersonde, womit das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



handelt, wobei

R^1 unabhängig von X , R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X , R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) -H,

(2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,

(3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,

(4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,

(5) (C_6-C_{22}) -Aryl,

(6) -Z- (C_1-C_{10}) -Alkyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkenyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkynyl, -Z- (C_6-C_{22}) -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein können, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R^{11} aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei R^1 für -Br oder -I steht.

6. Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins, der Abwesenheit oder der Menge einer Nukleinsäure, bei dem man

– eine Probe bereitstellt, von der vermutet wird, daß sie die Nukleinsäure enthält,

– eine nukleinsäurebindende Verbindung bereitstellt, die im wesentlichen zu der Nukleinsäure teilweise oder vollständig komplementär ist,

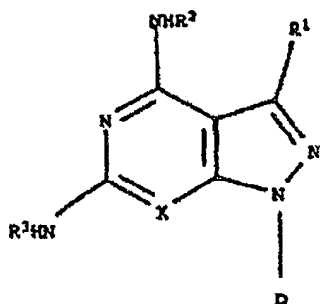
– die Probe mit der nukleinsäurebindenden Verbindung unter Bedingungen für die Bindung der nukleinsäurebindenden Verbindung an die Nukleinsäure unter Ausbildung eines Duplex in Kontakt bringt,

– das Bindungsprodukt oder den Grad der Hybridisierung zwischen der Nukleinsäure und der nukleinsäurebindenden Verbindung als Maß für das Vorhandensein, die Abwesenheit oder die Menge der Nukleinsäure bestimmt,

dadurch gekennzeichnet, daß

es sich bei der nukleinsäurebindenden Verbindung um eine ein Rückgrat umfassende nukleinsäurebindende Verbindung handelt, wobei das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



handelt, wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,
 R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
- (2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,
- (3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
- (4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
- (5) (C_6-C_{22}) -Aryl,
- (6) -Z- (C_1-C_{10}) -Alkyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkenyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkynyl, -Z- (C_6-C_{22}) -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$ -, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,
- (7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -NO₂, -OR¹², -CN, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$ -NR⁵R⁶, substituiert sein können, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R^{11} aus der Gruppe -NHR¹² und OR¹² ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe -H, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S- (C_1-C_6) -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s$ -NR⁵R⁶, substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die nukleinsäurebindende Verbindung eine Reportergruppe umfaßt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei es sich bei der Reportergruppe um eine Fluoreszenzmarkierung handelt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die nukleinsäurebindende Verbindung ferner einen Quencher umfaßt, der die Fluoreszenzemission der Fluoreszenzmarkierung löscht.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei es sich bei der Fluoreszenzmarkierung um ein Fluoreszein und bei dem Quencher um ein fluoreszierendes Rhodamin oder Cyanin handelt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 10, bei dem man in einem weiteren Schritt die räumliche Beziehung zwischen der Fluoreszenzmarkierung und dem Quencher im Anschluß an die Hybridisierung verändert.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Veränderung der räumlichen Beziehung zwischen der Fluoreszenzmarkierung und dem Quencher durch Exonuklease-Hydrolyse der nukleinsäurebindenden Verbindung erreicht wird, wobei die Freisetzung der Markierung als Ergebnis der Exonuklease-Hydrolase erfolgt.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei man den Grad der Hybridisierung zwischen der nukleinsäurebin-

denden Verbindung und der Nukleinsäure über die Menge an von der nukleinsäurebindenden Verbindung im Anschluß an die Hybridisierung freigesetzter Markierung bestimmt.

14. Verfahren nach Anspruch 6, wobei man den Grad der Hybridisierung zwischen der nukleinsäurebindenden Verbindung und der Nukleinsäure über das Priming-Vermögen der nukleinsäurebindenden Verbindung bestimmt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Priming als Teil einer Polymerase-Kettenreaktion erfolgt.

