



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 06 680 T2 2004.09.16**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 202 998 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 06 680.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK00/00375**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 943 690.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/004129**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.07.2000**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **18.01.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.05.2002**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **19.11.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.09.2004**

(51) Int Cl.7: **C07F 9/24**  
**C07H 21/00**

(30) Unionspriorität:  
**99987 07.07.1999 DK**

(73) Patentinhaber:  
**Exiqon A/S, Vedbaek, DK**

(74) Vertreter:  
**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

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

(72) Erfinder:  
**FENSHOLDT, Jef, DK-2860 Soborg, DK**

(54) Bezeichnung: **SYNTHESE VON STABILEM CHINON- UND PHOTOREAKTIVEM KETON-PHOSPHORAMIDIT-RE-AGENZ FÜR FESTPHASENSYNTHESE VON PHOTOREAKTIVEN OLIGOMER-KONJUGATEN**

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**

## GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet von stabilen Chinon- und photoreaktiven Ketonphosphoramidit-Reagenzien, die für die automatisierte Festphasensynthese von Oligomeren, die mit einer photoreaktiven Gruppierung enden, ausgerichtet sind.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Der Anbindung einer Reportergruppe oder einer anderen Konjugation an Oligonucleotide (ONs) war schon Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten, da die resultierenden funktionalisierten ONs großes Potential als diagnostische oder therapeutische Wirkstoffe besitzen (S.L. Beaucage, *Comprehensive Natural Products Chemistry* 7, 153–250, Hrsg. E.T. Kool, Chefredakteure D. Barton und K. Nakanishi, Pergamon (1999)). Beispielsweise wurden an Anthrachinon gebundene ONs (Anthrachinon-ONs) und Derivate davon hergestellt, um die Affinität zu komplementären ONs durch Interkalation zu erhöhen, sowie für Studien über ortsspezifische Modifikation, Spaltung und Vernetzung von Duplexstrukturen (K. Mori et al., *FEBS Lett.* 249, 213–218 (1989); S.M. Gasper und G.B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 12762–12771 (1997); L.G. Puskás et al., *Nucleosides Nucleotides* 14, 967 (1995); H. Kang und S.E. Rokita, *Nucleic acids Res.* 24, 3896–3902 (1996)). Eine weitere interessante Anwendung von Anthrachinon-Oligomeren besteht in der kovalenten Immobilisierung von Oligomeren auf Polymeroberflächen. Die Immobilisierung von Oligomeren auf verschiedenen Oberflächen (M.H. Jacobsen und T. Koch, WO 96/31557 (1996)), wie beispielsweise Kunststoffmikrotiterplatten, Mikrochips und Mikroteilchen, wurde mithilfe verschiedener Mittel erreicht und stellt den Ausgangspunkt für eine sich rasch weiterentwickelnde Technologie auf dem Gebiet der diagnostischen Assays und Krankheitsscreeningassays dar (F.N. Rehman et al., *Nucleic acids Res.* 27, 649–655 (1999); P.W. Stevens et al., *Nucleic acids Res.* 27, 1719–1727 (1999); G. Ramsay, *Nature Biotechnology* 16, 40–44 (1998)).

[0003] Bisher wurden zwei allgemeine Verfahren zur kovalenten Bindung von Anthrachinon an Oligomere mithilfe chemischer Mittel entwickelt. Das erste Verfahren umfasst die Kopplung eines aktivierten Anthrachinonderivats an ein vorsynthetisiertes Oligomer, das eine reaktive Gruppe, wie beispielsweise eine freie primäre Aminofunktion, umfasst. Dieser Ansatz wurde von Kang und Rokita (*Nucleic Acids Res.* 24, 3896–3902 (1996)) beschrieben, die 5'-Ende-Anthrachinon-Oligodesoxynucleotide (ODNs) für die Untersuchung von ortsspezifischer und photoinduzierter Alkylierung von DNA synthetisierten. Ein Dimethylanthrachinon-ODN-Konjugat wurde synthetisiert, indem der N-Hydroxysuccinimidester von 2-(3-Propionsäure)-1,4-dimethylantrachinon mit einem an 5'-Aminohexamethylen gebundenen ODN gekoppelt wurde, das durch herkömmliche automatisierte Festphasensynthese erhalten wurde. Anthrachinon-ONs wurden außerdem durch die Umsetzung von "Aminolinker"-modifizierten Nucleobasen oder Kohlenhydratgruppierungen enthaltenden ONs mit aktivierten Anthrachinonderivaten hergestellt (Telser et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7226–7232 (1989); Akira et al., *Bioconjugate Chem.* 4, 499–508 (1993)).

[0004] Das andere Verfahren umfasst die Überführung des Anthrachinons in ein Synthon, das für automatisierte Festphasensynthese, beispielsweise die Kopplung des Anthrachinons an ein Phosphoramidit-Reagens, verwendet werden kann. Je nach Verfügbarkeit des Bausteins kann argumentiert werden, dass diese direkte Inkorporation den effizientesten Ansatz darstellt, da die Gesamtsynthese des Anthrachinon-Oligomers auf einem automatisierten Synthesegerät durchgeführt werden kann.

[0005] An die Anbindung von Anthrachinonderivaten an ONs durch direkte Inkorporation wurde herangegangen, indem die Anthrachinongruppe an die 2'-O-Position von 5'-O-DMT- (4,4'-Dimethoxytrityl-) 3'-O-Phosphoramiditnucleosid-Reagenzien gebunden wurde. K. Yamana et al. (*Bioconjugate Chem.* 7, 715–720 (1996)) berichteten von der Synthese von 5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-(2-anthrachinonylmethyl)uridin-3'-O-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit, das für automatisierte Festphasensynthese von Anthrachinon-ONs verwendet wurde.

[0006] De Mesmaeker et al. (*Bioorganic, Medicinal Chem.* 7, 1869–1874 (1997)) beschrieben die Synthese von Nucleosiddimeren, die eine 3'-5'-Amidbindung enthielten, worin das Stickstoffatom über einen Polymethylenlinker an ein Anthrachinonmolekül gebunden ist. DMT-Schutz der 5'-O-Position und Phosphitylierung der 3'-O-Position des Dimers ergab ein Reagens, das für automatisierte Synthese von Anthrachinon-ONs geeignet war.

[0007] Ein nichtbasisches Pseudonucleosid, das eine Anthrachinongruppierung trug, wurde von K.-Y. Lin und M. Matteucci (*Nucleic Acids Res.* 19, 3111–3114 (1991) und US 5.214.136) hergestellt. Ausgehend von 2-Chloranthrachinon und Diethanolamin wurde ein Anthrachinondiolderivat erhalten, das in ein DMT-H-Phosphonat-Reagens übergeführt wurde, das danach mehrere Male in ODNs inkorporiert wurde.

[0008] Die oben genannten Reagenzien ermöglichen die Inkorporation einer Anthrachinonfunktionalität an verschiedenen Positionen in einem Oligomer.

[0009] Einige Beispiele für Phosphoramidit-Reagenzien, die nicht von Nucleosiden stammen, die ausschließlich zur Inkorporation von Anthrachinon am 5'-Terminus eines Oligomers entwickelt wurden, wobei automatisierte Festphasensynthese verwendet wurde, wurden berichtet.

[0010] K. Mori et al. (FEBS Lett. 249, 213–218 (1989)) beschreiben die Synthese von Anti-HIV-aktiven 5'-gebundenen Anthrachinon-ODNs, worin ein Anthrachinonderivat entweder über einen Ethylpiperazinyl- oder einen Hexamethylenlinker an ein Oligodesoxynucleotid (ODN) gebunden ist. Die 5'-gebundenen Anthrachinon-ODNs wurden erhalten, indem ein frisch hergestelltes Anthrachinon-Ethylpiperazinylphosphoramidit (erhalten in 65 % Ausbeute) oder Anthrachinonhexamethylen-gebundenes Phosphoramidit mithilfe herkömmlicher automatisierter Festphasensynthese an das 5'-Ende einer ODN-Sequenz gekoppelt wurde.

[0011] Das Anthrachinon-Ethylpiperazinylphosphoramidit-Reagens wurde auch in der WO 90/12802 beschrieben. Das Anthrachinonphosphoramidit wurde mithilfe desselben Verfahrens synthetisiert, das von K. Mori et al. beschrieben wurde: 1-Chloranthrachinon wurde mit 1-(2-Hydroxyethyl)piperazin umgesetzt, was 1-(1-(2-Hydroxyethyl)piperazinyl)anthrachinon ergab, das durch N,N-Diisopropylphosphoramidochlorid in Gegenwart von N,N-Diisopropylethylamin phosphityliert wurde, um Anthrachinonethylpiperazinylphosphoramidit zu erhalten. Das Anthrachinonphosphoramidit wurde ohne weitere Reinigung in der automatisierten Festphasensynthese von 5'-gebundenen Anthrachinon-ODNs verwendet, die zur Schwächung oder Zerstörung von genetischer Expression in Säugetieren oder Virenaktivität verwendet wurden.

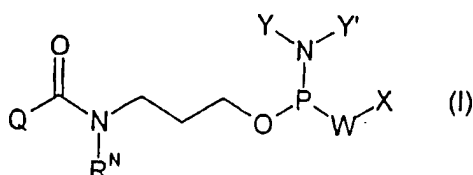
[0012] S.M. Gasper und G.B. Schuster (J. Am. Chem. Soc. 119, 12762–12771 (1997)) beschrieben die Synthese von 5'-gebundenen Anthrachinon-ODNs mit dem Ziel, zu beweisen, dass oxidative Schädigung in doppelsträngiger DNA wandern kann. Zu diesem Zweck wurden zwei Anthrachinonphosphoramidite synthetisiert: N-Ethyl- und N-Pentyl-2-anthrachinoncarboxamidphosphoramidit. Die zwei Phosphoramidite wurden aus Anthrachinon-2-carbonylchlorid synthetisiert, das mit 2-Amino-1-ethanol oder 5-Aminopentanol umgesetzt wurde, um N-(2-Hydroxyethyl)- bzw. N-(5-Hydroxypentyl)-2-anthrachinoncarboxamid herzustellen. Die Umsetzung dieser Carboxamide mit Chloriden von N,N-Diisopropylmethylphosphoramiden ergab die entsprechenden Phosphoramidite nach einer Säulenchromatographie als dicke rote Öle. Eine Kopplung dieser Anthrachinonphosphoramidite an den 5'-OH-Terminus von ODNs als letzten Schritt einer Festphasensynthese ergab Anthrachinon-ODN-Konjugate.

[0013] Die großtechnische Synthese von Anthrachinon-Oligomer-Konjugaten unter Verwendung von automatisierter Festphasenchemie erfordert leicht verfügbare und relativ stabile Anthrachinonsynthone. Erste Versuche, stabile Anthrachinonphosphoramidit-Reagenzien zu synthetisieren, zeigten, dass die oben genannten Arten von Reagenzien offensichtlich instabil sind.

[0014] Die Synthese eines Anthrachinonphosphoramiditderivats von N-(6-Hydroxyhexyl)-2-anthrachinoncarboxamid unter Verwendung von N,N,N',N'-Tetraisopropylphosphordiamidit und Tetrazol ist in Beispiel 1 beschrieben. Der Versuch einer Isolation dieses Cyanoethylphosphoramidits führte zur Zersetzung. Die Verwendung des Rohprodukts nach Filtration des Reaktionsgemisches direkt am DNA-Synthesegerät innerhalb eines Tages führte ebenfalls zur Zersetzung. Darauf folgende Versuche, ein Cyanoethylphosphoramiditanalog des N-(2-Hydroxyethyl)anthrachinoncarboxamids durch Umsetzung von N-(2-Hydroxyethyl)anthrachinoncarboxamid mit 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidochlorid in Gegenwart von Ethyldiisopropylamin (siehe Beispiel 2) oder durch dasselbe Verfahren wie in Beispiel 1 beschrieben herzustellen, ergaben nach einer Flaschenchromatographie zuerst einen hellgelben Schaum. Trocknen dieses Materials unter Hochvakuum über Nacht ergab einen dunkelbraunen Sirup, was auf Zersetzung hinweist. Aufgrund der Tatsache, dass alle der oben genannten Anthrachinonphosphoramidit-Reagenzien sofort nach ihrer Herstellung verwendet werden müssen, sind sie weniger für eine großtechnische Synthese von Anthrachinon-Oligomer-Konjugaten geeignet.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

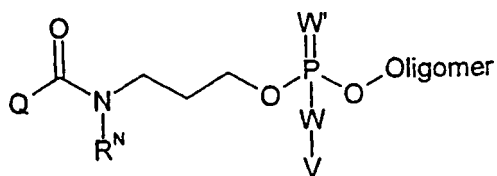
[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft ein stabiles Phosphoramidit-Reagens, das für eine automatisierte Festphasensynthese von Oligomeren ausgerichtet ist und die allgemeine Formel aufweist:



worin Y und Y' jeweils unabhängig voneinander aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl ausgewählt sind und Y und Y' gemeinsam mit dem Stickstoff, an den sie gebunden sind, einen nichtaromatischen N-heterozyklischen Ring bilden; W aus O und S ausgewählt ist; X aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl und gegebenenfalls substituiertem Benzyl ausgewählt ist; R<sup>N</sup> aus Wasserstoff, C<sub>1-4</sub>-Alkyl, gegebenenfalls substituiertem Benzyl, gegebenenfalls substituierten Chinonen und Nucleosiden ausgewählt ist; und Q aus gegebenenfalls substituierten Chinonen und gegebenenfalls substituierten photoreaktiven Ketonen ausgewählt ist, wie bei-

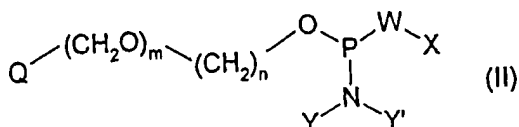
spielsweise gegebenenfalls substituiertem Benzophenon.

