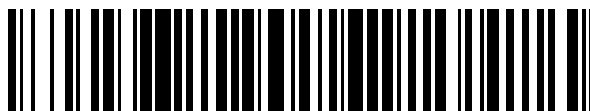


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 268**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08721474 .8**
96 Fecha de presentación: **06.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2130835**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.2009**

54 Título: **Compuesto que tiene una estructura derivada de mononucleósido o mononucleótido, ácido nucleico, sustancia marcadora y método y kit para la detección de ácido nucleico**

30 Prioridad:
09.03.2007 JP 2007059921
21.09.2007 JP 2007246253
26.12.2007 JP 2007335352

45 Fecha de publicación de la mención BOP: **20.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente: **20.07.2012**

73 Titular/es:
RIKEN
2-1 HIROSAWA
WAKO-SHI, SAITAMA 351-0198, JP

72 Inventor/es:
OKAMOTO, Akimitsu;
IKEDA, Shuji y
KUBOTA, Takeshi

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

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).

ES 2 385 268 T3

DESCRIPCIÓN

Compuesto que tiene una estructura derivada de mononucleósido o mononucleótido, ácido nucleico, sustancia marcadora y método y kit para la detección de ácido nucleico

Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a un ácido nucleico, una sustancia marcadora y un método y un kit para detectar un ácido nucleico.

Antecedentes

[0002] En, por ejemplo, los diagnósticos genéticos de enfermedades y el análisis de la expresión génica, es necesario detectar un ácido nucleico que tenga una secuencia específica. Para la detección, se utilizan ampliamente métodos que utilizan fluorescencia y, por ejemplo, se utiliza a menudo una sonda de fluorescencia obtenida mediante la unión covalente de un tipo de colorante fluorescente a ADN como sustancia marcadora.

[0003] Dicha sustancia marcadora (una sonda de fluorescencia) tiene el problema que, por ejemplo, emite fluorescencia incluso cuando no se ha formado una doble hélice con un ácido nucleico complementario. Para el objetivo de detener la fluorescencia de sólo la sonda, el método que utiliza transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) es efectivo (por ejemplo, documentos que no son patentes 1 a 4). Sin embargo, presenta problemas en, por ejemplo, el coste debido a la introducción de dos tipos de colorantes fluorescentes.

[0004] El naranja de tiazol, que es un tipo de colorante de cianina, es conocido como un colorante fluorescente cuya intensidad de fluorescencia aumenta a través de la interacción con ADN o ARN. Existen ejemplos en los que se pretendió producir una sonda fluorescente con naranja de tiazol unido a ADN mediante un enlace covalente. Sin embargo, también se emite una fluorescencia intensa a través de la interacción con un ADN de cadena sencilla que contiene una base purina (documento no de patente 5). Por consiguiente, el incremento en la intensidad de fluorescencia obtenido cuando se forma una doble hélice es pequeño y, por tanto, no se puede considerar como satisfactorio (documentos no de patente 6 y 7).

Documento no de patente 1: Tyagi, S., Kramer, F. R. (1996) Nat. Biotechnol. 14, 303-308.

Documento no de patente 2: Nazarenko, I. A., Bhatnagar, S. K., Hohman, R. J. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 2516-2521.

Documento no de patente 3: Gelmini, S., Orlando, C., Sestini, R., Vona, G., Pinzani, P., Ruocco, L., Pazzagli, M. (1997) Clin. Chem. 43, 752-758.

Documento no de patente 4: Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S. P., Brown, T., Little, S. (1999) Nat. Biotechnol. 17, 804-807.

Documento no de patente 5: Biopolymers 1998, 46, 39-51.

Documento no de patente 6: Analytica Chimica Acta 2002, 470, 57-70.

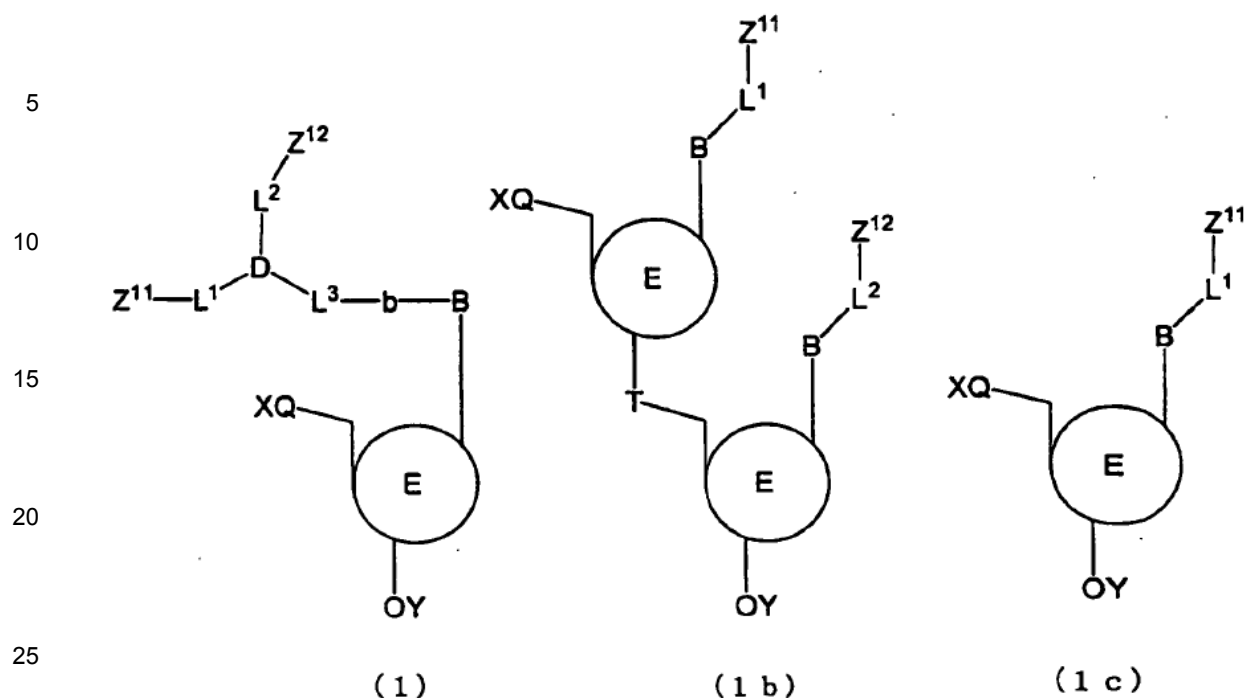
Documento no de patente 7: Chemistry - A European Journal 2006, 12, 2270-2281.

WO 2006/097320 A2 describe nucleótidos modificados denominados macromoléculas Nuc. Las macromoléculas Nuc se caracterizan porque uno o más componentes nucleótidos están conectados con uno o más componentes (marcadores) macromoleculares que generan la señal o median en la señal a través de un enlazador. El componente de Nuc particular mantiene su función como sustrato para enzimas en una macromolécula Nuc. Un componente de señalización macromolecular puede albergar varias moléculas colorantes. También se describen métodos para marcar ácidos nucleicos con nucleótidos modificados.

Descripción detallada de la invención

[0005] Por lo tanto, la presente invención pretende proporcionar, por ejemplo, una sustancia marcadora que permite la doble estructura de hélice de un ácido nucleico a detectar de manera eficaz.

[0006] También se describe aquí un compuesto que tiene una estructura derivada de mononucleósido o mononucleótido, siendo la estructura representada por las siguientes fórmulas (1), (1b), o (1c), un tautómero o estereoisómero de los mismos, o una sal de los mismos.



En las fórmulas (1), (1b), y (1c),

B es un grupo atómico que tiene un esqueleto de nucleobases naturales (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) o un esqueleto de nucleobases artificiales,

E es:

(i) un grupo atómico que tiene un esqueleto de desoxirribosa, un esqueleto de ribosas, o una estructura derivada de cualquiera de ellos, o

(ii) un grupo atómico que tiene una estructura peptídica o una estructura peptoide,

Z^{11} y Z^{12} son cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo protector o un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra

un efecto de excitón, y pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

Q es:

O, cuando E es un grupo atómico descrito en el punto (i), o

NH, cuando E es un grupo atómico descrito en el punto (ii),

X es:

un átomo de hidrógeno, un grupo protector de un grupo hidroxilo que se puede desproteger con ácido, un grupo fosfato (un grupo monofosfato), un grupo difosfato o un grupo trifosfato, cuando E es un grupo atómico descrito en el punto (i) o un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo amino, cuando E es un grupo atómico descrito en el punto (ii),

Y es:

un átomo de hidrógeno, un grupo protector de un grupo hidroxilo, o un grupo fosforamida, cuando E es un grupo atómico descrito en el punto (i), o un átomo de hidrógeno o un grupo protector, cuando E es un grupo atómico descrito en el punto (ii),

L^1 , L^2 , y L^3 son cada uno un enlazador (un átomo o un grupo atómico de enlace), la longitud de la cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) es arbitraria. Cada uno puede contener o no uno de C, N, O, S, P, y Si en la cadena principal, cada uno puede contener o no uno de un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, un enlace imino, un enlace éter, un enlace tioéter, y un enlace tioéster en la cadena principal. L^1 , L^2 , y L^3 pueden ser idénticos o diferentes entre sí, D es CR, N, P, P=O, B, o SiR, y R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un sustituyente arbitrario,

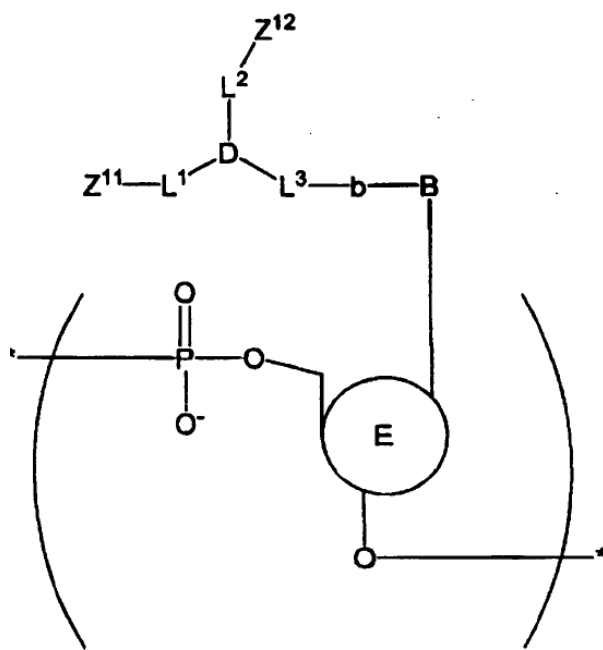
b es un enlace simple, un doble enlace o un triple enlace, o

en la fórmula (1), L^1 y L^2 son cada uno el enlazador mencionado anteriormente, L^3 , D, y b pueden no estar presentes, y L^1 y L^2 pueden estar unidos directamente a B, en la fórmula (1b), T es:

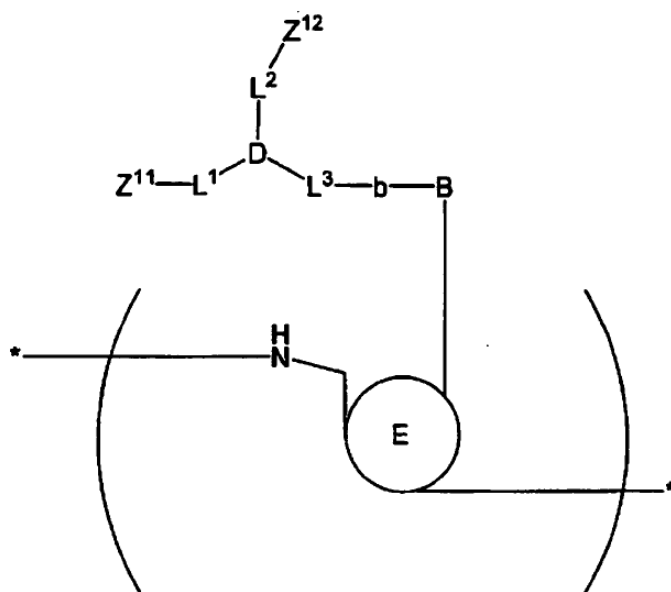
un enlace de ácido fosfórico (PO_4^-) en que por lo menos un átomo de oxígeno (O) puede estar sustituido con un átomo de azufre (S), cuando E es un grupo atómico descrito en el punto (i), o

NH, cuando E es un grupo atómico descrito en el punto (ii).

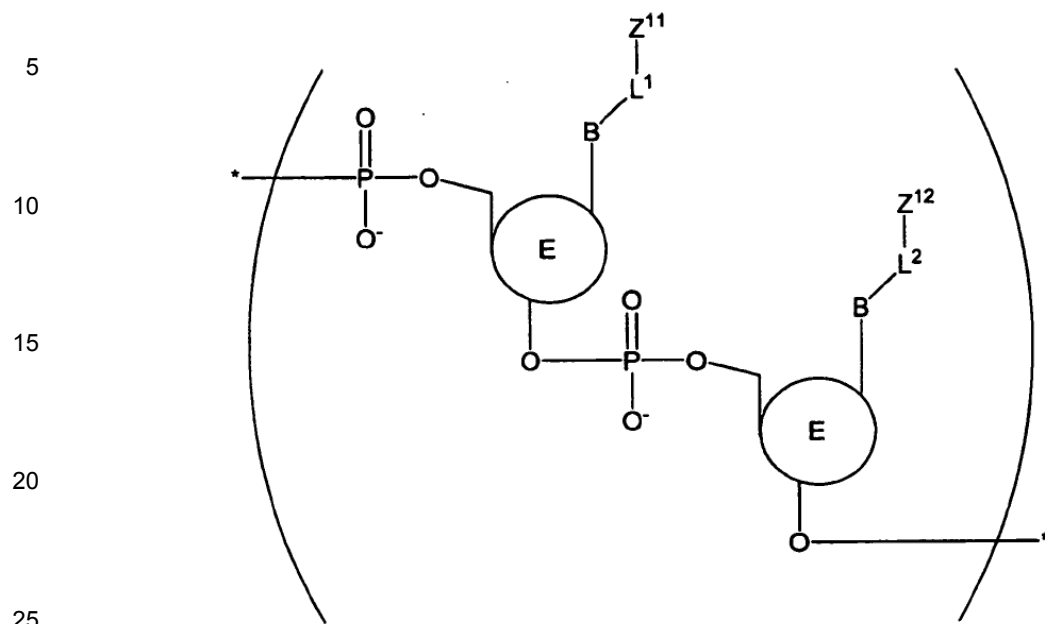
[0007] A efectos de resolver los problemas anteriores, la presente invención proporciona un ácido nucleico de la presente invención que es un ácido nucleico que incluye por lo menos una de las estructuras representadas por las siguientes fórmulas (16), (16b), (17) y (17b), un tautómero o estereoisómero de los mismos, o una sal de los mismos. Cabe indicar, en la presente memoria, que en las fórmulas químicas (por ejemplo, las siguientes fórmulas químicas (16), (16b), (17) y (17b), cuando un enlace se extiende desde el interior hacia el exterior de los paréntesis y el enlace está marcado con una estrella fuera de los paréntesis, la estrella significa que algún átomo o grupo atómico se une al enlace.



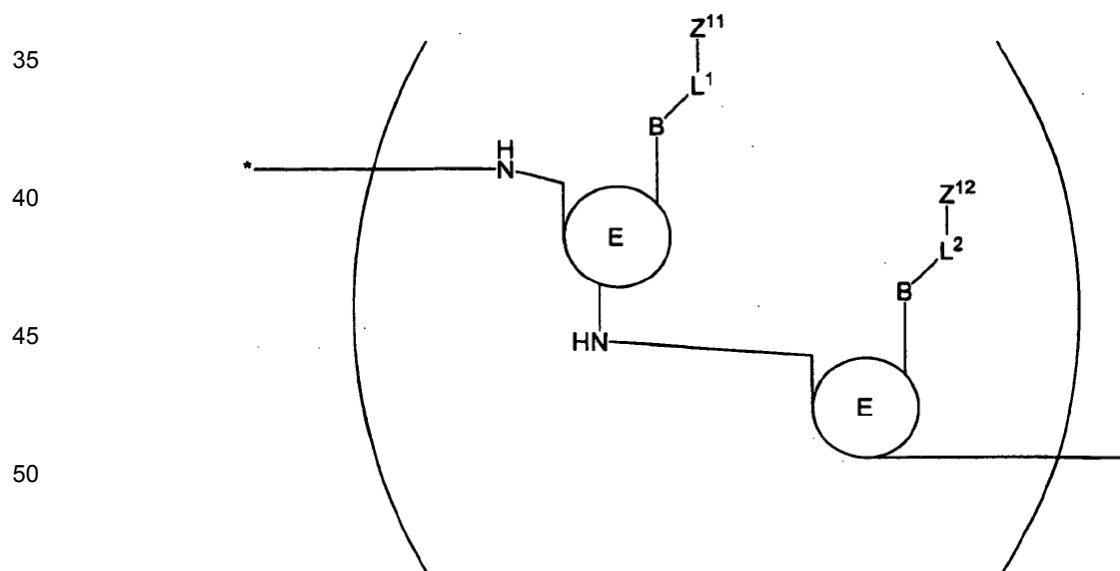
(1 6)



(1 6 b)



(1 7)



(1 7 b)

60 En la fórmulas (16), (16b), (17) y (17b),
 B, E, Z^{11} , Z^{12} , L^1 , L^2 , L^3 , D, y b tienen cada uno la misma estructura que la de la fórmula (1), (1b), o (1c),
 donde en las fórmulas (16) y (17), E es un grupo atómico descrito en el punto (i) en la fórmula (1), (1b), o (1c), y
 por lo menos un átomo de O en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido con un átomo de S,
 en las fórmulas (16b) y (17b), E es un grupo atómico descrito en el punto (ii) en la fórmula (1), (1b), o (1c), y
 65 en las fórmulas (17) y (17b), los respectivos B pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y los respectivos E
 pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

[0008] Además, una sustancia marcadora de la presente invención es:

(i) una sustancia marcadora que emite fluorescencia, con dos estructuras químicas planas contenidas en una molécula, que no existen en el mismo plano, sino con un cierto ángulo formado entre ellas, localizadas para disponerse en el mismo plano cuando la molécula experimenta una intercalación o unión en los surcos a un ácido nucleico

(ii) una sustancia marcadora formada de por lo menos dos grupos moleculares colorantes que no muestran emisión de fluorescencia debido al efecto de excitón obtenido cuando por lo menos dos moléculas colorantes se agregan en paralelo entre sí, pero muestran emisión de fluorescencia destruyéndose el estado de agregación cuando las moléculas experimentan una intercalación o unión en los surcos a un ácido nucleico, o

(iii) una sustancia marcadora compleja que tiene, como estructura química característica, una estructura química de por lo menos dos moléculas colorantes contenidas en una molécula, con los por lo menos dos moléculas colorantes sin exhibir la emisión de fluorescencia debido al efecto de excitón obtenido cuando se agregan en paralelo entre sí, pero mostrando emisión de fluorescencia destruyéndose el estado de agregación cuando las moléculas experimentan una intercalación o unión en los surcos a un ácido nucleico.

[0009] Además, un método de detección de un ácido nucleico de la presente invención es:

(I) un método de detección de un ácido nucleico, que comprende las etapas de:

llevar a cabo una síntesis de ácido nucleico utilizando, como sustrato, la sustancia marcadora según la presente invención que es un mononucleótido marcado u oligonucleótido marcado, sintetizando así un ácido nucleico de doble cadena al que está unido el grupo atómico que muestra fluorescencia o la estructura molecular colorante mediante una intercalación o unión en los surcos;

medir la intensidad de fluorescencia antes y después de la etapa de sintetizar el ácido nucleico de doble cadena;

y

detectar la síntesis de ácido nucleico mediante la comparación las intensidades de fluorescencia entre sí que se obtienen antes y después de la etapa de síntesis del ácido nucleico de doble cadena,

(II) un método de detección de un ácido nucleico, que comprende las etapas de: llevar a cabo la síntesis de ácido nucleico mediante la hibridación, como un primer ácido nucleico, de la sustancia marcadora según la presente invención que es un ácido nucleico de cadena sencilla, a un segundo ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria con el primer ácido nucleico o una secuencia análoga a la secuencia complementaria, sintetizando así un ácido nucleico de doble cadena al que está unido el grupo atómico que muestra fluorescencia o la estructura molecular colorante mediante una intercalación o unión en los surcos;

medir la intensidad de fluorescencia antes y después de la etapa de sintetizar el ácido nucleico de doble cadena;

y

detectar la hibridación entre el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico mediante la comparación las intensidades de fluorescencia entre sí que se obtienen antes y después de la etapa de síntesis del ácido nucleico de doble cadena,

(III) un método de detección de un ácido nucleico, que comprende las etapas de: llevar a cabo la síntesis de ácido nucleico mediante la hibridación, como un primer ácido nucleico, de la sustancia marcadora según la presente invención que es un ácido nucleico de cadena sencilla, a un segundo ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria con el primer ácido nucleico o una secuencia análoga a la secuencia complementaria, sintetizando así un ácido nucleico de doble cadena al que está unido el grupo atómico que muestra fluorescencia o la estructura molecular colorante mediante una intercalación o unión en los surcos;

medir la intensidad de fluorescencia antes y después de la etapa de sintetizar el ácido nucleico de doble cadena;

y

detectar la hibridación entre el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico mediante la comparación las intensidades de fluorescencia entre sí que se obtienen antes y después de la etapa de síntesis del ácido nucleico de doble cadena; o

(IV) un método de detección de un ácido nucleico, que detecta la formación de un ácido nucleico de triple cadena o un ácido nucleico análogo mediante la utilización de un tercer ácido nucleico que tiene una secuencia del primer ácido nucleico mencionado anteriormente o el segundo ácido nucleico, una secuencia complementaria a la secuencia del primer ácido nucleico o el segundo ácido nucleico, o una secuencia análoga a la secuencia complementaria, y está marcada o no marcada con la sustancia marcadora según la presente invención o una sustancia marcadora compleja.

[0010] Además, un kit de la presente invención incluye: una unidad de síntesis de ácido nucleico, una sustancia marcadora y una unidad de medición de intensidad de fluorescencia, en el que la sustancia marcadora es la sustancia marcadora mencionada anteriormente de la presente invención.

[0011] Por tener la estructura mencionada anteriormente, se pueden utilizar el compuesto y el ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, como sustancia marcadora que permite que la estructura de doble hélice de un ácido nucleico se detecte de manera eficaz. Más específicamente, el compuesto o ácido nucleico con una estructura representada por la fórmula (1), (1b), (1c), (16), (16b), (17) o (17b), donde Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra un efecto de excitón, por ejemplo, es adecuado como sustancia marcadora de la presente invención. Además, el compuesto o ácido nucleico en los que Z^{11} y Z^{12} son cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo protector se pueden utilizar como material de partida para sintetizar

la sustancia marcadora o un intermedio sintético de la misma. Cabe indicar, sin embargo, que la utilización del compuesto y ácido nucleico de la presente invención no se limita al mismo y se pueden utilizar para cualquier aplicación.

5 Breve descripción de los dibujos

[0012]

La figura 1 es un diagrama que muestra esquemáticamente el principio de la presente invención.

La figura 2 muestra los espectros de RMN ^1H y ^{13}C obtenidos de un compuesto de un ejemplo.

10 La figura 3 muestra los espectros de RMN ^1H y ^{13}C obtenidos de otro compuesto de un ejemplo.

La figura 4 muestra un espectro de masas MALDI-TOF de oligómero de ADN purificado 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3'; la flecha muestra el máximo de masa (4101,9) derivado del producto purificado, y el valor calculado de $[\text{M-H}]^-$ es 4101,8 basado en un valor calculado de peso molecular de 4102,8 ($\text{C}_{134}\text{H}_{176}\text{N}_{52}\text{O}_{76}\text{P}_{12}$) y, por tanto, concuerda con el mismo.

15 La figura 5 muestra un espectro de masas MALDI-TOF de un producto de reacción del oligómero de ADN 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' y un derivado de biotina; la flecha muestra el máximo de masa (4554,3) derivado del producto purificado, y el valor calculado de $[\text{M-H}]^-$ es 4554,4 basado en un valor calculado de peso molecular de 4555,4 ($\text{C}_{134}\text{H}_{176}\text{N}_{52}\text{O}_{76}\text{P}_{12}$) y, por tanto, concuerda con el mismo.

20 La figura 6 muestra un espectro RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) de un compuesto (ADN marcado con un colorante) de un ejemplo.

La figura 7 muestra un gráfico de HPLC de fase inversa del compuesto (ADN marcado con un colorante) mostrado en la figura 6.

La figura 8 muestra un espectro de masas MALDI-TOF del compuesto (ADN marcado con un colorante) mostrado en la figura 6.

25 La figura 9 muestra espectros UV de tres muestras de una sonda fluorescente según un ejemplo que estaban en un estado de cadena sencilla, un estado de doble hélice ADN-ADN, y un estado de doble hélice ADN-ARN, respectivamente.

La figura 10 muestra espectros de fluorescencia de las tres muestras de la sonda fluorescente mostrada en la figura 9 que estaban en un estado de cadena sencilla, un estado de doble hélice ADN-ADN, y un estado de doble hélice ADN-ARN, respectivamente, que se obtuvieron utilizando luz de excitón con una longitud de onda de 488 nm.

30 La figura 11 muestra espectros de fluorescencia de las tres muestras de la sonda fluorescente mostrada en la figura 9 que estaban en un estado de cadena sencilla, un estado de doble hélice ADN-ADN, y un estado de doble hélice ADN-ARN, respectivamente, que se obtuvieron utilizando luz de excitón con una longitud de onda de 510 nm.

35 La figura 12 muestra espectros UV de las tres muestras de una sonda fluorescente según otro ejemplo que estaban en un estado de cadena sencilla, un estado de doble hélice ADN-ADN, y un estado de doble hélice ADN-ARN, respectivamente.

40 La figura 13 muestra espectros de fluorescencia de las tres muestras de la sonda fluorescente mostrada en la figura 12 que estaban en un estado de cadena sencilla, un estado de doble hélice ADN-ADN, y un estado de doble hélice ADN-ARN, respectivamente.

La figura 14 muestra espectros UV de las tres muestras de una sonda fluorescente según otro ejemplo que estaban en un estado de cadena sencilla, un estado de doble hélice ADN-ADN, y un estado de doble hélice ADN-ARN, respectivamente.

45 La figura 15 muestra espectros de fluorescencia de las tres muestras de la sonda fluorescente mostrada en la figura 14 que estaban en un estado de cadena sencilla, un estado de doble hélice ADN-ADN, y un estado de doble hélice ADN-ARN, respectivamente.

La figura 16 muestra espectros UV de las tres muestras de una sonda fluorescente según otro ejemplo que estaban en un estado de cadena sencilla, un estado de doble hélice ADN-ADN, y un estado de doble hélice ADN-ARN, respectivamente.

50 La figura 17 muestra espectros de fluorescencia de las tres muestras de la sonda fluorescente mostrada en la figura 16 que estaban en un estado de cadena sencilla, un estado de doble hélice ADN-ADN, y un estado de doble hélice ADN-ARN, respectivamente.

La figura 18 muestra gráficos que ilustran espectros de absorción, espectros de excitón y espectros de emisión de varios tipos de sonda fluorescente según un ejemplo.

55 La figura 19 muestra gráficos que ilustran espectros de absorción, espectros de excitón y espectros de emisión de otra sonda fluorescente según un ejemplo.

La figura 20 muestra diagramas que ilustran espectros de absorción obtenidos midiendo los espectros de absorción de una sonda fluorescente según un ejemplo a varias temperaturas y concentraciones.

60 La figura 21 es un diagrama de espectro CD de una doble cadena obtenida a través de la hibridación de una sonda fluorescente de un ejemplo.

La figura 22 muestra gráficos que ilustran espectros de absorción, espectros de excitón y espectros de emisión de otra sonda fluorescente de un ejemplo.

65 La figura 23 es un diagrama que muestra la emisión de fluorescencia de una doble cadena obtenida a través de la hibridación de otra sonda fluorescente de un ejemplo.

La figura 24 muestra gráficos que ilustran espectros de absorción y espectros de emisión de otra sonda fluorescente según un ejemplo.

La figura 25 es un diagrama que muestra el cambio en la fluorescencia obtenido cuando una cadena de ARN hibridada con una sonda fluorescente de un ejemplo se digería con ARNasa H.

La figura 26 es un diagrama que muestra los resultados de la observación del cambio en la intensidad de emisión de fluorescencia obtenida mediante el cambio de la proporción de concentraciones de la cadena de ADN complementaria con respecto a la una sonda fluorescente según un ejemplo.

La figura 27 muestra diagramas que ilustran los estados de emisión de fluorescencia en un ensayo de transferencia según un ejemplo.

La figura 28 es una fotografía que muestra la interferencia diferencial medida cuando una sonda fluorescente de un ejemplo se introducía en una célula.

La figura 29 es una fotografía tomada mientras se observaba la fluorescencia cuando una sonda fluorescente de un ejemplo se introducía en una célula.

La figura 30 es una fotografía que muestra las figuras 28 y 29 en un estado de superposición ente sí.

La figura 31A es una fotografía tomada mientras se observaba la fluorescencia cuando otra sonda fluorescente de un ejemplo se introducía en una célula.

La figura 31B es una fotografía tomada mientras se observaba la fluorescencia cuando otra sonda fluorescente de un ejemplo se introducía en una célula.

La figura 32 muestra diagramas que ilustran el cambio en la fluorescencia con el tiempo después de inyectar en un núcleo celular una sonda idéntica a la mostrada en las figuras 28 a 30.

La figura 33 es una fotografía tomada mientras se observaba la fluorescencia cuando otra sonda fluorescente de un ejemplo se introducía en una célula.

Descripción de la invención

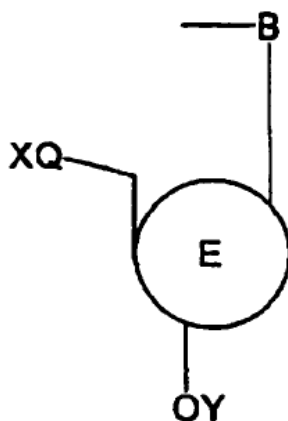
[0013] A continuación, se describen en detalle realizaciones de la presente invención.

[Compuesto, ácido nucleico y sustancia marcadora de la presente invención]

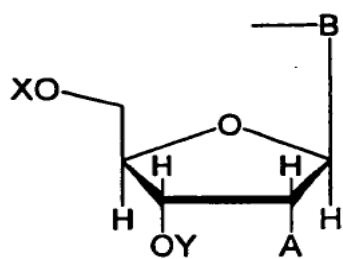
[0014] El compuesto y ácido nucleico de la presente invención no están particularmente limitados, a excepción de que están representados por las fórmulas químicas mostradas anteriormente. Tal como se ha descrito anteriormente, la utilización de los mismos no está particularmente limitada y se pueden utilizar, por ejemplo, como la sustancia marcadora mencionada anteriormente de la presente invención o como material de partida para la síntesis de la sustancia marcadora o un intermedio sintético de la misma. El compuesto, ácido nucleico y la sustancia marcadora de la presente invención se describen más específicamente, por ejemplo, a continuación.

[0015] En el compuesto de la presente invención, es preferible que E en las fórmulas (1), (1b), y (1c) sea un grupo atómico que tiene una estructura de cadena principal de, por ejemplo, ADN, ADN modificado, ARN, ARN modificado, LNA o PNA (ácido nucleico de péptido).

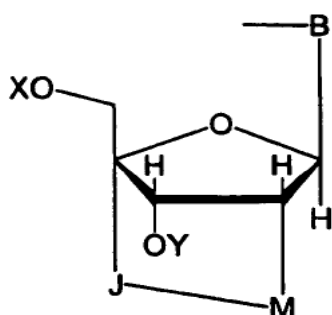
[0016] Además, en las formulas (1) y (1c), preferiblemente, el grupo atómico representado por:



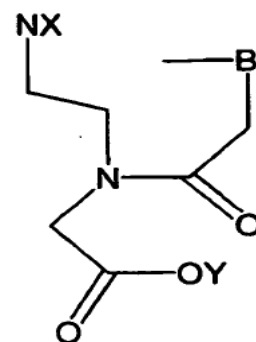
es un grupo atómico representado por cualquiera de las siguientes fórmulas (2) a (4),



(2)

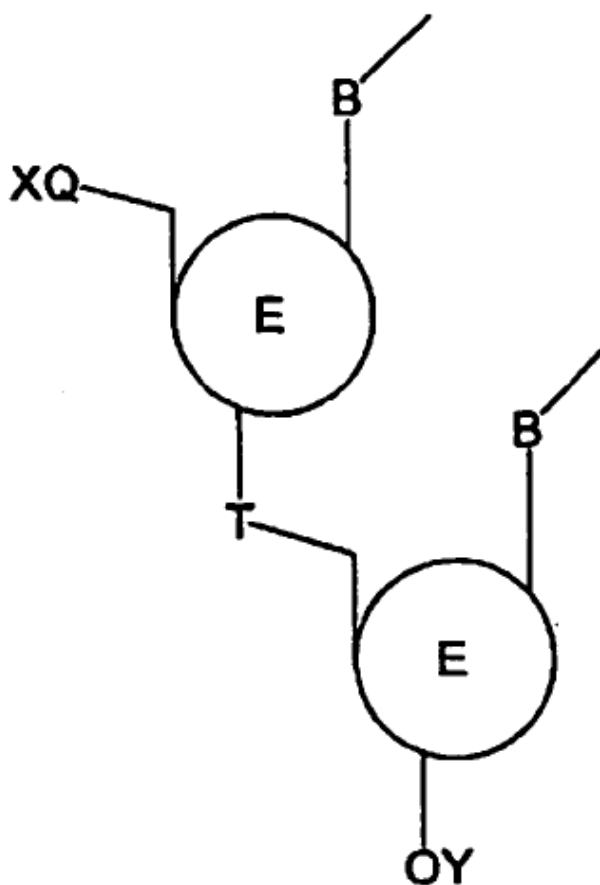


(3)

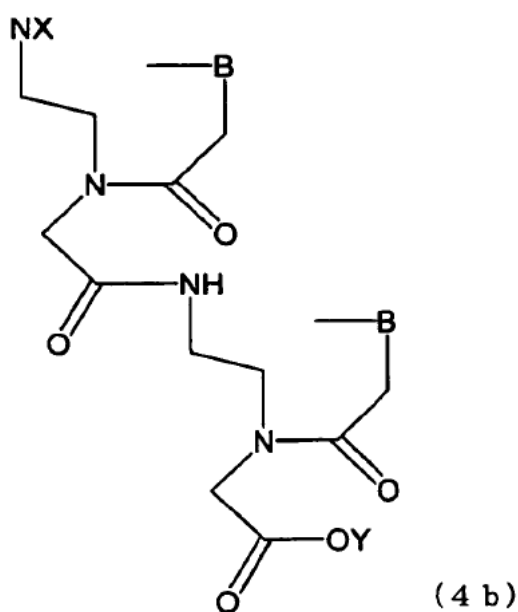
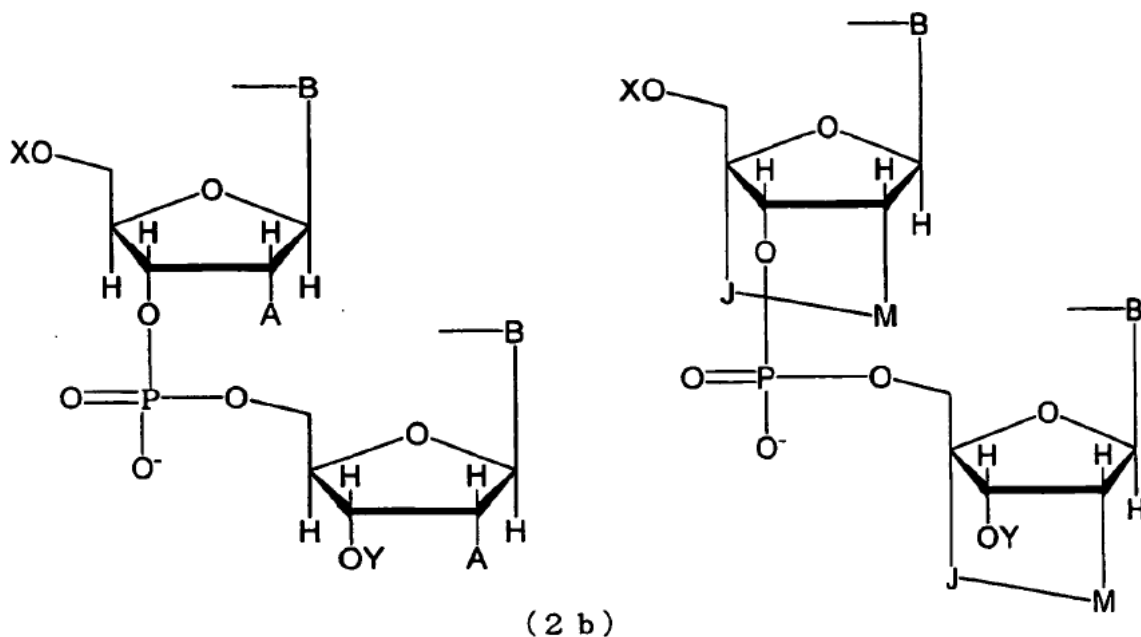


(4)

y
en la fórmula (1b), un grupo atómico representado por:



es un grupo atómico representado por cualquiera de las siguientes fórmulas (2b) a (4b).



En las fórmulas (2) a (4) y (2b) a (4b),

A es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo, o un grupo atractor de electrones,

M y J son cada uno CH_2 , NH, O, o S y pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

B, X, e Y son idénticos a aquellos, respectivamente, en la fórmula (1), (1b), o (1c), y

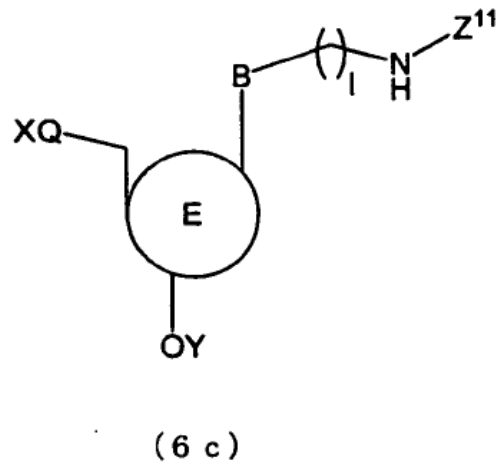
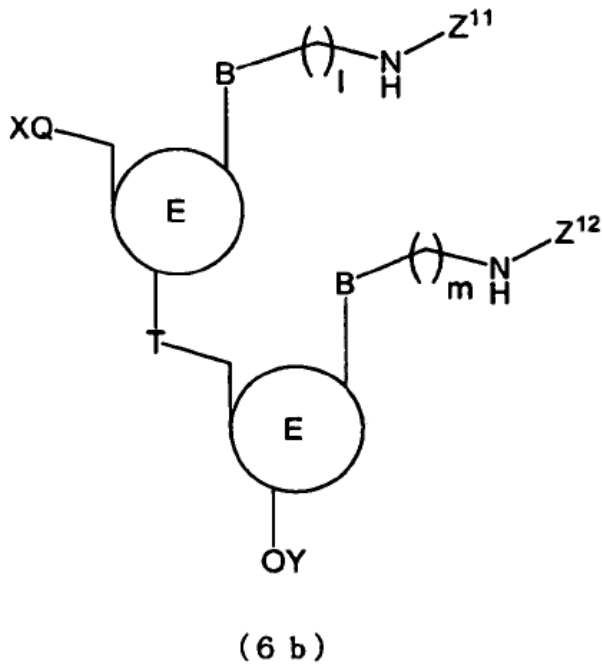
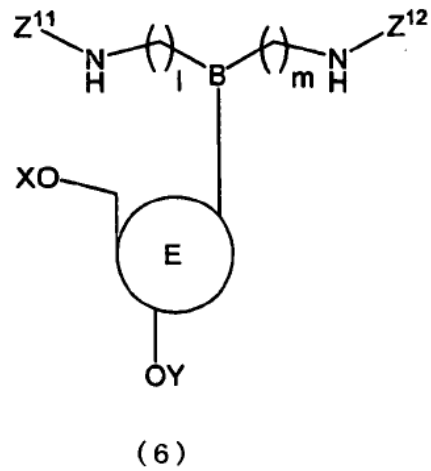
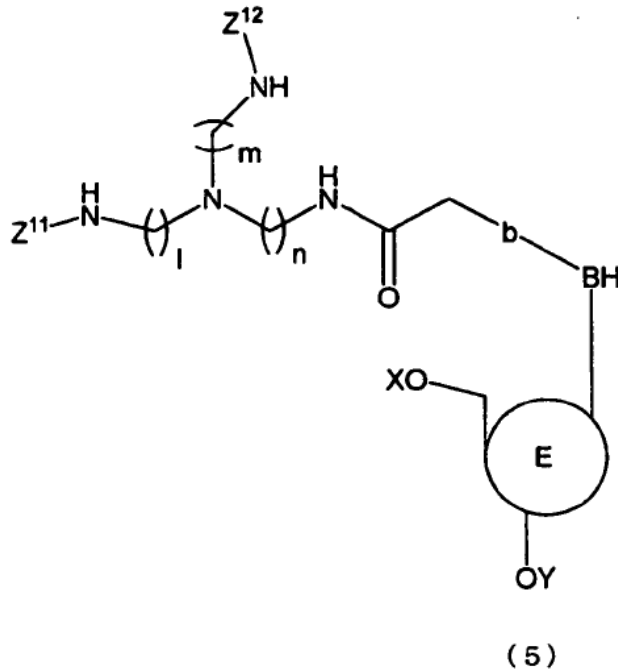
en las fórmulas (2), (3), (2b), y (3b), por lo menos un átomo de O contenido en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido por un átomo de S.

[0017] E es preferiblemente un grupo atómico que tiene una estructura de cadena principal de, por ejemplo, ADN, ADN modificado, ARN o ARN modificado desde el punto de vista de, por ejemplo, una síntesis fácil. Sin embargo, E puede ser un grupo atómico que tiene una estructura de cadena principal de LNA o PNA (ácido nucleico de péptido).

[0018] En las fórmulas (2) y (2b), se prefiere que, por ejemplo, el grupo alquilo puede ser un grupo metoxi y el grupo atractor de electrones puede ser halógeno.

[0019] En la fórmula (1), (1b), o (1c), es preferible que la longitud de cada cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) de L^1 , L^2 , y L^3 puede ser un número entero de 2 o más. El límite superior de la longitud de cada cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) de L^1 , L^2 , y L^3 no está particularmente limitado y es, por ejemplo, 100 o menos, más preferiblemente 30 o menos, y particularmente preferiblemente 10 o menos.

[0020] Preferiblemente, el compuesto de la presente invención es un compuesto representado por la siguiente fórmula (5), (6), (6b), o (6c), un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo.

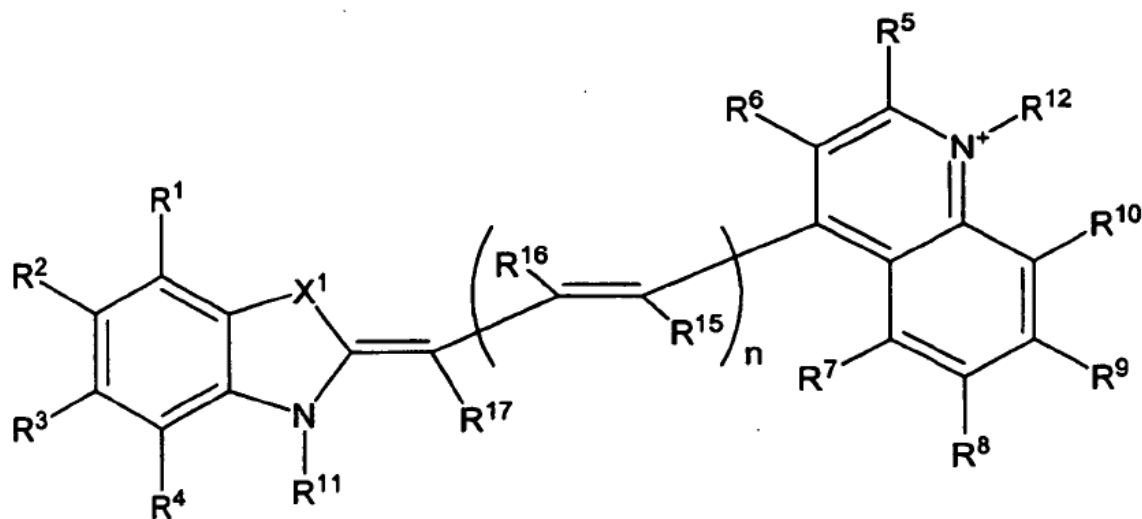


En las fórmulas (5), (6), (6b) y (6c), l, m, y n son arbitrarios y pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y B, E, Z^{11} , Z^{12} , X, Y, y T son idénticos a los de las fórmulas (1) y (1b), respectivamente. En las fórmulas (5), (6), (6b), y (6c), l, m, y n son cada uno preferiblemente un número entero de 2 o más. Los límites superiores de l, m, y n no están particularmente limitados y son, por ejemplo 100 o menos, más preferiblemente 30 o menos, y particularmente preferiblemente 10 o menos.

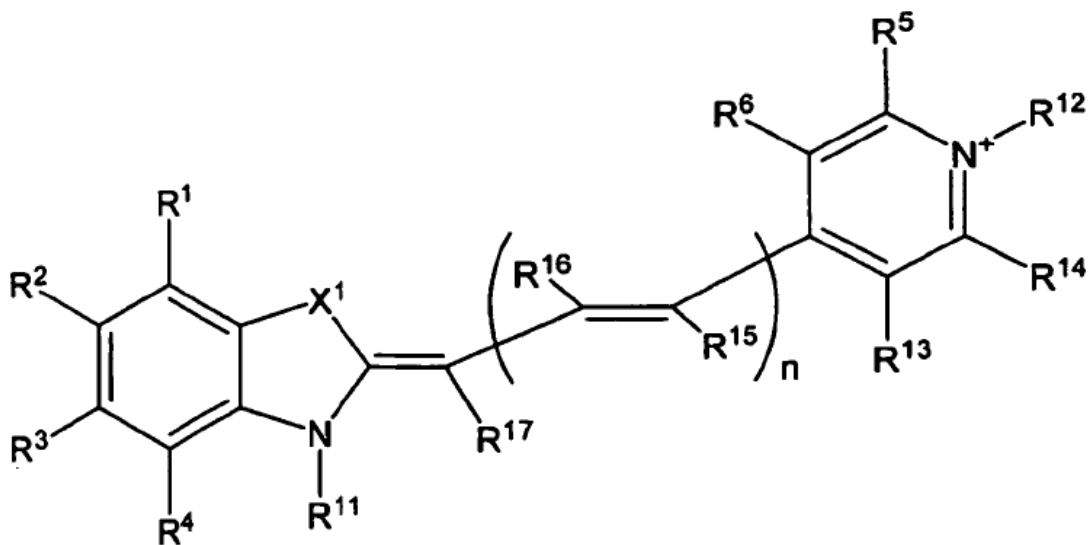
[0021] En el compuesto de la presente invención, es preferible que Z^{11} y Z^{12} sean cada uno un grupo atómico que muestre un efecto de excitón. Esto permite que aumente ampliamente la fluorescencia cuando, por ejemplo, se forma una estructura de doble hélice y, de este modo, se puede detectar posteriormente la estructura de doble hélice de manera eficaz. Sin embargo, en el compuesto de la presente invención, es posible detectar la estructura de doble hélice de manera eficaz incluso cuando Z^{11} y Z^{12} no son cada uno un grupo atómico que muestre un efecto de excitón o incluso cuando sólo un grupo atómico (colorante) que muestra fluorescencia se introduce en una molécula.

[0022] Preferiblemente, Z^{11} y Z^{12} son cada uno, por ejemplo, un grupo atómico que tiene fluorescencia y muestra un efecto de excitón tal como se ha descrito anteriormente. El grupo atómico que tiene fluorescencia y que muestra un efecto de excitón no está particularmente limitado. Más preferiblemente, Z^{11} y Z^{12} son, por ejemplo, cada uno independientemente un grupo derivado de naranja de tiazol, amarillo de oxazol, cianina, hemicianina, otro colorante de cianina, rojo metilo, colorante azo o un derivado del mismo. Además, también se puede utilizar de forma adecuada un grupo derivado de otro colorante conocido. Se han descrito muchos colorantes fluorescentes que cambian la intensidad de la fluorescencia mediante la unión a un ácido nucleico, tal como ADN. En un ejemplo típico, se ha sabido que el bromuro de etidio muestra una fluorescencia intensa al intercalarse en una estructura de doble hélice del ADN y se utiliza frecuentemente para la detección del ADN. Además, también son conocidos colorantes fluorescentes cuya intensidad de fluorescencia se puede controlar según la polaridad microscópica, tal como pirenocarboxiamida y prodan. El naranja de tiazol es un colorante fluorescente con un anillo benzotiazol y estando la quinolina unida entre sí con un grupo metina. Normalmente muestra una fluorescencia débil, pero proporciona una emisión de fluorescencia intensa mediante la intercalación en ADN que tiene una estructura de doble hélice. Otros ejemplos incluyen colorantes, tales como fluoresceína y Cy3.

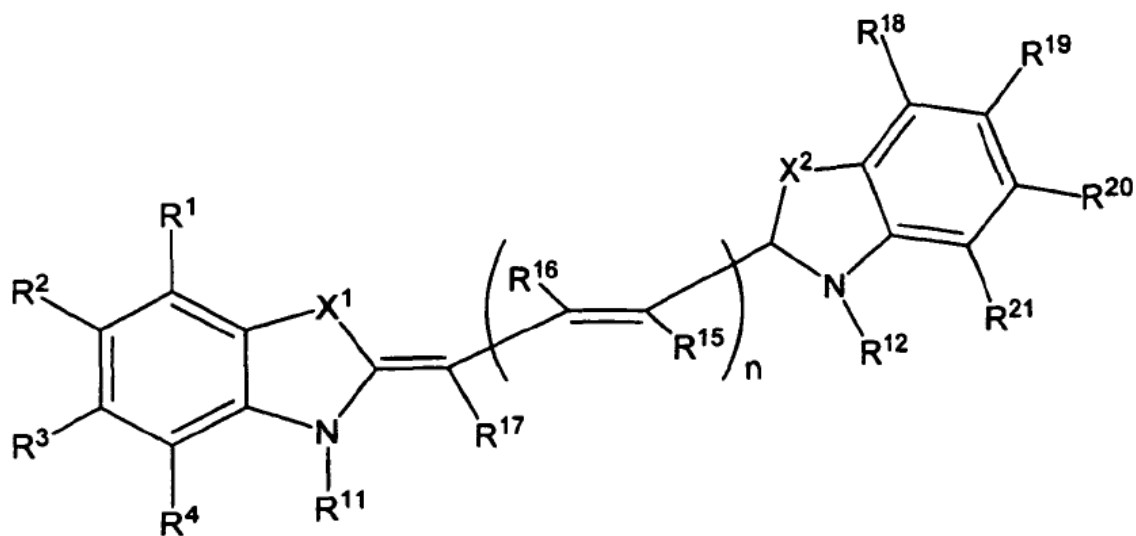
[0023] Además preferiblemente, Z^{11} y Z^{12} son, por ejemplo, cada uno independientemente un grupo atómico representado por cualquiera de las siguientes fórmulas (7) a (9).



(7)



(8)



(9)

En las fórmulas (7) a (9),

X^1 y X^2 son cada uno S u O y pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

n es 0 o un número positivo,

R^1 a R^{10} y R^{13} a R^{21} son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo alcoxi inferior, un grupo nitro, o un grupo amino, uno de R^{11} y R^{12} es un grupo de enlace que se une a L^1 o L^2 en la fórmula (1), (1b), o (1c) o NH en la fórmula (5), (6), (6b), o (6c), y el otro es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior,

cuando una pluralidad de R^{15} están presentes en la fórmula (7), (8), o (9), pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

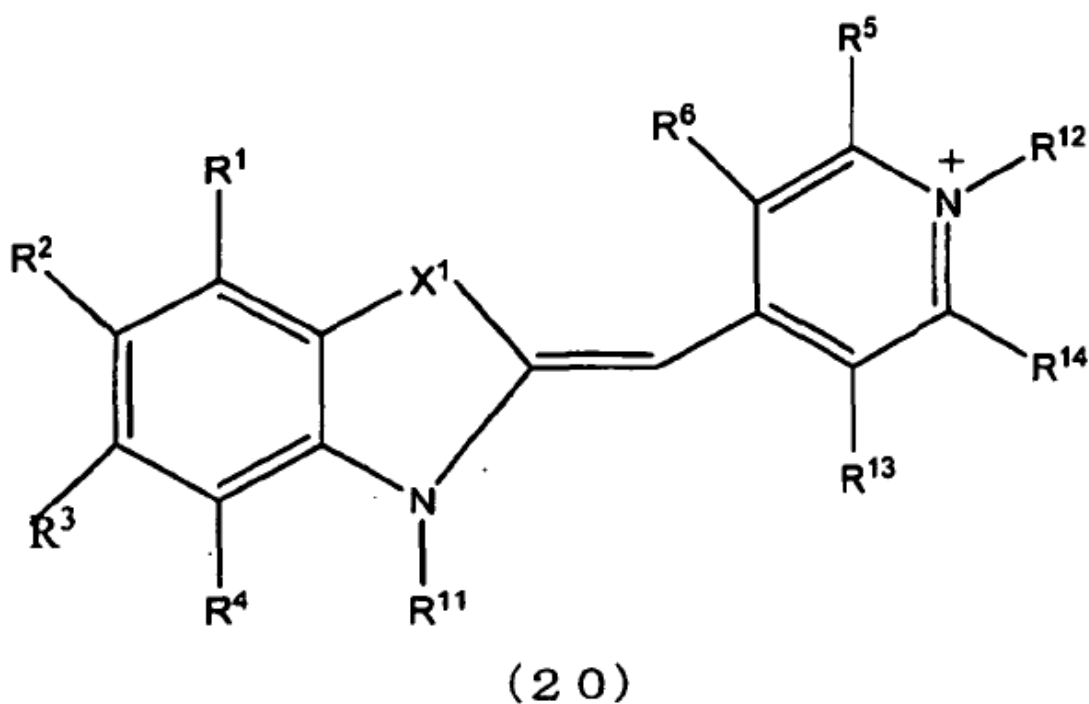
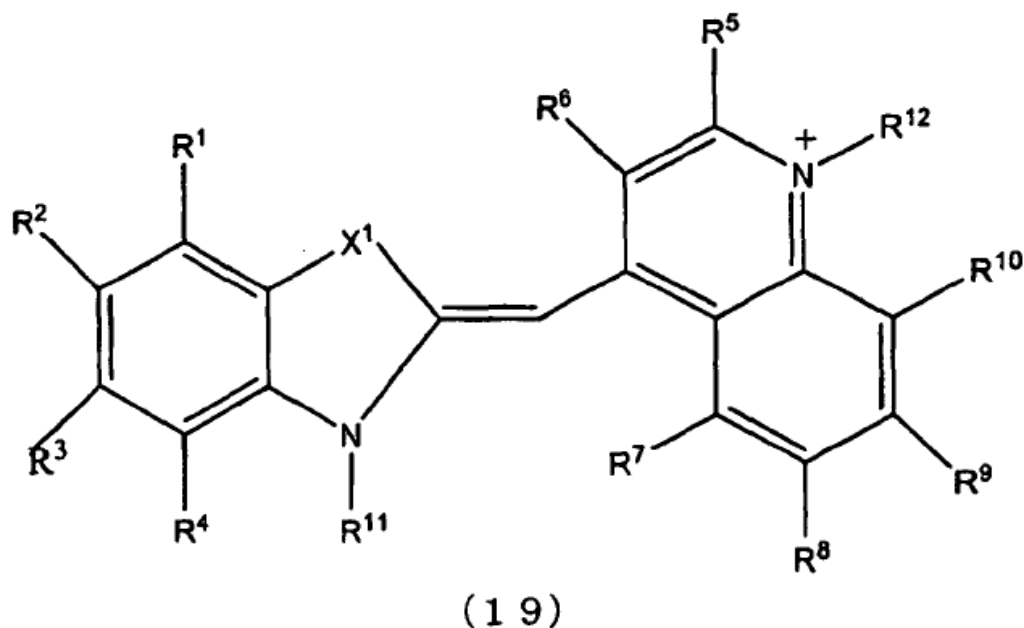
cuando una pluralidad de R^{16} están presentes en la fórmula (7), (8), o (9), pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y

X^1 , X^2 , y R^1 a R^{21} en Z^{11} y X , X^2 , y R^1 a R^{21} en Z^{12} pueden ser idénticos o diferentes entre sí, respectivamente.

[0024] En las fórmulas (7) a (9), se prefiere además que en R^1 a R^{21} , el alquilo inferior sea un grupo alquilo lineal o ramificado con un número de carbono de 1 a 6, y el grupo alcoxi inferior sea un grupo alcoxi lineal o ramificado con un número de carbonos de 1 a 6.

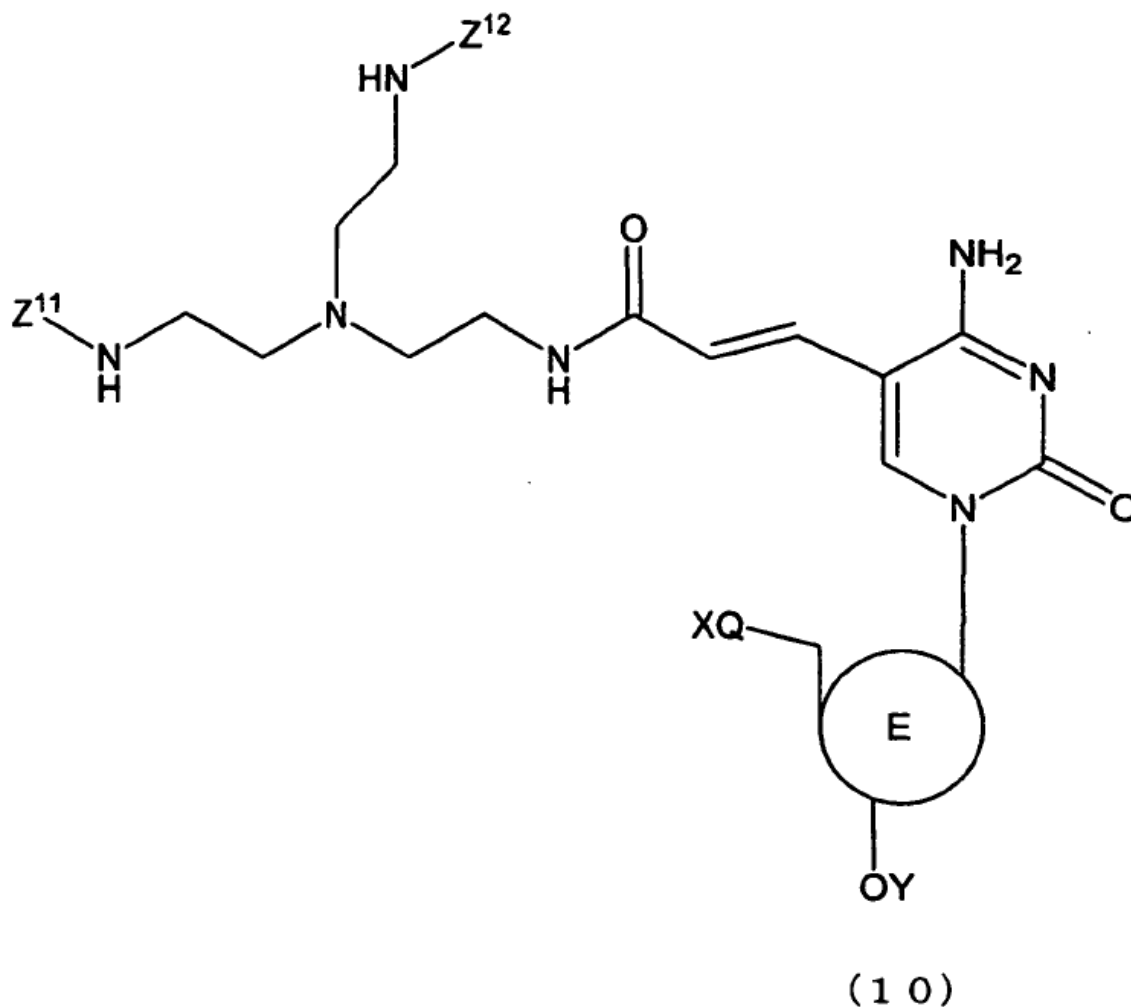
[0025] En las fórmulas (7) a (9), se prefiere además que en R^{11} y R^{12} , el grupo de enlace sea un grupo polimetilén carbonilo con un número de carbonos de por lo menos 2 y se una a L^1 o L^2 en la fórmula (1), (1b), o (1c) o NH en la fórmula (5), (6), (6b), o (6c), por el resto de grupo carbonilo del mismo. El límite superior del número de carbonos del grupo polimetilén carbonilo no está particularmente limitado y es, por ejemplo, 100 o inferior, preferiblemente 50 o inferior, más preferiblemente 30 o inferior, y particularmente preferiblemente 10 o inferior.

