

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 530**

51 Int. Cl.:
C07D 401/04 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10013830 .4**
- 96 Fecha de presentación: **20.10.2010**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2336119**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2011**

54 Título: **Moléculas bloqueadoras de la fluorescencia así como los métodos y utilizaciones que las implican**

30 Prioridad:
20.10.2009 EP 09013202

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2012

73 Titular/es:
**F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:
**Josel, Hans-Peter;
Heindl, Dieter;
Herrmann, Rupert;
Bergmann, Frank;
Beckert, Rainer y
Welzel, Thomas**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 386 530 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas bloqueadoras de la fluorescencia así como los métodos y utilizaciones que las implican

5 La presente invención esta relacionada con nuevos derivados de piridinil-isoquinolina-diona, métodos para producir estos derivados, conjugados que comprenden a los nuevos derivados de piridinil-isoquinolina-diona y (i) un soporte sólido, o (ii) una biomolécula, métodos para producir estos conjugados así como el uso de estos conjugados como bloqueadores en la transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET).

10 [0002] La transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (abreviado FRET), también conocida como transferencia de energía por resonancia Förster (en honor a su descubridor Theodor Förster) es un mecanismo que describe la transferencia de la energía de excitación de una molécula a otra sin la necesidad de fluorescencia y re-
 15 absorción. De acuerdo con Förster, la transferencia de energía procedente a través del acoplamiento dipolo-dipolo de los dipolos de fluorescencia donadores con los dipolos de absorción aceptores. Así, el fenómeno de FRET es siempre una transferencia de energía no radiactiva. Un cromóforo donador, inicialmente en su estado electrónicamente excitado tras haber absorbido luz de una determinada longitud de onda puede transferir energía sin radiación a un aceptor, después de lo cual el aceptor se promueve a su estado electrónicamente excitado. Posteriormente, el estado electrónicamente excitado del aceptor se desintegra de forma que a su vez emite energía. La eficiencia de FRET depende de muchos parámetros que pueden agruparse como sigue: la distancia entre el
 20 donador y el aceptor; el solapamiento espectral del espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor; y la orientación relativa del momento de emisión del dipolo donador y el momento de absorción del dipolo aceptor.

25 En la tecnología convencional FRET el donador y el aceptor son ambos fluoróforos. En consecuencia, la energía absorbida por un fluoróforo donador como luz de una cierta longitud de onda (absorción de longitud de onda) se transfiere al aceptor. Mediante la absorción de la energía transferida el aceptor se promueve a un estado electrónicamente excitado que posteriormente desaparece mientras que la energía transferida al aceptor emite luz de una longitud de onda particular (emisión de longitud de onda). La longitud de onda de emisión cambia a una longitud de onda más larga en comparación con la longitud de onda de absorción. Cuando el donador y el aceptor
 30 están muy cercanos (por ejemplo, 1-10 nm) debido a la interacción de los cromóforos, la emisión del aceptor se observa de forma predominante debido a la FRET desde el donador al aceptor.

35 En consecuencia, el fenómeno de la FRET puede detectarse mediante un descenso en la fluorescencia del donador o un aumento en la fluorescencia del aceptor.

40 En una forma específica de FRET un bloqueador se aplica en lugar de un aceptor fluorescente (J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence, 2ª edición, Kluwer Academic Plenum Publishers, NewYork, 1999). Un bloqueador es una molécula que absorbe la energía transferida desde el donador (también denominado marcador) pero en lugar de emitir luz bloquea la fluorescencia. En consecuencia, en un sistema marcador-bloqueador, el donador transfiere la energía al bloqueador. Por lo tanto, el donador vuelve a su estado inicial y genera el estado excitado del bloqueador. Posteriormente, el estado excitado del bloqueador desaparece de forma no radiactiva (bloqueador oscuro). En una desintegración no radiactiva o desintegración oscura, la energía se desprende mediante vibraciones moleculares (calor). Ya que la concentración de bloqueadores en una sonda está normalmente en el rango de μM o inferior, el calor desintegración no radiactiva es demasiado pequeña para afectar a la temperatura de la solución. De acuerdo
 45 con la ecuación de Förster dicho bloqueo de la fluorescencia también depende de la distancia entre el donador y el aceptor. Al contrario que en la técnica FRET mencionada anteriormente, se mide solo la emisión del donador y no la del aceptor: cuantos más cromóforos se separan los unos de los otros, más débil es la transferencia de energía por lo que la fluorescencia del donador aumenta correspondientemente.

50 Hasta estos últimos años, los bloqueadores han sido normalmente colorantes fluorescentes, por ejemplo, fluoresceína como marcador y rodamina como bloqueador (sondas FAM/TAMRA). Uno de los bloqueadores mejor conocidos es TAMRA (tetrametilrodamina) que se utiliza para disminuir la emisión del colorante marcador. Debido a sus propiedades TAMRA es adecuado como bloqueador para FAM (carboxifluoresceína), HEX (hexaclorofluoresceína), TET (tetracloro-fluoresceína), JOE (5'-Dicloro-dimetoxifluoresceína) y colorantes Cy3 (cianina).
 55

60 La utilidad de TAMRA, sin embargo, es limitada debido a su amplio espectro de emisión que reduce sus capacidades en multiplexeado (cuando dos o más sondas marcador-bloqueador se utilizan a la vez). Su fluorescencia intrínseca contribuye a la señal de fondo que conduce a una disminución en la dinámica de la señal y así, reduce potencialmente la sensibilidad de los ensayos basados en TAMRA.

65 Los bloqueadores oscuros ofrecen una solución a este problema porque no ocupan una banda de emisión. Además, los bloqueadores oscuros permiten el multiplexeado. Un bloqueador oscuro típico es DABCILLO (ácido 4-[4-(dimetilamino)-fenil]-azo]-benzoico) que se utiliza a menudo en combinación con balizas moleculares. DABCILLO bloquea colorantes en un rango desde 380 a 530 nm. En consecuencia, incluso los fluoróforos con una emisión de longitud de onda más larga como los colorantes Cy3 pueden bloquearse mejor con DABCILLO. No obstante,

DABCILO posee una banda de absorción inadecuada que se solapa muy poco con los fluoróforos que emiten por encima de los 480 nm. Otro colorante no fluorescente es el bloqueador Eclipse® (4-[[2-cloro-4-nitro-fenil]-azo]-anilina, una marca de Epoch Biosciences, Inc., Corporation Delaware 21720, 23rd Drive NE, Suite 150, Bothell Washington 98021, EEUU) que posee un máximo de absorción a 530 nm y bloquea de forma eficiente en un espectro desde 520 a 670 nm.

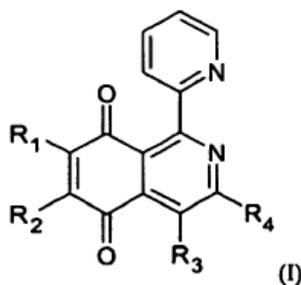
Una mejora sobre los bloqueadores oscuros mencionados anteriormente son los bloqueadores de agujero negro, como el BHQ-1 ([4-(2-nitro-4-metil-fenil)-azo]-il-((2-metoxi-5-metil-fenil)-azo))-anilina y BHQ-2 ([4-(1-nitro-fenil)-azo]-il-((2,5-dimetoxi-fenil)-azo))-anilina (todos disponibles en Biosearch Technologies, Inc.) que son capaces de bloquear a lo largo de todo el espectro visible. Estos aceptores no fluorescentes se aplican a menudo como alternativa a los aceptores fluorescentes para poder disminuir la fluorescencia de fondo y de esta manera la sensibilidad.

La desventaja de los bloqueadores no fluorescentes conocidos es, no obstante, su comportamiento de bloqueo insuficiente que resulta en un gran ruido de fondo que a su vez conduce a una dinámica de señal limitada.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos bloqueadores, preferiblemente con una señal de fondo baja y/o una eficiencia de bloqueo alta. Adicionalmente, en una realización preferible pueden acoplarse a biomoléculas o un soporte sólido para FRET.

Sorprendentemente, se ha encontrado que los derivados de piridinil-isoquinolina-diona presentan una señal de fondo baja y/o una eficiencia de bloqueo alta. Hasta ahora, esta clase de sustancias se ha descrito muy poco y solo para aplicaciones farmacéuticas (J. Med. Chem. 1991, 34, 1871-1879). Además, los derivados de difenilamino de esta clase de sustancias y derivados con grupos funcionales para acoplar a biomoléculas o un soporte sólido no son conocidos en la técnica.

En consecuencia, la presente invención esta relacionada con un compuesto para la fórmula I



en el que uno de R_1 y R_2 es hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o un halógeno, y el otro es $-Q-Y$, en el que Q es una cadena de hidrocarburo C_1-C_{10} recta o ramificada, saturada o insaturada, sustituida o sin sustituir y Y se selecciona de entre el grupo que consiste en hidroxilo, carboxilo, y amino; R_3 y R_4 están representados independientemente el uno del otro por $-NR_5R_6$, en el que R_5 y R_6 son independientemente el uno del otro hidrógeno o arilo sustituido o sin sustituir.

El término "alquilo" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a un residuo univalente que consiste en tan solo átomos de carbono e hidrógeno. Los alquilos forman series homólogas con la fórmula general C_nH_{2n+1} . El alquilo puede ser un alquilo recto o ramificado, por ejemplo el alquilo puede ser un alquilo secundario que está ramificado con el átomo de carbono central unido a los dos residuos de carbono o un alquilo terciario que está ramificado con el átomo de carbono central unido a tres residuos de carbono. El alquilo C_1-C_6 de fórmula (I) puede ser por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, terc-butilo, n-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 3-metilbut-2-ilo, 2-metilbut-2-ilo, 2,2-dimetil-propilo, n-hexilo, 2-metil-pentilo, 3-metil-pentilo, 2-dimetil-butilo, 3-dimetil-butilo, 4-dimetil-butilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,4-dimetilbutilo, o 3,4-dimetilbutilo, 2-etilbutilo, 3-etilbutilo, 2-metil-pentilo, o 3-metil-pentilo, preferiblemente metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, o terc-butilo, más adecuadamente metilo, etilo, o iso-propilo, y lo más adecuado metilo.

El término "halógeno" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a los residuos de flúor, cloro, bromo, yodo, y astatina, preferiblemente cloro y bromo.