[0016] Die Erfindung betrifft außerdem ein Oligomer, welches das folgende Fragment umfasst:



worin Q und R<sup>N</sup> wie oben für Formel I definiert sind; W und W' jeweils unabhängig voneinander aus O und S ausgewählt sind; und V aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl, gegebenenfalls substituiertem Benzyl, Wasserstoff, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ausgewählt ist.

[0017] Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung ein stabiles Phosphoramidit-Reagens der allgemeinen Formel II:



worin Y und Y' jeweils unabhängig voneinander aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl ausgewählt sind oder Y und Y' gemeinsam mit dem Stickstoff, an den sie gebunden sind, einen nichtaromatischen N-heterozyklischen Ring bilden; X aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl und gegebenenfalls substituiertem Benzyl ausgewählt ist; W aus O und S ausgewählt ist; Q aus gegebenenfalls substituierten Chinonen und gegebenenfalls substituierten photoreaktiven Ketonen ausgewählt ist; n eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist; und m = 0 oder 1 ist.

[0018] Die Erfindung betrifft auch ein Oligomer, welches das folgende Fragment umfasst:



worin Q, n und m wie oben für Formel II definiert sind; W und W' jeweils unabhängig voneinander aus O und S ausgewählt sind; und V aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl, gegebenenfalls substituiertem Benzyl, Wasserstoff, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ausgewählt ist.

## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

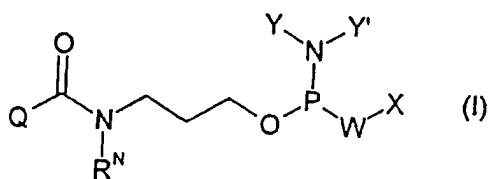
[0019] Der Anmelder hat sich erfolgreich mit der kovalenten Kopplung von synthetischen Oligomeren an kohlenstoffhaltige Polymere auf zwei verschiedene Weisen beschäftigt. Beim ersten Ansatz wurde eine Photosonde, die aus einem über einen Ethylenglykollinker an eine elektrophile Reaktivgruppe gebundenen Anthrachinon- oder Benzophenonmolekül bestand, durch kurzzeitige Bestrahlung mit UV-Licht an eine Polymeroberfläche gekoppelt. Dann führte eine Reaktion zwischen den an das Polymer gebundenen elektrophilen Gruppen und nucleophilen Aminoalkyl-ONs zur Immobilisierung der Oligomere.

[0020] Der zweite Ansatz umfasst eine automatisierte Festphasensynthese von Anthrachinon-Oligomeren oder Benzophenon-Oligomeren. Eine Bestrahlung einer wässrigen Lösung, die entweder die Anthrachinon-Oligomere oder Benzophenon-Oligomere enthielt, mit weichem UV-Licht führte zur Anbindung der Anthrachinon-Oligomere und Benzophenon-Oligomere an die Polymeroberfläche mittels einer kovalenten Bindung zwischen der Anthrachinongruppierung oder Benzophenongruppierung und der Oberfläche, auf welche die Lösung aufgetragen worden war.

[0021] Die vorliegende Erfindung beschreibt die Synthese von überraschend stabilen Chinon- und photoreaktiven Ketonphosphoramidit-Reagenzien, die nicht die oben genannten Nachteile mit sich bringen. Diese neuen Reagenzien können leicht aus handelsüblichen Ausgangsmaterialien synthetisiert werden. Im Gegensatz zu weiter oben beschriebenen 5'-Ende-Anthrachinon-markierenden Phosphoramiditen werden die Phosphoramidit-Reagenzien gemäß vorliegender Erfindung als stabile feste Materialien isoliert, die in ein Oligomer inkorporiert mehrere Monate lang bei -20°C gelagert werden können, ohne an Reaktivität zu verlieren, wobei herkömmliche automatisierte Festphasensynthese verwendet wird. Auf ähnliche Weise werden Benzophenonphosphoramidite gemäß vorliegender Erfindung als stabile Öle isoliert, die in ein Oligomer inkorporiert mehrere Monate lang bei -20°C gelagert werden können, ohne an Reaktivität zu verlieren, wobei automatisierte Fest-

phasensynthese verwendet wird.

[0022] Wie oben erwähnt betrifft die vorliegende Erfindung unter anderem ein stabiles Phosphoramidit-Reagens der allgemeinen Formel I:



worin Y und Y' jeweils unabhängig voneinander aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl ausgewählt sind und Y und Y' gemeinsam mit dem Stickstoff, an den sie gebunden sind, einen nichtaromatischen N-heterozyklischen Ring bilden.

[0023] In Bezug auf die möglichen Y und Y' scheint vor allem eine Situation, in der Y und Y' beide Ethyl oder Isopropyl oder zusammen Pyrrolidin, Piperidin oder Morpholin bezeichnen, besonders interessant zu sein, vor allem eine Situation, in der Y und Y' beide Isopropyl sind.

[0024] Der Substituent X ist aus der aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl und Benzyl bestehenden Gruppe ausgewählt. Beispiele für das gegebenenfalls substituierte C<sub>1-6</sub>-Alkyl sind Methyl, 2-Cyanoethyl, 2-(4-Nitrophenyl)ethyl, 2-(4-Pyridyl)ethyl, 2-(4-Pyridyl)ethyl und 2-(C<sub>1-6</sub>-Alkylsulfonyl)ethyl, wovon 2-Cyanoethyl derzeit am meisten bevorzugt ist.

[0025] W ist aus O und S ausgewählt, wobei O am meisten bevorzugt ist.

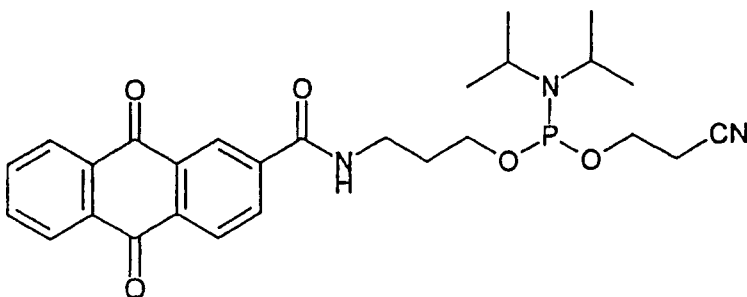
[0026] R<sup>N</sup> ist aus Wasserstoff und C<sub>1-4</sub>-Alkyl, wie beispielsweise Methyl, Ethyl und Isopropyl, gegebenenfalls substituiertem Benzyl, gegebenenfalls substituierten Chinonen, die mittels geeigneter Linker gebunden sind, z.B. Methylen und Polymethylen, und Nucleosiden, die mittels 5'-C durch einen Methylen- oder Polymethylenlinker gebunden sind, ausgewählt; vorzugsweise bezeichnet R<sup>N</sup> Wasserstoff.

[0027] Q stellt eine Gruppe dar, die aus gegebenenfalls substituierten Chinonen und gegebenenfalls substituierten photoreaktiven Ketonen ausgewählt ist.

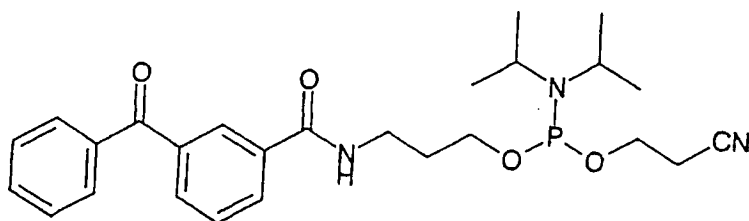
[0028] Der Begriff "Chinon" bezeichnet ein dihydroaromatisches System, worin die -CH<sub>2</sub>-Gruppen durch -C(=O)- ersetzt sind. Im vorliegenden Zusammenhang umfasst der Begriff "Chinon" Chinone, die von di- oder tetrahydroaromatischen Systemen stammen, die 2 bis 5 anellierte Kohlenstoffringe umfassen. Veranschaulichende Beispiele für solche Chinone stammen von 1,4-Benzochinon, 1,2-Benzochinon, Naphthochinon, Anthrachinon, Phenanthrenchinon, Alizarin, Rubiadin, Lucidin, Damnacanthal, Munjistin, Chrysophanol, Frangula-Emodin, Aloe-Emodin, Morindon und Copareolatin. Wie oben erwähnt können Chinone gegebenenfalls substituiert sein, derzeit herrscht jedoch die Ansicht vor, dass unsubstituierte Chinone, vor allem unsubstituiertes Anthrachinon und Phenanthrenchinon, insbesondere zu bevorzugen sind.

[0029] Beispiele für besonders interessante photoreaktive Ketone sind Acetophenon, Benzophenon, Anthron und anthronähnliche Heterozyklen, d.h. Anthron, worin die Gruppe an der 10-Position durch O, S oder NH ersetzt ist. Die photoreaktiven Ketone können gegebenenfalls wie im Folgenden beschrieben substituiert sein. Besonders interessante photoreaktive Ketone sind Benzophenon und Acetophenon, wobei unsubstituiertes Benzophenon derzeit am meisten bevorzugt wird.

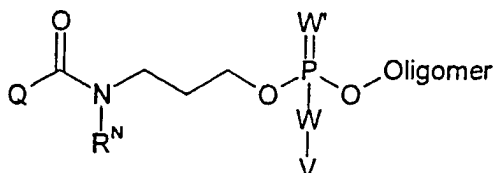
[0030] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das Phosphoramidit die folgende Struktur auf:



[0031] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das Phosphoramidit die folgende Struktur auf:

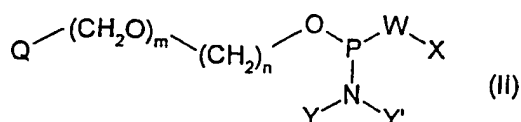


[0032] Wenn sie an Oligomere, beispielsweise ONs oder ODNs, gekoppelt sind, führen die Reagenzien gemäß vorliegender Erfindung zu einer neuen Art von Oligomeren. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Oligomer, welches das folgende Fragment umfasst:



worin Q und R<sup>N</sup> wie oben für Formel I definiert sind, W und W' jeweils unabhängig voneinander aus O und S ausgewählt sind, V aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl, gegebenenfalls substituiertem Benzyl, Wasserstoff, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ausgewählt ist und "Oligomer" die weiter unten definierte Bedeutung besitzt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist Q Anthrachinon, R<sup>N</sup> Wasserstoff, W und W' jeweils O und V Wasserstoff.

[0033] Die Erfindung betrifft außerdem ein Phosphoramidit-Reagens der Formel II:



worin Y und Y' jeweils unabhängig voneinander ein gegebenenfalls substituiertes C<sub>1-6</sub>-Alkyl bezeichnen können oder Y und Y' gemeinsam mit dem Stickstoff, an den sie gebunden sind, einen nichtaromatischen N-heterozyklischen Ring bilden.

[0034] In Bezug auf die möglichen Y und Y' scheint vor allem eine Situation, in der Y und Y' beide Ethyl oder Isopropyl oder zusammen Pyrrolidin, Piperidin oder Morpholin bezeichnen, besonders interessant zu sein, vor allem eine Situation, in der Y und Y' beide Isopropyl sind.

[0035] Der Substituent X ist aus der aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl und Benzyl bestehenden Gruppe ausgewählt. Beispiele für das gegebenenfalls substituierte C<sub>1-6</sub>-Alkyl sind Methyl, 2-Cyanoethyl, 2-(4-Nitrophenyl)ethyl, 2-(2-Pyridyl)ethyl, 2-(4-Pyridyl)ethyl und 2-(C<sub>1-6</sub>-Alkylsulfonyl)ethyl, wovon 2-Cyanoethyl derzeit am meisten bevorzugt wird.

