



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 366**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06808856 .6**

96 Fecha de presentación : **30.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1907592**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Enlazadores monómeros y polímeros útiles para conjugar moléculas biológicas y otras sustancias.**

30 Prioridad: **01.07.2005 US 695408 P**
01.07.2005 US 695409 P
01.07.2005 US 695410 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

73 Titular/es: **DAKO DENMARK A/S**
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, DK

72 Inventor/es: **Lohse, Jesper**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 366 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Enlazadores monómeros y polímeros útiles para conjugar moléculas biológicas y otras sustancias

La presente invención se refiere a enlazadores monómeros o polímeros útiles en aplicaciones biológicas y químicas, a su síntesis, y a la síntesis y al uso de derivados de los enlazadores conjugados con una variedad de marcadores detectables y otras sustancias. Los enlazadores se pueden utilizar, por ejemplo, junto con marcadores fluorescentes, sondas de ácido nucleico o de análogas de ácido nucleico, y sistemas en fase sólida, y para mejorar la solubilidad de átomos, grupos o moléculas conjugados.

Antecedentes y sumario de la invención

Grandes moléculas y marcadores detectables tales como fluoróforos, matrices o perlas en fase sólida, anticuerpos y sondas de hibridación, se fijan con frecuencia a otras moléculas indirectamente a través de enlazadores, para evitar choques estéricos que podrían disminuir la afinidad entre esas moléculas y sus dianas, reduciendo de este modo su actividad biológica. Un "enlazador" es una molécula que sirve para unir otros átomos, moléculas o grupos funcionales entre sí, a través de interacciones covalentes o no covalentes.

Idealmente, un enlazador puede separar un marcador detectable fijado, de una molécula diana, sin afectar a las propiedades útiles del marcador detectable, tales como su intensidad de señal, su afinidad de la unión o su solubilidad. Sin embargo, en la práctica, numerosas moléculas de enlazadores utilizadas en la técnica tienen una longitud relativamente corta, haciendo difícil el poder evitar choques estéricos entre las sustancias que sirven para la yuxtaposición. Por ejemplo, enlazadores tales como ácido 6-amino-hexanoico, ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC) y éster de N-γ-maleimidobutirilo succinimida (GMBS); tienen entre 7 y 9 átomos de longitud, que correspondería a aproximadamente 1 nm, si estuvieran completamente extendidos en solución. Esa longitud es solamente una pequeña fracción del tamaño promedio de la macromolécula biológica, tal como una proteína o un oligonucleótido, y puede ser insuficiente para evitar choques estéricos potenciales entre los átomos, los grupos o las moléculas con las que se conjugan esos enlazadores. Otros ejemplos de enlazadores relativamente cortos utilizados en la técnica, incluyen enlazadores homobifuncionales, tales como dialdehído glutárico, divinilsulfona, di-isocianato de hexano, dimetilapimidato, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno, enlazadores heterobifuncionales, tales como éster de N-gamma-maleimidobutirilo-succinimida, y enlazadores de longitud cero, tales como carbodiimida de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo).

Moléculas de enlazador más largas basadas en polietilenglicol (PEG) también están disponibles en la técnica. (Véase, por ejemplo, reactivos de modificación Discrete PEG (dPEG)[®], disponibles en Quanta Biodesign, Ltd., Powell, OH, o en www.quantabiodesign.com; reactivos a base de PEG disponibles en EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA, descritos en el folleto de Novabiochem, de abril de 2004, "Product focus: PEG reagents-bifunctional amino-PEG-acid spacers", disponible en www.novabiochem.com; y véase Baumeister y otros, Biopolymers, 71: 339 (2003); Kumar y Aldrich, Org. Lett., 5: 613 (2003). (Véase también, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking" Shan S. Wong, CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU., 1993; "BioConjugate Techniques" Greg T. Hermanson Academic Press, San Diego, California, EE.UU., 1996; "Catalog of Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation, 2004" Nektar Therapeutics Inc., Huntsville, Alabama, EE.UU). Aunque los enlazadores basados en PEG tienen una longitud más larga, por ejemplo, desde 20 hasta más de 70 átomos, pueden no permanecer siempre extendidos en solución, y en lugar de ello se pueden agregar o formar estructuras terciarias indeseadas. Tal homoagregación o heteroagregación no deseada puede afectar negativamente a la actividad de los átomos, grupos o moléculas conjugados.

La presente invención se define por las reivindicaciones.

Un objeto descrito era encontrar una estructura de enlazador que pudiera adoptar una variedad de longitudes, incluyendo longitudes muy largas, que puede tener una fórmula molecular y estructural bien definida, incluso con longitudes muy largas, que tendría menos tendencia a formar estructuras terciarias indeseadas o agregados, que se podría polimerizar fácilmente y de forma eficaz si se deseara, y que podría hallarse en forma extendida en solución. Los enlazadores descritos pueden permitir que diferentes átomos, grupos o moléculas conjugados se separen con distancias cortas o, por ejemplo, de hasta algunos nanómetros, en solución. Los presentes enlazadores también se pueden diseñar de modo que posean fórmulas moleculares y estructurales bien definidas, proporcionando una mayor uniformidad a las entidades moleculares que las comprenden. En algunas de las presentes realizaciones, incluso enlazadores muy largos según la presente invención, permanecen asombrosamente en una estructura extendida y flexible en soluciones acuosas y tienen una ligera tendencia a plegarse sobre sí mismos, a agregarse entre sí, o a formar otras estructuras terciarias que interfieren con las funciones de los átomos, grupos o moléculas conjugados que son portadores. Algunos de los presentes enlazadores forman cadenas con poco volumen estérico a lo largo de su longitud, y de este modo, pueden acceder fácilmente a espacios moleculares estrechos para interaccionar con superficies en fase sólida o membranas con una densidad elevada. La presente invención también comprende métodos para sintetizar los presentes enlazadores y fijarlos covalentemente a otras moléculas y grupos funcionales con un rendimiento elevado.

Los enlazadores de la presente invención pueden estar fijados de forma covalente o no covalente a una variedad de

5 sustancias que incluyen marcadores de color, componentes de superficies sólidas, ácidos nucleicos y análogos de ácidos nucleicos, proteínas y sustratos de proteínas. La capacidad de algunos de los presentes enlazadores para permanecer extendidos y flexibles en solución, puede minimizar la interferencia estérica entre el enlazador y el átomo, el grupo o la molécula conjugada, de modo que la señal del conjugado o su disponibilidad para ser reconocida por las moléculas diana, está mínimamente perturbada por el enlazador. Así, la presente invención comprende un método para mejorar la intensidad de la señal, la actividad o la afinidad de la unión de una molécula, tal como un marcador detectable, que incluye una sonda, que comprende conjugar la molécula con uno o varios de los presentes enlazadores.

10 Por ejemplo, cuando las sondas de proteína-ácido nucleico (PNA) se conjugan con los enlazadores, los PNAs son menos susceptibles a la agregación y permanecen más disponibles para unirse a sus secuencias diana destinadas. Además, ya que la estructura de los presentes enlazadores en solución puede ser larga y flexible, los presentes enlazadores se pueden utilizar para reticular moléculas grandes entre sí, de un modo que permita a las moléculas adoptar sus orientaciones preferidas, y de este modo perturbar mínimamente la estructura y la afinidad del complejo molecular.

15 Como otro ejemplo, el volumen estérico o la estructura terciaria próxima a un marcador fluorescente puede causar una extinción de la fluorescencia debido a la absorbancia de la señal por los enlaces moleculares circundantes. Las interacciones entre dos o varios fluoróforos próximos, también pueden causar la extinción de sus señales. Esto puede ser un problema al diseñar marcadores detectables que comprenden múltiples fluoróforos conjugados. Por ejemplo, en la detección de proteínas, típicamente solamente se pueden añadir aproximadamente 3-4 fluoróforos, antes de alcanzar una meseta en la intensidad de las señales. La adición de otros fluoróforos puede incluso disminuir la señal global. Dicha extinción se puede reducir usando realizaciones de la presente invención. Por consiguiente, esta invención incluye un método para mejorar la señal de uno o de varios fluoróforos, que comprende conjugar uno o varios fluoróforos por lo menos con uno de los presentes enlazadores. Debido a que la extinción debida a la fijación del enlazador de la presente invención, puede ser mínima, y a que los fluoróforos individuales se pueden conjugar de modo que no interfieran significativamente entre sí, los presentes enlazadores también permiten el diseño de derivados de enlazadores con fluoróforos múltiples que tienen colores de emisión predecibles que son una combinación de las emisiones procedentes de fluoróforos individuales con diferentes espectros de emisión.

20 Otra característica sorprendente de algunos de los presentes enlazadores es su elevada solubilidad en agua, a pesar del número relativamente limitado de grupos polares o cargados. Los presentes enlazadores pueden mejorar la solubilidad de una variedad de diferentes átomos, grupos o moléculas conjugados. De este modo, esta invención también comprende un método para mejorar la solubilidad de un átomo, un grupo o una molécula conjugada, que comprende conjugar directa o indirectamente conjugando uno o varios átomos, grupos o moléculas con uno o varios de los presentes enlazadores.

30 Objetos adicionales y ventajas de la invención se describen en la descripción que sigue a continuación.

35 **Breve descripción de los dibujos**

Los dibujos acompañantes, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran algunas de las realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar algunos de los principios de la invención.

40 La Figura 1 representa una síntesis de una unidad ejemplar de enlazador L15, obtenido a partir de ácido 3,9,12-trioxa-6,15-diaza-5-oxo-pentadecanoico, y la síntesis de un enlazador ejemplar L30 de acuerdo con la presente invención.

45 La Figura 2 representa derivados ejemplares de enlazadores que se pueden emplear para detectar proteínas o dianas de ácido nucleico en un sistema. El panel A muestra un anticuerpo (representado por una Y al revés) conjugado con tres derivados de enlazadores, comprendiendo cada uno múltiples fluoróforos (círculos sombreados). Los fluoróforos múltiples se pueden utilizar para detectar la unión entre el anticuerpo y un antígeno (triángulo sombreado). El panel B muestra un derivado ejemplar de enlazador que comprende PNA (línea gruesa) y fluoróforos múltiples (círculos sombreados), que reconoce una secuencia de ácido nucleico diana.

50 La Figura 3 representa un ensayo multicapa ejemplar. La unión entre un anticuerpo (Y al revés) y un antígeno (triángulo sombreado) se puede detectar conjugando en primer lugar el anticuerpo directa o indirectamente con un primer derivado de enlazador que comprende una secuencia de ácido nucleico o de análogo de ácido nucleico, después conjugando el primer derivado de enlazador con un segundo derivado de enlazador que se conjuga con dextrano y con una secuencia complementaria del ácido nucleico o del análogo del ácido nucleico. La hibridación entre los dos ácidos nucleicos o las dos secuencias de ácido nucleico se representa por las barras paralelas en el centro del dibujo. Las perlas de dextrano se muestran como círculos oscuros en la parte superior del dibujo.

55 La Figura 4 representa la activación de Lys(betaala)-NH₂ y Lys(NTA)-NH₂.

La Figura 5 representa ensayos ejemplares de captura usando los presentes enlazadores conjugados con sondas.

La Figura 6 representa bases nucleicas ejemplares que no son naturales.

La Figura 7 representa bases nucleicas muestra, productos intermedios y derivados de enlazadores.

La Figura 8 representa otro método ejemplar para preparar enlazadores según la invención.

La Figura 9 representa bases nucleicas ejemplares adicionales que no son naturales y pares de bases.

5 Descripción detallada de la invención

A. Enlazadores

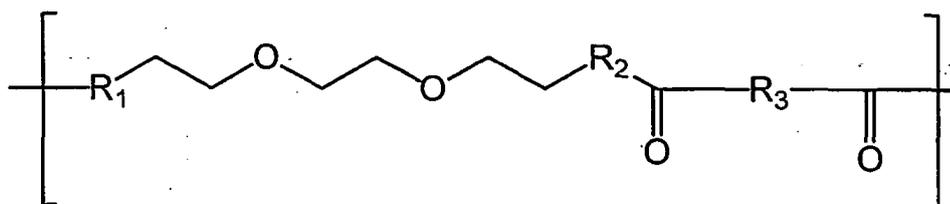
El presente "enlazador" es una molécula que puede ayudar a unir otros átomos, moléculas o grupos funcionales entre sí, a través de enlaces químicos. Por ejemplo, uno de los presentes enlazadores se puede conjugar con una proteína así como con otro grupo, tal como un fluoróforo, uniendo esas sustancias entre sí a través de los enlaces químicos intercalados en el enlazador.

En algunas realizaciones de la invención, el "enlazador" comprende una entidad molecular obtenida a partir de la reacción de por lo menos una amina, tal como una diamina, y un anhídrido de ácido dicarboxílico. En algunas realizaciones, la amina no comprende más de dos unidades de etilenoxi (CH₂-CH₂-O). Por ejemplo, el presente "enlazador" puede comprender un copolímero alternante de tal amina y unidades obtenidas a partir del anhídrido de ácido dicarboxílico. En algunas realizaciones, la amina comprende una fórmula estructural con no más de dos unidades de metileno en una hilera. Por ejemplo, la amina puede comprender una fórmula estructural, tal como por ejemplo: NH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH₂ o NH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH₂, u otras fórmulas estructurales en las que se coloca un heteroátomo después de cada dos unidades de metileno.

El "enlazador" comprende por lo menos dos unidades monómeras denominadas en esta memoria "L15". En otras realizaciones, el presente "enlazador" comprende dos o más unidades L15 dispuestas de forma lineal o ramificada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el enlazador es una cadena de polímero lineal que comprende dos unidades L15, denominadas "L30" en esta memoria. En todavía otras realizaciones, el enlazador comprende un polímero lineal más largo que comprende varias unidades L15, y se puede denominar, por ejemplo, "L45" o "L60", "L90" o "L120" o "L300", y así sucesivamente en esta memoria, dependiendo del número de unidades L15 que comprenda la cadena de polímero. En algunas realizaciones que comprenden más de una unidad L15, las unidades L15 se pueden conectar covalentemente a través de uno o varios enlaces químicos intercalados:

L15 comprende la unidad mostrada más abajo en la Fórmula I.

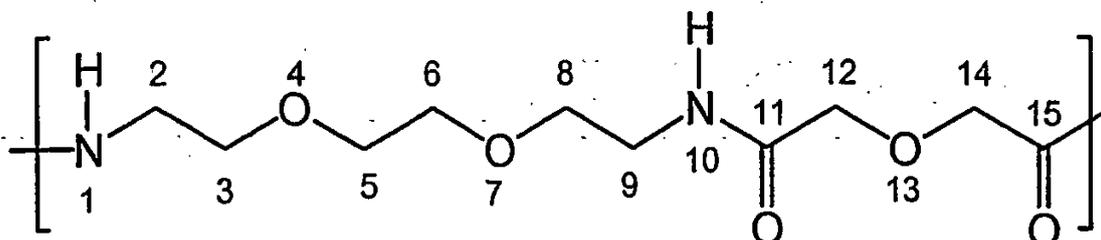
Fórmula I



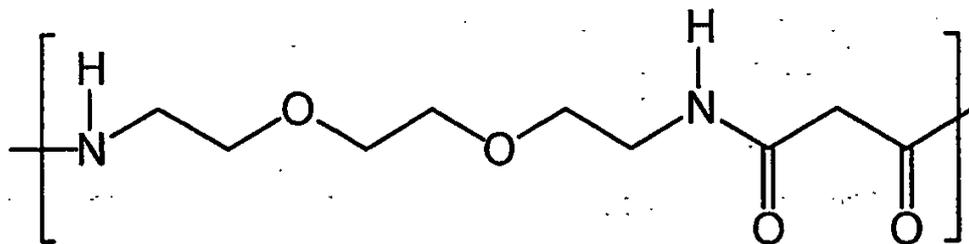
En la Fórmula I, R₁ y R₂ pueden comprender NH u O, mientras que R₃ puede comprender metilo, etilo, propilo, CH₂-O-CH₂, y (CH₂-O-CH₂)₂. Además, cuando la Fórmula I se conjuga con otros grupos, átomos o moléculas y, por ejemplo, R₁ y/o R₂ es un oxígeno, están presentes no más de tres grupos etilenoxi (CH₂-CH₂-O) que se repiten consecutivamente.

Por tanto, algunas de las unidades L15 de acuerdo con esta invención, pueden tener las siguientes estructuras moleculares:

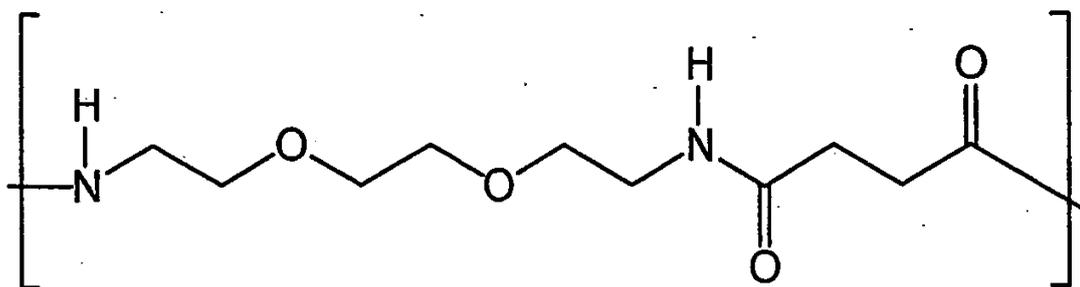
Fórmula II



Fórmula III

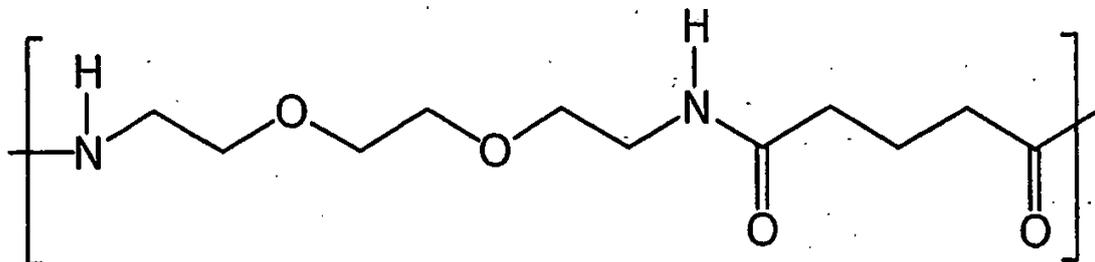


Fórmula IV



5

Fórmula V



Otras posibles estructuras de L15 que no se muestran más arriba, se pueden prever basándose en la elección de los grupos R_1 , R_2 y R_3 .

10 En algunas realizaciones, los presentes enlazadores comprenden un polímero lineal de unidades L15 en donde cada unidad L15 tiene la misma fórmula molecular, por ejemplo, que la de la fórmula II estructural. En otras realizaciones, una o varias unidades L15 pueden diferir de las otras en la cadena del enlazador. Por ejemplo, un enlazador puede comprender distintas unidades de fórmula II, y una o varias unidades que comprenden una o varias estructuras diferentes. Una unidad L15 tal, puede ser útil para fijar un átomo, un grupo o una molécula concreta en una posición definida en la cadena, por ejemplo. Ya que cada unidad se puede añadir de forma iterativa a la cadena del enlazador en crecimiento, tal como por síntesis en fase sólida, se puede construir sencillamente de manera controlada una variedad de polímeros L15 mezclados.

15 En algunas realizaciones, uno o varios de los grupos de heteroátomos en el enlazador comprenden un sustituyente adicional. Ese sustituyente puede comprender una variedad de átomos o de grupos funcionales, tales como un simple átomo de hidrógeno, un grupo protector o un grupo de conjugación que sirve para fijar el enlazador con un átomo, un grupo o una molécula. En algunas realizaciones, el sustituyente es un marcador detectable u otro enlazador. La fijación a través de los grupos de heteroátomos, con un enlazador adicional, forma un polímero ramificado del enlazador.

20 B. Diseño y síntesis de enlazadores

25 Se describen nuevos métodos para sintetizar un enlazador L15 y polímeros lineales del enlazador L15, con alto rendimiento. Según este método de síntesis, enlazadores largos de, por ejemplo, L120, L200, L300 o aún más largos, tales como L600 o L990, se pueden construir mediante adiciones consecutivas de unidades de L15 o de porciones de unidades de L15, por ejemplo, sobre una fase sólida. Alternativamente, los enlazadores largos se pueden

formar uniendo entre sí dos enlazadores de longitud intermedia. Los enlazadores L30 o más largos, sintetizados según este método, pueden comprender unidades L15 individuales con la misma estructura molecular o diferente.

Las unidades L15 se pueden preparar poniendo en contacto una amina protegida con un anhídrido de ácido dicarboxílico y anhídrido acético, dando por resultado un grupo terminal imida cíclica, que a continuación se puede abrir, una vez que el enlazador alcanza su longitud deseada, por ejemplo, mediante hidrólisis acuosa básica en dioxano usando una amina terciaria, tal como diisopropiletilamina. Una molécula de ácido 3,9,12-trioxa-6,15-diaza-5-oxopentadecanoico se ha sintetizado a partir de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) con un rendimiento de aproximadamente 87-91% (véase, Pieters y otros, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 161-6 (1999)). En cambio, los métodos controlados para sintetizar unidades L15 de acuerdo con la presente invención, pueden proporcionar rendimientos del 96%, por ejemplo.

La síntesis se puede realizar en solución. La amina se puede proteger con (Boc)₂O, monometoxitritilo (MMT), benciloxycarbonilo (z) o fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), u otro grupo protector adecuado. En algunas realizaciones, la amina es 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (estructura 1 de la Fig. 1). En algunas realizaciones, la amina está presente en exceso sobre el anhídrido de ácido dicarboxílico y el anhídrido acético. La adición del anhídrido de ácido dicarboxílico se puede realizar en un amplio intervalo de temperaturas. Los anhídridos de ácido dicarboxílico adecuados incluyen los procedentes del ácido diglicólico, ácido 1,5-dipentanoico, ácido 1,4-dibutírico, ácido 1,3-dipropanoico y ácido 3,6-dioxaoctano dióxido, dependiendo del grupo R₃ deseado. La posterior adición de anhídrido acético puede forzar al producto en la forma de imida cíclica, con alto rendimiento. (Estructura 2 de la Fig. 1). La imida cíclica se puede abrir cuantitativamente, si se desea, por ejemplo, en exceso de dioxano y di-isopropiletilamina (DIPEA). Para iniciar la preparación de un enlazador L30, la imida cíclica puede reaccionar con otra amina. (Estructura 3 de la Fig. 1). A continuación, el anhídrido de ácido dicarboxílico y el anhídrido acético se pueden añadir y la imida cíclica resultante se puede abrir. (Estructura 4 de la Fig. 1). En algunas realizaciones, la imida cíclica terminal en el enlazador, se puede dejar sin abrir para servir como un grupo reactivo para la formación de otros enlaces, tales como con grupos reactivos u otras uniones.

Por ejemplo, un monómero L15 obtenido a partir del ácido 3,9,12-trioxa-6,15-diaza-5-oxopentadecanoico se puede preparar protegiendo uno de los dos grupos amino de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) con (Boc)₂O. (Véase la Fig. 1, esquema de reacción 1, parte A). Después de disolver la 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) mono-protegida (estructura 1 de la Fig. 1) en piridina, se puede añadir ácido diglicólico y a continuación anhídrido acético, a temperatura elevada, tal como aproximadamente 100°C, para formar una estructura de L15 cíclica (estructura 2 de la Fig. 1). Un exceso de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) reacciona con la imida cíclica terminal para formar la estructura 3, mostrada en la Figura 1. Para formar un enlazador L30, se puede añadir un ácido diglicólico adicional, y abrir el extremo terminal cíclico, mediante la adición de 1,4-dioxano y diisopropiletilamina (DIPEA) en solución acuosa.

En algunas realizaciones de la invención en las cuales uno o ambos R₁ y R₂ son oxígeno más que grupos aminos, los amino-alcoholes o dialcoholes se pueden sustituir por la amina en las reacciones descritas anteriormente. Las condiciones también se pueden ajustar para explicar las diferentes reactividades de los alcoholes y las aminas. Por ejemplo, las reacciones se pueden realizar a temperaturas más elevadas cuando se acoplan alcoholes más que aminas.

Usando los presentes métodos, se pueden preparar grandes lotes, tales como 100 g, de enlazadores L30 protegidos en forma pura, mediante una elaboración extractiva, usando un equipo de laboratorio con escala de un litro. Los ejemplos siguientes proporcionan una descripción más detallada de la síntesis de moléculas ejemplares que comprenden enlazadores L15 y L30, de acuerdo con esta invención.

Los mismos principios sintéticos se aplican a la preparación de cadenas más largas de polímero del enlazador, utilizadas en algunas realizaciones de esta invención. Por ejemplo, enlazadores tales como L45, L60, L90, L120, L150, L200, L300, o incluso más largos, por ejemplo, que comprenden tanto como 40 unidades de L15, se pueden preparar repitiendo las etapas descritas anteriormente de forma sucesiva: primero hacer reaccionar la imida cíclica de la unidad L15 precedente en la cadena en crecimiento, con amina en exceso, y añadir anhídrido de ácido y a continuación anhídrido acético para agregar otra unidad L15. Una vez que se consigue la longitud deseada, se puede abrir el anillo terminal. Si se desea, esas etapas sucesivas se pueden realizar también sobre un soporte sólido, que puede ser conveniente para preparar enlazadores más largos que L30 o L60, por ejemplo. De hecho, compuestos con pesos moleculares de 8 a 15 kDa se pueden preparar con los métodos de la presente invención, porque las etapas sucesivas de la síntesis no están inhibidas por las cadenas en crecimiento de poli-L15. Esto es absolutamente inusual en la química de péptidos.

Alternativamente, para reducir el número de etapas necesarias para preparar enlazadores más largos, enlazadores de longitud intermedia, tal como L30, por ejemplo, se pueden combinar directamente entre sí o conjugar indirectamente a través de un grupo químico intercalado, tal como un grupo reactivo o un marcador detectable. Por ejemplo, una sola etapa de purificación cromatográfica permite la preparación de Boc-L30 con pureza elevada, que se puede oligomerizar fácilmente para preparar enlazadores más largos, tales como L300, con pureza elevada. Incluso enlazadores tales como L600 y más largos tales como L1000, se pueden preparar por tales métodos, siendo las únicas limitaciones, el rendimiento de cada etapa y la cantidad de material disponible. Además, dos enlazadores largos se pueden unir a lo largo de sus cadenas para formar enlazadores ramificados muy largos que comprenden, por ejem-

plo, hasta 10, 20, 40 o incluso 60 unidades de L15 en total.

Debido a que es posible controlar las condiciones de la síntesis, la presente invención comprende adicionalmente enlazadores y derivados de enlazadores que comprenden una fórmula molecular y estructural homogénea. Una fórmula molecular homogénea significa en esta memoria que el peso molecular del enlazador se puede obtener mediante espectrometría de masas, con menos de 1% de desviación del peso molecular esperado, basándose en el protocolo de síntesis utilizado, en algunas realizaciones menos del 0,1% o incluso menor del 0,01%. Esto es posible incluso con enlazadores muy largos, tales como L300, L600 o L990. Una fórmula estructural homogénea significa en esta memoria que la composición estructural de cada unidad L15 y su posición dentro de la cadena del enlazador está controlada por el protocolo de síntesis utilizado para preparar el enlazador. En cambio, numerosos enlazadores basados en PEG comprenden una mezcla de longitudes y fórmulas estructurales. Así, sustancias que comprenden esos enlazadores mezclados, son intrínsecamente heterogéneas, sin importar la pureza o la homogeneidad de las moléculas, los grupos o los átomos con los que se conjugaron los enlazadores.

Muchos de los enlazadores utilizados actualmente, tales como ciertos enlazadores de ácido nucleico o enlazadores basados en análogos de ácido nucleico, llevan una carga en cada monómero de la cadena, por ejemplo, de un grupo fosfato o fosforotioato de la cadena principal. Tales cargas pueden provocar que esos enlazadores se agreguen con sustancias de carga opuesta, incluyendo las paredes de una placa o un recipiente, o atraer iones metálicos indeseados, o precipitar en presencia de sales. En cambio, los presentes enlazadores se pueden diseñar de modo que no lleven carga, o solamente una o pocas cargas en posiciones definidas a lo largo de la cadena. Ya que se puede controlar la síntesis de los presentes enlazadores, se pueden diseñar para situar las cargas solamente en lugares específicos o para no llevar cargas en absoluto. Esto permite una modulación precisa de la posición y de la cantidad de carga en un enlazador dado y en un derivado de enlazador y es un método adicional para evitar una agregación indeseada o interacciones terciarias.

