

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 299**

51 Int. Cl.:
C07B 61/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07819506 .2**
96 Fecha de presentación: **31.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2089343**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2009**

54 Título: **QUÍMICA DE CLICK PARA LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS INFORMADORAS.**

30 Prioridad:
31.10.2006 US 855574 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2011

73 Titular/es:
**BASECLICK GMBH
BAHNHOFSTRASSE 9 - 15
82327 TUTZING, DE**

72 Inventor/es:
**CARELL, Thomas y
SCHWÖGLER, Anja**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 369 299 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

Química de click para la producción de moléculas informadoras

La presente invención se refiere a métodos para producir moléculas informadoras adecuadas para la detección de analitos, por ejemplo ácidos nucleicos.

5 Antecedentes de la invención

Los avances de referencia del campo de la síntesis de ADN, de forma muy importante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la química de fosforamiditos, han conducido a un repertorio creciente de modificaciones de ADN natural. En la PCR, los trifosfatos de nucleósidos modificados, que poseen un ligador en la posición 5 de pirimidinas o en la posición 7 de 7-desazapurinas, se puede incorporar usando ciertas polimerasas de la Familia B [1]. La
10 facilidad de incorporación de estos bloques de construcción en el ADN depende fuertemente del volumen estérico y de la estructura molecular de la cadena lateral. En principio, las cuatro nucleobases de origen natural se pueden sustituir por aquellas modificadas en una PCR [2]. Si se emplea la química de fosforamiditos, en principio se puede incorporar en el ADN cualquier estructura molecular. La mayor limitación es que las nucleobases modificadas que se
15 incorporan en el ADN deben ser estables con respecto a las condiciones de la síntesis de ADN mediante fosforamiditos y la desprotección de la hebra de ADN resultante.

En nuestro grupo [3] se ha desarrollado un enfoque que soslaya tanto los problemas del volumen estérico como la labilidad química potencial de las modificaciones. Los nucleótidos modificados poseen un ligador que contiene un alquino interno y un alquino terminal. El alquino interno facilita la incorporación vía PCR, ya que se minimiza el
20 volumen estérico en estrecha proximidad a la nucleobase. El alquino terminal es un sitio reactivo para la reacción de click [4], que es una cicloadición dipolar de *Huisgen*, catalizada por cobre, entre azidas y alquinos [5]. Esta reacción se puede usar convenientemente para el marcaje post-sintético de biomoléculas. Las azidas se pueden unir así a ADN en una reacción de alto rendimiento sin encontrar reacciones secundarias significativas, ya que las biomoléculas no poseen azidas o alquinos terminales. Este enfoque también se describe en el documento PCT/EP2006/004017. Géci et al. (Bioconjugate Chem., 2006, 17, 950-957) describe oligonucleótidos que tienen una
25 inserción que presenta un grupo alquino. No se describe la post-modificación del grupo alquino con una molécula que contiene azida (reacción de click).

Según procedimientos descritos previamente, sólo se puede introducir un único tipo de grupo marcador de una manera selectiva del sitio.

Aucagne et al. (Organic Letters, 2006, vol. 8, nº 20) describen "llevar a cabo una reacción de click" regioespecífica
30 sucesiva de un dipéptido con análogos dipeptídicos en una síntesis de una cazuela bajo formación de dos enlaces triazólicos.

Allí, un tripéptido se funcionaliza de forma terminal tanto con un grupo alquino como con un grupo alquino sililado, y después se hace reaccionar sucesivamente con análogos dipeptídicos que contienen azida.

De este modo, fue un objeto de la presente invención superar esta limitación y permitir el marcado, específico del
35 sitio, de moléculas informadoras con al menos dos grupos marcadores diferentes, por ejemplo colorantes u otras moléculas funcionales, de manera consecutiva, llevando a cabo de ese modo una versatilidad sin precedentes en la modificación.

Sumario de la invención

La presente invención permite la incorporación específica del sitio de dos o más grupos funcionales diferentes en
40 una molécula informadora, de manera consecutiva. Esto se logra incorporando al menos dos grupos asidero diferentes en la molécula informadora durante su síntesis, que se puede acoplar selectivamente a parejas de reacción que comprenden grupos funcionales diferentes.

La presente invención se refiere a un método para producir una molécula informadora que comprende al menos dos
45 grupos funcionales diferentes, que comprende

(a) sintetizar la molécula informadora a partir de una pluralidad de bloques de construcción, en el que al
50 menos un bloque de construcción comprende un primer grupo asidero que es un grupo alquino o un grupo alquino protegido, en el que al menos un grupo de construcción comprende un segundo grupo asidero que es un grupo alquino protegido, y en el que el primer grupo asidero es diferente del segundo grupo asidero;

(b) acoplar una primera pareja de reacción al primer grupo asidero en condiciones en las que el primer grupo
asidero es reactivo y el segundo grupo asidero no es reactivo, en el que la primera pareja de reacción
comprende un primer grupo funcional, y subsiguientemente

(c) acoplar una segunda pareja de reacción al segundo grupo asidero, en el que la segunda pareja de

reacción comprende un segundo grupo funcional, y en el que el primer grupo funcional es diferente del segundo grupo funcional,

en el que la molécula informadora se selecciona de ácidos nucleicos y análogos de ácidos nucleicos,

en el que una pareja de reacción que comprende un grupo azida se acopla a un grupo alquino vía reacción de click,

- 5 en el que la síntesis de la molécula informadora es una síntesis química en fase sólida en la que la molécula informadora se sintetiza mediante ensamblaje por etapas de bloques de construcción mientras está unida a una fase sólida y en la que al menos la primera pareja de reacción se acopla mientras que la molécula informadora está unida a la fase sólida, y

en el que el grupo alquino protegido es un alquino protegido con tris(alquil/aril)sililo.

- 10 Se describe un método para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas:

(a) proporcionar una muestra;

(b) poner en contacto la muestra con una molécula informadora que comprende al menos dos grupos funcionales diferentes, en el que los grupos funcionales están unidos a la molécula informadora vía grupos ligadores que comprenden anillos de 1,2,3-triazol, y

- 15 (c) detectar una interacción de la molécula informadora con el analito, lo que es indicativo de la presencia y/o la cantidad de analito en la muestra.

Además, se describe una molécula receptora que comprende al menos dos grupos funcionales diferentes, en la que los grupos funcionales están unidos a la molécula informadora vía grupos ligadores que comprenden anillos de 1,2,3-triazol.

- 20 Un aspecto adicional de la invención es un compuesto de la Fórmula (I)



en la que

C es un grupo alquino protegido,

S es un espaciador o un enlace, y

- 25 N es un bloque de construcción nucleotídico, en el que el grupo alquino protegido es un alquino protegido con tris(alquil/aril)sililo.

Adicionalmente, se describe un compuesto de la Fórmula (II)



en la que

- 30 B es biotina o un derivado de biotina, tal como destiobiotina o aminobiotina,

S es un espaciador o un enlace, y

N₃ es un grupo azida.

Se describe un compuesto de la Fórmula (III)



- 35 en la que

Q es un grupo con fluorescencia apagada,

S es un espaciador o un enlace, y

N es un grupo azida.

Adicionalmente, se describe un compuesto de la Fórmula (IV)

- 40 Z-S-N

en la que

Z es un grupo aldosa, en el que los grupos hidroxilo están protegidos con grupos acilo y/o sililo, o un grupo 1,2-diol protegido o no protegido,

S es un espaciador o un enlace, y

- 5 N es un bloque de construcción de ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, tal como un compuesto nucleosídico o nucleotídico.

Además, se describe un compuesto de la Fórmula (V)



en la que

- 10 D es un colorante de infrarrojos (IR),

S es un espaciador o un enlace, y

N es un grupo azida.

Los compuestos de las Fórmulas (I)-(V) son adecuados como reactivos en métodos para detectar analitos, particularmente mediante métodos fotográficos como se describe más abajo en detalle.

- 15 La presente invención permite una producción eficiente de moléculas informadoras que comprenden dos, tres o más grupos funcionales diferentes. Estas moléculas informadoras permiten una detección altamente sensible de un analito, por ejemplo ácidos nucleicos o proteínas que se unen a ácidos nucleicos, en muestras biológicas, por ejemplo muestras clínicas, muestras medioambientales o muestras agrícolas. Las aplicaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a, la detección de variabilidades genéticas, por ejemplo polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), resistencias a plaguicidas o a medicamentos, tolerancias o intolerancias, genotipado, por ejemplo la
- 20 detección de especies o cepas de organismos, la detección de organismos o cepas genéticamente modificados, o la detección de patógenos o plagas, y el diagnóstico de enfermedades, por ejemplo enfermedades genéticas, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades infecciosas. Una aplicación preferida adicional es la detección de ácidos nucleicos en muestras para la protección de marcas, en la que los productos tales como productos agrícolas, productos alimentarios, o bienes de valor y/o el envasado de estos productos se
- 25 codifican con información específica del producto, por ejemplo pero sin limitarse a sitio de producción, fecha de producción, distribuidor, etc., y en la que esta información se detecta con los métodos y reactivos como se describen anteriormente.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

- 30 La invención se refiere a la producción de una molécula informadora. La molécula informadora es adecuada para aplicaciones de diagnóstico, y se puede funcionalizar con al menos dos, por ejemplo dos, tres, cuatro o más grupos funcionales diferentes mediante reacciones de acoplamiento selectivo. La molécula informadora es una molécula de ácido nucleico o una molécula de análogo de ácido nucleico. La molécula informadora se sintetiza a partir de bloques de construcción, por ejemplo bloques de construcción monoméricos como nucleótidos o análogos nucleotídicos. La síntesis implica una síntesis química en fase sólida. Preferiblemente, la molécula informadora comprende al menos 4, más preferiblemente al menos 6, y lo más preferible al menos 10 bloques de construcción.
- 35 Aunque se pueden usar moléculas informadoras con una longitud de varios cientos y hasta miles de bloques de construcción, se prefiere una longitud superior de hasta 300 bloques de construcción. Más preferiblemente, la longitud es hasta 200, y muy preferiblemente hasta 100 bloques de construcción.
- 40 Los grupos funcionales se seleccionan preferiblemente de grupos marcadores, tales como colorantes, particularmente colorantes fluorescentes, grupos fotosensibilizadores, grupos extintores de la fluorescencia y grupos de unión. Los grupos marcadores pueden ser grupos marcadores directos, es decir, grupos que generan una señal detectable, o grupos marcadores indirectos, es decir, grupos que provocan la generación de una señal detectable mediante grupos diferentes.
- 45 En una realización especialmente preferida, los grupos marcadores son colorantes fluorescentes, por ejemplo colorantes fluorescentes azules, rojos, o verdes, tales como colorantes de cianina o colorantes de merocianina. Se prefieren particularmente los colorantes de IR. Estos colorantes se pueden funcionalizar en derivados de azida como se describe en el Ejemplo 18.

- 50 Los grupos extintores de la fluorescencia son grupos capaces de apagar las emisiones de fluorescencia de los grupos fluorescentes. Los grupos extintores de la fluorescencia se pueden seleccionar de grupos extintores de la fluorescencia conocidos, por ejemplo grupos extintores de la fluorescencia en moléculas informadoras de sondas

fluorescibles como se describe en las referencias [12-16].

Los grupos de unión son grupos para unir una pareja de unión específica vía interacciones de alta afinidad. Los ejemplos específicos de grupos de unión son biotina o derivados de biotina tales como destiobiotina, o aminobiotina, o haptenos, por ejemplo grupos de bajo peso molecular (por ejemplo peso molecular ≤ 2000) capaces de interactuar específicamente con un anticuerpo tal como trinitrofenilo o epítomos peptídicos tales como la secuencia FLAG.

La invención comprende el acoplamiento de diferentes grupos funcionales a la molécula informadora. Los diferentes grupos funcionales comprenden preferiblemente al menos un grupo marcador. En una realización especialmente preferida, el primer grupo funcional es un grupo marcador, y el segundo grupo funcional es un grupo extintor de la fluorescencia o un grupo de unión.

Cuando el primer grupo funcional es un grupo marcador y el segundo grupo funcional es un grupo extintor de la fluorescencia, la molécula informadora puede ser una sonda fluorescente (MB). Las sondas fluorescentes son sondas de hibridación monocatenarias, por ejemplo sondas de ácidos nucleicos o de análogos de ácidos nucleicos que forman una estructura de tallo y bucle. El bucle puede contener una secuencia de sonda que es complementaria a una secuencia diana, y el tallo está formado por la hibridación de secuencias de brazos complementarias que están localizadas en uno y otro lado de la secuencia de la sonda. Un grupo marcador, por ejemplo un fluoróforo, está enlazado preferiblemente al extremo de un brazo, y un extintor de la fluorescencia está enlazado al otro brazo. Las sondas fluorescentes no fluorescen cuando están libres en disolución. Sin embargo, cuando se hibridan a una hebra de ácido nucleico que contiene una secuencia diana, sufren un cambio conformacional que da como resultado una fluorescencia brillante. La longitud de las moléculas informadoras de sondas fluorescentes es preferiblemente 15-100, y más preferiblemente 20-50 bloques de construcción nucleotídicos o de análogos nucleotídicos.

En una realización adicional, los grupos funcionales primero y segundo son grupos marcadores capaces de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

El método de la invención implica la incorporación de al menos dos tipos diferentes de grupos asidero en la molécula informadora, a la que se pueden acoplar al menos dos tipos diferentes de grupos funcionales. Según la presente invención, los grupos asidero se seleccionan de grupos alquino sin proteger o protegidos, en los que los grupos asidero primero y segundo son diferentes.

Los grupos asidero se seleccionan de grupos alquino, en los que el primer grupo asidero puede ser un grupo alquino sin proteger y el segundo grupo asidero puede ser un grupo alquino protegido, o en los que el primer grupo asidero puede ser un primer grupo alquino protegido y el segundo grupo alquino puede ser un segundo grupo alquino protegido, en los que los grupos de protección primero y segundo son diferentes, y en los que el primer grupo de protección se puede eliminar selectivamente de la molécula informadora sin eliminar el segundo grupo de protección. Los grupos de protección son grupos tri(alquil/aril)silílicos tales como trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), trifenilsililo o terc-butil-dimetilsililo (TBDMS). Los grupos protectores silílicos se pueden eliminar de los grupos alquino mediante tratamiento con ácido y/o fluoruros. Los grupos de protección silílicos pequeños tales como TMS son lábiles y se pueden eliminar en condiciones suaves, mientras que los grupos de protección silílicos más voluminosos, tales como TBDMS o TIPS, requieren condiciones más duras para la eliminación.

El método de la invención comprende un acoplamiento selectivo de la primera pareja de reacción al primer grupo asidero en la molécula informadora, en condiciones en las que el primer grupo asidero está sin proteger y de este modo es capaz de reaccionar y el segundo grupo asidero no es reactivo, por ejemplo debido a la presencia de un grupo de protección. Los grupos alquino están acoplados a una pareja de reacción con un grupo azida vía una reacción de click, es decir, una cicloadición (3 + 2) entre grupos azida y alquino, lo que da como resultado la formación de anillos 1,2,3-triazólicos. La reacción de click se lleva a cabo preferiblemente en presencia de iones cobre, por ejemplo con CuBr, tris(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (TBTA) y ascorbato.