16. Verfahren nach Anspruch 8, wobei mehr als eine nukleinsäurebindende Verbindung verwendet wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei zwei nukleinsäurebindende Verbindungen verwendet werden.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die erste der beiden nukleinsäurebindenden Verbindungen einen Fluoreszenzdonor und die zweite der beiden nukleinsäurebindenden Verbindungen einen Fluoreszenzakzeptor umfaßt und wobei die Emissionswellenlängen des Fluoreszenzdonors mit den Absorptionswellenlängen des Fluoreszenzakzeptors überlappen.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei der Hybridisierungsgrad über die zwischen dem Fluoreszenzdonor und dem Fluoreszenzakzeptor übertragene und vom Fluoreszenzakzeptor emittierte Lichtmenge gemessen wird.

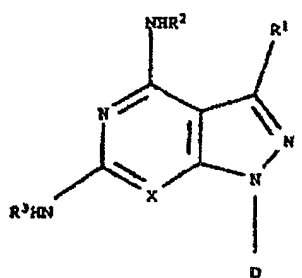
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der Hybridisierungsgrad über die Messung der Schmelztemperatur zwischen der nukleinsäurebindenden Verbindung und der Nukleinsäure bestimmt wird.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 20, wobei R^1 für -Br oder -I steht.

22. Verfahren zur Primerverlängerung, bei dem man in den folgenden Schritten:

- eine Zielsequenz enthaltende Nukleinsäure bereitstellt,
- eine oder mehrere zur Zielsequenz komplementäre nukleinsäurebindende Verbindung(en) bereitstellt,
- ein Polymerisationsenzym und Nukleotidsubstrate bereitstellt sowie
- die Nukleinsäure, die nukleinsäurebindenden Verbindungen, das Enzym und die Substrate unter die Polymerisation begünstigenden Bedingungen inkubiert, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der nukleinsäurebindenden Verbindung um eine ein Rückgrat umfassende nukleinsäurebindende Verbindung handelt, wobei das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



handelt, wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

- (1) -H,
- (2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,
- (3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,
- (4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,
- (5) (C_6-C_{22}) -Aryl,
- (6) -Z- (C_1-C_{10}) -Alkyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkenyl, -Z- (C_2-C_{10}) -Alkynyl, -Z- (C_6-C_{22}) -Aryl oder Z-H, wobei Z = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-\text{NO}_2$, $-\text{OR}^{12}$, $-\text{CN}$, $-\text{SH}$, $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkyl}$, $-\text{NR}^5\text{R}^6$, $-\text{N}^+\text{R}^5\text{R}^6\text{R}^{12}$, $-\text{COR}^{11}$, $-\text{NH}-\text{CONR}^5\text{R}^6$, $-\text{NH}-\text{CSNR}^5\text{R}^6$ und $-(\text{CH}_2)_n\text{-[O-(CH}_2\text{)]}_s\text{-NR}^5\text{R}^6$, substituiert sein können, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s,

wobei R^{11} aus der Gruppe $-\text{NHR}^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe $-\text{H}$, $-(\text{C}_1-\text{C}_{10})\text{-Alkyl}$, $-(\text{C}_2-\text{C}_{10})\text{-Alkenyl}$, $-(\text{C}_2-\text{C}_{10})\text{-Alkynyl}$, $-(\text{C}_6-\text{C}_{22})\text{-Aryl}$ und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, $-\text{SH}$, $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkyl}$, $-(\text{C}_1-\text{C}_6)\text{-Alkoxy}$, $-\text{OH}$, $-\text{NR}^5\text{R}^6$, $-\text{COR}^{11}$, $-\text{NH}-\text{CONR}^5\text{R}^6$, $-\text{NH}-\text{CSNR}^5\text{R}^6$ und $-(\text{CH}_2)_n\text{-[O-(CH}_2\text{)]}_s\text{-NR}^5\text{R}^6$, substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Verfahren Teil einer Polymerase-Kettenreaktion ist.

24. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Verfahren bei der Synthese eines cDNA-Moleküls eingesetzt wird.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, wobei R^1 für -Br oder -I steht.