Sin embargo, en algunas realizaciones, los presentes enlazadores también se pueden preparar usando una reacción de polimerización incontrolada. Por ejemplo, una síntesis en un solo recipiente, se puede realizar basándose en las etapas de reacción anteriores, tales como mezclando una diamina en solución con un exceso de anhídrido dicarboxílico. La síntesis también se puede finalizar, por ejemplo, añadiendo un reactivo que formará un grupo terminal, tal como un aminoácido o un fluoróforo. El control de la cantidad de dicho reactivo de terminación puede ayudar a establecer la distribución de la longitud real de la mezcla. Tales métodos pueden ser útiles, por ejemplo, cuando la longitud absoluta es poco importante, o para generar inmediatamente enlazadores con una variedad de diferentes longitudes. Los productos se pueden fraccionar según la longitud, por ejemplo, mediante cromatografía.

C. Derivados de enlazadores

Los enlazadores de la presente invención se pueden unir covalentemente a otro átomo, grupo o molécula para formar un "derivado de enlazador". Los derivados de enlazadores pueden comprender solamente un enlazador conjugado con otro átomo, grupo o molécula, o pueden comprender enlazadores múltiples, conjugados con más de uno del mismo átomo, grupo o molécula, o conjugados con diferentes átomos, grupos o moléculas. La unión del átomo, grupo o molécula puede ocurrir en uno o en varios extremos libres del enlazador, o a lo largo de su longitud, tal como en uno de sus heteroátomos. Ejemplos de átomos, grupos o moléculas que se pueden conjugar con los enlazadores para formar derivados de enlazadores, incluyen átomos de hidrógeno, grupos terminales tales como grupos protectores, grupos metilo o grupos acetilo. Otros ejemplos incluyen isótopos pesados o radiactivos, grupos salientes; fluoróforos; cromóforos; sustratos enzimáticos; antígenos; anticuerpos; otras proteínas y péptidos; aminoácidos y análogos de aminoácidos; ácidos nucleicos y análogos de ácidos nucleicos; componentes de una membrana o de un soporte sólido; y otras moléculas pequeñas o grandes. Los enlazadores de acuerdo con esta invención se pueden conjugar, por tanto, con distintos átomos, grupos o moléculas del mismo tipo, tales como fluoróforos múltiples, o se pueden conjugar con diferentes tipos de grupos o moléculas, tales como PNA y un fluoróforo o una proteína y una superficie sólida, o un grupo acetilo y un anticuerpo. La unión covalente puede ser directa, sin la intervención de enlaces o átomos, o indirecta, con uno o varios enlaces o átomos intercalados. Tal y como se utiliza en esta memoria, cualquier átomo, grupo o molécula que está unido covalentemente a un enlazador, tanto directa como indirectamente, está "conjugado" con el enlazador. Por lo tanto, los "derivados de enlazadores" incluyen entidades moleculares denominadas "conjugaciones." Los átomos, los grupos o las moléculas también pueden estar fijadas de forma no covalente a los presentes enlazadores o derivados de enlazadores, por ejemplo, mediante la adsorción a una superficie, la intercalación, la hibridación de ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos complementarios, u otras interacciones.

Los átomos, los grupos o las moléculas se pueden conjugar en un extremo del enlazador, o los mismos o diferentes átomos, grupos o moléculas se pueden colocar en ambos extremos. Alternativamente, los átomos, los grupos o las moléculas conjugados se pueden colocar entre dos enlazadores, por ejemplo, en una separación definida que evita interacciones indeseadas entre ellos. Por lo tanto, derivados de enlazadores tales como X-L, L-X o X-L-X o L-X-L, se pueden preparar, en donde X representa un átomo, grupo o molécula conjugado directa o indirectamente y L representa un enlazador. Tales derivados de enlazadores también incluyen diferentes átomos, grupos o moléculas, por ejemplo, X1-L-X2 o X1-L1-X2-L2 o L1-X1-L2-X2. Un átomo, un grupo o una molécula también se pueden conjugar, por ejemplo, a través de uno de los heteroátomos en el enlazador. Además, distintos enlazadores se pueden conjugar con un derivado de enlazador para formar estructuras ramificadas. Enlazadores conjugados con átomos, grupos

o moléculas múltiples, tales como marcadores de color o isótopos radiactivos, son ventajosos, por ejemplo, para amplificar señales en ensayos de detección, como una alternativa a los métodos de amplificación basados en anticuerpos y la radiactividad.

1. Conjugación indirecta

5 Un enlazador se puede conjugar con otro grupo, átomo o molécula indirectamente a través de un grupo que es más reactivo con el átomo, grupo o molécula anticipada, que el enlazador mismo. Tal y como se utiliza en esta memoria, tales grupos se denominan "grupos de conjugación". En algunas realizaciones, los enlazadores se conjugan con grupos de conjugación basados en carbodiimida. Los aminoácidos pueden también servir como grupos de conjugación. Por ejemplo, aminoácidos con cadenas laterales de amino, se pueden utilizar para conjugar, por ejemplo, 10 fluoróforos. El sulfhidrido de cisteína es también útil como grupo de conjugación para formar reticulaciones de diazurre con otras sustancias. En algunas realizaciones, los enlazadores se conjugan con Lys(Cys), que es una lisina-carboxamida C-terminal, con un aminoácido cisteína unido al N de la cadena lateral de lisina, y que puede servir como grupo de conjugación. La amina yuxtapuesta y los grupos sulfhidrido de este resto de cisteína proporcionan inesperadamente una reactividad significativamente más elevada hacia el dextrano que, por ejemplo, los grupos de 15 conjugación de carbodiimida.

En algunas realizaciones, el enlazador se conjuga con grupos amino, tales como un aminoácido lisina, en donde el N se derivatiza con ácido beta-alanina-N,N-diacético. El derivado de lisina se puede convertir cuantitativamente en su forma cíclica de anhídrido de N-2,6-dioxo-morfolino. Esa forma era muy reactiva con amino bajo condiciones acuosas ligeramente básicas, cuando se comparaba con grupos amino reactivos, tales como ésteres de NHS. Por lo 20 tanto, también puede servir como grupo de conjugación. Una persona con conocimientos ordinarios en la técnica puede prever fácilmente otros grupos de conjugación que se pueden conjugar con los presentes enlazadores, para ayudar en la conjugación de una variedad de sustancias de los presentes enlazadores.

2. Marcadores detectables

En algunas realizaciones, uno o varios marcadores detectables se conjugan con un enlazador. De acuerdo con esta 25 invención, un "marcador detectable" es cualquier molécula o grupo funcional que permita la detección de una característica biológica o química o un cambio en un sistema, tal como la presencia de una sustancia diana en la muestra.

Ejemplos de marcadores detectables que se pueden utilizar en la invención, incluyen fluoróforos, cromóforos, marcadores electroquimioluminiscentes, marcadores bioluminescentes, polímeros, partículas de polímero, perlas u otras superficies sólidas, oro u otras partículas metálicas o átomos pesados, marcadores de la rotación, radioisótopos, 30 sustratos enzimáticos, haptenos, antígenos, puntos cuánticos, aminohexilo, pireno, ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos, o proteínas, tales como receptores, ligandos o sustratos peptídicos, enzimas y anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpo).

Ejemplos de marcadores de partículas de polímero que se pueden utilizar en la invención, incluyen micropartículas, perlas o partículas de látex de poliestireno, PMMA o sílice, que se pueden embeber con colorantes fluorescentes o 35 micelas o cápsulas de polímero que contienen colorantes, enzimas o sustratos. Ejemplos de partículas metálicas que se pueden utilizar en la invención incluyen partículas de oro y partículas revestidas con oro, que se pueden convertir mediante tinción con plata. Ejemplos de haptenos que se pueden conjugar en algunas realizaciones, son fluoróforos, myc, nitrotirosina, biotina, avidina, estreptavidina, 2,4-dinitrofenilo, digoxigenina, bromodesoxi uridina, sulfonato, acetilaminofluoreno, trinitrofenol mercurio y estradiol.

40 Ejemplos de enzimas que se pueden utilizar en la invención comprenden peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (GAL), deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato, beta-N-acetilglucosaminidasa, β -glucuronidasa, invertasa, oxidasa de xantina, luciferasa de luciérnaga y oxidasa de glucosa (GO). Ejemplos de sustratos de uso general para la peroxidasa de rábano picante (HRP) incluyen 3,3'-diaminobencidina (DAB), diaminobencidina potenciada con níquel, 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), dihidrocloruro de bencidina (BDHC), reactivo de 45 Hanker-Yates (HYR), azul de indofenol (IB), tetrametilbencidina (TMB), 4-cloro-1-naftol (CN), alfa-naftol pironina (α -NP), o-dianisidina (OD), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), tetrazolio de nitroazul (NBT), cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT), tetrazolio de tetranitro azul (TNBT), 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-galactósido/ferro-ferricianuro (BCIG/FF). Ejemplos de sustratos de uso general para la fosfatasa alcalina, incluyen naftol-AS-B1-fosfato/rojo rápido TR (NABP/FR), naftol-AS-MX-fosfato/rojo rápido TR (NAMP/FR), naftol-AS-B1-fosfato/rojo rápido TR (NABP/FR), naftol-AS-MX-fosfato/rojo rápido TR (NAMP/FR), naftol-AS-B1-fosfato/fucsina 50 nueva (NABP/NF), fosfato de bromocloroindolilo/tetrazolio de nitroazul (BCIP/NBT), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-delta-galactopiranosido (BCIG).

Ejemplos de marcadores luminiscentes que se pueden utilizar en la invención, incluyen luminol, isoluminol, ésteres de acridinio, 1,2-dioxetanos y piridopiridazinas. Ejemplos de marcadores electroquimioluminiscentes incluyen derivados de rutenio. Ejemplos de marcadores radioactivos que se pueden utilizar en la invención, incluyen isótopos 55 radiactivos de yoduro, cobalto, selenio, hidrógeno, carbono, azufre y fosforoso.

Algunos "marcadores detectables" de acuerdo con esta invención, comprenden "marcadores de color", en donde se puede someter a ensayo el cambio o evento biológico en el sistema por la presencia de un color, o un cambio de

color. Ejemplos de “marcadores de color” son los cromóforos, los fluoróforos, los compuestos quimioluminiscentes, los marcadores electroquimioluminiscentes, los marcadores bioluminescentes y las enzimas que catalizan un cambio de color en un sustrato.

5 Los “fluoróforos” tal y como se describen en esta memoria, son moléculas que emiten una radiación electromagnética detectable después de la excitación con radiación electromagnética, en una o en varias longitudes de onda. En la técnica se conoce una gran variedad de fluoróforos y han sido desarrollados por los químicos para el uso como marcadores moleculares detectables y se pueden conjugar con los enlazadores de la presente invención. Ejemplos incluyen la fluoresceína o sus derivados, tales como 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5-(y 6)-carboxifluoresceína, 5- o 6-carboxifluoresceína, ácido 6-(fluoresceína)-5(y 6)-carboxamido hexanoico, isotiocianato de fluoresceína, rodamina o sus derivados, tales como tetrametilrodamina y 5-(y 6)-isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC). Otros ejemplos de fluoróforos que se podrían conjugar con los presentes enlazadores incluyen: colorantes de cumarina, tales como (dietil-amino)cumarina o ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético, éster de succinimidilo (AMCA); cloruro de sulforodamina 101 sulfonilo (TexasRed® o cloruro de sulfonilo TexasRed®; 5-(y 6)-carboxirodamina 101, éster de succinimidilo, también conocido como 5-(y 6)-carboxi-X-rodamina, éster de succinimidilo (CXR); lisamina o derivados de lisamina tales como cloruro de lisamina rodamina B sulfonilo (LisR); 5-(y 6)-carboxifluoresceína, éster de succinimidilo (CFI); 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC); ácido 7-dietilaminocumarin-3-carboxílico, éster de succinimidilo (DECCA); 5-(y 6)-carboxitetrametilrodamina, éster de succinimidilo (CTMR); ácido 7-hidroxycumarin-3-carboxílico, éster de succinimidilo (HCCA); ácido 6-fluorescein-5-(y 6)-carboxamido-hexanoico (FCHA); ácido N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-3-indacenopropiónico, éster de succinimidilo; también conocido como ácido 5,7-dimetil BODIPY[®] propiónico, éster de succinimidilo (DMBP); “derivado de fluoresceína activada” (FAP), disponible en Probes, Inc.; 5-isotiocianato de eosina (EITC); 5-isotiocianato de eritrosina (EriTC); y acetilazida de azul Cascada[®] (CBAA) (el derivado O-acetilazida de ácido 1-hidroxi-3,6,8-pirenotrisulfónico). Aún otros fluoróforos potenciales útiles en esta invención, incluyen proteínas fluorescentes tales como la proteína fluorescente verde y sus análogos o derivados, aminoácidos fluorescentes tales como tirosina y triptófano y sus análogos, nucleósidos fluorescentes, y otras moléculas fluorescentes tales como Cy2, Cy3, Cy 3.5, Cy5, Cy5.5, Cy 7, colorantes IR, colorantes de Dyomics, ficoeritrina, verde Oregon 488, azul pacífico, verde de rodamina y colorantes de Alexa. Aún otros ejemplos de marcadores fluorescentes que se pueden utilizar en la invención, incluyen conjugados de R-ficoeritrina o de aloficoeritrina, marcadores fluorescentes inorgánicos, tales como partículas basadas en material semiconductor, tal como nanocristalitos de CdSe revestidos.

30 Una variedad de los fluoróforos anteriores, así como otros, están disponibles comercialmente, en compañías tales como Probes, Inc. (Eugene, OR), Pierce Chemical Co. (Rockford, IL), o Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO).

35 En algunas realizaciones la unidad de detección puede comprender desde 1 hasta 500 moléculas de marcador detectables. En algunas realizaciones, el marcador detectable es una enzima, que puede estar conjugada con un polímero, de modo que el número de moléculas de enzimas conjugadas con cada molécula de polímero sea, por ejemplo, 1 a 200, 2 a 50 o 2 a 25. En algunas realizaciones, el marcador detectable es una partícula de oro, un isótopo radiactivo o un marcador de color, p. ej., un fluoróforo de peso molecular bajo, y el número de marcadores detectables conjugados con cada molécula de polímero es, por ejemplo, 1 a 500, o por ejemplo, 2 a 200. En algunas realizaciones, el marcador detectable es un fluoróforo proteico y el número de marcadores detectables, conjugados con cada molécula de polímero es 1-50, 2-20. En algunas realizaciones, el número de moléculas de marcador detectables, conjugadas con cada polímero es 1-200, 2-50, 2-25, o es 10-20, 5-10 o 1-5.

40 El marcador detectable se puede detectar por numerosos métodos, que incluyen, por ejemplo, reflectancia, transmitancia, dispersión de la luz, rotación óptica y fluorescencia o combinaciones de los mismos en el caso de marcadores ópticos o mediante películas, recuento del centelleo o fosfoformación de imágenes, en el caso de marcadores radioactivos. Véase, p. ej., Larsson, 1988, Immunocytochemistry: Theory and Practice, (CRC Press, Boca Raton, FL); Methods in Molecular Biology, vol. 80 1998, John D. Pound (compilador) (Humana Press, Totowa, NJ). En algunas realizaciones, se emplea más de un marcador detectable.

3. Sondas

50 Algunos derivados del enlazador de acuerdo con esta invención pueden comprender una “sonda” conjugada que, tal y como se utiliza en esta memoria, es un grupo funcional o una molécula que vigila los eventos o los cambios en un sistema, por ejemplo, uniéndose, reaccionando con, o hibridándose con una sustancia diana en el sistema, directa o indirectamente. Un ejemplo de una sonda es un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico capaz de unirse o de hibridarse con una secuencia diana concreta. Otros ejemplos incluyen anticuerpos, tales como anticuerpos primarios o secundarios, antígenos, sustratos enzimáticos y ligandos de proteína, haptenos, proteínas y péptidos.

4. Anticuerpos

55 En algunas realizaciones, los derivados de los presentes enlazadores comprenden, por ejemplo, por lo menos un anticuerpo policlonal, monoclonal, mono-específico, poliespecífico, humanizado, monocatenario, quimérico, sintético, recombinante, híbrido, mutado e injertado con CDR. En la técnica se conocen diferentes métodos para producir anticuerpos y preparar moléculas de anticuerpo recombinantes y se han descrito, véase, p. ej., en Kohler y Milstein, (1975) Nature 256:495; Harlow y Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) (Cold Spring Harbor Press, Cold

Spring Harbor, NY). Los anticuerpos utilizados en la invención se pueden obtener a partir de cualquier especie de mamífero, p. ej., rata, ratón, cabra, cobaya, burro, conejo, caballo, llama, camello o cualquier especie aviar, p. ej., pollo, pato. El origen del anticuerpo se define por la secuencia genómica, con independencia del método de producción.

5 El anticuerpo puede tener cualquier isotipo, p. ej., IgG, IgM, IgA, IgD, IgE o cualquier subclase, p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. El técnico experto apreciará que los anticuerpos producidos de forma recombinante, o por otro medio, para uso en la invención, incluyen cualquier fragmento de anticuerpo que todavía pueda unirse al antígeno, p. ej., Fab, F(ab)₂, Fv, scFv. En determinadas realizaciones, el anticuerpo, que incluye un fragmento de anticuerpo, se puede manipular de forma recombinante para incluir un hapteno, p. ej., un péptido. En determinadas realizaciones, el hapteno puede ser un marcador myc (véase, la Figura 6N). La inclusión de un hapteno en un anticuerpo o en un fragmento de anticuerpo facilita la unión posterior de un agente de ligación, de una sonda, o de un marcador.

10 Determinadas realizaciones emplean derivados de enlazadores que comprenden un anticuerpo primario que contiene una región de unión al antígeno. Algunas realizaciones emplean derivados de enlazadores que comprenden un anticuerpo secundario que contiene una región de unión al antígeno que se une específicamente a un anticuerpo primario, p. ej., la región constante del anticuerpo primario. En determinadas realizaciones, el derivado del enlazador se conjuga adicionalmente con un polímero. Algunas realizaciones emplean derivados de enlazadores que comprenden un anticuerpo terciario que contiene una región de unión al antígeno que se une específicamente al anticuerpo secundario, p. ej., una región constante del anticuerpo secundario, o un hapteno unido al anticuerpo secundario o un polímero conjugado con el anticuerpo secundario. En determinadas realizaciones, el anticuerpo terciario se conjuga adicionalmente con un polímero.

5. Ácidos nucleicos y análogos de ácidos nucleicos

En algunas realizaciones, el enlazador se conjuga por lo menos con un ácido nucleico y/o un análogo de ácido nucleico. Tal y como se utiliza en esta memoria, un "ácido nucleico" se refiere a una secuencia de bases nucleicas que comprenden cualquier oligómero, polímero o segmento de polímero, que tenga una cadena principal formada solamente por nucleósidos de ARN o de ADN y que comprenda solamente las bases adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y uracilo (U), en donde un oligómero significa una secuencia de dos o más bases nucleicas. Los ácidos nucleicos también se pueden denominar ácidos nucleicos.

Las bases que no son naturales pueden incluir, por ejemplo, moléculas similares a purina y a pirimidina, tales como las que pueden interaccionar empleando interacciones de emparejamiento del tipo Watson-Crick, oscilatorio o de tipo Hoogsteen. Ejemplos incluyen generalmente cualquier base nucleica denominada en otro lugar como "no natural" o como "análoga." Las Figuras 6 y 9 representan algunos ejemplos.

Los ejemplos incluyen: bases sustituidas con halógeno, bases sustituidas con alquilo, bases sustituidas con hidroxilo y bases sustituidas con tiol, así como 5-propinil-uracilo, 2-tio-5-propinil-uracilo, 5-metilcitosina, isoguanina, isocitosina, pseudoisocitosina, 4-tiouracilo, 2-tiouracilo y 2-tiotimina, inosina, 2-aminopurina, N9-(2-amino-6-cloropurina), N9-(2,6-diaminopurina), hipoxantina, N9-(7-deaza-guanina), N9-(7-deaza-8-aza-guanina) y N8-(7-deaza-8-aza-adenina).

Aún otros ejemplos incluyen bases en las cuales un grupo amino con un hidrógeno está sustituido con un halógeno ("h" minúscula abajo), tal como 2-amino-6-"h"-purinas, 6-oxo-2-"h"-purinas, 2-oxo-4-"h"-pirimidinas, 2-oxo-6-"h"-purinas, 4-oxo-2-"h"-pirimidinas. Esas formarán dos pares de bases enlazadas con hidrógeno con bases no tioladas y tioladas; respectivamente, 2,4-dioxo y 4-oxo-2-tioxo pirimidinas, 2,4-dioxo y 2-oxo-4-tioxo pirimidinas, 4-amino-2-oxo y 4-amino-2-tioxo pirimidinas, 6-oxo-2-amino y 6-tioxo-2-amino purinas, 2-amino-4-oxo y 2-amino-4-tioxo pirimidinas, y 6-oxo-2-amino y 6-tioxo-2-amino purinas.

Por ejemplo, algunas realizaciones específicas de bases no naturales son las estructuras mostradas en la Figura 6 con los siguientes sustituyentes: Estas y otras bases no naturales se describen adicionalmente más adelante y en el documento de solicitud internacional acompañante, titulado "New Non-Natural Base Pairs".

Base (Símbolo)	R2	R3	R4	R5	R6
A	H o CH ₃	H	H		
isoA	H o CH ₃	H	H		
D	H o CH ₃	H			
G	H o CH ₃	H			
Gs	H o CH ₃	H			
I	H o CH ₃		H		

U				H o CH ₃	
U2s				H o CH ₃	
U4s				H o CH ₃	
C				H o CH ₃	H
Py-2o			H o CH ₃	H o CH ₃	
Cs				H o CH ₃	H
isoG	H o CH ₃	H			
isoGs	H o CH ₃	H			
Pu-2o	H o CH ₃		H		
isoC		H		H o CH ₃	
isoCs		H		H o CH ₃	
Py-4o			H o CH ₃	H o CH ₃	
A	H o CH ₃	H	CH ₃		
isoA	H o CH ₃	H -	CH ₃		
D	H o CH ₃	CH ₃			
G	H o CH ₃	CH ₃			
Gs	H o CH ₃	CH ₃			
I	H o CH ₃		CH ₃		
U				H o CH ₃	
U2s				H o CH ₃	
U4s				H o CH ₃	
C				H o CH ₃	CH ₃
Py-2o			H o CH ₃	H o CH ₃	
Cs				H o CH ₃	CH ₃
isoG	H o CH ₃	CH ₃			
isoGs	H o CH ₃	CH ₃			
Pu-2o	H o CH ₃		CH ₃		
isoC		CH ₃		-CH ₃ o CH ₃	
isoCs		CH ₃		CH ₃ o CH ₃	
Py-4o			H o CH ₃	H o CH ₃	

5

En otros ejemplos, uno o varios de H o de CH₃ están independientemente sustituidos con un halógeno, tal como Cl o F. Ejemplos de otras bases y de pares de bases compatibles con la invención se representan en la Figura 9. R₁ o "BB" en las estructuras de las Figuras 6 y 9, puede servir como un punto de fijación a un grupo de la cadena principal, tal como PNA, ADN, ARN, etc.

En algunas realizaciones, se utilizan los siguientes tipos de pares de bases: uno o varios de Us:A, T:D, C:G, y P:Gs. En algunas realizaciones, se utiliza T:A y P:G. Aún otros ejemplos se ilustran en las Figuras 2(A) y 2(B) de Buchardt y otros. (Documento US 6.357.163).

Los análogos de ácido nucleico también pueden comprender unidades monómeras en las que bases naturales A, C, G, T, y U o bases no naturales se conectan con una unidad no natural de la cadena principal. Las unidades no naturales de la cadena principal incluyen, por ejemplo, las que tienen una cadena principal distinta a ribosa-fosfato o desoxirribosa-fosfato. Por ejemplo, en algunas realizaciones, uno o varios oxígenos del fosfato se pueden sustituir por otra molécula, tal como azufre. En otras realizaciones, un azúcar o un análogo de azúcar diferente se pueden utilizar, por ejemplo, uno en el cual un oxígeno del azúcar está sustituido por hidrógeno o una amina, o un O-metilo. En aún otras realizaciones, los análogos del ácido nucleico comprenden moléculas sintéticas que se pueden unir a un ácido nucleico o a un análogo de ácido nucleico. Por ejemplo, un análogo de ácido nucleico puede comprender ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), ácidos nucleicos bloqueados (LNAs) o cualquier forma derivatizada de un ácido nucleico.

Tal y como se utiliza en esta memoria, "ácido nucleico peptídico" o "PNA" significa cualquier oligómero o polímero que comprende por lo menos una o varias subunidades de PNA (residuos), que incluyen, pero no están limitadas a las mismas, cualquiera de los segmentos de oligómero o de polímero denominado o reivindicado como ácido nucleico peptídico en los documentos de patentes de EE.UU. n° 5.539.082, 5.527.675, 5.623.049, 5.714.331, 5.718.262, 5.736.336, 5.773.571, 5.766.855, 5.786.461, 5.837.459, 5.891.625, 5.972.610, 5.986.053, 6.107.470 6.201.103, 6.228.982 y 6.357.163.

El término PNA también se aplica a cualquier segmento de oligómero o de polímero que comprende una o varias subunidades de los miméticos de ácido nucleico descritos en las siguientes publicaciones: Lagriffoul y otros, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4: 1081-1082 (1994); Petersen y otros, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6: 793-796 (1996); Diederichsen y otros, *Test. Lett.* 37: 475-478 (1996); Fujii y otros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7: 637-627 (1997); Jordan y otros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7: 687-690 (1997); Krotz y otros, *Test. Lett.* 36: 6941-6944 (1995); Lagriffoul y otros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4: 1081-1082 (1994); Diederichsen, U., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7: 1743-1746 (1997); Lowe y otros, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, (1997) 1: 539-546; Lowe y otros, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 11*: 547-554 (1997); Lowe y otros, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 11*: 555-560 (1997); Howarth y otros, *J. Org. Chem.* 62: 5441-5450 (1997); Altmann, K-H y otros, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7: 1119-1122 (1997); Diederichsen, U., *Bioorganic & Med. Chem. Lett.*, 8: 165-168 (1998); Diederichsen y otros, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37:302-305 (1998); Cantin y otros, *Tett. Lett.*, 38:4211-4214 (1997); Ciapetti y otros, *Tetrahedron*, 53: 1167-1176 (1997); Lagriffoule y otros, *Chem. Eur. J.*, 3: 912-919 (1997); Kumar y otros, *Organic Letters* 3(9): 1269-1272 (2001); y los miméticos de ácido nucleico basados en péptidos (PENAMs, del inglés "Peptide-Based Nucleic Acid Mimics) de Shah y otros, tal y como se describe en el documento WO96/04000.

Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "ácido nucleico bloqueado" o "LNA" significa un oligómero o un polímero que comprende por lo menos una o varias subunidades de LNA. Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "subunidad de LNA" significa un ribonucleótido que contiene un puente de metilenos que conecta el oxígeno 2' de la ribosa con el carbono 4'. Véase en general, Kurreck, *Eur. J. Biochem.*, 270:1628 -44 (2003).

5. Derivados de enlazadores que comprenden fluoróforos

En algunas realizaciones, los enlazadores pueden estar conjugados con uno o varios fluoróforos. Por ejemplo, dos fluoróforos se pueden conjugar para formar un derivado fluoróforo-enlazador-Lys (fluoróforo)-enlazador-X. De forma similar, se pueden preparar derivados más largos en los cuales diversos fluoróforos están separados con unidades del enlazador con la misma longitud o longitudes diferentes, tal como la estructura Fluoróforo-[enlazador-Lys(fluoróforo)]_N-enlazador-X, en la cual X es un grupo de conjugación u otro átomo, grupo o molécula. En algunas realizaciones, dos fluoróforos están separados entre sí por al menos cuatro unidades L15 (L90), para asegurar que los fluoróforos están separados más allá del radio de Foerster (típicamente, no más de 5 nm), de modo que la extinción debida a la transferencia de energía de la fluorescencia mediante resonancia, está minimizada o eliminada. En algunas realizaciones, dos fluoróforos pueden estar separados por cuatro a diez unidades L15 (L90 a L150), mientras que en otros, por cuatro a seis unidades L15 (L90 a L120). De hecho, en algunas realizaciones, las fluoresceínas separadas por al menos cuatro unidades L15 (L90), mostraban una extinción insignificante en tampones acuosos, indicando firmemente que el enlazador adopta una estructura extendida en agua. En cambio, los espaciadores basados en polietilenglicol (PEG) pueden adoptar una estructura plegada, helicoidal en agua.

