

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 861**

51 Int. Cl.:
C07H 21/00 (2006.01)
C07C 245/08 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
C07F 9/24 (2006.01)
C07F 9/572 (2006.01)
C07F 9/655 (2006.01)
C07F 9/6561 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00984069 .5**
96 Fecha de presentación: **08.12.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1235938**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.09.2002**

54 Título: **Reactivos y procedimientos para la detección por desactivación de la fluorescencia**

30 Prioridad:
08.12.1999 US 457616

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2012

73 Titular/es:
EPOCH BIOSCIENCES, INC.
21720 23RD DRIVE SE, SUITE 150
BOTHELL, WA 98021, US

72 Inventor/es:
REED, Michael, W.;
LUKHTANOV, Eugeny, Alexander;
GALL, Alexander, A.;
DEMPCY, Robert, O. y
BELOUSOV, Yevgeniy, S.

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 381 861 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

Reactivos y procedimientos para la detección por desactivación de la fluorescencia

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a conjugados de oligonucleótido-desactivador-colorante-fluorescente que tienen características mejoradas, y a reactivos adecuados para incorporar restos de colorantes fluorescentes y desactivadores novedosos en oligonucleótidos. La invención también se refiere al uso de conjugados de oligonucleótido-desactivador-colorante-fluorescente en procedimientos de detección para dianas de ácidos nucleicos.

2. Breve descripción de la técnica relacionada

- 10 Los oligonucleótidos sintéticos se han usado durante años como sondas específicas de secuencia para dianas de ARN y ADN complementarios. Estos procedimientos tienen una amplia aplicación en estudios forenses, biología molecular y diagnóstico médico, ya que permiten la identificación y cuantificación de dianas de ácidos nucleicos específicos. Los primeros usos de sondas de ADN se basaron en la radiactividad (normalmente ^{32}P) como marcador, mientras que los últimos usan moléculas indicadoras que incluyen grupos quimioluminiscentes y fluorescentes. La mejora en la
 15 instrumentación ha permitido que la sensibilidad de estos procedimientos espectroscópicos se acerque o supere a los procedimientos de radiomarcado. Los procedimientos de detección desarrollados recientemente emplean el procedimiento de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para la detección de la hibridación de sonda en lugar de la detección directa de la intensidad de fluorescencia. En este tipo de ensayo, se produce la FRET entre un fluoróforo dador (indicador) y una molécula aceptora (desactivador) cuando el espectro de absorción de
 20 la molécula desactivadora se solapa con el espectro de emisión del fluoróforo dador y las dos moléculas están muy próximas. La energía del estado excitado del fluoróforo dador se transfiere al aceptor vecino por la interacción dipolo-dipolo inducido de resonancia, lo que da como resultado la desactivación de la fluorescencia del dador. Si la molécula aceptora es un fluoróforo, algunas veces se puede incrementar su fluorescencia. La eficacia de la transferencia de energía entre las moléculas de dador y aceptor es altamente dependiente de la distancia entre las
 25 moléculas. Las ecuaciones que describen esta relación se conocen. La distancia Forster (R_0) se describe como la distancia entre las moléculas de dador y aceptor en la que la transferencia de energía es eficaz en un 50 %. También se conocen otros mecanismos de desactivación de fluorescencia, tales como, desactivación por transferencia colisional y de carga.

- 30 Normalmente, los procedimientos de detección basados en FRET están diseñados de tal forma que fluoróforo dador y las moléculasceptoras estén muy próximos de modo que la desactivación de la fluorescencia del dador sea eficaz. Durante el ensayo, las moléculas de dador y aceptor se separan de tal forma que se produce la fluorescencia. Se han desarrollado ensayos de detección basados en FRET en los campos de la hibridación de ácidos nucleicos y enzimología. Varias formas de los ensayos de hibridación de FRET están revisadas (Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, Inc., San Diego 1992, p. 311-352).

- 35 Desde su descubrimiento, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha revolucionado la biología molecular. Esta técnica permite la amplificación de secuencias de ADN específicas, permitiendo así que se ejecuten ensayos de sondas de ADN a partir de una única copia de diana de ADN. Inicialmente no se han usado ensayos diagnósticos basados en PCR de forma rutinaria, en parte debido a problemas con la manipulación de la muestra y la posible contaminación con ADN de otra fuente. Recientemente, se han descrito nuevos ensayos de ADN basados en
 40 fluorescencia homogéneos, que pueden detectar el progreso de PCR mientras se produce (detección de PCR "en tiempo real") usando cicladores térmicos espectrofluorimétricos. Dos formatos de ensayo populares usan sondas de ADN que se vuelven fluorescentes mientras se produce la amplificación de ADN (sondas fluorogénicas).

- El primer formato de PCR "en tiempo real" usa sondas de ADN conocidas como "balizas moleculares" (Tyagi *et al.*, Nat. Biotech., 16: 49-53 (1998)). Las balizas moleculares tienen una estructura de horquilla en la que el colorante desactivador y el colorante indicador están en contacto íntimo entre sí el extremo de la base de la horquilla. Después de la hibridación con una secuencia complementaria, el bucle de la estructura de horquilla se vuelve bicatenario y fuerza que el colorante desactivador e indicador se aparten, generando así una señal fluorescente. Tyagi *et al.* informaron del uso de los colorantes desactivadores no fluorescentes incluyendo el resto dabcilo (4-[[4-(dimetilamino)fenil]diazetil]benzoílo, absorbancia máx. = 453 nm) usados en combinación con colorantes
 50 indicadores fluorescentes con una longitud de onda de emisión que varía ampliamente (475-615 nm). En el momento esto era sorprendente, ya que la FRET requiere un solapamiento considerable del espectro de absorción del desactivador y del espectro de emisión del indicador. En el caso de un desactivador que contenga un resto dabcilo (en lo sucesivo, "dabcilo") y algunos colorantes fluorescentes, el solapamiento espectral fue extremadamente bajo, aunque la eficacia de desactivación fue alta. Por lo tanto, se propuso que el mecanismo de desactivación para la forma de horquilla de las balizas no fuera la FRET, sino la desactivación colisional. De hecho, el espectro UV del desactivador cambia en la forma de horquilla de la baliza, proporcionando evidencias del contacto molecular y, por lo tanto, de desactivación colisional. Un procedimiento de detección relacionado usa cebadores de horquilla como sonda fluorogénica (Nazarenko *et al.*, Nucl. Acid Res., 25: 2516-2521 (1997)).

El segundo formato para PCR "en tiempo real" usa sondas de ADN que se denominan "sondas de 5'-nucleasa" (Lee et al., Nucl. Acid Res., 21: 3761-3766 (1993)). Normalmente, estas sondas fluorogénicas se preparan con el desactivador en el extremo 3' de una cadena de ADN simple y el fluoróforo en el extremo 5'. Durante cada ciclo de PCR, la actividad de 5'-nucleasa de la *Taq* ADN polimerasa escinde la cadena de ADN, separando de este modo el fluoróforo del desactivador y liberando la señal fluorescente. El ensayo de 5'-nucleasa requiere que la sonda se hibride a la cadena plantilla durante la etapa de extensión del cebador (60-65 °C). También dan a conocer la detección "en tiempo real" simultánea de más de una secuencia de polinucleótidos en el mismo ensayo, usando más de un par fluoróforo/desactivador. El ensayo de PCR de 5'-nucleasa se representa en la **figura 1**.

Inicialmente se pensaba que las sondas de 5'-nucleasa se tenían que preparar con el desactivador (normalmente tetrametilrodamina (TAMRA)) situado en un nucleótido interno muy próximo al 5'-fluoróforo (normalmente fluoresceína (FAM) o tetraclorofluoresceína (TET)) para obtener una FRET eficaz. Más tarde se demostró que esto no es necesario, y que el desactivador y el fluoróforo se pueden situar en el extremo 3' y 5' del ODN, respectivamente. Se ha propuesto que las estructuras en espiral aleatorias formadas por estas sondas fluorogénicas en disolución permiten que un colorante 3'-desactivador pase dentro del radio de Forster del 5'-fluoróforo durante el estado excitado de la molécula.

Previamente se han descrito varios pares dador/aceptor; importante para la presente invención es el dabcilo que se usa, por ejemplo, como un desactivador de sulfonamida de dansilo en quimiosensores (Rothman y Still (1999) Med. Chem. Lett. 22, 509 - 512).

Sorprendentemente, no se han publicado informes sobre el uso de dabcilo en sondas de 5'-nucleasa u otras sondas de FRET que usen fluoróforos de longitud de onda larga. Como se menciona anteriormente, se usó dabcilo en las sondas de tipo baliza pero este es un mecanismo de desactivación diferente en el que el dabcilo y el fluoróforo están en contacto íntimo (desactivación colisional). Se usó dabcilo en péptidos fluorogénicos como desactivador para el fluoróforo EDANS (ácido 5-[(2-aminoetil)amino]naftaleno-1-sulfónico) que emite a una longitud de onda corta (490 nm, azul) (Matayoshi et al. Science 247: 954-958 (1990)). EDANS también tiene un coeficiente de extinción menor que dabcilo por lo que no es sorprendente que la desactivación fluorescente sea eficaz. Se observó por primera vez en la presente invención que se puede usar dabcilo para desactivar la fluoresceína en un mecanismo de tipo FRET.

Además del ensayo de PCR de 5'-nucleasa, se han desarrollado otros formatos que usan el mecanismo de FRET. Por ejemplo, se han modificado cebadores de señales monocatenarios por enlace con dos colorantes para formar un par de colorantes dador/aceptor de tal forma que la fluorescencia del primer colorante se desactiva por el segundo colorante. Este cebador de señal contiene un sitio de restricción (patente de los Estados Unidos N.º 5.846.726) que permite que la enzima de restricción apropiada melle el cebador cuando se hibrida a una diana. Esta escisión separa los dos colorantes y se observa un cambio en la fluorescencia debido a una disminución en la desactivación. También se han descrito reactivos de enlace no nucleótidos para acoplar oligonucleótidos a ligandos (Patente de los Estados Unidos N.º 5.696.251).

Los sistemas de FRET también tienen aplicaciones en enzimología. Se han desarrollado sustratos de escisión de proteasa, en los que se diseñan los pares de colorantes dador/aceptor en el sustrato. La escisión enzimática del sustrato separa el par dador/aceptor y se observa un cambio en la fluorescencia debido a una disminución en la desactivación. Se han desarrollado sustratos dador/aceptor escindibles para quimiotripsina (Li et al. Bioconj. Chem., 10: 241-245 (1999)), aminopeptidasa P (Hawthorne et al., Anal. Biochem., 253: 13-17 (1997)), estromelina (Bickett et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 732: 351-355 (1994)) y leucotrieno D₄ hidrolasa (White et al., Anal. Biochem., 268: 245-251 (1999)). Se describió un quimiosensor en el que la unión del ligando separa el par dador/aceptor (Rothman et al. Biorg. Med. Chem. Lett., 9: 509-512 (1999)).

En la patente de los Estados Unidos N.º 5.801.155 se dio a conocer que los oligonucleótidos (ODN) que tienen un ligando del surco menor (MGB) unido covalentemente son más específicos con respecto a la secuencia para sus dianas complementarias que los oligonucleótidos no modificados. Además, los MGB-ODN muestran un incremento sustancial en la estabilidad híbrida con cadenas de diana de ADN complementario en comparación con oligonucleótidos no modificados, permitiendo la hibridación con oligonucleótidos más cortos.

Los reactivos para el marcado fluorescente de oligonucleótidos son decisivos para la aplicación eficaz de los ensayos de FRET descritos anteriormente. Otras aplicaciones tales como micromatrices de ADN también usan sondas de ADN marcadas fluorescentemente o cebadores, y hay una necesidad de obtener reactivos mejorados que faciliten la síntesis de ADN fluorescente. En general, se usan ampliamente reactivos de fosforamidita y soportes sólidos en la síntesis de ODN. Sin embargo, en el estado de la técnica no hay muchos reactivos de fosforamidita comercialmente disponibles para introducir grupos fluorescentes en ODN.

Los grupos enlazadores que unen diferentes grupos de ligandos a ODN desempeñan un papel importante en la síntesis de conjugados de oligonucleótidos. Se ha informado de un procedimiento para la síntesis de oligonucleótidos con cola de 3'-aminohexilo (Petrie et al., Bioconj. Chem., 3: 85-87 (1992)), el uso de un grupo trans-4-hidroxi-L-prolinol trifuncional (Reed et al., Bioconj. Chem., 2: 217-225 (1991)), ácido diglicólico (Pon et al., Nucl. Acids. Res., 25: 3629-3635 (1997)), reactivos de 1,3-diol (documentos US 5.942.610 y US 5.4511.463) y el reactivo trifuncional no nucleotídico (documento US 5.696.251).

Se han usado ampliamente derivados de resorufina y cumarina como sustratos de enzimas para diferenciar las isoenzimas del citocromo P450 (Haugland et al., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, sexta edición, Eugene, OR. p. 235-236. 1996.). Se han dado a conocer análogos de resorufina reactivos en la patente de los Estados Unidos N.º 5.304.645. En la técnica se conocen ésteres activados de derivados de cumarina (Hirshberg et al., Biochem., 37: 10391-5 (1998)). Se usaron dUTP marcados con cumarina en sondas para hibridaciones *in situ* (Wiegant et al., Cytogenet. Cell Genet., 63: 73-76 (1993)). Se han descrito fosforamiditas para introducir marcadores en oligonucleótidos en la patente de los Estados Unidos N.º 5.328.824 y 5.824.796.

Muchas aplicaciones de hibridación actuales, requieren más de una molécula indicadora. Además, aunque están disponibles fluoróforos indicadores para usar en pares indicador/desactivador, la mayoría tienen alguna característica no deseada, son mezclas difíciles de separar, están cargados positivamente, son difíciles de sintetizar, inestables durante la síntesis de oligonucleótidos o tienen longitudes de onda de emisión que se solapan con otros indicadores deseables. La presente invención proporciona reactivos para sondas de oligonucleótidos que abordan estas características desfavorables y superar algunas o todas las dificultades.

La técnica anterior pertinente para los antecedentes de la presente invención incluye la solicitud PCT internacional WO 97 39008, que da a conocer sondas, que comprende un nucleótido, un desactivador y un fluoróforo, que pueden hibridarse con ácido nucleico.

También, el "98 Catalogue" (1998), Amersham Pharmacia Biotech, S. Herbogenbosch, Países Bajos, da a conocer FluoroBlue®, que es un nucleótido fluorescente que consiste en un resto fluoróforo y un resto nucleótido.

Finalmente, Asanuma H. et al, Tetrahedron Letters, vol. 39, n.º 49 (1998-12-03), páginas 9015-9018, da a conocer una sonda que puede hibridarse con un ácido nucleico, conteniendo dicha sonda un desactivador.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un conjugado de oligonucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, 8-10, 13-17.

La presente invención también proporciona un reactivo de fosforamidita, para preparar un conjugado oligonucleótido - fluoróforo - desactivador, de acuerdo con las reivindicaciones 6-7 y 18.

La presente invención proporciona además un ligando del surco menor unido covalentemente y un desactivador de acuerdo con las reivindicaciones 11-12.

La presente invención proporciona procedimientos para hibridar ácidos nucleicos de acuerdo con las reivindicaciones 19, 20, 23-26.

La presente invención también proporciona procedimientos para discriminar entre polinucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 21 y 22.

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier información en la descripción que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente a efectos de información.

La descripción analiza moléculas desactivadoras basadas en la estructura de 4-[(4-nitrofenil)diazinil]fenilamina y/o 4-[(4-nitrofenil)diazinil]naftilamina. Las moléculas desactivadoras tienen un solapamiento espectral UV mejorado no sólo con grupos indicadores fluorescentes usados comúnmente que emiten en un intervalo de longitud de onda corto (aproximadamente de 400 a 500 nm), sino con los que tienen ampliado el intervalo de longitudes de onda de medio (525 nm = verde) a largo (670 nm = rojo). Los cromóforos desactivadores de la presente invención son no fluorescentes, se incorporan fácilmente en los reactivos de síntesis de ADN, son estables durante la síntesis de ADN automatizada y durante el almacenamiento y son compatibles sin efectos adversos sobre las propiedades de hibridación. Además, se observan proporciones señal ruido mejoradas con los colorantes indicadores fluorescentes sobre un intervalo de longitudes de onda más amplio. Por tanto, la presente invención ofrece ventajas considerables sobre el uso de dabcilo (Nazerenko et al, Nucl. Acids Res., 25: 2516-21 (1997)) como colorante de desactivación, tal como se usa en la técnica anterior.

La descripción analiza desactivadores basados en la estructura 4-[(4-nitrofenil)diazinil]fenilamina (y/o estructura 4-[(4-nitrofenil)diazinil]naftilamina) que se modifican con estructuras enlazadoras que permiten su fácil incorporación en sondas de ADN fluorogénicas durante la síntesis de ADN automatizada. La invención incluye la síntesis de fosforamiditas derivadas de moléculas desactivadoras novedosas para la incorporación de los restos de desactivador en oligonucleótidos durante la síntesis automatizada, y también la síntesis de reactivos derivados de moléculas desactivadoras novedosas para la unión de soporte post-fase sólida a oligonucleótidos con cola amino. En un aspecto relacionado, las moléculas desactivadoras novedosas se introducen en oligonucleótidos usando fosforamiditas pirazolo-[5,4-d]pirimidinas y pirimidinas que contienen los desactivadores unidos en las posiciones 3' y 5', respectivamente.

La descripción analiza tres tipos diferentes de reactivos fluorescentes que son compatibles con la síntesis de ADN que

se sintetizan o se seleccionan y se convierten en reactivos de fosforamidita adecuados para su incorporación en ODN. Específicamente, se incorporan a reactivos de fosforamidita colorantes fluorescentes de color violeta basados en la estructura 10-fenil-1,3,5,7,9,10-hexahidropirimidino[5',4'-5,6]piridino[2,3-d]pirimidina-2,4,6,8-tetraona (PPT), colorantes fluorescentes de color rojo basados en 7-hidroxi-fenoxazin-3-ona (resorufina) y colorantes fluorescentes de color azul basados en la estructura de cumarina. Estos colorantes fluorescentes tienen propiedades excelentes para el análisis fluorescente multicolor en combinación con otros colorantes (por ejemplo, fluoresceína). Estos reactivos son útiles para muchos procedimientos de análisis que usan formatos de detección directa de fluorescencia o bien de detección de FRET. En un aspecto relacionado la invención, los fluoróforos basados en PPT, cumarina y resorufina (colorantes fluorescentes) se convierten en reactivos novedosos adecuados para la unión covalente de la "síntesis post-oligonucleótido" en el extremo 5' de ODN. En otro aspecto, las nuevas moléculas fluorescentes se incorporan en los oligonucleótidos usando fosforamiditas pirazolo-[5,4-d]pirimidinas y pirimidinas que contienen los fluoróforos unidos en las posiciones 3' y 5', respectivamente.

La descripción analiza ODN enlazados covalentemente a las estructuras desactivadoras novedosas de la invención, apareados con restos fluorescentes unidos covalentemente que se preparan. El conjugado FL-ODN-Q resultante también puede incluir un ligando del surco menor (MGB) que mejora las características de unión y discriminación del conjugado FL-ODN-Q-MGB resultante en ensayos diagnósticos, en particular en el ensayo de PCR de TaqMan de polimorfismo de nucleótido individual (y similares) en el que la discriminación específica de alelo no sólo requiere sondas con diferentes moléculas indicadoras fluorescentes sino desactivadores eficaces. Los desactivadores usados de acuerdo con la invención en los conjugados FL-ODN-Q-MGB proporcionan un intervalo de longitudes de onda de desactivación amplio, y determinados reactivos de marcado de indicadores novedosos de acuerdo con la invención tienen longitudes de onda de emisión distintivas para un análisis multicolor mejorado.

En una aplicación de los principios resumidos anteriormente, se preparan sondas fluorogénicas usando un soporte sólido de "3'-hexanol" universal (disponible de acuerdo con Gamper et al. *Nucleic Acids Res.*, 21: 145-150 (1993)), donde se añade una fosforamidita desactivadora de la invención en la primera etapa de acoplamiento (extremo 3') de la secuencia de ODN y se une un fluoróforo (FL) en la última etapa de acoplamiento, proporcionando sondas de conjugados 5'-FL-ODN-Q-hexanol.

Como otras aplicaciones de la invención, se dan a conocer procedimientos para sintetizar y unir los desactivadores novedosos a conjugados ODN-fluoróforo con y sin ligando del surco menor 3' (MGB). Estos procedimientos utilizan soportes sólidos sintéticos para la síntesis de oligonucleótidos automatizada con enlazadores escindibles.

En otra aplicación, se prepara una sonda de oligonucleótido fluorogénico a partir de un soporte sólido modificado con MGB sustancialmente de acuerdo con el procedimiento de Lukhtanov et al. *Bioconjugate Chem.*, 7: 564-567 (1996)), donde se añade una fosforamidita desactivadora de la invención en la primera etapa de acoplamiento al MGB y se une un fluoróforo (FL) en la última etapa de acoplamiento al ODN, para proporcionar una sonda de conjugados 5'-FL-ODN-Q-MGB.

La descripción analiza micromatrices en ensayos diagnósticos basados en ácidos nucleicos que recientemente han pasado a ser importantes en muchos campos, tales como las ciencias médicas, forenses, agricultura y control de calidad del agua. Otra aplicación relacionada de los procedimientos y composiciones de la presente invención es en procedimientos que usan matrices de oligonucleótidos, tales como el análisis basado en matrices de expresión génica (Eisen, *Methods of Enzym.*, 303: 179-205 (1999)). En estos procedimientos, se usa una matriz ordenada de oligonucleótidos o ADN que corresponden a todos, o una gran parte de los genes en muchos organismos como plataforma para la hibridación. Se usan procedimientos basados en micromatrices en ensayos para medir la representación relativa de especies de ARN expresadas. La cuantificación de las diferencias en abundancia de cada especie de ARN se logra comparando directamente dos muestras marcándolas con colorantes fluorescentes espectralmente distintos y mezclando las dos sondas para hibridación simultánea a una matriz.

En la medida en que la aplicación de las composiciones y procedimientos de la presente invención se refiere a la detección de ácidos nucleicos, incluye pero no se limita a procedimientos en los que está implicada la FRET, tales como 5'-nucleasa, cebadores de transferencia de energía universal o ensayos con balizas. Normalmente, estos procedimientos se refieren, pero no se limitan a la detección de secuencias de ácidos nucleicos generadas por PCR. Algunos de estos procedimientos implican la detección simultánea de más de una secuencia de ácidos nucleicos en el mismo ensayo. De forma similar, la invención se refiere a procedimientos en los que está implicada la FRET en la detección de la concentración de proteína o la actividad enzimática.

La descripción analiza el marcado con colorantes basados en PPT, cumarina y resorufina luminiscentes de ácidos nucleicos, proteínas y otros materiales incluyendo fármacos, toxinas, células, materiales microbianos, superficies de vidrio o poliméricas y similares, en un grupo reactivo tal como un grupo amino, hidroxilo o sulfhidrilo. La presente invención se puede usar en procedimientos de marcado en una única y en dos etapas. En el procedimiento de marcado en dos etapas, se marca un componente principal, tales como un oligonucleótido con el reactivo que puede introducir los colorantes basados en PPT, cumarina y resorufina de fluoróforo novedosos, por reacción con un grupo reactivo del ODN (tal como un grupo amina, hidroxilo, carboxilo, aldehído o sulfhidrilo) y se usa el marcador para detectar un componente secundario, tal como una diana de oligonucleótido.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** es una representación esquemática del ensayo de PCR de 5'-nucleasa en tiempo real.

La **figura 2** es una gráfica que muestra el espectro UV de sondas de ADN modificadas con colorante Red13 y dabculo.

La **figura 3** es una gráfica que el rendimiento de sondas de MGB fluorogénicas en un ensayo de PCR "en tiempo real".

- 5 La **figura 4** es una gráfica que muestra el espectro fluorescente de sondas de ADN que contienen colorante violeta, FAM y resorufina.

Descripción detallada de la invención

Reactivos desactivadores para la síntesis de oligonucleótidos

- 10 Se ejemplifican dos tipos de reactivos para introducir los restos de desactivador de 4-(fenildiazenil)fenilamina sustituidos en oligonucleótidos usando un sintetizador de ADN automatizado en la divulgación a continuación. En este caso y en los esquemas de reacción, las abreviaturas MGB, FL, Q, CPG y ODN se refieren a los restos o moléculas de "ligando del surco menor", "fluorescente o fluoróforo", "desactivador" "vidrio de poro controlado" y "oligonucleótido", respectivamente, y de una manera que es evidente en el contexto.

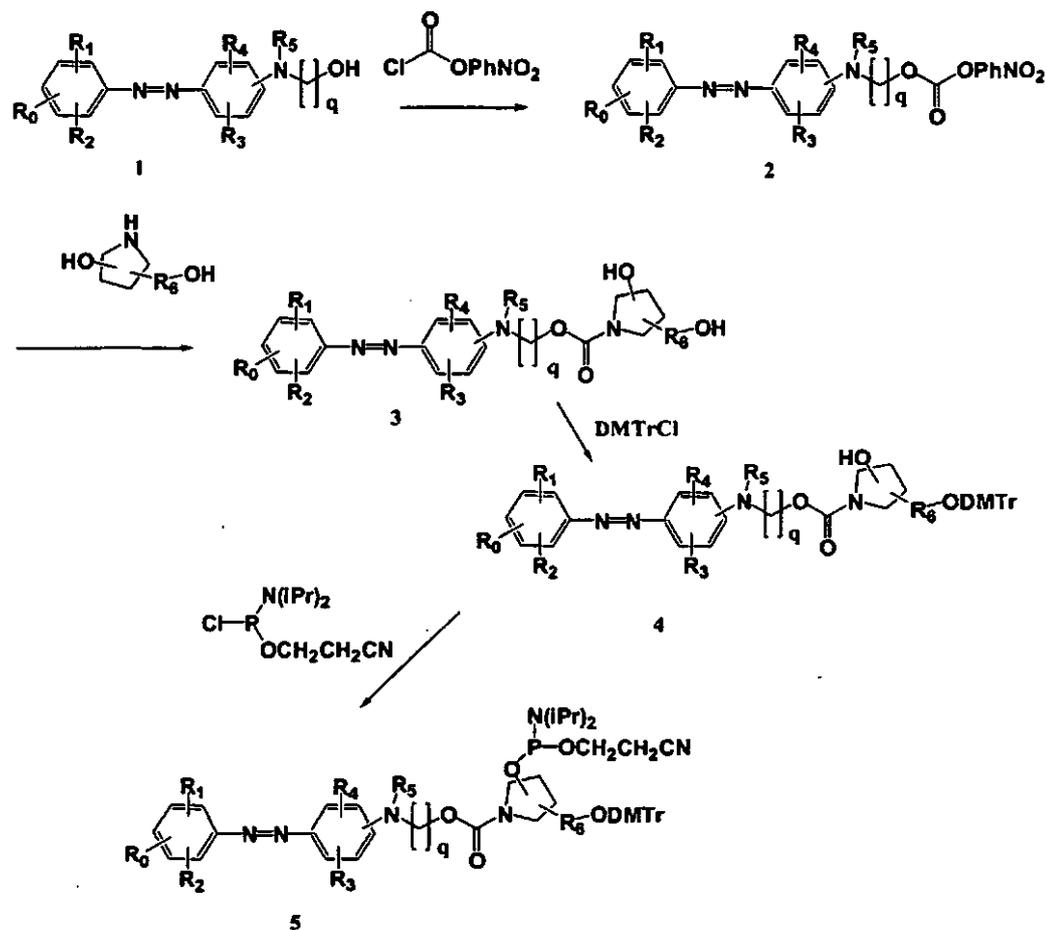
Fosforamiditas desactivadoras protegidas con dimetoxitritilo

- 15 El primer tipo de reactivos dados a conocer en el presente documento son fosforamiditas que llevan la molécula desactivadora (Q), así como un alcohol primario protegido con dimetoxitritilo (DMTr) (metoxitritilo, tritilo o el grupo de bloqueo de ácido lábil similar), que proporciona un punto de unión para la cadena de oligodesoxinucleótido (ODN) creciente durante la síntesis de oligonucleótidos subsiguientes. Ejemplos de estos reactivos se representan en las **fórmulas 1, 2, y 3**, y en los **esquemas de reacción 1 y 2**.

- 20 En el **esquema de reacción 1**, el compuesto de partida es una 4-(fenildiazenil)fenilamina sustituida **1** que tiene un grupo hidroxilo primario. Este material de partida está comercialmente disponible o se pueden sintetizar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, aplicando habilidades rutinarias disponibles para la práctica de química orgánica. Por ejemplo, se hace reaccionar la sal de 4-nitrobenzen-diazonio con 2-(2-cloroanilino)etanol para dar 2-[2-cloro-4-(4-nitrofenilazo)anilino]etanol de acuerdo con las enseñanzas de la patente de los Estados Unidos N.º 2.264.303. 2-[2-cloro-4-(4-nitrofenilazo)anilino]etanol está dentro del alcance del compuesto **1**, como se representa en el **esquema de reacción 1**.
- 25

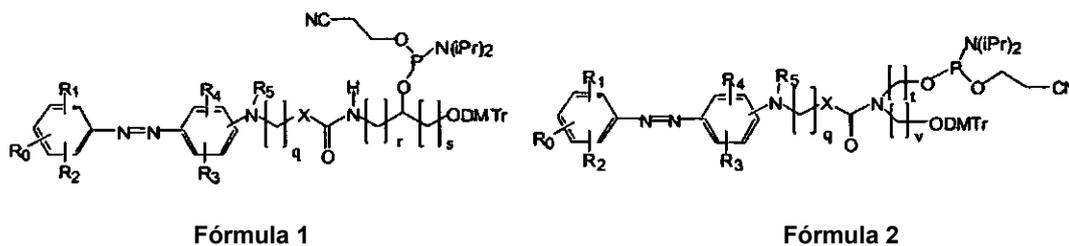
Otros ejemplos de materiales de partida comercialmente disponibles (o de sus precursores) son: 2-(etil{4-[(4-nitro-fenil)diazenil]fenil}amino)-etan-1-ol y 2-(etil{4-[(2-metoxi-4-nitrofenil)diazenil]fenil}amino)etan-1-ol.

- 30 Como se muestra en el **esquema de reacción 1**, se hace reaccionar el compuesto **1** con p-nitrofenilcloroformiato para proporcionar el carbonato **2**. La reacción de **2** con pirrolidindioles sustituidos proporciona un intermedio diol **3**. El pirrolidindiol es un reactivo trifuncional que tiene un grupo amino, un grupo hidroxilo primario y uno secundario. Un ejemplo de un pirrolidindiol así como ejemplos de otros reactivos trifuncionales que tienen un grupo amino, hidroxilo primario y secundario, se describen en la patente de los Estados Unidos N.º 5.512.667. En primer lugar, se hace reaccionar el diol **3** con cloruro de dimetoxitritilo (DMTrCl) para bloquear el grupo hidroxilo primario del reactivo trifuncional y proporcionar el intermedio **4**. Después, se hace reaccionar el intermedio **4**, que aún tiene un grupo hidroxilo secundario libre en el reactivo trifuncional, con diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo para dar el reactivo de fosforamidita protegido con dimetoxitritilo **5**. En los compuestos mostrados en el **esquema de reacción 1**, los símbolos se definen como sigue. R₀, R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente -H, halógeno, -O(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_nCH₃ en los que n = 0 a 5, -NO₂, -SO₃, -N[(CH₂)_nCH₃]₂ en el que n' = 0 a 5 o -CN; R₅ = -H o -(CH₂)_nCH₃ en el que n" = 0 a 5; R₆ = -(CH₂)_n en el que n* = 1 a 5 y q = 1 a 20. El reactivo de fosforamidita protegido con dimetoxitritilo **5** es adecuado para unirse a oligonucleótidos en etapas diferentes conocidas en la síntesis de ODN rutinaria.
- 40



ESQUEMA DE REACCIÓN 1

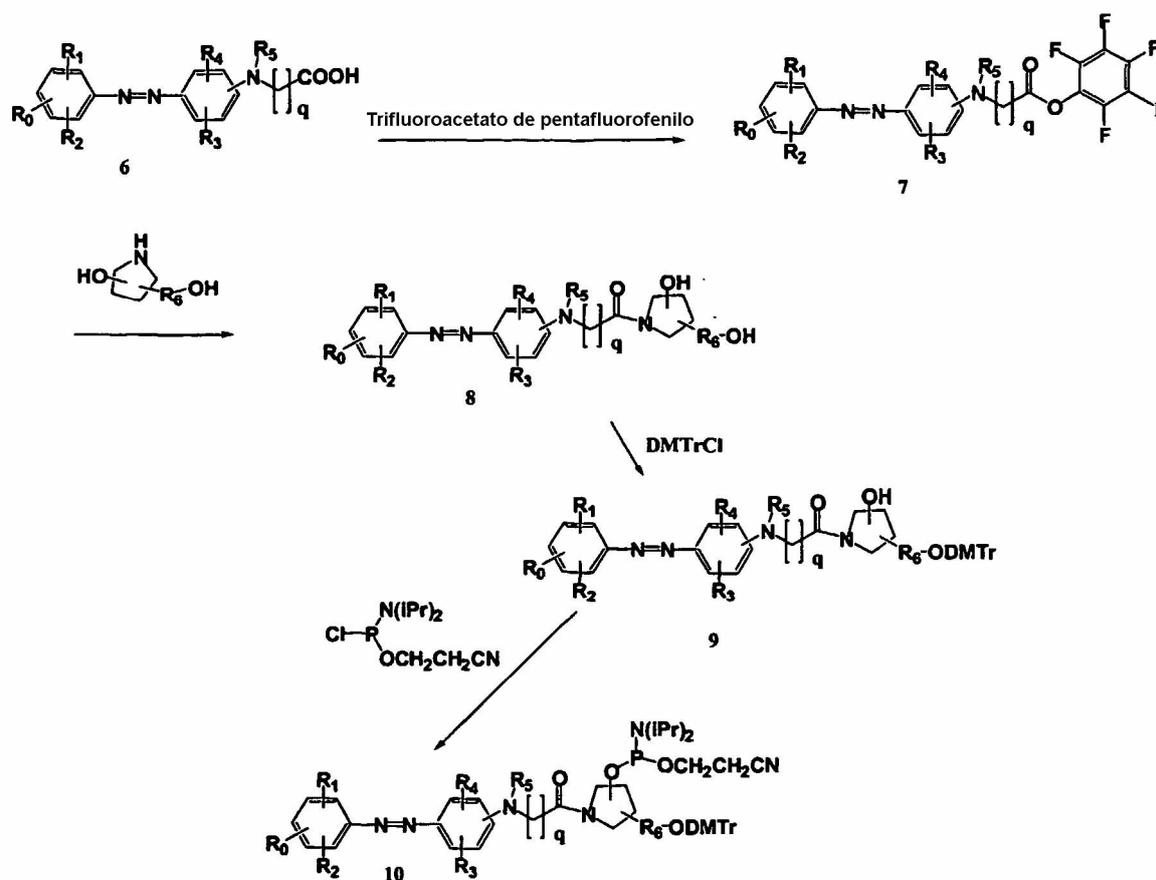
5 En otras realizaciones, usando las reacciones descritas en el **esquema de reacción 1**, (o sólo tales modificaciones que están dentro del alcance de la práctica de la química orgánica) comenzando con otros reactivos trifuncionales que tienen un grupo amino y dos grupos hidroxilo, se sintetizan las fosforamiditas de **fórmula 1** y **fórmula 2**, en las que q, R₀, R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅, se definen como antes; r y s, son independientemente de 1 a 20; X es -O- o -CH₂-; t y v son independientemente de 1 a 20.