[0026] Cuando Z^{11} y Z^{12} están cada uno representados por cualquiera de las fórmulas (7) a (9), es más preferible que sean, por ejemplo, cada uno independientemente un grupo representado por la fórmula (19) o (20).



En las fórmulas (19) y (20), X^1 indica -S- o -O-. R^1 a R^{10} , R^{13} y R^{14} indican cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo alcoxi inferior, un grupo nitro, o un grupo amino. Uno de R^{11} y R^{12} es un grupo de enlace que se une a L^1 o L^2 en la fórmula (1), (1b), o (1c) o NH en la fórmula (5), (6), (6b), o (6c), y el otro es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior.

[0027] El compuesto de la presente invención puede ser, por ejemplo, un compuesto que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula (10), un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo.



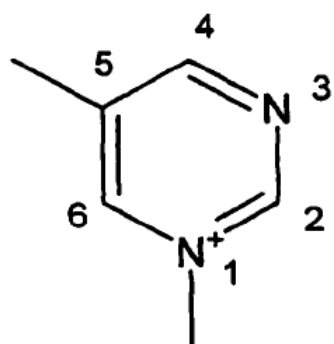
En la fórmula (10), E, Z^{11} , Z^{12} , Q, X, e Y son idénticos a los de la fórmula (1), respectivamente.

[0028] En las fórmulas (1), (1b), y (1c), B puede tener un esqueleto de nucleobases naturales pero puede tener un esqueleto de nucleobases artificiales tal como se ha descrito anteriormente.

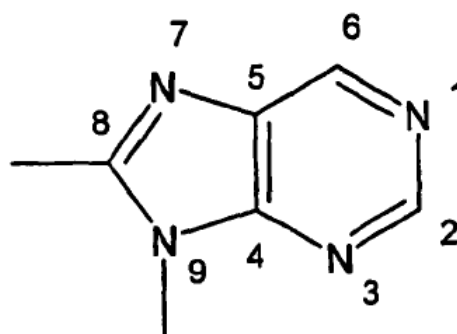
Por ejemplo, B es preferiblemente una estructura representada por Py, derivado de Pyr, Pu, o derivado de Pu, donde el Py es un grupo atómico que tiene un enlace covalente a E en la posición 1 y un enlace covalente a un grupo enlazador en la posición 5 en el anillo de 6 miembros representado por la siguiente fórmula (11), el "derivado de Pyr" es un grupo atómico en que por lo menos uno de los átomos del anillo de seis miembros del Py ha sido sustituido de manera adecuada por un átomo de N, C, S, u O, y el átomo de N, C, S, u O puede tener una carga eléctrica, un átomo de hidrógeno, o un sustituyente,

el Pu es un grupo atómico que tiene un enlace covalente a E en la posición 9 y un enlace covalente a un grupo enlazador en la posición 8 en el anillo condensado representado por la siguiente fórmula (12), y

el derivado de Pu es un grupo atómico en que por lo menos uno de todos los átomos del anillo de 5 miembros del Pu ha sido sustituido de forma adecuada por un átomo de N, C, S, u O, y el átomo de N, C, S, u O puede tener una carga eléctrica, un átomo de hidrógeno, o un sustituyente.

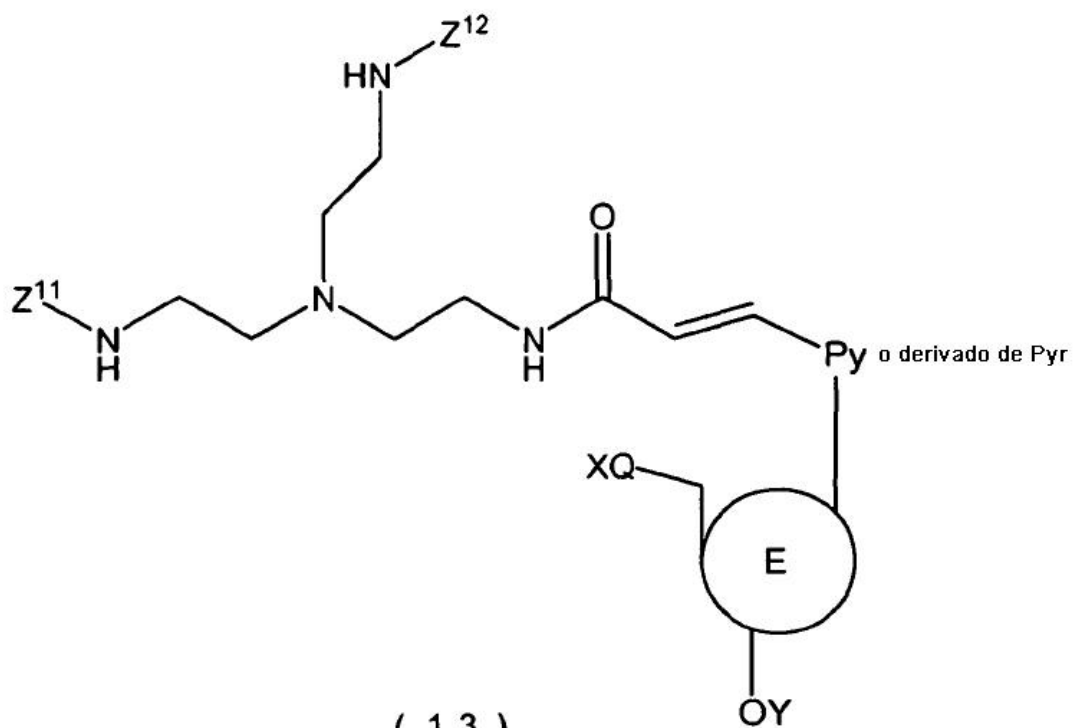


(1 1)

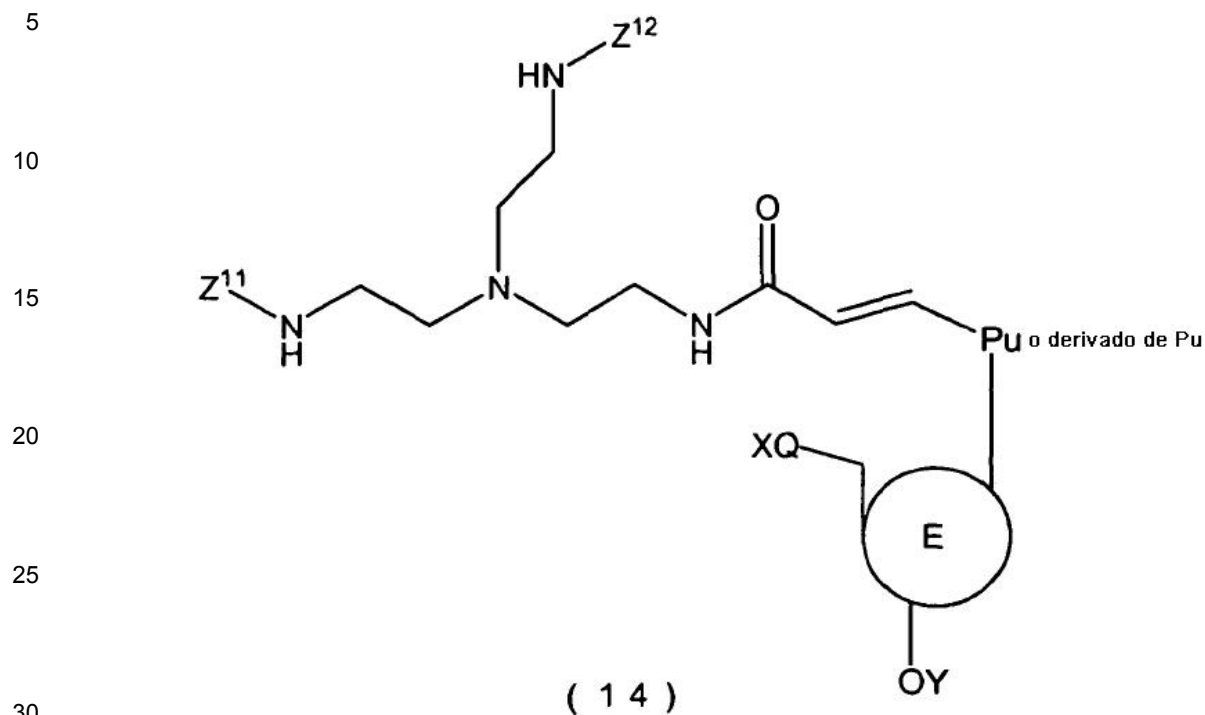


(1 2)

[0029] El compuesto de la presente invención puede ser, por ejemplo, un compuesto representado por la siguiente fórmula (13) o (14), un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo.



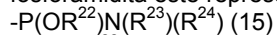
(1 3)



En las fórmulas (13) y (14),

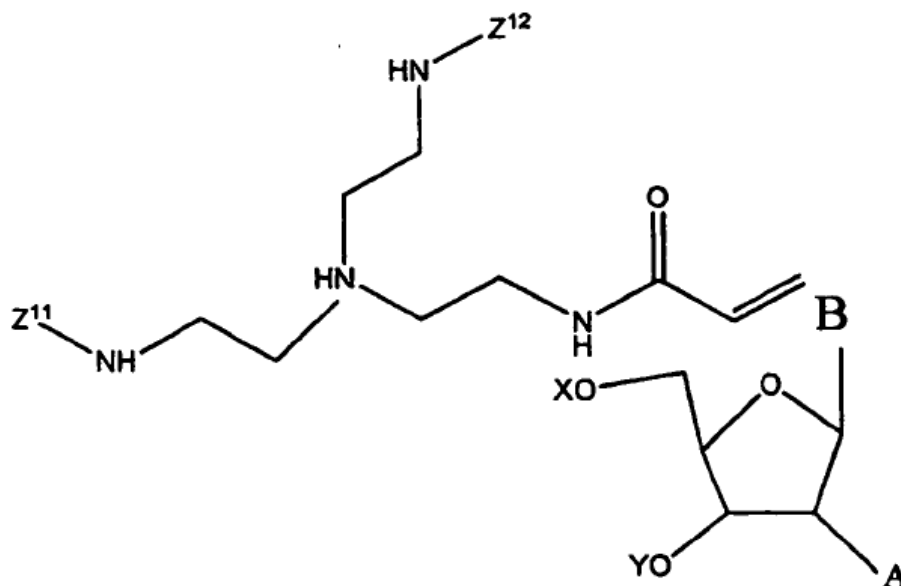
E, Z¹¹, Z¹², Q, X, e Y son idénticos a los de la fórmula (1), respectivamente, y Py, derivado de Pyr, Pu, y derivado de Pu son tal como se han definido anteriormente.

[0030] Cuando el compuesto de la presente invención tiene un grupo fosforamidita, se prefiere que el grupo fosforamidita esté representado por, por ejemplo, la siguiente fórmula (15):



donde R²² es un grupo protector de un grupo fosfato, y R²³ y R²⁴ son cada uno un grupo alquilo o un grupo arilo. Además preferiblemente, en la fórmula (15), R¹⁵ es un grupo cianoetilo, y en R¹⁶ y R¹⁷, el grupo alquilo es un grupo isopropilo y el grupo arilo es un grupo fenilo.

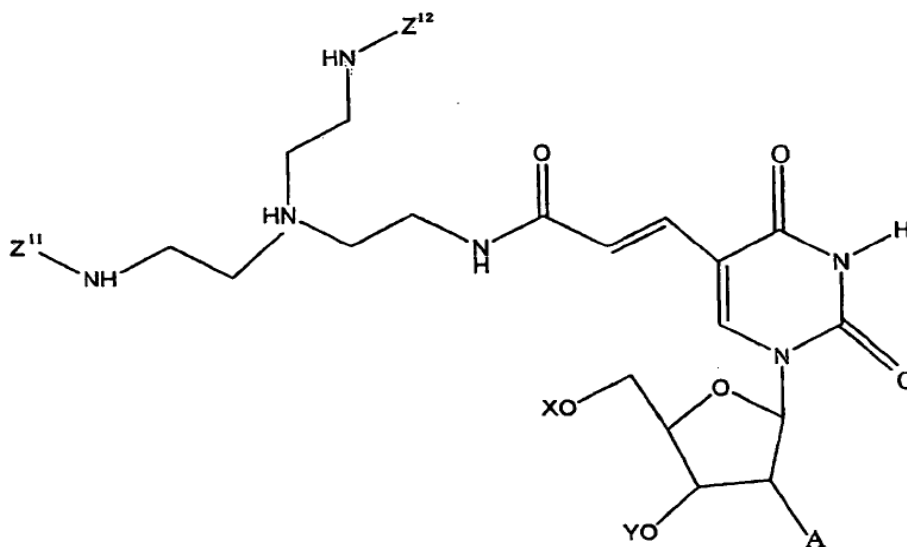
[0031] En el compuesto de la presente invención, por ejemplo, el compuesto representado por la fórmula (1) puede ser un compuesto representado por la siguiente fórmula (21).



(21)

En la fórmula (21), A indica un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo. Preferiblemente, A es un átomo de hidrógeno. B indica un residuo de adenina, guanina, citosina, timina o uracilo. Por ejemplo, adenina y guanina se han unido a un doble enlace en la posición 8, y la citosina, timina o uracilo se han unido a un doble enlace en la posición 5. Z¹¹ y Z¹² indica cada uno independientemente un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra un efecto de excitón, un átomo de hidrógeno, o un grupo protector de un grupo amino, y son particularmente preferiblemente un residuo de un derivado de amarillo de oxazol o un derivado de naranja de tiazol. X indica un átomo de hidrógeno, un grupo protector de un grupo hidroxilo que se puede desproteger con ácido, un grupo monofosfato, un grupo difosfato, o un grupo trifosfato. Y es un átomo de hidrógeno, un grupo protector de un grupo hidroxilo, o un grupo fosforamidita.

[0032] También es preferible que el compuesto representado por la fórmula (21) esté representado por la siguiente fórmula (22).



(22)

En la fórmula (22), A indica un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo. Z^{11} y Z^{12} son cada uno independientemente un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra un efecto de excitón, un átomo de hidrógeno, o un grupo protector de un grupo amino, y particularmente preferiblemente un residuo de un derivado de amarilla de oxazol o un derivado de naranja de tiazol. X indica un átomo de hidrógeno, un grupo protector de un grupo hidroxilo que se puede desproteger con ácido, un grupo monofosfato, un grupo difosfato, o un grupo trifosfato. Y es un átomo de hidrógeno, un grupo protector de un grupo hidroxilo, o un grupo fosforamidita.

[0033] En el compuesto de la fórmula (21) o (22), cuando Z^{11} y Z^{12} son cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo amino, dos grupos amino (o grupos amino protegidos) están contenidos en una molécula, y, por tanto, se pueden introducir dos moléculas marcadas en una molécula utilizando los grupos amino. Por ejemplo, cuando se produce ácido nucleico marcado, con, por ejemplo, una sustancia fluorescente o una sustancia quimioluminiscente unidas al mismo, se puede mejorar la sensibilidad de detección del ácido nucleico. Además, como en el caso en que Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra un efecto de excitón, el marcaje de un ácido nucleico con una sustancia fluorescente específica posibilita su detección de manera fácil.

[0034] Además, en el compuesto de la fórmula (21) o (22), un compuesto en que Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra un efecto de excitón está modificado en los nucleótidos con dos moléculas de fluorescencia, por ejemplo, un derivado de naranja de tiazol o un derivado de amarillo de oxazol. Una sonda formada de un ácido nucleico de una cadena que contiene dicho compuesto emite una fluorescencia muy débil, cuando la sonda se utiliza por sí misma, debido a la desactivación causada por el acoplamiento del excitón, pero emite una fluorescencia intensa mediante la hibridación con ADN o ARN. Es decir, por ejemplo, la fluorescencia del derivado de naranja de tiazol o el derivado del amarillo de oxazol se suprime de manera intensa por la estructura distorsionada de los mismos, pero cuando el derivado de naranja de tiazol o el derivado de amarillo de oxazol se unen al ADN, la distorsión estructural se cancela y se fija y, por tanto, se emite una fluorescencia intensa. La fluorescencia se puede detectar mediante, por ejemplo, la excitación realizada utilizando un láser de Ar con una longitud de onda de 488 nm o 514 nm, pero el método de detección no se limita al mismo.

[0035] El compuesto de la presente invención representado por la fórmula (1), (1b), o (1c) se puede utilizar para sintetizar un ácido nucleico (polinucleótido), por ejemplo. Es decir, el compuesto de la presente invención se puede utilizar como sustancia marcadora para el ácido nucleico (reactivo marcador de ácido nucleico). Por ejemplo, mediante la utilización del compuesto de la presente invención representado por la fórmula (1), (1b), o (1c) como sustrato de nucleótido y la realización de la reacción de síntesis de ácidos nucleicos utilizando ácido nucleico de cadena simple como plantilla, o mediante la síntesis de un ácido nucleico de cadena sencilla químicamente (por ejemplo, un método de síntesis química, tal como un método de fosforamidita que se lleva a cabo utilizando un sintetizador automático de ácidos nucleicos) utilizando un compuesto representado por la fórmula (1), (1b), o (1c), se puede producir un ácido nucleico que contiene por lo menos una molécula del compuesto de la presente invención en una molécula. En este caso, los grupos atómicos Z^{11} y Z^{12} pueden ser cada uno un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra un efecto de excitón, pero también puede ser un átomo de hidrógeno o un grupo protector.

[0036] Tal como se ha descrito anteriormente, el ácido nucleico de la presente invención presenta una estructura que contiene por lo menos una estructura representada por la siguiente fórmula (16), (16b), (17) o (17b). Un tautómero o estereoisómero del compuesto o una sal del compuesto, el tautómero o el estereoisómero también están comprendidos por el ácido nucleico de la presente invención,

5

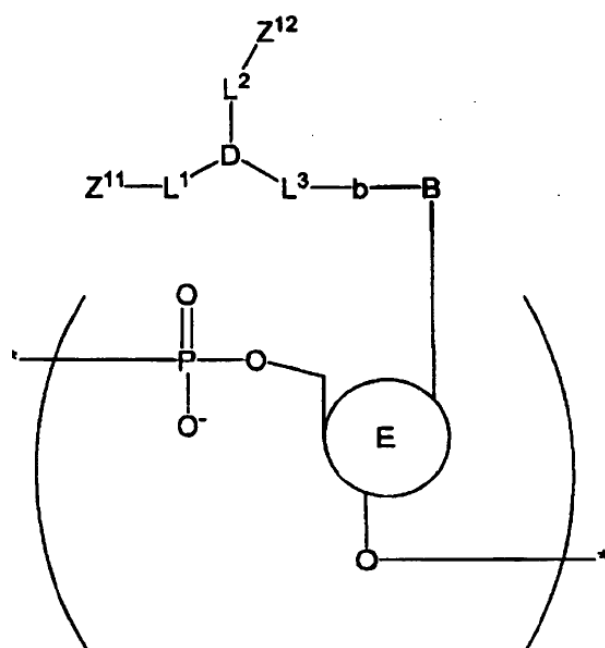
10

15

20

25

30



(1 6)

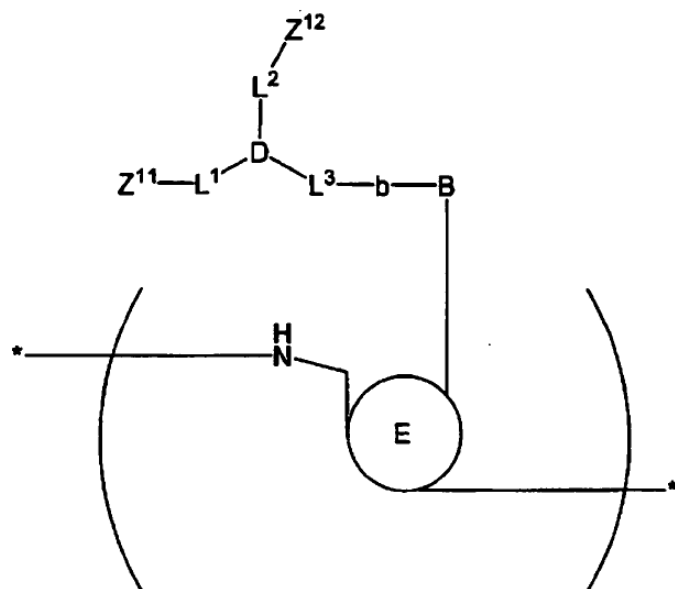
35

40

45

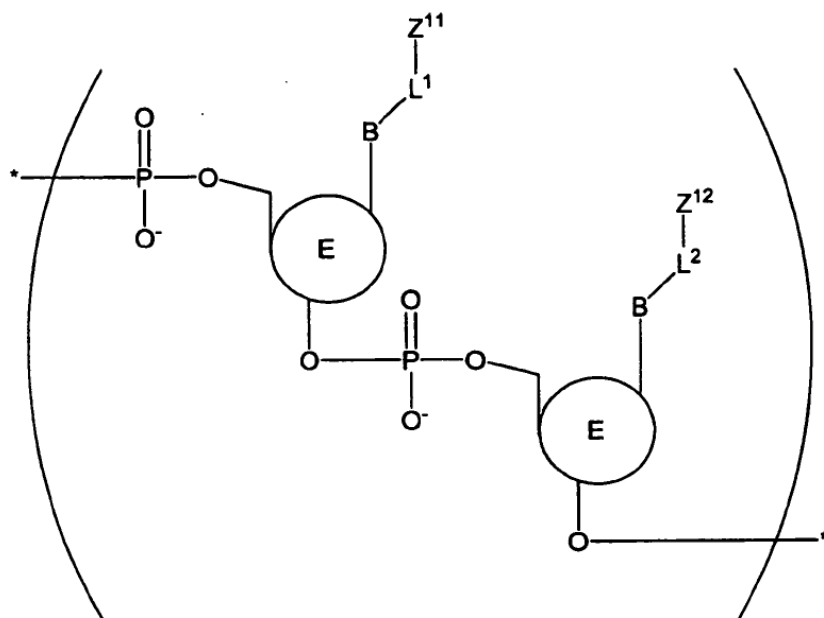
50

55

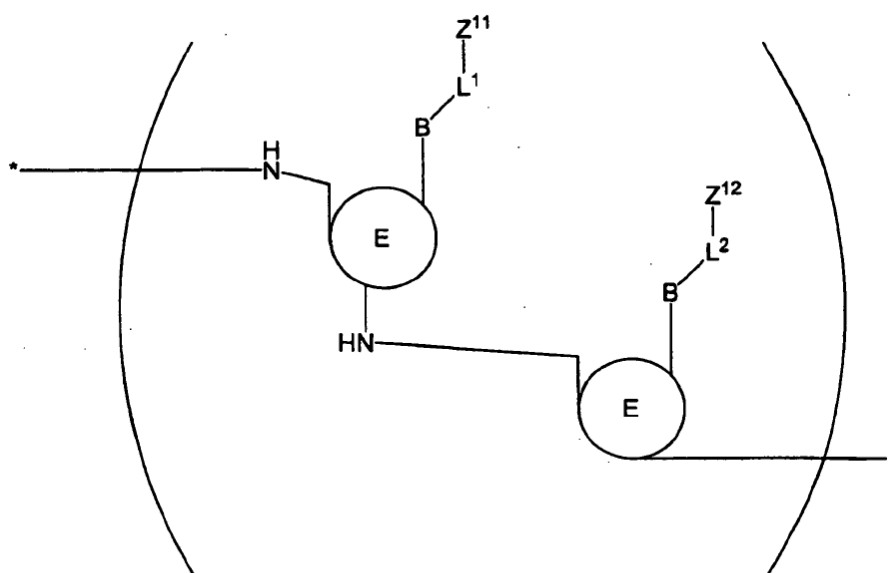


(1 6 b)

60



(1 7)



(1 7 b)

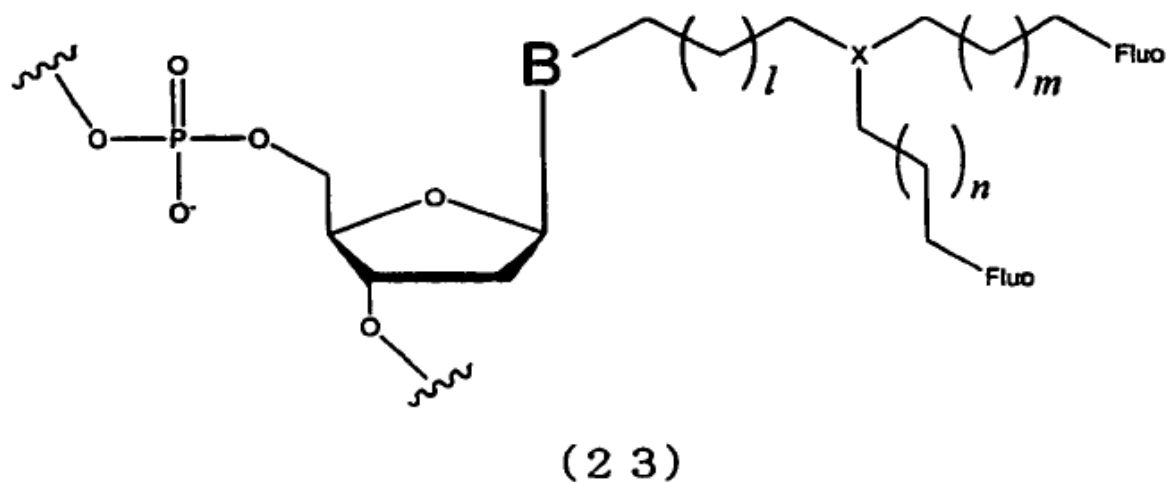
En las fórmulas (16), (16b), (17) y (17b), B, E, Z^{11} , Z^{12} , L^1 , L^2 , L^3 , D, y b tienen cada uno la estructura mostrada en la fórmula (1), (1b), o (1c), donde en las fórmulas (16) y (17), E es el grupo atómico descrito en el punto (i) en la fórmula (1), (1b), o (1c), y por lo menos un átomo de O en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido por un átomo de S, en las fórmulas (16b), (17b), y (18b), E es el grupo atómico descrito en el punto (ii) en la fórmula (1), (1b), o (1c), y en las fórmulas (17) y (17b), los B respectivos pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y los respectivos E pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

En las fórmulas (16), (17), (16b) y (17b), Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra un efecto de excitón, y pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

[0037] El esqueleto básico del ácido nucleico de la presente invención no está particularmente limitado. Puede ser, por ejemplo, cualquiera de AND, AND modificado, ARN, ARN modificado, LNA y PNA (ácido nucleico de péptido), u otra estructura. Además, el número de bases contenidas en el ácido nucleico de la presente invención no está particularmente limitado. Es, por ejemplo, aproximadamente de 10 bp a 10 kb, preferiblemente aproximadamente de 10 bp a 1 kb. Cuando el ácido nucleico de la presente invención es un oligonucleótido, la longitud del mismo no está particularmente limitado, y tiene, por ejemplo, aproximadamente de 10 a 100 bp, más preferiblemente de 10 a 50 bp, y aún más preferiblemente de 10 a 30 bp.

[0038] El número de compuestos representados por la fórmula (1), (1b), o (1c) que están contenidos en el ácido nucleico de la presente invención no está particularmente limitado. Es, por ejemplo, aproximadamente de 1 a 100, y preferiblemente aproximadamente de 1 a 20.

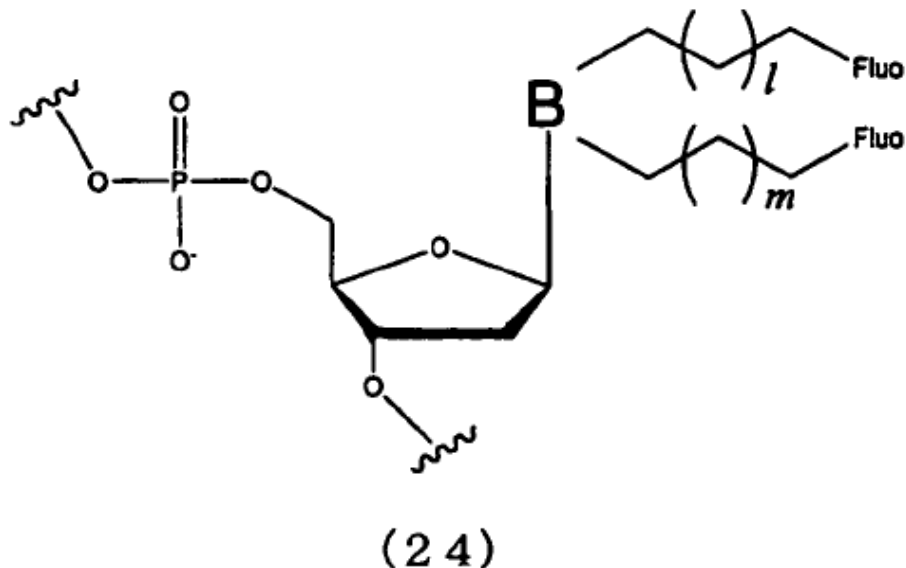
[0039] El compuesto o ácido nucleico de la presente invención puede tener, por ejemplo, una estructura representada por cualquiera de las siguientes fórmulas (23) a (25). En este caso, se puede utilizar de manera adecuada como sonda de fluorescencia con un colorante introducido en la misma. Sin embargo, el compuesto de la presente invención preferiblemente utilizado como sonda de fluorescencia no se limita al mismo.



[0040] En la fórmula (23), dos colorantes (Fluo) están unidos a una base B. El lugar en que se une la base B a un enlazador no está particularmente limitado. Por ejemplo, la base B está unida a un enlazador en una posición seleccionada entre la posición 4, la posición 5 y la posición 6 de pirimidina y la posición 2, la posición 3, la posición 6, la posición 7 y la posición 8 de purina. El enlazador tiene un sitio de unión a base, ramificaciones en por los menos dos puntos a lo largo de su extensión, y está unido a colorantes en los extremos del mismo. El método a utilizar para unirlo a una base o un colorante no es sólo un enlace formado por, por ejemplo, una reacción catalizada por metal, una reacción de condensación de formación de anillos, o una reacción de adición de Michael a un doble enlace o un triple enlace, sino también, por ejemplo, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro o un enlace formado por, por ejemplo, una reacción de formación de imina. Con respecto al enlazador, las longitudes (l, m y n) son arbitrarias y pueden contener un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, amina, imina, un enlace éter, un enlace tioéter o un enlace tioéster. Además, es preferible que el enlazador no evite el efecto del excitón causado por la dimerización. La ramificación (X) es cada átomo de carbono, silicio, nitrógeno, fósforo y boro y puede tener lugar la protonación (por ejemplo, NH^+) u oxidación (por ejemplo, $P=O$). Preferiblemente, el colorante a utilizar es aquel que muestra un efecto de excitón por la dimerización. El sitio en que se une el colorante a un enlazador es cualquier parte del mismo. La fórmula (23) muestra el desoxirribonucleótido, que es una estructura parcial de ADN, pero en lugar del mismo, el esqueleto del ácido nucleico puede ser ribonucleótido (ARN), así como un

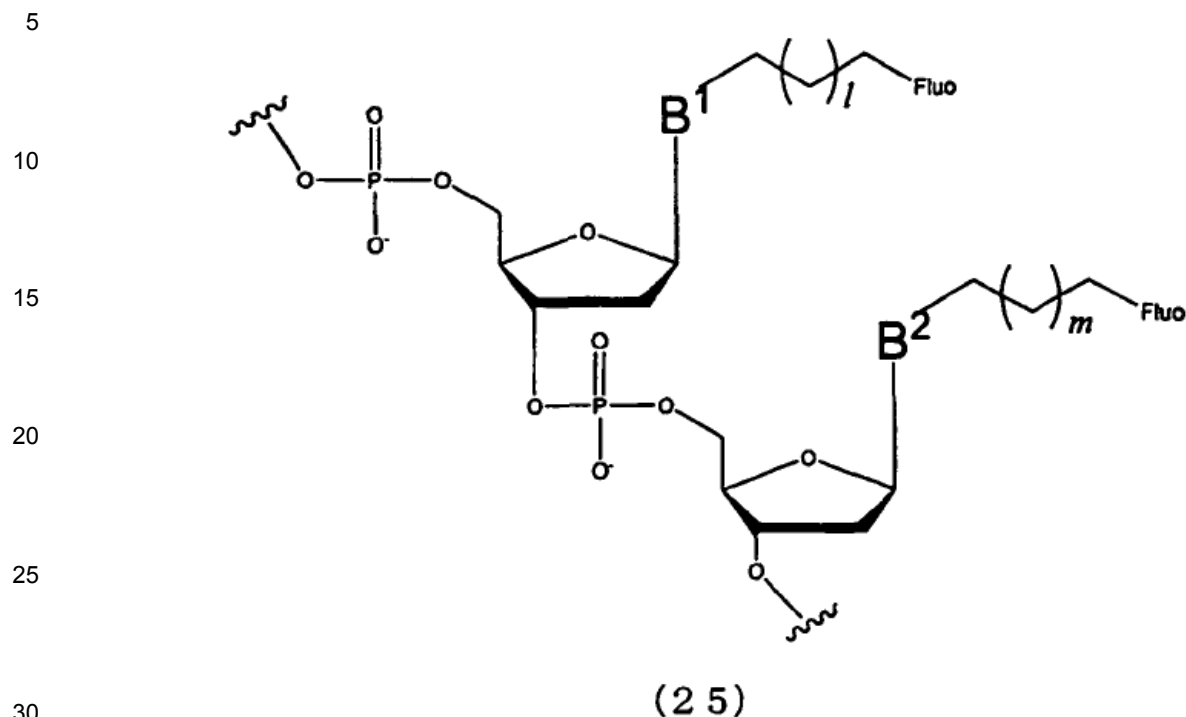
ácido nucleico modificado con azúcar, tal como 2'-O-metil ARN o 2'-fluoro ADN, ácido nucleico modificado con ácido fosfórico, tal como ácido nucleico fosforotioato, o ácido nucleico funcional, tal como PNA o LNA (BNA).

[0041]



[0042] En la fórmula (24), dos colorantes (Fluo) están unidos a una base B. El lugar en que se une la base B a un enlazador no está particularmente limitado. Por ejemplo, la base B está unida a enlazadores en dos posiciones seleccionadas entre la posición 4, la posición 5 y la posición 6 de pirimidina y la posición 2, la posición 3, la posición 6, la posición 7 y la posición 8 de purina. Los dos enlazadores tienen un sitio de unión a base y están unidos a un colorante en los extremos de los mismos. El método a utilizar para unirlos a una base o un colorante no es sólo un enlace formado por, por ejemplo, una reacción catalizada por metal, una reacción de condensación de formación de anillos, o una reacción de adición de Michael a un doble enlace o un triple enlace, sino también, por ejemplo, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro o un enlace formado por, por ejemplo, una reacción de formación de imina. Con respecto a los enlazadores, las longitudes (l y m) son arbitrarias y pueden contener un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, amina, imina, un enlace éter, un enlace tioéter o un enlace tioéster. Además, es preferible que los enlazadores no eviten el efecto del excitón causado por la dimerización. Preferiblemente, el colorante a utilizar es aquel que muestra un efecto de excitón mediante la dimerización. El sitio en que se une el colorante a un enlazador es cualquier parte del mismo. La fórmula (24) muestra el desoxirribonucleótido, que es una estructura parcial de ADN, pero en lugar del mismo, el esqueleto del ácido nucleico puede ser ribonucleótido (ARN), así como un ácido nucleico modificado con azúcar, tal como 2'-O-metil ARN o 2'-fluoro ADN, ácido nucleico modificado con ácido fosfórico, tal como ácido nucleico fosforotioato, o ácido nucleico funcional, tal como PNA o LNA (BNA).

[0043]



[0044] En la fórmula (25), las bases (B1 y B2) de nucleótidos contiguos están cada uno unidos a un colorante (Fluo). El lugar en que se une cada base B a un enlazador no está particularmente limitado. Por ejemplo, cada base B está unida a un enlazador en una posición seleccionada entre la posición 4, la posición 5 y la posición 6 de pirimidina y la posición 2, la posición 3, la posición 7 y la posición 8 de purina. Los dos enlazadores tienen cada uno un sitio de unión a base y están unidos a un colorante en el otro extremo de los mismos. El método a utilizar para unirlos a bases o colorantes no es sólo un enlace formado por, por ejemplo, una reacción catalizada por metal, una reacción de condensación de formación de anillos, o una reacción de adición de Michael a un doble enlace o un triple enlace, sino también, por ejemplo, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro o un enlace formado por, por ejemplo, una reacción de formación de imina. Con respecto a los enlazadores, las longitudes (l y m) son arbitrarias y pueden contener un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, amina, imina, un enlace éter, un enlace tioéter o un enlace tioéster. Además, es preferible que los enlazadores no eviten el efecto del excitón causado por la dimerización. Preferiblemente, el colorante a utilizar es aquel que muestra un efecto de excitón mediante la dimerización. El sitio en que se une el colorante a un enlazador es cualquier parte del mismo. La fórmula (25) muestra el desoxirribonucleótido, que es una estructura parcial de ADN, pero en lugar del mismo, el esqueleto del ácido nucleico puede ser ribonucleótido (ARN), así como un ácido nucleico modificado con azúcar, tal como 2'-O-metil ARN o 2'-fluoro ADN, ácido nucleico modificado con ácido fosfórico, tal como ácido nucleico fosforotioato, o ácido nucleico funcional, tal como PNA o LNA (BNA).

[0045] Cuando el compuesto o ácido nucleico de la presente invención presenta un isómero, tal como un tautómero o un estereoisómero (por ejemplo, un isómero geométrico, un confórmero, o un isómero óptico), se puede utilizar cualquier isómero para la presente invención. La sal del compuesto o ácido nucleico de la presente invención puede ser una sal de adición de ácido, pero puede ser una sal de adición de base. Además, el ácido que forma la sal de adición de ácido puede ser un ácido inorgánico o un ácido orgánico, y la base que forma la sal de adición de base puede ser una base inorgánica o una base orgánica. El ácido inorgánico no está particularmente limitado. Ejemplos de los mismos incluyen ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido fluorhídrico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido hipofluoroso, ácido hipocloroso, ácido hipobromoso, ácido hipoyodoso, ácido fluoroso, ácido cloroso, ácido bromoso, ácido yodoso, ácido fluórico, ácido clórico, ácido brómico, ácido yódico, ácido perfluórico, ácido perclórico, ácido perbromico y ácido peryódico. El ácido orgánico tampoco está particularmente limitado. Ejemplos de los mismos incluyen ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromobenzenosulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, y ácido acético. La base inorgánica no está particularmente limitada. Ejemplos de las mismas incluyen hidróxido de amonio, hidróxido de metal alcalino, hidróxido, carbonato e hidrogenocarbonato de metal alcalinotérreo. Ejemplos más específicos incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de potasio,

carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidrogenocarbonato de potasio, hidróxido de calcio y carbonato de calcio. La base orgánica tampoco está limitada. Ejemplos de las mismas incluyen etanolamina, trietilamina y tris(hidroximetil)aminometano. El método de producción de sales de los mismos no está particularmente limitado. Se pueden producir mediante un método en el que, por ejemplo, los ácidos o las bases descritas anteriormente se añaden de manera adecuada a la molécula de unión dadora/aceptora de electrones mediante un método conocido. Además, cuando, por ejemplo, el sustituyente tiene un isómero, se puede utilizar cualquier isómero. Por ejemplo, en el caso de un "grupo naftilo", puede ser un grupo 1-naftilo o un grupo 2-naftilo.

[0046] Además, en la presente invención, el grupo alquilo no está particularmente limitado. Ejemplos del mismo incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo y un grupo tert-butilo, así como grupos (por ejemplo, un grupo alquilamino y un grupo alcoxi) que contienen grupo alquilo en sus estructuras. Además, el grupo perfluoroalquilo no está particularmente limitado. Ejemplos del mismo incluyen grupos de perfluoroalquilo derivados de un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo y un grupo tert-butilo, así como grupos que contienen grupos perfluoroalquilo en sus estructuras (por ejemplo, un grupo perfluoroalquilsilfonilo y un grupo perfluoroacilo). En la presente invención, el grupo acilo no está particularmente limitado. Ejemplo del mismo incluyen un grupo formilo, un grupo acetilo, un grupo propionilo, un grupo isobutirilo, un grupo valerilo, un grupo isovalerilo, un grupo pivaloilo, un grupo hexanoilo, un grupo ciclohexanoilo, un grupo bencilo, y un grupo etoxicarbonilo, así como grupos que contienen un grupo acilo en sus estructuras (por ejemplo, un grupo aciloxi y un grupo alcanilo). En la presente invención, se incluye el carbono de carbonilo en el número de carbonos del grupo acilo. Por ejemplo, un grupo alcanilo (un grupo acilo) con un número de carbonos de 1 indica un grupo formilo. Además, en la presente invención, "halógeno" indica un elemento halógeno arbitrario, y ejemplo del mismo incluyen flúor, cloro, bromo y yodo. En la presente invención, el grupo protector de un grupo amino no está particularmente limitado. Ejemplos del mismo incluyen un grupo trifluoroacetilo, un grupo formilo, un grupo alquil C₁₋₆-carbonilo (por ejemplo, acetilo y etilcarbonilo), un grupo alquil C₁₋₆-sulfonilo, un grupo tert-butiloxicarbonilo (de aquí en adelante también referido como "Boc"), un grupo benciloxicarbonilo, un grupo aliloxicarbonilo, un grupo fluorenilmetiloxi carbonilo, un grupo arilcarbonilo (por ejemplo, fenilcarbonilo y naftilcarbonilo), un grupo arilsulfonilo (por ejemplo, fenilsulfonilo y naftilsulfonilo), un grupo alquilo C₁₋₆-carbonilo (por ejemplo, metoxicarbonilo y etoxicarbonilo), un grupo aralquil C₇₋₁₀ carbonilo (por ejemplo, bencilcarbonilo), un grupo metilo, y un grupo aralquilo (por ejemplo, grupo bencilo, difenilmetilo, y tritilo). Estos grupos pueden estar sustituidos por, por ejemplo, uno a tres átomos de halógeno (por ejemplo, flúor, cloro, o bromo) o grupos nitro. Ejemplos específicos de los mismos incluyen un grupo p-nitrobenciloxicarbonilo, un grupo p-clorobenciloxicarbonilo, un grupo m-clorobenciloxicarbonilo, y un grupo p-metoxibenciloxicarbonilo. En la presente invención, el grupo protector de un grupo hidroxilo (incluyendo uno capaz de ser desprotegido con ácido) no está particularmente limitado. Ejemplos del mismo incluyen un grupo dimetoxitritilo, un grupo monometoxitritilo, y un grupo pixilo.

[0047] Particularmente, los ejemplos preferidos del compuesto o ácido nucleico de la presente invención incluyen los descritos posteriormente en la sección de ejemplo, en particular, los compuestos (ácidos nucleicos) 102 a 106, 110, 113, 114, 116 a 118, 120, 121, 122, 123, 124, ODN1, ODN2, ODN3, ODN4, ODN5, ODN6, ODN7, ODN8, ODN9, ODN10, ODN (anti4.5S), y ODN (antiB1), así como isómeros geométricos, estereoisómeros y sales de los mismos. Especialmente, los compuestos 110, 113, 114, 116 a 118, 120, 121, 122, 123, 124, ODN1, ODN2, ODN3, ODN4, ODN5, ODN6, ODN7, ODN8, ODN9, ODN10, ODN (anti4.5S), y ODN (antiB1) son particularmente buenos en, por ejemplo, la sensibilidad de detección de ácidos nucleicos, ya que el naranja de tiazol y el ADN se unen covalentemente con una estructura única. Además, los compuestos 110, 113, 117, 118, 120, 121, 122, 123, 124, ODN1, ODN2, ODN3, ODN4, ODN5, ODN9, ODN (anti4.5S) y ODN (antiB1) que contienen dos estructuras de naranja de tiazol en una molécula se pueden utilizar además de manera efectiva como una sonda de fluorescencia de un ADN de cadena sencilla que suprime la fluorescencia en un estado de cadena sencilla y tiene la intensidad de fluorescencia que se incrementa mediante la formación de una doble hélice con un ADN o ARN complementario.

[0048] A continuación, la sustancia marcadora de la presente invención es, tal como se ha descrito anteriormente:

(i) una sustancia marcadora que emite fluorescencia, con dos estructuras químicas planas contenidas en una molécula, que no existen en el mismo plano, sino con un cierto ángulo formado entre ellas, localizado para disponerse en el mismo plano cuando la molécula experimenta una intercalación o unión en los surcos a un ácido nucleico

(ii) una sustancia marcadora formada de por lo menos dos grupos moleculares colorantes que no muestran emisión de fluorescencia debido al efecto de excitón obtenido cuando por lo menos dos moléculas colorantes se agregan en paralelo entre sí, pero muestran emisión de fluorescencia destruyéndose el estado de agregación cuando las moléculas experimentan una intercalación o unión en los surcos a un ácido nucleico, o

(iii) una sustancia marcadora compleja que tiene, como estructura química característica, una estructura química de por lo menos dos moléculas colorantes contenidas en una molécula, con los por lo menos dos moléculas colorantes sin exhibir la emisión de fluorescencia debido al efecto de excitón obtenido cuando se agregan en paralelo entre sí, pero mostrando emisión de fluorescencia destruyéndose el estado de agregación cuando las moléculas experimentan una intercalación o unión en los surcos a un ácido nucleico.

En el caso del punto (ii) o (iii), es preferible que las moléculas colorantes sean la molécula descrita en el punto (i). Además, en el caso del punto (iii), es preferible que la sustancia marcadora compleja tenga una estructura en que

por lo menos dos moléculas colorantes estén unidas a una molécula enlazadora unida a un ácido nucleico a marcar, con una molécula enlazadora adicional interpuesta entre ellas para tener una estructura ramificada o está unidas directamente a las mismas sin molécula enlazadora adicional interpuesta entre ellas.

[0049] La sustancia marcadora de la presente invención es preferiblemente un compuesto de la presente invención, donde los grupos atómicos Z^{11} y Z^{12} muestran fluorescencia y muestran un efecto de excitón, un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo, o un ácido nucleico de la presente invención, donde los grupos atómicos Z^{11} y Z^{12} muestran fluorescencia y muestran un efecto de excitón, un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo. Por ejemplo, en el compuesto o ácido nucleico de la presente invención, dado que Z^{11} y Z^{12} son grupos atómicos que muestran el efecto de excitón, la fluorescencia aumenta cuando se forma una estructura de doble hélice y, de este modo, se puede detectar la estructura de doble hélice posteriormente de manera efectiva. Sin embargo, en el compuesto o ácido nucleico de la presente invención, incluso cuando Z^{11} y Z^{12} no son grupos atómicos que muestren el efecto de excitón o incluso cuando sólo un grupo atómico (colorante) que muestra fluorescencia ha sido introducido en una molécula, se puede utilizar como sustancia marcadora, por ejemplo, para ácidos nucleicos, y la estructura de doble hélice también se puede detectar de manera efectiva. Ejemplos de la forma de la sustancia marcadora según la presente invención incluyen la forma de una sonda de fluorescencia de un ácido nucleico de cadena sencilla. Sin embargo, no se limita a la misma y puede tener cualquier forma, tal como mononucleótido marcado, oligonucleótido marcado o ácido nucleico de doble cadena.

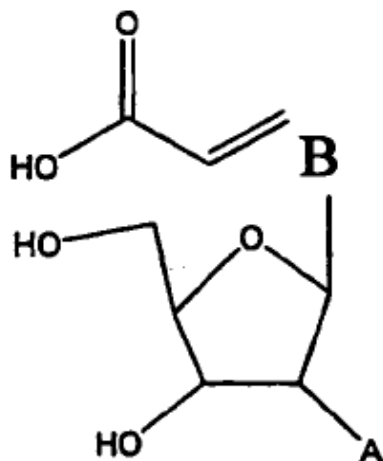
[0050] La sustancia marcadora de la presente invención es, por ejemplo, mononucleótido marcado, oligonucleótido marcado, ácido nucleico marcado o un análogo de ácido nucleico marcado, donde la sustancia marcadora es una sustancia marcadora marcada con cualquiera de los puntos (i) a (iii), un compuesto de la presente invención, donde Z^{11} y Z^{12} son cada uno grupos atómicos que muestran fluorescencia y muestran un efecto de excitón, un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo, o un ácido nucleico de la presente invención, donde Z^{11} y Z^{12} son cada uno grupos atómicos que muestran fluorescencia y muestran un efecto de excitón, un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo.

[0051] Una sustancia marcadora de la presente invención es, por ejemplo, mononucleótido marcado, oligonucleótido marcado, ácido nucleico marcado o un análogo de ácido nucleico marcado, donde la sustancia marcadora es una sustancia marcadora marcada con cualquiera de los puntos (i) a (iii), un compuesto de la presente invención, donde Z^{11} y Z^{12} son cada uno grupos atómicos que muestran fluorescencia y muestran un efecto de excitón, un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo, o un ácido nucleico de la presente invención, donde Z^{11} y Z^{12} son cada uno grupos atómicos que muestran fluorescencia y muestran un efecto de excitón, un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo, con una molécula enlazadora unida a por lo menos una molécula o moléculas base que forman la cadena principal que están contenidas en mononucleótido, oligonucleótido, ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico o una sustancia marcadora.

[0052] Una sustancia marcadora de la presente invención es, por ejemplo, mononucleótido marcado, oligonucleótido marcado, ácido nucleico marcado o un análogo de ácido nucleico marcado, donde la sustancia marcadora es una sustancia marcadora marcada con cualquiera de los puntos (i) a (iii), un compuesto de la presente invención, donde Z^{11} y Z^{12} son cada uno grupos atómicos que muestran fluorescencia y muestran un efecto de excitón, un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo, o un ácido nucleico de la presente invención, donde Z^{11} y Z^{12} son cada uno grupos atómicos que muestran fluorescencia y muestran un efecto de excitón, un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo, con una molécula enlazadora unida a un átomo de carbono en la posición 5 de un núcleo de pirimidina o un átomo de carbono en la posición 8 de un núcleo de purina de por lo menos una molécula base contenida en mononucleótido, oligonucleótido, ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico o una sustancia marcadora.

[Método de producción del compuesto y del ácido nucleico de la presente invención]

[0053] Los métodos de producción del compuesto y el ácido nucleico no están especialmente limitados, y pueden utilizarse adecuadamente métodos de síntesis conocidos (métodos de producción). En caso de un compuesto representado por la fórmula (21), como ejemplo, puede producirse mediante un método de producción que incluye: una etapa de reacción de tris(2-aminoetil) amina con un compuesto representado por la fórmula siguiente (26) después de que se activara el grupo carboxilo del compuesto; una etapa de protección de un grupo amino; y una etapa de realización de una reacción para proteger el grupo hidroxilo presente en el compuesto obtenido anteriormente con un grupo protector y una reacción para añadir ácido fosfórico o un grupo de fosforamida al grupo hidroxilo presente en el compuesto obtenido anteriormente.



(26)

En la fórmula (26), A indica un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo y B indica un residuo de adenina, guanina, citosina, timina, o uracilo.

[0054] Por ejemplo, puede utilizarse el método de producción siguiente (método de síntesis) para la producción de un compuesto y ácido nucleico según la presente invención. Es decir, se ha utilizado ampliamente un método en el cual un grupo amino activo contenido en ADN y un grupo carboxilo activado en un agente marcador reaccionan uno con el otro en una solución tampón como un método fácil de marcaje de ADN. Puede utilizarse este método para la producción tanto del compuesto como del ácido nucleico de la presente invención, y puede utilizarse especialmente para la introducción de un enlazador o un colorante. Los ejemplos del método de introducción de un grupo amino incluyen un método que utiliza una fosforamidita modificadora de amino disponible en GLEN RESEARCH.

[0055] Los grupos atómicos Z^{11} y Z^{12} cada uno pueden convertirse, por ejemplo, desde un grupo protector a un átomo de hidrógeno (es decir se elimina un grupo protector), y adicionalmente puede sustituirse el átomo de hidrógeno por un grupo atómico (colorante) que tiene fluorescencia. El método de eliminación del grupo protector no está especialmente limitado, y puede utilizarse adecuadamente un método conocido. El método de sustitución con un grupo atómico (colorante) fluorescente tampoco está especialmente limitado. Por ejemplo, puede hacerse que reaccionen adecuadamente un compuesto o ácido nucleico de la presente invención en los que Z^{11} y Z^{12} son cada uno un átomo de hidrógeno con una molécula de fluorescencia (colorante). Por ejemplo, es preferible que por lo menos uno de entre Z^{11} o Z^{12} sea un grupo amino activo, ya que tiende a reaccionar con una molécula de fluorescencia (colorante). Más preferiblemente, tanto Z^{11} como Z^{12} son grupos amino activos. La molécula de fluorescencia (colorante) tampoco está especialmente limitada y puede ser, por ejemplo, un compuesto representado por cualquiera de las fórmulas (7) a la (9) (en las que R^{11} y R^{12} son cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, o un grupo carboxipolimetileno). Además, en el caso del ácido nucleico (polinucleótido, polinucleósido, oligonucleótido, o oligonucleósido), pueden llevarse a cabo la etapa de eliminar un grupo protector y la etapa de sustituir con un grupo atómico (colorante) que tiene fluorescencia antes de la polimerización (síntesis de ácido nucleico) o pueden llevarse a cabo después de ello. Por ejemplo, desde el punto de vista de la prevención de que se dañe una porción de colorante en el proceso de síntesis, es preferible que se introduzca un grupo atómico (colorante) que tiene fluorescencia después de la polimerización (síntesis de ácido nucleico).

[0056] Tal y como se ha descrito anteriormente, el colorante no está limitado especialmente y puede utilizarse cualquier colorante. Por ejemplo, es preferible el colorante de cianina y particularmente preferible el naranja de tiazol. El colorante de cianina tiene una estructura química en la cual, por ejemplo, se enlazan entre sí dos heterociclos que tienen heteroátomos con un enlazador de metino. Es posible sintetizar colorantes fluorescentes con varias longitudes de onda de excitación/emisión mediante, por ejemplo, el cambio del tipo de los heterociclos o la longitud del enlazador de metino, o introduciendo un sustituyente en los heterociclos. Además, también es

relativamente fácil la introducción de un enlazador para la introducción de ADN. El naranja de tiazol apenas emite fluorescencia en el agua pero emite una fluorescencia intensa a través de una interacción con ADN o ARN. Posiblemente, se previene la interacción entre las moléculas de colorante mediante una interacción con un ácido nucleico y se previene la rotación alrededor del enlazador de metino localizado entre los dos heterociclos de moléculas de colorante, lo cual conduce a un incremento en la intensidad de la fluorescencia. Es bien conocido el método de utilización de un colorante de naranja de tiazol. Puede utilizarse con referencia a, por ejemplo, H. S. Rye, M. A. Quesada, K. Peck, R. A. Mathies y A. N. Glazer, High-sensitivity two-color detection of double-stranded DNA with a confocal fluorescence gel scanner using ethidium homodimer and thiazole orange, *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 327-33; y L. G. Lee, C. H. Chen y L. A. Chiu, Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis, *Cytometry*, 1986, 7, 508-17.

[0057] Tal y como se ha descrito anteriormente, el esqueleto básico del compuesto y el ácido nucleico de la presente invención no está especialmente limitado. Puede ser, por ejemplo, cualquier estructura de ADN, ADN modificado, ARN, ARN modificado, LNA, y PNA (ácido nucleico de péptido), u otra estructura. Es preferible como esqueleto básico el ADN, el ADN modificado, el ARN, o el ARN modificado, ya que facilitan la síntesis y también facilitan, por ejemplo, la sustitución con un colorante (introducción de una molécula de colorante). El método de introducción de una molécula de colorante dentro de LNA o PNA no está limitado especialmente y puede utilizarse adecuadamente un método conocido. Específicamente, por ejemplo, puede hacerse referencia a *Analytical Biochemistry* 2000, 281, 26-35. Svanvik, N., Westman, G., Wang, D., Kubista, M. (2000) *Anal Biochem.* 281, 26-35. Hrdlicka, P. J., Babu, B. R., Sorensen, M. D., Harrit, N., Wengel, J. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* 127, 13293-13299.

[0058] Se conoce bien un método para sintetizar ácido nucleico que tiene, como un esqueleto básico, ADN, ADN modificado, ARN, o ARN modificado. Por ejemplo, pueden sintetizarse mediante un método denominado de fosforamidita. El reactivo de fosforamidita para que sirva como un material de partida del mismo también puede sintetizarse fácilmente mediante un método conocido. Si el ácido nucleico de la presente invención es ADN, en particular oligodesoxirribonucleótido corto, puede sintetizarse fácilmente con, por ejemplo, un sintetizador de ADN automático. Además, también es posible sintetizar, por ejemplo, un ácido nucleico de cadena larga (ADN) mediante, por ejemplo, PCR. Tal y como se ha descrito anteriormente, la posición en la que se unen el ADN y una molécula de colorante entre sí no está especialmente limitada, pero, por ejemplo es especialmente preferible la posición 5 de timidina. Se sabe que el ácido trifosfórico de un derivado de nucleótido con varios sustituyentes se extiende a partir de la posición 5 de timidina para tener una eficiencia relativamente alta de introducción llevada a cabo con ADN polimerasa. Por consiguiente, puede sintetizarse fácilmente un ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo no sólo cuando sea un oligodesoxirribonucleótido corto, sino también cuando es un ADN de cadena larga.

[0059] Especialmente, una sonda fluorescente (sustancia marcadora) de la presente invención, que es un ADN de cadena sencilla, con, por ejemplo, naranja de tiazol utilizado en la misma tiene las siguientes ventajas, por ejemplo: (1) puede prepararse simplemente proporcionando un colorante para ADN sintetizado con un sintetizador de ADN automatizado, en un tampón de solución, y es sintéticamente fácil, y (2) también es posible producir una sonda de fluorescencia de cadena larga mediante la reacción de un colorante con ADN de cadena larga preparada enzimáticamente. Además, puede excitarse con luz que tiene una longitud de onda relativamente larga aproximadamente, por ejemplo, 500 nm.

[Método y kit para la detección de ácido nucleico]

[0060] El método para detectar un ácido nucleico según la presente invención es tal como se ha descrito anteriormente,

(I) un método de detección de un ácido nucleico, que comprende las etapas de:

llevar a cabo una síntesis de ácido nucleico utilizando, como sustrato, la sustancia marcadora según la presente invención que es un mononucleótido marcado u oligonucleótido marcado, sintetizando así un ácido nucleico de doble cadena al que está unido el grupo atómico que muestra fluorescencia o la estructura molecular colorante mediante una intercalación o unión en los surcos;

medir la intensidad de fluorescencia antes y después de la etapa de sintetizar el ácido nucleico de doble cadena;

y

detectar la síntesis de ácido nucleico mediante la comparación las intensidades de fluorescencia entre sí que se obtienen antes y después de la etapa de síntesis del ácido nucleico de doble cadena,

(II) un método de detección de un ácido nucleico, que comprende las etapas de: llevar a cabo la síntesis de ácido nucleico mediante la hibridación, como un primer ácido nucleico, la sustancia marcadora según la presente invención que es un ácido nucleico de cadena sencilla, a un segundo ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria con el primer ácido nucleico o una secuencia análoga a la secuencia complementaria, sintetizando así un ácido nucleico de doble cadena al que está unido el grupo atómico que muestra fluorescencia o la estructura molecular colorante mediante una intercalación o unión en los surcos;

medir la intensidad de fluorescencia antes y después de la etapa de sintetizar el ácido nucleico de doble cadena;

y

detectar la hibridación entre el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico mediante la comparación las intensidades de fluorescencia entre sí que se obtienen antes y después de la etapa de síntesis del ácido nucleico de doble cadena,

(III) un método de detección de un ácido nucleico, que comprende las etapas de: llevar a cabo la síntesis de ácido nucleico mediante la hibridación, como un primer ácido nucleico, la sustancia marcadora según la presente invención que es un ácido nucleico de cadena sencilla, a un segundo ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria con el primer ácido nucleico o una secuencia análoga a la secuencia complementaria, sintetizando así un ácido nucleico de doble cadena al que está unido el grupo atómico que muestra fluorescencia o la estructura molecular colorante mediante una intercalación o unión en los surcos;

medir la intensidad de fluorescencia antes y después de la etapa de sintetizar el ácido nucleico de doble cadena; y

detectar la hibridación entre el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico mediante la comparación las intensidades de fluorescencia entre sí que se obtienen antes y después de la etapa de síntesis del ácido nucleico de doble cadena; o

(IV) un método de detección de un ácido nucleico, que detecta la formación de un ácido nucleico de triple cadena o análogo de ácido nucleico mediante la utilización de un tercer ácido nucleico que tiene una secuencia del primer ácido nucleico mencionado anteriormente o el segundo ácido nucleico, una secuencia complementaria a la secuencia del primer ácido nucleico o el segundo ácido nucleico, o una secuencia análoga a la secuencia complementaria, y está marcada o no marcada con la sustancia marcadora según la presente invención o una sustancia marcadora compleja.