[0036] W ist aus O und S ausgewählt, wobei O am meisten bevorzugt ist.

[0037] Q stellt eine Gruppe dar, die aus gegebenenfalls substituierten Chinonen und gegebenenfalls substituierten photoreaktiven Ketonen ausgewählt ist. Veranschaulichende Beispiele für solche Chinone stammen von Phenanthrenchinon, 1,4-Benzochinon, 1,2-Benzochinon, Naphthochinon, Anthrachinon, Alizarin, Rubiadin, Lucidin, Damnacanthal, Munjistin, Chrysophanol, Frangula-Emodin, Aloe-Emodin, Morindon und Coparelatin. Wie oben erwähnt können Chinone gegebenenfalls substituiert sind, derzeit herrscht jedoch die Ansicht vor, dass unsubstituierte Chinone, vor allem unsubstituiertes Anthrachinon und Phenanthrenchinon, insbesondere zu bevorzugen sind.

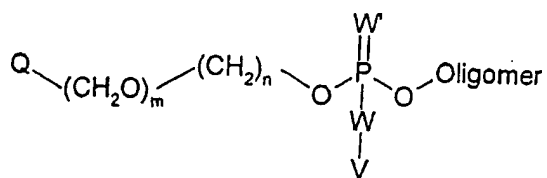
[0038] Beispiele für besonders interessante, gegebenenfalls substituierte, photoreaktive Ketone sind Benzophenon, Amino-, Hydroxy-, Halogen-, Acyl-, Nitro- und Cyanobenzophenon, wovon unsubstituiertes Benzophenon am meisten bevorzugt ist.

[0039] n ist eine ganze Zahl von 1 bis 10. Derzeit herrscht die Annahme vor, dass Varianten, bei denen n 1 bis 4 beträgt, wie beispielsweise 1, 2, 3 oder 4, von spezieller Relevanz sind.

[0040] m = 0 oder 1.

[0041] In einer bevorzugten Ausführungsform ist sowohl Y als auch Y' Isopropyl, und X bezeichnet 2-Cyanoethyl.

[0042] Die Kopplung von Phosphoramidit-Reagenzien der allgemeinen Formel II an die Termini eines Oligomers ergibt Oligomere, welche das folgende Fragment enthalten. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Oligomer, welches das folgende Fragment umfasst:



worin Q, n und m wie oben für Formel II definiert sind, W und W' jeweils unabhängig voneinander aus O und S ausgewählt sind, und V aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl, gegebenenfalls substituiertem Benzyl, Wasserstoff, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ausgewählt ist und "Oligomer" die weiter unten definierte Bedeutung besitzt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist Q Anthrachinon oder Phenanthrenchinon, W und W' jeweils O, V Wasserstoff, n = 1 und m = 0.

[0043] Außerdem sollte erwähnt werden, dass die Phosphoramidit-Reagenzien der allgemeinen Formeln I und II an die 3'-OH-Termini eines Oligomers gekoppelt werden können, das von 5'→3' synthetisiert wurde.

#### Herstellung von Phosphoramidit-Reagenzien

[0044] In einer bevorzugten Ausführungsform wurden Anthrachinonphosphoramidite mithilfe der folgenden Verfahren synthetisiert:

Die Synthese des Anthrachinonphosphoramidits 3 ist in **Fig. 1** dargestellt und wurde in zwei Schritten durchgeführt, ausgehend von handelsüblicher Anthrachinon-2-carbonsäure (1). Die Kopplung der Verbindung 1 mit 3-Amino-1-propanol in Gegenwart von Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) ergab das Amid 2. Danach ergab eine Phosphitylierung von 2 unter Verwendung von 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidochloridit das Anthrachinonphosphoramidit 3 nach wässriger Aufarbeitung als rotes Öl. Eine Wiederauflösung des Rohprodukts 3 in einer minimalen Menge wasserfreiem Methylenchlorid und darauf folgende Ausfällung in heftig gerührtem Petrolether bei 0°C ergab 3 als hellgelbes Pulver. Das Produkt 3 wurde über Nacht bei Hochvakuum getrocknet und unter Stickstoff bei -20°C gelagert.

[0045] Die Synthese des Anthrachinonphosphoramidits 5 ist in **Fig. 1** dargestellt und wurde in einem Schritt durchgeführt, ausgehend von handelsüblichem 2-(Hydroxymethyl)anthrachinon (4). Eine Phosphitylierung von 2-(Hydroxymethyl)anthrachinon (4) unter Verwendung desselben Verfahrens wie für die Herstellung von 3 beschrieben wurde ergab das entsprechende Phosphoramidit 5 als gelbes Öl, das zusammen mit wasserfreiem Acetonitril eingedampft wurde, um 5 als gelben Feststoff zu erhalten.

[0046] Alternativ dazu ergab die Umsetzung von 2-(Hydroxymethyl)anthrachinon (4) mit 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidit und Tetrazol das Phosphoramidit 5 nach Filtration und wässriger Aufarbeitung als hellgelben Feststoff.

[0047] Phosphoramidit 3 wurde in einer automatisierten Festphasensynthese für eine große Anzahl an Anthrachinon-ODN-Konjugaten verwendet. Das Phosphoramidit 3 wurde in einem letzten Schritt einer automatisierten Festphasensynthese auf einem Synthesegerät Gene Assembler Special<sup>®</sup> unter Verwendung einer 0,1 M Lösung und einer 5-minütigen Kopplungszeit direkt an die 5'-OH-Termini eines ODN oder mittels eines 5'-Hexaethoxyglykol-Spacers (Spacer<sup>™</sup>) an ein ODN gekoppelt. Die Kopplungseffizienz wurde auf >98 % geschätzt, da der Versuch der Kopplung eines weiteren Thymidinnucleosid- (T-) Rests an eine Testsequenz 5'-Anthrachinon-T-3' komplett fehlschlug (keine 4,4'-Dimethoxytrityl-Abgabe wurde beobachtet). Die beiden allgemeinen Arten von synthetisiertem Anthrachinonoligonucleotid sind in **Fig. 2** dargestellt.

[0048] In einer bevorzugten Ausführungsform wurden gegebenenfalls substituierte photoreaktive Ketonphosphoramidite, wie beispielsweise Benzophenonphosphoramidite, mithilfe der folgenden Verfahren synthetisiert: Die Synthese des Benzophenonphosphoramidits 8 wurde in zwei Schritten durchgeführt, ausgehend von handelsüblicher Benzoylbenzoesäure (6). Die Kopplung der Verbindung 6 mit 3-Amino-1-propanol in Gegenwart von Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) ergab das Amid 7. Danach ergab die Phosphitylierung von 7 unter Verwendung von 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidochloridit das Benzophenonphosphoramidit 8 als blassgelbes Öl. Dieses Öl wurde ohne weitere Reinigung verwendet und unter Stickstoff bei -20°C gelagert.

[0049] **Fig. 3** die Synthese eines Benzophenonphosphoramidit-Reagens. Seine Verwendung zur Herstellung von Benzophenon-Oligonucleotid-Konjugaten entsprach der in **Fig. 2** dargestellten Herstellung von Anthrachinon-Oligonucleotid-Konjugaten.

[0050] Phosphoramidit 8 wurde in automatisierter Festphasensynthese für eine große Anzahl an Anthrachinon-ODN-Konjugaten verwendet. Das Phosphoramidit 8 kann in einem letzten Schritt einer automatisierten Festphasensynthese auf einem Synthesegerät Gene Assembler Special<sup>®</sup> unter Verwendung einer 0,2 M Lösung und einer 15-minütigen Kopplungszeit direkt an die 5'-OH-Termini eines ODN oder mittels eines 5'-Hexaethoxyglykol-Spacers (Spacer<sup>™</sup>) an ein ODN gekoppelt werden.

[0051] DNA-Oligomere, die ein 5'-Anthrachinon oder ein 5'-Benzophenon tragen, können durch Bestrahlung auf einem festen Träger kovalent immobilisiert werden, und die immobilisierten Oligomere sind wirksam beim

Einfangen eines komplementären DNA-Oligomers.

[0052] Wie in **Fig. 6** und **7** dargestellt ergeben sowohl AQ-Oligomere als auch BP-Oligomere ein klar konzentrationsabhängiges Signal. Als eine nicht komplementäre Sequenz verwendet wurde, konnte kein Signal detektiert werden. Das führt zu dem Schluss, dass sowohl Anthrachinon als auch gegebenenfalls substituierte photoreaktive Ketonoligomere, wie beispielsweise AQ- und BP-Oligomere, durch Bestrahlung kovalent an eine feste Oberfläche gebunden werden können und dass auf diese Weise gebundene Oligomere zur Hybridisierung ihrer komplementären Ziel-DNA-Oligomere fähig sind.

## DEFINITIONEN

[0053] Im vorliegenden Kontext bezeichnet der Begriff " $C_{1-6}$ -Alkyl" eine lineare, zyklische oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise Methyl, Ethyl, Propyl, iso-Propyl, Pentyl, Cyclopentyl, Hexyl, Cyclohexyl; wobei Ethyl, Propyl, iso-Propyl, Butyl, tert-Butyl, iso-Butyl, Pentyl, Cyclopentyl, Hexyl, Cyclohexyl, vor allem jedoch Ethyl, bevorzugte Beispiele für " $C_{1-6}$ -Alkyl" sind. Analog dazu bezeichnet der Begriff " $C_{1-4}$ -Alkyl" eine lineare, zyklische oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise Methyl, Ethyl, Propyl, iso-Propyl, Butyl, iso-Butyl und tert-Butyl.

[0054] Im vorliegenden Kontext, d.h. in Zusammenhang mit den Begriffen "Alkyl", "Chinon" und "photoreaktive Ketone", bedeutet der Begriff "gegebenenfalls substituiert", dass die betreffende Gruppe ein oder mehrere Male, vorzugsweise 1- bis 4-mal, mit aus Hydroxyl, Amino, Halogen, Acyl, Nitro und Cyano,  $C_{1-6}$ -Alkoxy,  $C_{1-6}$ -Alkyl (nur für Chinon und photoreaktive Ketone von Relevanz), Formyl, Carboxyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-carbonyl,  $C_{1-6}$ -Alkylcarbonyl, Aryl, Aryloxycarbonyl, Arylcarbonyl, Heteroaryl, Mono- und Di( $C_{1-6}$ -alkyl)amino, Carbamoyl, Mono- und Di( $C_{1-6}$ -alkyl)aminocarbonyl, Amino- $C_{1-6}$ -alkylaminocarbonyl, Mono- und Di( $C_{1-6}$ -alkyl)amino- $C_{1-6}$ -alkylaminocarbonyl,  $C_{1-6}$ -Alkylcarbonylamino und Carbamido ausgewählten Gruppen substituiert sein kann, wobei  $C_{1-6}$ -Alkyl, -Aryl und -Heteroaryl 1- bis 5-mal, vorzugsweise 1- bis 3-mal, mit Hydroxyl, Acyl,  $C_{1-4}$ -Alkyl,  $C_{1-4}$ -Alkoxy, Nitro, Cyano, Amino oder Halogen substituiert sein können.

[0055] "Halogen" umfasst Fluor, Chlor, Brom und Iod.

[0056] Im vorliegenden Kontext steht der Begriff "Oligomer(e)" für Oligonucleotide (ONs), Oligodesoxynucleotide (ODNs) und Derivate davon, wie beispielsweise ONs/ODNs, die in der Kohlenwasserstoffgruppierung modifiziert sind, z.B. "Locked Nucleoside Analogues" (LNAs), in der Phosphordiester-Bindung modifizierte ONs/ODNs, z.B. Thiophosphate, Phosphoramidate und Methylphosphonate, in der heterozyklischen Base modifizierte ONs/ODNs und in der "Hauptkette" modifizierte ONs/ODNs, z.B. Peptidnucleinsäure (PNAs). Die Oligomere können 1 bis 1.000 Einheiten, beispielsweise 1 bis 1.000 Nucleotide, vorzugsweise 1 bis 200, noch bevorzugter 5 bis 30 Einheiten, umfassen, und jedes Oligomer kann verschiedene Arten von Einheiten umfassen, beispielsweise ein ODN-LNA-Konjugat. Außerdem sollte erwähnt werden, dass der Begriff "Oligomer" für Oligomere steht, die von 3'→5', mit einem 5'-OH endend, synthetisiert wurden, sowie für Oligomere, die von 5'→3', mit einem 3'-OH endend, synthetisiert wurden.

## KURZBESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0057] **Fig. 1** zeigt die Synthese der Anthrachinonphosphoramidite **3** und **5**.

[0058] **Fig. 2** zeigt die Synthese von zwei allgemeinen Anthrachinonoligonucleotid-Arten.