La presente invención también permite la incorporación de más de dos grupos asidero diferentes en una molécula informadora. En este caso, el primer grupo asidero puede ser un grupo alquino no protegido. El segundo grupo asidero puede ser un primer grupo alquino protegido que se puede separar por escisión en las primeras condiciones de desprotección. El tercer grupo asidero puede ser un segundo grupo protegido, por ejemplo un segundo grupo alquino protegido que es estable en las primeras condiciones de desprotección, que dan como resultado la desprotección del primer grupo protegido, y que se puede separar por escisión en unas segundas condiciones de desprotección, que son diferentes de las primeras condiciones de desprotección. Los ejemplos específicos de los grupos protegidos primero y segundo son TMS y TIPS. TMS se puede separar por escisión en condiciones ácidas suaves, por ejemplo ácido acético al 1%. TIPS es estable en estas condiciones, y se puede separar por escisión mediante tratamiento con fluoruro, por ejemplo con fluoruro de *tetra-n*-butilamonio (TBAF) en acetonitrilo/DMF.

La síntesis de la molécula informadora comprende una síntesis química en fase sólida (por ejemplo Fig. 17), en la que la molécula informadora se sintetiza mediante ensamblaje por etapas de bloques de construcción mientras está unida a una fase sólida. Al menos la primera pareja de reacción se acopla mientras que la molécula informadora

está unida a la fase sólida. En este caso, el acoplamiento de la segunda pareja de reacción, y opcionalmente otras parejas de reacción, puede tener lugar mientras que la molécula informadora también está todavía unida a la fase sólida, o después de la escisión de la molécula informadora de la fase sólida.

5 Se describe además un método para detectar un analito en una muestra usando una molécula informadora, que comprende dos grupos funcionales diferentes, en el que los grupos funcionales están unidos a la molécula informadora vía grupos ligadores que comprenden anillos 1,2,3-triazólicos. Estos grupos ligadores resultan de llevar a cabo una reacción de click que implica el acoplamiento de los al menos dos grupos funcionales diferentes vía una reacción de click entre un alquino y un grupo azida a la cadena principal de la molécula informadora.

10 La detección puede ser una detección cualitativa, por ejemplo la determinación de la presencia o ausencia de un analito, por ejemplo una secuencia de ácido nucleico específica, en la muestra a analizar. Sin embargo, el método también permite la detección cuantitativa de un analito, por ejemplo una secuencia de ácido nucleico, en la muestra a analizar. La detección cualitativa y/o cuantitativa puede comprender la determinación de grupos marcadores según métodos conocidos en la técnica.

15 El analito a detectar se selecciona preferiblemente de ácidos nucleicos y moléculas de unión a nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos, por ejemplo proteínas de unión a nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos. Más preferiblemente, el analito es un ácido nucleico, por ejemplo cualquier tipo de ácido nucleico que se puede detectar según técnicas conocidas, particularmente técnicas de hibridación. Por ejemplo, los analitos de ácido nucleico se pueden seleccionar de ADN, por ejemplo ADN bicatenario o monocatenario, ARN, o híbridos de ADN-ARN. Los ejemplos particulares de analitos de ácido nucleico son ADN genómico, ARNm, o productos derivados de ellos, por
20 ejemplo ADNc. Además, los analitos de ácido nucleico pueden ser fragmentos de ADN, que se unen mediante una ligasa a partir de una pluralidad de, por ejemplo, dos subfragmentos.

El método de detección se puede llevar a cabo según cualquier formato de ensayo conocido que sea adecuado para la detección de analitos, particularmente analitos de ácido nucleico, en una muestra. Por ejemplo, el método puede implicar la detección de analitos inmovilizados sobre superficies sólidas tales como membranas, por ejemplo en transferencias Southern o Northern, chips, matrices, o partículas tales como perlas. Además, la detección se puede llevar a cabo en geles, por ejemplo tras la separación electroforética de la muestra en geles, por ejemplo geles de agarosa o de poliacrilamida. El método puede implicar la detección de analitos individuales, o la detección paralela de una pluralidad de analitos, por ejemplo en un formato de chip o micromatrices.

La detección puede implicar irradiar un medio fotosensible en presencia de una muestra que se sospecha que contiene el analito y una molécula informadora que comprende grupos marcadores fotosensibilizadores, por ejemplo grupos fluorescentes, capaces de efectuar una transferencia de energía al medio fotosensible, en el que los grupos marcadores se pueden formar en el medio. Preferiblemente, se usa una molécula informadora en la que el grupo fotosensibilizador tiene extinguida su fluorescencia en ausencia de analitos. En presencia de analito, la extinción de la fluorescencia del grupo fotosensibilizador se reduce o se termina.

Debido a su elevada sensibilidad, el método de detección es adecuado para detectar directamente analitos sin amplificación. Incluso se pueden determinar cantidades minúsculas de analitos, por ejemplo de ácidos nucleicos, por ejemplo 0,1 ng o menores, preferiblemente 0,01 ng o menores, más preferiblemente 1 pg o menores, todavía más preferiblemente 0,1 pg o menores, incluso más preferiblemente 0,01 pg o menores, y lo más preferiblemente 0,001 pg o menores, incluso sin amplificación. Se puede obtener una sensibilidad especialmente elevada incorporando múltiples grupos marcadores en una molécula informadora. Por ejemplo, la detección de un analito, por ejemplo un gen, en una muestra biológica se puede llevar a cabo mediante una combinación de transferencia Southern y el método de detección. Sin embargo, se debería observar que el método de detección también permite la detección de ácidos nucleicos combinada con una etapa de amplificación, que se puede llevar a cabo según protocolos conocidos tales como PCR o sus modificaciones, tales como PCR asimétrica, PCR en tiempo real, PCR de transcripción inversa, etc., u otros protocolos de amplificación tales como LCR.

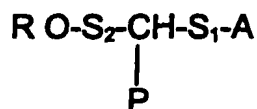
Por ejemplo, se lleva a cabo una detección del analito específica de la secuencia, en la que por ejemplo un ácido nucleico que tiene una secuencia específica se distingue de otras secuencias de ácido nucleico en la muestra, o un polipéptido capaz de unirse a una secuencia de ácido nucleico específica se distingue de otros polipéptidos en la muestra. Tal detección específica de la secuencia comprende preferiblemente una reacción de hibridación específica de la secuencia, mediante la cual la secuencia de ácido nucleico a detectar se asocia con un compuesto que posee un grupo marcador o un grupo precursor marcador. Sin embargo, se debería observar que el método de detección también permite la detección de ácidos nucleicos no específica de la secuencia, por ejemplo la detección de cualesquiera ácidos nucleicos presentes en una muestra.

El grupo asidero está unido a un bloque de construcción que es adecuado para la síntesis de la molécula informadora. Preferiblemente, el grupo asidero está unido a una nucleobase, que se puede seleccionar de bases purínicas y pirimidínicas de origen natural y de origen no natural. Preferiblemente, las nucleobases se seleccionan de citidina, uracilo, timina, adenina, guanina, 7-desazaadenina, 7-desazaguanina, inosina y xantina. El grupo asidero

está unido preferiblemente a la posición 5 ó 6, más preferiblemente a la posición 5, de una nucleobase pirimidínica, o a la posición 7 u 8, más preferiblemente a la posición 7, de una nucleobase purínica.

Como alternativa, el grupo asidero también se puede unir a grupos fosfato o de azúcar de los bloques de construcción nucleotídicos.

- 5 Además, la presente invención también permite la incorporación de bloques de construcción no nucleosídicos que poseen grupos asidero en una molécula informadora. Los bloques de construcción no nucleosídicos preferidos tienen la Fórmula general (VI):



en la que

- 10 A es un grupo alquino protegido o no protegido,

S₁ y S₂ son, en cada caso independientemente, un grupo no nucleosídico, por ejemplo un espaciador o un enlace, por ejemplo S₁ es un espaciador como se define más abajo, y S₂ es un enlace covalente,

P es un grupo fosfato o grupo análogo de fosfato, por ejemplo un grupo fosforamidito, y

R es un grupo de acoplamiento para la síntesis de ácidos nucleicos, por ejemplo un grupo dimetoxitritilo (DMT).

- 15 El grupo asidero se puede unir covalentemente al bloque de construcción, por ejemplo vía un enlace directo o un espaciador, por ejemplo un espaciador que tiene una longitud de cadena de hasta 20 átomos. El espaciador puede ser un espaciador flexible, por ejemplo un espaciador a base de alquileo, que contiene opcionalmente heteroátomos tales como O, S, y/o N, o un espaciador al menos parcialmente rígido, por ejemplo un espaciador que comprende al menos un grupo rígido seleccionado de grupos alqueno, grupos alquino, grupos cíclicos, particularmente grupos aromáticos o heteroaromáticos, pero también grupos cicloalifáticos y sus combinaciones. Se prefiere una unión del grupo funcional vía un enlace directo, un espaciador flexible o un espaciador parcialmente rígido, en la que el espaciador flexible podría tener por ejemplo una longitud de cadena de hasta 6 átomos, más particularmente hasta 4 átomos, y en la que el espaciador parcialmente rígido tiene preferiblemente una longitud de cadena de hasta 20 átomos, por ejemplo hasta 10 átomos, y comprende al menos un grupo rígido como se define anteriormente, particularmente un grupo alquileo, y al menos un grupo flexible, por ejemplo un grupo alquileo. La estructura de un espaciador que contiene un grupo rígido, por ejemplo un espaciador parcialmente rígido, es preferiblemente tal que el grupo rígido está unido directamente a la nucleobase.
- 20
- 25

- El término "nucleótido" según la presente invención se refiere particularmente a ribonucleótidos, 2'-desoxirribonucleótidos, o 2',3'-didesoxirribonucleótidos. Los análogos nucleotídicos se pueden seleccionar de nucleótidos modificados con azúcar o en la cadena principal, particularmente de análogos nucleotídicos que se pueden incorporar enzimáticamente en ácidos nucleicos. En nucleótidos preferidos modificados con azúcar, el grupo 2'-OH o H del azúcar de ribosa se sustituye por un grupo seleccionado de OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en los que R es alquilo de C₁-C₆, alqueno o alquinilo, y halo es F, Cl, Br o I. La propia ribosa se puede sustituir por otros grupos de 5 ó 6 miembros carbocíclicos o heterocíclicos tales como un grupo ciclopentano o un grupo ciclohexeno. En nucleótidos preferidos modificados en la cadena principal, el grupo fosfo(tri)éster se puede sustituir por un grupo modificado, por ejemplo un grupo fosforotioato o un grupo H-fosfonato. Otros análogos nucleotídicos preferidos incluyen bloques de construcción para la síntesis de análogos de ácido nucleico tales como ácidos morfolinonucleicos, ácidos nucleicos peptídicos o ácidos nucleicos bloqueados.
- 30
- 35

- Los ácidos nucleicos funcionalizados pueden ser oligonucleótidos, por ejemplo ácidos nucleicos que tienen una longitud de hasta 30 bloques en construcción nucleotídicos (o de análogos nucleotídicos), o polinucleótidos que tienen una longitud de más de 30 bloques de construcción nucleotídicos (o de análogos nucleotídicos). Preferiblemente, los ácidos nucleicos y análogos nucleicos son capaces de unirse específicamente al analito, por ejemplo capaces de hibridarse con un analito de ácido nucleico en las condiciones de ensayo. La longitud mínima es preferiblemente 12, y más preferiblemente 14 bloques de construcción nucleotídicos (o de análogos nucleotídicos).
- 40

- Los grupos asidero unidos a bloques de construcción de ácidos nucleicos o de análogos de ácidos nucleicos se pueden incorporar en ácidos nucleicos mediante técnicas estándar para la síntesis química en fase sólida. La síntesis química, por ejemplo, se puede llevar a cabo mediante química de fosforamiditos estándar usando fosforamiditos de nucleósidos modificados como bloques de construcción en protocolos de síntesis estándar. Otros tipos de bloques de construcción preferidos para la síntesis química incluyen nucleósidos modificados con H-fosfonato o con fosforotriéster.
- 45
- 50

El método de detección se puede llevar a cabo mediante cualesquiera protocolos de detección de ácidos nucleicos conocidos, por ejemplo que implican el uso de soportes sólidos. Por ejemplo, se puede proporcionar un soporte sólido, por ejemplo un chip o una matriz, o un material en partículas tal como una perla, al que se une una sonda de captura capaz de hibridarse al analito a detectar. El analito de ácido nucleico unido a la fase sólida se puede detectar usando sondas de hibridación funcionalizadas, que se hibridan con el analito de ácido nucleico en una parte de la secuencia diferente a como lo hace la sonda de captura, y la posterior detección de la sonda de hibridación unida, por ejemplo con un reactivo de metalización. Este método es particularmente adecuado para las aplicaciones de diagnóstico en el campo agrícola y clínico, por ejemplo para la detección de ADN y/o ARNm procedente de plantas, por ejemplo plantas genéticamente modificadas, ADN procedente de patógenos o plagas vegetales, etc., o para la protección de marcas.

La detección puede implicar poner en contacto un producto de asociación del analito y una molécula informadora que comprende un grupo fotosensibilizador con un medio fotosensible, por ejemplo transfiriendo una muestra o alícuota de muestra en la que puede estar presente un producto de asociación sobre el medio fotosensible, por ejemplo mediante aplicación de manchas, pipeteo, etc. Con la irradiación, se efectúa una transferencia de energía desde el grupo fotosensibilizador al medio fotosensible, de manera que se forman en el medio fotosensible grupos marcadores tales como núcleos de metal, por ejemplo plata, en presencia, pero no en ausencia, de grupos fotosensibilizadores. Si es necesario, los grupos marcadores se pueden someter a un procedimiento de desarrollo, por ejemplo un procedimiento de desarrollo químico o fotoquímico según técnicas fotográficas. El medio fotosensible puede ser cualquier soporte sólido, o cualquier material soportado capaz de formar grupos marcadores, por ejemplo núcleos de metal.

Preferiblemente, el medio fotosensible es un medio sensible a la luz, tal como papel sensible a la luz, o una emulsión o gel sensible a la luz sobre un material de soporte. Más preferiblemente, el medio fotosensible es un medio fotográfico, tal como papel fotográfico. La irradiación se lleva a cabo en condiciones, por ejemplo de longitudes de onda y/o intensidad de la luz de irradiación, bajo las cuales tiene lugar la formación selectiva de grupos marcadores en presencia de grupos fotosensibilizadores. Preferiblemente, la irradiación tiene lugar con luz infrarroja y/o con luz visible de onda larga, dependiendo de la sensibilidad del medio. La longitud de onda de la irradiación puede ser, por ejemplo, 500 nm o mayor, 520 nm o mayor, 540 nm o mayor, 560 nm o mayor, 580 nm o mayor, para la luz visible o 700 nm a 10 μm , para la luz infrarroja.