La letra Q en el grupo $-Q-Y$ representa un "grupo de unión" que comprende de 1 a 10 átomos unidos de forma lineal y covalente. El término "grupo de unión" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y esta relacionado con una porción que se utiliza en la síntesis para la conexión de porciones más grandes. En consecuencia, en un primer aspecto el grupo divalente $-Q-$ se refiere a un grupo de unión que conecta el grupo funcional Y con la porción

piridinil-isoquinolin-diona. En un aspecto adicional y más importante, el grupo de unión Q se refiere al último grupo de unión en el conjugado de la presente invención en que el compuesto de la presente invención está acoplado a un soporte sólido o a una biomolécula, en el que el compuesto está acoplado al soporte o la biomolécula mediante el grupo de unión Q (tal como se ha explicado más abajo en más detalle).

En consecuencia, el término "grupo de unión" en el presente contexto también comprende el significado del término "enlazante" tal como lo conoce el experto en la materia. Por ejemplo, el grupo de unión puede comprender por completo átomos de hidrógeno y carbono de forma que de 1 a 10 átomos de carbono están conectados de forma lineal, o covalente, ya sea en forma de una cadena de hidrocarburos saturada o insaturada, sustituida o sin sustituir, ramificada o lineal.

En un ejemplo la cadena de 1 a 10 átomos del grupo de unión Q puede estar comprendida totalmente de hidrógeno y átomos de carbono en forma de una cadena de hidrocarburo saturada o insaturada, ramificada o lineal, sustituida o sin sustituir.

El término "cadena de hidrocarburo" en contexto con el grupo de unión se utiliza aquí como lo conoce el experto, y esta relacionada con un compuesto orgánico que consiste por completo de carbono e hidrógeno. En consecuencia, en el caso del grupo de unión que es una cadena de hidrocarburo, el grupo de unión puede ser un grupo alquileo divalente que puede estar representado por la fórmula $-(CH_2)_n-$, en el que n es un número entero en el rango de 1 a 10, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, un grupo alqueno divalente con uno o más dobles enlaces carbono-carbono y por ejemplo de 1 a 10 átomos de carbono, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono, o un grupo alquino divalente con uno o más triple enlaces carbono-carbono y por ejemplo de 1 a 10 átomos de carbono, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. En consecuencia, por ejemplo, Q puede ser un grupo alquileo divalente con 1 a 10 átomos de carbono, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, como n-decileno, n-nonileno, n-octileno, n-heptileno, n-hexileno, n-pentileno, n-butileno, n-propileno, n-etileno y metileno.

La cadena de hidrocarburo puede también estar ramificada con uno o más grupos alquilo, en el que el grupo alquilo puede ser metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, o terc-butilo.

Alternativamente o adicionalmente, la cadena de hidrocarburo puede también incluir un componente cíclico, como un grupo cicloalquileo o un grupo fenileno, en el que el término grupo fenileno utilizado es conocido por el experto en la materia y está relacionado con un grupo aromático divalente $-C_6H_4-$ que deriva de benceno. El término cicloalquileo se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con un residuo de hidrocarburo divalente cíclico, en el que el cicloalquileo puede ser ciclopropileno, ciclobutileno, ciclopentileno o ciclohexileno, preferiblemente ciclohexileno.

Dicha cadena de hidrocarburo puede también estar sustituida mediante por ejemplo átomos de halógeno o grupos hidroxilo. En consecuencia, desde 1 átomo de hidrógeno a todos los átomos de hidrógeno de la correspondiente cadena de hidrocarburo puede sustituirse mediante por ejemplo átomos de halógeno o un grupo hidroxilo.

El término "sustituido" en contexto con la definición del término grupo de unión se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con la sustitución de un átomo de hidrógeno de la cadena de hidrocarburo mediante un residuo monovalente, como halógeno, un grupo hidroxilo, grupo tiol, grupo amino, grupo metilo o etilo, en el que el término halógeno es como se ha definido anteriormente.

Además, el término "sustituido" también se refiere a la sustitución de dos átomos de hidrógeno mediante un átomo de oxígeno bajo la formación de un grupo carbonilo mediante la sustitución de dos átomos de hidrógeno en un solo átomo de carbono o mediante la formación de un grupo epóxido mediante la sustitución de dos átomos de hidrógeno en dos átomos de carbono adyacentes.

Finalmente, el término "sustituido" puede también referirse a la sustitución de uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, o como mucho 4, unidades de metileno $(-CH_2-)$ de la cadena de hidrocarburo mediante el correspondiente número de átomos divalentes o grupos de átomos, como un grupo que contiene azufre, oxígeno, o nitrógeno como $-NH-$ o $-NR-$, en el que R es por ejemplo metilo o etilo.

Por ejemplo, el grupo de unión puede contener al menos un enlace éter mediante la sustitución de una unidad de metileno por oxígeno. En consecuencia, el grupo de unión puede contener, por ejemplo, al menos una unidad de etilenglicol del tipo $-(O-CH_2-CH_2)_n-$, en la que la n es un número entero en el rango de 1 a 3, y así, para n=3 el grupo de unión puede considerarse como una cadena corta de polietilenglicol. Como ejemplo adicional, el grupo de unión puede también contener uno o dos enlaces éster o amida. La incorporación de al menos un grupo éster y/o al menos un grupo amida está recomendada para poder obtener un grupo de unión más rígido.

El término "sin sustituir" en contexto con la definición del término grupo de unión se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con una cadena de hidrocarburo que consiste totalmente de carbono e hidrógeno.

El término "lineal" en contexto con la definición del término grupo de unión se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con un grupo de unión en el que los miembros del grupo de unión que son al menos divalentes y poseen al menos dos átomos adyacentes están dispuestos en una línea recta. En consecuencia, los términos "lineal" y "recto" se utilizan de forma equivalente en el contexto de la presente invención.

El término "átomos conectados de forma lineal, covalente" en contexto con la definición del término grupo de unión se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con un grupo de unión en el que los miembros del grupo de unión están conectados a través de enlaces covalentes y en los que estos miembros conectados covalentemente están dispuestos en una línea recta. Los enlaces covalentes pueden ser enlaces únicos carbono-carbono, enlaces dobles carbono-carbono, o enlaces triples carbono-carbono. Como ejemplo adicional los átomos de carbono y heteroátomos como los grupos que contienen oxígeno, azufre o nitrógeno como -NH- o -NR-, en el que R es por ejemplo metilo o etilo, están covalentemente conectados de forma lineal. De forma adecuada, el término "átomos conectados linealmente, covalentemente" en contexto con la definición del término grupo de unión es una cadena que contiene de 1 a 20 átomos.

El término "ramificado" en contexto con la definición del término grupo de unión se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a la presencia de una cadena lateral en la cadena principal de la molécula o porción. En consecuencia, un grupo de unión ramificado puede ser una cadena de hidrocarbano tal como se ha definido anteriormente con uno o más grupos alquilo como cadena lateral, en el que el grupo alquilo es metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, o terc-butilo, de forma preferible un grupo metil o etilo. En la cadena de hidrocarbano ramificada representada por Q de uno a todos los átomos de carbono pueden tener uno o más grupos alquilo tal como se ha definido anteriormente.

El término "saturado" en contexto con la definición del término grupo de unión se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con un grupo de unión en el que todos los miembros del grupo están conectados con el (los) correspondiente(s) átomo(s) adyacente(s) a través de enlaces sencillos. En consecuencia, una cadena de hidrocarbano saturada está representada por la fórmula $-(CH_2)_n$ con n siendo un número entero en el rango de 1 a 10. De forma similar, una cadena corta de polietilenglicol del tipo $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ o una cadena corta de sulfuro de polietileno del tipo $-(S-CH_2-CH_2)_n-$, en la que n es un número entero en el rango de 1 a 3 está saturada. De forma alternativa o adicional, una cadena corta de polietilenimina del tipo $-(NH-CH_2-CH_2)_n-$, en la que n es un número entero en el rango de 1 a 3 también es un ejemplo de grupo de unión saturado.

El término "insaturado" en contexto con la definición del término grupo de unión se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a un grupo de unión, por ejemplo, una cadena de hidrocarbano en la que no todos los átomos de carbono está totalmente saturados con hidrógeno u otros átomos.

Como ejemplo, la cadena de hidrocarbano puede tener uno o más dobles o triples enlaces, en el que el término "doble enlace" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con un enlace de dos átomos a través de dos pares de electrones. De forma similar, el término "triple enlace" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con un enlace de dos átomos a través de tres pares de electrones. El grupo de unión puede tener al menos un doble enlace, en consecuencia, el grupo de unión Q puede ser una cadena de hidrocarbano con uno, dos o más dobles enlaces carbono-carbono. Como ejemplo, el grupo de unión Q puede ser una cadena de hidrocarbano que está comprendida por completo de dobles enlaces alternos de carbono-carbono del tipo $-CH=CH-CH=CH-$. De forma alternativa, el grupo de unión puede estar comprendido por completo de dobles enlaces acumulativos carbono-carbono, y así, el grupo de unión puede estar representado por $-(CH=CH)_n-$, en el que n es un número entero en el rango de 1 a 5, es decir, 1, 2, 3, 4 o 5. En otro ejemplo de cadena de hidrocarbano insaturada, uno o ambos átomos de carbono del doble enlace carbono-carbono pueden tener un grupo alquilo, en el que el término grupo alquilo es como se ha definido anteriormente, siendo preferiblemente metilo. En otro ejemplo, solamente cada segundo doble enlace carbono-carbono puede tener un grupo alquilo, preferiblemente un grupo metilo, comparable a la cadena de hidrocarbano de los carotenoides.

Además, los dobles enlaces carbono-carbono pueden ser independientemente entre ellos cis o trans, respectivamente Z o E. Los términos cis y Z respecto al doble enlace carbono-carbono se utilizan como lo conoce el experto en la materia y están relacionados con un isómero en el que ambos sustituyentes o átomos de hidrógeno, respectivamente, están en el mismo lado del doble enlace. Los términos trans y E respecto al doble enlace carbono-carbono se utilizan como lo conoce el experto en la materia y están relacionados con un isómero en el que ambos sustituyentes o átomos de hidrógeno están cada uno en lados diferentes del doble enlace, comparable a la cadena de hidrocarbano de los carotenoides.

En otro ejemplo, la cadena de hidrocarbano puede tener uno o más enlaces triples. En consecuencia, la cadena de hidrocarbano puede tener de una a doce enlaces triples carbono-carbono. El grupo de unión puede estar comprendido por completo de enlaces triples alternados o acumulativos carbono-carbono. También, la cadena de hidrocarbano de forma simultánea puede tener doble enlace carbono-carbono y triple enlace carbono-carbono. La incorporación de al menos un doble enlace carbono-carbono y/o al menos un triple enlace carbono-carbono en el grupo de unión puede ser deseable, si se pretende rigidez del grupo de unión debido a la pérdida de la rotación libre de los enlaces múltiples carbono-carbono.