[0059] **Fig. 3** zeigt die Synthese eines Benzophenonphosphoramidit-Reagens. Seine Anwendung in der Herstellung von Benzophenon-Oligonucleotid-Konjugaten entsprach jener der in **Fig. 2** beschriebenen für Anthrachinon-Oligonucleotid-Konjugate.

[0060] **Fig. 4** zeigt, dass die Anthrachinon-ODN-Konjugate **1** bis **6** (Tabelle 1) ihre spezifischen komplementären biotinylierten Oligomere sehr effizient und bedeutend besser als die entsprechenden unmodifizierten Kontroll-ODN-Fangsonden **A** und **B** einfangen kann. Es wurde kein Signal beobachtet, wenn die Fangsonden mit den nicht verwandten komplementären biotinylierten ODNs inkubiert wurden.

[0061] **Fig. 5**

Die **6** Scans zeigen jeweils eine Anordnung. Jede Anordnung ist eine individuelle Analyse und wird auf individuellen Objektträgern durchgeführt. Vor der Hybridisierung mit einer Probe wurde eine Anordnung von AQ-Oligonucleotiden auf den Objektträgern aufgetragen und mittels UV-Bestrahlung immobilisiert. Das Muster, nach dem die Tupfen in der Anordnung aufgebracht sind, ist im Folgenden dargestellt:

Neg	ON8	ON8	ON7
ON9	ON7	Neg	ON9
ON9	Neg	ON7	ON8
ON7	ON8	ON9	Neg

worin Neg eine negative Kontrolle darstellt, ON8 eine Mutanten fangende Sonde ist, ON7 eine positive Kontrolle ist und ON9 eine Wildtyp fangende Sonde ist. Dieses Muster wird 4-mal (2 × 2) auf jedem Objektträger wiederholt.

[0062] Die 6 hier analysierten Proben sind:

1. Ein homogener Wildtyp, der eine positive Kontrolle umfasst.

Nur die "Wildtyp-Tupfen" und die "positiven Kontrolltupfen" werden auf diesem Objektträger aufgeheilt, und somit ist es möglich, den "Genotyp" der analysierten Probe als homogenen Wildtyp zu bestimmen.

2. Eine homogene Mutante, die eine positive Kontrolle umfasst.

Nur die "Mutanten-Tupfen" und die "positiven Kontrolltupfen" werden auf diesem Objektträger aufgeheilt, und somit ist es möglich, den "Genotyp" der analysierten Probe als homogene Mutante zu bestimmen.

3. Eine Heterozygote, die eine positive Kontrolle umfasst.

Sowohl die "Wildtyp-Tupfen" als auch die "Mutanten-Tupfen" und die "positiven Kontrolltupfen" werden auf diesem Objektträger aufgeheilt, und somit ist es möglich, den "Genotyp" der analysierten Probe als heterogenen Wildtyp zu bestimmen.

4. Eine Heterozygote ohne positive Kontrolle.

Wie in 3) werden sowohl die "Wildtyp-Tupfen" als auch die "Mutanten-Tupfen" aufgeheilt, und somit ist es möglich, den "Genotyp" der analysierten Probe als heterogenen Wildtyp zu bestimmen. Die "positiven Kontrolltupfen" leuchten nicht, da während der Herstellung kein positives Kontroll-Oligo zur Probe zugesetzt wurde, und so ist es möglich, "Cross-Talk"/unspezifische Hybridisierung der Proben an die positiven Kontrollpunkte auszuschließen.

5. Positive Kontrolle alleine.

Da während der Hybridisierung keine andere Probe vorhanden ist, werden nur die positiven Kontrolltupfen aufgeheilt, und so ist es möglich, "Cross-Talk" zwischen der positiven Kontrolle und den "Wildtyp"- bzw. "Mutanten-Tupfen" auszuschließen.

6. Blindprobe (negative Kontrolle).

Wenn eine Anordnung mit einem Puffer hybridisiert wird, der keine Probe oder Kontrollen enthält, wird von keinem der Tupfen ein Signal erhalten.

[0063] Die Signalstärke von den Mutanten- und Wildtyp-Tupfen auf dem Objektträger 1, 2 und 3 wurde mithilfe eines passenden Programms (Optiquant) quantifiziert, und die Ergebnisse sind in **Fig. 5B** in einem Balkendiagramm präsentiert.

[0064] **Fig. 6** zeigt die Immobilisierungseffizienz als Funktion von einem an Anthrachinon und Benzophenon gekoppelten Oligonucleotid in 0,2 M NaCl der Typ-A-Sequenz.

[0065] **Fig. 7** zeigt die Immobilisierungseffizienz als Funktion von einem an Anthrachinon und Benzophenon gekoppelten Oligonucleotid in 0,2 M NaCl der Typ-B-Sequenz.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### Beispiel 1

[0066] N-(6-Hydroxyhexyl)-2-anthrachinoncarboxamid (193 mg, 0,55 mmol) wurde durch einmaliges Eindampfen mit trockenem Acetonitril getrocknet und in trockenem Acetonitril (5 ml) unter Stickstoff suspendiert. Zu dieser Suspension wurde 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidit (150 mg, 0,50 mmol) und Tetrazol (1,0 ml einer 0,43 M Lösung in Acetonitril, 0,43 mmol) zugesetzt. Das Gemisch wurde gerührt und 1 Stunde lang auf 40°C erhitzt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und (üblicherweise 3 bis 4 Stunden lang) wieder auf 40°C erhitzt, bis ein <sup>31</sup>P-NMR zeigte, dass alle Phosphorreagenzien umgesetzt worden waren (Signale bei 123 und 132 ppm fehlen, das Produkt ist bei 146,4 ppm). Das Reaktionsgemisch (eine dicke Aufschlämmung) wurde unter Stickstoff filtriert (wobei eine Poly-Prep-Säule von Bio-Rad als Filter verwendet wurde), und der Rückstand wurde mit trockenem Acetonitril gewaschen, um das Filtrat auf etwa 5 ml zu bringen. Diese Lösung (ca. 0,1 M an Phosphoramidit) wurde innerhalb eines Tages direkt auf dem DNA-Synthesegerät verwendet. Das Phosphoramidit zerfällt langsam in Lösung bei Raumtemperatur, und Versuche, es zu isolie-

ren, führten zu seinem Zerfall.

### Beispiel 2

[0067] Zu einer Suspension von N-(2-Hydroxyethyl)-2-anthrachinoncarboxamid (500 mg, 1,69 mmol) in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml) unter  $\text{N}_2$  wurde Diisopropylethylamin (1,0 ml, 5,74 mmol) zugesetzt, wonach 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidochloridit (0,38 ml, 1,70 mmol) zugetropft wurde. Die resultierende klagelbe Lösung wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und dann in Ethylacetat (10 ml) gegossen, das Triethylamin (1 ml) enthielt. Das Gemisch wurde mit gesättigtem wässrigem  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 5$  ml) und Kochsalzlösung ( $2 \times 5$  ml) gewaschen, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und unter reduziertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde einer Säulenchromatographie auf Kieselgel unterzogen (Eluent: 45:45:10, Ethylacetat:Petrolether:Triethylamin) und ergab 640 mg eines gelben Sirups, der sich nach Trocknung im Hochvakuum über Nacht in einen dunkelroten Gummi verwandelte.

[0068] Eine 120 Minuten dauernde Behandlung von N-(2-Hydroxyethyl)-2-anthrachinoncarboxamid (510 mg, 1,73 mmol) mit 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetrakispropylphosphoramidit (0,55 ml, 1,73 mmol) und Tetrazol (3,65 ml einer 0,45 M Lösung in Acetonitril, 1,64 mmol) in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml) bei Raumtemperatur ergab nach Filtration des Reaktionsgemischs und wässriger Aufarbeitung sowie Abdampfung der Lösungsmittel einen gelben Schaum, der zu einem dunkelbraunen Sirup zusammenfiel, nachdem er über Nacht unter Hochvakuum getrocknet worden war.

### Beispiel 3

#### Herstellung von N-(3-Hydroxypropyl)-2-anthrachinoncarboxamid (2)

[0069] Zu einer gerührten Suspension von Anthrachinon-2-carbonsäure (Aldrich, 10,00 g, 39,64 mmol) in DMF (130 ml) wurden (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (17,54 g, 39,66 mmol) und Triethylamin (11,05 ml, 79,28 mmol) zugesetzt. Das resultierende Gemisch (anfänglich eine klargrüne Lösung) wurde 10 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt, bevor 3-Amino-1-propanol (3,34 ml, 43,67 mmol) zugetropft wurde. Das Reaktionsgemisch (klarbraune Lösung) wurde 17 Stunden lang bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Die Lösung wurde als dünner Strahl in Wasser (300 ml), das etwa Eis enthielt, gegossen. Das ausgefällte Material wurde durch Filtration isoliert und aus kochendem 96% Ethanol (ca. 200 ml) umkristallisiert, was die Titelverbindung 2 als hellgelben Feststoff ergab (6,93 g, 57% Ausbeute).

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 1,74 (2H, Quintett,  $J = 6,52$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,25–3,44 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3,50 (2H, breites t,  $J = 5,80$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 4,53 (1H, breites s, OH), 7,76–8,00 (2H, m, Ar), 8,04–8,36 (4H, m, Ar), 8,56 (1H, d,  $J = 1,55$  Hz, Ar), 8,89 (1H, t,  $J = 5,42$  Hz, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 32,32, 36,96, 58,68, 125,50, 126,83, 126,85, 127,05, 132,79, 133,04, 133,08, 134,45, 134,66, 139,49, 164,62, 182,11.

### Beispiel 4

#### Herstellung von N-(3-(2-Cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphinoxy)propyl)-2-anthrachinoncarboxamid (3)

[0070] N-(3-Hydroxypropyl)-2-anthrachinoncarboxamid (2) (1,00 g, 3,23 mmol) wurde unter  $\text{N}_2$  in wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml) suspendiert. N,N-Diisopropylethylamin (1,24 ml, 7,12 mmol) wurde unter Rühren zugesetzt, wonach 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidochloridit (0,72 ml, 3,23 mmol) zugetropft wurde. Das resultierende, leicht trübe Reaktionsgemisch wurde 25 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde filtriert und mit Ethylacetat (100 ml), das Triethylamin (10 ml) enthielt, verdünnt und mit gesättigtem wässrigem  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 20$  ml) gewaschen. Die organische Lösung wurde getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und unter reduziertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde in einer minimalen Menge  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und zu heftig gerührten, eisgekühltem Leicht-Petrolether (200 ml) zugetropft. Das ausgefällte gelbe Pulver wurde abfiltriert und über Nacht unter Hochvakuum getrocknet, was 3 (1,26 g, 55 % Ausbeute) ergab. Diese Verbindung konnte unter  $\text{N}_2$  bei  $-20^\circ\text{C}$  mehrere Monate lang gelagert werden, ohne dass nennenswerte Zersetzung stattfand:  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,17 (d,  $J = 6,86$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,87–2,15 (m,  $\text{CH}_2$ ), 2,70 (t,  $J = 5,72$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,41–4,04 (m,  $\text{CH}_2$ , CH), 7,17 (breites t,  $J = 5,49$  Hz, NH), 7,76–7,87 (m, Ar), 8,24–8,41 (m, Ar), 8,59 (d,  $J = 1,65$  Hz, Ar).  $^{13}\text{C-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CHCl}_3$ )  $\delta$ : 20,43, 20,54, 24,58, 24,69, 30,22, 30,33, 38,53, 43,03, 43,23, 58,19, 58,51, 62,45, 62,74, 117,90, 125,04, 127,39, 127,83, 133,15, 133,42, 134,39, 135,04, 139,80, 165,57, 182,50.  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 148,49.

## Beispiel 5

Herstellung von 2-[2-Cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphinoxymethyl]anthrachinon (5).

[0071] Zu einer gerührten Suspension von 2-(Hydroxymethyl)anthrachinon (Fluka, 1,00 g, 4,20 mmol) in wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (42 ml) unter  $\text{N}_2$  wurde 2-Cyanoethyl N,N,N',N'-tetrakisopropylphosphordiamidit (1,33 ml, 4,20 mmol) zugesetzt, wonach Tetrazol (8,86 ml einer 0,45 M Lösung in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) zugetropft wurde. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 90 Minuten lang gerührt, und die resultierende Salze wurden abfiltriert. Das Filtrat wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml) verdünnt und mit gesättigtem wässrigem  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 20$  ml) und Kochsalzlösung (20 ml) gewaschen. Die organische Lösung wurde getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und unter reduziertem Druck eingedampft. Das restliche gelbe feste Material wurde zusammen mit wasserfreiem  $\text{CH}_3\text{CN}$  eingedampft und über Nacht unter Hochvakuum getrocknet, was 5 als gelben Feststoff ergab (1,84 g, 100 % Ausbeute).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,23 (d, J = 6,96 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2,69 (t, J = 6,41 Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3,65–3,75 (m, CH), 3,84–3,97 (m,  $\text{CH}_2$ ), 4,82–4,95 (m,  $\text{CH}_2$ ), 7,77–7,82 (m, Ar), 8,27–8,32 (m, Ar).  $^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 20,29, 20,35, 24,50, 24,57, 43,13, 43,26, 58,32, 58,51, 64,48, 64,66, 117,40, 125,03, 127,04, 127,10, 127,41, 132,01, 132,21, 132,48, 133,37, 133,39, 133,89, 133,96, 134,07, 145,95, 146,03, 182,68, 182,89.  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 149,76.