Fórmula 1

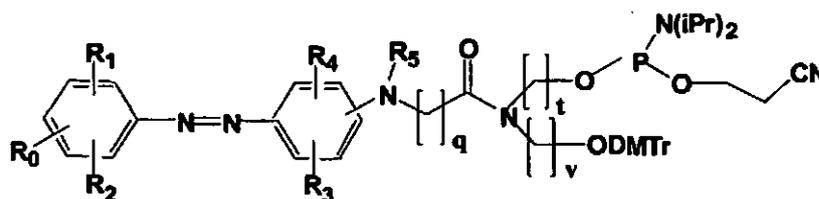
Fórmula 2

10 El **esquema de reacción 2** da a conocer la síntesis de otro reactivo de fosforamidita ejemplar **10** que lleva el resto desactivador 4-(fenildiazenil)-fenilamina sustituido y que incluye el resto de pirrolidindiol trifuncional. En este esquema sintético, el material de partida es un compuesto de 4-(fenildiazenil)fenilamina **6** que tiene un grupo carboxilo libre. El compuesto **6** (disponible comercialmente o preparado de acuerdo con la literatura química dentro del alcance de la práctica de química orgánica) se hace reaccionar con trifluoroacetato de pentafluorofenilo para preparar un éster activo **7**, que posteriormente se hace reaccionar para acoplar el resto 4-(fenildiazenil)-fenilamina sustituido con el nitrógeno del anillo de un resto pirrolidindiol que tienen un grupo hidroxilado primario libre y secundario libre, proporcionando el compuesto **8**. El tratamiento de **8** con DMTrCl seguido de reacción con diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo da el reactivo de fosforamidita protegido con dimetoxitritilo **10**. En el **esquema de reacción 2**, los símbolos se definen igual que en el **esquema de reacción 1**.



ESQUEMA DE REACCIÓN 2

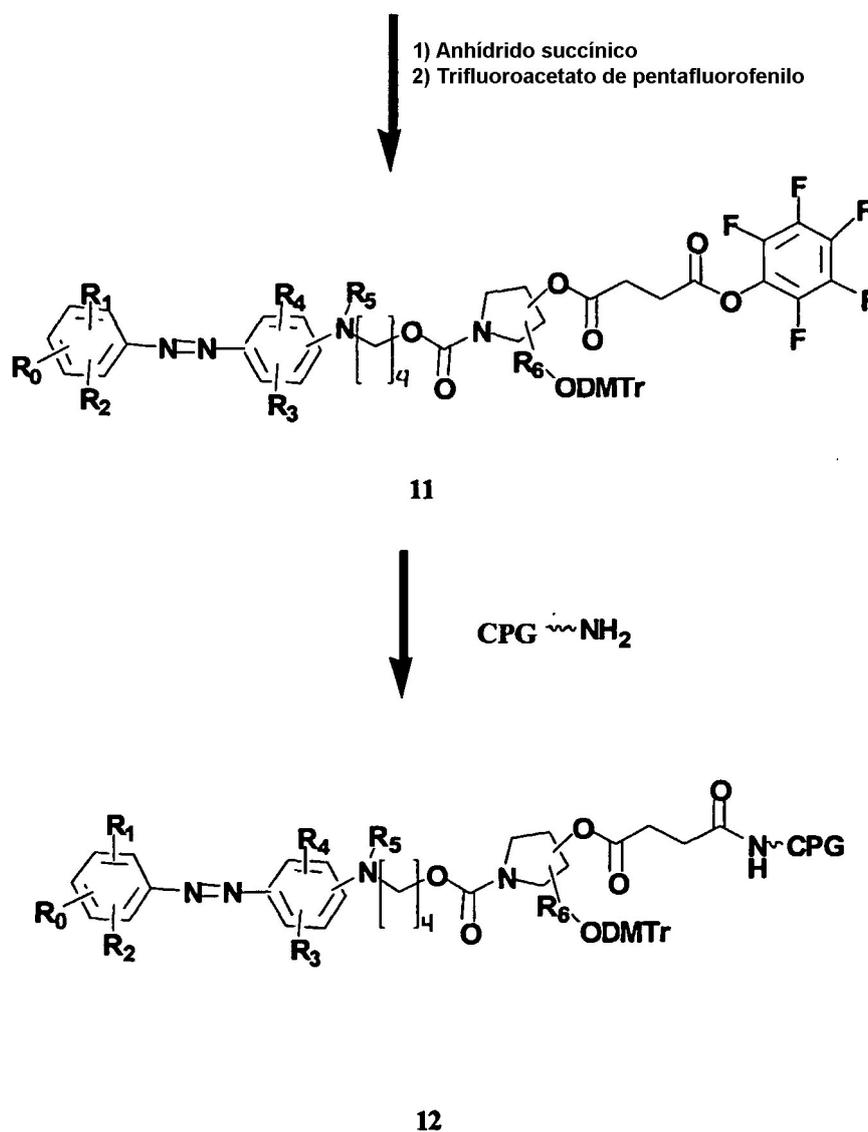
Aún en otro ejemplo, usando las reacciones se descritas en el **esquema de reacción 2**, comenzando con un 4-(fenyldiazenil)fenilamina sustituido (compuesto **6**) y usando un reactivo trifuncional no cíclico (que tiene un grupo amino y dos funciones hidroxilo), en lugar del pirrolidindiol mostrado en el **esquema 2**, se sintetiza la fosoramidita protegida con dimetoxitritilo de **fórmula 3**, en la que q, R₀, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se definen como antes y t y v son independientemente de 1 a 20.



Fórmula 3

- 10 Desactivadores unidos al soporte sólido a través (o de forma similar) de un enlazador protegido, adecuado para la síntesis de ODN

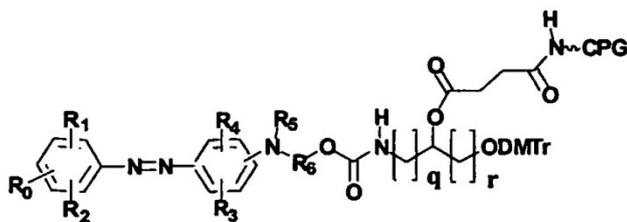
Una segunda clase de compuestos o reactivos adecuados para introducir las moléculas desactivadoras en los ODN constituye una composición que tiene un soporte sólido del tipo usado para la síntesis de ODN (por ejemplo, de vidrio de poro controlado (CPG)), y un enlazador que une el desactivador al soporte sólido. El enlazador tiene una función hidroxilo que está protegida, normalmente por un grupo dimetoxitritilo que se retira durante la síntesis cuando se une el primer nucleótido al enlazador. De manera general, los mismos intermedios de desactivador/enlazador descritos anteriormente en el **esquema de reacción 1** también se pueden usar para preparar estos reactivos (perlas de CPG) que tienen la estructura ejemplar **12**, mostrada en el **esquema de reacción 3**.



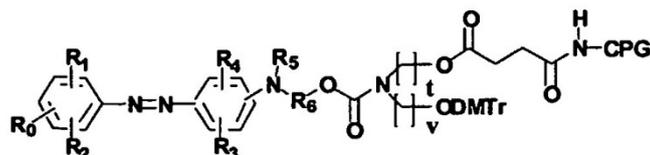
ESQUEMA DE REACCIÓN 3

De acuerdo con el este esquema, el grupo hidroxilo secundario del intermedio **4** (mostrado en el **esquema 1**) se hace reaccionar con anhídrido succínico y, posteriormente con trifluoroacetato de pentafluorofenilo para proporcionar el éster activo **11**. Después, se hace reaccionar el éster activo **11** con el grupo amino libre unido al soporte sólido (perla de CPG) para proporcionar el soporte sólido modificado **12**. Considerando que el soporte sólido modificado ejemplar **12** incluye el "enlazador trifuncional" derivado de pirrolidin-diol, se entenderá fácilmente por los expertos en la técnica que se pueden preparar sustancialmente soportes sólidos modificados análogos que incluyen otros enlazadores y estructuras relacionadas, tales como los enlazadores mostrados en las **fórmulas 1, 2 y 3** de acuerdo con el **esquema de reacción 3**, dando como resultado composiciones de soporte sólido modificado que incluyen el resto desactivador, como las mostradas en la **fórmula 4** y la **fórmula 5**.

Las composiciones de soporte sólido modificado, incluyendo el resto desactivador de estructura **12** y de **fórmula 4** y **5** se usan para preparar conjugados de 3'-desactivador, permitiendo la introducción de un fluoróforo en el extremo 5' con la fosoramidita apropiada, o post-sintéticamente con un fluoróforo que contiene un grupo reactivo. En el **esquema de reacción 3** y en la **fórmula 4** y la **fórmula 5**, los símbolos se definen como antes. Debe entenderse que también se pueden preparar otros soportes sólidos (tales como poliestireno) y otros sistemas enlazadores escindibles (además del enlazador de succinato mostrado) de acuerdo con estas enseñanzas genéricas, y por lo tanto, también están dentro del alcance de la invención.



Fórmula 4



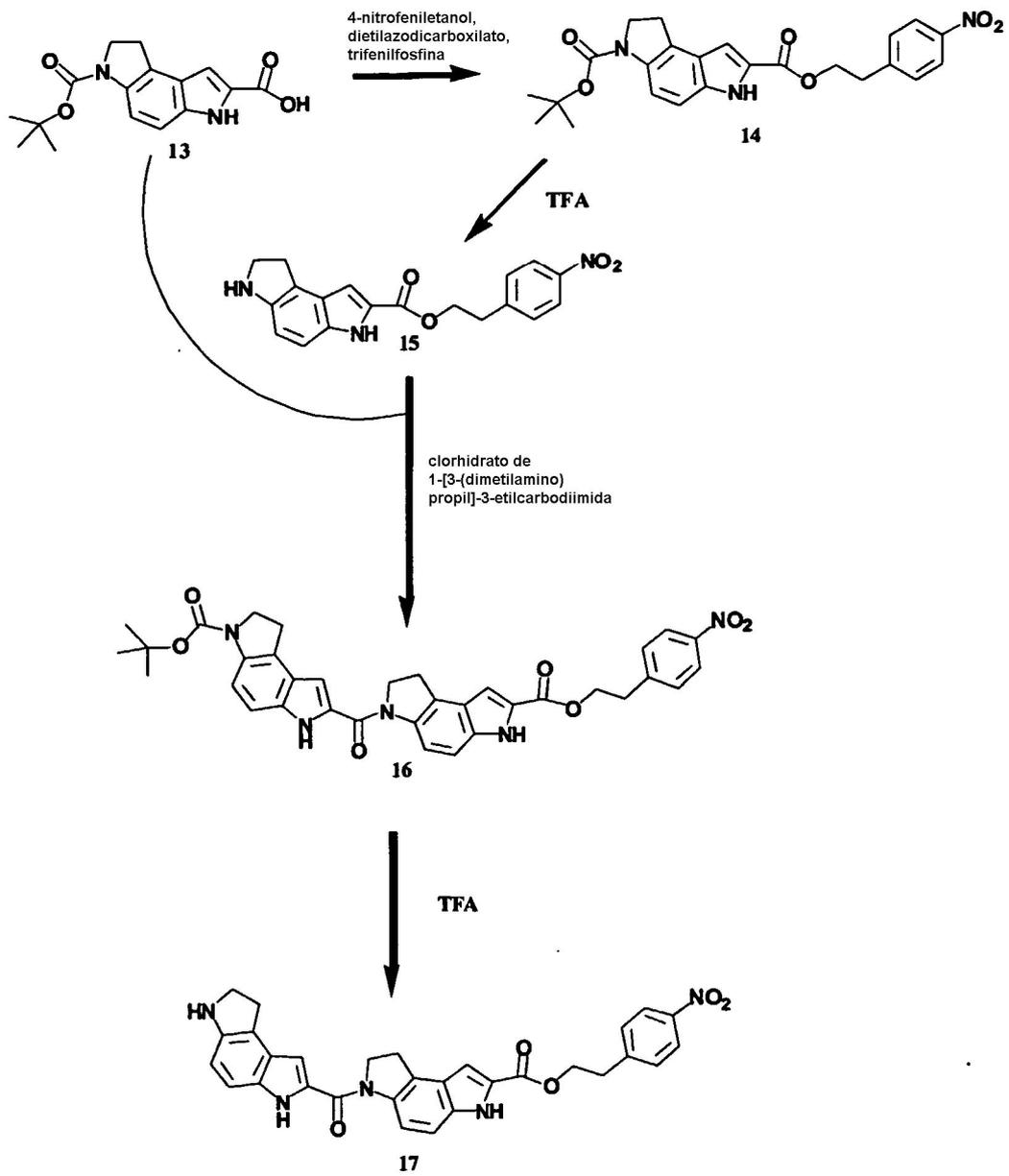
Fórmula 5

Reactivos desactivadores de ligandos del surco menor para síntesis de oligonucleótidos

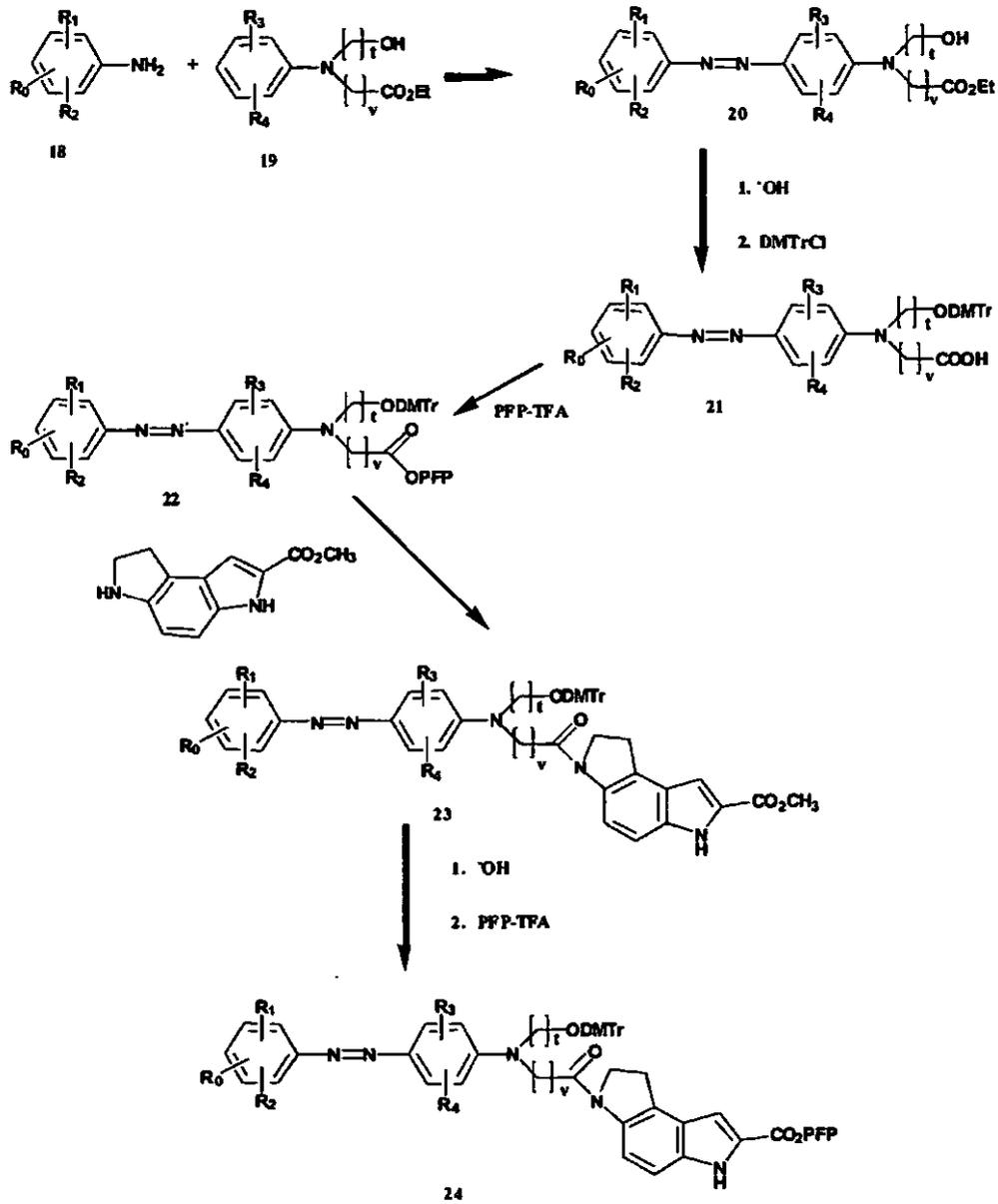
En una realización, se une un ligando del surco menor (MGB) al vidrio de poro controlado (CPG) a través de un enlazador escindible. Un resto desactivador, basado en la estructura de 4-(fenildiazenil)fenilamina, se une a través de una molécula enlazadora al MGB. La molécula enlazadora también contiene un grupo hidroxilo bloqueado con el grupo de bloqueo DMTr (o similar). Después de retirar el grupo DMTr, se sintetiza un oligonucleótido en un sintetizador de oligonucleótidos automatizado por unión en etapas de unidades de nucleótidos al grupo hidroxilo. Se introduce un fluoróforo en el extremo 5' con la fosoramidita apropiada, o post-sintéticamente con un fluoróforo que contiene un grupo reactivo, para proporcionar un ODN que tiene unido el resto fluorescente (LF), el desactivador (Q) y el MGB (FL-ODN-Q-MGB). A este respecto, cabe señalar que la síntesis de MGB y su unión a ODN es muy conocida (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N.º 5.801.155, los documentos 09/539.097 y 09/141.764).

En una realización preferida, el MGB es ácido 3-[[3-(pirrolo[4,5-e]indolin-7-ilcarbonyl)pirrolo[4,5-e]indolin-7-il]carbonyl]pirrolo[3,2-e]indolin-7-carboxílico (DPI₃). La síntesis del "agregado" unido covalentemente FL-ODN-Q-DPI₃ requiere cinco fases, descritas a continuación. La primera fase, descrita en el **esquema de reacción 4**, es la síntesis de un intermedio, 3-(pirrolo[4,5-e]indolin-7-carbonyl)pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de 2-(4-nitrofenil)etilo (DPI₂-NPC) **17**. La segunda fase, descrita en el **esquema de reacción 5**, es la síntesis de Q-DMTr-DPI-CO₂PFP **24** en la que se acopla un desactivador a través de un enlazador a una unidad de ácido pirrolo[3,2-e]indolin-7-carboxílico (DPI). Aquí, y en los esquemas de reacción, PFP representa el grupo pentafluorofenilo o pentafluorofeniloxi, según lo requiera el contexto. En la tercera fase, mostrada en el **esquema de reacción 6**, se sintetiza DMTr-Q-DPI₃-PFP **25a** a partir de **17** y **24**. En la cuarta fase, **25a** se acopla a CPG para proporcionar un DMTr-Q-DPI₃-CPG **29** y en la quinta fase, se usa **29** en un sintetizador de oligonucleótido automatizado para unir por etapas unidades de nucleótidos y proporcionar, después de retirar del CPG, el producto FL-5'-ODN-3'-Q-DPI₃ **30**.

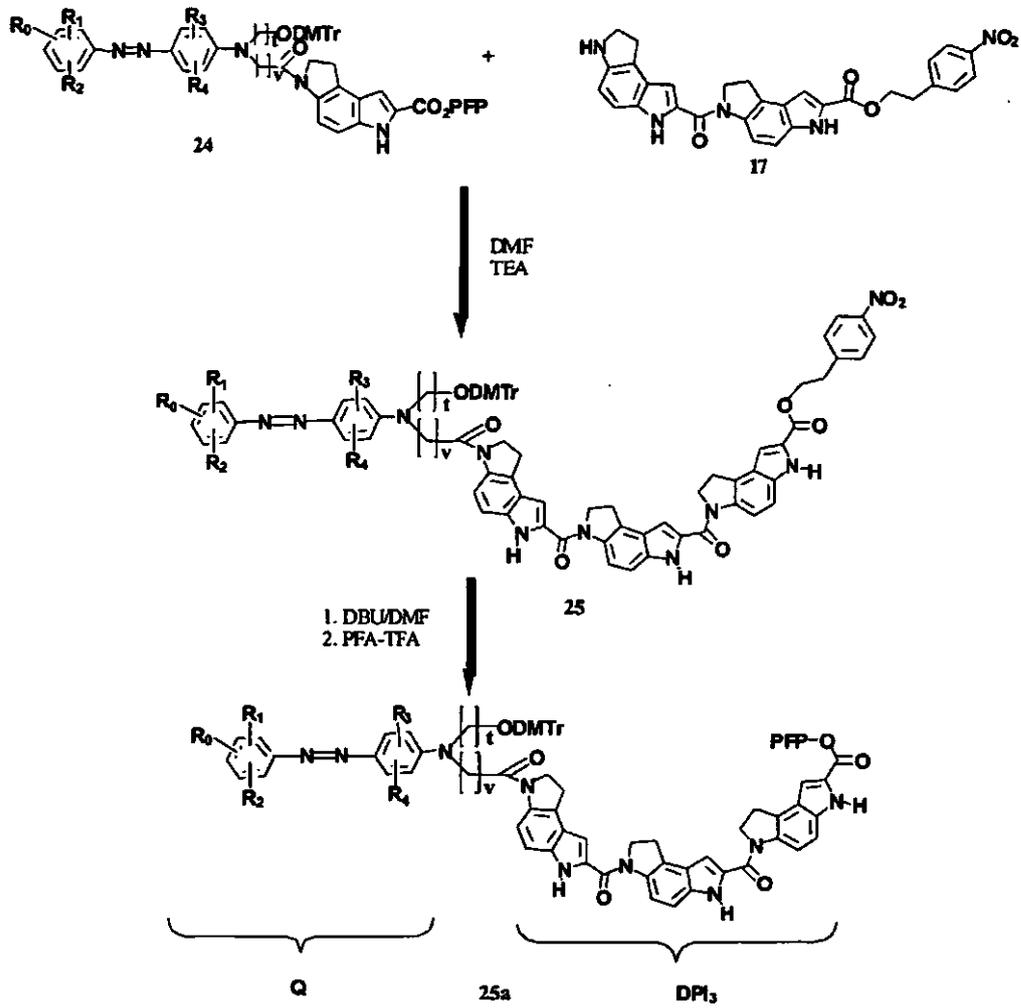
Las fases cuarta y quinta de este procedimiento sintético se muestran en el **esquema de reacción 7**. Las condiciones experimentales para esta secuencia (fases de 1 a 5) se describen a continuación.



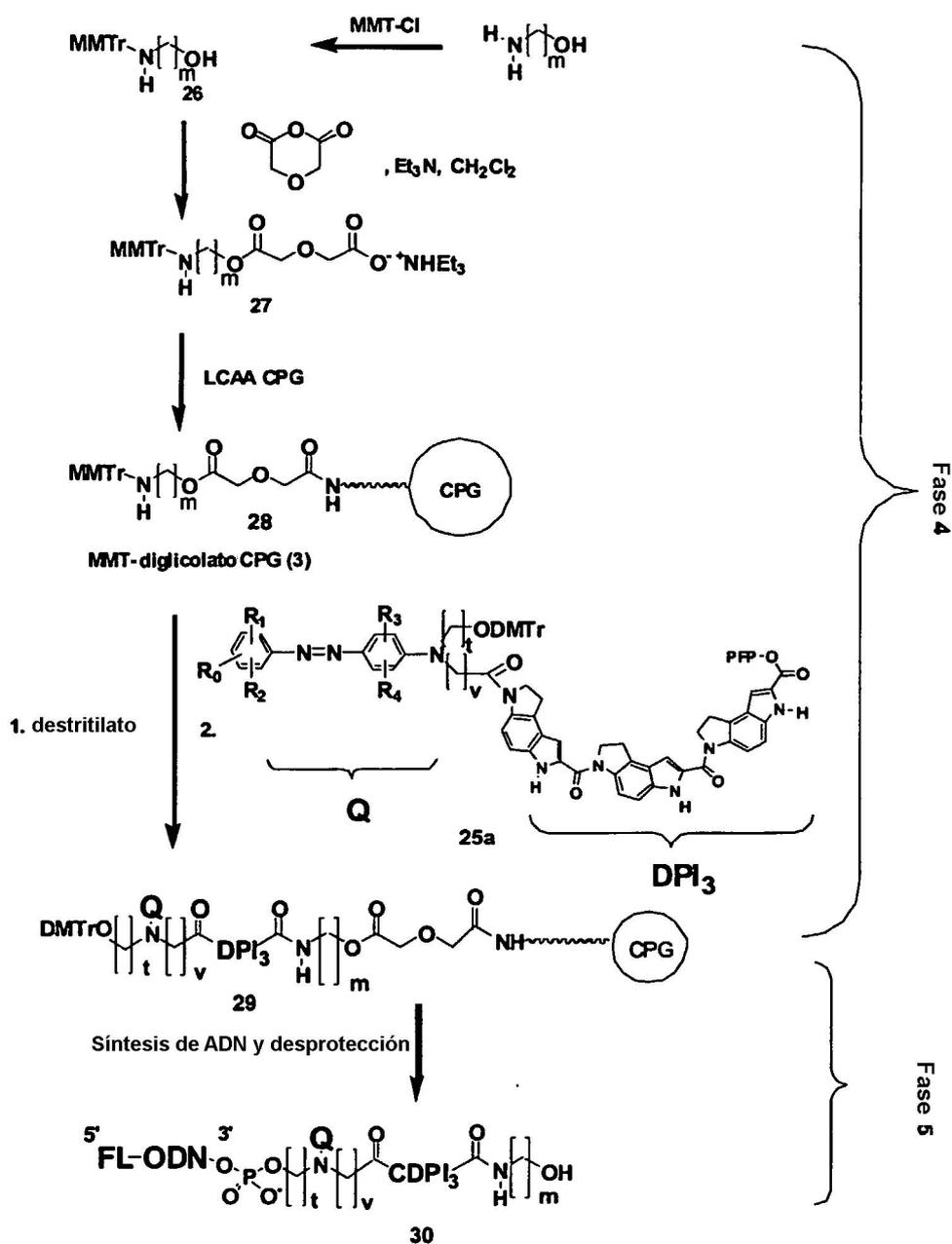
ESQUEMA DE REACCIÓN 4



ESQUEMA DE REACCIÓN 5



ESQUEMA DE REACCIÓN 6



Al describir estas fases o reacciones ahora con más detalle, se sintetiza el resto Q-DPI₃ **25** (fase 3) por la reacción de dos intermedios, **17** y **24**, como se muestra en el **esquema de reacción 6**. El primer intermedio DPI₂-NPE **17** se prepara como se muestra en el **esquema 4**. Se hace reaccionar DPI-tBoc **13** con p-nitrofeniletanol en presencia de azodicarboxilato de dietilo (DEAD) y trifetilfosfina para proporcionar el diéster **14**. En primer lugar, se trató el compuesto **14** con ácido trifluoroacético (TFA) para proporcionar **15** y después se conjugó con **13** en presencia de clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida para dar el éster 4-nitrofenílico de DPI₂ **16** con un buen rendimiento. La reacción de **16** con TFA da el éster p-nitrofenético de de DPI₂ **17**. Se sintetiza el segundo intermedio DPI-Q **24** (fase 2) como se muestra en el **esquema de reacción 5**. Se diazotiza una nitroanilina sustituida **18** (disponible comercialmente o de acuerdo con la literatura química) en presencia de ácido nitroso y se acopla a una anilina sustituida **19** (disponible comercialmente o de acuerdo con la literatura química) para formar la molécula desactivadora intermedia azo **20**. La hidrólisis alcalina del éster etílico **20** seguida del tratamiento con DMTrCl da el DMTr-Q **21**, que se activa posteriormente con trifluoroacetato de pentafluorofenilo para proporcionar **22**. La reacción de **22** con el éster DPI-metílico da el éster metílico de Q-DMTr-DPI **23**. Después, se trata el compuesto **23** con álcali para hidrolizar el éster metílico y después se activa con PFP-TFA para proporcionar el PFP-éster de Q-DMTr-DPI **24**. En el **esquema de reacción 5** los símbolos R₀, de R₁ a R₄, v y t se definen como antes.

En referencia ahora al **esquema de reacción 6**, en el que los símbolos también se definen como antes, en primer

lugar se sintetiza DMTr-Q-DPI₃-PFP **25a** (tercera fase) haciendo reaccionar el desactivador activado **24** (DMTr-Q-DPI PFP) con DPI₂-NPC **17** para proporcionar el éster p-nitrofenilético **25**, que se convierte en el éster activo **25a**, en primer lugar por tratamiento con base tal como 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) para retirar el resto p-nitrofenilético y después por tratamiento con trifluoroacetato de 2,3,4,5,6-pentafluorofenilo (PFP-TFA).

5 La síntesis de DMTr-Q-DPI₃-CPG **29** (fase 4) se muestra en el **esquema de reacción 7**. En esta secuencia sintética, la molécula desactivadora mejorada se une a través de un enlazador de diglicolato escindible a perlas de vidrio de por controlado (CPG). Específicamente, aminopropanol, o un homólogo del mismo, se hace reaccionar sucesivamente con cloruro de monometoxitritilo (MMTr-Cl) y después con anhídrido diglicólico para formar aminopropanol bloqueado con MMT **26** (u homólogo) y MMT-diglicolato **27**, respectivamente. El símbolo **m** se define como un número entero que
10 tiene los valores de 2 a 20. Para el aminopropanol actualmente preferido **m** es 3. Los símbolos restantes en este esquema se definen como antes. La reacción de **27** con CPG de aminoalquilo de cadena larga en presencia de agentes de activación (HOBT y HBTU), proporciona MMT-diglicolato-CPG **28**, que se convierte después de destilación y reacción con **25a** en DMTrO-Q-DPI₃-CPG **29**.

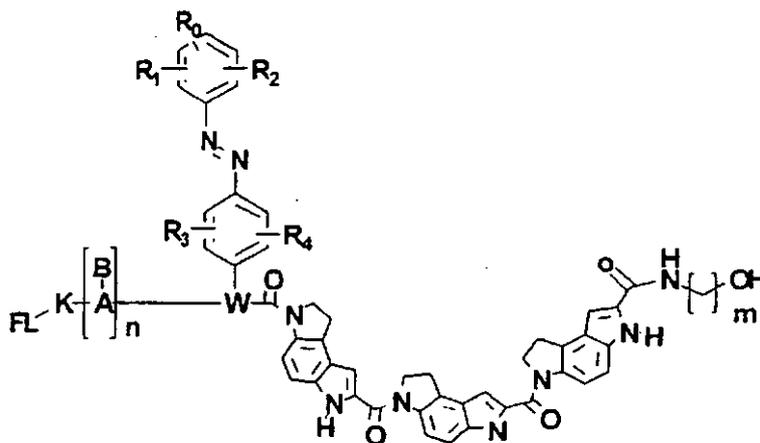
15 En la fase 5, mostrada aún en el **esquema de reacción 7**, se realiza la síntesis de oligonucleótidos con la ayuda de un sintetizador de ADN automatizado, y se une un fluoróforo en el extremo 5' del ODN, usando un fluoróforo fosforamidita o bien un fluoróforo que contiene un grupo reactivo, para proporcionar el conjugado FL-ODN-Q-DPI₃ **30**.

20 El conjugado FL-ODN-Q-DPI₃ **30** también se puede sintetizar por una ruta sintética alternativa que no se ilustra específicamente en los esquemas de reacción. En esta ruta alternativa, el éster DPI₃-metílico (obtenido de acuerdo con Boger et al., J. Org. Chem., 52: 1521-(1987)) se hace reaccionar en primer lugar con el compuesto **22** y después con álcali para dar éster Q-DPI₃-metílico y Q-DPI₃-COOH, respectivamente. Después, se activa el último compuesto con trifluoroacetato de pentafluoroetilo, para proporcionar **25a**, que después se usa en las reacciones mostradas en el **esquema 7**, para proporcionar **30**.