El término "grupo funcional" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a cualquiera de las numerosas combinaciones de átomos que forma partes de moléculas químicas, que experimentan reacciones características en ellas, y que en muchos casos influye en la reactividad del resto de la molécula. Los grupos funcionales típicos son hidroxilo, carboxilo, aldehído, carbonilo, amino, azida, alquinilo, tiol y nitrilo. Estos grupos pueden también derivarse de acuerdo con los métodos tal como lo conoce el experto en la materia. En consecuencia, un grupo funcional puede también ser un grupo hidroxilo que ha sido derivado, por ejemplo con cloruro de tosilo en un grupo tosilo que es un buen grupo saliente en las reacciones nucleofílicas, o el grupo funcional puede también ser por ejemplo un haluro de ácido carboxílico, o un éster de N-hidroxisuccinimida o una fosforamidita. Las fosforamiditas pueden formarse directamente mediante la reacción con un grupo hidroxilo o mediante el uso de enlazantes trifuncionales (Gen Probe PE 313219). El compuesto de la presente invención puede estar acoplado a una biomolécula o a un soporte sólido mediante el grupo funcional.

Dependiendo de la naturaleza del soporte sólido o de la biomolécula a la que el compuesto de la presente invención se acoplará al grupo funcional debe escogerse en consecuencia. En general, el grupo funcional deberá escogerse de forma que coincide con la reactividad del correspondiente grupo funcional del soporte sólido o de la biomolécula con la que el grupo funcional del compuesto de la presente invención se pretende reaccionar para poder formar un enlace. Por ejemplo, si el grupo funcional del compuesto de la presente invención es un grupo nucleofílico, como un amino, o grupo hidroxilo el correspondiente grupo del soporte sólido o de la biomolécula es en principio un grupo electrofílico, como un carbonilo, aldehído, átomo de halógeno, haluro de ácido carboxílico o un grupo carboxilo. En otro ejemplo, un grupo hidroxilo como grupo nucleofílico representativo puede derivarse mediante la reacción con cloruro de tosilo o anhídrido trifluoroacético a un grupo tosilo o un grupo triflato que son ambos excelentes grupos salientes en reacciones de sustitución nucleofílicas.

El término "derivación" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con un derivado de un compuesto químico, en el que empezando a partir del compuesto químico el derivado se forma a menudo en solo una reacción. Así, el derivado tiene una relación química cercana a la del compuesto químico de partida. De forma similar, un éster del ácido carbónico NHS es una forma derivada de un ácido carboxílico obtenido a través del tratamiento de un ácido carboxílico con N-hidroxisuccinimida y DCC (diciclohexol-carbodiimida). Un grupo nitrilo puede reducirse a un grupo amino a través de la hidrogenación de paladio sobre carbono como catalizador de la hidrogenación e hidrógeno o cualquier fuente de hidrógeno que proporcione hidrógeno. Para evitar cualquier reacción secundaria, la correspondiente reacción de derivación se realizará antes de acoplar el compuesto de la presente invención con el soporte sólido o la biomolécula.

R₃ y R₄ están representados independientemente el uno del otro por -NR₅R₆, en el que R₅ y R₆ son independientemente el uno del otro hidrógeno o arilo sustituido o sin sustituir. El término "-NR₅R₆" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con un grupo amino primario, secundario o terciario dependiendo de sus sustituyentes R₅ y R₆. Si ambos sustituyentes R₅ y R₆ son átomos de hidrógeno, el correspondiente grupo -NR₅R₆ es un grupo amino primario, si uno de R₅ y R₆ es hidrógeno y el otro un arilo sustituido o sin sustituir entonces -NR₅R₆ es un grupo amino secundario y si R₅ y R₆ son ambos grupos arilo sustituidos o sin sustituir entonces -NR₅R₆ es un grupo amino terciario. R₃ y R₄ están representados independientemente el uno del otro por -NR₅R₆. En consecuencia, R₃ y R₄ pueden tener cada uno diferentes sustituyentes representados por R₅ y R₆. Como ejemplo, R₃ puede tener -NR₅R₆ con R₅ y R₆ siendo ambos hidrógeno, y R₄ puede tener -NR₅R₆ con R₅ siendo hidrógeno y R₆ siendo un arilo sin sustituir. En otro ejemplo, R₃ puede tener -NR₅R₆ con R₅ y R₆ siendo ambos arilos sin sustituir mientras que R₄ puede tener -NR₅R₆ con ambos R₅ y R₆ siendo arilos sustituidos.

El término "arilo" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a un residuo aromático que contiene únicamente átomos de carbono e hidrógeno, como un residuo de fenilo (C₆H₅-), naftilo (C₁₀H₇-) o antraceno (C₁₄H₉-). El arilo puede estar sustituido o sin sustituir con por ejemplo grupos alquilo, como metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, o terc-butilo; o átomos de halógeno, como bromuro, cloruro, o fluoruro.

Tal como se ha explicado en más detalle anteriormente, Y en el grupo -Q-Y representa un grupo funcional. En el contexto de la presente invención ejemplos de grupos funcionales son hidroxilo, carboxilo, y amino. En consecuencia, en un ejemplo de la invención el grupo Y del compuesto de fórmula I se selecciona de entre el grupo que consiste en hidroxilo, carboxilo, amino, azida, alquinilo, fosforamidita, y éster de NHS.

En otra realización de la invención el grupo Q del compuesto de fórmula I es una cadena C₂-C₈ de hidrocarbano recta o ramificada, saturada o insaturada, sustituida o sin sustituir, por ejemplo una cadena C₂-C₅ de hidrocarbano, como una cadena de hidrocarbano C₃, C₄, o C₅, y de forma adecuada una cadena de hidrocarbano C₄; y/o el grupo Y del compuesto de fórmula I es un grupo hidroxilo o carboxilo.

El término "hidrocarbano" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a un residuo orgánico que consiste por completo de hidrógeno y átomos de carbono. El término "cadena" además del término "hidrocarbano" se utiliza aquí en su sentido más común y en contexto con el término "hidrocarbano" se refiere a residuos de hidrocarbano no cíclicos. En contexto con el compuesto de fórmula I la cadena de hidrocarbano,

representada por Q, está conectada con el derivado de piridinil-isoquinolinadiona con su extremo final y está terminado por el grupo funcional Y en su otro extremo. La cadena de hidrocarbano puede ser recta o ramificada.

5 El término "saturado" en contexto con la cadena de hidrocarbano se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a una cadena saturada de hidrocarbano que consiste por completo de una estructura de carbono con enlaces sencillos que está saturada con enlaces de hidrógeno. El término "insaturado" en contexto con la cadena de hidrocarbano se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a una cadena insaturada con uno o más doble o triple enlaces entre los átomos de carbono. El término "sustituido" en contexto con la "cadena de hidrocarbano" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a una cadena de hidrocarbano en que uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos mediante por ejemplo uno o más átomos de halógeno, o uno y más grupos hidroxilo o uno o más grupos alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, como metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, o terc-butilo.

15 En otra realización preferible de la invención R₃ y/o R₄ de fórmula I de la presente invención es/son -NR₅H, adecuadamente en la que R₅ es un residuo fenilo sustituido o sin sustituir. En consecuencia, en un caso R₃ y R₄ son ambos -NR₅H y en otro caso R₃ o R₄ es -NR₅H. Además, R₅ adecuadamente es un grupo fenilo. El término "fenilo" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y está relacionado con un residuo que deriva del residuo benceno, y por lo tanto se refiere al grupo químico C₆H₅.

20 En una realización preferible de la invención cada uno de R₃ y R₄ del compuesto de fórmula I es -NR₅R₆, preferiblemente -NR₅H. En consecuencia, R₃ y R₄ del compuesto de fórmula I son preferiblemente -NR₅H.

25 En una realización más preferible de la invención cada uno de R₃ y R₄ del compuesto de fórmula I es -NR₅R₆, preferiblemente -NR₅H, en el que R₅ es arilo sin sustituir o sustituido, preferiblemente sustituido con alquilo C₁-C₄, más preferiblemente sustituido con metilo. En consecuencia, R₃ y R₄ preferiblemente son -NR₅H con R₅ siendo arilo sin sustituir o metil arilo sustituido.

30 En una realización más preferible de la invención R₃ y/o R₄ del compuesto de fórmula I es/son -NR₅H, en el que R₅ es un residuo fenilo o toluilo sin sustituir o sustituido. El residuo fenilo puede estar sustituido por un grupo alquilo, como metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, o terc-butilo. En consecuencia, el fenilo sustituido puede ser un toluilo.

35 En otra realización preferible de la invención arilo es un residuo hidrocarbano aromático C₆H₅, C₁₀H₇, o C₁₄H₉, como fenilo, naftilo, o antraceno, preferiblemente un residuo hidrocarbano aromático C₆H₅ o C₁₀H₇, y más preferiblemente un residuo hidrocarbano aromático C₆H₅. En consecuencia, el residuo fenilo, naftilo, o antraceno puede estar sin sustituir o sustituido con átomos de halógeno, como bromo, cloro, o fluor, preferiblemente bromo o cloro, o con grupos alquilo, como metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo o terc-butilo. Son adecuados los grupos fenilo sustituidos por alquilo, como toluilo.

40 En aún otra realización preferible de la invención uno de R₁ y R₂ es un residuo 1-hidroxi-4-etil-butilo o un residuo n-pentanoico y el otro es hidrógeno; y R₅ es un residuo 4-toluilo o fenilo. Son compuestos adecuados en los que uno de R₁ y R₂ es un residuo 1-hidroxi-4-etil-butilo y el otro es hidrógeno, y R₅ es un residuo 4-toluilo; o uno de R₁ y R₂ es un residuo 1-hidroxi-4-etil-butilo y el otro es hidrógeno, y R₅ es fenilo; o uno de R₁ y R₂ es un residuo de ácido n-pentanoico y el otro es hidrógeno, y R₅ es un residuo 4-toluilo; tal como se ha definido en los ejemplos.

45 El término "residuo 1-hidroxi-4-etil-butilo" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a una cadena de hidrocarbano del tipo HO-(CH₂)₃CH(C₂H₅)- que está conectado con su posición 4 a la porción quinolinadiona del compuesto de fórmula I.

50 El término "residuo 4-toluilo" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere al grupo -C₆H₄(CH₃), derivado de tolueno, y que en el contexto de la presente invención está conectado al átomo de nitrógeno del grupo -NR₅R₆ de R₃ y R₄ en su posición 1.