Se prefiere que: (a) por lo menos dos moléculas colorantes estén unidas a una molécula base en el primer ácido nucleico a través de un enlazador; (b) por lo menos dos moléculas colorantes estén unidas a una molécula base en el primer ácido nucleico a través de por lo menos dos enlazadores; o (c) por lo menos dos moléculas colorantes unidas a dos moléculas bases adyacentes en el primer ácido nucleico a través de por lo menos un enlazador.

[0061] La síntesis de ácido nucleico se lleva a cabo preferiblemente mediante, por ejemplo, un método enzimático, pero se pueden utilizar también otros métodos. En los métodos mencionados anteriormente para detectar el ácido nucleico según la presente invención, se prefiere detectar un ácido nucleico de cadena doble o triple utilizando el compuesto de la presente invención, donde Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra un efecto de excitón, un tautómero o estereoisómero del mismo, o una sal del mismo, o un ácido nucleico marcado que tiene, en una parte del mismo, una estructura del ácido nucleico de la presente invención.

[0062] A continuación, un kit de la presente invención incluye, tal como se ha descrito anteriormente: una unidad de síntesis de ácido nucleico; una sustancia marcadora y una unidad de medición de intensidad de fluorescencia, en el que la sustancia marcadora es la sustancia marcadora mencionada anteriormente de la presente invención. Es decir, dado que la sustancia marcadora del kit de la presente invención es la sustancia marcadora de la presente invención, el kit puede detectar un ácido nucleico con una sensibilidad elevada, por ejemplo. A excepción de esto, no existe una limitación particular en el kit de la presente invención. Por ejemplo, la unidad de síntesis de ácido nucleico no está particularmente limitada y puede ser, por ejemplo, un sintetizador automatizado de ácidos nucleicos conocido o similar. La unidad de medición de las intensidades de fluorescencia tampoco está particularmente limitada y puede ser, por ejemplo, un dispositivo de medición de fluorescencia conocido o similar.

[0063] El kit de la presente invención preferiblemente se utiliza en el método de detección de un ácido nucleico de la presente invención. Sin embargo, la utilización del mismo no se limita al mismo, y se puede utilizar para cualquier aplicación. El kit de la presente invención se utiliza preferiblemente como kit para, por ejemplo, estudios, uso clínico o diagnóstico.

[0064] A continuación, se describirá más específicamente el método o kit de detección de ácidos nucleicos de la presente invención. Cabe indicar que, sin embargo, el método o kit de detección de ácidos nucleicos de la presente invención no están limitados, en ningún modo, por la siguiente descripción.

[0065] El método de detección de ácido nucleico de la presente invención utiliza la sustancia marcadora de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente. En este caso, la sustancia marcada de la presente invención puede tener sólo un grupo atómico (colorante) que tiene fluorescencia por molécula, pero tiene preferiblemente por lo menos dos grupos atómicos (colorante) que tienen fluorescencia por molécula. Esto permite, por ejemplo, que los grupos atómicos (colorante) que tienen fluorescencia tengan un efecto de excitón. El efecto de excitón, por ejemplo, suprime la intensidad de fluorescencia en un estado de cadena sencilla y de este modo permite la detección posterior de manera eficaz de una estructura de doble hélice. El "efecto de excitón" (acoplamiento de excitón) es un efecto en que, por ejemplo, se agregan en paralelo una pluralidad de colorantes para formar un agregado H y, de este modo, apenas muestran emisión de fluorescencia. Posiblemente, este efecto se obtiene de la siguiente manera. Es decir, el estado de excitación del colorante se divide en dos niveles de energía mediante la separación de Davydov, excitación hasta el nivel de energía superior y, a continuación, tiene lugar la conversión interna en el nivel de energía inferior y, de este modo, la

emisión está térmicamente prohibida. Sin embargo, estas descripciones no limitan, de ningún modo, la presente invención. La posible aparición del efecto de excitón se puede confirmar mediante la aparición de la banda de absorción de los colorante que han formado el agregado H en una longitud de onda más corta en comparación con la banda de absorción de un único colorante. Ejemplos de los colorante que incluyen dicho efecto incluyen naranja de tiazol y un derivado del mismo, amarillo de oxazol y un derivado del mismo, cianina y un derivado del mismo, hemicianina y un derivado del mismo, y rojo de metilo y un derivado del mismo tal como se ha descrito anteriormente, así como grupos colorantes referidos en general como colorante de cianina y colorantes azo.

[0066] Estos colorantes tienden a unirse a una doble cadena de ADN-ADN o una doble cadena de ADN-ARN que forma una doble hélice o una doble cadena formada de ADN o ARN y un ácido nucleico artificial, tal como ácido nucleico de fosfotioato, PNA (ácido nucleico de péptido) o LNA (BNA) mediante intercalación. Cuando una pluralidad de dichos colorantes se ha introducido en una sonda, tiene lugar una fuerte desactivación debido al efecto de excitón en un estado de cadena sencilla normal (es decir, en el estado en el que la sonda no se ha hibridado aún), pero se rompe un agregado a través de la hibridación con un ADN o ARN diana y, a continuación, los colorantes respectivos se intercalan en la doble cadena por separado. En este caso, no ocurre una interacción electrónica entre los colorantes y, por tanto, el efecto de excitón no tiene lugar, lo cual resulta en una observación de emisión de fluorescencia intensa. La banda de absorción de los colorantes en esta etapa es idéntica a la de un colorante individual, lo cual indica que no tiene lugar un efecto de excitón entre los colorantes. Además, cuando los colorantes se intercalan en una doble cadena, se cancela la torsión estructural inherente a los colorantes, lo cual da lugar a una emisión de fluorescencia adicional más intensa.

[0067] Por consiguiente, por ejemplo, se diseña una sonda de manera que una pluralidad de colorantes permiten obtener el efecto de excitón, de manera que es posible activar o desactivar la fluorescencia muy claramente a través de la hibridación de los mismos a una secuencia diana. El efecto de excitón no aparece a través de la unión de sólo una molécula de colorante a una secuencia de sonda. Sin embargo, por las razones de que, por ejemplo, la intercalación del colorante causada por la formación de una doble cadena aplan la estructura del colorante, también es posible que se muestre una fluorescencia más intensa que la mostrada en el estado de cadena sencilla. Por otro lado, incluso en el caso en que por lo menos dos moléculas de colorante estén unidas, cuando los respectivos colorantes están separados por una distancia que no les permite mostrar una correlación electrónica, el efecto de excitón no tiene lugar. Es decir, a efectos de permitir que se muestre el efecto de excitón, por lo menos dos moléculas del colorante deben unirse a una molécula de un ácido nucleico o compuesto de la presente invención de manera que están localizados en una distancia que les permite estar suficientemente cerca. En otras palabras, cuando el compuesto o ácido nucleico de la presente invención se utiliza como sonda de fluorescencia, es preferible que por lo menos dos moléculas de un colorante estén unidas a un nucleótido en la sonda o una molécula de colorante esté unida a cada uno de por lo menos dos nucleótidos contiguos.

[0068] El método de detección de ácidos nucleicos de la presente invención se puede ilustrar conceptualmente en referencia a la figura 1. La figura 1(A) (el diagrama izquierdo indicado con "No híbrido") muestra una sonda desactivada por el efecto excitón y la figura 1(B) (el diagrama de la derecha indicado con "Híbrido") muestra una sonda que forma una doble cadena para someterse a intercalación y emite fluorescencia. En la figura 1, el número 1 indica un ácido nucleico (sonda de fluorescencia) de la presente invención, el número 2 indica un grupo atómico (colorante) que muestra fluorescencia, el número 1' indica una cadena complementaria al ácido nucleico (sonda de fluorescencia) 1, y el número 3 indica un ácido nucleico de doble cadena formado de la sonda 1 y la cadena complementaria 1'. En la parte superior de la figura 1, se muestra un diagrama de transición electrónica. El término "permitida" indica una transición permisible, mientras que el término "prohibida" indica una transición prohibida. El término "Emisión" indica que se puede emitir fluorescencia, y el término "sin emisión" indica que teóricamente no se puede emitir fluorescencia. Es decir, posiblemente, en el estado de cadena sencilla (figura 1(A)), los colorantes 2 en el estado base se agregan para interaccionar entre sí según la teoría de acoplamiento del excitón y el estado de excitación del agregado de colorantes se divide en dos niveles de energía, de manera que se suprime la emisión. Dado que la emisión desde un nivel de energía bajo está teóricamente prohibida, el estado de excitación de singlete del agregado permanece en un estado de emisión bajo. Por otro lado, probablemente, cuando la sonda se hibrida para formar una doble cadena (la figura 1(B)), los colorantes 2 experimentan una intercalación o unión en los surcos a un ácido nucleico de doble cadena 3 y así se disuelve el acoplamiento del excitón de manera que se emite fluorescencia. La figura 1 es una vista esquemática que conceptualmente muestra un ejemplo de un mecanismo de detección de un ácido nucleico según la presente invención. La presente invención no está limitada por la figura 1 y la descripción de la misma. En el efecto de excitón, la emisión de fluorescencia se puede controlar mediante la regulación de la distancia entre dos colorantes. Cuando este sistema está unido a ADN para discriminar una secuencia, se puede obtener emisión de fluorescencia selectiva de secuencia. En el método de detección de ácido nucleico o kit de la presente invención, se puede detectar la hibridación mediante, por ejemplo, la irradiación de una muestra con luz visible de la cara inferior de la misma e incluso visualizándolo se puede discriminar claramente. Además, en el método de detección de ácidos nucleicos o kit de la presente invención, se puede observar la hibridación en un recipiente, tal como una celda fluorescente, una microplaca, un gel, un capilar o un tubo de plástico. Además, en el método de detección de ácidos nucleicos o kit de la presente invención, por ejemplo, la hibridación se puede observar inmediatamente después de la mezcla con el ácido nucleico diana.

[0069] con la sustancia marcadora y el método de detección de ácidos nucleicos o kit de la presente invención, es posible la detección por fluorescencia específica de secuencia de un ácido nucleico, por ejemplo, incluso en un medio en el que el lavado es difícil, tal como en el caso de PCR a tiempo real o un medio intracelular. Más específicamente, son aplicables a los usos descritos en los siguientes puntos (1) a (7), por ejemplo. Debe indicarse que, a partir de ahora, "la sonda de la presente invención" se refiere a una sonda de fluorescencia que es un tipo de sustancia marcadora de la presente invención. Tal como se ha descrito anteriormente, el método de detección de ácidos nucleicos o kit de la presente invención usan la sustancia marcadora de la presente invención. Los siguientes puntos (1) a (7) se indican únicamente con fines ilustrativos, y la sustancia marcadora y el método de detección de ácidos nucleicos o kit de la presente invención no se limitan de ningún modo a las descripciones en estos puntos.

[0070]

(1) La sonda de la presente invención se puede utilizar en un ensayo homogéneo en fase líquida (utilizando, por ejemplo, una microplaca de 96 pocillos o capilar).

(2) La sonda de la presente invención se puede utilizar como una sonda de PCR. Se puede utilizar para la detección de una curva de amplificación en una reacción de amplificación del ADN (PCR a tiempo real) o un método de bajo coste sustituido con el método de la sonda TaqMan. Se puede utilizar como marcador principal o una sonda marcada internamente.

(3) La sonda de la presente invención se puede utilizar como sonda de atrapamiento o sonda marcada en un chip de ADN. Este es un sistema de alto rendimiento que no requiere reactivo y el proceso de marcado y el proceso de lavado no son necesarios. Con este sistema, se pueden evitar considerablemente los errores humanos. Posibilita llevar a cabo análisis simultáneos múltiples (alto rendimiento) en un material portador de vidrio o fase sólida sustituido por el mismo (un material al que se pueden unir muchas especies, tales como un sustrato fabricado de oro, ITO, o cobre, diamante o plástico).

(4) La sonda de la presente invención se puede fijar a una esfera, fibra o hidrogel. Permite detectar un gen bajo un medio semilíquido/semisólido. Aunque tiene un medio de medición como un líquido, se puede transportar como un sólido.

(5) La sonda de la presente invención se puede utilizar como sonda para transferencias (por ejemplo, transferencia Southern, transferencia Northern o transferencia de puntos). Con la utilización de las mismas, sólo se permite que un segmento génico diana emita luz y, de este modo, se detecte. Según el método de la presente invención, el lavado no es necesario después de la operación de hibridación.

(6) La sonda de la presente invención se puede utilizar como sonda para la detección y el rastreo de ácido nucleico intracelular. Esto permite que se realice el análisis espaciotemporal del ADN/ARN intracelular. Se puede utilizar un microscopio de fluorescencia y un clasificador celular. Se puede utilizar para el marcaje de ADN, el rastreo de la transcripción/empalme a ARN, y el análisis funcional de ARNi, por ejemplo. En el método de la presente invención, dado que el lavado no es necesario, es adecuado para rastrear una función de una célula viva.

(7) La sonda de la presente invención se puede utilizar como sonda para hibridación fluorescente in situ (FISH). El método de la presente invención permite, por ejemplo, colorear un tejido. En el método de la presente invención, no se necesita lavado, lo cual reduce el error humano. Es decir, la sonda de la presente invención sirve como colorante fluorescente que no emite fluorescencia cuando no reconoce una biomolécula diana. Por lo tanto, la utilización de la misma puede establecer una bioimagen que no requiere una etapa de lavado incómodo. Esto conduce a una observación de fluorescencia altamente fiable a tiempo real con menos trabajo

[0071] Los efectos de la sonda fluorescente (sustancia marcadora) de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, las siguientes ventajas en comparación con la sonda fluorescente desactivante de cadena sencilla convencional (por ejemplo, una baliza molecular). Sin embargo, son sólo ejemplos y no limitan la presente invención.

(1) es fácil de sintetizar cuando sólo se utiliza un tipo de colorante.

(2) es fácil utilizar como una sonda de PCR cuando la sonda de ADN (sustancia marcadora) de la presente invención tiene un extremo libre.

(3) no es necesario formar una conformación especial, tal como una estructura en orquilla y, por tanto, no son necesarias secuencias que no están asociadas con el reconocimiento de secuencias, tal como una secuencia tallo (no se contienen ni secuencias no útiles ni secuencias limitadas)

(4) se pueden introducir colorantes fluorescentes en una pluralidad de sitios (sitios deseados) en la sonda.

(5) cuando por los menos dos estructuras de colorantes están contenidos en una molécula, la relación posicional entre los colorantes está limitada y de este modo la proporción S/N (la relación de la intensidad de fluorescencia antes y después de la hibridación) es elevada.

[0072] La intensidad de fluorescencia de la sonda según la presente invención se puede cambiar de manera eficaz mediante, por ejemplo, el control de la interacción de excitón en las partes de colorante unidas a la misma. En la presente invención, una estrategia que utiliza particularmente la interacción de excitón posibilita obtener una capacidad de desactivación suficientemente elevada para servir como sonda on-off y, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente, una serie de ventajas que son claramente diferentes en comparación con los ensayos convencionales. El diseño de dichos nucleótidos de fluorescencia on-off es muy importante para el establecimiento de un ensayo de bioimagen que no requiere lavado, por ejemplo. Las propiedades fotofísicas que la sonda que utiliza el efecto excitón muestra no son sólo muy características, sino también son adecuadas para el diseño de una nueva sonda de ADN fluorescente para la secuenciación de ADN (determinación de la secuencia), la búsqueda del genotipo (análisis de genotipo), seguimiento de la transición conformacional de ADN y observación de la expresión génica.

[0073] Además, con la sonda (ácido nucleico) de la presente invención, cuando, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana se determina cuantitativamente, se puede detectar inmediatamente que tuvo lugar un fenómeno, tal como la amplificación, degradación y unión a la proteína de la secuencia en cuestión y también se pueden determinar cuantitativamente las cantidades de estos fenómenos. La siguiente descripción está dirigida a dicha detección y determinación cuantitativa, pero indica ejemplos y no limita la presente invención. Es decir, en primer lugar, la sonda (ácido nucleico) de la presente invención se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana en una cierta relación de cantidad de sustancia y, de este modo, se forma una doble cadena. La cantidad de sustancia de la doble cadena formada de este modo es directamente proporcional a la cantidad de sustancia de la secuencia de ácido nucleico diana. Por consiguiente, la medición de la intensidad de fluorescencia de la doble cadena permite que se detecte una secuencia de ácido nucleico diana y se determine cuantitativamente la cantidad de sustancia de la misma. En este caso, dado que se evita que la sonda (ácido nucleico) de la presente invención emita fluorescencia, no se impide la medición de la intensidad de la fluorescencia de la doble cadena y, de este modo, se puede medir correctamente.

Ejemplos

[0074] La presente invención se describe con mayor detalle a continuación utilizando los siguientes ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada por los siguientes ejemplos. En la descripción siguiente, "ODN" indica oligodesoxirribonucleótido (oligómero de ADN).

[0075] Los reactivos y disolventes utilizados aquí están disponibles comercialmente. El éster N-hidroxisuccinimidilo de biotina utilizado aquí era el disponible de PIERCE. El gel de sílice para purificar un compuesto utilizado aquí fue el gel Wako C-200 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Se midieron los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P con JNM- α 400 (nombre comercial) disponible de JEOL (JOEL Ltd.). La constante de acoplamiento (valor J) se indica en hertz (Hz). El desplazamiento químico se indica en ppm. Se utilizaron el dimetilsulfóxido ($\delta=2,48$ en RMN ^1H , $\delta=39,5$ en RMN ^{13}C) y metanol ($\delta=3,30$ en RMN ^1H , $\delta=49,0$ en RMN ^{13}C) para los patrones internos. Para la medición del RMN ^{31}P , se utilizó H_3PO_4 ($\delta=0,00$) como patrón externo. El espectro de masas ESI se midió utilizando Bruker Daltonics APEC-II (nombre comercial) disponible de Bruker Daltonics. El sintetizador de ADN automatizado utilizado aquí fue el sintetizador 392 DNA-RNA (nombre comercial) disponible de Applied Biosystems. En la HPLC de fase inversa, la separación se llevó a cabo utilizando un Cromatógrafo Gilson, Modelo 305 (nombre comercial), un aparato disponible de Gilson, Inc. y la columna preparativa CHEMCOBOND 5-ODS-H (nombre comercial; 10 x 150 mm) disponible de Chemco Scientific Co., Ltd. Y la detección se llevó a cabo con un detector UV, Modelo 118 (nombre comercial) a una longitud de onda de 260 nm. La masa del ADN se midió con MS MALDI-TOF. El MS MALDI-TOF utilizado aquí fue PerSeptive Voyager Elite (nombre comercial) disponible de Applied Biosystems. La masa se midió a un voltaje acelerante de 21 kV en un modo negativo, se utilizó 2',3',4'-trihidroxiacetofenona como matriz, y se utilizaron T8 ([M.H]. 2370m61) y T17 ([M.H]. 5108,37) como patrones internos. Los espectros de UV y fluorescencia se midieron utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2550 (nombre comercial) y un espectrofotómetro de fluorescencia RF-5300PC (nombre comercial) disponible de Shimadzu Corporation, respectivamente. El tiempo de vida de fluorescencia se midió con un sistema compacto de espectrofluorómetros de tiempo de vida de alto rendimiento HORIBA JOBIN YVON FluoroCube (nombre comercial) equipado con NanoLED-05A (nombre comercial) disponible de HORIBA, Ltd. El punto de fusión (Tf) de ácido nucleico de doble cadena se midió en una solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH=7,0) que contenía cloruro de sodio 100 mM, siendo la concentración final de la doble cadena 2,5 μM . La absorbancia de la muestra se midió a una longitud de onda de 260 nm, y se trazó en el intervalo de 10°C a 90°C mientras se calentaba a una velocidad de 0,5°C/min. A partir de las propiedades así observadas, la temperatura a partir de la que ocurrió un primer cambio se tomó como el punto de fusión Tf.

[0076] Las mediciones del espectro de absorción, el espectro de fluorescencia y el espectro CD se llevaron a cabo a una concentración de cadena de 2,5 μM (cadena sencilla o doble cadena) en una solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) que contenía cloruro de sodio 100 mM utilizando una celda de medición con una longitud de paso óptico de 1 cm, amén que se describa lo contrario. El ancho de banda de la excitación y la emisión de fluorescencia fue de 1,5 nm. El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) se calculó en base al rendimiento cuántico $\Phi_F=0,95$ de 9,10-difenilantraceno en etanol, utilizando 9,10-difenilantraceno como sustancia

de control. El área del espectro de emisión se calculó mediante la integración llevada a cabo utilizando software de instrumentación. El rendimiento cuántico (Φ_F) se calculó mediante la siguiente fórmula (1):

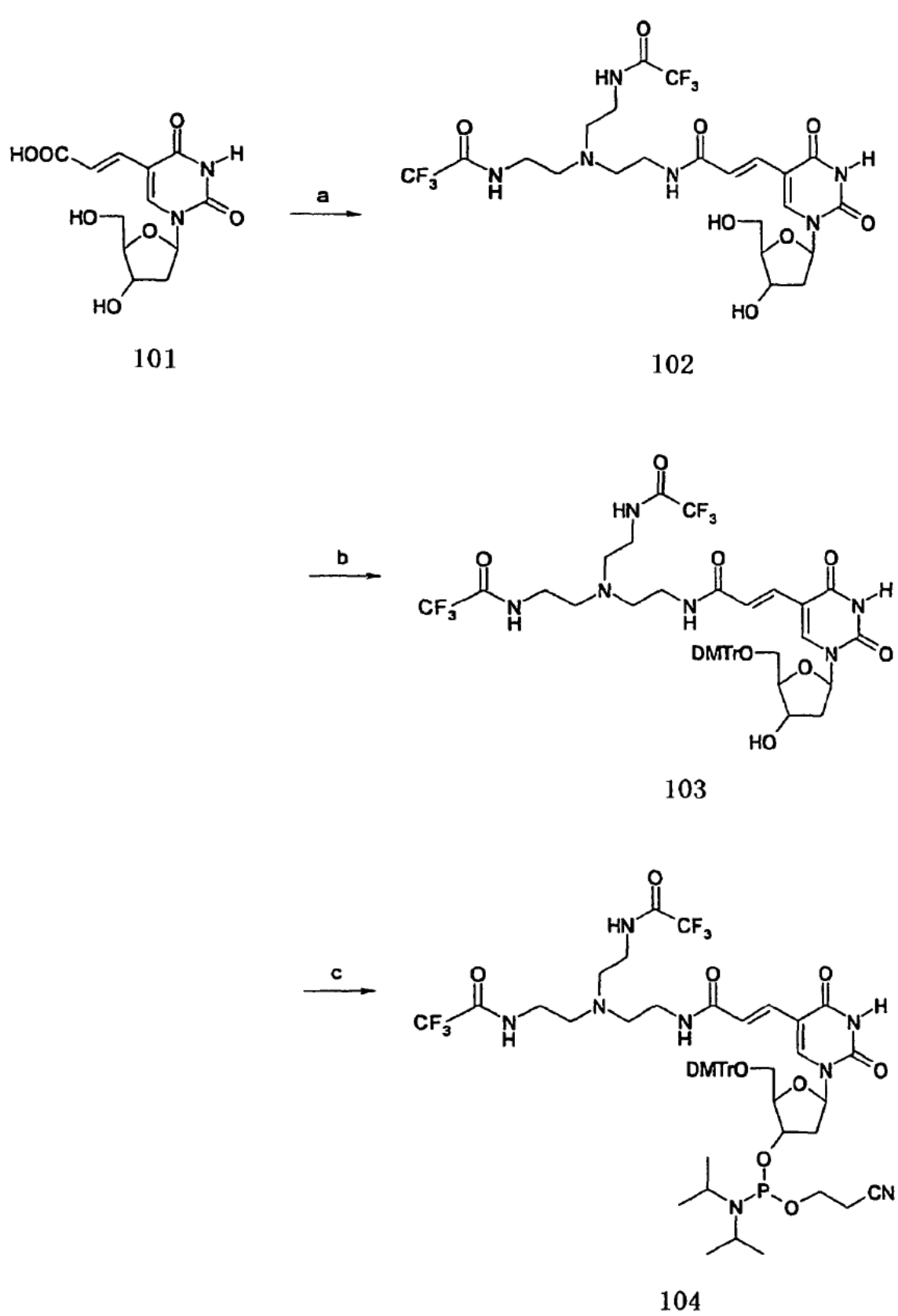
$$\Phi_{F(S)}/\Phi_{F(R)}=[A_{(S)}/A_{(R)}]\times[(Abs)_{(R)}/(Abs)_{(S)}]\times[n_{(S)}^2/n_{(R)}^2] \quad (1)$$

donde ($\Phi_{F(S)}$) es el rendimiento cuántico de fluorescencia de una muestra, ($\Phi_{F(R)}$) es el rendimiento cuántico de fluorescencia de una sustancia de control (Referencia), $A_{(S)}$ es el área del espectro de fluorescencia de la muestra, $A_{(R)}$ es el área del espectro de fluorescencia de la sustancia de control, $(Abs)_{(S)}$ es la densidad óptica de la solución de muestra obtenida a una longitud de onda de excitación, $(Abs)_{(R)}$ es la densidad óptica de la solución de sustancia de control obtenida a una longitud de onda de excitación, $n_{(S)}$ es el índice de refracción de la solución de muestra, $n_{(R)}$ es el índice de refracción de la solución de la sustancia de control, y el cálculo se llevó a cabo con $n_{(S)}=1,333$ y $n_{(R)}=1,383$.

[Ejemplos 1 a 3]

[0077] Según el siguiente esquema 1, se sintetizaron (produjeron) los compuestos 102 y 103 que incluyen dos grupos amino activos protegidos con grupos trifluoroacetilo, respectivamente, y posteriormente se sintetizó fosforamidita 104.

(Continúa en página siguiente)



Esquema 1 – Reactivo de reacción y condiciones de reacción:

(a) (i) N-hidroxisuccinimida, EDC/DMF, (ii) tris(2-aminoetil)-amina/CH₃CN, (iii) CF₃COOEt, Et₃N; (b) DMTrCl/piridina; (c) 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilo fosforamidita, 1H-tetrazolo/CH₃CN.

[0078] El esquema 1 se describe a continuación con mayor detalle.

[Ejemplo 1: Síntesis de 2-[2-[N,N-bis(2-trifluoroacetamidoetil)]-aminoetil]carbamoil-(E)-vinil)-2'-desoxiuridina (Compuesto 102)]

[0079] El material de partida (E)-5-(2-carboxivinil)-2'-desoxiuridina (Compuesto 101), se sintetizó según Tetrahedron 1987, 43, 20, 4601-4607. Es decir, en primer lugar se añadieron 71 mL de 1,4-dioxano a 430 mg de acetato de paladio (II) (FW 224,51) y 1,05 g de trifenilfosfina (FW 262.29), y posteriormente se añadió a los mismos 7,1 mL de trietilamina (FW 101,19, d=0,726). Se calentó y agitó a 70°C. Después de que la solución de reacción cambió de marrón rojizo a marrón negruzco, se añadieron a la misma 14,2 g de 2'-desoxi-5-yodouridina (FW 354,10) y 7,0 mL de acrilato de metilo (FW 86.09, d=0.956) que estaban suspendidos en 1,4-dioxano. Se puso a reflujo con calor a 125°C durante una hora. A continuación, se filtró mientras estaba aún caliente, el residuo se lavó con metanol y, a continuación, se recuperó el filtrado. Después de evaporar el disolvente del filtrado bajo presión reducida, el producto obtenido de esta manera se purificó con una columna de gel de sílice (5-10% metanol/diclorometano). El disolvente de la fracción recogida se evaporó bajo presión reducida y el sólido blanco residual se secó bajo presión reducida. Se añadieron aproximadamente 100 mL de agua ultrapura al sólido secado y se añadieron 3,21 g de hidróxido de sodio (FW 40,00). Se agitó a 25°C durante la noche. A continuación, se añadió a la misma ácido clorhídrico concentrado para acidificar la solución. El precipitado obtenido de este modo se filtró, se lavó con agua ultrapura y a continuación se secó a presión reducida. De este modo, se obtuvieron 8,10 g (con un rendimiento del 68%) de compuesto objetivo (Compuesto 101) como un polvo blanco. Se confirmó que el polvo blanco era el compuesto 101 objetivo ya que el valor de RMN ¹H medido concordaba con el valor de referencia. El valor de RMN ¹³C medido se describe a continuación.

[0080] (E)-5-(2-carboxivinil)-2'-desoxiuridina (Compuesto 101): RMN ¹³C (DMSO-d₆): δ168.1, 161.8, 149.3, 143.5, 137.5, 117.8, 108.4, 87.6, 84.8, 69.7, 60.8, 40.1.

[0081] A continuación, se colocaron 1,20 g de (E)-5-(2-carboxi vinil)-2'-desoxiuridina 101 (con un peso molecular de 298,25), 925 mg de N-hidroxisuccinimida (con un peso molecular de 115,09), y 1,54 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (con un peso molecular de 191,70) en un matraz de recuperación que contenía una barra de agitación, y se añadieron al mismo 20 mL de DMF que a continuación se agitó a 25°C durante 16 horas. Se añadió al mismo aproximadamente 1 mL de ácido acético y se añadieron al mismo 300 mL de cloruro de metileno y 100 mL de agua ultrapura, que a continuación se agitó vigorosamente. Se extrajo la fase acuosa y se añadieron posteriormente 100 mL de agua ultrapura que a continuación se lavó dos veces de la misma manera. El precipitado producido de este modo se filtró, se lavó con cloruro de metileno y a continuación se secó bajo presión reducida. El disolvente se evaporó del filtrado, se añadió cloruro de metileno al precipitado producido de este modo, y a continuación se recuperó el precipitado de la misma manera descrita anteriormente. Los precipitados así recuperados se recogieron y a continuación se suspendieron en 80 mL de acetonitrilo. Se agitó vigorosamente. A continuación, se añadieron de una vez 3,0 mL de tris(2-aminoetil)amina (con un peso molecular de 146,23, d=0,976), que a continuación se agitaron a 25°C durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 4,8 mL de trifluoroacetato de etilo (con un peso molecular de 142,08, d=1,194) y a continuación se añadieron a la misma 5,6 mL de trietilamina (con un peso molecular de 101,19, d=0,726), que a continuación se agitó a 25°C durante tres horas. El disolvente se evaporó y el producto así obtenido se purificó con una columna de gel de sílice (5-10% MeOH/CH₂Cl₂). El disolvente se evaporó, el producto así obtenido se disolvió en una pequeña cantidad de acetona, y a continuación se añadió éter. Como resultado, se produjo un precipitado blanco. Éste se filtró y a continuación se lavó con éter. A continuación, se secó bajo presión reducida. De sete modo, se obtuvieron 884 mg (33,5%) de sustancia diana (Compuesto 102).

[0082] La misma síntesis descrita anteriormente se llevó a cabo a excepción de ligeros cambios en las cantidades de, por ejemplo, los materiales de partida y los disolventes utilizados, el tiempo de reacción y las etapas realizadas. Como resultado, el rendimiento mejoró hasta un 37%. Es decir, se colocaron 597 mg (2,0 mmol) de (E)-5-(2-carboxi vinil)-2'-desoxiuridina 101 (con un peso molecular de 298,25), 460 mg (4,0 mmol) de N-hidroxisuccinimida (con un peso molecular de 115,09), y 767 mg (4,0 mmol) de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (con un peso molecular de 191,70) en un matraz de recuperación con una barra de agitación. A continuación, se añadieron 5,0 mL de DMF, que se agitó a 25°C durante tres horas. Se añadieron aproximadamente 0,5 mL de ácido acético y se añadieron a la misma 100 mL de cloruro de metileno y 100 mL de agua ultrapura, que se agitó vigorosamente. El precipitado así producido se filtró, se lavó con agua y a continuación se secó bajo presión reducida durante toda la noche. El residuo blanco resultante se suspendió en 50 mL de acetonitrilo, que a continuación se agitó vigorosamente. A continuación, se añadieron de golpe 3,0 mL

(20 mmol) de tris(2-aminoetil)amina (con un peso molecular de 146,23, d=0,976), que a continuación se agitó a 25°C durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 4,8 mL de trifluoroacetato de etilo (con un peso molecular de 142,08, d=1,194) y posteriormente se añadieron 5,6 mL (40 mmol) de trietilamina (con un peso molecular de 101,19, d=0,726), que a continuación se agitó a 25°C durante 16 horas. El disolvente se evaporó y el producto así obtenido se purificó con una columna de gel de sílice (5-10% MeOH/CH₂Cl₂). El disolvente se evaporó, el producto así obtenido se disolvió en una pequeña cantidad de acetona, y a continuación se añadió éter. Como resultado, se produjo precipitado blanco. Se filtró y a continuación se lavó con éter. A continuación, se secó bajo presión reducida. De este modo, se obtuvieron 453 mg (37%) de sustancia objetivo (Compuesto 102) como un polvo blanco. Los valores analíticos instrumentales del Compuesto 102 se indican a continuación. Además, se muestra un diagrama de espectro RMN ¹H en la figura 2.

[0083] 2-[2-[N,N-bis(2-trifluoroacetamidoetil)]-aminoetil]carbamoil-(E)-vinil-2'-desoxiuridina (Compuesto 102): RMN¹H(CD₃OD): δ8.35 (s, 1H), 7.22 (d, J=15.6Hz, 1H), 7.04 (d, J=15.6Hz, 1H), 6.26 (t, J=6.6Hz, 1H), 4.44-4.41 (m, 1H), 3.96-3.94 (m, 1H), 3.84 (dd, J=12.2, 2.9Hz, 1H), 3.76 (dd, J=12.2, 3.4Hz, 1H), 3.37-3.30 (m, 6H), 2.72-2.66 (m, 6H), 2.38-2.23 (m, 2H). RMN¹³C(CD₃OD): δ169.3, 163.7, 159.1 (q, J=36.4Hz), 151.2, 143.8, 134.3, 122.0, 117.5 (q, J=286Hz), 110.9, 89.1, 87.0, 71.9, 62.5, 54.4, 53.9, 41.7, 38.9, 38.7. HRMS (ESI) calculado para C₂₂H₂₉F₆N₆O₈ ([M+H]⁺) 619,1951, hallado 619,1943.

[Ejemplo 2: Síntesis de 5'-O-DMTr-(2-[2-[N,N-bis(2-trifluoroacetamidoetil)]-aminoetil]carbamoil-(E)-vinil)-2'-desoxiuridina (Compuesto 103)]

[0084] El grupo 5'-hidroxi del Compuesto 102 se protegió con un grupo DMTr. De este modo, se obtuvo el compuesto 103. Es decir, en primer lugar, se colocaron 618 mg del Compuesto 102 (con un peso molecular de 618.48) y 373 mg de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (con un peso molecular de 338,83) en un matraz de recuperación que contenía una barra de agitación. A continuación, se añadieron a la misma 10 mL de piridina, que se agitó a 25°C durante 16 horas. Se le añadió una pequeña cantidad de agua, se evaporó el disolvente y el producto así obtenido se purificó con una columna de gel de sílice (2-4% MeOH, 1% Et₃N/CH₂Cl₂). Se evaporó el disolvente de la fracción que contiene el compuesto 103 objetivo. De este modo, se obtuvieron 735,2 mg (79,8%) de sustancia objetivo (Compuesto 103). Los valores analíticos instrumentales del compuesto 103 se indican a continuación. Además, se muestra un diagrama del espectro de RMN¹H en la figura 3.

[0085] 5'-O-DMTr(2-[2-[N,N-bis(2-trifluoroacetamidoetil)]-aminoetil] carbamoil-(E)-vinil)-2'-desoxiuridina (Compuesto 103):

RMN¹H (CD₃OD): δ7.91 (s, 1H), 7.39-7.11 (m, 9H), 7.02 (d, J=15.6Hz, 1H), 6.93 (d, J=15.6Hz, 1H), 6.80-6.78 (m, 4H), 6.17 (t, J=6.6Hz, 1H), 4.38-4.35 (m, 1H), 4.06-4.04 (m, 1H), 3.68 (s, 6H), 3.32-3.22 (m, 8H), 2.66-2.55 (m, 6H), 2.40 (ddd, J=13.7, 5.9, 2.9Hz, 1H), 2.33-2.26 (m, 1H). RMN¹³C(CD₃OD): δ168.9, 163.7, 160.1, 159.1 (q, J=36.9Hz), 151.0, 146.1, 143.0, 137.0, 136.9, 134.1, 131.24, 131.16, 129.2, 128.9, 128.0, 122.5, 117.5 (q, J=286.7Hz), 114.2, 110.9, 88.1, 87.9, 87.6, 72.6, 65.0, 55.7, 54.2, 53.9, 41.7, 38.9, 38.6. HRMS (ESI) calculado para C₄₃H₄₇F₆N₆O₁₀ ([M+H]⁺) 921.3258, hallado 921.3265.

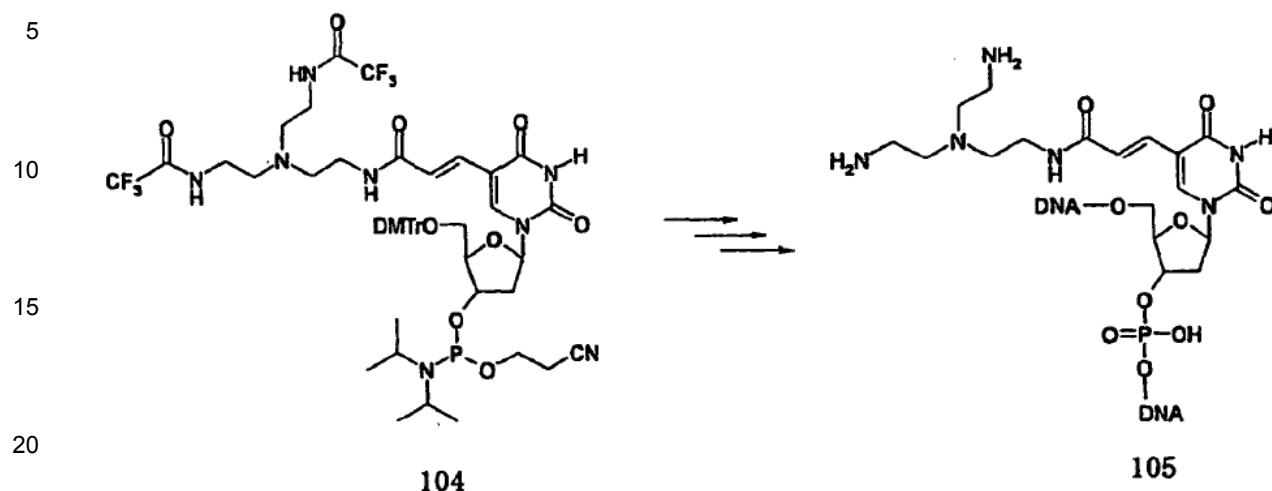
[Ejemplo 3: Síntesis de 5'-O-DMTr-(2-[2-[N,N-bis(2-trifluoroacetamidoetil)]-aminoetil]carbamoil-(E)-vinil)-2'-desoxiuridina, 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Compuesto 104)]

[0086] En primer lugar, se dejó que 188 mg (0,20 mmol) del Compuesto 103 (con un peso molecular de 920,85) formaran un azeótropo con CH₃CN, y se le añadieron 28,6 mg (0,40 mmol) de 1H-tetrazol (con un peso molecular de 70,05). Se secó al vacío con una bomba de vacío durante la noche. A continuación, se le añadieron 5,1 mL de CH₃CN y de este modo se disolvió el reactivo en el mismo, que se agitó a continuación. A continuación, se le añadieron de golpe 194 μL (0,60 mmol) de 2-cianoetilN,N,N',N'-tetraisopropilfosforamidita (con un peso molecular de 301,41, d=0,949) que se agitó a 25°C durante dos horas. Después de eso, se le añadió una mezcla de 50 mL de acetato de etilo y 50 mL de bicarbonato de sodio saturado y se llevó a cabo la separación líquida. Después de lavar la fase orgánica así obtenida con una solución salina saturada, se secó con sulfato de magnesio. El sulfato de magnesio se extrajo por filtración y a continuación se separó el disolvente. El producto crudo obtenido mediante esta separación líquida se dejó que formara un azeótropo con CH₃CN. A continuación, asumiendo que el producto (Compuesto 104) se obtuvo con un rendimiento del 100%, se preparó 0,1 M de solución CH₃CN y se utilizó para la síntesis de ADN. El hecho de que el compuesto 104 se había obtenido se confirmó a partir de RMN ³¹P (CDCl₃) y HRMS (ESI) del producto crudo. Los valores de los mismos se indican a continuación.

[0087] Compuesto 104:

RMN ³¹P (CDCl₃) δ149.686, 149.430; HRMS (ESI) calculado para C₅₂H₆₄F₆N₈O₁₁P ([M+H]⁺) 1121,4336, hallado 1121,4342.

[0088] [Ejemplo 4: síntesis de oligómeros de ADN]



Esquema 2

[0089] La síntesis de oligodesoxiribonucleótido con un sintetizador automatizado de ADN utilizando el Compuesto 104 se llevó a cabo mediante un método convencional de fosforamidita (DMTr OFF) en una escala de 1 μ mol. De este modo, se sintetizó un oligómero de ADN con una secuencia de 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' (13 unidades, la estructura de X es la misma que la de la fórmula química 105) (SEQ ID NO. 1). La desprotección se llevó a cabo con amoníaco concentrado en agua (28% en masa) a 55°C durante 16 horas. Se volatilizó el amoníaco con un speed vac, y el producto así obtenido se pasó a través de un filtro de 0,45 μ m. A continuación, se analizó el oligómero de ADN cortado a partir del mismo mediante HPLC de fase inversa y el pico que había aparecido después de aproximadamente 10,5 minutos se purificó (CHEMCOBOND 5-ODS-H (nombre comercial); 10 x 150 mm, 3 mL/min, tampón 5-30% CH₃CN/50 mM TEAA pH 7 (20 minutos), detectado a 260 nm). El peso molecular del producto así purificado se midió con espectrómetro de masas MALDI TOFF en su modo negativo. Como resultado, se confirmó que el producto tenía el peso molecular (4102,8, que era un valor calculado en base de C₁₃₄H₁₇₆N₅₂O₇₆P₁₂) esperado a partir de la secuencia de 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' (13 unidades, la estructura de X es tal como se muestra en la fórmula química 105) ([M-H]⁻ valor medido: 4101,9, valor calculado: 4101,8). La figura 4 muestra el espectro obtenido con el espectrómetro de masas MALDI TOF.

[0090] Además, se sintetizó 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' (13 unidades, la estructura de X es tal como se muestra en la fórmula química 105) de la misma manera que se ha descrito anteriormente a excepción de que la desprotección se llevó a cabo con el amoníaco acuoso concentrado a 55°C durante 4 horas y posteriormente a 25°C durante 16 horas, la concentración del tampón de TEAA (acetato de trietilamina) (pH 7) fue de 0,1 M en la HPLC de fase inversa y el tiempo de desarrollo fue de por lo menos 30 minutos en la HPLC de fase inversa. Además, el ADN (que contenía nucleótidos representados por la fórmula química 105) que se utilizó como material de partida para cada ODN indicado en la tabla 1 se sintetizó de la misma manera.

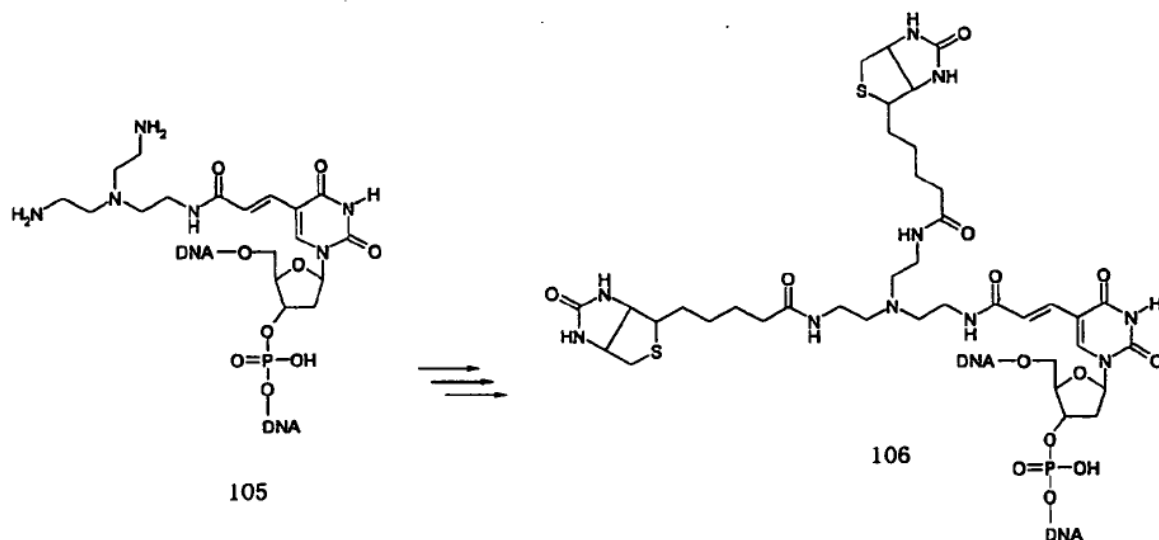
[0091] A efectos de determinar la concentración de cada ADN así sintetizado, cada ADN purificado se digirió completamente a 25°C durante 16 horas utilizando fosfatasa alcalina intestinal de ternero (50 U/mL), fosfodiesterasa de veneno de serpiente (0,15 U/mL), y P1 nucleasa (50 U/mL). Los líquidos digeridos así obtenidos se analizaron mediante HPLC con una columna CHEMCOBOND 5-ODS-H (nombre comercial) (4,6 x 150 mm). En este análisis, se utilizó 0,1 M TEAA (pH 7,0) como revelador y la velocidad de flujo fue de 1,0 mL/min. La concentración del ADN sintetizado descrito anteriormente se determinó en comparación con el área máxima de la solución estándar que contenía dA, dC, dG, y dT, la concentración de cada uno fue de 0,1 mM. Además, el ADN sintetizado descrito anteriormente también se identificó con un espectro de masas MALDI TOFF. Los valores de la espectrometría de masas del mismo se indican a continuación, donde [105] indica que el nucleótido representados por la fórmula química 105 está insertado en ese sitio.

[0092]

CGCAAT[105]TAACGC, calculado para C₁₃₄H₁₇₇N₅₂O₇₆P₁₂ ([M+H]⁺) 4103,8, hallado 4107,0;
 TTTTTT[105]TTTTTT, calculado para C₁₈₈H₁₈₇N₃₀O₉₀P₁₂ ([M + H]⁺) 4077,8, hallado 4076,9;
 TGAAGGGCTT[105]TGAAGCTG, calculado para C₂₀₅H₂₆₅N₇₇O₁₂₂P₁₉ ([M+H]⁺) 6348,2, hallado 6348,7;
 GCCTCCT[105]CAGCAAATCC[105]ACCGGCGTG, calculado para C₂₈₅H₃₇₆N₁₀₈O₁₆₉P₂₇ ([M+H]⁺) 8855,0, hallado 8854,8;

CCTCCCAAG[105]GCTGGGAT[105]AAAGGCGTG, calculado para $C_{289}H_{376}N_{116}O_{168}P_{27}$ ($[M+H]^+$) 8999,1, hallado 9002,2.

[0093] [Ejemplo 5: modificación con biotina del oligómero de ADN que contiene nucleótido con dos grupos amino]

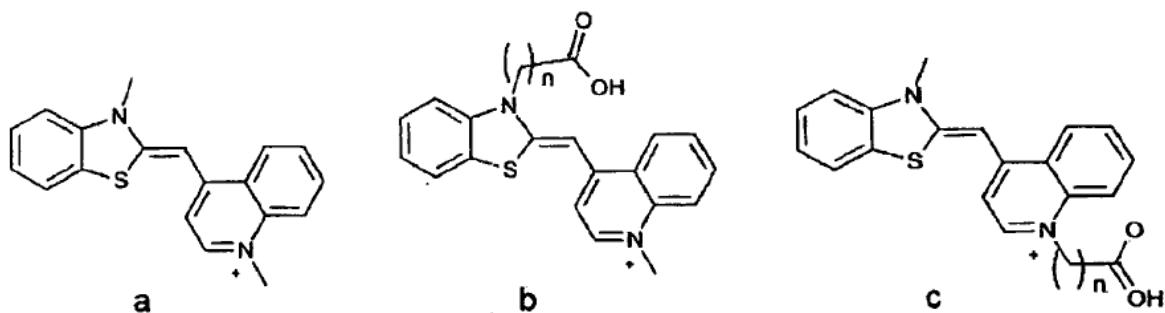


Esquema 3

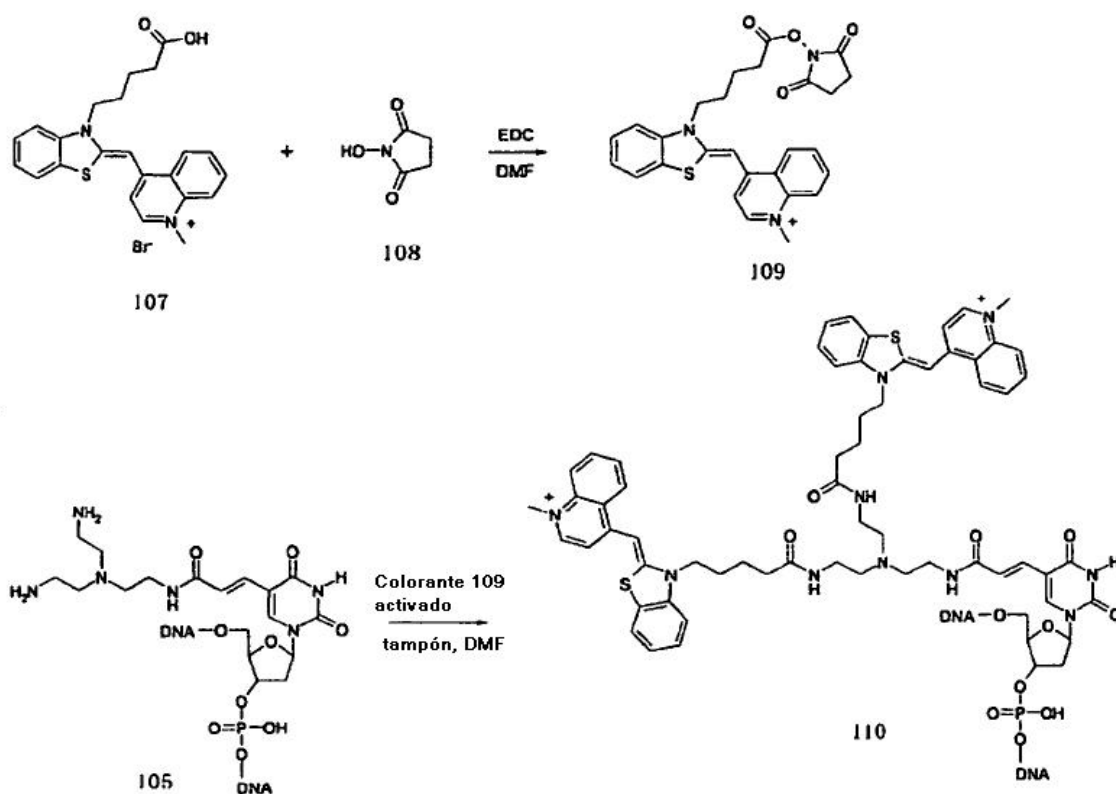
[0094] El oligómero de ADN sintetizado 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' (Compuesto 105, donde el Compuesto 105 se utilizó como X) se dejó reaccionar con éster de N-hidroxisuccinimido de biotina y de este modo dos grupos amino se marcaron con dos biotinas (Esquema 3 mostrado anteriormente). Es decir, en primer lugar, se mezclaron 30 μ L de 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' (Compuesto 105, con una concentración de cadena de 320 μ M), 10 μ L de tampón $Na_2CO_3/NaHCO_3$ (1 M, pH 9,0), y 60 μ L de H_2O . A continuación, se le añadieron 100 μ L de solución en DMF de éster de N-hidroxisuccinimido de biotina (20 mM), que a continuación se mezcló correctamente. Se dejó reposar a 25°C durante 16 horas. A continuación, se le añadieron 800 μ L de H_2O , que se pasaron a través de un filtro de 0,45 μ m. El máximo que apareció en HPLC de fase inversa después de aproximadamente 14 minutos se purificó (CHEMCOBOND 5-ODS-H 10 x 150 mm, 3 mL/min, 5-30% $CH_3CN/50$ mM tampón TEAA (20 minutos), detectado a 260 nm). El producto obtenido mediante esta purificación con HPLC se midió con el espectrómetro de masas MALDI TOF en su modo negativo. Como resultado, el máximo se observó a 4554,3. Este valor máximo concordaba con el valor calculado de $[MH]^-$, 4554,4, determinado a partir del peso molecular de 4555,4 (un valor calculado según $C_{154}H_{204}N_{56}O_{80}P_{12}S_2$) del producto objetivo 106 en que dos moléculas de biotina reaccionaron con dos grupos amino. La figura 5 muestra el espectro obtenido con el espectrómetro de masas MALDI TOF.

[0095] Utilizando este compuesto 106 (en un estado de cadena sencilla), se sintetizaron ADN y ARN de doble cadena y la intensidad de fluorescencia obtenido en el estado de cadena sencilla se comparó con la obtenida en el estado de doble cadena. Como resultado, se confirmó que la emisión de fluorescencia de la sonda de ADN fluorescente (Compuesto 106) estaba suprimida en el estado de cadena sencilla, mientras que se obtuvo una emisión de fluorescencia intensa cuando se formó una doble hélice junto con un ácido nucleico complementario.

[0096] En los ejemplos 6 a 13 descritos a continuación, se sintetizaron derivados de naranjas de tiazol con enlazadores de carboximetileno representados por las siguientes fórmulas químicas b y c. Se activaron como éster de N-hidroxisuccínico y se dejaron reaccionar con oligómero de ADN (oligonucleótido) con grupos amino activos. De este modo, se prepararon varios oligonucleótidos (sondas de ADN fluorescentes) que tienen fluorescencia. Es decir, se produjeron varios oligonucleótidos (sondas de ADN fluorescentes) que eran diferentes entre sí en la longitud del enlazador de metileno extendido desde un colorante y en el enlazador con el grupo amino extendido desde la posición 5 de timidina. Como resultado, en cualquiera de las sondas de ADN fluorescentes, era posible suprimir la emisión de fluorescencia de la sonda de ADN de cadena sencilla fluorescente y obtener emisión de fluorescencia intensa cuando se formó una doble hélice junto con un ácido nucleico complementario. En las siguientes fórmulas químicas b y c, n indica la longitud del enlazador (el número de átomos de unión).



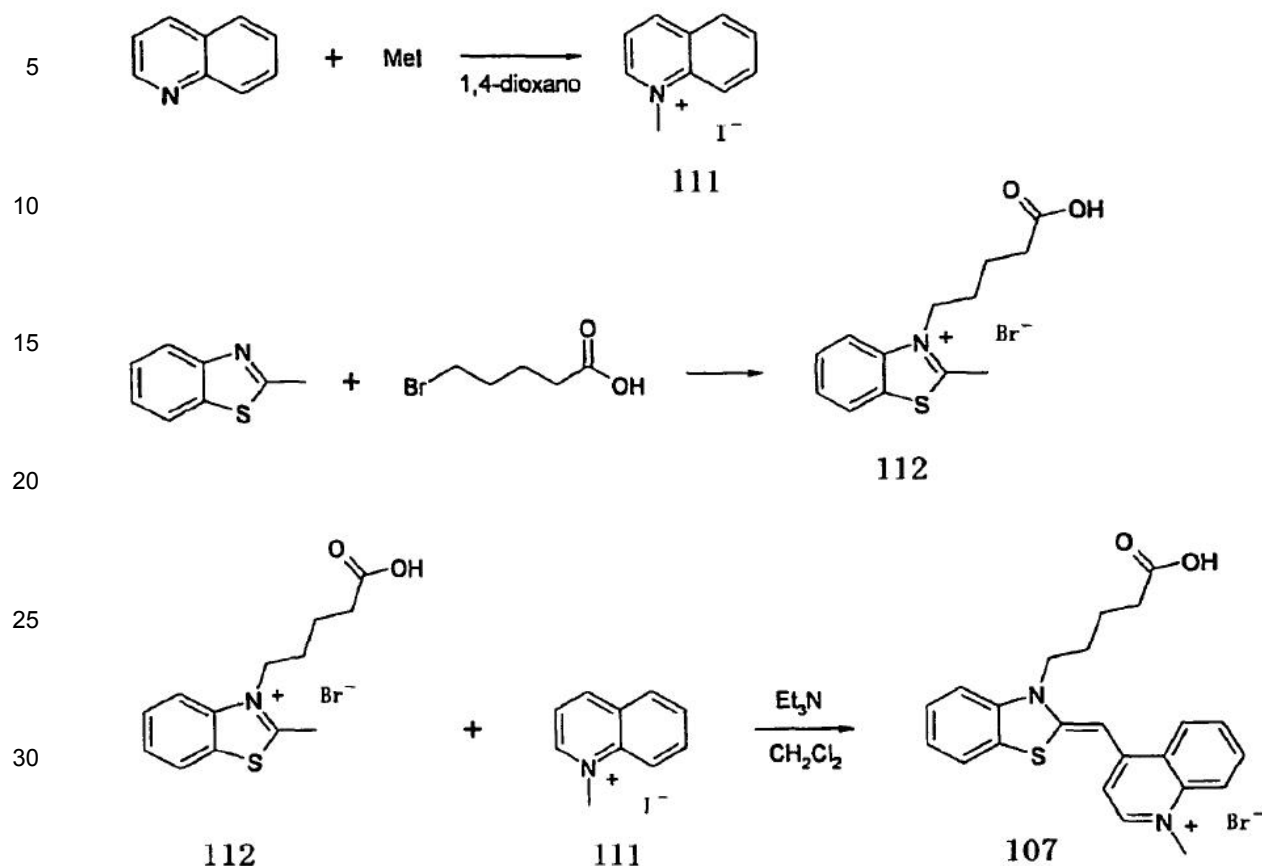
[0097] [Ejemplo 6: Síntesis de compuesto que tiene, en una molécula, estructuras derivadas de naranja de tiazol en dos lugares]



Esquema 4

[0098] Tal como se muestra en el esquema 4, se sintetizó el oligómero de ADN (oligonucleótido) 110 que tiene, en una molécula, estructuras derivadas de naranja de tiazol en dos lugares. A continuación se muestra una descripción más específica.

[0099] El derivado de naranja de tiazol 107 se sintetizó tal como se indica a continuación en el esquema 5 en referencia a Organic Letters 2000, 6, 517-519.



Esquema 5

(1) Síntesis de yoduro de N-metilquinolinio (Compuesto 111)

[0100] Se sintetizó yoduro de N-metilquinolinio (Compuesto 111) según la descripción en la referencia mencionada anteriormente. Específicamente, se añadieron 2,4 mL de quinolina y 4 mL de yoduro de metilo a 42 mL de dioxano anhidro, que se agitó a 150°C durante una hora. A continuación, se filtró y así se recogió un precipitado y a continuación se lavó con éter y éter de petróleo. Éste se secó y de este modo se obtuvo el yoduro de N-metilquinolinio (Compuesto 111).

(2) Síntesis de bromuro de 3-(4-carboxibutil)-2-metilbenzotiazolio (Compuesto 112)

[0101] En primer lugar, se agitaron 8 mL de 2-metilbenzotiazol (FW 149,21, d=1,173) y 9,4 g de ácido 5-bromovalérico (ácido 5-bromopentanoico) (FW 181,03) a 110°C durante 16 horas. El producto crudo se enfrió hasta temperatura ambiente y el sólido producido de este modo se suspendió en 20 mL de metanol y se le añadieron posteriormente 40 mL de éter. El precipitado así producido se filtró y a continuación se lavó con dioxano hasta que se eliminó el olor de 2-metilbenzotiazol. Éste se lavó posteriormente con éter y a continuación se secó bajo presión reducida. De este modo, se obtuvieron 9,8 g de polvo blanco. A continuación, se midió el RMN¹H de este polvo blanco. Como resultado, se observó que era una mezcla de bromuro de 3-(4-carboxibutil)-2-metilbenzotiazolio (Compuesto 112), que era la sustancia Diana cuya posición 2 se había alquilado, y bromuro de 3-(4-carboxibutil)-benzotiazolio cuya posición 2 no se había alquilado. La proporción máxima de protón no alquilado: alquilado = 10 : 3. Este producto crudo se utilizó para la siguiente reacción sin ser tratado posteriormente.