Sondas FL-ODN-Q y FL-ODN-Q-MGB

25 Se muestra una estructura general de una realización preferida de conjugados de FL-ODN-Q-DPI₃ en la **fórmula 6**, en la que:

30 FL es un fluoróforo con longitudes de onda de emisión en el intervalo de aproximadamente 300 a aproximadamente 800 nm y más preferentemente de 400 a 700 nm; K es un enlazador que contiene entre 1 y 30 átomos, que incluyen cualquiera de C, O, N, S, P y H; **[A-B]_n** simboliza un ADN, ARN o APN o cualquier combinación de los mismos, donde **A** es el esqueleto azúcar-fosfato (incluyendo azúcares modificados y fosfatos modificados), **B** es la base heterocíclica y **n** es el número de unidades de nucleótidos. **B** puede ser independientemente cualquiera de las bases purina- y pirimidina-; pirazolo[3,4-d]pirimidina-, pirazolo[3,4-d]pirimidina- 7-sustituida, 7-deazapurinas, 7-deazapurinas 7-sustituidas, purina- y pirimidina- modificadas, y el oligonucleótido o ácido nucleico puede incluir cualquier combinación de estas bases. W es un enlazador de longitud de 0 a aproximadamente 30 átomos, seleccionados del grupo que consiste en C, O, N, S, P y H, además, W es una estructura de cadena alifática ramificada sustituida o de anillo sustituido o una estructura alifática y de anillo combinada; R₀, R₁, R₂, R₃ y R₄ son como se describe previamente y m = 1 a 20.



Fórmula 6

40 Las síntesis de quimeras de APN y APN/ADN se conocen en la técnica y de manera general se pueden realizar de acuerdo con las publicaciones Uhlmann et al., Angew. Chem. Iter. Ed., 37:2796-2823 (1998); Mayfield et al., Anal. Biochem., 401-404 (1998).

Otra realización más preferida dentro del alcance de la **fórmula 6** es una en la que W es $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(-)(\text{CH}_2)_3-$; $\text{R}_0=\text{NO}_2$; $\text{R}_1=-\text{Cl}$; $\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{H}$; K es un enlazador de 6 carbonos y $m = 3$.

5 Las sondas de conjugado de la presente invención que contienen un par indicador-desactivador fluorescente se usan, de manera general, junto con la amplificación de polinucleótidos diana, frecuentemente en procedimientos que utilizan PCR, como se describe, por ejemplo, por Holland et al. Proc. Acad. Sci., 88: 7276-7280(1991) y Wittwer et al., Biotechniques, 22: 176-181 (1997). El sitio de unión de la sonda de conjugado se sitúa entre los cebadores de PCR usados para amplificar el polinucleótido diana.

10 El uso de las sondas de oligonucleótidos de conjugado de acuerdo con la presente invención para la detección de secuencias de oligonucleótidos diana proporciona varias ventajas sobre los grupos desactivadores indicadores de la técnica anterior y combinaciones. Por ejemplo, los desactivadores, incluyendo la estructura 4-[(4-nitrofenil)diazinil]fenilamina de acuerdo con la presente invención, dieron proporciones señal-ruido mayores (S/N) en sondas en las que FAM o bien TAMRA sirven como indicadores que el dabcilo como desactivador. Además, los desactivadores de acuerdo con la invención muestran un intervalo de absorbancia más amplio que para dabcilo, permitiendo la desactivación eficaz de un amplio rango de fluoróforos. Además, en conjugados MGB-oligonucleótido se han mejorado las características de hibridación, un desactivador mejorado mostró un incremento de aproximadamente 30 veces en la proporción S/N con TAMRA en comparación con una sonda estándar (no DPI₃) con dabcilo. Los reactivos de la presente invención permiten la introducción del desactivador durante la síntesis de oligonucleótidos automatizada. (Fosforamidita de dabcilo está comercialmente disponible; (Glen Research, Sterling, VA))

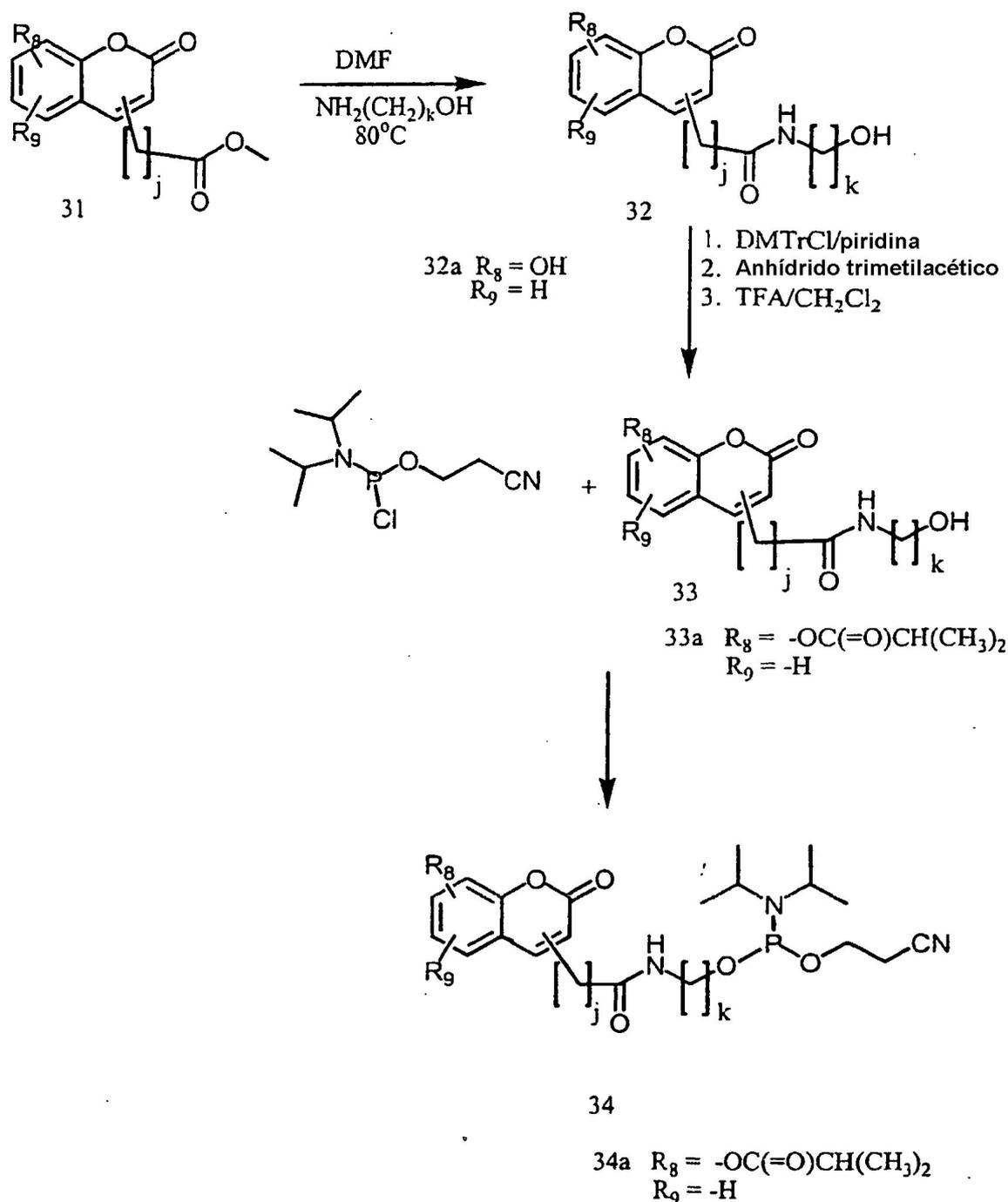
20 Se debe entender que, de manera general, con el propósito de esta invención, un oligonucleótido comprende una pluralidad de unidades de nucleótidos, un extremo 3' y un extremo 5'. El oligonucleótido puede contener una o más bases modificadas distintas de las bases purina y pirimidina normales, así como enlaces internucleótidos modificados que se pueden unir específicamente al polinucleótido diana a través de un emparejamiento de bases de Watson-Crick o similares. Además, los oligonucleótidos pueden incluir los oligonucleótidos de péptidos (APN) o quimeras de APN/ADN, cuya síntesis se conoce y se puede realizar, por ejemplo, de acuerdo con las publicaciones Uhlmann et al., Angew. Chem. Inter. Ed., 37:2796-2823 (1998) Mayfield et al., Anal. Biochem., 401-404 (1998).

25 En general, las sondas de oligonucleótidos de la invención tendrán un número suficiente de enlaces de fosfodiéster adyacentes al extremo 5' para permitir la actividad exonucleasa 5'-3' para permitir la escisión eficaz entre el desactivador y las moléculas de fluoróforo en la sonda. Un número adecuado a este respecto es de aproximadamente entre 1 y 100.

Reactivos de fluoróforo

Reactivos de fosforamidita de cumarina

35 Los colorantes fluorescentes que tienen longitudes de onda de emisión más cortas que el colorante fluorescente verde FAM también tienen utilidad en los ensayos basados en sondas de ADN. Sin embargo, en la técnica anterior estas sondas se han vuelto menos populares ya que la excitación con fuentes de luz láser es menos viable que con longitudes de onda más largas. Para el mejor conocimiento de los presentes inventores, hasta la fecha no ha habido informes de reactivos de síntesis de ADN que contengan colorantes fluorescentes azules. Un ejemplo de un reactivo de fosforamidita de este tipo que contienen un fluoróforo de cumarina preferido y que es adecuado para la síntesis de ADN, se muestra en el **esquema de reacción 8**, como compuesto **34**. En el reactivo de fosforamidita **34**, R_8 y R_9 son independientemente H, halógeno, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ o $-\text{CN}$; $-\text{OR}_{\text{nn}}$, $-\text{SR}_{\text{nn}}$, $-\text{NHR}_{\text{nn}}$, $-\text{N}[\text{R}_{\text{nn}}]_2$ donde R_{nn} es independientemente H, un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligómero y que se puede retirar bajo condiciones ácidas o alcalinas; o un grupo que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, j y k son independientemente de 1 a 10. Como se puede ver, el reactivo **34** incluye un cromóforo de cumarina unido covalentemente que emite luz a 458 nm. Las sondas de ADN que contiene este cromóforo de cumarina se prepararon y dieron las propiedades de emisión fluorescente deseadas.

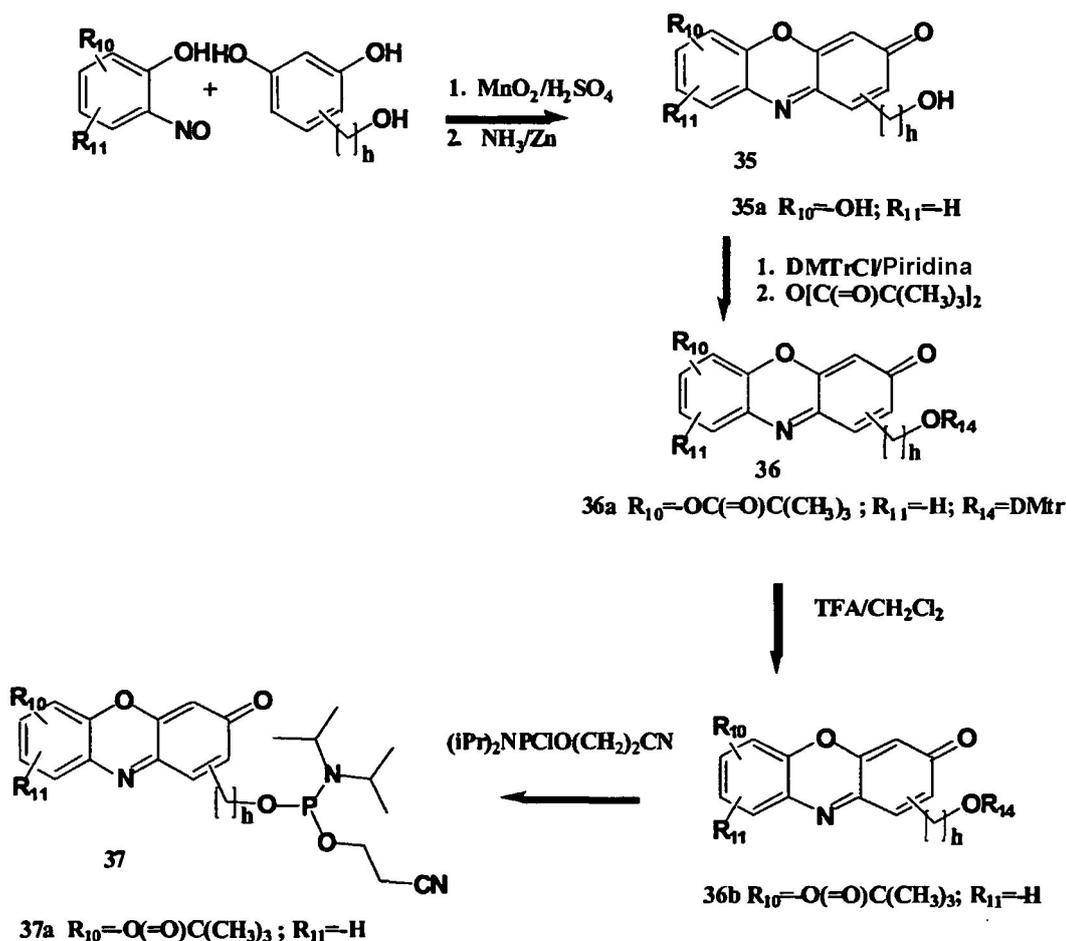


ESQUEMA DE REACCIÓN 8

En referencia ahora al **esquema 8** en términos generales, y también en un ejemplo que proporciona el reactivo de fosforamidita específico **34a**, se obtiene un éster metílico de (2-oxo-2H-cromen-4-il)-alquilcarboxilo sustituido con hidroxilo (**31**) de acuerdo con la publicación Baker et al. (J. Chem. Soc.; 170, 173 (1950)). El compuesto **31** se convierte en el derivado de alcohol **32** (específicamente a **32a** donde R_8 es -OH y R_9 es -H) por reacción con un aminoalcohol a 80 °C. La reacción de **32**, en primer lugar con DMTrCl y después con anhídrido trimetilacético seguido por la retirada del grupo de bloqueo DMTr, da un derivado pivalato **33**, en el ejemplo específico **33a** donde R_8 es -OC(=O)CH(CH₃)₂ y R_9 es -H. La reacción de **33** con diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetil da el reactivo **34** (específicamente **34a** donde R_8 es -OC(=O)CH(CH₃)₂, R_9 es -H). Se usa el reactivo **34** para incorporar el fluoróforo de cumarina en el extremo 5'-terminal de las sondas de ADN. Hay que destacar que la retirada de los grupos protectores durante la síntesis de oligonucleótidos automatizada avanzó bien, dando como resultado rendimientos altos. Los símbolos j y k en el esquema **8** se definen como de 0 a 20 y de 1 a 20, respectivamente.

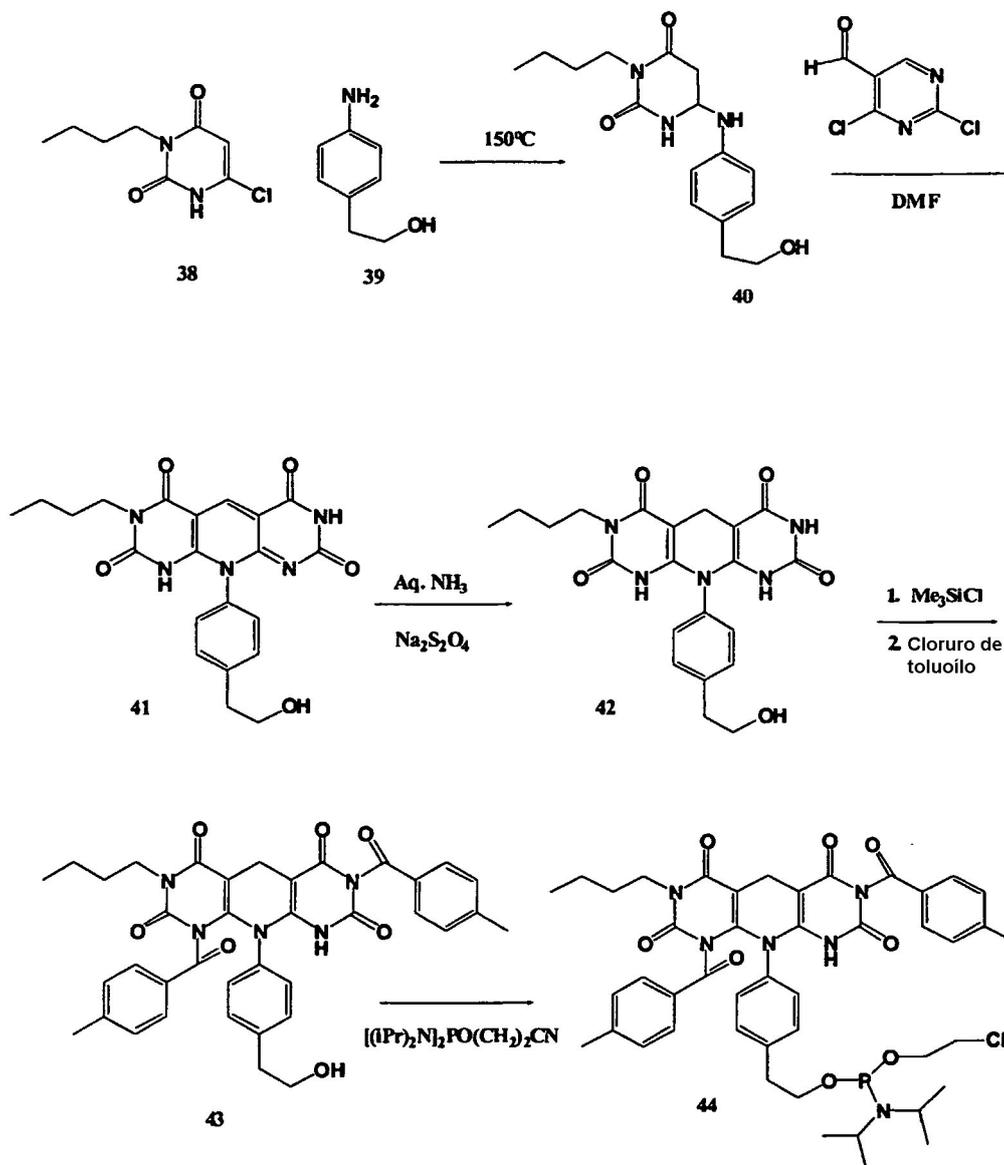
Fosforamidita de resorufina

Otra nueva clase de reactivos de síntesis de ADN se basan en el cromóforo 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona presente en el compuesto original (resorufina) y tienen una longitud de onda de emisión (595 nm) que se distingue fácilmente de la emisión FAM. De acuerdo con la invención, se sintetiza el cromóforo de tal manera que incorpore una estructura enlazadora para una funcionalización adicional a los reactivos de fosoramidita deseados. La preparación de ejemplos preferidos de estos reactivos **37** adecuados para la síntesis de ADN, se muestra en el **esquema de reacción 9**. De manera general, en el reactivo **37**, R_{10} y R_{11} son independientemente H, $-OR_{12}$, $-NHR_{13}$, halógeno, $-O(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$, $-NO_2$, $-SO_3$, $-C(=O)NH_2$, $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$, O-alquilo u O-alcanoilo donde el grupo alquilo o alcanoilo tiene de 1 a 10 átomos de carbono, o $-CN$ donde $n = 0$ a 5; $h = 1$ a 20; y R_{12} y R_{13} son grupos de bloqueo compatibles con la síntesis de ODN. R_{14} en el esquema es H o DMTr.



ESQUEMA DE REACCIÓN 9

Como se muestra en el ejemplo del **esquema 9**, en términos generales, y también para un ejemplo específico, la reacción del derivado de nitrosorecorcinol (disponible comercialmente o sintetizado de acuerdo con el estado de la técnica) y de 4-(3-hidroxipropil)benceno-1,3-diol (obtenido de acuerdo con Forchiassin et al. J..Heterocyc. Chem., 1983, 493-494) y MnO_2 proporcionó un derivado de resazurina contaminado con algo de derivado de resorufina. Esta mezcla se trató con NH_4OH y polvo de Zn para proporcionar el derivado de resorufina **35** (específicamente **35a** donde R_{10} es OH , y R_{11} es H) contaminado con 2,3,4-trihidro-2H-pirano[3,2-b]fenoxazin-9-ona como impureza principal. Se trató la última mezcla con $DMTrCl$ y piridina, y después con anhídrido de ácido trimetilacético. Después, se sometió a purificación el producto **36** por cromatografía en gel de sílice para dar el derivado de protegido de $DMTr$ de **36a** (donde R_{10} es $-OC(=O)C(CH_3)_3$, R_{11} es H y R_{14} es $DMTr$). El derivado de $DMTr$ puro se trató con TFA/CH_2Cl_2 para proporcionar un único producto **36b** después de la cromatografía en gel de sílice. El tratamiento de **36** (donde R_{10} es $-OC(=O)C(CH_3)_3$, R_{11} y R_{14} son H) con diisopropilclorofosoramidita de 2-cianoetilo dio el reactivo de fosoramidita deseado **37** (específicamente **37a**) que se utiliza para introducir el fluoróforo en un ODN deseado.



ESQUEMA DE REACCIÓN 10

Fosforamidita de PPT

La síntesis de un reactivo de fosforamidita que incorpora un colorante fluorescente púrpura PPT **44** que tiene longitudes de onda de excitación y de emisión de 384 y 400 nm, respectivamente, se muestra en el **esquema de reacción 10** y en el **ejemplo X**. De acuerdo con este esquema, se hace reaccionar 6-cloro-3-n-butiluracilo **38** y 2-(4-aminofenil)etanol **39** para proporcionar el derivado de uracilo sustituido con fenilo **40**. Los compuestos **38** y **39** se pueden obtener de acuerdo con el estado de la técnica y la literatura química. La reacción de **40** con 5-formil-4,6-dicloro-pirimidina en DMF a temperatura ambiente proporciona el heterociclo tricíclico **41**. La reducción de **41** en $\text{NH}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ proporciona **42**, que posteriormente se bloquea como el derivado de toluoilo **43**. En la etapa final, se hace reaccionar **43** con diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo para proporcionar el reactivo fosforamidita de cianoetilo PPT **44** que se usa para introducir el fluoróforo de PPT en un ODN.

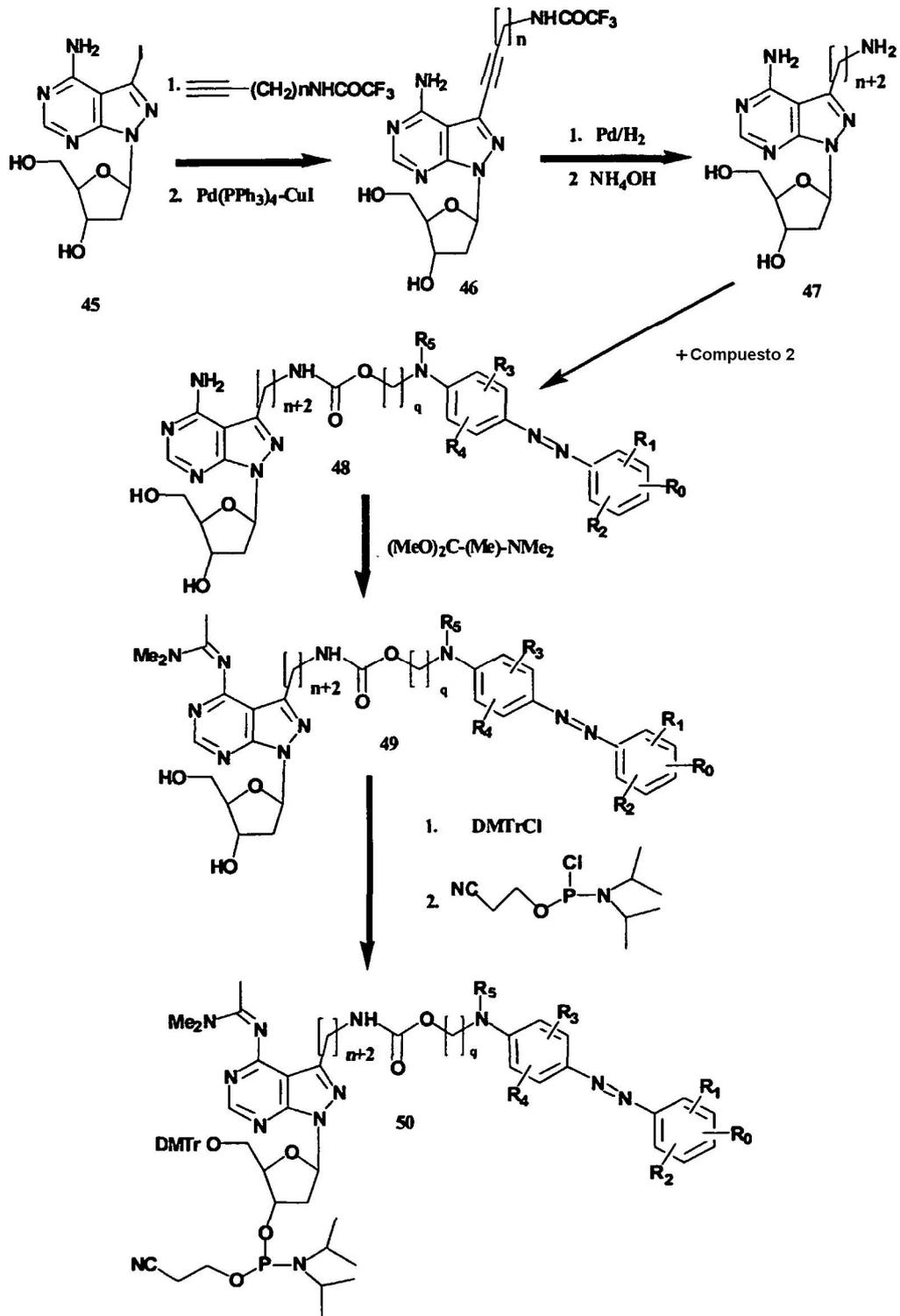
Aún en otras realizaciones, los fluoróforos cumarina, resorufina y PPT sustituidos con un grupo alquilcarboxilo sirven como materiales de partida para la síntesis de los reactivos de fosforamidita correspondientes. Los fluoróforos cumarina, resorufina y PPT sustituidos con un grupo alquilcarboxilo están comercialmente disponibles o bien se pueden sintetizar de acuerdo con el estado de la técnica. Estos compuestos se activan en el grupo alquilcarboxilo como los ésteres pentafluorofenílicos. Los ésteres activados se usan para unir estos colorantes a oligonucleótidos modificados con amina.

De forma similar, aún en otras realizaciones, se obtienen fluoróforos o desactivadores marcados con dUTP, por

ejemplo, de acuerdo con las enseñanzas de la patente de los Estados Unidos N.º 5.328.824). Además, la fosforamidita de los fluoróforos o desactivadores marcados con pirazolo[3,4-d]pirimida 7-marcados se sintetizan de acuerdo con las enseñanzas del documento US 5.824.796 y se puede usar para marcar oligonucleótidos.

Reactivos basados en colorante rojo PPG y otros reactivos de fosforamidita para la síntesis de oligonucleótidos.

- 5 En otra realización, el desactivador de colorante rojo 13 se une en la posición 3 de pirazolo[5,4-d]pirimidinas (PP) o en la posición 5 de una pirimidina. En referencia ahora al **esquema 11** en sí, el material de partida es 5-[(4-amino-3-yodopirazolo[5,4-d]pirimidinil)-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol **45** que está disponible de acuerdo con la publicación Seela et al. J. Chem. Soc. Perkin. Trans., 1 (1999, 479-488). En primer lugar, se hace reaccionar el compuesto **45** con N-propinil-2,2,2-trifluoroacetato (o un homólogo del mismo que en el esquema **n** es de 1 a 10) y
- 10 después con Pd(PPh₃)₄-CuI para proporcionar el derivado de alquino **46**. La reducción con Pd/H₂ de **46** seguida del tratamiento con hidróxido de amonio da el derivado de aminoalquilo **47** (PPA'). La reacción de PPA' con el compuesto **2** (disponible tal como se da a conocer junto con el **esquema de reacción 1**) proporcionó PPA'-Rojo 13 sustituido **48**. La reacción de **48** con (1,1-dimetoxietil)dimetilamina bloquea el grupo amino de la pirazolo[5,4-d]pirimidina para proporcionar **49**. En primer lugar se hace reaccionar **49** con DMTrCl y después con diisopropilclorofosforamidita de
- 15 2-cianoetilo para dar fosforamidita de PPA'-Rojo 13 bloqueada con DMTrCl **50**.



ESQUEMA DE REACCIÓN 11

5 Aún en otras realizaciones que comienzan con el desoxirribósido de 6-amino-5-hidroxi-3-yodo-pirazolo [5,4-d]pirimidin-4-ona (3-yodo-PPG) el reactivo de fosoramidita que contiene el colorante Rojo 13 unido covalentemente al resto 3-yodo-PPG se sintetiza con reacciones análogas a las mostradas en el **esquema de reacción 11**. De modo similar, comenzando con 5-aminopropil-desoxiuridina, se sintetiza el reactivo de fosoramidita que contiene el colorante Rojo 13 unido covalentemente a 5-aminopropil-desoxiuridina.

Quedará claro para los expertos en la técnica a la luz de la divulgación anterior, que las fosoramiditas basadas en pirazolopirimidina-Rojo-13 o uridina-Rojo 13 dentro del alcance de esta invención pueden contener diversos

enlazadores entre las bases de pirazolopirimidina y los desactivadores de Rojo 13, en la medida en que estos enlazadores estén disponibles de acuerdo con el estado de la técnica y esta divulgación.

Ejemplos

5 Se pueden usar los procedimientos y las composiciones de la presente invención con muchas técnicas, tanto actualmente en uso como en desarrollo, en las que está implicada la hibridación de un oligonucleótido con otro ácido nucleico. Éstas incluyen, pero no se limitan a, técnicas en las que la hibridación de un oligonucleótido con un ácido nucleico diana es el punto final; técnicas en las que la hibridación de uno o más oligonucleótidos con un ácido nucleico diana precede una o más etapas de elongación mediadas con polimerasa que usan el oligonucleótido como un cebador y el ácido nucleico diana como plantilla; técnicas en las que la hibridación de un oligonucleótido con un ácido nucleico diana se usa para bloquear la ampliación de otro cebador; técnicas en las que la hibridación de un oligonucleótido con un ácido nucleico diana está seguida de hidrólisis del oligonucleótido para liberar un marcador unido; y técnicas en las que se hibridan dos o más oligonucleótidos con un ácido nucleico diana y se miden las interacciones entre múltiples oligonucleótidos. Las condiciones de hibridación de oligonucleótidos, y los factores que influyen en el grado y la especificidad de la hibridación, tales como temperatura, fuerza iónica y composición de disolvente, se conocen bien por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sambrook et al., supra*; *Ausubel et al., supra*; Innis et al. (eds.) *PCR Protocols*, Academic Press, San Diego, 1990; Hames et al. (eds.) *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1985; y van Ness et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:5143-5151.

Sondas de hibridación

20 En una aplicación de la presente invención, se usan uno o más conjugados de FL-oligonucleótido como sonda(s) para identificar un ácido nucleico diana sometiendo a ensayo la hibridación entre la(s) sonda(s) y el ácido nucleico diana. Se puede marcar una sonda con cualquier marcador detectable de la presente invención, o puede tener la capacidad de marcarse antes o bien después de la hibridación, tal como conteniendo un grupo reactivo que se puede asociar con un marcador o que se puede hibridar con una sonda marcada secundaria, antes o bien después de la hibridación con la diana. Como fundamento de esta técnica, cabe destacar que las condiciones de hibridación de sondas de ácidos nucleicos se conocen bien por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); *Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Hames et al. (eds.) *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1985; y van Ness et al. *Nucleic Acids Res.* 19:5143-5151(1991).

35 Se puede ensayar la hibridación (es decir, se pueden identificar los ácidos nucleicos hibridados) distinguiendo la sonda hibridada de la sonda libre por uno de varios procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Éstos incluyen, pero no se limitan a, unión de ácido nucleico diana a un soporte sólido, directa o bien indirectamente (por hibridación con una segunda sonda unida a soporte o por interacción entre ligandos unidos a superficie y conjugados con sonda) seguido por hibridación directa o indirecta con sonda, y lavado para retirar la sonda no hibridada; determinación de la resistencia de nucleasa; determinación de densidad de flotación; procedimientos de afinidad específicos para dúplex de ácidos nucleicos (por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita); interacciones entre múltiples sondas hibridadas al mismo ácido nucleico diana; y *otras técnicas conocidas*. Véase, por ejemplo, *Falkow et al.*, patente de los Estados Unidos N.º 4.358.535; *Urdea et al.*, Patente de los Estados Unidos N.º 4.868.105 y 5.124.246; *Freifelder, Physical Biochemistry*, segunda edición, Freeman & Co., San Francisco, 1982; *Sambrook, et al., supra*; *Ausubel et al., supra*; y *Hames et al., supra*.