55 El término "residuo de ácido n-pentanoico" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a un residuo recto del tipo -(CH₂)₄-COOH que deriva del ácido n-pentanoico, también conocido como ácido n-valérico.

60 Para observar el fenómeno de la FRET, el donador y el aceptor, respectivamente el bloqueador, debe llevarse muy cerca. Por lo tanto, el bloqueador no fluorescente puede estar unido a la biomolécula o a un soporte sólido mediante un brazo enlazante, como la porción de unión Q tal como se ha definido anteriormente. La longitud de cada brazo enlazante puede ser importante, ya que el brazo enlazante afectará a la distancia entre las porciones donadora y aceptora. La longitud de un brazo enlazante con el propósito de la presente invención es la distancia en Ångstroms desde el bloqueador a la biomolécula o al soporte sólido. El brazo enlazante puede ser del tipo descrito en WO 84/03285. También se describen en WO 84/03285 y PE 313219 los métodos para unir los brazos enlazantes a bases de nucleótido particulares, y también para unir porciones fluorescentes a un brazo enlazante.

65 En consecuencia, en una realización preferible de la invención Y es capaz de unirse a (i) un soporte sólido, como un

transportador, una cuenta, o un disco; o (ii) una biomolécula, como un ácido nucleico, o una proteína.

El término "soporte sólido" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a cualquier material inorgánico u orgánico insoluble e inerte, por ejemplo material inorgánico, que de forma adecuada posea una gran superficie a la que las moléculas orgánicas de superficie puedan unirse a través de la formación de enlaces o absorbidas a través de interacciones electrónicas o estáticas como a través de la formación de enlaces a través de un grupo funcional Y tal como se ha definido anteriormente. Ejemplos representativos de un "soporte sólido" en contexto con la presente invención son silicatos, como una resina de SiO₂, como una resina de intercambio de iones, vidrio, dextranos, celulosas o polímeros hidrofílicos o hidrofóbicos.

El término "transportador" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a una sustancia normalmente inactiva que actúa como un soporte sólido para el compuesto de la invención.

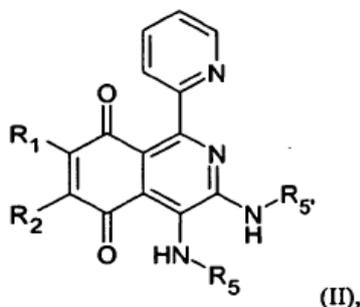
El término "cuenta" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a cualquier objeto pequeño esencialmente esférico hecho de material orgánico o inorgánico o que puede estar cargado y/o magnetizado de forma adecuada con una gran área de superficie a la que las moléculas orgánicas de superficie puedan unirse a través de la formación de enlaces o absorbidas a través de interacciones electrónicas o estáticas. Ejemplos representativos de una "cuenta" en contexto con la presente invención puede estar hecha de silicatos, como resina de SiO₂, como una resina de intercambio de iones, vidrio, dextranos, celulosas o polímeros hidrofílicos o hidrofóbicos. El término "disco" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a cualquier objeto delgado, plano con una superficie que es plana y aproximadamente redonda, que posea de forma adecuada una gran superficie de área a la que las moléculas orgánicas de superficie puedan unirse a través de la formación de enlaces o absorbidas a través de interacciones electrónicas o estáticas. Ejemplos representativos de un "disco" en contexto con la presente invención puede estar hecho de silicatos, como resina de SiO₂, como una resina de intercambio de iones, vidrio, dextranos, celulosas o polímeros hidrofílicos o hidrofóbicos.

El término "transportador" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a una sustancia normalmente inactiva que actúa como vehículo de una sustancia activa.

El término "biomolécula" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a cualquier molécula orgánica que está producida por un organismo vivo o por cualquier derivado producido de forma artificial de dichos compuestos, incluyendo moléculas poliméricas grandes como proteínas, polisacáridos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y oligonucleótidos así como moléculas pequeñas como metabolitos primarios, metabolitos secundarios, y productos naturales.

El término "ácido nucleico" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a una macromolécula compuesta de cadenas de nucleótidos monoméricos, en los que cada nucleótido consiste de tres componentes: una base nitrogenada heterocíclica, que puede ser una purina o pirimidina; un azúcar pentosa; y un grupo fosfato. El término "proteína" se utiliza aquí como lo conoce el experto en la materia y se refiere a compuestos orgánicos hechos de aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y unidos juntos mediante enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de los residuos de aminoácidos adyacentes. Los péptidos también están dentro de la definición.

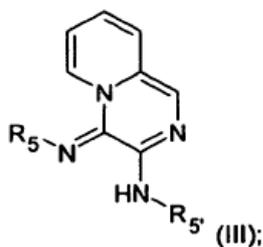
Además, la presente invención está relacionada con un método para producir un compuesto de fórmula II



el método comprende los pasos de:

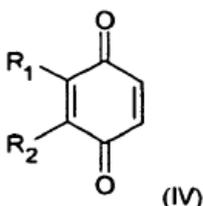
a) reaccionar una diamida de ácido oxálico disustituida de fórmula R₅- N=C(OH)- C(OH)=N- R₅' con pentacloruro de fósforo para obtener un cloruro de bis-imidoilo de ácido oxálico con la fórmula R₅- N=C(Cl)- C(Cl)=N- R₅';

b) reaccionar el cloruro de bis-imidoilo del ácido oxálico obtenido en el paso a) con 2-amino metilpiridina para obtener una pirido[1,2-a]pirazina disustituida de fórmula III



y c) hacer reaccionar la pirido[1,2-a]pirazina disustituida obtenida en el paso b) con una quinona mono-sustituida de fórmula IV

5



para obtener el compuesto de fórmula II,

10 en el que R_1 , R_2 , R_5 son como se ha definido anteriormente para el compuesto de la presente invención, siempre que sea aplicable, y en el que R_5 , se define como R_5 tal como se ha definido anteriormente para el compuesto de la presente invención, siempre que sea aplicable.

15 En el paso a) del método detallado anteriormente para producir un compuesto de fórmula II normalmente, 1 equivalente de una diamida de ácido oxálico disustituida de fórmula $R_5-N=C(OH)-C(OH)=N-R_5'$ en el que R_5' se define como R_5 tal como se ha definido anteriormente para el compuesto de la presente invención, siempre que sea aplicable se suspende con aproximadamente 2 equivalentes de pentacloruro de fósforo en tolueno seco y la suspensión se somete a reflujo hasta obtener una solución clara amarilla oscura y la evolución de gas se completó. Tras completar la evolución de gas el solvente se evaporó al vacío y el residuo se recrystalizó a partir de por ejemplo n-heptano para obtener un cloruro de bis-imidoilo de ácido oxálico de la fórmula $R_5-N=CCl-CIC=N-R_5'$.

20 En el paso b) 1 equivalente de 2-amino metilpiridina junto con aproximadamente 2 equivalentes de trietilamina se disolvieron en THF y la solución obtenida se mezcló por ejemplo por goteo con una solución de aproximadamente de 1 equivalente del correspondiente cloruro de bis-imidoilo del ácido oxálico como la obtenida en el paso a). Entonces la solución obtenida se sometió a reflujo durante por ejemplo aproximadamente 4 horas y tras enfriar la solución, el solvente se evaporó al vacío. El residuo se lavó con por ejemplo un poco de metanol y después el residuo se recrystalizó a partir de acetonitrilo o THF para proporcionar la pirido [1,2-a]pirazina disustituida de fórmula III.

25 En el paso c) 1 equivalente de la quinona mono-sustituida de fórmula IV y aproximadamente 1 equivalente de la pirido[1,2-a]pirazina de fórmula III como la obtenida en el paso b) se disuelven en por ejemplo cloruro de metileno seco. La solución obtenida puede por ejemplo someterse a reflujo durante normalmente de 5 a 12 horas o la solución puede agitarse a temperatura ambiente durante normalmente de 2 a 3 días. El progreso de la reacción puede monitorizarse por ejemplo utilizando una cromatografía de capa fina. Tras completar la reacción, la mezcla de reacción se evaporó hasta la sequedad y se purificó por ejemplo utilizando cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyendo con por ejemplo tolueno/ éster de ácido acético o cloroformo/metanol) para obtener el compuesto de fórmula II. Se observó la formación de los regioisómeros, los residuos R_1 y R_2 se permutaron. De forma alternativa, la reacción también puede realizarse en tolueno. La reacción procede más rápido en este solvente, no obstante, se observa de forma simultánea un aumento en la cantidad de productos secundarios.

35 Los ejemplos preferibles se ejemplifican también en los Ejemplos.

40 Las biomoléculas que poseen un bloqueador tal como se detalla anteriormente son de particular interés como herramienta moderna en los ensayos FRET. En este contexto, el término biomolécula se utiliza aquí tal como se ha explicado anteriormente. En un ensayo FRET representativo la puede analizarse unión de dos moléculas o polímeros como una enzima y un sustrato. En dicho proceso un fluoróforo y un bloqueador están conectados a partes particulares de las dos moléculas de polímeros. Tras la ausencia de un espectro de emisión del fluoróforo debido al bloqueo que involucra al mecanismo de FRET, puede detectarse la formación del correspondiente complejo. De forma similar, la acción específica de las biomoléculas puede investigarse más profundamente

45

utilizando bloqueadores FRET. Este ejemplo se ilustra además en base a la cercanía de las denominadas chaperonas que tienen forma de barril "recipiente de reacción" en las que se pliegan proteínas específicas (véase H.S. Rye, *Methods* 24 (2001), 278). El "recipiente" (GroEL) posee un "tapón" (GroES) que se coloca sobre el recipiente en un proceso dependiente de ATP. GroEL se ha proporcionado con un fluoróforo y GroES se ha proporcionado con un bloqueador. En presencia de ATP el espectro de fluorescencia de la muestra que contiene la chaperona cambia de forma significativa debido al bloqueo que involucra a FRET. En ausencia de ATP se mide es espectro de emisión del fluoróforo mientras que en presencia de ATP cuando el "recipiente" está cerrado con el "tapón" y así, fluoróforo y bloqueador están cercanos entre ellos, la fluorescencia del fluoróforo está al menos parcialmente e idealmente totalmente bloqueado.