Debido a que los enlazadores de la presente invención pueden permitir la separación de fluoróforos individuales, de modo que se reduce la extinción, dos u otros tipos diferentes de fluoróforos se pueden conjugar con uno o varios enlazadores para producir señales amplificadas o únicamente coloreadas. Por ejemplo, grupos de 2, 3, 4 o 5 grupos de fluoróforos se pueden conjugar con enlazadores, estando cada uno separado de otro al menos por cuatro unidades L15, por ejemplo, separados uno de otro con entre cuatro y diez unidades L15 o cuatro y seis unidades L15. Algunas realizaciones de esta invención comprenden Rodamina-L-Lys(fluoresceína)-L-X, en donde L tiene una longitud suficiente para evitar la extinción de las señales de rodamina y de fluoresceína, por ejemplo, y en donde X es otro átomo, grupo o molécula, o un grupo de conjugación. La separación óptima para un fluoróforo dado, depende en parte de su tamaño, pero se puede determinar fácilmente sometiendo a ensayo la intensidad de la señal fluorescente, por ejemplo, en diferentes separaciones.

En algunas realizaciones, una molécula tal como una proteína, se puede conjugar con distintos derivados de enlazadores, los cuales están conjugados cada uno con un marcador detectable, tal como un fluoróforo. (Véase la Figura

2A). En métodos convencionales para marcar con fluorescencia una proteína sin enlazadores o con enlazadores cortos, el tamaño de la proteína conjugada determina hasta qué distancia se pueden colocar los fluoróforos fijados, y por lo tanto, se determina en primer lugar la intensidad de la fluorescencia. El mismo principio se aplica a otras moléculas también. En cambio, realizaciones de la presente invención pueden debilitar esta limitación del tamaño porque los presentes enlazadores: (1) se pueden conjugan con diversos fluoróforos, (2) pueden conservar una estructura extendida en solución que minimiza interacciones indeseadas entre los fluoróforos individuales, y (3) se pueden conjugar con numerosos tipos de proteínas y otras moléculas. Así, en algunas realizaciones, esta invención puede mejorar considerablemente la intensidad de la fluorescencia de una molécula, y puede eliminar la necesidad de etapas extra, empleadas generalmente para potenciar una señal en un sistema. Por ejemplo, la fijación de múltiples derivados de enlazadores que comprenden cada uno múltiples fluoróforos, a un anticuerpo, puede permitir la detección directa de cantidades minúsculas de un antígeno, sin la necesidad de procedimientos secundarios para amplificar la señal del anticuerpo.

6. Derivados de enlazadores con múltiples sustancias conjugadas

Algunos derivados de enlazadores, de acuerdo con esta invención, incluyen diferentes tipos de marcadores detectables conjugados. En algunas realizaciones, los enlazadores se conjugan con dos marcadores detectables diferentes en los cuales un marcador sirve para vigilar un cambio o un evento en un sistema, mediante la unión o la hibridación con una diana, mientras que el otro sirve para detectar ese evento de unión a través de un cambio de color, radiactividad u otra señal detectable. Por ejemplo, un fluoróforo se puede combinar con un tipo diferente de marcador de color. Se han preparado derivados, tales como DNP-enlazador-Lys(flúoróforo)-enlazador-X. DNP (dinitrofenol) se puede reconocer con un anticuerpo anti-DNP, mientras que la emisión fluorescente proporciona un segundo tipo de señal, proporcionando de este modo dos métodos alternativos de marcación.

Además, las realizaciones pueden comprender otras combinaciones de átomos, grupos o moléculas, tales como un marcador detectable y una superficie sólida, una membrana, una proteína u otra molécula grande. Las fijaciones pueden ser covalentes así como no covalentes. Realizaciones con más de un tipo de átomo, grupo o molécula conjugada son útiles, por ejemplo, en la inmunoprecipitación o ensayos ELISA, ensayos de detección *in situ*, ensayos multicapa, ensayos fluorescentes con microesferas y ensayos de captura.

En algunas realizaciones, los enlazadores se conjugan con fluoróforos, así como con sondas, tales como ácidos nucleicos y análogos de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico se puede utilizar para hibridarse con una secuencia diana en un sistema, mientras que el fluoróforo conjugado con la sonda a través del enlazador proporciona un medio para detectar la hibridación. Tales derivados de enlazadores marcados de forma bifuncional pueden ser útiles, por ejemplo, en ensayos de hibridación *in situ*, tales como FISH.

Otros derivados de enlazadores comprenden conjugados múltiples de ácido nucleico o de análogos de ácido nucleico, opcionalmente conjugados adicionalmente con otros tipos de marcadores detectables. Por ejemplo, una molécula de derivado de un solo enlazador puede comprender diferentes ácidos nucleicos o análogos de ácido nucleico, cada uno separado de los otros por segmentos de una o varias unidades L15. En algunas realizaciones, los diferentes ácidos nucleicos o análogos de ácido nucleico se separan entre sí por separaciones de L120 a L300, L150 a L300, o L300.

En algunas realizaciones, los enlazadores se conjugan con fluoróforos u otros marcadores basados en el color, así como con sondas de PNA o de LNA. Los derivados de enlazadores que contienen PNA, preparados de acuerdo con la presente invención, incluyen, por ejemplo, derivados de enlazadores que comprenden X-L-PNA-L-Lys(Cys), en donde X puede ser un grupo terminal, tal como acetilo, un grupo de conjugación, o un marcador de color, tal como un fluoróforo o un sustrato enzimático, tal como DNP. La fijación de un fluoróforo tal como fluoresceína puede permitir una purificación y un análisis más simples del derivado. Una separación de L30 o mayor entre el grupo de X y un PNA o un oligonucleótido, es generalmente una distancia suficiente para evitar un impedimento estérico entre el enlazador y la diana de hibridación, no obstante se puede utilizar una separación más larga, por ejemplo para incrementar la entropía para disminuir adicionalmente interacciones terciarias indeseadas o la agregación. Por ejemplo, la distancia entre el PNA o el oligonucleótido y un grupo Lys(Cys) puede ser, por ejemplo, de hasta L300, incluyendo desde L120 hasta L300 o desde L150 hasta L300. Las separaciones entre el PNA y otros conjugados pueden ser, por ejemplo, desde L120 hasta L300, desde L150 hasta L300, o L300. Otros derivados de enlazadores ejemplares que comprenden PNA, de acuerdo con la invención, también incluyen fijaciones múltiples de fluoróforos o de marcadores de color. Por ejemplo, se preparó el derivado [(Flu-L60)₂Lys]₂-Lys-L30-PNA y contiene cuatro derivados de enlazadores de fluoresceína (Flu). En otras realizaciones, un derivado lineal del enlazador se puede preparar, conjugado con PNA y fluoróforos múltiples. La realización Lys(Flu)-L30-PNA-L30-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu) también se preparó y contiene de forma similar cuatro fluoresceínas. Aunque los fluoróforos conjugados con el mismo derivado de enlazador pueden agregarse más probablemente en solución que los fluoróforos conjugados con diferentes derivados de enlazadores, asombrosamente, los derivados de enlazadores que comprenden una sonda de PNA y distintos fluoróforos separados por enlazadores L90, no sólo proporcionaron señales potenciadas sobre otros que contenían fluoróforos aislados, sino que también mostraron un ruido de fondo reducido, indicando que la elevada entropía debida a la estructura flexible, extendida de cada enlazador L90, compensaba cualquier tendencia incrementada a interaccionar de los fluoróforos. En algunas realizaciones, los derivados de enlazadores también pueden formar estructuras ramificadas o se pueden hibridar específicamente entre sí, a través de los PNAs conju-

dos, de modo que se amplifica la señal.

7. Agentes de reticulación

Los enlazadores descritos también se pueden utilizar como reticuladores de proteínas. Por ejemplo, los presentes enlazadores se pueden conjugar con un grupo de conjugación de proteínas, tal como maleimida, y/o con un antígeno, un ligando o un sustrato para una proteína o un anticuerpo particular, y opcionalmente también con un marcador detectable para visualizar la reticulación. Por ejemplo, se han preparado grupos maleimida-enlazador-X, en los cuales X representa un grupo reactivo tal como Lys(betaalanina-ácido N,N diacético) o un ligando, un antígeno o un sustrato específico de la proteína de interés. Dicho enlazador se puede utilizar, por ejemplo, para unirse a una proteína o a un anticuerpo específico a través del grupo X, y para la reticulación de otras proteínas en la proximidad de esa proteína específica, a través del enlazador de maleimida. Un marcador detectable también puede estar conjugado con el derivado del enlazador para ayudar a detectar la reticulación. Incluso segmentos relativamente cortos de enlazador, tales como L30 entre un marcador y un ligando de proteína, pueden permitir la detección del marcador sin una interferencia significativa por la extinción de un marcador fluorescente, por ejemplo.

La estructura extendida y flexible de algunos de los presentes enlazadores les permite que ayuden en la reticulación de incluso dos moléculas grandes, tales como una proteína fluorescente (por ejemplo, RPE o una proteína fluorescente verde) y un anticuerpo. Por ejemplo, los enlazadores largos de acuerdo con la presente invención, pueden tener longitudes en solución de, por ejemplo, 9 nm en el caso de L90, o incluso 30 nm en el caso de L300, o incluso más largas. Esa longitud proporciona una libertad significativa hasta para proteínas muy grandes dentro de un complejo entrecruzado, para adoptar sus orientaciones preferidas, independientemente de otras dentro del complejo. Así, los presentes enlazadores permiten una identificación más exacta de las proteínas que interactúan porque el complejo está mínimamente perturbado por la presencia del enlazador.

8. Conjugación con una superficie o un polímero

En algunas realizaciones, los presentes enlazadores pueden servir para fijar de forma covalente o no covalente un marcador detectable u otro átomo, grupo o molécula a un polímero o a una superficie tal como dextrano o una membrana o una agrupación o una placa. Los presentes enlazadores ocupan poco espacio en la dirección longitudinal. Por lo tanto, pueden ser útiles para revestir tales superficies con alta densidad porque pueden acceder a espacios o a poros relativamente estrechos en tales superficies. Además, los enlazadores largos se pueden emplear para maximizar la distancia entre la superficie y otros componentes del sistema, de modo que el sistema se perturba mínimamente. Por ejemplo, los derivados de enlazadores se pueden preparar para la conjugación con dextrano junto con ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos, tales como PNA, así como marcadores de color, tales como HRP y uno o varios fluoróforos. Otros derivados de enlazadores se pueden preparar para la conjugación con combinaciones de dextrano, PNA y anticuerpos. (Véase la Figura 3, por ejemplo.)

Los derivados de enlazadores con múltiples átomos, grupos o moléculas conjugados se pueden utilizar para amplificar señales en una variedad de formas. Por ejemplo, cantidades minúsculas de anticuerpos o de antígenos se pueden detectar, fijando el anticuerpo o el antígeno a un derivado de enlazador que comprende múltiples fluoróforos. (Véase la Figura 2A, por ejemplo.) {Nota: esto ya se había mencionado anteriormente.} Además, dos antígenos potencialmente reticulados se pueden distinguir fijando los antígenos a los derivados de enlazadores que comprenden diferentes tipos de fluoróforos. Los sistemas multicapas también se pueden construir de forma que determinados átomos, grupos o moléculas que interactúan, tales como ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos o una proteína y un ligando complementarios, se colocan entre otro marcador detectable, tal como un marcador de color, y una superficie o una molécula. (Véase la Figura 3.)

9. Mejora de la solubilidad de sustancias conjugadas

Otra característica sorprendente de algunos de los presentes enlazadores es una solubilidad relativamente elevada a pesar de la presencia de relativamente pocos grupos polares o cargados. Por lo tanto, enlazadores, por ejemplo, los que comprenden dos o unidades L15 en algunos derivados, o cuatro o más unidades L15 en otros derivados, también se pueden emplear para mejorar la solubilidad de un átomo, de un grupo o de una molécula en solución acuosa. Por ejemplo, un grupo acetil-L-X se puede utilizar para mejorar la solubilidad del átomo, grupo o molécula X. De forma sorprendente, sondas de PNA con fluoróforos múltiples, separados con al menos cuatro unidades L15, mostraban una solubilidad en agua más elevada, así como menos agregación y menos unión no específica, que las sondas sin enlazadores conjugados y con solamente un fluoróforo. Además, los derivados de polienlazadores de la presente invención conjugados hasta incluso con 50 a 100 bases de PNA, así como con fluoróforos, no se agregaban y mostraban una elevada solubilidad en agua.

10. Otros usos ejemplares de los derivados de enlazadores

En aún otras realizaciones, los presentes enlazadores se pueden conjugar con un compuesto de fármaco, por ejemplo, para aumentar su retención, su solubilidad o para ligarlo con eficacia con otro grupo, para dirigirlo hacia una diana en un área particular del cuerpo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, por lo menos un enlazador de fórmula molecular y estructural homogéneas, se conjuga con al menos a un compuesto de fármaco.

Los presentes enlazadores también son útiles en una variedad de ensayos biológicos y químicos. Por ejemplo, en ensayos de captura, las barreras estéricas se pueden relajar, sustentando de hecho una sonda desde una superficie, de modo que esté libre en la solución para reconocer su diana. (Véase la Figura 5.) Si la tasa de unión entre la sonda y la diana es lenta, en relación con la tasa de difusión, se puede emplear un enlazador más corto. Sin embargo, cuando la tasa de unión es rápida comparada con la tasa de difusión en el sistema, un enlazador largo puede ser ventajoso. Debido a que los presentes enlazadores se pueden preparar con longitudes precisas cortas o largas, así como en mezclas de diferentes longitudes, dependiendo del método de síntesis utilizado, los presentes enlazadores proporcionan un sistema uniforme en torno al cual se pueden diseñar tales ensayos.

La presente invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos no limitantes.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de enlazadores L30 y L60

Parte A:

15 Una solución de 146 ml de 2,2'-(etilendioxo)bis(etilamina) (98%) en 360 ml de tetrahidrofurano (THF), se enfrió en un baño de hielo. A esto, se añadió gota a gota durante 1 h, una solución de 65 g de dicarbonato de di-terc-butilo (97%) en 260 ml de THF. El disolvente se evaporó en un evaporador rotatorio. El producto se lavó con 300 ml de agua y el disolvente se eliminó de nuevo.

El producto se añadió a 300 ml de agua y se extrajo con 300 ml de diclorometano (DCM), a continuación se extrajo adicionalmente con 2x 150 ml de DCM. La fase orgánica recogida se lavó con 50 ml de agua antes de evaporar hasta aproximadamente la mitad del volumen.

20 El DCM se extrajo a continuación con 400 ml solución de solución 1 M de NaCitrato (pH 4,5), a continuación se extrajo de nuevo con otros 50 ml de solución de NaCitrato. Las dos fases acuosas resultantes se lavaron con 50 ml de DCM antes de enfriar en un baño de hielo. Bajo agitación, se añadieron 100 ml de NaOH 10 M hasta que el pH de la solución era >13.

25 En un embudo de separación, el producto se separó por sí mismo. Se agitó con 300 ml de DCM y 50 ml de agua. La fase orgánica se evaporó a continuación, proporcionando un aceite blanco.

Rendimiento 48,9 g = 65,7%. MS calc. Para $C_{11}H_{24}N_2O_4$ 248,3, encontrada 248,5. (Véase la estructura 1, Fig. 1).

Parte B: Preparación de Boc-L15-imida

30 76,2 g de la estructura 1 (Fig. 1), preparada, por ejemplo, tal y como se ha descrito en la parte A anterior, se disolvieron en 155 ml de piridina. Se añadieron 54,0 g de anhídrido diglicólico (90%) y la solución se agitó durante 15 min. A continuación, se añadieron 117 ml de anhídrido acético (mín. 98%) y se agitaron de forma continuada a 95°C durante 1 h. Los disolventes se evaporaron en un evaporador rotatorio.

35 Se añadieron 117 ml de agua y la solución se agitó durante 15 minutos antes de añadir otros 272 ml de agua y 193 ml de DCM. La capa orgánica se extrajo dos veces con 193 ml de Na_2CO_3 (1 M) y a continuación, dos veces con una mezcla de 72 ml de HCl 4 M y 289 ml de citrato sódico 1 M, pH 4,5. Después de cada extracción, la fase acuosa se lavó con un poco de DCM. La fase orgánica recogida se lavó con 150 ml de agua. El disolvente se evaporó dejando el producto (estructura 2 de la Fig. 1) como un aceite pálido.

Rendimiento 100,3 g (0,29 mol) el = 94%. MS calc. para $C_{15}H_{26}N_2O_7$ 346, encontrada 346,7.

Parte C:

40 Se disolvieron 100,3 g de la estructura 2 (Fig. 1) en 100 ml de THF y se añadieron gota a gota a 169,4 ml de 2,2'-(etilendioxo)bis(etilamina) a 60°C, durante 1 h. La amina se destiló de la mezcla de reacción a 75-80°C/0,3 mBar.

El residuo procedente de la destilación se añadió a una mezcla de 88 ml de HCl 4 M y 350 ml de NaCitrato 1 M, pH 4,5 y se extrajo tres veces con 175 ml de DCM. La fase acuosa se enfrió en un baño de hielo y se añadieron 105 ml de NaOH 10 M.

45 En un embudo de separación, el producto se separó lentamente de la solución. Cuando estaba separado, el producto se distribuyó entre 100 ml de agua y 950 ml de DCM. La fase acuosa se extrajo adicionalmente cuatro veces con 150 ml de DCM y las fases combinadas de DCM se redujeron a un aceite. El residuo oleoso se deshidrató por evaporación en tolueno, proporcionando un aceite amarillo.

Rendimiento 115,48 g = 81%. MS calc. para $C_{21}H_{42}N_4O_9$, 494,6, encontrada 494,8. (Véase la estructura 3, Fig. 1).

Parte D: Preparación de Boc-L30-imida

50 Se disolvieron 115,5 g de la estructura 3 (Fig. 1) en 115 ml de piridina. Se añadieron 40,6 g de anhídrido diglicólico

(90%). Después de agitar durante 15 minutos, se añadieron 97 ml de anhídrido acético (mín. 98%), y la solución se agitó a 95°C durante 1 h. El disolvente se evaporó bajo presión reducida.

5 La mezcla de reacción se enfrió un poco y se añadieron 80 ml de agua. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos, a continuación se añadieron 200 ml de agua y 150 ml de DCM. La capa orgánica se extrajo dos veces con 150 ml de Na₂CO₃ (1 M) y después dos veces con una mezcla de 53 ml de HCl (4 M) y 213 ml de NaCitrato (1 M). Después de cada extracción, la fase acuosa se lavó con un poco de DCM.

La fase orgánica recogida se lavó con 150 ml de agua. El disolvente se evaporó. El residuo oleoso se deshidrató por evaporación en tolueno, proporcionando un aceite amarillo.

Rendimiento 125 g = 92%. MS calc. para C₂₅H₄₄N₄O₁₂ 592,6, encontrada 592,5. (Véase la estructura 4 de la Fig 1).

10 Una purificación adicional del producto se realiza en una columna de sílice, con un gradiente de 5 - 10% de metanol en DCM. Alternativamente, el producto se utiliza para otras reacciones químicas. Rendimiento 69%, como aceite blanco.

Parte E: Apertura del anillo para preparar Boc-L30 ácido libre

15 Se disolvieron 12,4 g de la estructura 4 (Figura 1) en 12 ml de agua, 12 ml de 1,4-dioxano y 6 ml de DIPEA y se sometió a reflujo durante 30 minutos, a continuación se enfrió se evaporó. El residuo oleoso se deshidrató por evaporación en tolueno, proporcionando un aceite amarillo. MS calc. para C₂₅H₄₆N₄O₁₄ 610,6, encontrada 610,8. (Véase la estructura 5, Fig. 1).

Parte F: Preparación de un enlazador L-60 a partir de Boc-L30-imida

20 Para preparar Boc-L60-imida a partir de dos enlazadores más cortos, Boc-L30-imida, 10 g, se disolvieron en 100 ml de ácido trifluoroacético (TFA). Después de 10 minutos, el TFA se retiró por evaporación a presión reducida, para dejar 20 g de un aducto de amina libre-L30-imida:TFA. Este se disolvió en 100 ml de acetonitrilo y se neutralizó con 15 ml de trietilamina.

25 A esta solución se añadieron 10,3 g de Boc-L30-ácido libre activado con 6,2 g de HATU (hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridi-1-ilmetileno]-N-metilmetanamino) y 4,5 ml de diisopropiletilamina en 50 ml de acetonitrilo, durante 5 min.

Después de 1 hora, los disolventes se separaron por evaporación, el producto se añadió a 500 ml de diclorometano y se extrajo con 150 ml de carbonato sódico 1 M. El diclorometano se eliminó por evaporación y el producto se purificó sobre sílice con metanol al 15% en diclorometano. Rendimiento: 12,3 g de Boc-L60-imida, o 67%.

30 Para preparar Boc-L60-ácido libre, se disolvieron 12,3 g de Boc-L60-imida en 20 ml de agua, 20 ml de dioxano y 20 ml de diisopropiletilamina y se hirvió durante 1 h. Los disolventes se separaron por evaporación para dejar 14,3 g de la sal diisopropil-etil-amina de Boc-L60-ácido libre. Un análisis por TLC mostraba que la reacción era cuantitativa.

Ejemplo 2: Síntesis de enlazadores y de derivados de enlazadores más largos – Procedimientos generales

35 Los derivados de enlazadores más largos se prepararon mediante síntesis en fase sólida. Inicialmente, la resina “se descargó” para las síntesis en fase sólida. Ya que muchos derivados de enlazadores alcanzan pesos moleculares de, por ejemplo, 10 kDa, se debe descargar una cantidad de resina correspondiente. Por ejemplo, en general, la carga en mol/g multiplicada por el peso molecular del producto deseado en g/mol, no debe exceder a 1, lo que se corresponde con un rendimiento en bruto formal de 1 de producto/1g de resina.

Los procedimientos generales para la preparación de componentes de los derivados de enlazadores también se describen en este ejemplo.

40 Síntesis de enlazadores

Procedimiento de descarga de la resina

3 g de resina MBHA (01-64-0042, NovaBiochem) se expandieron en NMP (N-metil-pirrolidona) durante una noche. Se lavaron con piridina (2x), a continuación con NMP y se drenaron.

45 0,15 mmol/g de la resina Boc-Lys(Fmoc)-OH (04-12-0063, NovaBiochem), 0,45 mmol, 211 mg y 162 mg de 0,95 equi. de HATU (GEN076525, Applied Biosystems) y 156 µl de 2 equi. de DIPEA (diisopropiletilamina, 550043, Aldrich), se disolvieron en 7 ml de NMP, se activaron durante 2 minutos, y después se aplicaron sobre la resina. Se permitió que la reacción procediera durante 1 h con sacudida suave. La mezcla de reacción se separó por drenaje y la resina se lavó repetidamente con NMP. Los grupos amino restantes que no habían reaccionado en la resina, se acetilaron con NMP/piridina/anhídrido acético (2:2:1), durante no menos de 1 h, y hasta que una prueba de Kaiser cualitativa falló para mostrar grupos amino libres. La resina se lavó a continuación repetidamente con NMP, seguido por repetidos lavados con DCM, y finalmente se secó a vacío. Se designó como “resina descargada”.

Una muestra de la resina se desprotegió con TFA (ácido trifluoroacético)/mCresol, 19:1 durante 2 x 5 min, se lavó repetidamente con DCM, y se secó a vacío. Esta muestra se sometió a una prueba de Kaiser cuantitativa para determinar la carga. Resultado = grupos amino 0,085 mmol/g de resina.

Procedimiento de síntesis en fase sólida

5 Los procedimientos convencionales para la síntesis en fase sólida de Boc eran los siguientes:

En primer lugar, la resina se desprotegió con TFA (ácido trifluoroacético)/mCresol, 19:1 durante 2 x 5 min, se lavó repetidamente con DCM, a continuación con NMP, después con piridina. En segundo lugar, Boc-L30-OH, 0,26 M en NMP, se mezcló con volúmenes iguales de HATU 0,234 M en NMP y DIPEA 0,5 M en piridina y se permitió la activación durante 2 min antes de añadir a la resina. Se utilizó un volumen justo suficiente para cubrir la resina y se permitió que la reacción de acoplamiento tuviera lugar durante 20 min. Generalmente, un solo acoplamiento tal sería suficiente para obtener una prueba de Kaiser negativa, sin embargo cuando se acopla a un residuo de αNH_2 -Lys(ϵ Fmoc), se realiza un acoplamiento doble.

15 Para evitar trazas de productos delecionados, se utilizó una etapa de encapsulamiento con anhídrido acético/NMP/piridina 2:49:49, durante 2 min, después de cada acoplamiento. La resina se lavó con NMP y a continuación con DCM para la preparación de la siguiente etapa de desprotección.

Aminoácidos protegidos con Boc y monómeros de PNA se introdujeron usando condiciones convencionales. Se introdujeron residuos de lisina para permitir la desprotección de la cadena lateral en la resina, así como la introducción por ejemplo de fluoróforos.

20 Los grupos de protección Fmoc se eliminaron con piperidina/NMP 1:4 durante 2 x 5 min. Los grupos de tinción y de protección se eliminaron con hidracina al 3% en NMP durante 2 x 5 min.

Las síntesis también se realizaron en un sintetizador de péptidos ABI 433A, según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA).

25 En general, se observó que Boc-L30-OH se acoplaba bien, especialmente sobre sí mismo. Aparte de los residuos mencionados αNH_2 -Lys(ϵ Fmoc), se tuvieron que realizar acoplamientos dobles, solamente si se preparaba una estructura ramificada, con acoplamiento simultáneo en distintos extremos amino terminales libres del mismo compuesto.

30 Una característica notable de las resinas con segmentos más largos de enlazador unidos, era una extinción extraordinaria, especialmente durante la desprotección con TFA. Por ejemplo, cuando se partía de 1 g de resina descargada, 3 ml de TFA serían suficientes para extinguir y cubrir la resina. Sin embargo, después de 10 acoplamientos de Boc-L30-OH (la resina ahora con Boc-L-300 unido), se requerían más de 10 ml de TFA para extinguir y cubrir la resina. Por otra parte, no parecía que incluso dicho segmento Boc-L300 en el N α de la lisina C-terminal, diera lugar a ningún problema al realizar la reacción química en el N ϵ del residuo de lisina. Por ejemplo, un grupo Fmoc se escindía fácilmente de esta posición, y los acoplamientos subsiguientes en esa posición, parecía que no estaban afectados por la longitud del enlazador.

35 Eliminación de la resina en fase sólida

Una vez que se había obtenido el producto deseado sobre la resina, se retiró por escisión la resina, usando ácido trifluorometanosulfónico/TFA/M-Cresol, 7:2:1, liberando el producto como una carboxamida C-terminal. El producto precipitó en éter dietílico y se secó en una corriente de nitrógeno. Los productos brutos se disolvieron en acetonitrilo al 15% en agua, y la purificación se realizó mediante RP-HPLC. Un gradiente de acetonitrilo del 15% al 40% en TFA acuoso al 0,02%, se utilizó típicamente. Se observó que los derivados de enlazadores más largos eran ligeramente lábiles al ácido. Antes de la liofilización, el tampón de elución de la HPLC se neutralizó típicamente con una base apropiada, tal como sal sódica de MES (ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico). Por ejemplo, un producto aislado en 5 ml de TFA al 0,02% contiene 1 μl de TFA, o 12 μmol , y se neutralizó a pH 6 con 25 μl de sal sódica de MES 1 M. Este procedimiento se utilizó para los derivados de enlazadores que se iban a utilizar después en agua. La piridina o DIPEA se utilizó para la neutralización cuando los productos se iban a utilizar en un disolvente orgánico, o cuando las sales inorgánicas habían presentado un problema de solubilidad en soluciones acuosas.

Síntesis de PNA en fase sólida

50 En un sintetizador de péptidos (ABI 433A, Applied Biosystems) se acoplaron monómeros de PNA a la resina, usando procedimientos convencionales para el acoplamiento de aminoácidos y reacciones químicas de PNA convencionales. A continuación, la resina se maneja en un recipiente de vidrio para eliminar los grupos protectores y para marcar con otros aminoácidos o fluoróforos.