Ensayos utilizando sondas marcadas, sondas hidrolizables y cebadores marcados

45 Las aplicaciones adicionales para conjugados de oligonucleótidos que contienen un fluoróforo y un desactivador se encuentran en ensayos en los que se hibrida una sonda marcada a una diana y/o un producto de extensión de una diana, y se efectúa un cambio en el estado físico del marcador como consecuencia de la hibridación. Una sonda es una molécula de ácido nucleico que se puede hibridar con una secuencia diana en una segunda molécula de ácido nucleico. A modo de ejemplo, un ensayo de este tipo, el ensayo de sonda hidrolizable, aprovecha el hecho de que muchas enzimas de polimerización, tales como ADN polimerasas, poseen actividades exonucleolíticas 5'-3' intrínsecas. Por consiguiente, si una sonda se hibrida a una secuencia que puede servir como plantilla para la polimerización (por ejemplo, si la sonda se hibrida a una región de ADN situado entre dos cebadores de amplificación, durante el transcurso de una reacción de amplificación), una enzima de polimerización que ha iniciado la polimerización en un cebador de amplificación corriente arriba puede digerir de forma exonucleolítica la sonda. Cualquier marcador unido a una sonda de este tipo se liberará, si la sonda se hibrida a su diana y si se produce la amplificación en toda la región a la cual se hibrida la sonda. El marcador liberado se separa de la sonda marcada y se detecta por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, dependiendo de la naturaleza del marcador. Por ejemplo, los fragmentos marcados radioactivamente se pueden separar por cromatografía en capa fina y detectarse por autorradiografía; mientras que los fragmentos marcados de forma fluorescente se pueden detectar por irradiación en las longitudes de onda de excitación apropiadas con la observación en las longitudes de onda de emisión apropiadas. Esta técnica básica se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N.º 5.210.015.

En una variación de esta técnica, una sonda contiene tanto un marcador fluorescente como un agente de desactivación, que desactiva la emisión de fluorescencia del marcador fluorescente. En este caso, el marcador fluorescente no es detectable hasta que se haya alterado su relación espacial con el agente de desactivación, por ejemplo, por liberación exonucleolítica del marcador fluorescente de la sonda. Por tanto, antes de la hibridación con su secuencia diana, la sonda marcada de fluoróforo/desactivador dual no emite fluorescencia. Posteriormente a la hibridación de la sonda marcada de fluoróforo/desactivador con su diana, se vuelve un sustrato para la actividad exonucleolítica de una enzima de polimerización que ha iniciado la polimerización en un cebador corriente arriba. La degradación exonucleolítica de la sonda libera el marcador fluorescente de la sonda, y, por lo tanto, de las proximidades del agente de desactivación, permitiendo la detección de una señal fluorescente después de la irradiación en las longitudes de onda de excitación apropiadas. Este procedimiento tiene la ventaja de que el marcador liberado no se tiene que separar de la sonda intacta. Múltiples enfoques utilizan múltiples sondas, de las que cada una es complementaria de una secuencia diana diferente y lleva un marcador distinguible, permitiendo el ensayo de varias secuencias diana de forma simultánea.

El uso de conjugados de FL-ODN-Q-DPI₃ en este y otros procedimientos relacionados permite aplicar una mayor potencia discriminación, velocidad y sensibilidad a estos ensayos. En particular, la capacidad potenciada de los conjugados MGB-oligonucleótido para permitir la discriminación entre un híbrido perfecto y un híbrido que contiene un emparejamiento inadecuado de bases individuales facilita el uso de ensayos de sondas hidrolizables en la identificación de polimorfismos de nucleótidos individuales y similares, tal como se describe en la publicación del documento WO 995162A2. Los ejemplos 13 y 14 ilustran la utilidad de conjugados de FL-ODN-Q-DPI₃ en este tipo de ensayo. Quedará claro para los expertos en la técnica que las composiciones y los procedimientos, tales como los de la invención, que pueden discriminar emparejamientos inadecuados de nucleótidos individuales también podrán discriminar entre secuencias que tienen emparejamientos inadecuados múltiples con respecto a otras.

Otra realización de la aplicación usa un cebador de auto-sonda con una cola integrada, donde el desactivador/fluoróforo está presente en la horquilla, que puede probar el producto de extensión del cebador y después de la amplificación se hibrida al amplicón de forma que emite fluorescencia. El sondeo de una secuencia diana se puede convertir de este modo en un acontecimiento unimolecular (Whitcombe, D. et al., Nat. Biotech. 17: 804-807 (1999)).

Transferencia de energía de fluorescencia

En otras aplicaciones de las composiciones novedosas de esta invención, los conjugados de oligonucleótidos que contienen un par fluoróforo/desactivador (FL-ODN-Q) se usan en diversas técnicas que implican múltiples sondas con marcado fluorescente. En algunos de estos ensayos se usan cambios en las propiedades de un marcador fluorescente para monitorizar la hibridación. Por ejemplo, se ha usado la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), como indicador de la hibridación de oligonucleótidos. En una realización de esta técnica, se usan dos sondas, conteniendo cada una un marcador fluorescente y una molécula desactivadora respectivamente. El marcador fluorescente es un dador, y el desactivador es un aceptor, en los que las longitudes de onda de emisión del dador solapan las longitudes de onda de absorción del aceptor. Las secuencias de las sondas se seleccionan de modo que se hibridan con regiones adyacentes de un ácido nucleico diana, llevando al dador y al aceptor de fluorescencia muy próximos, si está presente la diana. En presencia de ácido nucleico diana, la irradiación en longitudes de onda correspondientes con las longitudes de onda de absorción del dador de fluorescencia dará como resultado la emisión desde el aceptor de fluorescencia. Estos tipos de ensayos tienen la ventaja de que son ensayos homogéneos, proporcionando una señal positiva sin necesidad de retirar la sonda sin reaccionar. Para más detalles y ejemplos adicionales de estos ensayos que son conocidos *per se* en la técnica, véase, por ejemplo, la publicación de patente Europea 070685; y la publicación Cardullo et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8790-8794. Las aplicaciones adicionales de las composiciones novedosas de la presente invención son en esas técnicas y en otras relacionadas en las que se miden las interacciones entre dos oligonucleótidos diferentes que se hibridan ambos al mismo ácido nucleico diana. La selección de pares de dador de fluorescencia/aceptor de fluorescencia apropiados será evidente para un experto en la técnica, basándose en el principio de que, para un par determinado, las longitudes de onda de emisión del dador de fluorescencia solaparán las longitudes de onda de absorción del aceptor. La capacidad potenciada de conjugados de DPI₃-oligonucleótido para distinguir híbridos perfectos de híbridos que contienen un emparejamiento inadecuado de base única facilita el uso de técnicas basadas en FRET en la identificación de polimorfismos de nucleótidos individuales y similares.

En otra aplicación de las composiciones novedosas de la invención, la fluorescencia del conjugado de FL-ODN-Q se desactiva en su estado natural. Sin embargo, después de la hibridación con la diana prevista, la disposición espacial de los restos de fluoróforo y desactivador se cambia de modo que se produce la fluorescencia. Para esta técnica básica, véase, por ejemplo, Tyagi et al., Nat. Biotech., 16: 49-53 (1998); y la patente de los Estados Unidos N.º 5.876.930.

Debe entenderse que, además de los fluoróforos que se encuentra que son, de acuerdo con la presente invención, especialmente útiles para su uso con los desactivadores de la invención, y los fluoróforos que se incorporan en los ODN de acuerdo con la invención, un experto puede elegir fluoróforos adicionales para su uso en combinación con los desactivadores de la presente invención, basándose en las propiedades ópticas descritas en la literatura, tales como las referencias: Haugland Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, sexta edición, Eugene, OR. p.

235-236. 1996; Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2ª, Academic Press, Nueva York, 1971; Du et al., PhotochemCAD. A Computer-Aided Design and Research Tool in Photochemistry, Photochem. Photobiol. 68, 141-142 (1998). Por lo tanto, el uso de los conjugados de ODN desactivador novedosos en combinación con estos fluoróforos conocidos se considera dentro del alcance de la invención.

- 5 En otra aplicación, el ligando del surco menor, DPI_3 , se acopla a un desactivador en un conjugado de FL-ODN-Q- $CDPI_3$ para mejorar las proporciones señal-ruído (véase la tabla 2). Los desactivadores preferidos son los desactivadores de fórmula 6 y más preferidos son los desactivadores **8-11, 12-16 y 30**.

Los desactivadores adicionales adecuados para su uso en combinación con los fluoróforos novedosos (34, 37 y 44) de la invención incluyen dabcilnitrotiazol, TAMRA, ácido 6-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il]amino)hexanoico, 6-carboxi-X-rodamina (Rox) y QSY-7.

15 Otra aplicación de los pares fluoróforo/desactivador novedosos de la invención es la de incorporar el par en sustratos de enzimas, en los que se desactiva la fluorescencia debido a la proximidad del fluoróforo y del desactivador. Sin embargo, después de que una enzima escinda el sustrato, el fluoróforo y el desactivador se separan y se observa fluorescencia. Un ejemplo de esta técnica se describe a continuación usando la enzima fosfodiesterasa. Quedará claro para los expertos en la técnica que se pueden construir sustratos adecuados que contienen tanto desactivadores como fluoróforos novedosos para enzimas que escinden sustratos.

Matrices de oligonucleótidos

En otra aplicación, los FL-ODN de la presente invención se utilizan en procedimientos que emplean matrices de oligonucleótidos. Ejemplos de esta técnica que se conoce *per se* en la técnica incluyen la secuenciación por hibridación y análisis basados en matrices de expresión de genes. En estos procedimientos, se usa una matriz ordenada de oligonucleótidos de diferentes secuencias conocidas como una plataforma para la hibridación a uno o más polinucleótidos, ácidos nucleicos o poblaciones de ácidos nucleicos de prueba. La determinación de los oligonucleótidos que se hibridan y la alineación de sus secuencias conocidas permite la reconstrucción de la secuencia del polinucleótido de prueba. Para una descripción de estas técnicas véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N.º. 5.492.806; 5.525.464; 5.556.752; y las publicaciones de PCT WO 92/10588 y WO 96/17957. Los materiales de construcción de matrices incluyen, pero no se limitan a, nitrocelulosa, vidrio, obleas de silicio y fibras ópticas.

Consideraciones estructurales

30 Los términos oligonucleótido, polinucleótido y ácido nucleico se usan de forma intercambiable para referirse a polímeros mono o bicatenarios de ADN o ARN (o ambos) incluyendo polímeros que contienen nucleótidos modificados o no naturales, o a cualquier otro tipo de polímero que puede emparejar bases a ADN o ARN de forma estable incluyendo, pero sin limitarse a, ácidos nucleicos peptídicos que se dan a conocer por Nielsen et al. (1991) Science 254:1497-1500; oligómeros de ADN biciclo (Bollí et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24:4660-4667) y estructuras relacionadas. Se pueden unir uno o más restos de MGB y/o uno o más marcadores fluorescentes, y agentes de desactivación en el extremo 5', en el extremo 3' o en una parte interna del oligómero. Un MGB preferido de acuerdo con la invención es DPI_3 y el desactivador preferido es la amida de rojo 13.

En la presente invención se prefieren oligonucleótidos de ADN que sean de hebra simple y tengan una longitud de 100 nucleótidos o menos, más preferentemente 50 nucleótidos o menos, aún más preferentemente 30 nucleótidos o menos y lo más preferentemente 20 nucleótidos o menos con un límite inferior de aproximadamente 5 nucleótidos.

40 Los conjugados de oligonucleótidos que contienen un par fluoróforo/desactivador con o sin un MGB también pueden comprender una o más bases modificadas, además de las bases naturales adenina, citosina, guanina, timina y uracilo. Las bases modificadas se consideran que son las que difieren de las bases naturales por adición o deleción de uno o más grupos funcionales, diferencias en la estructura de anillo heterocíclico (es decir, sustitución de carbono por un heteroátomo, o *vice versa*) y/o unión de una o más estructuras de brazo de enlazador a la base. Los nucleótidos modificados que se pueden incluir en los conjugados de ODN de la invención incluyen 7-deazapurinas y sus derivados y pirazolopirimidinas (descritos en el documento PCT WO 90/14353); y en la solicitud en propiedad conjunta y pendiente de tramitación con la presente solicitud con número de serie 09/054.630.

Los análogos de base preferidos de este tipo incluyen el análogo de guanina 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG o PPG) y el análogo de adenina 4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (ppA o PPA). También es de uso el análogo de xantina 1H-pirazolo[5,4-d]pirimidin-4(5H)-6(7H)-diona (ppX). Estos análogos de bases, cuando están presentes en un oligonucleótido, refuerzan la hibridación y mejoran la discriminación de apareamiento inadecuado. Todas las formas tautómeras de bases naturales, bases modificadas y análogos de bases se pueden incluir en los conjugados de oligonucleótidos de la invención.

De forma similar, pueden estar presentes azúcares modificados o análogos de azúcar en una o más de las subunidades de nucleótidos de un conjugado de oligonucleótido de acuerdo con la invención. Las modificaciones de azúcares incluyen, pero no se limitan a, unión de sustituyentes al átomo de carbono 2', 3' y/o 4' del azúcar, diferentes formas epiméricas del azúcar, diferencias en la configuración α o β del enlace glicosídico, y otros cambios anoméricos.

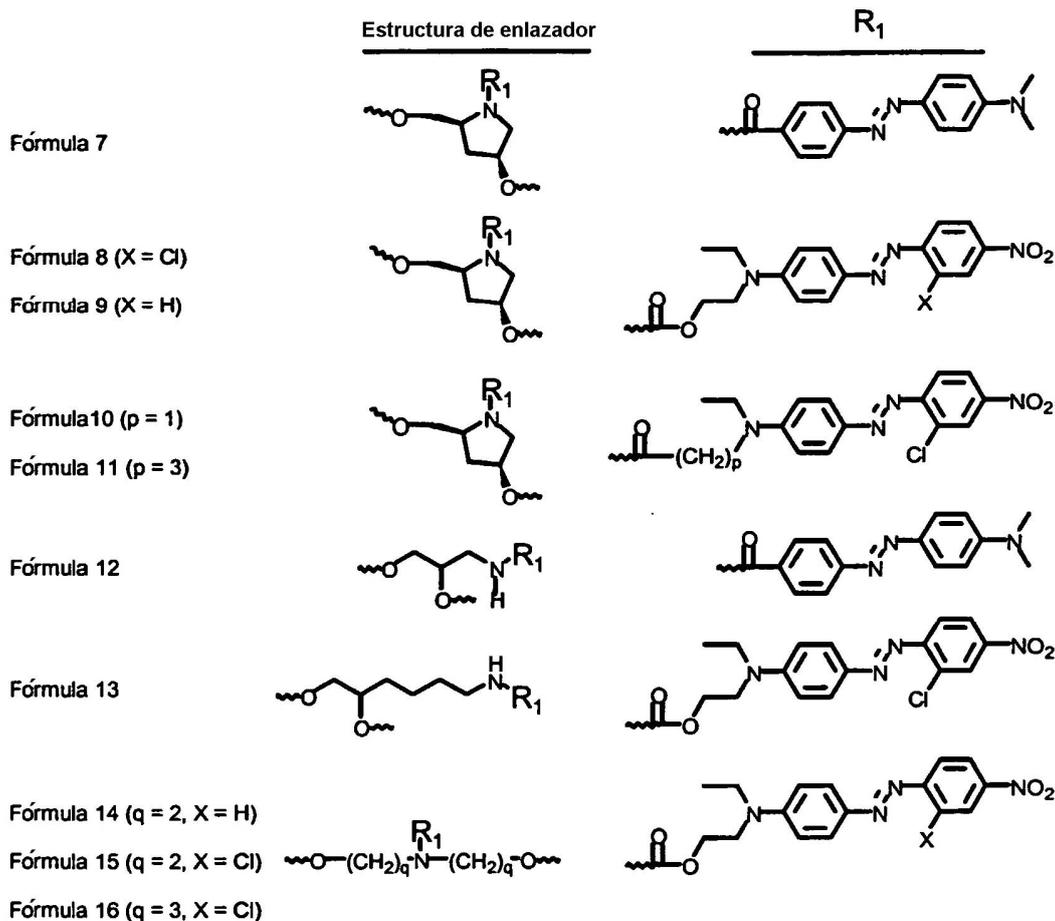
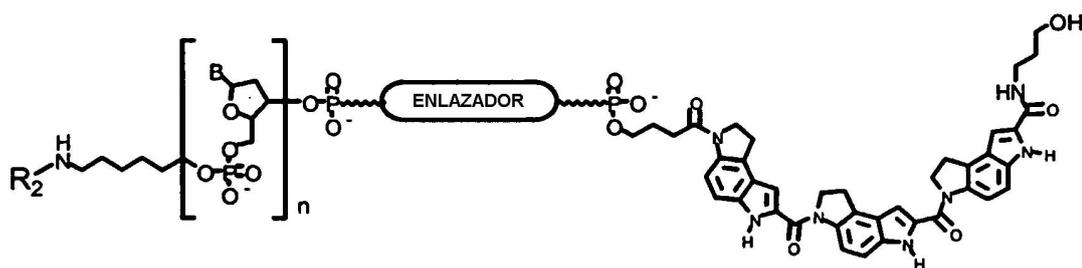
Los restos de azúcares incluyen, pero no se limitan a, pentosa, desoxipentosa, hexosa, desoxihexosa, ribosa, desoxirribosa, glucosa, arabinosa, pentofuranosa, xilosa, lixosa y ciclopentilo.

5 Los enlaces de internucleótidos modificados también pueden estar presentes en conjugados de oligonucleótidos de la invención. Estos enlaces modificados incluyen, pero no se limitan a, péptido, fosfato, fosfodiéster, fosfotriéster, alquilfosfato, alcanofosfonato, tiofosfato, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, fosforamidato sustituido y similares. Varias modificaciones adicionales de bases, azúcares y/o enlaces de nucleótidos, que son compatibles con su uso en los oligonucleótidos que sirven como sondas y/o cebadores, serán evidentes para los expertos en la técnica.

10 Determinadas realizaciones preferidas de la invención implican la síntesis de numerosas fosforamiditas con diversos cromóforos desactivadores y enlazadores y su incorporación en el extremo 3' de ODN de MGB fluorogénicos como se describe en el **esquema de reacción 3**. También se incorporan diferentes grupos indicadores fluorescentes (mostrados en el **esquema de reacción 7**) en las sondas de oligonucleótidos y se describen en la sección EXPERIMENTAL. Las propiedades fluorogénicas de estos conjugados de ODN se describen en la **tabla 2**. En otras realizaciones, las moléculas de MGB, debido a sus propiedades de hibridación mejoradas deseables, se incorporaron en oligonucleótidos que contenían tanto un fluoróforo como un desactivador, sin pérdida de especificidad de hibridación, desactivación fluorescente ni señal fluorescente. El residuo desactivador aromático plano acoplado al residuo de DPI₃ aromático vecino, tienen requisitos geométricos estrictos, ya que el enlazador entre el oligonucleótido y el residuo de DPI₃ debe ser lo suficientemente flexible para permitir el posicionamiento del DPI₃ en el surco menor después de la formación del dúplex de ADN.

20 Características de los reactivos de la invención

Una serie de conjugados de FL-ODN-Q-DPI₃ sintetizados con los reactivos y procedimientos de la invención se muestran en las **fórmulas 7 a 16**, en las que n especifica el número de bases en el oligonucleótido y R₂ es FAM o bien TAMRA. "B" significa una base heterocíclica unida al resto de azúcar desoxirribosa.



Fórmulas 7 a 16

Los desactivadores incorporados en los compuestos representados por las **fórmulas 7-16** están comercialmente disponibles 2-[4-(4-nitrofenilazo)-N-etilfenilamino]etanol (Rojo disperso 1), 2-[4-(2-cloro-4-nitrofenilazo)-N-etilfenilamino]etanol (Rojo disperso 13) y ácido 2-[4-(dimetilamino)fenilazo]benzoico, identificados en esta invención como Rojo 1, Rojo 13 y dabculo, respectivamente.

Propiedades UV de conjugados de oligonucleótido con Rojo 13 y dabculo

La **figura 2** muestra las propiedades de absorbancia del cromóforo Rojo 13 (**fórmula 8**, sin DPI₃) en comparación con dabculo (**fórmula 7**, sin DPI₃) cuando se incorpora en el extremo 3' de una sonda de ADN no modificada diferente. La absorbancia más amplia (en especial, a longitudes de onda largas) del cromóforo Rojo 13 es una clara ventaja. Nótese que el $\lambda_{\text{máx}}$ para Rojo 13 está a 522 nm, mientras que el $\lambda_{\text{máx}}$ para dabculo es de 479 nm. La absorbancia de Rojo 13 es ideal para la desactivación de fluoresceína (emisión máx. = 525 nm), pero también se solapa con la emisión de fluorescencia de otros colorantes láser comunes.

Propiedades de desactivación de sondas de DPI₃ con diversos desactivadores y enlazadores.

Para las 10 sondas fluorogénicas descritas en las **fórmulas 7 a 16**, se midió la fluorescencia de una disolución

estándar de cada sonda antes y después de la digestión con fosfodiesterasa (PDE) de veneno de serpiente, tal como se describe en la sección EXPERIMENTAL. Este ensayo de PDE permite comparar las propiedades de desactivación de cada sonda. La fluorescencia de la sonda digerida (señal) dividida entre la fluorescencia inicial (ruido) dio una proporción señal-ruido (S/N), presentada en la **tabla 1**. Un número mayor de S/N refleja una desactivación de fluorescencia más eficaz (menor fondo fluorescente) de la sonda intacta.

5

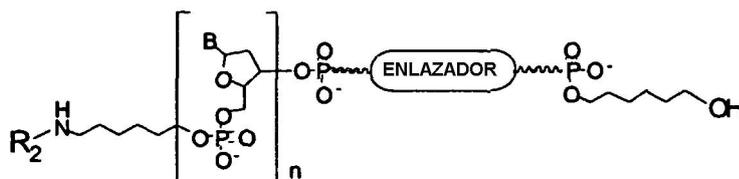
Tabla 1. Efecto de diferentes desactivadores y enlazadores sobre las sondas fluorogénicas mostradas en las fórmulas 7-16.

N.º de fórmula (desactivador)	S/N ⁿ (R ₂ = FAM)	S/N ⁿ (R ₂ = TAMRA)
7 (dabcilo)	16	13
8 (Rojo 13)	21	21
9 (Rojo 1)	24	21
10 (Rojo 13)	13	33
11 (Rojo 13)	27	21
12 (dabcilo)	13	7
13 (Rojo 13)	23	21
14 (Rojo 1)	19	3
15 (Rojo 13)	24	4
16 (Rojo 13)	22	24

ⁿLa proporción señal-ruido (S/N) se determinó usando el ensayo de fosfodiesterasa descrito en ejemplo 13. La secuencia de ODN fue 5'-gagggatgtaaaaat (SEC ID N.º: 1). Los fluoróforos (R₂) estudiados aquí son 6-carboxifluoresceína (6-FAM) o bien 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA).

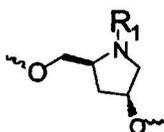
Queda claro de los datos en la **tabla 1** que el cromóforo Rojo 13 y el cromóforo Rojo 1 estrechamente relacionado son mejores desactivadores tanto para FAM como para TAMRA con muchos enlazadores que dabcilo. El enlazador puede afectar a la desactivación por el cromóforo Rojo 13. Por ejemplo, la **fórmula 14** y la **fórmula 15** funcionaron bien con FAM, pero tuvieron una eficacia de desactivación mala para TAMRA. Es un poco sorprendente que dabcilo funcionara tan bien, en especial para las sondas de TAMRA. Como se describe a continuación, la desactivación de FRET eficaz por dabcilo es un caso específico para sondas de MGB.

10

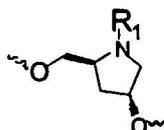


Fórmula 17

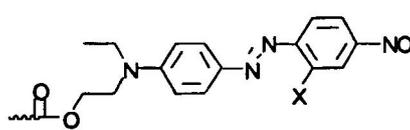
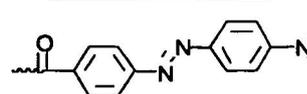
Estructura de enlazador



Fórmula 18 (X = Cl)



R₁



Fórmulas 17 a 18

15

Comparación de propiedades de desactivación de sondas de DPI₃ y sondas sin DPI₃.

5 Para demostrar adicionalmente las ventajas del cromóforo desactivador Rojo 13, se compararon sondas fluorogénicas con un grupo de bloqueo 3'-hexanol (sin MGB). Se compararon la estructura y las propiedades de fluorescencia de 13 sondas fluorogénicas con la misma secuencia usando el ensayo de PDE. Se usó un detector sensible al rojo en este estudio (tabla 2) mientras que se usó un detector sensible al azul en el estudio mostrado en la **tabla 1** (las proporciones S/N para ODN idénticos son diferentes debido a que detectores diferentes tienen sensibilidades diferentes para el mismo fluoróforo). Las siguientes variables estructurales se resumen en la **tabla 2**: Tipo de sonda (sin MGB frente a MGB), Desactivador (dabcilo frente a Rojo 13 frente a amida de Rojo 13) y colorante indicador (FAM frente a TAMRA).

Tabla 2. Propiedades de fluorescencia de oligonucleótidos con diversos desactivadores/fluoróforos¹.

N.º de formula	Tipo de sonda	Desactivador	TAMRA	
			FAM (S/N)	(S/N)
17	sin DPI ₃	dabcilo	4,7	3,9
18	sin DPI ₃	Rojo 13	11.6	5,8
7	DPI ₃	dabcilo	23	23,5
8	DPI ₃	Rojo 13	35	108
30 (R1=2- Cl, t=v=3)	DPI ₃	amida de Rojo 13	48	97

¹ La proporción señal-ruido (S/N) se determinó usando el ensayo de fosfodiesterasa descrito anteriormente. La secuencia de ODN fue 5'-gagggatgtaaaaat (**SEC ID N.º: 1**). La estructura del enlazador de los desactivadores dabcilo o Rojo 13 (Q) se muestra en las fórmulas 7 y 8, respectivamente. La estructura del enlazador de la amida Rojo 13 se muestra en 30 esquema de reacción 7, R₀ es NO₂, R₁= 2-Cl, R₂= R₃= R₄=H; t = v = 3.

10 Queda claro de los datos mostrados en la **tabla 2**, que en las sondas que no contienen DPI₃ el colorante Rojo 13 desactivador funciona mejor que dabcilo tanto para FAM como para TAMRA. En las sondas que contienen DPI₃, el colorante Rojo 13 funciona mejor en combinación con FAM y mucho mejor en combinación con TAMRA. Tanto **8** como **30** funcionan mejor en sondas que contienen DPI₃ con ambos fluoróforos, mostrando **30** la mejor proporción S/N para FAM. Por tanto, se encontró que el cromóforo Rojo 13 es un desactivador más eficaz que dabcilo para grupos indicadores fluorescentes de longitud de onda larga. Para el fluoróforo más comúnmente usado (FAM) se observó un incremento de 2,5 veces en S/N para sondas estándar (sin DPI₃). Esta desactivación mejorada por Rojo 13 es consistente con el incremento en el solapamiento espectral presentado en la **figura 2** y un mecanismo de FRET estándar. El incremento en S/N tanto de **8** como de **30** cuando se incorporan dentro de las sondas de DPI₃ es drástico y sorprendente. La combinación de desactivador Rojo 13 y del DPI₃ dio como resultado un incremento de 10 veces en S/N para desactivación de FAM y un incremento de 28 veces en S/N para desactivación de TAMRA.

20 Es sorprendente que el residuo de DPI₃ ayude en la mejora de la desactivación fluorescente por los cromóforos de dabcilo y Rojo 13. Sin comprometerse con ninguna teoría, se considera actualmente que la conformación en espiral aleatoria de la sonda fluorogénica en disolución está más estructurada en las sondas de DPI₃ de tal forma que la distancia promedio entre el fluoróforo y el desactivador es más próxima que en las sondas sin MGB. Esta distancia promedio más próxima en las sondas de DPI₃ (espiral más estrecha) daría lugar a FRET más eficaz. La naturaleza exacta de esta interacción no se conoce, pero los espectros UV de los cromóforos desactivador y colorante no están afectados por el DPI₃. Esto contrasta con las sondas de horquilla fluorogénicas en las que los espectros UV están modificados por la conformación constreñida (desactivación colisional).

Realización de sondas de DPI₃ fluorogénicas en un ensayo de PCR "en tiempo real".

30 Se sometieron a prueba sondas de DPI₃ preparadas con 5'-fluoresceína y enlazador de amida de Rojo 13 en el ensayo de 5'-nucleasa para ver si las propiedades de hibridación eran compatibles con el sistema de enlazador. Como se muestra en la **figura 3**, tanto dabcilo y como Rojo 13 funcionaron como desactivadores para fluoresceína en el ensayo de 5'-nucleasa cuando se usaron sondas de MGB. Rojo 13 funcionó mejor que dabcilo, como se evidencia por la fluorescencia inicial menor (fondo) y la meseta mayor después de PCR. Los fluorímetros de ciclo térmico comercialmente disponibles actuales no pueden leer colorantes de longitud de onda más largas en la PCR en tiempo real, pero se mostró que el cromóforo Rojo 13 da una buena S/N sondas que contienen TAMRA en un análisis de punto final después de PCR.

40 De acuerdo con otro procedimiento general, los conjugados de 5'-fluoróforo-ODN-Q-MGB de la presente invención tienen resultados mejores en ensayos diseñados para detectar dianas de ADN por hibridación directa. Una descripción básica de este procedimiento se encuentra en la patente de los Estados Unidos N.º 5.876.930. En este formato de ensayo, la estructura no hibridada, que separa de este modo el desactivador y el fluoróforo.

El cromóforo Rojo 13 desactiva una amplia gama de grupos indicadores fluorescentes

Se preparó una serie de sondas de DPI₃ con la amida de Rojo 13 con diferentes grupos indicadores fluorescentes para examinar el intervalo eficaz de desactivación. Se digirieron sondas con PDE como de costumbre y se mostró una proporción S/N buena para colorantes que emiten desde 458 -665 nm.

5 Tabla 3. Resultados de sondas DPI₃ fluorogénicas con diferentes fluoróforos.

Fluoróforo (FL)	Ex 8 (nm)	Em 8 (nm)	S/N
cumarina	378	458	32
FAM	488	522	63
Cy3	541	565	61
TAMRA	547	582	37
resorufina	549	595	110
Cy5	641	665	36

La estructura de las sondas fluorogénicas fue FL-ODN-Q-CDPI₃ en las que Q es la amida de Rojo 13 y la secuencia de ODN fue 5'-GTC CTG ATT TTA C (SEC ID N.º: 2). Se incorporaron los fluoróforos FAM, TAMRA, cy3 y cy5 usando reactivos de fosforamidita comercialmente disponibles. Se incorporaron los fluoróforos de cumarina y resorufina usando fosforamiditas 34 y 37 que se prepararon como se describe a continuación.

La emisión fluorescente se separa bien de FAM, tal como se muestra en los espectros solapados en la **figura 4**. Como se muestra en la **tabla 3**, la fluorescencia de resorufina también se desactiva por el cromóforo Rojo 13. Por lo tanto, la fosforamidita de resorufina tiene propiedades excelentes para su uso en sondas de FRET y en combinación con FAM para análisis multicolor.

10 Como se muestra en la **tabla 3**, la fluorescencia de cumarina también se desactiva por el cromóforo Rojo 13. Por tanto, el reactivo de fosforamidita de cumarina se puede incorporar en sondas de FRET y en particular, en combinación con FAM para análisis multicolor.

Sustratos de enzimas basadas en Fret

15 Se pueden usar las moléculas desactivadoras mejoradas en otros sistemas de ensayo basados en FRET. De acuerdo con otra aplicación general de la invención, una molécula desactivadora y un fluoróforo se unen a un sustrato, en capilaridad abierta y no se han corregido. Se realizó el análisis elemental por Quantitative Technologies Inc. (Boundbrook, NJ). Se registraron los espectros de absorción UV-visible en el intervalo de 200-400-nm en un espectrofotómetro UV-2100 (Shimadzu) o un Lambda 2 (Perkin Elmer). Se realizaron los espectro de RMN de ¹H a 20CE en un espectrofotómetro Bruker WP-200 o en un Varian XL-200; se reportan los desplazamientos químicos en ppm de campo bajo de Me₄Si. Se realizó una cromatografía en capa fina sobre placas con base de aluminio sobre gel de sílice 60 F-254 (EM Reagents).

Procedimientos experimentales

20 Parte experimental general

Se llevaron a cabo todas las reacciones sensibles al aire y al agua bajo una presión ligeramente positiva de argón. Se obtuvieron disolventes anhidros de Aldrich (Milwaukee, WI). Se realizó una cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice de malla 230-400. Se determinaron los puntos de fusión en un aparato de punto de fusión Mel-Temp, en capilaridad abierta y no se han corregido. Se realizó el análisis elemental por Quantitative Technologies Inc. (Boundbrook, NJ). Se registraron los espectros de absorción UV-visible en el intervalo de 200-400-nm en un espectrofotómetro UV-2100 (Shimadzu) o un Lambda 2 (Perkin Elmer). Se realizaron los espectro de RMN de ¹H a 20CE en un espectrofotómetro Bruker WP-200 o en un Varian XL-200; se reportan los desplazamientos químicos en ppm de campo bajo de Me₄Si. Se realizó una cromatografía en capa fina sobre placas con base de aluminio sobre gel de sílice 60 F-254 (EM Reagents).

30 Ejemplo 1

(2S,4R)-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-4-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinooxi]pirrolidin-carboxilato de 2-({4-[(2-cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil}etilamino)etilo (5).

(5S,3R)-3-hidroxi-5-(hidroximetil)pirrolidincarboxilato de 2-({4-[(2-cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil}etilamino)etilo (3).