La tecnología FRET puede también aplicarse para diseñar oligonucleótidos que se van a utilizar como sondas de (hibridación). El diseño de los oligonucleótidos que se van a utilizar como sondas (hibridación) pueden realizarse de forma similar al diseño de los cebadores, aunque los miembros de un par de sondas preferiblemente hibridado con un producto de amplificación dentro de unos pocos, por ejemplo no más de 5 nucleótidos del otro, en la misma cadena de forma que pueda ocurrir transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET) (por ejemplo, en no más de 1, 2, 3, o 4 nucleótidos del otro). Este mínimo grado de separación normalmente lleva a las correspondientes porciones fluorescentes en una cercanía suficiente para que ocurra la FRET. Además, las sondas pueden diseñarse para hibridar a las dianas que contienen una mutación o polimorfismo, permitiendo así la detección diferencial de por ejemplo ácidos nucleicos específicos basados en una hibridación absoluta de diferentes pares de sondas que corresponden a por ejemplo cada tipo particular de ácido nucleico a distinguir o temperaturas de fusión diferencial de por ejemplo, miembros de una pareja de sondas y cada producto de amplificación generado a partir de por ejemplo un ácido nucleico específico.

Tal como se utiliza aquí, "amplificar" se refiere a los procesos de síntesis de ácidos nucleicos que son complementarios a una o ambas cadenas de un molde de ácido nucleico. La amplificación de un ácido nucleico normalmente incluye la desnaturalización de un molde de ácido nucleico, la hibridación de los cebadores al ácido nucleico a una temperatura que está por debajo de las temperaturas de fusión de los cebadores, y elongar de forma enzimática los cebadores para generar un producto de amplificación. Los pasos de desnaturalización, hibridación y elongamiento pueden realizarse una vez. En general, no obstante, los pasos de desnaturalización, hibridación y elongamiento se realizan múltiples veces de forma que la cantidad de producto de amplificación aumenta, a menudo de forma exponencial. La amplificación normalmente requiere la presencia de desoxiribonucleósidos trifosfato, una enzima de polimerasa de DNA (por ejemplo, polimerasa Taq) y un tampón apropiado y/o cofactores para una actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, $MgCl_2$ y/o KCl).

Un formato común de ácido nucleico basado en la tecnología FRET utiliza dos sondas de hibridación, en la que una sonda está marcada con un fluoróforo y la otra sonda está marcada con un bloqueador y en el que las sondas están generalmente diseñadas para hibridar en cercana proximidad entre ellas en una molécula de DNA (por ejemplo, un producto de amplificación). No obstante, un formato de FRET alternativo utiliza sondas de hidrólisis para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación. Esta tecnología utiliza una sonda de hibridación de una cadena con una porción fluorescente y una porción bloqueadora. Cuando la porción fluorescente está excitada con luz de una longitud de onda adecuada la energía absorbida se transfiere al bloqueador de acuerdo con los principios de FRET después de lo cual se bloquea la fluorescencia. Durante el paso de hibridación de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la sonda de hidrólisis marcada se une al DNA diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada mediante la actividad exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq durante la posterior fase de elongación. Como resultado, la porción fluorescente excitada y la porción de bloqueo pasan a estar espacialmente separadas entre ellas. Como consecuencia, tras la excitación del fluoróforo cuando no hay un bloqueador cercano, puede detectarse la emisión de fluorescencia. A modo de ejemplo, un Sistema ABI® PRISM 7700 de Detección de Secuencias (marca registrada de Applied Biotechnology Institute, Inc. Corporación Iowa, Edificio 36, Cal Poly State Universidad San Luis Obispo, California 93407, USA) utiliza la tecnología de sonda de hidrólisis. Información sobre la amplificación por PCR y la detección utilizando un Sistema ABI® PRISM 7700 puede encontrarse en <http://www.appliedbiosystems.com/products>.

Otro formato que también involucra la transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia es la conocida LightCycler® HybProbe® (ambas marcas registradas de Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (DE)). En esta tecnología dos sondas de oligonucleótido específicas de secuencia están marcadas con diferentes tinciones (donador y aceptor), y se añaden a la mezcla de reacción junto con los cebadores de PCR. Durante la fase de hibridación, las sondas HybProbe hibridan a las secuencias diana sobre el fragmento amplificado de DNA en una disposición cabeza-cola, acercando por lo tanto a los dos colorantes. El colorante donador (fluoresceína) se excita mediante el LED azul. Mientras los dos colorantes están cerca el uno del otro (15 nucleótidos), la energía emitida por el colorante donador excita al colorante aceptor en el segundo HybProbe, que emite entonces luz fluorescente en una longitud de onda diferente. Esta fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de DNA diana generado durante la PCR. Las sondas HybProbe se desplazan durante los pasos de elongación y desnaturalización.

En consecuencia, la fluoresceína o JA270 como donador y las moléculas bloqueadoras de la fluorescencia de la presente invención como aceptor pueden utilizarse en las tecnologías que involucran FRET, como la tecnología

explicada anteriormente.

5 Las balizas moleculares junto con FRET pueden también utilizarse para detectar la presencia de un producto de
amplificación utilizando los métodos de PCR a tiempo real. La tecnología de balizas moleculares utiliza una sonda
de hibridación marcada con un fluoróforo y un bloqueador, en el que los marcajes están normalmente localizados al
final de cada sonda. La tecnología de baliza molecular utiliza una sonda de oligonucleótidos que posee secuencias
que permiten la formación de estructuras secundarias (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación
10 de una estructura secundaria en la sonda, el fluoróforo y el bloqueador están en una proximidad espacial cuando la
sonda está en solución. Tras la hibridación con los ácidos nucleicos diana (es decir, los productos de amplificación),
la estructura secundaria de la sonda se rompe y el fluoróforo y el bloqueador se separan entre ellos y así, tras la
excitación con luz de una longitud de onda adecuada, la emisión del fluoróforo puede detectarse.

15 Finalmente, ya que la eficiencia de FRET depende significativamente de la distancia entre el fluoróforo y el
bloqueador puede aplicarse para determinar la distancia entre dos áreas específicas en una molécula particular, en
la que un área se ha marcado con un fluoróforo y la otra área se ha marcado con el bloqueador.

Debido a las desventajas de conjugados conocidos de bloqueadores existe una necesidad para un conjugado de
comprender un bloqueador adecuado para los ensayos FRET y una biomolécula.

20 Además, existe también una necesidad para un conjugado que comprende un bloqueador adecuado para ensayos
FRET y un soporte sólido, para poder facilitar la separación del bloqueador de una solución, por ejemplo a partir de
la solución de una sonda. En este contexto, un conjugado que comprende el compuesto de la presente invención y
un soporte sólido es beneficioso con respecto a los métodos de separación, como la filtración o separación que
25 involucra la migración en un campo eléctrico o separación que involucra las partículas cargadas en un campo
magnético.

En consecuencia, el compuesto de la presente invención puede también ser parte de un conjugado que comprende
el compuesto de la presente invención y un soporte sólido. Tal como se ha detallado anteriormente el compuesto de
la presente invención contiene el grupo - Q- Y, en el que Q es un grupo de unión y Y es un grupo funcional. De
30 forma similar, tal como se ha detallado anteriormente, el grupo funcional Y que está conectado con el grupo de unión
Q puede reaccionar con un grupo funcional coincidente del soporte sólido o de la biomolécula para formar un nuevo
enlace. A través de este enlace recién formado, el grupo de unión conecta el compuesto de la presente invención
con el soporte sólido o con la biomolécula.

35 Por lo tanto, la presente invención también está relacionado con un conjugado que comprende el compuesto de
acuerdo con la presente invención y (i) un soporte sólido, como un transportador, una cuenta, o un disco; o (ii) una
biomolécula, como un ácido nucleico, o una proteína, en el que el compuesto está acoplado al soporte o a la
biomolécula mediante el grupo de unión Q.

40 Los términos "soporte sólido", "transportador", "cuenta", "disco", "biomolécula", y el "grupo funcional Y" en contexto
con el conjugado de la presente invención puede ser tal como se ha definido anteriormente en el contexto de
realizaciones preferibles del compuesto de la presente invención.

45 Además, para obtener el conjugado de la presente invención que comprende el compuesto de la invención y (i) un
soporte sólido, como un transportador, una cuenta, o un disco; o (ii) una biomolécula, como un ácido nucleico, o una
proteína, existe una necesidad de producir los conjugados de la presente invención.

50 En consecuencia, la presente invención también está relacionada con un método para producir el conjugado de
acuerdo con la presente invención, que comprende la unión de un compuesto de la presente invención a (i) un
soporte sólido, como un transportador, una cuenta, o un disco; o (ii) una biomolécula, como un ácido nucleico, o una
proteína.

55 Los términos "soporte sólido", "transportador", "cuenta", "disco" "biomolécula", "ácido nucleico" y "proteína" en
contexto con el método de la presente invención para producir el conjugado de acuerdo con la presente invención
son tal como se ha definido anteriormente.

60 Ya que el conjugado comprende el compuesto de la presente invención que puede utilizarse como bloqueador, el
conjugado por sí mismo también puede utilizarse como bloqueador. En consecuencia, el conjugado que comprende
el compuesto de la presente invención y (i) una biomolécula, como un ácido nucleico, o una proteína; o (ii) un
soporte sólido, como un transportador, una cuenta, o un disco puede utilizarse como un bloqueador de un donador
fluorescente.

65 Por lo tanto, la invención también está relacionada con el uso de un compuesto de acuerdo con la presente
invención o de un conjugado que comprende el compuesto de la presente invención y (i) un soporte sólido, como un
transportador, una cuenta, o un disco; o (ii) una biomolécula, como un ácido nucleico, o una proteína, en el que el
compuesto está acoplado al soporte o la biomolécula mediante el grupo de unión Q como bloqueador de un donador

fluorescente.

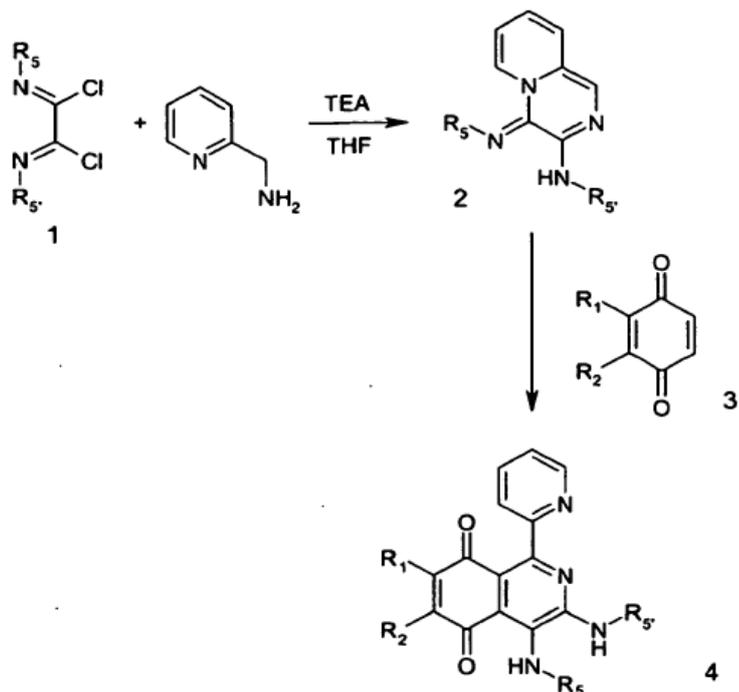
5 Ya que el conjugado de la presente invención que comprende el compuesto de la presente invención y (i) un soporte sólido, como un transportador, una cuenta, o un disco; o (ii) una biomolécula, como un ácido nucleico, o una proteína puede utilizarse como bloqueador de un donador fluorescente, este conjugado puede también utilizarse como bloqueador en la transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET).