## Beispiel 6

Herstellung von 5'-Ende-Anthrachinon-ONs

[0072] Zuerst wurde eine unmodifizierte ODN-Sequenz auf einem DNA-Synthesegerät (Pharmacia Gene Assembler Special<sup>®</sup>) synthetisiert, wobei herkömmliche Phosphoramidit-Kopplungsbedingungen laut Vorschrift (0,2- $\mu\text{mol}$ - oder 1,3- $\mu\text{mol}$ -Maßstab) und herkömmliches 2'-Desoxynucleosid-CPG oder herkömmliche Polystyrol-Trägermaterialien verwendet wurden. Noch auf dem Synthesegerät wurden die 5'-OH-Termini der ODN-Sequenz unter Verwendung einer 0,1 M Lösung und 5 Minuten Kopplungszeit mit dem Phosphoramidit-Reagens (3) oder (5) gekoppelt. Die Kopplungseffizienz wurde auf >98% geschätzt, da der Versuch der Kopplung eines weiteren Thymidinnucleosid- (T-) Rests an eine Testsequenz 5'-Anthrachinon-T-3' komplett fehlschlug (keine 4,4'-Dimethoxytrityl-Abgabe wurde beobachtet).

[0073] Nach Beendigung der Synthese wurde das gewünschte Anthrachinon-ODN vom Trägermaterial abgespalten, und die Nucleobase-Schutzgruppen wurden durch 10- bis 15-stündige Inkubation mit 32%  $\text{NH}_4\text{OH}$  bei 55 bis 60°C entfernt. Das rohe Anthrachinon-ODN-Konjugat wurde durch Umkehrphasen-HPLC (C-18, 100 Å, 15 m, 300  $\times$  3,9 mm ID) in einem Gradienten von 100 % 0,05 M Triethylammoniumacetat (pH 7,4) zu 100 %  $\text{H}_2\text{O}$ (50%)/ $\text{CH}_3\text{CN}$ (50%), Vol.-%, gereinigt.

[0074] Tabelle 1: Beispiele für synthetisierte Anthrachinon-ODN-Konjugate:

1	5'-AQCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -aacagctatgaccatg-3'
2	5'-AQCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -HEG-aacagctatgaccatg-3'
3	5'-AQCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(HEG) <sub>2</sub> -aacagctatgaccatg-3'
4	5'-AQCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -gtaaaacgacggccagt-3'
5	5'-AQCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -HEG-gtaaaacgacggccagt-3'
6	5'-AQCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(HEG) <sub>2</sub> -gtaaaacgacggccagt-3'
7	5'-AQCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -HEG-attaatgctatgcagaaaatctta g-3'
8	5'-AQCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -„15-mer nichtbindende DNA-Sequenz“-GACCGTGTg-3'
9	5'-AQCONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -„15-mer nichtbindende DNA-Sequenz“-GACTGTGTg-3'
10	5'-AQCH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -gtaaaacgacggccagt-3'
11	5'-AQCH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -aacagctatgaccatg-3'

AQCONH = Anthrachinon-2-carboxamid. HEG = Hexaethoxyglykol. ON-Sequenz: Kleinbuchstaben = normale 2'-Desoxynucleosidmonomere; Großbuchstaben = modifizierte Nucleoside („Locked“ Nucleinsäuren) LNA™.

#### Beispiel 7

Photoimmobilisierte Anthrachinon-ODN-Konjugate, die effizient und spezifisch mit komplementären ODNs in Mikrotiterplatten hybridisiert wurden

[0075] Die Anthrachinon-ODN-Konjugate 1 bis 6 (Tabelle 1) und unmodifizierte Kontroll-ODN-A (5'-aacagctatgaccatg-3') und -ODN-B (5'-gtaaaacgacggccagt-3') wurden wie beschrieben synthetisiert. Alle ODNs wurden in 0,2 M LiCl auf eine Endkonzentration von 0,1 µM verdünnt, und 100 µl wurden pro Napf in eine Mikrotiterplatte (MTP, Nunc, Polysorp) gegeben. Die ODN-Lösungen wurden 15 Minuten lang mit weichem UV-Licht bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde die MTP vier Mal mit 300 µl entmineralisiertem Wasser gewaschen.

[0076] 100 µl pro Napf von 0,004 µM komplementären biotinylierten Oligomeren, entweder 5'-Biotin-catggtcatagctgtt-3' (Biotin-Zus. ODN-A) oder 5'-Biotin-actggcgcgttttac-3' (Biotin-Zus. ODN-B), wurden bei Raumtemperatur 2 Stunden lang an die immobilisierten Oligomere in 2 × SSCT (30 mM Citrat, 0,3 M NaCl, pH 7,0, 0,1 Vol.-% Tween 20 (registrierter Markenname)) hybridisiert. Nach dreimaligem Waschen mit 300 µl 1 × SSCT (15 mM Citrat, 0,15 M NaCl, pH 7,0, 0,1 Vol.-% Tween 20) und einmaligem Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBST, 0,15 M Na<sup>+</sup>, pH 7,2, 0,05 Vol.-% Tween 20) wurden pro Napf 100 µl 1 µg/ml Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Pierce) zu der MTP zugesetzt. Die MTP wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und drei Mal mit 300 µl PBST gewaschen.

[0077] Die Nöpfe wurden auf Peroxidaseaktivität untersucht, indem 100 µl Substratlösung (0,1 ml Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0, 0,66 mg/ml Orthophenylendiamindihydrochlorid, 0,012 Vol.-% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugesetzt wurden, und nach 30 Minuten wurde die Reaktion gestoppt, indem 100 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugesetzt wurden, und das Absorptionsvermögen bei 492 nm wurde auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät abgelesen.

[0078] Wie in **Fig. 4** dargestellt, fangen die Anthrachinon-ODN-Konjugate 1 bis 6 (Tabelle 1) ihre spezifischen komplementären biotinylierten Oligomere sehr effizient und bedeutend besser ein als die entsprechenden unmodifizierten Kontroll-ODN-Fangsonden A und B. Es wurde kein Signal beobachtet, wenn die Fangsonden mit den nicht verwandten komplementären biotinylierten ODNs inkubiert wurden.

#### Beispiel 8

Detektion eines Einzelnucleotid-Polymorphismus (SNP) mit einer Anordnung von Anthrachinon-ON-Konjugaten

[0079] Vier Lösungen von ArrayIt™-Spotting-Lösung (Telechem, Chargen-Nr. 99301) wurden hergestellt. Lösung 1 (positive Kontrolle): 7 µM ON7 (Tabelle 1), Lösung 2 (negative Kontrolle): reine Spotting-Lösung (Neg), Lösung 3 (Wildtyp fangende Sonde): 7 µM ON8 (Tabelle 1) und Lösung 4 (Mutanten fangende Sonde): 7 µM

ON9 (Tabelle 1).

[0080] Ein Spotting-Roboter Cartesian Tech PixSys 3500 wurde so programmiert, dass er die 4 verschiedenen Lösungen von einer Mikrotiterplatte auf silanisierten Objektträgern (Hersteller, Chargen-Nr.) anordnete. Die Tupfen wurden in einem Abstand von 1 mm in einer 4-mal-4-Anordnung mit jeweils 30 nl angeordnet, wobei 4 Kopien jeder Lösung laut dem folgenden Muster angeordnet wurden:

Neg	ON8	ON8	ON7
ON9	ON7	Neg	ON9
ON9	Neg	ON7	ON8
ON7	ON8	ON9	Neg

[0081] Nach dem Spotting wurden die Tupfen 10 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen und dann 30 Minuten lang mit einer ULS-20-2-Leuchtquelle mit UV-Licht bestrahlt, wobei sowohl Ober- als auch Unterlicht und ein Glasplattenhalter verwendet wurden. Schließlich wurden die Objektträger 3 × 10 Minuten mit Milli-Q-Wasser (ca. 100 ml pro 25 Objektträger) gewaschen.

[0082] In einem Hybridisierungsassay wurden sechs getupfte Objektträger mit unterschiedlichen Kombinationen aus Proben, Reportersystemen und positiven Kontrollen inkubiert, wie sie unten beschrieben sind. Zwei synthetische 50-mer-ODNs, von denen eines die Nucleotidsequenz des Gens, das den betreffenden SNP enthält, als Mutante (MT) und eines als Wildtyp (WT) enthielt, wurden als Proben verwendet. Um zu detektieren, ob ein Proben-50-mer an den immobilisierten Fangsonden hybridisiert hatte, wurde eine 25-mer-ODN-Detektionssonde, die komplementär zu einer Sequenz war, die sowohl in der 50-mer-Mutante als auch im -Wildtyp vorhanden war und die am 5'-Ende mit einem Biotin markiert war, verwendet (5'-Biotin-ttggagtgccctgcagctt-3', ODN-Bio). Die Gegenwart von Biotin wurde durch Inkubation mit Cy5-markiertem Streptavidin (SA/Cy5) detektiert. Als positive Kontrolle wurde ein ODN verwendet, das zu ON7 komplementär war und am 5'-Ende mit einem Cy5-Fluorophor markiert war (Pos-Cy5: 3'-ctaagattttctgcatagcattaat-Cy5-5').

[0083] Die Objektträger wurden bei 37°C 30 Minuten lang mit 20 µl eines Hybridisierungsgemischs unter einem Deckglas inkubiert. Die folgenden sechs unterschiedlichen Hybridisierungsgemische wurden verwendet (alle in 2 × SSC):

1. "Homozygote" Wildtyp-Probe (0,1 µM):
  - 3,6 µl WT-50-mer (Stammlösung: 2,8 µM)
  - 47,2 µl ODN-Bio (Stammlösung: 1,06 µM)
  - 1,0 µl Pos-Cy5 (Stammlösung: 1,0 µM)
  - 40 µl 5×SSC, 0,1% SDS (2×SSC final)
  - 8,2 µl Milli-Q-Wasser.
2. "Homozygote" Mutanten-Probe (0,1 µM):
  - 7,1 µl MT-50-mer (Stammlösung: 1,4 µM)
  - 47,2 µl ODN-Bio (Stammlösung: 1,06 µM)
  - 1,0 µl Pos-Cy5 (Stammlösung: 1,0 µM)
  - 40 µl 5×SSC, 0,1% SDS (2×SSC final)
  - 4,7 µl Milli-Q-Wasser.
3. "Heterozygote" Probe (0,1 µM):
  - 3,6 µl WT-50-mer (Stammlösung: 2,8 µM)
  - 7,1 µl MT-50-mer (Stammlösung: 1,4 µM)
  - 47,2 µl ODN-Bio (Stammlösung: 1,06 µM)
  - 1,0 µl Pos-Cy5 (Stammlösung: 1,0 µM)
  - 40 µl 5×SSC, 0,1 % SDS (2×SSC final)
  - 1,1 µl Milli-Q-Wasser.
4. "Heterozygote" Probe (0,1 µM), ÷ Pos-Cy5:
  - 3,6 µl WT-50-mer (Stammlösung: 2,8 µM)
  - 7,1 µl MT-50-mer (Stammlösung: 1,4 µM)
  - 47,2 µl ODN-Bio (Stammlösung: 1,06 µM)
  - 40 µl 5×SSC, 0,1% SDS (2×SSC final)
  - 2,1 µl Milli-Q-Wasser.

5. Positive Kontrolle alleine (0,01  $\mu\text{M}$ ): 1,0  $\mu\text{l}$  Pos-Cy5 (Stammlösung: 1,0  $\mu\text{M}$ )  
40  $\mu\text{l}$  5 $\times$ SSC, 0,1% SDS (2 $\times$ SSC final)  
59  $\mu\text{l}$  Milli-Q-Wasser.
6. Detektions-Oligo alleine (0,5  $\mu\text{M}$ ): 47,2  $\mu\text{l}$  ODN-Bio (Stammlösung: 1,06  $\mu\text{M}$ )  
40  $\mu\text{l}$  5 $\times$ SSC, 0,1% SDS (2 $\times$ SSC final)  
12,8  $\mu\text{l}$  Milli-Q-Wasser.