26. Verfahren zur Bestimmung der Nukleotidsequenz einer Zielsequenz in einer Nukleinsäure, bei dem man in den folgenden Schritten:

a) eine die Zielsequenz umfassende Nukleinsäure bereitstellt,

b) wenigstens zwei nukleinsäurebindende Verbindungen mit bekannter Sequenz bereitstellt, wobei wenigstens eine der wenigstens zwei nukleinsäurebindenden Verbindungen eine Sequenz aufweist, die zur Zielsequenz vollkommen komplementär ist, und wenigstens eine weitere der nukleinsäurebindenden Verbindungen eine verwandte Zielsequenz aufweist,

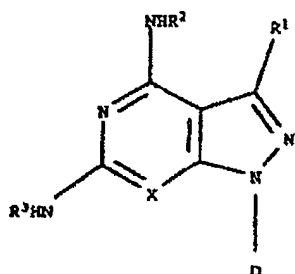
c) die wenigstens zwei nukleinsäurebindenden Verbindungen mit der Nukleinsäure unter Hybridisierungsbedingungen inkubiert und

d) den Grad der Hybridisierung zwischen jeder der nukleinsäurebindenden Verbindungen und der Nukleinsäure bestimmt,

dadurch gekennzeichnet, daß

es sich bei der nukleinsäurebindenden Verbindung um eine ein Rückgrat umfassende nukleinsäurebindende Verbindung handelt, wobei das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



handelt, wobei

R^1 unabhängig von X, R^2 oder R^3 ist und für -F, -Cl, -Br, -I oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X, R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) -H,

(2) $(\text{C}_1-\text{C}_{10})\text{-Alkyl}$,

(3) $(\text{C}_2-\text{C}_{10})\text{-Alkenyl}$,

(4) $(\text{C}_2-\text{C}_{10})\text{-Alkynyl}$,

(5) $(\text{C}_6-\text{C}_{22})\text{-Aryl}$,

(6) $-Z-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-Z-(C_6-C_{22})$ -Aryl oder $Z-H$, wobei $Z = -CO-$, $-CO-NH-$, $-CS-NH-$, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s ,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe $-Halogen$, $-NO_2$, $-OR^{12}$, $-CN$, $-SH$, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein können, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s ,

wobei R^{11} aus der Gruppe $-NHR^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe $-H$, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe $-Halogen$, $-SH$, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-(C_1-C_6)$ -Alkoxy, $-OH$, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s ;

X unabhängig von R^1 , R^2 oder R^3 ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

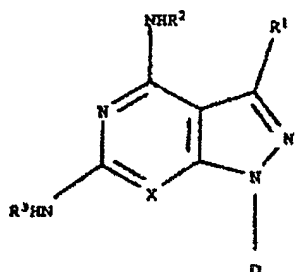
D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei die wenigstens eine weitere nukleinsäurebindende Verbindung eine Einzelnukleotidfehlpaarung mit der Zielsequenz aufweist.

28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, wobei R^1 für $-Br$ oder $-I$ steht.

29. Nukleinsäurebindende Verbindung zur Verwendung in der Medizin, womit es sich um eine ein Rückgrat umfassende nukleinsäurebindende Verbindung handelt, wobei das Rückgrat daran gebundene heterocyclische Gruppen aufweist, die zur Basenpaarung an Nukleobasen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei einer heterocyclischen Gruppe um eine Gruppe der allgemeinen Formel I

Formel I



handelt, wobei

R^1 unabhängig von X , R^2 oder R^3 ist und für $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$ oder Cyano steht,

R^2 , R^3 unabhängig von X , R^1 , R^2 und R^3 ist und ausgewählt ist aus der Gruppe

(1) $-H$,

(2) (C_1-C_{10}) -Alkyl,

(3) (C_2-C_{10}) -Alkenyl,

(4) (C_2-C_{10}) -Alkynyl,

(5) (C_6-C_{22}) -Aryl,

(6) $-Z-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-Z-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-Z-(C_6-C_{22})$ -Aryl oder $Z-H$, wobei $Z = -CO-$, $-CO-NH-$, $-CS-NH-$, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, mit r und s jeweils unabhängig voneinander gleich einer ganzen Zahl zwischen 1 und 18 und n gleich 1 oder 2, unabhängig von r und s ,