10 En consecuencia, la presente invención también está relacionada con el uso de un conjugado que comprende el compuesto de acuerdo con la presente invención y (i) un soporte sólido, como un transportador, una cuenta, o un disco; o (ii) una biomolécula, como un ácido nucleico, o una proteína, en la que el compuesto está acoplado al soporte o la molécula orgánica mediante el grupo de unión Q, en le que el conjugado se utiliza como bloqueador en la transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET), por ejemplo tal como se ha detallado anteriormente.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de ejemplos de compuestos bloqueadores

20 El esquema de reacción de más abajo ilustra la ruta de reacción general para producir el compuesto de fórmula I.



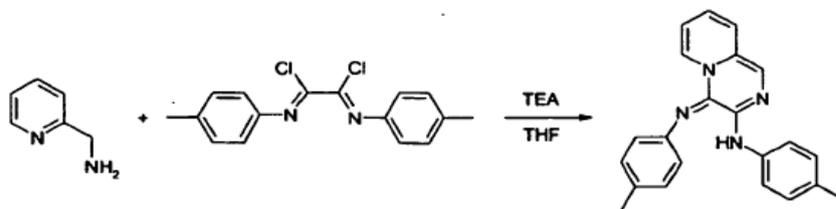
| Compuesto | R_1 | R_2 | $R_5 = R_{5'}$ |
|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------|
| 4a (TWDQ9 A) | $(CH_2)_4COOH$ | H | 4-toluido |
| 4b (TWDQ9 B) | H | $(CH_2)_4COOH$ | 4-toluido |
| 4c (TWDQ11 A) | $(CH_2)_4COOH$ | H | fenilo |
| 4d(TWDQ11 B) | H | $(CH_2)_4COOH$ | fenilo |
| 4e (TWDQ8 A) | $CH(CH_2CH_3)(CH_2)_3COOH$ | H | 4-toluido |
| 4f (TWDQ8 B) | H | $CH(CH_2CH_3)(CH_2)_3COOH$ | 4-toluido |
| 4g(TWDQ10 A) | $CH(CH_2CH_3)(CH_2)_3COOH$ | H | fenilo |
| 4h(TWDQ10 B) | H | $CH(CH_2CH_3)(CH_2)_3COOH$ | fenilo |

Preparación de cloruro de bis-imidoilo de ácido oxálico (1):

25 La diamida del ácido oxálico (20 mmol) se suspendió con pentacloruro de fósforo (40 mmol) en tolueno seco (200) y se sometió a reflujo hasta que se obtuvo una solución clara amarilla oscura y se completó la evolución de gas. Tras completar la reacción, el solvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo se recrystalizó a partir de n-heptano.

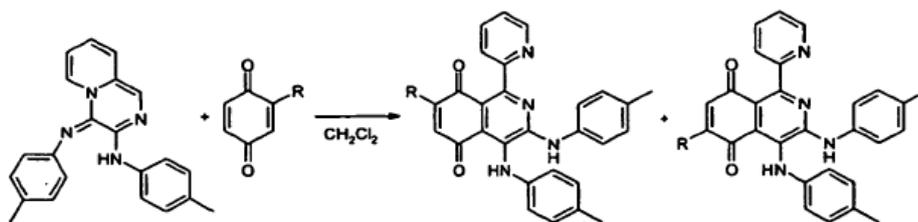
Pirido[1,2-a]pirazina (2):

5 Se disolvió 2-aminometil piridina (10 mmol) junto con trietilamina (20 mmol) en THF (50 ml) y una solución del correspondiente cloruro de bis-imidoilo (10 mmol) se añadió por goteo. Entonces la solución se sometió a reflujo durante alrededor de 4 h y tras enfriar el solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se lavó con un poco de metanol frío y posteriormente, el residuo se recrystalizó a partir de acetonitrilo o THF.



Reacción del componente quinolina con pirido[1,2-a]pirazina (4a/b):

10 Se disolvió la quinona (1 equivalente) y pirido[1,2-a]pirazina (1 equivalente) en diclorometano seco (sin atmósfera inerte) (alrededor de 30 ml de solvente/1 mmol de quinona) y se sometió a reflujo durante varias horas (normalmente de 3 a 12 h) o se agitó a temperatura ambiente (normalmente 2-3 días). El progreso de la reacción se monitorizó utilizando cromatografía en capa fina. Tras completar la reacción, la mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad y se purificó utilizando cromatografía en columna (SiO₂/tolueno: acetato de etilo o cloroformo/metanol). Se formaron dos regioisómeros, por ejemplo TWDQ 9 A y B. De forma alternativa, la reacción se realizó en tolueno, en la que la reacción progresó más rápido, no obstante se observó una mayor cantidad de productos secundarios.



20 2-(ω-carboxi-butyl)-1,4-benzoquinona: precursor de TWDQ 9

Una solución de peroxodisulfato de amonio (27 mmol) en 25 ml de agua se añadió por goteo bajo agitación vigorosa durante 45 min a una temperatura de 60-65°C a una solución de 1,4-benzoquinona (20 mmol), ácido adipínico (40 mmol) y nitrato de plata (6 mmol) en 40 ml de agua. La agitación continuó durante 10 minutos y después la solución se enfrió hasta 0°C, se filtró y el residuo se extrajo con benceno en un aparato Soxhlet.

25 Rendimiento: alrededor de 35-40%, bibliografía: 42%

Punto de fusión: 108-109°C

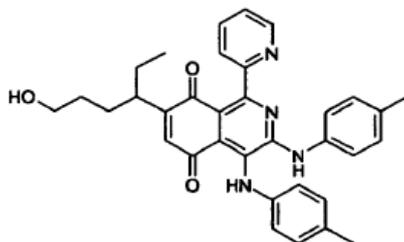
30 2-(1-etil-4-hidroxibutil)-1,4-benzoquinona: precursor de TWDQ 10 y TWDQ 8

Mientras se agitaba a 60°C, se añadió una solución de peroxodisulfato de sodio (0,01 mol) en agua (10 ml) a una mezcla heterogénea de nitrato de plata (0,2 g) en agua (40 ml) y 1,4-benzoquinona (0,01 mol) y 1-hexanol (0,04 mol) en hexano (5 ml). La extracción con dietil éter seguida de la vaporización al vacío proporcionó un residuo que se purificó utilizando cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyendo con hexano/dietiléter).

35 Isoquinolina-quinonas:

40 TWDQ 8B (asignación de los regioisómeros no clara debido a la pérdida de análisis de la estructura cristalina de rayos X)

45

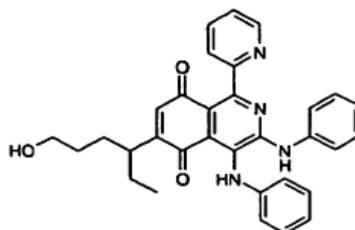
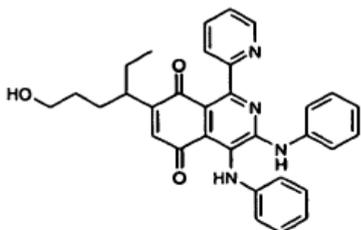


Rendimiento: alrededor de 65% para ambos isómeros

5 1H-RMN (250 MHz en CDCl₃): 0,85 (t, 3H); 1,25 (t, 2H); 1,53-1,63 (m, 4H); 2,25 (s, 3H); 2,34 (s, 3H); 2,36 (s, 1H); 2,95 (m, 1H); 3,60 (t, 2H); 6,59 (s, 1H); 6,90-7,26 (m, 9H); 7,35 (t, 1H); 7,60 (d, 1H); 7,86 (t, 1H); 8,63 (d, 1H); 10,47 (s, 1H) UV/Vis (en CHCl₃): λ_{max} (lgε) = 586 nm (3,9)

EM (DEI) = 546 (M⁺)

10 TWDQ 10A y B (asignación de los regioisómeros no clara debido a la pérdida de análisis de la estructura cristalina de rayos X)



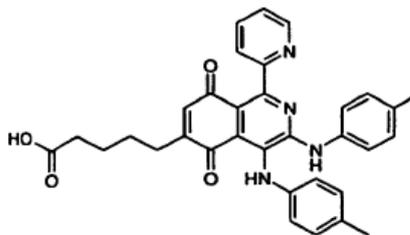
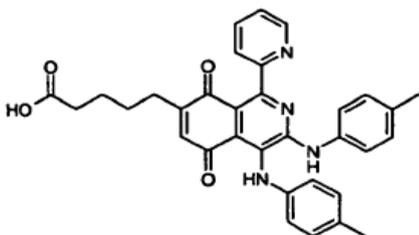
15 TWDQ 10A

Rendimiento: alrededor de 25%

20 1H-RMN (250 MHz en CDCl₃): 0,70 (t, 3H); 0,83 (d, 2H); 1,51-1,61 (m, 4H); 2,36 (s, 1H); 2,88 (m, 1H); 3,51 (t, 2H); 6,64 (s, 1H); 3,90-7,30 (m, 12H); 7,67 (d, 1H); 7,88 (t, 1H); 8,56 (d, 1H); 70,27 (s, 1H) UV/Vis (en CHCl₃): λ_{max} (lgε) = 550 nm (3,9) EM (DEI) = 518 (M⁺) TWDQ 10B

25 Rendimiento: alrededor de 40% 1H-RMN (en CDCl₃): 0,84 (t, 3H); 0,90 (d, 2H); 1,51-1,61 (m, 4H); 2,37 (s, 1H); 2,88 (m, 1H); 3,51 (t, 2H); 6,61 (s, 1H); 7,00-7,39 (m, 12H); 7,63 (d, 1H); 7,86 (t, 1H); 8,63 (d, 1H); 10,35 (s, 1H) UV/Vis (en CHCl₃): λ_{max} (lgε) = 555 nm (3,9) EM (DEI) = 518 (M⁺)