[0084] Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger 3  $\times$  5 Minuten lang mit 1  $\times$  SSC/0,1 % SDS (ca. 50 ml pro 6 Objektträger) bei Raumtemperatur gewaschen und mit 20  $\mu\text{l}$  SA/Cy5 (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 2  $\times$  SSC) unter einem Deckglas 30 Minuten lang bei Raumtemperatur hybridisiert. Schließlich wurden die Objektträger 3  $\times$  5 Minuten lang in 1  $\times$  SSC/0,1% SDS (ca. 50 ml pro 6 Objektträger) gewaschen, luftgetrocknet und in einem konfokalen Laser-Scanner gelesen (Fig. 5A). Das TIFF-Bild des Laser-Scanners wurde mithilfe geeigneter Analyse-Software analysiert, und das erhaltene Balkendiagramm ist in Fig. 5B zu sehen. Es zeigt klar, dass die AQ-Oligos zur effizienten Produktion von hochqualitativen Oligonucleotid-Anordnungen verwendet werden können.

#### Beispiel 9

##### Herstellung von N-(3-Hydroxypropyl)-2-benzophenoncarboxamid (7)

[0085] Zu einer Lösung von 4-Benzoylbenzoesäure (Fluka, >98%, 5,0 g, 22,1 mmol) in DMF (70 ml) von HPLC-Reinheit wurden BOP (10,26 g, 23,20 mmol) und Triethylamin (5,88 ml, 42,19 mmol) zugesetzt, und das resultierende Gemisch wurde bei Raumtemperatur 10 Minuten lang gerührt. 3-Amino-1-propanol (1,78 ml, 23,27 mmol) wurde zugesetzt, und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die dunkelgelbe Lösung wurde in Wasser (400 ml) gegossen, und das Produkt wurde mit Ethylacetat (3  $\times$  250 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Kochsalzlösung (100 ml) gewaschen, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und unter reduziertem Druck eingedampft. Der restliche gelbe Sirup, der sich beim Stehen lassen verfestigte, wurde aus Ethylacetat und Hexan umkristallisiert, was die Verbindung 7 als grauweißen Feststoff ergab (2,38 g, 38 % Ausbeute).

$^1\text{N-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,83 (2H, Quintett,  $J = 5,86$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,65 (2H, "q",  $J = 5,85$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,76 (2H, t,  $J = 5,68$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7,46–7,89 (9H, m, Ar).  $^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 31,60, 37,66, 60,14, 126,81, 128,30, 129,88, 132,79, 136,75, 137,41, 139,86, 167,29, 195,93.

##### Herstellung von N-(3-(2-Cyanoethoxy)düsopropylamino)phosphinoxy)propyl)-2-benzophenoncarboxamid (8)

[0086] Der Alkohol 7 (500 mg, 1,76 mmol) wurde in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 ml) unter  $\text{N}_2$  gelöst. 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-Tetraisopropylphosphordiamidit (0,56 ml, 1,76 mmol) und Tetrazol (3,80 ml einer 0,45 M Lösung in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 1,71 mmol) wurden zugesetzt, und das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 120 Minuten lang gerührt. Der gebildete Feststoff (Tetrazoliumsalze) wurde abfiltriert und mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml) gewaschen. Die vereinigten klaren Filtrate wurden mit gesättigtem wässrigem  $\text{NaHCO}_3$  (2  $\times$  30 ml) gewaschen, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und unter reduziertem Druck eingedampft. Das Rohprodukt wurde unter Hochvakuum getrocknet, was das Phosphoramidit 8 als blassgelbes Öl ergab (812 mg, 95 % Ausbeute), das ohne weitere Reinigung eingesetzt wurde.  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 148,45.

[0087] Die Fällung des Phosphoramidits 8 (erhalten durch die Phosphitylierung von 7 mit 2-Cyanoethyl-N,N-phosphoramidochloridit in Gegenwart von N,N-Diisopropylethylamin) aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  oder Toluol in Hexan war nicht möglich, was darauf hinweist, dass dieses Material von Natur aus ein Öl ist. Das Phosphoramidit 8 kann jedoch bei  $-20^\circ\text{C}$  unter  $\text{N}_2$  mehrere Wochen oder möglicherweise sogar Monate lang gelagert werden, ohne dass es zerfällt.

#### Beispiel 10

##### Herstellung von 5'-Ende-Benzophenon-(BP-)Oligodesoxynucleotid-(ODN-) Konjugaten

[0088] Die folgenden zwei BP-ODN-Konjugate wurden auf einem DNA-Synthesegerät EXPEDITE™ 8909 synthetisiert.

1) 5'-BP-CONH( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub>-HEG-gtaaacgacggccagt-3'

2) 5'-BP-CONH( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub>-HEG-aacagctatgacatg-3'

[0089] Herkömmliche Phosphoramidit-Kopplungsbedingungen laut Anleitungen des Synthesegeräts (0,2- $\mu\text{mol}$ -Maßstab) und herkömmliche 2'-Desoxynucleosid-CPG-Trägermaterialien wurden verwendet, um die oben genannten Oligonucleotid-Sequenzen herzustellen. Noch auf dem Synthesegerät wurden die

5'-OH-Termini der ODNs unter Verwendung einer 0,1 M Lösung in CH<sub>3</sub>CN und herkömmlicher Kopplungszeit (100 Sekunden) mit dem Benzophenonphosphoramidit-Reagens 8 gekoppelt. Die Kopplungseffizienz von 8 wurde auf >98% geschätzt, da der Versuch der Kopplung eines weiteren Thymidinnucleosidrests an eine Testsequenz 5'-BP-t-3' fehlschlug (bei abgetrennter Abdeckung wurde keine 4,4'-Dimethoxytrityl-Abgabe beobachtet).

[0090] Die oben genannten BP-ODNs wurden vom Trägermaterial abgespalten, freigegeben und wie oben beschrieben (Beispiel 6) gereinigt.

[0091] Die Zusammensetzung des Benzophenons, das die Oligodesoxynucleotide enthält, wurde durch MALDI-TOF verifiziert.

[0092] DNA-Oligomere, die ein 5-Anthrachinon oder ein 5'-Benzophenon tragen, können durch Bestrahlung auf einem Trägermaterial kovalent immobilisiert werden, und die immobilisierten Oligomere sind effizient beim Einfangen eines komplementären DNA-Oligomers.

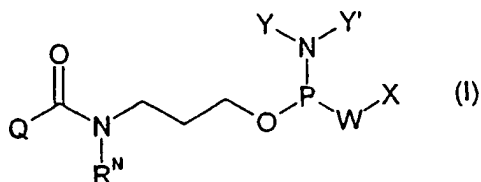
[0093] Anthrachinon- (AQ-) und Benzophenon- (BP-) Oligonucleotide wurden in Wasser verdünnt, und die Konzentration wurde bei 260 nm bestimmt (Typ-A-Oligomere: AQ1-C3-Seq (Tabelle 1, Eintrag 4), AQ1-C3-HEG-Seq (Tabelle 1, Eintrag 5), AQ-1-C3-HEG2-Seq (Tabelle 1, Eintrag 6), AQ2-C3-Seq (Tabelle 1, Eintrag 10) und BP-C3-Seq (Beispiel 10, Oligo 1). Typ-B-Oligomere: AQ1-C3-Seq (Tabelle 1, Eintrag 1), AQ1-C3-HEG-Seq (Tabelle 1, Eintrag 2), AQ1-C3-HEG2-Seq (Tabelle 1, Eintrag 3), AQ2-C3-Seq (Tabelle 1, Eintrag 11) und BP-C3-Seq (Beispiel 10, Oligo 2). Gewünschte Oligo-Konzentrationen wurden in 0,2 M NaCl (12,5 µM) verdünnt, und weitere 5fache Verdünnungen in 0,2 M NaCl wurden vorgenommen (2,5, 0,5, 0,1, 0,02, 0,004, 0,0008 µM). Für jedes Oligomer wurden pro Mikrotiter-Napf 100 µl der einzelnen Konzentrationen genommen. Der Immobilisierungsvorgang wurde durch 15-minütige Bestrahlung mit weichem UV-Licht aus einer Entfernung von 10 cm über der Mikrotiterplatte (MTP) durchgeführt. Die MTP wurde dann mit 3 × 300 µl/Napf entmineralisiertem Wasser gewaschen.

[0094] 2 µM komplementäre biotinylierte Oligonucleotide (komplementär zu Typ-A-Oligomeren: 5'-Biotin-CATGGTCATAGCTGTT-3' und komplementär zu Typ-B-Oligomeren: 5'-Biotin-ACTGGCCGTCGTT-TTAC-3') wurden 60 Minuten lang bei 37°C in 100 µl/Napf 2 × SSCT (30 mM Citrat, 0,3 M NaCl, pH 7,0, 0,05 Vol.-% Tween 20) an die immobilisierten Oligonucleotide hybridisiert. Die MPT wurde dann mit 3 × 300 µl/Napf phosphatgepufferter Kochsalzlösung (1 × PBST, 0,15%, pH 7,2, 0,05 Vol.-% Tween 20) gewaschen und mit 100 µl/Napf 1 µg/ml Streptavidin, das mit in 1 × PBST verdünnter Merrettich-Peroxidase konjugiert war, 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nachdem sie mit 3 × 300 µl/Napf 1 × PBST gewaschen worden war, wurde eine einfach kalorimetrische Endpunktmessung erhalten, nachdem 0,66 mg Orthophenylendiamin, 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0, 0,012 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µl/Napf) zugesetzt worden waren. Die Reaktion wurde 90 Sekunden nach dem Zusatz von 100 µl/Napf 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt, und die Absorptionsfähigkeit bei 492 nm wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

[0095] Wie in Fig. 6 und 7 dargestellt, ergeben sowohl die AQ-Oligomere als auch die BP-Oligomere eine klar konzentrationsabhängiges Signal. Als eine nicht komplementäre Sequenz verwendet wurde, konnte kein Signal detektiert werden. Die Erfinder sind zu dem Schluss gekommen, dass sowohl AQ- als auch BP-Oligomere durch Bestrahlung kovalent an eine feste Oberfläche gebunden werden können und dass auf diese Weise gebundene Oligomere zur Hybridisierung an ihre komplementären Ziel-DNA-Oligomere fähig sind.

## Patentansprüche

1. Phosphoramiditreagens der Formel I:



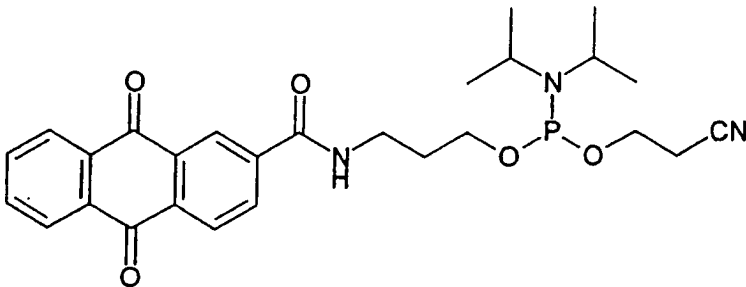
worin Y und Y' jeweils unabhängig voneinander aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl ausgewählt sind und Y und Y' gemeinsam mit dem Stickstoff, an den sie gebunden sind, einen nichtaromatischen N-heterozyklischen Ring bilden; W aus O und S ausgewählt ist; X aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl und gegebenenfalls substituiertem Benzyl ausgewählt ist; R<sup>N</sup> aus Wasserstoff, C<sub>1-4</sub>-Alkyl, gegebenenfalls substituiertem Benzyl, gegebenenfalls substituierten Chinonen und Nucleosiden ausgewählt ist; und Q aus gegebenenfalls substituierten Chinonen und gegebenenfalls substituierten photoreaktiven Ketonen ausgewählt ist.

2. Reagens nach Anspruch 1, worin R<sup>N</sup> Wasserstoff ist.

3. Reagens nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin Q ein Chinon oder ein gegebenenfalls

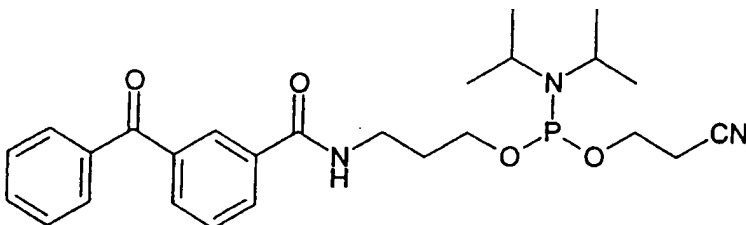
substituiertes Benzophenon ist.