El método de detección comprende la detección de grupos marcadores. Los grupos marcadores pueden ser seleccionados preferiblemente de grupos formadores de deposición metálica, por ejemplo grupos funcionalizados con aldehídos, de grupos fluorescentes o formadores de fluorescencia, o de grupos activos redox.

La formación de deposiciones metálicas requiere el tratamiento de grupos aldehídos con un reactivo de metalización, por ejemplo un reactivo que comprende átomos y/o iones metálicos seleccionados de Ag, Au, Bi, Cu, Pd o Pt que se pueden depositar selectivamente alrededor de grupos aldehído, por ejemplo mediante reducción. Preferiblemente, el reactivo de metalización comprende una sal de Ag^+ , tal como un complejo de Ag-amoniaco, es decir, el reactivo de Tollens. Otros ejemplos preferidos de reactivos de metalización son $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, complejos terpiridínicos de platino tales como $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ o KAuCl_4 .

La detección de los grupos marcadores se puede llevar a cabo según métodos conocidos. Por ejemplo, las deposiciones metálicas se pueden determinar cualitativa y/o cuantitativamente por métodos ópticos y/o métodos eléctricos. En una realización preferida, las deposiciones metálicas sobre una superficie sólida se pueden determinar midiendo parámetros eléctricos, por ejemplo la conductividad. Los grupos marcadores fluorescentes se pueden determinar cualitativa y/o cuantitativamente mediante métodos de medida fluorescentes conocidos, por ejemplo excitación vía una fuente de luz adecuada, tal como un láser, y detectando la luz fluorescente emitida.

Adicionalmente, el método de detección puede comprender la detección de grupos marcadores que se forman específicamente en el sitio en un medio fotosensible en presencia de grupos fotosensibilizadores. Los grupos fotosensibilizadores se seleccionan preferiblemente de grupos fluorescentes o luminiscentes. El medio fotosensible comprende grupos que, cuando se irradian en presencia de grupos fotosensibilizadores, forman grupos marcadores detectables, tales como núcleos de metal, que se pueden desarrollar según técnicas fotográficas estándar, por ejemplo mediante técnicas de desarrollo químico o fotoquímico.

Además, la presente invención se refiere a un conjugado de un bloque de construcción de ácido nucleico o de análogo de ácido nucleico con un grupo alquino protegido, opcionalmente enlazado mediante una molécula como se muestra en la Fórmula (I). Preferiblemente, el espaciador tiene una longitud de cadena de 3-10 átomos. Adicionalmente, se prefiere que el espaciador comprenda internamente un grupo rígido, por ejemplo un grupo alquino. El grupo alquino protegido es preferiblemente un grupo alquino protegido con sililo como se describe anteriormente.

Adicionalmente, se describe un conjugado de una biotina o un derivado de biotina, tal como destiobiotina o aminobiotina, con un grupo azida enlazado opcionalmente mediante un espaciador como se muestra en la Fórmula

(II). El espaciador puede tener una longitud de cadena de 1-10 átomos.

Adicionalmente, se describe un conjugado de un grupo extintor de la fluorescencia con un bloque de construcción de ácido nucleico o de análogo de ácido nucleico, opcionalmente enlazado mediante un grupo espaciador como se muestra en la Fórmula (III). El espaciador tiene preferiblemente una longitud de cadena de 3-10 átomos, y puede comprender un grupo rígido interno, por ejemplo, alquino.

Adicionalmente, se describe un conjugado de un grupo aldosa protegido, en el que los grupos hidroxílicos de la aldosa están protegidos preferiblemente con grupos acilo y/o sililo, o de un grupo 1,2-diol protegido o no protegido, con un bloque de construcción de ácido nucleico o de análogo de ácido nucleico, opcionalmente vía un espaciador según la Fórmula (IV). Los grupos protectores acílicos o silílicos pueden ser como se describen anteriormente.

El espaciador tiene preferiblemente una longitud de cadena de 3-10 átomos, y preferiblemente comprende un grupo rígido, por ejemplo un grupo alquino.

La invención se refiere además a compuestos de Fórmula (I). Estos compuestos se pueden usar en particular para marcar ácidos nucleicos, en particular ADN o ARN. Con estos compuestos, es posible la unión de uno, preferiblemente de al menos dos grupos funcionales, a una molécula. Los compuestos son en particular útiles para la purificación de ADN, por ejemplo usando un marcador de biotina, para micromatrices de ADN, para chips de ADN, para PCR de tiempo real, así como para experimentos de ARNi y para la localización de ADN en células.

La invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras.

Leyendas de las figuras

- Figura 1: desoxirribonucleótidos modificados para el marcado post-sintético de ADN.
- Figura 2: funcionalización de ADN vía química de click.
- Figura 3: funcionalización de ADN vía reacciones de click secuenciales.
- Figura 4: síntesis de un trifosfato de 2'-desoxiuridina funcionalizado con alquino y un fosforamidito.
- Figura 5: síntesis de un trifosfato de 2'-desoxicitidina funcionalizado con alquino y dos fosforamiditos.
- Figura 6: síntesis de un trifosfato de 2'-desoxiguanosina funcionalizado con alquino.
- Figura 7: electroforesis en gel de PAGE (Vent exo-, 0,5 mM de Mg^{2+} , 50 mM de TMAC). Línea 1: escala de ADN de 100 pb, línea 2: fragmento de 289 pb natural, línea 3: igual que 2, todas las timidinas están modificadas, línea 4: todas las timidinas y citidinas están modificadas.
- Figura 8: reacción de click en el ADN.
- Figura 9: secuencia de la reacción que produce oligonucleótidos enlazados covalentemente a dos moléculas diferentes (R1-R2).
- Figura 10: bloques de construcción nucleotídicos modificados con azúcar.
- Figura 11: síntesis de un trifosfato de uridina funcionalizado con diol cíclico y fosforamidito.
- Figura 12: desprotección mediante $NaIO_4$ de aldehídos.
- Figura 13: bloques de construcción de timidinas y citidinas modificados con alquino.
- Figura 14: bloques de construcción azídicos. Azida de bencilo 35, azida de cumarina 36, azida de biotina 37, azida de antraquinona 38, azida de galactosa 39, azida de dabcilo 40, azida de pireno 41, azida de fluoresceína 42, azida de TAMRA 43, azida de Cy3 44.
- Figura 15: traza de HPLC bruta (260 nm) de un oligonucleótido ODN-3 modificado con azida de dabcilo 40 y azida de cumarina 36 (Tabla 2, entrada 10), y espectro de MALDI (inserto).
- Figura 16: modificadores de ADN no nucleosídicos 13 y 14.
- Figura 17: representación esquemática de la funcionalización de ácidos nucleicos vía reacciones de click secuenciales tras la síntesis en fase sólida.

Ejemplos

1. Síntesis de bloques de construcción de nucleótidos modificados

La síntesis de bloques de construcción nucleotídicos 1-5 como trifosfatos y como fosforamiditos según se muestra en la Figura 1 se puede lograr en secuencias de reacción cortas y eficientes. La síntesis de ADN que emplea estos fosforamiditos en química estándar de fase sólida se puede llevar a cabo según protocolos estándar, con la única excepción de tiempos de acoplamiento alargados para los bloques de construcción modificados. La incorporación de los trifosfatos vía PCR se describe en el Ejemplo 6. Estos bloques de construcción se pueden usar para la funcionalización de moléculas informadoras, particularmente moléculas de ADN, vía la química de click como se muestra en la Fig. 2. Se pueden incorporar diferentes grupos funcionales vía reacciones de click secuenciales como se muestra en la Figura 3.

5

10 2. Síntesis de derivados de 2'-desoxiuridina que poseen un grupo asidero alquínico

En la Fig. 4 se representa esquemáticamente la síntesis de derivados de 2'-desoxiuridina funcionalizados con alquino. Comienza con la 5-2'-desoxiyodouridina 6 comercialmente disponible. El nucleósido funcionalizado libre 8 se puede obtener mediante una secuencia estándar de protección-Sonogashira-desprotección usando 1-trimetilsilil-1,7-octadieno para introducir el ligador fácilmente funcionalizado en el acoplamiento cruzado de Sonogashira. El fosforamidito 9 se puede obtener usando procedimientos estándar. El trifosfato 10 se prepara mediante el procedimiento de fosforilación de Yoshikawa [7].

15

3. Síntesis de derivados de 2'-desoxicitidina que poseen un alquino o un grupo asidero alquínico protegido con sililo

El nucleósido 12 libre fácilmente funcionalizado se puede preparar mediante un acoplamiento cruzado de Sonogashira sobre la 5-yodo-2'-desoxicitidina no protegida y comercialmente disponible. El grupo TMS se puede eliminar mediante tratamiento con amoníaco. El fosforamidito 13, que está protegido mediante N⁴-benzoílo, se prepara de una manera por etapas. El trifosfato 14 se prepara mediante el procedimiento de *Ludwig-Eckstein* de dos etapas [8]. El fosforamidito 16, que posee un alquino protegido con TMS, se obtiene simplemente omitiendo la etapa de desprotección de TMS tras el acoplamiento cruzado de Sonogashira. El esquema de reacción se muestra en la Fig. 5. Por medios análogos, se puede obtener un fosforamidito que posee un grupo alquino protegido con TIPS.

20

25 4. Síntesis de derivados de 2'-desoxiguanosina que poseen un grupo asidero alquínico

La síntesis de 17 sigue la síntesis de *Froehler et al.* [9]. Una secuencia de reacción estándar de acoplamiento cruzado de *Sonogashira*, desprotección global y fosforilación mediante el enfoque de *Yoshikawa* [7] produce el trifosfato 18. El esquema de reacción se muestra en la Figura 6.

25

5. Síntesis de derivados de 2'-desoxiadenosina que poseen un grupo asidero alquínico

La síntesis de derivados de 2'-desoxiadenosina modificados 4 es muy similar a la de los derivados de desoxiguanosina. Se parece mucho al trabajo de *Froehler et al.* [9]. Se ha llevado a cabo con éxito un acoplamiento cruzado de *Sonogashira*, en analogía con la síntesis de guanosina. Las etapas finales son similares a las descritas para el derivado 18.

30

6. Incorporación de trifosfatos nucleosídicos vía PCR

La incorporación simultánea de los bloques de construcción 1 y 2 en una hebra de ADN de 289 meros se llevó a cabo mediante extensión de cebadores. Las mejores eficiencias de incorporación se lograron para el trifosfato de 2. Las polimerasas usadas son Vent exo- y Pwo de la Familia B. En el caso de una densidad elevada de modificación, se hace necesaria la adición de aditivos (DMSO, formamida, TMAC, betaína). Se pueden visualizar mediante electroforesis en gel de PAGE diferentes niveles de modificación alquínica. Las líneas 2-4 en la Figura 7 muestran el efecto del aumento de la incorporación de alquinos en el ADN. El desplazamiento observado se debe a un incremento de la masa molecular de las hebras de ADN.

35

40

7. Funcionalización post-sintética

Como se esboza en la introducción, la ventaja principal de la estrategia de marcaje post-sintética es la posibilidad de introducir restos lábiles o reactivos en el ADN. Las moléculas a unir a ADN sólo tienen que tener una azida a fin de ser usadas en reacciones de click. Este enfoque es muy modular, y de este modo se puede variar sin la necesidad de síntesis elaboradas.

45

La reacción de click se ha empleado con éxito para funcionalizar ADN a un nivel de alta densidad. Los ligadores son suficientemente flexibles para permitir incluso la incorporación de seis modificaciones consecutivas mediante reacción de click, como se muestra en la modificación de un oligonucleótido corto que posee seis bases modificadas mediante alquino en una fila. Las reacciones se llevan a cabo en presencia de agua y oxígeno, y no requieren ningún equipo sofisticado. La especie catalítica activa es el Cu(I), y se puede estabilizar mediante un ligando. En la Figura 8 se muestra el esquema de reacción.

50

8. Estrategias para la funcionalización por etapas

8.1 Consideraciones generales

ADN que contiene dos ligadores para la modificación post-sintética se puede preparar usando la metodología descrita anteriormente. El ADN preparado mediante PCR no está ligado a una resina y no contiene ningún grupo protector en las nucleobases, y se puede funcionalizar de una manera directa como se representa en la Figura 9.

Los alquinos sin proteger se pueden someter a una reacción de click con R^1-N_3 . Los alquinos protegidos con TMS muestran una estabilidad suficiente a las condiciones estándar de click en reacciones de ensayo. El grupo TMS-alquino se puede desproteger con TBAF, liberando así el alquino libre. Entonces, otra azida R^2-N_3 se puede enlazar a ADN en una segunda reacción de click.

El ADN preparado mediante química de fosoramiditos en fase sólida se une a una resina y posee grupos protectores, lábiles a bases, en las nucleobases. El grupo TMS-alquino se puede desproteger usando amoníaco en $H_2O/MeOH$. Sin embargo, la desprotección empleada preparativamente del grupo sililo en 15 (Figura 5) tarda 2-4 días en terminar. Esta notable estabilidad se podría usar para separar selectivamente ADN mediante escisión de la resina y/o desproteger las nucleobases sin desproteger cantidades sustanciales de los alquinos modificados, por ejemplo TMS-alquinos. En principio, hay tres maneras para enfocar esta cuestión, que se propondrán en lo siguiente.

8.2 Protocolos específicos

Por ejemplo, se prepararon oligonucleótidos (ODNs) mediante el método de DMT- y β -(cianoetil)fosoramidito sobre soportes de CPG (500 Å) con un sintetizador de ADN *Expedite (Applied Biosystems)* o en un *Åkta Oligopilot* de *Amersham Biosciences*. Se aplicó un protocolo de doble acoplamiento (10 equivalentes cada uno) para el acoplamiento de bases modificadas, y el tiempo de acoplamiento se alargó hasta 10 minutos. Como activador, el benciliotetrazol (BTT) dio los mejores rendimientos de acoplamiento. Después de la síntesis automatizada, los ODNs se separaron del soporte sólido empapándolos en una disolución concentrada de amoníaco acuoso/etanol (3:1) durante 24 horas a 25°C. El amoníaco acuoso se eliminó en un SpeedVac, y el ODN bruto se purificó mediante RP-HPLC. Para caracterizar los ODNs, se usó la espectroscopía UV/Vis y la espectrometría de masas MALDI-TOF.

9. Química de click en la resina

9.1 Consideraciones generales

La química de click se puede llevar a cabo sobre resinas [10]. En el momento en el que el primer grupo funcional R^1 está unido a ADN, se puede lograr en una sola etapa usando amoníaco durante un período prolongado una desprotección global de los grupos TMS, los grupos protectores de nucleobases y la separación por escisión de la resina. En este punto, el segundo grupo funcional R^2 se puede introducir mediante reacción de click estándar. En este enfoque, R^1 ha de ser una molécula estable a bases.