(3) Síntesis de bromuro 1-metil-4-[(3-(4-carboxibutil)-2(3H)-benzotiazoliliden)metil]quinolinio (Compuesto 107)

[0102] En primer lugar, se agitaron 2,18 g de producto crudo que contenía bromuro de 3-(4-carboxibutil)-2-metilbenzotiazolio (Compuesto 112) obtenido en (2) anterior y 700 mg de yoduro de N-metilquinolinio (Compuesto 111) (FW 271,10) en 10 mL de cloruro de metileno a 25°C durante dos horas en presencia de 3,6 mL de trietilamina (FW 101,19, d=0,726). A continuación, se le añadieron 50 mL de éter y el precipitado así

producido se filtró, lavó con éter y a continuación se secó bajo presión reducida. El precipitado se suspendió en 50 mL de agua ultrapura, que se filtró, se lavó con agua ultrapura, y a continuación se secó bajo presión reducida. Además, el precipitado se dispersó en 50 mL de acetonitrilo, que se filtró, se lavó con acetonitrilo y a continuación se secó bajo presión reducida. De este modo, se obtuvieron 307,5 mg de polvo rojo (con un rendimiento del 25,3%). Este polvo rojo se confirmó que era la sustancia objetivo (Compuesto 107) mediante la comparación en el espectro RMN¹H con el valor de referencia.

[0103] Además, también fue posible sintetizar bromuro de 3-(4-carboxibutil)-2-metilbenzotiazolio (Compuesto 112) y bromuro de 1-metil-4-[[3-(4-carboxibutil)-2(3H)-benzotiazoliliden]metil]quinolinio (Compuesto 107) de la siguiente manera. Es decir, en primer lugar, se agitaron 11,7 mL (92 mmol) de 2-metilbenzotiazol (FW 149,21, d=1,173) y 13,7 g (76 mmol) de ácido 5-bromovalérico (ácido 5-bromopentanoico) (FW 181,03) a 150°C durante una hora. El producto crudo se enfrió hasta temperatura ambiente y el sólido así producido se suspendió en 50 mL de metanol. Posteriormente se le añadieron 200 mL de éter. El precipitado así producido se filtró, se lavó con éter y a continuación se secó bajo presión reducida. De este modo, se obtuvieron 19,2 g de polvo violeta claro. Este polvo era una mezcla de un compuesto 112 objetivo (bromuro de 3-(4-carboxibutil)-2-metilbenzotiazolio) y bromuro de 2-metilbenzotiazolio. Esta mezcla se sometió a la medición de RMN¹H (en DMSO-d₆) y se calculó que el rendimiento del compuesto 112 objetivo era de 9,82 g (14 mmol, 32%) a partir de la proporción de área máxima entre el máximo a 8,5 ppm (derivado del compuesto objetivo 112) y el máximo a 8,0 ppm (derivado de bromuro de 2-metilbenzotiazolio). Esta mezcla (producto crudo) se utilizó para la siguiente reacción sin ser purificado. De la misma manera descrita anteriormente a excepción de que el ácido 5-bromovalérico (ácido 5-bromopentanoico) se sustituyó por ácido 4-bromobutírico (ácido 4-bromobutanoico), se sintetizó bromuro de 3-(4-carboxipropil)-2-metilbenzotiazolio con un enlazador (una cadena de polimetileno unida a un grupo carboxilo) que tenía un número de carbonos n de 3, que se obtuvo con un rendimiento de 4%. Además, de la misma manera descrita anteriormente a excepción de que el ácido 5-bromovalérico (ácido 5-bromopentanoico) se sustituyó por ácido 6-bromohexanoico, se sintetizó bromuro de 3-(4-carboxipentil)-2-metilbenzotiazolio con un enlazador (una cadena de polimetileno unida a un grupo carboxilo) que tenía un número de carbonos n de 5, que se obtuvo con un rendimiento de 35%. Además, de la misma manera descrita anteriormente a excepción de que el ácido 5-bromovalérico (ácido 5-bromopentanoico) se sustituyó por ácido 7-bromohexanoico, se sintetizó bromuro de 3-(4-carboxipropil)-2-metilbenzotiazolio con un enlazador (una cadena de polimetileno unida a un grupo carboxilo) que tenía un número de carbonos n de 6, que se obtuvo con un rendimiento de 22%

[0104] A continuación, se añadieron 1,36 g (5,0 mmol) de yoduro de N-metilquinolinio (Compuesto 111) (FW 271,10), 7,0 mL (50 mmol) de trietilamina (FW 101,19, d=0,726), y 100 mL de cloruro de metileno a 3,24 g de mezcla (producto crudo) que contenía el Compuesto 112 (bromuro de 3-(4-carboxibutil)-2-metilbenzotiazolio) y bromuro de 2-metilbenzotiazolio. Como resultado, se obtuvo una solución transparente. Esta solución se agitó a 25°C durante 16 horas. A continuación, el disolvente se evaporó bajo presión reducida. A continuación, se añadió acetona (200 mL) al residuo y el precipitado así obtenido se filtró, a continuación se lavó con acetona. El residuo así obtenido se secó bajo presión reducida y el residuo rojo obtenido después de secar se lavó con agua destilada (50 mL). Éste posteriormente se filtró, que se lavó con agua destilada y, a continuación, se secó bajo presión reducida. De este modo, se obtuvo una sustancia objetivo (Compuesto 107) como un polvo rojo (654 mg, 1,39 mmol, 28%). Este polvo rojo se confirmó que era la sustancia objetivo (Compuesto 107) mediante la comparación en el espectro RMN¹H con el valor de referencia. Los valores máximos de RMN¹H y RMN¹³C (DMSO-d₆) y los valores medidos de HRMS (ESI) se indican a continuación. Además, la figura 6 muestra el espectro RMN¹H (DMSO-d₆) del Compuesto 107.

[0105] Compuesto 107: RMN¹H (DMSO-d₆): δ 8.74 (d, J=8.3Hz, 1H), 8.51 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.94-7.89 (m, 3H), 7.74-7.70 (m, 1H), 7.65 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.55-7.51 (m, 1H), 7.36-7.32 (m, 1H), 7.21 (d, J=7.3Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.47 (t, J=7.1Hz, 2H), 4.07 (s, 3H), 2.22 (t, J=6.6Hz, 1H), 1.77-1.63 (m, 4H); RMN¹³C (DMSO-d₆, 60°C) δ 174.6, 158.8, 148.4, 144.5, 139.5, 137.6, 132.7, 127.9, 126.8, 125.5, 124.1, 123.7, 123.6, 122.4, 117.5, 112.6, 107.6, 87.4, 45.6, 42.0, 35.5, 26.2, 22.3; HRMS (ESI) calculado para C₂₃H₂₃N₂O₂S ([M.Br]⁺) 391,1480, hallado 391,1475.

[0106] Se sintetizó el bromuro de 4-((3-(3-carboxipropil)benzo[d]tiazol-2(3H)-iliden)metil)-1-metilquinolinio con un enlazador (una cadena de polimetileno unida a un grupo carboxilo) que tenía un número de carbonos n de 3 a partir de la mezcla de bromuro de 3-(4-carboxipropil)-2-metilbenzotiazolio y bromuro de 2-metilbenzotiazolio por el mismo método utilizado para el compuesto 107, que se obtuvo con un rendimiento del 43%. Los valores analíticos instrumentales se indican a continuación.

[0107] Bromuro de 4-((3-(3-carboxipropil)benzo[d]tiazol-2(3H)-iliden)metil)-1-metilquinolinio:

RMN¹H (DMSO-d₆) δ 8.85 (d, J=8.3Hz, 1H), 8.59 (d, J=7.3Hz, 1H), 8.02-7.93 (m, 3H), 7.78-7.70 (m, 2H), 7.61-7.57 (m, 1H), 7.42-7.38 (m, 1H), 7.31 (d, J=6.8Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 4.47 (t, J=8.1Hz, 2H), 4.13 (s, 3H), 2.52-2.48 (m, 2H), 1.99-1.92 (m, 2H); RMN¹³C (DMSO-d₆, 60°C) δ 174.3, 158.9, 148.6, 144.5, 139.5, 137.7, 132.7, 127.9, 126.7, 125.6, 124.1, 124.0, 123.7, 122.5, 117.5, 112.5, 107.6, 87.7, 45.6, 42.0, 31.6, 22.4; HRMS (ESI) calculado para C₂₂H₂₁N₂O₂S ([M.Br]⁺) 377,1324, hallado 377,1316.

[0108] Además, se sintetizó el bromuro de 4-((3-(3-carboxipentil)benzo[d]tiazol-2(3H)-iliden)metil)-1-metilquinolinio con un enlazador (una cadena de polimetileno unida a un grupo carboxilo) que tenía un número de carbonos n de 5 a partir de la mezcla de bromuro de 3-(4-carboxipentil)-2-metilbenzotiazolio y bromuro de 2-metilbenzotiazolio por el mismo método utilizado para el compuesto 107, que se obtuvo con un rendimiento del 26%. Los valores analíticos instrumentales se indican a continuación.

[0109] Bromuro de 4-((3-(3-carboxipentil)benzo[d]tiazol-2(3H)-iliden)metil)-1-metilquinolinio:

RMN¹H (DMSO-d₆) δ 8.70 (d, J=8.3Hz, 1H), 8.61 (d, J=6.8Hz, 1H), 8.05.8.00 (m, 3H), 7.80.7.73 (m, 2H), 7.60,7.56 (m, 1H), 7.41.7.35 (m, 2H), 6.89 (s, 1H), 4.59 (t, J=7.3Hz, 2H), 4.16 (s, 3H), 2.19 (t, J=7.3Hz, 1H), 1.82,1.75 (m, 2H), 1.62.1.43 (m, 4H); RMN¹³C (DMSO-d₆, 60°C) δ 174.5, 159.0, 148.6, 144.7, 139.7, 137.8, 132.9, 127.9, 126.9, 125.2, 124.2, 123.8, 123.6, 122.6, 117.8, 112.6, 107.7, 87.4, 45.6, 42.1, 36.0, 26.3, 25.9, 24.9; HRMS (ESI) calculado para C₂₄H₂₅N₂O₂S ([M.Br]⁺) 405.1637, hallado 405.1632.

[0110] Además, se sintetizó el bromuro de 4-((3-(3-carboxihexil)benzo[d]tiazol-2(3H)-iliden)metil)-1-metilquinolinio con un enlazador (una cadena de polimetileno unida a un grupo carboxilo) que tenía un número de carbonos n de 6 a partir de la mezcla de bromuro de 3-(4-carboxihexil)-2-metilbenzotiazolio y bromuro de 2-metilbenzotiazolio por el mismo método utilizado para el compuesto 107, que se obtuvo con un rendimiento del 22%. Los valores analíticos instrumentales se indican a continuación.

[0111] Bromuro de 4-((3-(3-carboxihexil)benzo[d]tiazol-2(3H)-iliden)metil)-1-metilquinolinio:

RMN¹H (DMSO-d₆) δ 8.72 (d, J=8.3Hz, 1H), 8.62 (d, J=6.8Hz, 1H), 8.07.8.01 (m, 3H), 7.81.7.75 (m, 2H), 7.62,7.58 (m, 1H), 7.42.7.38 (m, 2H), 6.92 (s, 1H), 4.61 (t, J=7.3Hz, 2H), 4.17 (s, 3H), 2.18 (t, J=7.3Hz, 1H), 1.82,1.75 (m, 2H), 1.51.1.32 (m, 6H); ¹³NMR (DMSO-d₆, 60°C) δ 174.0, 159.1, 148.6, 144.7, 139.8, 137.8, 132.9, 127.9, 126.8, 125.0, 124.2, 123.8, 123.6, 122.6, 118.0, 112.7, 107.8, 87.4, 45.5, 42.1, 33.4, 27.9, 26.4, 25.5, 24.1; HRMS (ESI) calculado para C₂₅H₂₇N₂O₂S ([M.Br]⁺) 419,1793, hallado 419,1788.

(4) Síntesis del éster de N-hidroxisuccinimido 109

[0112] Se agitaron 9,4 mg (20 μmol) de bromuro de 1-metil-4-[(3-(4-carboxibutil)-2(3H)-benzotiazoliden)metil]quinolinio (Compuesto 107) (FW 471,41), 4,6 mg (40 μmol) de N-hidroxisuccinimida (Compuesto 108) (FW 115,09), y 7,6 mg (40 μmol) de EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (FW 191,70) en 1 mL de DMF a 25°C durante 16 horas. De este modo, se obtuvo el éster de N-hidroxisuccinimido (Compuesto 109), en que el grupo carboxilo de un colorante (Compuesto 107) se había activado. Este producto de reacción no se purificó y la solución de reacción (20 mM de un colorante) se utilizó para la reacción con ADN oligomérico (oligonucleótido) 105 sin ser tratado adicionalmente.

[0113] Además, se sintetizó el bromuro de 4-((3-(4-(succinimidiloxi)-4-oxobutil)benzo[d]tiazol-2(3H)-iliden)metil)-1-metilquinolinio con un enlazador (una cadena de polimetileno) que tenía un número de carbonos n de 3 mediante el mismo método utilizado para el Compuesto 109 a excepción de usar un compuesto con un enlazador (una cadena de polimetileno) que tenía un número de carbonos diferente en lugar del Compuesto 107 como material de partida. Además, se sintetizaron de la misma manera el bromuro de 4-((3-(4-(succinimidiloxi)-4-oxohexil)benzo[d]tiazol-2(3H)-iliden)metil)-1-metilquinolinio con un enlazador (una cadena de polimetileno) que tenía un número de carbonos n de 5 y el bromuro de 4-((3-(4-(succinimidiloxi)-4-oxoheptil)benzo[d]tiazol-2(3H)-iliden)metil)-1-metilquinolinio con un enlazador (una cadena de polimetileno) que tenía un número de carbonos n de 6.

(5) Síntesis de oligómero de ADN (oligonucleótido 110) modificado con 2 moléculas de naranja de tiazol

[0114] Se sintetizó un oligómero de ADN (oligonucleótido) 105 que tenía dos grupos amino activos mediante un método convencional con un sintetizador automatizado de ADN de la misma manera que en el ejemplo 4. La secuencia del compuesto 105 utilizada aquí fue la misma que la utilizada en el ejemplo 4, específicamente, 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' (X era el compuesto 105). A continuación, este oligómero de ADN (oligonucleótido) 105 se hizo reaccionar con éster de N-hidroxisuccinimido (Compuesto 109) y de este modo se sintetizó un oligómero de ADN (oligonucleótido) 100 que tenía, en una molécula, estructuras derivadas de naranja de tiazol en dos puntos. Es decir, en primer lugar, se mezclaron 30 μL de 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' (Compuesto 105, con una concentración de cadena de 320 μM), 10 μL de tampón de Na₂CO₃/NaHCO₃ (1 M, pH 9,0), y 60 μL de H₂O. A continuación, se le añadieron 100 μL de solución de DMF (20 mM) de éster de N-hidroxisuccinimido (Compuesto 109) y se mezclaron. Se dejó en reposo a 25°C durante 16 horas. A continuación, se le añadieron 800 μL de H₂O que a continuación se pasó por un filtro de 0,45 μm. El pico que apareció después de aproximadamente 14,5 minutos en HPLC de fase inversa se purificó (CHEMCOBOND 5-ODS-H (nombre comercial); 10 x 150 mm, 3 mL/min, tampón 5-30% CH₃CN/50 mM TEAA (20 minutos), detectado a 260 nm). La figura 7 muestra el diagrama de la HPLC de fase inversa. La fracción indicada con el pico marcado con una flecha se fraccionó y purificó. El producto así obtenido mediante purificación HPLC se midió con un

espectrómetro de masas MALDI TOFF en su modo negativo. Como resultado, se observó un pico a 4848,8 y se confirmó que era el oligómero de ADN (oligonucleótido) 110. La figura 8 muestra el espectro de masas MALDI TOFF del oligómero de ADN (oligonucleótido) 110. En la figura 8 la flecha indica el pico de masa (4848,8) derivado del producto purificado. Este valor de pico concordaba con un valor calculado de 4848,8 de $[M2+-3H+]$ - en que se extrajeron tres protones de una molécula $M(C_{180}H_{220}N_{56}O_{78}P_{12}S_2)$ de oligómero de ADN (oligonucleótido) 110 que tenía dos cargas positivas. Los picos localizados en las partes izquierda y derecha de la misma derivan de la unidad T8 y la unidad T18 de ADN que se añadieron como sustancias patrón.

[Ejemplo 7: Utilización de oligómero de ADN (oligonucleótido) 110 como sonda fluorescente]

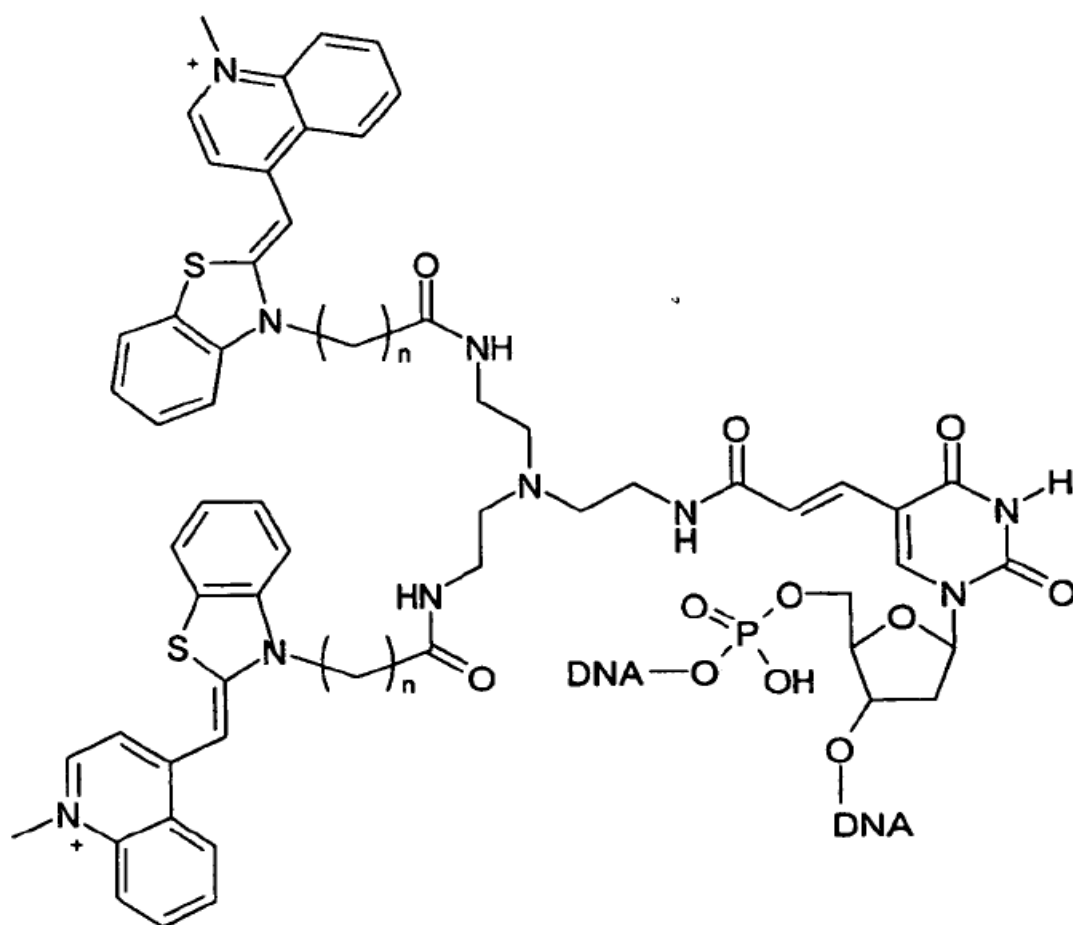
[0115] Se desaló y purificó oligómero de ADN (oligonucleótido) 100 (ADN con dos moléculas de colorante) purificado en el ejemplo 6. A continuación, se preparó una solución acuosa del mismo y se determinó la concentración de la misma según la absorción UV (X se aproximó mediante T). A continuación, se llevó a cabo la medición de UV con respecto a la sonda de fluorescencia (oligómero de ADN 110) bajo condiciones que incluyen una concentración de cadena de 2,5 μ M, tampón de ácido fosfórico 50 mM (pH 7,0) y NaCl 100 mM estando la sonda de fluorescencia en un estado de cadena sencilla, un estado de doble hélice ADN-ADN, y un estado de doble hélice ADN-ARN. La figura 9 muestra los espectros de estas tres muestras. En la figura 9, la línea de puntos muestra el espectro obtenido cuando la sonda de fluorescencia estaba en un estado de cadena sencilla, la línea gruesa muestra el espectro obtenido cuando la sonda de fluorescencia estaba en el estado de doble hélice ADN-ADN y la línea delgada muestra el espectro obtenido cuando la sonda de fluorescencia estaba en el estado de doble hélice ADN-ARN. Tal como se muestra en la figura 9, la longitud de onda máxima de absorción UV alrededor de 500 nm se movió cuando se formaron las dobles hélices. En la figura 9 y cada dos espectros de absorción UV, el eje horizontal indica la longitud de onda (nm) y el eje vertical indica la absorbancia.

[0116] A continuación, la sonda de fluorescencia se excitó con luz de excitación (ancho de banda: 1,5 nm) con una longitud de onda de 488 nm bajo las mismas condiciones que incluyen una concentración de cadena de 2,5 μ M, tampón de ácido fosfórico 50 mM (pH 7,0) y NaCl 100 mM. A continuación, se llevó a cabo la medición de la fluorescencia. La figura 10 muestra espectros de tres muestras de la sonda de fluorescencia en un estado de cadena sencilla (línea de puntos), un estado de doble hélice ADN-ADN (línea gruesa), y un estado de doble hélice de ADNA-ARN (línea delgada), respectivamente. Tal como se muestra en la figura 10, cuando se compara con la intensidad de fluorescencia de la sonda de fluorescencia de cadena sencilla obtenida a 530 nm, la intensidad de fluorescencia aumentó 15 veces en el caso de la doble hélice de ADN-ADN y 22 veces en el caso de la doble hélice de ADN-ARN. En la figura 10 y cada dos espectros de emisión de fluorescencia y en los espectros de excitación, el eje horizontal indica la longitud de onda (nm) y el eje vertical indica la intensidad de emisión.

[0117] Además, se obtuvieron los mismos resultados cuando se utilizó una luz de excitación con una longitud de onda de 510 nm en lugar de la luz de excitación con una longitud de onda de 488 nm. La figura 1 muestra los espectros de los mismos.

[Ejemplo 8: Síntesis de compuestos con enlazadores que tienen longitudes cambiadas de manera variable y utilización de los mismos como sonda de fluorescencia]

[0118] Los compuestos (oligómeros de ADN) representados por la fórmula química 113 mostrada a continuación se sintetizaron cambiando de manera variable las longitudes n de enlazadores. Los compuestos se sintetizaron de la misma manera que en los ejemplos 1 a 4 y 6, a excepción de que los compuestos se prepararon en que cada uno de los cuales el número de carbonos (longitud de cadena) del ácido 5-bromovalérico (ácido 5-bromopentanoico) utilizado como material de partida se cambió según la longitud del enlazador. En este ejemplo, la secuencia del compuesto 113 fue de 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' (X era el punto en el que se introdujo un colorante). Además, se utilizó cada compuesto como sonda de fluorescencia de la misma manera que en el ejemplo 7 y el rendimiento del mismo se evaluó a través de la medición de la fluorescencia. Como resultado, se demostró que cuando la sonda se hibrida con un ácido nucleico diana, la fluorescencia se incrementó aproximadamente 10 veces o más que la de una sonda de cadena sencilla, siempre que el enlazador tenía una longitud en el intervalo indicado a continuación. Además, la doble cadena formada de la sonda y el ácido nucleico diana mostraron una estabilidad térmica superior que la de una doble cadena con una secuencia nativa.



1 1 3

Tabla 1

		λ_{max} (nm) de UV y coeficiente de absorción	λ_{max} (nm) de fluorescencia	Rendimiento cuántico ϕ_F	Proporción de la intensidad de fluorescencia $I_{\text{ds}}/I_{\text{ss}}$ entre la cadena doble y la cadena sencilla	Tf(°C)
n = 3	Sonda de cadena sencilla	480(117000) 510(93800)	537	0,0193	-	Ninguna
	Sonda de cadena doble de ADN	505(145000)	529	0,137	7,1	66
	Sonda de cadena doble de ARN	506(139000)	529	0,161	8,3	54
n = 4	Sonda de cadena sencilla	479(156000) 509(104000)	537	0,0105	-	Ninguna

	Sonda de cadena doble de ADN	509(179000)	529	0,110	10,5	65
	Sonda de cadena doble de ARN	509(171000)	529	0,116	11,0	52
n = 5	Sonda de cadena sencilla	480(139000) 510(107000)	538	0,0131	-	Ninguna
	Sonda de cadena doble de ADN	508(172000)	529	0,123	9,4	67
	Sonda de cadena doble de ARN	508(162000)	529	0,126	9,6	51
n = 6	Sonda de cadena sencilla	479(139000) 509(93300)	536	0,0122	-	Ninguna
	Sonda de cadena doble de ADN	509(164000)	528	0,122	10,0	65
	Sonda de cadena doble de ARN	511(162000)	530	0,129	10,6	52

5'-d(CGCAATTTAACGC)-3'/5'-d(GCGTTAAATTGCG)-3' Tf(°C) 58

5'-d(CGCAATTTAACGC)-3'/5'-r(GCGUAAAUUGCG)-3' Tf(°C) 46

5 Condiciones de medición: sonda 2,5 μ M (Compuesto 113), tampón de ácido fosfórico 50 mM (pH 7,0), NaCl 100 mM, cadena complementaria 2,5 μ M. La longitud de onda máxima de fluorescencia fue el valor obtenido cuando la excitación se llevó a cabo con una luz que tenía una longitud de onda de 488 nm (1,5 nm de ancho). El rendimiento cuántico se calculó con 9,10-difenilantraceno como sustancia de referencia.

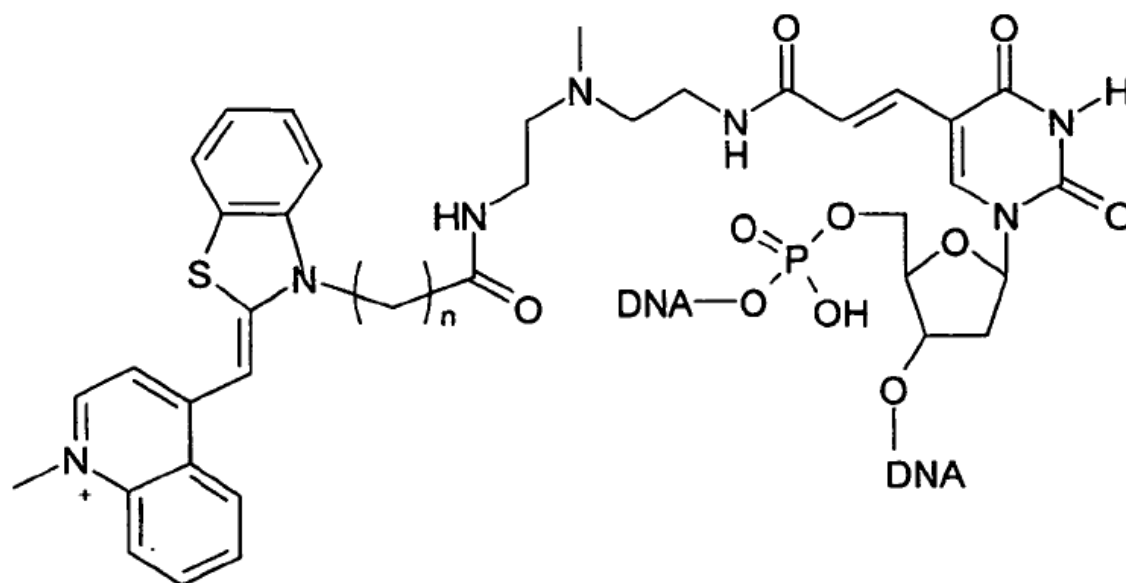
10 **[0119]** La figura 12 muestra los espectros de absorción obtenidos con la longitud de enlazador n siendo 4 en el ejemplo 8. La línea de puntos muestra el espectro de la cadena sencilla, la línea continua muestra el espectro de la cadena de ADN-ADN y la línea en puntos y rayas muestra el espectro de la cadena de ADN-ARN. Cuando se presta atención a la absorción que aparecía entre 400 y 600 nm, la banda de absorción obtenida en el estado de cadena sencilla aparecía en la parte de longitud de onda más corta en comparación con la banda de absorción obtenida después de la hibridación. Esto indica claramente la formación de un agregado H del dímero de colorante en el estado de cadena sencilla.

15 **[0120]** La figura 13 muestra los espectros de emisión y de excitación obtenidos con una longitud de enlazador n de 4 en el ejemplo 8. En la figura 13, las curvas localizadas en la parte izquierda (la parte de longitud de onda más corta) indican los espectros de excitación, mientras que las curvas localizadas en la parte derecha (la parte de la longitud de onda más larga) indican los espectros de emisión de fluorescencia. En la figura 13, la longitud de onda de la emisión de fluorescencia de referencia (λ_{max} de fluorescencia) con respecto a los espectros de excitación y la longitud de onda de excitación con respecto a los espectros de emisión de fluorescencia se indican en paréntesis en la nota explicativa. Tanto en los espectros de excitación como en los espectros de emisión de fluorescencia, la cadena sencilla mostraba la intensidad de emisión más baja, la cadena de ADN-ADN mostraba una intensidad de emisión más elevada que la de la cadena sencilla, y la cadena de ADN-ARN mostraba la intensidad de emisión más elevada. A partir de los espectros de excitación, se demostró que la absorción asociada con la emisión de fluorescencia era solo aquella en la banda de absorción en la parte de la longitud de onda más larga mostrada en a figura 12 y la absorción en la parte de la longitud de onda más corta no estaba asociada con la emisión de fluorescencia. Es decir, se indica claramente que la emisión de fluorescencia estaba suprimida por el efecto de excitón. Por consiguiente, la emisión de fluorescencia era intensa después de la hibridación, mientras que era muy débil en el estado de cadena sencilla. Esto permite que los estados antes y después de la hibridación se diferencien claramente entre sí.

35 [Ejemplo 9]

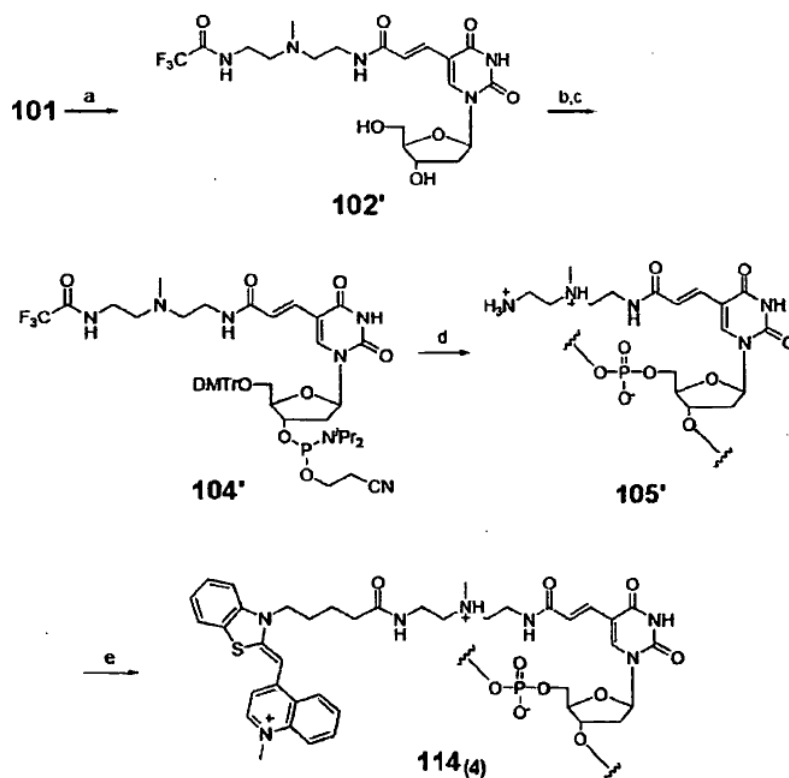
[0121] Se sintetizaron compuestos (oligómeros de ADN) representados por la fórmula química 14 siguiente, cada uno de los cuales contenía, en una molécula, una estructura de colorante sola, cambiando las longitudes n de enlazador de manera variable. Los compuestos se sintetizaron de la misma manera que en los ejemplos 1 a 4 y 6, a excepción de que los compuestos se prepararon en que cada uno el número de carbonos (longitud de cadena) del ácido 5-bromovalérico (ácido 5-bromopentanoico) como material de partida se cambió según la

longitud del enlazador, y se utilizó bis(2-aminoetil)metilamina en lugar de tris(2-aminoetil)amina utilizada en la síntesis del compuesto 102. Los compuestos con n igual a 3, 4, 5, y 6 se sintetizaron de la misma manera.



1 1 4

[0122] Más específicamente, la síntesis se llevó a cabo según el siguiente esquema. El siguiente esquema muestra el caso en el que $n = 4$, pero la síntesis se llevó a cabo de la misma manera incluso cuando n era otro valor numérico.



[Síntesis de (E)-5-(3-(2-(N-Metil-N-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)etil)amino)etilamino)-3-oxoprop-1-enil)-2'-desoxiuridina (102')]

[0123] En primer lugar, se colocaron 1,19 g (4,0 mmol) de (E)-5-(2-carboxivinil)-2'-desoxiuridina 101 (con un peso molecular de 298,25), 921 mg (8,0 mmol) de N-hidroxisuccinimida (con un peso molecular de 115,09), y 1,53 g (8,0 mmol) de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (con un peso molecular de 191,70) en un matraz de recuperación que contenía una barra de agitación. A continuación, se le añadieron 1,0 mL de DMF, que se agitó a 25°C durante ocho horas. Se le añadieron aproximadamente 1 mL de ácido acético, y se añadieron posteriormente 250 mL de cloruro de metileno y 250 mL de agua ultrapura, que a continuación se agitó vigorosamente. El precipitado producido de este modo se filtró, se lavó con agua y se secó bajo presión reducida durante la noche. El residuo blanco obtenido de este modo se suspendió en 100 mL de acetonitrilo, que se agitó vigorosamente. Posteriormente, se le añadieron de golpe 2,34 g (20 mmol) de N-metil-2,2'-diaminodietilamina (con un peso molecular de 146,23, d=0,976), que se agitó a continuación a 25°C durante 10 minutos. A continuación, se le añadieron 4,8 mL (40 mmol) de trifluoroacetato de etilo (con un peso molecular de 142,08, d=1,194), 5,6 mL (40 mmol) de trietilamina (con un peso molecular de 101,19, d=0,726), y 50 mL de etanol, que se agitó a 25°C durante 16 horas. A partir de la mezcla así obtenida, el disolvente se evaporó bajo presión reducida, que a continuación se purificó en una columna de gel de sílice (10-20% MeOH/CH₂Cl₂). De la fracción que contenía la sustancia objetivo, se evaporó el disolvente bajo presión reducida. El producto producido de este modo se disolvió en una pequeña cantidad de acetona y a continuación se le añadió éter. Como resultado, se produjo un precipitado blanco. Se filtró, se lavó con éter y a continuación se secó bajo presión reducida. De este modo, se obtuvieron 750 mg (76%) de sustancia objetivo (Compuesto 102') como un polvo blanco. Los valores analíticos instrumentales se indican a continuación.

[0124] Compuesto 102':

RMN¹H (CD₃OD) δ 8.29 (s, 1H), 7.17 (d, J=15.6Hz, 1H), 6.97 (d, J=15.6Hz, 1H), 6.21 (t, J=6.3Hz, 1H), 4.40, 4.36 (m, 1H), 3.92, 3.90 (m, 1H), 3.80 (dd, J=11.7, 2.9Hz, 1H), 3.72 (dd, J=11.7, 3.4Hz, 1H), 3.37, 3.25 (m, 5H), 2.60, 2.53 (m, 5H), 2.33, 2.19 (m, 5H); RMN¹³C (CD₃OD) δ 169.2, 158.7 (q, J=36.4Hz), 151.2, 143.7, 143.6, 134.1, 122.2, 117.5 (q, J=286.2Hz), 111.0, 89.2, 87.0, 72.1, 62.6, 57.4, 56.7, 42.4, 41.8, 38.5, 38.3; HRMS (ESI) calculado para C₁₉H₂₇F₃N₅O₇ ([M+H]⁺) 494,1863, hallado 494,1854.

[Síntesis de (E)-5-(3-(2-(N-Metil-N-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)etil)amino)etilamino)-3-oxoprop-1-enil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiuridina 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita (Compuesto 104')]

[0125] En primer lugar, 296 mg (0,60 mmol) de Compuesto 102' (con un peso molecular de 494,19) y 224 mg (0,66 mmol) de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (con un peso molecular de 338,83) en un matraz de recuperación que contenía una barra de agitación. A continuación, se le añadieron 4 mL de piridina, que se agitó a 25°C durante dos horas. Posteriormente, se le añadieron 1 mL de agua y a continuación el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El producto obtenido de este modo se purificó en una columna de gel de sílice (1,5% MeOH y 1% Et₃N/CH₂Cl₂). Se concentró una fracción que contenía tritiluro (un intermedio de compuesto 104') del compuesto objetivo 102' y se añadió una solución acuosa de bicarbonato de sodio al residuo. La mezcla se extrajo con acetato de etilo, se lavó con solución salina saturada, y se secó bajo presión reducida. De este modo, se obtuvo un tritiluro espumoso blanco (366 mg, 77%).

[0126] RMN¹H (CD₃OD) δ 7.94 (s, 1H), 7.42, 7.17 (m, 9H), 7.01 (d, J=15.6Hz, 1H), 6.95 (d, J=15.6Hz, 1H), 6.86, 6.83 (m, 4H), 6.21 (t, J=6.3Hz, 1H), 4.41, 4.38 (m, 1H), 4.09, 4.06 (m, 1H), 3.75 (s, 6H), 3.40, 3.30 (m, 6H), 2.59 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.53 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.46, 2.31 (m, 5H); RMN¹³C (CD₃OD) δ 169.2, 158.7 (q, J=36.4Hz), 151.2, 143.7, 143.6, 134.1, 122.2, 117.5 (q, J=286.2Hz), 111.0, 89.2, 87.0, 72.1, 62.6, 57.4, 56.7, 42.4, 41.8, 38.5, 38.3; HRMS (ESI) calculado para C₄₀H₄₅F₃N₅O₉ ([M+H]⁺) 796,3169, hallado 796,3166.

[0127] En un matraz de base redonda se colocaron 159 mg (0,20 mmol) de tritiluro (con un peso molecular de 920,85) del Compuesto 102' y 28,6 mg (0,40 mmol) de 1H-tetrazol (con un peso molecular de 70,05). Se secó al vacío con una bomba de vacío durante la noche. A continuación, se le añadieron 4,0 mL de CH₃CN y de este modo el producto así seco se disolvió en el mismo, que a continuación se agitó. A continuación, se le añadieron de golpe 191 µL (0,60 mmol) de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosforamidita (con un peso molecular de 301,41, d=0,949), que se agitó a 25°C durante dos horas. Después de confirmar que la reacción se había completado mediante TLC, se le añadió bicarbonato sódico acuoso saturado, que se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida de este modo se lavó con una solución salina saturada y a continuación se secó con sulfato de magnesio. Después de eliminar el sulfato de magnesio mediante filtración, el disolvente se evaporó bajo presión reducida. De este modo, se obtuvo un producto crudo que contenía el compuesto objetivo 104'. Esta composición se utilizó para la síntesis de ADN sin purificarse o tratarse posteriormente. A partir de ³¹PRMN (CDCl₃ y HRMS (ESI) del producto crudo, se confirmó que se había obtenido el compuesto 104'. Estos valores se indican a continuación.

[0128] Compuesto 104':

³¹P RMN (CDCl₃) δ 149.686, 149.393; HRMS (ESI) calculado para C₄₉H₆₁F₃N₇O₁₀P ([M+H]⁺) 996.4248, hallado 996.4243.

[0129] Se sintetizó DNA 105' se la misma manera que en el caso del compuesto 105. Los valores analíticos instrumentales se indican a continuación.

5 **[0130]** DNA 105':

CGCAAT[105']TAACGC, calculado para $C_{133}H_{174}N_{51}O_{76}P_{12}$ ($[M+H]^+$) 4074.8, hallado 4072.0; CGCAAT[105']AACGC, calculado para $C_{140}H_{187}N_{54}O_{77}P_{12}$ ($[M+H]^+$) 4230.0, hallado 4228.9.

10 **[0131]** Se sintetizó de la misma manera DNA 114 que contenía naranja de tiazol introducido en el mismo como en el caso del compuesto 113. Los valores analíticos instrumentales se indican a continuación.

CGCAAT[114]₍₄₎TAACGC, calculado para $C_{156}H_{194}N_{53}O_{77}P_{12}S(M^+)$ 4447.3, hallado 4445.6; CGCAAT[114]₍₄₎[114]₍₄₎AACGC, calculado para $C_{186}H_{228}N_{58}O_{79}P_{12}S_2$ ($[M.H]^+$) 4976.0, hallado 4976.9.

15 **[0132]** Con respecto a ODN (una sonda que sólo contiene un colorante) que tiene una secuencia de 5'-d(CGCAAT[114](n)TAACGC)-3' seleccionada entre los oligómeros de ADN sintetizados (ODN), se observó el comportamiento de fluorescencia de la misma manera que en los ejemplos 7 y 8. Los resultados se indican en la tabla 2 siguiente y las figuras 14 y 15. La figura 14 muestra los espectros de absorción (la línea de puntos muestra el espectro de la cadena sencilla, la línea continua muestra el espectro de la cadena de ADN-ADN y la línea semicontinua muestra el espectro de la cadena de ADN-ARN), y la figura 15 muestra los espectros de excitación y los espectros de emisión. En la figura 15, las curvas localizadas en la parte izquierda (la parte de la longitud de onda más corta) indican los espectros de excitación, mientras que las curvas localizadas en la parte derecha (la parte de la longitud de onda más larga) indican los espectros de emisión de fluorescencia. En la figura 15, las longitudes de onda indicaban en la nota explicativa la longitud de onda de la emisión de fluorescencia de referencia (λ_{max} de fluorescencia) con respecto a los espectros de excitación y la longitud de onda de excitación con respecto a los espectros de emisión de fluorescencia, respectivamente. Tanto los espectros de excitación como los espectros de emisión de fluorescencia, la cadena sencilla mostraba la intensidad de emisión más baja, la cadena de ADN-ADN mostraba una intensidad de emisión más elevada que la de la cadena sencilla y la cadena de ADN-ARN mostraba la intensidad de emisión más elevada. Tal como se muestra en las figuras 19 y 15, el compuesto 114 presenta, en una molécula, sólo una estructura de colorante y, por tanto, no se forma un agregado H. De este modo, no tiene lugar el efecto de excitón (no se observa un desplazamiento hacia la parte de la longitud de onda más corta en el espectro de absorción). Por consiguiente, la desactivación de la fluorescencia fue más débil en el estado de cadena sencilla en comparación con los compuestos que contenían dos estructuras de colorante y la proteínas de la intensidad de fluorescencia I_{ds}/I_{ss} entre la doble cadena y la cadena sencilla es relativamente baja. Sin embargo, dado que la intercalación del colorante a través de la formación de una doble cadena aplanan la estructura del colorante, se obtuvo una mayor intensidad de fluorescencia en el estado de doble cadena en comparación con la cadena sencilla tal como se muestra en la tabla 2 siguiente. En la cadena sencilla, cuando la longitud de onda de excitación cambió de 488 nm a λ_{max} (una en la parte de la longitud de onda más larga si existen dos λ_{max}) en el espectro de absorción UV, se obtuvo un rendimiento cuántico Φ_F de 0,120 como resultado de medición. Además, en la doble cadena ADN-ADN, cuando la longitud de onda de excitación cambió de 488 nm a λ_{max} (una en la parte de la longitud de onda más larga si existen dos λ_{max}) en el espectro de absorción UV, se obtuvieron un rendimiento cuántico Φ_F de 0,307 y una proporción de intensidad de fluorescencia I_{ds}/I_{ss} entre la doble cadena y la cadena sencilla de 3,4 como resultados de medición.

45 Tabla 2

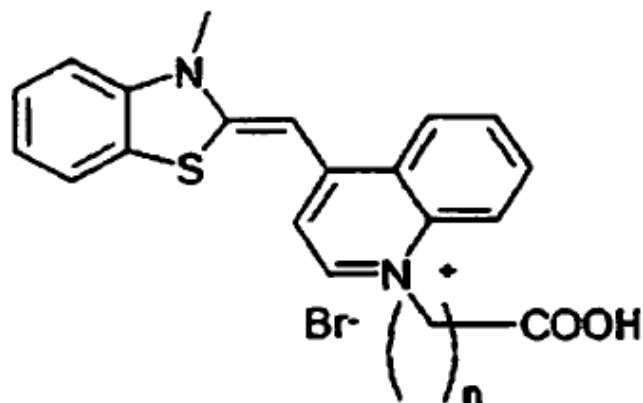
		λ_{max} (nm) de UV y coeficiente de absorción	λ_{max} (nm) de fluorescencia	Rendimiento cuántico	Proporción	Tf(°C)
n = 4	Cadena sencilla	515(123000)	532	0,0681	-	Ninguna
	Cadena doble de ADN-ADN	509(125000)	526	0,180	2,64	65
	Cadena doble ADN-ARN	511(125000)	527	0,244	3,58	55

Condiciones de medición: sonda 2,5 μ M, tampón de ácido fosfórico 50 mM (pH 7,0), NaCl 100 mM, cadena complementaria 2,5 μ M.

50 La longitud de onda máxima de fluorescencia es un valor obtenido cuando la excitación se llevó a cabo con luz que tenía una longitud de onda de 488 nm (con una amplitud de 1,5 nm). El rendimiento cuántico se calculó con 9,10-difenilantraceno como sustancia de referencia.

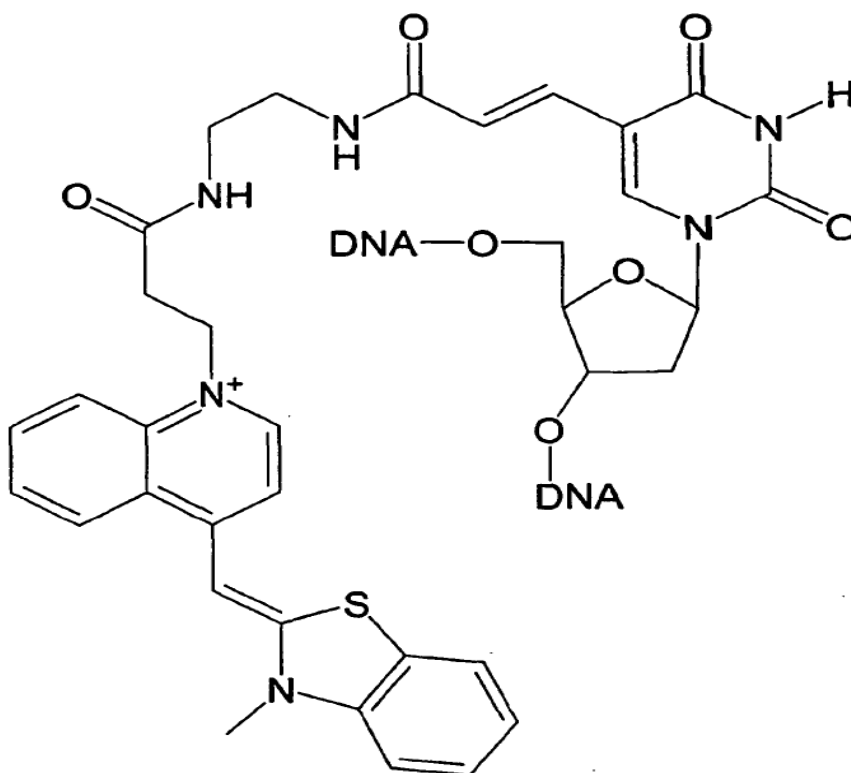
[Ejemplo 10]

[0133] Los compuestos (oligómeros de AND, cada uno de los cuales contiene sólo una estructura de colorante en una molécula, se sintetizaron de la misma manera que el ejemplo 9 a excepción de que se utilizó un compuesto representado por la fórmula química 115 como colorante en lugar del compuesto 107. La síntesis se llevó a cabo cambiando la longitud n de enlazador de manera variable de 1 a 4. La secuencia fue 5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' (X era el sitio donde se introduce un colorante) como en el compuesto 105.



1 1 5

El compuesto 116 indicado a continuación se obtiene cuando n=2. La intensidad de fluorescencia del compuesto 116 se evaluó de la misma manera que en los ejemplos 7 a 9. Como resultado, en el caso de doble cadena de ADN-ARN, el incremento en la intensidad de fluorescencia se observó en comparación con el caso de la cadena sencilla.



1 1 6

[Medición del tiempo de vida de la fluorescencia]

[0134] Con respecto a los oligómeros de ADN (oligonucleótidos) del ejemplo 8 (dos colorantes) y el ejemplo 9 (un colorante), se midió el tiempo de vida de la fluorescencia en el caso de la cadena sencilla y en el caso de la cadena doble de ADN, respectivamente. El oligómero utilizado como control de medición contiene, en el sitio X en la siguiente secuencia, un nucleótido que contiene un colorante introducido en el mismo.

5'-d(CGCAATXTAACGC)-3' (SEQ ID NO. 1)

5'-d(GCGTTAAATTGCG)-3' (SEQ ID NO. 2)

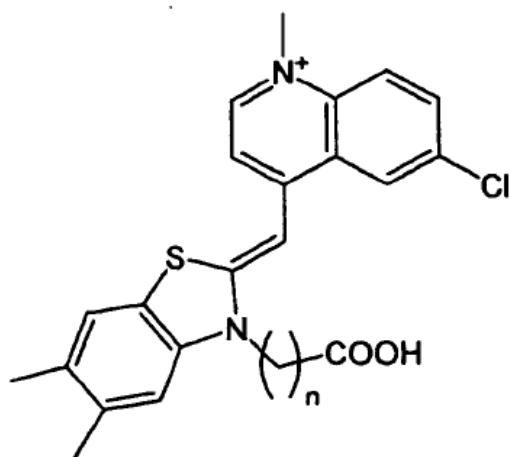
[0135] Los resultados de la medición del tiempo de vida de fluorescencia se indican en la tabla 3 siguiente. En la tabla 3, T es el tiempo de vida de fluorescencia (ns). CHISQ indica un error de medición. T1 indica el tiempo transcurrido desde inmediatamente después de completar la excitación. T2 indica el tiempo adicional transcurrido después de haber transcurrido el tiempo T1 en el caso de la sonda que contenía dos colorantes del ejemplo 8, siendo el tiempo transcurrido desde inmediatamente después de completar la excitación en el caso de la sonda que contenía un colorante del ejemplo 9. T3 indica el tiempo transcurrido posteriormente después de que ha transcurrido el tiempo T2. En la tabla 3, el valor numérico expresado en “%” es la velocidad de decaimiento de la fluorescencia (tomando la intensidad de fluorescencia obtenida inmediatamente después de completar la excitación como el 100%) durante el paso de tiempo T1, T2, o T3, y la suma total es el 100% con respecto a cada sonda (oligómero de ADN). Tal como se indica en la Tabla 3, la sonda que contiene dos colorantes (Ejemplo 8) experimenta un proceso de desactivación muy corto (la velocidad de decaimiento de la fluorescencia obtenida 0,0210 ns después de la excitación fue del 81,54%) en el estado de cadena sencilla, lo cual indica la presencia de un efecto de excitón. Esto no se observó en otros casos. El decaimiento de la fluorescencia de este ODN marcado con dos colorantes, en el estado de cadena sencilla, juega un papel importante en el cambio brusco y específico de hibridación en la intensidad de fluorescencia. Además, tal como se puede observar en la tabla 3, las propiedades de decaimiento de la fluorescencia concordaban con propiedades de función cuadrática o cúbica. Con respecto a la doble cadena con dos colorantes indica en la tabla 3 a continuación, la medición se llevó a cabo de nuevo bajo las mismas condiciones (sin embargo, se omitió la medición de T1). Como resultado, la velocidad de decaimiento de la fluorescencia cuando T2 = 2,05 fue del 44%, la velocidad de decaimiento de la fluorescencia cuando T3 = 4,38 fue del 56%, T fue 3,33 (ns), y CHISQ fue 1,09. De este modo, se obtuvieron los valores que estaban próximos a los indicados en la tabla 3 siguiente. Es decir, se indica que la sonda de este ejemplo presenta una reproducibilidad excelente en esta medición del tiempo de vida de fluorescencia.

Tabla 3

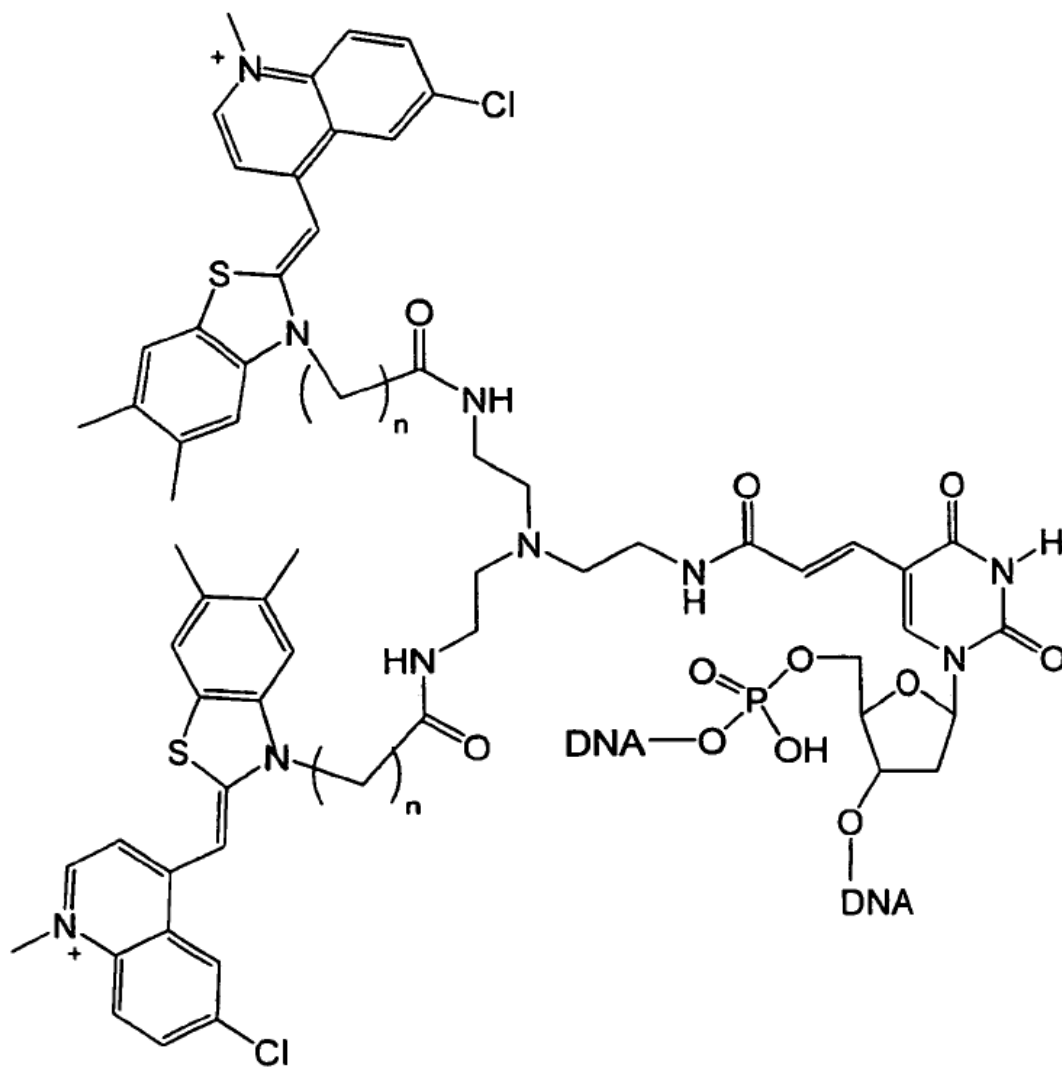
	Cadena sencilla con un colorante	Cadena doble con un colorante	Cadena sencilla con dos colorantes	Cadena doble con dos colorantes
T1	-	-	0,0210 ns (81,54%)	0,0551 ns (2,73%)
T2	0,934 ns (39,19%)	1,58 ns (24,63%)	1,28 ns (8,99%)	2,33 ns (50,30%)
T3	3,12 ns (60,81%)	3,60 ns (75,37%)	3,76 ns (9m,48%)	4,57 ns (46,97%)
T	2,26	3,10	0,489	3,33
CHISQ	1,32	0,96	1,11	1,04
Cadena 2,5 μ M Tampón de ácidos fosfórico 50 mM (pH 7,0) NaCl 100 mM Medido a 455 nm (inicio inmediato) y 600 nm (decaimiento)				

[Ejemplo 11]

[0136] Se sintetizó un oligómero de ADN representado por la fórmula química 117 siguiente de la misma manera que en el ejemplo 8 a excepción de que se utilizó un compuesto representado por la fórmula química 115' siguiente como colorante en lugar del compuesto 107. Los compuestos con n igual a 3, 4, 5 y 6 se sintetizaron de la misma manera. Además, se utilizó como una sonda de fluorescencia de la misma manera que en el ejemplo 8, y el rendimiento de la misma se evaluó mediante la medición de la fluorescencia. El resultado se indica en la tabla 4 siguiente. Tal como se indica en la tabla 4, el compuesto 117 es diferente en la banda de absorción del oligómero de ADN (compuesto 113) del ejemplo 8, pero de manera similar mostraba un buen efecto de excitón. Esto indica que, en la presente invención, la detección multicolor se puede llevar a cabo utilizando sondas de fluorescencia con diferentes bandas de absorción entre sí.



1 1 5'



1 1 7

Tabla 4

		λ_{max} (nm) de UV y coeficiente de absorción	λ_{max} (nm) de fluorescencia	Rendimiento cuántico	Proporción
n = 4	Sonda de cadena sencilla	499(135000) 532(86000)	553	0,00911	-
	Sonda de cadena doble de ADN	505(111000) 530(148000)	550	0,0706	7,7

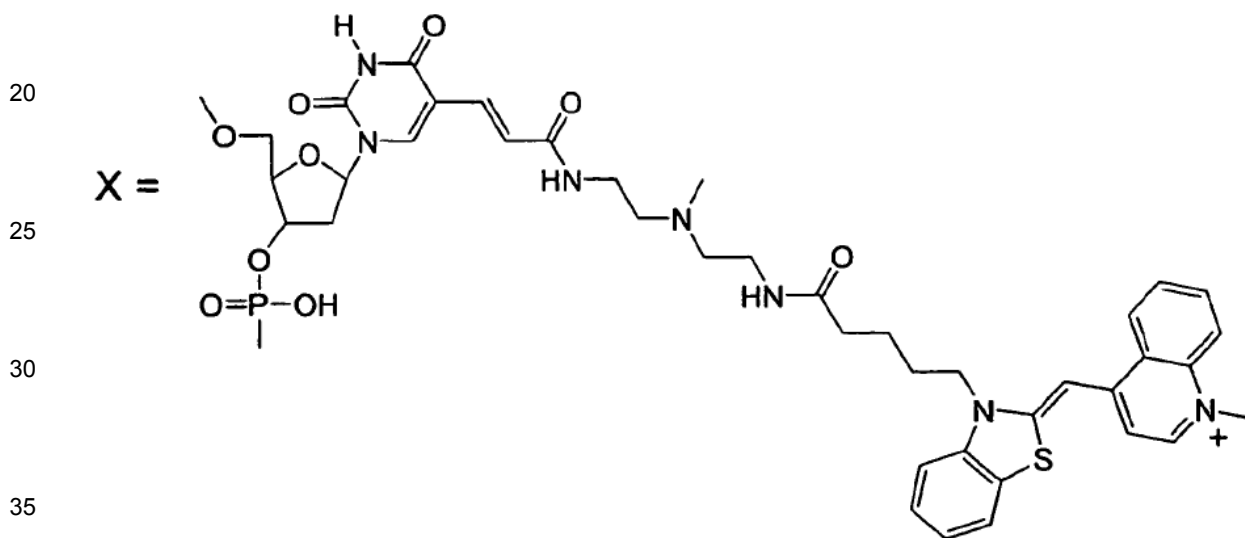
5

[Ejemplo 12]

5 [0137] Se sintetizó un oligómero de ADN (compuesto 118) expresado por la secuencia descrita a continuación. X es un nucleótido (representado por la fórmula descrita a continuación referida como fórmula química 118) que
 10 tiene la misma estructura de colorante que la del ejemplo 9. Tal como se indica en la secuencia descrita a continuación, este oligómero de ADN contiene dos nucleótidos sucesivos secuenciados, cada uno contiene un colorante introducido en los mismos. La introducción del colorante y la síntesis del oligómero de ADN se llevó a cabo de la misma manera que en los respectivos ejemplos descritos anteriormente.