4. Reagens nach Anspruch 3, worin das Chinon Anthrachinon ist.
5. Reagens nach Anspruch 3, worin das Chinon Phenanthrenchinon ist.
6. Reagens nach Anspruch 3, worin Q Benzophenon ist.
7. Reagens nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin Y und Y' aus Ethyl und Isopropyl, insbesondere Isopropyl, ausgewählt sind.
8. Reagens nach Anspruch 7, worin sowohl Y als auch Y' Isopropyl sind.
9. Reagens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin Y und Y' gemeinsam mit dem Stickstoff, an den sie gebunden sind, einen Morpholinring bilden.
10. Reagens nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin X 2-Cyanoethyl bezeichnet und W O bezeichnet.
11. Reagens nach Anspruch 1, das



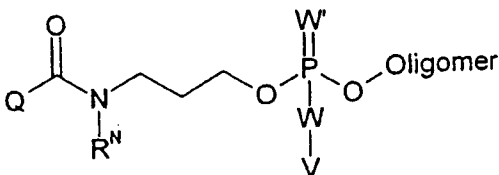
ist.

12. Reagens nach Anspruch 1, das



ist.

13. Oligomer, welches das folgende Fragment umfasst:



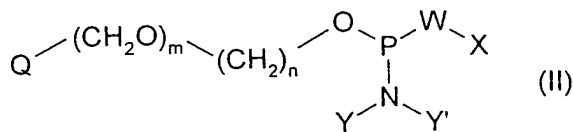
worin  $R^N$  aus Wasserstoff,  $C_{1-4}$ -Alkyl, gegebenenfalls substituiertem Benzyl, gegebenenfalls substituierten Chinonen und Nucleosiden ausgewählt ist; Q aus gegebenenfalls substituierten Chinonen und gegebenenfalls substituierten photoreaktiven Ketonen ausgewählt ist; W und W' jeweils unabhängig voneinander aus O und S ausgewählt sind; und V aus gegebenenfalls substituiertem  $C_{1-6}$ -Alkyl, gegebenenfalls substituiertem Benzyl, Wasserstoff,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $NH_4^+$  ausgewählt ist.

14. Oligomer nach Anspruch 13, worin  $R^N$  Wasserstoff ist und Q aus Anthrachinon und gegebenenfalls substituiertem Benzophenon ausgewählt ist.

15. Oligomer nach Anspruch 13, worin R<sup>N</sup> Wasserstoff ist und Q Phenanthrenchinon ist.

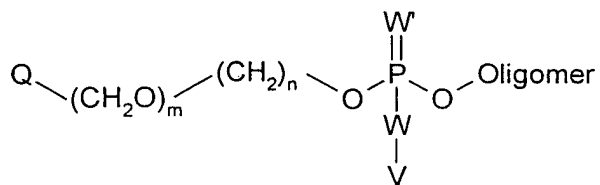
16. Oligomer nach Anspruch 13, worin R<sup>N</sup> Wasserstoff ist und Q Benzophenon ist.

17. Phosphoramiditreagens der Formel II:



worin Y und Y' jeweils unabhängig voneinander aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl ausgewählt sind oder Y und Y' gemeinsam mit dem Stickstoff, an den sie gebunden sind, einen nichtaromatischen N-heterozyklischen Ring bilden; X aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl und gegebenenfalls substituiertem Benzyl ausgewählt ist; W aus O und S ausgewählt ist; Q aus gegebenenfalls substituierten Chinonen und gegebenenfalls substituierten photoreaktiven Ketonen ausgewählt ist; n eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist; und m = 0 oder 1 ist.

18. Oligomer, welches das folgende Fragment umfasst:



worin Q aus gegebenenfalls substituierten Chinonen und gegebenenfalls substituierten photoreaktiven Ketonen ausgewählt ist; W und W' jeweils unabhängig voneinander aus O und S ausgewählt sind; und V aus gegebenenfalls substituiertem C<sub>1-6</sub>-Alkyl, gegebenenfalls substituiertem Benzyl, Wasserstoff, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ausgewählt ist; n eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist, und m = 0 oder 1 ist.

19. Oligomer nach Anspruch 18, worin Q Anthrachinon ist, m = 0 ist und n = 1 ist.

20. Oligomer nach Anspruch 18, worin Q ein gegebenenfalls substituiertes Benzophenon ist, m = 0 ist und n = 1 ist.

21. Oligomer nach Anspruch 18, worin Q Phenanthrenchinon ist, m = 0 ist und n = 1 ist.

22. Oligomer nach Anspruch 18, worin Q Benzophenon ist, m = 0 ist und n = 1 ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

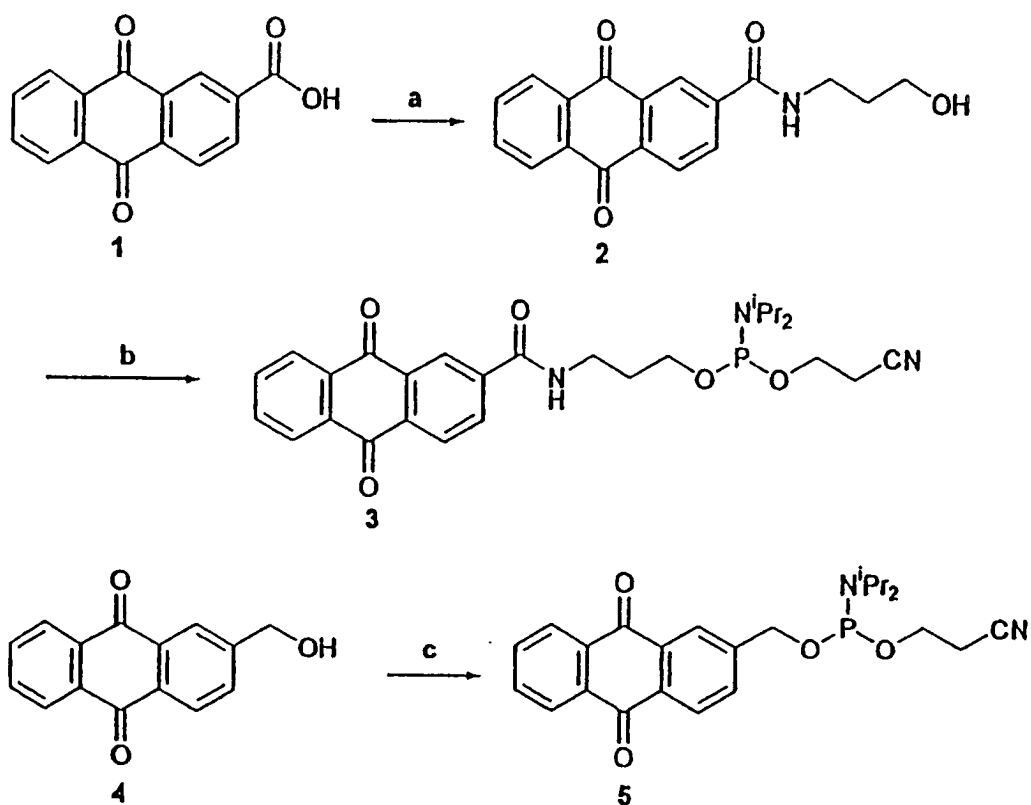


Fig. 1

a) 3-Amino-1-propanol, BOP, Et<sub>3</sub>N, DMF. b) N,N-Diisopropylphosphoramidochloridit, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DIPEA. c) N,N,N',N'-Tetraisopropylphosphoramidit, Tetrazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN.

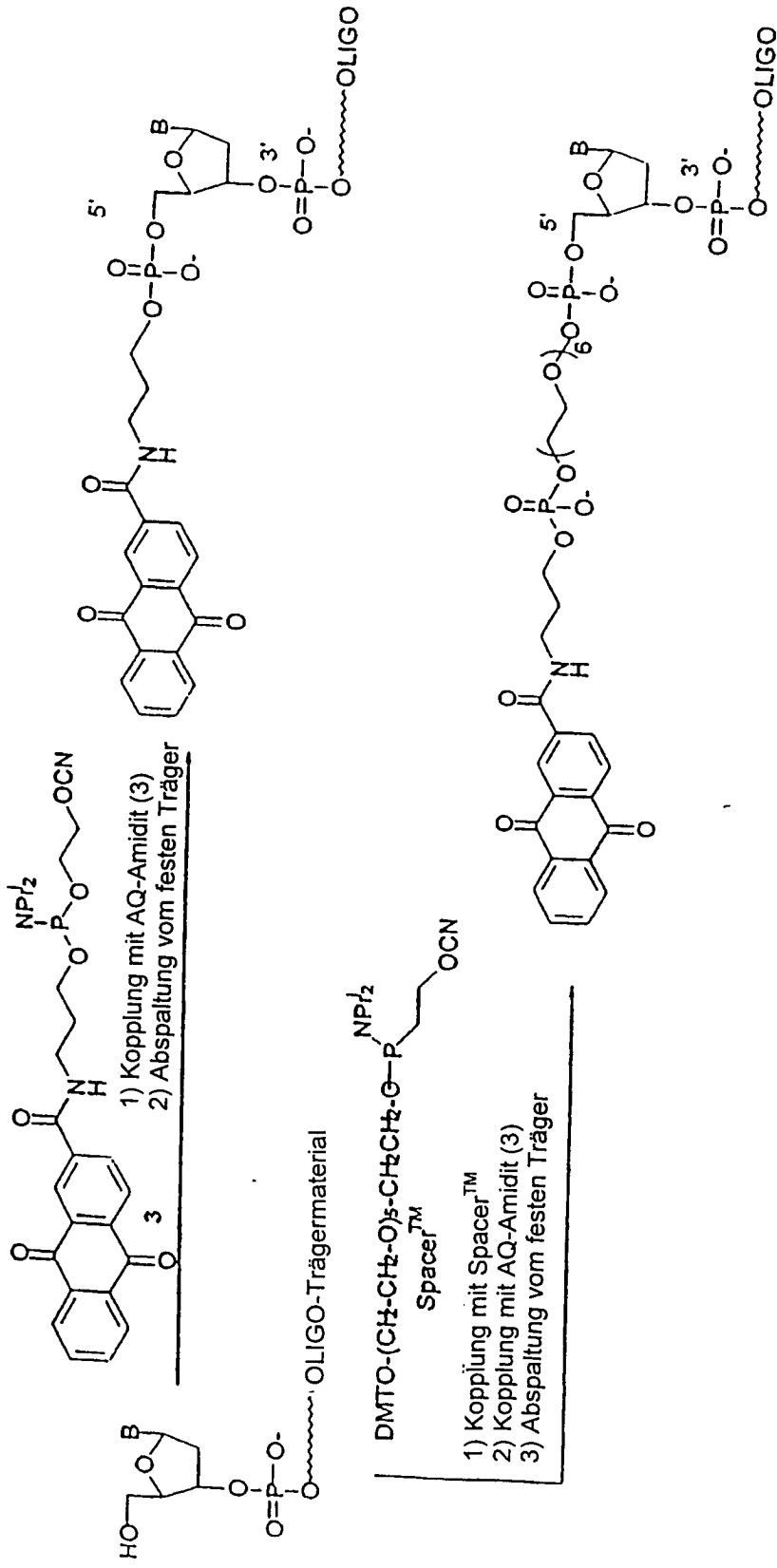
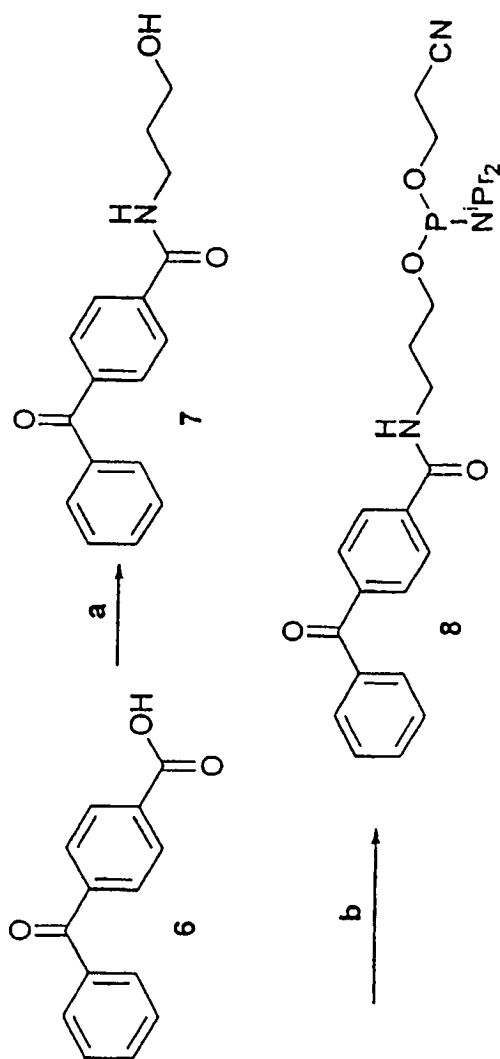


Fig. 2



a) 3-Amino-1-propanol, BOP, Et<sub>3</sub>N, DMF. b) 2-Cyanoethoxyethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphoramidite, Tetrazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CH.