9.2 Protocolos específicos

Por ejemplo, se secaron aprox. 0,02 μ moles de ADN en una resina de CPG a alto vacío tras la síntesis del ADN, y se colocaron en un vial de 1,5 ml junto con 20 μ l de azida bencílica 35. En un vial separado, se sometió a vórtex 40 μ l de disolución de CuBr (10 mM en DMSO/tBuOH 3:1), 10 μ l de ascorbato de sodio (100 mM en agua) y 80 μ l de disolución de ligando (10 mM en DMSO/tBuOH 3:1), y se añadió al ADN. El vial de reacción se hizo girar suavemente toda la noche, se centrifugó, y la disolución se eliminó con cuidado y se desechó. La resina se lavó repetidamente (2 x DMSO, 2 x H_2O , 2 x etanol) añadiendo el disolvente, sometiendo a vórtex, centrifugando, y desechando la disolución. El ADN se desprotegió subsiguientemente como se describe anteriormente.

10. Desprotección global de ADN antes de la primera reacción de click

Las nucleobases de ADN se pudieron desproteger y la hebra se separó por escisión de la resina antes de la primera reacción de click (amoníaco, 12 h). La estabilidad del TMS-alquino a las condiciones de desprotección debería ser suficientemente elevada para retener la mayoría del mismo en forma intacta. Se habrá de llevar a cabo la purificación mediante HPLC para eliminar ADN que contiene sitios de TMS-alquino desprotegidos. Desde este punto en adelante, se puede emplear la síntesis esquematizada en la Figura 9.

11. Rotura separada por escisión de la resina

11.1 Consideraciones generales

La química de click también se puede llevar a cabo en disolución tras separar por escisión el ADN de la resina sin eliminar los grupos de protección.

La unión del ADN a la resina es menos estable a condiciones básicas que los grupos protectores de las nucleobases. De este modo, el ADN se puede separar por escisión de la resina mediante tratamiento con amoníaco durante 30 minutos. Después de este tratamiento, las nucleobases se desprotegen parcialmente, el grupo TMS-alquino se debería de retener casi cuantitativamente. Esta mezcla compleja se ha de someter a una reacción de click introduciendo R¹. En este punto, el ADN se puede tratar con amoníaco durante un período prolongado, conduciendo a una desprotección global de las nucleobases y los TMS-alquinos. Esta etapa libera el segundo sitio de click, que se puede hacer reaccionar con R²-N₃.

11.2 Protocolos específicos

Se colocaron ADN (0,38 μM, 200 μl) y azida (10 mM, 114 μl) en un vial de 1,5 ml. En un vial separado, se sometió a vórtex 17 μl de disolución de CuBr (100 mM en DMSO/tBuOH 3:1) y 34 μl de disolución de ligando (100 mM en DMSO/tBuOH 3:1), y se añadió al ADN. La disolución se agitó a 25°C durante 4 h, y se evaporó hasta casi sequedad en un SpeedVac. Se añadió disolución de acetato de sodio (0,3 M, 100 μl), y la suspensión se dejó reposar durante 1 h sometiéndola a vórtex ocasionalmente. Se añadió 1 ml de etanol, el vial se sometió a vórtex y se colocó en un congelador (-20°C) toda la noche. Después de la centrifugación (15 min. a 13.000 rpm), el sobrenadante se eliminó con cuidado del pelete de ADN. Se añadió etanol al 70% (-20°C), el vial se sometió a vórtex, se centrifugó, y se eliminó el sobrenadante. Esta etapa de lavado se repitió dos veces. Después de la última etapa de lavado, el pelete se dejó secar al aire y se recogió en agua o en tampón, según se prefiera.

11.3 Desprotección del grupo TIPS-alquino

Se disolvió ADN liofilizado en acetonitrilo seco (400 μl) y DMF seca (100 μl). Se añadieron dos gotas de TBAF (1,0 M en THF), y la disolución se agitó a 45°C durante 2 h. Los iones fluoruro en exceso se apagaron con MeOTMS (10 μl). Si se ha de llevar a cabo una reacción de click adicional en la hebra de ADN, los disolventes orgánicos se deberían intercambiar con agua según lo siguiente: la disolución de la reacción se evapora hasta casi sequedad en un SpeedVac. Se añade agua (1 ml), la disolución se congela, se liofiliza hasta sequedad, y se recoge en una cantidad apropiada de agua.

12. Síntesis de bloques de construcción modificados con azúcar

Los trifosfatos 22-26 se han incorporado con éxito en el ADN. El fosforamidito correspondiente de 23 también se ha sintetizado e incorporado en el ADN. El azúcar protegido con acetilo en el compuesto 26 provoca la tinción efectiva del ADN modificado en un gel de poliacrilamida, puesto que los grupos protectores se escinden en las condiciones del tratamiento de Tollens. Los azúcares 24 y 25 protegidos con acetona necesitan ser desprotegidos en condiciones ácidas. Los experimentos preliminares muestran que una escisión de los grupos protectores acetal es factible sin provocar la despurinación del ADN.

En lo siguiente, se presenta con detalle una síntesis ejemplar del nucleótido modificado con diol cíclico.

La síntesis de los trifosfatos de uridina 31, modificados con un diol cíclico, comienza con el compuesto 27 conocido [11]. La etapa clave es una dihidroxilación vecinal de Sharpless de doble enlace de pirrolina. A partir del intermedio 30, se puede sintetizar el fosforamidito 32 según métodos conocidos.

13. Incorporación de trifosfatos nucleosídicos vía PCR

Los cinco nucleótidos presentados se pueden incorporar en ADN vía PCR; el nucleótido 26 incluso en una hebra de 2000 pb. Los resultados obtenidos hasta ahora con el nucleótido 26 abren la vía para la tinción efectiva con plata de cualquier gen de interés. En principio, debería ser posible sintetizar una citidina modificada con un diol terminal, y de ese modo realizar una funcionalización aldehídica de cada par de bases en ADN.

La incorporación de los trifosfatos vía síntesis enzimática, por ejemplo PCR y la triple reacción de click, se ilustra en la Fig. 18. Las polimerasas preferidas usadas son *Vent exo*⁻ y *Pwo* de la Familia B. En el caso de una alta densidad de modificación, se prefiere la adición de aditivos (DMSO, formamida, TMAC y/o betaína). Se pueden visualizar mediante electroforesis en gel de PAGE diferentes niveles de modificación alquínica.

14. Funcionalización post-sintética

Como se muestra mediante síntesis química de una hebra de ADN con un uracilo modificado con diol, las hebras resultantes se pueden tratar en condiciones suaves con NaIO₄, dando una escisión suave de los restos diólicos sin reacciones secundarias observables en absoluto. Las hebras que poseen aldehídos se podrían caracterizar mediante MALDI, así como mediante una reacción de acoplamiento limpia con dinitrofenilhidrazina. Se ha llevado a cabo la escisión de hebras de ADN largas, modificadas con dioles, y los estudios de digestión han mostrado que la escisión transcurre con eficiencia comparable como en oligonucleótidos cortos. Se han obtenido los primeros resultados en el acoplamiento del ADN que posee aldehídos a colorantes que contienen hidrazinas, demostrando la

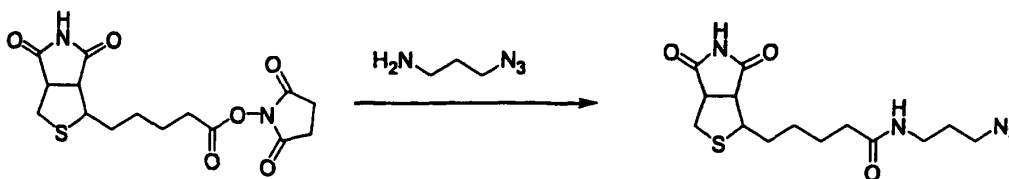
eficiencia de la escisión mediante peryodato.

En el caso de las hebras de ADN que contienen azúcar, los experimentos de digestión también muestran una incorporación eficiente en el ADN. Se ha demostrado la tinción eficiente con plata en el caso del azúcar protegido con acetilo.

- 5 Se proponen nuevos nucleótidos modificados con dioles para la incorporación directa en ADN, así como nuevos nucleótidos modificados con azúcares. La incorporación directa de estos trifosfatos en ADN, seguido de la desprotección post-sintética suave, simplifica enormemente los procedimientos de tinción con plata desarrollados en nuestro grupo. En una combinación con química "click-click", la modificación selectiva con aldehídos de nuestro ADN modificado, mediante escisión con peryodato, se podría usar para desarrollar una nueva estrategia de marcaje triple.

10 15. Síntesis de una azida de biotina

La reacción de un éster activo con 1-amino-3-azidopropano da como resultado la formación de una azida de biotina.



16. Modificación individual, doble y triple de ADN con química de click

16.1 Introducción de dos marcadores diferentes

15 16.1.1 Reacción de click doble en la resina

Un primer enfoque implicó la introducción de un alquino libre para la primera reacción de click, y un segundo alquino protegido con TMS para el segundo proceso de click, después de la desprotección con ácido suave en la resina. Para ensayar la factibilidad de una reacción de click en la resina, se preparó una hebra de ensayo que contiene un alquino libre 33, y se llevó a cabo la reacción de click directamente en la resina, seguido de la desprotección del ADN. La comparación de la traza de HPLC de la hebra de ADN funcionalizada con una hebra de ADN sin tratar de la misma serie mostró una conversión virtualmente cuantitativa, demostrando que la reacción de click transcurre con una eficiencia elevada en el soporte de vidrio de poro controlado usado para la síntesis de ADN (datos no mostrados).

25 Para introducir dos marcadores, se incorporaron los bloques de construcción timidínicos y citidínicos 33 y 34a en oligonucleótidos tales como ODN-1 u ODN-2 (Tabla 1) usando la química estándar de fosoramiditos. Los rendimientos del acoplamiento de ambos fosoramiditos fueron excelentes. Después del ensamblaje completo del oligonucleótido en el soporte sólido, la resina se secó, y se llevó a cabo la primera reacción de click agitando la resina con una disolución de CuBr, ligando TBTA, ascorbato de sodio y azida bencílica 35. La resina se lavó y se aclaró con ácido acético al 1% para escindir el grupo protector TMS en el segundo alquino. Finalmente, se llevó a cabo de nuevo la segunda reacción de click de forma análoga a la primera, usando azida dabcílica 40. El ADN se escindió finalmente de la resina, y todos los grupos protectores se eliminaron exponiendo la resina a amoníaco (H₂O/EtOH 3:1). Se encontró que el espectro de MALDI sin tratar obtenido estaba en completo acuerdo con el oligonucleótido doblemente modificado esperado (Tabla 2, entrada 1), mostrando que se pueden introducir directamente dos marcadores estables en el ADN sobre el soporte sólido.

35 16.1.2 Reacción de click individual en la resina y escisión/desprotección combinadas

En algunos casos, se prefiere llevar a cabo la segunda reacción de click en disolución. El tratamiento del ODN-2 modificado individualmente (Tabla 1) con NH₃ conc. en agua/etanol escinde el ADN de la resina. En estas condiciones, los grupos protectores de bases y el grupo TMS, que protege el alquino, se eliminan igualmente. El ADN bruto obtenido, que posee una modificación mediante reacción de click y un alqueno libre, se somete a la segunda reacción de click en disolución (CuBr, ligando TBTA, azida), produciendo el ADN doblemente modificado con rendimientos y pureza excelentes (Tabla 2, entrada 2).

16.1.3 Reacción de click doble en disolución (ejemplo comparativo)

45 Los oligonucleótidos modificados con dos moléculas sensibles a bases y a nucleófilos se pueden obtener fácilmente con los dos bloques de construcción 33 y 34b que poseen alquinos. Ambos se incorporaron en ODN-3 (Tabla 1) usando química estándar de fosoramiditos en fase sólida. Tras la desprotección y escisión del oligonucleótido de la resina, se llevó a cabo la primera reacción de click (usando las condiciones de disolución dadas a conocer

anteriormente), produciendo el oligonucleótido modificado individualmente, con un rendimiento elevado de <90% de media. En una segunda etapa, se escindió el grupo protector TIPS con una disolución de TBAF en acetonitrilo/DMF (4:1 v/v), sin provocar ningún daño a la hebra de ADN que posee un marcador. La segunda reacción de click en disolución produjo los oligonucleótidos doblemente modificados, con excelentes rendimientos de típicamente 60-90% con respecto al procedimiento de tres etapas.

A fin de investigar la amplia aplicabilidad de la modificación de click doble, se llevó a cabo la reacción de click doble con una serie completa de diferentes marcadores, y se encontraron excelentes rendimientos para la química en ADN (Tabla 2, entradas 3-15). Merece la pena mencionar que las reacciones de click individuales y las etapas de desprotección son tan limpias que, en todos los casos, fue suficiente para la purificación una simple precipitación con etanol después de cada etapa de reacción. La Figura 15 muestra un cromatograma de HPLC bruto típico y un análisis de MALDI (inserto) obtenido tras una doble modificación de ODN-3. Para aplicaciones muy sensibles, se recomienda una purificación final mediante HPLC. En casos raros, tales como para la azida de Cy3 44, se encontró que el ligador se escindió en pequeño grado.

16.2 Introducción de tres marcadores diferentes

Usando la reacción de click, seguida de la precipitación mediante etanol, también fue posible modificar oligonucleótidos con tres marcadores diferentes. Para este fin, se introdujeron los tres bloques de construcción 33, 34a y 34b en oligonucleótidos tales como ODN-4 (Tabla 1). La primera reacción de click se llevó a cabo directamente en la resina. El oligonucleótido modificado individualmente se escindió subsiguientemente del soporte en escisión concomitante del grupo TMS, y se purificó mediante HPLC. La segunda reacción de click se llevó a cabo en disolución con rendimiento elevado. La precipitación con etanol del oligonucleótido modificado doblemente, la escisión del grupo TIPS con TBAF, y una tercera reacción de click subsiguiente en disolución produjeron los oligonucleótidos triplemente modificados deseados después de una precipitación final con etanol, con rendimientos de alrededor de 50% (Tabla 2, entradas 16 y 17).

16.3 Introducción de grupos asidero en bloques de construcción no nucleosídicos

Mientras que el marcaje de oligonucleótidos directamente en ciertas bases (aquí dC y dT) es muy deseable, frecuentemente es necesaria la introducción de marcadores fuera de las nucleobases, por ejemplo en los fosfatos o los azúcares. A fin de permitir la introducción fácil de marcadores, se prepararon los modificadores de ADN no nucleosídicos 37 y 38 que poseen alquinos (Fig. 16). Las reacciones de click que usan estos bloques de construcción en ADN funcionaron igualmente de manera eficiente.