(7) Substituenten (2) bis (6), wobei jedes Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl jeweils mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe $-Halogen$, $-NO_2$, $-OR^{12}$, $-CN$, $-SH$, $-S-(C_1-C_6)$ -Alkyl, $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ und $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, substituiert sein können, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s ,

wobei R^{11} aus der Gruppe $-NHR^{12}$ und OR^{12} ausgewählt ist,

wobei R^5 , R^6 und R^{12} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe $-H$, $-(C_1-C_{10})$ -Alkyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkenyl, $-(C_2-C_{10})$ -Alkynyl, $-(C_6-C_{22})$ -Aryl und einer Reportergruppe,

wobei das Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Aryl in den Substituenten (2) bis (7) unsubstituiert oder mit einer oder mehreren Gruppierungen, ausgewählt aus der Gruppe -Halogen, -SH, -S-(C₁-C₆)-Alkyl, -(C₁-C₆)-Alkoxy, -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ und -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, substituiert sind, r und s jeweils unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 1 und 18 bedeuten und n gleich 0 oder 1 ist, unabhängig von r und s;

X unabhängig von R¹, R² oder R³ ist und aus der Gruppe N und CH ausgewählt ist, und

D die Position der Anbindung der Gruppe an den Rest der nukleinsäurebindenden Verbindung darstellt, oder beliebige Salze davon.

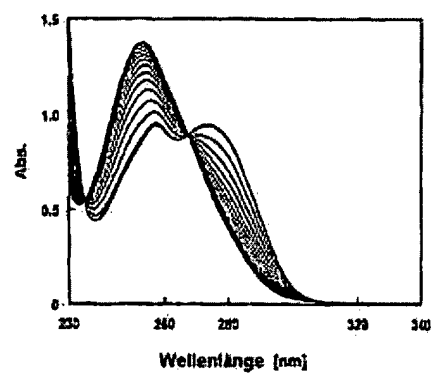
30. Nukleinsäurebindende Verbindung nach Anspruch 29, wobei R¹ für -Br oder -I steht.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

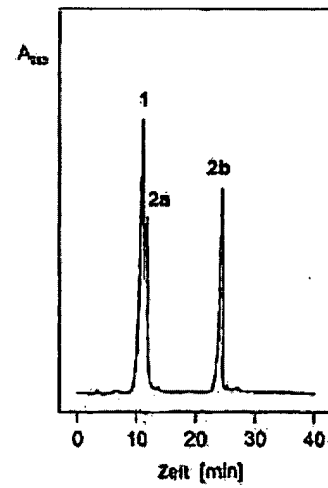
Anhängende Zeichnungen

Figur 1

a)

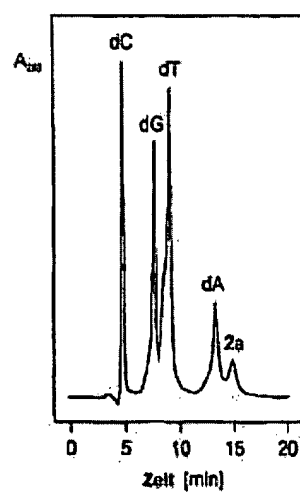


b)

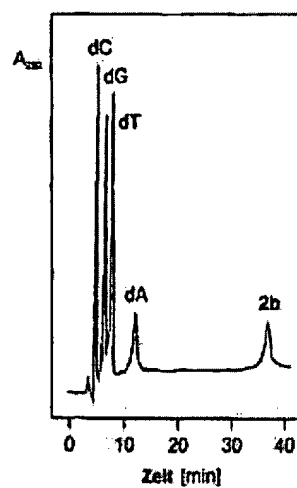


Figur 2

a)

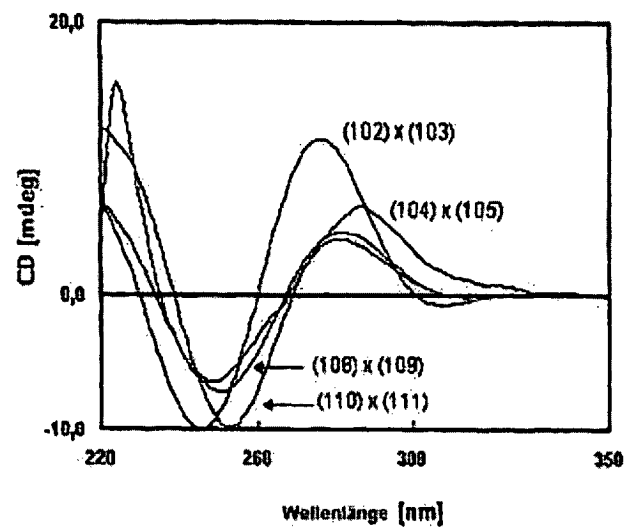


b)