**Fig. 3**

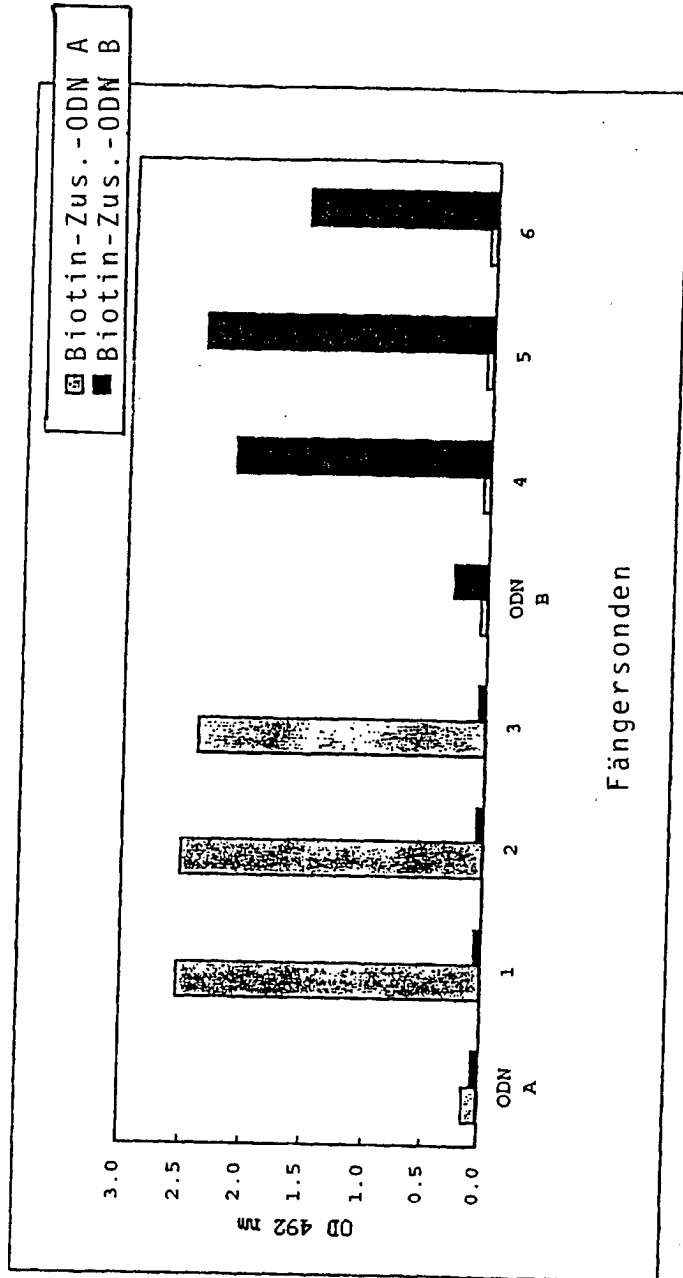
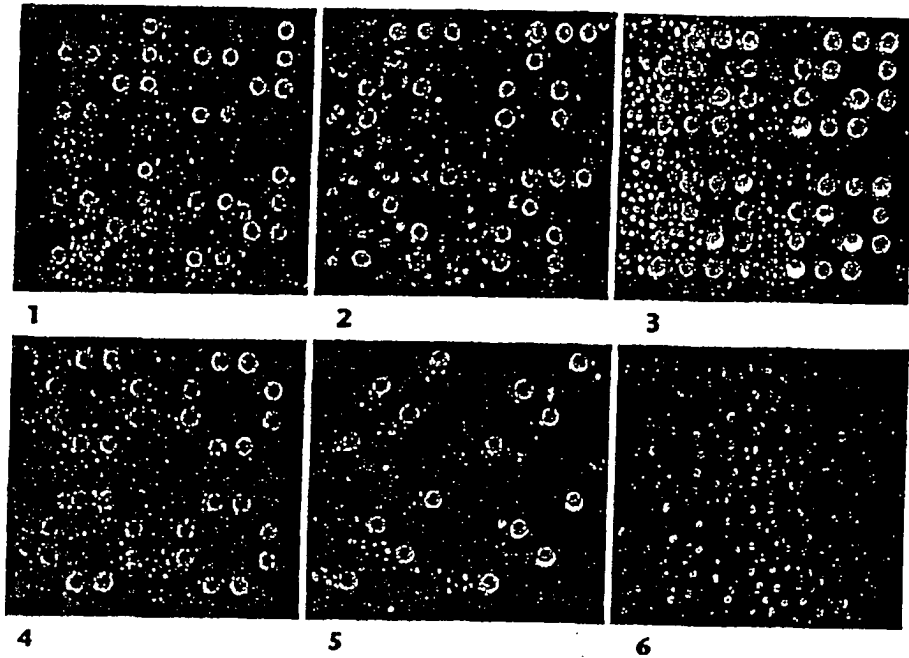
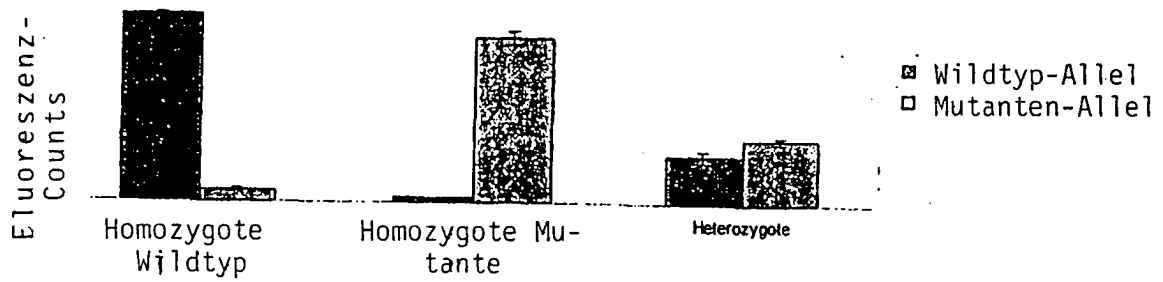


Fig. 4



Figur 5A

Fig. 5



Figur 5B

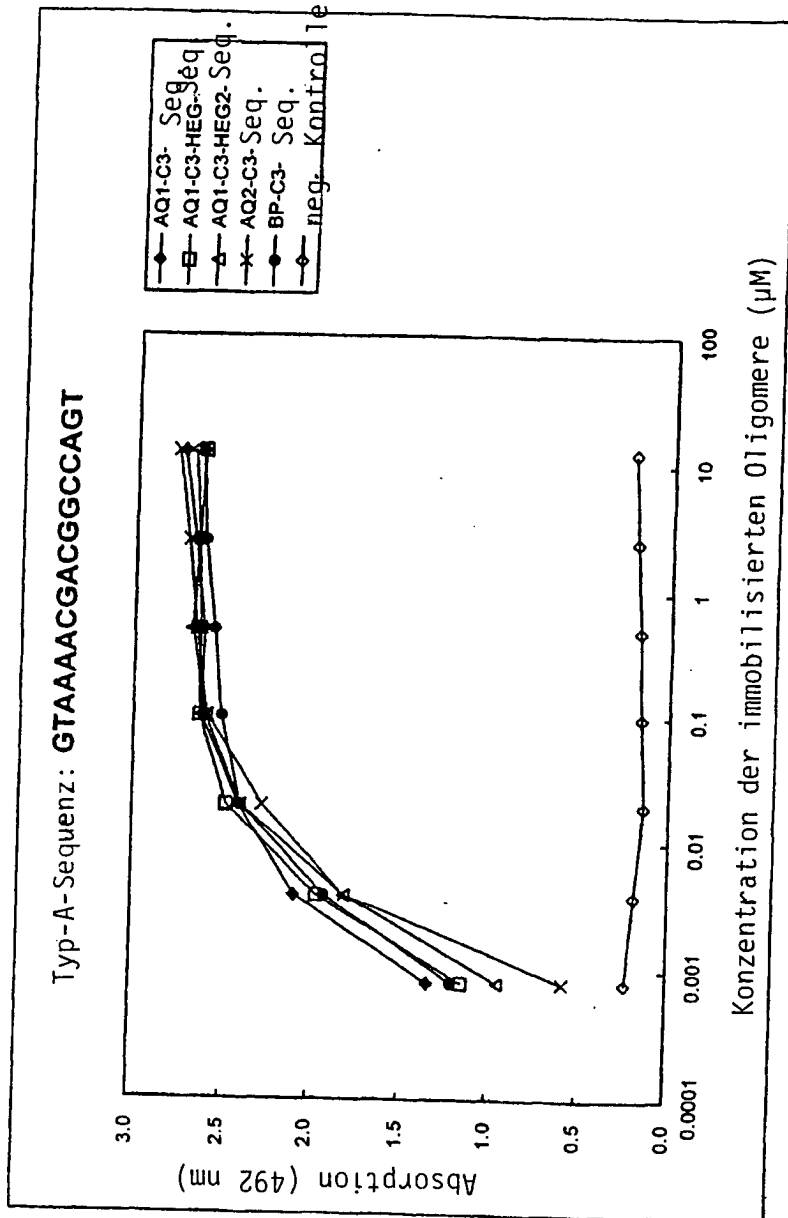


Fig. 6

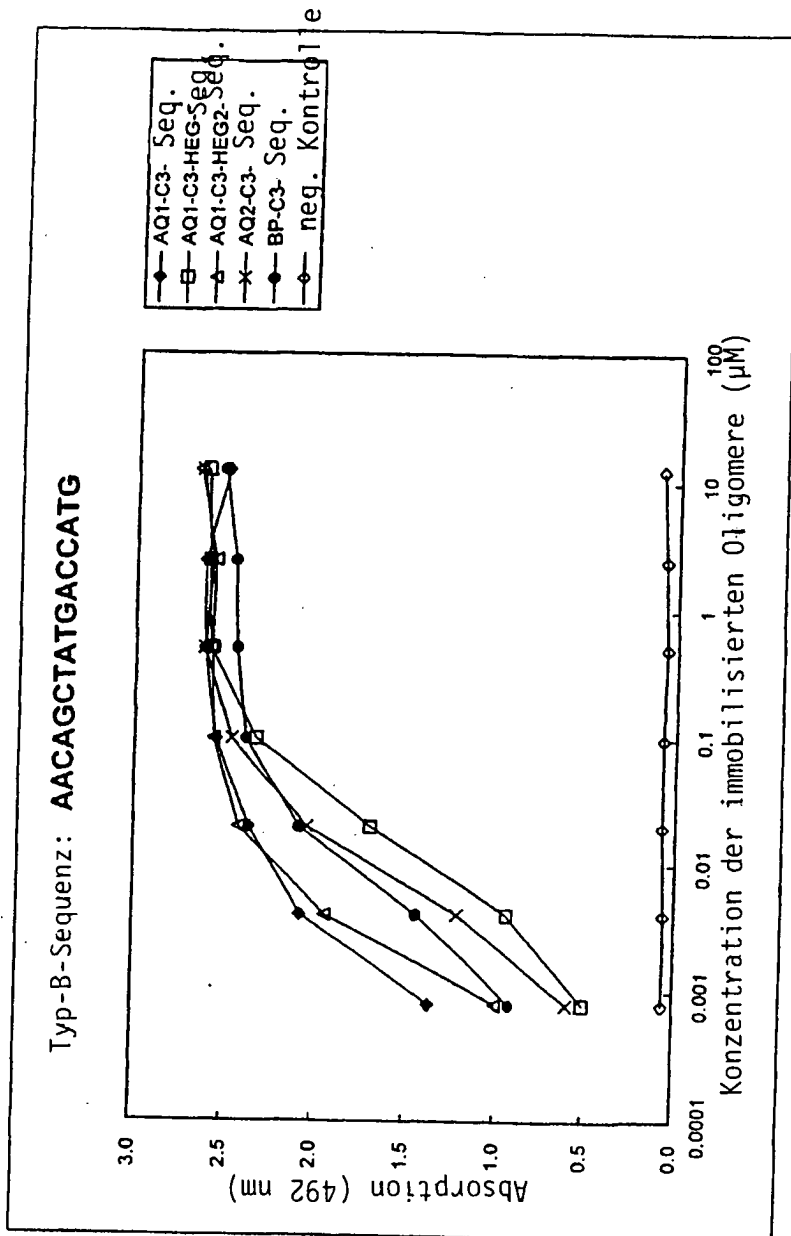


Fig. 7