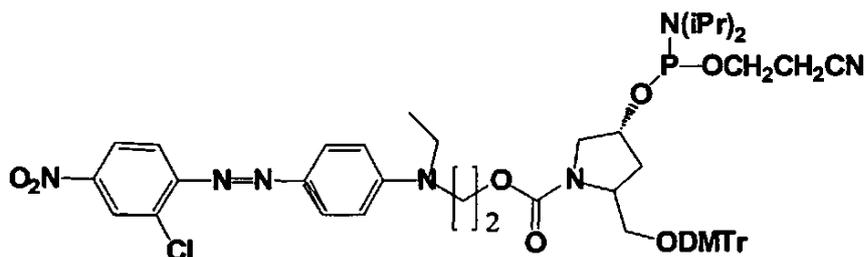
35 Se agitó una disolución de 2-[4-(2-cloro-4-nitrofenilazo)-N-etilfenilamino]etanol (Rojo disperso 13, de Aldrich Chemical Co., 9,0 g, 25,80 mmol) y cloroformiato de 4-nitrofenilo (Aldrich Chemical Co., 9,4 g, 46.61 mmol) en 90 ml de piridina anhidra a 70 °C durante 40 min, proporcionando el intermedio **2**. Se añadió etanol (5,0 ml) a la disolución de reacción seguido de trans-hidroxiprolinol (Reed et al., Bioorg. Chem. 2: 217-225 (1991) (42 ml de una disolución 0,5 M en

etanol) y trietilamina (3,2 ml). Se agitó la disolución resultante durante 30 min a 70 °C. Se evaporó la disolución hasta sequedad y se suspendió el residuo en 1 litro de agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml). Se secaron los extractos combinados sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de metanol al 0-10 % en acetato de etilo. Se evaporaron las fracciones de producto puras y precipitó a partir de acetato de etilo - éter: 9,2 g (59 %); TLC (acetato de etilo), $R_f = 0,25$. RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 8,43 (1H, d, $J = 2,5$ Hz), 8,25 (1H, dd, $J = 9,0$ y $2,4$ Hz), 7,86 (2H, d, $J = 9,1$ Hz), 7,78 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 6,96 (2H, d, $J = 9,3$ Hz), 4,88 (1H, m), 4,67 (1H, t, $J = 5,7$ Hz), 4,19 (3H, m), 3,80 (1H, m), 3,73 (2H, t, $J = 5,4$ Hz), 3,56 (2H, q), 3,46 (1H, t, $J = 4,7$ Hz), 3,27 (1H, m), 1,94 (1H, m), 1,79 (1H, m), 1,17 (3H, t, $J = 6,8$ Hz). Anal. Calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{ClN}_5\text{O}_6 + 0,2 \text{ H}_2\text{O}$: C, 53,32; H, 5,37; N, 14,13. Hallado: C, 53,24; H, 5,25; N, 13,99.

10 (5*S*,3*R*)-5-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-3-hidroxi-pirrolidincarboxilato de 2-({4-[(2-cloro-4-nitrofenil) diazenil]fenil}etilamino)etilo (4).

A una disolución de **3** (9,1 g, 18,53 mmol) en 130 ml de piridina anhidra se le añadieron 6,26 g de cloruro de dimetoxitritilo. Se agitó la disolución durante 3 h a temperatura ambiente y después se vertió en 300 ml de disolución de bicarbonato de sodio al 5 %. Se extrajo la mezcla con acetato de etilo (2 x 300 ml) y se secaron los extractos combinados sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. Se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de hexano al 20-0 % en acetato de etilo, seguido de un gradiente de metanol al 0-2 % en acetato de etilo. El eluyente de cromatografía también contenía trietilamina al 1 %. Se combinaron las fracciones de producto puras proporcionando un sólido amorfo: 12,66 g (86 %); TLC (acetato de etilo), $R_f = 0,44$. RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 8,45 (1H, s), 8,26 (1H, d, $J = 8,9$ Hz), 7,82 (3H, m), 7,27 (4H, m), 7,16 (5H, m), 6,95-6,79 (6H, m), 4,95 (1H, m), 4,32 (1H, m), 4,14 (1H, m), 3,99 (2H, m), 3,73 (1H, m), 3,69 (6H, s), 3,56 (1H, m), 3,40-3,30 (2H, m), 3,14 (1H, m), 2,10-1,82 (2H, m), 1,16 (3H, m), 1,06 (3H, t, $J = 6,5$ Hz). Anal. Calc. para $\text{C}_{43}\text{H}_{44}\text{ClN}_5\text{O}_8 + 0,2 \text{ H}_2\text{O}$: C, 64,73; H, 5,61; N, 8,78. Hallado: C, 65,08; H, 5,70; N, 8,31.

(2*S*,4*R*)-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-4-[[bis(metiletil)amino](2-ciano-etoxi)fosfinooxi]pirrolidincarboxilato de 2-({4-[(2-cloro-4-nitrofenil) diazenil]fenil}etilamino)etilo (5).



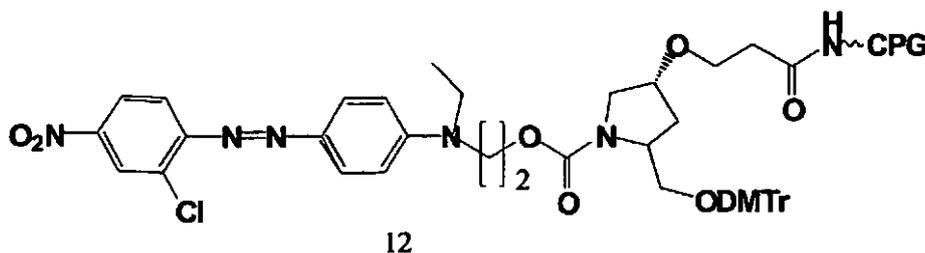
5

25 A una disolución de **4** (12,63 g, 15,91 mmol) disuelto en 440 ml de cloruro de metileno anhidro, que contiene 8,0 ml de N,N-diisopropiletilamina, se le añadieron 5,94 ml de diisopropilclorofosforamida de 2-cianoetilo. Se agitó la disolución 30 min a temperatura ambiente bajo argón. Se trató la mezcla de reacción con 10 ml de metanol y se vertió en 400 ml de disolución de bicarbonato de sodio al 5 %. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se evaporó. Se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de hexano al 40-20 % en acetato de etilo (triethylamina al 2 %). Se evaporaron las fracciones de producto puras proporcionando un sólido amorfo: 14,75 g (rendimiento del 93 %). RMN de ^{31}P (DMSO- d_6) δ 146,93 (singlete). Anal. Calc. para $\text{C}_{52}\text{H}_{61}\text{ClN}_7\text{O}_9 + 1,0 \text{ H}_2\text{O}$: C, 61,68; H, 6,27; N, 9,68. Hallado: C, 61,44; H, 6,47; N, 9,35.

Ejemplo 2

35 **Rojo 13-pirrolidina-DMTr-CPG 12**

Síntesis del éster pentafluorofenilico (11) y Rojo 13_pirrolidina_DMTr_CPG (12) Esquema de reacción 3.



Se sintetiza el éster pentafluorofenílico (**11**) por el mismo procedimiento usado para la síntesis del compuesto **22** como se describe en el ejemplo 4 y el **esquema de reacción 5**.

Rajo 13-pirrolidina-DMTr-CPG (12)

- 5 Se combinaron 10 g de LCAA_CPG con 5 ml de una disolución 0,3 M de 11 en DMF y se agitó suavemente durante toda una noche, después se filtró y se lavó con 2x 100 ml de DMF, 2x 100 ml de acetonitrilo y 2x 100 ml de éter. Se retiraron las trazas de éter a vacío (bomba de aceite). Se acetilaron los grupos amino sin reaccionar tratando el CPG con 40 ml de piridina seca y 5 ml de anhídrido acético. Después de remover durante 1,5 h, se filtró el CPG y se lavó con 2x 100 ml de DMF, 2x 100 ml de acetonitrilo y 2x 100 ml de éter. Se retiraron las trazas de éter a vacío (bomba de aceite). Se analizó el CPG para determinar la carga de MMT tratando 3_5 mg de CPG en 25 ml de 1:1 / 70% de ácido perclórico:metanol. Se registró la absorbancia del catión de MMT liberado a 472 nm y se ajustó el nivel de para que esté entre 30_40 mmol / g de CPG usando la ecuación:

$$\text{Carga de MMT (mmol / g)} = A472 \times \text{volumen (en ml)} \times 14,3, \text{ en peso de CPG (mg)}$$

Ejemplo 3

- 15 **3-[(pirrolo[4,5-e]indolin-7-ilcarbonil)pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de 2-(4-nitrofenil)etilo (17). (Esquema de reacción 4)**

3-[(terc-butil)oxicarbonil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de 2-(4-nitrofenil)etilo (14).

- Se colocan diez gramos (33,1 mmol) de ácido 3-[(terc-butil)oxicarbonil]pirrolo[3,2-e]indolin-7-carboxílico (Boger, D.L., Coleman, R.S., Invergo, B.J. (1987) J. Org. Chem., 52, 1521.), y bien secos, en un matraz cargado de argón, y se añaden 84 ml de THF y 10,4 ml (66,2 mmol) de azodicarboxilato de dietilo (DEAD). Después, se coloca un embudo de goteo en la parte superior del matraz (purgado con argón) y se coloca debajo un baño de agua (para enfriar el matraz). Se prepara una disolución de 17,3 g (66 mmol) de trifenilfosfina y 6,64 g (39,7 mmol) de 2-(p-nitrofenil)etanol en 160 ml de éter etílico. Se añade esta disolución al embudo de goteo, y después al matraz de reacción, gota a gota, con agitación. Se deja que la reacción siga durante una hora, tiempo en el que se realiza un análisis de TLC (2:1 de hexanos/acetato de etilo) examinado por UV (254 nm) para determinar si se ha completado la reacción. Si se ha completado, entonces desaparecerá la mancha en la línea de base (azulada) y el producto, con un R_f de 0,55, aparecerá como una mancha oscura. A menudo, en especial si los reactivos no están totalmente secos, se requiere otra parte de trifenilfosfina y DEAD. Si es así, normalmente es suficiente una décima parte de las cantidades originales, es decir, 1,73 g de trifenilfosfina y 1,04 ml de DEAD. Éstos se pueden añadir en puro a la disolución agitada. Se deja que reaccione otra hora, después, normalmente otro análisis de TLC revela la reacción completada. El producto normalmente precipita en parte, esto se recoge por filtración y se lava con metanol, después se recrystaliza disolviendo en una cantidad mínima (normalmente, 80 - 100 ml) de acetona templada y añadiendo cuatro veces ese volumen de metanol templado. Se enfría hasta 4 °C durante varias horas o tal vez durante toda una noche. Se guarda el sobrenadante de la precipitación original y se evapora hasta formar un jarabe o hasta sequedad. Esto también se disuelve en una cantidad mínima de acetona templada; normalmente de aproximadamente 100-120 ml de acetona templada. La cantidad total de acetona usada para las dos recrystalizaciones normalmente es de aproximadamente 200 ml. Como antes, se añade una cantidad de metanol templado igual a cuatro veces la cantidad de acetona. Se enfría la disolución; la recrystalización comienza casi instantáneamente, pero se deja que continúe de varias horas a durante toda una noche. Las recrystalizaciones son bastante eficaces, pero normalmente el producto del sobrenadante de reacción no es bastante puro y se purifica por recrystalización. El rendimiento es de aproximadamente un 85%. (pf 191-193 °C) RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 11,83 (s, 1H), 8,18 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,84 (s a, 1H), 7,64 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,25 (d, J=8,8 Hz), 6,96 (s, 1H), 4,56 (t, J=6 Hz, 2H), 4,00 (t, J=8,8 Hz, 2H), 3,21 (m, 4H), 1,51 (s, 9H). Análisis de combustión: Hallado: C, 63,16 %; H, 5,56 %; N, 9,45 %. Calculado para 0,4 moles de agua añadida: C, 62,8 %; H, 5,7 %; N, 9,16 %.

- 45 **Pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de 2-(4-nitrofenil)etilo (15).**

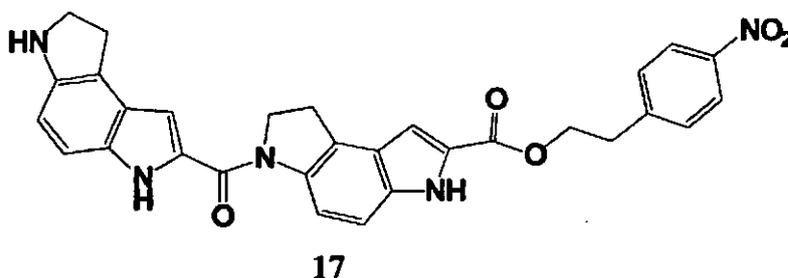
Se pesan dos gramos (4,43 mmol) de **14** en un matraz de fondo redondo. Después, en una campana de gases, se añaden 25 ml (325 mmol) de ácido trifluoroacético y se tapa y se agita el matraz. El sólido se disuelve

aproximadamente en un minuto. Se agita la mezcla durante 1 hora, tiempo en el que se realizará la desprotección (se puede usar HPLC como control). Se evapora el ácido en un evaporador rotatorio (se usa una trampa) y se disuelve el producto en 100 ml de cloruro de metileno. Esto se extrae dos veces con 100 ml de la mitad a 2/3 de disolución saturada de bicarbonato de sodio. Se vuelven a extraer una vez las capas acuosas con ~ 50 ml de cloruro de metileno y esto se combina con el resto. Se seca la capa orgánica sobre sulfato de sodio dos veces y se evapora para dar un sólido marrón. Si se desea, se puede recrystalizar este material diluyendo una disolución muy concentrada en cloruro de metileno con metanol y enfriando. Normalmente se obtienen rendimientos próximos al 100%. pf 192-194 °C. RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 11,51 (s, 1H), 8,18 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,63 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,11 (d, J=8,5 Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,70 (d, J=8,5 Hz), 5,03 (s a, 1H), 4,54 (t, J=6,4 Hz, 2H), 3,46 (t, J=8,6 Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,04 (t, J=8,6 Hz, 2H). Análisis de combustión: Calc. para C₁₉H₁₇N₃O₄: C, 64,94 %; H, 4,88 %; N, 11,96 %. Hallado: C, 65,50 %; H, 4,70 %; N, 11,64 %.

3-({3-[(*tert*-butil)oxycarbonil]pirrolo[4,5-*e*]indolin-7-il)carbonil}pirrolo[4,5-*e*]indolin-7-carboxilato de 2-(4-nitrofenil)etilo (16).

Se mezclan 3,09 g (8,8 mmol) de **15** con 2,66 g (8,8 mmol) de **13** (Boger, D.L., Coleman, R.S., Invergo, B.J. (1987) J. Org. Chem., 52, 1521), y se añaden 46 ml de DMF. Después, se añaden 3,85 gramos (8,77 mmol) de clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida. Se agita la mezcla durante aproximadamente tres horas. Inicialmente, la mezcla es homogénea, pero según sigue la agitación, se forma un precipitado del producto. Se evapora el disolvente DMF a alto vacío y se añaden aproximadamente 100 ml de metanol. Se remueve la mezcla en un embudo de vidrio sinterizado, después se lava exhaustivamente con 3x 50 ml de partes de metanol. Después, se seca a vacío. Normalmente los rendimientos se acercan al 100 %. pf: 132E-134 °C. RMN de ¹H (DMSO-d₆) *: 11,93 (s, NH, 1H), 11,62 (s, NH, 1H), 8,30 (s a, protón aromático, 1H), 8,27 (s a, protón aromático, 1H), 8,19 (d, protones aromáticos, J=8,3 Hz, 2H), 7,65 (d, protones aromáticos, J=8,3 Hz, 2H), 7,34 (d, J=9 Hz, protón aromático, 1H), 7,29 (d, J=9 Hz, protón aromático, 1H), 7,07 (s, protón aromático, 1H), 6,98 (s, protón aromático, 1H), 4,60 (m, protones alifáticos, 4H), 4,02 (t, J=8,5 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,40 (t, J=8 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,24 (m, protones alifáticos, 4H), 1,52 (s, 3xCH₃, 9H). Análisis de combustión: Calculado: C, 66,13 %; H, 5,23 %; N, 11,02 %. Hallado: C, 65,94 %; H, 5,19 %; N, 11,07 %.

3-(pirrolo[4,5-*e*]indolin-7-ilcarbonil)pirrolo[4,5-*e*]indolin-7-carboxilato de 2-(4-nitrofenil)etilo (17).



Se colocan 5 gramos de **16** en un matraz. Se añaden 100 ml de ácido trifluoroacético y se agita la mezcla. Después de una hora, se evapora el ácido en un evaporador rotatorio y se añaden 100 ml de disolución de bicarbonato de sodio saturada y 100 ml de agua. Se agita la mezcla o se somete a sonicación durante ~ 1/2 hora, después se filtra y se lava con agua y después metanol y se seca al vacío. Se puede recrystalizar el material. Se disuelve en una cantidad mínima de DMF templado, y después se añade aproximadamente una parte triple parte de metanol y la disolución se somete a sonicación unos minutos. Un material de color crema a marrón cristaliza. Esto se lava con metanol y se seca a vacío. El rendimiento se aproxima a los valores teóricos. RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 11,96 (s, NH, 1H), 11,71 (s, NH, 1H), 8,30 (s a, protón aromático, 1H), 8,27 (s a, protón aromático, 1H), 8,19 (d, protones aromáticos, J=8,5 Hz, 2H), 7,66 (d, protones aromáticos, J=8,3 Hz, 2H), 7,34 (m, protones aromáticos, 2H), 7,08 (s, protón aromático, 1H), 7,03 (s, protón aromático, 1H), 4,60 (m, protones alifáticos, 4H), 3,68 (t, J=8 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,40 (t, J=8 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,24 (m, protones alifáticos, 4H). Análisis de combustión: Hallado: C, 63,55 %; H, 4,42 %; N, 11,95 %. Calculado para 1/2 mol de contaminante bicarbonato de sodio: C, 63,43 %; H, 4,45 %; N, 12,13 %.

40 Ejemplo 4

3-[4-({3-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]propil}{4-[(2-cloro-4-nitrofenil)diazetil]fenil}amino)butanoil]pirrolo[4,5-*e*]indolin-7-carboxilato de 2,3,4,5,6-pentafluorofenilo (24) (Esquema de reacción 5)

4-[(3-hidroxi)propil]fenilamino]butanoato de etilo (19)

Se agita una mezcla de 3-(fenilamino)propan-1-ol (Huang, Yande; Arif, Atta M.; Bentrude, Weseley G.; J. Org. Chem., 58(23) 1993; 6235-6246) (65,6 g, 0,43 mol), 4-bromobutirato de etilo (104,5 g, 0,54 mol) y 100 ml de etilidipropilamina a 100 °C durante 1 h. Se enfría la reacción hasta temperatura ambiente y se fracciona entre agua 400 ml y acetato de etilo (500 ml). Se lava la capa orgánica con NaHCO₃ saturado, salmuera y se seca sobre Na₂SO₄.

Se somete a cromatografía en sílice el aceite obtenido después de la concentración eluyendo con un 10 % de EtOH/CHCl₃. La concentración de las fracciones apropiadas proporciona 115 g (100 %) del producto deseado como un aceite incoloro, viscoso. RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,23 (m, 2H), 6,72 (m, 3H), 4,14 (q, J=7 Hz, 2H), 3,72 (t, J=6Hz, 2H), 3,43 (t, 7 Hz, 2H), 3,34 (t, 7 Hz, 2H), 2,35 (t, 7 Hz), 1,88 (m, 4H), 1,26 (t, 7 Hz, 3H).

5 **4-({4-[(2-cloro-4-nitrofenil) diazenil]fenil}(3-hidroxiopropil)amino)butanoato de etilo (20)**

Se coloca 2-cloro-4-nitroanilina 2,5 g (10 mmol) en un matraz de 125 ml y se añaden 6 ml de agua. La agitación y la sonicación disuelve parcialmente la cloronitroanilina amarilla. Después, se enfría la disolución agitada con hielo en una campana de gases y se añaden 15,8 ml de HCl concentrado (~ 12 M). La mayoría del material amarillo se disuelve en este punto. Se ajusta el matraz con un embudo de goteo y se añade una disolución de 1,51 g (21,9 mmol) de nitrito de sodio en 3-4 ml de agua al embudo de goteo y se añade lentamente a la disolución en el matraz con agitación, durante aproximadamente 20 minutos. Cuando esto se completa, se añaden 0,6 g (~ 21 mmol) de urea seguido de 2,73 g de 4-[(3-hidroxiopropil)fenilamino]butanoato etilo como una disolución en 8,2 ml de ácido acético. Después de un minuto, se añaden 20 g de acetato de sodio en ~ 50 ml de agua. Se deja que la mezcla se agite durante una hora a temperatura ambiente. Se separa la mayoría del producto como una emulsión. Se repartió la mezcla entre acetato de etilo y agua. Se lava la capa orgánica con NaHCO₃ (3x 50 ml), salmuera y se seca sobre sulfato de sodio anhidro. Después, se evaporan los disolventes orgánicos hasta un jarabe. Se somete a cromatografía en gel de sílice el producto en bruto (3,81 x 50,8 cm (1,5 x 20 pulgadas)) eluyendo con un 50 % de acetato de etilo/hexano. Se recogen las fracciones apropiadas, se combinan, se evapora (30-40 grados), y se seca a vacío. El producto es un aceite oscuro. El rendimiento es aproximadamente de un 68-70 %. RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 8,42 (d, J=2,5 Hz, protón aromático, 1H), 8,24 (dd, J₁=9 Hz, J₂=2,5 Hz, protón aromático, 1H), 7,86 (d, J=9Hz, 2H), 7,77 (d, J=9 Hz, 1H), 6,92 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 2H), 4,67 (t, J=6 Hz, OH, 1H), 4,07 (q, J=7 Hz, CH₂O, 2H), 3,5 (m, protones alifáticos, 6H), 2,40 (t, J=7 Hz, protones alifáticos, 2H), 1,84 (m, protones alifáticos, 2H), 1,72 (m, protones alifáticos, 2H), 1,18 (t, J=7 Hz, CH₃, 3H).

Ácido 4-({4-[(2-cloro-4-nitrofenil) diazenil]fenil}(3-hidroxiopropil)amino)butanoico.

25 A una disolución agitada de **20** (4,48 g, 10 mmol) en 40 ml de THF se le añaden 40 ml de etanol seguido de una disolución de KOH (0,84 g, 15 mmol) en 20 ml de agua y 20 ml de etanol. Se agita la mezcla durante toda una noche y se concentra. Se suspende el residuo en 125 ml de agua, se trata con 2,6 ml (~ 3 eq.) de ácido acético y se enfría hasta 4 °C. Se filtra el sólido resultante, se lava con agua y se seca. El rendimiento es cuantitativo. RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 8,42 (d, J=2,5 Hz, protón aromático, 1H), 8,23 (dd, J₁=9 Hz, J₂=2,5 Hz, protón aromático, 1H), 7,82 (d, J=9Hz, 2H), 7,90 (d, J=9Hz, 1H), 7,03 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 2H), 4,8 (s a, OH, 1H), 3,5 (m, protones alifáticos, 6H), 1,86 (t, J=6 Hz, protones alifáticos, 2H), 1,72 (m, protones alifáticos, 4H).

Ácido 4-({3-[Bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]propil}{4-[(2-cloro-4-nitrofenil) diazenil]fenil}amino)butanoico (21)

35 Se colocan 4,21 g (10 mmol) del ácido de la etapa anterior en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Se añade piridina seca (100 ml) y se evapora (30-40 grados) con un evaporador rotatorio. Se repite una o dos veces el procedimiento para retirar todas las trazas de agua. Se añade piridina seca (80 ml) al contenido del matraz. Después, se añaden 4,07 g (12 mmol) de cloruro de dimetoxitritilo. Después de agitar durante 1 h, se evapora la piridina y se disuelve el jarabe resultante en unos mililitros de cloruro de metileno/metanol/trietilamina 18:1:1. Se prepara una columna de gel de sílice (~ 1,5" x 20" (3,81 x 50,8 cm)) con un eluyente de cloruro de metileno/metanol/trietilamina 18:1:1 y se pasa el producto a través de la columna, se recogen y se combinan las fracciones apropiadas. Después de retirar los disolventes por evaporación, el sólido amorfo resultante contiene algunas sales de trietilamonio además del producto deseado. La impureza no interfiere con la siguiente etapa y se usa el producto sin purificación adicional.

4-({3-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]-propil}{4-[(2-cloro-4-nitrofenil) diazenil]fenil}amino)butanoato de 2,3,4,5,6-pentafluorofenilo (22).

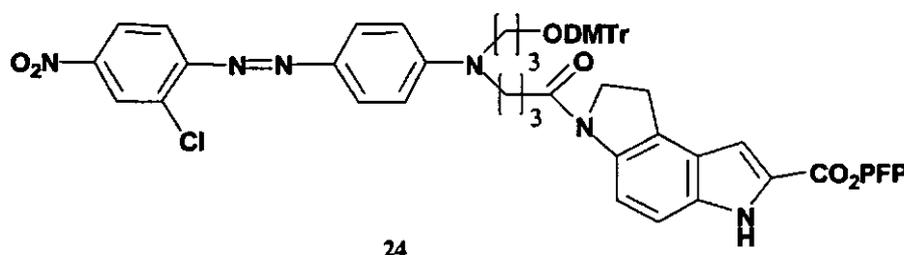
45 Al matraz que contiene **21** (10 mmol) se le añaden 7 ml de trietilamina, seguido de 100 ml de cloruro de metileno, después se añaden 2,05 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (PFP-TFA). Se agita la disolución media hora. Al final de este tiempo, normalmente la reacción se ha completado. (TLC: 2:1 hexano/acetato de etilo). Se retira el disolvente en el evaporador rotatorio para dar un jarabe, que se somete a cromatografía en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo/hexano 1:3. Se recogen las fracciones apropiadas, se combinan, se evapora y se seca a vacío. El rendimiento es de un 41 %. RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 8,43 (d, J=2,5 Hz, protón aromático, 1H), 8,24 (dd, J₁=9 Hz, J₂=2,5 Hz, protón aromático, 1H), 7,83 (d, J=9 Hz, protón aromático, 1H), 7,78 (d, J=9 Hz, protón aromático, 1H), 7,42-7,15 (m, protones aromáticos, 10H), 7,07 (m, protones aromáticos, 2H), 7,00-6,80 (m, protones aromáticos, 4H), 3,72 (s, 2xCH₃, 6H), 3,56 (m, protones alifáticos, 2H), 3,48 (t, J=6,3 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,08 (t, J=5 Hz, protones alifáticos, 2H), 2,89 (t, J=7 Hz, protones alifáticos, 2H), 1,95 (m, protones alifáticos, 2H), 1,86 (m, protones alifáticos, 2H).

55 **3-[4-({3-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]propil}{4-[(2-cloro-4-nitrofenil) diazenil]fenil}amino)butanoil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de metilo (23).**

A una disolución de **22** (3,0 g, 3,37 mmol) en 15 ml de DMF anhidra se le añade trietilamina (0,75 ml) seguido de pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de metilo (Boger, D.L., Coleman, R.S., Invergo, B.J. (1987) J. Org. Chem., 52, 1521)

(0,8 g, 3,7 mmol). Se almacena la disolución resultante a temperatura ambiente durante 20 h. Se analiza la reacción por HPLC para confirmar su completitud. Se retira la DMF en un evaporador rotatorio equipado con una bomba de aceite. Se suspende el residuo, jarabe oscuro, en 50 % de acetato de etilo/hexanos (~ 25 ml). Se somete a sonicación la mezcla para iniciar la cristalización. Se agitan los cristales durante 15 min, se recogen por filtración en un embudo de vidrio sinterizado, se lava con metanol (2x 30 ml) y se seca a vacío. El rendimiento del producto deseado es de 2,7 g (87 %) como un sólido púrpura oscuro. RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 11,93 (d, $J=1,7$ Hz, indol NH, 1H), 8,43 (d, $J=2,5$ Hz, protón aromático, 1H), 8,3-8,2 (m, protón aromático, 2H), 7,85-7,75 (m, protones aromáticos, 3H), 7,45-7,18 (m, protones aromáticos, 10 H), 7,05 (d, $J=1,8$ Hz, protón aromático, 1H), 6,97 (d, $J=9$ Hz, protones aromáticos, 2H) 6,87 (d, $J=9$ Hz, protones aromáticos, 4H), 4,12 (t, $J=8$ Hz, protones alifáticos, 2H), 3,87 (s, éster CH_3 , 3H), 3,71 (s, CH_3 , 6H), 3,60 (t a, protones alifáticos, 2H), 3,45 (t a, protones alifáticos, 2H), 3,29 (t a, protones alifáticos, 2H), 3,08 (t, $J=5$ Hz, protones alifáticos, 2H), 2,5 (t a, oscurecido por señal de DMSO, protones alifáticos, 2H), 1,88 (m a, protones alifáticos, 4H).

3-[4-({3-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]propil}{4-[(2-cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil}amino)butanoil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de 2,3,4,5,6-pentafluorofenilo (24).



15

1. Hidrólisis del éster metílico

A una disolución de **23** (2,67 g, 2,9 mmol) en 25 ml de THF se le añade metanol (25 ml) y un 5 % de LiOH, monohidrato en H_2O (10 ml). Se agita la suspensión resultante a 50 °C (temperatura del baño) durante 90 minutos, tiempo en el que se obtiene una solución transparente. El análisis de TLC no muestra material de partida. Se retira el disolvente a vacío y se fracciona el producto entre CH_2Cl_2 y ácido cítrico al 10 % frío. Se neutraliza la fase orgánica con trietilamina, se seca sobre Na_2SO_4 y se concentra. Se seca el producto resultante (sólido amorfo) a alto vacío durante al menos 3 h y se usa en la siguiente etapa sin purificación adicional.

2. Preparación del éster de PFP

Se disuelve el producto obtenido en la etapa anterior en 100 ml de DMF anhidra. Se añade trietilamina (2 ml) seguido de PFP-TFA (2 ml, 4,4 mmol). Se agita la reacción durante 30 min y se analizan por HPLC. No se debe observar ningún material de partida ni ácido libre. Se evapora la DMF y se suspende el residuo, jarabe púrpura oscuro, en 100 ml de MeOH. Después de agitar durante 30 minutos, se forma un precipitado oscuro que se recoge por filtración en un embudo de vidrio sinterizado, se lava con metanol (3x 20 ml) y se seca a vacío (15 - 30 h). Este procedimiento proporciona 2,7 g (94 %) del producto deseado como un sólido púrpura. RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 12,45 (d, $J=1,8$ Hz, indol NH, 1H), 8,43 (d, $J=2,5$ Hz, protón aromático, 1H), 8,38 (d, $J=9$ Hz, protón aromático, 1H), 8,24 (dd, $J_1=9$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, protón aromático, 1H), 7,85-7,75 (m, protones aromáticos, 3H), 7,52-7,18 (m, protones aromáticos, 11 H), 6,97 (d, $J=9$ Hz, protones aromáticos, 2H), 6,88 (d, $J=9$ Hz, protones aromáticos, 4H), 4,16 (t, $J=8,5$ Hz, protones alifáticos, 2H), 3,71 (s, CH_3 , 6H), 3,61 (t a, protones alifáticos, 2H), 3,47 (t a, protones alifáticos, 2H), 3,32 (t a, protones alifáticos, 2H), 3,08 (t, $J=5$ Hz, protones alifáticos, 2H), 2,5 (t a, oscurecido por señal de DMSO, protones alifáticos, 2H), 1,88 (m a, protones alifáticos, 4H).

Ejemplo 5

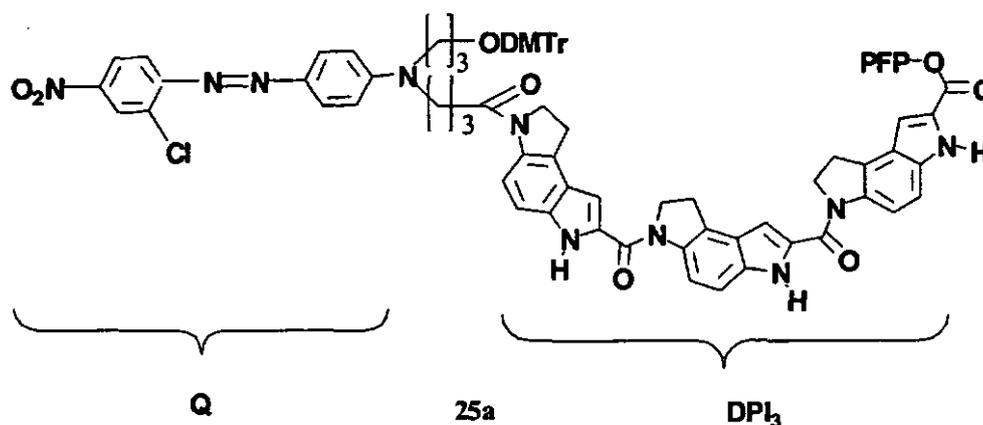
3-({3-({3-[4-({3-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]propil}{4-[(2-cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil}amino)butanoil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-il}carbonil)pirrolo[4,5-e]indolin-7-il}carbonil)pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de 2,3,4,5,6-pentafluorofenilo (25a). donde $R_1=2\text{-Cl}$ y $t=v=3$ (Esquema de reacción 6)

3-({3-({3-[4-({3-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]propil}{4-[(2-cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil}amino)butanoil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-il}carbonil)pirrolo[4,5-e]indolin-7-il}carbonil)pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de 2-(4-nitrofenil)etilo (25).