15

5'-d(TTTTTTXXTTTT)-3' (SEQ ID NO.3)



40 [0138] Además, este oligómero de ADN se utilizó como sonda de fluorescencia de la misma manera que en los respectivos ejemplos descritos anteriormente y el rendimiento de la misma se evaluó mediante la medición de fluorescencia.

Sonda 2,5 μM (concentración de cadena)
 Tampón de ácido fosfórico 50 mM (pH 7,0)
 NaCl 100 mM

45 Cadena complementaria 2,5 μM (concentración de cadena)

50 [0139] Los resultados se muestran en las figuras 16 y 17. La figura 16 es un diagrama que muestra los espectros de absorción (la línea de puntos muestra el espectro de la cadena sencilla, la línea continua muestra el espectro de la cadena de ADN-ADN y la línea semicontinua muestra el espectro de cadena de ADN-ARN) y la figura 17 es un diagrama que muestra tanto los espectros de excitación como los espectros de emisión de fluorescencia. En la figura 17, las curvas localizadas en la parte izquierda (la parte de la longitud de onda más corta) indican los espectros de excitación, mientras que las curvas localizadas en la parte derecha (la parte de la longitud de onda más larga) indican los espectros de emisión de fluorescencia. Tanto en los espectros de excitación como de emisión de fluorescencia, la cadena sencilla mostraba la intensidad de emisión más baja la cadena de ADN-ARN mostraba una intensidad de emisión más elevada que la de la cadena sencilla, y la cadena ADN-ADN mostraba la intensidad de emisión más elevada. Tal como se muestra en las figuras 16 y 17, incluso cuando los dos

55

nucleótidos sucesivos, cada uno contiene un colorante introducido en los mismos, se secuencias, se mostró un efecto de excitón porque era posible localizar los colorantes a una corta distancia, y se pueden diferenciar claramente entre sí los estados antes y después de la hibridación con ácido nucleico diana mediante la intensidad de fluorescencia.

[Ejemplo 13]

[0140] Los compuestos (oligómeros de AND) representados por la fórmula química 113 o 114, es decir, los respectivos ODN indicados en la tabla 5 siguiente, se sintetizaron cambiando la longitud n del enlazador y la secuencia de al ácido nucleico. El "ODN" indica oligodesoxirribonucleótido (oligómero de ADN) tal como se ha descrito anteriormente. La síntesis se llevó a cabo de la misma manera que en los ejemplos 1 a 4, 6, 8, 9, y 12, a excepción de que en cada uno de los compuestos preparados, el número de carbonos (longitud de cadena) de ácido 5-bromovalérico (ácido 5-bromopentanoico) utilizado como material de partida cambió según la longitud del enlazador, y la secuencia cambió de manera adecuada en la síntesis de oligodesoxirribonucleótido. ODN1 es idéntico al oligodesoxirribonucleótido (oligómero de ADN) sintetizado en el Ejemplo 8, y ODN4 y ODN5 son idénticos al oligodesoxirribonucleótido (oligómero de ADN) sintetizado en el ejemplo 9. En la síntesis, el éster de N-hidroxisuccinimido (compuesto 109) de naranja de tiazol utilizado aquí era por lo menos 50 equivalentes del grupo amino activo. Después de la síntesis, el tiempo de desarrollo en HPLC de fase inversa fue de 20 a 30 minutos o más largo según fuera necesario. En la tabla 5 indicada a continuación, por ejemplo, [113]_(n) o [114]_(n) indican que un nucleótido representado por la fórmula química 113 ó 114 ha sido insertado en ese sitio, y n indica la longitud del enlazador. En la tabla 5, ODN1' indica una cadena de ADN complementaria a ODN1. De manera similar, ODN2' indica una cadena de ADN complementaria a ODN2 y ODN3' indica una cadena de ADN complementaria a ODN3.

Tabla 5

	Secuencia (5'→3')	
ODN1	CGCAAT[113] _(n) TAACGC	SEQ ID NO: 1
ODN1'	GCGTTAAATTGCG	SEQ ID NO: 2
ODN2	TTTTTT[113] ₍₄₎ TTTTTT	SEQ ID NO: 3
ODN2'	AAAAAAAAAAAAA	SEQ ID NO: 4
ODN3	TGAAGGGCTT[113] ₍₄₎ TGAACTCTG	SEQ ID NO: 5
ODN3'	CAGAGTTCAAAGCCCTTCA	SEQ ID NO: 6
ODN4	CGCAAT[114] ₍₄₎ TAACGC	SEQ ID NO: 7
ODN5	CGCAAT[114] ₍₄₎ [114] ₍₄₎ AACGC	SEQ ID NO: 8
ODN(anti4.5S)	GCCTCCT[113] ₍₄₎ CAGCAAATCC[113] ₍₄₎ ACCGGCGTG	SEQ ID NO: 9
ODN(antiB1)	CCTCCCAAG[113] ₍₄₎ GCTGGGAT[113] ₍₄₎ AAAGGCGTG	SEQ ID NO: 10

[0141] con respecto a cada ODN sintetizado descrito anteriormente, la concentración se determinó a través de la digestión enzimática de la misma manera que en el ejemplo 4. Además, cada ODN sintetizado descrito anteriormente se identificó con un espectro de masas MALDI TOF. Los valores de la espectrometría de masas se indican a continuación.

[0142] ODN1 (n=3), CGCAAT[113]₍₃₎TAACGC, calculado para C₁₇₈H₂₁₃N₅₆O₇₈P₁₂S₂ ([M.H]⁺) 4820,7, hallado 4818,9; ODN1 (n=4), CGCAAT[113]₍₄₎TAACGC, calculado para C₁₈₀H₂₁₇N₅₆O₇₈P₁₂S₂ ([M.H]⁺) 4848,8, hallado 4751,4;

ODN1 (n=5), CGCAAT[113]₍₅₎TAACGC, calculado para C₁₈₂H₂₂₁N₅₆O₇₈P₁₂S₂ ([M.H]⁺) 4876,8, hallado 4875,6;

ODN1 (n=6), CGCAAT[113]₍₆₎TAACGC, calculado para C₁₈₄H₂₂₅N₅₆O₇₈P₁₂S₂ ([M.H]⁺) 4904,9, hallado 4903,6;

ODN2, TTTTTT[113]₍₄₎TTTTTT, calculado para C₁₈₄H₂₂₇N₃₄O₉₂P₁₂S₂ ([M.H]⁺) 4822,8, hallado 4821,4;

ODN3, TGAAGGGCTT[113]₍₄₎TGAACTCTG, calculado para C₂₅₁H₃₀₅N₈₁O₁₂₄P₁₉S₂ ([M.H]⁺) 7093,2, hallado 7092,3;

ODN (anti4.5S), GCCTCCT[113]₍₄₎CAGCAAATCC[113]₍₄₎ACCGGCGTG, calculado para C₃₇₇H₄₅₆N₁₁₆O₁₇₃P₂₇S₄ ([M.3H]⁺) 10344,9, hallado 10342,7;

ODN (antiB1), CCTCCCAAG[113]₍₄₎GCTGGGAT[113]₍₄₎AAAGGCGTG, calculado para C₃₈₁H₄₅₆N₁₂₄O₁₇₂P₂₇S₄ ([M.3H]⁺) 10489,0, hallado 10489,8.

[0143] Entre los ODN indicados en la tabla 5, con respecto a cada uno de ODN (ODN1, ODN2 y ODN3) que contienen [113]_(n) que se obtuvieron cambiando de forma variada la secuencia y la longitud del enlazador, se midieron el espectro de absorción, el espectro de excitación y el espectro de emisión antes y después de la hibridación con una hebra complementaria. Los resultados se indican juntos en la tabla 6 siguiente, así como las figuras 18 y 19.

Tabla 6

	$\lambda_{\max}/\text{nm}(\epsilon)$	$\lambda_{\max}/\text{nm}^b$	ϕ_f^c	$I_{ds}/I_{ss}d$	Tf/°C
ODN (n=3)	480(117000) 510(93800)	537	0,096	-	-
ODN1 (n=3)/ODN1'	505(145000)	529	0,298	7,6	66
ODN1 (n=4)	479(156000) 509(104000)	538	0,059	-	-
ODN1 (n=4)/ODN1'	509(179000)	528	0,272	14,4	65
ODN1 (n=5)	480(139000) 510(107000)	538	0,043	-	-
ODN1 (n=5)/ODN1'	508(172000)	529	0,208	8,1	67
ODN1(n=6)	479(139000) 509(93300)	536	0,053	-	-
ODN1 (n=6)/ODN1' 5'CGCAAT'I'TAACGC- 3'/O	509(164000)	528	0,265	10,9	65
DN1' ODN2	-	-	-	-	58
ODN2/ODN2'	478(221000) 505(115000)	545	0,010	-	-
ODN3	513(209000) 482(146000) 510(145000)	536 535	0,469 0,07 4	160 -	62 -
ODN3/ODN3'	509(191000)	530	0,232	4,5	74

Condiciones de medición: ADN 2,5 μM , solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH = 7,0), cloruro de sódico 100 mM

b: Excitación a 488 nm

c: Excitación a $\lambda_{\max}$ (excitación a $\lambda_{\max}$ en la parte de la longitud de onda más larga cuando hay dos $\lambda_{\max}$)

d: proporción de la intensidad de fluorescencia a λ_{em} entre una estado de doble cadena y un estado de cadena sencilla

[0144] En la tabla 6, ODN1 (n = 3 a 6) tiene la misma estructura que la del oligodesoxirribonucleótido (5'-d(CGCAATXTAACGC)-3', en el que X era el sitio en que se había introducido un colorante 113) del ejemplo 8. En el ejemplo 8, el rendimiento cuántico de fluorescencia Φ_F y la proporción de intensidad de fluorescencia (I_{ds}/I_{ss}) entre el estado de doble cadena y un estado de cadena sencilla se midieron a través de la excitación llevada a cabo a una longitud de onda de 488 nm. Sin embargo, en este ejemplo (ejemplo 13) tal como se ha descrito anteriormente, se midieron a través de la excitación llevada a cabo a $\lambda_{\max}$ en el espectro de absorción UV. Por lo tanto, la tabla 1 (ejemplo 8) y la tabla 6 (ejemplo 13) indican la misma sustancia con diferente rendimiento cuántico de fluorescencia Φ_F y la proporción de intensidad de fluorescencia (I_{ds}/I_{ss}).

[0145] La figura 18 muestra gráficos, cada uno de los cuales ilustra el espectro de absorción, espectro de excitación y espectro de emisión de ODN que contiene [113]₍₄₎. En cada una de las figuras 18(a), (b), y (c), el gráfico mostrado en la parte izquierda ilustra el espectro de absorción, con el eje horizontal indicando la longitud de onda y el eje vertical indicando la absorbancia. El gráfico mostrado en la parte derecha ilustra el espectro de excitación y el espectro de emisión, con el eje horizontal indicando la longitud de onda y el eje vertical indicando la intensidad de emisión. Cada medición se realizó a 25°C utilizando, como muestra, ODN que contiene [113]₍₄₎ en una solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH=7,0) que contenía cloruro de sodio 100 mM. En cada gráfico mostrado en la figura 18, la línea negra indica el resultado de la medición con respecto al ODN de cadena sencilla (ss) y la línea gris indica el resultado de la medición con respecto a ODN (ds) hibridado con una cadena de ADN complementaria correspondiente.

La figura 18(a) muestra el resultado de la medición con respecto a ODN1 (n=4) (2,5 μM). Con respecto al espectro de excitación, la intensidad de emisión a una longitud de onda de 534 nm se midió con respecto a la ss y la intensidad de emisión a una longitud de onda de 528 nm se midió con respecto a la ds. Los espectros de

emisión se midieron excitándose la ss a una longitud de onda de 519 nm y la ds a una longitud de onda de 514 nm.

La figura 18(b) muestra el resultado de medición con respecto a ODN2. La concentración de la cadena fue de 2,5 μM en el gráfico mostrado en la parte izquierda, y fue de 1 μM en el gráfico mostrado en la parte derecha. Con respecto al espectro de excitación, la intensidad de emisión a una longitud de onda de 534 nm se midió con respecto a la ss, y la intensidad de emisión a una longitud de onda de 537 nm se midió con respecto a la ds. Los espectros de emisión se midieron, excitándose la ss a una longitud de onda de 517 nm y la ds a una longitud de onda de 519 nm.

La figura 18(c) muestra el resultado de medición con respecto a ODN3. La concentración de la cadena fue de 2,5 μM . Con respecto al espectro de excitación, la intensidad de emisión a una longitud de onda de 535 nm se midió con respecto a la ss, y la intensidad de emisión a una longitud de onda de 530 nm se midió con respecto a la ds. Los espectros de emisión se midieron, excitándose la ss a una longitud de onda de 518 nm y la ds a una longitud de onda de 516 nm.

[0146] La figura 19 muestra gráficos, cada uno de los cuales ilustra el espectro de absorción, espectro de excitación y espectro de emisión de ODN1 ($n=3, 5$ y 6). En cada una de las figuras 19(a), (b), y (c), el gráfico mostrado en la cara izquierda ilustra el espectro de absorción, con el eje horizontal indicando la longitud de onda y el eje vertical indicando la absorbancia. El gráfico mostrado en la parte derecha ilustra el espectro de excitación y el espectro de emisión, con el eje horizontal indicando la longitud de onda y el eje vertical indicando la intensidad de emisión. Cada medición se llevó a cabo a 25°C utilizando, como muestra, ODN1 ($n=3, 5$, ó 6) en una solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM ($\text{pH}=7,0$) que contenía cloruro de sodio 100 mM. En cada gráfico mostrado en la figura 19, la línea negra indica el resultado de medición con respecto al ODN de cadena sencilla (ss), y la línea gris indica el resultado de la medición con respecto a ODN (ds) hibridado con una cadena de ADN complementaria correspondiente.

La figura 19(a) muestra el resultado de la medición con respecto a ODN1 ($n=3$) (2,5 μM). Con respecto al espectro de excitación, la intensidad de emisión a una longitud de onda de 537 nm se midió con respecto a la ss, y la intensidad de emisión a una longitud de onda de 529 nm se midió con respecto a ds. Los espectros de emisión se midieron, excitándose la ss a una longitud de onda de 521 nm y la ds a una longitud de onda de 511 nm.

La figura 19(b) muestra el resultado de la medición con respecto a ODN1 ($n=5$) (2,5 μM). Con respecto al espectro de excitación, la intensidad de emisión a una longitud de onda de 538 nm se midió con respecto a la ss, y la intensidad de emisión a una longitud de onda de 529 nm se midió con respecto a ds. Los espectros de emisión se midieron, excitándose la ss a una longitud de onda de 520 nm y la ds a una longitud de onda de 512 nm.

La figura 19(c) muestra el resultado de la medición con respecto a ODN1 ($n=6$) (2,5 μM). La concentración de la cadena fue de 2,5 μM . Con respecto al espectro de excitación, la intensidad de emisión a una longitud de onda de 536 nm se midió con respecto a la ss, y la intensidad de emisión a una longitud de onda de 528 nm se midió con respecto a ds. Los espectros de emisión se midieron, excitándose la ss a una longitud de onda de 523 nm y la ds a una longitud de onda de 514 nm.

[0147] Tal como se muestra en la tabla 6, así como en las figuras 18 y 19, las bandas de absorción se observaron en un intervalo de 400 a 500 nm con respecto a las muestras que contenía [113](n) respectivas. La banda de absorción en la parte de la longitud de onda más corta (hasta 480 nm) se incrementó cuando la muestra de ODN que contenía 1(n) estaba en un estado de cadena sencilla, mientras que la banda de absorción en la parte de longitud de onda más larga (hasta 510 nm) apareció prominentemente (de manera dominante) cuando la muestra de ODN que contenía 1(n) se hibridó con una cadena complementaria. La banda de absorción en la parte de la longitud de onda más larga (hasta 510 nm) es una banda de absorción típica de naranja de tiazol solo. En el espectro de emisión, se observó hasta 530 nm una banda de absorción amplia única. Con la hibridación de una muestra de ODN que contiene [113](n) con una cadena complementaria, la intensidad de emisión cambió claramente. Es decir, la muestra de ODN que contiene [113](n) hibridado a una cadena de ADN diana mostró una fluorescencia intensa, pero la muestra de ODN que contenía [113](n) antes de ser hibridado mostraba una fluorescencia sólo muy débil en comparación con la mostrada después de la hibridación. Particularmente, la fluorescencia de ODN2 formado de una secuencia de polipirimidina se desactivó casi completamente en el estado de cadena sencilla. La proporción de la intensidad de fluorescencia (I_{ds}/I_{ss}) ente el estado de doble cadena y el estado de cadena sencilla de ODN2 alcanzó 160 en la longitud de onda de emisión máxima. Cuando ODN3' como cadena de ODN de 20 unidades y ODN3 que tiene una secuencia común se hibridaron entre sí, la intensidad de emisión era claramente diferente antes y después de la hibridación. Además, tal como puede verse de la tabla 6, así como de las figuras 18(a) y 19, cuando la longitud del enlazador n se cambió de 3 a 6 en ODN1 de este ejemplo, se obtuvo un valor de I_{ds}/I_{ss} amplio con cualquier longitud de enlazador. Tal como se ha descrito anteriormente, todos los ODN indicados en la tabla 6 mostraron una capacidad de desactivación elevada aunque hubo una diferencia en la capacidad de desactivación dependiendo de la longitud del enlazador y la secuencia de la sonda.

[0148] Tal como se indica en la tabla 6 anterior, el punto de fusión (T_f) de ODN1 ($n=4$)/ODN1' se incrementó en 7 a 9°C en comparación con la doble cadena nativa, 5'-CGCAATTTAACGC-3'/ODN1'. Este incremento en el valor

de Tf implica que los dos colorantes catiónicos contenidos en la sonda se unieron de manera efectiva a una cadena doble formada junto con la secuencia diana. Además, tal como puede observarse a partir de las figuras 18 y 19, el espectro de excitación indicó un pico individual amplio alrededor de 510 nm independientemente de la estructura del compuesto. Esta longitud de onda concordaba con una longitud de onda en la banda de absorción. Es decir, posiblemente, la absorción asociada con la emisión de fluorescencia tiene lugar sólo en la banda de absorción alrededor de 510 nm y la banda de absorción alrededor de 480 nm apenas afecta a la emisión. Además, la energía de acoplamiento del excitón se estimó en 1230 cm^{-1} en base al desplazamiento de la banda de absorción desde 510 nm a alrededor de 480 nm que estaba causado por la agregación del colorante. Esto es equivalente a la energía de acoplamiento que se ha descrito para el agregado H de los colorantes de cianina. Sin embargo, estas consideraciones teóricas no limitan la presente invención.

[Espectro de absorción]

[0149] Los espectros de absorción del ODN1 ($n=4$) se determinaron a varias temperaturas y concentraciones y se comprobaron los efectos de la temperatura y la concentración en la banda de absorción. Los resultados se muestran en el diagrama del espectro de absorción en la figura 20. En las figuras 20(1) y 20(b), el eje horizontal indica la longitud de onda, y el eje vertical indica la absorbancia. Cada medición se llevó a cabo utilizando, como muestra, ODN1 ($n=4$) contenida en una solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM ($\text{pH}=7,0$) que contenía cloruro de sodio 100 mM.

La figura 20(a) muestra un cambio en el espectro de absorción obtenido cuando cambió la temperatura de solución. La concentración de ODN fue de $2,5\text{ }\mu\text{M}$. El espectro se midió a intervalos de 10°C desde 10°C a 90°C . La figura 20(b) muestra un cambio en el espectro de absorción obtenido cuando se cambió la concentración de la solución. La temperatura de medición fue de 25°C . Las concentraciones de ODN fueron 0,5, 0,75, 1,0, 1,2, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, y $5,0\text{ }\mu\text{M}$. El inserto es un gráfico que muestra la relación entre el logaritmo de la absorbancia a una longitud de onda de 479 nm (eje vertical) y el logaritmo de la absorbancia a una longitud de onda de 509 nm (eje horizontal).

[0150] Tal como se muestra en la figura 20(a), la proporción de absorbancia entre las dos bandas de absorción cambió ligeramente cuando la medición se llevó a cabo cambiando la temperatura de muestra. Es decir, con el incremento en la temperatura de muestra, la absorbancia en la banda de absorción de 479 nm disminuyó gradualmente y se incrementó la absorbancia en la banda de absorción de 509 nm. Sin embargo, tal como puede observarse de la figuras 20(a), el cambio fue muy pequeño. Esto indica que en la sonda de la presente invención, ODN1 ($n=4$), el cambio de estructura causado según el cambio de temperatura es muy pequeño, y por tanto, se puede utilizar sin apenas verse afectado por la temperatura. Tal como se muestra en la figura 20(a), se observó un punto de isosbético que indicaba la presencia de dos componentes del espectro a 487 nm.

[0151] Por otro lado, tal como se muestra en la figura 20(b), cuando se incrementó la concentración de la muestra, ODN1($n=4$), se observó un incremento en la absorbancia en ambas bandas de absorción. Además, tal como se muestra en el inserto, la representación de $\log(\text{Abs}_{479})$ frente a $\log(\text{Abs}_{509})$, es decir la proporción entre los logaritmos de las absorbancias en las respectivas bandas de absorción, mostró una línea recta. Esto indica que la proporción entre los dos componentes del espectro era casi constante independientemente de la concentración de ODN. En otras palabras, la sonda de la presente invención, ODN1 ($n=4$), se puede utilizar sin verse afectada por la concentración de la misma, ya que la estructura de la misma apenas cambia incluso cuando su concentración en la solución cambia.

[0152] La causa de los cambios en el espectro mostrados en las figuras 20(a) y (b) se pueden describir, por ejemplo, de la siguiente manera. Sin embargo, estas descripciones son ejemplos de consideraciones teóricas y no limitan la presente invención. Es decir, en primer lugar, ODN1 ($n=4$) forma un agregado H intramolecular según el sistema dicróico. Presumiblemente, el cambio de espectro mostrado en la figura 20(a) estaba causado porque la estructura del agregado H se había deshecho ligeramente debido al incremento de temperatura. Posiblemente, dado que el agregado H intramolecular está intramolecularmente completado, la estructura apenas cambia mediante, por ejemplo, una interacción intermolecular incluso cuando aumenta la concentración y, por tanto, la proporción entre los dos componentes del espectro es casi constante tal como se muestra en la figura 20(b) y el inserto. Posiblemente, existen dos modos de conformación de un agregado H intramolecular y monómeros de colorantes (las partes de colorantes que no han sido agregadas) en la solución de muestra de ODN1 ($n=4$). Se supone que la banda de absorción localizada en la parte de la longitud de onda más corta (479 nm) deriva del agregado H intramolecular. Por otro lado, se supone que la banda de absorción (509 nm) localizada en la parte de la longitud de onda más larga deriva de los monómeros de colorantes ya que aumentaba con el calor.

[Espectro CD]

[0153] Se midió el espectro CD de ODN1 ($n=4$)/ODN1'. La medición se llevó a cabo a 25°C en una solución de tampón fosfato de sodio 50 mM ($\text{pH}=7,0$) que contenía cloruro de sodio 100 mM, siendo la concentración de cadena de $2,5\text{ }\mu\text{M}$. El resultado de la medición se muestra en el diagrama del espectro CD en la figura 21. En la figura 21, el eje horizontal indica la longitud de onda (nm), y el eje vertical indica el ángulo θ . Tal como se

muestra en la figura 21, la doble cadena de ODN1 (n=4)/ODN1' mostró de un efecto Cotton de separación ente 450 y 550 nm. Es decir, una pareja de CD medida mostró un patrón típico observado cuando el colorante naranja de tiazol se intercalaba en una doble cadena de ADN. Posiblemente, en otras palabras, las partes de colorante del ODN1 (n=4) se intercalaron en el ADN de doble cadena que se había formado y de este modo se evitaba la formación de un agregado dicroico (agregado H). Este resultado de la medición de CD implica, junto con el resultado de la medición de Tf, que cuando las partes de colorante del ODN1 (n=4) se unen al ADN de doble cadena, ambas partes de colorante se intercalan en el surco principal y, de este modo, se forma una estructura de doble cadena térmicamente estable. Sin embargo, esta consideración teórica no limita la presente invención. El hecho de que la estructura de doble cadena a formar sea térmicamente estable indica que la sonda (ácido nucleico) de la presente invención se puede utilizar de manera eficaz para detectar la secuencia complementaria.

[Ejemplo 14]

[0154] Con respecto al ODN5 (CGCAAT[114]₍₄₎[114]₍₄₎AACGC), se midieron el espectro de absorción, el espectro de excitación, y el espectro de emisión en el estado de doble cadena y el estado de cadena sencilla. A continuación en la Tabla 7 y en la figura 22 se muestran los resultados.

Tabla 7

	$\lambda_{\max}/\text{nm}(\epsilon)$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}^b$	Φ_f^c	$I_{\text{ds}}/I_{\text{ss}}^d$	Tf/°C
ODN5	483(123000) 511(118000)	545	0,059	-	-
ODN5/ODN1'	509(180000)	528	0,275	10,3	71

Condiciones de medición: ADN 2,5 μM , solución de tampón de fosfato sódico (pH=7,0), cloruro sódico 100 mM
b: Excitación a 488 nm
c: Excitación a $\lambda_{\max}$ (excitación a $\lambda_{\max}$ en la parte de longitud de onda más larga cuando hay dos $\lambda_{\max}$)
d: Proporción de intensidad de fluorescencia a λ_{em} entre el estado de la cadena doble y el estado de cadena sencilla

[0155] La figura 22 muestra gráficos que ilustran el espectro de absorción, el espectro de excitación, y el espectro de emisión de ODN5, específicamente, ODN que contiene [114]₍₄₎. Se llevó a cabo la medición a 25°C en una solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH=7,0) que contenía cloruro sódico 100 mM, con la concentración de cadena de ODN5 siendo 2,5 μM . La línea negra indica el resultado de la medición con respecto al ODN5 de cadena sencilla (ss), y la línea gris indica el resultado de la medición con respecto al ODN5 de doble cadena (ds) hibridado con ODN1'. La figura 22(a) muestra el espectro de absorción, con el eje horizontal indicando la longitud de onda y el eje vertical indicando la absorbancia. La figura 22(b) muestra el espectro de excitación (la curva localizada en parte de la longitud de onda más corta) y el espectro de emisión (la curva localizada en la parte de la longitud de onda más larga), con el eje horizontal indicando la longitud de onda y el eje vertical indicando la intensidad de emisión. Con respecto al espectro de excitación, se midió la intensidad emisión a una longitud de onda de 534 nm con respecto al ss, y se midió la intensidad de emisión a una longitud de onda de 514 nm con respecto al ds. Se midieron los espectros de emisión, excitándose la ss a una longitud de onda de 528 nm y la ds a una longitud de onda de 519 nm.

[0156] Tal y como se muestra en la Tabla 7 y en la figura 22, el ODN 5 que tiene una secuencia que contiene dos nucleótidos sucesivos [114]₍₄₎ mostró una desactivación de la fluorescencia efectiva adicional en comparación con la supresión de emisión (Tabla 2 en el Ejemplo 9) del ODN4 de cadena sencilla que contiene sólo un [114]₍₄₎ nucleótido. Con respecto al espectro de absorción de ODN5, se desplazó la banda de absorción a la parte de la longitud de onda más corta en el estado de cadena sencilla. Esto implica que dos nucleótidos de [114]₍₄₎ contenidos en el ODN5 formaban un agregado H intramolecular. Esta agregación dio lugar a la desactivación del ODN5 de cadena sencilla tal y como se observa en el ODN que contiene [113]_(n). Es decir, posiblemente, la causa de la supresión de la emisión de fluorescencia (desactivación) es que las partes de colorante de los dos nucleótidos de [114]₍₄₎ contenidos en el ODN5 formaron un agregado H y de ese modo se produjo un acoplamiento de excitón entre los colorantes. Esto confirmó que el ODN5 que contiene dos nucleótidos de [114]₍₄₎ era útil para detectar la cadena complementaria como en el caso del ODN que contiene [113]_(n).

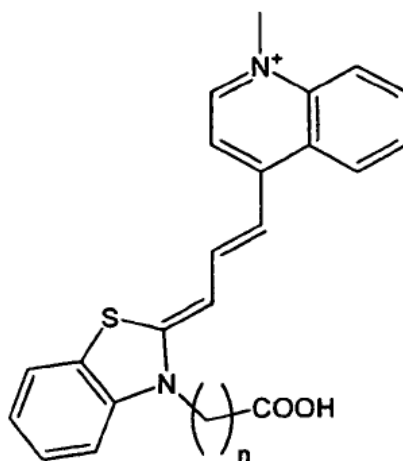
[Ejemplo 15]

[0157] Se determinó a simple vista la fluorescencia obtenida cuando ODN1 (n=4) se hibridó con un ODN1' complementario. El resultado de la medición se muestra en la figura 23. En la figura 23, la celda izquierda es una celda que contiene un ODN1 (n=4) de cadena sencilla, y la celda derecha es una celda que contiene un ODN1 (n=4)/ODN1' de doble cadena. Las celdas respectivas muestran los estados de los mismos obtenidos después de la irradiación con una lámpara halógena de 150 W. Cada celda tiene una concentración de cadena de 2,5 μM y contiene un tampón de ácido fosfórico 50 mM (solución de tampón de fosfato sódico) (pH 7,0) y NaCl 100 mM. Tal y como se muestra en la figura 23, la celda izquierda que contiene ODN1 (n=4) de cadena sencilla apenas

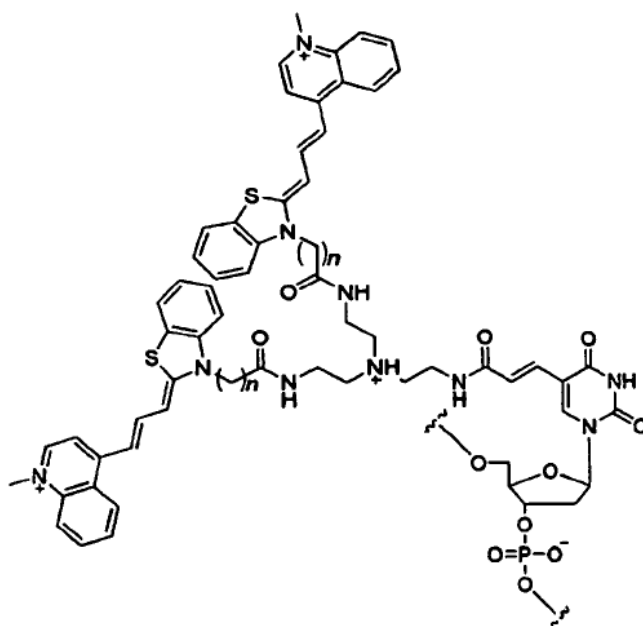
emitió fluorescencia después de la irradiación con la lámpara halógena de 150 W, pero la celda derecha que contiene ODN1 (n=4)/ODN1' de doble cadena emitió fluorescencia de luz verde muy claramente. Además, se obtuvo el mismo resultado incluso cuando se sustituyó la cadena de ADN complementaria ODN1' por una cadena de ARN complementaria correspondiente. Además, se obtuvo el mismo resultado en los casos de ODN2 y ODN2'. Además, en los casos de ODN2 y ODN2', se obtuvo el mismo resultado incluso cuando se sustituyó ODN2' por un ARN complementario correspondiente (A13-unidades). En estos casos, la concentración de cadena fue 5 μ M. Además, se obtuvieron los mismos resultados con respecto a todos los ODN indicados en la Tabla 6 anterior. De este modo, debido a que el ODN de este ejemplo permite cambiar claramente la intensidad de fluorescencia dependiendo de la hibridación, fue fácil determinar la secuencia diana hibridable a simple vista. Esto indica que estos ODN son útiles para el análisis génico visible.

[Ejemplo 16]

[0158] Se sintetizó un oligómero de ADN representado por la Fórmula Química 120 siguiente de la misma manera que en el Ejemplo 8 excepto que se utilizó el compuesto representado por la Fórmula Química 119 siguiente, como un colorante, en lugar del compuesto 107.



1 1 9



1 2 0

5

[0159] Se sintetizaron compuestos (oligodesoxiribonucleótidos) representados por la Fórmula 120, con n siendo 3, 4, 5, y 6, en el mismo método. Además, utilizando ODN (referido como ODN6 (n=5)) expresado mediante una secuencia de 5'-d (CGCAAT[120]₍₅₎TAACGC)-3' como una sonda de fluorescencia, se determinaron el espectro de absorción y el espectro de emisión de fluorescencia y se evaluó el rendimiento de la misma. Las condiciones de medición fueron las mismas que las empleadas en el Ejemplo 7. La figura 24 muestra los resultados de la medición. La figura 24(a) muestra los espectros de absorción, con el eje horizontal indicando la longitud de onda (nm) y el eje vertical indicando la absorbancia. La figura 24(b) muestra los espectros de emisión de fluorescencia, con el eje horizontal indicando la longitud de onda (nm) y el eje vertical indicando la intensidad de emisión. La línea negra indica el espectro del ODN de cadena sencilla, y la línea gris indica el espectro del ODN de doble cadena hibridado con un ODN complementario. Tal y como se muestra en la figura 24(a), en el ODN de doble cadena, se desplazó la longitud de onda máxima de la absorción de UV aproximadamente 600 nm a la parte de la longitud de onda más larga a través de la formación de una doble hélice. Además, tal y como se muestra en la figura 24(b), en el ODN de doble cadena, se incrementó considerablemente la intensidad de fluorescencia en comparación con el de cadena sencilla. De este modo, es posible que se muestre un efecto de excitón en el estado de cadena sencilla. Es decir, a pesar de que el ODN (Compuesto 120) de este ejemplo es diferente en la banda de absorción del ODN (Compuesto 113) del Ejemplo 8 y el ODN (Compuesto 117) del Ejemplo 11, también mostró un buen efecto de excitón. Esto indica que puede realizarse la detección multicolor utilizando sondas de fluorescencia que son diferentes entre sí en la banda absorción en la presente invención.

[Ejemplo 17: Formación de doble cadena con ARN]

[0160] En una cubeta, se formó ODN de doble cadena con el ODN2 (con una secuencia de 5'-d(TTTTTT[113]₍₄₎TTTTTT)-3') y una cadena de ARN complementaria correspondiente (ARN A13-unidades), y se midió el espectro de emisión de la fluorescencia del mismo. Además, se añadió ARNasa H a la misma y se observó el cambio en el espectro. La figura 25 muestra el resultado. En la figura 25, el eje horizontal indica el tiempo y el eje vertical indica la intensidad de fluorescencia. En la figura 25, la línea negra indica el cambio de espectro del ODN de doble cadena al que se añadió ARNasa H durante la medición y la línea gris indica el cambio de espectro de un control, es decir, el ODN de doble cadena al que no se añadió ARNasa H. La medición se llevó a cabo utilizando el fluoroespectrómetro, con agitación a 37°C. Tal como se muestra en la figura 25, cuando se añadió ARNasa H, el ARN que se había hibridado al ODN2 se digirió y, de este modo, el ODN2 volvió a una cadena sencilla, lo cual dio lugar a un descenso gradual en la intensidad de fluorescencia. Esto también confirmó que la sonda (ácido nucleico) de la presente invención era útil en la detección de la fluorescencia del ARN complementario.

[Ejemplo 18]

[0161] El cambio en la intensidad de la emisión de fluorescencia se observó cambiando las proporciones de concentración del ODN1' (con una secuencia, 5'-d(GCGTTAAATTGCG)-3'), donde el ODN1' era una cadena de ADN complementaria al ODN1 (n=4) (con una secuencia de 5'-d(CGCAAT[113]₍₄₎TAACGC)-3'). Las condiciones de medición fueron las siguientes. Es decir, la concentración de cadena del ODN1 (n=4) se fijó a 1,0 μ M, se utilizaron un tampón de ácido fosfórico 50 mM (pH 7,0) y NaCl 100 mM, y se empleó una longitud de onda de excitación de 488 nm (con una amplitud de 1,5 nm). La medición se llevó a cabo con una concentración de la cadena complementaria ODN1' de 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,5, 2,0, y 3,0 μ M. Los resultados de la medición de la misma se muestran en la figura 26. En la figura 26, el eje horizontal indica el número equivalente del ODN1' con respecto al ODN1 (n=4), y el eje vertical indica la intensidad de emisión de fluorescencia (valor relativo) a λ_{max} (529 nm) de fluorescencia. Tal como se muestra en la figura 26, la intensidad de emisión de fluorescencia indicaba una relación directamente proporcional con una precisión muy elevada con respecto al número equivalente cuando el número equivalente de ODN1' era 1 o más pequeño, pero no cambió después de que el número equivalente era superior a 1. Esto indica que el ODN1 (n=4) se hibridó con el ODN1' a una proporción exacta de cantidades de sustancia (proporción en número de moléculas) de 1 : 1.

[0162] Tal como se ha descrito anteriormente, cuando la cantidad de sustancia del ODN1' (ADN diana) es igual o inferior a la del ODN1 (n=4), la intensidad de fluorescencia aumenta en proporción a la concentración del ADN diana. Es decir, es posible determinar la cantidad del ADN diana midiendo la intensidad de fluorescencia cuando se añade un exceso de ODN1 (n=4) (sonda) al sistema en que existe el ODN1' (ADN diana). Además, también es posible determinar el incremento o disminución en el ADN diana mediante el seguimiento del incremento o disminución en la intensidad de fluorescencia.

[0163] A efectos de determinar la cantidad del ADN diana en el sistema, por ejemplo, se puede preparar una curva de calibración de antemano tal como se muestra en la figura 26. Por ejemplo, cuando se midió una

muestra en que la concentración de ODN1' (ADN diana) era desconocida bajo las mismas condiciones que las utilizadas en este ejemplo, si la intensidad de fluorescencia obtenida de este modo era 80, la concentración del ODN1' (ADN diana) se puede determinar que es aproximadamente 0,55 μM a partir de la figura 26.

- 5 **[0164]** De hecho, cuando la cantidad de la secuencia de ODN1' (ADN diana) contenida en el ácido nucleico se determinaba mediante el método anterior, era posible no sólo detectar inmediatamente la aparición de un fenómeno, tal como la amplificación, degradación y unión a proteína de la secuencia en cuestión, sino también cuantificar dicho fenómeno.

10 [Ejemplo 19: Análisis de transferencia de puntos]

[0165] Con respecto a la nueva sonda (ácido nucleico) sintetizada en este punto, a efectos de observar el cambio en las propiedades de fluorescencia causado por la hibridación, se llevó a cabo un análisis de ADN mediante transferencia de puntos utilizando el ODN (antiB1) y ODN(anti4.5S). Para la secuencia de ADN diana, se utilizó un fragmento de ADN de cadena corta que contenía la secuencia de ARN B1. Esta secuencia es una de los elementos nucleares intercalados cortos del genoma de roedor. Además, el fragmento de ADN de cadena corta contiene la secuencia de ARN 4,5S. Esta secuencia es una de los ARN nucleares pequeños aislados de una célula de roedor y presente una amplia homología con la familia B1. En el presente ejemplo, el ODN (antiB1) y ODN (anti4.5S) se prepararon como sondas de transferencia y se integraron dos nucleótidos [113]₍₄₎ en los mismos, de manera que se les proporcionaba una elevada sensibilidad y una intensidad de fluorescencia elevada. Las estructuras del ODN (antiB1) y ODN (anti4.5S) fueron las indicadas en la tabla del ejemplo 13.

[0166] Más específicamente, el análisis de transferencia de puntos en el presente ejemplo se llevó a cabo de la siguiente manera. Es decir, se prepararon los siguientes dos fragmentos de ADN (1) y (2) con el sintetizador automático de ADN.

- (1) ADN de doble cadena que contiene la secuencia de ARN 4.5S y el ADN complementario al mismo siguiente:

30 5'-d(GCCGGTAGTGGTGGCGCACGCCGGTAGGATTTGCTGAAGGAGGCAG
AGGCAGGAGGATCACGAGTTCGAGGCCAGCCTGGGGCTACACATTTTTTTT)

35

40 -3' (SEQ ID NO. 11)

- (2) ADN de doble cadena que contiene la secuencia de ARN B1 y el ADN complementario al mismo siguiente:

45

5'-d(GCCGGGCATGGTGGCGCACGCCTTTAATCCCAGCACTTGGGAGGCA
GAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTCGAGGCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAG
50)-3' (SEQ ID NO. 12)

[0167] El ADN de doble cadena se desnaturalizó con una solución acuosa que contenía hidróxido de sodio 0,5 M y cloruro de sodio 1 M. Se esparció en puntos (manchas) una alícuota de este ADN así desnaturalizado sobre una membrana de nylon cargada positivamente (disponible en Roche). Esta lámina de membrana de nylon cargada positivamente se humedeció con una solución acuosa que contenía fosfato de sodio 0,5 M y cloruro de sodio 1 M. A continuación, se incubó a 50°C durante 30 minutos en una solución acuosa que contenía fosfato de sodio 0,5 M, cloruro de sodio 1 M, y ADN de esperma de salmón 100 $\mu\text{g/mL}$. A continuación, la lámina de membrana de nylon cargada positivamente se incubó a 50°C durante una hora en una solución acuosa de la sonda (la sonda era 150 pmol de ODN (anti4.5S) o ODN (antiB1)) que contenía fosfato de sodio 0,5 M y cloruro de sodio 1 M. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, se extrajo la solución de tampón de hibridación, se añadió a la misma una solución nueva de tampón de ácido fosfórico y se observó la fluorescencia emitida por la lámina de membrana de nylon cargada positivamente con un sistema de obtención de imágenes VersaDoc (nombre comercial) disponible en BioRad. La luz de excitación utilizada aquí era luz obtenida mediante la conversión de luz emitida desde un transiluminador UV Modelo-2270 (nombre comercial) disponible en WAKENYAKU CO., LTD. mediante al paso por el mismo de una placa de conversión de luz UV/azul (UVP).

65

[0168] La figura 27 muestra los resultados de la medición.

La figura 27(a) es una vista esquemática que muestra el estado en que los ADN que tienen diferentes secuencias entre sí se transfirieron sobre la membrana de nylon. Las cuatro manchas en la fila superior indican el ADN que contenía la secuencia de ARN 4.55 y las cuatro manchas en la fila inferior indican el ADN que contenía el ARN B1.

La figura 27(b) es una diagrama que muestra la emisión de fluorescencia obtenida después de la incubación llevada a cabo en la solución que contiene ODN (anti4.5S).

La figura 27(c) es una diagrama que muestra la emisión de fluorescencia obtenida después de la incubación llevada a cabo en la solución que contiene ODN (antiB1).

[0169] Tal como se observa en la figura 27, era posible leer la fluorescencia de las manchas transferidas a temperatura ambiente con un sistema de obtención de imágenes de fluorescencia sin llevar a cabo un lavado repetitivo después del ensayo de transferencia. Como resultado de la incubación con las sondas, cuando se había añadido el ODN (anti4.5S), se obtuvo una emisión de fluorescencia intensa derivada de las manchas de la secuencia 4.5S, pero la emisión de fluorescencia derivada de las manchas de la secuencia B1 era negligible. En cambio, cuando se había añadido el ODN (antiB1), las manchas de B1 mostraban una fluorescencia intensa, pero sólo se observaba una fluorescencia débil a partir de las manchas de 4.5S. De este modo, la sonda de la presente invención puede realizar un ensayo que es claramente diferente de un ensayo de transferencia convencional al no requerir ni un proceso de lavado multietapas incómodo ni un proceso de tratamiento con anticuerpos o enzimas después de la transferencia. Además, a diferencia de la sonda on-off, tal como una baliza molecular, la sonda de la presente invención permite que se introduzcan fácilmente en la misma una pluralidad de partes marcadas con fluorocromos y así permite que se incremente adicionalmente la intensidad de la fluorescencia. Esta es una gran ventaja de la presente invención. Las partes marcadas con fluorocromos pueden ser cada una, por ejemplo, una contenida en el nucleótido [113]₍₄₎ como en el presente ejemplo.

[Ejemplo 20]

[0170] La sonda poli T (el ODN2 descrito anteriormente) que contenía un colorante con una longitud de enlazador n de 4 utilizado en el ejemplo 8 se introdujo en una célula mediante técnicas de microinyección utilizando un microtubo de vidrio y a continuación se midió la emisión de fluorescencia con un microscopio invertido equipado con una lámpara de mercurio, una cámara CCD enfriada y un grupo de filtros de fluorescencia (para YFP). Las figuras 28 a 30 muestran los resultados. La figura 28 es una fotografía tomada en interferometría diferencial. La figura 29 es una fotografía tomada durante la observación de la fluorescencia y la figura 30 muestra las figuras 28 y 29 en el estado de superposición entre sí. Tal como se muestra en las figuras, la sonda de fluorescencia (sustancia marcadora) de la presente invención se unió a una secuencia terminal poli(A) de ARNm que se expresó intracelularmente y, de este modo, emitió luz. Es decir, el oligómero de ADN marcado de la presente invención es efectivo no sólo para la detección de genes in vitro, sino también para la detección de genes in vivo.

[Ejemplo 21]

[0171] Además, se unió un colorante fluorescente común, Cy5, al ODN2 (con una secuencia de 5'-d(TTTTTT[113]₍₄₎TTTTTT)-3') mediante un método convencional, que se introdujo posteriormente en una célula mediante el método mencionado anteriormente. En este caso, se añadió Cy5 al extremo 5' del ODN2 con un sintetizador de ADN automático para unirse al mismo en el proceso de síntesis del ODN2 (con una secuencia de 5'-Cy5-d(TTTTTT[113]₍₄₎TTTTTT)-3'). La emisión de fluorescencia se midió con un microscopio confocal de barrido láser. La figura 31 muestra el resultado. La figura 31A muestra la fluorescencia derivada de Cy5, obteniéndose la fluorescencia con una longitud de onda de por lo menos 650 nm mediante la excitación a 633 nm. La figura 31B muestra la fluorescencia derivada de dos partes de naranja de tiazol, obteniéndose la fluorescencia entre 505 nm y 550 nm mediante al excitación a 488 nm. Tal como se muestra en las figuras, el ODN2 se unió a la secuencia terminal poli(A) de ARNm que se expresó intracelularmente y, de este modo, emitió luz. Esto permitió hacer el seguimiento de la distribución de los ARNm intracelulares. Tal como se ha descrito anteriormente, se pueden introducir una pluralidad de tipos de colorantes (grupos atómicos que muestran fluorescencia) en el compuesto o ácido nucleico de la presente invención. Esto también permite que se lleve a cabo una detección multicolor, ya que, por ejemplo, los respectivos colorantes son diferentes entre sí en la λ_{max} de fluorescencia.

[Ejemplo 22]

[0172] El ODN2 mencionado anteriormente (con una secuencia de 5'-d(TTTTTT[113]₍₄₎TTTTTT)-3') se inyectó en un núcleo celular mediante el método mencionado anteriormente, y se hizo el seguimiento de la emisión de fluorescencia con un microscopio confocal de barrido láser desde inmediatamente después de la inyección (segundo 0) hasta aproximadamente 4,5 minutos (excitación a 488 nm, y la fluorescencia obtenida entre 505 nm y 550 nm). La figura 32 muestra el resultado. La figura 32 incluye 11 diagramas que muestran el progreso después de la inyección del ODN2, de izquierda a derecha y de la fila de arriba a la fila de abajo. En cada

diagrama, el tiempo transcurrido (después de la inyección del ODN2) se indica en la taba 8 siguiente. Tal como se muestra en la figura 32, se confirmó que la sonda ODN2 se concentraba en el núcleo celular inmediatamente después de la inyección de la misma, pero se dispersaba gradualmente a través de la célula junto con el ARNm (poliA) hibridado con la misma. Según la presente invención, también es posible hacer el seguimiento del ARNm de la manera descrita anteriormente.

Tabla 8

0 s	8 s	38 s	68 s
98 s	128 s	158 s	188 s
218 s	248 s	278 s	-

[Ejemplo 23]

[0173] Se sintetizó un ODN en que se incrementaba el número de T localizadas en cada parte de [113](4) del ODN2 hasta 24. A éste se hace referencia como "ODN7". Se sintetizó mediante el mismo método que el de la síntesis de ODN2. La secuencia del ODN7 es:

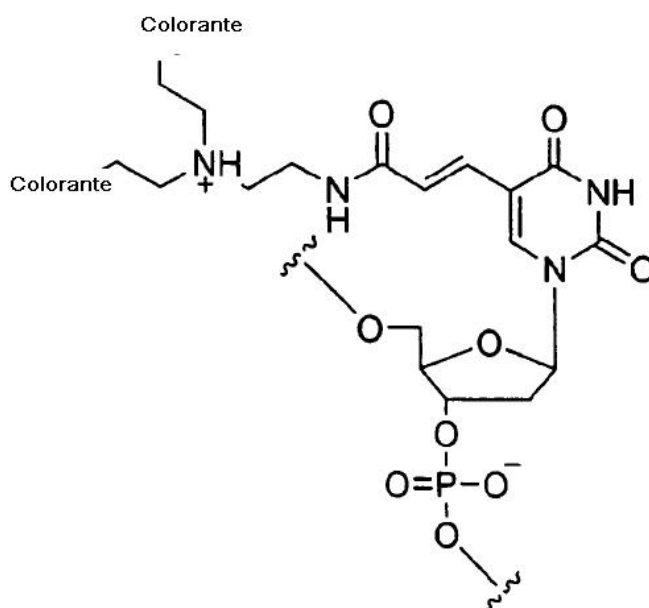
5'-d(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[113]₍₄₎TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TT)-3' (SEQ ID NO. 13).

Se inyectó en un núcleo celular mediante el mismo método empleado en el ejemplo 22 y se midió la intensidad de fluorescencia. La figura 33 muestra una fotografía de fluorescencia tomada después del transcurso de un cierto periodo de tiempo. El ODN7 se concentró en el núcleo celular inmediatamente después de la inyección, pero se dispersó gradualmente a través de la célula junto con el ARNm (poliA) hibridado con la misma, como en el ejemplo 22, y finalmente, se dispersó alrededor del núcleo celular tal como se muestra en la figura 33.

[Ejemplo 24: Detección multicolor]

[0174] Tal como se describe, por ejemplo, en los ejemplos 11 y 16, las sondas fluorescentes de la presente invención permiten la detección multicolor de cadenas complementarias al tener, por ejemplo, diferentes longitudes de onda de absorción y diferentes longitudes de onda de emisión entre sí. Esta detección multicolor se puede conseguir utilizando partes de colorante (grupo atómico que muestra fluorescencia) que tienen diferentes estructuras como en el caso de los compuestos 113, 117, y 120. En el presente ejemplo, se sintetizaron (produjeron) varias sondas fluorescentes adicionales y se llevó a cabo la detección multicolor de cadenas complementarias.

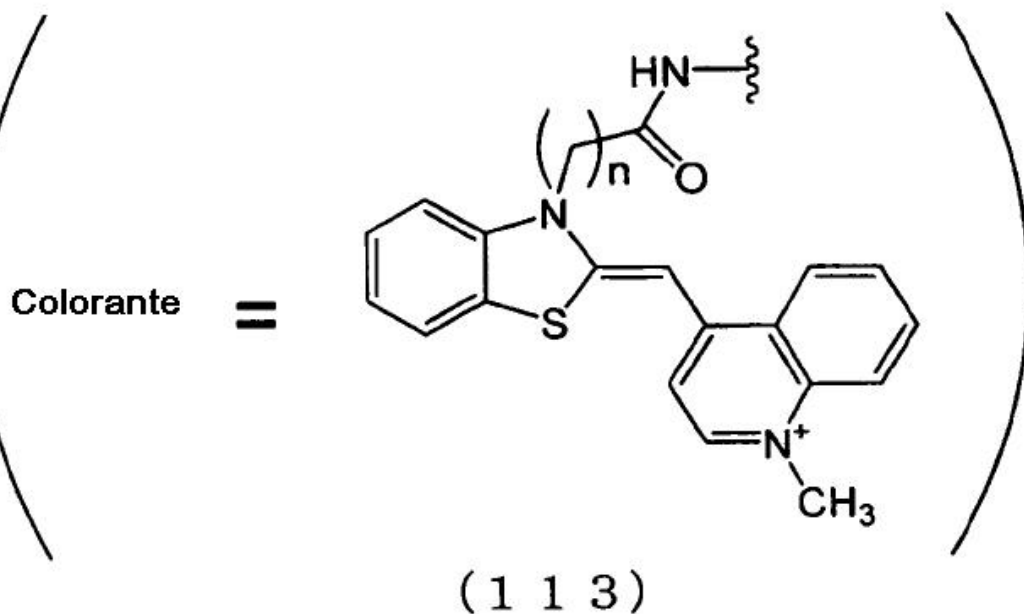
[0175] En primer lugar, se sintetizaron cadenas de ADN (sondas), cada una de las cuales contenía una estructura de nucleótido representada por la siguiente fórmula (121), variando las estructuras de partes de colorante (grupo atómico que muestra fluorescencia). En la siguiente fórmula (212), "colorante" indica la parte de colorante.

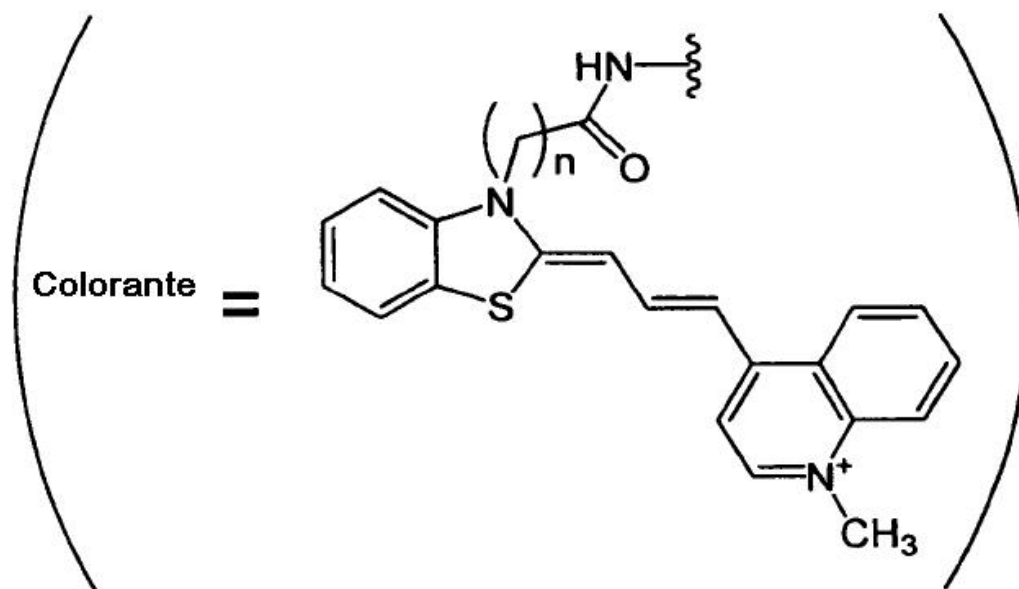


(1 2 1)

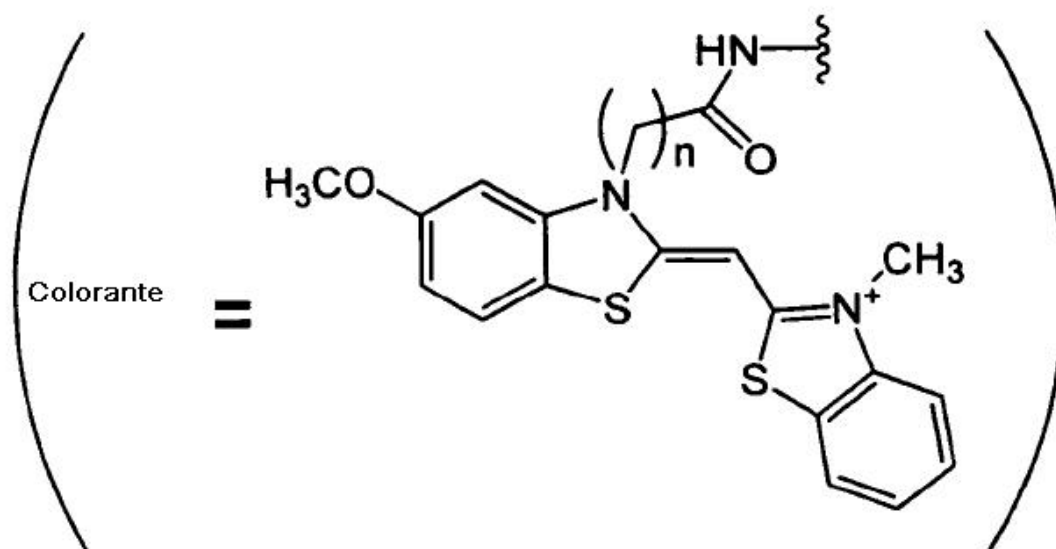
5

[0176] Específicamente, se sintetizaron los compuestos (cadenas de ADN) 113, 120, 122, 123, y 124, los cuales contienen partes representadas por las siguientes fórmulas, como la parte "colorante" contenida en la fórmula (121). En las siguientes fórmulas, n es la longitud del enlazador (el número de átomos de carbono). Con respecto a los compuestos 113, 120, 122, 123, y 124, se sintetizaron compuestos cuyas longitudes de enlazador n fueron 3, 4, 5, y 6, respectivamente. La síntesis se llevó a cabo mediante el mismo método que el utilizado en los ejemplos 1 a 4, 6, 8, 9, 12, 13, y 16, a excepción de la utilización de colorantes con las correspondientes estructuras, respectivamente, en lugar del colorante 107. La síntesis de los colorantes que sustituyen el colorante 107 también se llevó a cabo de la misma manera que en la síntesis del colorante 107 (Esquema 5 en el ejemplo 6), a excepción de que las estructuras de los materiales de partida cambiaron de manera adecuada. Además, los compuestos 113 y 120 presentan las mismas estructuras que las de los compuestos 113 y 120 de los respectivos ejemplos descritos anteriormente, respectivamente.