TWDQ 9A y B (asignación de los regioisómeros no clara debido a la pérdida de análisis de la estructura cristalina de rayos X)



30 TWDQ 9A

Rendimiento: alrededor de 20%

35 1H-RMN (250 MHz en CDCl₃): 1,27 (m, 2H); 1,64 (m, 2H); 2,26 (s, 3H); 2,30 (s, 3H); 2,34 (m, 2H); 2,47 (m, 2H); 6,65 (s, 1H); 6,90-7,30 (m, 9H); 7,42 (t, 1H); 7,72 (d, 1H); 7,95 (t, 1H); 8,76 (d, 1H); 10,45 (s, 1H) UV/Vis (en CHCl₃): λ_{max}

(lgε) = 558 nm (3,9) EM (DEI) = 546 (M+)

TWDQ 9B

5 Rendimiento: alrededor de 35%

1H-RMN (250 MHz en CDCl₃): 1,26 (m, 2H); 1,60 (m, 2H); 2,24 (s, 3H); 2,28 (s, 3H); 2,31 (m, 2H); 2,45 (m, 2H); 6,60 (s, 1H); 6,90-7,25 (m, 9H); 7,35 (t, 3H); 7,60 (d, 1H); 7,85 (t, 1H); 8,64 (d, 1H); 10,41 (s, 1H) UV/Vis (en CHCl₃): λ_{max} (lgε) = 568 nm (3,9) EM (DEI) = 546 (M+)

10 Éster de TWDQ 9-NHS

15 El educto se disolvió en DMF (25 mg en 3 ml) y se añadieron 6 mg de N-hidroxisuccinimida, 15 mg de HBTU y 11 ml de morfolino-etil-isocianuro. La solución se agitó durante 3 h. Tras la evaporación la mezcla bruta se purificó mediante HPLC preparativa. Rendimiento: 81 %

Ejemplo 2: Utilización de ejemplos de compuestos bloqueadores en un ensayo FRET

20 La eficiencia de bloqueo de TWDQ9 se evaluó en un ensayo de PCR Lambda de DNA a tiempo real aplicando tecnología de detección de sondas de hidrólisis.

1. Síntesis de cebadores de DNA Lambda

25 Los cebadores se sintetizaron en un sintetizador de DNA ABI® 394 (marca registrada de Applied Biotechnology Institute, Inc. Corporación Iowa, Edificio 36, Cal Poly State Universidad San Luis Obispo, California 93407, USA) en una escala de 1 mmol utilizando la química estándar de fosforamidita (todos los reactivos están disponibles por ejemplo de Sigma-Aldrich o Glen Research). Los cebadores se desprotegeron con hidróxido de amonio a 55°C durante 8 horas. La solución de amoniaco se evaporó y el oligonucleótido crudo se purificó utilizando una columna HPLC de intercambio aniónico fuerte con un gradiente lineal de cloruro de sodio, a un pH alto. Las fracciones que contenían el producto de oligonucleótido se juntaron, desalaron y formularon en Tris 10 mM, pH 8,0. Se determinó la pureza y la densidad óptica.

| | | |
|------------------------|-------------------------|------------------|
| Lambda cebador directo | AACAAAAACGGGGTTTACCTTA | Id. de Sec. Nº 1 |
| Lambda cebador reverso | GTCGCTTTTGTCTGTCCACAGTA | Id. de Sec. Nº 2 |

35 2. Síntesis de sondas de hidrólisis de bloqueo Lambda DNA BHQ2 (referencia)

40 Las sondas de hidrólisis se sintetizaron en un sintetizador de DNA AB® 394 (marca registrada de Applied Biotechnology Institute, Inc. Corporación Iowa, Edificio 36, Cal Poly State Universidad San Luis Obispo, California 93407, USA) en una escala de 1 mmol utilizando la química estándar de fosforamidita. Al margen de las fosforamiditas dT estándar tac-dA, tac-dC y tacdG se utilizaron fosforamiditas de desoxinucleótidos protegidas (Sigma-Aldrich, Nº de cat. T111031, A112031, C112031, G112031). Además, se incorporaron marcajes fosforamidita JA270 (Roche Applied Science, material nº 4906802) y Bloqueador Black Hole (BHQ-2) (Biosearch Technologies Inc., Nº de cat. BNS-5052) utilizando los reactivos de fosforamidita. El 3'-fosfato se introdujo por medio de bloqueador de la extensión 3' CPG (Clontech Inc., Nº de Cat. PT3357-2). El oligonucleótido se desprotegió con hidróxido de amonio a temperatura ambiente durante la noche. La solución de amoniaco se evaporó y el oligonucleótido bruto se purificó utilizando HPLC de fase reversa con un gradiente de cantidad creciente de acetonitrilo en acetato de trietilamonio 0,1 M en tampón a pH 7. Las fracciones que contienen el producto de oligonucleótido se juntaron, desalaron y formularon en Tris 10 mM, pH 8,0. Se determinó la pureza y la densidad óptica.

| | |
|----------------|---|
| Sonda Lambda 1 | 5'- JA270 TCG GTA CCG ATA CCG CGA AAG AGC BHQ2 PO4 -3' |
|----------------|---|

50 3. Síntesis de sondas de hidrólisis de bloqueo Lambda DNA TWDQ9

55 Las sondas de hidrólisis se sintetizaron en un sintetizador de DNA ABI® 394 (marca registrada de Applied Biotechnology Institute, Inc. Corporación Iowa, Edificio 36, Cal Poly State Universidad San Luis Obispo, California 93407, USA) en una escala de 1 mmol utilizando la química estándar de fosforamidita. Al margen de las fosforamiditas dT estándar tac-dA, tac-dC y tacdG se utilizaron fosforamiditas de desoxinucleótidos protegidas (Sigma-Aldrich, Nº de Cat. T111031, A112031, C112031, G112031), fosforamidita TFA-protegida 3'-amino modificada (preparación de fosforamidita amino-modificada basada en 3-amino-1,2-propanodiol según US 6.031.091). Además, se incorporaron marcajes FAM (5'-fluoresceína fosforamidita, Glen Research, Nº de Cat. 10-5901) o fosforamidita JA270 (EP 0 962 497) en el extremo 5'-terminal. El fosfato 3' se introdujo mediante soporte

ES 2 386 530 T3

5 CPG bloqueador de la extensión en 3' (Clontech Inc., N° de Cat. PT3357-2). Los oligonucleótidos se desprotegeron con hidróxido de amonio a temperatura ambiente durante la noche. Las soluciones de amoniaco se evaporaron, y los oligonucleótidos brutos se purificaron utilizando HPLC de fase reversa con un gradiente de cantidad creciente de acetonitrilo en acetato de trietilamonio 0,1 M en tampón a pH 7. Las fracciones que contienen el pico principal se recogieron, desalaron y se evaporaron. Los oligonucleótidos amino modificados se disolvieron en tampón borato sódico 0,1 M, pH 8,5 y se añadieron 2 x 2 mg de éster de TWDQ9-NHS disueltos en DMF (la segunda porción tras 5 h). Tras la reacción durante la noche (18 h) a temperatura ambiente la solución se dializó y posteriormente se purificó de nuevo utilizando HPLC de fase reversa con un gradiente de cantidad creciente de acetonitrilo en acetato de trietilamonio 0,1 M en tampón a pH 7. Las fracciones que contienen el producto de oligonucleótido se juntaron, desalaron y formularon en Tris 10 mM, pH 8,0. Se determinó la pureza y la densidad óptica.

| | |
|----------------|---|
| Sonda Lambda 2 | 5'- JA270 TCG GTA CGG ATA CCG CGA AAG AGC TWDQ9 PO4 -3' |
| Sonda Lambda 3 | 5'- FAM TCG GTA CGG ATA CCG CGA AAG AGC TWDQ9 PO4 -3' |

4. Ensayo de PCR a tiempo real

15 Materiales y métodos:

Instrumento LC480 (bloque de 96) (Roche Applied Science, N° de Cat. 04640268001)

20 LC TaqMaster Roche (Roche Applied Science, N° de Cat. 04535286001)

DNA lambda Roche (Roche Applied Science, N° de Cat.: 10745782001, [c = 6,25ng/ml])

Cebador reverso Lambda:

25 5'- GTC GCT TTT TGC CCC ACA GTA-3' Id. de sec. N° 3

BMO 07,442983 lot ah_PP_48_A12-H12 [c = 10µM] del ejemplo 1

Cebador directo Lambda: Id. de sec. N° 1

30

5'- AAC AAA AAC GGG GTT TAC CTT A-3'

BMO 07,442982 lot ah_PP_A11-H11 [c = 10µM] del ejemplo 1

35 3 sondas Lambda con diferentes combinaciones marcador/bloqueador [c = 5µM] (de los ejemplos 2 y 3):

5'- R TCG GTA CGG ATA CCG CGA AAG AGC Q PO4 -3'

| Nombre de Oligo | Oligo nº | modificación R 5' | modificación Q 3' |
|-----------------|----------|-------------------|-------------------|
| sonda Lambda 1 | GO2986 | JA270 | BHQ2 |
| sonda Lambda 2 | GO3014 | JA270 | TWDQ9 |
| sonda Lambda 3 | HO 1214 | FAM | TWDQ9 |

40 El ajuste de PCR se realizó de acuerdo con el manual de uso de LC TaqMaster.

| Paso | Acción | | |
|------|--|---------------------|---------------------|
| 1 | Componente | Concentración final | por pocillo y sonda |
| | Taqman Master (5x) | 1x | 4 µl |
| | Cebador directo 10 µM | 0,50 µM | 1 µl |
| | Cebador reverso 10 µM | 0,50 µM | 1 µl |
| | Sonda 5 µM | 0,25 µM | 1 µl |
| | H ₂ O | | 8 µl |
| | Volumen total | | 15 µl |
| 2 | pipetear 15 µl de mezcla en un pocillo de la placa multipocillos LC480 | | |
| 3 | añadir 5 µl de agua de PCR o DNA diana | | |
| 4 | sellar la placa LC480 con papel de aluminio | | |
| 5 | colocar la placa en la centrífuga y centrifugar durante 2 minutos a 1500xG | | |
| 6 | cargar la placa en un instrumento LC480 e iniciar la PCR tal como se ha descrito antes | | |

Cada sonda se analizó con dos muestras negativas y dos positivas.