16.4 Conclusión

En resumen, se da a conocer aquí un protocolo de funcionalización múltiple de ADN altamente eficiente, modular y robusto. La eficiencia del método se basa en tres características: 1. El alquino protegido con TMS se elimina cuantitativamente durante el tratamiento con amoníaco durante la desprotección del ADN. 2. El alquino protegido con TIPS se retiene cuantitativamente durante este tratamiento con amoníaco. 3. La escisión del alquino protegido con TIPS se puede lograr eficiente y suavemente. La síntesis de un trifosfato que posee un alquino protegido nos permite igualmente marcar fragmentos de PCR de una manera por etapas. El método ampliará enormemente nuestra capacidad para manipular ADN según sea necesario para diagnósticos biomoleculares y aplicaciones nanotecnológicas. Además, las síntesis combinatorias de librerías de hebras de ADN modificadas de forma múltiple conducen a nuevos aptámeros.

Tabla 1. ODNs empleados en este estudio.^[a]

ODN-1	5'-GCGCYGTTTCATTXGCG-3'
ODN-2	5'-CGCYACACGAAXCCG-3'
ODN-3	5'-GCGCZGTTTCATTXGCG-3'
ODN-4	5'-GCGCYGTTXATTZCGC-3'

[a] X = nucleótido de ADN basado en 1, .Y = nucleótido de ADN basado en 34a, Z = nucleótido de ADN basado en 34b

Tabla 2. Marcaje post-sintético de los ODNs 1-4.

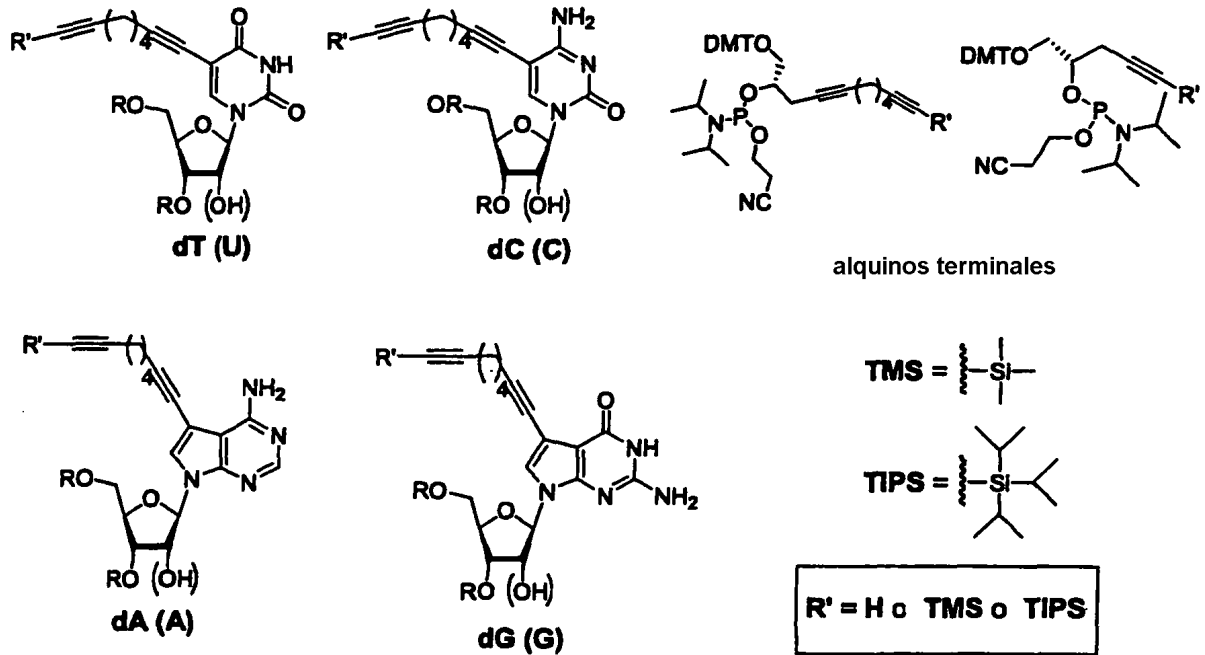
Entrada	ADN	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	Rendimiento ^[a]
---------	-----	------------	------------	------------	----------------------------

1	ODN-1	35*	40*	–	n.a.
2	ODN-2	35*	36	–	75 ^[b]
3	ODN-3	37	36	–	67
4	ODN-3	36	38	–	59
5	ODN-3	36	39	–	59
6	ODN-3	35	37	–	70
7	ODN-3	35	36	–	85
8	ODN-3	35	39	–	67
9	ODN-3	35	41	–	66
10	ODN-3	40	36	–	83
11	ODN-3	41	35	–	92
12	ODN-3	41	37	–	62
13	ODN-3	41	36	–	90
14	ODN-3	42	37	–	74
15	ODN-3	40	43	–	58
16	ODN-4	35*	40	39	45 ^[c]
17	ODN-4	35*	39	37	52 ^[c]

[a] Determinado mediante integración de la HPLC bruta a 260 nm después de la última reacción de click. [b] Ninguna purificación mediante HPLC tras la escisión de la resina. Por lo tanto, el rendimiento incluye impurezas procedentes de la síntesis del ADN. [c] Purificación mediante HPLC tras la click en la resina. * Reacción de click llevada a cabo en la resina.

17. Bloques de construcción para la reacción de click triple en ADN (y ARN)

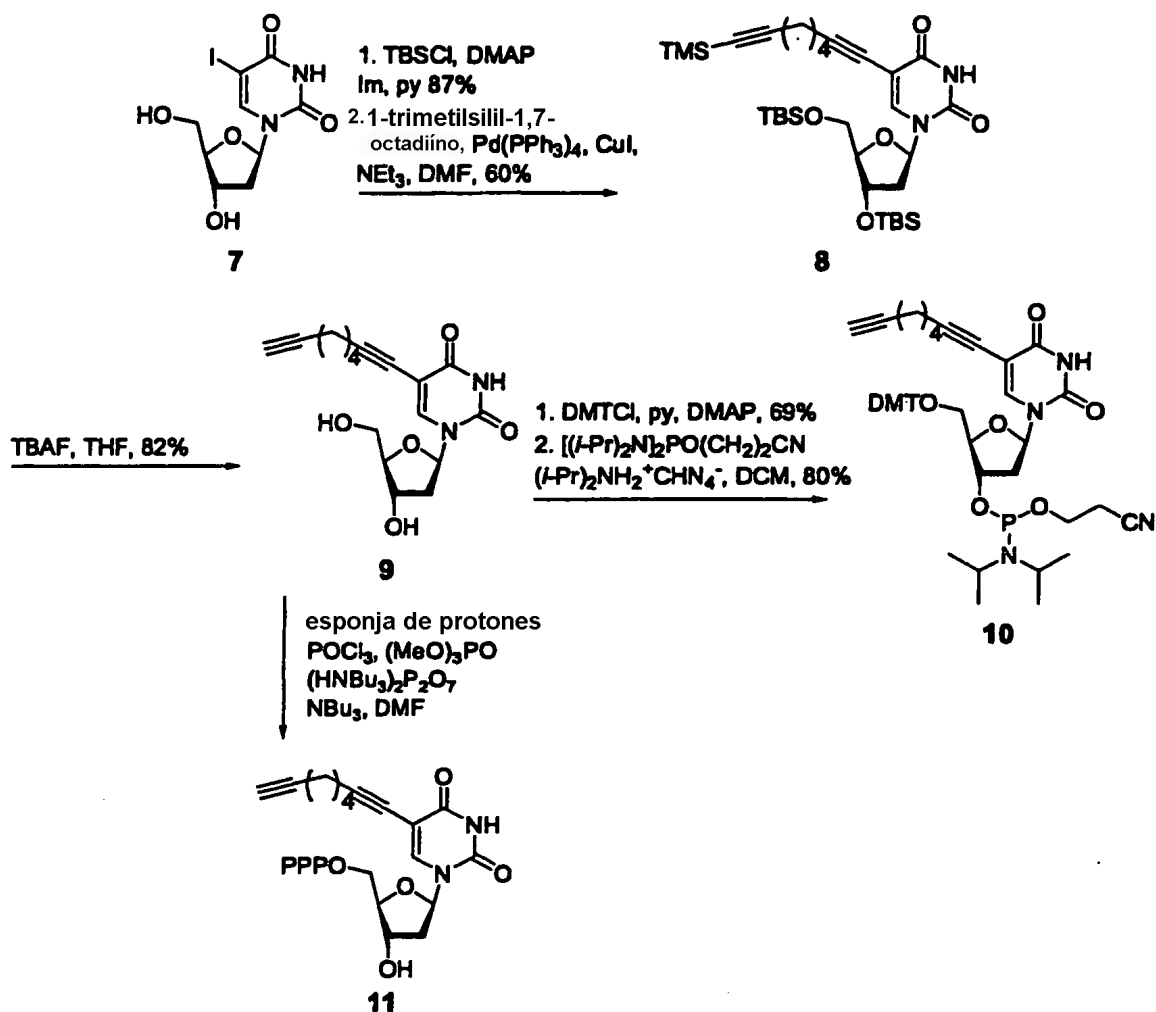
5 La síntesis de los ribonucleótidos sigue el mismo procedimiento de la serie de desoxirribonucleótidos. Todos los alquinos se pueden generar como alquino libre, como alquino protegido con TMS, o como alquino protegido con TIPS. Esto da acceso a 12 fosforamiditos de desoxirribonucleótidos y 12 trifosfatos de desoxirribonucleótidos (3 alquinos diferentes por nucleobase), y otros 24 para la serie ribonucleotídica. Además, igualmente están disponibles 6 fosforamiditos alquínicos terminales.



Esquema 1: Desoxirribonucleótidos (o ribonucleótidos) modificados y alquinos terminales para el marcaje post-sintético de ADN

5 Las síntesis de bloques de construcción nucleosídicos como trifosfatos y como fosforamiditos se pueden lograr en secuencias de reacción cortas y eficientes. Más abajo se dan a conocer unos pocos ejemplos de esta síntesis.

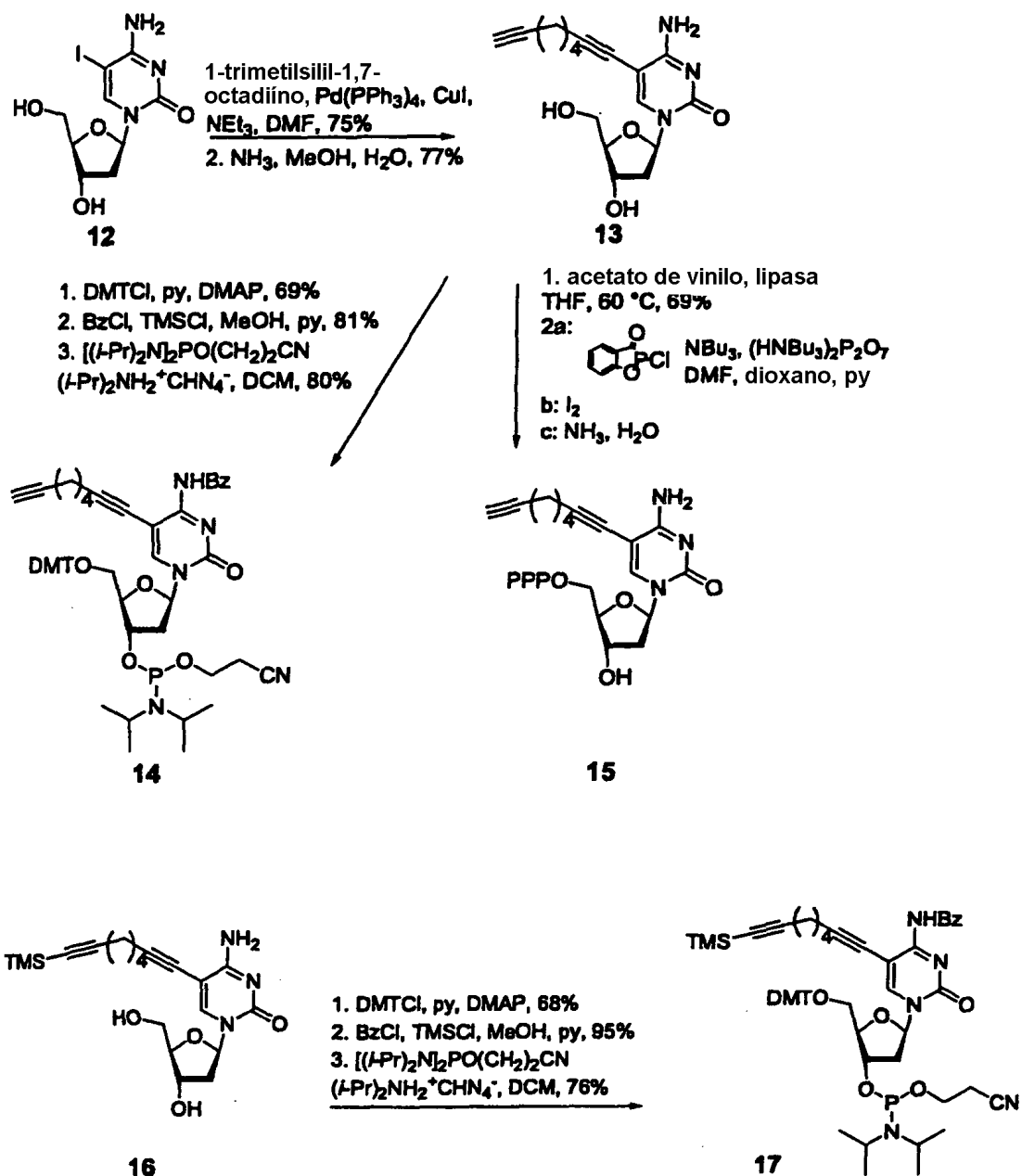
Síntesis de derivados de uridina que poseen un alquino terminal



Esquema 2: Síntesis de un trifosfato de uridina funcionalizado con alquino y un fosforamido.

La síntesis de derivados de uridina funcionalizados con alquino comienza con la 5-yodouridina **7** comercialmente disponible. El nucleósido funcionalizado libre **9** se puede obtener mediante una secuencia estándar de protección-Sonogashira-desprotección usando 1-trimetilsilil-1,7-octadiino para introducir el ligador fácilmente funcionalizado en el acoplamiento cruzado de *Sonogashira*. El fosforamido **10** se puede obtener usando procedimientos estándar. El trifosfato **11** se prepara mediante el procedimiento de fosforilación de *Yoshikawa*.