La eliminación de los grupos protectores indicados se consigue con las siguientes condiciones:

Boc: TFA/m-cresol (en una relación de 95/5) 2x5 min.

Fmoc: 20% de piperidina en DMF 2x5 min.

Dde: 3% de hidrazina en DMF 2x5 min.

5 Cuando la síntesis finaliza, el PNA se escinde de la resina con TFA/TFMSA/m-cresol/tioanisol (en una relación de 6/2/1/1). El PNA se precipita a continuación con éter y se purifica mediante HPLC. La espectrometría de masas MALDI-TOF se utiliza para determinar el peso molecular del producto. {NOTA – esto procede de las bases Funny del Ejemplo 2}.

Preparación de bases no naturales y de monómeros de PNA

Monómero de pirimidinona (método 1)

10 1. En el equipo seco, se añadieron 4,6 g de Na sólido en trozos pequeños a 400 ml de etanol (99,9%), y se disolvieron agitando. Se añadió hidrocloreto de hidroxipirimidina, 13,2 g, y la mezcla se sometió a reflujo durante 10 minutos. A continuación se añadieron 12,2 ml de bromoacetato de etilo (98%) y la mezcla se sometió a reflujo durante hora y media. La reacción continuó usando cromatografía en capa fina (TLC). El etanol se evaporó dejando un compuesto blanco, que se disolvió en una mezcla de 80 ml de NaCitrato 1 M (pH 4,5) y 40 ml de NaOH 2 M. Esta solución se extrajo cuatro veces con 100 ml de diclorometano (DCM). Las fases de DCM se reunieron y se lavaron con 10 ml de una mezcla de NaCitrato/NaOH. Las fases lavadas de DCM se evaporaron bajo presión reducida y dieron como resultado 17,2 g de producto sólido bruto. Este producto sólido bruto se recristalizó en acetato de etilo proporcionando un polvo amarillo. El rendimiento de esta etapa era 11,45 g (63%).

20 2. El polvo amarillo, 12,45 g, procedente de arriba, se hidrolizó sometiendo a reflujo durante una noche una mezcla de 36 ml de DIPEA, 72 ml de agua y 72 ml de dioxano. El disolvente se evaporó y el agua se eliminó del residuo por evaporación en tolueno. El rendimiento de esta etapa era 100%.

25 3. OBS. El ácido pirimidinona acético (10,5 g), 16,8 g de éster etílico de la cadena principal de PNA, 12,3 g de DHBT-OH, 19 ml de trietilamina, se disolvieron en 50 ml de N,N-dimetilformamida (DMF). Se añadió DIPIDIC (11,8 ml) y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El producto se añadió a 100 ml de DCM y se extrajo tres veces con 100 ml de NaHCO₃ acuoso diluido. La fase orgánica se extrajo dos veces con una mezcla de 80 ml de NaCitrato 1 M y 20 ml de HCl 4 M. Ya que la TLC mostraba que algún material estaba en la fase de citrato, se extrajo dos veces con DCM. Las fases orgánicas se reunieron y se evaporaron. Debido a que había una precipitación de urea, el producto se disolvió en DCM, y la urea se eliminó por filtración. La evaporación subsiguiente dejó un aceite de color naranja. La purificación del aceite de color naranja fue realizada en una columna de sílice con metanol al 10% en DCM. Las fracciones se recogieron y se evaporaron proporcionando una espuma amarilla. El rendimiento de esta etapa era 7,0 g (26,8%).

30 4. La espuma amarilla (8,0 g) se hidrolizó a reflujo durante una noche en 11 ml de DIPEA, 22 ml de agua y 22 ml de dioxano. El disolvente se evaporó y el aceite se deshidrató por evaporación en tolueno, dejando una espuma de color naranja. El rendimiento de esta etapa era del 100%.

Monómero de pirimidinona (método 2)

35 Etapa 1. En un equipo seco, se disolvieron 9,2 g de Na sólido en trozos pequeños en 400 ml de etanol (99,9%), con agitación. Se añadió hidrocloreto de hidroxipirimidina, 26,5 g, y la mezcla se agitó durante 10 minutos a 50°C. A continuación se añadieron 24,4 ml de bromoacetato de etilo (98%) y la mezcla se agitó a 50°C durante 1 hora. La reacción continuó usando cromatografía en capa fina (TLC).

40 El etanol se evaporó dejando un compuesto blanco, que se había disuelto en 70 ml de agua y se extrajo con 20 ml de DCM. Se añadieron otros 30 ml de agua a la fase acuosa, que se extrajo con 3x100 ml de DCM. La fase de DCM procedente de la primera extracción contiene mucho producto, pero también algunas impurezas, por lo que esta fase se extrajo dos veces con agua. Estas dos fases acuosas se extrajeron a continuación con DCM.

45 Las fases de DCM combinadas se reunieron y se lavaron con 10 ml de agua. Las fases de DCM lavadas se evaporaron a presión reducida y dieron como resultados 25,1 g de polvo amarillo. El rendimiento de esta etapa era 25,1 g = 69%. Maldi-Tof: 181,7 (calc. 182).

50 Etapa 2. Se disolvieron 34,86 g del polvo amarillo anterior, en 144 ml de NaOH 2 M. Después de agitar durante 10 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se enfrió en un baño de hielo. Entonces se añadieron 72 ml de HCl 4 M (frío). El producto precipitó. Después de agitar durante 5 minutos, el material precipitado se filtró y se lavó a fondo con agua helada. El secado en un desecador bajo presión reducida proporcionó 18,98 g de polvo amarillo. El rendimiento de esta etapa era 18,98 g = 64%.

55 Etapa 3. Se disolvieron 11,1 g de ácido pirimidinona acético y 12,5 ml de trietilamina en 24 ml de N,N-dimetilformamida (DMF), se añadieron 26,2 g de HBTU más 6 ml extra de DMF. Después de 2 minutos, se añadió una solución de 14,7 g de éster etílico de PNA-cadena principal disuelta en 15 ml de DMF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y a continuación usando TLC. Después de hora y media se formó un precipitado. Este se separó por filtración.

- 5 El producto se añadió a 100 ml de DCM y se extrajo con 2 x 100 ml de NaHCO₃ acuoso diluido. Ambas fases acuosas se lavaron con un poco de DCM. Las fases orgánicas se reunieron y se evaporaron. La evaporación dejó un aceite de color naranja. La purificación del producto se realizó en una columna de sílice con metanol 10-20% en acetato de etilo. Las fracciones se recogieron y se evaporaron, proporcionando un aceite amarillo. El aceite se disolvió y se evaporó dos veces en etanol. El rendimiento de esta etapa era 20,68 g = 90%.
- 10 Etapa 4. El aceite amarillo (18,75 g) se disolvió en 368 ml de Ba(OH)₂ 0,2 M. Se agitó durante 10 minutos antes de añadir 333 ml de H₂SO₄ 0,221 M. Una precipitación se realizó inmediatamente. Se filtró a través de celite, que se había lavado con agua. El disolvente se evaporó. Antes de que finalizara la evaporación, el producto se centrifugó para eliminar el resto de la precipitación. La evaporación de nuevo del disolvente proporcionó un aceite amarillo. El rendimiento de esta etapa era 13,56 g = 78%.
- 15 Etapa 5. Para realizar un ensayo sobre el P-monómero, se acoplaron 3 P consecutivos a la resina Boc-L300-Lys(Fmoc), siguiendo un procedimiento convencional normal de PNA. El producto se escindió de la resina y se precipitó también siguiendo procedimientos convencionales: HPPP-L300-Lys(Fmoc). Maldi-Tof del producto bruto: 6000 (calc. 6000) mostrando solamente pequeñas impurezas.
- 20 Monómero de tioguanina
- Se agitaron 1,6-loroguanina (4,93 g) y 10,05 g de K₂CO₃ con 40 ml de DMF durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se colocó en un baño de agua a temperatura ambiente y se añadieron 3,55 ml de bromoacetato de etilo. La mezcla se agitó en un baño de agua hasta que la TLC (20% de metanol/DCM) mostraba que la reacción había terminado. El carbonato precipitado se separó por filtración y se lavó dos veces con 10 ml de DMF. La solución, que estaba un poco turbia, se añadió a 300 ml de agua, con lo que se volvió clara. En un baño de hielo, el compuesto diana precipitó lentamente. Después de la filtración, los cristales se lavaron con etanol frío y se secaron en un desecador. El rendimiento de esta etapa era 3,3 g (44,3%) de acetato de etil cloroguanina.
- 25 2. Acetato de etil cloroguanina (3,3 g) fue disuelto a reflujo en 50 ml de etanol absoluto. Se añadió tiourea (1,08 g). Después de someter a reflujo durante un corto periodo de tiempo, empezó a formarse un precipitado. De acuerdo con la TLC (20% de metanol/DCM) la reacción terminó en 45 minutos. Después de la terminación, la mezcla se enfrió en un baño de hielo. El material precipitado se filtró a continuación y se secó durante una noche en un desecador. El rendimiento de esta etapa fue de 2,0 g (60%) de acetato de etil tioguanina.
- 30 3. El acetato de etil tioguanina (3,57 g) se disolvió en 42 ml de DMF. A continuación, se añadió bromuro de bencilo (2,46 ml) y la mezcla se agitó en un baño de aceite a 45°C. La reacción siguió usando TLC (25% de metanol/DCM). Después de 3 horas, todo el material básico se había consumido. El compuesto diana de la etapa 3 precipitó después de la evaporación a presión reducida y temperatura elevada. El material precipitado recristalizó en etanol absoluto, se filtró y a continuación se secó en un desecador. El rendimiento de esta etapa era 3,88 g (82%) de éster etílico de metil bencil tioguanina.
- 35 4. El éster etílico de metil bencil tioguanina (5,68 g) se disolvió en 12,4 ml de NaOH 2 M y 40 ml de THF, y después se agitó durante 10 minutos. El THF se evaporó. Esto se repitió. El material se disolvió en agua y a continuación se añadieron 6,2 ml de HCl 4 M, mientras que el producto diana precipitaba. Se filtró y se secó en un desecador. El rendimiento de esta etapa era 4,02 g (77%).
- 40 5. El producto de la etapa 4 (4,02 g), 3,45 g de éster etílico del material de la cadena principal, 9 ml de DMF, 3 ml de piridina, 2,1 ml de trietilamina y 7,28 g de PyBop se mezclaron y a continuación se agitaron a temperatura ambiente. Después de 90 minutos, se formó una precipitación sólida. El producto se añadió a 125 ml de DCM y 25 ml de metanol. Esta solución se extrajo a continuación, en primer lugar con una mezcla de 80 ml de NaCitrato 1 M y 20 ml de HCl 4 M, y después con 100 ml de NaHCO₃ acuoso y diluido. La evaporación de la fase orgánica proporcionó un material sólido. El material se disolvió en 175 ml de etanol hirviendo. El volumen de la solución se redujo hasta aproximadamente 100 ml, hirviendo. Después de enfriar en un baño de hielo, el producto diana precipita. Los cristales se filtraron, se lavaron con etanol frío y a continuación se secaron en un desecador. El rendimiento de esta etapa era de 6,0 g (86%).
- 45 6. El producto de la etapa 5 (6,0 g) se disolvió en 80 ml de THF, 7,5 ml de NaOH 2 M y 25 ml de agua. La solución se volvió clara después de diez minutos de agitación. El THF se evaporó. El agua (50 ml) se añadió a la mezcla. Cuando se ajustó el pH por la adición de 3,75 ml de HCl 4 M, el monómero de tioguanina precipitaba. A continuación se filtró, se lavó con agua y se secó en un desecador. El rendimiento de esta etapa era de 5,15 g (91%).
- 50 Éster etílico de ácido diaminopurín-acético
1. Diaminopurina (10 g) y 40 g de K₂CO₃ se añadieron a 85 ml de DMF y se agitaron durante 30 minutos. La mezcla se enfrió en un baño de agua a 15°C. Se añadió bromoacetato de etilo (3 ml) tres veces a intervalos de 20 minutos entre cada adición. Esta mezcla se agitó a continuación durante 20 minutos a 15°C. La mezcla se dejó en el baño de agua durante otros 75 minutos, y la temperatura se incrementó a 18°C. El DMF se eliminó por filtrado y el K₂CO₃ restante se añadió a 100 ml de etanol y se sometió a reflujo durante 5 minutos. El K₂CO₃ se filtró y se sometió a reflujo repetidamente en 50 ml de etanol. Las fases de etanol reunidas se colocaron en un congelador, después de

lo cual se formaron cristales. Estos cristales se filtraron, se lavaron con etanol frío, se filtraron de nuevo y después se secaron en un desecador durante una noche. El rendimiento de esta etapa era de 12 g (76%).

Otros procedimientos generales

Acoplamiento de aminoácidos

- 5 El grupo protector Boc se elimina de la resina con TFA/m-cresol (en una relación de 95/5) 2x5 min. La resina se lavó a continuación con DCM, piridina y DMF, antes del acoplamiento con el aminoácido, que se disuelve en NMP en una concentración entre 0,2 y 0,4 M y se activa con 0,95 eq. de HATU y 2 eq. de DIPEA, durante 2 minutos. El acoplamiento se completa cuando la prueba de Kaiser es negativa. La formación de una cubierta tiene lugar al exponer la resina durante 3 minutos a (Ac)₂O/piridina/NMP (en una relación de 1/2/2). La resina se lava a continuación con DMF y DCM.

Resina de Boc-L₃₀₀-Lys(Fmoc)

A la resina cargada de Boc-Lys(Fmoc), se acopló un enlazador L₃₀ con una concentración de 0,26 M, utilizando un acoplamiento de aminoácidos convencional. Esto se realizó 10 veces proporcionando la resina de Boc-L₃₀₀-Lys(Fmoc).

- 15 Marcación con fluoresceína

Se disolvió 5(6)-carboxi fluoresceína en NMP hasta tener una concentración de 0,2 M. La activación se realizó con 0,9 eq. de HATU y 1 eq. de DIPEA durante 2 minutos, antes del acoplamiento durante al menos 2x20 minutos o hasta que la prueba de Kaiser era negativa.

Síntesis de Fmoc-L30

- 20 Fmoc-L30 es adecuado para preparar conjugados con sustituyentes lábiles frente a ácido. Se disolvieron 23 g de Boc-L30-ácido se disolvieron en 200 ml de TFA y el nitrógeno burbujeó a través de la solución durante 15 min. El TFA se eliminó lo más posible en un evaporador rotatorio dejando 43 g, (aproximadamente 19 g de L30 amino-ácido, 24 g de TFA). Se añadieron 130 ml de acetonitrilo y a continuación 42 ml de trietilamina (1,5 equivalentes en relación con el TFA residual). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 16 g de éster de Fmoc-NHS. Después de 30 minutos, la reacción se completó, y los disolventes se evaporaron de nuevo lo más posible. El residuo se añadió a 300 ml de DCM y 200 ml de agua, en un embudo de separación. El pH de la emulsión se ajustó cuidadosamente con NaOH 2 M, hasta aproximadamente 8, y se formó muy, muy lentamente una fase acuosa clara sobre la emulsión. Después de varias horas, la fase acuosa se recogió, y la emulsión restante se extrajo de nuevo con 200 ml de agua, añadiendo de nuevo un poco de NaOH extra hasta tener un pH 8. De nuevo siguió una separación lenta y las fases acuosas combinadas se recogieron. Se colocaron de nuevo en un embudo de separación, junto con 300 ml de DCM, y con HCl 4 M, se ajustó el pH de la fase acuosa a 3. Después de un cierto tiempo, se separó una solución clara de DCM con el producto, y la fase acuosa se extrajo con 200 ml adicionales de DCM. Las fases combinadas de DCM se evaporaron hasta sequedad para proporcionar 16 g de Fmoc-L30-ácido.

Nomenclatura de los productos representativos

- 35 Una noción estricta de péptido se utiliza para describir los productos ejemplares más abajo. Así, los productos están todos escritos con el extremo N-terminal a la izquierda, el extremo C-terminal a la derecha, indicando un "H" a la extrema izquierda, un amino terminal libre, indicando un "NH₂" a la extrema derecha una carboxamida C-terminal. Cuando los residuos de lisina están sustituidos en el grupo amino de la cadena lateral, esto se indica poniendo el sustituyente entre paréntesis, indicando (NH₂) un grupo amino libre; (Flu) 5/6-carboxifluoresceína; (Cys) cisteína, (betaala) ácido beta-alanina-N,N-diacético. Los residuos de PNA se indican del modo siguiente: A=adenina; C=citosina; D=diaminopurina; G=guanina; Gs=tioguanina; I=inosina; P=2-oxo-pirimidina (pirimidinona); T=timina; U2s=2-tiouracilo.

Las Figuras 6 y 7 representan estructuras representativas de bases nucleicas naturales y no naturales, de monómeros de PNA, de productos intermedios y de derivados de enlazadores.

- 45 Ejemplo 3: Preparación de derivados de enlazadores ejemplares 1-13

1: Ac-L30-Lys(betaala)-NH₂.

- La resina descargada Boc-Lys(Fmoc), 0,5 g, se desprotegió en Fmoc y se sometió a un acoplamiento con beta-alanina-N,N-diacetato de bencilo. A continuación se eliminó el grupo protector Boc, y la resina se sometió a un acoplamiento con L30. El grupo amino terminal protegido con Boc se desprotegió y se acetiló durante 5 minutos con anhídrido acético al 2% en NMP/piridina. El producto se escindió de la resina, se precipitó y se purificó mediante RP-HPLC, a continuación se neutralizó con piridina y se liofilizó para formar un aceite incoloro. El rendimiento era de 25 mg. MS calc. para C₃₅H₆₂N₈O₁₇ era 866,923.

2: Ac-L60-Lys(betaala)-NH₂.

- 5 La resina descargada Boc-Lys(Fmoc), 0,5 g, se desprotegió en Fmoc y se sometió a un acoplamiento con beta-alanina-N,N-diacetato de bencilo. A continuación se eliminó el grupo protector Boc, y la resina se sometió a dos acoplamientos con L30. El grupo amino terminal protegido con Boc se desprotegió y se acetiló durante 5 minutos con anhídrido acético al 2% en NMP/piridina. El producto se escindió de la resina, se precipitó y se purificó mediante RP-HPLC, a continuación se neutralizó con piridina y se liofilizó para formar un aceite incoloro. El rendimiento era de 62 mg. MS calc. para $C_{55}H_{98}N_{12}O_{27}$ era 1359,452.
- 3: Ac-L90-Lys(betaala)-NH₂.
- 10 La resina descargada Boc-Lys(Fmoc), 0,5 g, se desprotegió en Fmoc y se sometió a un acoplamiento con beta-alanina-N,N-diacetato de bencilo. A continuación se eliminó el grupo protector Boc, y la resina se sometió a tres acoplamientos con L30. El grupo amino terminal protegido con Boc se desprotegió y se acetiló durante 5 minutos con anhídrido acético al 2% en NMP/piridina. El producto se escindió de la resina, se precipitó y se purificó mediante RP-HPLC, a continuación se neutralizó con piridina y se liofilizó para formar un aceite incoloro. El rendimiento era de 90 mg. MS calc. para $C_{75}H_{134}N_{16}O_{37}$ era 1851,980.
- 4: MCC-L150-Lys(betaala)-NH₂
- 15 La resina descargada Boc-L150-Lys(Fmoc), 0,25 g, se desprotegió en Fmoc y se sometió a un acoplamiento con beta-alanina-N,N-diacetato de bencilo. A continuación se eliminó el grupo protector Boc y el producto se escindió de la resina, y se precipitó. El producto bruto se resuspendió en 1 ml de NMP y 0,25 ml de DIPEA y se añadieron 14 mg de ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-14-(N-maleimidometilo) (Pierce 22360). La reacción se completó después de 1 h. El producto se precipitó en éter dietílico y se purificó mediante RP-HPLC, se neutralizó con DIPEA y se liofilizó para formar un aceite incoloro. El rendimiento era de 35 mg. MS calc. para $C_{125}H_{217}N_{25}O_{59}$ era 3014,239.
- 20 5: Flu-L120-Lys(NTA)-NH₂
- 25 La resina descargada Boc-Lys(2-Cl-Z), 500 mg, se desprotegió en Boc y se sometió a dos acoplamientos con Boc-L60-OH. El grupo Boc se eliminó y la carboxifluoresceína, 150 mg, se activó con HBTU, 136 mg, y se añadieron a la resina DIPEA, 70 µl, en 2 ml de NMP. Después de 1 h de acoplamiento, la resina se lavó y se trató con piperidina al 20% en DMF durante 5 min. La resina se lavó con TFA y el producto intermedio (Flu-L120-Lys(NH₂)-NH₂) se escindió de la resina y precipitó en éter dietílico. El producto se resuspendió en 500 µl de NMP y se añadieron 100 µl de DIPEA y de éster NTA-ditercbutílico, 9 mg, activados con hexafluorofosfato de succinimidil-N,N,N',N'-tetrametiluronio, 10 mg, y 10 µl de DIPEA en 50 µl de NMP. Después de 10 minutos de reacción, se añadieron 50 µl de piperidina, y después de otros 5 minutos, el producto fue precipitado en éter dietílico. El producto se disolvió en 500 µl de TFA, 50 µl de TFMSA, 50 µl de m-cresol, y después de 10 minutos, precipitó de nuevo y se purificó mediante RP-HPLC. El rendimiento era de 26 mg. MS calc. para $C_{113}H_{176}N_{20}O$ era 2646,752, y la MS medida era 2646.
- 30 6: DNP-L120-Lys(Rho)-L120-Lys Lys(NH₂)-NH₂
- 35 La resina descargada Boc-Lys(2-Cl-Z), 55 mg, se desprotegió en Boc y se sometió a dos acoplamientos con Boc-L60-OH. Boc-Lys(Fmoc) se acopló a continuación, seguido por otros dos acoplamientos con Boc-L60-OH. El grupo Fmoc se eliminó y el ácido tetrametilrodamin carboxílico, 17 mg, se activó con hexafluorofosfato de succinimidil-N,N,N',N'-tetrametiluronio, 14 mg, y DIPEA, 13 µl, en 400 µl de NMP se añadió a la resina. Después de 30 minutos, la resina se lavó y se desprotegió en Boc, seguido por tratamiento con 2,4-dinitrofluorobenceno, 19 mg, y DIPEA, 35 µl, en 400 µl de NMP. El producto se escindió de la resina, precipitó en éter dietílico y se purificó mediante RP-HPLC. Rendimiento 6,5 mg. MS calc. para $C_{203}H_{336}N_{41}O_{90}$ era 4791,135, mientras que la MS encontrada era 4778,3. (el DNP pierde oxígeno en MS)
- 40 7: Flu-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(NTA)-NH₂
- 45 La resina descargada Boc-Lys(2-Cl-Z), 200 mg, se desprotegió en Boc y se sometió a dos acoplamientos con Boc-L60-OH. Boc-Lys(Fmoc) se acopló a continuación, seguido por otros dos acoplamientos con Boc-L60-OH. Se eliminaron los grupos Boc y Fmoc y la carboxifluoresceína, 75 mg, se activó con HBTU, 68 mg, y se añadió DIPEA, 35 µl, en 1 ml de NMP, a la resina. Después de 1 h de acoplamiento, la resina se lavó y se trató con piperidina al 20% en DMF durante 5 min. La resina se lavó con TFA y el producto intermedio (Flu-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(NH₂)-NH₂) se escindió de la resina y se precipitó en éter dietílico. El producto se resuspendió en 500 µl de NMP y 100 µl de DIPEA y éster NTA-di tercbutílico, 9 mg, se activó con hexafluorofosfato de succinimidil-N,N,N',N'-tetrametiluronio, 10 mg, y se añadieron 10 µl de DIPEA en 50 µl de NMP. Después de 10 minutos de reacción, se añadieron 50 µl de piperidina, y después de otros 5 minutos, el producto precipitó en éter dietílico. El producto se disolvió en 500 µl de TFA, 50 µl de TFMSA, 50 µl de m-cresol, y después de 10 minutos, precipitó de nuevo y se purificó mediante RP-HPLC. El rendimiento era de 38 mg. MS calc. para $C_{220}H_{342}N_{38}O_{99}$ era 5103,347, mientras que la MS medida era 5094.
- 50 8: Rho-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(betaala)Lys(betaala)-NH₂
- 55 La resina descargada Boc-Lys(Fmoc), 100 mg, se desprotegió en Boc y se sometió a un acoplamiento con Boc-Lys(Fmoc)-OH. Se eliminaron dos grupos Fmoc y se sometió a un acoplamiento con beta-alanina-N,N-diacetato de bencilo, acoplado a los dos grupos amino de la cadena lateral. La síntesis continuó con 4 x Boc-L30-OH, Boc-

Lys(Fmoc)-OH y después 4 x Boc-L30-OH. Se eliminó el grupo Fmoc y la carboxifluoresceína, 37 mg, activada con HBTU, 34 mg, y DIPEA, 17 μ l, en 0,5 ml de NMP, se añadió a la resina durante 30 min. A continuación se eliminó el grupo Boc terminal y se añadió a la resina ácido tetrametilrodamin carboxílico, 17 mg, activado con hexafluorofosfato de succinimidil-N,N,N',N'-tetrametiluronio, 14 mg, y DIPEA 13 μ l, en 400 μ l de NMP,. Después de 30 minutos de acoplamiento, la resina se trató con piperidina al 20% en NMP. La resina se lavó con DCM, después con TFA, y el producto se escindió de la resina, precipitó en éter dietílico, y se purificó mediante RP-HPLC. El rendimiento era de 8 mg. MS calc. para $C_{238}H_{375}N_{43}O_{103}$ era 5486,838, mientras que la MS encontrada era 5478,3.

9: Flu-L90-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-L60-Lys(betaala)-Lys(betaala)-NH₂

La resina descargada Boc-Lys(Fmoc), 250 mg, se desprotegió en Boc y se sometió a un acoplamiento con Boc-Lys(Fmoc)-OH. Se eliminaron los dos grupos Fmoc y beta-alanina-N,N-diacetato de bencilo se acopló a los dos grupos amino de la cadena lateral. La síntesis continuó con 2 x Boc-L30-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH, 3 x Boc-L30-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH y finalmente con 3 x Boc-L30-OH. Se eliminaron los dos grupos Fmoc, a continuación el grupo Boc terminal. La carboxifluoresceína, 75 mg, activada con HBTU, 68 mg, y DIPEA, 35 μ l, en 1 ml de NMP, se añadió a la resina dos veces durante 30 minutos, seguido por 5 min de tratamiento con piperidina al 20% en NMP. La resina se lavó con DCM, después con TFA, y el producto se separó de la resina por escisión, precipitó en éter dietílico y se purificó mediante RP-HPLC. El rendimiento era de 25 mg. MS calc. para $C_{261}H_{387}N_{43}O_{112}$ era 5919,183, mientras que la MS encontrada era 5030.

10: Flu-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(betaala)-Lys(betaala)-NH₂

La resina descargada Boc-Lys(Fmoc), 250 mg, se desprotegió en Boc y se sometió a un acoplamiento con Boc-Lys(Fmoc)-OH. Se eliminaron los dos grupos Fmoc y se acopló beta-alanina-N,N-diacetato de bencilo a los dos grupos amino de la cadena lateral. La síntesis continuó con 4x Boc-L30-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH, 4x Boc-L30-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH y finalmente con 4x Boc-L30-OH. Se eliminaron los dos grupos Fmoc, a continuación el grupo Boc terminal. La carboxifluoresceína, 75 mg, activada con HBTU, 68 mg, y DIPEA, 35 μ l, en 1 ml de NMP se añadió a la resina dos veces durante 30 minutos, seguido por 5 minutos de tratamiento con piperidina al 20% en NMP. La resina se lavó con DCM, después con TFA y el producto se separó de la resina por escisión, precipitó en éter dietílico y se purificó mediante RP-HPLC. El rendimiento era de 34 mg. MS calc. para $C_{341}H_{531}N_{59}O_{152}$ era 7889,296, mientras que la MS encontrada era 7885.