En un matraz de fondo redondo de 100 ml se pesan 1,31 g (1,22 mmol) de **24**. Esto se disuelve en 25 ml de dimetilformamida. Después, se añaden 0,81 ml de trietilamina y finalmente 0,623 g (1,162 mmol) de **17**. Se deja la mezcla de reacción durante toda una noche, después, se concentra la disolución hasta ~ 10 ml y se filtra el precipitado resultante, usando un embudo de filtro de vidrio sinterizado. Se lava el sólido con volúmenes abundantes de metanol (agitando el lodo en el filtro con el metanol antes de aplicar el vacío) varias veces y éter. Cuando el efluente es transparente y prácticamente incoloro, se seca el precipitado violeta oscuro a vacío para proporcionar 1,5 g (90%) del

producto deseado. RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 11,96 (s, indol NH, 1H), 11,76 (s, indol NH, 1H), 11,69 (s, indol NH, 1H), 8,43 (d, J=2,4 Hz, protón aromático, 1H), 8,35-8,20 (m, protones aromáticos, 4H), 8,19 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 2H), 7,85-7,75 (m, protones aromáticos, 3H), 7,66 (d, J=9Hz, protones aromáticos, 2H), 7,45-7,18 (m, protones aromáticos, 12H), 7,10 (s, protón aromático, 1H), 7,01 (s, protón aromático, 1H), 6,99 (m, protones aromáticos, 3H), 6,88 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 4H), 4,61 (m, protones alifáticos, 6H), 4,14 (t, J=8,5 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,71 (s, $2\times\text{CH}_3\text{O}$, 6H), 3,59 (m, protones alifáticos, 2H), 3,43 (m, protones alifáticos, 6H), 3,34 (m, oscurecido por señal de agua, protones alifáticos, 2H), 3,22 (m, protones alifáticos, 2H), 3,08 (t, J=5 Hz, protones alifáticos, 2H), 2,5 (t, oscurecido por señal de DMSO, COCH_2 , 2H), 1,89 (m a, protones alifáticos, 4H). Análisis: Calculado: C, 68,27%; H, 4,95%; N, 10,81%. Hallado: C, 68,08%; H, 4,98%; N, 10,63%.

10 3-[[3-({3-[4-({3-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]propil)}4-[(2-cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil]amino)butanoil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-il]carbonil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-il]carbonil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de 2,3,4,5,6-pentafluorofenilo (25a).



Dentro de un matraz se coloca 1,0 g (0,73 mmol) del producto de la etapa anterior, 40 ml de THF y 2,46 g de DBU. Se agita la mezcla a 50 grados durante 4 horas, después, se retira del calor y se evapora hasta de 15 a 20 ml. Se añaden aproximadamente 40 ml de metanol al producto y la mezcla se agita y se somete a sonicación. Después, se filtra el precipitado con un embudo de vidrio sinterizado y se lava con 40-60 ml de metanol adicional, seguido de una cantidad similar de éter etílico, agitando cada vez el material en el filtro antes de aplicar el vacío, de modo que el efluente pronto se vuelve transparente. Se seca el producto a vacío durante una hora o dos antes de que se use en la etapa siguiente. Se disuelve el material en 20 ml de DMF en un matraz de 100 ml y se agita hasta disolverlo. Después, se añaden 0,6 ml (4,3 mmol) de trietilamina, seguido de 0,6 ml de PFP-TFA. Se agita la mezcla de reacción bajo argón durante toda una noche y después se evapora hasta una goma y se añaden ~ 10 ml de DMF, seguido de ~ 80 ml de metanol. Se remueve esta mezcla y se somete a sonicación, y después el producto, que precipita, se filtra y se seca a vacío. El rendimiento es de un 85% - 90%. RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ 12,01 (s, indol NH, 1H), 11,76 (s, indol NH, 1H), 11,69 (s, indol NH, 1H), 8,43 (d, J=2,4 Hz, protón aromático, 1H), 8,40 (s a, protón aromático, 1H), 8,35-8,20 (m, protones aromáticos, 3H), 7,85-7,75 (m, protones aromáticos, 3H), 7,59 (d, J=1,2 Hz, protón aromático, 1H), 7,45-7,18 (m, protones aromáticos, 12H), 7,13 (s, protón aromático, 1H), 6,99 (m, protones aromáticos, 3H), 6,88 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 4H), 4,66 (m, protones alifáticos, 4H), 4,14 (t, J=8,5 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,71 (s, $2\times\text{CH}_3\text{O}$, 6H), 3,59 (m, protones alifáticos, 2H), 3,43 (m, protones alifáticos, 6H), 3,34 (m, oscurecido por señal de agua, protones alifáticos, 2H), 3,08 (t, J=5 Hz, protones alifáticos, 2H), 2,5 (t, oscurecido por señal de DMSO, COCH_2 , 2H), 1,89 (m a, protones alifáticos, 4H). Análisis: Hallado: C, 63,58%; H, 4,13%; N, 9,53%. Calculado, para 2,3 moles de agua: C, 63,97%; H, 4,21%; N, 9,44%.

Ejemplo 6

DMTrO-Rojo 13-amida-CDPI₃-CPG (29) (Esquema de Reacción 7)

35 3-[(4-Metoxifenil)difenilamino]propan-1-ol (26).

Se disolvieron 4 g (53 mmol) de 3-aminopropanol agitando en 50 ml de cloruro de metileno en un matraz de fondo redondo de 250 ml secado en horno. Se detuvo esta disolución y se reservó. Se disolvieron 7,7 g (24,9 mmol) de cloruro de monometoxitritilo (MMT-Cl, Aldrich grado de reactivo) en otros 50 ml de cloruro de metileno. Se ajustó un embudo de goteo secado en horno al matraz y se añadió la solución de MMT-Cl al embudo. Después se añadió la solución de MMT-Cl a la solución en el matraz durante ~ 10 min (genera algo de calor). Después de una hora, se analizó la reacción por TLC (1:1 v/v de hexanos/acetato de etilo, R_f 0,4) y se encontró que se había completado. La visualización de manchas de TLC por pulverización de ninhidrina / calor mostró una traza de producto secundario de bis-MMT (movimiento más rápido). Se añadió la mezcla de reacción a 200 ml de agua situada sobre 200 ml de cloruro de metileno en un embudo de separación. Se agitó la mezcla y se separó en capas; se desechó la capa acuosa y se lavó la capa orgánica con 200 ml adicionales de agua. Se secó la capa orgánica sobre 10-20 g de sulfato de sodio y se

evaporó para dar ~ 7 g de la amina tritilada como un jarabe amarillo pálido. Este compuesto no requirió purificación adicional y se secó durante toda una noche. Después de varios días el jarabe solidificó. Se recrystalizó el producto a partir de éter-hexanos para dar 4,6 g (53 % de rendimiento) de **26** como un sólido blanco (pf = 89,5 - 90,5 CE). Anal. calc. para C₂₃H₂₅NO₂: C, 79,51; H, 7,25; N, 4,03. Hallado: C, 79,48; H, 7,18; N, 3,98.

5 *Sal de trietilamonio del ácido 2-[(3-[(4-metoxifenil)difenilamino]propil)oxicarbonil]metoxi-acético (27).*

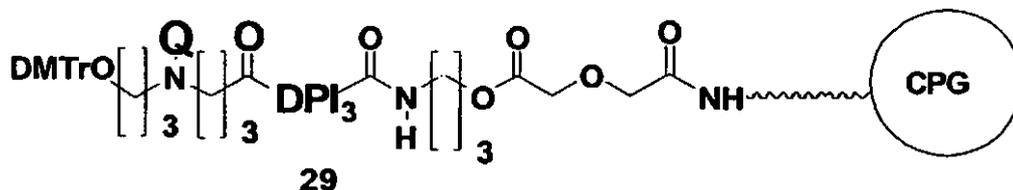
Se disolvieron 2,72 g (7,83 mmol) del alcohol (**26**) en 20 ml de cloruro de metileno con 1,3 ml (9,4 mmol) de trietilamina y 1,1 g (9,5 mmol) de anhídrido glicólico. Se agitó la mezcla durante 2 h (se volvió homogénea). La TLC mostró una reacción limpia (Rf = 0,35 en 9:1 / cloruro de metileno:metanol). Se retiró el disolvente por evaporación y se sometió a cromatografía el residuo en una columna en gel de sílice de 3,81 x 45,7 cm (1,5 x 18 pulgadas) empaquetada con un 93 % de cloruro de metileno, 5 % de metanol y 2 % de trietilamina. Se combinaron las fracciones que contenían producto y se retiró el disolvente por evaporación. La evaporación conjunta con DMF seco garantizó la retirada de trazas de agua y disolventes volátiles residuales. Se creyó que el rendimiento del jarabe incoloro (**27**) fue de un 100 %. Se disolvió el jarabe en DMF seco para dar un volumen final de 23,4 ml (disolución ~ 0,33 M).

Síntesis de N-MMT diglicolato CPG (28).

15 Se combinaron 10 g de LCAA-CPG con 5 ml de una disolución 0,33 M de **27** en DMF (1,66 mmol) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Se preparó una disolución de 2,5 ml de diisopropiletilamina, 0,11 g (0,8 mmol) de HOBT y 0,63 g (1,66 mmol) de HBTU y se añadió al CPG. Se taponó la mezcla y se removió durante 16 h en un agitador orbital (150 rpm). Se filtró el CPG en un embudo de vidrio sinterizado de porosidad media y se lavó con 2x 100 ml de DMF, 2x 100 ml de acetonitrilo y 2x 100 ml de éter. Se retiraron las trazas de éter a vacío (bomba de aceite). Se acetilaron los grupos amino sin reaccionar tratando el CPG con 40 ml de piridina seca y 5 ml de anhídrido acético. Después de remover durante 1,5 h, se filtró el CPG y se lavó con 2x 100 ml de DMF, 2x 100 ml de acetonitrilo y 2x 100 ml de éter. Se retiraron las trazas de éter a vacío (bomba de aceite). Se analizó el CPG para determinar la carga de MMT tratando 3-5 mg de CPG en 25 ml de 1: 1 70 % de ácido perclórico:metanol. Se registró la absorbancia del catión de MMT liberado a 472 nm y se calculó el nivel de carga para ser de 95,7 :mol / g de CPG usando la ecuación:

25 Carga de MMT (:mol / g) = A₄₇₂ x volumen (en ml) x 14,3 ÷ peso de CPG (mg)

Síntesis de CPG 29.

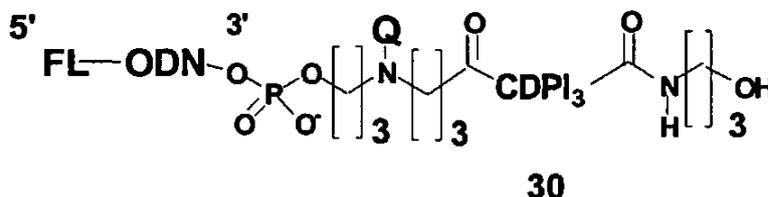


30 Se pesaron 4 g de N-MMT diglicolato CPG (**28**) en un embudo de vidrio sinterizado de porosidad media. Se destrilló el CPG tratándolo con 25 ml de TCA al 3%/DCM. Después de agitar brevemente con una espátula, se hizo reaccionar la mezcla durante 5 minutos antes de filtrar (se volvió amarilla). Se repitió el procedimiento cuatro veces hasta que el filtrado fue incoloro. Se lavó el CPG con 4x 40 ml de cloruro de metileno. Se desechó el filtrado para residuos orgánicos, y se neutralizó el CPG por tratamiento con 40 ml de 20 % de trietilamina en acetonitrilo. Después de agitar brevemente con una espátula, se filtró la mezcla y se lavó con 2x 40 ml de acetonitrilo y 2x 40 ml de éter. Se retiraron las trazas de éter a vacío (bomba de aceite). Se usó el CPG destrillado inmediatamente para la siguiente reacción de inmovilización.

35 Se agitaron 0,259 g (180 :mol) de **25a** con 12 ml de DMSO seco, en un tubo de polipropileno de 15 ml. Después de 15 min, se añadió la disolución púrpura oscuro a 4 g de diglicolato destrillado CPG (en un matraz de fondo redondo de 50 ml). Esto corresponde a una proporción de producto de 45 :mol de éster de PFP por gramo de CPG. Se añadieron 5 ml adicionales de DMSO al tubo de polipropileno para disolver el éster de PFP residual y se añadió la disolución al CPG. 40 Se añadieron 2 ml de trietilamina y se taponó la mezcla y se removió en un mezclador orbital durante 14 horas. Se filtró el CPG y se lavó con 2x 50 ml de DMSO, 2x 50 ml de acetonitrilo y 2x 50 ml de éter. Se retiraron las trazas de éter a vacío (bomba de aceite). Se acetilaron los grupos amino sin reaccionar tratando el CPG con 10 ml de piridina seca y 3 ml de anhídrido acético. Después de remover durante 6 h, se filtró el CPG y se lavó con 2x 50 ml de DMF, 2x 50 ml de acetonitrilo y 2x 50 ml de éter. Se retiraron las trazas de éter a vacío (bomba de aceite). Se analizó el CPG para determinar la carga de DMT tratando 3-5 mg de CPG en 25 ml de 1:1 / 70 % de ácido perclórico:metanol. Se registró la absorbancia del catión de DMT liberado a 498 nm y se calculó el nivel de carga para ser de 45 :mol / g de CPG usando la ecuación:

Carga de DMT (:mol / g) = A₄₉₈ x volumen (en ml) x 14,3 ÷ peso de CPG (mg)

Ejemplo 7

Síntesis de FL-ODN-Rojo 13-amida-CDPI₃ (30).

Se sintetizaron los oligonucleótidos en el CPG 29 usando química de acoplamiento de fosforamidita estándar, excepto porque se diluyó la disolución de oxidación de I₂ 0,1 estándar hasta 0,01-0,015 para evitar la yodización del resto MGB. Se incorporaron FAM y TET en el extremo 5' usando las fosforamiditas correspondientes disponibles de Glen Research.

Ejemplo 8

2,2-Dimetilpropanoato de 4-[[N-(6-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinooxi]hexil)carbamoil]metil]-2-oxo-2H-cromen-7-ilo (34a).10 *N*-(6-hidroxihexil)-2-(7-hidroxi-2-oxo(2H-cromen-4-il))acetamida (32a).

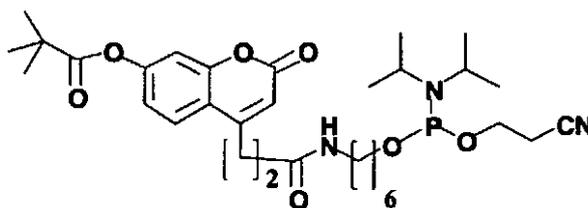
Se sintetizó el éster metílico del ácido (7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)-acético (1) de acuerdo con Baker et al. (J. Chem. Soc.; 1950; 170, 173.).

Se calentó una disolución de **31** (2,0 g, 8,5 mmol) y 6-aminohexanol (4,0 g, 34,1 mmol) en 15 ml de DMF a 80 °C durante 24 h. Se evaporó la DMF a vacío para proporcionar la mezcla del producto y el exceso de 6-aminohexanol como un jarabe viscoso. La cromatografía en gel de sílice eluyendo con MeOH al 10%/CH₂Cl₂ y la evaporación de las fracciones de producto puras proporcionaron un sólido blanco que se lavó con éter y se secó a vacío. El rendimiento fue de 2,05 g (75 %).

2,2-Dimetilpropanoato de 4-[[N-(6-hidroxihexil)carbamoil]metil]-2-oxo-2H-cromen-7-ilo (33a).

A una disolución de **32a** (2,0 g, 6,3 mmol) en 20 ml de piridina seca se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitrietilmetilo (3,0 g, 8,9 mmol). Se mantuvo la disolución a temperatura ambiente durante 1 h, el análisis de TLC (acetato de etilo, R_f ~ 0,7) mostró la reacción completa (protección del grupo hidroxil principal). A esta disolución se le añadió anhídrido trimetilacético (2,0 ml, 9,9 mmol) seguido de trietilamina (5 ml) y 4-(dimetilamino)piridina (0,3 g). Se agitó la mezcla durante 5 h, el análisis de TLC mostró una protección completa del grupo fenol (R_f ~ 0,9, acetato de etilo). Se añadió metanol para desactivar el anhídrido en exceso. Se retiró la piridina por evaporación a vacío y evaporación conjunta con xileno. Se fraccionó el producto obtenido entre acetato de etilo y 2% de NaHCO₃, se concentró la fase orgánica a vacío para dar **33a** protegido con DMT bruto.

Para retirar el grupo DMT, se disolvió el derivado de DMT en 100 ml de MeOH al 10% en CH₂Cl₂ y se trató con 0,5 ml de ácido trifluoroacético. Después de agitar durante 1 h, se neutralizó la mezcla de reacción con trietilamina (0,7 ml) y se concentró. Se fraccionó el aceite viscoso resultante entre acetato de etilo y agua. Se secó la capa orgánica sobre Na₂SO₄ y se concentró. Se suspendió el sólido obtenido en éter (50 ml) y se agitó durante 30 min. El producto deseado fue el material insoluble y se recogió por filtración, se lavó con éter y se secó. El rendimiento del producto del título **33** fue de 1,6 g (64 %).

2,2-Dimetilpropanoato de 4-[[N-(6-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinooxi]hexil)carbamoil]metil]-2-oxo-2H-cromen-7-ilo (34).

35

A una disolución de **33a** (0,6 g, 1,5 mmol) en 10 ml de CH₂Cl₂ anhidro se le añadió trietilamina (0,4 ml) seguido de diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo (0,35 ml, 1,6 mmol). Se mantuvo la disolución a temperatura ambiente

durante 1 h y se trató con 0,1 ml de MeOH. Se evaporó el disolvente y se fraccionó el residuo entre acetato de etilo y NaHCO₃ saturado. Se lavó la fase orgánica con NaCl saturado, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. El producto en bruto se sometió a cromatografía en gel de sílice eluyendo con un 5 % de trietilamina en acetato de etilo. La concentración de las fracciones de producto puras y el secado a vacío proporcionó 0,59 g (65%) de **34** como un aceite incoloro, viscoso.

Ejemplo 9

2,2-dimetilpropanoato de 8-(3-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinooxi]propil)-7-oxofenoxazin-3-ilo (**37a**). (Esquema de reacción 9)

7-Hidroxi-2-(3-hidroxi)propil)fenoxazin-3-ona (**35a**).

Se enfrió una suspensión de 4-nitrosorecorcinol (4,5 g, 32,4 mmol), 4-(3-hidroxi)propil)benceno-1,3-diol (Forchiassin, M.; Russo, C., J. Heterocyc. Chem., 1983, 493-494.) (4,0 g, 23,8 mmol) y MnO₂ (2,5 g, 17,6 mmol) en 50 ml de MeOH hasta ~ 0 °C (baño de hielo). A esta suspensión se le añadieron gota a gota 2,5 ml de H₂SO₄ conc. y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 5 h. Se recogió el compuesto de resazurina rojo precipitado por filtración, se lavó con metanol y se secó. El rendimiento fue de 5,5 g. Este producto no fue homogéneo, estaba contaminado con compuesto de resorufina y sales de manganeso.

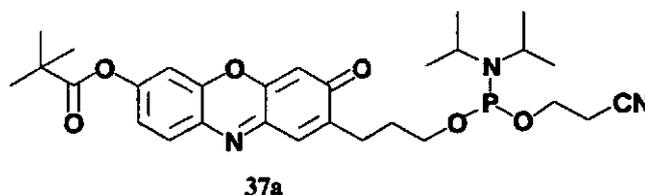
Se suspendió el compuesto de resazurina en bruto en una mezcla de 200 ml de agua y 50 ml de NH₄OH conc. Se añadió polvo de cinc (2,0 g) y se agitó la suspensión durante 20 min. Se filtró la mezcla púrpura resultante, se agitó vigorosamente el filtrado en aire para oxidar la leuco-resorufina, el producto de la sobre-reducción parcial. Se acidificó la reacción con ácido acético, se recogió el sólido marrón formado por filtración, se lavó con agua y se secó. El rendimiento fue de 2,1 g. El material contenía ~ 50 % de 2,3,4-trihidro-2H-pirano[3,2-b]fenoxazin-9-ona, producto de la ciclación intramolecular que se había pospuesto desde la primera etapa. El resto del material fue el compuesto del título deseado **35**.

2,2-Dimetilpropanoato de 8-(3-hidroxi)propil)-7-oxofenoxazin-3-ilo (**36b**).

Se trató una suspensión de **35a** (2,0 g) en 50 ml de piridina con cloruro de 4,4'-dimetoxitrietilmetilo (5,0 g, 14,8 mmol) y se agitó durante 5 h. Se filtró la mezcla para retirar algo de material insoluble y se trató el filtrado con anhídrido de trimetilacético (2 ml). Se agitó la solución durante 15 h y se añadió MeOH (2 ml) para desactivar el anhídrido en exceso. Después de agitar durante 3 horas, se concentró la mezcla de reacción a vacío. Se retiró la piridina residual por evaporación conjunta con trietilamina y xileno. El producto en bruto resultante **36a** se sometió a cromatografía de sílice eluyendo con acetato de etilo al 50 %/hexano.

Se disolvió el derivado de DMT en 100 ml de MeOH al 10 %/CH₂Cl₂ y se trató con 0,5 ml de ácido trifluoroacético. Después de 1 h, se añadió trietilamina (2 ml) y se concentró la solución. La cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo) y el secado proporcionó 0,38 g del producto deseado como un sólido naranja.

2,2-Dimetilpropanoato de 8-(3-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinooxi]propil)-7-oxofenoxazin-3-ilo (**37a**).



Se disolvió **36b** (0,38 g, 1,1 mmol) en 6 ml de CH₂Cl₂ anhidro. Se añadió trietilamina (1,5 ml) seguido de diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo (0,29 ml, 1,3 mmol). Se mantuvo la disolución a temperatura ambiente durante 30 min, se añadió MeOH (0,1 ml) y se concentró la reacción a vacío. Se fraccionó el residuo obtenido entre acetato de etilo y NaHCO₃. Se lavó la fase orgánica con NaCl saturado, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para proporcionar la amidita en bruto. Se disolvió en 2 ml de éter y se añadió gota a gota a ~ 50 ml de hexano. Se recogió el sólido naranja resultante por filtración, se lavó con hexano y se secó. El rendimiento fue de 0,4 g.

Ejemplo 10

3-[[[(Terc-butil)(metiletil)amino][2-(4-{3-butil-7-[(4-metifenil)-carbonil]-2,4,6,8-tetraoxo-1-(fenilcarbonil)(1,3,5,7,9,10-exahidro-pirimidino[5',4'-5,6]piridino[2,3-d]pirimidin-10-il)}fenil)etoxi]-fosfinooxi]propanonitrilo (PPT) **44** (Esquema de reacción 10)

3-n-Butil-6-[4-(2-hidroxi)etil]aminofenil]uracilo **40**.

Se calentó una mezcla de 6-cloro-3-n-butiluracilo (10,4 g, 51,3 mmol), 2-(4-aminofenil)etanol (10,0 g, 72,9 mmol) y

etil-diisopropilamina (18 ml, 0,1 mol) con agitación bajo argón en un baño de aceite a 150° durante 1 h 20 min. se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente, se diluyó con 50 ml de agua, se trató con 10 ml de ácido acético y se agitó para cristalización durante toda una noche. Se filtró el sólido precipitado, se lavó con un ácido acético al 2%, se secó sobre filtro y se disolvió en 100 ml de etanol al 96 % caliente. A la disolución se le añadieron 100 ml de agua caliente, seguido de 1,0 g de carbón activado. Se filtró la mezcla en caliente y se cristalizó en hielo. Se recogió el sólido amarillo por filtración y se secó a vacío para proporcionar 10,7 g de **40**, p.f. 207-208 °C. RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 0,88 (t, 3H, J = 7,3 Hz, CH₃), 1,25 (m, 2H, CH₂), 1,46 (m, 2H, CH₂), 2,70 (t, 2H, J = 6,8 Hz, CH₂), 3,60 (dd, 2H, J = 11,8, 6,8 Hz, CH₂), 3,68 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂), 4,62 (t, 1H, J = 5,3 Hz, OH), 4,73 (d, 1H, J = 1,8 Hz, 5-H), 7,10 (d, 2H, J = 8,4 Hz, ArH), 7,23 (d, 2H, J = 8,4 Hz, ArH), 7,10 (s, 1H, NH), 10,37 (s, 1H, NH).

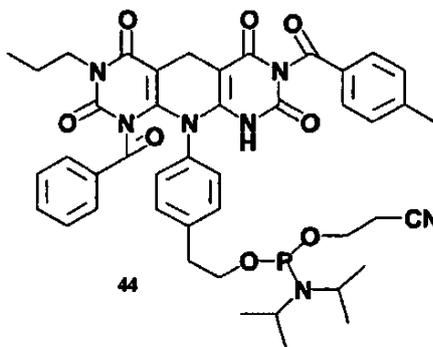
10 **3-n-Butil-10-[(2-hidroxietil)fenil]pirido[2,3-d; 6,5-d']dipirimidina-2,4,6,8-(3H,7H,9H,10H)-tetrona 41.**

Se agitó una disolución de **40** (6,6 g, 20 mmol) y 5-formil-2,4,6-tricloropirimidina (5,85 g, 27,7 mmol) en 80 ml de DMF seca a TA durante 8 horas y se diluyó lentamente con 80 ml de agua. La disolución produjo un sólido después de refrigeración durante 2 días. Se aisló el producto por filtración, se lavó con etanol al 50 % frío (50 ml) y etanol al 25 % (50 ml) y se secó a vacío para proporcionar 8,16 g (96 %) de **41** como un sólido incoloro, pf 205-215 °C (descomp). RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 0,88 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃), 1,27 (m, 2H, CH₂), 1,48 (m, 2H, CH₂), 2,81-2,90 (m, 2H, CH₂), 3,71-3,85 (m, 4H, CH₂), 4,50 (s a, 5H, OH, NH, H₂O), 7,26 (d, 2H, J = 8,4 Hz, ArH), 7,44 (d, 2H, J = 8,4 Hz, ArH), 8,62 (s, 1H, 5-H).

15 **3-n-Butil-5,10-dihidro-10-[(2-hidroxietil)fenil]pirido[2,3-d;6,5-d']dipirimidina-2,4,6,8-(1H,3H,7H,9H,10H)-tetrona. 42**

A una suspensión de **41** (7,91 g, 18,7 mmol) en 300 ml de NH₃ ac. al 25 % se le añadió Na₂S₂O₄ (13,8 g, 85 %, 67 mmol) y se calentó lentamente hasta 60° con agitación. Se agitó la mezcla a 60° durante 40 minutos, se diluyó con agua (100 ml) y se agitó durante 1 hora adicional a la misma temperatura. Se formó una disolución transparente. se evaporó parcialmente la disolución hasta la mitad de su volumen original, se enfrió con hielo y se neutralizó con 50 ml de ácido acético a pH 5 hasta formar un precipitado. Se mantuvo la mezcla en la nevera para su cristalización completa, se filtró y se lavó con agua fría. Se secó el sólido a vacío para proporcionar 7,32 g (92 %) de **42** como un sólido blanco, pf 182-210 °C (descomp). RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 0,86 (t, 3H, J = 7,3 Hz, CH₃), 1,23 (m, 2H, CH₂), 1,42 (m, 2H, CH₂), 2,80 (t, 2H, J = 6,6 Hz, CH₂), 3,14 (s, 2H, 5-CH₂), 3,68 (m, 4H, ArCH₂CH₂), 4,64 (t, 1H, OH), 7,25 (d, 2H, J = 8,3 Hz, ArH), 7,33 (d, 2H, J = 8,3 Hz, ArH), 7,73 (s a, 3H, NH).

PPT 44



30 Se evaporó el **42** sólido (1,2 g, 2,82 mmol) con piridina (10 ml), se suspendió en piridina (13 ml), se trató con Me₃SiCl (2,2 ml, 17,3 mmol) y se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 30 min. Se enfrió la mezcla de reacción con hielo y se trató lentamente con cloruro de toluoilo (5 ml, 28,8 mmol). Se continuó agitando a temperatura ambiente durante 2 horas, y se evaporó el disolvente. Se trató el residuo con ácido acético (10 ml) seguido de adición de agua (10 ml). Se extrajo el aceite precipitado con hexanos (3x 50 ml) y se evaporó con agua el residuo que era insoluble en hexanos. Se suspendió el residuo en etanol al 96 % (10 ml) y se filtró para recuperar 0,3 g del material de partida. Se diluyó el licor madre con agua para precipitar el derivado de bis-toluoilo como un aceite. Se secó el aceite a vacío para dar 0,96 g (52 %) de **43** como una espuma sólida. Este compuesto sin purificación adicional se convirtió en fosforamidita por el siguiente procedimiento. Se evaporó el sólido con acetonitrilo, se disolvió en 25 ml de diclorometano, se trató con tetrazolida de diisopropilamonio (0,54 g, 3,13 mmol) seguido de tetraisopropilfosforodiamidita de 2-cianoetilo (0,88 g, 2,9 mmol). Se agitó la mezcla de reacción bajo argón durante 1 hora, se trató con metanol (1 ml), se suspendió en EtOAc (100 ml), se lavó con disolución de NaCl sat. y se secó sobre Na₂SO₄. Se evaporó la disolución, se purificó por HPLC en columna de gel de sílice usando un sistema de gradiente de 0-50 % de B; CH₂Cl₂-hexanos-NEt₃ (15:30:1) (A); EtOAc (B); detectado a 320 nm. Se evaporó la fracción principal dando una espuma incolora, 0,79 g (33 %) de fosforamidita AG1 **44**. RMN de ¹H (CDCl₃) δ 0,92 (t, 3H, J = 7,3 Hz, CH₃), 1,07-1,42 (m, 14H, 4xCH₃ (i-Pr), CH₂ (Bu)), 1,50-1,65 (m, 2H, CH₂ (Bu)), 2,35-2,60 (m, 2H, CH₂CN), 2,40 (s, 3H, CH₃Ar), 2,46 (s, 3H, CH₃Ar), 2,95-3,13 (m, 4H, 2xCH (i-Pr), CH₂ (Bu)), 3,45-3,60 (m, 2H, OCH₂), 3,80-4,02 (m, 4H, ArCH₂CH₂), 3,82 (s, 2H, 5-CH₂), 7,15-7,35 (m, 8H, ArH (Tol)), 7,45 (s, 1H, NH), 7,73 (s a, 3H, NH), 7,95 (d, 2H, J = 8,0

H_z, ArH), 8,05 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, ArH). RMN de ³¹P (CDCl₃) δ (ppm, H₃PO₄) 143,2 (s).

Ejemplo 11

N-{3-[4-[(1Z)-1-aza-2(dimetilamino)prop-1-enil]-1-(5-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-4-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetil)fosfinooxi]oxolan-2-il)]pirazolo[5,4-d]pirimidin-3-il]propil}[2-{{4-[(2-cloro-4-nitrofenil) diazenil]fenil}etilamino)-etoxi]carboxamida (50) (Esquema de reacción 11)

4-Amino-1-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-3-(3-trifluoroacetimido-propin-1-il) pirazolo[3,4-d]pirimidina (46; n = 1).

A una mezcla de **45** (1,96 g, 5,20 mmol), CuI (103 mg, 0,54 mmol) y tetraquis[trifenilfosfina]paladico[0] (317 mg, 0,276 mmol) en 10 ml de DMF anhidra se le añadió trietilamina anhidra (1,1 ml) seguido de propargil-trifluoroacetimida (1,50g, 9,88 mmol). Se agitó la mezcla de reacción bajo argón durante 4 h. Se retiró el disolvente de DMF por evaporación y se purificó el aceite residual por cromatografía en gel de sílice eluyendo con metanol al 7 % en acetato de etilo. Se combinaron las fracciones de producto y se evaporaron proporcionando una espuma: 2,16 g (rendimiento del 99 %).

4-Amino-1-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-3-(3-aminopropil)pirazolo[3,4-d]pirimidina (47; n=1).

A una disolución de **46** (2,10 g, 5,25 mmol) en 50 ml de etanol, que contenía 0,300 mg de paladio al 5% sobre carbono (preactivado con ácido fórmico), se le añadió 1,0 ml de tampón de formiato de trietilamonio 4 M (pH 6,5). Se agitó la mezcla a 40 psi (2,76 bar) de gas hidrógeno durante 18 h. Se filtró la mezcla a través de Celite y se evaporó el filtrado proporcionando un sólido. 1,8 g (rendimiento del 85 %).

Se agitó el sólido en 15 ml de hidróxido de amonio concentrado (matraz sellado) durante 12 h y después se evaporó hasta sequedad. Se evaporó el sólido (**47**) a partir de acetonitrilo seco y se almacenó a vacío: 1,74 g de rendimiento.

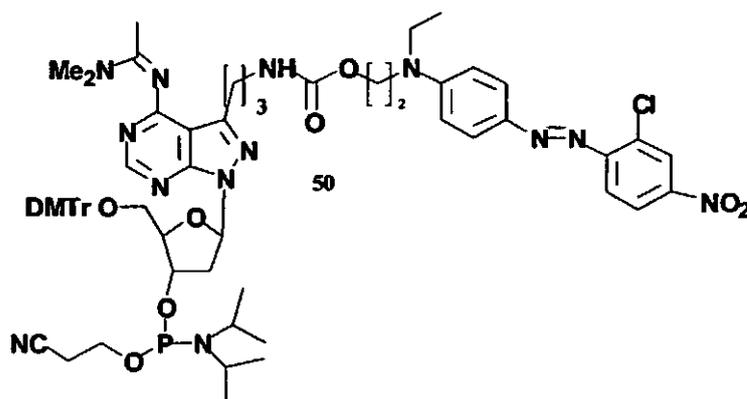
Síntesis de 48 (n=1, q=2, R₅=CH₃CH₂-, R₅, R₅=H, R₁=2-Cl, R₅=4-NO₂).