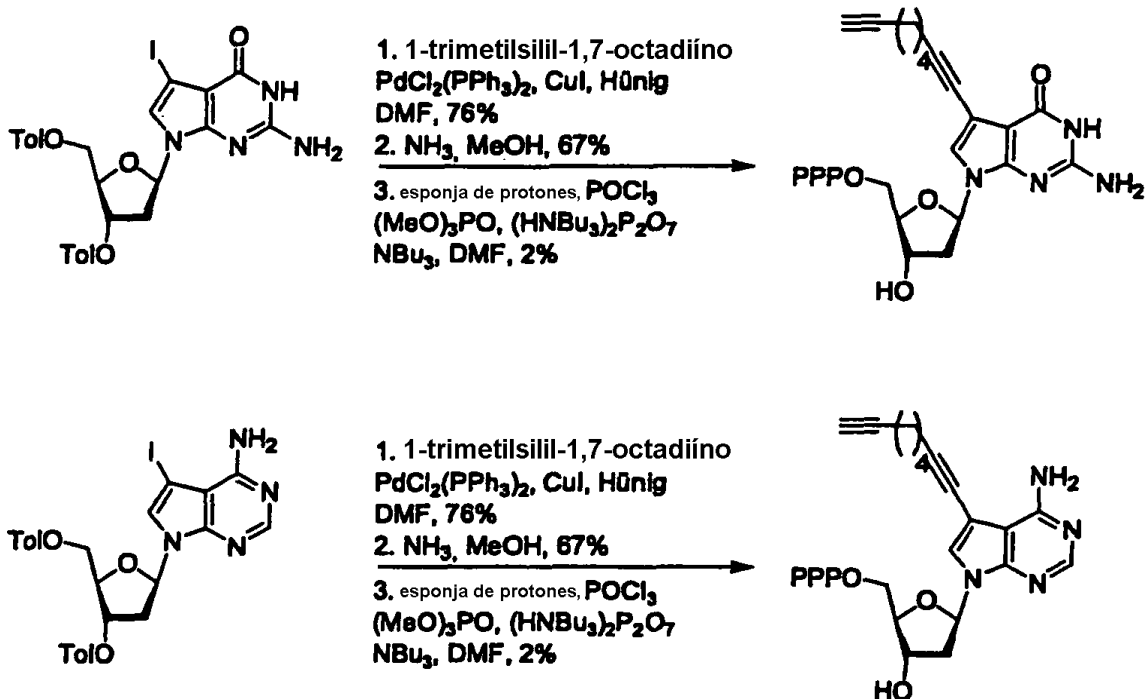
Síntesis de derivados de citidina que poseen un alquino terminal y un alquino protegido con sililo



Esquema 3: Síntesis de un trifosfato de citidina funcionalizado con alquino y dos fosforamiditos.

5 El nucleósido libre fácilmente funcionalizado **13** se puede preparar mediante un acoplamiento cruzado de *Sonogashira* sobre la 5-yodocitidina no protegida y comercialmente disponible. El grupo TMS se puede eliminar mediante tratamiento con amoníaco. El fosforamidito **14**, que está protegido mediante *N*^t-benzoílo, se prepara de una manera por etapas. El trifosfato **15** se prepara mediante el procedimiento de *Ludwig-Eckstein* de dos etapas. El fosforamidito **17**, que posee un alquino protegido con TMS, se obtiene omitiendo simplemente la etapa de desprotección de TMS tras el acoplamiento cruzado de *Sonogashira*¹.

Síntesis de derivados de guanosina y adenosina que poseen un alquino terminal



Esquema 4: Síntesis de trifosfatos de guanosina y adenosina funcionalizados con alquino.

La síntesis de **18** sigue la síntesis de *Froehler et al.* Una secuencia de reacción estándar de acoplamiento cruzado de *Sonogashira*, desprotección global y fosforilación mediante el enfoque de *Yoshikawa* produce el trifosfato **19**. La síntesis de derivados de adenosina modificados **4** es muy similar a la de los derivados de guanosina, y todavía está en práctica. Se parece mucho al trabajo de *Froehler et al.* Se ha llevado a cabo con éxito un acoplamiento cruzado de *Sonogashira*, en analogía con la síntesis de guanosina. Las etapas finales son similares a las descritas para el derivado guanósínico **19**.

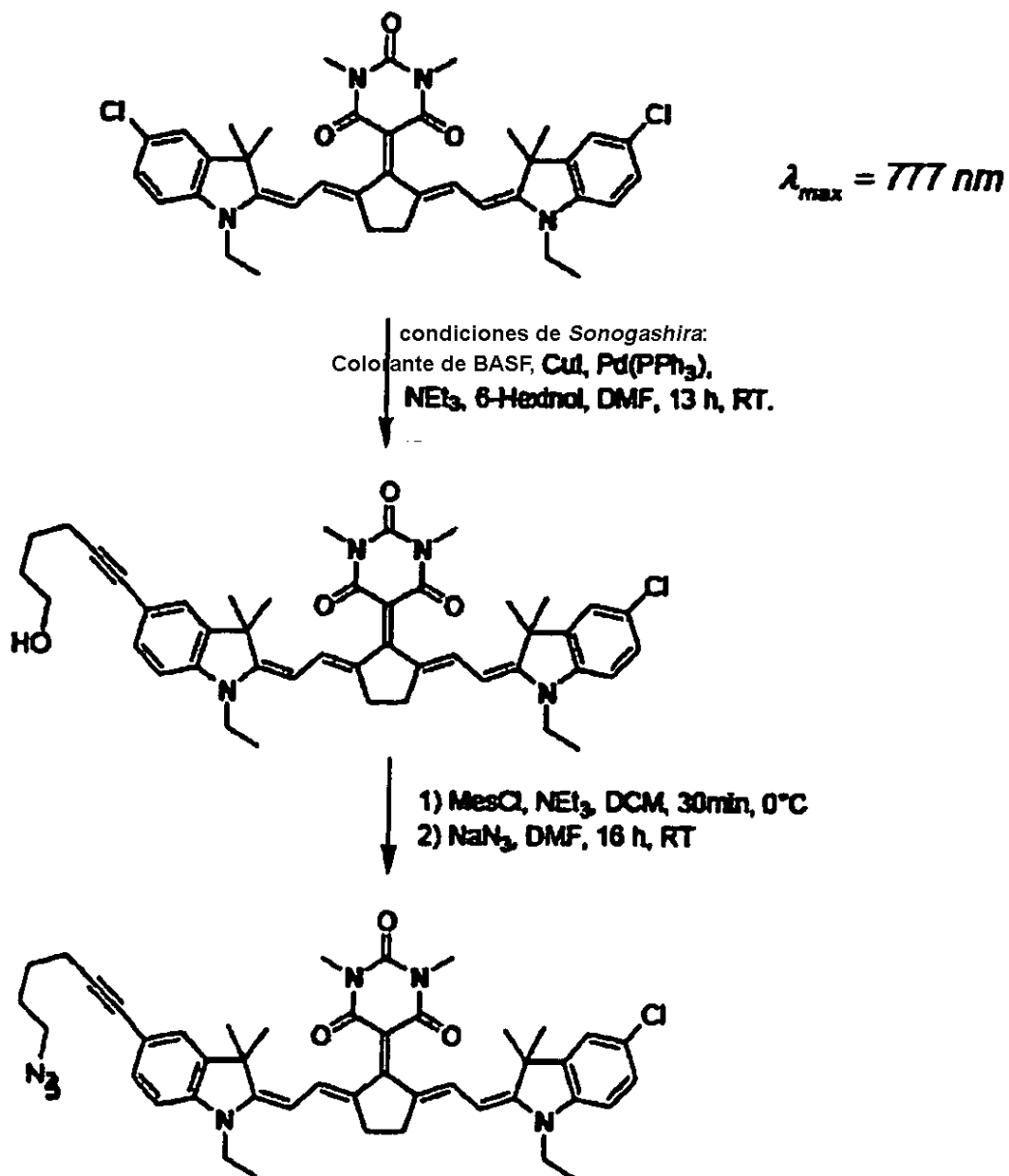
La síntesis de ADN (o ARN) que emplea estos fosforamiditos modificados en química estándar en fase sólida es directa, con la única excepción de tiempos de acoplamiento alargados para los bloques de construcción modificados.

Se usan tres alquinos diferentes a fin de lograr la reacción de click triple: un alquino libre, un alquino protegido con TMS, y un alquino protegido con TIPS. La primera reacción de click se lleva a cabo todavía en presencia de la resina (el soporte sólido para la síntesis automatizada). Después de la escisión estándar del ADN (o ARN) de la resina, que elimina asimismo los grupos TMS, se logra una segunda reacción de click usando el protocolo de click estándar. Una desprotección final con TBAF (fluoruro de *tetrabutilamonio*) de los grupos TIPS, se lleva a cabo una tercera reacción de click (Esquema 4).

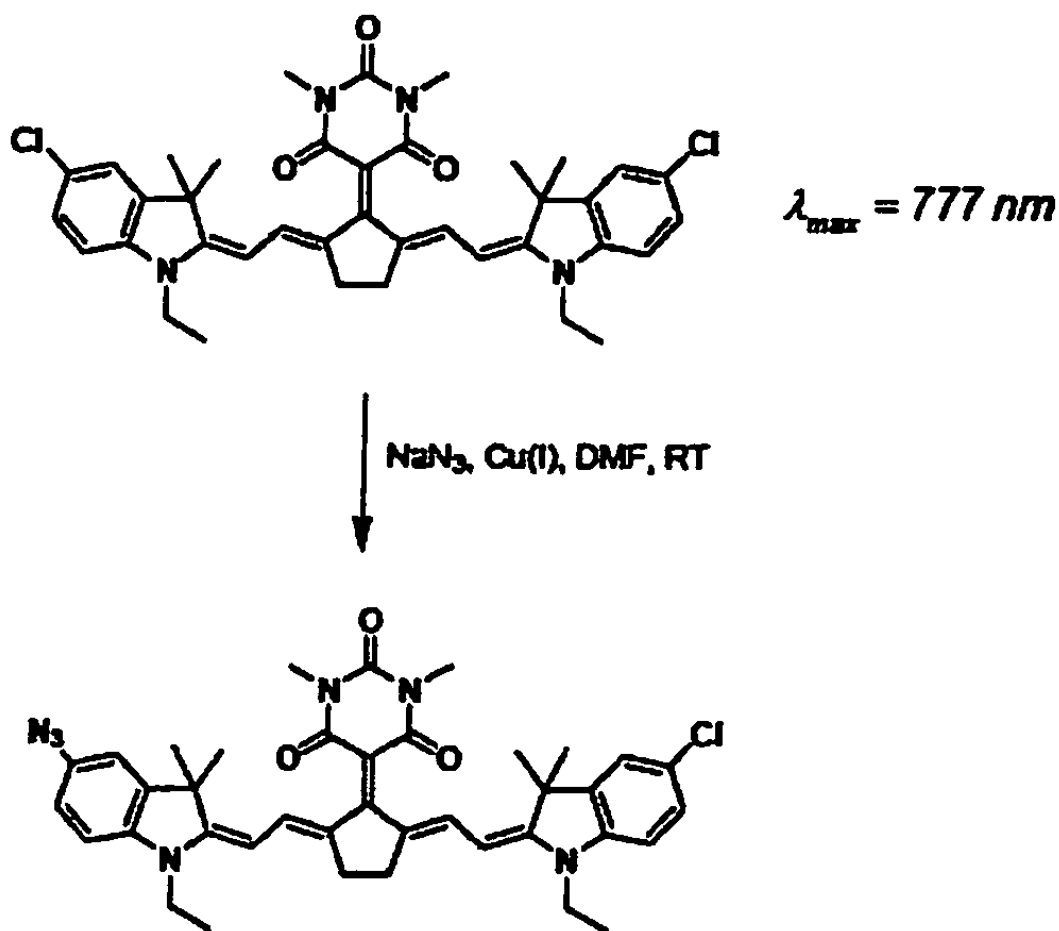
18. Ejemplo de modificación de un colorante de IR comercial como azida

Los colorantes de IR se pueden transformar fácilmente en sus derivados azídicos. Los siguientes esquemas muestran dos rutas sintéticas diferentes de muchas otras síntesis posibles.

En el primer caso, se une un ligador al colorante vía un acoplamiento de *Sonogashira*. La mesilación y azidación siguientes producen la azida, lista para la reacción de click en el ADN.



En la segunda síntesis, la azida se genera directamente en el núcleo del colorante (Esquema 2).



Las azidas de colorantes de IR se pueden usar en fotografía de ADN como fotosensibilizador de papel diseñado y desarrollado para ser sensibilizado por la luz IR. Tal papel se podría manipular en una condición normal de luz, eliminando la limitación de condiciones de cuarto oscuro.

5 Referencias

- [1] Langer, P. R.; Waldrop, A. A.; Ward, D. C. Enzymatic Synthesis of Biotin- Labeled Polynucleotides: Novel Nucleic Acid Affinity Probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981, 78, 6633-6637.
- [2] Jager, S.; Famulok, M. Erzeugung und enzymatische Amplifikation hochgradig funktionalisierter DNA-Doppelstränge. *Angew. Chem.* 2004, 116, 3399-3403.
- 10 [3] Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. M.; Carell, T. Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalisation of Alkyne-Modified DNA. *Org. Lett.* 2006, 8, 3639-3642.
- [4] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001,40, 2004-2021.
- [5] Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry; Wiley: Nueva York, 1984, 1-176.
- 15 [6] Aucagne, V.; Leigh, D. A. Chemoselective Formation of Successive Triazole Linkages in One Pot: "Click-Click" Chemistry. *Org. Lett.* 2006, published online.
- [7] Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. A Novel Method for Phosphorylation of Nucleosides to 5-Nucleotides. *Tetrahedron Lett.* 1967, 8, 5065-5068.
- 20 [8] Ludwig, J.; Eckstein, F. Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside 5'-O- (1-Thiotriphosphates), 5'-Triphosphates and 2'3'-Cyclophosphorothioates Using 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 631-635.