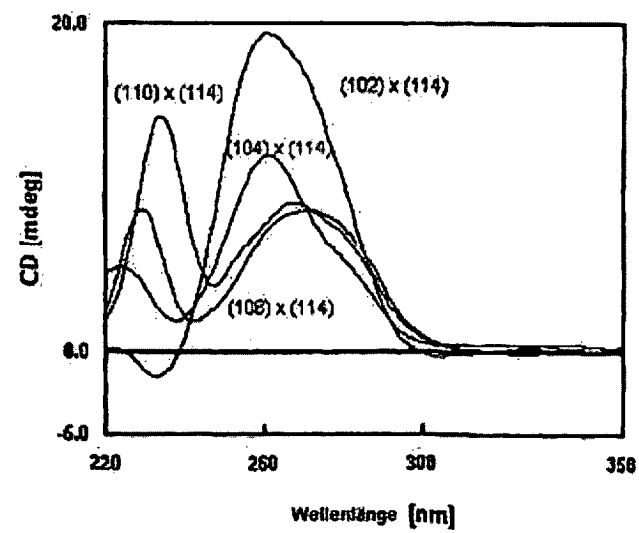


Figur 3

a)

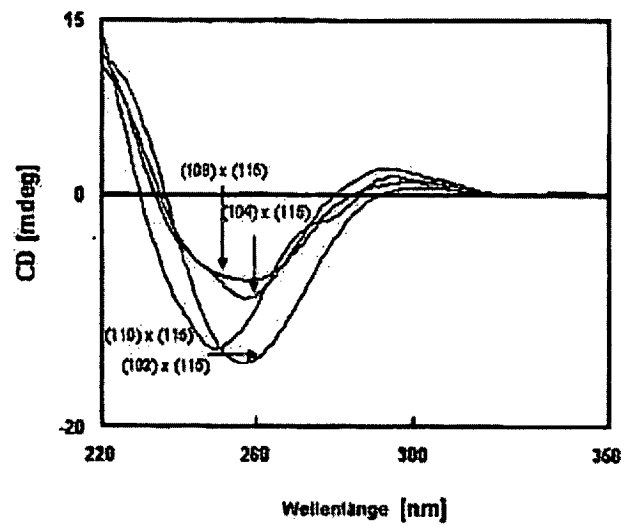


b)