11: Flu-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(betaala)-Lys(betaala)-NH₂

La resina descargada Boc-Lys(Fmoc), 250 mg, se desprotegió en Boc y se sometió a un acoplamiento con Boc-Lys(Fmoc)-OH. Se eliminaron los dos grupos Fmoc y beta-alanina-N,N-diacetato de bencilo se acopló a los dos grupos amino de la cadena lateral. La síntesis continuó con 4 x Boc-L30-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH, 4 x Boc-L30-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH, 4 x Boc-L30-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH y finalmente con 4 x Boc-L30-OH. Se eliminaron los tres grupos Fmoc, a continuación el grupo Boc terminal. La carboxifluoresceína, 75 mg, activada con HBTU, 68 mg, y DIPEA, 35 μ l, en 1 ml de NMP se añadió a la resina dos veces durante 30 minutos, seguido por 5 minutos de tratamiento con piperidina al 20% en NMP. La resina se lavó con DCM, después con TFA y el producto se separó por escisión de la resina, precipitó en éter dietílico y se purificó mediante RP-HPLC. El rendimiento era de 25 mg. MS calc. para $C_{448}H_{697}N_{77}O_{199}$ era 10345,89, mientras que la MS encontrada era 10336.

12: Flu-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(Flu)-L120-Lys(betaala)-NH₂

La resina descargada Boc-Lys(Fmoc) se desprotegió en Fmoc y el beta-alanina-N,N-diacetato de bencilo se acopló al grupo amino de la cadena lateral. Cincuenta mg de esta resina se utilizaron para la síntesis en fase sólida automatizada, el acoplamiento de la secuencia 4 x Boc-L30-OH, a continuación Boc-Lys(Fmoc)-OH cuatro veces y finalmente 4 x Boc-L30-OH. Se eliminaron los cuatro grupos Fmoc y el grupo Boc terminal, y la resina se sometió a una marcación con carboxifluoresceína durante 3 x 1 h. La resina se trató con piperidina al 20% en DMF, se lavó con NMP, DCM, TFA y el producto se separó por escisión. Después de la precipitación con éter dietílico, se purificó mediante RP-HPLC. El rendimiento era de 7 mg. MS calc. para $C_{542}H_{942}N_{92}O_{240}$ era 12487,16, mientras que la MS encontrada era 12463.

13: (betaala)-L60-Lys(Flu)-L240-TGTACCTTGA-NH₂

La resina descargada Boc-PNA-A, 50 mg, se utilizó para la síntesis automatizada en un sintetizador de péptidos 433A. En primer lugar se acoplaron los 9 monómeros apropiados de PNA, después 8 x Boc-L30-OH, entonces Boc-Lys(Fmoc)-OH y finalmente de nuevo 2 x Boc-L30-OH. A continuación, la resina se desprotegió en Boc manualmente, se acopló con beta-alanina-N,N-diacetato de bencilo, a continuación se desprotegió en Fmoc y se marcó con carboxifluoresceína sobre la cadena lateral de lisina. El producto se separó de la resina por escisión, precipitó en éter dietílico y se purificó mediante RP-HPLC. El rendimiento era de 4,5 mg. MS calc. para $C_{342}H_{528}N_{98}O_{144}$ era 8316,547, mientras que la MS encontrada era 8318.

Ejemplo 4: Derivados de enlazadores 14-19 y sus intensidades de fluorescencia

Los siguientes 6 PNAs con la misma secuencia pero con diferente enlazador, y las estructuras artificiales de fluores-

ceína en uno o en ambos extremos del PNA, se prepararon por síntesis convencionales en fase sólida.

14: Ac-Lys(Flu)-L30-AACGGGATAACTGCACCT-L30-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-NH₂. PM calc. para C₃₇₆H₄₈₈N₁₃₄O₁₂₃ 8852,852; encontrado 8855.

5 15: Ac-Lys(Flu)-L30-AACGGGATAACTGCACCT-L30-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-NH₂. PM cal. para C₄₆₃H₆₁₈N₁₄₈O₁₆₀ 10816,92; encontrado 10819.

16: H-Lys(Flu)-L30-AACGGGATAACTGCACCT-L30-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-L90-Lys(Flu)-NH₂. PM calc. para C₄₆₁H₆₁₅N₁₄₈O₁₅₉ 10773,87; encontrado 10777.

17: (Flu-L60)₂-Lys-L30-AACGGGATAACTGCACCT-NH₂. PM calc. para C₃₄₁H₄₅₂N₁₃₀O₁₁₄ 8196,159; encontrado 8197.

10 18: Flu-L30-AACGGGATAACTGCACCT-NH₂. PM calc. para C₂₃₄H₂₈₆N₁₁₂O₆₇ 5739,564; encontrado 5741,9.

19: ((Flu-L60)₂-Lys-L60)₂-Lys-L30-AACGGGATAACTGCACCT-NH₂. PM calc. para C₅₅₅H₇₈₄N₁₆₆O₂₀₈ 13109,35; encontrado 13113,6.

15 La secuencia de PNA se dirigió hacia una secuencia de ADN repetitiva en el centrómero del cromosoma humano 17, permitiendo la comparación de los PNAs mediante FISH en las metafases. Para eliminar la variación del espécimen, se mezcló cada uno de los PNAs con un PNA rojo fluorescente dirigido a la misma región del centrómero en el cromosoma 17, y la intensidad de las señales rojas y verdes se comparó visualmente y se cuantificó con la función "Medición. Intensidad" en el programa QFISH de Leica.

20 La intensidad de la señal verde obtenida a partir de diferentes PNAs marcados con fluoresceína, se incrementaba con el número de fluoresceínas en el PNA, indicando poca extinción o ninguna de los fluoróforos. Los derivados 15, 16 y 19, que comprendían cada uno 4 fluoróforos, dieron señales más intensas. La más intensa de las tres sondas era el derivado 16, indicando que su grupo amino extra N-terminal libre, en relación con el derivado 15, incrementaba su afinidad hacia el ADN. El derivado 16 era también más intenso que el derivado 19, indicando que el diseño lineal de 16 proporcionaba a la sonda un acceso más fácil al ADN que el diseño similar a un dendrímero ramificado de 19.

25 La intensidad de la fluorescencia de los conjugados de PNA, de acuerdo con esta invención, también se comparó con la de PNAs marcados de forma convencional, sin enlazadores. Convencionalmente, el tamaño de la secuencia de PNA limita el número de fluoróforos que se pueden fijar. Por ejemplo, solamente dos fluoróforos se pueden fijar típicamente a un PNA de 20-meros, ya que la extinción se convierte en un problema con un número elevado de fluoróforos. Además, las bases de guanina extinguen los fluoróforos cercanos, de modo que la intensidad de una sonda de PNA marcada individualmente desciende típicamente hasta aproximadamente 20-60% de la intensidad del fluoróforo solo en solución. En cambio, los presentes derivados de enlazadores mitigan esas limitaciones. Los derivados de enlazadores que comprenden PNAs se pueden marcar con cuatro marcadores fluorescentes, por ejemplo, proporcionando 200% de la intensidad de una sonda fluorescente libre en solución.

Ejemplo 5: Derivados de enlazadores 20-23

35 Conjugados de proteína y sus intensidades fluorescentes

40 Los derivados de enlazadores 9, 10 y 11 se utilizaron para el acoplamiento con estreptavidina. Los restos de ácido betaalanina-N,N-diacético sobre los enlazadores se convirtieron en anhídridos cíclicos amino-reactivos por medio del tratamiento con diisopropil carbodiimida. Encontramos que este método de activación era particularmente adecuado para la conjugación en medios acuosos ligeramente básicos, y era superior a la activación con NHS-éster y con otros anhídridos cíclicos, tales como ácido nitrilotriacético (NTA). (Véase la figura 4 para una representación de la activación de Lys(betaala).) No sólo se formaban anhídridos cíclicos de ácido betaalanina-N,N-diacético cuantitativamente en 30 minutos, también mostraban una selectividad elevada para reaccionar con grupos amino sobre proteínas, más que para ser hidrolizados en agua.

45 Procedimiento típico: El derivado de enlazador 10, 1 micromolar, se disolvió en 86 µl de NMP y 4 µl de piridina. Una vez que se completó la disolución, se añadieron 10 µl de diisopropil carbodiimida y se permitió que la mezcla reposara durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para confirmar que había tenido lugar la conversión a anhídrido cíclico, 1 µl de la mezcla se hizo reaccionar con un gran exceso de amina primaria (véase, p. ej., la estructura 3 de la figura 1, 493 Da). La espectroscopía de masas MALDI-TOF confirmó que la activación deseada había tenido lugar. El enlazador activado precipitó en éter dietílico, se secó brevemente en una corriente de nitrógeno, y se disolvió de nuevo en una solución de 2,6 mg de estreptavidina (50 nmol) en 100 µl de hidrogenocarbonato de sodio 150 mM, pH 8,0. La reacción se completó después de 10 min. El producto se purificó mediante cromatografía por exclusión de tamaño en una columna 200 de SUPERDEX[®]. La espectroscopía de masas y las mediciones UV mostraban que 4 moléculas que comprendían enlazador con un total de 12 fluoresceínas, se habían fijado a la estreptavidina.

Usando el procedimiento anterior, se prepararon los siguientes 4 conjugados:

20: Estreptavidina con 4 derivados de enlazadores, comprendiendo cada uno el derivado 9 anterior. El conjugado comprendía en total, 12 fluoresceínas con espaciadores L90 entre los fluoróforos.

21: Estreptavidina con 8 derivados de enlazadores, comprendiendo cada uno el derivado 9. En total, el conjugado comprendía 24 fluoresceínas espaciadores L90 entre los fluoróforos.

5 22: Estreptavidina con 4 derivados de enlazadores, comprendiendo cada uno el derivado 10 anterior. En total, el conjugado comprendía 12 fluoresceínas con espaciadores L120 entre los fluoróforos.

23: Estreptavidina con 4 derivados de enlazadores, comprendiendo cada uno el derivado 11 anterior. En total, el conjugado comprendía 16 fluoresceínas con espaciadores L120 entre los fluoróforos.

10 Se determinó la fluorescencia de los tres derivados de enlazadores 9, 10 y 11, los 4 conjugados de estreptavidina 20, 21, 22 y 23, y un conjugado de estreptavidina marcado convencionalmente con FITC, con dos fluoresceínas fijadas (F422 de Dako con 2 FITC/estreptavidina). Todos los compuestos se prepararon como soluciones totales de fluoresceína 100 nm en carbonato 150 mM pH 8, usando carboxi fluoresceína libre 100 nM como referencia para la normalización de las intensidades relativas. Las soluciones se excitaron a 488 nm, y la intensidad de la fluorescencia se leyó a 520 nm. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Compuesto	Intensidad a 520 nm (unidades arbitrarias)	Intensidad relativa para cada fluoresceína	Intensidad total para un compuesto = intensidad relativa x nº de fluoresceínas
carboxi fluoresceína	884	1.000 (referencia)	1.000 (referencia)
9	517	0,58	1,75
10	592	0,67	2,01
11	535	0,61	2,42
20	233	0,26	3,16
21	161	0,29	3,53
22	260	0,18	4,38
23	240	0,27	4,34
F422	411	0,46	0,93

15 Tal y como se puede observar, los derivados de enlazadores de la presente invención, son hasta varias veces más intensos que la estreptavidina marcada convencionalmente con F422. Además, tal y como se esperaba, cuanto más largos son los enlazadores y, por lo tanto, mayor era la separación entre los fluoróforos individuales, se observaba menos extinción. De hecho, se observó una ligera extinción en los derivados de enlazadores libres 9, 10 y 11, indicando fuertemente que los enlazadores se habían extendido completamente en agua.

20 Cuantos más enlazadores se incorporaban en el mismo conjugado, la extinción se incrementaba evidentemente, ya que los enlazadores se inmovilizaban sobre la estreptavidina. (Compárese 20 a 21, por ejemplo). Sin embargo, el número absoluto de fluoresceínas que se podrían conjugar a través de los derivados de enlazadores compensó fácilmente esto, permitiendo la preparación de conjugados con 4-5 veces la intensidad fluorescente utilizada normalmente en métodos convencionales, de la técnica anterior.

25

Ejemplo 6: Derivados de enlazadores que comprenden PNAs con bases no naturales

Parte A: Realizaciones ejemplares de secuencias de PNA

Todos preparados por procedimientos convencionales de PNA (véase el Ejemplo 2)

DENOMINACIÓN DE LA SECUENCIA	SECUENCIAS DE PNA ¹	N-TERMINAL	C-TERMINAL	PESO MOLECULAR
SEQ. AA	TCD-DG _S G _S -TAC-A	FLU-L ₃₀ -	-LYS(CYS)	8805
SEQ. AB	U _S GU _S -DPP-TTG-D	FLU-L ₃₀ -	-LYS(CYS)	8727
SEQ. AC	CU _S G _S -G _S DD-TU _S D-G _S DC	FLU-L ₃₀ -	-LYS(CYS)	9413
SEQ. AD	GTP-TAA-TTP-PAG	FLU-L ₃₀ -	-LYS(CYS)	9203
SEQ. AE	DG _S T-CG _S D-DG _S G-U _S CU _S	FLU-L ₃₀ -	-LYS(CYS)	9413
SEQ. AF	AGA-CPT-TPG-APT	FLU-L ₃₀ -	-LYS(CYS)	9187
SEQ. AG	TCD-DI I-TAC-A	FLU-L ₃₀ -	-LYS(CYS)	8742

¹ Flu es fluoresceína; T es tiamina; C es citosina; D es diaminopurina; G_S es tioguanina; A es adenina; U_S es 2/4-tiouracilo; G es guanina; P es pirimidinona; I es inosina.

5 Parte B - Tres PNAs con el enlazador L₃₀ con diferentes aminoácidos en el extremo C-terminal

BA: Flu-L₃₀-DGT-DTC-GTD-CCG-Lys(acetilo)

BB: Flu-L₃₀-DGT-DTC-GTD-CCG-Lys(Cys)

BC: Flu-L₃₀-DGT-DTC-GTD-CCG-Lys(Lys)₃

Parte C - Síntesis de Flu-L₉₀-Lys(Flu)-L₉₀-Lys(Cys)

- 10 Usando el procedimiento de resina descargada, proporcionado en el Ejemplo 2, se cargó una resina MBHA con Boc-Lys(Dde)-OH. Usando un sintetizador de péptidos, los aminoácidos se acoplaron según el procedimiento en fase sólida de PNA, proporcionado en el Ejemplo 2, proporcionando Boc-L₉₀-Lys(Fmoc)-L₃₀-Lys(Dde). Los grupos protectores Boc y Fmoc se eliminaron y los grupos amino se marcaron con fluoresceína usando el procedimiento en el Ejemplo 2. A continuación se eliminó el grupo protector Dde y se añadió cisteína 0,4 M, de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2. El PNA se escindió de la resina, se precipitó en éter y se purificó mediante HPLC de acuerdo con el Ejemplo 2. Se encontró que el producto tenía un peso molecular de 3062 empleando la espectrometría de masas de MALDI-TOF; el peso molecular calculado era 3061.

Ejemplo 7: Síntesis de conjugados de dextrano

Conjugado preparado a partir de la secuencia AA del Ejemplo 6, DexVS70, y Flu(10)

- 20 El dextrano (con un peso molecular de 70 kDa) se activó con divinilsulfona hasta un nivel de 92 grupos reactivos/polímero de dextrano; este producto se designa DexVS70.

280 µl de DexVS70 20 nmol
66 µl de Flu₂Cys 160 nmol (preparado a partir del Ejemplo 8)
25 µl de NaHCO₃ 0,8 M pH = 9,5
29 µl de H₂O

- 30 Los cuatro compuestos anteriores se mezclaron. La mezcla se colocó en un baño de agua a 30°C durante 16 horas. La mezcla se añadió a 50 nmol de PNA liofilizado (secuencia AA). La mezcla se colocó en un baño de agua a 30°C, durante 30 minutos. La reacción de conjugación se extinguió rápidamente con 50 µl de cisteína 500 mM durante 30 minutos a 30°C. La purificación del producto se realizó usando FPLC: columna SUPERDEX[®] - 200, tampón Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, método 7 banco 2, bucle 1 ml. Se recogieron dos fracciones: una con el producto y otra con el residuo. La absorbancia relativa Flu₂ ($\epsilon_{500 \text{ nm}} = 146000 \text{ M}^{-1}$, $\epsilon_{260 \text{ nm}} = 43350 \text{ M}^{-1}$) y PNA ($\epsilon_{500 \text{ nm}} = 73000 \text{ M}^{-1}$, $\epsilon_{260 \text{ nm}} = 104000 \text{ M}^{-1}$) se utilizó para calcular proporción promedio de conjugación de Flu₂, PNA y DexVS70. La proporción promedio de conjugación entre Flu₂ y DexVS70 era 9,4. La proporción de conjugación entre PNA (secuencia AA) y DexVS70 era 1,2.

35 HRP-DexVS70-Sec. AA

Usando el procedimiento para la síntesis convencional del conjugado HRP-DexVS70-PNA, se preparó el conjugado HRP-DexVS70-Sec. AA. La proporción entre HRP y DexVS70 es 12,2; la proporción entre Sec. AA y Dex70 es 1,2.

GaM-DexVS70-Sec. AB

La síntesis de GaM-DexVS70-Sec. AB se realizó usando el procedimiento del Ejemplo 17 con los siguientes cambios tal y como se indican.

5 El dextrano (peso molecular 70 kDa) se activa con divinilsulfona hasta un nivel de 92 grupos reactivos/polímero de dextrano.

105,0 µl de DexVS70 7,5 nmol
 57,0 µl de inmunoglobulina de cabra anti-ratón (GAM-Ig) 15 nmol
 8,9 µl de NaCl 4 M
 10,6 µl de NaHCO₃ 0,8 M (pH = 9,5)
 10 144,5 µl de H₂O

15 Los cinco componentes anteriores se mezclaron y se colocaron en un baño de agua a 30°C, durante 40 minutos. Doscientos noventa µl se tomaron de la mezcla y se añadieron a 100 nmol de Sec. AB, que se había disuelto previamente en 80 µl de H₂O. A continuación, 20 µl de NaHCO₃ 0,8 M (pH 9,5) se añadieron y la mezcla se colocó en un baño de agua a 30°C durante 1 hora. La extinción se realizó añadiendo 39 µl de cisteína 500 mM y dejando reposar la mezcla resultante durante 30 minutos a 30°C.

20 La purificación del producto mediante FPLC: columna SUPERDEX® - 200, tampón Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, método 7 banco 2, bucle de 1 ml. Se recogieron dos fracciones: una con el producto y otra con el residuo. La absorbancia relativa de PNA(Flu) ($\epsilon_{500\text{ nm}} = 73000\text{ M}^{-1}$) y GAM ($\epsilon_{278\text{ nm}} = 213000\text{ M}^{-1}$) (factor de corrección para PNA a 278 nm es debido al PNA específico y se calcula: 278/500 nm) se utilizó para calcular proporción promedio de conjugación de PNA, GAM y DexVS70. La proporción entre PNA y DexVS70 era de 5,3 y la proporción entre GAM y DexVS70 era 0,8.

Realizaciones ejemplares de los conjugados PNA1-DexVS-PNA2

Denominación del conjugado	proporción	PNA1	PNA1 nmol	PNA1 frente a DexVS	PNA2	PNA2 nmol	PNA2 frente a DexVS	DexVS
Conj. CA	1:9	Sec. AA	12,5	1,02	Sec. AD	100	8,2	DexVS70
Conj. CB	1:6	Sec. AC	40	1,5	Sec. AB	200	7,4	DexVS70
Conj. CC	1:16	Sec. AC	13,3	0,84	Sec. AB	200	12,7	DexVS150
Conj. CD	1:6	Sec. AC	40	2,3	Sec. AB	200	11,5	DexVS150

25 Todos los conjugados se prepararon mediante procedimientos de conjugación convencionales, descritos para la síntesis de PNA1-DexVS70-PNA2.

BCL2 anti-humano-DexVS70-PNA

El dextrano (peso molecular 70 kDa) se activó con divinilsulfona hasta un nivel de 92 grupos reactivos/polímero de dextrano, y se denominó DexVS70. El anticuerpo BCL2 anti-humano se designó AHB.

30 105 µl de DexVS70 7,5 nmol
 800 µl de AHB conc. (2,9 g/l) 15,1 nmol
 25 µl de NaCl 4 M
 32 µl de NaHCO₃ 0,8 M (pH = 9,5)

35 Los cuatro compuestos anteriores se mezclaron y se colocaron en un baño de agua a 30°C durante 65 minutos. De esta mezcla, se tomaron 875 µl y se añadieron al número indicado de nmol de PNA en la tabla más abajo; antes de la adición, el PNA se había sido disuelto en los µl de H₂O indicados en la tabla más abajo. A continuación, se añadió el número de µl de NaHCO₃ 0,8 M (pH 9,5), de acuerdo con la tabla más abajo. La mezcla resultante se colocó en un baño de agua a 30°C durante 70 minutos. La extinción se realizó añadiendo 6 mg de cisteína sólida (0,05 M) a la mezcla y dejándola reposar durante 30 minutos a 30°C.

40 Purificación del producto mediante FPLC: columna SUPERDEX® - 200, tampón Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, método 7 banco 2, bucle de 1 ml. Se recogieron dos fracciones: una con el producto y otra con el residuo. La absorbancia relativa de PNA(Flu) ($\epsilon_{500\text{ nm}} = 73000\text{ M}^{-1}$) y AHB ($\epsilon_{278\text{ nm}} = 213000\text{ M}^{-1}$) (el factor de corrección para PNA a 278 nm es debido al PNA específico y se calcula: 278/500 nm) se utilizó para calcular la proporción promedio de conjugación de PNA, AHB y DexVS70.

Conjugados con diferentes proporciones de PNA

Denominación del conjugado	nmol de PNA añadidos	µl de H ₂ O añadidos	µl de NaHCO ₃ 0,8 M (pH 9,5) añadidos	PNA frente a DexVS70	AHB frente a DexVS70
Conj. DA	100	75	25	9,5	1,6
Conj. DB	33	30	10	2,9	1,2
Conj. DC	67	60	20	5,6	1,1

Ejemplo 7: Síntesis en fase sólida y purificación de Lys(Flu)-L₃₀-chr 17: 14-L₃₀-Lys(Flu)-L₉₀-Lys(Flu)-L₉₀-Lys(Flu)

Todos los procedimientos convencionales se describen en el Ejemplo 2.

5 1. Una resina MBHA se cargó con Boc-L₃₀-Lys(Fmoc)-L₉₀-Lys(Fmoc)-L₉₀-Lys(Fmoc) usando un procedimiento de carga convencional para una carga de 0,084 mmol/g.

10 2. A esta resina, se acopló Boc-Lys(Fmoc)-L₃₀-AAC-GGG-ATA-ACT-GCA-CCT- usando el sintetizador de péptidos, después de una reacción química en fase sólida convencional de PNA. Se eliminaron los grupos protectores Fmoc y los grupos amino se marcaron con fluoresceína. Después de escindir y precipitar, el PNA se disolvió en TFA. El material precipitado se lavó con éter. El material precipitado se disolvió en 200 µl de NMP. A esta solución se añadieron 6 mg de Fmoc-Osu y se disolvió. A continuación, se añadió DIPEA (9 µl) y la reacción se vigiló usando la espectrometría de masas de MALDI-TOF. Después de 30 minutos, la reacción terminó y el PNA precipitó y se lavó con éter.

15 La HPLC después de disolver el PNA en 30% de CH₃CN y 10% de TFA/H₂O, proporcionó tres fracciones puras. Las fracciones se reunieron y se liofilizaron. El PNA liofilizado se disolvió a continuación en 192 µl de NMP. La piperidina (4 µl) y 4 µl de DBU se añadieron a esta solución que se dejó reposar durante 30 minutos. El análisis por espectrometría de masas de MALDI-TOF proporcionó un peso molecular de 10777.

El material precipitado se lavó con éter y después se disolvió en 100 µl de TFA. El material precipitado se lavó con éter y a continuación se secó empleando gas N₂.

Ejemplo 8: Síntesis convencional del conjugado HRP-DexVS70-PNA

20 El dextrano (peso molecular 70 kDa) se activa con divinilsulfona hasta un nivel de 92 grupos reactivos/polímero de dextrano.

25 192 µl de DexVS70 13,7 nmol
255 µl de peroxidasa de rábano picante (HRP) 602 nmol
15 µl de NaCl 4 M
19 µl de NaHCO₃ 0,8 M pH = 9,5
119 µl de H₂O

30 Los cinco componentes anteriores se mezclaron entre sí, y se colocaron en un baño de agua a 30° C durante 16 horas. Quinientos microlitros de esta mezcla se añadieron a PNA 50 nmol, que se había disuelto previamente en 40 µl de H₂O. A continuación, se añadieron 10 µl de NaHCO₃ 0,8 M (pH 9,5). La mezcla se colocó a continuación en un baño de agua a 30°C, durante 2 horas. La extinción se realiza añadiendo 55 µl de cisteína 110 mM y dejando reposar la mezcla resultante durante 30 minutos a 30°C.

La purificación del producto se realiza mediante FPLC: columna SUPERDEX® - 200, tampón Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, método 7 banco 2, bucle de 1 ml.

35 Se recogieron dos fracciones: una con el producto y otra con el residuo. La absorbancia relativa de HRP ($\epsilon_{404 \text{ nm}} = 83000 \text{ M}^{-1}$, $\epsilon_{500 \text{ nm}} = 9630 \text{ M}^{-1}$) y PNA(Flu) ($\epsilon_{500 \text{ nm}} = 73000 \text{ M}^{-1}$) se utilizó para calcular la proporción promedio de conjugación de HRP, PNA y DexVS70.

Ejemplo 9: Métodos adicionales de síntesis de AP-DexVS70-PNA

Conjugado

40 La fosfatasa alcalina ("AP") (de intestino de ternera, calidad de EIA) se dializó durante una noche frente a HEPES 2mM, pH 7,2; NaCl 0,1 M; ZnCl₂ 0,02 mM. El dextrano (peso molecular 70 kDa) se activó con divinilsulfona hasta un nivel de 92 grupos reactivos por polímero de dextrano (DexVS70).

Los tres componentes más abajo se mezclaron entre sí y se colocaron en un baño de agua a 40°C, durante 30 minutos.

192,0 µl de DexVS70 13,7 nmol
 41,0 µl de PNA PNA 41 mmol disuelto en H₂O
 6,0 µl de NaHCO₃ 1 M

Se recogieron 108,0 µl del conjugado DexVS70-PNA y se añadieron a una mezcla de:

5 160,0 µl de AP 43,4 nmol
 7,7 µl de NaHCO₃ 1 M
 30,6 µl de Hepes de 20 mM, pH 7,2; NaCl 1 M; MgCl₂ 500 mM ; ZnCl₂ 1 mM

10 La mezcla se colocó en un baño de agua a 40°C durante 3 horas. La extinción se realizó añadiendo 30,6 µl de etanolamina 0,1 M y dejando reposar la mezcla durante 30 minutos en un baño de agua a 40°C. El producto se purificó mediante FPLC con: Columna SUPERDEX® - 200, tampón: Hepes 200 mM, pH 7,2; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 5 mM; ZnCl₂ 0,1 mM. Se recogieron dos fracciones: una con el producto y otra con el residuo.

En comparación con el experimento descrito anteriormente, se preparó otro conjugado con un tiempo de conjugación extendido. Los tres componentes más abajo se mezclaron entre sí y se colocaron en un baño de agua a 40°C durante 30 minutos.

15 192,0 µl de DexVS70 13,7 nmol
 41,0 µl de PNA PNA 41 mmol disuelto en H₂O
 6,0 µl de NaHCO₃ 1 M

108,0 µl del conjugado DexVS70-PNA se retiraron y se añadieron a una mezcla de:

20 160,0 µl de AP 43,4 nmol
 7,7 µl de NaHCO₃ 1 M
 30,6 µl de Hepes 20 mM, pH 7,2; NaCl 1 M; MgCl₂ 50 mM; ZnCl₂ 1 mM

25 La mezcla se colocó en un baño de agua a 40°C durante 5 horas. La extinción se realizó añadiendo 30,6 µl de etanolamina 0,1 M y dejando reposar la mezcla durante 30 minutos en un baño de agua a 40°C. Purificación del producto en FPLC: Columna SUPERDEX® - 200, tampón: Hepes 2 mM, pH 7,2; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 5 mM; ZnCl₂ 0,1 mM. Se recogieron dos fracciones: una con el producto y otra con el residuo.

La absorbancia relativa de PNA(Flu) ($\epsilon_{500 \text{ nm}} = 73000 \text{ M}^{-1}$) y AP ($\epsilon_{278 \text{ nm}} = 140000 \text{ M}^{-1}$). Corregido para la absorbancia de PNA a 278 nm, este factor de corrección es debido al PNA específico y se calcula: $278/500 \text{ nm}$) se utilizó para calcular la proporción promedio de conjugación de PNA, AP y DexVS70.