- [9] Buhr, C. A.; Wagner, R. W.; Grant, D.; Froehler, B. C Oligodeoxynucleotides Containing C-7 Propyne Analogs of 7-Deaza 2'-deoxyguanosine and 7-Deaza-2'-deoxyadenosine. *Nucleic Acids Res* 1996, 24, 2974-2980.
- [10] Jang, H.; Fafarman, A.; Holub, J. M.; Kirshenbaum, K. Click to Fit: Versatile Polyvalent Display on a Peptidomimetic Scaffold. *Org. Lett.* 2005, 7, 1951-1954.
- 5 [11] Kahl, J. D.; Greenberg, M. M. Introducing Structural Diversity in Oligonucleotides via Photolabile, Convertible C5-Substituted Nucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 597-604.
- [12] Tyagi, S.; Kramer, F. R. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* 1996, 14, 303-308.
- 10 [13] Marras, S. A. E.; Kramer, F. R.; Tyagi, S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research* 2002, 30, e122.
- [14] Varma-Basil, M.; El-Hajj, H.; Marras, S. A. E.; Hazbon, M. H.; Mann, J. M.; Connell, N. D.; Kramer, F. R.; Alland, D. Molecular Beacons for Multiplex Detection of Four Bacterial Bioterrorism Agents. *Clin Chem* 2004, 50, 1060- 1062.
- [15] Tan, W.; Wang, K.; Drake, T. J. Molecular beacons. *Current Opinion in Chemical Biology* 2004, 8, 547-553.
- 15 [16] Marras, S. A. E.; Tyagi, S.; Kramer, F. R. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Clinica Chimica Acta* 2006, 363, 48-60.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una molécula informadora que comprende al menos dos grupos funcionales diferentes, que comprende
- 5 (a) sintetizar la molécula informadora a partir de una pluralidad de bloques de construcción, en el que al menos un bloque de construcción comprende un primer grupo asidero que es un grupo alquino o un grupo alquino protegido, en el que al menos un grupo de construcción comprende un segundo grupo asidero que es un grupo alquino protegido, y en el que el primer grupo asidero es diferente del segundo grupo asidero;
- 10 (b) acoplar una primera pareja de reacción al primer grupo asidero en condiciones en las que el primer grupo asidero es reactivo y el segundo grupo asidero no es reactivo, en el que la primera pareja de reacción comprende un primer grupo funcional, y subsiguientemente
- (c) acoplar una segunda pareja de reacción al segundo grupo asidero, en el que la segunda pareja de reacción comprende un segundo grupo funcional, y en el que el primer grupo funcional es diferente del segundo grupo funcional,
- en el que la molécula informadora se selecciona de ácidos nucleicos y análogos de ácidos nucleicos,
- 15 en el que una pareja de reacción que comprende un grupo azida se acopla a un grupo alquino vía reacción de click, en el que la síntesis de la molécula informadora es una síntesis química en fase sólida en la que la molécula informadora se sintetiza mediante ensamblaje por etapas de bloques de construcción mientras está unida a una fase sólida, y en la que al menos la primera pareja de reacción se acopla mientras que la molécula informadora está unida a la fase sólida, y
- 20 en el que el grupo alquino protegido es un alquino protegido con tris(alquil/aril)sililo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que
- (i) la molécula informadora comprende hasta 2000 bloques de construcción, y/o
- (ii) los grupos funcionales se seleccionan de grupos marcadores, grupos extintores y grupos de unión.
3. El método de la reivindicación 2, en el que los grupos marcadores son colorantes.
- 25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el primer y el segundo grupo funcional son un grupo marcador y un grupo extintor, o en el que el primer y el segundo grupo funcional son un grupo marcador y un grupo de unión.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la primera pareja de reacción se acopla al primer grupo asidero en condiciones en las que el primer grupo asidero está sin proteger y el segundo grupo asidero está protegido.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que se incorporan en la molécula informadora al menos tres grupos asidero.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el primer grupo asidero es un grupo alquino, y el segundo y tercer grupos asidero son grupos alquino protegidos que poseen diferentes grupos de protección.
- 35 8. Un compuesto de la Fórmula (I)



en la que

C es un grupo alquino protegido, S es un espaciador o un enlace, y N es un bloque de construcción nucleotídico,

en la que el grupo alquino protegido es un grupo alquino protegido con tris(alquil/aril)sililo.