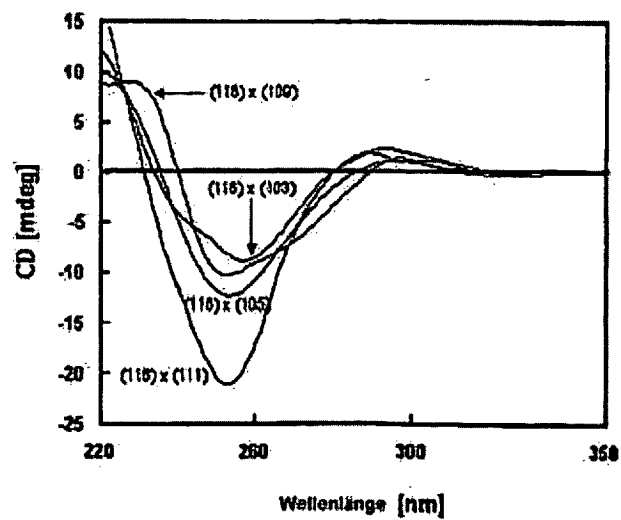


Figur 4

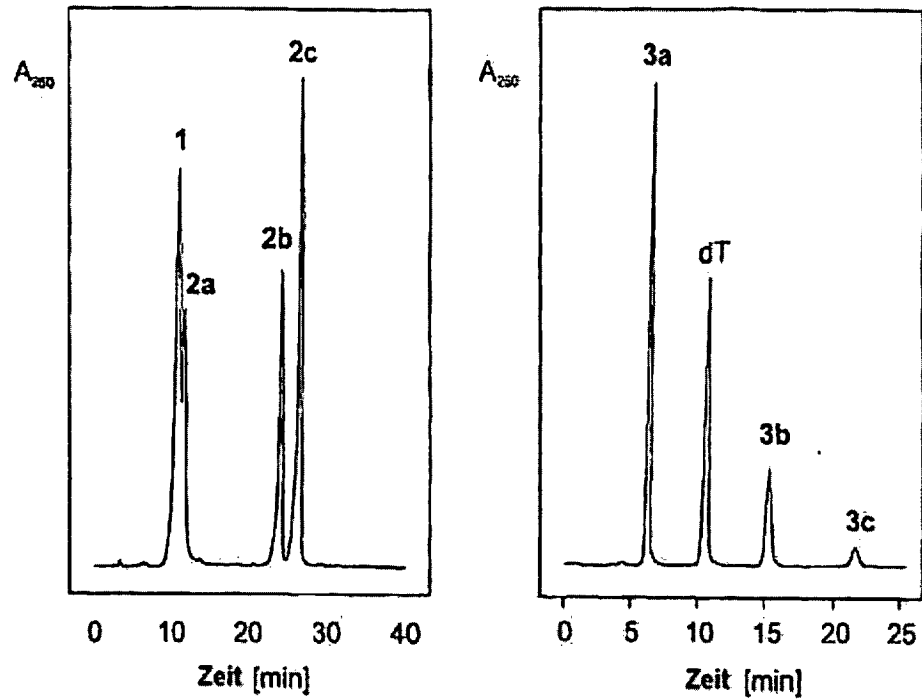
a)



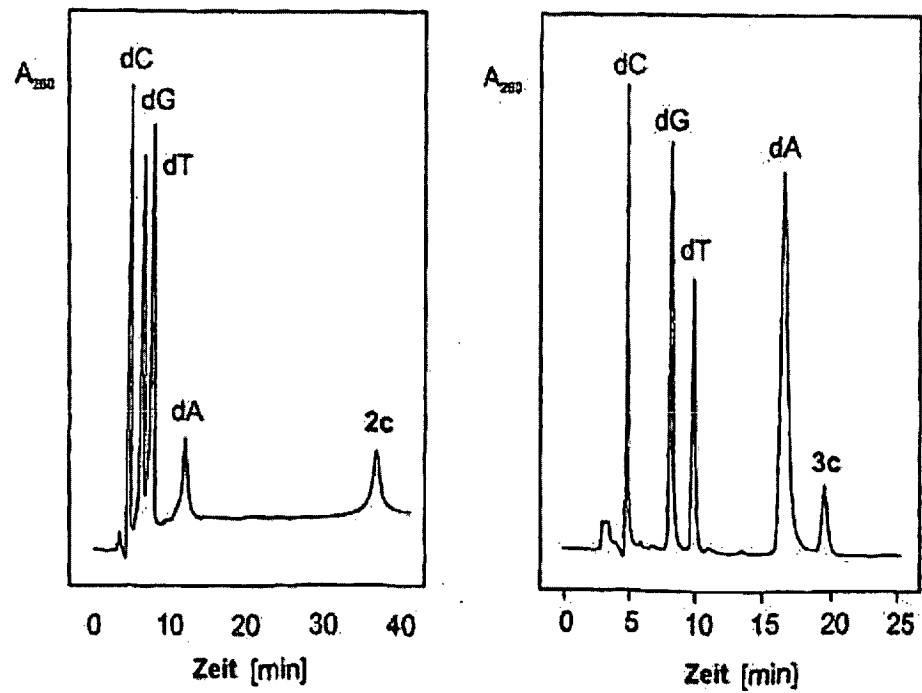
b)