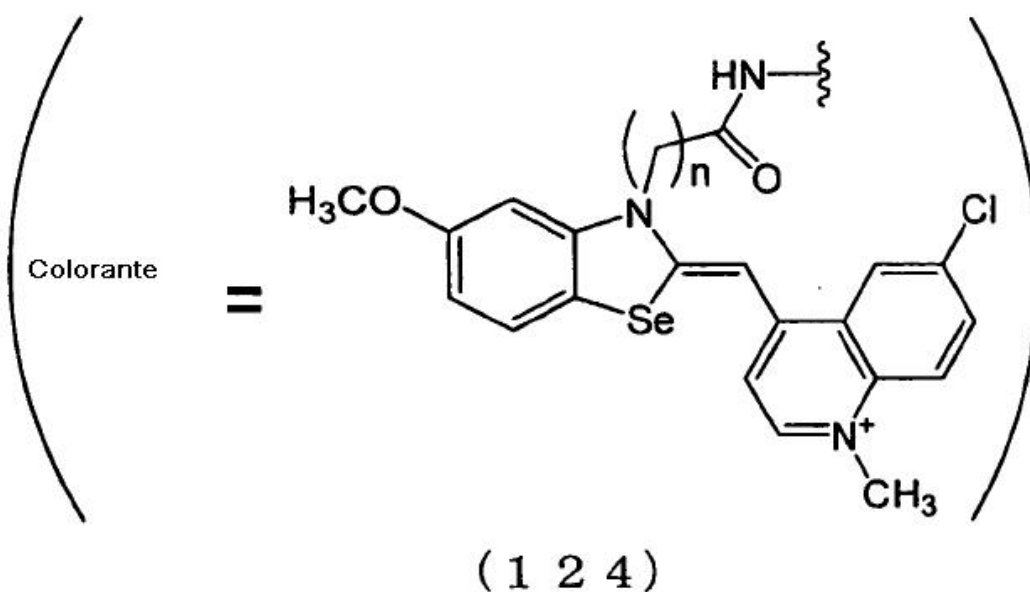
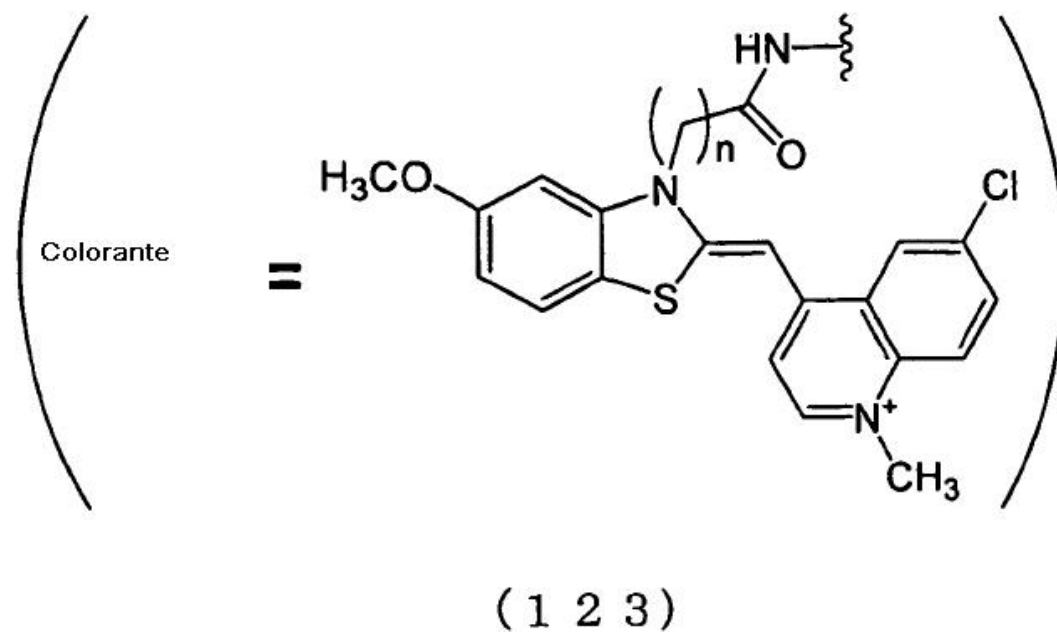




(1 2 0)



(1 2 2)



[0177] Con respecto a los compuestos 113, 120, 122, 123, y 124, se sintetizaron los ODN, cada uno de los cuales estaba representado por una secuencia de 5'-d(CGCAATX_(n)TAACGC)-3', donde X es 113, 120, 122, 123, ó 124, y n es la longitud del enlazador. Un ODN representado por una secuencia de 5'-d(CGCAAT[113]_(n)TAACGC)-3' es idéntico al ODN1 mencionado anteriormente. Un ODN representado por una secuencia de 5'-d(CGCAAT[120]_(n)TAACGC)- es idéntico al ODN6 mencionado anteriormente. Un ODN

representado por una secuencia de 5'-d(CGCAAT[122]_(n)TAACGC)-3' se refiere como un "ODN8". Un ODN representado por una secuencia de 5'-d(CGCAAT[123]_(n)TAACGC)-3' se refiere como un "ODN9". Un ODN representado por una secuencia de 5'-d(CGCAAT[124]_(n)TAACGC)-3' se refiere como un "ODN10". Con respecto a cada uno de los ODN1, ODN6, ODN8, ODN9, y ODN10, se sintetizaron los ODN con longitudes de enlazador n de 3, 4, 5, y 6, respectivamente

[0178] Con respecto a cada uno de los ODN1 (n=4), ODN6 (n=4), ODN8 (n=4), ODN9 (n=4), y ODN10 (n=4), después de dejar que cada uno de ellos formara un doble enlace junto con una cadena complementaria, ODN1', se midió el espectro de emisión de fluorescencia. Las condiciones de medición fueron las mismas que las empleadas en cada ejemplo descrito anteriormente a excepción de la longitud de onda de excitación. El resultado se indica en la tabla 9 siguiente. En la tabla 9, E_x indica longitud de onda de excitación y E_m indica la longitud de onda máxima de la emisión de fluorescencia. La longitud de onda de excitación E_x se fijó para que fuera casi igual a la longitud de onda máxima λ_{max} de absorción.

Tabla 9

Estructura de la doble cadena	E _x	E _m
5'-d(CGCAAT[113] ₍₄₎ TAACGC)-3' (ODN1 (n = 4) / ODN1')	514 nm	528 nm
5'-d(CGCAAT[120] ₍₄₎ TAACGC)-3' (ODN6 (n = 4) / ODN1')	650 nm	654 nm
5'-d(CGCAAT[122] ₍₄₎ TAACGC)-3' (ODN8 (n = 4) / ODN1')	436 nm	456 nm
5'-d(CGCAAT[123] ₍₄₎ TAACGC)-3' (ODN9 (n = 4) / ODN1')	534 nm	563 nm
5'-d(CGCAAT[124] ₍₄₎ TAACGC)-3' (ODN10(n=4) / ODN1')	541 nm	563 nm

[0179] Tal como se puede observar de la tabla 9, cuando los respectivos ODN formaron cada uno una doble cadena, mostraron diferentes longitudes de onda máximas E_m de emisión de fluorescencia entre sí en un intervalo amplio de longitudes de onda desde 456 nm a 654 nm. Es decir, fue posible llevar a cabo una detección multicolor de ADN de cadena complementarias utilizando los ODN sintetizados en este ejemplo (ejemplo 24). Además, con respecto a los compuestos (cadenas de ADN) 113, 120, 122, 123, y 124, así como ODN1, ODN6, ODN8, ODN9, y ODN10 de este ejemplo de referencia, se confirmó su uso de la misma manera que en los ejemplos respectivos descritos anteriormente, por ejemplo, la detección de ARN de cadena complementaria, análisis por transferencia de puntos y la detección de ARNm intracelular mediante multicolor.

Aplicabilidad industrial

[0180] Tal como se ha descrito anteriormente, la presente invención puede proporcionar una sustancia marcadora que permite, por ejemplo, que la estructura de doble hélice de un ácido nucleico sea detectada de manera eficaz. La presente invención también puede proporcionar un método de detección de ácido nucleico y un kit, que utilizan la sustancia marcadora descrita anteriormente. El compuesto o ácido nucleico de la presente invención presenta una estructura característica mostrada en las fórmulas (1), (1b), (1c), (16), (16b), (17) y (17b), se manera que se pueden utilizar como, por ejemplo, una sustancia marcadora que permite que la estructura de doble hélice de un ácido nucleico se detecte de manera eficaz. Dado que la sustancia marcadora de la presente invención es excelente en la sensibilidad de la detección de un ácido nucleico, se puede utilizar para una gama amplia de aplicaciones, por ejemplo, el estudio, uso clínico, diagnóstico, detección génica in vitro y detección génica in vivo. Además, la utilización del compuesto y ácido nucleico de la presente invención no se limita a los mismos y se pueden utilizar para cualquier aplicación.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0181]

<110> RIKEN

<120> Compuesto mononucleósido o derivado de mononucleótido, ácido nucleico, sustancia marcadora, método de detección de ácido nucleico y kit

<130> TF07054-01

<150> JP 07/059921

<151> 2007-03-09

<150> JP 07/246253

<151> 2007-09-21

<150> JP 07/335352

<151> 2007-12-26

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Oligómero de ADN
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (7)
 <223> n representa pirimidina modificada
 10 <400> 1
 cgcaatntaa cgc 13
 <210> 2
 <211> 13
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligómero de ADN
 <400> 2
 gcgttaaatt gcg 13
 20 <210> 3
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Oligómero de ADN
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (8)
 <223> n representa pirimidina modificada
 30 <400> 3
 tttttnttt ttt 13
 <210> 4
 <211> 13
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligómero de ADN
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (7) .. (7)
 <223> n representa pirimidina modificada
 <400> 4
 tttttnttt ttt 13
 <210> 5
 45 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligómero de ADN
 50 <400> 5
 aaaaaaaaaaaa aaa 13
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligómero de ADN
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (11) .. (11)
 <223> n representa pirimidina modificada
 <400> 6
 tgaaggcgtt ntgaactctg 20
 <210> 7
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Oligómero de ADN
 <400> 7
 5 cagagttcaa aagcccttca 20
 <210> 8
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Oligómero de ADN
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (8)
 15 <223> n representa pirimidina modificada
 <400> 8
 cgcaatnnaa cgc 13
 <210> 9
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligómero de ADN
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (8) .. (8)
 <223> n representa pirimidina modificada
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (19) .. (19)
 <223> n representa pirimidina modificada
 <400> 9
 gcctcctnca gcaaatccna ccggcgtg 28
 <210> 10
 35 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligómero de ADN
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n representa pirimidina modificada
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (19) .. (19)
 <223> n representa pirimidina modificada
 <400> 10
 cctccaagn gctgggatna aaggcgtg 28
 50 <210> 11
 <211> 95
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Fragmento de ADN
 <400> 11

gcgggtagtg gtggcgacg ccggtaggat ttgctgaagg aggcagagge aggaggatca 60
 60 **cgagttcgag gccagcctgg gctacacatt ttttt 95**

 <210> 12
 <211> 95
 <212> ADN
 65 <213> Artificial
 <220>

ES 2 385 268 T3

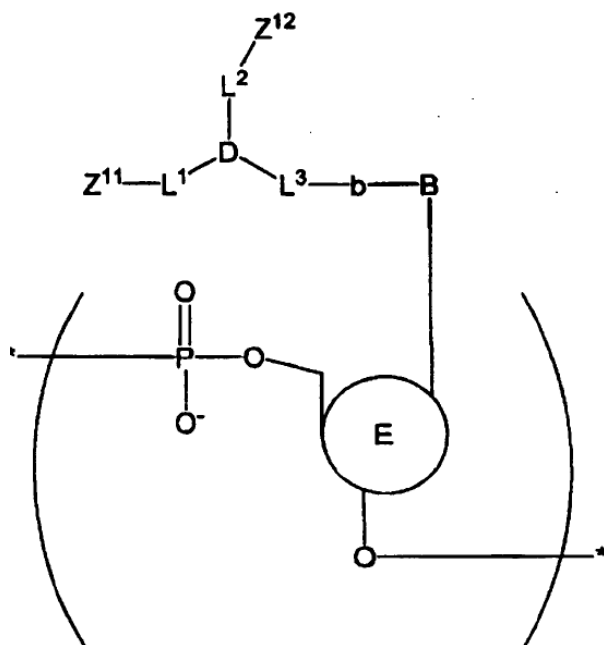
<223> Fragmento de ADN
<400> 12

5 **gccgggcatg gtggcgcacg cctttaatcc cagcacttgg gaggcagagg caggcggatt 60**
tctgagttcg aggccagcct ggtctacaga gtgag 95

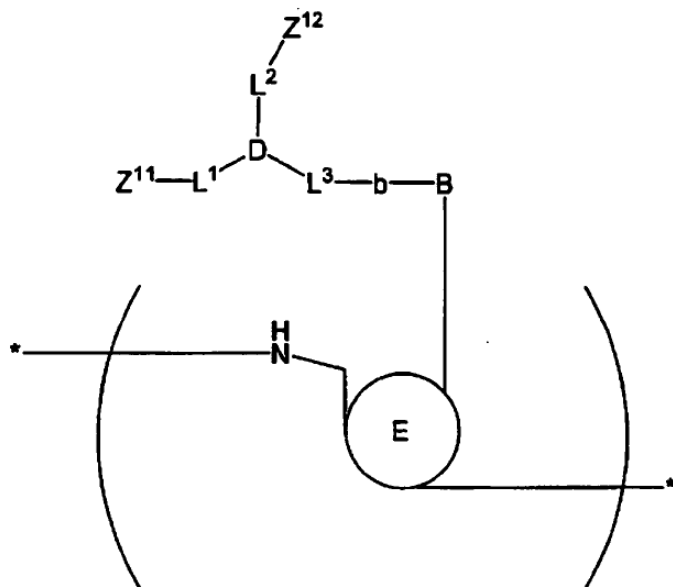
10 <210> 13
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligómero de ADN
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25) .. (25)
 <223> n representa pirimidina modificada
 20 <400> 13
 tttttttt tttttttt tttntttt tttttttt tttttttt 49

REIVINDICACIONES

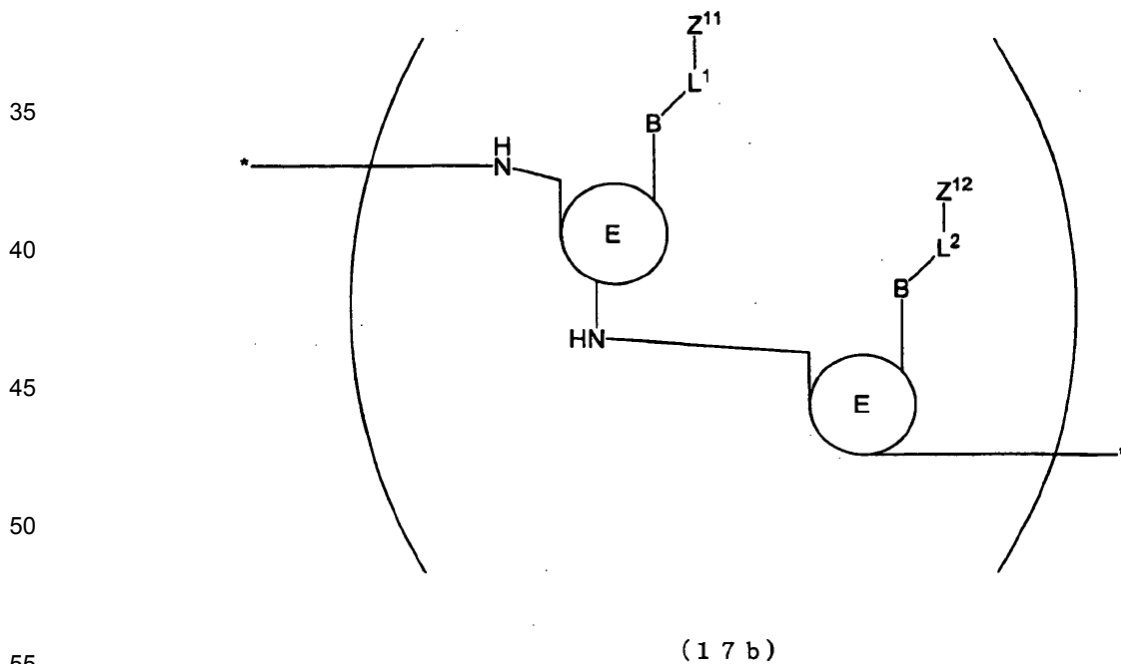
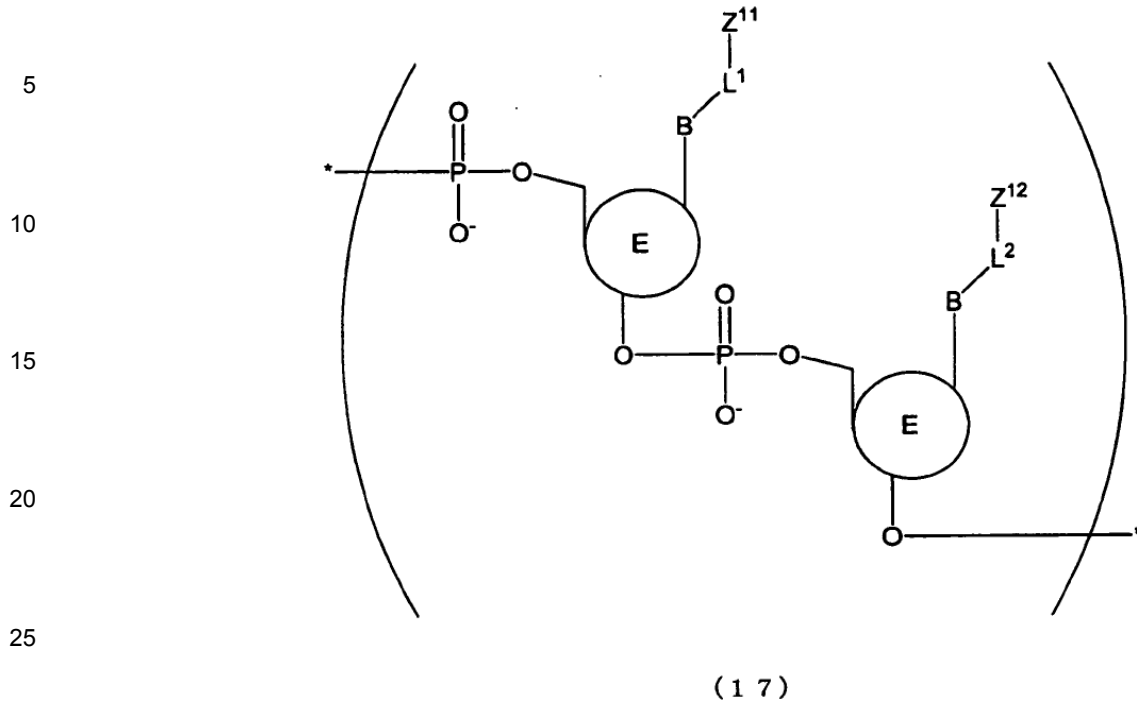
1. Ácido nucleico que comprende por lo menos una de las estructuras representadas por las siguientes fórmulas (16), (16b), (17) o (17b); un tautómero o estereoisómero del ácido nucleico; o una sal del ácido nucleico, el tautómero o el estereoisómero:



(1 6)



(1 6 b)



en el que en las fórmulas (16), (16b), (17) y (17b),

B es un grupo atómico que tiene un esqueleto de nucleobases naturales (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) o un esqueleto de nucleobases artificiales,

Z^{11} y Z^{12} son cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo protector o un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra un efecto de excitón, y pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

L^1 , L^2 , y L^3 son cada uno un enlazador (un átomo o un grupo atómico de enlace), la longitud de la cadena principal (el número de átomos de la cadena principal) es arbitraria, cada uno puede contener o no uno entre C, N, O, S, P, y Si en la cadena principal, cada uno puede contener o no uno entre un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, un grupo imino, un enlace éter, un enlace tioéter, un enlace tioéster en la cadena principal, y L^1 , L^2 , y L^3 pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

D es CR, N, P, P=O, B, o SiR, y R es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un sustituyente arbitrario, b es un enlace simple, un doble enlace o un triple enlace, o en la fórmula (16) y (16b), L^1 y L^2 son cada uno un enlazador, L^3 , D, y b pueden no estar presentes, y L^1 y L^2 pueden estar unidos directamente a B,

5 en el que en la fórmula (16) y (17),

E es un grupo atómico que tiene un esqueleto de desoxirribosa, un esqueleto de ribosas, o una estructura derivada de cualquiera de ellos y por lo menos un átomo de O en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido por un átomo de S,

10 E es un grupo atómico que tiene una estructura peptídica o una estructura peptoide, y en las fórmulas (17) y (17b),

las respectivas B pueden ser idénticas o diferentes entre sí, y los respectivos E pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

15 2. Ácido nucleico según la reivindicación 1,

en el que en las fórmulas (16) y (17), E es un grupo atómico que tiene una estructura de cadena principal de ADN, ADN modificado, ARN, ARN modificado o LNA;

un tautómero o estereoisómero del compuesto; o

una sal del compuesto, el tautómero o el estereoisómero,

20 en el que en las fórmulas (16b) y (17b), E es un grupo atómico que tiene una estructura de cadena principal de PNA (ácido nucleico de péptido);

un tautómero o estereoisómero del compuesto; o

una sal del compuesto, el tautómero o el estereoisómero.

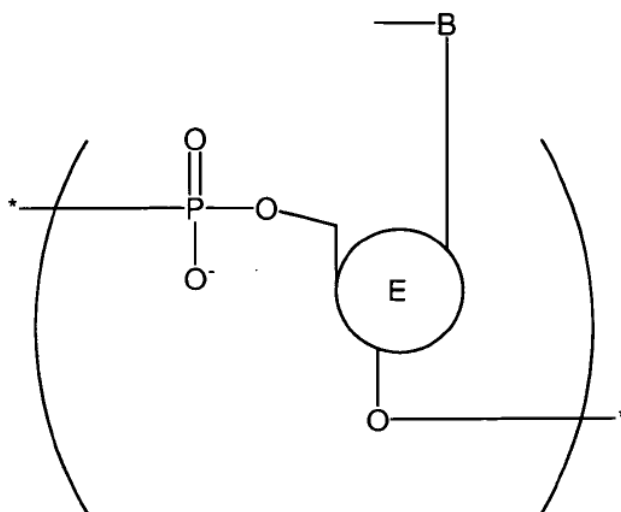
25 3. Ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que en las fórmulas (16), el grupo atómico representado por:

30

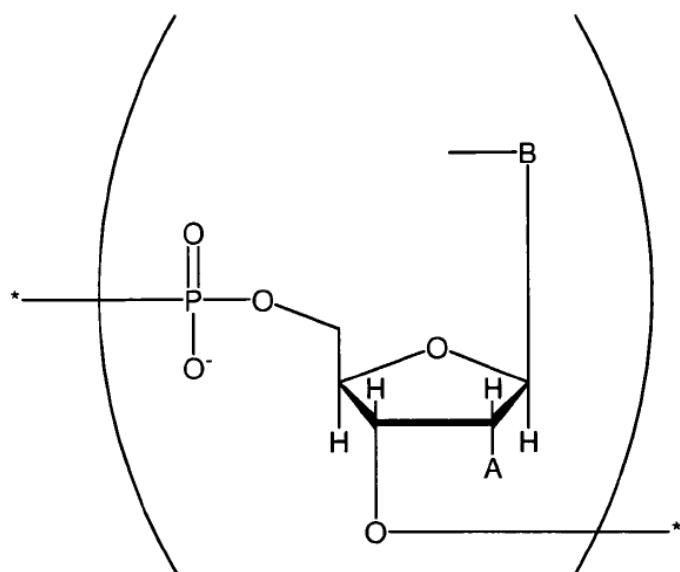
35

40

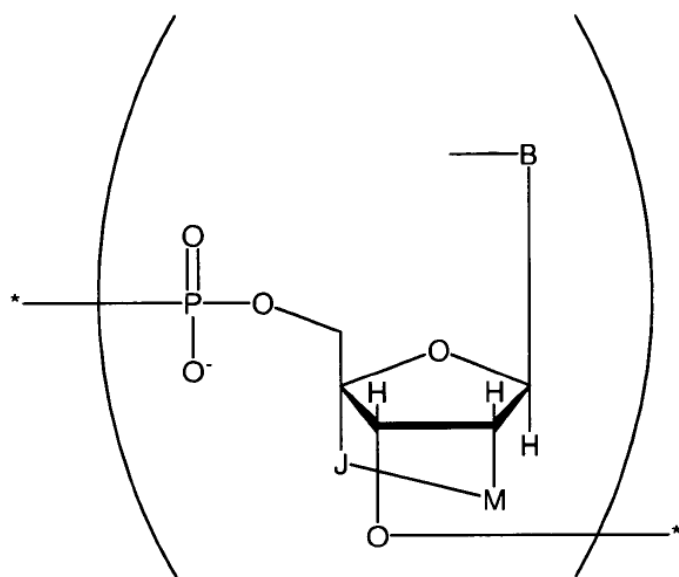
45



50 es un grupo atómico representado por las siguientes fórmulas (2-1) o (3-1),



(2 - 1)



(3 - 1)

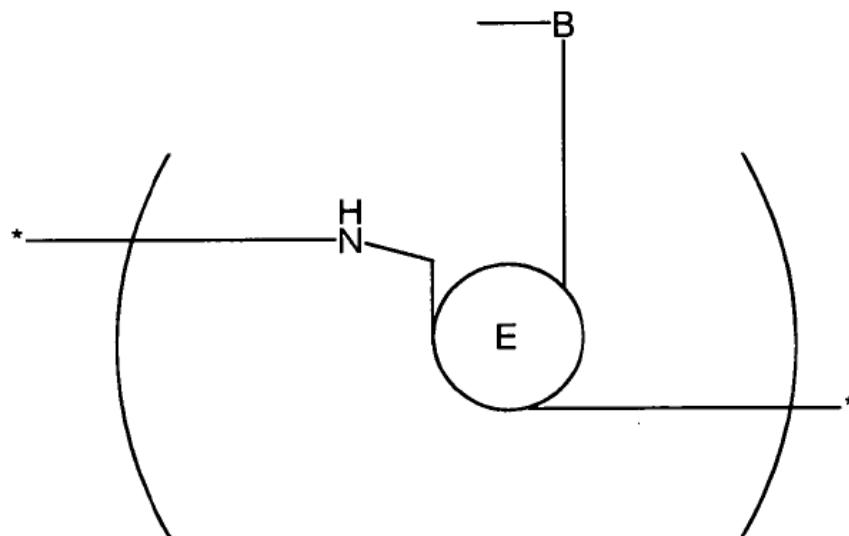
en la fórmula (16b), un grupo atómico representado por:

5

10

15

20



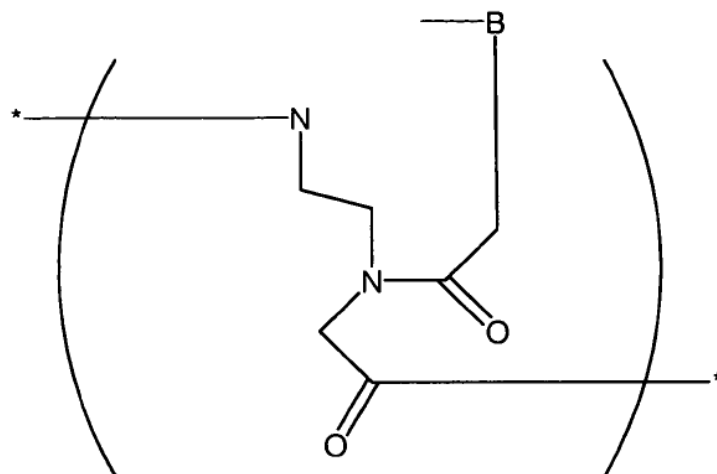
es un grupo atómico representado por la siguiente fórmula (4-1),

25

30

35

40

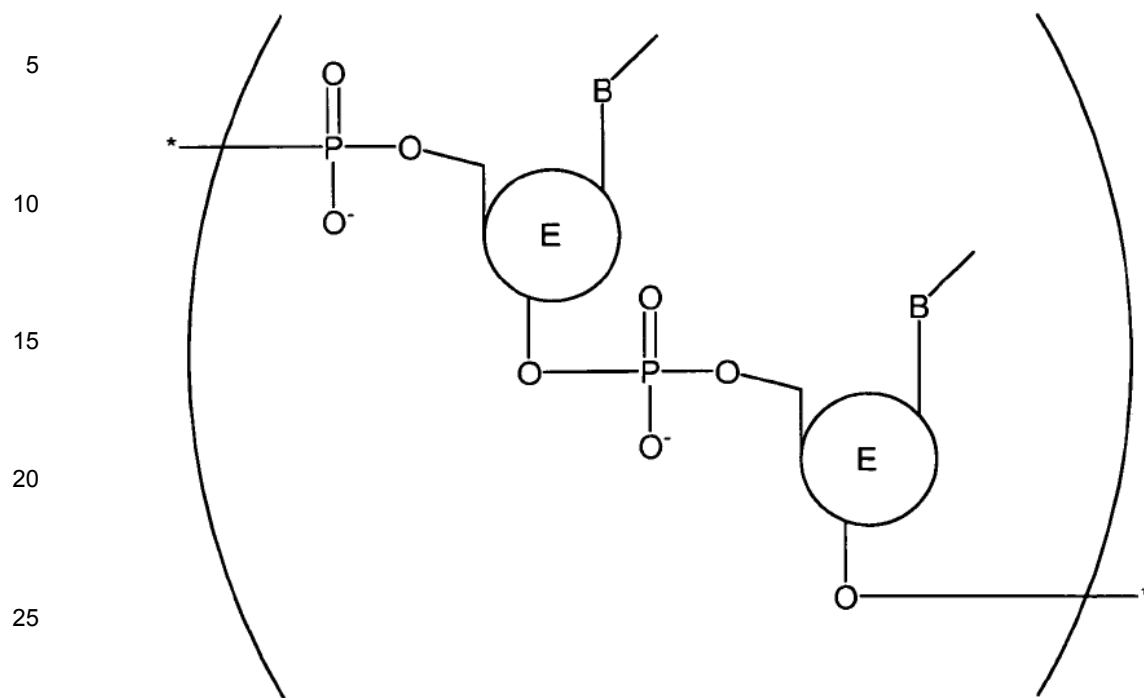


45

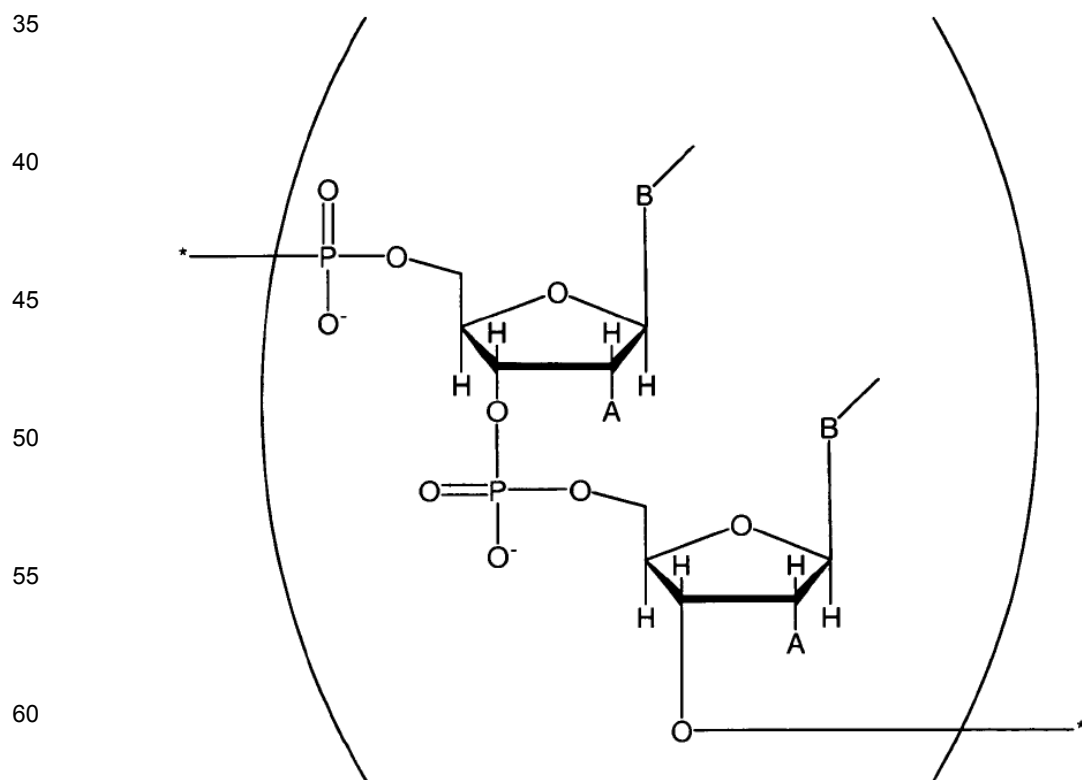
(4 - 1)

50

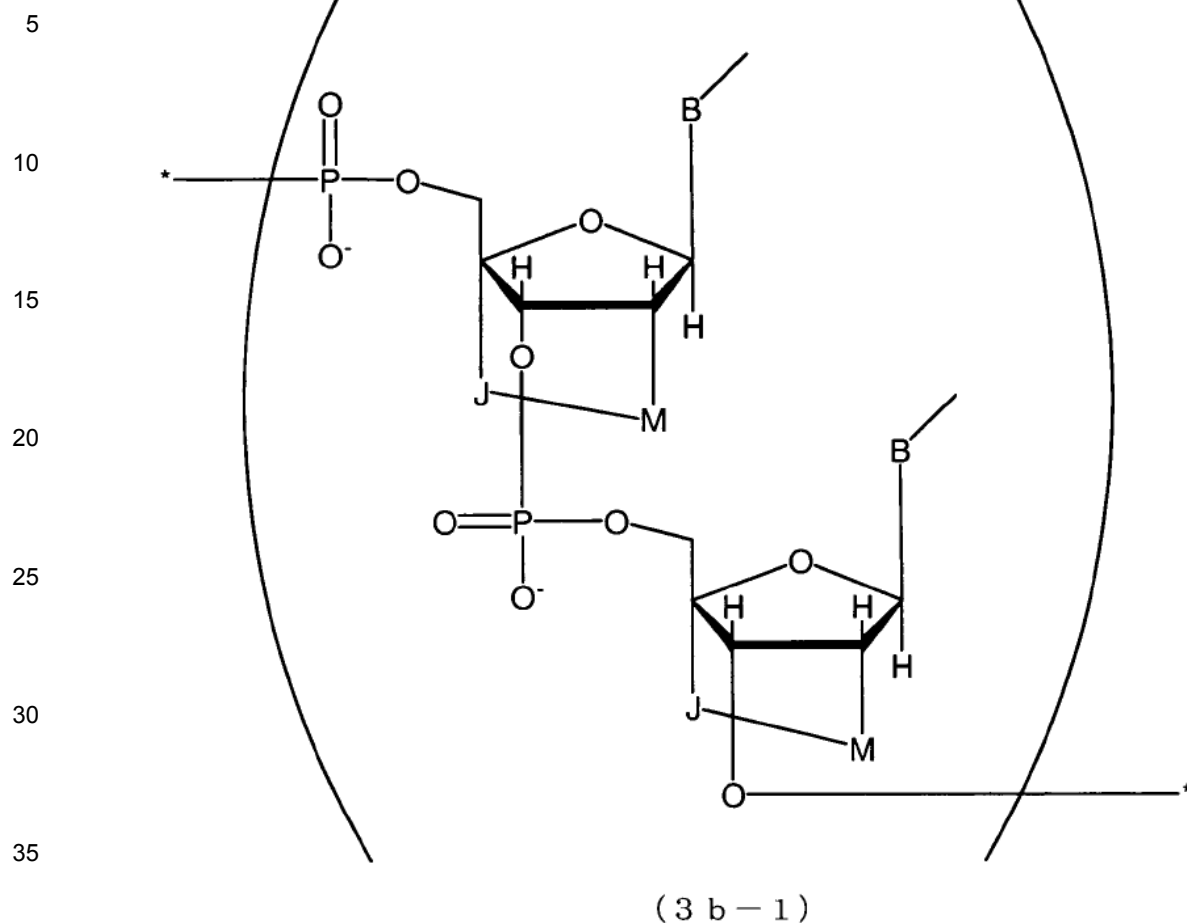
en la fórmula (17), un grupo atómico representado por:



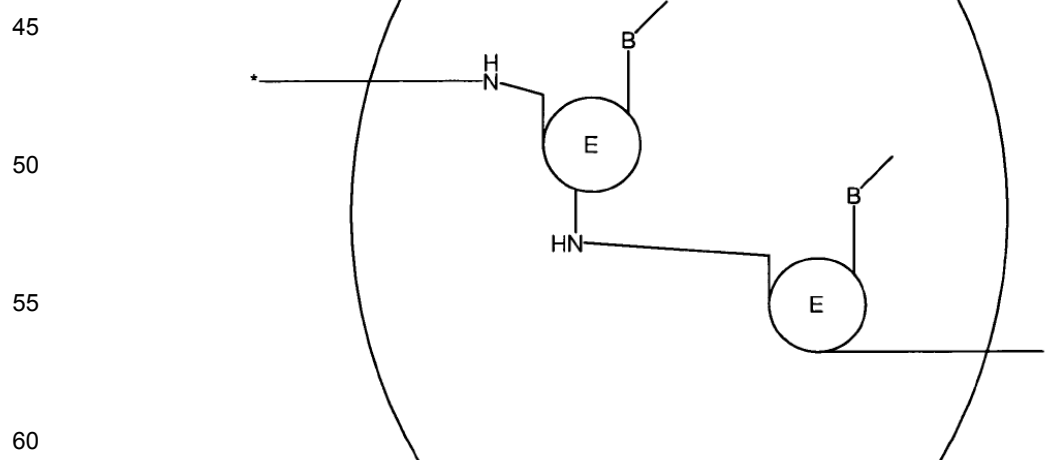
30 es un grupo atómico representado por las siguientes fórmulas (2b-1) o (3b-1),



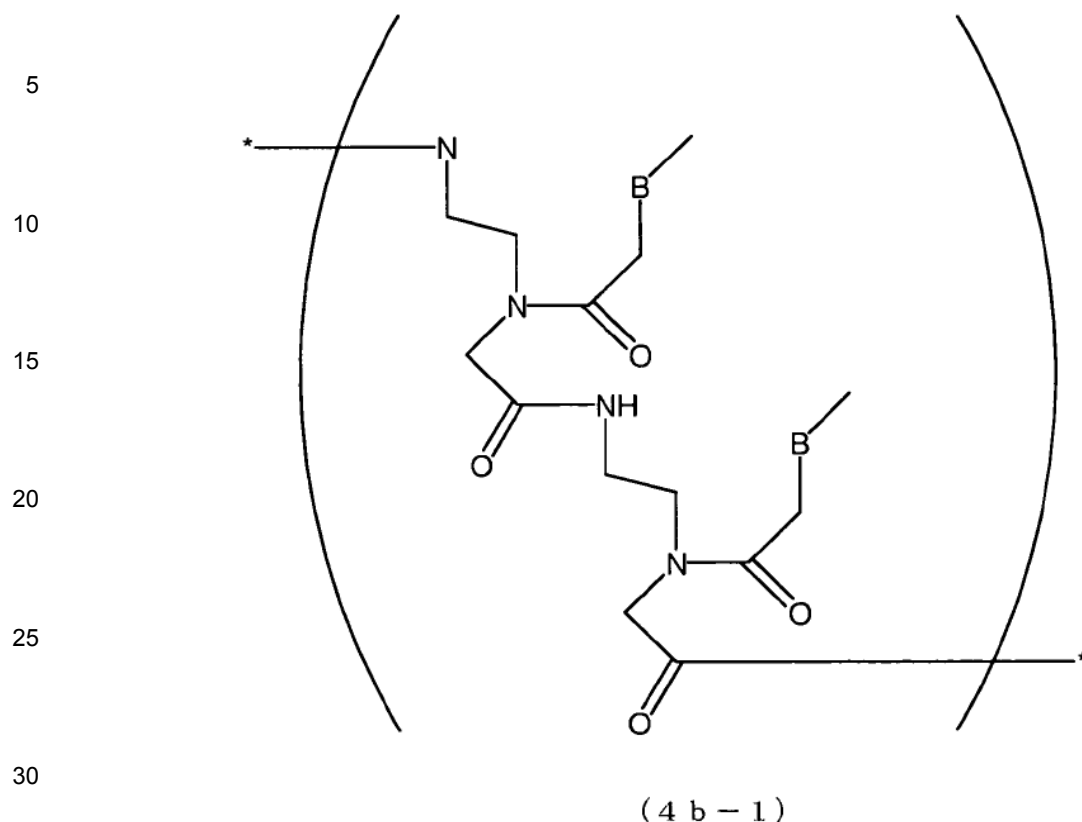
(2 b - 1)



en la fórmula (17b), un grupo atómico representado por:

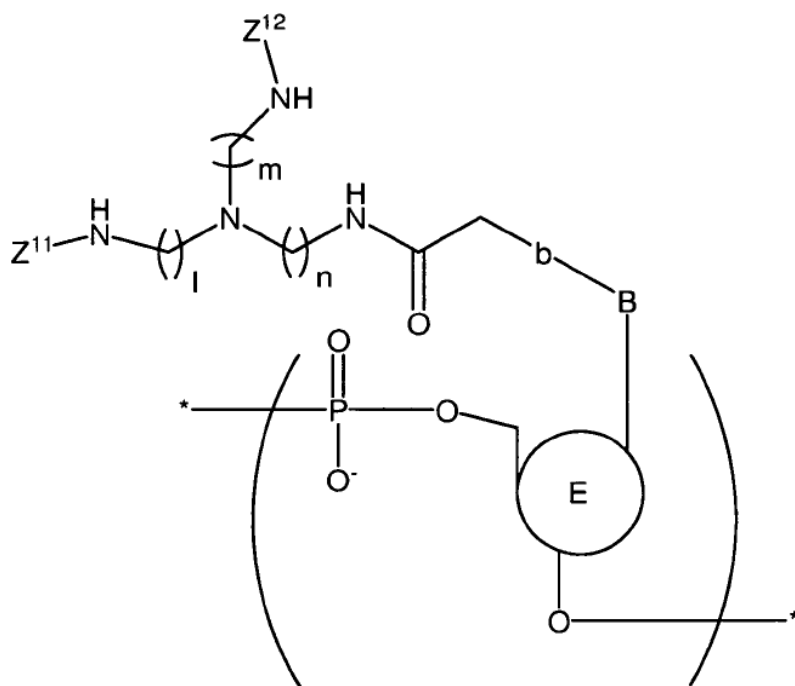


es un grupo atómico representado por la siguiente fórmula (4b-1),

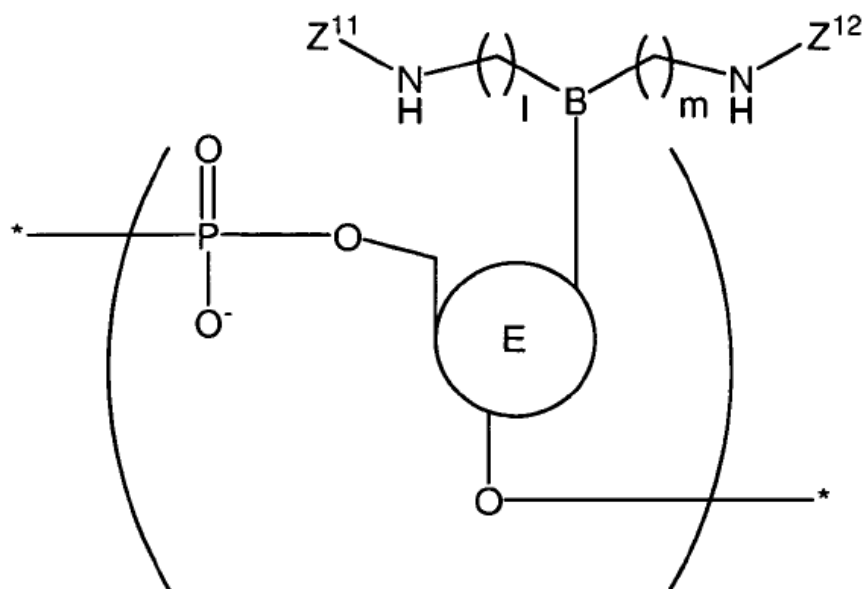


35 en las fórmulas (2-1), (3-1), (4-1), (2b-1), (3b-1), y (4b-1),
B son idénticas a las de, respectivamente, en la fórmula (16), (16b), (17) y (17b),
en las fórmulas (2-1) y (2b-1),
A es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo, o un grupo atractor de electrones,
en las fórmulas (3-1) y (3b-1),
40 M y J son cada uno CH₂, NH, O, o S y pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y
en las fórmulas (2-1), (3-1), (2b-1), y (3b-1),
por lo menos un átomo de O contenido en un enlace de ácido fosfórico puede estar sustituido por un átomo de S;
un tautómero o estereoisómero del compuesto; o
una sal del compuesto, el tautómero o el estereoisómero.

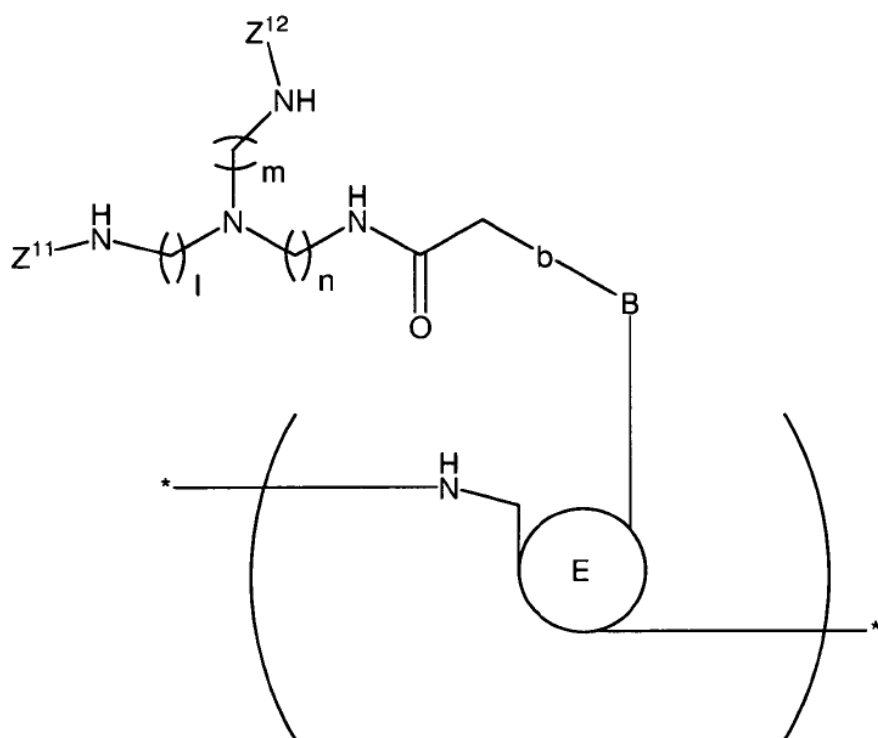
45 4. Ácido nucleico según la reivindicación 1 a 3, representado por las siguientes fórmulas (16-1), (16-2), (16b-1),
(16b-2), (17-1) o (17b-1); un tautómero o estereoisómero del compuesto; o una sal del compuesto, el tautómero o
el estereoisómero:



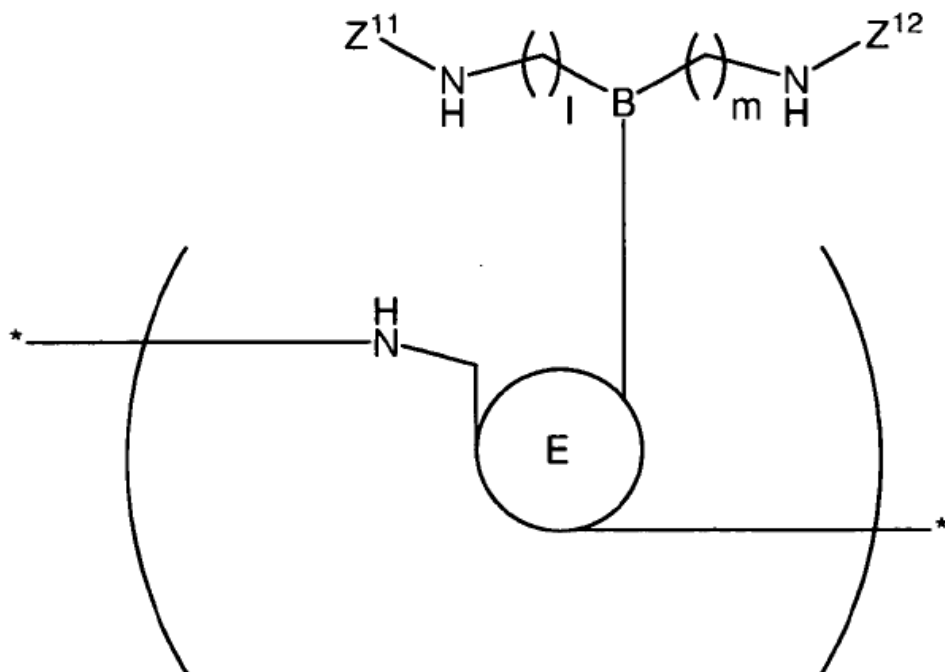
(16-1)



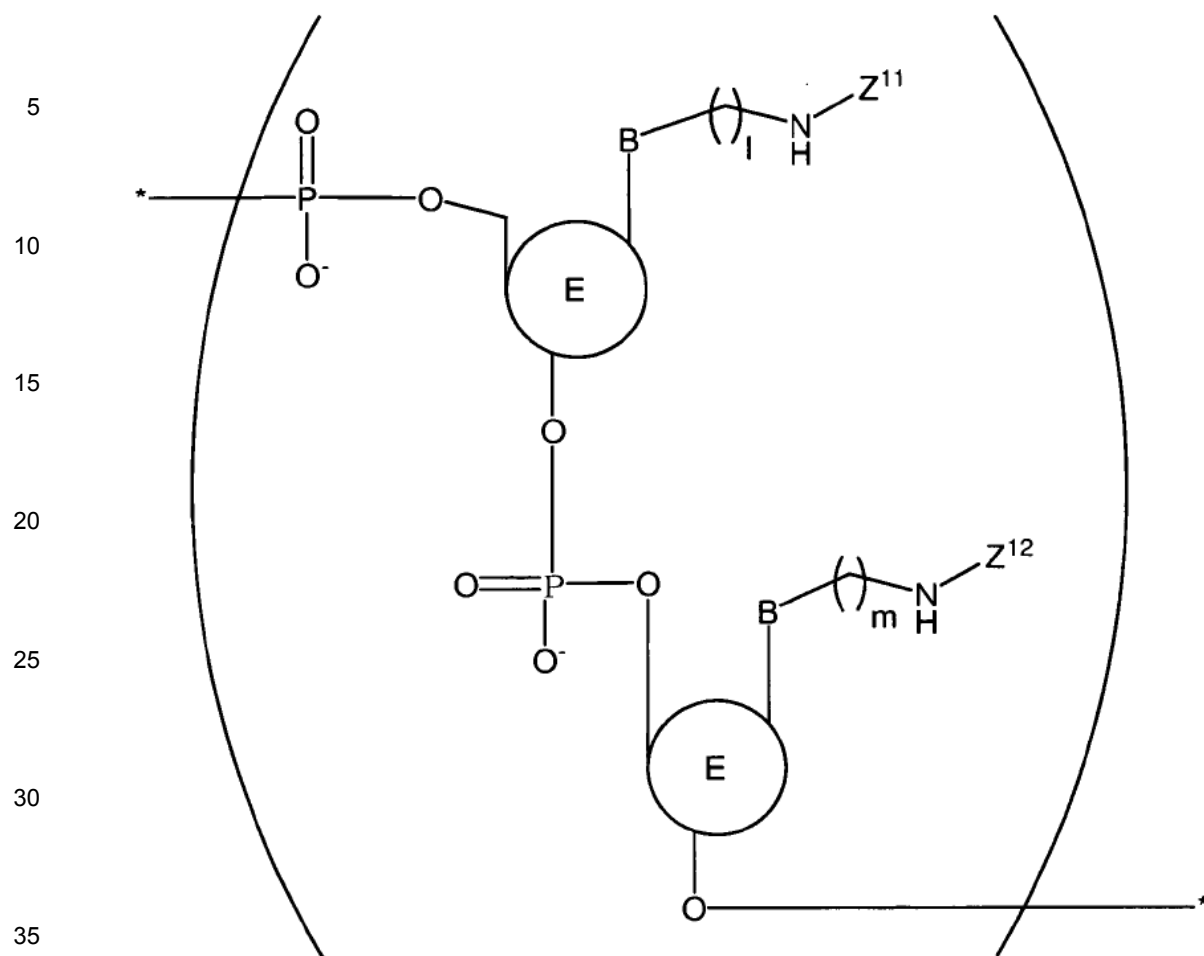
(16-2)



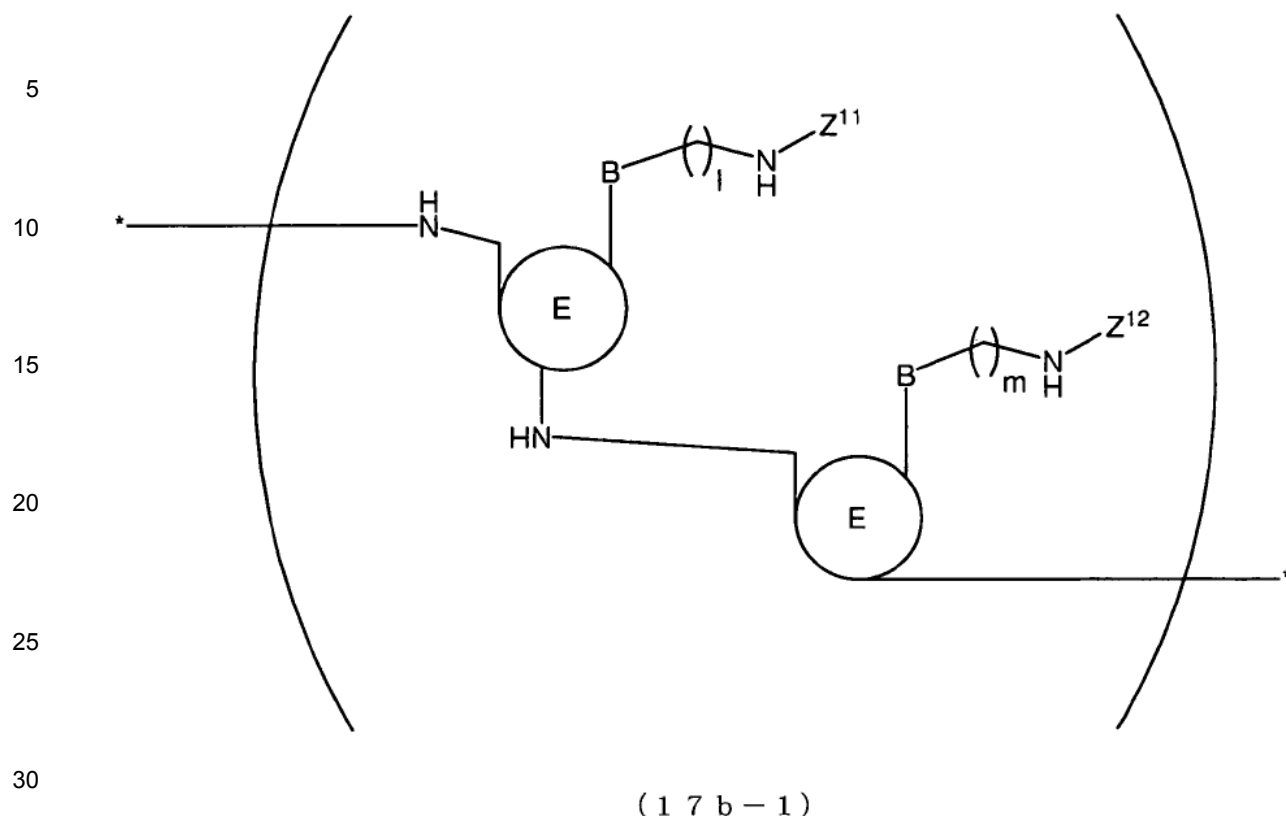
(16b-1)



(16b-2)



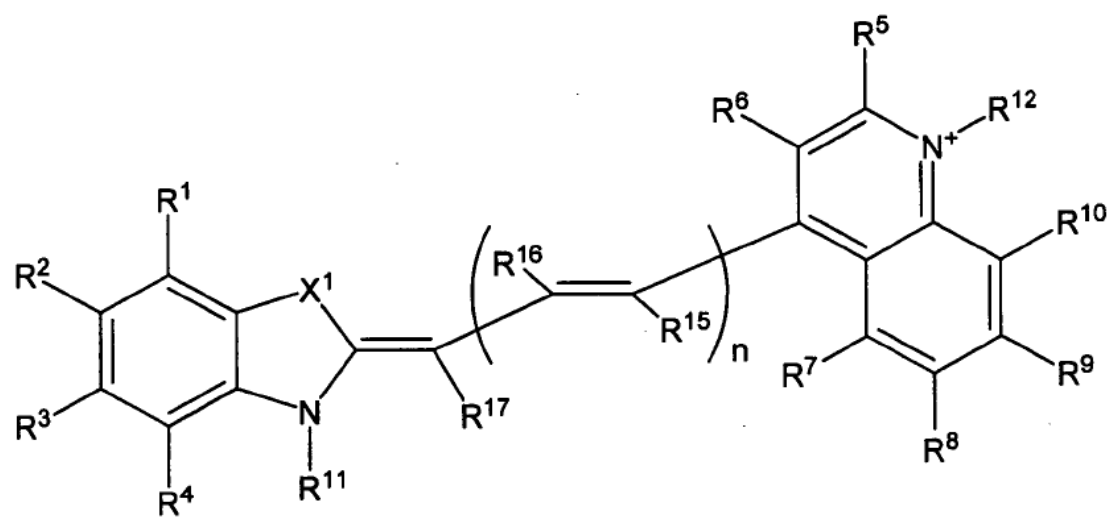
(1 7 - 1)



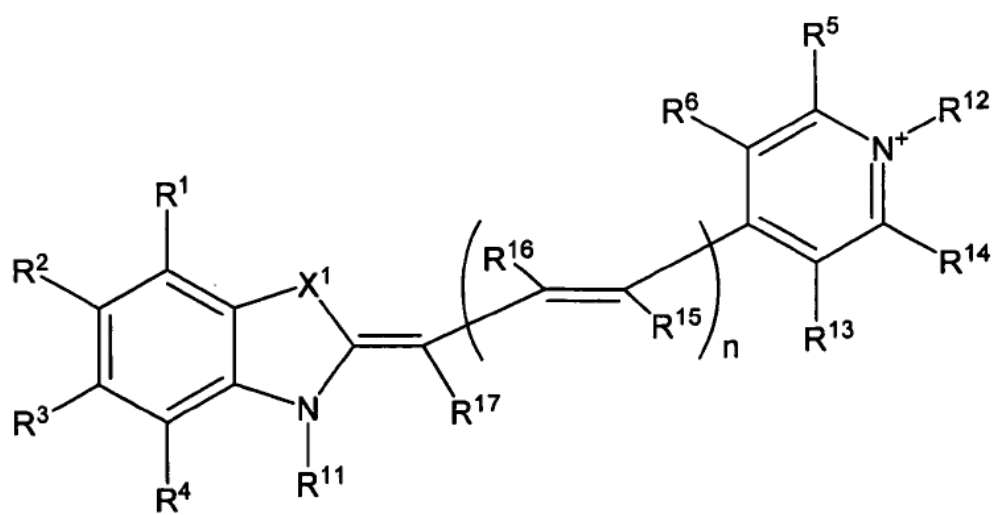
en el que en las fórmulas (16-1), (16-2), (16b-1), (16b-2), (17-1), y (17b-1), las longitudes de cadena l, m, y n son arbitrarias y pueden ser idénticas o diferentes entre sí, los enlazadores pueden contener o no uno de C, N, O, S, P, y Si en la cadena principal, los enlazadores pueden contener o no uno de un enlace simple, un doble enlace, un triple enlace, un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, un grupo imino, un enlace éter, un enlace tioéter y un enlace tioéster en la cadena principal, y B, E, Z¹¹ y Z¹² son idénticos a los de las fórmulas (16), (16b), (17) o (17b), respectivamente, en las fórmulas (16-1) y (16b-1), b es idéntico al de la fórmula (16) o (16b).

5. Ácido nucleico según la reivindicación 1 a 4, en el que Z¹¹ y Z¹² son cada uno independientemente un grupo derivado de naranja de tiazol, amarillo de oxazol, cianina, hemicianina, otro colorante de cianina, rojo de metilo, colorante azo, o un derivado de los mismos un tautómero o estereoisómero del compuesto; o una sal del compuesto, el tautómero o el estereoisómero.