Se agitó una disolución de **47** (0,90 g, 2,92 mmol) y **7** (1,59 g, 2,92 mmol) en 5,0 ml de dimetilformamida anhidra, que contenía 1,0 ml de trietilamina a 50 °C durante 1 h. Se evaporó la disolución hasta sequedad y se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de metanol al 0-20 % en acetato de etilo. Se evaporaron las fracciones de producto proporcionando un sólido amorfo: 0,74 g (rendimiento del 37 %).

Síntesis de 49 (n=1, q=2, R₅=CH₃CH₂-, R₅, R₅=H, R₁=2-Cl, R₅=4-NO₂).

A una disolución de **48** (0,71 g, 1,03 mmol) y dimetilacetal de N,N-dimetilacetamida (1,9 ml) en 5,0 ml de dimetilacetamida se le añadieron 2,0 ml de trietilamina. Se agitó la disolución durante 18 horas y después se evaporó hasta sequedad proporcionando un aceite: 0,75 g (rendimiento del 100 %).

Síntesis de 50 (n=1, q=2, R₅=CH₃CH₂-, R₅, R₅=H, R₁=2-Cl, R₅=4-NO₂).



Se añadió cloruro de dimetoxitritilo (0,42 g) a una disolución de **49** (0,75 g, 1,03 mmol) en 10 ml de piridina seca. Se agitó la disolución durante 4,0 h bajo argón y después se vertió en 200 ml de disolución de bicarbonato de sodio al 5%. Se extrajo el producto con 300 ml de acetato de etilo. Se secó el extracto sobre sulfato de sodio y se evaporó. Se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con metanol al 10 % en acetato de etilo (trietilamina al 1 %). Se evaporaron las fracciones de producto proporcionando una espuma: 556 mg (rendimiento del 57 %).

A una solución del derivado de 5'-dimetoxitritilo (540 mg, 0,567 mmol) en 15 ml de cloruro de metileno anhidro, y que contenía 0,30 ml de diisopropilamina, se le añadió N, N-diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo (0,25 ml). Después de agitar durante 30 minutos bajo argón a 25 °C, se trató la disolución con 1,0 ml de metanol y se diluyó con

200 ml de acetato de etilo. Se lavó la disolución con 200 ml de disolución de bicarbonato de sodio al 5 % y se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó. Se purificó el producto en bruto por cromatográfica en gel de sílice, eluyendo con metanol al 5 % en acetato de etilo (trietilamina al 2 %). Se evaporaron las fracciones de producto proporcionando una espuma: 453 mg (rendimiento del 76 %).

5 Ejemplo 12

Síntesis de sondas de oligodesoxinucleótidos fluorogénicos.

Se prepararon las sondas 3'-DPI₃ por síntesis de ADN automatizada a partir de soporte de vidrio modificado con DPI₃ usando procedimientos descritos anteriormente (Lukhtanov et al. *Biorg. Chem.*, 7: 564-567 (1996)). Se realizó la síntesis de oligonucleótidos en un sintetizador ABI 394 de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante excepto porque se utilizó una disolución de yodo 0,015 M (en lugar del estándar 0,1 M) en la etapa de oxidación para evitar la yodización del resto CDPI₃. Para evitar la ampliación durante PCR, se prepararon sondas sin 3'-CDPI₃ con el fosfato de 3'-hidroxihexilo, como se describe previamente (Gamper et al. *Biochem.* 36: 14816-14826 (1997)). Se añadieron las fosforamiditas desactivadoras al CPG y se usaron β-cianoetilfosforamiditas y reactivos estándar (Glen Research, Sterling, VA) en la síntesis de oligonucleótidos. Se usó fosforamidita de 6-carboxifluoresceína (6-FAM) (Glen Research) para introducir los colorantes 5'-indicadores. De forma alternativa, se usó fosforamidita de TAMRA-dU (Glen Research), fosforamidita de cy3 o cy5 (Glen Research), fosforamidita de resorufina, fosforamidita de cumarina o fosforamidita de AG para introducir el 5'-fluoróforo indicado. Se incorporó la fosforamidita de 5'-hexilamina (Glen Research) en determinados ODN para conjugación postsintética del colorante 3'desactivador tetrametilrodamina (TAMRA). Después de la desprotección, todos los oligonucleótidos se purificaron con HPLC de fase inversa y se aislaron como sales de sodio por concentración con butanol / precipitación con perclorato de sodio (Milesi et al. *Methods Enzym.* 313: 164-173 (1999)).

Ejemplo 13

Conjugación postsintética de ODN con TAMRA.

Se usó el éster de TAMRA NHS (Glen Research) para acilar los enlazadores de hexilamina en determinados ODN de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Se purificaron las sondas con CDPI₃ resultantes con dos colorantes conjugados desnaturalizando por electroforesis en gel usando poliacrilamida al 8 %. Se escindieron las bandas deseadas y se incubaron las láminas de gel durante toda una noche a 37 °C en 10 ml de Tris-HCl 100 mM, cloruro de trietilamonio 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,8). Se aislaron los productos del extracto por HPLC de fase inversa, concentración con butanol y precipitación con perclorato de sodio. Se disolvieron los sedimentos en agua y se determinaron espectrofotométricamente las concentraciones. Un modelo vecino más próximo (Cantor, et al. *Biopolymers* 9: 1059 - 1077 (1970) se aplicó para calcular los coeficientes de extinción (ϵ_{260}) de los ODN. Para los conjugados y las sondas, se calcularon los coeficientes de extinción como una suma de ϵ_{260} para los ODN y los residuos incorporados de DPI₃ ($68.000 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$), 6-FAM ($22.800 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$), TAMRA ($34.000 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$) y desactivador ($11.300 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$).

35 Ejemplo 14

Digestión de oligonucleótidos por fosfodiesterasa de veneno de serpiente.

Se digirieron los oligonucleótidos con fosfodiesterasa de veneno de serpiente (PDE) para estudiar la el potencial de desactivación de fluorescencia de diversos desactivadores. Se añadieron 200 nM de oligonucleótido en un tampón que contenía NaCl 40 mM, Tris 20 mM (pH 8,9) MgCl₂ 5 mM y 0,025 % de BSA. Se leyó la fluorescencia inicial en un fluorímetro LS50B (Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA) antes de la adición de fosfodiesterasa (Pharmacia, Piscataway, NJ) se añadieron 54 unidades de enzima a la mezcla de reacción y se incubó a 37 °C durante 16 horas. Después, se midió la fluorescencia final usando el LS50B. La proporción de fluorescencia final con respecto a la fluorescencia inicial representa la proporción señal-ruido (S/N) de los desactivadores. Independientemente, se monitorizaron la cinética de las reacciones de digestión usando el LS50B para determinar el tiempo requerido para la digestión completa de oligonucleótidos.

Ejemplo 15

Ensayo de PCR 5'-nucleasa.

Se conjugaron oligonucleótidos conjugados con CDPI₃ con un fluoróforo, FAM en el extremo 5' y se conjugaron diversos desactivadores a través de un enlazador en el extremo 3' por los procedimientos descritos anteriormente. Se realizaron ensayos de 5'-nucleasa con los oligonucleótidos anteriores para determinar la capacidad de desactivación de los diversos desactivadores bajo investigación. Se realizó la monitorización fluorescente en un LC-24 LightCycler de Idaho Technologies. Cada reacción contenía un tampón de PCR (NaCl 40 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,9, MgSO₄ 5 mM, seroalbúmina bovina al 0,05 %), cada dNTP 125 mM, cada cebador 0,5 mM, sonda de CDPI₃ fluorescente 0,1 mM, 0,5 U/10 ml Taq polimerasa y 0,1 ng/10 ml de ADN sintético como plantilla. El programa de ciclación fue de 50 ciclos (o como se indica) de 2 segundos a 95CE, después de 30 segundos a la temperatura de extensión (55-70E).

REIVINDICACIONES

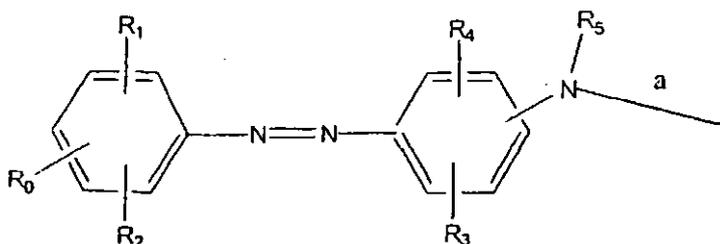
1. Un conjugado de oligonucleótido que tiene la fórmula

FL-ODN-Q

en la que ODN es un oligonucleótido o ácido nucleico;

- 5 FL es un resto fluoróforo unido covalentemente al ODN a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, y

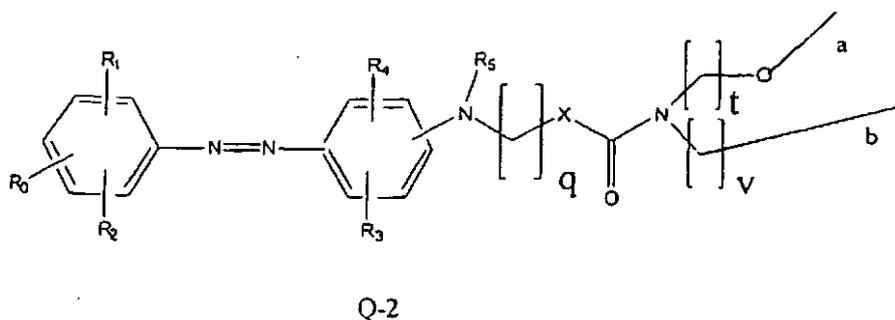
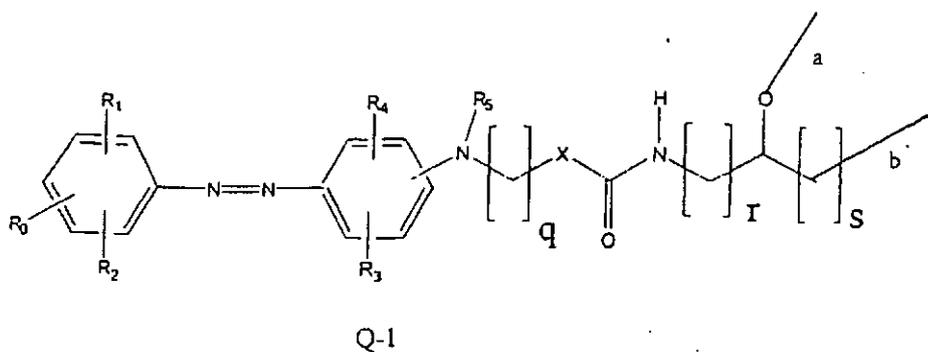
Q es un resto desactivador unido covalentemente al ODN a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo el resto desactivador la estructura

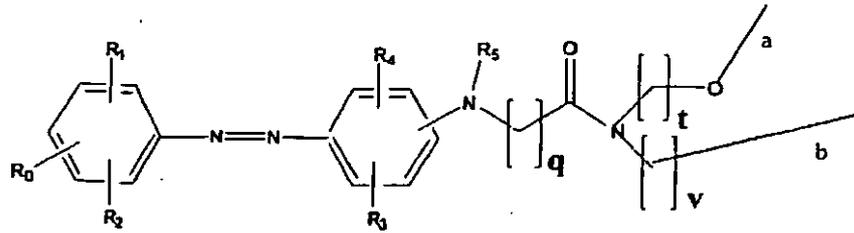


- 10 en la que R₀, R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente -H, halógeno, -O(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_nCH₃ en la que n= 0 a 5, -NO₂, -SO₃, -N[(CH₂)_nCH₃]₂ en la que n'= 0 a 5 o -CN, y R₅= -H o -(CH₂)_nCH₃ en la que n''= 0 a 5, y en la que el resto desactivador se une al enlazador a través del enlace de valencia designado a.

- 15 2. Un conjugado de oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₀ es H, R₁ es NO₂ en la posición 4 del núcleo de benceno, R₂ es H o Cl en la posición 2 del núcleo de benceno, y R₃ y R₄ son hidrógeno y R₅ es etilo.

3. Un conjugado de oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el resto desactivador y el enlazador que lo une al ODN comprende las estructuras seleccionadas de los restos mostrados por las fórmulas Q-1, Q-2 y Q-3

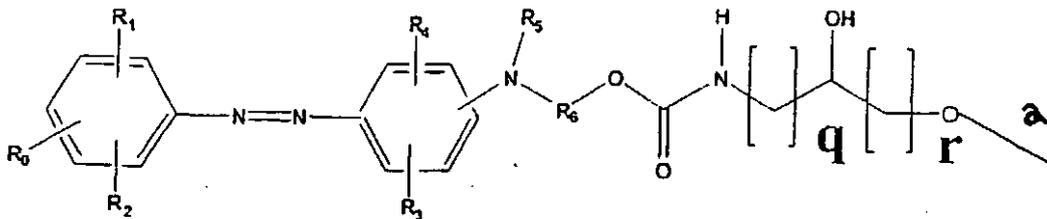




Q-3

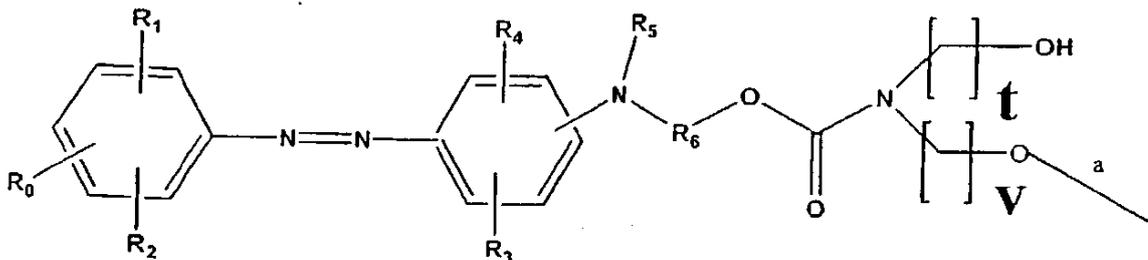
en las que q es de 1 a 20, X es -O-, -OCH₂- o CH₂-; t y v son independientemente de 1 a 20, r y s son independientemente de 1 a 20, y el resto de desactivador y enlazador conjugados se une al ODN a través de uno de los enlaces de valencia designados a o b.

- 5 4. Un conjugado de oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además un resto de ligando del surco menor unido al conjugado desactivador-enlazador a través de uno de los enlaces de valencia designados a o b.
5. Un conjugado de oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el resto desactivador y el enlazador que lo une al ODN comprende las estructuras seleccionadas de los restos mostrados por las fórmulas Q-4 y Q-5



Q-4

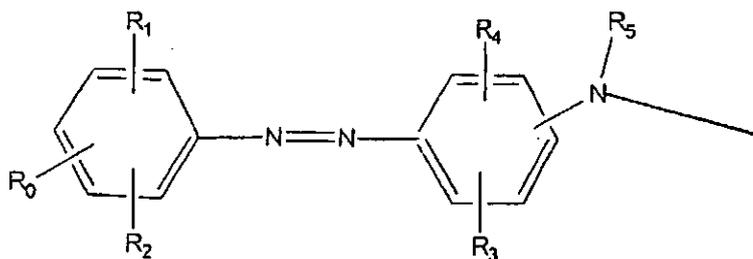
10



Q-5

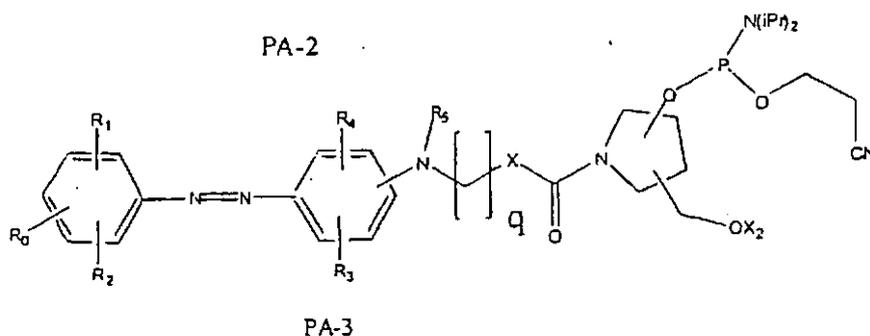
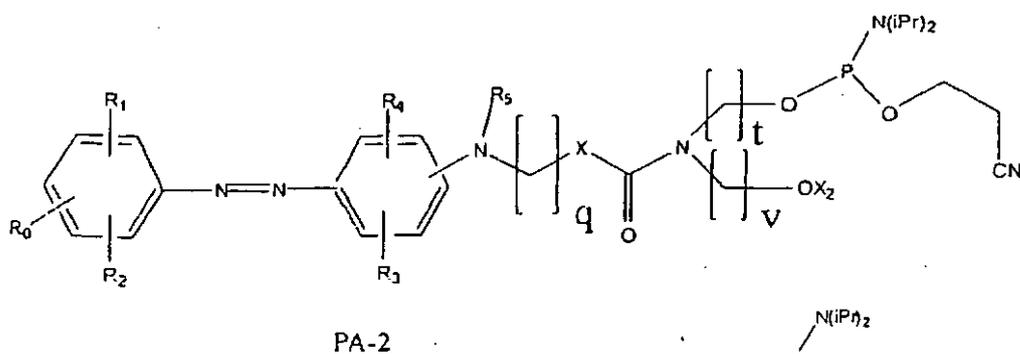
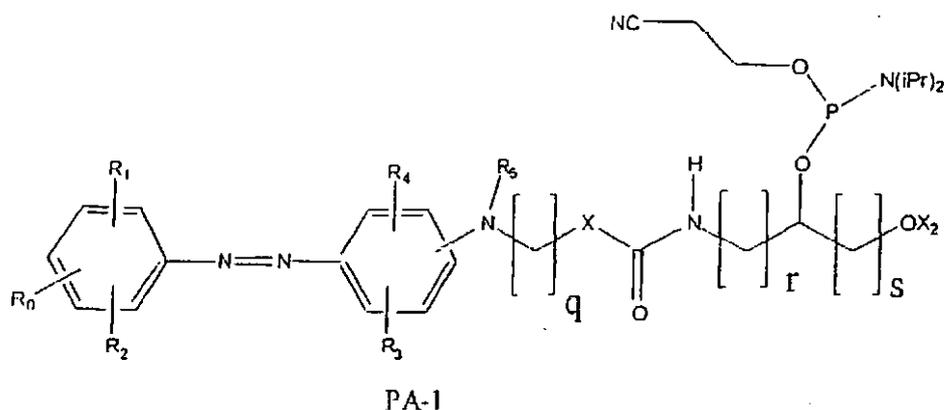
en la que R₆ es -(CH₂)_{n*} en la que n* es de 1 a 20, y q, r, t y v son independientemente de 1 a 20, y en la que el resto desactivador se une al ODN a través del enlace de valencia designado a.

- 15 6. Un reactivo de fosoramidita para preparar un conjugado oligonucleótido-fluoróforo-desactivador, incluyendo el reactivo el resto



en el que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente -H, halógeno, $-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$ en la que $n=0$ a 5, $-NO_2$, $-SO_3$, $-N[(CH_2)_{n'}CH_3]_2$ en la que $n'=0$ a 5 o -CN, y $R_5=-(CH_2)_{n''}CH_3$ en la que $n''=0$ a 5, y un resto bis(metiletil)amino] (2-cianoetoxi)fosfinoxi unido covalentemente a él.

- 5 7. Un reactivo de fosoramidita de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene la fórmula seleccionada del grupo que consiste en las fórmulas designadas PA-1, PA-2 y PA-3.

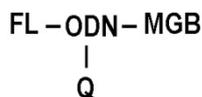


- 10 en las que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente -H, halógeno, $-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$ en la que $n=0$ a 5, $-NO_2$, $-SO_3$, $-N[(CH_2)_{n'}CH_3]_2$ en la que $n'=0$ a 5 o -CN, y $R_5=-(CH_2)_{n''}CH_3$ en la que $n''=0$ a 5, q es de 1 a 20, X es -O- o $-CH_2-$; t , v , r y s son independientemente de 1 a 20, y X_2 es H o dimetoxitritilo, metoxitritilo, tritilo o un grupo de bloqueo lábil en ácido.

8. Un conjugado de oligonucleótido que tiene la fórmula

FL-ODN-Q-MGB;

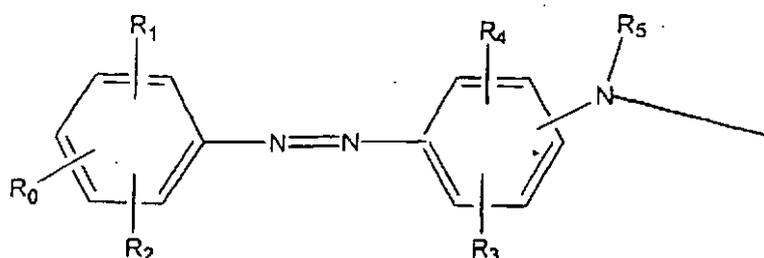
o



- 5 en la que ODN es un oligonucleótido o ácido nucleico;

FL es un fluoróforo unido covalentemente al ODN a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, y

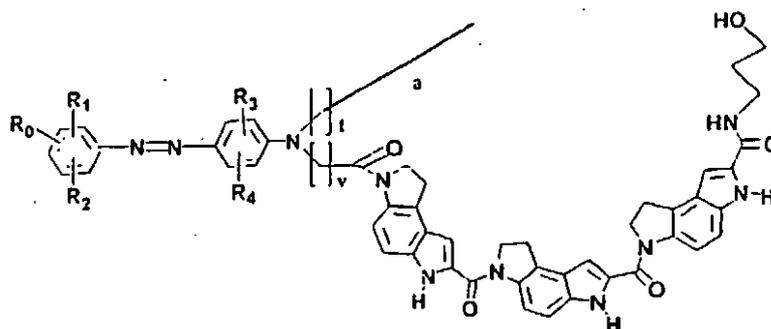
Q es un resto desactivador unido covalentemente al ODN a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo el resto desactivador la estructura



- 10 en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente -H, halógeno, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en la que $n=0$ a 5, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ en la que $n'=0$ a 5 o $-\text{CN}$, y $R_5 = -\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_{n''}-\text{CH}_3$ o $-(\text{CH}_2)_{n''}$ en las que $n''=0$ a 5, y

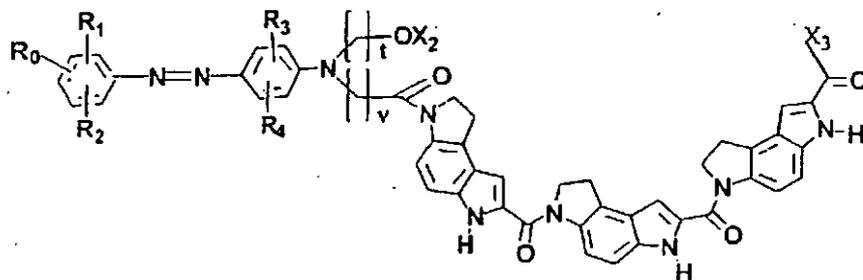
- 15 MGB es un resto de enlace del surco menor unido covalentemente al resto de ODN o al resto desactivador a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, y en el que cuando el MGB se une covalentemente al ODN el resto desactivador sólo se une al ODN.

9. Un conjugado de oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el resto MGB se une al resto desactivador, y el resto MGB-Q unido covalentemente tiene la estructura



- 20 en la que t y v son independientemente de 1 a 20, y el enlace de valencia designado a une el resto MGB-Q al resto ODN.

10. Un oligonucleótido de conjugado de acuerdo con la reivindicación 9, en el que R_0 es H, R_1 es NO_2 en la posición 4 del núcleo de benceno, R_2 es H o Cl en la posición 2 del núcleo de benceno, y R_3 y R_4 son hidrógeno.
11. Un reactivo desactivador y ligando del surco menor unidos covalentemente para las síntesis de oligonucleótidos, que tienen la fórmula



en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente -H, halógeno, $-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$ en las que $n = 0$ a 5, $-NO_2$, $-SO_3$, $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ en la que $n' = 0$ a 5 o -NC, y t y v son independientemente de 1 a 20;

X_2 es H o dimetoxitritilo, metoxitritilo, tritilo o un grupo de bloqueo lábil en ácido, y

5 X_3 es pentafluorofeniloxi o NH-ENLAZADOR-CPG o O-ENLAZADOR-CPG en los que CPG es un soporte sólido polimérico y ENLAZADOR es un resto de enlace que tiene una longitud de 0 a 30 átomos uniendo el resto tricíclico al CPG.

12. Un reactivo desactivador y ligando del surco menor unidos covalentemente de acuerdo con la reivindicación 11, en el que R_0 es H, R_1 es NO_2 en la posición 4 del núcleo de benceno, R_2 es H o Cl en la posición 2 del núcleo de benceno, R_3 y R_4 son hidrógeno y $v=t=3$.

10

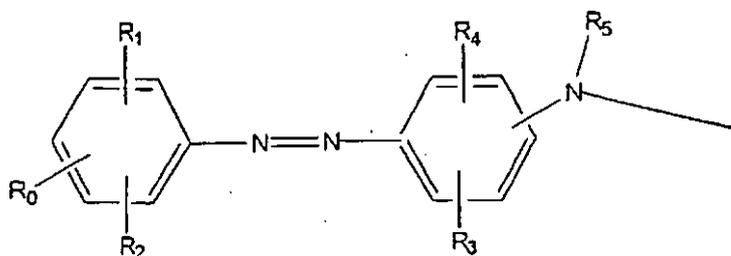
13. Un conjugado de oligonucleótido que tiene la fórmula

FL-ODN-Q

en la que ODN es un oligonucleótido o ácido nucleico;

15 Q es un resto desactivador unido covalentemente al ODN a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, el resto desactivador comprende la estructura

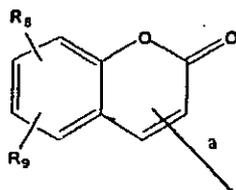
15



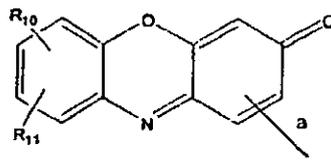
en el que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente -H, halógeno, $-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$ en la que $n = 0$ a 5, $-NO_2$, $-SO_3$, $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ en la que $n' = 0$ a 5 o -CN, y $R_5 = -H$ o $-(CH_2)_nCH_3$ en la que $n'' = 0$ a 5, y

20 FL es un fluoróforo unido covalentemente al ODN a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo dicho resto fluoróforo la estructura seleccionada del grupo designado FL-1 y FL-2,

20



FL-1



FL-2

en las que R_8 y R_9 son independientemente H, halógeno, $-NO_2$, $-SO_3$, $-C(=O)NH_2$, o -CN; $-OR_{nn}$, $-SR_{nn}$, $-NHR_{nn}$, $-N[R_{nn}]_2$ en las que R_{nn} es independientemente H, un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcoilo de 1 a 10 carbonos;

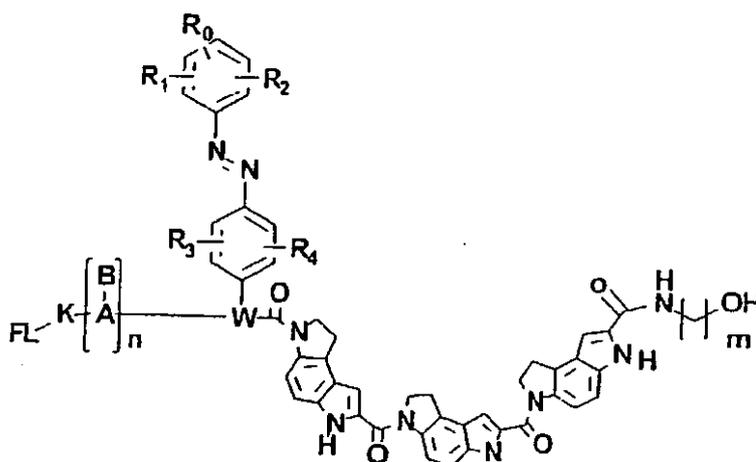
R₁₀ y R₁₁ son independientemente H, -CN, -OR₁₂, N(R₁₂)₂, halógeno, -O(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_nCH₃, -NO₂, -SO₃, -C(=O)NH₂, N[(CH₂)_nCH₃]₂ en las que n = 0 a 5, o R₁₂ es un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcanoílo de 1 a 10 carbonos; y

el enlace de valencia designado a simboliza la unión covalente del fluoróforo con el enlazador.

- 5 14. Un conjugado de oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende adicionalmente un resto de ligando del surco menor (MGB) unido al resto desactivador a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, de modo que el conjugado de oligonucleótido tiene la fórmula

FL-ODN-Q-MGB.

15. Un conjugado de oligonucleótido de la fórmula



10

en la que R₀, R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente -H, halógeno, -O(CH₂)_n-CH₃, -(CH₂)_n-CH₃ en las que n = 0 a 5, -NO₂, -SO₃, -N[(CH₂)_nCH₃]₂ en la que n' = 0 a 5 o -CN;

FL es un resto fluoróforo con longitudes de onda de emisión en el intervalo de aproximadamente 300 a aproximadamente 800 nm;

- 15 K es un enlazador que contiene de 1 a 30 átomos seleccionados del grupo que consiste en C, O, N, S, P y H;

[A-B]_n simboliza un ODN, ADN, ARN o APN o cualquier combinación de los mismos, en la que A es el esqueleto azúcar-fosfato en el que el azúcar y el fosfato se pueden modificar independientemente; B es una base heterocíclica, en la que B se selecciona independientemente de las bases purinas, pirimidina, pirazolo[3,4-d]pirimidina, pirazolo[3,4-d]pirimidina 7-sustituida, 7-deazapurina, 7-deazapurina 7-sustituida, y purina y pirimidina modificadas, y en la que el ADN, ARN, APN u ODN pueden incluir cualquier combinación de estas bases, y

20

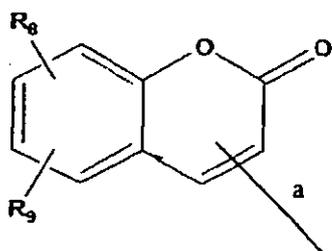
y n es el número de unidades de nucleótidos en dicho ADN, ARN APN u ODN que está entre 2 y 101;

W es N, y

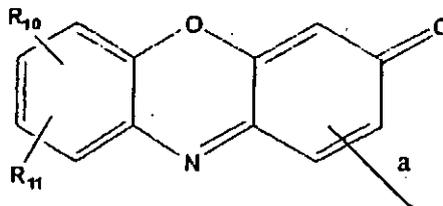
m es un número entero que tiene los valores de 1 a 20.

- 25 16. Un conjugado de oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 15, en el que R₀ es H, R₁ es NO₂ en la posición 4 del núcleo de benceno, R₂ es H o Cl en la posición 2 del núcleo de benceno, y R₃ y R₄ son hidrógeno.

17. Un conjugado de oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho resto fluoróforo tiene la estructura seleccionada del grupo designado FL-1 y FL-2,



FL-1



FL-2

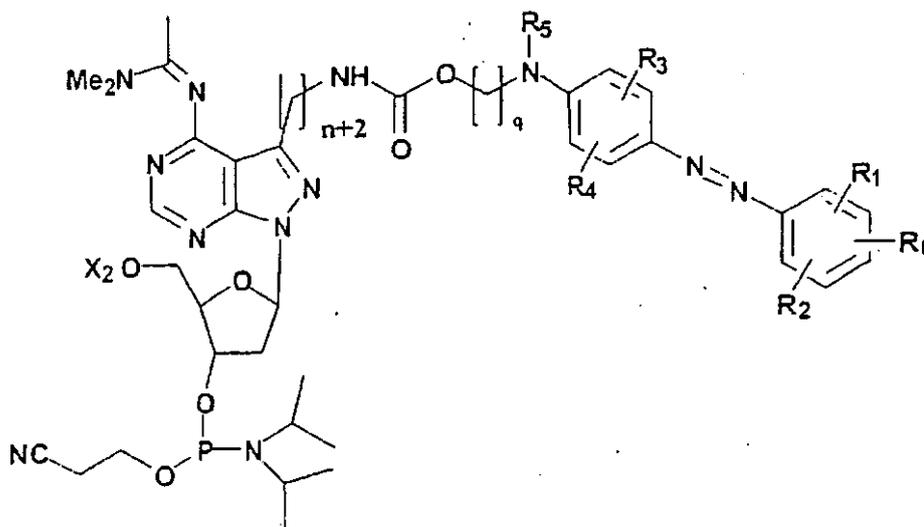
en la que R_8 es OH u O-alcanoilo, en la que el grupo alcanoilo tiene de 1 a 10 carbonos;

R_9 es H o alquilo de 1 a 10 carbonos;

5 R_{10} y R_{11} son independientemente H, $-OR_{12}$, $-NHR_{13}$, halógeno, $-O(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$, $-NO_2$, $-SO_3$, $-C(=O)NH_2$, $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ o $-CN$ en las que $n = 0$ a 5; y R_{12} y R_{13} son grupos de bloqueo compatibles con la síntesis de ODN;

el enlace de valencia designado a simboliza la unión covalente del fluoróforo con el enlazador K.