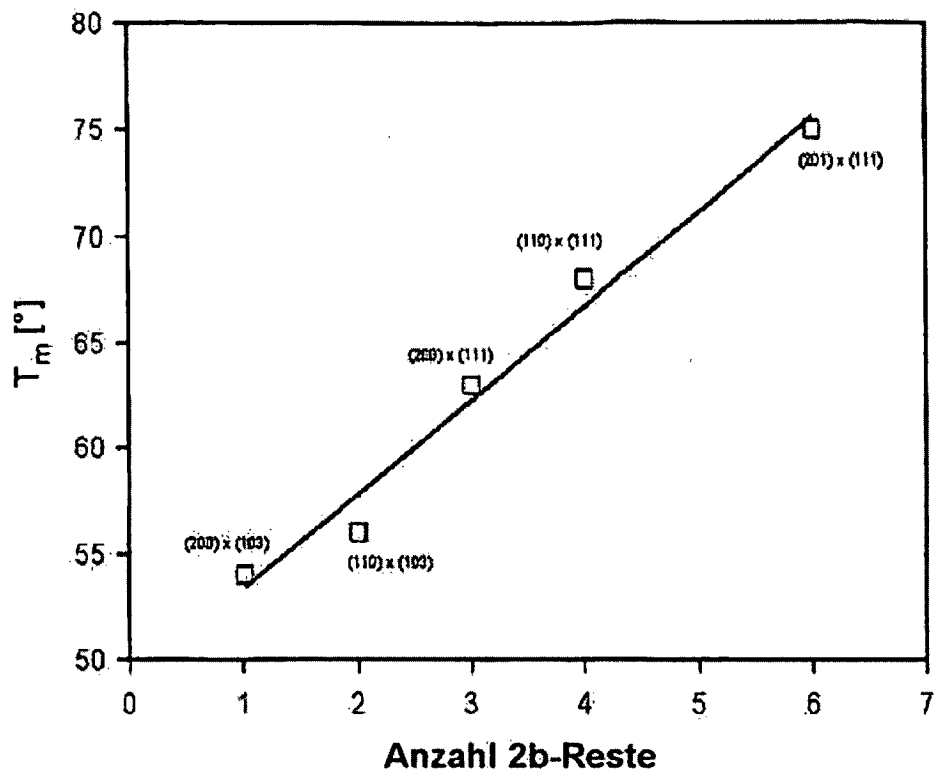
Figur 5a,b



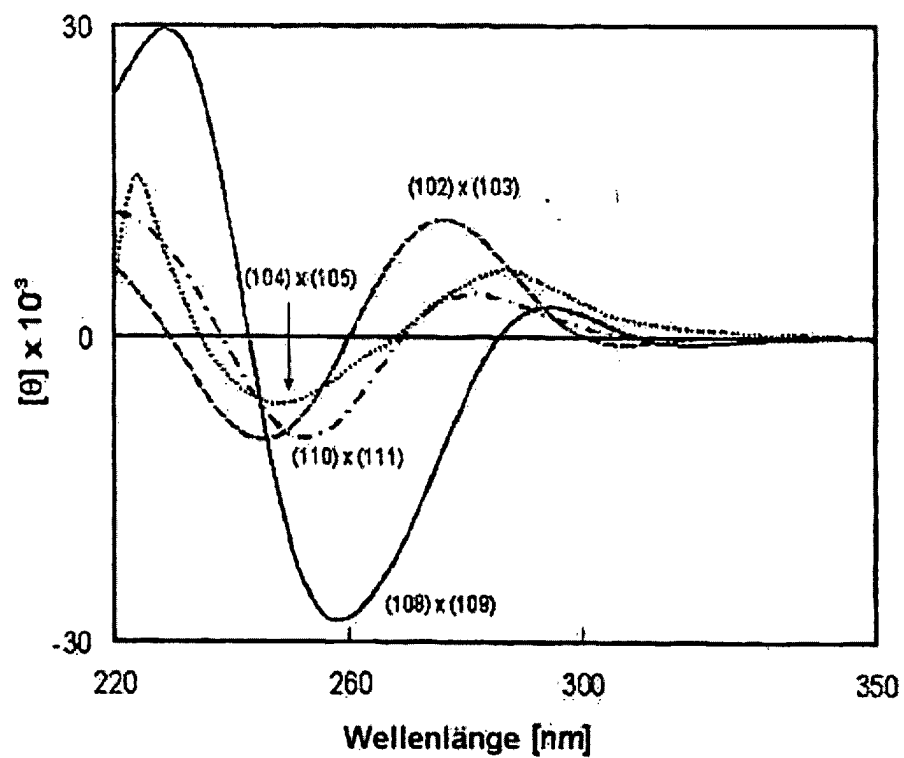
Figur 5c,d



Figur 6



Figur 7a



Figur 7b