AP-DexVS70-PNA, 3 hs:

30 PNA/DexVS70: 1,8
 AP/DexVS70: 1,8

AP-DexVS70-PNA, 5 hs:

 PNA/DexVS70: 2,0
 AP/DexVS70: 2,4

35 Debido a estos resultados, se recomienda seguir un procedimiento en el cual el tiempo de conjugación (AP + DexVS70-PNA) sea de 5 horas.

Ejemplo 10: Síntesis convencional del conjugado GAM-DexVS70-PNA

El dextrano (peso molecular 70 kDa) se activa con divinilsulfona hasta un nivel de 92 grupos reactivos/polímero dextrano (DexVS70).

40 105,0 µl de DexVS70 7,5 nmol
 57,0 µl de inmunoglobulina de cabra anti-ratón (GAM) 15 nmol
 8,9 µl de NaCl 4 M
 10,6 µl de NaHCO₃ 0,8 M (pH = 9,5)
 144,5 µl de H₂O

45 Los cinco componentes anteriores se mezclaron y se colocaron en un baño de agua a 30° C durante 40 minutos. Doscientos noventa µl se retiraron de la mezcla y se añadieron a 50 nmol de PNA, que se había disuelto previamente en 40 µl de H₂O. A continuación, se añadieron 10 µl de NaHCO₃ 0,8 M (pH 9,5) y la mezcla se colocó en un baño de agua a 30°C durante 1 hora. La extinción se realizó añadiendo 34 µl de cisteína 500 mM y dejando reposar el conjunto resultante de la mezcla durante 30 minutos a 30°C.

50 Purificación del producto mediante FPLC: columna SUPERDEX® - 200, tampón Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, méto-

do 7 banco 2, bucle de 1 ml. Se recogieron dos fracciones: una con el producto y otra con el residuo. La absorbancia relativa de PNA(Flu) ($\epsilon_{500 \text{ nm}} = 73000 \text{ M}^{-1}$) y GAM ($\epsilon_{278 \text{ nm}} = 213000 \text{ M}^{-1}$). El factor de corrección para PNA a 278 nm es debido al PNA específico y se calcula: $278/500 \text{ nm}$) se utilizó para calcular la proporción promedio de conjugación de PNA, GAM y DexVS70.

5 Ejemplo 11: Síntesis convencional de PNA1-DexVS70-PNA2

10 El dextrano (peso molecular 70 kDa) se activa con divinilsulfona hasta un nivel de 92 grupos reactivos/polímero dextrano. PNA1 (100 nmol) se disuelve en 140 μl de DexVS70 (10 nmol). A esta mezcla, se añaden 12,5 μl de PNA2 (12,5 nmol) disueltos en H_2O , y a continuación se añaden 30 μl de NaHCO_3 (pH 9,5) y la solución se mezcla. La mezcla resultante se coloca en un baño de agua a 30°C durante 35 minutos. La extinción se realizó añadiendo 18,3 μl de cisteína 500 mM en Hepes y dejando reposar este conjunto de la mezcla durante 30 minutos a 30°C .

Purificación del producto mediante FPLC: columna SUPERDEX[®] - 200, tampón Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, método 7 banco 2, bucle de 1 ml. Se recogieron dos fracciones: una con el producto y otra con el residuo. La absorbancia relativa de PNA(Flu) ($\epsilon_{500 \text{ nm}} = 73000 \text{ M}^{-1}$) y la proporción entre los dos PNAs se utilizó para calcular la proporción promedio de conjugación de PNA, PNA y DexVS70.

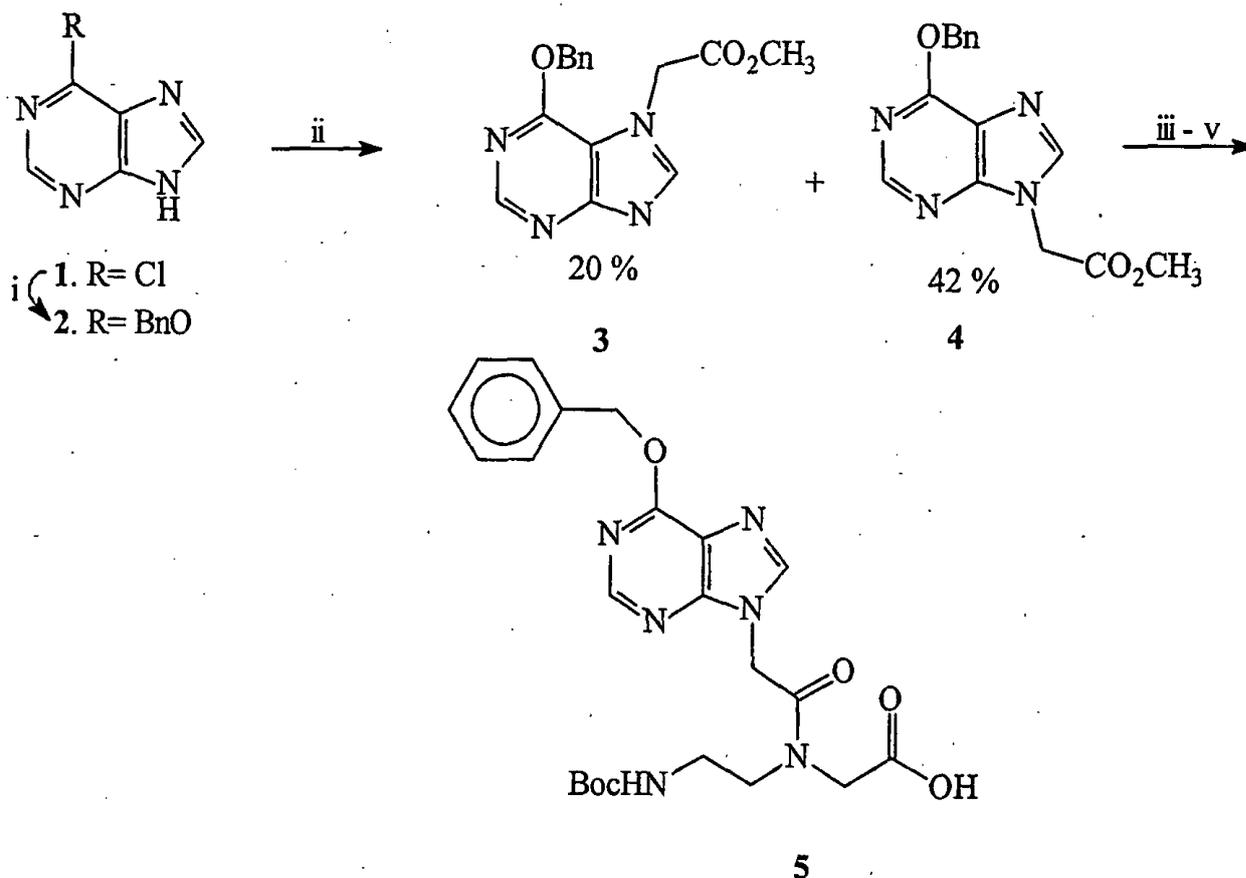
15 Ejemplo 12: Síntesis del monómero Boc-PNA-I(O-Bz).

20 6-Benciloxipurina. Hidruro de sodio (60% de dispersión en aceite mineral; 3,23 g; 80 mmol) se añadió lentamente a alcohol bencílico (30 ml; 34,7 mmol). Después de la adición de más alcohol bencílico (10 ml) y 6-cloropurina (5,36 g), la mezcla de reacción, se calentó a 100°C durante 4 horas. Cuando la mezcla de reacción había alcanzado la temperatura ambiente, el agua (1 ml) se añadió lentamente. La 6-benciloxipurina precipitó por la adición de ácido acético (4,6 ml) y éter dietílico (550 ml). El material precipitado se separó por filtración (11,72 g). La recristalización en éter proporcionó (4,78 g; 65,4%). Punto de fusión $175\text{-}177^\circ\text{C}$ (lit. $170\text{-}172^\circ\text{C}$) [Ramazaeva N., 1989 n° 473] 1H-RMN (DMSO-d₆): 8,53 (1H, s); 8,39 (1H, s); 7,54-7,35 (5H, m); 5,62 (2H, s).

25 (6-(Benciloxi)purin-9-il)-acetato de metilo. 6-Benciloxipurina (4,18 g; 18,5 mmol) se añadió a una suspensión de carbonato potásico (3,1 g; 22,4 mmol) en DMF (100 ml). Después de 15 min, se añadió éster metílico de ácido bromoacético (1,93 ml; 20,4 mmol). La reacción se vigiló con TLC en butanol:ácido acético:agua 4:1:1. Después de la terminación, la mezcla de reacción se dividió entre agua (600 ml) y acetato de etilo (600 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó hasta un volumen de ~ 10 ml y precipitó en éter de pet. Los dos productos se separaron por cromatografía en columna, usando acetato de etilo como disolvente. Los productos precipitaron en éter de pet. Rendimiento: 2,36 g (43%). Punto de fusión: $111,5\text{-}115^\circ\text{C}$. λ máx UV= 250 nm (9-alquilado); λ max= 260 nm (7-alquilado). 1H-RMN (DMSO-d₆): 8,60 (1H, s); 8,43 (1H, s); 7,6-7,35 (5H, m); 5,69 (2H, s); 5,26 (2H, s); 3,75 (3H, s).

35 Ácido (6-(benciloxi)purin-9-il)acético. (6-(Benciloxi)purin-9-il)-acetato de metilo (2,10 g; 7,0 mmol) se disolvió en metanol (70 ml) y se añadió NaOH 0,1 M (85 ml). Después de 15 min, el pH de la mezcla de reacción disminuyó por la adición de HCl 0,1 M (~ 80 ml) hasta pH 3. El material precipitado se separó de la mezcla por filtración y se lavó con agua y éter. Rendimiento: 1,80 g (90,2%). 1H-RMN (DMSO-d₆): 8,55 (1H, s); 8,37 (1H, s); 7,55-7,30 (5H, m); 5,64 (2H, s); 5,09 (2H, s).

40 N-(6-(benciloxi)purin-9-il)acetil)-N-(2-Boc-aminoetil)glicina. N-(2-Boc-aminoetil)glicinato de etilo (0,285 g; 1,15 mmol), ácido (6-(benciloxi)purin-9-il)acético (0,284 g; 1,0 mmol) y 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (0,180; 1,1 mmol), se disolvieron en diclorometano/dimetilformamida 1:1 (10 ml). Después de la adición de dicitohexilcarbodiimida (0,248 g; 1,2 mmol) la reacción se dejó reposar durante una noche. El material precipitado se eliminó por filtración. La fase orgánica se extrajo dos veces con bicarbonato sódico saturado, se secó con sulfato de magnesio y se evaporó para formar un aceite. La purificación de la columna sobre sílice usando diclorometano con metanol al 0-5% como eluyente, proporcionó el éster del monómero que se disolvió en metanol (10 ml). Se añadió hidróxido sódico 0,1 M (12 ml). Después de 30 minutos, la reacción se filtró y el pH se ajustó con KHSO_4 saturado/agua (1:3) hasta 2,7. La fase acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo (2 x 100). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se evaporaron hasta tener un volumen de 10 ml. Con la precipitación con éter de pet. se obtuvo el monómero (0,15 g; 31%). 1H-RMN (DMSO-d₆): 8,51 (1H, s); 8,23 (1H, s); 7,6-7,3 (5H, m); 5,64 (2H, s); 5,31 (ma.) + 5,13 (mi.) (2H, s); 4,23 (mi. + 3,98 (ma.) (2H, s); 3,55-3,00 (4H, m); 1,36 (9H, s).



La síntesis del monómero hipoxantina PNA, (i) BnOH, NaH (ii) K₂CO₃, BrCH₂CO₂CH₃ (iii) OH⁻ (iv) DCC, Dhbt-OH, Boc-aeg-OEt (v) OH⁻

- 5 El monómero Boc-PNA-diaminopurina-(N6-Z) se preparó según Gerald Haaima, Henrik F. Hansen, Leif Christensen, Otto Dahl y Peter E. Nielsen; *Nucleic Acids Research*, 1997, vol. 25, número 22 4639-4643

El monómero Boc-PNA-2-tiouracil-(S-4-MeOBz) se preparó según Jesper Lohse, Otto Dahl y Peter E. Nielsen; "Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America", 1999, vol. 96, número 21, 11804-11808.

- 10 El monómero Boc-PNA-Adenina-(Z) era del catálogo GEN063011 de PE Biosystems.

El monómero Boc-PNA-Citosina-(Z) era del cat. GEN063013 de PE Biosystems.

El monómero Boc-PNA-Guanina-(Z) era del cat. GEN063012 de PE Biosystems.

El monómero Boc-PNA-Timina era del cat. GEN063010 de PE Biosystems.

- 15 La IsoAdenina (2-aminopurina) se puede preparar como un monómero de PNA mediante la alquilación en 9-N con bromoacetato de metilo, protección del grupo amino con cloroformato de bencilo, hidrólisis del éster metílico, acoplamiento mediado con carbodiimida, con (2-Boc-aminoetil)-glicinato de metilo, y finalmente la hidrólisis del éster metílico.

- 20 El 4-tiouracilo se puede preparar como monómero de PNA mediante la protección en S con 4-metoxi-bencilcloruro, alquilación en 1-N con bromoacetato de metilo, hidrólisis del éster metílico, acoplamiento mediado con carbodiimida, con (2-Boc-aminoetil)-glicinato de metilo, y finalmente hidrólisis del éster metílico.

La tiocitosina se puede preparar como monómero de PNA tratando el éster metílico del monómero Boc-PNA-citosina(Z) con el reactivo de Lawessons, seguido por la hidrólisis del éster metílico.

- 25 Una variedad de bases halogenadas están disponibles comercialmente, y se pueden convertir en monómeros de PNA de forma análoga a las bases no halogenadas. Éstas incluyen el análogo de guanina, 8-bromo-guanina, los análogos de adenina, 8-bromo-adenina y 2-fluoro-adenina, el análogo de isoadenina, 2-amino-6-cloro-purina, el

análogo de 4-tiouracilo, 5-fluoro-4-tiouracilo, y el análogo de 2-tiouracilo, 5-cloro-2-tiouracilo.

Los monómeros de Boc-PNA-Uracilo se describieron en primer lugar en "Uracil og 5-bromouracil I PNA", un proyecto de licenciatura de Kristine Kilså Jensen, Universidad de Copenhague 1992.

Ejemplo 13: PNA con cargas positivas y negativas

5 Para preparar conjugaciones mejores simultáneamente, proporcionando PNA, se intentó una carga. Ambos PNAs se prepararon por los procedimientos convencionales de PNA (véase el Ejemplo 2).

1. Flu-L₃₀-Glu-TCA-AGG-TAC-A-Glu-L₃₀-Lys(Cys)

Glu = glutamato tiene cargas negativas y para mayor simplicidad el PNA se designa -A4-

2. Flu-L₃₀-Lys(Me)₂-TGT-ACC-TTG-A-Lys(Me)₂-L₃₀-Lys(Cys)

10 Lys(Me)₂ = Boc-Lys(Me)₂-OH tiene cargas positivas y el PNA se designa +T+

nombre	número	HRP	GaM	equiv.	HRP/Dex	Gam/Dex	PNA/Dex
-A4-	D 13041	D 13050		9	12,3		0,13
-A4-	D 13041		D 13060	7		0,94	0,66
+T4+	D 13042	D 13058		9	13,5		0,19
+T4+	D 13042		D 13056	7		1,42	0,45

Ejemplo 14 - Derivados de enlazadores adicionales

15 Se descargaron 100 mg de la resina MBHA hasta una carga de 0,1 mmol/g con Boc-Lys(Fmoc) y se sometieron a ciclos repetidos de acoplamiento con Boc-L30-ácido libre. Cada acoplamiento se realizó con 48 mg de Boc-L30-ácido libre activado con 23 mg de HATU y 14 mg de DIPEA en 0,9 ml de NMP. Después de 20 ciclos, se escindió una pequeña muestra de la resina, precipitó en éter dietílico, y se sometió a espectroscopía de masas.

Esto confirmó la estructura esperada:

H-L600-Lys(Fmoc)-NH₂ calc. para C₄₂₁H₇₄₄N₈₃O₂₀₃ 10217,00, encontrada 10214,63

20 La resina se sometió a otros 8 ciclos de acoplamiento con Boc-L30-ácido libre. Una pequeña muestra fue escindida de nuevo de la resina para análisis. De nuevo la estructura esperada fue confirmada:

H-L840-Lys(Fmoc)-NH₂ calc. para C₅₈₁H₁₀₃₂N₁₁₅O₂₈₃ 14157,23, encontrada 14153,4

La resina se sometió a otros 5 ciclos de acoplamiento con Boc-L30-ácido libre. Una pequeña muestra se escindió de nuevo de la resina para análisis. De nuevo, la estructura esperada fue confirmada:

H-L990-Lys(Fmoc)-NH₂ calc. para C₆₈₁H₁₂₁₂N₁₃₅O₃₃₃ 16619,87, encontrada 16618,88

25 Cincuenta mg de la resina se desprotegieron en Boc y se marcaron con carboxi fluoresceína. Se eliminó el grupo Fmoc sobre la lisina, y el producto se separó por escisión de la resina y precipitó en éter dietílico. Se resuspendió en TFA y precipitó de nuevo. El producto se disolvió en agua y se utilizó la absorbancia a 500 nm para cuantificar el rendimiento del producto de longitud completa marcado con fluoresceína. El rendimiento era de 1470 nm, 24 mg, correspondiendo hasta un excedente del 29% sobre todo el rendimiento, de los 33 acoplamientos con L30, que se correspondían con un rendimiento promedio del acoplamiento de 96,3%. La estructura se confirmó por espectroscopía de masas, y no había pruebas de ninguna impureza sustancial.

30 Flu-L990-Lys(NH₂)-NH₂ calc. para C₆₈₇H₁₂₁₃N₁₃₅O₃₃₇ 16756,94, encontrada 16752,49.

Ejemplo 15: Método de síntesis alternativa del enlazador

Síntesis de Diimida

35 Véase la Figura 8, estructura 6. 2,2'(etilendioxi)bis(etilamina), 2,96 g, 20 mmol, en piridina, 10 ml, reaccionó con 5,8 g, 50 mmol, de anhídrido diglicólico durante 5 minutos a 80°C. Se añadieron 5 ml de anhídrido acético y la mezcla se agitó durante 1 h adicional a 100°C. Los disolventes se evaporaron y el residuo se agitó con 20 ml de agua durante 30 min. El producto se extrajo en 100 ml de DCM, y se lavó con 100 ml de citrato sódico 1 M, pH 4,5, 100 ml de hidrogenocarbonato de sodio 1 M y después finalmente agua. El DCM se evaporó para proporcionar 5,3 g de un aceite incoloro, al 77%, que solidificó en una masa blanca a lo largo del tiempo.

40

Polimerización de Diimida y de un exceso de 2,2'(etilendioxi)bis(etilamina)

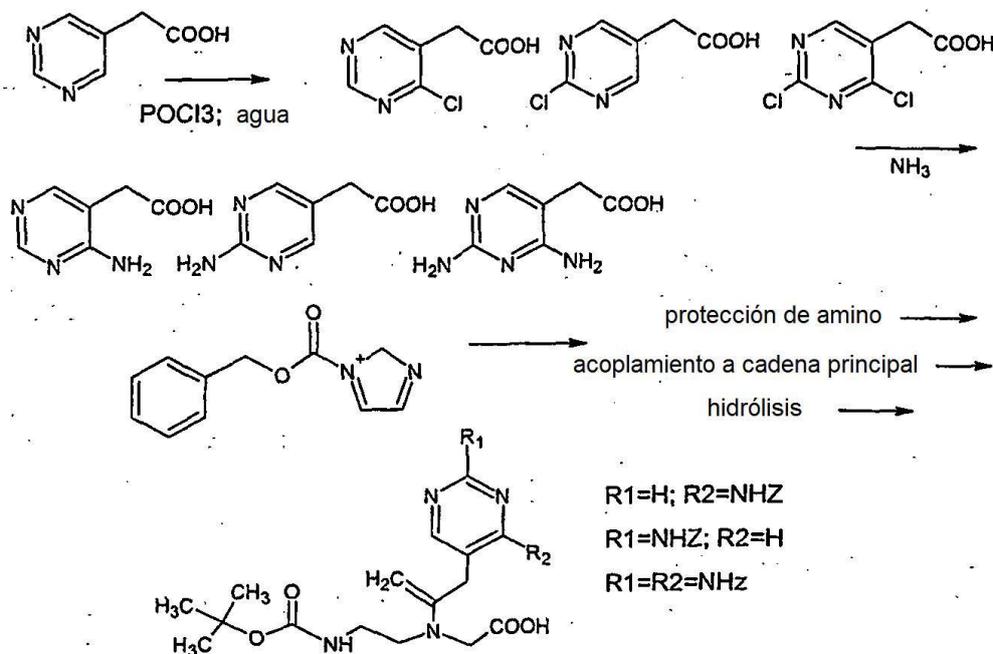
Se disolvieron 344 mg de diimida, 1 mmol, y 160 mg de 2,2'(etilendioxi)bis(etilamina) 1,08 mmol en 0,5 ml de NMP. La mezcla se calentó a 95°C durante 90 Min. Adicionalmente, se añadieron 148 mg de 2,2'(etilendioxi)bis(etilamina) 1 mmol a la mezcla calentada durante 60 min adicionales. La mezcla bruta de reacción se analizó por espectroscopía de masas MALDI-TOF. Esta mostraba que se había formado una mezcla de productos cíclicos y lineales. Había evidencias de ciclo-L30 (m=0) y de ciclo L60 (m=1), pero no de oligómeros cíclicos con un número más elevado. Los oligómeros lineales comprendían desde n=1 hasta n=9. Véase la Figura 8 y las estructuras más abajo:

Cíclico:

m=0; calc. para C₂₀H₃₆N₄O₁₀ 492,5282, encontrado 492,23
 m=1; calc. para C₄₀H₇₂N₈O₂₀ 985,0564, encontrado 985,039 lineal
 n=1; calc. para C₂₆H₅₂N₆O₁₂ 640,7334, encontrado 640,23
 n=2; calc. para C₄₆H₈₈N₁₀O₂₂ 1133,26, encontrado 1132,02
 n=3; calc. para C₆₆H₁₂₄N₁₄O₃₂ 1625,29, encontrado 1624,80
 n=4; calc. para C₈₆H₁₆₀N₁₈O₄₂ 2118,3, encontrado 2117,6
 n=5; calc. para C₁₀₆H₁₉₆N₂₂O₅₂ 2610,84, encontrado 2609,53
 n=6; calc. para C₁₂₆H₂₃₂N₂₆O₆₂ 3103,37, encontrado 3101,48
 n=7; calc. para C₁₄₆H₂₆₈N₃₀O₇₂ 3595,90, encontrado 3593,54
 n=8; calc. para C₁₆₆H₃₀₄N₃₄O₈₂ 4088,42, encontrado 4086,74
 n=9; calc. para C₁₈₆H₃₄₀N₃₈O₉₂ 4580,95, encontrado 4580,02.

Ejemplo 16. Método de síntesis de monómeros mono- y 2,4-diamino-pirimidin-5-il PNA.

El 2,4-diamino-pirimidin-5-ilo se puede introducir en oligómeros de ADN por métodos conocidos en la técnica (p. ej., S.A. Benner y otros, Nucleic Acid Research 24(7): 1308-1313 (1996)). Un oligómero de PNA correspondiente se prepara tratando el ácido de pirimidin-5-acético con cloro para obtener ácido 2-cloro-pirimidin-5-acético, ácido 4-cloro-pirimidin-5-acético y ácido 2,4-dicloro-pirimidin-5-acético. La separación de los isómeros, seguida de un tratamiento a temperatura y presión elevadas con amoníaco, proporciona los tres derivados correspondientes de amino-pirimidina (véase la Figura 9). Los derivados de amino-pirimidina se separan y se protegen los amino, a continuación se acoplan con un éster protegido de la cadena principal de PNA. La hidrólisis del éster da como resultado monómeros de PNA para la producción de oligómeros de PNA que contienen bases de 2-amino; 4-amino; y/o 2,4-diamino-pirimidin-5-ilo.

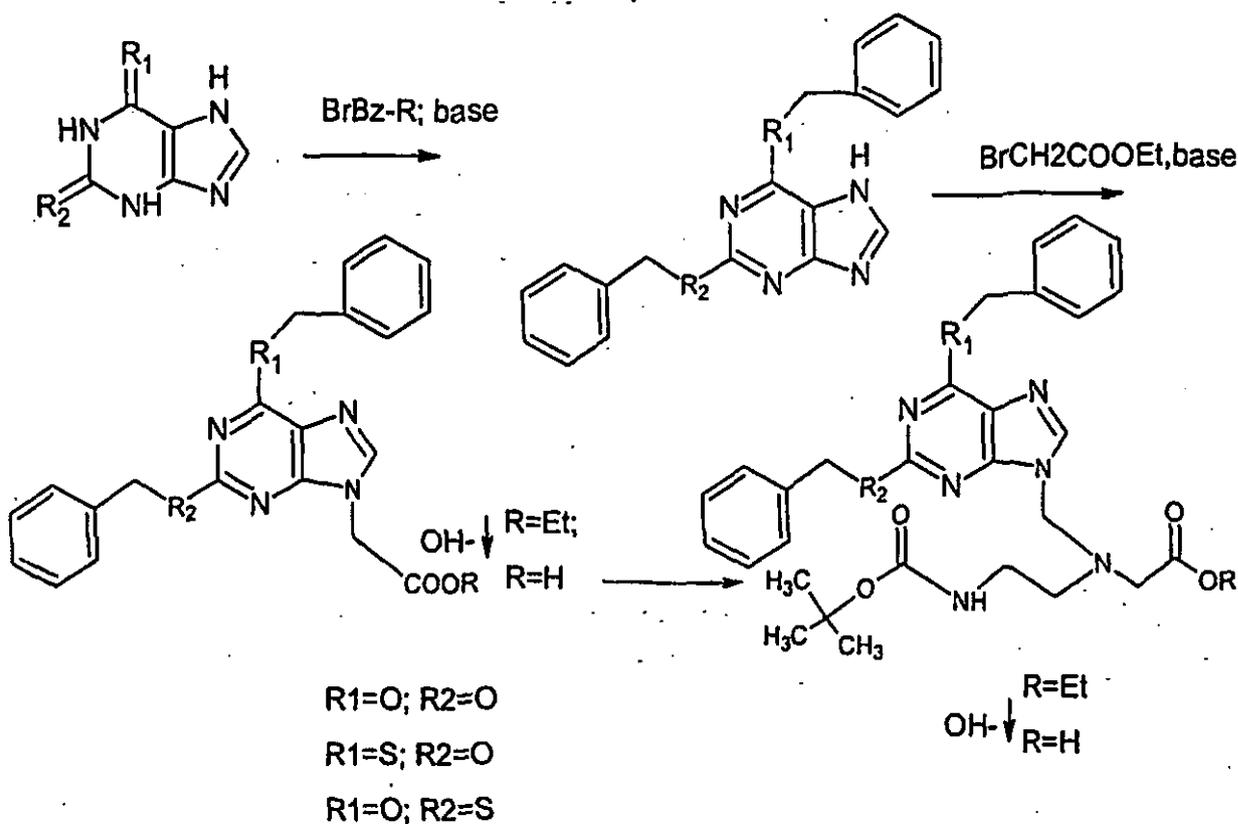


Ejemplo 17. Síntesis de monómeros de xantina y tioxantina acoplados con PNA.

La xantina, la 2-tiotioxantina y la 6-tioxantina están disponibles comercialmente, por ejemplo, en ScienceLab.com. Además, S.A. Benner y otros, Nucleic Acid Research 24(7): 1308-1313 (1996) describen la preparación de un monómero de xantosa-ADN, que incluye un análogo menos ácido y preferible de 7-deaza, y señala la protección preferida de ambos oxígenos durante síntesis en fase sólida.