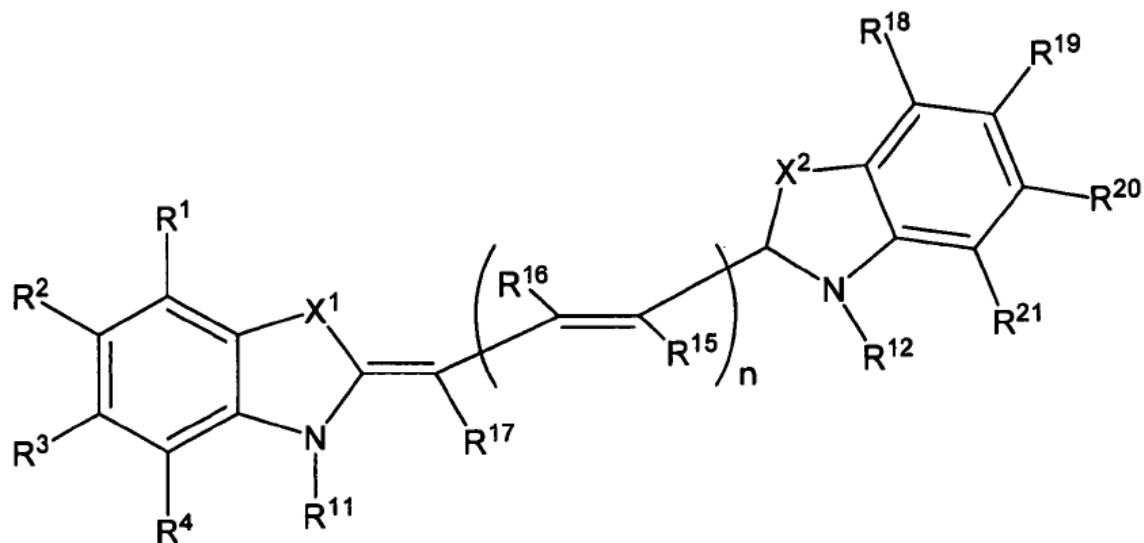
6. Ácido nucleico según la reivindicación 1 a 4, en el que Z¹¹ y Z¹² son cada uno independientemente un grupo atómico representado por cualquiera de las siguientes fórmulas (7) a (9): un tautómero o estereoisómero del compuestos o una sal del compuesto, el tautómero o el estereoisómero:



(7)



(8)



(9)

en el que en las fórmulas (7) a (9),

X^1 y X^2 son cada uno S u O y pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

n es 0 o un número entero positivo,

R^1 a R^{10} y R^{13} a R^{21} son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo alcoxi inferior, un grupo nitro, o un grupo amino, uno de R^{11} y R^{12} es un grupo de enlace que se une a L^1 o L^2 en las fórmulas (16), (16b), (17) o (17b) o NH en las fórmulas (16-1), (16-2), (16b-1), (16b-2), (17-1) o (17b-1), y el otro es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior,

cuando una pluralidad de R^{15} están presentes en la fórmula (7), (8), o (9), pueden ser idénticos o diferentes entre sí,

cuando una pluralidad de R^{16} están presentes en la fórmula (7), (8), o (9), pueden ser idénticos o diferentes entre sí, y

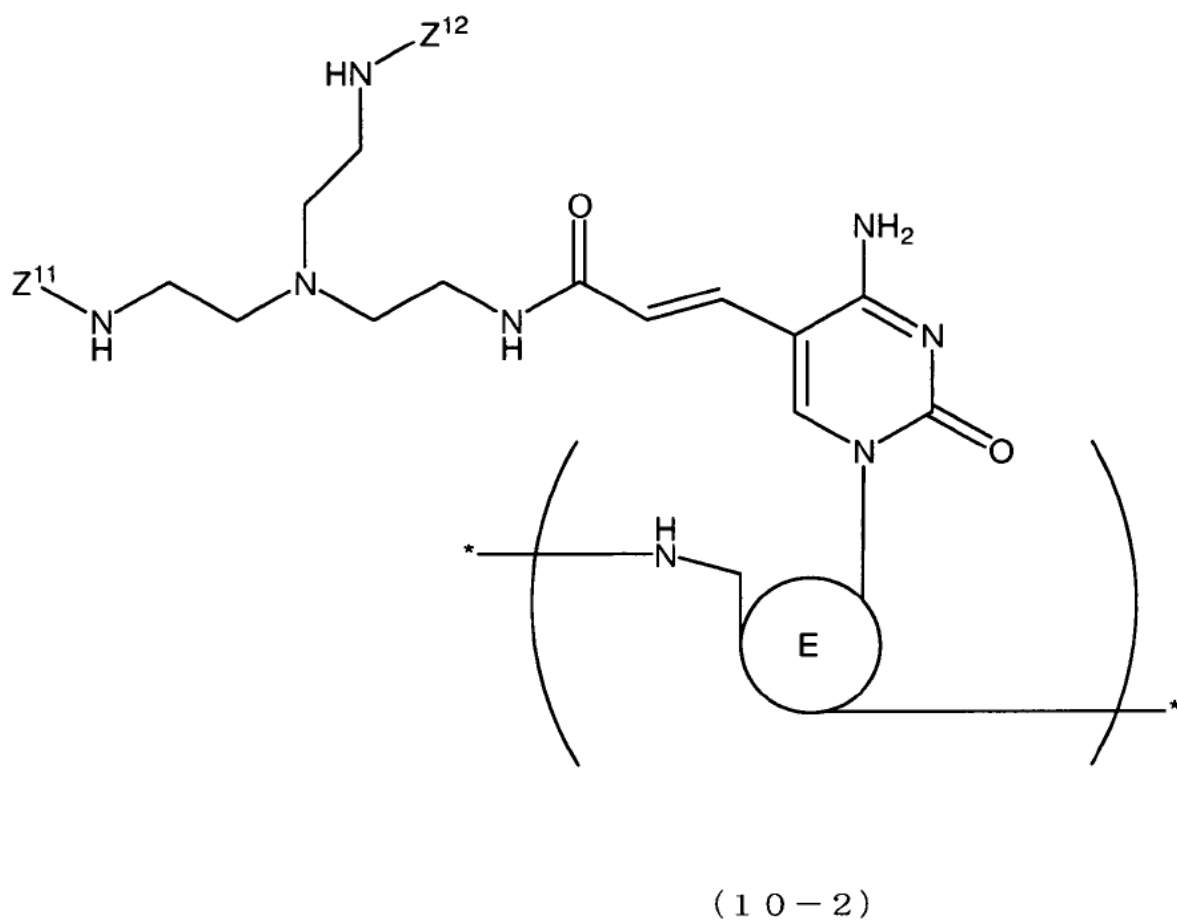
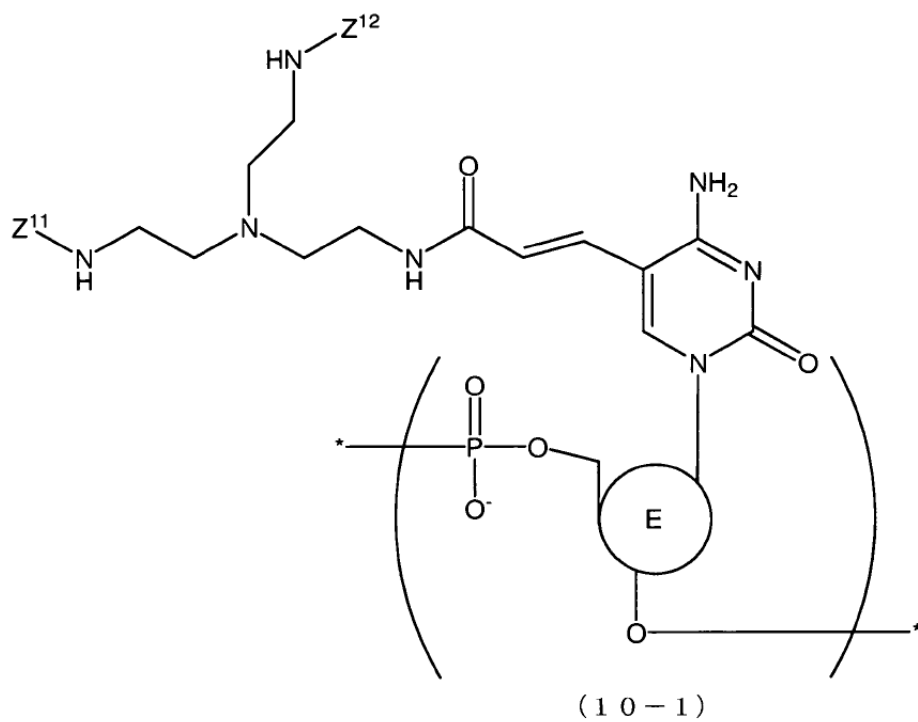
X^1 , X^2 y R^1 a R^{21} en Z^{11} y X^1 , X^2 y R^1 a R^{21} en Z^{12} pueden ser idénticos o diferentes entre sí, respectivamente,

en el que opcionalmente en las fórmulas (7) a (9), en R^1 a R^{21} , el grupo alquilo inferior es un grupo alquilo lineal o ramificado con un número de carbonos de 1 a 6, y el grupo alcoxi inferior es un grupo alcoxi lineal o ramificado con un número de carbonos de 1 a 6; y

en el que opcionalmente en las fórmulas (7) a (9), en R^{11} y R^{12} , el grupo de enlace es un grupo de polimetilencarbonilo con un número de carbonos de por lo menos 2 y se unen a L^1 o L^2 en las fórmulas (16), (16b), (17) o (17b) o NH en las fórmulas (16-1), (16-2), (16b-1), (16b-2), (17-1) o (17b-1), por un grupo carbonilo de los mismos.

7. Ácido nucleico según la reivindicación 1 a 6, que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula (10-1) o (10-2);

un tautómero o estereoisómero del compuesto; o una sal del compuesto, el tautómero o el estereoisómero:



en el que en la fórmula (10-1),

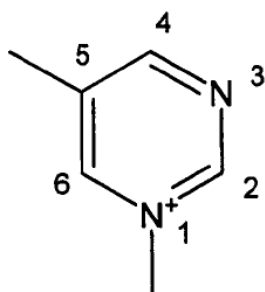
E, Z^{11} y Z^{12} son idénticos a los utilizados en la fórmula (16), respectivamente;
 en la fórmula (10-2),
 E, Z^{11} y Z^{12} son idénticos a los utilizados en la fórmula (16b), respectivamente.

- 5 8. Ácido nucleico según la reivindicación 1 a 6, en el que en las fórmulas (16), (16b), (17) y (17b), B es una estructura representada por Py, derivado de Pyr, Pu, o derivado de Pu; un tautómero o estereoisómero del compuesto; o una sal del compuesto, el tautómero, o el estereoisómero:

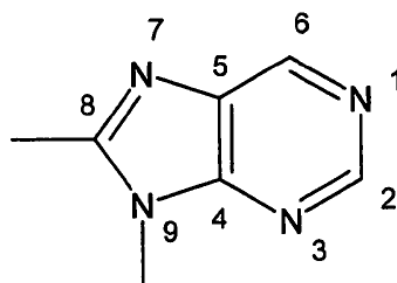
en el que

el Py es un grupo atómico que tiene un enlace covalente a E en una posición 1 y un enlace covalente a un grupo
 10 enlazador en una posición 5 en un anillo de seis miembros representado por la siguiente fórmula (11),
 el derivado de Pyr es un grupo atómico en que por lo menos uno de todos los átomos del anillo de seis miembros
 de la Py ha sido sustituido por un átomo de N, C, S, u O, y el átomo de N, C, S, u O puede tener opcionalmente
 una carga eléctrica, un átomo de hidrógeno, o un sustituyente,

la Pu es un grupo atómico que tiene un enlace covalente a E en una posición 9 y un enlace covalente a un grupo
 15 enlazador en una posición 8 en un anillo condensado representado por la siguiente fórmula (12), y
 el derivado de Pu es un grupo atómico en que por lo menos uno de todos los átomos del anillo de cinco
 miembros de Pu ha sido sustituido por un átomo de N, C, S, u O, y el átomo de N, C, S, u O puede tener
 opcionalmente una carga eléctrica, un átomo de hidrógeno, o un sustituyente,

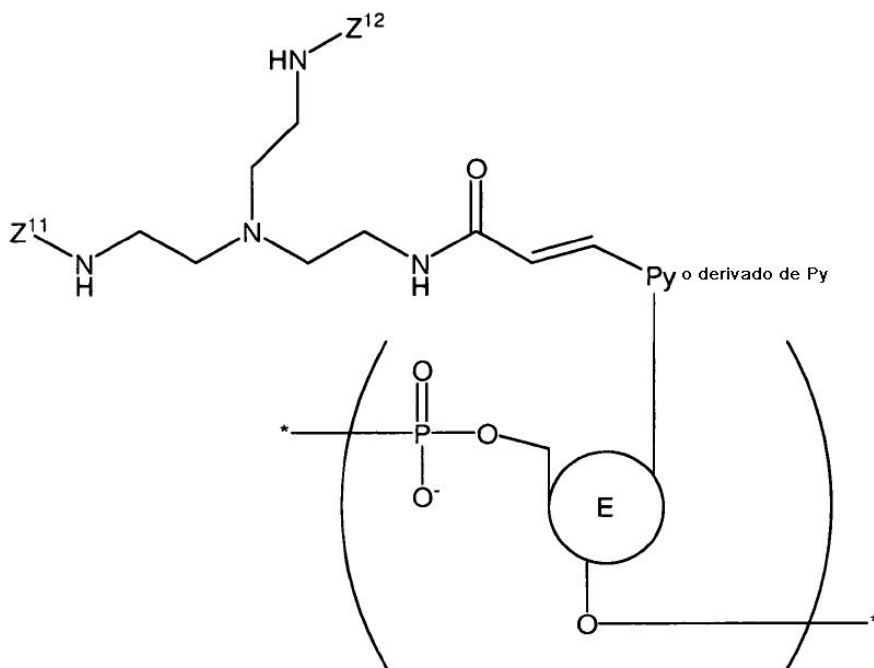


(1 1)

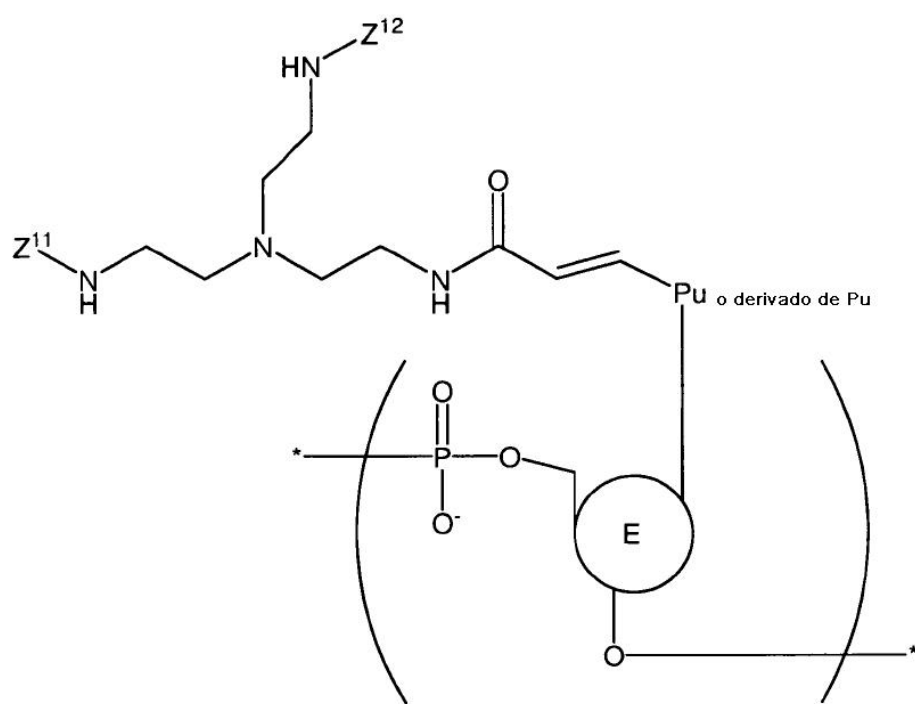
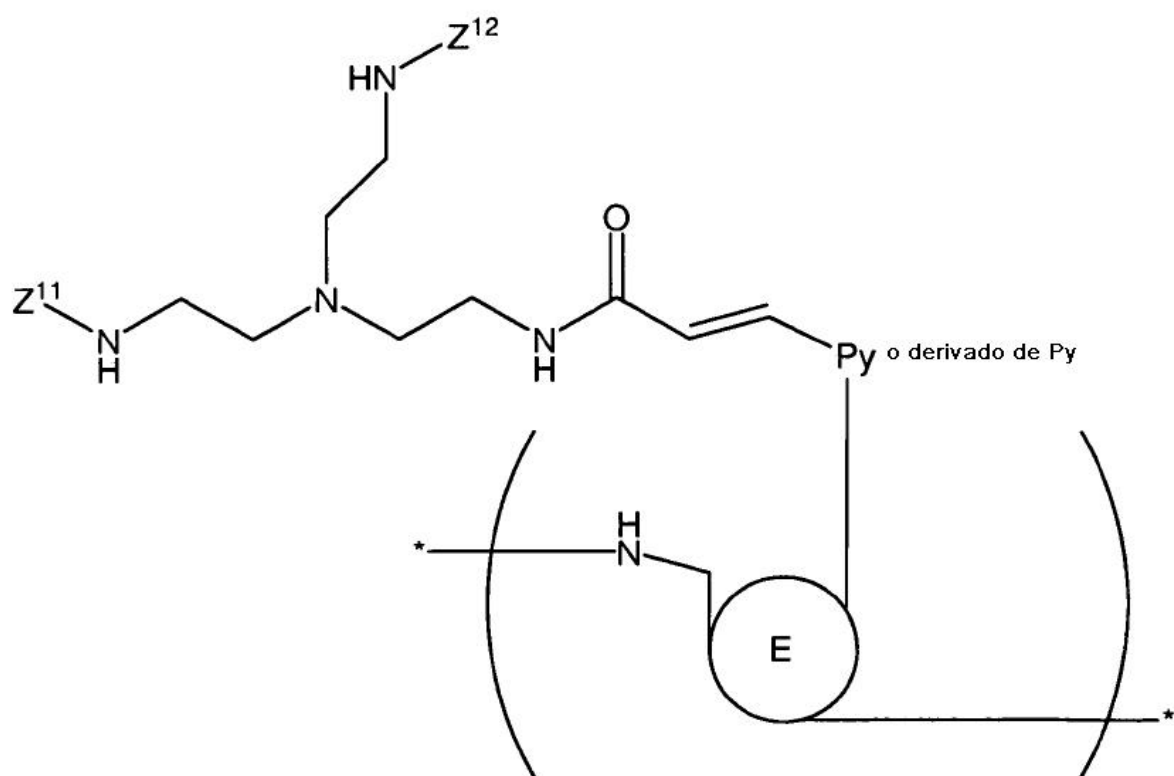


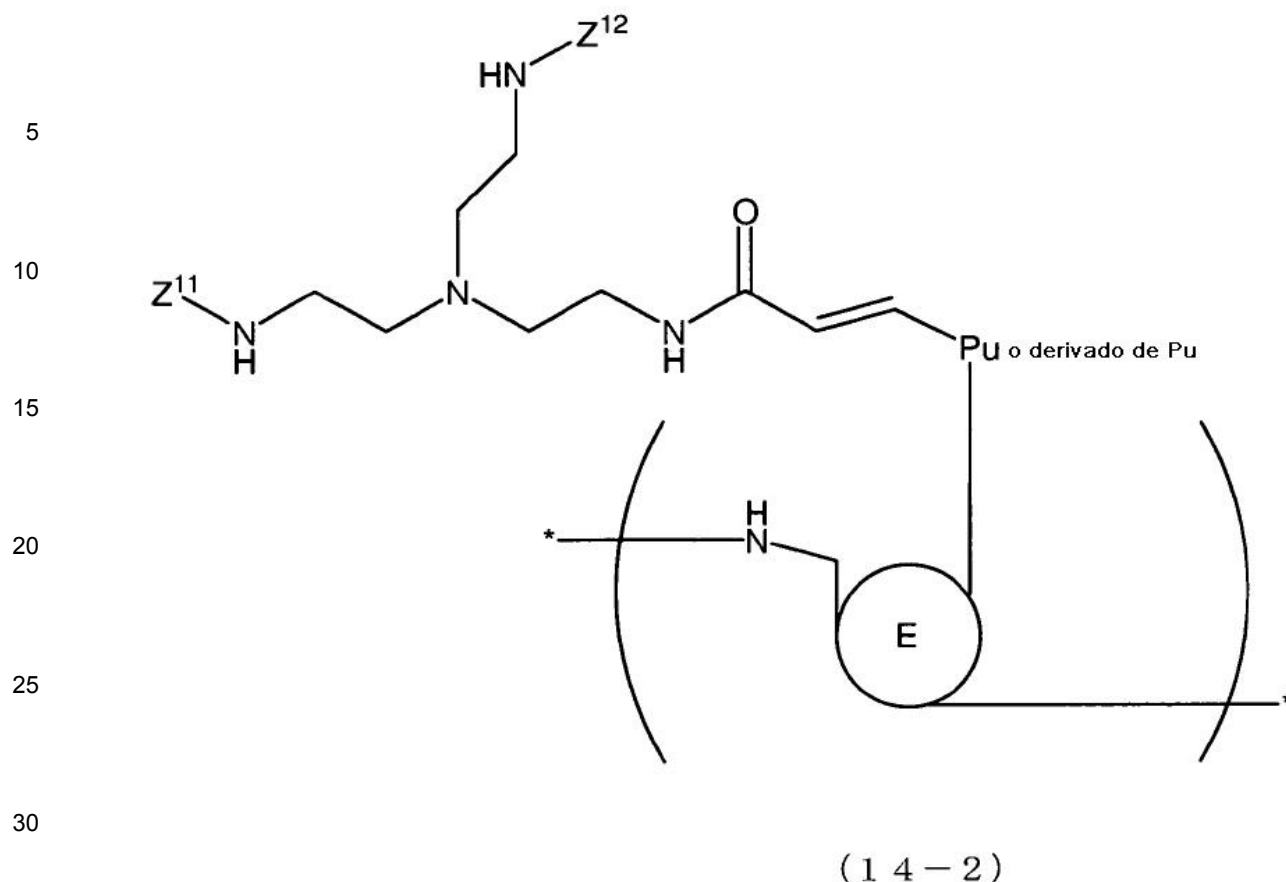
(1 2)

estando el ácido nucleico representado por las siguientes fórmulas (13-1), (13-2), (14-1) o (14-2):



(1 3 - 1)





en el que en las fórmulas (13-1) y (14-1),

E, Z^{11} y Z^{12} son idénticos a los de la fórmula (16), respectivamente; en la fórmula (13-2) y (14-2),

E, Z^{11} y Z^{12} son idénticos a los de la fórmula (16b), respectivamente.

9. Sustancia marcadora que emite fluorescencia con dos estructuras químicas planas contenidas en una molécula, que no existen en el mismo plano, sino con un cierto ángulo formado entre las mismas, localizadas de manera que están dispuestas en el mismo plano cuando la molécula experimenta una intercalación o unión en los surcos a un ácido nucleico,

en la que la sustancia marcadora está formada preferiblemente de por lo menos dos grupos moleculares colorantes que no muestran emisión de fluorescencia debido al efecto de excitón obtenido cuando por lo menos dos moléculas colorantes se agregan en paralelo entre sí, pero muestran emisión de fluorescencia destruyéndose el estado de agregación cuando las moléculas experimentan una intercalación o unión en los surcos a un ácido nucleico,

en el que la sustancia marcadora es:

el ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que muestra fluorescencia y muestra un efecto de excitón;

un tautómero o estereoisómero del ácido nucleico;

o una sal del ácido nucleico, el tautómero o el estereoisómero.

10. Sustancia marcadora compleja que tiene, como estructura química característica, una estructura química de por lo menos dos moléculas colorantes contenidas en una molécula, sin mostrar las por lo menos dos moléculas colorantes emisión de fluorescencia debido al efecto de excitón obtenido cuando se agregan en paralelo entre sí, pero mostrando emisión de fluorescencia destruyéndose el estado de agregación cuando las moléculas experimentan una intercalación o unión en los surcos a un ácido nucleico,

teniendo opcionalmente la sustancia marcadora compleja una estructura en que por lo menos dos moléculas colorantes están unidas a una molécula enlazadora unida a un ácido nucleico a marcar, con una molécula enlazadora adicional interpuesta entre las mismas para tener una estructura ramificada, o unidas directamente a las mismas sin molécula de enlace adicional interpuesta entre las mismas, en la que las moléculas colorantes son cada una la sustancia marcadora descrita en la reivindicación 9.

11. Sustancia marcadora seleccionada entre mononucleótido marcado, oligonucleótido marcado, un ácido nucleico marcado y un análogo de ácido nucleico marcado, en la que la sustancia marcadora está marcada con: la sustancia marcadora según la reivindicación 9;

el ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que Z^{11} y Z^{12} son cada uno un grupo atómico que muestra fluorescencia y un efecto de excitón;

un tautómero o estereoisómero del ácido nucleico; o

una sal del ácido nucleico, el tautómero o el estereoisómero,

- 5 opcionalmente con una molécula de enlace unida a un átomo de carbono en una posición 5 de un núcleo de pirimidina o un átomo de carbono en una posición 8 de un núcleo de purina de por lo menos una molécula base contenida en un mononucleótido, oligonucleótido, ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico.

12. Método de detección de un ácido nucleico, que comprende las etapas de:

- 10 llevar a cabo una síntesis de ácido nucleico utilizando, como sustrato, la sustancia marcadora según las reivindicaciones 9 u 11 que es un mononucleótido marcado u oligonucleótido marcado, sintetizando así un ácido nucleico de doble cadena al que está unido el grupo atómico que muestra fluorescencia o la estructura molecular colorante mediante intercalación o unión en los surcos;

- 15 medir la intensidad de fluorescencia antes y después de la etapa de sintetizar el ácido nucleico de doble cadena; y
detectar la síntesis de ácido nucleico mediante la comparación de las intensidades de fluorescencia entre sí que se obtienen antes y después de la etapa de síntesis del ácido nucleico de doble cadena.

13. Método de detección de un ácido nucleico, que comprende las etapas de:

- 20 llevar a cabo la síntesis de ácido nucleico mediante la hibridación, como un primer ácido nucleico, de la sustancia marcadora según la reivindicación 11 que es un ácido nucleico de cadena sencilla, a un segundo ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria al primer ácido nucleico o una secuencia análoga a la secuencia complementaria, sintetizando así un ácido nucleico de doble cadena al que está unido el grupo atómico que muestra fluorescencia o la estructura molecular colorante mediante intercalación o unión en los surcos;

- 25 medir la intensidad de fluorescencia antes y después de la etapa de sintetizar el ácido nucleico de doble cadena; y
detectar la hibridación entre el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico mediante la comparación de las intensidades de fluorescencia entre sí que se obtienen antes y después de la etapa de síntesis del ácido nucleico de doble cadena.

- 30 14. Kit que comprende:

una unidad de síntesis de ácido nucleico;

una sustancia marcadora; y

una unidad de medición de intensidad de fluorescencia,

- 35 en el que la sustancia marcadora es la sustancia marcadora según las reivindicaciones 9 ó 11.

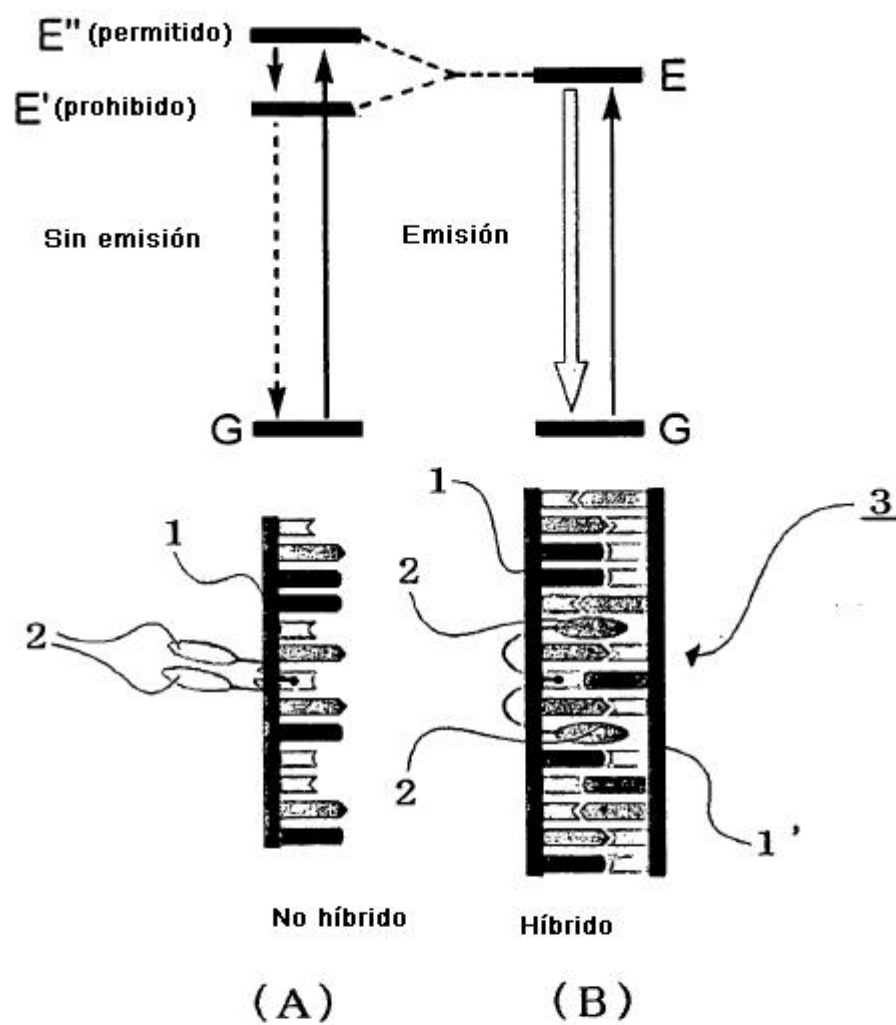
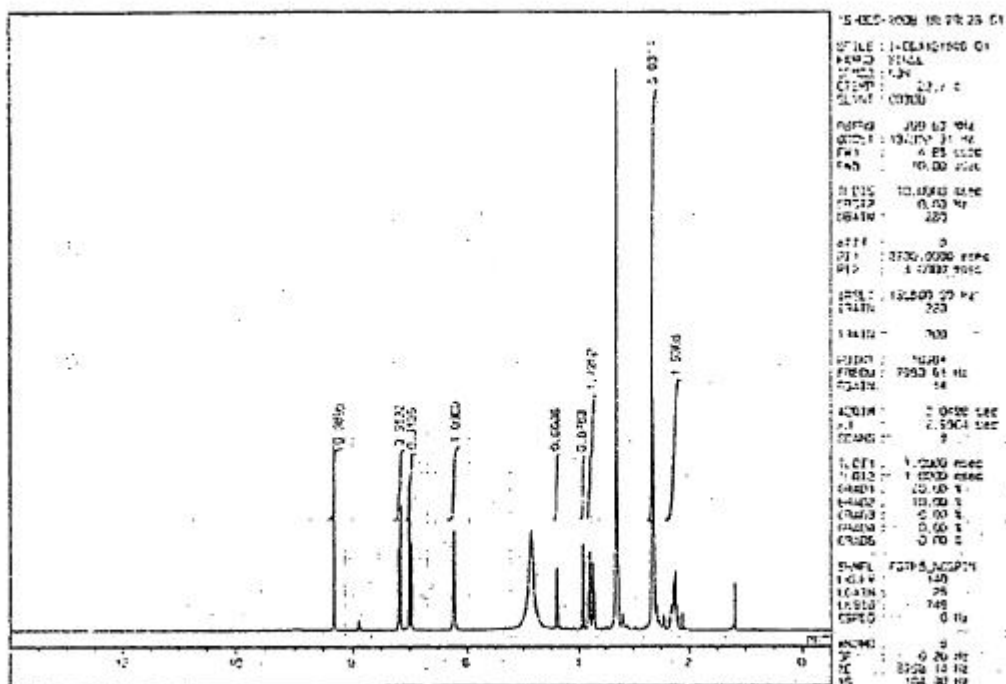


FIG. 1

espectro RMN 1H



espectro RMN 13C

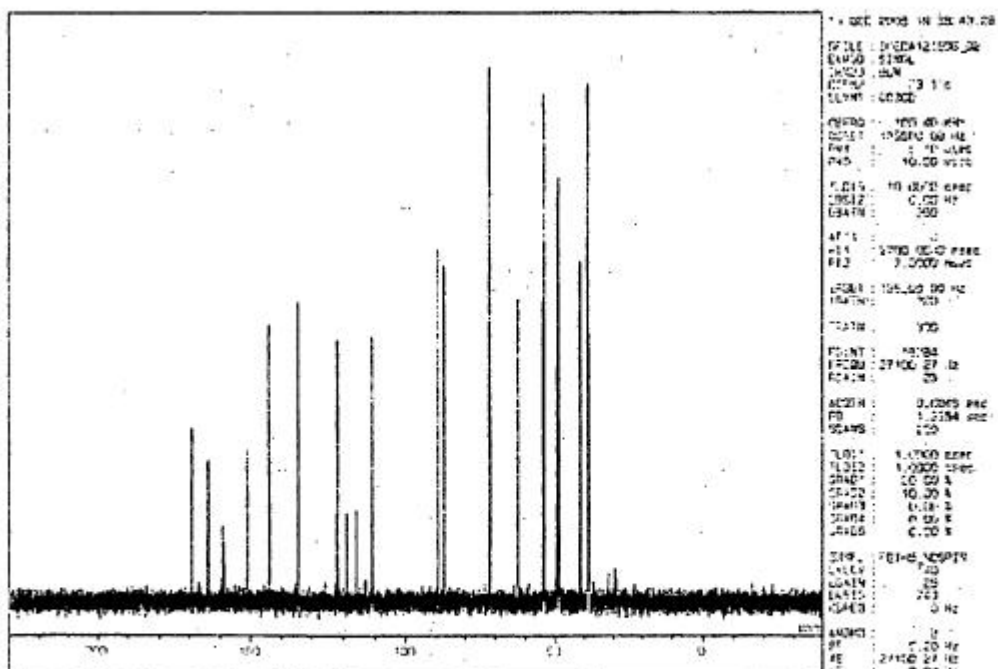
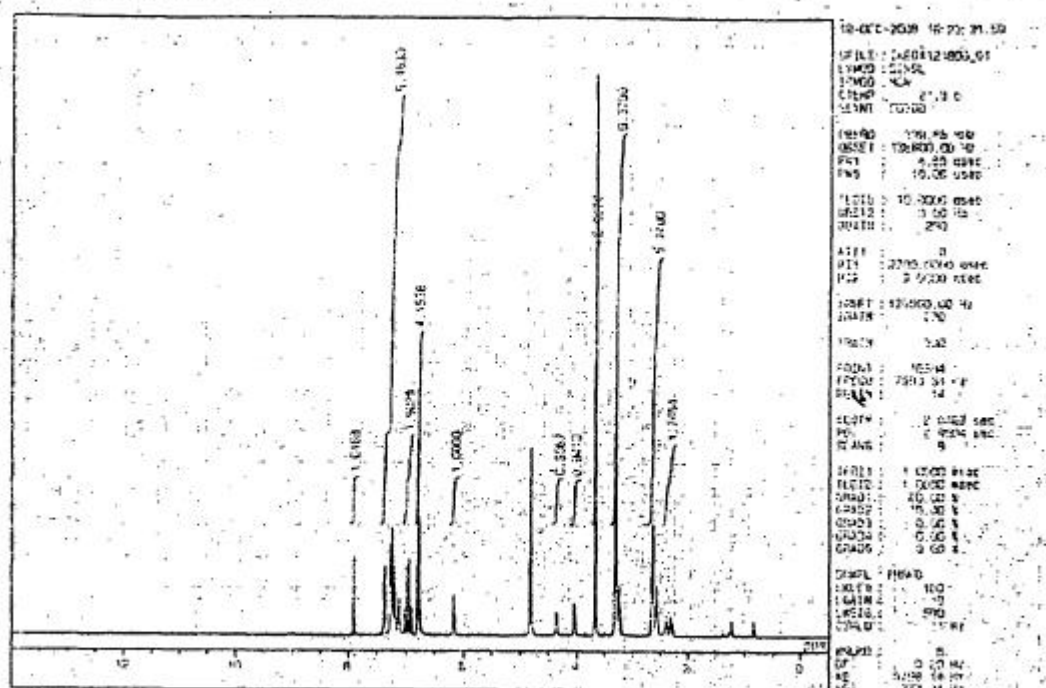