18. Un reactivo de fosoramidita para preparar un conjugado oligonucleótido-fluoróforo-desactivador, teniendo el reactivo la fórmula



10

en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente $-H$, halógeno, $-O(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$ en la que $n^* = 0$ a 5, $-NO_2$, $-SO_3$, $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ en la que $n^* = 0$ a 5 o $-CN$, y $R_5 = -H$ o $-(CH_2)_nCH_3$ en la que $n^* = 0$ a 5;

n es de 1 a 10;

q es de 1 a 20, y

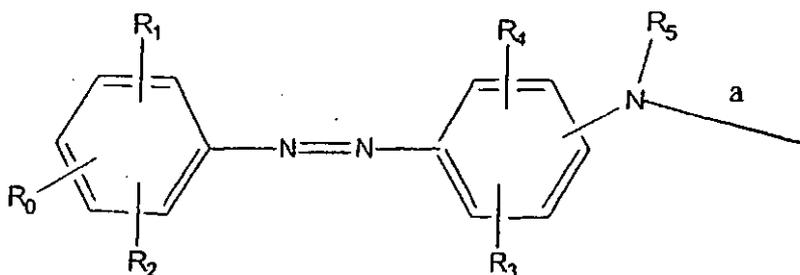
15 X_2 es H o dimetoxitritilo, metoxitritilo, tritilo o un grupo de bloqueo lábil en ácido.

19. Un procedimiento para hibridar ácidos nucleicos, comprendiendo las etapas de:

(a) proporcionar un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico,

(b) incubar los ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación, e

20 (c) identificar ácidos nucleicos hibridados; en el que al menos uno de los ácidos nucleicos comprende un conjugado **FL-ácido-nucleico-Q** en el que **FL** es un resto fluoróforo unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, y **Q** es un resto desactivador unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo el resto desactivador la estructura



en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente -H, halógeno, $-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$ en la que $n=0$ a 5, $-NO_2$, $-SO_3$, $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ en la que $n'=0$ a 5 o $-CN$, y $R_5 = -H$ o $-(CH_2)_nCH_3$ en la que $n''=0$ a 5, y en la que el resto desactivador se une al enlazador a través del enlace de valencia designado a.

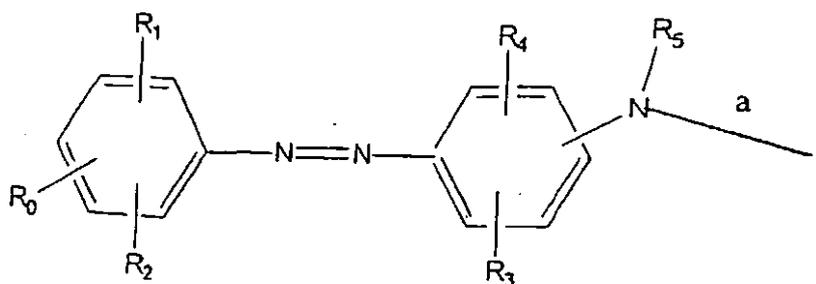
5 20. Un procedimiento para hibridar ácidos nucleicos, comprendiendo las etapas de:

(a) proporcionar un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico,

(b) incubar los ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación, e

(c) identificar ácidos nucleicos hibridados; en el que al menos uno de los ácidos nucleicos comprende un conjugado **FL-ácido-nucleico-Q** en el que **Q** es un resto desactivador unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo el resto desactivador la estructura

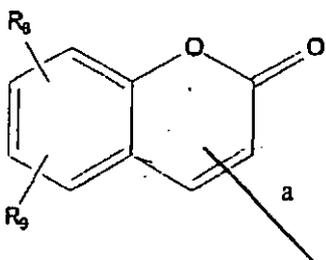
10



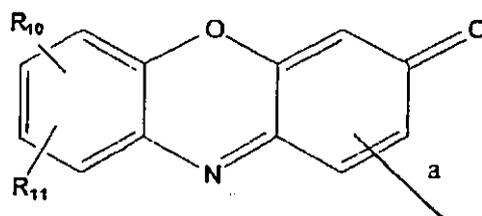
en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente -H, halógeno, $-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$ en las que $n=0$ a 5, $-NO_2$, $-SO_3$, $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ en la que $n'=0$ a 5 o $-CN$, y $R_5 = -H$ o $-(CH_2)_nCH_3$ en la que $n''=0$ a 5, y

en la que FL es un fluoróforo unido covalentemente al ODN a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo dicho resto fluoróforo la estructura seleccionada del grupo designado FL-1 y FL-2

15



FL-1



FL-2

en el que R_8 y R_9 son independientemente H, halógeno, $-NO_2$, $-SO_3$, $-C(=O)NH_2$, o $-CN$; $-OR_{nn}$, $-SR_{nn}$, $-NHR_{nn}$, $-N[R_{nn}]_2$ en los que R_{nn} es independientemente H, un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcanoilo de 1 a 10 carbonos;

20 R_{10} y R_{11} son independientemente H, $-CN$, $-OR_{12}$, $-N(R_{12})_2$, halógeno, $-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$, $-NO_2$, $-SO_3$, $-C(=O)NH_2$, $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ en las que $n=0$ a 5, o R_{12} es un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcanoilo de 1 a 10 carbonos;

el enlace de valencia designado **a** simboliza la unión covalente del fluoróforo con el enlazador.

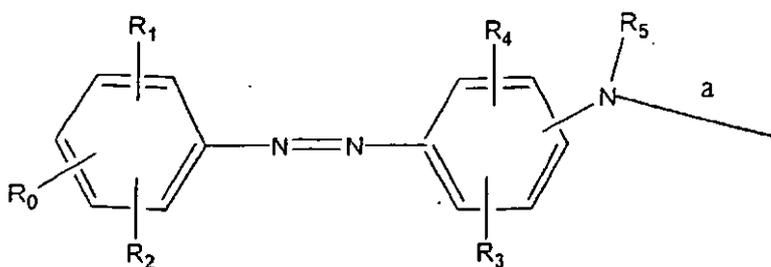
21. Un procedimiento para discriminar entre polinucleótidos que difieren en un único nucleótido, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

(a) proporcionar un polinucleótido que comprende una secuencia diana,

5 (b) proporcionar al menos dos conjugados **FL-ODN-Q**, en los que ODN representa un resto oligonucleótido, uno de los al menos dos conjugados **FL-ODN-Q** tiene una secuencia que es perfectamente complementaria con la secuencia diana y al menos otro de los conjugados **FL-ODN-Q** tiene un emparejamiento inadecuado de nucleótido único con la secuencia diana;

10 (c) incubar por separado cada uno de los conjugados **FL-ODN-Q** con el polinucleótido bajo condiciones de hibridación; y

(d) determinar la fuerza de hibridación entre cada uno del **FL-ODN-Q** y el polinucleótido y, en el que **FL** es un resto fluoróforo unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, y **Q** es un resto desactivador unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo el resto desactivador la estructura



15 en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente -H, halógeno, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en los que $n = 0$ a 5 , $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ en la que $n' = 0$ a 5 o -CN, y $R_5 = -\text{H}$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en la que $n'' = 0$ a 5 , y en el que el resto desactivador se une al enlazador a través del enlace de valencia designado **a**.

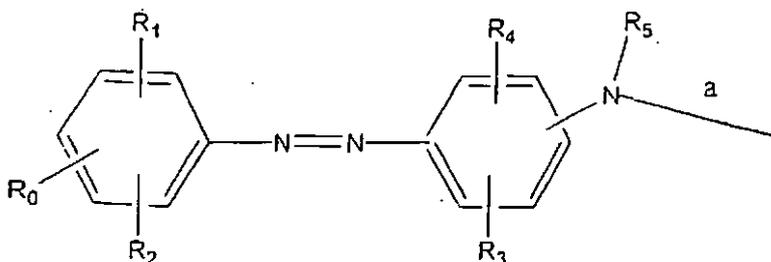
- 20 22. Un procedimiento para discriminar entre polinucleótidos que difieren en un único nucleótido, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

(a) proporcionar un polinucleótido que comprende una secuencia diana,

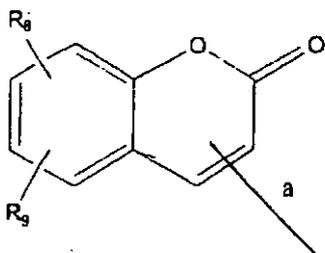
25 (b) proporcionar al menos dos conjugados **FL-ODN-Q**, en los que ODN representa un resto oligonucleótido, uno de los al menos dos conjugados **FL-ODN-Q** tiene una secuencia que es perfectamente complementaria con la secuencia diana y al menos otro de los conjugados **FL-ODN-Q** tiene un emparejamiento inadecuado de nucleótido único con la secuencia diana;

(c) incubar por separado cada uno de los conjugados **FL-ODN-Q** con el polinucleótido bajo condiciones de hibridación; y

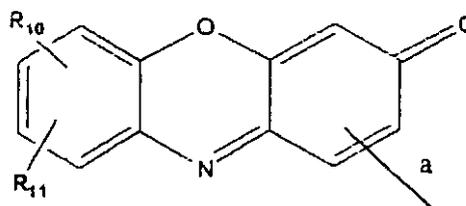
30 (d) determinar la fuerza de hibridación entre cada uno del **FL-ODN-Q** y el polinucleótido, en el que **Q** es un resto desactivador unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo el resto desactivador la estructura



35 en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente -H, halógeno, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en las que $n = 0$ a 5 , $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ en la que $n' = 0$ a 5 o -CN, y $R_5 = -\text{H}$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en la que $n'' = 0$ a 5 , y **FL** es un resto fluoróforo unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo el resto fluoróforo la estructura seleccionada del grupo designado FL-1 y FL-2



FL-1



FL-2

en las que R_8 y R_9 son independientemente H, halógeno, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, o $-\text{CN}$; $-\text{OR}_{nn}$, $-\text{SR}_{nn}$, $-\text{NHR}_{nn}$, $-\text{N}[\text{R}_{nn}]_2$ en las que R_{nn} es independientemente H, un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcanoilo de 1 a 10 carbonos;

5 R_{10} y R_{11} son independientemente H, $-\text{CN}$, $-\text{OR}_{12}$, $\text{N}(\text{R}_{12})_2$, halógeno, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ en las que $n = 0$ a 5 , o R_{12} es un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcanoilo de 1 a 10 carbonos;

el enlace de valencia designado a simboliza la unión covalente del fluoróforo con el enlazador.

23. Un procedimiento para hibridar ácidos nucleicos, comprendiendo las etapas de:

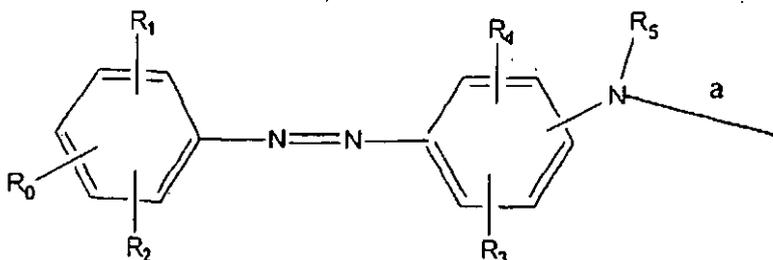
- 10 (a) proporcionar un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico,
 (b) incubar los ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación, e
 (c) identificar ácidos nucleicos hibridados;

en el que al menos uno de los ácidos nucleicos comprende o bien un conjugado

FL – ácido nucleico – MGB



15 o bien un **FL-ácido-nucleico-Q-MGB** en el que **FL** es un resto fluoróforo unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, **MGB** es el resto de ligando del surco menor unido covalentemente al resto ODN o al resto desactivador a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos y **Q** es un resto desactivador unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo el resto desactivador la estructura

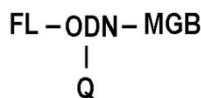


20 en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente $-\text{H}$, halógeno, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en la que $n = 0$ a 5 , $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ en la que $n = 0$ a 5 o $-\text{CN}$, y $\text{R}_5 = -\text{H}$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en la que $n = 0$ a 5 , y en la que el resto desactivador se une al enlazador a través del enlace de valencia designado a.

24. Un procedimiento para hibridar ácidos nucleicos, comprendiendo las etapas de:

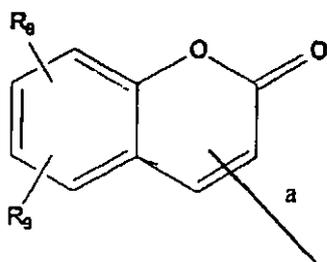
- 25 (a) proporcionar un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico,
 (b) incubar los ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación, e
 (c) identificar ácidos nucleicos hibridados;

en el que al menos uno de los ácidos nucleicos comprende o bien un conjugado

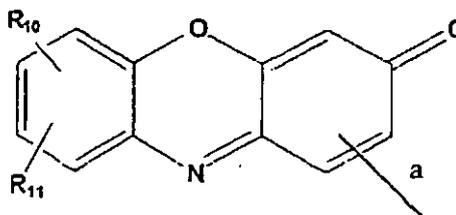


5

o bien **FL-ODN-Q-MGB** en el que ODN es un ácido nucleico o un ácido nucleico que contiene una o más bases modificadas, MGB es un resto de ligando del surco menor unido covalentemente al resto ODN o al resto desactivador a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, **Q** es un resto desactivador unido covalentemente al ODN a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, y **FL** es un resto fluoróforo unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, y teniendo el resto fluoróforo la estructura seleccionada del grupo designado FL-1 y FL-2,



FL-1



FL-2

10

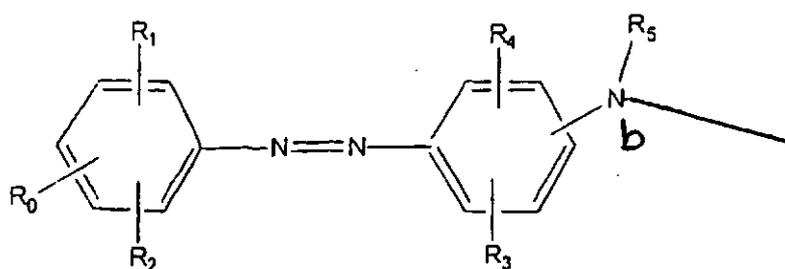
en las que R_8 y R_9 son independientemente H, halógeno, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, o $-\text{CN}$; $-\text{OR}_{nn}$, $-\text{SR}_{nn}$, $-\text{NHR}_{nn}$, $-\text{N}[\text{R}_{nn}]_2$ en las que R_{nn} es independientemente H, un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcanoilo de 1 a 10 carbonos;

15

R_{10} y R_{11} son independientemente H, $-\text{CN}$, $-\text{OR}_{12}$, $\text{N}(\text{R}_{12})_2$, halógeno, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ en las que $n = 0$ a 5, o R_{12} es un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcanoilo de 1 a 10 carbonos;

el enlace de valencia designado a simboliza la unión covalente del fluoróforo con el enlazador; y

Q comprende un resto diazo que tiene la fórmula:



20

en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente $-\text{H}$, halógeno, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en la que $n = 0$ a 5, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ en la que $n = 0$ a 5 o $-\text{CN}$, y $R_5 = -\text{H}$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en la que $n = 0$ a 5,

en la que la unión covalente al enlazador es a través del átomo de nitrógeno designado como **b**.

25. Un procedimiento para hibridar ácidos nucleicos, comprendiendo las etapas de:

(a) proporcionar un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico,

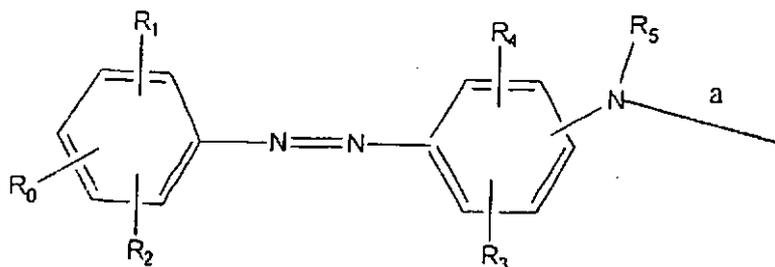
(b) incubar los ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación, e

25

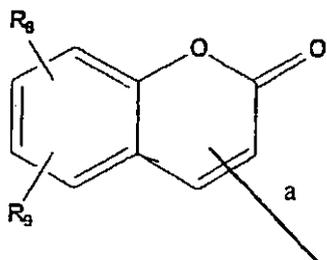
(c) identificar ácidos nucleicos hibridados;

en el que al menos uno de los ácidos nucleicos comprende un conjugado **FL-ODN-Q-MGB** en el que ODN es un ácido nucleico o un ácido nucleico que contiene una o más bases modificadas, MGB es un resto de ligando del surco menor unido covalentemente al resto ODN o al resto desactivador a través de un enlazador que tiene la

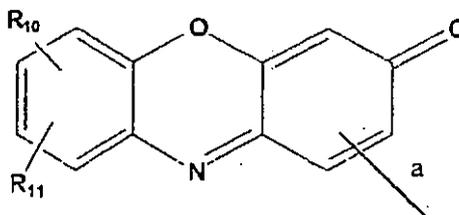
longitud de 0 a 30 átomos, **Q** es un resto desactivador unido covalentemente al ODN a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo el resto desactivador la estructura



- 5 en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente -H, halógeno, $-O(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$ en las que $n=0$ a 5, $-NO_2$, $-SO_3$, $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ en la que $n=0$ a 5 o -CN, y $R_5 = -H$ o $-(CH_2)_nCH_3$ en la que $n=0$ a 5, y **FL** es un resto fluoróforo unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, teniendo dicho resto fluoróforo la estructura seleccionada del grupo designado FL-1 y FL-2



FL-1



FL-2

- 10 en las que R_8 y R_9 son independientemente H, halógeno, $-NO_2$, $-SO_3$, $-C(=O)NH_2$, o -CN; $-OR_{nn}$, $-SR_{nn}$, $-NHR_{nn}$, $-N[R_{nn}]_2$ en las que R_{nn} es independientemente H, un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcanoilo de 1 a 10 carbonos;

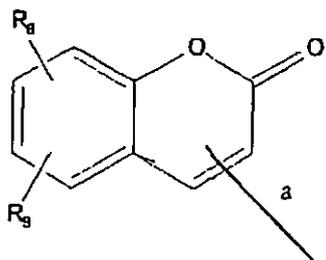
R_{10} y R_{11} son independientemente H, -CN, $-OR_{12}$, $N(R_{12})_2$, halógeno, $-O(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_nCH_3$, $-NO_2$, $-SO_3$, $-C(=O)NH_2$, $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ en las que $n=0$ a 5, o R_{12} es un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcanoilo de 1 a 10 carbonos;

- 15 el enlace de valencia designado **a** simboliza la unión covalente del fluoróforo con el enlazador.

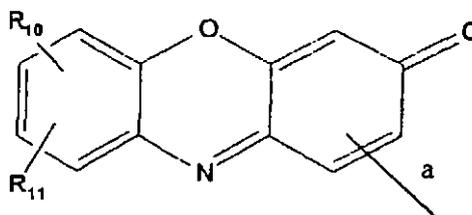
26. Un procedimiento para hibridar ácidos nucleicos, comprendiendo las etapas de:

- (a) proporcionar un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico,
- (b) incubar los ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación, e
- (c) identificar ácidos nucleicos hibridados;

- 20 en el que al menos uno de los ácidos nucleicos comprendió un conjugado **FL-ODN-Q** en el que ODN es un ácido nucleico o un ácido nucleico que contiene una o más bases modificadas, **Q** es un resto desactivador unido covalentemente al ODN a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, y **FL** es un resto fluoróforo unido covalentemente al ácido nucleico a través de un enlazador que tiene la longitud de 0 a 30 átomos, y teniendo el resto fluoróforo la estructura seleccionada del grupo designado FL-1 y FL-2,



FL-1



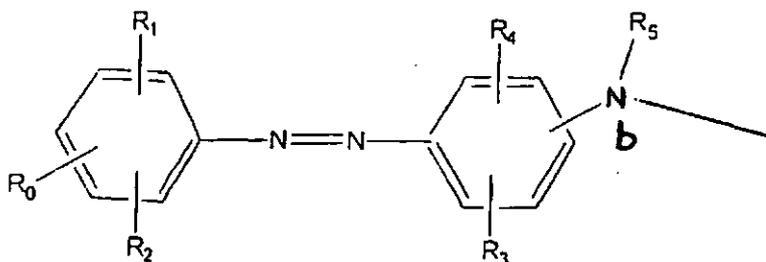
FL-2

en las que R_8 y R_9 son independientemente H, halógeno, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, o $-\text{CN}$; $-\text{OR}_{nn}$, $-\text{SR}_{nn}$, $-\text{NHR}_{nn}$, $-\text{N}[\text{R}_{nn}]_2$ en las que R_{nn} es independientemente H, un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcoilo de 1 a 10 carbonos;

- 5 R_{10} y R_{11} son independientemente H, $-\text{CN}$, $-\text{OR}_{12}$, $\text{N}(\text{R}_{12})_2$, halógeno, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ en las que $n = 0$ a 5, o R_{12} es un grupo alquilo de 1 a 10 carbonos o un grupo alcoilo de 1 a 10 carbonos;

el enlace de valencia designado **a** simboliza la unión covalente del fluoróforo con el enlazador; y

Q comprende un resto diazo que tiene la fórmula:



- 10 en la que R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente $-\text{H}$, halógeno, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en la que $n = 0$ a 5, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3$, $-\text{N}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ en la que $n' = 0$ a 5 o $-\text{CN}$, y $R_5 = -\text{H}$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ en la que $n'' = 0$ a 5,

en la que la unión covalente al enlazador es a través del átomo de nitrógeno designado como **b**.

15

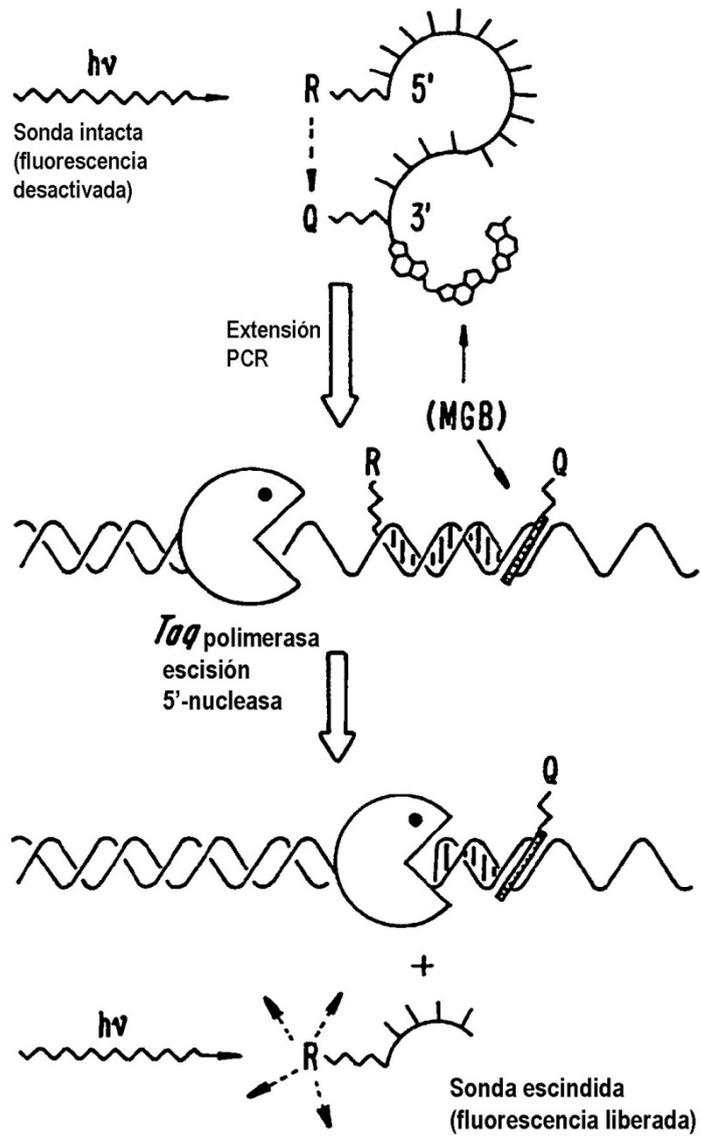


FIG. 1.

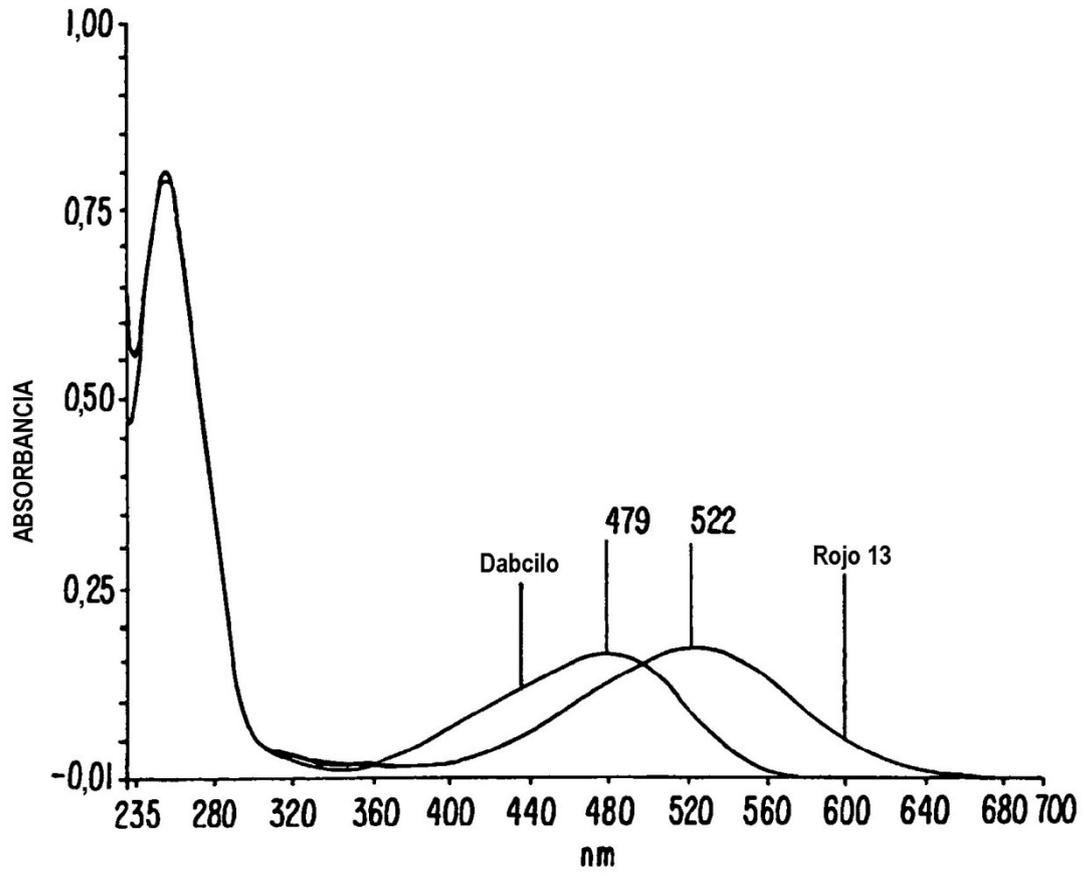


FIG. 2.

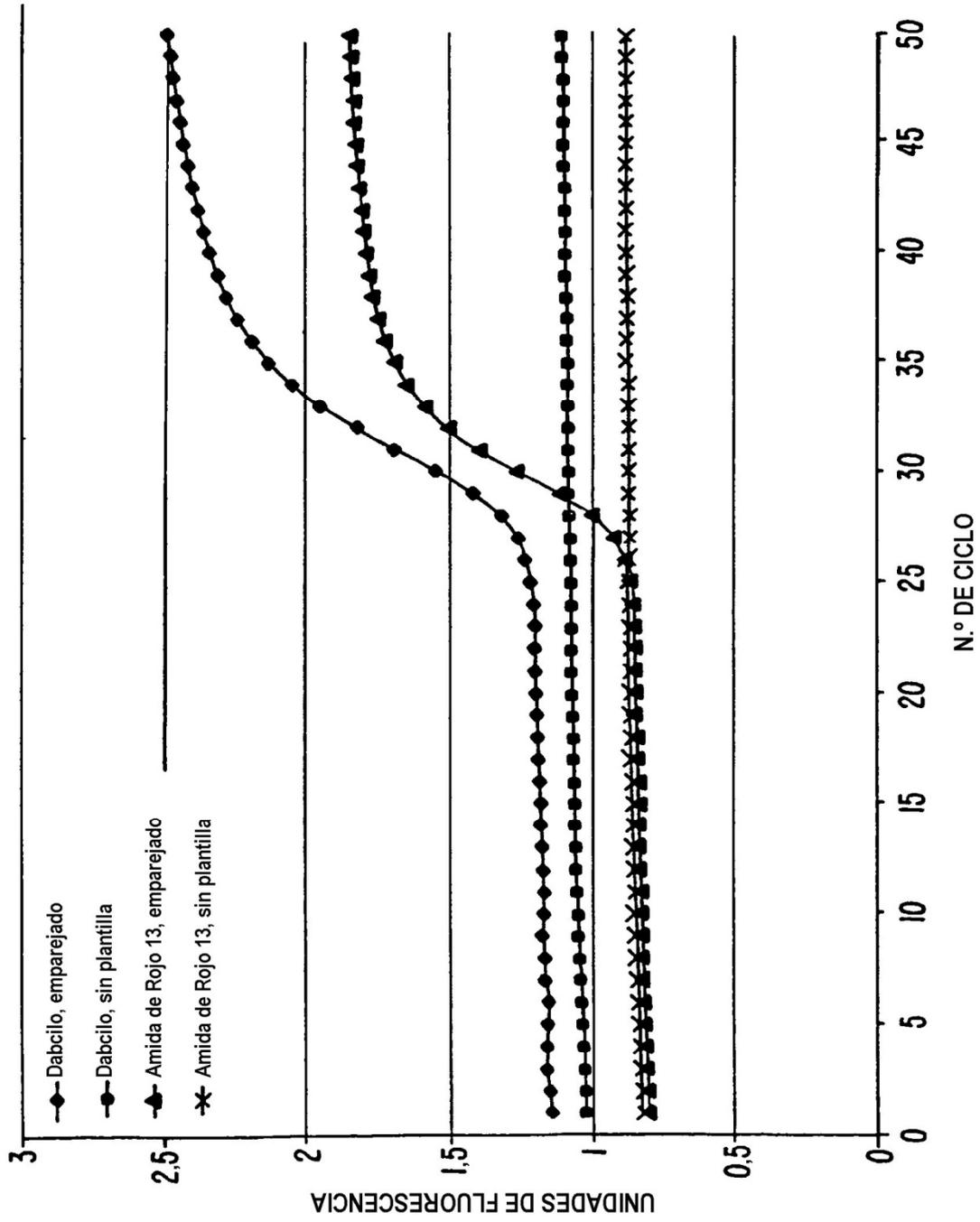


FIG. 3.

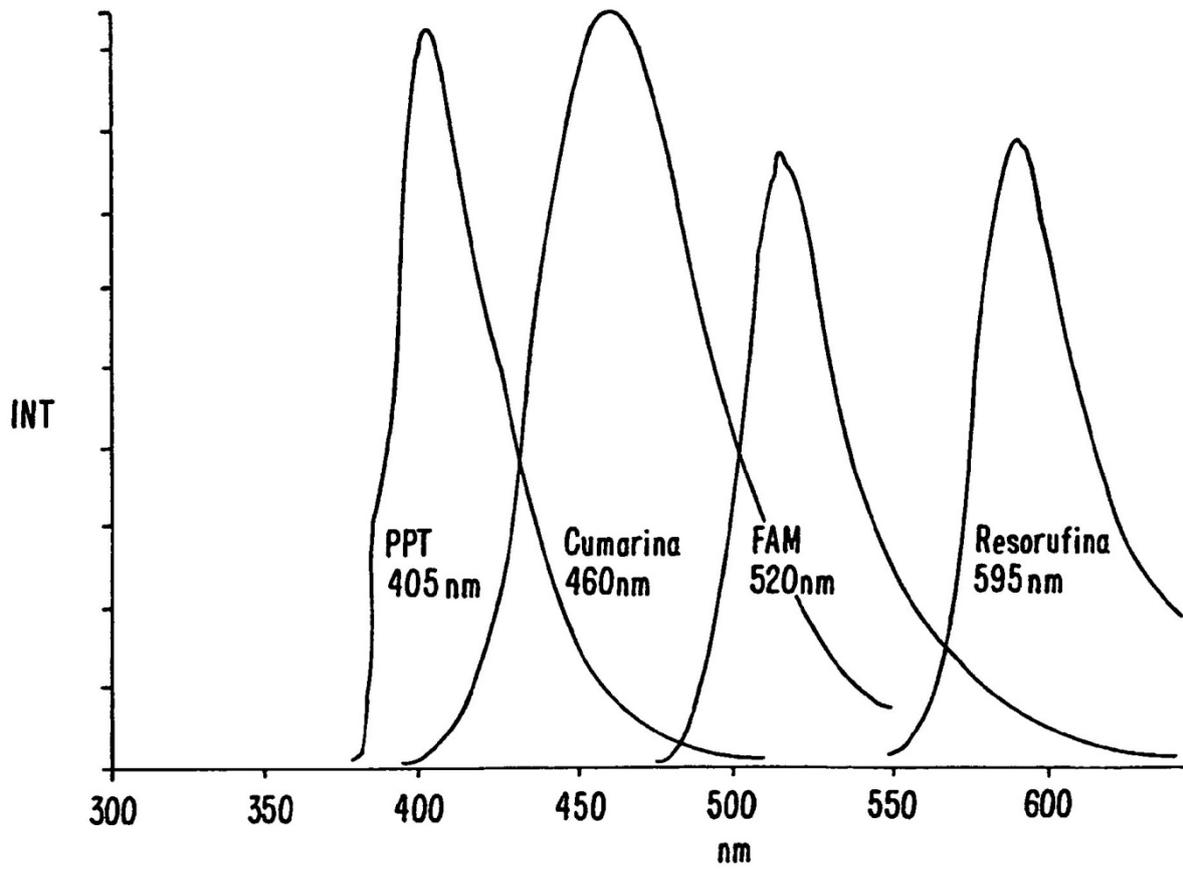


FIG. 4.