Los monómeros de xantina y PNA, así como los monómeros de 2-tio y 4-tioxantina, se preparan:

1. Protegiendo ambos oxígenos o el oxígeno y el azufre con grupos de protección apropiados, tales como bencilo (posiblemente sustituido).
2. Alquilando en N-9 con bromoacetato de etilo. (Separando el subproducto alquilado en N-7.)
- 5 3. Hidrolizando el éster etílico.
4. Acoplado con la mediación de HBTU o de Carbodiimida las bases nucleicas-ácidos con 2-Boc-aminoetil-glicinato.
5. Hidrolizando el éster del monómero resultante en el monómero con ácido libre.
- 10 6. Pudiendo utilizar los monómeros resultantes en la síntesis en fase sólida de Merrifield de PNAs que contienen xantina, 2-tioxantina y 6-tioxantina.



Ejemplo 18. Uso de unidades de detección específicas de IHC con diferente longitud del enlazador.

Objetivo: Usar la detección en 2 capas con peroxidasa de rábano picante (HRP) para someter a ensayo y comparar unidades de reconocimiento con diferente longitud del enlazador (L150, L300, L540).

Unidad nº	Longitud del enlazador	Puntuación específica	Puntuación de ruido de fondo
209-033	L150	2,5+	1+
209-029	L300	2,5+	1+
195-147	L540	2+	0

15

Etapas experimentales: El anticuerpo primario de ratón M3515 (Dako) que se dirigía a la diana CK, se diluyó hasta tener 1:200 en S2022 (Dako) y se aplicó sobre una multisección de tejido. Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, la sección se lavó 5 minutos usando S3006 diluido 10 veces (Dako).

5 GaM-dex-PNA1 (cabra anti-ratón-dextrano-PNA1) (209-033, 209-029 o 195-147) se diluyó hasta tener una concentración final de 0,08 μ M/dex en tampón BP-HEPES (1,5% de BSA, 3% de PEG, NaCl 0,15 M, HEPES 10 mM, pH 7,2) y se aplicó. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, la sección se lavó 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako). Las secciones se aclararon en agua desionizada. Después de 10 minutos de incubación en 0,5% de glutaraldehído a temperatura ambiente, las secciones se aclararon en agua desionizada y se lavaron 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako).

10 PNA2-dex-HRP (209-041) se diluyó hasta tener una concentración final de 0,05 μ M/dex en tampón BAP-HEPES (1,5% de BSA, 3% de PEG, NaCl 0,15 M, 0,05% de 4-aminoantipirina, HEPES 10 mM, pH 7,2) y se aplicó. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las secciones se lavaron 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako).

15 Se aplicó una solución de trabajo preparada de DAB+ (un tampón acuoso de imidazol con peróxido de hidrógeno y DAB; K3468 Dako). Después de 10 minutos de incubación, las secciones se lavaron 5 minutos con agua desionizada. Finalmente las secciones se tiñeron para recuento durante 5 minutos usando hematoxilina S3301 (Dako), se aclararon en agua desionizada, se lavaron 3 minutos en tampón de lavado, y se montaron en Faramount S3025 (Dako).

Resultado: En el producto final marrón de la reacción de HRP, se visualiza una tinción específica de citoqueratina de las células epiteliales y no muestra una diferencia significativa en la realización cuando se compararan unidades de reconocimiento que tienen diferente longitud del enlazador.

Ejemplo 19. Ensayo IHC para la detección de unidades con diferente número de enlazador-PNA fijados.

20 Objetivo: usar la detección de HRP en 2-capas para someter a ensayo y comparar las unidades de detección con diferentes cantidades de PNA por dextrano (0,8 PNA/dex y 1,5 PNA/dex).

Unidad nº	PNA/dex	Puntuación específica	Puntuación de ruido de fondo
195-051	0,8	3+	0,5+
D15008	1,5	3+	0,5+

25 Etapas experimentales: El anticuerpo primario de ratón M3515 (Dako) que se dirigía a la diana CK, se diluyó hasta tener al final 1:200 en S2022 (Dako) y se aplicó sobre una multisección de tejido. Después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, la sección se lavó 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako).

30 GaM-dex-PNA1 (195-047) diluido hasta tener una concentración final de 0,08 μ M/dex, se aplicó en tampón BP-HEPES (1,5% de BSA, 3% de PEG, NaCl 0,15 M, HEPES 10 mM, pH 7,2). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, la sección se lavó 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako). Las secciones se aclararon en agua desionizada. Después de una incubación de 10 minutos en 0,5% de glutaraldehído a temperatura ambiente, las secciones se aclararon en agua desionizada y se lavaron 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako).

35 PNA2-dex-HRP (HRP = peroxidasa de rábano picante) (195-051 o D15008) diluido hasta tener una concentración final de 0,05 μ M/dex, se aplicó en tampón BAP-HEPES (1,5% de BSA, 3% de PEG, NaCl 0,15 M, 0,05% de 4-aminoantipirina, HEPES 10 mM, pH 7,2). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las secciones se lavaron 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako).

Se aplicó una solución de trabajo preparada de DAB+ (K3468 Dako). Después de 10 minutos de incubación, las secciones se lavaron 5 minutos con agua desionizada. Finalmente las secciones se tiñeron para recuento durante 5 minutos usando hematoxilina S3301 (Dako), se aclararon en agua desionizada, se lavaron 3 minutos en tampón de lavado, y se montaron en Faramount S3025 (Dako).

40 Resultado: En el producto final marrón de la reacción de HRP, se visualiza la tinción específica de citoqueratina de las células epiteliales y no muestra una diferencia significativa en la realización cuando se compararan las unidades de detección que tienen diferente cantidad de PNA/dex.

Ejemplo 20. Ensayo de IHC que compara las unidades de reconocimiento y de detección que tienen "enlazador-PNA" o "enlazador-PNA-cola del enlazador" fijada.

45 Objetivo: Usar la detección en 2 capas para someter a ensayo y comparar las unidades de reconocimiento y de detección que tienen secuencias de PNA sin y con "cola de enlazador".

Nº de unidad GaM-dex-PNA	cola	nº de unidad PNA-dex-HRP	cola	puntuación específica	puntuación de ruido de fondo
218-113	no	218-021	no	3+	1+
D16074	si	218-021	no	3+	0,5+
218-113	no	D16076	si	3+	0,5+
D16074	si	D16076	si	4+	1,5+

5 Etapas experimentales: anticuerpo primario de ratón M3515 (Dako) que se dirige a la diana CK, se diluyó hasta tener al final 1:200 en S2022 (Dako) y se aplicó sobre una multisección de tejido. Después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, la sección se lavó 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako). GaM-dex-PNA1 (218-113 o D16074) diluido hasta tener una concentración final de 0,08 μ /dex, se aplicó en tampón BP-HEPES (1,5% de BSA, 3% de PEG, NaCl 0,15 M, HEPES 10 mM, pH 7,2). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, la sección se lavó 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako). Las secciones se aclararon en agua desionizada. Después de una incubación de 10 minutos en 0,5% de glutaraldehído a temperatura ambiente, las secciones se aclararon en agua desionizada y se lavaron 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako).

10 PNA2-dex-HRP (218-021 o D16076) diluida hasta tener una concentración final de 0,05 μ M/dex, se aplicó en tampón BAP-HEPES (1,5% de BSA, 3% de PEG, NaCl 0,15 M, 0,05% de 4-aminoantipirina, HEPES 10 mM, pH 7,2). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las secciones se lavaron 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako).

15 Se aplicó una solución de trabajo preparada de DAB+ (K3468 Dako). Después de 10 minutos de incubación, las secciones se lavaron 5 minutos con agua desionizada. Finalmente las secciones se tiñeron para recuento durante 5 minutos usando hematoxilina S3301 (Dako), se aclararon en agua desionizada, se lavaron 3 minutos en tampón de lavado, y se montaron en Faramount S3025 (Dako).

20 Resultado: En el producto final marrón de la reacción de HRP, se visualiza la tinción específica de citoqueratina de las células epiteliales y muestra que la realización depende de la presencia de una “cola de enlazador” en la secuencia de PNA. Una “cola de enlazador” en la secuencia de PNA puede influir sobre la puntuación específica y sobre la puntuación de ruido de fondo.

Ejemplo 21. Ensayo de IHC que compara las unidades de reconocimiento y de detección que tienen “enlazador-PNA” o “enlazador-PNA-carga” fijada.

25 Objetivo: Usar la detección en 2 capas con HRP para someter a ensayo y comparar las unidades de reconocimiento y de detección que tienen secuencias de PNA con y sin carga.

Nº de unidad GaM-dex-PNA	cola	nº de unidad PNA-dex-HRP	carga	puntuación específica	puntuación de ruido de fondo
D15078	no	D15069	no	0,5+	0
209-149	si	209-157	si	3+	1+

30 Etapas experimentales: el anticuerpo primario de ratón M3515 (Dako) que se dirige a la diana CK, se diluyó hasta tener al final 1:200 en S2022 (Dako) y se aplicó sobre una multisección de tejido. Después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, la sección se lavó 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako).

35 GaM-dex-PNA1 (2D15078 o 209-149) diluido hasta tener una concentración final de 0,08 μ /dex, se aplicó en tampón BP-HEPES (1,5% de BSA, 3% de PEG, NaCl 0,15 M, HEPES 10 mM, pH 7,2). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, la sección se lavó 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako). Las secciones se aclararon en agua desionizada. Después de una incubación de 10 minutos en 0,5% de glutaraldehído a temperatura ambiente, las secciones se aclararon en agua desionizada y se lavaron 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako).

40 PNA-dex-HRP (D15069 o 209-157) diluido hasta tener una concentración final de 0,05 μ M/dex, se aplicó en tampón BAP-HEPES (1,5% de BSA, 3% de PEG, NaCl 0,15 M, 0,05% de 4-aminoantipirina, HEPES 10 mM, pH 7,2). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las secciones se lavaron 5 minutos usando S3006 diluido 10x (Dako).

40 Se aplicó una solución de trabajo preparada de DAB+ (K3468 Dako). Después de 10 minutos de incubación, las secciones se lavaron 5 minutos con agua desionizada. Finalmente las secciones se tiñeron para recuento durante 5 minutos usando hematoxilina S3301 (Dako), se aclararon en agua desionizada, se lavaron 3 minutos en tampón de lavado, y se montaron en Faramount S3025 (Dako).

minutos usando hematoxilina S3301 (Dako), se aclararon en agua desionizada, se lavaron 3 minutos en tampón de lavado, y se montaron en Faramount S3025 (Dako).

- 5 Resultado: En el producto final marrón de la reacción de HRP, se visualiza la tinción específica de citoqueratina de las células epiteliales y muestra que la realización depende de la presencia de carga en la secuencia de PNA. La carga en las secuencias de PNA dentro de una pareja de PNA, puede influir sobre la puntuación específica y sobre la puntuación de ruido de fondo.

Ejemplo 22. Síntesis y ensayo de IHC de un conjugado de Anticuerpo-PNA.

Parte A. Ensayo de diferentes proporciones de enlazador frente a anticuerpo

- 10 Materiales: Anticuerpo: CD45 dializado durante una noche contra Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH=7,2. SMCC: peso molecular de ciclohexan-1-carboxilato de succinimidil-4(N-maleimidometilo). 334,33. PNA: acetil-L₃₀-GTP-TAA-TTP-PAG-L₁₅₀-Lys(Cys)

Ensayo 1

- 15 CD45 10 nmol se disolvió en 161 µl de Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH=7,2. SMCC 250 nmol se disolvió en 8 µl de NMP. Los componentes anteriores se mezclaron y se colocaron en un baño de agua a 30°C durante 60 minutos. La mezcla se purificó en una columna de mini-prep (Sephadex G-25) con Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH=7,2 como eluyente. Fracciones de 0,3 ml. Midiendo la absorbancia a 278 nm, se identificaron tres fracciones que contenían el producto (58%). Estas tres fracciones se añadieron a 100 nmol de un PNA liofilizado. A continuación, 1 µl de EDTA disódico al 5%/agua se añadió y la solución se mezcló hasta disolución y se colocó en un baño de agua a 30°C durante 30 minutos. La extinción se realizó añadiendo 2 mg de cisteína. Baño de agua a 30°C durante 30 minutos.

- 20 El producto se purificó mediante FPLC: Columna SUPERDEX[®]-75, tampón Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH 7,2. Se recogió la fracción con el producto. La absorbancia relativa entre PNA ($\epsilon_{260\text{ nm}}$) y el anticuerpo ($\epsilon_{278\text{ nm}}$) se utilizó para calcular la proporción promedio de conjugación entre PNA y el anticuerpo. PNA / CD45: 5,2. Rendimiento del 39% basado en anticuerpo.

Ensayo 2

- 25 CD45 10 nmol se disolvió en 161 µl de Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH=7,2. SMCC 150 nmol se disolvió en 5 µl de NMP. Los componentes anteriores se mezclaron y se colocaron en un baño de agua a 30°C durante 60 minutos. La mezcla se purificó en una columna de mini-prep (Sephadex[®] G-25) con Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH=7,2 como eluyente. Fracciones de 0,3 ml. Midiendo la absorbancia a 278 nm, se identificaron tres fracciones que contenían el producto (74%).

- 30 Estas tres fracciones se añadieron a 100 nmol de un PNA liofilizado. A continuación, se añadió 1 µl de EDTA disódico al 5%/agua y la solución se mezcló hasta disolución y se colocó en un baño de agua a 30°C durante 30 minutos. La extinción se realizó añadiendo 2 mg de cisteína. Baño de agua a 30°C durante 30 minutos.

- 35 El producto se purificó mediante FPLC: Columna SUPERDEX[®]-75, tampón Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH 7,2. Se recogió la fracción con el producto. La absorbancia relativa entre PNA ($\epsilon_{260\text{ nm}}$) y el anticuerpo ($\epsilon_{278\text{ nm}}$) se utilizó para calcular la proporción promedio de conjugación entre PNA y el anticuerpo. PNA / CD45: 3,4. Rendimiento del 55% basado en anticuerpo.

Ensayo IHC de los conjugados

Un ensayo IHC posterior mostraba que PNA/CD45 en el ensayo 2 dio una puntuación más alta que la del ensayo 1. Esto nos llevó a la conclusión de que la proporción entre CD45/SMCC/PNA debía ser 10/150/100.

- 40 Parte B. Ensayo de diferentes tiempos de conjugación - anticuerpo y enlazador

Materiales: Anticuerpo: GAM (cabra anti-ratón) dializado durante una noche contra NaCl 0,1 M. SMCC: peso molecular del ciclohexan-1-carboxilato de succinimidil-4(N-maleimidometilo). 334,33. Flu-enlazador: Flu-L₉₀-Lys(Flu)-L₃₀-Lys(Cys)

Ensayo 1

- 45 GAM 20 nmol se disolvió en 402 µl de Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH=7,2. SMCC 400 nmol se disolvió en 13 µl de NMP. Los componentes anteriores se mezclaron y se colocaron en un baño de agua a 30°C durante 1 hora. 207 µl de la mezcla se purificaron en una columna de mini-prep (Sephadex[®] G-25) con Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH=7,2 como eluyente. Se tomaron fracciones de 0,3 ml. Midiendo la absorbancia a 278 nm, se identificaron tres fracciones que contenían el producto (79%). Estas tres fracciones se añadieron a 200 nmol de un Flu-enlazador liofilizado. A continuación, se añadió 1 µl de EDTA disódico al 5%/agua y la solución se mezcló hasta disolución y se colocó en un baño de agua a 30°C durante una noche. La extinción se realizó añadiendo 2 mg de cisteína. Baño de agua a 30°C durante 30 minutos.

El producto se purificó mediante FPLC: Columna SUPERDEX®-75, tampón Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH 7,2. Se recogió la fracción con el producto. La absorbancia relativa entre Flu-enlazador ($\epsilon_{498 \text{ nm}}$) y el anticuerpo ($\epsilon_{278 \text{ nm}}$) se utilizó para calcular la proporción promedio de la conjugación entre PNA y el anticuerpo. Flu-enlazador/GAM: 7,1. Rendimiento del 55% basado en anticuerpo.

5 Ensayo 2

GAM 20 nmol se disolvió con 402 μl de Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH=7,2. SMCC 400 nmol se disolvió en 13 μl de NMP. Los componentes anteriores se mezclaron y se colocaron en un baño de agua a 30°C durante 2 horas. El resto de la síntesis y de la purificación se realizó con exactamente el mismo procedimiento que para 1 hora. Había un rendimiento del 64% de GAM/SMCC antes de añadir el Flu-enlazador. Flu-enlazador/GAM: 8,7. Rendimiento del 33% basado en el anticuerpo.

Parte C. Ensayo de diferentes tiempos de conjugación - Fluoróforo y enlazador

Materiales: Anticuerpo: GAM dializado durante una noche contra NaCl 0,1 M. SMCC: peso molecular del ciclohexan-1-carboxilato de succinimidil-4(N-maleimidometilo). 334,33. Flu-enlazador: Flu-L₉₀-Lys(Flu)-L₃₀-Lys(Cys)

Ensayo 1

15 GAM 20 nmol se disolvió en 378 μl de Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH=7,2. SMCC 400 nmol se disolvió en 13 μl de NMP. Los componentes anteriores se mezclaron y se colocaron en un baño de agua a 30°C durante 1 hora. La mezcla se dividió en dos y se purificó en dos columnas de mini-prep (Sephadex® G-25) con Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH=7,2 como eluyente. Se tomaron fracciones de 0,3 ml. Midiendo la absorbancia a 278 nm, se identificaron tres fracciones de cada columna que contenían el producto (76% en todas). Estas seis fracciones se reunieron, se dividieron en dos y se añadió cada una a 200 nmol de un Flu-enlazador liofilizado. A continuación, se añadió 1 μl de EDTA disódico al 5%/agua y la solución se mezcló hasta disolución y se colocó en un baño de agua a 30°C, una durante 30 minutos, la otra durante 60 minutos. La extinción se realizó añadiendo 2 mg de cisteína. Baño de agua a 30°C durante 30 minutos.

25 El producto se purificó mediante FPLC: Columna SUPERDEX®-75, tampón Hepes 0,01 M, NaCl 0,1 M pH 7,2. Se recogieron las fracciones con el producto de cada purificación. La absorbancia relativa entre Flu-enlazador ($\epsilon_{498 \text{ nm}}$) y el anticuerpo ($\epsilon_{278 \text{ nm}}$) se utilizó para calcular la proporción promedio de la conjugación entre PNA y el anticuerpo. Treinta minutos de conjugación Flu-enlazador / GAM: 7,0 dieron un rendimiento del 55% basado en anticuerpo. Sesenta minutos de conjugación Flu-enlazador / GAM: 6,9 dieron un rendimiento del 52% basado en anticuerpo. Los resultados anteriores muestran que 30 minutos de conjugación entre GAM/SMCC y Flu-enlazador son suficientes.

30 Otras realizaciones ejemplares incluyen derivados de enlazadores con de las siguientes estructuras:

- Lys(PNA₁)-L30-PNA₂-L30-Lys(PNA₁)-L30-Lys(PNA₁)-L30-Lys(PNA₁)
- PNA₁-enlazador-(PNA₁-enlazador)_n-PNA₁-enlazador-PNA₂
- PNA₁-enlazador-(PNA₁-enlazador)_n-PNA₁-enlazador-PNA₂-enlazador-PNA₁-enlazador-(PNA₁-enlazador)_n-PNA₁
- PNA₁-enlazador-(Lys(enlazador-PNA₁)-enlazador)_n-Lys(enlazador-PNA₁)-enlazador-PNA₂
- 35 PNA₁-enlazador-(Lys(enlazador-PNA₁)-enlazador)_n-enlazador-PNA₂-(enlazador-Lys(enlazador-PNA₁))_n.

Otros ejemplos incluyen derivados de enlazadores con la estructura general: $([L15]_n\text{-PNA})_m$, en los que el derivado de enlazador se acopla de forma adicional covalente o no covalentemente con un anticuerpo y/o con dextrano, y en donde n y m son números enteros iguales o superiores a 1.

40 Aún otros ejemplos incluyen derivados de enlazadores con la estructura general: $([L15]_n\text{-F})_m$ en donde el derivado de enlazador está unido covalente o no covalentemente de forma adicional a un anticuerpo y/o a dextrano, y en donde F es un fluoróforo y n y m son números enteros iguales o superiores a 1.

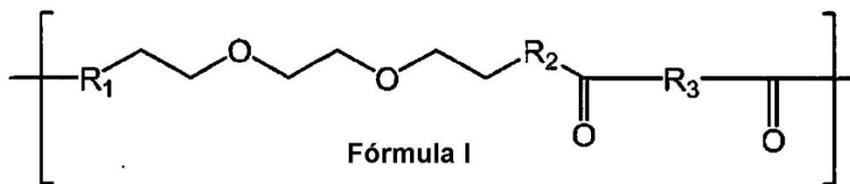
Aún otros ejemplos incluyen:

Microesferas fluorescentes que comprenden enlazadores conjugados con lisamina, y/o con marcadores de color, tales como DNP o colorantes fluorescentes, tales como fluoresceína o rodamina o sus derivados, y/o con PNA.

45 Sistemas tales como: anticuerpo:dextrano:(L-PNA)_n; anticuerpo:dextrano:(L-F)_n; PNA-L:dextrano:(L-F)_n; PNA-L:dextrano:(enzima HRP); PNA₁-L:dextrano(L-PNA₂)_n; en donde L representa un enlazador de al menos una unidad L-15, F representa un fluoróforo, n representa un número entero igual o superior a 1, “.” representa una fijación covalente o no covalente, y “-” representa una fijación covalente.

REIVINDICACIONES

1.- Un enlazador polimérico lineal que comprende al menos dos unidades consecutivas escogidas entre:



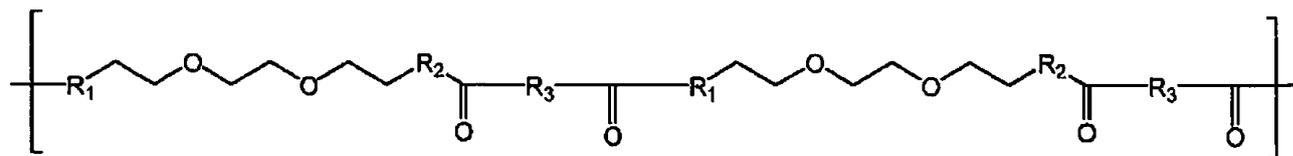
5 en donde

- R₁ y R₂ se escogen entre NH y O,
- R₃ se escoge entre metilo, etilo, propilo, CH₂OCH₂ y (CH₂OCH₂)₂,

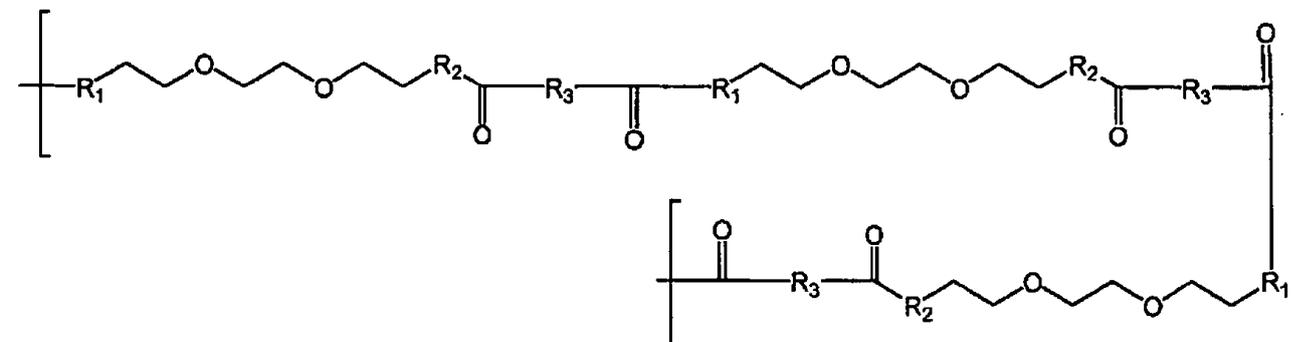
y en donde el enlazador comprende entre uno y tres grupos etiloxi repetidos de forma consecutiva.

10 2.- El enlazador de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos una unidad de Fórmula I en la que R₁ y R₂ son NH, y R₃ es CH₂OCH₂.

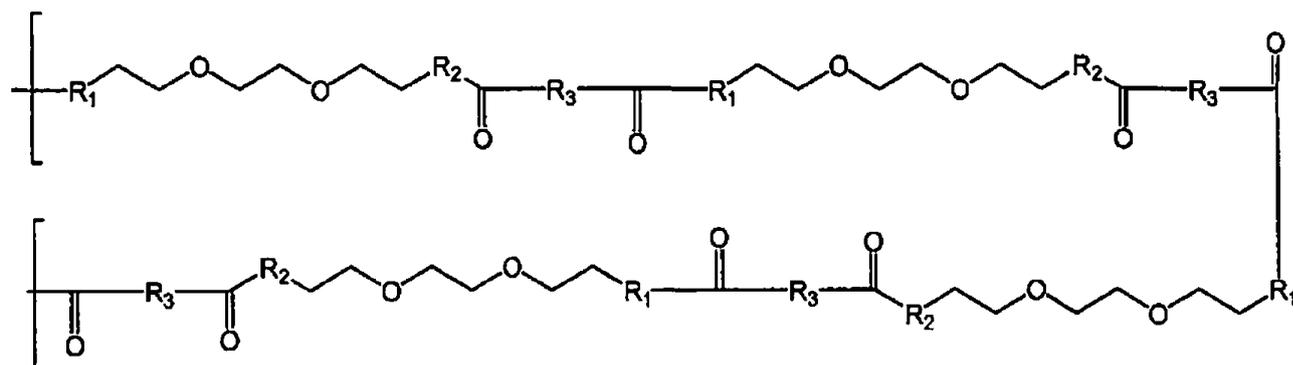
3.- El enlazador de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende dos unidades de Fórmula I, de fórmula:



4.- El enlazador de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende tres unidades de Fórmula I, de fórmula:



15 5.- El enlazador de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende cuatro unidades de Fórmula I, de fórmula:



fluoróforo.

- 22.- El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la molécula comprende al menos un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico.
- 5 23.- El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde al menos un análogo de ácido nucleico comprende el PNA.
- 24.- El método para amplificar una señal procedente de un cambio en un sistema molecular, que comprende detectar dicho cambio con al menos un derivado de enlazador de acuerdo con la reivindicación 8.
- 25.- El método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el derivado de enlazador comprende al menos un marcador de color.
- 10 26.- El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde al menos un marcador de color comprende un fluoróforo.
- 15 27.- Un método de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el derivado de enlazador comprende al menos dos fluoróforos con la misma longitud de onda o con longitudes de onda de emisión diferentes y distinguibles, en donde cada fluoróforo está separado de los otros fluoróforos del derivado de enlazador por un enlazador que comprende entre cuatro y diez unidades consecutivas de la Fórmula I.
- 28.- Un sistema que comprende al menos dos derivados de enlazadores, en donde cada enlazador es un enlazador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y en donde el primer derivado de enlazador comprende al menos un fluoróforo y un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico; y en donde el segundo derivado de enlazador comprende una proteína o una superficie sólida y un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico.
- 20 29.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el análogo de ácido nucleico es PNA.
- 30.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el ácido nucleico o los análogos de ácido nucleico del primer y del segundo derivado de enlazador son capaces de hibridarse entre sí.
- 25 31.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el primer derivado de enlazador se conjuga con al menos un fluoróforo y un PNA; y en donde la proteína o la superficie sólida del segundo derivado de enlazador es un anticuerpo, un antígeno y/o dextrano; y en donde el PNA del primer derivado de enlazador y el PNA del segundo derivado de enlazador son capaces de hibridarse entre sí.
- 32.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 28, que comprende tres derivados de enlazadores.
- 33.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 29, que comprende tres derivados de enlazadores.
- 30 34.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el primer y el segundo derivado de enlazador no son capaces de hibridarse entre sí, y en donde el tercer derivado de enlazador comprende al menos un PNA que reconoce secuencias del PNA sobre cada uno del primero y del segundo derivados de enlazadores.