FIG. 2

espectro RMN 1H



espectro RMN 13C

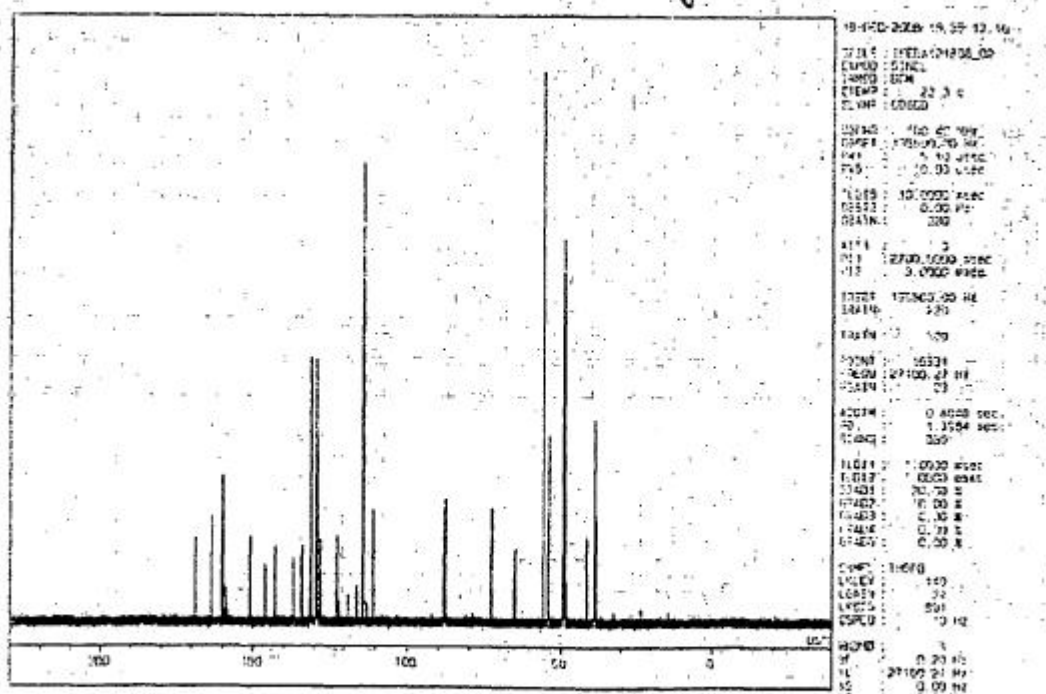


FIG. 3

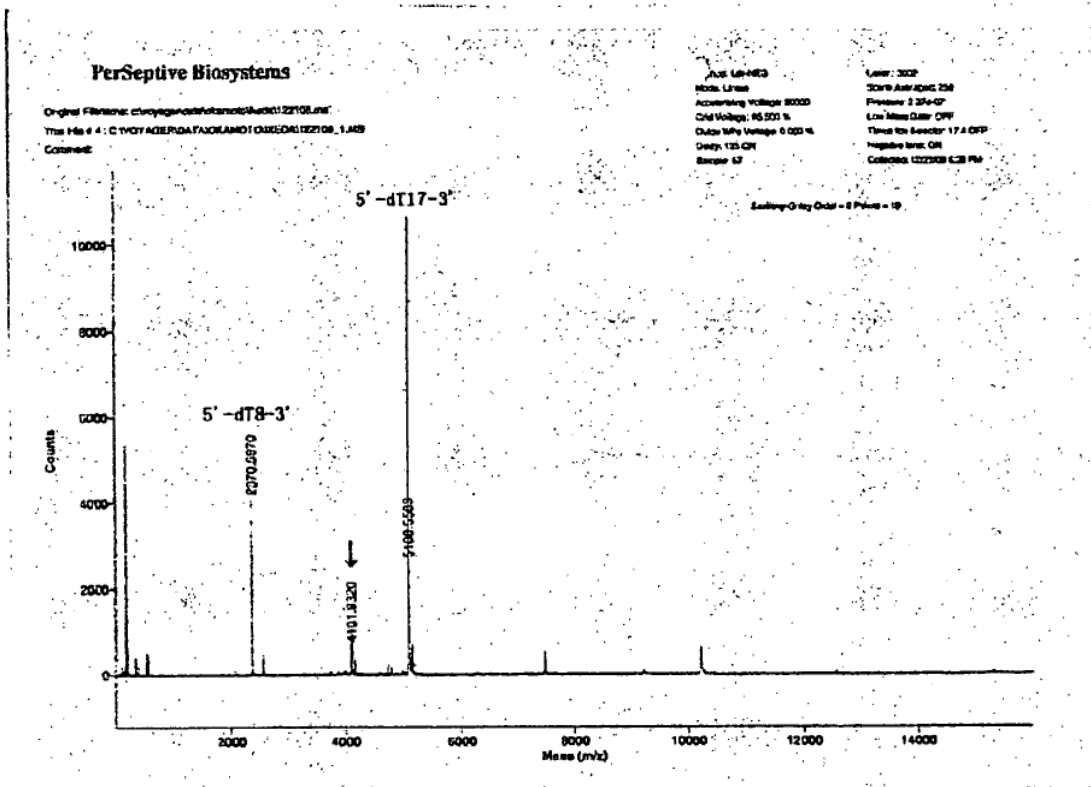


FIG. 4

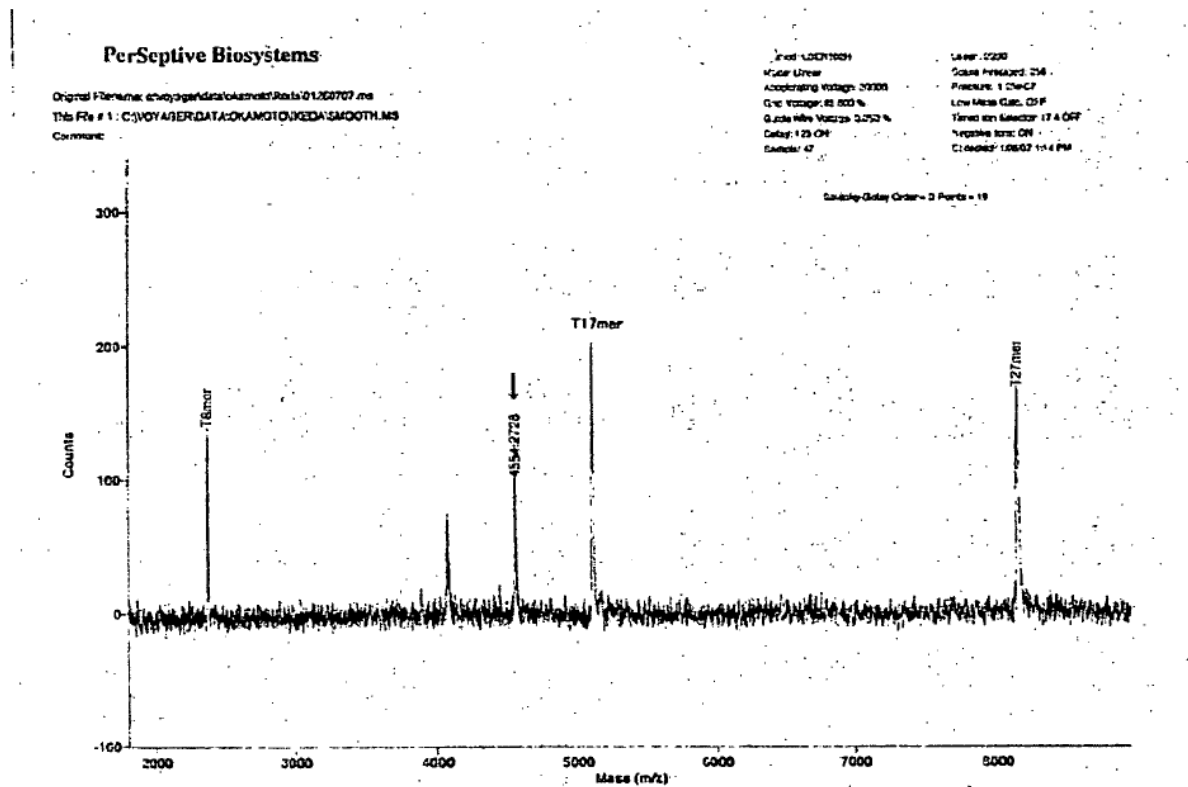


FIG. 5

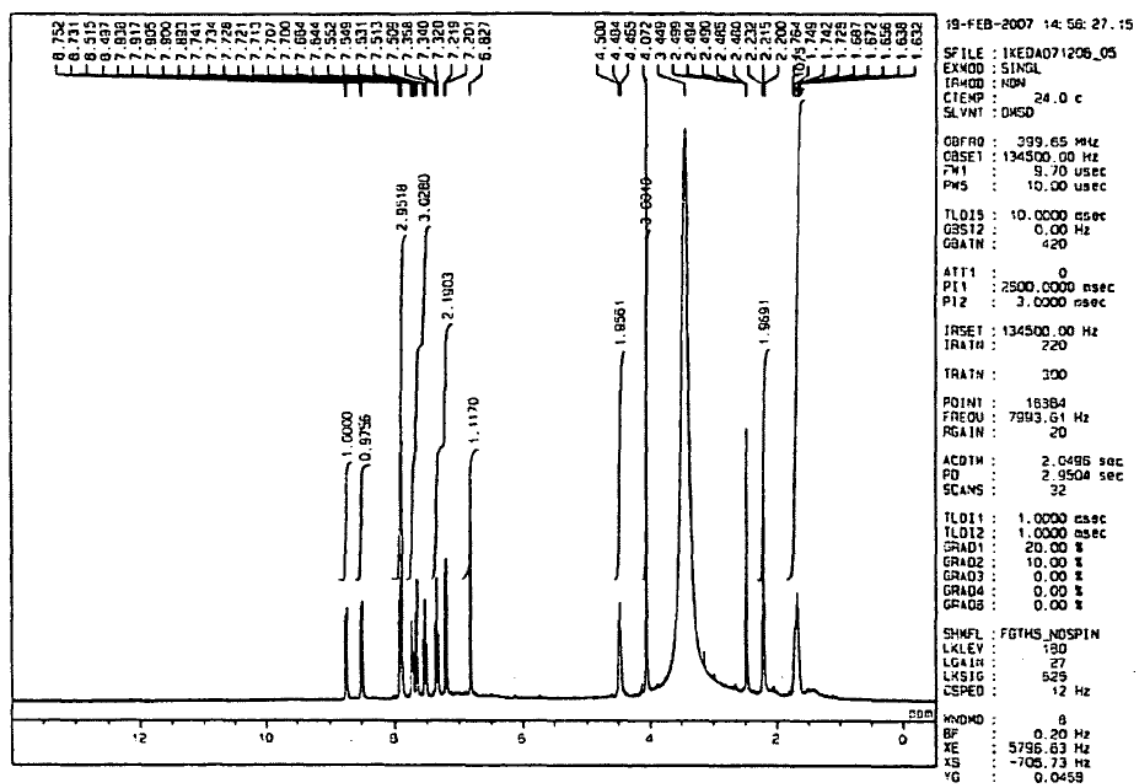


FIG. 6

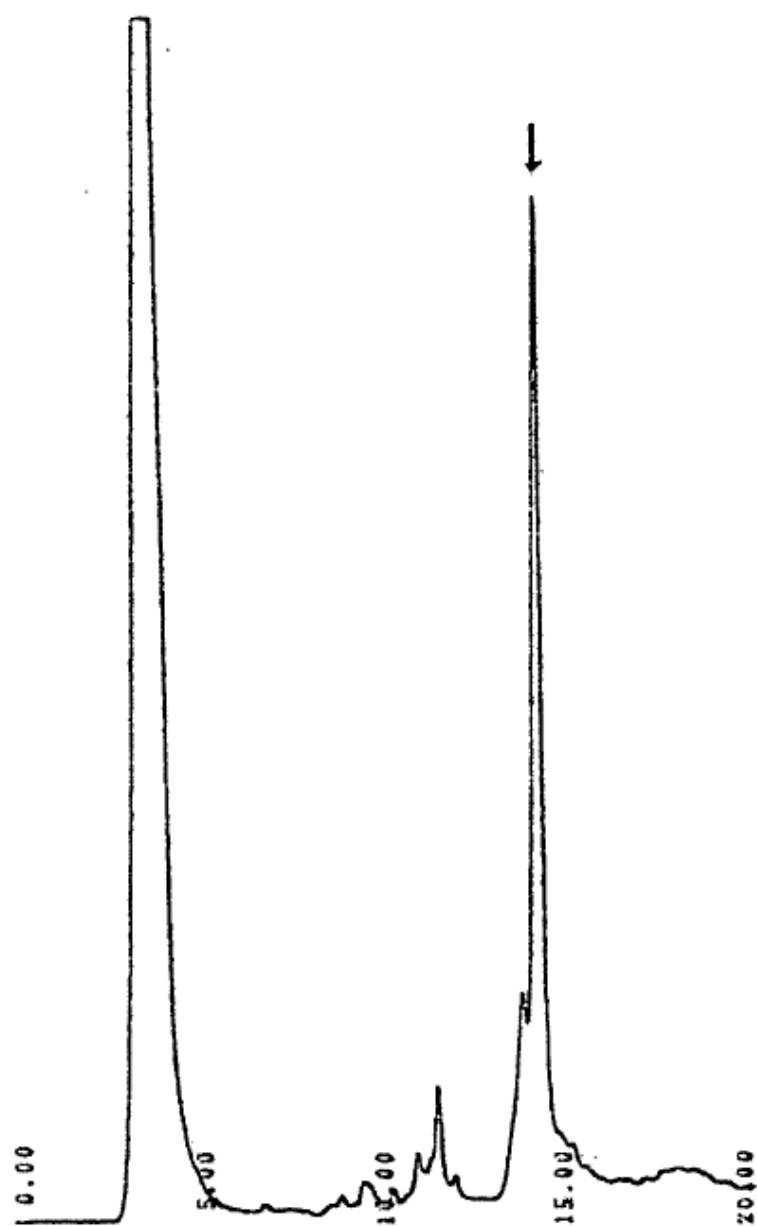


FIG. 7

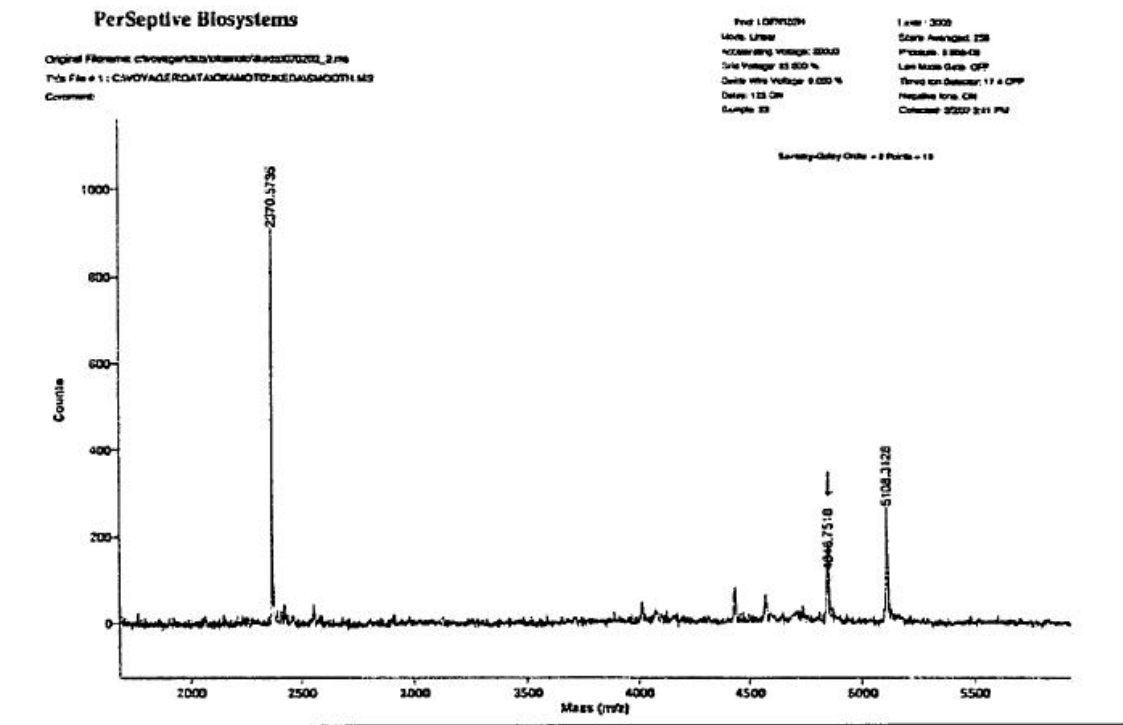


FIG. 8

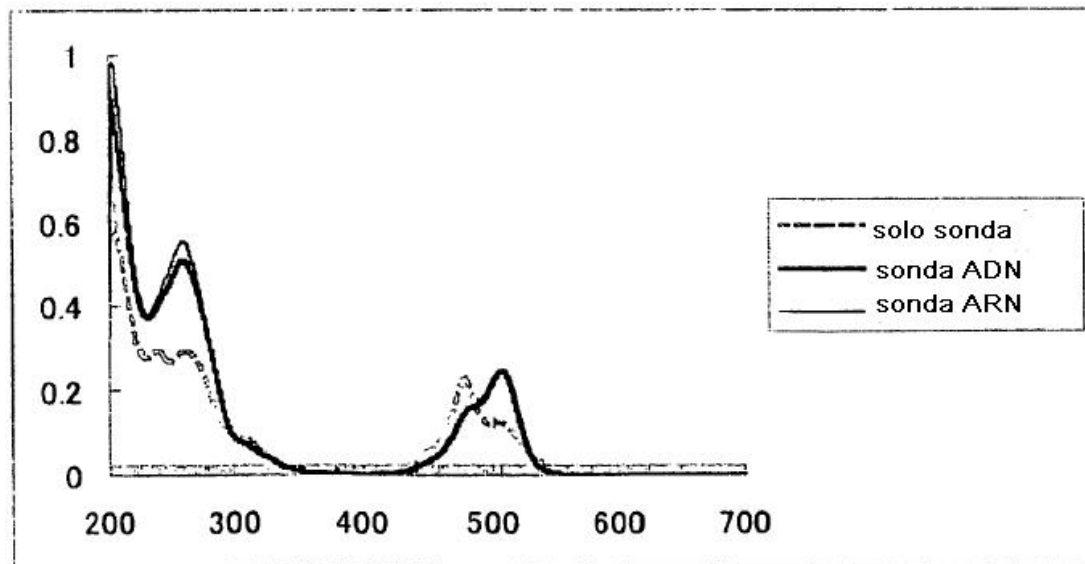


FIG. 9

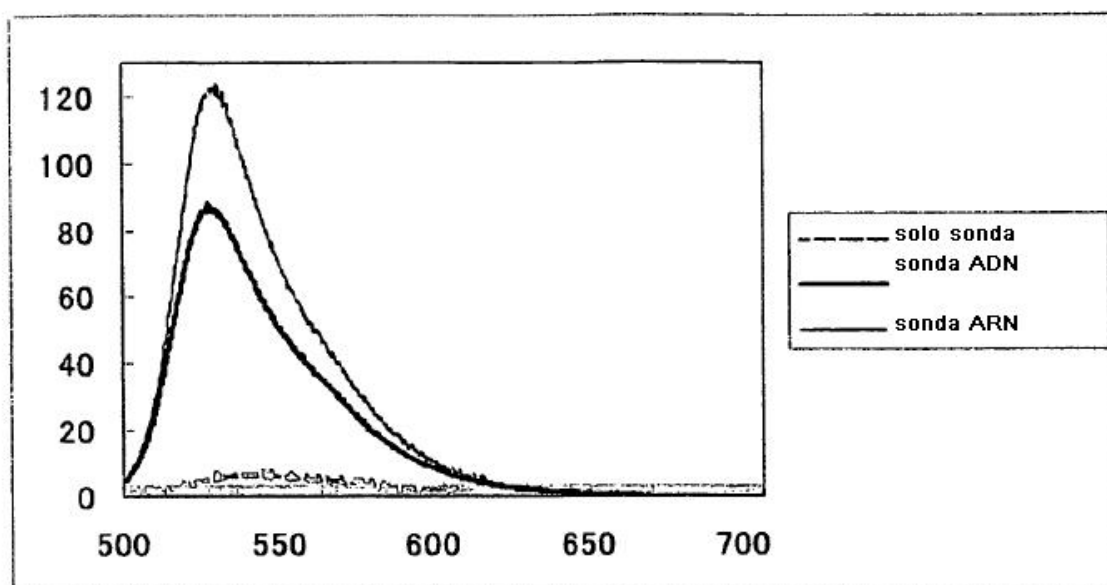


FIG. 10

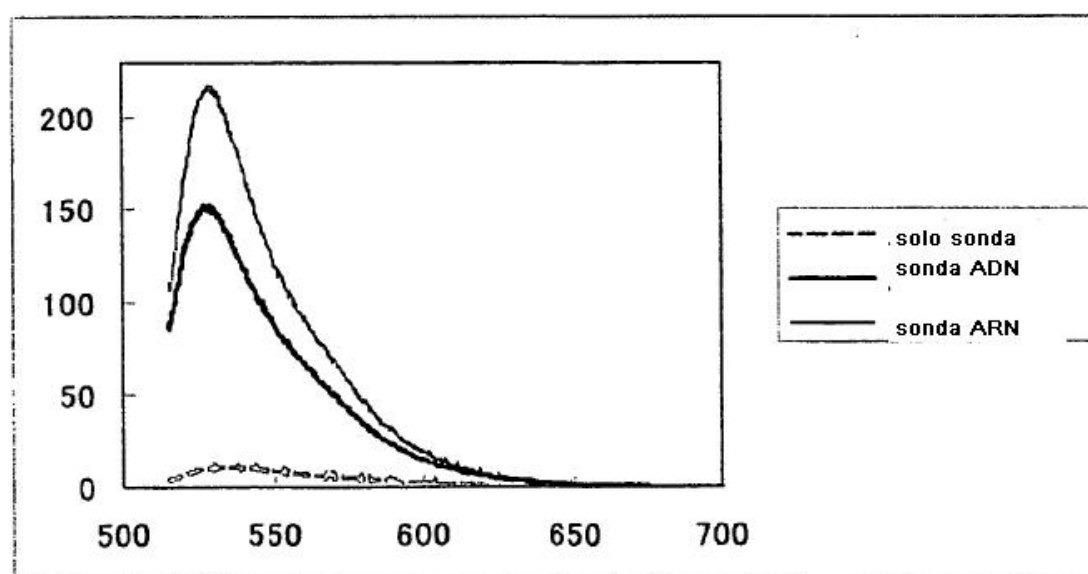


FIG. 11

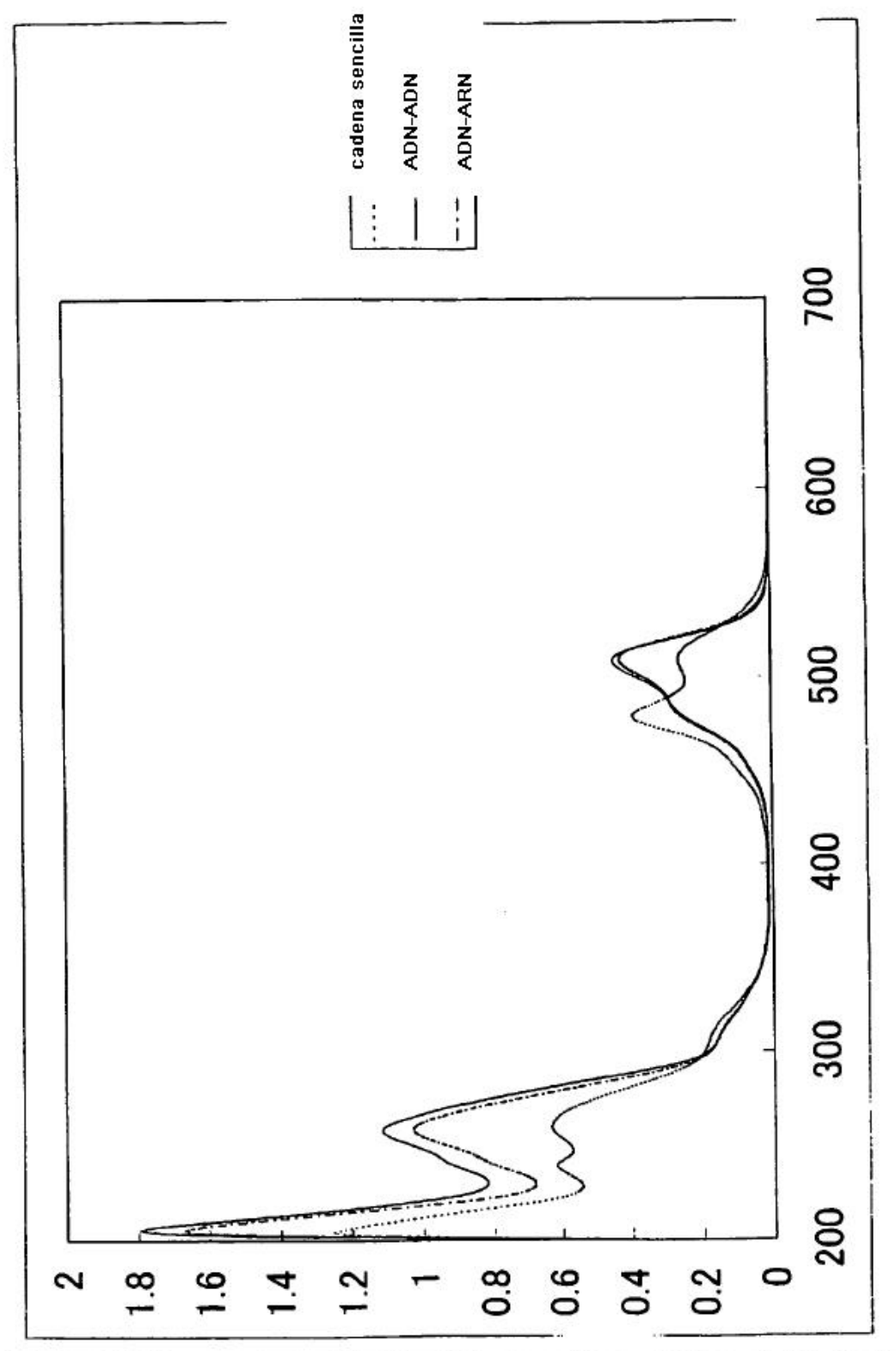


FIG. 12

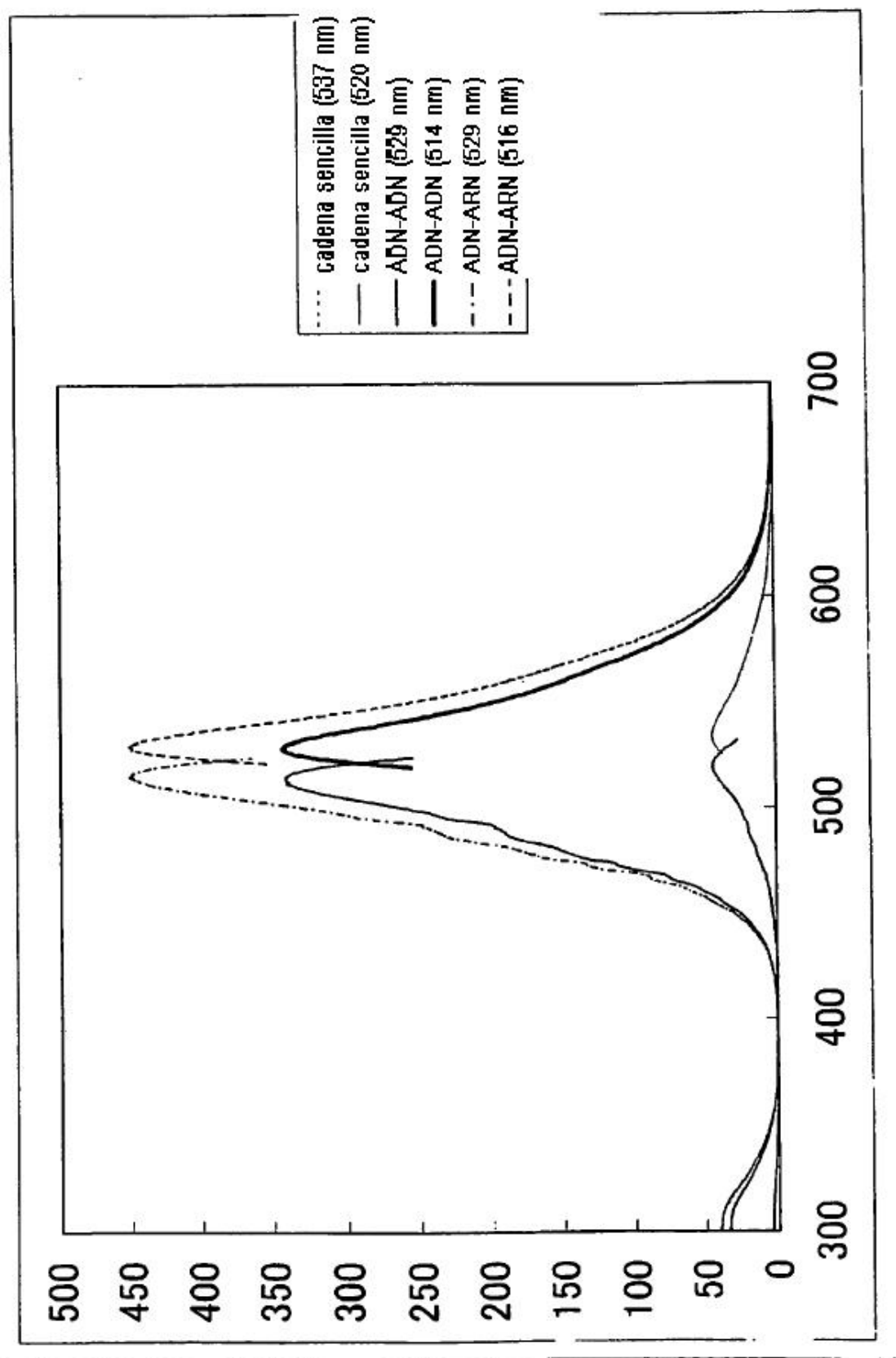


FIG. 13

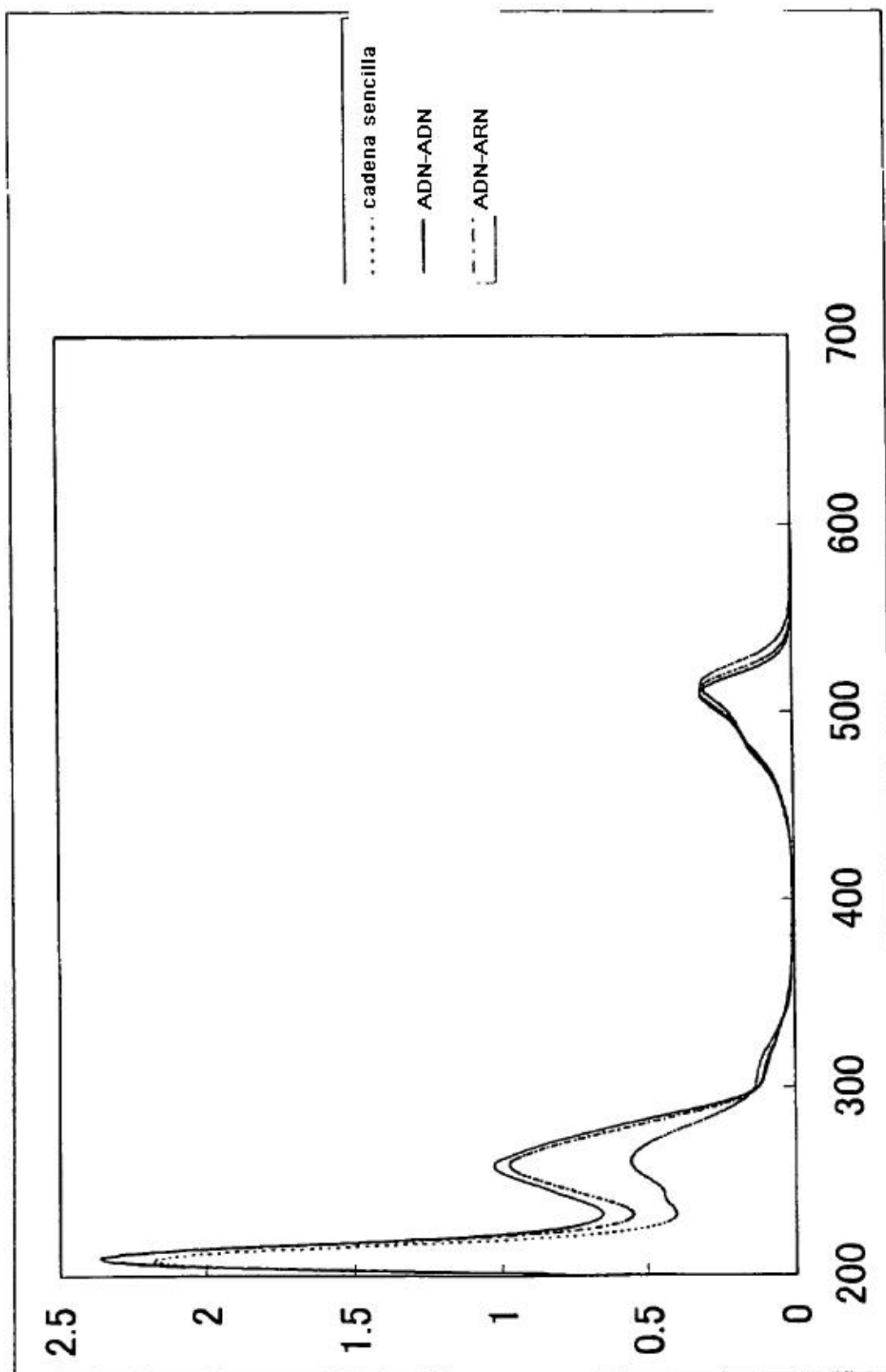


FIG. 14

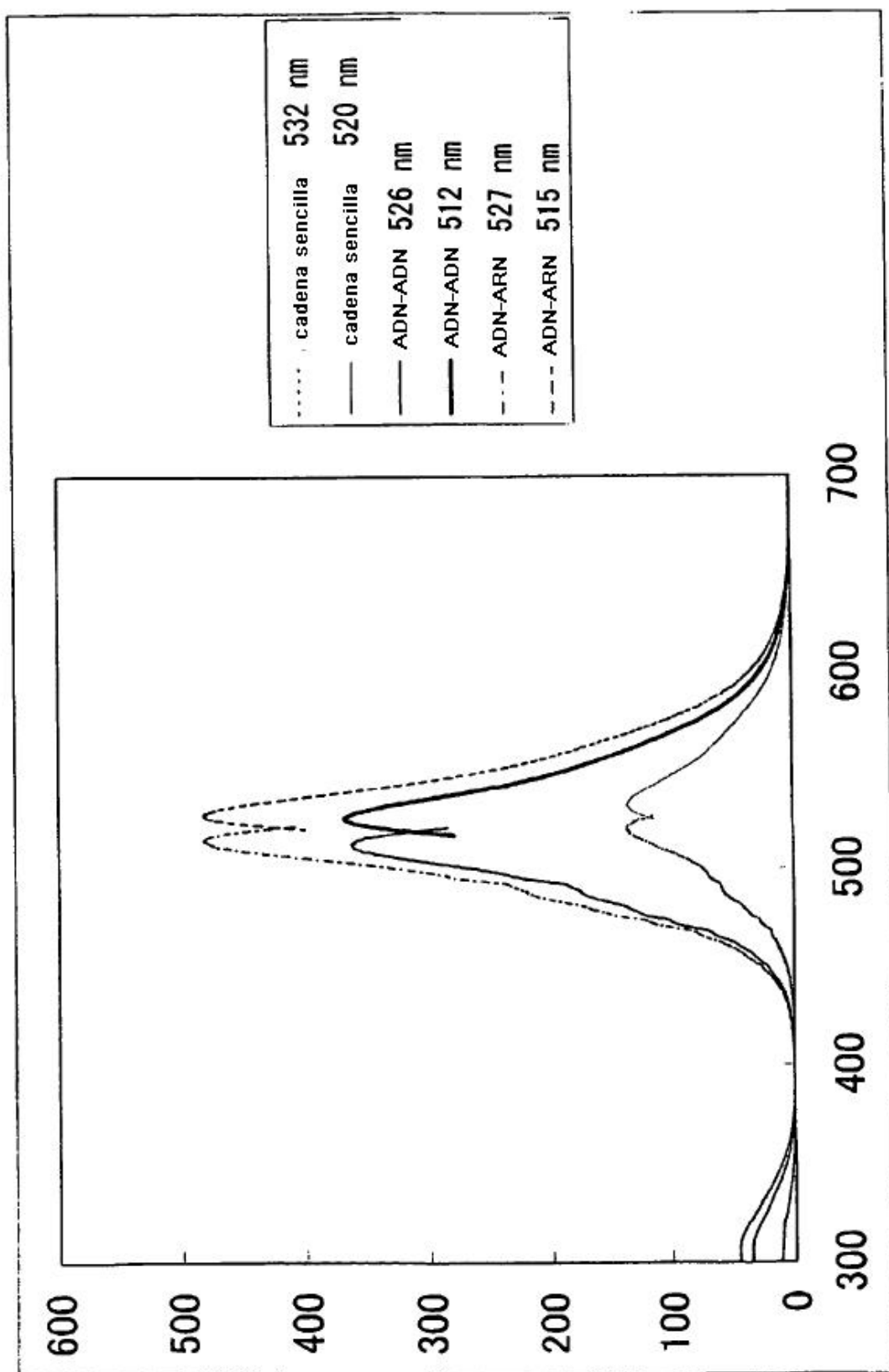


FIG. 15

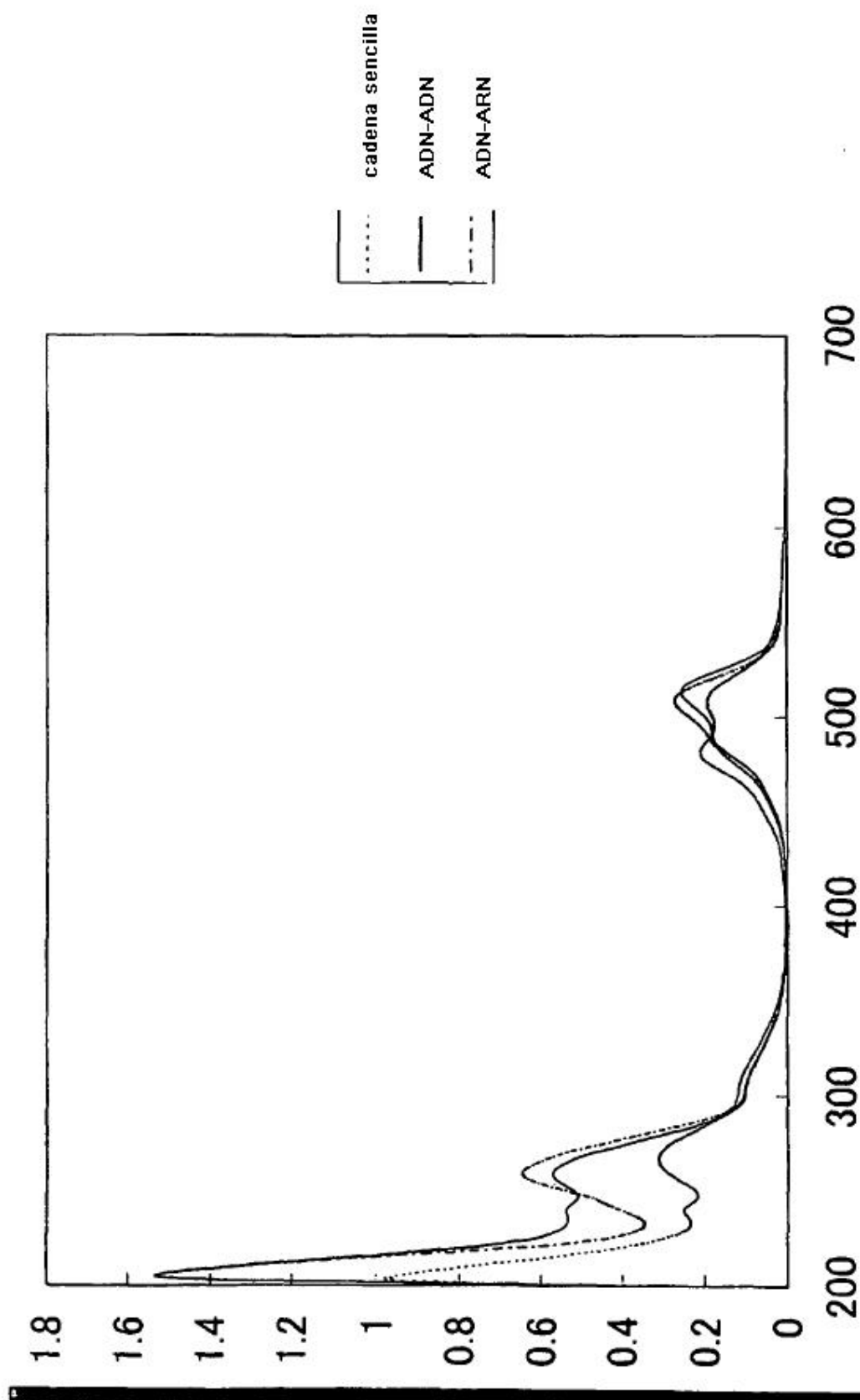


FIG. 16

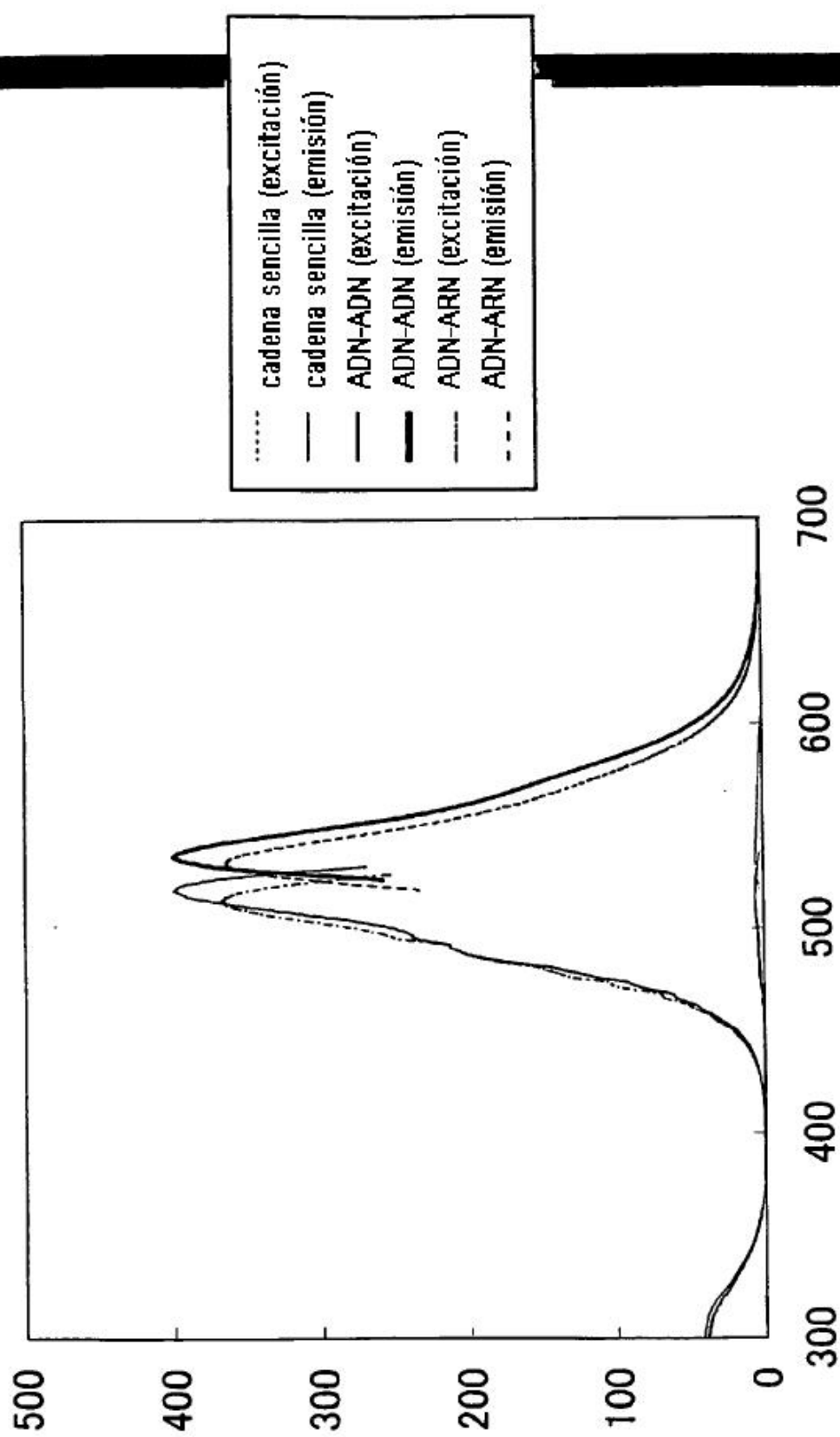


FIG. 17

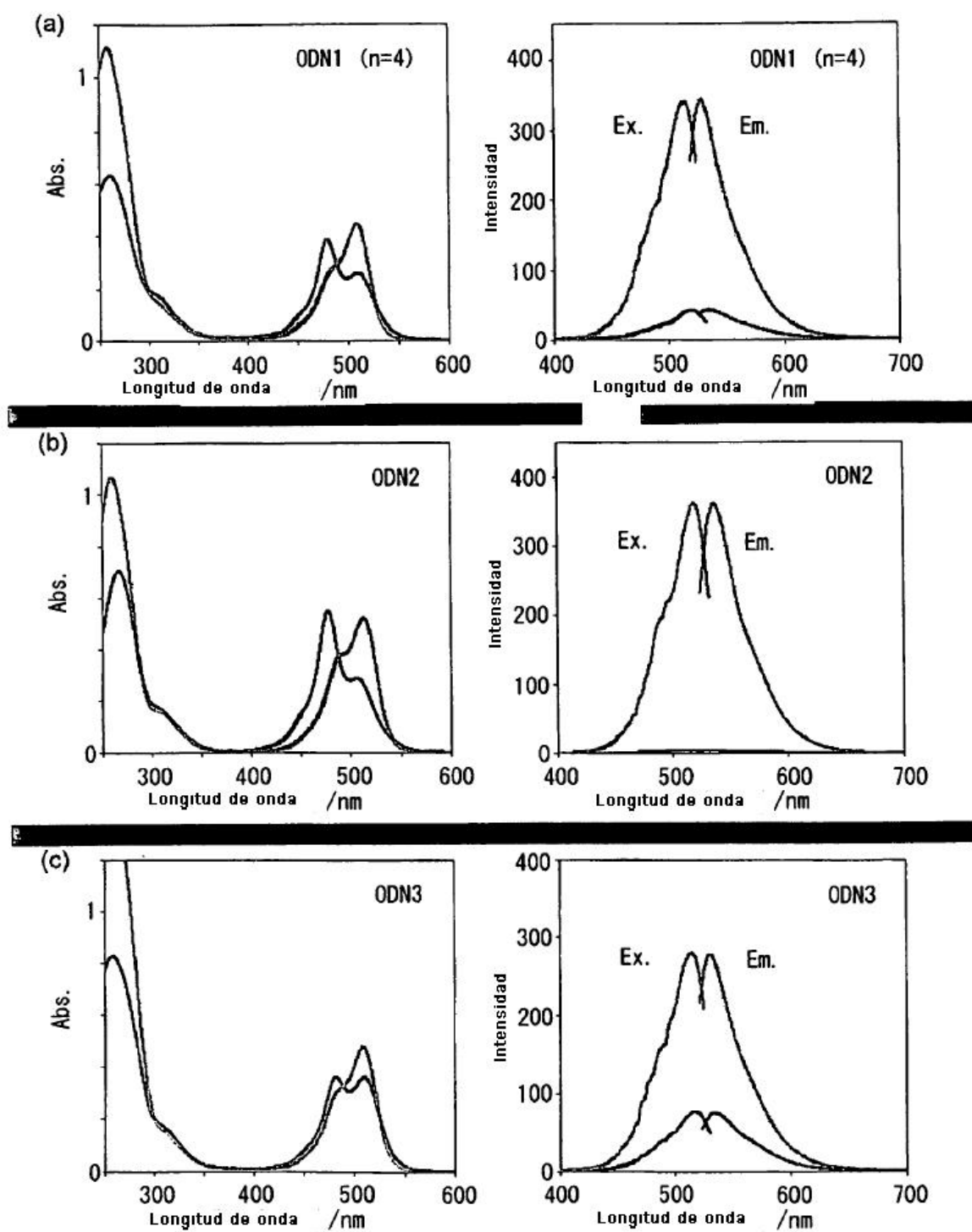


FIG. 18

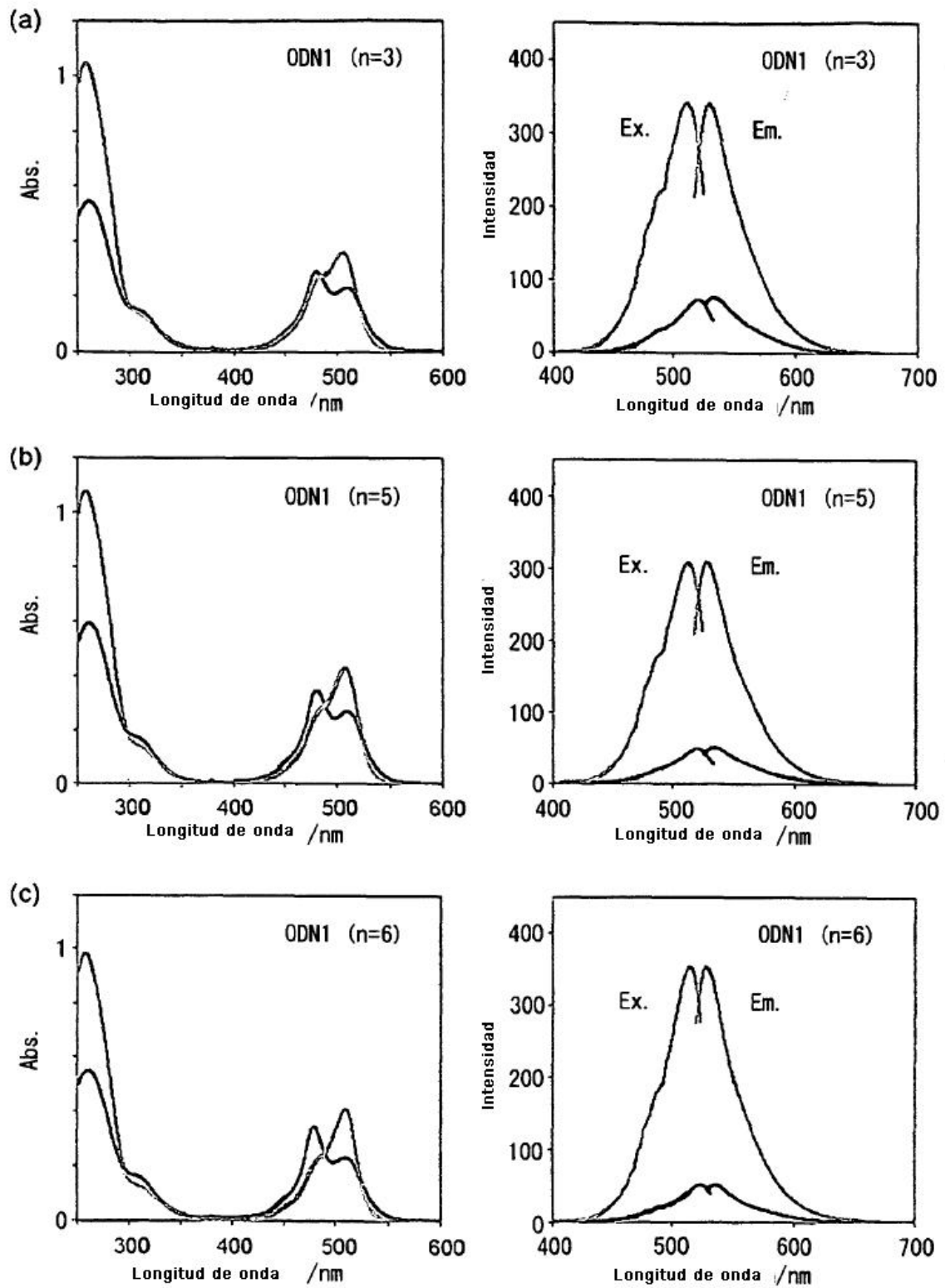


FIG. 19

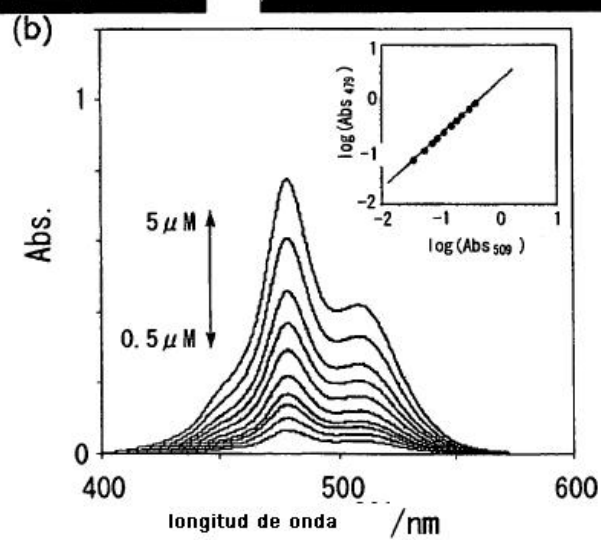
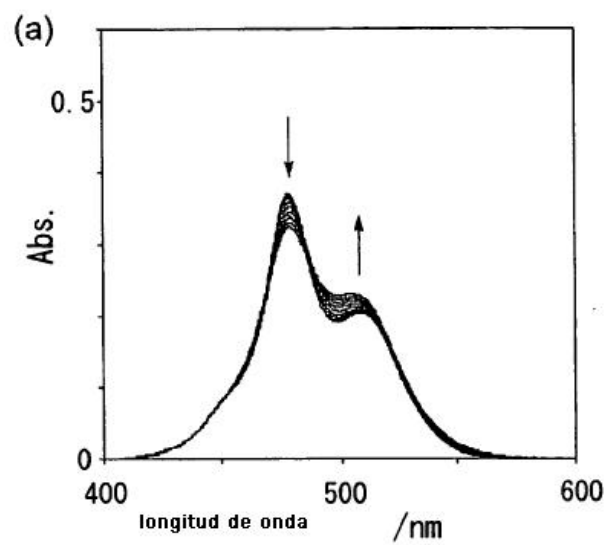


FIG. 20

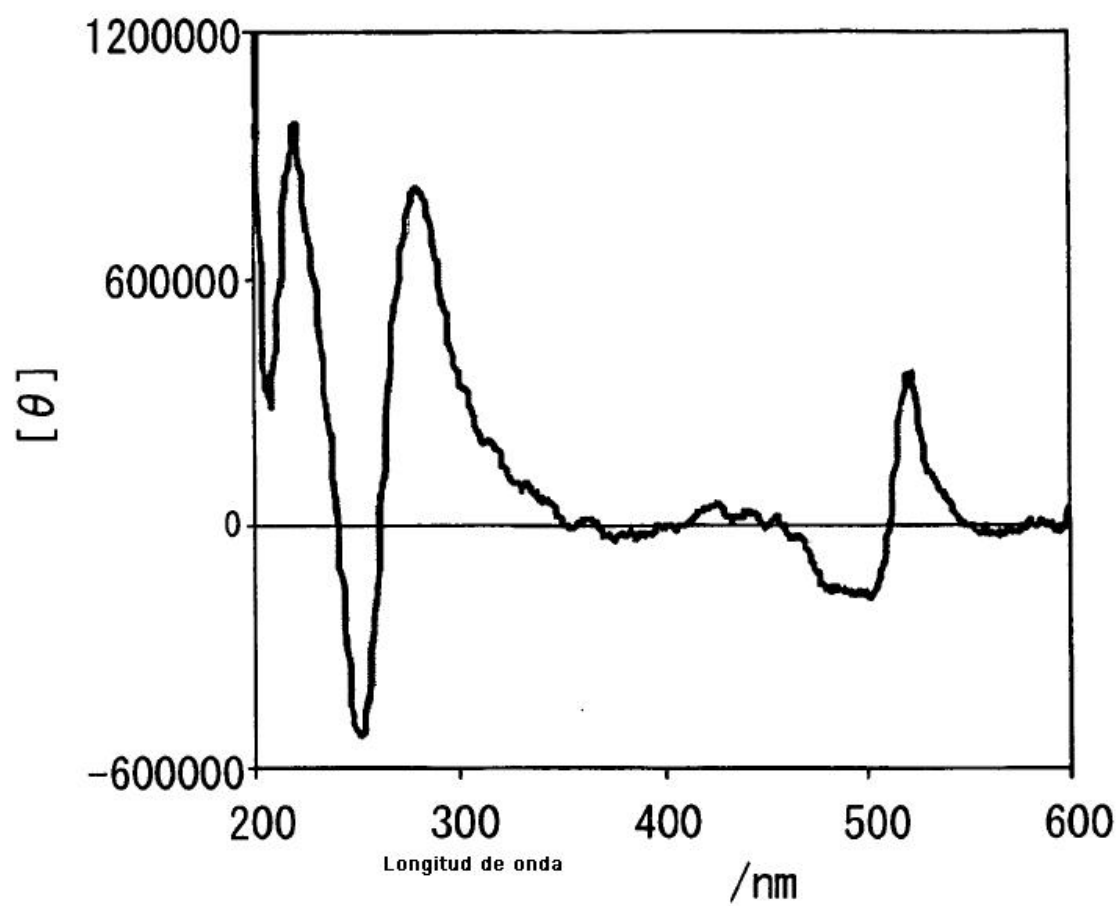


FIG. 21

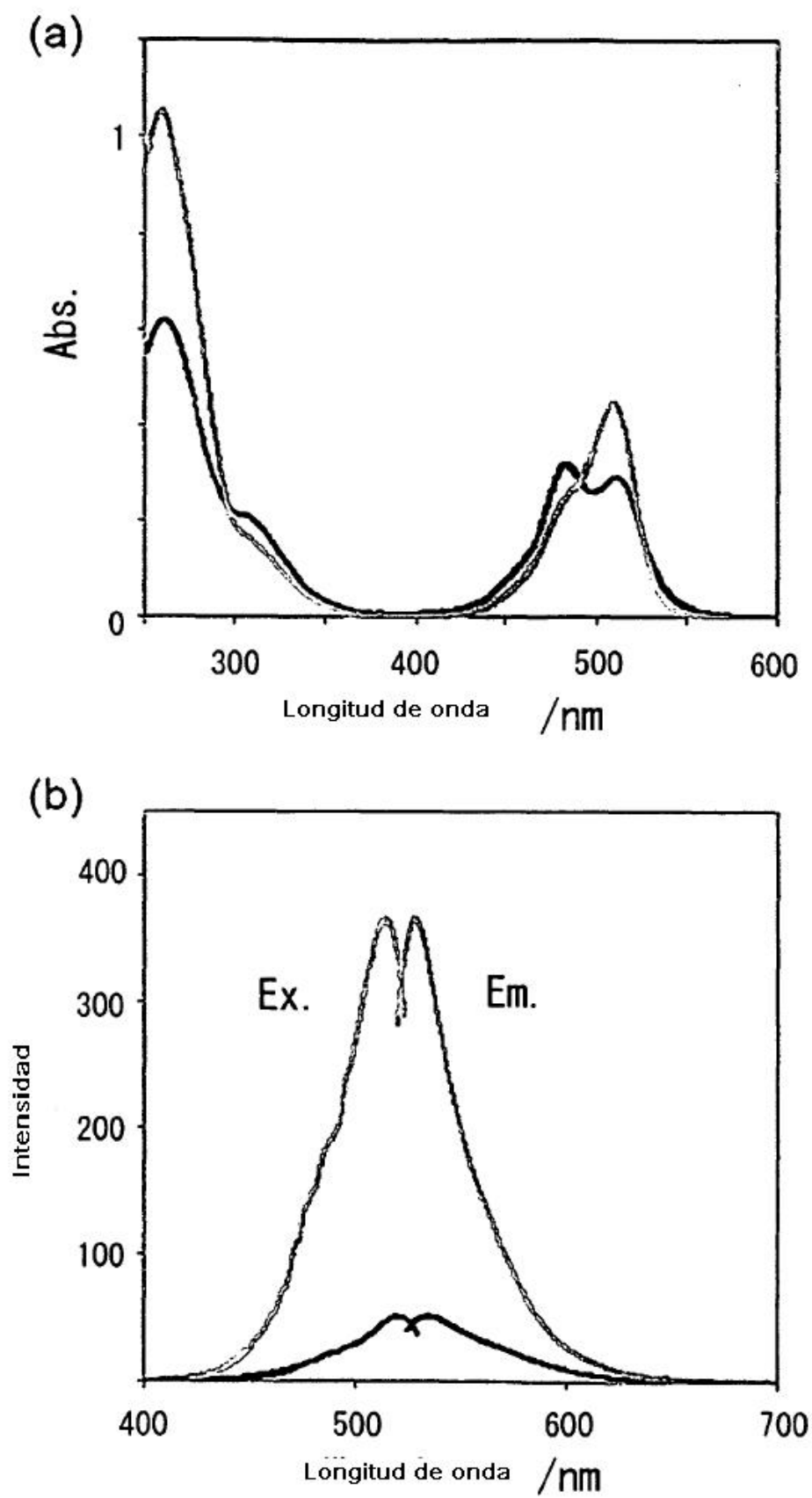


FIG. 22



FIG. 23

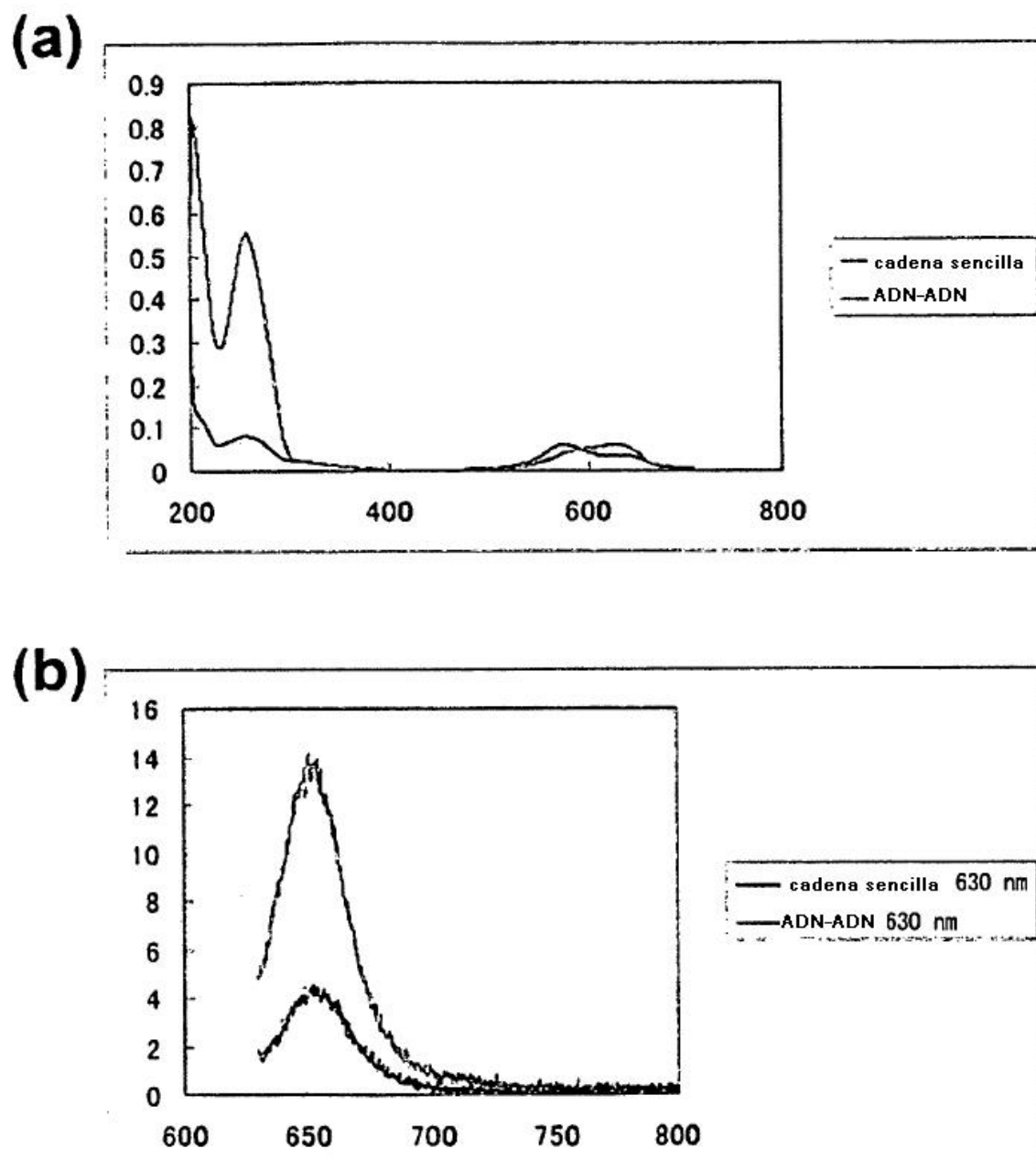


FIG. 24

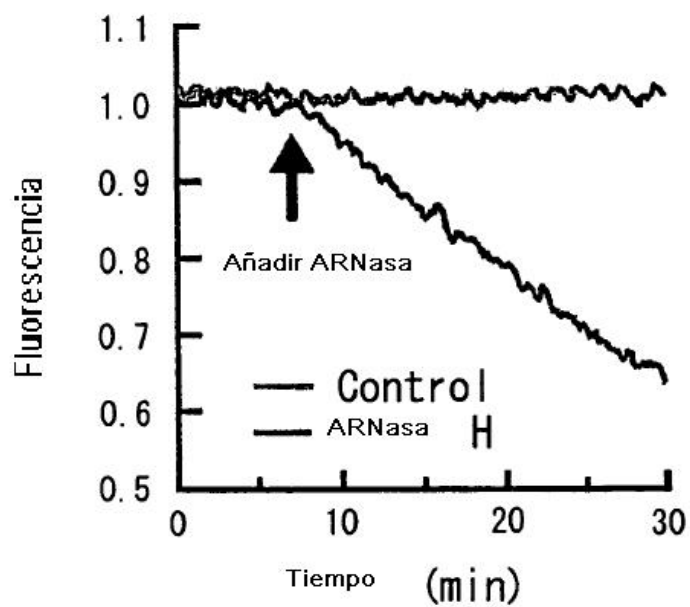


FIG. 25

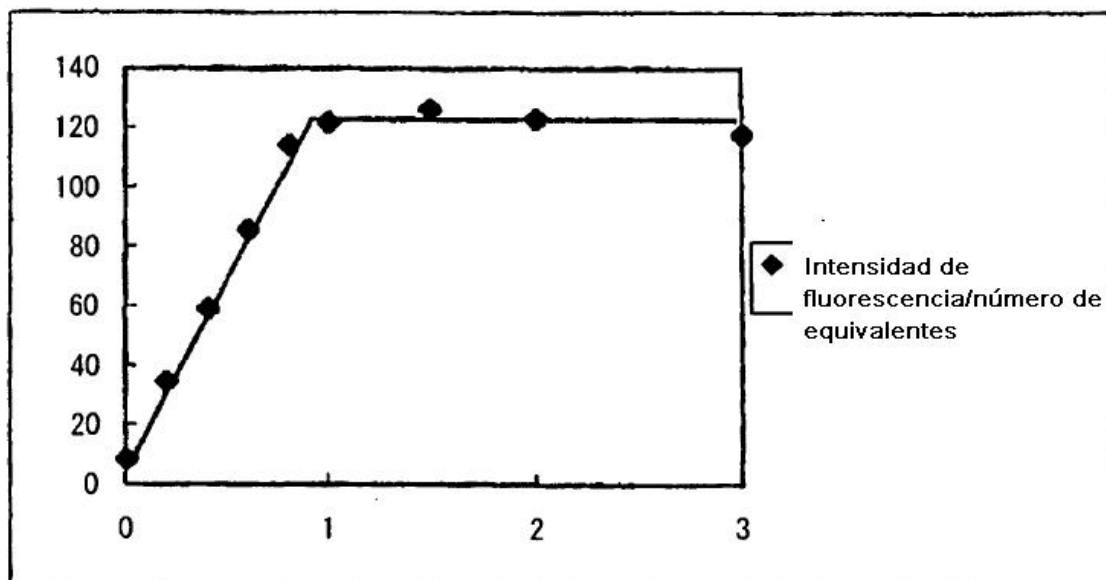


FIG. 26

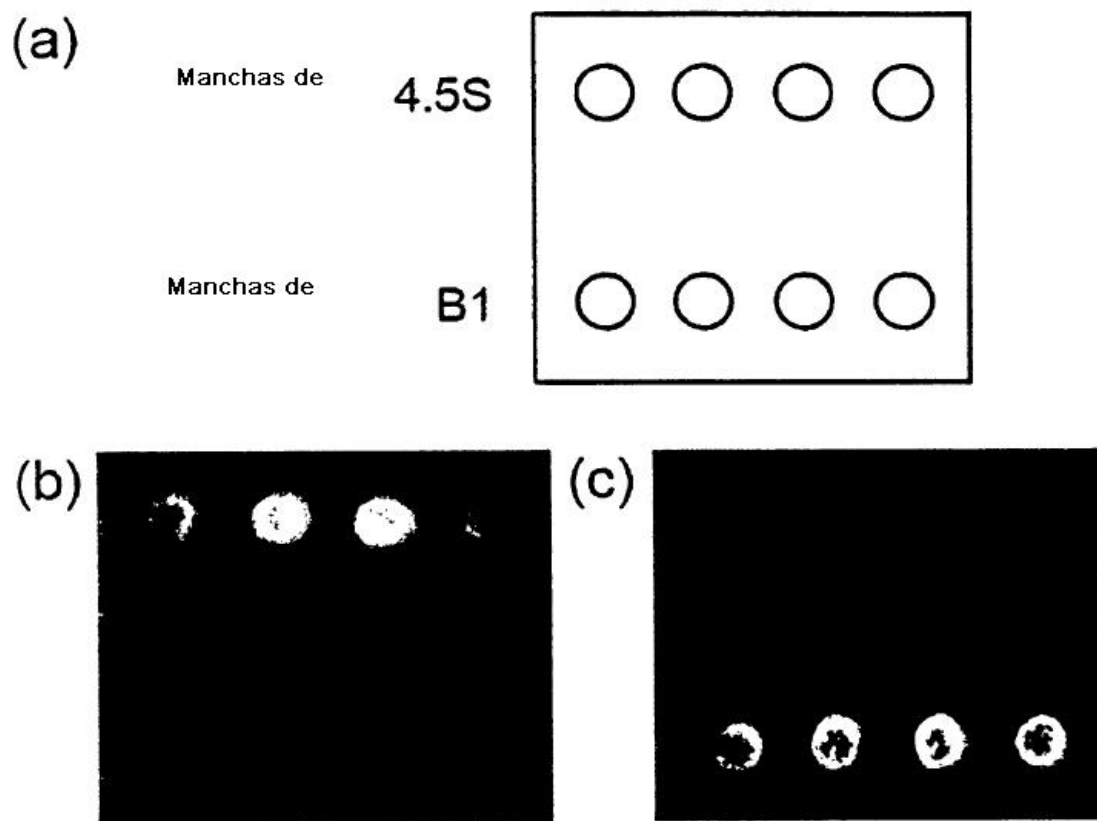


FIG. 27

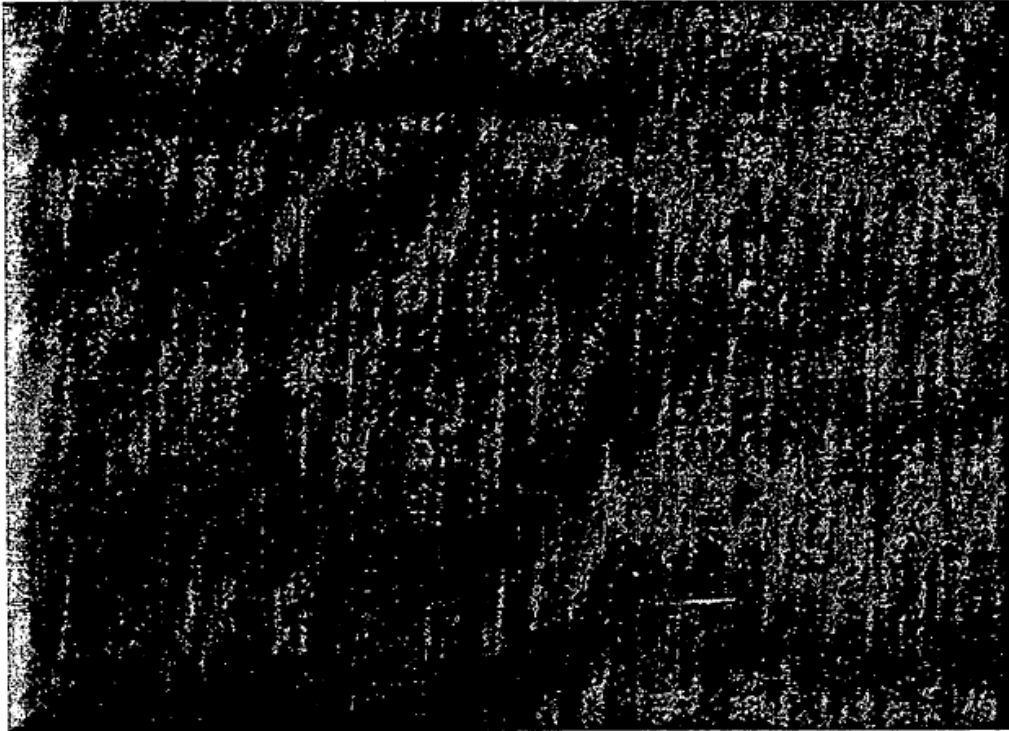


FIG. 28

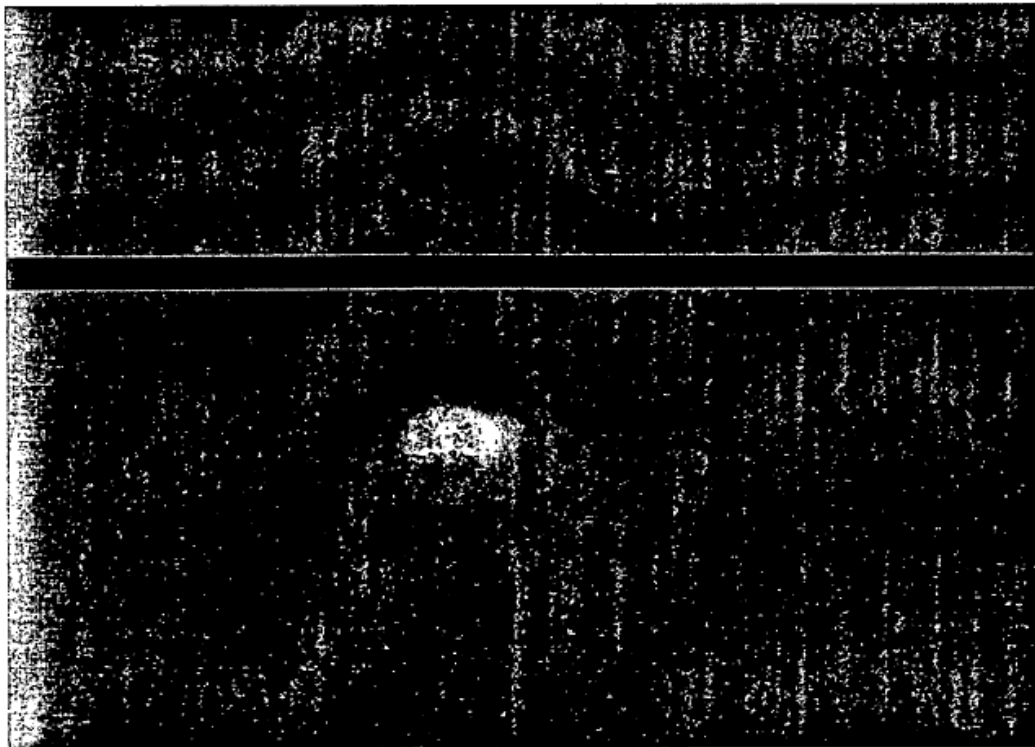


FIG. 29

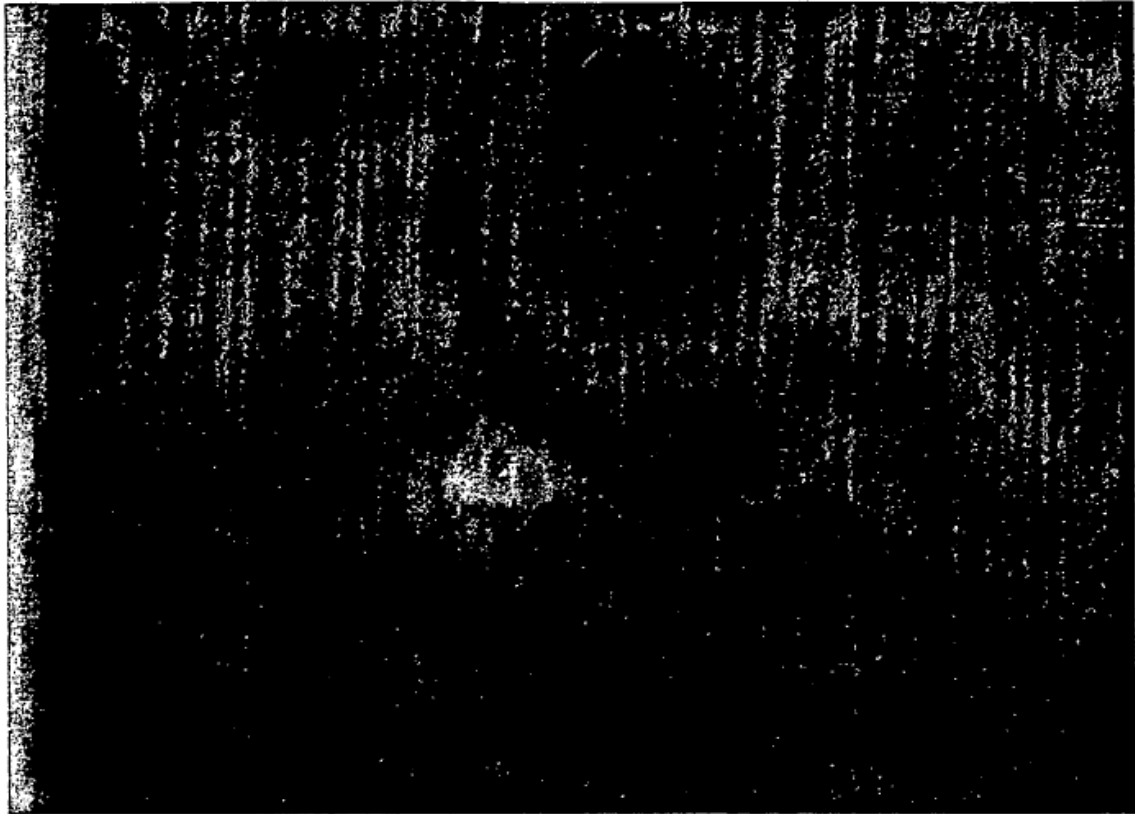


FIG. 30

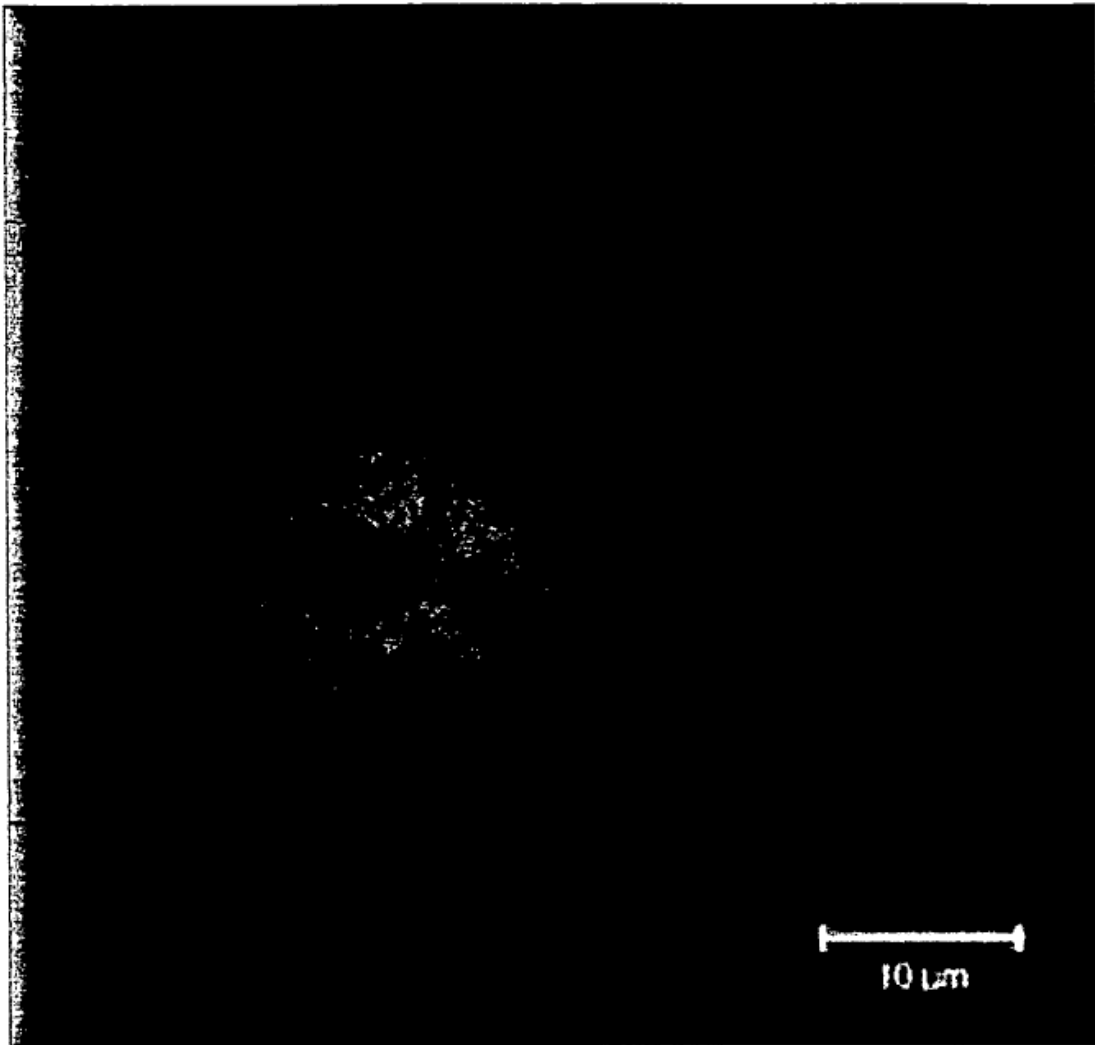


FIG. 31A



FIG. 31B

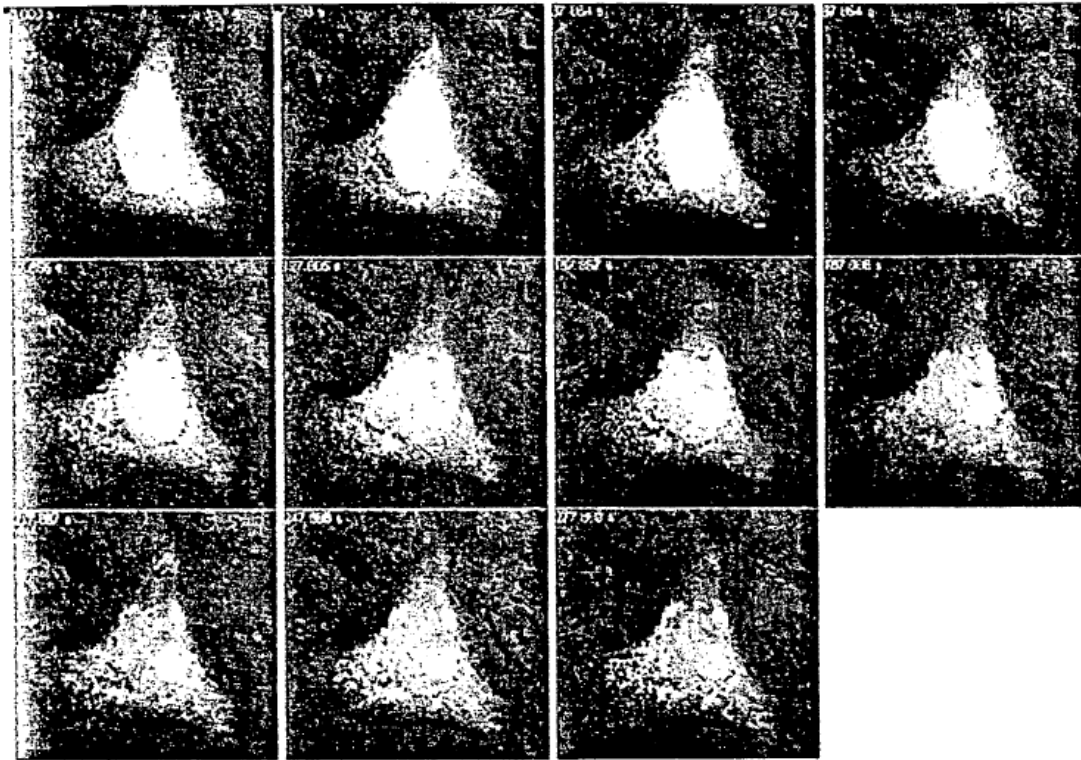


FIG. 32



FIG. 33