Figura 1

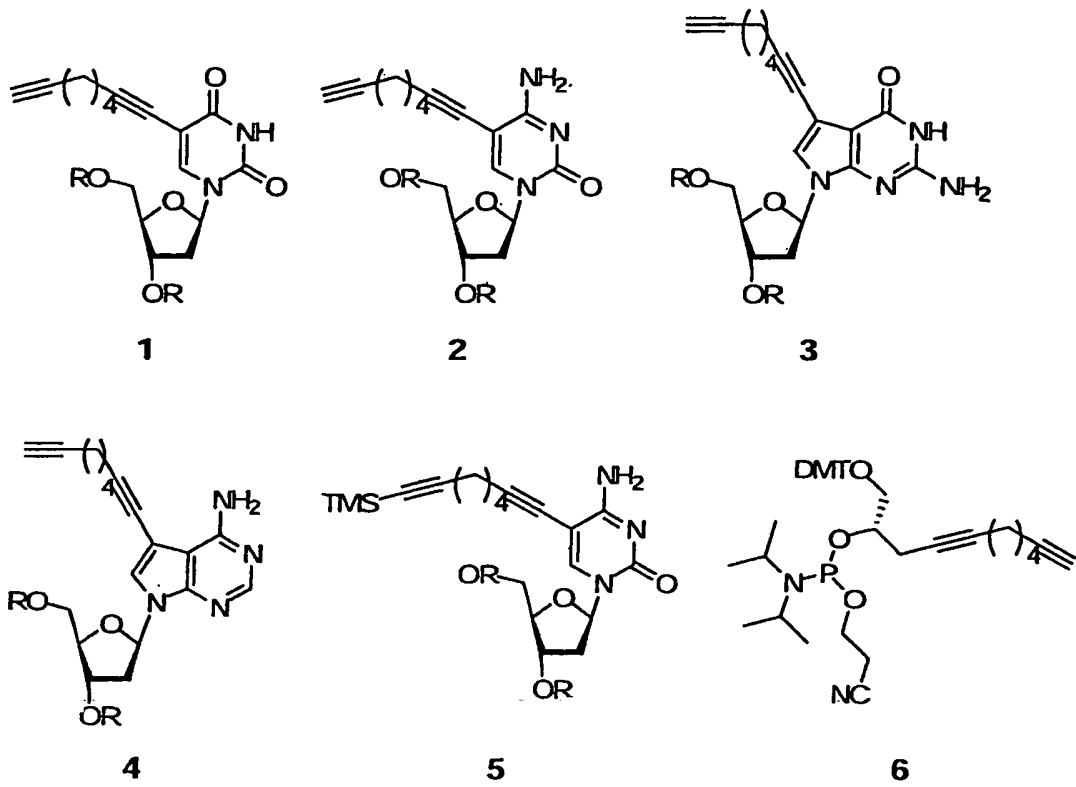


Figura 2

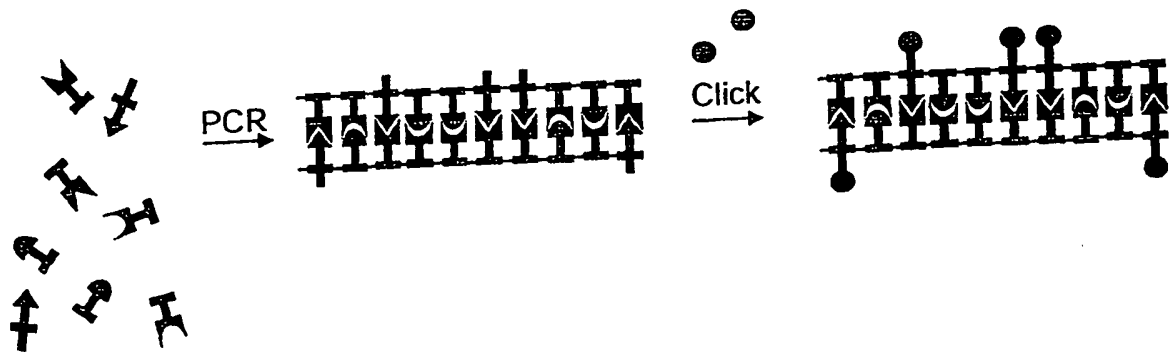


Figura 3

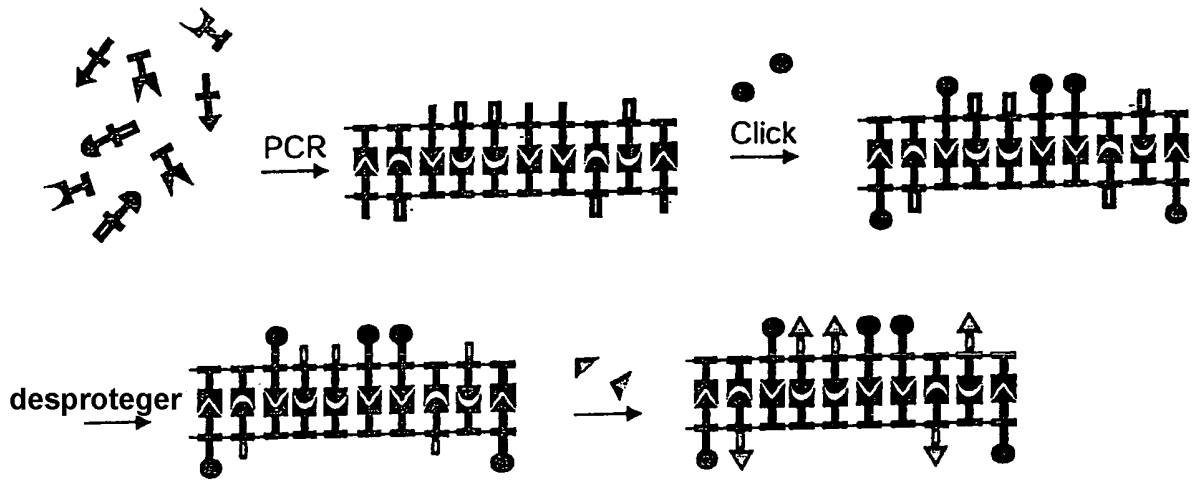


Figura 4

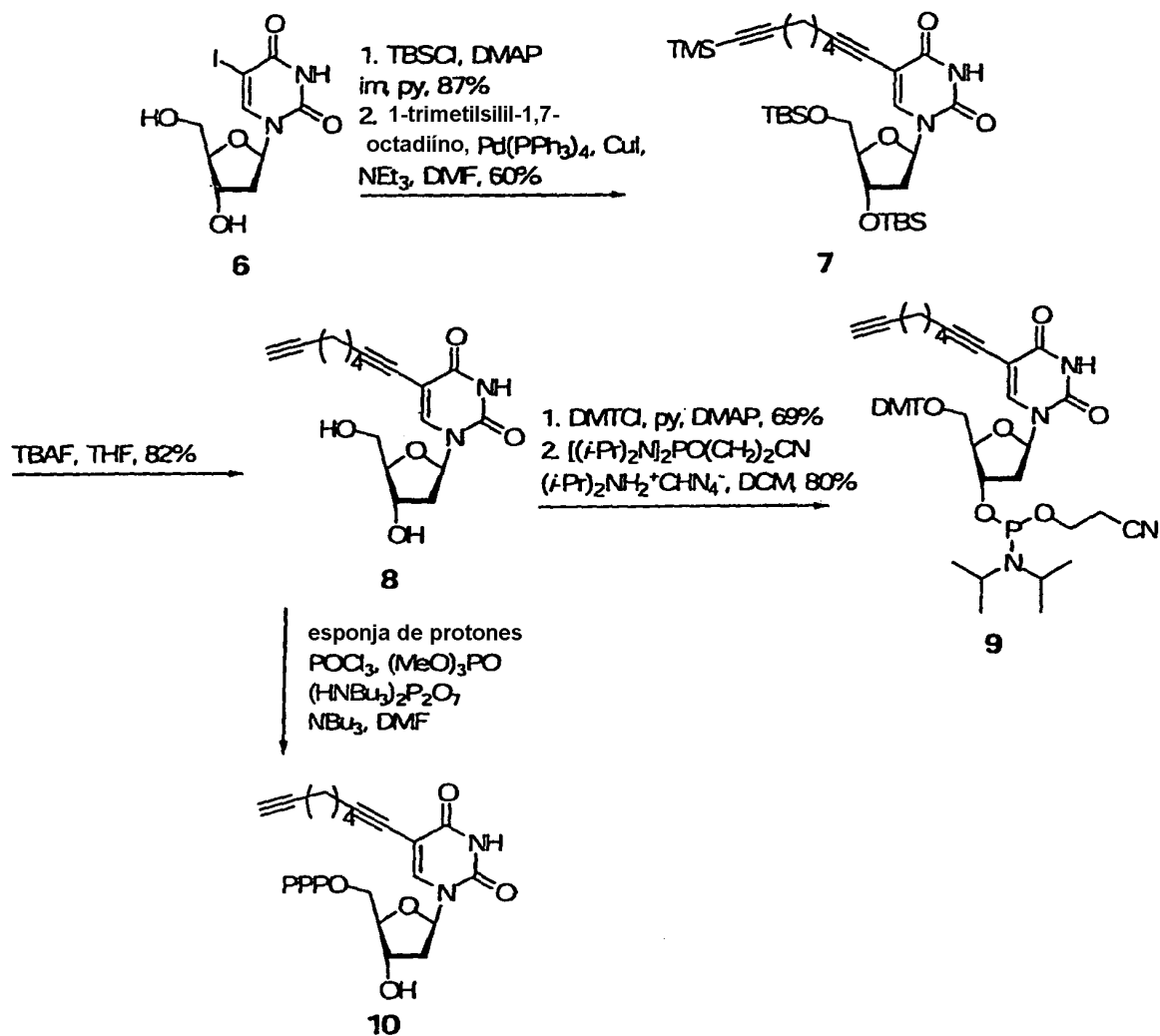


Figura 5

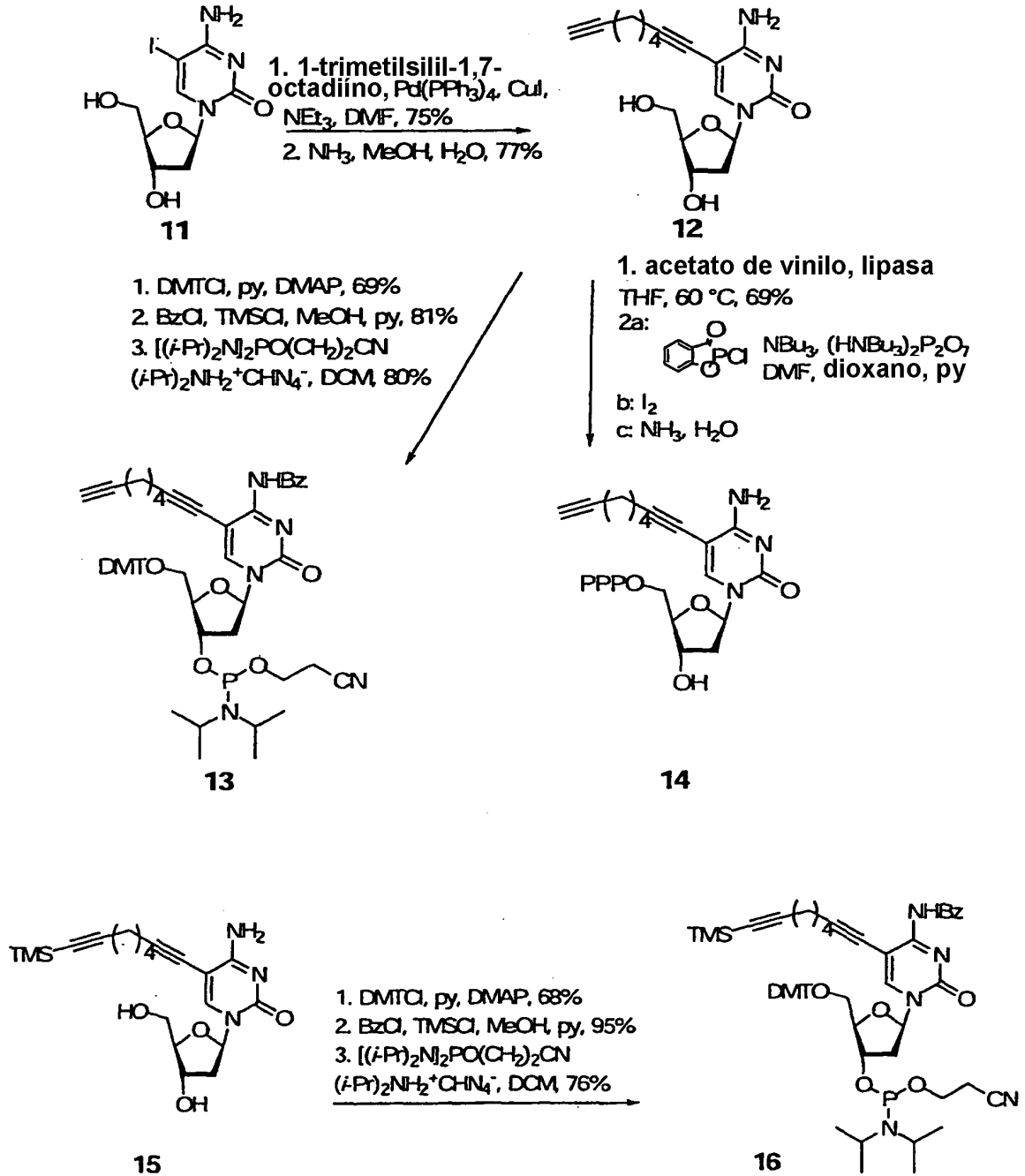


Figura 6

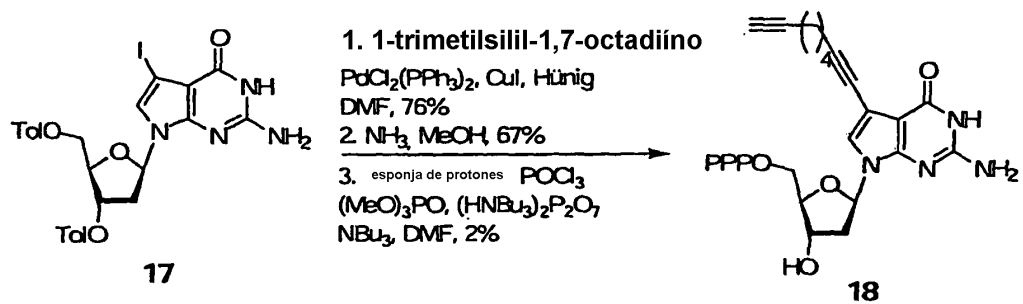


Figura 7

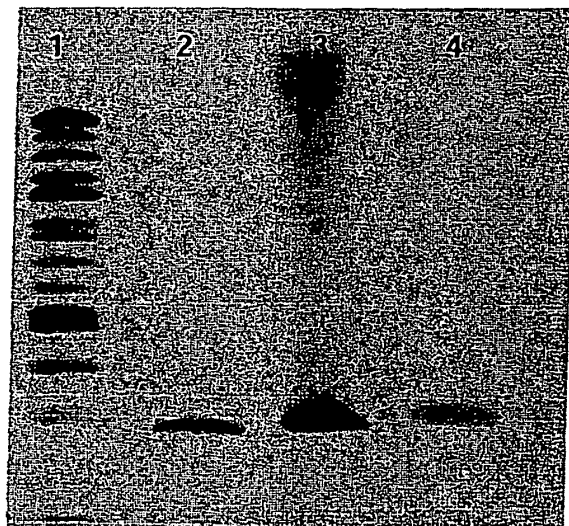


Figura 8

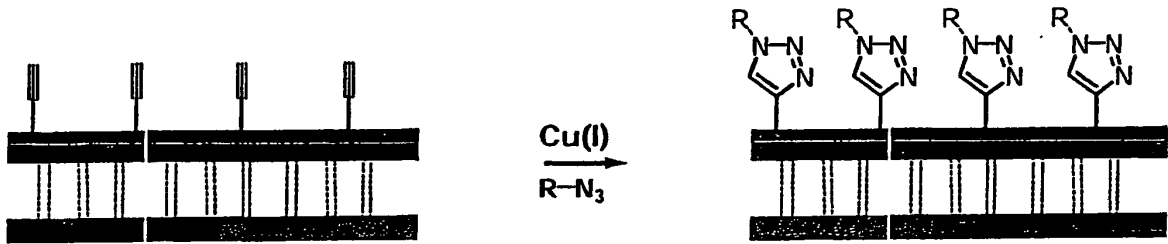


Figura 9

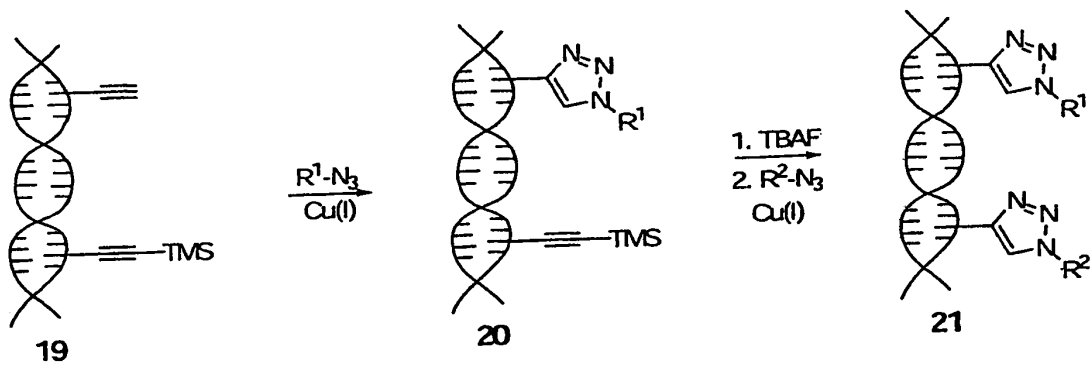


Figura 10

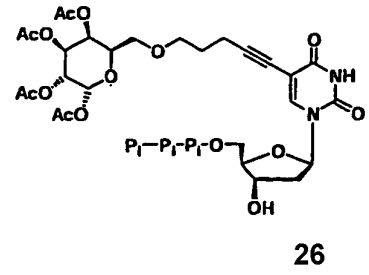
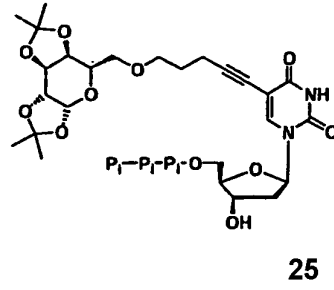
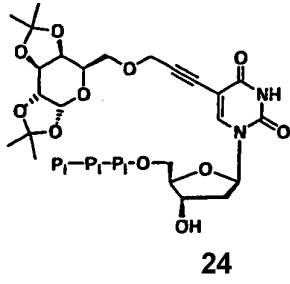


Figura 11

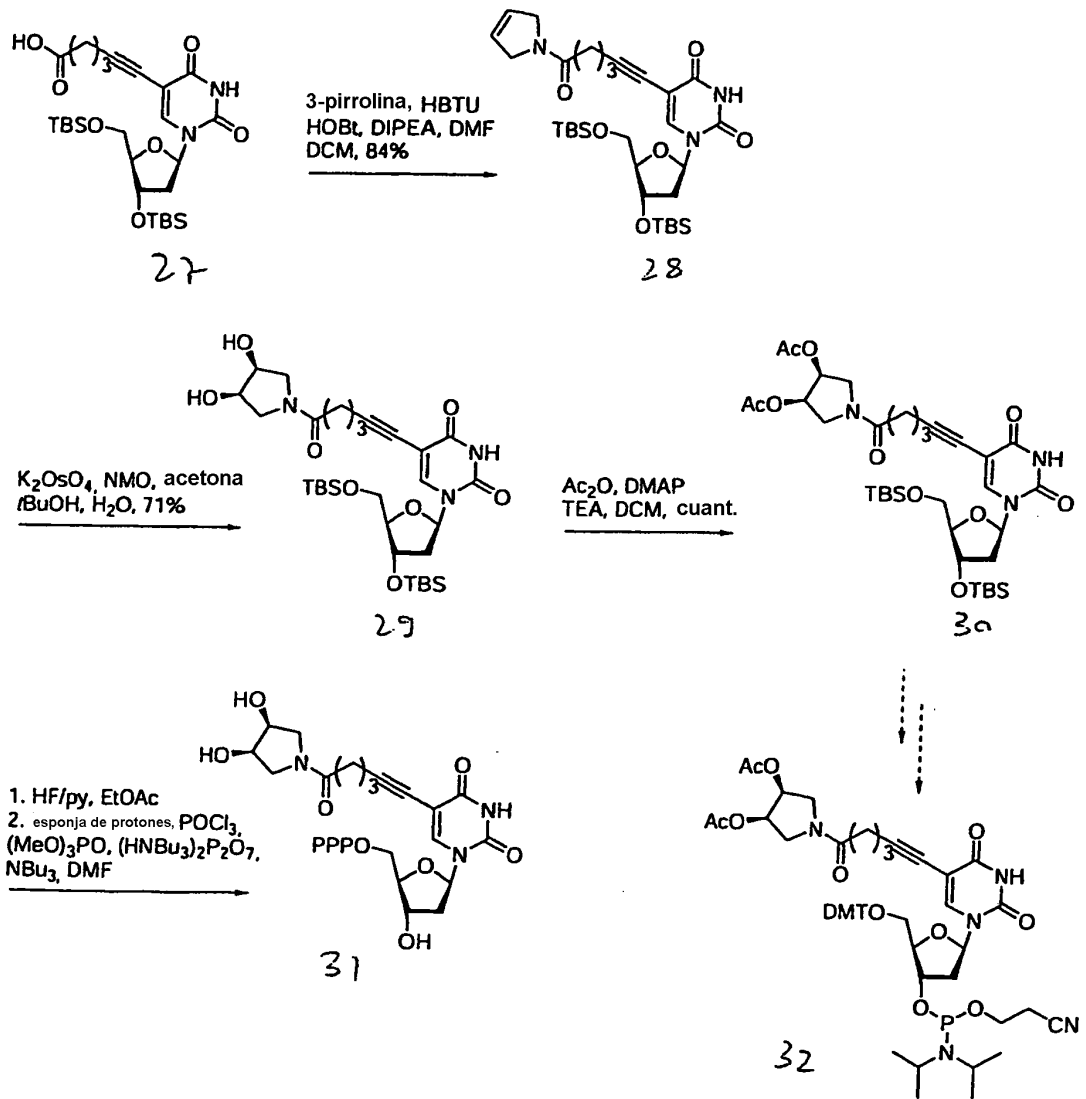


Figura 12

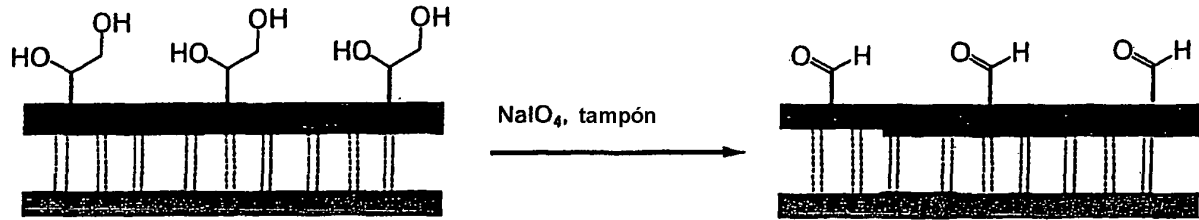


Figura 13

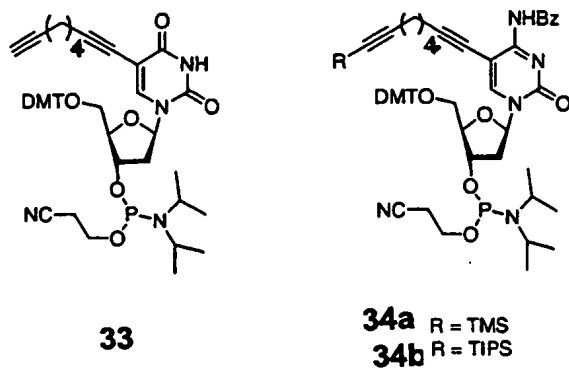


Figura 14

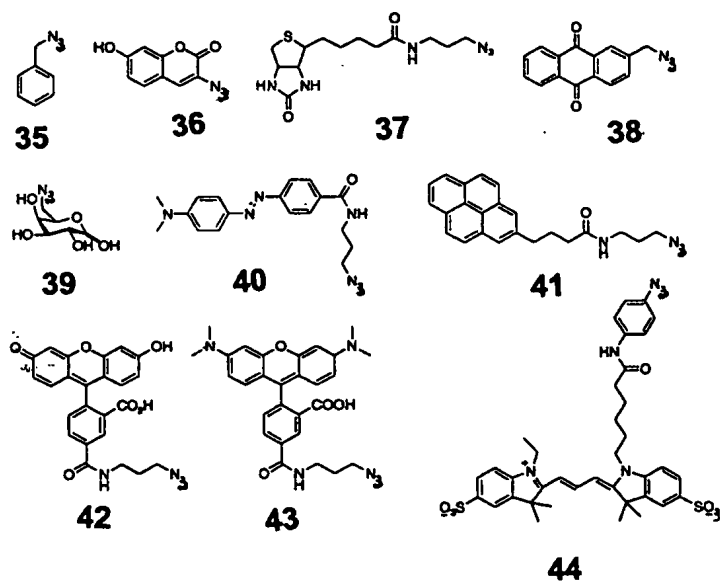


Figura 15

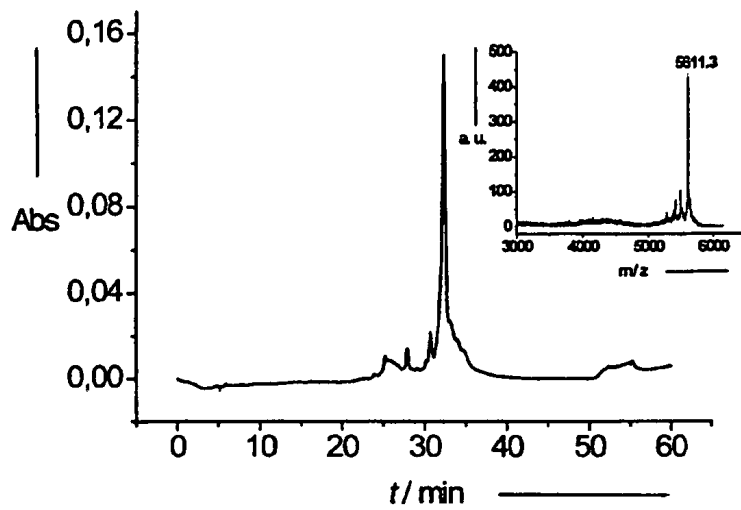


Figura 16

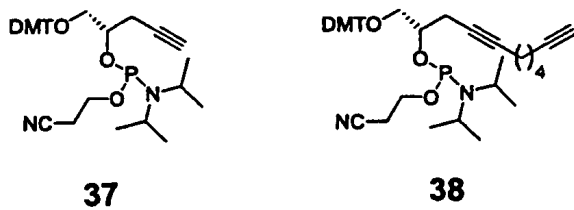


Figura 17