Figura 1

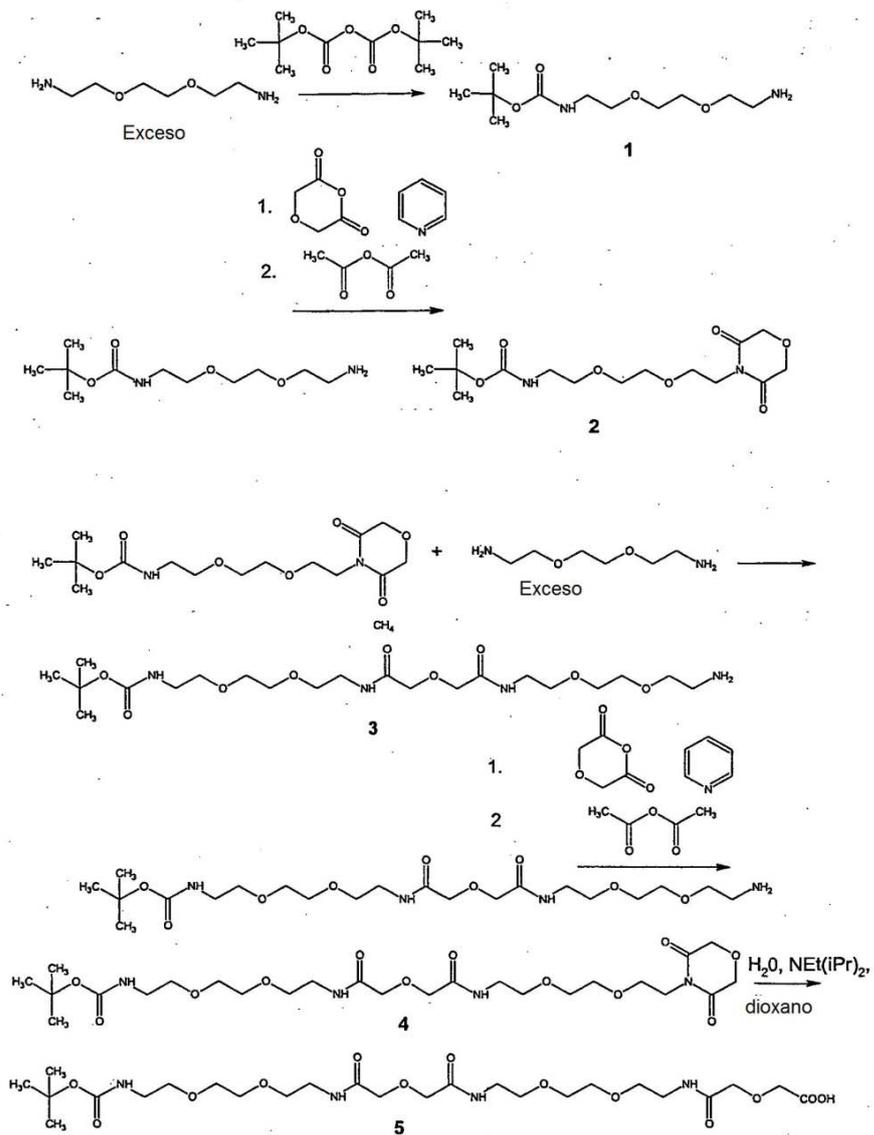
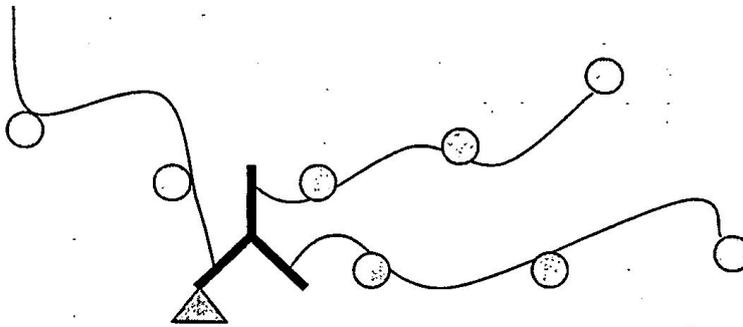
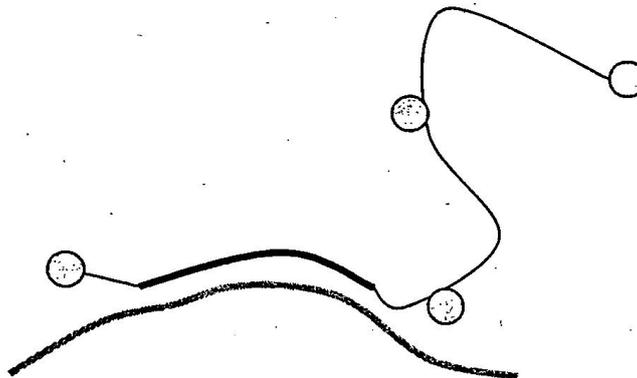


Figura 2A



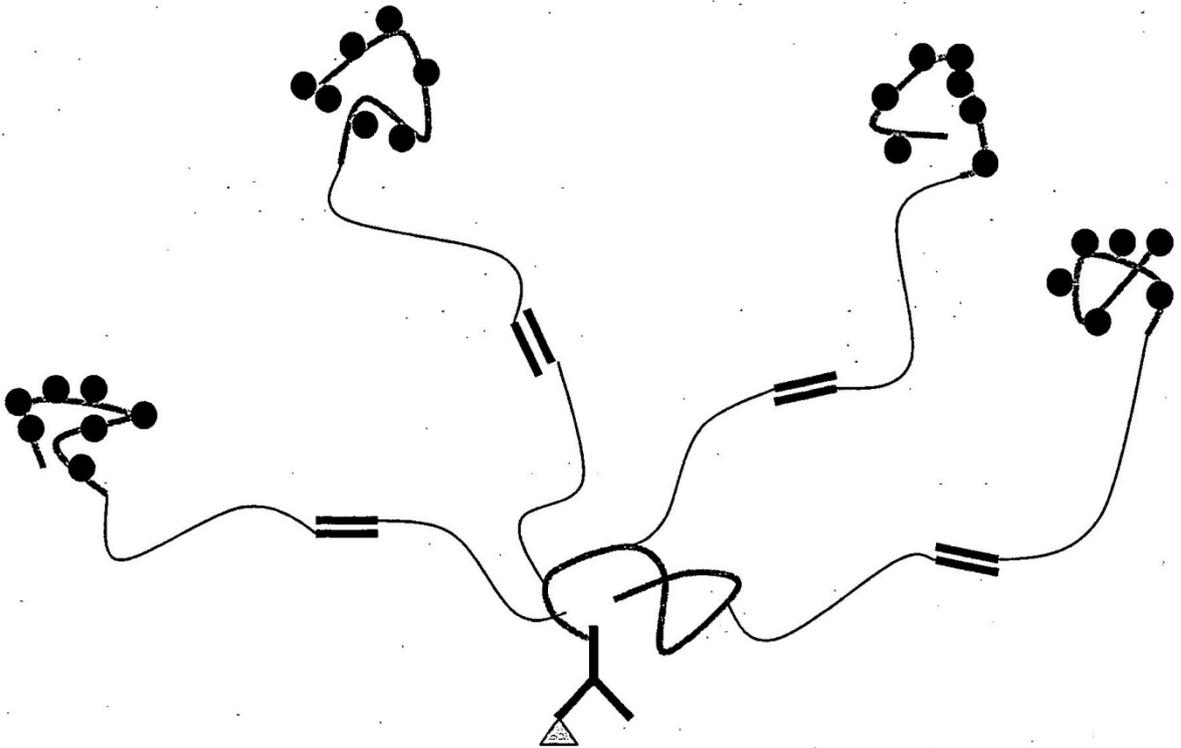
**Derivado de enlazador con anticuerpo conjugado
y
fluoróforos que reconocen un antígeno diana**

Figura 2B



**Derivado de enlazador con ácido nucleico o
análogo de ácido nucleico y conjugados de
fluoróforos que reconocen un ácido nucleico diana**

Figura 3



Sistema ejemplar de ensayo multicapa

Figura 4

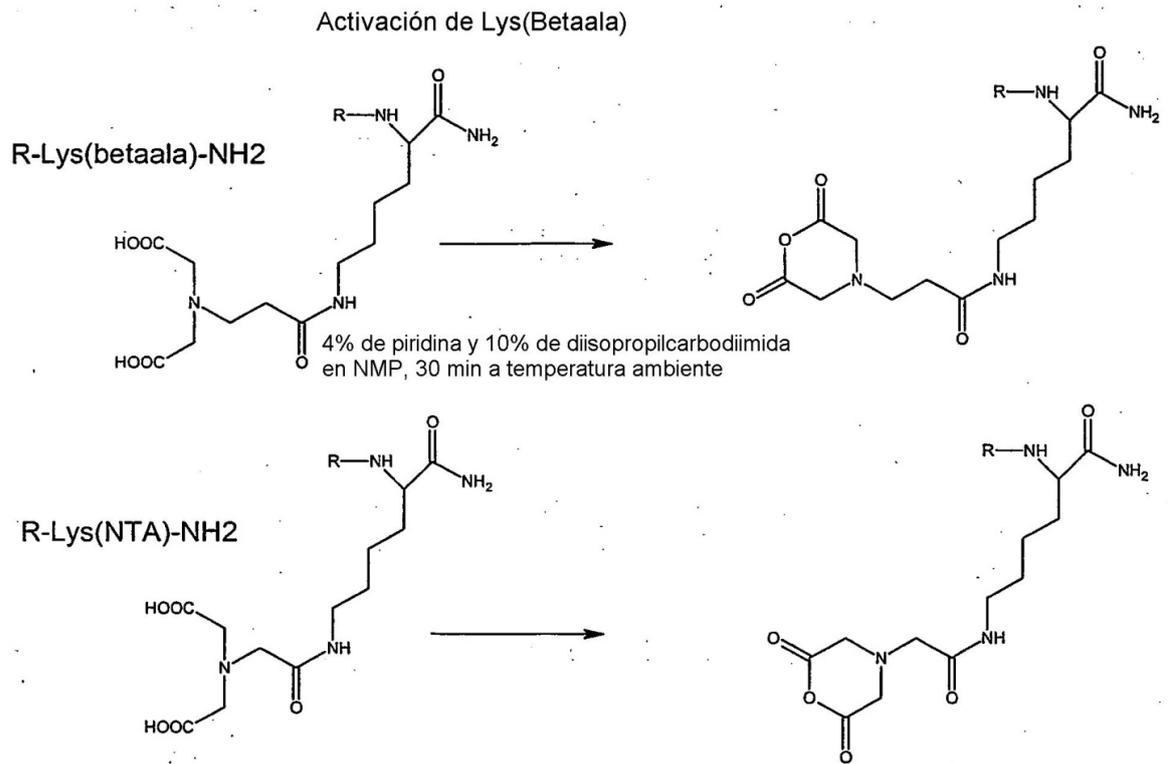


Figura 5

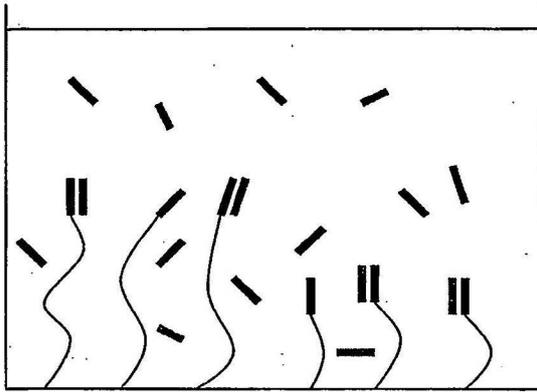


Figura 5A: Captura lenta en relación con la difusión

La concentración de la diana permanece en gran parte constante debido a la difusión rápida. La longitud del enlazador de las sondas tiene menos importancia.

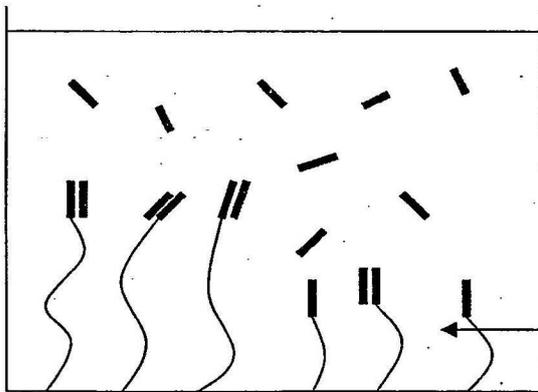


Figura 5b: Captura rápida en relación con la difusión

Zona de captura reducida. La difusión de la diana limitará la captura y las sondas sobre enlazadores más largos capturan con más eficacia debido a que capturan con mayor volumen

Figura 6

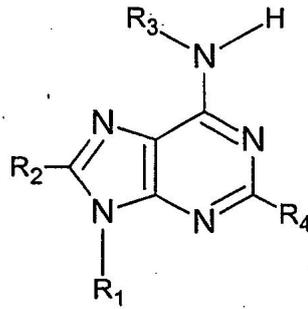


Figura 6a, Adenina, A

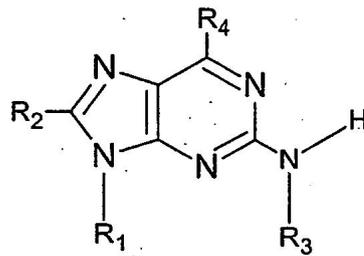


Figura 6b, isoAdenina, isoA

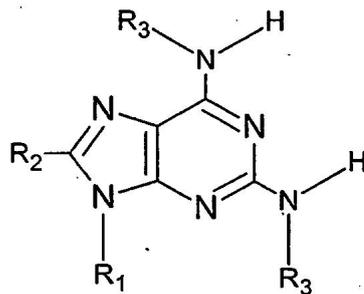


Figura 6c, Diaminopurina, D

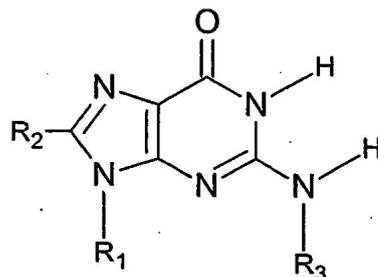


Figura 6d, Guanina, G

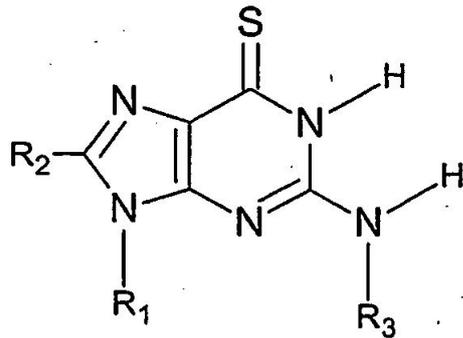


Figura 6e, TioGuanina, Gs

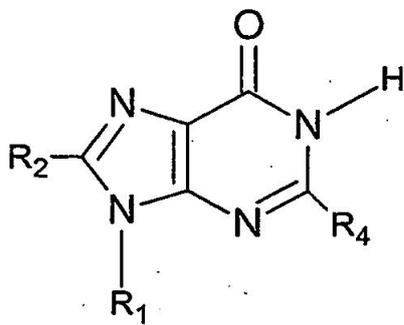


Figura 6f, Inosina, I

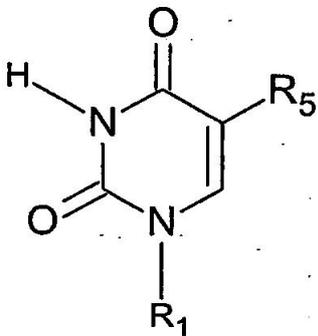


Figura 6g, Uracilo, U

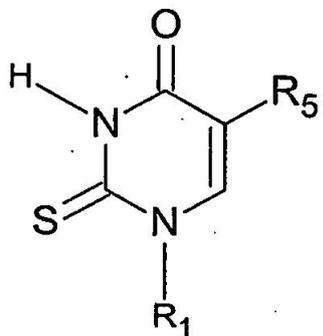


Figura 6h, 2-TioUracilo, U2s

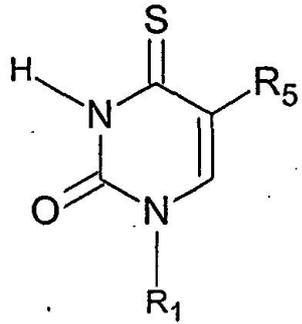


Figura 6i, 4-TioUracilo, U4s

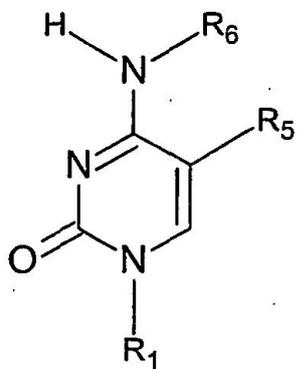


Figura 6j, Citosina, C

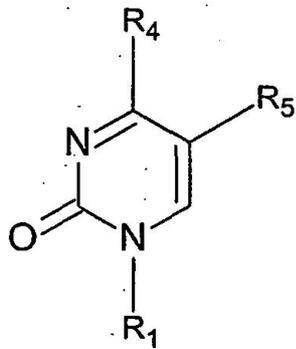


Figura 6k, 2-oxo-Pirimidina, Py-2o

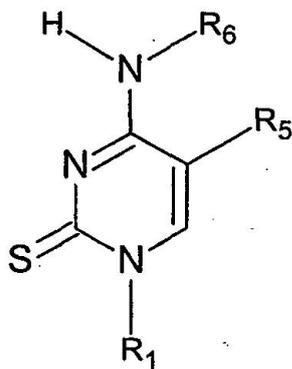


Figura 6l, TioCitosina, Cs

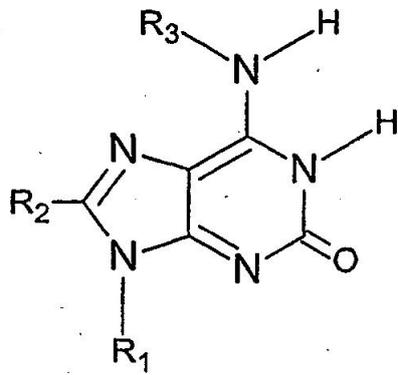


Figura 6m, isoGuanina, isoG

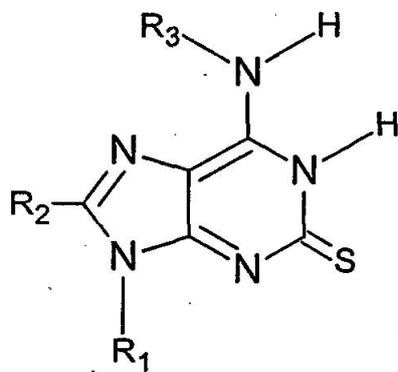


Figura 6n, isotioGuanina, isoGs

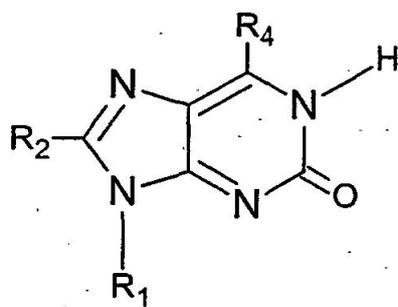


Figura 6o, 2-oxoPurina, Pu-2o

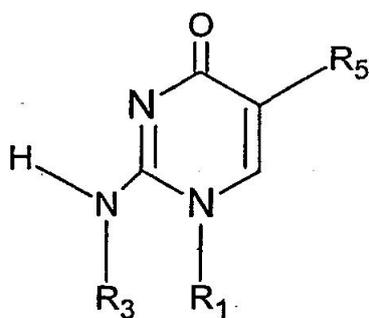


Figura 6p, isoCitosina, isoC

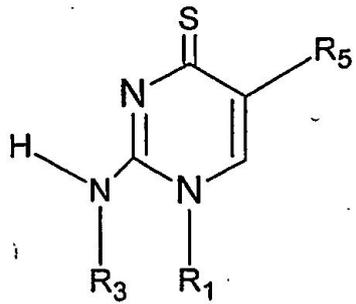


Figura 6q, isotioCitosina, isoCs

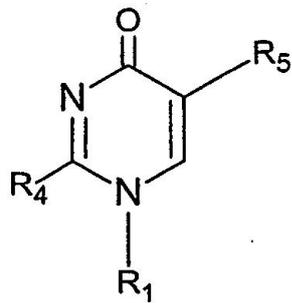
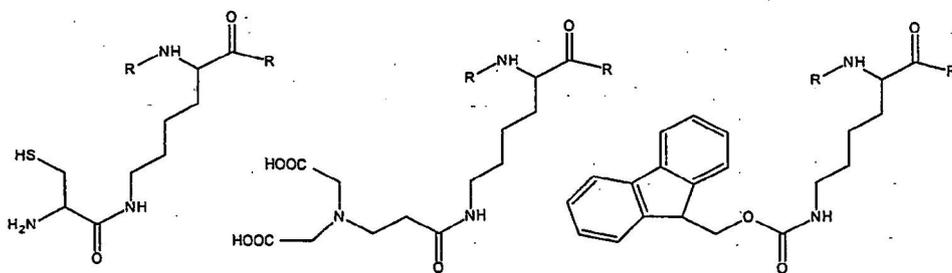


Figura 6r, 4-oxoPirimidina, Py-4o

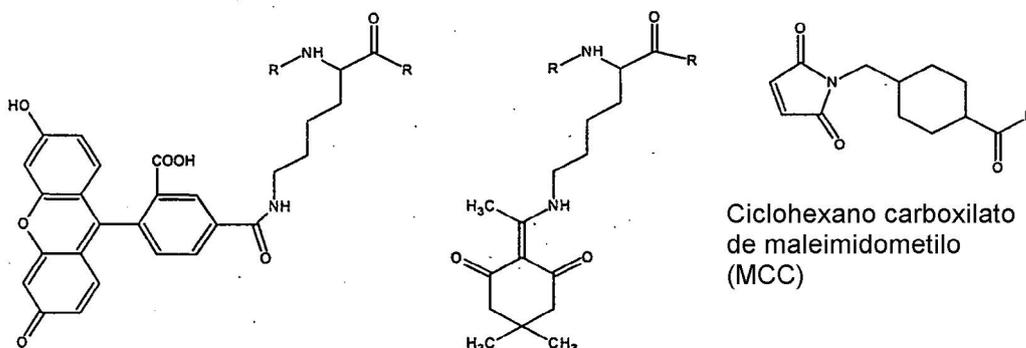
Figura 7



R-Lys(Cys)-R

R-Lys(betaala)-R

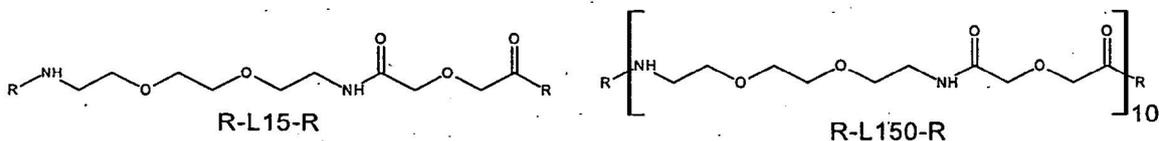
R-Lys(Fmoc)-R



R-Lys(Flu)-R

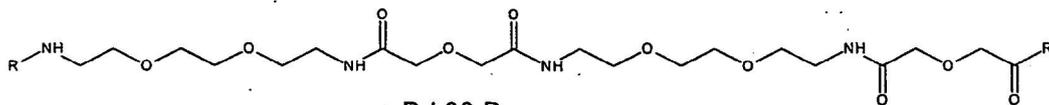
R-Lys(Dde)-R

Ciclohexano carboxilato de maleimidometilo (MCC)

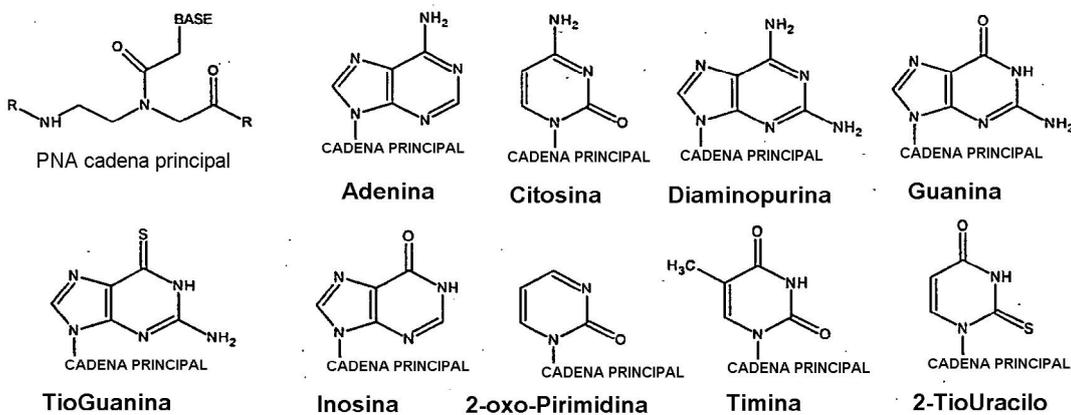


R-L15-R

R-L150-R



R-L30-R



PNA cadena principal

TioGuanina

Inosina

2-oxo-Pirimidina

Timina

2-TioUracilo

Figura 8

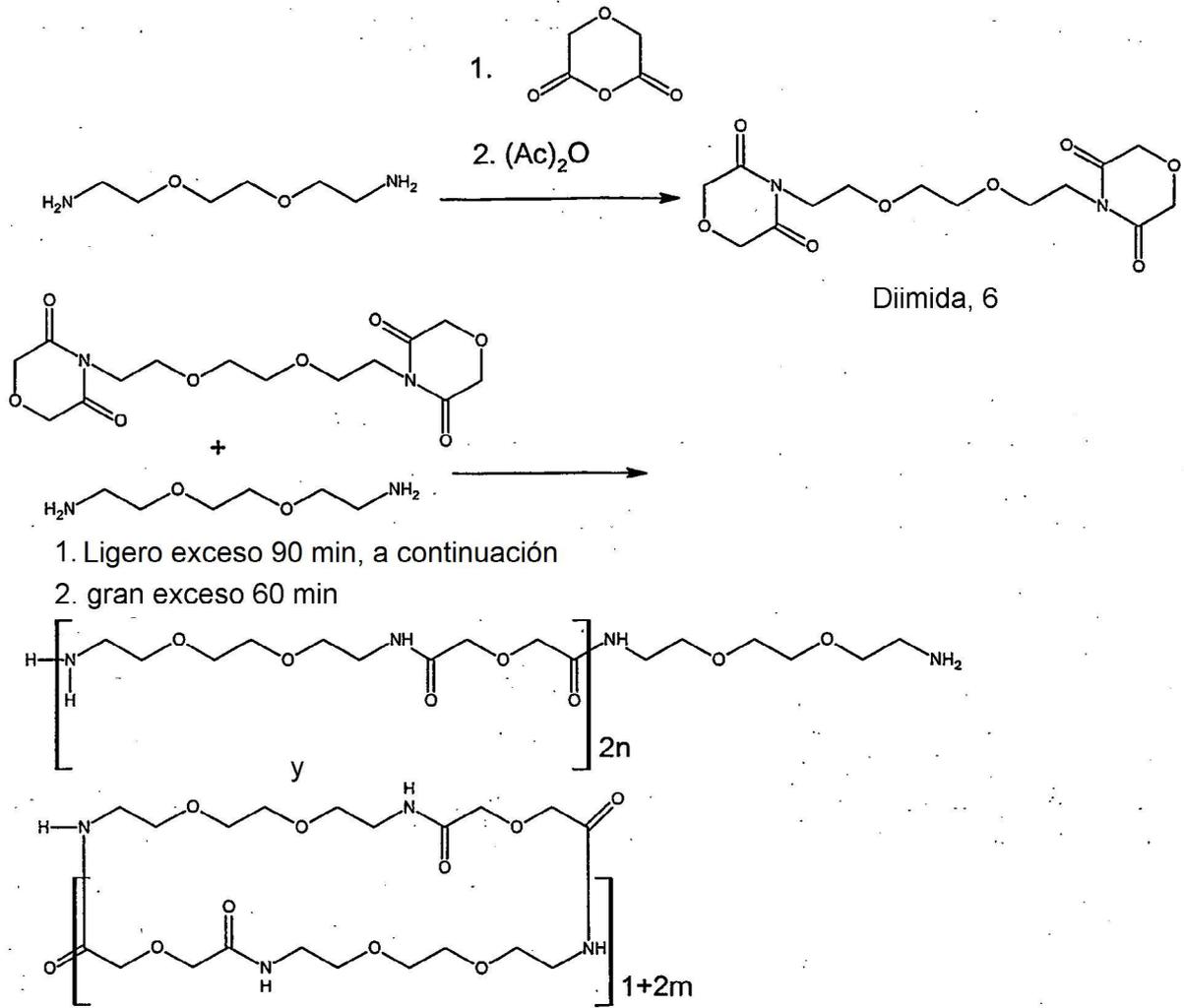


Figura 9