45 Programa de PCR:

| programa | modo | temperatura | mantenimiento | adquisición | tasa |
|----------------|-------------------|-------------|---------------|-------------|-------------|
| pre-incubación | activación | 95°C | 10min | ninguna | 4,4°C/s |
| amplificación | desnaturalización | 95°C | 10s | ninguna | 4,4°C/s |
| | hibridación | 60°C | 30s | ninguna | 2,2°C/s/45x |
| | extensión | 72°C | 2s | única | 4,4°C/s |
| enfriamiento | | 37°C | 30s | ninguna | 2,2°C/s |

En los ejemplos A y B, los experimentos de PCR a tiempo real se llevaron a cabo utilizando las siguientes sondas:

Ejemplo A

5

Sonda de hidrólisis Lambda 1 (GO 2986):

5'- X TCG GTA CGG ATA CCG CGA AAG AGC Y PO4-3'
X = JA270 Y = BHQ2

10

Sonda de hidrólisis Lambda 2 (GO 3014):

5'- X TCG GTA CGG ATA CCG CGA AAG AGC Y PO4-3'
X = JA270 Y = TWDQ9

15

Ejemplo B

Sonda de hidrólisis Lambda 1 (GO 2986):

20

5'- X TCG GTA CGG ATA CCG CGA AAG AGC Y PO4-3'
X = JA270 Y = BHQ2

Sonda de hidrólisis Lambda 2 (GO 3014):

25

5'- X TCG GTA CGG ATA CCG CGA AAG AGC Y PO4-3'
X = JA270 Y = TWDQ9

30

Los experimentos de PCR a tiempo real se llevaron a cabo para obtener una comparación entre las sondas de hidrólisis marcadas con JA270 colorante marcador de rodamina que se bloquearon mediante BHQ2 (sonda 1) o TWDQ9 (sonda 2). Mientras que los valores de señal de fondo fueron muy comparables para ambas sondas, tanto la altura y la inclinación de la curva de crecimiento fueron superiores para la sonda de bloqueo TWDQ9. Los valores Cp para la sonda de bloqueo TWDQ9 2 fueron mejores que para la sonda de bloqueo BHQ2 1 (cp = 21,8 comparada con cp = 22,0). La tabla inferior muestra los valores exactos cp obtenidos:

| Nº | Muestra | Sonda | cp |
|----|---------------------|---|-------|
| 1 | Lambda DNA negativo | Sonda de DNA Lambda 1 (GO 2986) JA270/BHQ2 | - |
| 2 | Lambda DNA negativo | Sonda de DNA Lambda 1 (GO 2986) JA270/BHQ2 | - |
| 3 | Lambda DNA positivo | Sonda de DNA Lambda 1 (GO 2986) JA270/BHQ2 | 22,06 |
| 4 | Lambda DNA positivo | Sonda de DNA Lambda 1 (GO 2986) JA270/BHQ2 | 22,03 |
| 5 | Lambda DNA negativo | Sonda de DNA Lambda 2 (GO 3014) JA270/TWDQ9 | - |
| 6 | Lambda DNA negativo | Sonda de DNA Lambda 2 (GO 3014) JA270/TWDQ9 | - |
| 7 | Lambda DNA positivo | Sonda de DNA Lambda 2 (GO 3014) JA270/TWDQ9 | 21,80 |
| 8 | Lambda DNA positivo | Sonda de DNA Lambda 2 (GO 3014) JA270/TWDQ9 | 21,82 |

35

Ejemplo C

Un experimento de PCR a tiempo real también se llevó a cabo con una sonda de hidrólisis marcadas con colorante marcador de fluoresceína bloqueado mediante TWDQ9 con la siguiente secuencia:

40

Sonda de hidrólisis Lambda 3 (HO 1214):

5'- X TCG GTA CGG ATA CCG CGA AAG AGC Y PO4-3'
X = FAM Y = TWDQ9

45

Se obtuvieron buenas curvas de crecimiento. Los valores Cp obtenidos fueron comparables a la sonda de hidrólisis 2marcada con JA270/TWDQ9. La tabla inferior muestra los valores exactos cp obtenidos:

50

ES 2 386 530 T3

| Nº | Muestra | Sonda | cp |
|----|---------------------|--|-------|
| 1 | Lambda DNA negativo | Sonda de DNA Lambda 3 (HO1214) FAM/TWDQ9 | - |
| 2 | Lambda DNA negativo | Sonda de DNA Lambda 3 (HO1214) FAM/TWDQ9 | - |
| 3 | Lambda DNA positivo | Sonda de DNA Lambda 3 (HO1214) FAM/TWDQ9 | 21,83 |
| 4 | Lambda DNA positivo | Sonda de DNA Lambda 3 (HO1214) FAM/TWDQ9 | 21,81 |

El resultado demuestra que el bloqueador también puede combinarse con diferentes colorantes marcadores.

Listado de secuencias

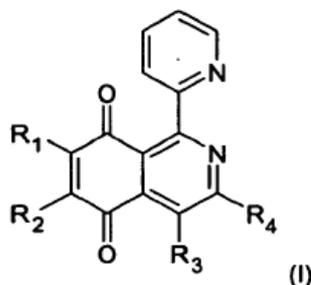
<110> F. Hoffmann-La Roche AG Roche Diagnostics GmbH
 <120> Moléculas bloqueadoras de la fluorescencia así como los métodos y utilizaciones que las implican
 5 <130> R66349EP1
 <160> 6
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 22
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo Lambda
 <400> 1
 15 acaaaaaacg gggtttacct ta 22
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador reverso Lambda
 <400> 2
 gtcgctttt gctgtccac agta 24
 <210> 3
 25 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sonda de DNA con marcador y bloqueador (sonda Lambda 1)
 30 <220>
 <221> unión miscelánea
 <222>
 < 1
 <223> /porción unida="JA270"
 35 <220>
 <221> unión miscelánea
 <222> > 24
 <223> / porción unida ="BHQ2"
 <400> 3
 40 tcggtacgga taccgcaaa gagc 24
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> sonda de DNA con marcador y bloqueador (Lambda sonda 2)
 <220>
 <221> unión miscelánea
 <222>
 50 < 1
 <223> / porción unida ="JA270"
 <220>
 <221> unión miscelánea
 <222> > 24
 55 <223> / porción unida ="TWDQ9"
 <400> 4
 tcggtacgga taccgcaaa gagc 24
 <210> 5
 <211> 24
 60 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sonda de DNA con marcador y bloqueador (Lambda sonda 3)
 <220>
 65 <221> unión miscelánea
 <222> < 1

ES 2 386 530 T3

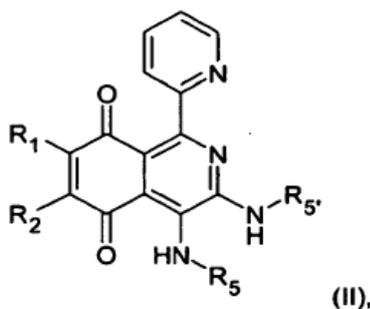
<223> / porción unida ="FAM"
<220>
<221> unión miscelánea
<222> > 24
5 <223> / porción unida ="TWDQ9"
<400> 5
tcggtacgga tacgcgaaa gagc 24
<210> 6
<211> 21
10 <212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador reverso Lambda
<400> 6
15 gtcgctttt gccccacagt a 21

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I



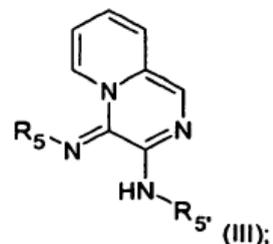
- 5 en el que
uno de R_1 y R_2 es hidrógeno, alquilo C_1-C_6 o un halógeno,
y el otro es $-Q-Y$, en el que Q es una cadena de hidrocarburo C_1-C_{10} recta o ramificada, saturada o insaturada,
sustituida o sin sustituir y Y se selecciona de entre el grupo que consiste en hidroxilo, carboxilo, y amino; y
10 R_3 y R_4 están representados independientemente el uno del otro por $-NR_5R_6$, en el que R_5 y R_6 son
independientemente el uno del otro hidrógeno o arilo sustituido o sin sustituir.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en la que Q es una cadena de hidrocarburo C_2-C_8 recta o ramificada,
saturada o insaturada, sustituida o sin sustituir.
- 15 3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en la que Y es un grupo hidroxilo o carboxilo.
4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que R_3 y/o R_4 es/son $-NR_5H$.
5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que cada uno de R_3 y R_4 es $-NR_5R_6$.
- 20 6. El compuesto de la reivindicación 5, en la que R_5 es arilo sustituido o sin sustituir.
7. El compuesto de la reivindicación 5 o 6, en la que el arilo sustituido o sin sustituir es fenilo o toluilo.
- 25 8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que arilo es un residuo de hidrocarburo aromático
 C_6H_5 , $C_{10}H_7$, o $C_{14}H_9$.
9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que uno de R_1 y R_2 es un residuo 1-hidroxi-4-etil-
butilo o un residuo de ácido n -pentanoico y el otro es hidrógeno; y R_5 es un residuo de 4-toluilo o un residuo de
30 fenilo.
10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que Y es capaz de unirse a (i) un soporte sólido; o
(ii) una biomolécula.
- 35 11. Un método para producir un compuesto de fórmula II



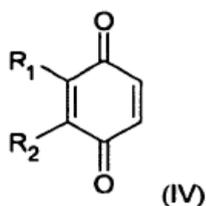
dicho método comprende los pasos de:

- 40 a) reaccionar una diamida de ácido oxálico disustituida de fórmula $R_5-N=C(OH)-C(OH)=N-R_5'$ con pentacloruro de
fósforo para obtener un cloruro de bis-imidoilo de ácido oxálico con la fórmula $R_5-N=C(Cl)-C(Cl)=N-R_5'$;

b) reaccionar el cloruro de bis-imidoilo del ácido oxálico obtenido en el paso a) con 2-amino metilpiridina para obtener una pirido[1,2-a]pirazina disustituida de fórmula III



5 c) hacer reaccionar la pirido[1,2-a]pirazina disustituida obtenida en el paso b) con una quinona mono-sustituida de fórmula IV



10 para obtener el compuesto de fórmula II,

en el que R_1 , R_2 , R_5 son como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 7, 9 y 10, y en el que R_5' se define como R_5 en las reivindicaciones 1, 3 a 7, 9 y 10.

15 12. Un conjugado que comprende el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y (i) un soporte sólido o (ii) una biomolécula, en la que el compuesto está acoplado al soporte o la biomolécula mediante el grupo de unión Q.

20 13. Un método para producir el conjugado de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende la unión de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 a (i) un soporte sólido o (ii) una biomolécula.

14. La utilización del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o del conjugado de acuerdo con la reivindicación 12 como un bloqueador de un donador fluorescente.

25 15. La utilización de la reivindicación 14, en la que el conjugado se utiliza como bloqueador en la transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET).