

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 213**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C07H 19/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08075235 .5**
- 96 Fecha de presentación: **01.03.2001**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1975256**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **Oligonucleótidos modificados para discriminación de desapareamiento**

30 Prioridad:  
**01.03.2000 US 186046 P**  
**28.11.2000 US 724959**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.11.2012**

73 Titular/es:  
**EPOCH BIOSCIENCES, INC. (100.0%)**  
**21720 23RD DRIVE SE, SUITE 150**  
**BOTHELL, WA 98021, US**

72 Inventor/es:  
**DEMPCY, ROBERT O.;**  
**GALL, ALEXANDER A.;**  
**LOKHOV, SERGEY G.;**  
**AFONINA, IRINA A.;**  
**SINGER, MICHAEL J.;**  
**KUTYAVIN, IGOR V. y**  
**VERMEULEN, NICOLAAS M.J.**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 391 213 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**

Oligonucleótidos modificados para discriminación de desapareamiento.

**Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional Número de serie 60/186.046, presentada el 1 de marzo de 2000 y la solicitud número de serie 09/724.959, presentada el 28 de noviembre de 2000.

**Indicación de los derechos de invención realizada bajo investigación y desarrollo patrocinados federalmente**

No aplicable

**Antecedentes de la invención**

10 La presente solicitud se enmarca en el campo de la biología molecular relacionada con el uso de oligonucleótidos como sondas y cebadores en ensayos en fase líquida, sólida y mixta. La solicitud se refiere además al uso de bases de ácidos nucleicos modificadas y oligonucleótidos modificados para mejorar las propiedades de hibridación y las capacidades discriminatorias de oligonucleótidos que se emplean en matrices y como sondas y cebadores.

15 Muchas técnicas actualmente en uso en la biología molecular emplean oligonucleótidos como sondas y/o cebadores. A menudo resulta ventajoso, en la práctica de estas tecnologías, poder distinguir entre dos o más secuencias que están relacionadas pero que se diferencian en uno o más nucleótidos. Por ejemplo, muchas mutaciones de importancia clínica se diferencian sólo en un único nucleótido de la secuencia de tipo salvaje. Los polimorfismos en los genomas de mamífero a menudo también se caracterizan por diferencias en la secuencia de uno o unos pocos nucleótidos. La capacidad para realizar tal distinción se conoce como discriminación de desapareamientos. En términos prácticos, la discriminación de desapareamientos describe la propiedad mediante la cual un oligonucleótido de secuencia definida, a una rigurosidad concreta, se hibrida con gran fuerza (una manifestación de ello es que los híbridos tienen un alto punto de fusión) con una secuencia diana con la que es complementaria a lo largo de su longitud completa (un híbrido perfecto o un apareamiento perfecto), pero se hibrida, de una manera detectable, de forma más débil con una secuencia diana que no es complementaria con la secuencia del oligonucleótido en uno o unos pocos nucleótidos (un desapareamiento). Las diferencias en la fuerza de hibridación son tales que puede seleccionarse una rigurosidad concreta en la que un apareamiento perfecto es detectable como un híbrido y un desapareamiento no puede formar un híbrido.

20

25

30 En un dúplex de ácido nucleico, cada par de bases contribuye a la estabilidad. Por tanto, cuanto más corto sea el dúplex, mayor será la contribución relativa de cada par de bases individual a la estabilidad del dúplex. Como resultado, la diferencia en la estabilidad entre un apareamiento perfecto y un desapareamiento será mayor para oligonucleótidos más cortos. Sin embargo, los oligonucleótidos cortos se hibridan de forma débil, incluso con una secuencia perfectamente complementaria, y por tanto deben hibridarse bajo condiciones de rigurosidad reducida. Por tanto, el poder discriminatorio potencial de oligonucleótidos cortos no puede obtenerse con facilidad excepto bajo condiciones de baja rigurosidad.

35 En la técnica se necesitan nuevos procedimientos para la discriminación de desapareamientos, en particular desapareamientos de un único nucleótido, bajo condiciones de alta rigurosidad, por ejemplo, a las elevadas temperaturas características de la mayoría de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. De forma sorprendente, la presente invención proporciona dichos procedimientos, junto con nuevos reactivos y composiciones que pueden utilizarse en los procedimientos.

**Sumario de la invención**

40 La presente invención proporciona una serie de oligonucleótidos modificados como se menciona en la reivindicación 1, que se ha descubierto que poseen unas propiedades y una utilidad excepcionales en una diversidad de ensayos. Por consiguiente, la presente invención también proporciona procedimientos para utilizar los oligonucleótidos modificados descritos en la presente.

45 En un aspecto, la presente invención proporciona oligonucleótidos modificados que tienen al menos dos bases seleccionadas de base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida y 3-sustituida como se menciona en la reivindicación 1. En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos que tienen bases modificadas comprenderán además otros restos, tales como marcadores detectables, extintores de fluorescencia y de quimioluminiscencia y/o ligantes del surco menor y/u otros tipos de bases modificadas o análogos de bases.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona oligonucleótidos modificados que tienen al menos una base de pirimidina 5-sustituida y al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida como se menciona en la reivindicación 1. En realizaciones preferidas, estos oligonucleótidos modificados comprenderán además otros restos (como anteriormente) tales como marcadores extintores de fluorescencia y quimioluminiscencia y/o ligantes de surco menor detectables.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para distinguir polinucleótidos que tienen secuencias relacionadas.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona procedimientos para detectar la presencia de una secuencia diana en un polinucleótido.

- 5 En otros aspectos más, la presente invención proporciona procedimientos para la extensión de cebadores, y procedimientos para determinar la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido.

En aspectos relacionados más, la presente invención proporciona procedimientos para estudiar la expresión génica en una célula, y procedimientos para identificar una mutación o un polimorfismo en una secuencia diana de un gen de interés.

- 10 En otro aspecto más, la presente invención proporciona una serie de bases modificadas que son útiles para preparar oligonucleótidos modificados para los procedimientos descritos en la presente y otros procedimientos y ensayos convencionales.

- 15 En otro aspecto más, la presente invención proporciona matrices de oligonucleótidos modificados en las que los miembros de la matriz tienen unas  $T_m$  diferente aproximadamente en 1-2 °C, y unas longitudes diferentes aproximadamente en 1-2 bases entre ellos. También se proporcionan procedimientos para determinar las secuencias de los miembros de la matriz.

### Breve descripción de la invención

20 Las **figuras 1A** y **1B** proporcionan las estructuras de varias bases modificadas y sus abreviaturas. La línea ondulada se utiliza para indicar la posición de un resto azúcar unido (sin proteger, protegido, activado y similares).

La **figura 2** es una gráfica que ilustra el equilibrio de la  $T_m$  de sondas de 8 meros ricas en GC y ricas en AT con diferentes combinaciones de MGB, PPPA y PU.

25 La **figura 3** es una gráfica que ilustra una ventaja lograda mediante el uso de PPPA y PPG en sondas oligonucleotídicas modificadas con MGB. Como puede observarse en la figura, las bases modificadas permiten acortar la sonda que muestre una mayor discriminación de desapareamientos en una PCR a tiempo real.  $\hat{A}$  es PPPA y  $\hat{G}$  es PPG. Sonda FAM modificada con MGB = SEQ ID NO:1; complemento de la sonda FAM modificada con MGB = SEQ ID NO:2; complemento de la sonda FAM modificada con MGB que contiene PPPA y PPG = SEQ ID NO:3; sonda FAM modificada con MGB que contiene PPPA y PPG = SEQ ID NO:4.

30 La **figura 4** ilustra un ensayo Invader™ en que pueden utilizarse los oligonucleótidos modificados de la invención.

La **figura 5** ilustra la comparación de la actuación de la sonda de Invader™ con diferentes números de PPG.

### Descripción de la invención

#### 35 Abreviaturas y definiciones

Las abreviaturas para una serie de bases modificadas descritas en la presente se proporcionan como sigue (las estructuras de estas bases se muestran en las figuras 1A y 1B): 6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, PPPG; 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, HOPPPG; 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, NH<sub>2</sub>PPPG; 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, PPPA; 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, HOPPPA; 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, NH<sub>2</sub>PPPA; 3-prop-1-inilpirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamino, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPA; 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)etin-1-ol, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPAOH; 3-(2-aminoetinil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPANH<sub>2</sub>; 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, PU; 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, HOPU; 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidin-2-ona, PC; 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, HOPC; y 6-amino-5-(3-aminoprop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, NH<sub>2</sub>PC; 5-[4-amino-3-(3-metoxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol, CH<sub>3</sub>OPPPA; 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxi-prop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, CH<sub>3</sub>OPPPG; 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, HOBuU; 6-amino-5-(4-hidroxi-but-1-inil)-3-dihidropirimidin-2-ona, HOBuC; 4-(4-aminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)but-3-in-1-ol, HOBuPPA; 6-amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ol, HOBuPPG; 4-(4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)but-3-in-1-ol, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>BuPPAOH.

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos empleados en la memoria y en las reivindicaciones tienen los significados que aparecen a continuación.

55 El término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente saturado lineal, ramificado o cíclico o una combinación de radicales hidrocarbonados monovalentes saturados cíclicos y lineales o ramificados, que tienen el número de átomos indicado en el prefijo. Por ejemplo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) pretende incluir metilo, etilo, n-propilo, 2-propilo,

terc-butilo, pentilo, ciclopentilo, ciclopropilmetilo y similares. Para cada una de las definiciones de la presente (por ejemplo, alquilo, alqueno, alcoxi, aralquilo), cuando no se incluye un prefijo para indicar el número de átomos de carbono de la cadena principal en una porción alquílica, el radical o su porción tendrá ocho o menos átomos de carbono de la cadena principal.

- 5 El término "alquileno" significa un radical hidrocarbonado divalente saturado lineal o un radical hidrocarbonado divalente saturado ramificado, que tienen el número de átomos indicado en el prefijo. Por ejemplo, alquileno(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) pretende incluir metileno, etileno, propileno, 2-metilpropileno, pentileno y similares.

10 El término "alqueno" significa un radical hidrocarbonado monovalente lineal o un radical hidrocarbonado monovalente ramificado, que tienen el número de átomos indicado en el prefijo y que contiene al menos un doble enlace. Por ejemplo, alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) pretende incluir etenilo, propenilo y similares.

El término "alquino" significa un radical hidrocarbonado monovalente lineal o un radical hidrocarbonado monovalente ramificado que contiene al menos un triple enlace, y que tienen el número de átomos indicado en el prefijo. Por ejemplo, alquino(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) pretende incluir etinilo, propinilo y similares.

- 15 Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquilo" (o tioalcoxi) se emplean con su sentido convencional, y se refieren a los grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente. De forma similar, el término dialquilamino se refiere a un grupo amino que tiene dos grupos alquilo unidos que pueden ser iguales o diferentes.

20 El término "arilo" significa un radical hidrocarbonado aromático monocíclico o bíciclico monovalente de 6 a 10 átomos del anillo que no está sustituido o está sustituido independientemente con uno a cuatro sustituyentes, preferiblemente uno, dos o tres sustituyentes seleccionados de alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, halógeno, nitro, ciano, hidroxilo, alcoxi, amino, acilamino, monoalquilamino, dialquilamino, haloalquilo, haloalcoxi, heteroalquilo, COR (en el que R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo), -(CR'R'')<sub>n</sub>-COOR (en el que n es un número entero de 0 a 5, R' y R'' son independientemente hidrógeno o alquilo, y R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo), o -(CR'R'')<sub>n</sub>-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> (en el que n es un número entero de 0 a 5, R' y R'' son independientemente hidrógeno o alquilo, y R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo). De forma más específica, el término arilo incluye, pero no se limita a fenilo, bifenilo, 1-naftilo y 2-naftilo, y sus formas sustituidas. De manera similar, el término "heteroarilo" se refiere a los grupos arilo en los que uno o más heteroátomos o grupos funcionales de heteroátomos han reemplazado a un carbono del anillo pero manteniendo las propiedades aromáticas, por ejemplo piridilo, quinolinilo, quinazolinilo, tienilo y similares. Para ser más breves, el término arilo, cuando se emplea en combinación con otros radicales (por ejemplo, ariloxi, arilalquilo), pretende incluir grupos arilo y grupos heteroarilo según se describió anteriormente.

35 El término "arilalquilo" se refiere a un radical -R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, en el que R<sup>a</sup> es un grupo alquileno (que tiene el número indicado de átomos de carbono, o si no se especifica tiene seis o menos átomos de carbono en la cadena principal), y R<sup>b</sup> es un grupo arilo como se define en la presente. Los ejemplos de grupos arilalquilo incluyen bencilo, feniletilo, 3-(3-clorofenil)-2-metilfenilo y similares.

De manera similar, el término "arilalqueno" significa un radical -R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, en el que R<sup>a</sup> es un grupo alqueno, y R<sup>b</sup> es un grupo arilo como se define en la presente, por ejemplo, 3-fenil-2-propenilo y similares.

40 Un "arilheteroalquilo" significa un radical -R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, en el que R<sup>a</sup> es un grupo heteroalquileno (que tiene el número indicado de átomos de carbono), y R<sup>b</sup> es un grupo arilo como se define en la presente, por ejemplo, 2-hidroxil-2-feniletilo, 2-hidroxil-1-hidrometil-2-feniletilo y similares.

El término "ariloxi" se refiere a un radical -OR, en el que R es un grupo arilo, por ejemplo, fenoxi, naftiloxi y similares.

El prefijo "halo" y el término "halógeno", cuando se emplean para describir un sustituyente, se refieren a -F, -Cl, -Br e -I.

45 El término "heteroalquilo" se refiere a un radical alquilo como se define en la presente, con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente de ciano, -OR<sup>a</sup>, -NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, y -S(O)<sub>n</sub>R<sup>d</sup> (en el que n es un número entero de 0 a 2), entendiéndose que el punto de unión del radical heteroalquilo es a través de un átomo de carbono del radical heteroalquilo. R<sup>b</sup> es hidrógeno, alquilo, arilo o arilalquilo. R<sup>c</sup> es hidrógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, carboxamido, mono- o dialquilcarbamoilo o alquilsulfonilo. R<sup>d</sup> es hidrógeno (con la condición de que n sea 0), alquilo, arilo, arilalquilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino o hidroxialquilo. Los ejemplos representativos incluyen, por ejemplo, 2-hidroxietilo, 2,3-dihidroxipropilo, 2-metoxietilo, benciloximetilo, 2-cianoetilo y 2-metilsulfonietilo. Para cada uno de los anteriores, R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> pueden estar también sustituidos con NH<sub>2</sub>, flúor, alquilamino, dialquilamino, OH o alcoxi. Además, el prefijo que indica el número de átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) se refiere al número total de átomos de carbono en la porción del grupo heteroalquilo excluyendo las porciones de ciano, -OR<sup>a</sup>, -NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, o -S(O)<sub>n</sub>R<sup>d</sup>.

55 El término "heterocíclico" se refiere a un radical cíclico no aromático saturado o insaturado de 3 a 8 átomos del anillo

en el que uno o dos átomos del anillo son heteroátomos seleccionados de O, NR (en el que R es independientemente hidrógeno o alquilo), o S(O)<sub>n</sub> (en el que n es un número entero de 0 a 2), siendo el resto de los átomos del anillo C, en el que uno o dos átomos de C pueden estar opcionalmente reemplazados por un grupo carbonilo. El anillo heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados de alquilo, halógeno, nitro, ciano, hidroxilo, alcoxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, haloalquilo, haloalcoxi, -COR (en el que R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo), - (CR'R'')<sub>n</sub>-COOR (en el que n es un número entero de 0 a 5, R' y R'' son independientemente hidrógeno o alquilo, y R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo), o -(CR'R'')<sub>n</sub>-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> (en el que n es un número entero de 0 a 5, R' y R'' son independientemente hidrógeno o alquilo, y R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente hidrógeno, alquilo, fenilo o fenilalquilo). De forma más específica, el término heterocíclico incluye, pero no se limita a tetrahidropirano, piperidino, N-metilpiperidin-3-ilo, piperazino, N-metilpirrolidin-3-ilo, 3-pirrolidino, 2-pirrolidino-1-ilo, morfolino, tiomorfolino, tiomorfolino-1-óxido, tiomorfolino-1,1-dióxido, pirrolidinilo y sus derivados. El prefijo que indica el número de átomos de carbono (por ejemplo, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>) se refiere al número total de átomos de carbono en la porción del grupo heterocíclico excluyendo el número de heteroátomos.

Los términos "heterocíclicilalquilo", "heterocíclicilalquenilo", "heterocíclicilalquinilo" se refieren a radicales -R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, en el que R<sup>a</sup> es un grupo alquileo, alquenileno o alquinileno, respectivamente, y R<sup>b</sup> es un grupo heterocíclico como se define en la presente, por ejemplo, tetrahidropiran-2-ilmetil, 4-metilpiperazin-1-iletilo, 3-piperidinilmetil y similares.

El término "heteroalquileo" significa un radical hidrocarbonado divalente saturado lineal de uno a seis carbonos, o un radical hidrocarbonado saturado ramificado de tres a seis átomos de carbono con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente de -OR<sup>a</sup>, -NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, y -S(O)<sub>n</sub>R<sup>d</sup> (en el que n es un número entero de 0 a 2), en los que R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> son como se define en la presente para un radical heteroalquilo. Los ejemplos incluyen 2-hidroxietan-1,2-diilo, 2-hidroxipropan-1,3-diilo y similares.

Cada uno de los anteriores términos (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo" y "arilo") pretenden incluir las formas sustituidas y no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo los grupos que a menudo se denominan alquileo, alquenilo, heteroalquileo, heteroalquenilo, alquinilo, heterocicloalquilo y heterocicloalquenilo) pueden ser una diversidad de grupos seleccionados de -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R''', -NR'C(O)<sub>2</sub>R', -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NR'C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NR', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -CN y -NO<sub>2</sub> en un número que varía de cero a cuatro, preferiblemente cero, uno, dos o tres sustituyentes. R', R'' y R''' se refieren cada uno independientemente a hidrógeno, alquilo- y heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) no sustituidos, arilo no sustituido, arilo sustituido con 1-3 halógenos, grupos alquilo, alcoxi o tioalcoxi no sustituidos, o grupos aril(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>). Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir del anterior análisis de los sustituyentes, los expertos en la técnica comprenderán que el término "alquilo", en su sentido más amplio, pretende incluir grupos, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> y similares). Preferiblemente, los grupos alquilo tendrán 0-3 sustituyentes, más preferiblemente 0, 1 ó 2 sustituyentes, a menos que se indique lo contrario.

De manera similar, los sustituyentes para los grupos arilo son variados y se seleccionan de -halógeno, -OR', -OC(O)R', -NR'R'', -SR', -R', -CN, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R'', -C(O)R', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'C(O)<sub>2</sub>R', -NR'-C(O)NR'R''', -NHC(NH<sub>2</sub>)=NH, -NR'C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NR', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, perfluoro(alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), y perfluoro(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas sobre el sistema de anillos aromático; y en el que R', R'' y R''' se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo- y heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), arilo y heteroarilo no sustituidos, (arilo no sustituido)-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), y (arilo no sustituido)-oxi(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>).

Dos de los sustituyentes sobre átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente reemplazados por un sustituyente de fórmula -T-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-U-, en la que T y U son independientemente -NH-, -O-, -CH<sub>2</sub>- o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 2. Como alternativa, dos de los sustituyentes sobre átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente reemplazados por un sustituyente de fórmula -A-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-B-, en la que A y B son independientemente -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NR'- o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 3. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo formado de esta manera puede estar opcionalmente reemplazado por un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes sobre átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente reemplazados por un sustituyente de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-, en la que s y t son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR', -S-, -S(O)<sub>2</sub>-, o -S(O)<sub>2</sub>NR'-. El sustituyente R' en -NR'- y -S(O)<sub>2</sub>NR'- se selecciona de hidrógeno o alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) no sustituido.

Ciertos compuestos u oligonucleótidos de la presente invención pueden existir en forma salina. Estas sales incluyen sales de adición de bases, tales como sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos o los oligonucleótidos modificados de la presente invención contienen

funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición de ácidos poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, en forma pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácidos aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monobicarbonato, fosfórico, monobifosfórico, 5 dibifosfórico, sulfúrico, monobisulfúrico, yodhídrico o fosforoso, y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos, tales como el ácido acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, láctico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencensulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metansulfónico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos, tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos, tales como ácido glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen 10 funcionalidades básicas y ácidas que permiten convertir los compuestos en sales de adición de bases o de ácidos.

Las formas neutras de los compuestos pueden regenerarse poniendo en contacto la sal con una base o con un ácido y aislando el compuesto de origen de la manera convencional. La forma original del compuesto se diferencia de las diversas formas salinas en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a la forma original del compuesto para los fines de la presente invención. 15

Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretende incluirlas en el alcance de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención. 20

Ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; se pretende que todos los racematos, los diastereómeros, los isómeros geométricos y los isómeros individuales estén incluidos en el alcance de la presente invención. Los procedimientos para la determinación de la estereoquímica y para la separación de los isómeros son muy conocidos en la técnica (véase el análisis en el capítulo 4 de "Advanced Organic Chemistry", 4ª edición J. March, John Wiley and Sons, Nueva York, 1992). 25

Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radiativos, tales como por ejemplo tritio ( $^3\text{H}$ ), yodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ) o carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, tanto radiactivas o no (por ejemplo,  $^2\text{H}$ ), pretenden estar incluidas en el alcance de la presente invención. 30

Un "grupo protector" o "su forma protegida" se refiere a un agrupamiento de átomos que, cuando se une a un grupo reactivo en una molécula, enmascara, reduce o evita esa reactividad. Pueden encontrarse ejemplos de grupos protectores en T.W. Greene y P.G. Futs, Protective Groups in Organic Chemistry, (Wiley, 2ª ed. 1991); Beaucauge e Iyer, Tetrahedron, 48:2223-2311 (1992); y Harrison y Harrison et al., Compendium of Synthetic Organic Methods, vol. 1-8 (John Wiley and Sons. 1971-1996). Los grupos protectores de amino representativos incluyen formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo (CBZ), terc-butoxicarbonilo (Boc), trimetilsililo (TMS), 2-trimetilsililetansulfonilo (SES), grupos tritilo y tritilo sustituido, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC), nitroveratrilocarbonilo (NVOC) y similares. Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen aquellos en que el grupo hidroxilo está acilado o alquilado, tal como bencil y tritilo éteres, así como alquilo éteres, tetrahidropiraniol éteres, trialkilsilil éteres y alil éteres. 35 40

"Opcional" u "opcionalmente" en las anteriores definiciones significa que el acontecimiento o la circunstancia descrita posteriormente puede haber ocurrido, pero no necesariamente, y que la descripción incluye los casos en que el acontecimiento o la circunstancia ocurre y los casos en que no ocurre. Por ejemplo, un grupo heterociclo opcionalmente mono- o disustituido con un grupo alquilo significa que el alquilo puede estar presente, pero no necesariamente, y la descripción incluye situaciones en que el grupo heterociclo está mono- o disustituido con un grupo alquilo, y situaciones en que el grupo heterociclo no está sustituido con un grupo alquilo. 45

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales en la química orgánica, la bioquímica, la síntesis y modificación de oligonucleótidos, la química de bioconjugados, la hibridación de ácidos nucleicos, la biología molecular, la microbiología, la genética, el ADN recombinante y los campos relacionados, tal como se incluyen en la técnica. Estas técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch y Sambrook, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982); Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Gait (ed.), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1984); Eckstein (ed.), OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1991). 50 55

### Generalidades

Los oligonucleótidos son polímeros cortos de nucleótidos, con una longitud en general menor de 200 nucleótidos,

preferiblemente menor de 150 nucleótidos, más preferiblemente menor de 100 nucleótidos, más preferiblemente menor de 50 nucleótidos, y lo más preferiblemente menor de 21 nucleótidos. En la técnica se considera que los polinucleótidos, en general, comprenden polímeros más largos de nucleótidos que los oligonucleótidos, aunque existe un solapamiento, reconocido en la técnica, entre el límite superior de la longitud de los oligonucleótidos y el límite inferior de la longitud de los polinucleótidos. Con respecto a la presente invención, "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico, que comprende normalmente un marcador detectable, que se emplea como sonda o como cebador, mientras que polinucleótido se refiere a un ácido nucleico que contiene una secuencia diana. Por consiguiente, para los objetivos de la presente invención, los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no deben considerarse limitantes con respecto a la longitud del polímero.

La presente invención proporciona oligonucleótidos modificados que tienen nuevas y sorprendentes propiedades de mayor discriminación de desapareamientos, comparados con oligonucleótidos sin modificar. Los oligonucleótidos modificados de la invención se emplean como sondas, y en los que se detecta su hibridación con una secuencia diana, o como cebadores, y en los que se sigue su hibridación con una secuencia diana mediante la síntesis de polinucleótidos iniciada desde el extremo 3'-terminal del oligonucleótido modificado, y se detecta el producto sintetizado (es decir, el producto de la extensión).

Una secuencia diana se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende un sitio de hibridación para una sonda o un cebador. Las secuencias diana pueden encontrarse en cualquier ácido nucleico incluyendo, pero sin limitarse a ADN genómico, ADNc, ARN y cualquier producto amplificado a partir de los mismos, y pueden comprender una secuencia génica de tipo salvaje, una secuencia génica mutante, una secuencia no codificadora, una secuencia reguladora, etc. Una secuencia diana tendrá una longitud en general menor de 100 nucleótidos, preferiblemente menor de 50 nucleótidos, y lo más preferiblemente menor de 21 nucleótidos.

#### Descripción de las realizaciones

La presente divulgación proporciona una serie de oligonucleótidos modificados que pueden dividirse, en general, en tres grupos.

El primer grupo de oligonucleótidos modificados de la divulgación son los que tienen al menos dos bases modificadas que reemplazan a las bases naturales. En la presente, las bases modificadas serán pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas o 3-sustituidas. En algunas realizaciones de la invención, sin embargo, las bases modificadas serán seleccionadas de manera que al menos una de las base sea una primidina 5-sustituida y al menos una de las bases sea una pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas o 3-sustituidas como se define en la reivindicación 1. Preferiblemente, este grupo de oligonucleótidos modificados tendrá grupos unidos adicionales (por ejemplo, ligantes del surco menor, grupos indicadores, extintores, etc.) que, durante los ensayos, ayudan a detectar las secuencias diana.

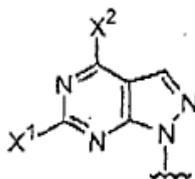
El segundo grupo de oligonucleótidos modificados de la divulgación son los que tienen al menos una base modificada pero también un ligante del surco menor unido, un grupo indicador, un extintor o similares.

El tercer grupo de oligonucleótidos modificados de la divulgación son los que comprenden una o más de las nuevas bases modificadas descritas a continuación. Al igual que en el primer grupo, este grupo de oligonucleótidos modificados preferiblemente tendrá unidos grupos seleccionados, por ejemplo, de ligantes del surco menor, grupos indicadores o extintores. Cualesquiera realizaciones que no se encuentran dentro del alcance de la invención son proporcionadas solo con fines comparativos.

#### 40 *Oligonucleótidos modificados*

En un aspecto, la presente divulgación proporciona oligonucleótidos modificados que comprenden al menos dos bases seleccionadas del grupo que consiste en bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida y 3-sustituida.

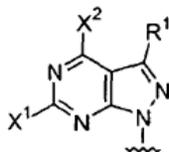
Las bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina son aquellas bases en que un anillo pirazol está condensado con un anillo pirimidina en la siguiente orientación específica



Ia

45 :

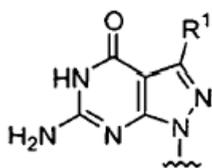
5 en la que la línea ondulada indica el punto de unión entre la base y un azúcar formador de oligómero unido o un aminoácido implicado en la formación de ácidos nucleicos peptídicos. Además, los grupos  $X^1$  y  $X^2$  son independientemente H, OH o  $NH_2$ , de forma que las bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina se acercan a la construcción de las bases de purina naturales, guanósina, adenina e inosina, así como a los derivados de estas bases relacionados. En este grupo de realizaciones, una “base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida” se refiere a las bases de fórmula general Ia, mientras que la expresión “base de pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida” se refiere a las bases que tienen la fórmula Ib, en la que  $R^1$  se define como se describe a continuación.



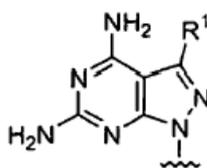
Ib

10 En la fórmula Ib, los símbolos  $X^1$  y  $X^2$  representan independientemente H, OH,  $NH_2$  o su forma protegida. El símbolo  $R^1$  representa un miembro seleccionado de heteroalquilo ( $C_1-C_{12}$ ), heteroalquenilo ( $C_2-C_{12}$ ), heteroalquinilo ( $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -O-(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -S-(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y sus formas protegidas. Los grupos heteroalquilo, heteroalquenilo y heteroalquinilo preferidos son los que terminan (distalmente al sistema de anillos de pirazolo[3,4-d]pirimidina) en un grupo de heteroátomo (por ejemplo, OH,  $NH_2$ , SH y similares). Por ejemplo, los grupos heteroalquilo, heteroalquenilo y heteroalquinilo preferidos incluyen 3-amino-1-propilo, 4-hidroxi-1-butilo, 3-amino-1-propin-1-ilo, 3-hidroxi-1-propin-1-ilo, 4-hidroxi-3-hidroximetil-1-butin-1-ilo y 4-hidroxi-1-butin-1-ilo, así como sus homólogos superiores. Otros grupos  $R^1$  preferidos incluyen los que terminan en un grupo arilo o heterocíclico (por ejemplo, heterociclil(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), y aril(alquinilo  $C_2-C_{12}$ )). Los grupos arilo y heterocíclicos preferidos son fenilo, tienilo, tiazolilo, imidazolilo, furanilo, oxazolilo, piridinilo, pirrolilo, indolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo y benzoxazolilo sustituidos o no sustituidos.

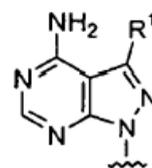
En realizaciones de la divulgación, la base de pirazolo[3,4-d]pirimidina se selecciona de:



Ic



Id



Ie

25 Aún más preferiblemente, las bases modificadas se seleccionan de Ic, Id o Ie, en las que cada  $R^1$  es un grupo propinilo, hidroxipropinilo, aminopropinilo, aminobutinilo, hidroxibutinilo, o un grupo fenilo, tienilo, tiazolilo, imidazolilo, furanilo, oxazolilo, piridinilo, pirrolilo, indolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo o benzoxazolilo sustituidos o no sustituidos, unido directamente al sistema de anillos de pirazolo[3,4-d]pirimidina, o unido al sistema de anillos a través de uno a cuatro grupos conectores de carbono que pueden estar saturados (por ejemplo, etileno, propileno, butileno) o insaturados (por ejemplo, acetilenilo, propinileno, butinileno, propenileno, butenileno).

30 Los oligonucleótidos modificados de la presente invención tienen un esqueleto como, por ejemplo, el que se encuentra en los oligonucleótidos naturales o en los ácidos nucleicos peptídicos (por ejemplo, bases heterocíclicas unidas a azúcares formadores de oligómero o aminoácidos formadores de ácidos nucleicos peptídicos). Los expertos en la técnica conocen otros esqueletos oligoméricos (denominados en lo sucesivo esqueletos “modificados” o que comprenden modificaciones en el esqueleto). Para los objetivos de esta invención, un oligonucleótido modificado es cualquier polímero oligomérico, incluyendo el esqueleto de fosfato natural y los esqueletos no naturales, que contenga bases naturales y/o modificadas y que mantenga la capacidad para hibridarse de modo específico con un ácido nucleico complementario para formar un dúplex estable.

40 En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos modificados de la invención tienen un esqueleto de restos azúcar o glicosídicos, preferiblemente 2-desoxirribofuranósidos, en el que todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosfodiéster naturales. Sin embargo, en una realización alternativa, los grupos 2-desoxi-β-D-ribofuranosa están reemplazados por otros azúcares, por ejemplo β-D-ribofuranosa. Además, la β-D-ribofuranosa puede estar presente, en la que el 2-OH del resto ribosa se alquila con un grupo alquilo  $C_{1-6}$  (2-(O-(alquil  $C_{1-6}$ ))ribosa) o con un grupo alquenilo  $C_{2-6}$  (2-(O-(alquenil  $C_{2-6}$ ))ribosa), o está reemplazado por un grupo flúor (2-fluororribosa). Los azúcares formadores de oligómero relacionados útiles en la presente invención son los que están “bloqueados”, es decir,

contienen un puente metileno entre C-4' y un átomo de oxígeno en C-2'. También pueden utilizarse otros restos azúcar compatibles con la hibridación del oligonucleótido y son conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a  $\alpha$ -D-arabinofuranósidos,  $\alpha$ -2'-desoxirribofuranósidos o 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos. Los oligonucleótidos que contienen  $\alpha$ -D-arabinofuranósidos pueden prepararse como se describe en la patente de EEUU nº 5.177.196. Los oligonucleótidos que contienen 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos se describen en Chen et al. (1995), Nucleic Acids Res., 23:2661-2668. Se han descrito procedimientos sintéticos para los ácidos nucleicos bloqueados (Singh et al., Chem. Comm., 455-456 (1998); Wengel J., Acc. Chem. Res., 32:301-310 (1998)) y oligonucleótidos que contienen 2'-halógeno-2'-desoxirribofuranósidos (Palissa et al., Z. Chem., 27:216 (1987)). El esqueleto de fosfato de los oligonucleótidos modificados descritos en la presente también puede modificarse de modo que los oligonucleótidos contengan enlaces fosforotioato y/o metilfosfonatos y/o fosfoamidatos (Chen et al., Nucl. Acids Res., 23:2662-2668 (1995)). Las combinaciones de enlaces en el oligonucleótido también está dentro del alcance de la presente invención. Otras modificaciones en el esqueleto son conocidas por los expertos en la técnica.

En otro grupo de realizaciones, las bases modificadas descritas en la presente se incorporan en PNA y quimeras de ADN/PNA para equilibrar las  $T_m$  y proporcionar oligonucleótidos modificados que tengan una mayor discriminación de desapareamientos. Diversas formas modificadas de ADN y de análogos de ADN se han utilizado en los intentos para solucionar algunas de las desventajas del uso de moléculas de ADN como sondas y cebadores. Entre estos se encuentran los ácidos nucleicos peptídicos (PNA, también denominados ácidos nucleicos de poliamida) (Nielsen et al. (1991), Science, 254:1497-1500). Los PNA contienen unidades de bases heterocíclicas, al igual que en el ADN y en el ARN, que están unidas a través de un esqueleto de poliamida, en lugar del esqueleto de azúcar-fosfato característico del ADN y del ARN. Los PNA son capaces de hibridarse con secuencias diana de ADN y ARN complementarias y, de hecho, se hibridan con más fuerza que una correspondiente sonda de ácido nucleico. La síntesis de oligómeros de PNA y de monómeros reactivos utilizados en la síntesis de oligómeros de PNA se ha descrito en las patentes de EEUU nº 5.539.082, 5.714.331, 5.773.571, 5.736.336 y 5.766.855. Otras estrategias para la síntesis de PNA y de quimeras de ADN/PNA y de monómeros para la síntesis de PNA se han resumido (Uhlmann et al. (1998), Angew. Chem. Int. Ed., 37:2796-2823). Por consiguiente, el uso de cualquier combinación de bases normales, bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituidas (por ejemplo, PPG y PPA), pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas, purina modificada, pirimidina modificada, pirimidinas 5-sustituidas, bases universales o un ligante del surco menor para equilibrar las  $T_m$  de un PNA o una quimera de ADN/PNA se encuentra dentro del alcance de esta invención. En la técnica se conoce una diversidad de bases universales. Otras bases universales se han descrito en fechas recientes y también son útiles en la presente invención (véase, Seela, et al., XIV International Round Table: Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications, 10-14 de septiembre, 2000, San Francisco, California, p. 40). Los procedimientos sintéticos necesarios para la síntesis de unidades monoméricas de bases modificadas necesarias para la síntesis de PNA y de quimeras de ADN/PNA están disponibles en la técnica (véanse los procedimientos de esta solicitud, y Uhlmann et al., Angew. Chem. Int. Ed., 37:2796-2823 (1998)).

De forma similar, la presente invención demuestra que una combinación de bases normales, bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituidas (por ejemplo, PPG y PPA), pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas, purina modificada, pirimidina modificada, pirimidinas 5-sustituidas, bases universales o un ligante del surco menor puede utilizarse para equilibrar las  $T_m$  de cualquier polímero oligonucleotídico o quimera de oligopolímero/ADN.

Para los usos descritos en la presente, los oligonucleótidos modificados tendrán preferiblemente de 4 a 70 bases, más preferiblemente de 4 a 25 bases. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos modificados tendrán 15 o menos, o más preferiblemente 10 o menos bases. Además, los oligonucleótidos modificados tendrán, en algunas realizaciones, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 o más bases modificadas (pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas o 3-sustituidas). Para cada una de las realizaciones en las que están presentes múltiples bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituidas, las bases modificadas pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Además de los componentes de bases modificadas, los oligonucleótidos modificados de la presente invención comprenderán, en algunas realizaciones, otros grupos colgantes, tales por ejemplo intercalantes, grupos lipófilos, ligantes del surco menor, grupos indicadores, agentes quelantes, extintores y agentes reticulantes unidos a una o más de las bases nucleotídicas localizadas internamente, al extremo 3', al extremo 5', a ambos extremos, o pueden tener estos grupos colgantes unidos internamente y a uno o a ambos extremos. Los procedimientos para unir intercalantes, grupos lipófilos, ligantes del surco menor, grupos indicadores, agentes quelantes, extintores y agentes reticulantes a oligonucleótidos se han descrito, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 5.512.667 y 5.419.966, la publicación PCT WO 96/32496 y la solicitud de EEUU nº de serie 09/457.616. Los oligonucleótidos de la invención también tienen un "resto de cola" de peso molecular relativamente bajo unido al extremo 3' o al extremo 5', o a ambos extremos. Un ejemplo de una molécula de cola puede ser un fosfato, un éster de fosfato, un grupo alquilo, un grupo aminoalquilo, o un grupo lipófilo. El resto de cola también puede conectar los intercalantes, los grupos lipófilos, los ligantes del surco menor, los grupos indicadores, los agentes quelantes y las funcionalidades reticulantes a los oligonucleótidos de la invención.

La naturaleza de los restos de cola y los procedimientos para obtener oligonucleótidos con diversos restos de cola también se describen en las patentes de EEUU nº 5.512.667 y 5.419.966, citadas anteriormente.

*Ligantes del surco menor*

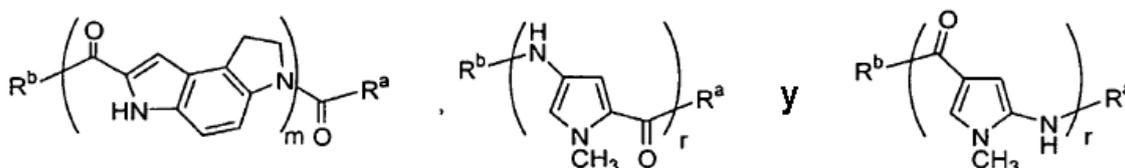
En un grupo de realizaciones, los oligonucleótidos modificados también tendrán unido de forma covalente un ligante del surco menor ("minor groove binder", MGB). En la bibliografía se han descrito una diversidad de ligantes del surco menor adecuados. Véase, por ejemplo, Kutayavin, et al., patente de EEUU nº 5.801.155; Wemmer, D.E. y Dervan P.B., *Current Opinon in Structural Biology*, 7:355-361 (1997); Walker, W.L., Kopka, J.L. y Goodsell, D.S., *Biopolymers*, 44:323-334 (1997); Zimmer, C. y Wahnert, U., *Prog. Biophys. Molec. Bio.*, 47:31-112 (1986); y Reddy, B.S.P., Dondhi, S.M., y Lown, J. W., *Pharmacol. Therap.*, 84:1-111 (1999).

Los procedimientos adecuados para unir MGB (así como grupos indicadores, tales como fluoróforos y extintores descritos a continuación) a través de conectores a oligonucleótidos se describen, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 5.512.677; 5.419.966; 5.696.251; 5.585.481; 5.942.610; y 5.736.626.

Los MGB pueden unirse a cualquiera o a ambos extremos del oligonucleótido. Además, o como alternativa, uno o más MGB pueden unirse en el interior del oligonucleótido, dependiendo de la longitud del oligonucleótido. En general, la conjugación de un MGB con cualquiera de los extremos del oligonucleótido proporcionará el mayor grado de estabilidad del híbrido, puesto que el fundido de un dúplex oligonucleotídico comienza en los extremos terminales. No obstante, si ambos extremos de un dúplex formado por un oligonucleótido son relativamente estables, por ejemplo, debido a un alto contenido en G+C, la unión de un MGB en el interior de un oligonucleótido (por ejemplo, cerca de una secuencia rica en A+T) también puede potenciar la estabilidad. El uso previsto del conjugado de MGB-oligonucleótido también puede crear limitaciones a la localización del MGB conjugado. Por ejemplo, si un oligonucleótido se diseña para ser empleado como cebador, el grupo 3'-hidroxi debe estar libre y debe ser capaz de ser alargado por una enzima polimerizante. Como alternativa, un ensayo que requiera un oligonucleótido que posea un extremo 5' marcado requerirá la unión interna o en el extremo 3' de un MGB.

La localización de un MGB dentro de un conjugado de MGB-oligonucleótido modificado también puede afectar a las propiedades discriminatorias de dicho conjugado. Una región desapareada dentro de un dúplex producirá cambios en la forma del surco menor en la vecindad de la base o bases desapareadas. Puestos que los MGB encajan mejor dentro del surco menor de un dúplex de ADN perfectamente apareado, los desapareamientos que producen cambios en la forma del surco menor reducirán la fuerza de unión de un MGB a una región que contenga un desapareamiento. Por tanto, la capacidad de un MGB para estabilizar dicho híbrido disminuirá, aumentando con ello la capacidad de un conjugado de MGB-oligonucleótido para discriminar un desapareamiento de un dúplex perfectamente apareado. Por otra parte, si un desapareamiento se encuentra fuera de la región complementaria con un conjugado de MGB-oligonucleótido, se espera que la capacidad discriminatoria de los oligonucleótidos no conjugados y conjugados con MGB de *igual longitud* sea aproximadamente la misma. Puesto que la capacidad de una sonda oligonucleotídica para discriminar desapareamientos de una sola base depende de su longitud, unos oligonucleótidos más cortos serán más eficaces para discriminar desapareamientos. La principal ventaja de utilizar conjugados de MGB-oligonucleótido en este contexto se basa en el hecho de que pueden utilizarse oligonucleótidos mucho más cortos, comparados con los que se utilizan en la técnica anterior (es decir, 20-meros o más cortos), que tienen mayor poder discriminatorio, debido al pronunciado efecto estabilizante de la conjugación del MGB.

Los ligantes del surco menor preferidos se seleccionan de las siguientes fórmulas:



El subíndice m es un número entero de 2 a 5; el subíndice r es un número entero de 2 a 10; y cada R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente un grupo conector con el oligonucleótido modificado, H, -OR<sup>c</sup>, -NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>, -COOR<sup>c</sup> o -CONR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>, en los que cada R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> se seleccionan de H, heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), heteroalquenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), heteroalquinilo(C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), alquenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), alquinilo(C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), aril(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), y arilo.

Los ligantes del surco menor particularmente preferidos incluyen el trímero de 3-carbamoyl-1,2-dihidro-(3H)-pirrolo[3,2-e]indol-7-carboxilato (CDPI<sub>3</sub>), el pentámero de N-metilpirrol-4-carbox-2-amida (MPC<sub>5</sub>) y otros ligantes del surco menor que muestran una mayor discriminación de desapareamientos. Otros restos MGB que pueden utilizarse en la práctica de la presente invención se divulgan en la patente de EEUU nº 5.801.155, de propiedad del solicitante. En ciertas realizaciones, los MGB pueden tener unidos grupos potenciadores de la solubilidad en agua (por ejemplo, azúcares o aminoácidos).

#### Grupos indicadores

En otro grupo de realizaciones, el oligonucleótido modificado también comprenderá al menos un grupo indicador unido de modo covalente. Los grupos indicadores pueden unirse utilizando procedimientos y grupos conectores descritos anteriormente para los MGB. Los grupos indicadores adecuados para los presentes oligonucleótidos modificados incluyen esferas, nanopartículas (Taton, T.A. et al., *Science*, 289:1757-1760 (2000)),

quimioluminiscentes, isótopos, enzimas y fluoróforos. Preferiblemente, el grupo indicador es un fluoróforo (véase, Haugland, R.P., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, 6ª edición, Molecular Probes, Eugene, OR, 1996). Los fluoróforos adecuados incluyen los tintes de resorrufina, los tintes de cumarina, los tintes de rodamina, los tintes de cianina, los tintes de BODIPY y los pirenos.

## 5 Extintores

Los procedimientos de detección desarrollados en fechas recientes emplean el proceso de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para la detección de la hibridación de las sondas, en lugar de la detección directa de la intensidad de fluorescencia. En este tipo de ensayo, se produce una FRET entre un fluoróforo donante (indicador) y una molécula aceptora (extintor) cuando el espectro de absorción de la molécula extintora se solapa con el espectro de emisión del fluoróforo donante, y las dos moléculas están muy cercanas. La energía del estado excitado del fluoróforo donante se transfiere al aceptor vecino mediante interacción de dipolos inducida por dipolos de resonancia, que da como resultado la extinción de la fluorescencia del donante. Si la molécula aceptora es un fluoróforo, su fluorescencia a veces puede aumentar. La eficacia de la transferencia de energía entre las moléculas de donante y aceptora es muy dependiente de la distancia entre las moléculas. Las ecuaciones que describen esta relación son conocidas. La distancia de Forster ( $R_0$ ) se describe como la distancia entre las moléculas de donante y aceptora a la que la transferencia de energía es 50% eficaz. También se conocen otros mecanismos de extinción de la fluorescencia, tales como la extinción de transferencia de carga y colisional. En la técnica se encuentra una gran cantidad de directrices para seleccionar parejas de extintor y fluoróforo, y su unión a oligonucleótidos (Haugland, R.P., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, 6ª edición, Molecular Probes, Eugene, OR, 1996; patentes de EEUU nº 3.996.345 y 4.351.760 y similares).

Los extintores preferidos se describen en el documento U.S. nº de serie 09/457.616, de propiedad del solicitante (presentado el 8 de diciembre, 1999).

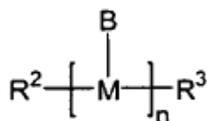
### Fluoróforos y extintores

En ciertas realizaciones de la presente invención, se emplean oligonucleótidos que comprenden marcadores fluorescentes (fluoróforos) y/o agentes extintores de la fluorescencia. En una realización preferida, un oligonucleótido contiene un fluoróforo y un agente extintor. Los marcadores fluorescentes incluyen, pero no se limitan a fluoresceínas, rodaminas, cianinas, ficoeritrinas y otros fluoróforos descritos en la presente. Otros fluoróforos adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. Tal como se indicó anteriormente, los agentes extintores o extintores pueden absorber la energía emitida por un fluoróforo para reducir la cantidad de fluorescencia emitida (es decir, para extinguir la emisión del marcador fluorescente). Diferentes fluoróforos son extinguidos por diferentes agentes extintores. En general, las propiedades espectrales de una pareja concreta de fluoróforo/agente extintor son de tal forma que una o más longitudes de onda de absorción del extintor se solapan con una o más de las longitudes de onda de emisión del fluoróforo. Una pareja de fluoróforo/agente extintor preferida puede ser seleccionada por los expertos en la técnica mediante la comparación entre las longitudes de onda de emisión y de excitación según las propiedades indicadas anteriormente.

Para su uso en los ensayos de amplificación realizados a temperaturas elevadas, tales como una reacción en cadena de polimerasa u otros procedimientos que emplean enzimas termoestables, el marcador es preferiblemente estable a temperaturas elevadas. Para los ensayos que impliquen polimerización, el marcador no debe interferir con la actividad de la enzima polimerizante. Además, el marcador estará presente en el extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido y/o también puede estar presente de modo interno en una posición que no interfiera. Por consiguiente, puede unirse un marcador a cualquiera de las bases, azúcares o restos fosfato del oligonucleótido, o a cualquier grupo conector que, en sí mismo, esté unido a estos restos.

Aunque la invención se ha descrito en términos de las diversas bases y otros componentes opcionales, la estructura global de los oligonucleótidos modificados también puede expresarse en una fórmula para indicar una construcción deseada.

Por tanto, en un grupo de realizaciones, los oligonucleótidos modificados tienen la fórmula:

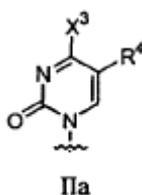


en la que  $R^2$  y  $R^3$  representan los terminales del oligonucleótido modificado; el subíndice  $n$  es un número entero de 4 a 70, más preferiblemente de 4 a 25, y aún más preferiblemente de 4 a 10; cada  $B$  es un miembro seleccionado independientemente de adenina, timina, citosina, guanina, uracilo, una pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida, y una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida; y cada  $M$  se selecciona de un azúcar formador de oligómero y un aminoácido formador de ácidos nucleicos peptídicos, con la condición de que al menos dos de los  $B$  se seleccionan de pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas y pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas como se menciona en la

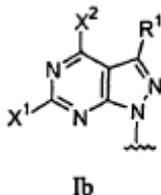
reivindicación 1. En ciertas realizaciones específicas,  $R^2$  y  $R^3$  representan los extremos 5'- y 3'-terminales de un oligonucleótido modificado, en la que M es un azúcar formador de oligómero (por ejemplo, 2-desoxi- $\beta$ -D-ribofuranosa,  $\beta$ -D-ribofuranosa,  $\alpha$ -D-arabinofuranósidos,  $\alpha$ -2'-desoxirribofuranósidos, 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos y azúcares bloqueados). Para aquellas realizaciones en que los oligonucleótidos modificados tienen unidos ligantes del surco menor, grupos indicadores, etc., cada uno de los grupos  $R^2$  y  $R^3$  pretende incluir grupos funcionales adecuados para la unión de grupos indicadores y los otros componentes funcionales (MGB, fluoróforo, extintor y similares). Estos grupos funcionales incluyen, por ejemplo, grupos hidroxilo, grupos amino, grupos ácido carboxílico o éster, grupos éster o ácido fosfórico, fosfónico o fosfínico, grupos éster y ácido sulfónico, y similares. En otras realizaciones, los MGB, los grupos indicadores y similares están unidos a cualquiera de los grupos de bases interiores/del esqueleto utilizando la metodología convencional.

En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona oligonucleótidos modificados que comprenden al menos una base de pirimidina 5-sustituida y al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida. La base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida útiles en este aspecto de la invención son esencialmente las que se han descrito en las patentes de los Estados Unidos números 5.645.985 y 5.484.908.

En realizaciones preferidas de la invención, la base de pirimidina 5-sustituida tiene la fórmula:

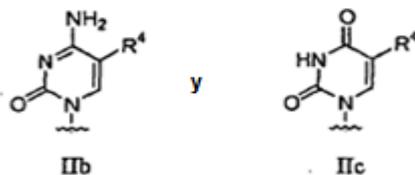


y la base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida tiene la fórmula:



en la que en la que cada uno de los grupos  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  se selecciona independientemente de H, OH,  $NH_2$  y un grupo amino protegido; y cada uno de  $R^1$  y  $R^4$  se selecciona independientemente de H, heteroalquilo ( $C_1-C_{12}$ ), heteroalqueno ( $C_2-C_{12}$ ), heteroalquino ( $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -O-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquino  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -S-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquino  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil (alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil (alqueno  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil (alquino  $C_2-C_{12}$ ), aril (alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril (alqueno  $C_2-C_{12}$ ), aril (alquino  $C_2-C_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y sus formas protegidas, con la característica adicional de que  $R^1$  también puede ser H

En realizaciones particularmente preferidas, la base de pirimidina 5-sustituida se selecciona a partir de:



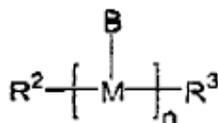
en las que  $R^4$  se selecciona preferiblemente a partir de propinilo, hidroxipropinilo, aminopropinilo, hidroxibutinilo, o un grupo fenilo, tienilo, tiazolilo, imidazolilo, furanilo, oxazolilo, piridinilo, pirrolilo, indolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo o benzoxazolilo, unido directamente al anillo de pirimidina o unido al anillo por uno a cuatro grupos conectores de carbono que pueden estar saturados (por ejemplo, etileno, propileno, butileno) o insaturados (por ejemplo, acetileno, propinileno, butinileno, propenileno, butenileno).

En otras realizaciones la base de pirazolo[3,4-d]pirimidina se selecciona de las bases preferidas proporcionadas anteriormente (Ic, Id e Ie). Además, las bases adecuadas también están representadas en la figura 1.

Al igual que el anterior aspecto de la invención, en el que los oligonucleótidos modificados comprenden al menos dos pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas o 3-sustituidas, este aspecto de la invención puede comprender, de modo similar, otros grupos, tales como MGB y grupos indicadores (por ejemplo, fluoróforos, extintores y similares),

así como grupos conectores adecuados para la unión de estos componentes adicionales.

También se prefieren las realizaciones en que el oligonucleótido modificado se representa con la fórmula:

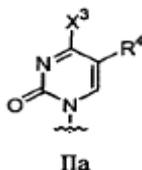


5 en la que R<sup>2</sup> representa un primer extremo del oligonucleótido modificado; R<sup>3</sup> representa un segundo extremo del oligonucleótido modificado; el subíndice n es un número entero de 4 a 70; cada B se selecciona independientemente de adenina, timina, citosina, guanina, uracilo, una pirimidina 5-sustituida, una pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida, y una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida (con la condición de que al menos una base es una pirimidina 5-sustituida y al menos una base es una pirazolo[3,4-d]pirimidina como se menciona en la reivindicación 1); y cada M es un azúcar formador de oligómero y un aminoácido formador de ácidos nucleicos peptídicos.

10 En otro aspecto más de la divulgación, se proporcionan oligonucleótidos modificados que comprenden un ligante del surco menor unido, y en los que tan pocas como una de las bases está reemplazada por una base modificada. De manera sorprendente, la combinación de MGB y una única base modificada (u opcionalmente múltiples bases modificadas) conduce a un oligonucleótido modificado que tiene propiedades particularmente útiles para la discriminación de desapareamientos, así como extensiones de cebadores y otras utilidades descritas a continuación. Este grupo de oligonucleótidos modificados preferiblemente comprende de 4 a 70 bases, y un ligante del surco menor unido, en el que al menos una de las bases está reemplazada por una base modificada seleccionada del grupo que consiste en pirimidinas 5-sustituidas y pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas o 3-sustituidas.

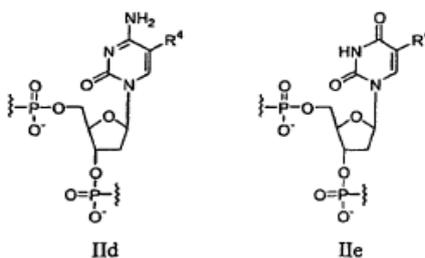
15 En este aspecto de la divulgación, los ligantes del surco menor, las pirimidinas 5-sustituidas y las pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas o 3-sustituidas pueden ser fundamentalmente cualquiera de los componentes descritos anteriormente.

20 En un grupo de realizaciones de la divulgación, el oligonucleótido modificado tiene al menos una pirimidina 5-sustituida, que tiene preferiblemente la fórmula:

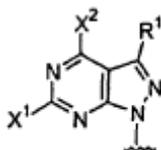


25 en la que X<sup>3</sup> se selecciona a partir de H, NH<sub>2</sub>, OH y SH, y R<sup>4</sup> se selecciona a partir de heteroalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), heteroalqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), heteroalquino(C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), -O-(alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), -O-(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), -S-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), -S-(alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), -S-(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), heterociclil(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), heterociclil(alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), heterociclil(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), aril(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), aril(alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), aril(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y sus formas protegidas. En este grupo de realizaciones grupo arilo y heterociclilo preferidos (incluyendo los componentes de otros grupos, por ejemplo, arilaquilo) se seleccionan a partir de versiones sustituidas y no sustituidas de fenilo, toliilo, piridilo, tiazolilo, imidazolilo, furanilo, oxazolilo, tienilo, pirrolilo, benzimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, indolilo, triazinilo, pirimidinilo y naftilo. Los sustituyentes adecuados para estos grupos arilo y heterociclilo son los proporcionados en las definiciones generales anteriores.

30 Mas preferiblemente, los oligonucleótidos modificados comprenden al menos un grupo de base de pirimidina 5-sustituido de la Fórmula IId y IIe, donde el grupo sustituyente R<sup>4</sup> se selecciona a partir de un grupo alquilo o grupo alquino sustituido o no sustituido. Preferiblemente R<sup>4</sup> es un grupo hidroxipropinilo, hidroxibutinilo, aminopropinilo, aminobutinilo o propinilo. Alternativamente, el sustituyente R<sup>4</sup> puede ser un grupo 3-(hidroximetil)-4-hidroxi-1-butinilo (descrito más en detalle en lo sucesivo).



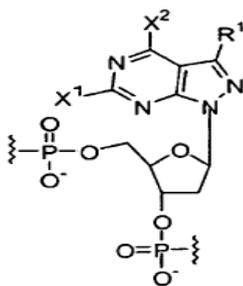
En otro grupo de realizaciones preferidas de la divulgación, el oligonucleótido modificado tiene al menos una base modificada que tiene la fórmula



Ib

5 en la que en la que cada uno de los grupos  $X^1$  y  $X^2$  se selecciona independientemente de H, OH,  $NH_2$  y un grupo amino protegido; y cada uno de  $R^1$  y  $R^4$  se seleccionado independientemente de H, heteroalquilo( $C_1-C_{12}$ ), heteroalqueno( $C_2-C_{12}$ ), heteroalquinilo( $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -O-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -S-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y sus formas protegidas. En este grupo de realizaciones grupo arilo y heterociclilo preferidos (incluyendo los componentes de otros grupos, por ejemplo, arilaquilo, heterocicloalquilo) se seleccionan a partir de versiones sustituidas y no sustituidas de fenilo, toliilo, piridilo, tiazolilo, imidazolilo, furanilo, oxazolilo, tienilo, pirrolilo, benzimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, indolilo, triazinilo, pirimidinilo y naftilo. Los sustituyentes adecuados para estos grupos arilo y heterociclilo son los proporcionados en las definiciones generales anteriores.

15 En realizaciones particularmente preferidas de la divulgación, los oligonucleótidos modificados comprenden al menos un monómero de fórmula If:



If

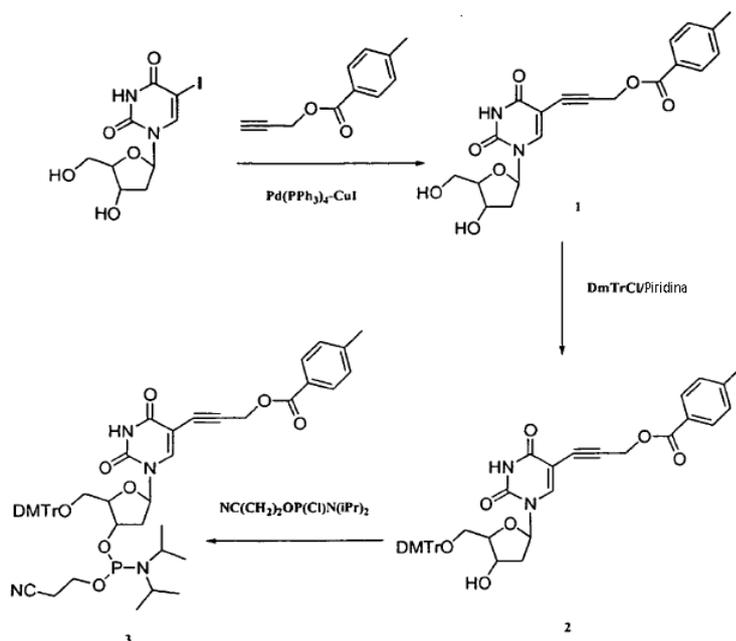
en la que  $X^1$  y  $X^2$  son independientemente H, OH o  $NH_2$ ;  $R^1$  es más preferiblemente 3-hidroxi-propin-1-ilo, propinilo, 3-aminopropin-1-ilo, 4-hidroxi-1-butinilo, , halógeno o 3,3,3-trifluoropropin-1-ilo. La síntesis de algunos de estos monómeros se ha descrito (Balow et al., Nuc. Acid Res., 26:3350-33357 (1998); Seela et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans., I, 479-488 (1999); Ramzaeva et al., Helv. Chim. Acta, 80:1809-1822 (1997)).

#### 20 Preparación de bases modificadas y oligonucleótidos

Los esquemas de reacción 1-6 proporcionan procedimientos ilustrativos para preparar una serie de bases modificadas (pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas y 3-sustituidas, y pirimidinas 5-sustituidas) que son útiles en la presente invención. El esquema ilustra la preparación de derivados de fosforamidita de las bases modificadas que pueden utilizarse, por ejemplo, en sintetizadores automáticos para preparar los oligonucleótidos modificados de la invención.

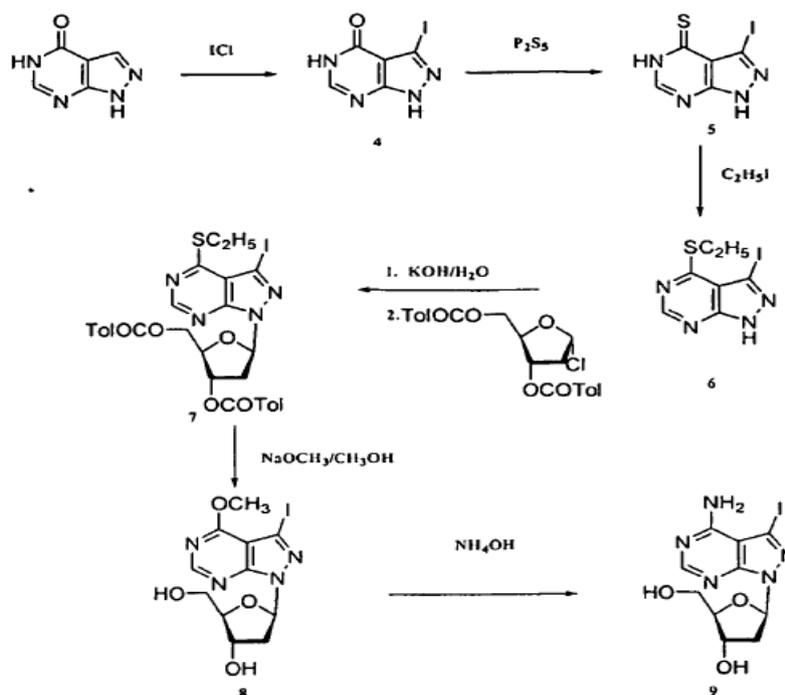
El esquema de reacción 1 ilustra la preparación de 3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita] de la 5-(propin-2-inil-4-metilbenzoato)-5'-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-2'-desoxiuridina (3), comenzando a partir de 5-yodo-2'-desoxiuridina. Los materiales de partida se trataron con 4-metilbenzoato de prop-2-inilo en presencia de  $Pd(PPh_3)_4-CuI$  para producir el derivado de metilbenzoato (1) que entonces se convirtió en el derivado de DMTr 5'-bloqueado (2) y después en la fosforamidita (3).

Esquema de reacción 1



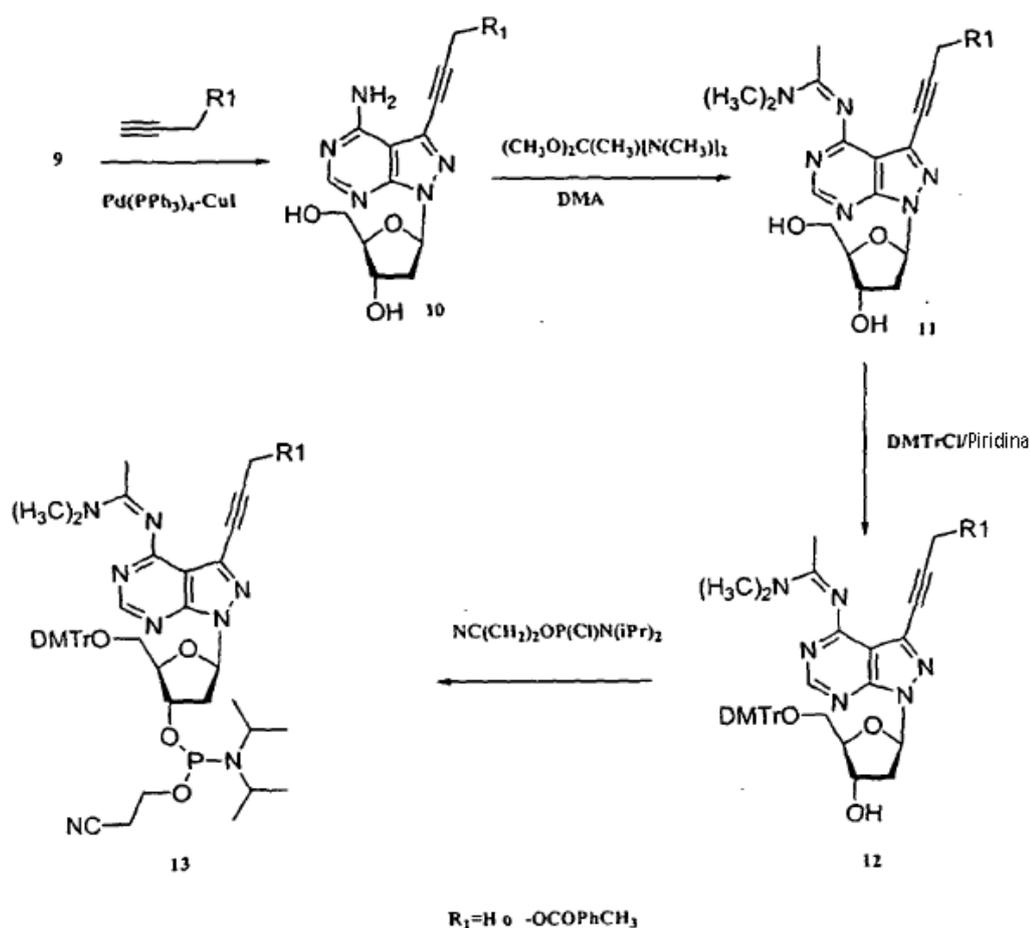
Los esquemas de reacción 2 y 3 proporcionan un procedimiento para la preparación de las fosforamitidas de la pirazolo[3,4-d]pirimidina. Más en concreto, estos esquemas ilustran la preparación de 4-metilbenzoato de 3-[4-((1E)-1-aza-2-metilprop-1-enil)-1-((2R,5R)-4-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinooxi]-5-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]oxolan-2-il)pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]prop-2-ilnilo (**13**;  $\text{R}_1 = \text{-OCOPhCH}_3$ ) que se sintetiza en dos porciones.

Esquema de reacción 2



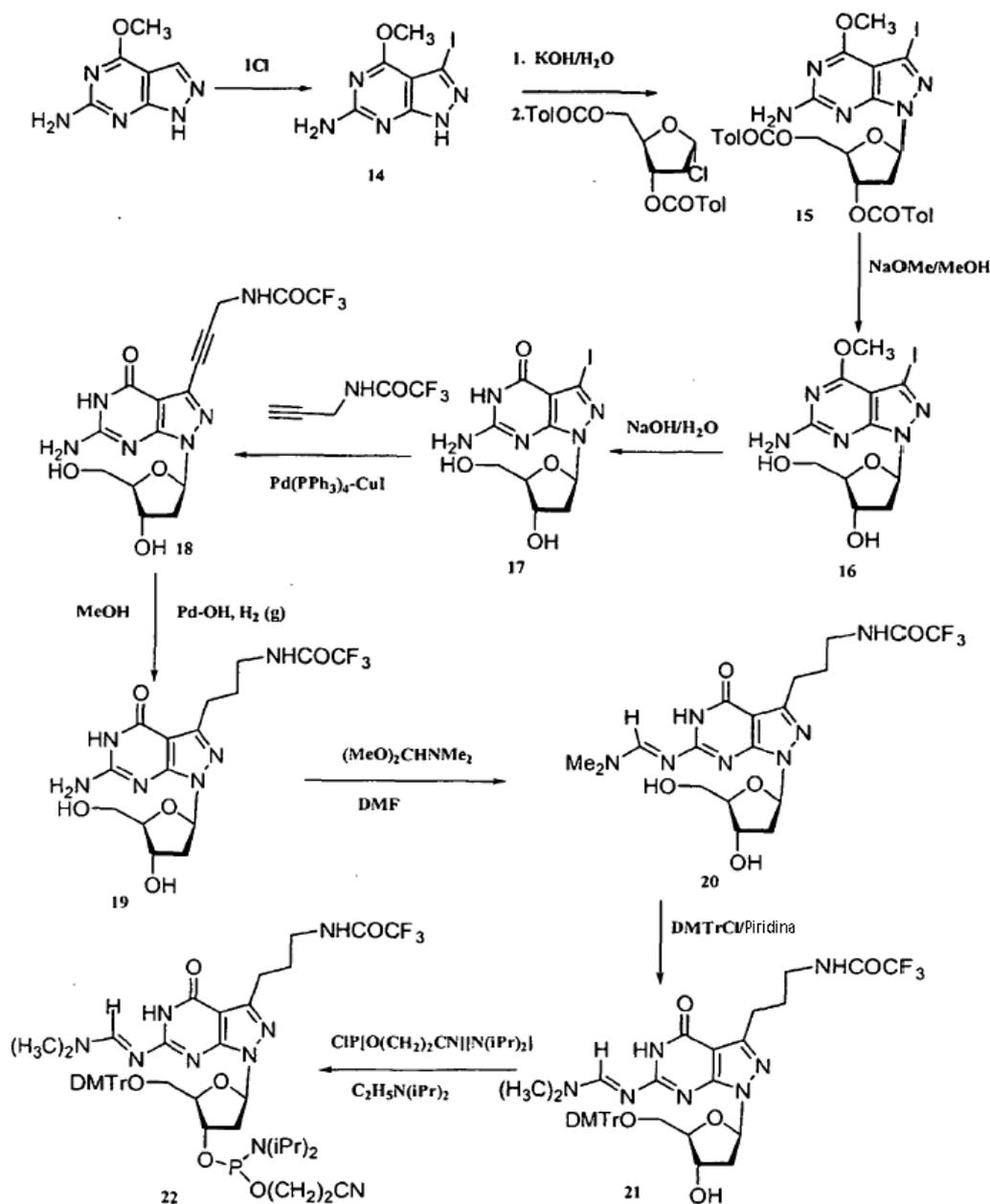
En la primera porción (esquema de reacción 2), se sintetizó el (2R,5R)-5-(4-amino-3-yodopirazolo[3,4-d]pirimidinil)-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (**9**) comenzando a partir de 1,5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona. El material de partida se trató con monocloruro de yodo y P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> sucesivamente para producir los derivados de yodo (**4**) y tiona (**5**), respectivamente. La tiona (**5**) se convirtió en el derivado de etiltio (**6**), que se combinó con un derivado de 1-cloro-1,2-didesoxi-3,5-di-O-toluoiribofuranosa para producir el nucleósido bloqueado (**7**). La reacción del compuesto (**7**) con metóxido de sodio, seguido de hidróxido de amonio, produjo el derivado de hidroximetilo (**8**) y el compuesto (**9**), respectivamente. En la segunda porción (esquema de reacción 3), se preparó el 4-metilbenzoato de 2,3-[4-((1E)-1-etoxifenil)fenilmetoxi]metil]oxolan-2-il]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]prop-2-inoilo (**13**; R<sub>1</sub> = -OCOPhCH<sub>3</sub>) comenzando a partir del compuesto (**9**). El compuesto (**9**) se hizo reaccionar con 4-metilbenzoato de prop-2-inoilo en presencia de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>-CuI para producir el derivado de prop-2-inoilo (**10**, R<sub>1</sub> = -OCOPhCH<sub>3</sub>). El grupo amino en este compuesto se protegió mediante una reacción con N,N-dimetilacetamida dimetil acetal para producir (**11**) (R<sub>1</sub> = -OCOPhCH<sub>3</sub>). El compuesto (**11**) (R<sub>1</sub> = -OCOPhCH<sub>3</sub>) se convirtió en el derivado de DMTr (**12**) (R<sub>1</sub> = -OCOPhCH<sub>3</sub>) y después en la fosforamidita (**13**) (R<sub>1</sub> = -OCOPhCH<sub>3</sub>).

15 **Esquema de reacción 3**



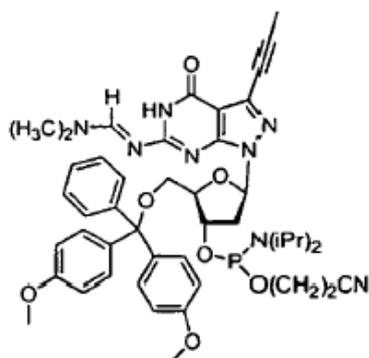
El esquema de reacción 4 ilustra la preparación de N-{3-[1-((2R,5R)-5-{bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil)-4-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinoxi]oxolan-2-il)-6-amino-4-oxo-(5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)]propil}-2,2,2-trifluoroacetamida (**22**).

## Esquema de reacción 4

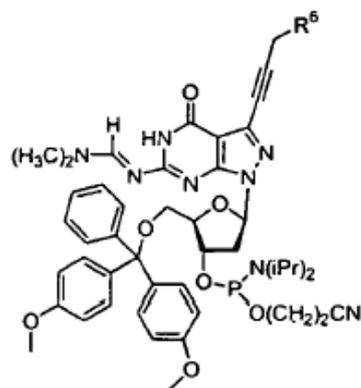


En el esquema de reacción 4, la 6-amino-4-metoxipirazolo[3,4-d]pirimidina se convirtió en el derivado de yodo (**14**), que se trató con 1-cloro-1,2-didesoxi-3,5-di-O-toluoilribofuranosa para producir el nucleósido (**15**). El compuesto (**15**) se trató con NaOMe/MeOH para hidrolizar los grupos toluoilo y producir el nucleósido no bloqueado (**16**). El tratamiento de (**16**) con hidróxido de sodio acuoso produjo (**17**), que puede convertirse en el derivado de trifluoro-N-prop-2-inilacetamida (**18**). El compuesto (**18**) se redujo con hidrógeno y un catalizador de Pd para producir el derivado de trifluoro-N-propilacetamida (**19**). El grupo 4-amino del compuesto (**19**) se protegió mediante un tratamiento con N,N-dimetilformamida dimetil acetal para producir el compuesto (**20**), que se convirtió en el derivado de DMTr (**21**) y después en el derivado de fosoramidita (**22**).

- 10 Los compuestos de fórmula 4 (3-(((2R,5R)-5-(6-amino-4-oxo-3-prop-1-inil-(5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidinil))-2-[[bis(4-metoxifenil)fenil]metil]oxolan-3-iloxi)-[bis(metiletil)-amino]fosfinooxi]propanitrilo) (PPPG fosoramidita) pueden sintetizarse utilizando algunas de las reacciones en el esquema de reacción 4.



Fórmula 4

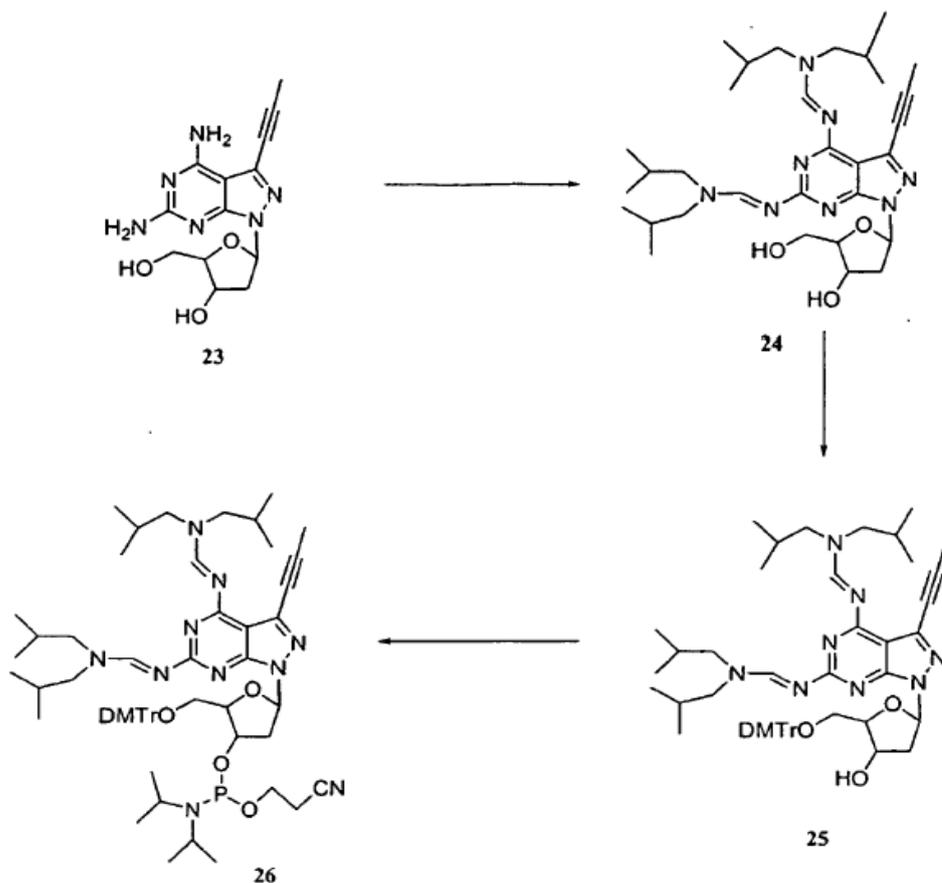


Fórmula 5

5 En la conversión de (17) a (18), se emplea prop-1-ino en lugar de 2,2,2-trifluoro-N-prop-2-inilacetamida. El grupo 6-amino puede protegerse como se describió para el compuesto (20), y el 5'-hidroxilo puede protegerse con un grupo DMTr como se describió para el compuesto (21). Por último, la fosforamidita puede prepararse como se describió para el compuesto (22), para producir el compuesto de fórmula 4. De manera similar, los compuestos de fórmula 5, en la que R<sup>6</sup> es -OCOPhCH<sub>3</sub> o -NHCOF<sub>3</sub>, pueden prepararse utilizando reacciones conocidas en la técnica.

El esquema de reacción 5 ilustra la preparación de 3-[[5-(4,6-bis((1E)-1-aza-2-[bis(2-metilpropil)amino]vinil)-3-prop-1-inilpirazolo[3,4-d]pirimidinil)-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]-metil]oxolan-3-iloxi]-etil(metiletil)amino]fosfino]propannitrilo (26).

#### 10 Esquema de reacción 5

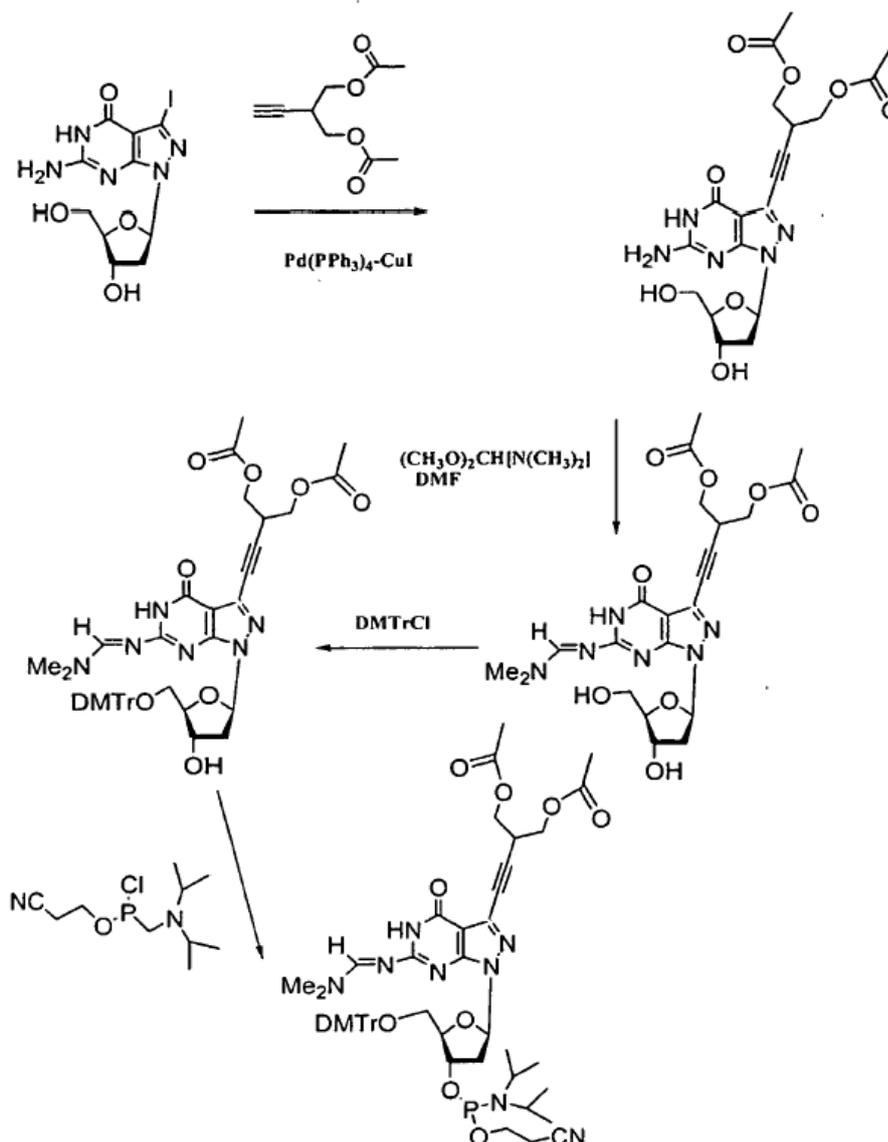


El compuesto (26) puede sintetizarse comenzando a partir de (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPA (23) (véase, Seela y Driller, Helv. Chim. Acta, 71:757-761(1988)). El compuesto (23) puede convertirse en el derivado de bis(metiletil)amino (24) (Vincent et

al., J. Org. Chem., 64:991-997 (1999)), seguido de una reacción primero con DMTTrCl para producir (**25**), que puede convertirse en la fosforamidita (**26**).

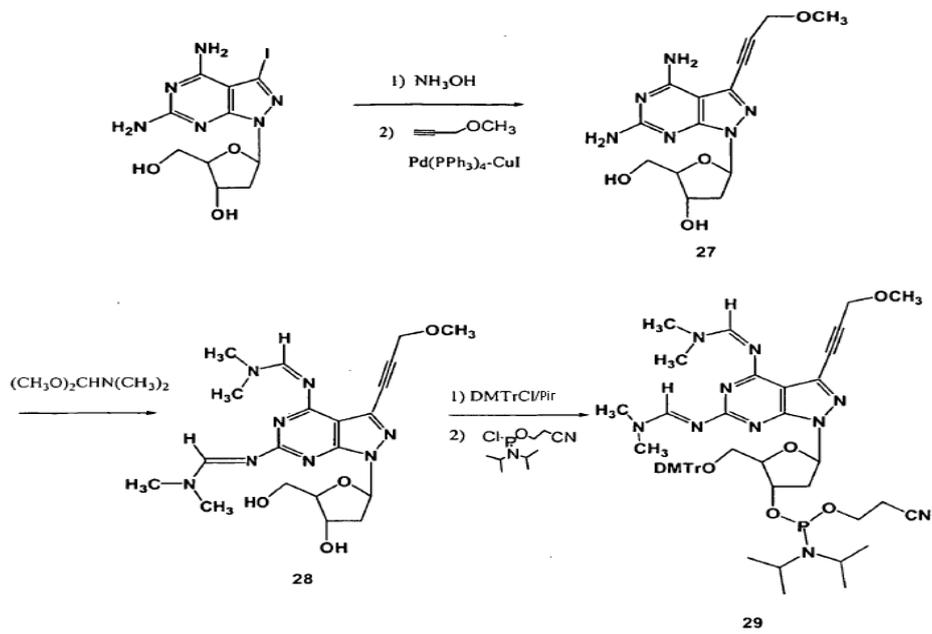
La reacción del esquema 6 proporciona la síntesis de pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas protegidas, en las que el sustituyente es un grupo heteroalquilo.

#### 5 Esquema de reacción 6



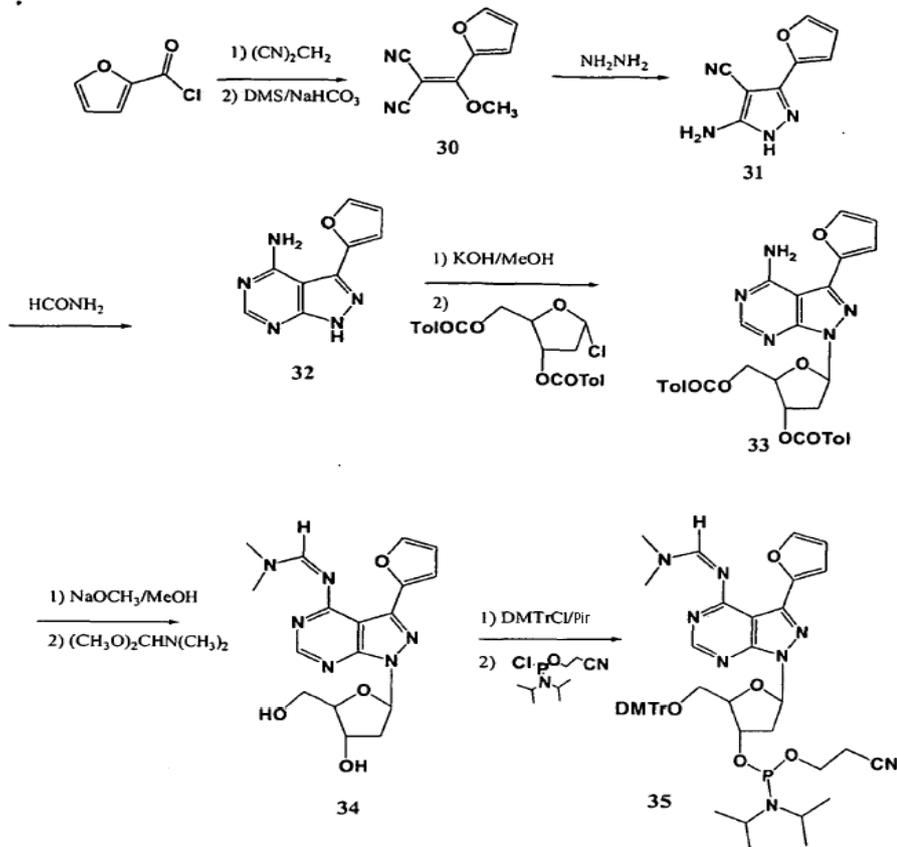
El esquema de reacción 7 proporciona la síntesis de una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida protegida, en la que el sustituyente es un grupo metoxipropinilo. El derivado de 3-yododiamino (**23**) se hizo reaccionar con  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4\text{-CuI}$ , trietilamina en DMF anhidro, seguido de metil propargil éter, para producir el derivado de 3-metoxipropinil-2,4-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidina (**27**). Los grupos amino en este compuesto se bloquearon mediante una reacción con N,N-dimetilformamida dimetil acetal para producir (**28**). El nucleósido bloqueado se hizo reaccionar primero con cloruro de dimetoxitritilo y después con diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo para producir la fosforamidita bloqueada deseada (**29**).

Esquema de reacción 7



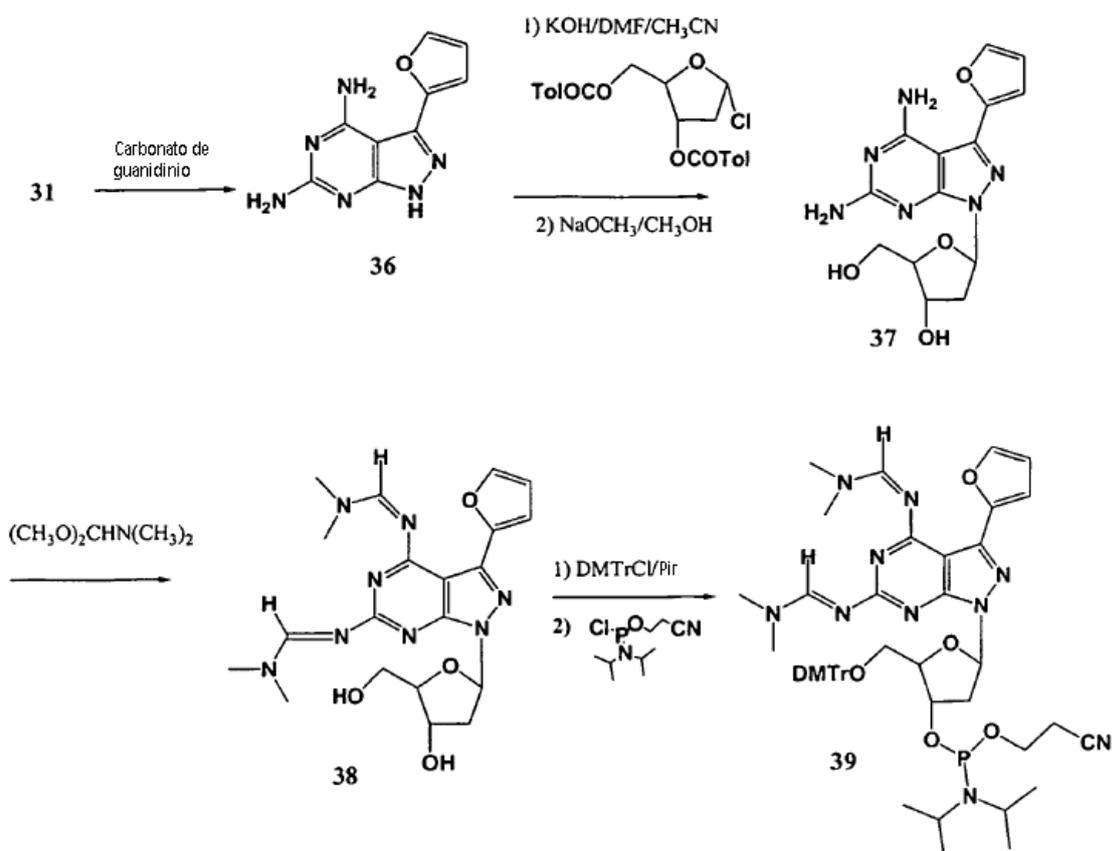
Los siguientes esquemas de reacción proporcionan procedimientos para la preparación de pirazolo[3,4-d]pirimidinas sustituidas con 3-heterociclo. Los procedimientos generales proporcionados en la presente pueden adaptarse para la preparación de otros sustituyentes heterocíclicos.

5 Esquema de reacción 8



El esquema de reacción 8 proporciona la síntesis de una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida protegida, en la que el sustituyente es un grupo furanilo. Se hizo reaccionar malonitrilo con cloruro de 2-furfurilo en presencia de una base, seguido de un tratamiento con sulfuro de dimetilo para producir el derivado de metoxi dinitrilo (**30**). La reacción de (**30**) con hidrazina produjo el pirazol sustituido (**31**) que se hizo reaccionar con formamida para producir 3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (**32**). La base (**32**) se trató con 1-cloro-1,2-didesoxi-3,5-di-O-toluoilribofurano para producir el nucleótido bloqueado (**33**). El compuesto (**33**) se trató primero con NaOMe/MeOH para hidrolizar los grupos toluóilo para producir el derivado de nucleósido no bloqueado que se hizo reaccionar con N,N-dimetilformamida dimetil acetal para producir el derivado de nucleósido protegido (**34**). Este derivado se hizo reaccionar primero con cloruro de dimetoxitritilo y después con diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo para producir la fosforamidita bloqueada deseada (**35**).

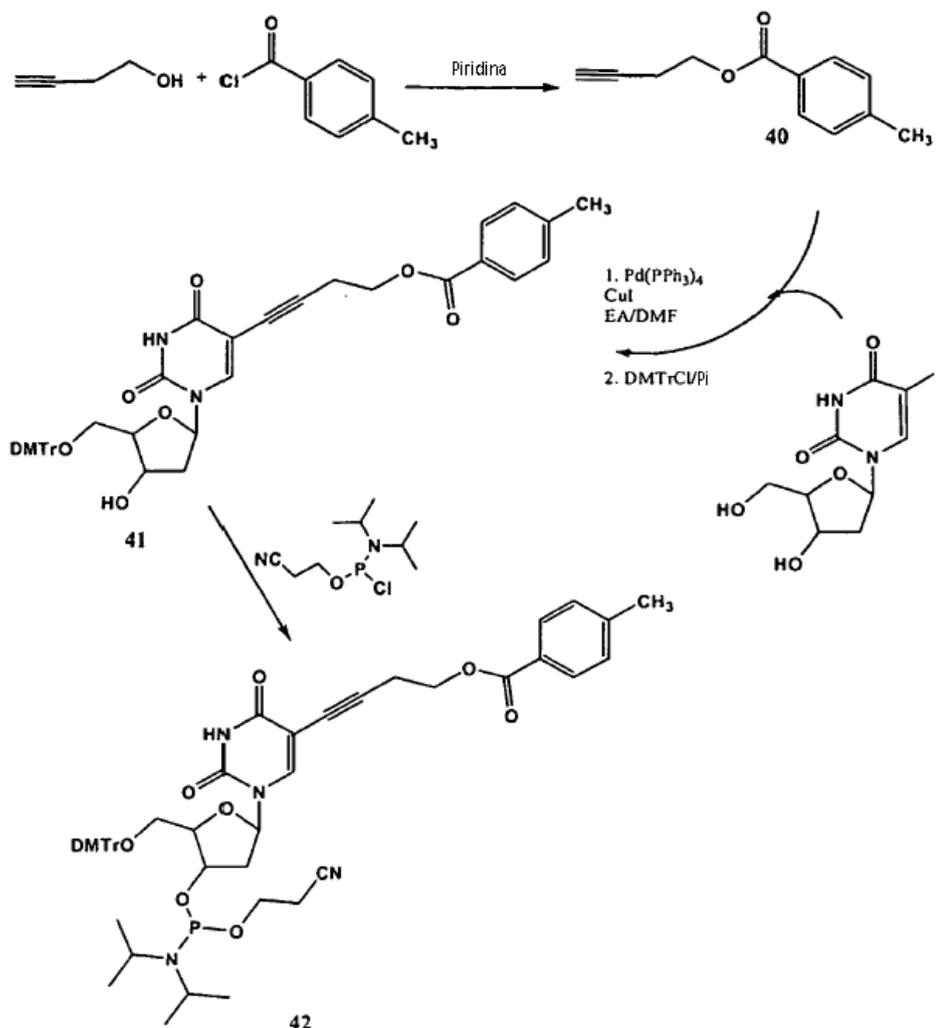
### Esquema de reacción 9



El esquema de reacción 9 proporciona la síntesis de una 2,4-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida protegida, en la que el sustituyente es un grupo furanilo. El carbonitrilo (**31**) se hizo reaccionar con carbonato de guanidinio para producir 3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina (**36**). Esta base se trató con 1-cloro-1,2-dideoxi-3,5-di-O-toluoilribofurano para producir el nucleótido bloqueado, que se trató con NaOMe/MeOH para hidrolizar los grupos toluóilo y producir el derivado de nucleósido no bloqueado (**37**). Este último compuesto se hizo reaccionar con N,N-dimetilformamida dimetilacetil para producir el derivado de nucleósido protegido (**38**). Este derivado se hizo reaccionar primero con cloruro de dimetoxitritilo y después con diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo para producir la fosforamidita bloqueada deseada (**39**).

20

## Esquema de reacción 10

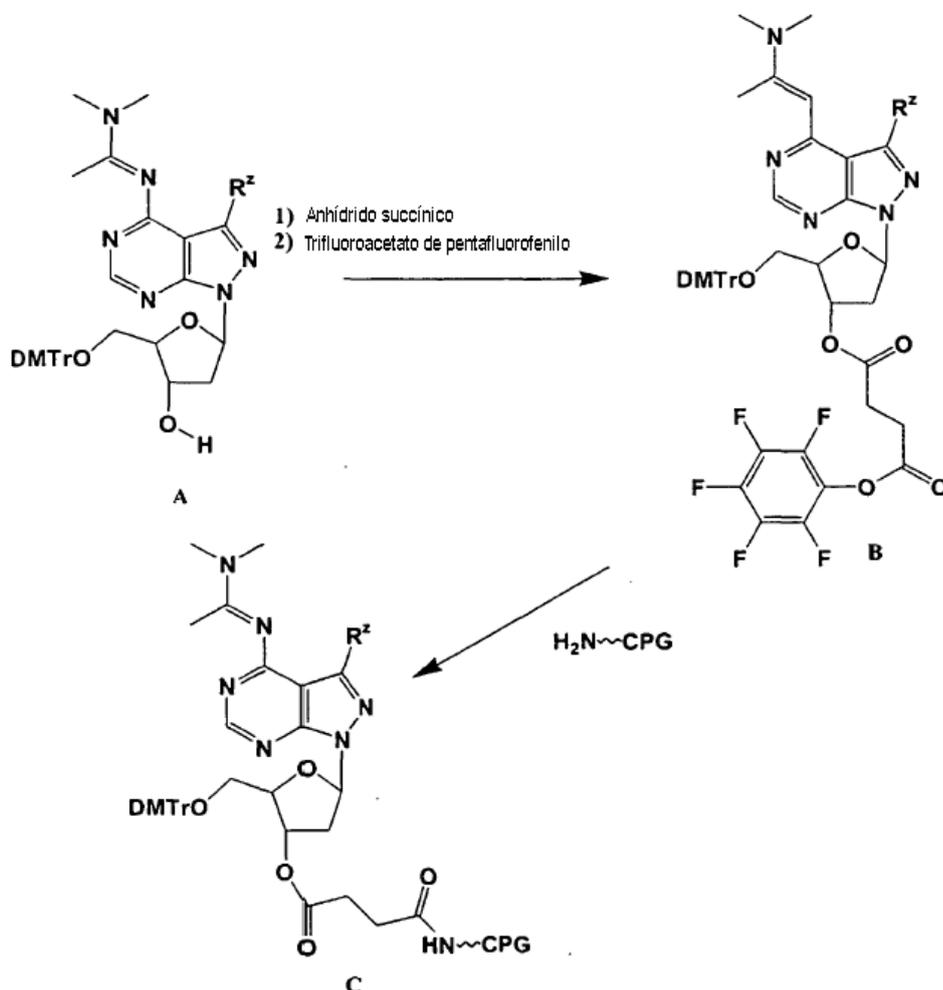


El esquema de reacción 10 proporciona una vía de síntesis para una HOBU-fosforamidita hidroxiprottegida. En este esquema, el 3-butin-1-ol se convierte en su éster *p*-toluoílico (**40**) con cloruro de *p*-toluoilo en presencia de piridina. El butinol protegido se combina con 5-yodo-2'-desoxiuridina en presencia de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) y yoduro de cobre, después se protege (como un DMT éter) para formar (**41**), que entonces puede convertirse en su correspondiente derivado de fosforamidita (**42**). El reactivo (**42**) puede utilizarse directamente en la preparación de oligonucleótidos modificados. La eliminación del grupo protegido de *p*-toluoilo puede realizarse según procedimientos convencionales.

En cada uno de los anteriores esquemas, los expertos en la técnica entenderán que pueden utilizarse otros grupos protectores y/o grupos activantes. Además, diferentes monómeros que contienen bases no naturales, con diferentes grupos funcionales, pueden requerir diferentes grupos bloqueantes para la síntesis satisfactoria de los oligonucleótidos modificados. Una diversidad de grupos de protección útiles, su síntesis y los procedimientos de desprotección se describen, por ejemplo, en Beaucage e Iyer, *Tetrahedron*, 48:2223-2311 (1992).

La síntesis de oligonucleótidos y de oligonucleótidos modificados puede iniciarse a partir de un soporte sólido que contenga un conector escindible al cual se une la primera base. Los oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse para que contengan una pirazolo[3,4-d]pirimidina sustituida como primer nucleótido en el extremo 3', utilizando una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida apropiada. Como alternativa, una pirimidina 5-sustituida puede unirse inicialmente a un soporte sólido. El esquema de reacción 11 ilustra una estrategia general para la síntesis de un derivado de dA CPG de pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida protegida (C). El intermedio (A) puede prepararse utilizando los procedimientos descritos en el esquema de reacción 3, mientras que (B) y (C) pueden sintetizarse como se describe en la solicitud de EEUU nº de serie 09/457.616, en tramitación junto con la presente.

## Esquema de reacción 11



En este aspecto de la divulgación, una diversidad de soportes sólidos son útiles, con la condición de que el soporte sea compatible con las técnicas de oligonucleótidos automáticas, e incluyen vidrio, poliestireno, nailon, plástico y similares. Además, la presente invención proporciona, en un aspecto relacionado, un soporte sólido (por ejemplo, vidrio de tamaño de poro controlado (CPG)) que tenga una base modificada unida, preferiblemente las que tienen las fórmula 1c, 1d, 1e, 1f, 1lb, 1lc, 1ld, 1le. Más preferiblemente, la base modificada unida es un resto pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida o pirimidina 5-sustituida, en la que los sustituyentes se seleccionan de los grupos preferidos descritos anteriormente, y también incluye las nuevas bases descritas con más detalle a continuación.

La presente invención incluye además aquellas composiciones y procedimientos en los que cualquiera de las pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas y/o 3-sustituidas y/o pirimidinas 5-sustituidas se combinan o se usan en combinación con otras bases modificadas conocidas en la técnica. Se han descrito otras unidades monoméricas modificadas (Scheit, NUCLEOTIDE ANALOGS, John Wiley, Nueva York, 1980; Uhlman y Meyman, Chemical Reviews, 90:543-584 (1990); Seela y Debelak, Nucl. Acids Res., 28:3224-3232 (2000); Balow et al., Nucl. Acids Res., 26:3350-3357 (1998); Bolli et al., Nucl. Acids Res., 24:4660-4667 (1996).

#### 15 Matrices de oligonucleótidos modificados

En otra realización de la presente invención, los oligonucleótidos modificados se emplean en procedimientos que utilizan matrices de oligonucleótidos, tales como la secuenciación mediante hibridación y el análisis basado en matrices de la expresión génica. La presente invención contempla una diversidad de matrices incluyendo, por ejemplo, matrices en chip o plataforma, matrices en esferas, matrices en fase líquida, matrices de "código postal" y similares. En la secuenciación mediante hibridación, una matriz ordenada de oligonucleótidos de diferente secuencia conocida se emplea como plataforma para la hibridación con uno o más polinucleótidos, ácidos nucleicos o poblaciones de ácidos nucleicos de ensayo. La determinación de los oligonucleótidos que se hibridan y el alineamiento de sus secuencias conocidas permite la reconstrucción de la secuencia del polinucleótido de ensayo. Como alternativa, pueden colocarse en matriz oligonucleótidos que comprenden la secuencia de tipo salvaje y todas las posibles secuencias mutantes para una región dada de un gen de interés. La exposición de la matriz al ADN o

ARN de un sujeto o espécimen biológico, bajo condiciones de hibridación, permite la determinación del estado de tipo salvaje o mutante para el gen de interés. Véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU nº 5.492.806; 5.525.464; 5.556.752; y las publicaciones PCT WO 92/10588 y WO 96/17957. Ambas técnicas requieren una discriminación entre las secuencias relacionadas, en especial al nivel de nucleótidos individuales; por tanto, las mayores propiedades discriminatorias de los oligonucleótidos modificados de la invención proporcionarán mejoras en estas técnicas. Los materiales para la construcción de matrices incluyen, pero no se limitan a nitrocelulosa, vidrio, obleas de silicio, fibras ópticas y otros materiales adecuados para la construcción de matrices, tales como son conocidos por los expertos en la técnica. La síntesis de matrices de oligonucleótidos se ha descrito en la solicitud U.S. nº de serie 09/364.320, en tramitación junto con la presente, y pueden realizarse modificaciones adecuadas a los procedimientos que aparecen en ésta para preparar las matrices de la presente invención.

Otra aplicación de la presente invención a la tecnología de las matrices es para el estudio de patrones de expresión génica en una célula o tejido concretos. En este caso, los oligonucleótidos o los polinucleótidos que se corresponden con diferentes genes se distribuyen en matriz sobre una superficie y, por ejemplo, se incubaba una muestra de ácido nucleico procedente de un tipo de célula o de tejido concreto con la matriz bajo condiciones de hibridación. La detección de los sitios sobre la matriz en los que se produce la hibridación permite determinar cuáles oligonucleótidos se han hibridado y, por tanto, cuáles son los genes activos en la célula o el tejido concretos a partir de los cuales se derivó la muestra.

Los procedimientos de matrices también pueden utilizarse para la identificación de mutaciones o polimorfismos, en los que las secuencias de tipo salvaje y mutantes se colocan en una matriz ordenada sobre una superficie. La hibridación de una muestra de polinucleótido con la matriz bajo condiciones rigurosas y la determinación de cuáles son los oligonucleótidos en la matriz que se hibridan con el polinucleótido permite determinar si el polinucleótido posee la secuencia de tipo salvaje o la mutante. Puesto que muchas secuencias mutantes de genes con importancia clínica se diferencian de sus homólogos de tipo salvaje sólo en una o en unas pocas posiciones de nucleótidos, los mayores poderes discriminatorios de los oligonucleótidos modificados de la invención proporcionarán mejoras en la detección de mutaciones.

En todas las aplicaciones mencionadas anteriormente de la tecnología de matrices, las mayores capacidades discriminatorias de los oligonucleótidos modificados proporcionan mejoras significativas en la sensibilidad y en el poder de resolución.

Una hibridación eficaz, por ejemplo en matrices, requiere que las sondas de captura contengan  $T_m$  en un intervalo de temperaturas pequeño. En una realización de la invención, la  $T_m$  del oligonucleótido de captura para su uso en matrices está equilibrada, eliminando el problema asociado con las secuencias ricas en GC y en AT, utilizando una combinación de 3'-MGB y bases modificadas (por ejemplo, PPPA y PPPU). La tabla 1 y la figura 2 ilustran el equilibrio de la  $T_m$  de sondas ricas en pirimidina con diferentes pares de bases G/C y A/T. Para equilibrar la  $T_m$  de las diferentes sondas se utilizaron PPPA, PU y MGB en combinación. Las sondas ricas en purinas y en pirimidinas y las dianas complementarias se muestran en la tabla 1, y las  $T_m$  de estas sondas se muestran en la figura 2. Tal como se muestra en la figura 2, la diferencia en  $T_m$  entre una sonda rica en GC y una sonda rica en AT puede ser mayor que 50 °C.

**Tabla 1. Secuencias de las sondas oligonucleotídicas y las dianas complementarias**

<u>Dianas complementarias</u>		<i>Sondas ricas en Pi/Pu</i>	<i>pares de bases</i>	<b>SEQ ID NO:</b>
1*	TCGGCGGCGT	1*.MGB-Q-CGCCGCCG	8 G/C	8
2*	ACAGCGGCGT	2*.MGB-Q-CGCCGCTG	7 G/C, 1 A/T	9
3*	ACAGCGACGT	3*.MGB-Q-CGTCGCTG	6 G/C, 2 A/T	10
4*	TCAGTGACGA	4*.MGB-Q-CGTCACTG	5 G/C, 3 A/T	11
5*	TCAGTGACAA	5*.MGB-Q-TGTCACTG	4 G/C, 4 A/T	12
6*	TCAATGACAG	6*.MGB-Q-TGTCATTG	3 G/C, 5 A/T	13
7*	ACAATGATAA	7*.MGB-Q-TATCATTG	2 G/C, 6 A/T	14
8*	CCAATAATAA	8*.MGB-Q-TATTATTG	1 G/C, 7 A/T	15
9*	GTAATAATAA	9*.MGB-Q-TATTATTA	8 A/T	16

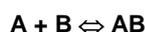
Como puede observarse en la figura 2, la modificación con PPPA, PU y MGB proporciona un conjunto de sondas con  $T_m$  equilibradas.

Una hibridación eficaz, por ejemplo en matrices, requiere que las sondas contengan  $T_m$  en un intervalo de temperaturas estrecho. Por tanto, en realizaciones relacionadas, los oligonucleótidos modificados descritos en la presente pueden comprender cualquier combinación de bases normales, bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida (por ejemplo, PPG y PPA), pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas, purina modificada, pirimidina modificada, pirimidinas 5-sustituidas, bases universales y un ligante del surco menor para equilibrar la  $T_m$  del oligonucleótido.

La capacidad para predecir y "equilibrar" las  $T_m$  de múltiples oligonucleótidos modificados es particularmente útil para el desarrollo de matrices de oligonucleótidos o para composiciones que tengan una pluralidad de oligonucleótidos. Además, la capacidad para predecir las  $T_m$  de los oligonucleótidos modificados es útil para establecer condiciones apropiadas para la hibridación, la renaturalización, las variaciones de cartografiado de las composiciones de bases de las secuencias, la determinación de la complejidad y de la divergencia de la secuencia. Puede desarrollarse un algoritmo de predicción de  $T_m$  utilizando modelos que asignan contribuciones termodinámicas a la formación de dúplex para todas las pares de bases posibles individuales que sean las vecinas más cercanas. Los parámetros termodinámicos para 10 pares de bases independientes que son las vecinas más cercanas están disponibles en fuentes publicadas para híbridos de ADN:ARN (véase, Sugimoto et al., Biochem., 34:11211-11216 (1995)) y ADNbc (SantaLucia et al., Biochem., 36:10581-10595 (1997)). El uso de los parámetros de los vecinos más cercanos para desarrollar programas para calcular la estabilidad de dúplex oligonucleotídicos en términos de la  $T_m$  se ha descrito (véase, Schutz y von Ahsen, Biotechniques, 27:1218-1222 (1999); Owczarzy et al., Biopolymers, 44:217-239 (1997); para PNA/ADN, véase Geisen et al., Nucl. Acids Res., 26:5004-5006 (1998); Blake et al., Bioinformatics, 15:370-375 (1999); y la patente de EEUU nº 5.556.749.

Los principios básicos de la descripción termodinámica y cinética de la discriminación de desapareamientos son muy conocidos y se resumen a continuación.

Una interacción sonda-diana es una reacción en equilibrio que puede describirse como:



en la que A = sonda, B = diana de ADN

A una temperatura de equilibrio T de reacciones directas (asociación) e inversas (disociación) se puede describir una constante de equilibrio K, en la que:

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]}$$

en términos de equilibrio termodinámico:

$$K = \exp(-\Delta H_{AB}^0/RT + \Delta S_{AB}^0/R);$$

$$\Delta G_{AB}^0 = \Delta H_{AB}^0 - T\Delta S_{AB}^0;$$

$$\Delta G_{AB}^0 = -RTLn(K)$$

en las que  $\Delta H_{AB}^0$ ,  $\Delta S_{AB}^0$  y  $\Delta G_{AB}^0$  son los cambios en la entalpía, la entropía y la energía libre para la formación de un dúplex AB.

El dúplex AB tiene N pares de bases (N-1 vecinas más cercanas) y la aproximación de la vecina más cercana supone:

$$\Delta H_{AB}^0 = \Delta H_1^0 + \Delta H_2^0 + \dots + \Delta H_{n-1}^0 + \Delta H_{inic}^0 = \Sigma(\Delta H_i^0 + \Delta H_{inic}^0)$$

$$\Delta S_{AB}^0 = \Delta S_1^0 + \Delta S_2^0 + \dots + \Delta S_{n-1}^0 + \Delta S_{inic}^0 = \Sigma(\Delta S_i^0 + \Delta S_{inic}^0)$$

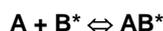
$$\Delta G_{AB}^0 = \Delta G_1^0 + \Delta G_2^0 + \dots + \Delta G_{n-1}^0 + \Delta G_{inic}^0 = \Sigma(\Delta G_i^0 + \Delta G_{inic}^0)$$

en las que  $\Delta H^0_i$ ,  $\Delta S^0_i$  y  $\Delta G^0_i$  son los cambios en la entalpía, la entropía y la energía libre para cada incremento de pares de bases que son las vecinas más cercanas para la formación de un dúplex AB,  $\Delta H^0_{inic}$ ,  $\Delta S^0_{inic}$  y  $\Delta G^0_{inic}$  son los parámetros termodinámicos de inicio de la formación de un dúplex AB.

- 5 En el caso de la igualdad de concentración total,  $C_{sonda} = C_{diana}$ , puede generarse una ecuación para la  $T_m$  en términos de energía libre, entalpía y entropía como se muestra a continuación:

$$T_m = \frac{\Sigma(\Delta H^0_i + \Delta H^0_{inic})}{\Sigma(\Delta S^0_i + \Delta S^0_{inic}) + R \ln[(C_{sonda} + C_{diana})/4]}$$

De manera similar a la mostrada anteriormente, pueden desarrollarse relaciones cuando la sonda se hibrida con una diana que contiene un desapareamiento, como se muestra a continuación:



- 10 en la que A = sonda, B\* = diana de ADN desapareada

Los parámetros termodinámicos para el dúplex desapareado AB\* son:  $K^*$ ,  $\Delta H^0_{AB^*}$ ,  $\Delta S^0_{AB^*}$  y  $\Delta G^0_{AB^*}$ . En términos de parámetros de las vecinas más próximas para un par de bases desapareadas en la posición "4", por ejemplo, que implica a las vecinas más próximas "3" y "4", los parámetros de discriminación  $\Delta\Delta H^0$ ,  $\Delta\Delta S^0$  y  $\Delta\Delta G^0$  pueden expresarse como:

$$15 \quad \Delta\Delta H^0 = \Delta H^0_{AB} - \Delta H^0_{AB^*} = (\Delta H^0_3 - \Delta H^0_{3^*}) + (\Delta H^0_4 - \Delta H^0_{4^*}) = \Delta\Delta H^0_3 + \Delta\Delta H^0_4$$

$$\Delta\Delta S^0 = \Delta S^0_{AB} - \Delta S^0_{AB^*} = (\Delta S^0_3 - \Delta S^0_{3^*}) + (\Delta S^0_4 - \Delta S^0_{4^*}) = \Delta\Delta S^0_3 + \Delta\Delta S^0_4$$

$$\Delta\Delta G^0 = \Delta G^0_{AB} - \Delta G^0_{AB^*} = (\Delta G^0_3 - \Delta G^0_{3^*}) + (\Delta G^0_4 - \Delta G^0_{4^*}) = \Delta\Delta G^0_3 + \Delta\Delta G^0_4$$

- 20 En una realización de la invención se diseñan secuencias de sondas para determinar los parámetros termodinámicos de las vecinas más cercanas para oligonucleótidos que contienen purinas normales, pirimidinas y un ligante del surco menor CDPI<sub>3</sub> unido al extremo 3' de un oligonucleótido. En otra realización, se determinan los parámetros termodinámicos de las vecinas más cercanas para oligonucleótidos que contienen pirimidinas normales, purinas, un CDPI<sub>3</sub> unido al extremo 3', pero en los que la guanina está reemplazada por 5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona. Los parámetros termodinámicos de las vecinas más cercanas se emplean en estas dos realizaciones para calcular las  $T_m$  de estos tipos de oligonucleótidos con y sin CDPI<sub>3</sub>. En el caso en que el CDPI<sub>3</sub> se une en la base 1 del extremo 3', se emplea la nueva fórmula y algoritmo de predicción de  $T_m$  derivados de:
- 25

$$T_m = \frac{\Sigma(\Delta H^0_i + \Delta H^0_{inic})}{\Sigma(\Delta S^0_i + \Delta S^0_{inic}) + R \ln\left[\frac{C_{sonda} + C_{diana}}{4}\right] + \Delta\Delta S^0_{MGB}}$$

- 30 El modelo supone que un MGB unido a un oligonucleótido tiene un factor entrópico puro adicional  $\Delta\Delta S^0_{MGB}$ . Este valor puede calcularse según el algoritmo: 6 bases (5 vecinas más cercanas) del cebador-3' y son cubiertas por el MGB desde la base de comienzo "1" o "2". Cada vecina más cercana cubierta tiene un valor exclusivo de  $\Delta\Delta S^0_{MGB}$ . Se introduce el factor de corrección "A" en el caso en que haya una adenosina en las posiciones de las bases 6, 7 u 8. Se introduce el factor estadístico "n", además del factor "A", cuando n = 3 para -AAA-; n = 2 para -AA-, -ANA-; n = 35 1 para -A-; n = 0 para -AN- y -NA- (N es cualquier base distinta de A). Un valor final de  $\Delta\Delta S^0_{MGB}$  puede determinarse mediante la ecuación:

$$\Delta\Delta S^0_{MGB} = \Sigma\Delta\Delta S^0_{iMGB} + A(\text{opcional}) + R \cdot \ln(N)(\text{opcional})$$

- 40 Las tablas 2a y 2b contienen los parámetros termodinámicos de las vecinas más cercanas para oligonucleótidos que contienen PPG sólo y la contribución entrópica del MGB, respectivamente. En el último caso, se incorpora la contribución de la fluoresceína y de un extintor oscuro en el tratamiento termodinámico y en general se ha demostrado que es despreciable (el extintor es parte del conector entre el MGB y el oligonucleótido).

**Tablas 2a y 2b. a) Parámetros de las vecinas más cercanas para oligonucleótidos que contienen PPG; b) La contribución entrópica del CDPI<sub>3</sub>**

a)				
Número	5'-3'	$\Delta H^\circ$	$\Delta S^\circ$	$\Delta G^\circ(65)$
1	AA	-7850	-22,3	-324
2	AT	-8180	-23,0	-411
3	AC	-8450	-22,6	-795
4	AG	-6560	-17,2	-730
5	TA	-7230	-21,8	129
6	TT	-7850	-22,3	-324
7	TC	-8750	-24,0	-614
8	TG	-6900	-18,3	-715
9	CA	7530	-20,3	-652
10	CT	-6390	-17,3	-548
11	CC	-7860	-20,1	-1071
12	CG	-6030	-14,0	-1288
13	GA	-10070	-27,4	-795
14	GT	-9110	-23,5	-1175
15	GC	-13170	-34,0	-1665
16	GG	-8080	-20,2	-1258
17	GC <sub>inic</sub>	-48440	-17,6	1116
18	AT <sub>inic</sub>	-1060	-7,1	1341
b)				
Número	5'-3'	$\Delta\Delta S^\circ$		
1	AA	3,408		
2	AT	3,060		
3	AC	1,442		
4	AG	0,750		
5	TA	2,463		
6	TT	3,313		
7	TC	2,870		
8	TG	0,893		
9	CA	0,607		
10	CT	2,253		

11	CC	0,905		
12	CG	-0,721		
13	GA	1,282		
14	GT	2,397		
15	GC	2,172		
16	GG	1,298		

5 En una realización preferida, se equilibran las  $T_m$  de múltiples oligonucleótidos modificados que contienen el mismo número de bases utilizando un algoritmo para seleccionar los parámetros de las vecinas más cercanas a partir de cualquier combinación de bases normales, bases universales, PPA, PPG, PPPA, PPPG, PU, PC, HOPU, HOBuU, HOBuC,  $(NH_2)_2PPPA$ ,  $(NH_2)_2PPPAOH$ ,  $(NH_2)_2BuPPAOH$ ,  $(NH_2)_2PPAI$ , HOBuPPG, ligante del surco menor, fluoróforo, extintor y un quimioluminiscente.

Como alternativa, las  $T_m$  de múltiples oligonucleótidos modificados se equilibran sustancialmente para que contengan el mismo número de bases más o menos 1 ó 2 bases, con un intervalo de  $T_m$  de aproximadamente  $\pm 2$  °C.

10 En algunos casos, se emplean bases modificadas que aumentan la estabilidad del dúplex, además de las bases modificadas que disminuyen la estabilidad del dúplex. Las bases modificadas que disminuyen la estabilidad del dúplex son muy conocidas, por ejemplo, 7-desazaadenina y 7-desazaguanina.

#### *Uso de los oligonucleótidos modificados*

15 Los oligonucleótidos modificados de la presente invención proporcionan numerosas ventajas frente a los oligonucleótidos no modificados, incluyendo una mejor discriminación de desapareamientos. Los oligonucleótidos modificados de la invención son particularmente útiles como sondas, y se detecta su hibridación con una secuencia diana, o como cebadores, y se sigue su hibridación a una secuencia diana mediante la síntesis del polinucleótido iniciada desde el extremo 3'-terminal del oligonucleótido modificado, y se detecta el producto sintetizado (es decir, el producto de la extensión).

20 Los oligonucleótidos modificados de la presente invención son útiles en otras técnicas en que está implicada la hibridación de un oligonucleótido a otro ácido nucleico. Éstas incluyen, pero no se limitan a las técnicas en que la hibridación de un oligonucleótido a un ácido nucleico diana es el objetivo final; las técnicas en que la hibridación de uno o más oligonucleótidos a un ácido nucleico diana es anterior a una o más etapas de alargamiento mediadas por polimerasa, que emplean el oligonucleótido como cebador y el ácido nucleico diana como molde; las técnicas en que  
25 la hibridación de un oligonucleótido a un ácido nucleico diana se emplea para bloquear la extensión de otro cebador; las técnicas en que la hibridación de un oligonucleótido a un ácido nucleico diana es seguida por la hidrólisis del oligonucleótido para liberar un marcador unido; y las técnicas en que dos o más oligonucleótidos se hibridan con un ácido nucleico diana y se miden las interacciones entre los múltiples oligonucleótidos. Las condiciones para la hibridación de oligonucleótidos y los factores que influyen en el grado y la especificidad de la hibridación, tales como  
30 la temperatura, la fuerza iónica y la composición del disolvente, son muy conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*; Ausubel, et al., *supra*; M.A. Innis et al. (eds.), PCR Protocols, Academic Press, San Diego, 1990; B.D. Hames et al. (eds.), Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1985; y van Ness et al. (1991), Nucleic Acids Res. 19:5143-5151.

35 La hibridación de sondas y/o cebadores a secuencias diana se realiza según propiedades de apareamiento de bases muy conocidas y reconocidas en la técnica, de forma que las bases de adenina se aparean con timina o uracilo, y las bases de guanina se aparean con citosina. La propiedad de un nucleótido que le permite aparearse con bases de un segundo nucleótido se llama complementariedad. Por tanto, la adenina es complementaria con la timina y con el uracilo, y viceversa; de manera similar, la guanina es complementaria con la citosina, y viceversa. Un oligonucleótido que es complementario a lo largo de toda su longitud con una secuencia diana se dice que es  
40 perfectamente complementario, que está perfectamente apareado, o que es totalmente complementario con la secuencia diana, y viceversa. Un oligonucleótido y su secuencia diana pueden tener secuencias relacionadas, en las que la mayoría de las bases en las dos secuencias son complementarias, pero una o más bases no son complementarias, o están desapareadas. En este caso, se dice que las secuencias son sustancialmente complementarias entre sí. Si las secuencias de un oligonucleótido y de una secuencia diana son de tal forma que  
45 son complementarias en todas las posiciones de los nucleótidos excepto una, el oligonucleótido y la secuencia diana tienen un único desapareamiento de nucleótido entre sí.

Los nucleótidos de pirazolo[3,4-d]pirimidina modificada de la invención conservan la especificidad de apareamiento de bases de sus análogos naturales; los análogos de PPPG son complementarios con la citosina, mientras que los análogos de PPPA son complementarios con la timina y con el uracilo. Los análogos de PPPG y PPPA no sólo tienen una menor tendencia al denominado apareamiento "bamboleante" con bases no complementarias, comparados con la guanina y la adenina, sino que los grupos 3-sustituídos aumentan la afinidad de unión de los dúplex. De manera similar, las pirimidinas modificadas se hibridan de modo específico con sus homólogos naturales.

Las condiciones para la hibridación son muy conocidas por los expertos en la técnica, y pueden variarse dentro de unos límites relativamente amplios. La rigurosidad de la hibridación se refiere al grado en que las condiciones de hibridación no favorecen la formación de híbridos que contienen nucleótidos desapareados, estimulando con ellos la formación de híbridos perfectamente apareados o de híbridos que contienen menos desapareamientos; una mayor rigurosidad se correlaciona con una menor tolerancia por híbridos desapareados. Los factores que afectan a la rigurosidad de la hibridación incluyen, pero no se limitan a la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la concentración de disolventes orgánicos, tales como formamida y dimetilsulfóxido, y de caotropos. Tal como es bien sabido por los expertos en la técnica, la rigurosidad de la hibridación aumenta con una mayor temperatura, una menor fuerza iónica y una menor concentración de disolventes. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., *supra*; Sambrook et al., *supra*; M.A. Innis et al. (eds.), PCR Protocols, Academic Press, San Diego, 1990; B.D. Hames et al. (eds.), Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1985; y van Ness et al., (1991) Nucleic Acids Res., 19:5143-5151.

Por tanto, en la formación de híbridos (dúplex) entre un oligonucleótido y su secuencia diana, el oligonucleótido se incuba en disolución, junto con un polinucleótido que contiene la secuencia diana, bajo condiciones de temperatura, fuerza iónica, pH, etc., que son favorables para la hibridación, es decir, bajo condiciones de hibridación. Las condiciones de hibridación se eligen, en algunas circunstancias, para que se favorezca la hibridación entre dos ácidos nucleicos que tengan secuencias perfectamente apareadas, comparadas con una pareja de ácidos nucleicos que tengan uno o más desapareamientos en la secuencia que se hibrida. En otras circunstancias se eligen las condiciones de hibridación para permitir una hibridación entre secuencias desapareadas, favoreciendo la hibridación entre los ácidos nucleicos que tengan menos desapareamientos.

El grado de hibridación de un oligonucleótido con una secuencia diana, también conocido como fuerza de hibridación, se determina mediante procedimientos que son muy conocidos en la técnica. Un procedimiento preferido es determinar la  $T_m$  del dúplex híbrido. Esto se logra, como se describió anteriormente, sometiendo al dúplex en disolución a una temperatura gradualmente en aumento y controlando la desnaturalización del dúplex, por ejemplo, mediante la absorbancia de la luz ultravioleta, que aumenta según se desapilan las pares de bases, que se produce durante la desnaturalización. La  $T_m$  se define en general como el punto medio de temperatura de la transición en la absorbancia de ultravioleta que se produce durante la desnaturalización. Como alternativa, si se conocen las  $T_m$ , puede elegirse una temperatura de hibridación (a una fuerza iónica, pH y concentración de disolvente fijados) que esté por debajo de la  $T_m$  del dúplex deseado y por encima de la  $T_m$  de un dúplex no deseado. En este caso, la determinación del grado de hibridación se logra sencillamente ensayando la presencia de la sonda hibridada.

Si una sonda comprende un marcador detectable, los ensayos para la sonda que se va a hibridar normalmente se diseñan para que detecten la presencia de un marcador en un material de dúplex. Esto puede lograrse, por ejemplo, seleccionando de modo específico el material de dúplex, destruyendo de modo específico el material monocatenario, o utilizando alguna combinación de estos procedimientos. Por ejemplo, las mezclas de la reacción de hibridación pueden someterse a condiciones de alta rigurosidad y/o a nucleasas específicas de cadena sencilla; o los dúplex pueden purificarse mediante técnicas de afinidad específicas para ácidos nucleicos bicatenarios, en oposición a monocatenarios. En una realización preferida de la invención, los dúplex se detectan por la liberación de un marcador de la sonda bajo condiciones en que el marcador se libera sólo cuando la sonda está en un dúplex. Otra realización requiere la separación del marcador y extintores cuando se hibrida con la diana.

Los marcadores detectables adecuados para su uso con sondas de ácidos nucleicos son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a isótopos radiactivos, cromóforos, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes y electroquimioluminiscentes, marcadores magnéticos, microesferas, metales coloidales (Taton et al., Science 289:1757-1760 (2000)), marcadores inmunológicos, ligandos y marcadores enzimáticos. Los marcadores adecuados también incluyen marcadores de masa y los que se emplean en la deducción de bancos de química combinatoria, por ejemplo, marcadores que pueden ser reconocidos mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases, espectrometría de masas, fibras de formación de imágenes ópticas, resonancia de plasmón de superficie, espectroscopía de correlación, nanotecnología (Guetence et al., J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 739:139-150 (2000)) y similares.

Los procedimientos para marcar oligonucleótidos son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, procedimientos químicos y enzimáticos. Como ejemplo, los procedimientos para la incorporación de grupos químicos reactivos en nucleótidos, en sitios específicos, son muy conocidos por los expertos en la técnica. Los oligonucleótidos que contienen un grupo químico reactivo, localizado en un sitio específico, pueden combinarse con un marcador unido a un grupo reactivo complementario (por ejemplo, un oligonucleótido que contenga un grupo

reactivo nucleófilo puede hacerse reaccionar con un marcador unido a un grupo reactivo electrófilo) para acoplar un marcador con una sonda mediante una técnica química. Los ejemplos de marcadores y de procedimientos para unir un marcador a un oligonucleótido se describen, por ejemplo, en la patente de EEUU nº 5.824.796; la patente de EEUU nº 5.210.015; Kessler (ed.), *Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules*, Springer-Verlag, Berlin, 1992; Kricka (ed.), *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press, San Diego, 1992; Howard (ed.), *Methods in Nonradioactive Detection*, Appleton y Lange, Norwalk, 1993. Puede lograrse un marcaje químico no específico de un oligonucleótido combinando el oligonucleótido con un compuesto químico que reaccione, por ejemplo, con un grupo funcional concreto de una base nucleotídica, y al mismo tiempo o después hacer reaccionar el oligonucleótido con un marcador. Véase, por ejemplo, Draper et al. (1980), *Biochemistry*, 19:1774-1781. La incorporación enzimática de un marcador en un oligonucleótido puede lograrse realizando una modificación enzimática o una polimerización de un oligonucleótido utilizando precursores marcados, o añadiendo el marcador de modo enzimático a un oligonucleótido ya existente. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.449.767. Los ejemplos de enzimas modificadoras incluyen, pero no se limitan a ADN polimerasas, transcriptasas inversas, ARN polimerasas, etc. Los ejemplos de enzimas que son capaces de añadir un marcador a un oligonucleótido ya existente incluyen, pero no se limitan a quinasas, transferasas terminales, ligasas, glicosilasas, etc.

Si un oligonucleótido es capaz de actuar como un cebador, el grado de hibridación del oligonucleótido también puede determinarse midiendo los niveles del producto de la extensión del cebador. En este caso, el cebador puede marcarse, o uno o más de los precursores para la polimerización (normalmente los nucleósidos trifosfato) pueden marcarse. El producto de la extensión puede detectarse, por ejemplo, por el tamaño (por ejemplo, mediante una electroforesis en gel), mediante procedimientos de afinidad, o mediante cualquier otra técnica conocida por los expertos en la técnica.

Los ensayos de extensión de cebadores ("minisequenciación", "análisis de bits genéticos") se emplean habitualmente para la tipificación de SNP y tienen el potencial de poderse utilizar en otras aplicaciones de genotipificación y selección de mutaciones (Pastinen T. et al., *Genome Res.*, 10:1031-42 (2000)). En ciertas realizaciones, las bases modificadas y los ligantes del surco menor mejoran los ensayos de extensión de cebadores de varias formas. La mayor estabilidad del dúplex proporcionada por MGB, o la pirimidina 5-sustituida o la pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida, permite realizar las extensiones a temperaturas elevadas. Esto resulta ventajoso porque se eliminan las estructuras secundarias problemáticas en las moléculas diana a temperaturas elevadas. Además, la hibridación de la diana al cebador es más rápida a mayor temperatura. En estas reacciones pueden utilizarse polimerasas termoestables, tales como Taq polimerasa y ADN polimerasa de Bst.

Además, los MGB y las bases modificadas mejoran la especificidad de los ensayos eliminando una clase de señales de falsos positivos. Las secuencias de cebadores que forman estructuras en horquilla u homodímeros son propensas a una extensión independiente del molde (el extremo 5' del cebador actúa como molde), dando una señal de falso positivo. Los MGB y las bases modificadas sobre "molde" inhiben la extensión por ADN polimerasas. Por tanto, los MGB en el extremo 5', o las bases modificadas en el extremo 5' o en mitad de un cebador puede evitar la extensión (falsos positivos) a partir de horquillas de cebadores o dímeros de cebadores. Por último, PPG puede emplearse para eliminar las estructuras no canónicas formadas por oligonucleótidos ricos en G, permitiendo ensayos de extensión de cebadores en estas secuencias.

Otros ensayos en los que los presentes oligonucleótidos modificados son particularmente útiles se describen en la solicitud nº de serie 09/054.862, en tramitación junto con la presente.

Otros ensayos de amplificación en los que los nucleótidos modificados son útiles incluyen los ensayos de amplificación basados en la ruptura invasiva de sondas oligonucleotídicas por endonucleasas de ADN solapado (Lyamichev et al., *Nature Biotechnol.*, 17:292-296 (1999); y Olson, et al., *High-Throughput Gene Expression Monitoring with the Invader® Assay*, Poster, Society for Biomolecular Screening Conference, Vancouver, Columbia Británica, Canadá, 2000); los ensayos de tipo de replicación de secuencia autosostenida (Mueller et al., *Histochem. Cell Biol.*, 108:431-437 (1997)) y similares. De manera sorprendente, las bases no naturales pueden sustituirse en las sondas invasoras y en las sondas genómicas de un ensayo basado en cleavasas. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a pirazolo[3,4-d]pirimidinas, pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas y pirimidinas 5-sustituidas. Los esqueletos no naturales también se incluyen, tales como los monómeros utilizados en ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, etc. Además, los oligonucleótidos modificados pueden tener unidos ligantes del surco menor, fluoróforos, extintores y similares. Los expertos en la técnica apreciarán que también pueden utilizarse quimeras para permitir la actividad enzimática y la actuación óptimas.

En la presente invención, de modo inesperado se descubrieron marcadas mejoras en los sistemas basados en cleavasas, cuando las bases modificadas sustituyeron a las bases normales en las sondas invasoras y en las sondas genómicas. Por tanto, el uso de bases modificadas, tales como hidroxipropilPPA (HOPPPA),  $(\text{NH}_2)_2\text{PPPAOH}$  y 3-yododiaminoPPA permite disminuir la longitud de las sondas invasoras y las sondas genómicas, mientras que se proporciona una mejor actuación del ensayo. En otra realización, las bases no naturales también se incorporan en la sonda módulo.

En vista de lo anterior, la presente invención proporciona en un aspecto un procedimiento para distinguir polinucleótidos con secuencias relacionadas, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) poner en contacto un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia definida que comprende al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituída y al menos una pirimidina 5-sustituída como se define en la reivindicación 1 en lugar de una base de purina o de pirimidina, con al menos dos polinucleótidos, en el que uno de los polinucleótidos tiene una secuencia diana que es perfectamente complementaria con el oligonucleótido modificado y al menos uno de los otros polinucleótidos tiene una secuencia diana con al menos una base desapareada; y
- (b) determinar el grado de hibridación entre el oligonucleótido modificado y cada uno de los polinucleótidos.

Preferiblemente, al menos uno de los otros polinucleótidos tiene una secuencia diana con una o dos bases desapareadas, más preferiblemente sólo una base desapareada.

Como se indicó anteriormente, una secuencia diana se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende un sitio de hibridación para una sonda o un cebador. Las secuencias diana pueden encontrarse en cualquier ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitarse a ADN genómico, ADNc, ARN y cualquier producto amplificado de los mismos, y pueden comprender una secuencia génica de tipo salvaje, una secuencia de un gen mutante, una secuencia no codificadora, una secuencia reguladora, etc. Una secuencia diana en general tendrá una longitud menor que 100 nucleótidos, preferiblemente menor que 50 nucleótidos, y lo más preferiblemente menor que 21 nucleótidos.

Los oligonucleótidos modificados utilizados en este aspecto de la invención son fundamentalmente sondas modificadas, y los polinucleótidos pueden distinguirse determinando cuáles son los polinucleótidos que se hibridan con la sonda modificada. Las sondas modificadas pueden marcarse con cualquier marcador detectable, o la sonda puede tener la capacidad de ser marcada antes o después de la hibridación, por ejemplo porque contenga un grupo reactivo capaz de asociarse con un marcador o porque sea capaz de hibridarse con una sonda marcada secundaria, antes o después de la hibridación a la diana. Las condiciones para la hibridación de sondas de ácidos nucleicos son muy conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*; Innis et al., *supra*; Hames et al., *supra*; y van Ness et al., *supra*.

La hibridación puede ensayarse (es decir, los ácidos nucleicos hibridados pueden identificarse) distinguiendo la sonda hibridada de la sonda libre mediante uno de varios procedimientos muy conocidos por los expertos en la técnica. Éstos incluyen, pero no se limitan a la unión de un ácido nucleico diana a un soporte sólido, directa o indirectamente (mediante hibridación con una segunda sonda unida a un soporte, o mediante la interacción entre ligandos unidos a un soporte y conjugados con una sonda), seguido de la hibridación directa o indirecta con la sonda, y lavando para eliminar la sonda no hibridada; la determinación de la resistencia a nucleasas; la determinación de la densidad de flotación; los procedimientos de afinidad específicos para dúplex de ácidos nucleicos (por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita); las interacciones entre múltiples sondas hibridadas con el mismo ácido nucleico diana, etc. Véase, por ejemplo, Falkow et al., patente de EEUU nº 4.358.535; Urdea et al., patentes de EEUU nº 4.868.105 y 5.124.246; Freifelder, *Physical Biochemistry*, 2ª edición, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1982; Sambrook, et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*; Hames et al., *supra*; y otras referencias relacionadas. La capacidad estabilizante de dúplex de los conjugados de oligonucleótidos modificados con MGB hace posible la hibridación bajo condiciones más rigurosas, en las que puede minimizarse la aparición de una estructura secundaria potencialmente oclusora en el ácido nucleico diana. Por consiguiente, estos oligonucleótidos modificados con MGB son particularmente preferidos en este aspecto de la invención.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de una secuencia diana en un polinucleótido, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) incubar un polinucleótido que se va a ensayar para la presencia de la secuencia diana con un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia que es sustancialmente complementaria con la secuencia diana bajo condiciones de hibridación; e
- (b) identificar los ácidos nucleicos hibridados;

en el que el oligonucleótido modificado comprende al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituída en lugar de un resto purina y al menos una pirimidina 5-sustituída en lugar de un resto purina como se menciona en la reivindicación 1.

Preferiblemente, el oligonucleótido modificado es una sonda marcada y tiene al menos dos bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituída. En este grupo de realizaciones, una sonda marcada se hibrida con una diana y/o un producto de la extensión de una diana, y se realiza un cambio en el estado físico del marcador como consecuencia de la hibridación. Tal como se emplea en la presente, una "sonda" es una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridarse con una secuencia diana en una segunda molécula de ácido nucleico. Como ejemplo, un ensayo de este tipo, el ensayo de la sonda hidrolizable, aprovecha el hecho de que muchas enzimas polimerizantes, tales como ADN polimerasas, poseen actividades exonucleolíticas 5'-3' intrínsecas. Por consiguiente, si una sonda se hibrida con una secuencia que puede actuar como molde para la polimerización (por ejemplo, si una sonda se hibrida con una región del ADN localizada entre dos cebadores de la amplificación, durante el desarrollo de una reacción de amplificación), una enzima polimerizante que ha iniciado la polimerización en un cebador de la amplificación cadena

arriba es capaz de digerir la sonda de modo exonucleolítico. Cualquier marcador unido a dicha sonda se liberará si la sonda se hibrida con su diana y si la amplificación se está produciendo a través de la región con la que se hibrida la sonda. El marcador liberado se separa de la sonda marcada y se detecta mediante procedimientos muy conocidos por los expertos en la técnica, dependiendo de la naturaleza del marcador. Por ejemplo, los fragmentos marcados de modo radiactivo pueden separarse mediante una cromatografía en capa fina y detectarse mediante una autorradiografía, mientras que los fragmentos marcados con fluorescencia pueden detectarse mediante irradiación a las longitudes de onda de excitación apropiadas, realizándose la observación a las longitudes de onda de emisión apropiadas. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.210.015.

En una variación de esta técnica, una sonda contiene un marcador fluorescente y un agente extintor que extingue la emisión de fluorescencia del marcador fluorescente. En este caso, el marcador fluorescente no es detectable hasta que su relación espacial con el agente extintor haya sido alterada, por ejemplo, mediante la liberación exonucleolítica del marcador fluorescente de la sonda. Así, antes de la hibridación con su secuencia diana, la sonda marcada de modo dual con un fluoróforo y un extintor no emite fluorescencia. Después de la hibridación de la sonda marcada con un fluoróforo y un extintor con su diana, se transforma en un sustrato para la actividad exonucleolítica de una enzima polimerizante que ha iniciado la polimerización en un cebador cadena arriba. La degradación exonucleolítica de la sonda libera al marcador fluorescente de la sonda y, por tanto, de la vecindad del agente extintor, permitiendo la detección de una señal fluorescente tras la irradiación a las longitudes de onda de excitación apropiadas. Este procedimiento tiene la ventaja de que el marcador liberado no tiene que separarse de la sonda intacta. Las estrategias con múltiplex emplean múltiples sondas, cada una de las cuales es complementaria con una secuencia diana diferente y porta un marcador distinguible, permitiendo el ensayo de varias secuencias diana de modo simultáneo.

El uso de conjugados de oligonucleótidos modificados con MGB en este procedimiento y en procedimientos relacionados permite aplicar a estos ensayos una mayor velocidad, sensibilidad y poder discriminatorio. En particular, la mayor capacidad de los conjugados de oligonucleótidos modificados con MGB para permitir la discriminación entre un híbrido perfecto y un híbrido que contenga una única base desapareada facilitará el uso de ensayos de sondas hidrolizables para la identificación de polimorfismos de un único nucleótido y similares. Los expertos en la técnica apreciarán que las composiciones y los procedimientos, tales como los de la invención, que sean capaces de discriminar desapareamientos de un único nucleótido también serán capaces de discriminar entre sí secuencias que tengan 2, 3, 4, 5 o incluso 6 desapareamientos.

En otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona un procedimiento para la extensión de cebadores, comprendiendo dicho procedimiento la incubación de un polinucleótido que contiene una secuencia diana con uno o más cebadores oligonucleotídicos complementarios con la secuencia diana, en presencia de una enzima polimerizante y de sustratos de nucleótidos bajo condiciones favorables para la polimerización; en el que al menos uno de los cebadores oligonucleotídicos contiene una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida o pirimidina 5-sustituida en lugar de una base de purina o de pirimidina como se menciona en las reivindicaciones.

Los procedimientos de amplificación son aquellos en los que se generan muchas copias de una secuencia de ácido nucleico diana, normalmente de una manera exponencial, mediante polimerización secuencial y/o reacciones de acoplamiento. Además de las reacciones de amplificación más tradicionales analizadas a continuación, la presente invención es útil en amplificaciones que implican uniones de tres vías (véase el documento WO 99/37085), amplificación de señales (véase, Capaldi, et al., Nuc. Acids Res., 28:E21 (2000)), polimerasas de T7, transcriptasa inversa, ARNasa H, RT-PCR, círculos rodantes, cleavasa y similares.

Muchas reacciones de amplificación, tal como la PCR, utilizan reacciones de polimerización dependientes de cebadores reiterativos. Un cebador es un ácido nucleico que es capaz de hibridarse con un segundo ácido nucleico molde y que, cuando está hibridado, es capaz de ser extendido por una enzima polimerizante (en presencia de sustratos de nucleótidos), utilizando el segundo ácido nucleico como molde. Las enzimas polimerizantes incluyen, pero no se limitan a ADN y ARN polimerasas y transcriptasas inversas, etc. Las condiciones favorables para la polimerización por diferentes enzimas polimerizantes son muy conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*; Ausubel, et al., *supra*; Innis et al., *supra*. En general, para ser extendible por una enzima polimerizante, un cebador debe tener un extremo 3' desbloqueado, preferiblemente un grupo 3' hidroxilo libre. El producto de una reacción de amplificación es un cebador extendido, en el que el cebador ha sido extendido por una enzima polimerizante.

Por tanto, en una realización de la invención, los procedimientos y las composiciones descritos y reivindicados en la presente son útiles en reacciones de amplificación mejoradas, tales como PCR. Véase, por ejemplo, las patentes de EEUU nº 4.683.202; 4.683.195 y 4.800.159; Mullis y Faloona, *supra*; y Saiki et al., *supra*. La etapa de polimerización de la PCR es catalizada con más frecuencia por una enzima polimerizante termoestable, tal como una ADN polimerasa aislada a partir de una bacteria termófila, debido a la elevada temperatura requerida para la etapa de desnaturalización de la PCR. Tal como se analizó anteriormente, uno de los problemas existentes hasta la fecha asociados con la práctica de la PCR es la necesidad de cebadores oligonucleotídicos relativamente largos, que tengan la suficiente estabilidad del híbrido para actuar como cebadores a las temperaturas elevadas en que se realiza la PCR. Los oligonucleótidos modificados y, en especial, los conjugados de oligonucleótidos modificados con

MGB son útiles como cebadores en reacciones de amplificación, tales como la PCR, puesto que las bases modificadas y los MGB aumentan la estabilidad del híbrido, extendiendo con ello significativamente el límite inferior de la longitud del cebador útil. Además, los conjugados de oligonucleótidos modificados con MGB son útiles en protocolos de PCR especializados, en los que resulta deseable una longitud reducida del cebador. Éstos incluyen, pero no se limitan a la presentación diferencial, en la que la longitud óptima del cebador es menor que 10 nucleótidos, las técnicas de amplificación aleatoria de polimorfismos en el ADN (RAPD), y los análisis de polimorfismos de longitud de amplificación (Liang et al., *supra*; Williams et al., *supra*).

Los oligonucleótidos modificados de la presente invención son aplicables a cualquier tipo de ensayo o procedimiento en el que se emplee una PCR o una técnica de amplificación relacionada incluyendo, pero sin limitarse a ensayos de sondas hidrolizables, cebado con oligonucleótidos específicos de alelos (ASO), análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos, análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNP), y análisis de microsátelites, por ejemplo. Estas y otras técnicas son útiles en el cartografiado de genes, en la identificación y la selección de genes relacionados con enfermedades, y en farmacogenética, por mencionar sólo unas pocas aplicaciones.

En otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) incubar el polinucleótido con una matriz de oligonucleótidos modificados bajo condiciones de hibridación; y
- (b) determinar cuáles son los oligonucleótidos modificados en la matriz con los que se hibrida el polinucleótido;

en el que el oligonucleótido modificado comprende al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituída en lugar de una base de purina y al menos una piridina 5-sustituída en lugar de un resto purina como se menciona en la reivindicación 1.

En estos procedimientos, una matriz ordenada que comprende una pluralidad de oligonucleótidos modificados de diferentes secuencia conocidas se emplea como plataforma para la hibridación con uno o más polinucleótidos, ácidos nucleicos o poblaciones de ácidos nucleicos de ensayo. La determinación de los oligonucleótidos que se hibridan y el alineamiento de sus secuencias conocidas permiten la reconstrucción de la secuencia del polinucleótido de ensayo. Véase, por ejemplo, las patentes de EEUU nº 5.492.806; 5.525.464; 5.556.752; y las publicaciones PCT WO 92/10588 y WO 96/17957. Los materiales para la construcción de las matrices incluyen, pero no se limitan a nitrocelulosa, vidrio, obleas de silicio, fibras ópticas y otros materiales adecuados para la construcción de matrices, tales como son conocidos por los expertos en la técnica.

Un problema principal con los actuales procedimientos de análisis y secuenciación basados en matrices es que los diferentes oligonucleótidos en una matriz tendrán una  $T_m$  diferente. Por tanto, es difícil determinar las condiciones de rigurosidad que proporcionarán la máxima sensibilidad, manteniendo al mismo tiempo la capacidad de distinguir los desapareamiento de una sola base. Esto es una consideración particularmente importante para la mayoría, sino todas, las aplicaciones de la tecnología de matrices. El uso de oligonucleótidos modificados y/o de conjugados de oligonucleótidos modificados con MGB en las técnicas análisis y secuenciación basadas en matrices proporciona una solución a este problema. De modo sorprendente, la conjugación de un MGB a un oligonucleótido modificado hace que su  $T_m$  sea relativamente independiente de la composición de bases. Por tanto, para una población de oligonucleótidos modificados y de conjugados de oligonucleótidos modificados con MGB de una longitud dada, la  $T_m$  para un híbrido perfecto se encuentra dentro de un intervalo de temperatura relativamente estrecho, independientemente de la secuencia. Al mismo tiempo, la  $T_m$  para un desapareamiento de un único nucleótido está muy por debajo de la  $T_m$  del apareamiento perfecto. Por tanto, las matrices diseñadas para que todos los oligonucleótidos modificados tengan la misma longitud y para que están opcionalmente presente como sus conjugados de MGB muestran una variación mínima en las  $T_m$  entre los diferentes oligonucleótidos en la matriz, lo cual permite unas condiciones de hibridación más uniformes para la matriz entera. Otra ventaja del uso de oligonucleótidos modificados y de conjugados de oligonucleótidos modificados con MGB en estas técnicas es que proporcionan mayor sensibilidad mediante el uso de oligonucleótidos más cortos, a temperaturas mayores (y, por tanto, a mayor rigurosidad), mientras que se sigue manteniendo la resolución de un único nucleótido.

Otra aplicación de la presente invención a la tecnología de matrices es para el estudio de patrones de expresión génica en una célula o tejido concretos (véase, en general, Eisen, et al., METHODS IN ENZYMOLOGY, 303:179-205 (1999)). En este caso, los oligonucleótidos modificados o polinucleótidos que se corresponden con los diferentes genes se disponen en matriz sobre una superficie, y por ejemplo se incuba una muestra de ácido nucleico procedente de un tipo de célula o de tejido concreto con la matriz bajo condiciones de hibridación. La detección de los sitios en la matriz en que se produce hibridación permite determinar cuáles son los oligonucleótidos modificados que se han hibridado y, por tanto, cuáles son los genes activos en la célula o el tejido concretos a partir de los cuales se derivó la muestra.

Los procedimientos de matrices también pueden utilizarse para la identificación de mutaciones o polimorfismos, en la que las secuencias de tipo salvaje y mutantes se colocan en una matriz ordenada sobre una superficie (véase, Hacia, et al., J. Mol. Genet., 36:730-736 (1999)). La hibridación de una muestra de polinucleótido con la matriz bajo

condiciones rigurosas y la determinación de cuáles son los oligonucleótidos en la matriz que se hibridan con el polinucleótido permite determinar si el polinucleótido posee la secuencia de tipo salvaje o la mutante. Las mayores capacidades discriminatorias de los conjugados de oligonucleótido-MGB son especialmente útiles en esta aplicación de la tecnología de matrices.

5 Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar una mutación en una secuencia diana de un gen de interés, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) incubar un polinucleótido que comprende la secuencia diana con una matriz de oligonucleótidos de diferentes secuencias, en el que las diferentes secuencias incluyen la secuencia diana de tipo salvaje y diferentes secuencias diana mutantes, bajo condiciones de hibridación; y
- 10 (b) determinar cuáles son los oligonucleótidos en la matriz que se hibridan con el polinucleótido;

en el que uno o más restos purina en una pluralidad de oligonucleótidos están reemplazados por una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida, y una o más bases de pirimidina subsustituida por una base de pirimidina 5-sustituida como se menciona en la reivindicación 1.

15 En otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos de una secuencia diana en un polinucleótido, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) poner en contacto un polinucleótido que comprende la secuencia diana con al menos dos oligonucleótidos de secuencia conocida, en el que uno o más restos purina están reemplazados por una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida y una o más bases de pirimidina son sustituidas por una base de pirimidina 5-sustituida como se menciona en la reivindicación 1, y en el que uno de los al menos dos oligonucleótidos
- 20 tiene una secuencia que es perfectamente complementaria con la secuencia diana y al menos otro de los oligonucleótidos tiene una secuencia diana relacionada, e incubar cada uno de los oligonucleótidos con el polinucleótido bajo condiciones de hibridación; y
- (b) determinar el grado de hibridación entre cada uno de los oligonucleótidos y el polinucleótido.

25 En una realización, se emplea una colección de todos los posibles oligonucleótidos n-meros (en el que n es un número entero menor que aproximadamente 10) en un ensayo de sonda hidrolizable para determinar una secuencia de nucleótidos. Cada oligonucleótido está marcado de manera exclusiva (y preferiblemente modificado), y el análisis del marcador liberado indica cuáles son los oligonucleótidos que se han hibridado con la secuencia diana. El alineamiento de las secuencias de los oligonucleótidos que se han hibridado proporciona la secuencia de nucleótidos.

30 Los oligonucleótidos modificados, y más preferiblemente los conjugados de oligonucleótido-MGB modificados, también son útiles en los procedimientos dependientes de cebador para la secuenciación de ADN, tales como el procedimiento de terminación de cadena y sus derivados, descrito por vez primera por Sanger et al., *supra*. El uso de conjugados de oligonucleótidos modificados con MGB en la secuenciación de terminación de cadena permite el uso de cebadores más cortos con mayor rigurosidad, y permite un grado mayor de discriminación de desapareamientos durante la secuenciación. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a la búsqueda de genes que

35 comparten una región corta de homología (del orden de unos pocos aminoácidos) y la secuenciación en una región en que existe muy poca información de secuencia disponible. Los conjugados de oligonucleótido-MGB son útiles en estas técnicas de secuenciación de cebadores cortos.

40 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para estudiar la expresión génica en una célula, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) incubar una población de polinucleótidos representativa de los genes expresados en la célula con una matriz de oligonucleótidos que comprende una pluralidad de oligonucleótidos modificados de diferentes secuencias bajo condiciones de hibridación; y
- (b) determinar cuáles son los oligonucleótidos modificados en la matriz que se hibridan con los polinucleótidos;

45 en el que dichos oligonucleótidos modificados comprenden al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida en lugar de una purina y una o más bases de pirimidina son sustituidas por una base de pirimidina 5-sustituida como se menciona en la reivindicación 1.

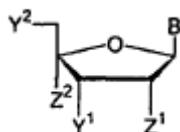
50 En un grupo de realizaciones, el procedimiento se lleva a cabo con una pluralidad  $P_f$  de genes expresados procedentes de múltiples tipos celulares o tejidos. Los genes están preferiblemente marcados con diferentes marcadores de detección, después se hibridan con una matriz al mismo tiempo y se controlan mediante el marcador para determinar el patrón de expresión de cada gen.

55 Además de los ensayos y de los procedimientos de diagnóstico descritos anteriormente, los oligonucleótidos modificados y las bases modificadas descritas en la presente tendrán utilidad en las tecnologías antisentido. Se sabe que los oligonucleótidos antisentido inhiben de modo selectivo la expresión génica y proporcionan una estrategia genética para el tratamiento y la prevención de enfermedades ((Smith et al., *Int. J. Oncol.*, 17:841-850 (2000)). Otros

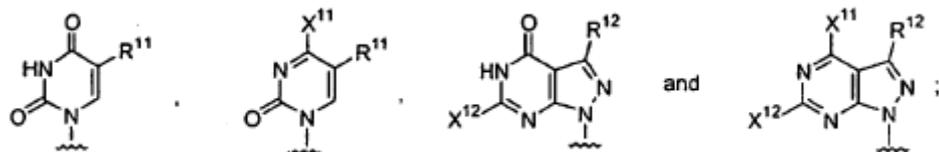
oligonucleótidos modificados se han utilizado para mejorar la actuación de oligonucleótidos antisentido (Zhang et al., Nat. Biotechnol., 18:862-867 (2000); Flanagan et al., Nat. Biotechnol., 14:1139-1145 (1996)). Por consiguiente, otra realización de la presente invención es el uso de pirimidinas 5-sustituidas, de pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas y de pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas como monómeros, por sí solas o en cualquier combinación, en la síntesis de oligómeros antisentido. En otra realización, las bases modificadas descritas en la presente pueden utilizarse como monómeros en un oligonucleótido para disminuir la degradación enzimática de los oligómeros antisentido.

*Nuevas bases modificadas*

En otro aspecto, la presente invención proporciona una serie de nuevas bases modificadas para su uso en la preparación de oligonucleótidos modificados de la invención. Estas bases de la divulgación tienen la fórmula general:

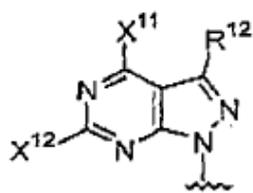


en la que  $Z^1$  es un miembro seleccionado del grupo que consiste en H, F y  $OR^a$ , en el que  $R^a$  es un miembro seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo ( $C_1-C_8$ ) y un grupo protector de hidroxilo;  $Z^2$  es un miembro seleccionado del grupo de H, alquilo ( $C_1-C_8$ ), o se combina opcionalmente con  $Z^1$  para formar un anillo de cinco o siete miembros, que tiene de uno a tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, S y N;  $Y^1$  es un miembro seleccionado del grupo que consiste en OH, un grupo hidroxilo protegido, y  $O-P^1$ , en el que  $P^1$  es una fosforamidita o un grupo H-fosfonato;  $Y^2$  es un miembro seleccionado del grupo que consiste en OH, un grupo hidroxilo protegido y  $O-P^2$ , en el que  $P^2$  es una fosforamidita, H-fosfonato, monofosfato, difosfato o trifosfato; y B es un nucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en:

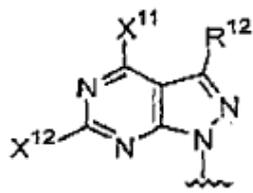


en las que  $X^{11}$  y  $X^{12}$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H,  $NH_2$  y un grupo amino protegido; y cada  $R^{12}$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en heterociclil(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquino  $C_2-C_{12}$ ), heterociclilo, 3-hidroxi-prop-1-inilo, 3-aminoprop-1-inilo, 3-metoxiprop-1-inilo, 4-hidroxi-1-butinilo, 4-amino-1-butinilo y 3-(hidroximetil)-4-hidroxi-1-butinilo, con la condición de que  $R^{12}$  sea distinto de 2-piridiletinilo.

En un grupo de realizaciones, B es:



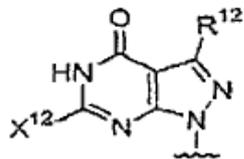
Preferiblemente,  $X^{11}$  es  $NH_2$ , y  $X^{12}$  es H. Más preferiblemente,  $X^{11}$  es  $NH_2$ ,  $X^{12}$  es H,  $Y^1$  es  $O-P^1$ ,  $Y^2$  es hidroxilo



protegido,  $Z^1$  es H, y  $R^{12}$  se selecciona de 3-hidroxi-prop-1-inilo, 3-aminoprop-1-inilo, 4-hidroxi-1-butinilo, 4-amino-1-butinilo, 3-(hidroximetil)-4-hidroxi-1-butinilo, 3-metoxiprop-1-inilo, 2-furanilo, 3-furanilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 1,3-isoxazol-4-ilo, 1,3-isoxazol-5-ilo, 1,3-isoxazol-2-ilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 2-piridilo, 3-piridilo y 4-

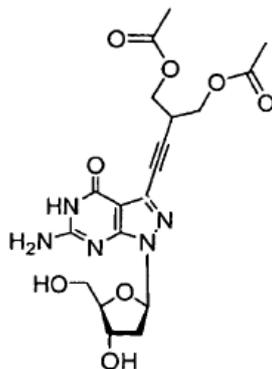
piridilo. En realizaciones particularmente preferidas, Y<sup>1</sup> es -O-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita] e Y<sup>2</sup> es -O-(4,4'-dimetoxitritilo).

En otro grupo de realizaciones, B es:



- 5 Preferiblemente, X<sup>12</sup> es NH<sub>2</sub> o H. Más preferiblemente, X<sup>12</sup> es NH<sub>2</sub> o H, Y<sup>1</sup> es O-P<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup> es hidroxil protegido, Z<sup>1</sup> es H, y R<sup>12</sup> se selecciona de 3-hidroxiprop-1-ilo, 3-aminoprop-1-ilo, 3-(hidroximetil)-4-hidroxi-1-butinilo, 3-metoxiprop-1-ilo, 2-furanilo, 3-furanilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 1,3-isoxazol-4-ilo, 1,3-isoxazol-5-ilo, 1,3-isoxazol-2-ilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 2-piridilo, 3-piridilo y 4-piridilo. En realizaciones particularmente preferidas, Y<sup>1</sup> es -O-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita] e Y<sup>2</sup> es -O-(4,4'-dimetoxitritilo).

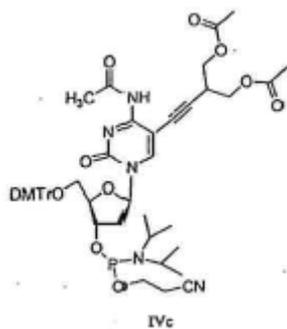
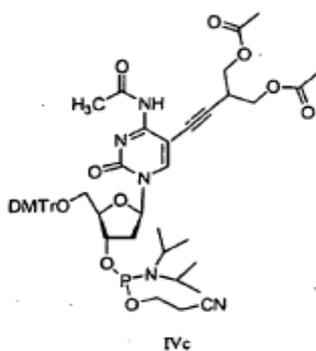
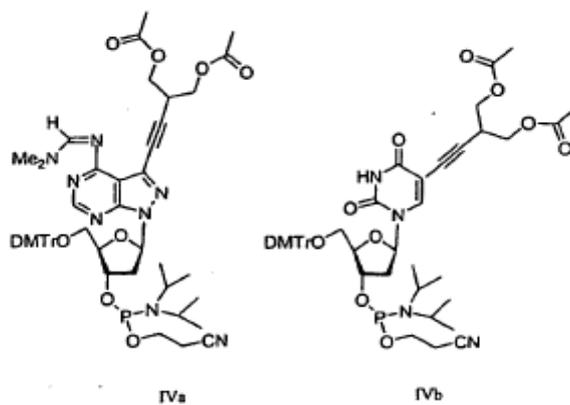
- 10 En otra realización preferida, los oligonucleótidos modificados de la invención tienen al menos una base de fórmula III (incluyendo aquellos en los que los grupos protectores de acetilo han sido retirados, e incluyendo otras formas protegidas y otras formas activadas de los mismos).



III

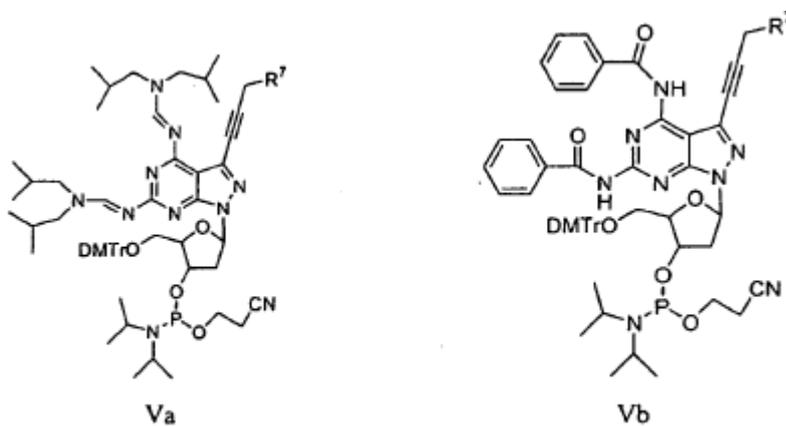
La preparación de los compuestos de fórmula II (incluyendo los compuestos en los que el grupo 6-amino está protegido y los grupos hidroxil del azúcar están protegidos o activados como una fosforamidita) se proporciona en el esquema de reacción 6, anterior.

- 15 En la realización más preferida de la invención, las bases modificadas se seleccionan de las fórmulas IVa, IVb o IVc.



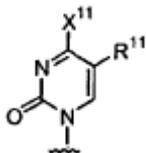
Estos compuestos son particularmente adecuados para su uso en sintetizadores de oligonucleótidos automáticos, y para preparar ciertos oligonucleótidos modificados descritos en la presente

- 5 Otras bases modificadas que son útiles en la presente invención incluyen las representadas por las fórmula Va y Vb:



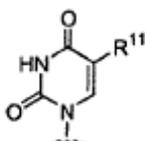
en las que  $R^7$  se selecciona de OH, SH o  $NH_2$ . Estos compuestos pueden sintetizarse mediante los procedimientos descritos en la presente.

5 En otro grupo de realizaciones B es



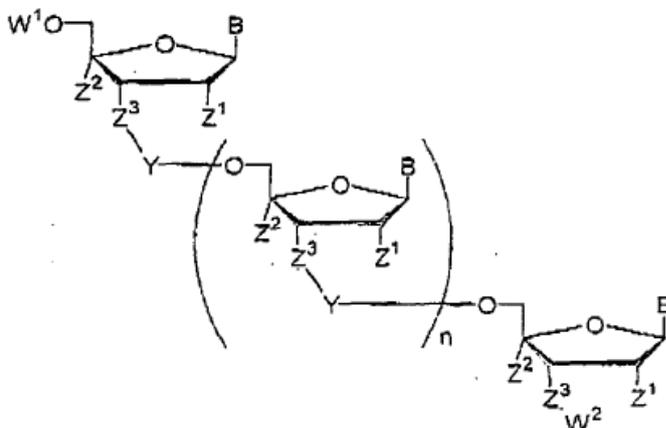
10 Preferiblemente  $X^{11}$  es  $NH_2$ . Más preferiblemente  $X^{11}$  es  $NH_2$ ,  $Y^1$  es  $O-P^1$ ,  $Y^2$  es hidroxil protegido,  $Z^1$  es H, y  $R^{11}$  se selecciona de 3-hidroxiprop-1-ilo, 3-aminoprop-1-ilo, 4-hidroxil-1-butinilo, 4-amino-1-butinilo 3-(hidroximetil)-4-hidroxil-1-butinilo, y 3-metoxiprop-1-ilo. En realizaciones particularmente preferidas  $Y^1$  es  $-O-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita]$  e  $Y^2$  es  $-O-(4,4'-dimetoxitritilo)$ .

En otro grupo de realizaciones, B es

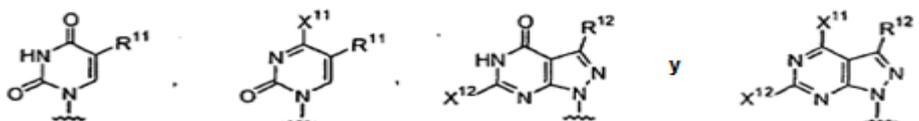


15 Preferiblemente,  $Y^1$  es  $O-P^1$ ,  $Y^2$  es un hidroxil protegido,  $Z^1$  es H,  $R^{11}$  se selecciona a partir de 3-hidroxiprop-1-ilo, 3-aminoprop-1-ilo, 4-hidroxil-1-butinilo, 4-amino-1-butinilo 3-(hidroximetil)-4-hidroxil-1-butinilo, y 3-metoxiprop-1-ilo. En realizaciones particularmente preferidas  $Y^1$  es  $-O-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita]$  e  $Y^2$  es  $-O-(4,4'-dimetoxitritilo)$ .

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona oligonucleótidos modificados que tienen la fórmula:



20 en la que cada  $Z^1$  se selecciona independientemente de H, F y  $OR^a$ , en el que  $R^a$  es un miembro seleccionado de H, alquilo ( $C_1-C_8$ ) y un grupo protector de hidroxil; cada  $Z^2$  es H o alquilo ( $C_1-C_8$ ), o se combina opcionalmente con  $Z^1$  para formar un anillo de cinco o siete miembros; cada  $Z^3$  se selecciona de O, S o NH; cada Y se selecciona independientemente de  $P(O)OH$ ,  $P(S)OH$  y  $P(O)CH_3$ ; el subíndice n es un número entero de 1 a 98;  $W^1$  y  $W^2$  se seleccionan cada uno independientemente de H, un monofosfato, un difosfato, un trifosfato y un ligante del surco menor-resto de grupo conector que tiene unido opcionalmente un grupo indicador o un extintor; y cada B se selecciona independientemente del grupo que consiste en adenina, guanina, citosina, uridina y las bases modificadas de fórmula:



en las que X<sup>11</sup> y X<sup>12</sup> se seleccionan cada uno independientemente H, NH<sub>2</sub> y un grupo amino protegido; y cada R<sup>11</sup> se selecciona independientemente de las formas protegidas o no protegidas de 3-hidroxi-prop-1-inilo, 3-aminoprop-1-inilo, 3-metoxiprop-1-inilo, 4-hidroxi-1-butinilo, 4-amino-1-butinilo, 3-(hidroximetil)-4-hidroxi-1-butinilo, y cada R<sup>12</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en formas protegidas o no protegidas de 3-hidroxi-prop-1-inilo, 3-aminoprop-1-inilo, 3-metoxiprop-1-inilo, 4-hidroxi-1-butinilo, 4-amino-1-butinilo, 3-(hidroximetil)-4-hidroxi-1-butinilo

heterociclil(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), heterociclil(alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), heterociclil(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), y heterociclilo, con la condición de que R<sup>12</sup> sea distinto de 2-piridiletinilo; y

con la condición además de que al menos uno de los B se selecciona de las bases modificadas, y opcionalmente uno o más de los B tiene unido un ligante del surco menor unido-resto de grupo conector, un grupo indicador o una combinación de los mismos.

Las bases modificadas particularmente preferidas son las que se han descrito anteriormente.

### Ejemplos

Cualesquiera ejemplos que se encuentran fuera de las reivindicaciones son proporcionado solo confines comparativos.

En el ensayo de sondas hidrolizables, se añade una sonda marcada a una reacción de PCR. La sonda es complementaria con una región entre los dos cebadores de PCR y está marcada con dos fluoróforos, uno de los cuales extingue la fluorescencia del otro. La sonda se diseña para hibridarse con su secuencia diana complementaria sobre una de las hebras del producto de la PCR a la temperatura de extensión de hebra o a una temperatura mayor, que se utiliza habitualmente en la PCR (55-57 °C). Las enzimas de polimerización que normalmente se emplean en la PCR (en particular, la *Taq* polimerasa) poseen una actividad 5'-exonucleasa intrínseca. Durante la síntesis de nuevas hebras en la etapa de extensión de la reacción de PCR, esta actividad 5'-exonucleasa actuará sobre las hebras complementarias unidas al molde. Si una sonda, marcada como se describió anteriormente, se une al molde, la actividad 5'-exonucleasa asociada con la enzima polimerizante liberará el fluoróforo unido. Una vez liberado, su fluorescencia ya no será extinguida y se obtendrá una señal fluorescente. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.210.015; Livak et al. (1995), *PCR Meth. App.*, 4:357-362; y Heid et al. (1996), *Genome Res.*, 6:986-994.

Se realizó una cromatografía en capa fina sobre placas revestidas de aluminio de gel de sílice 60 F-254 (EM Reagents). Se obtuvo una RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz en un espectrómetro Varian VXR-300. Se emplearon experimentos bidimensionales (Cosy) y NOE para ayudar a asignar las resonancias de protón. Los análisis elementales fueron realizados por Quantitative Technologies Inc. (Boundbrook, NJ).

### Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la síntesis de la 3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita] de la 5-(propin-2-inil-4-metilbenzoato)-5'-O-(4,4'-dimetoxitriphenilmetil)-2'-desoxiuridina (**3**).

#### 5-(prop-2-inil-4-metilbenzoato)-2'-desoxiuridina (**1**)

A una mezcla de 5-yodo-2'-desoxiuridina (5,0 g, 14,12 mmol), CuI (270 mg, 1,42 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,82 g, 0,714 mmol) y trietilamina (2,4 ml) en 30 ml de DMF anhidra se le añadió 4-metilbenzoato de prop-2-inilo (6,10 g, 35,06 mmol). La mezcla se agitó bajo una atmósfera de argón durante 4 h y luego se evaporó hasta la sequedad. El residuo se trituró en metanol y se retiró el exceso de 4-metilbenzoato de prop-2-inilo precipitado mediante filtración. El filtrado se evaporó y el residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con metanol al 10% en acetato de etilo. Las fracciones del producto puro se evaporaron hasta la sequedad y el residuo precipitó en acetato de etilo-éter: 3,14 g (56%) de rendimiento; TLC (metanol al 10% en acetato de etilo), R<sub>f</sub> = 0,50; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11,68 (1H, s, uracil N-H), 8,29 (1H, s, 6-H), 7,89 y 7,35 (4H, 2 x d, J = 8,2 Hz, toluoil Hs), 6,10 (1H, t, J = 6,4 Hz, 1'-H), 5,24 (1H, d, J = 4,4 Hz, 3'-OH), 5,15 (2H, s, alquiniil-CH<sub>2</sub>), 5,12 (1H, t, J = 5,2 Hz, 5'-OH), 4,24 (1H, m, 3'-H), 3,79 (1H, q, 4'-H), 3,59 (2H, m, 5'-Hs), 2,39 (3H, s, toluoil-CH<sub>3</sub>), 2,13 (2H, m, 2'-H).

#### 5-(prop-2-inil-4-metilbenzoato)-5'-O-(4,4'-dimetoxitriphenilmetil)-2'-desoxiuridina (**2**)

A una disolución de (**1**) (3,0 g, 7,50 mmol) en 45 ml de piridina anhidra se le añadió cloruro de dimetoxitritilo (3,0 g). La disolución resultante se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y luego se vertió sobre 400 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 300 ml) y el extracto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con metanol al 5% en acetato de etilo. Las fracciones del producto puro se reunieron y se evaporaron para producir (**2**) como una espuma: 4,16 g (79%) de rendimiento.

3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita] de la 5-(propin-2-inil-4-metilbenzoato)-5'-O-(4,4'-dimetoxitriphenilmetil)-2'-desoxiuridina (**3**)

A una disolución de **(2)** (4,0 g, 5,70 mmol) en 130 ml de cloruro de metileno anhidro, que contenía 3,0 ml de *N,N*-diisopropiletilamina, se le añadió cloro(2-cianoetoxi)-(N,N-diisopropilamino)fosfina (2,22 ml) bajo una atmósfera de argón. La disolución se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y después se trató con 3,0 ml de metanol. La disolución se diluyó con 300 ml de acetato de etilo y se lavó con 300 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. La fase acuosa se extrajo con 300 ml de acetato de etilo y las fases orgánicas reunidas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de hexano del 30% al 0% en acetato de etilo (trietilamina al 2%). Las fracciones puras se reunieron y se evaporaron, y el residuo precipitó en acetato de etilo-hexanos: 3,35 g (65%) de rendimiento; TLC (hexano al 20% en acetato de etilo),  $R_f = 0,82$  y  $0,71$  (diastereómeros); RMN de  $^{31}\text{P}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  147,82 y 147,45.

## 10 Ejemplo 2

**Fase 1:** Preparación de (2R,5R)-5-(4-amino-3-yodopirazolo[3,4-d]pirimidinil)-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (**9**)

*3-yodo-1,5-dihidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona (4)*

La síntesis de este compuesto ha sido indicada previamente por Taylor et al. (Tetrahedron, 48(37):8089-8100 (1992)) utilizando N-yodosuccinimida. La síntesis de los inventores, que emplea monocloruro de yodo como agente yodante, se describe a continuación.

A una disolución de 1,0 l de acetato de sodio 1,2 M se le añadió 4-hidroxipirazolo[3,4-d]pirimidina (25 g, 184 mmol), seguido de monocloruro de yodo (46 g, 284 mmol). La mezcla se agitó en un recipiente sellado durante 4 h a 110 °C. La reacción completada se enfrió hasta la temperatura ambiente y se trató con una disolución de 30 g de metabisulfito de sodio en 200 ml de agua. El precipitado blanco formado se filtró y se enjuagó con agua fría. El sólido entonces se disolvió en 200 ml de una disolución de hidróxido de potasio 3,2 M. Se añadió monohidrato de hidrazina (5 ml) y la disolución se agitó durante 15 min. La disolución entonces se acidificó hasta aproximadamente pH 7 mediante la adición de 50 ml de HCl concentrado, seguido de un ajuste fino del pH con ácido acético. El sólido que se formó se filtró, se enjuagó con agua fría y se secó: 551, g (114% de rendimiento). Nota: es difícil eliminar el agua residual secando el sólido al vacío. El agua residual se retira mediante un proceso de evaporación de piridina en la siguiente etapa.

*3-yodo-1,5-dihidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-tiona (5)*

El compuesto **(4)** (21,5 g, 82,1 mmol) se suspendió en 150 ml de piridina anhidra y la mezcla se evaporó hasta la sequedad. El sólido se resuspendió en 170 ml de piridina seca (bajo una atmósfera de argón) y se añadió  $\text{P}_2\text{S}_5$  (26,8 g). La mezcla se agitó durante 10 min a 65 °C y después durante 2-6 horas a 95 °C. La disolución resultante se enfrió hasta la temperatura ambiente y se desgasificó burbujeando una corriente de argón en la disolución (se hace pasar gas de sulfuro hacia una trampa que contiene una disolución de hidróxido de sodio). La disolución de reacción entonces se redujo en volumen hasta que se formó un jarabe espeso. El exceso de  $\text{P}_2\text{S}_5$  se descompuso mediante la adición de partes alícuotas de 1 ml de agua hasta que cesó la reacción vigorosa, seguido de la adición de 500 ml de agua y 10 ml de ácido acético. La mezcla se calentó hasta 70 °C durante 1 h para facilitar la expulsión del gas de sulfuro de hidrógeno y después se diluyó con 500 ml de agua y se enfrió en un baño de hielo. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó: 19,8 g (87%) de rendimiento.

*4-etiltio-3-yodopirazolo[3,4-d]pirimidina (6)*

El compuesto **(5)** (43,5 g, 157 mmol) se agitó en una disolución de hidróxido de potasio (38,6 g de KOH en 350 ml de agua) durante 30 min. La mezcla se filtró y el filtrado se acidificó hasta pH 10 mediante la adición de ácido acético, y después se diluyó con 350 ml de etanol absoluto. Se añadió yodoetano (10 ml) y la disolución se agitó a temperatura ambiente. Se añadieron más partes alícuotas de 10 ml de yodoetano después de 30 min y de 1,0 h. La reacción se completó después de un total de 90 min. Otros ensayos requieren la posterior adición de yodoetano para completar la reacción. La disolución de reacción se diluyó con 700 ml de agua y 20 ml de ácido acético. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y el sólido se filtró, se enjuagó con agua y se secó. Este producto bruto se disolvió en 300 de DMF y se agitó a 90 °C durante 15 min. El material insoluble se retiró mediante filtración y el filtrado se diluyó con 1 l de agua y se enfrió en un baño de agua helada. El sólido se filtró, se enjuagó con agua y se secó: 19 g (40%) de rendimiento.

*4-metilbenzonato de [(2R,5R)-5-(4-etiltio-3-yodopirazolo[3,4-d]pirimidinil)-3-(4-metilfenilcarbonilo)oxolan-2-il]metilo (7)*

El compuesto **(6)** se convirtió en la correspondiente sal potásica mediante una reacción con 1 equivalente molar de hidróxido de potasio en agua. La disolución resultante se evaporó hasta la sequedad y el residuo se evaporó en acetonitrilo seco. La sal potásica de **(6)** (29,0 g, 94,73 mmol) se disolvió en 80 ml de DMF anhidra y después se diluyó con 830 ml de acetonitrilo anhidro. El derivado de clorazúcar (48 g, 123 mmol) se añadió en una porción y la mezcla se agitó durante 3 h y después se diluyó con 1,5 l de metanol acuoso al 25%. Se dejó la mezcla en reposo a 5 °C durante la noche. Los cristales se filtraron, se enjuagaron con metanol acuoso al 25% y se secaron: 32,2 g (52%) de rendimiento.

*(2R,5R)-2-(hidroximetil)-5-(3-yodo-4-metilpirazolo[3,4-d]pirimidinil)oxolan-3-ol (8)*

5 A una suspensión de **(7)** (10,97 g, 16,66 mmol) en 250 ml de metanol se le añadieron 22 ml de metóxido de sodio 1 N en metanol. La mezcla se agitó a reflujo y se controló el avance de la reacción en cuanto la mezcla se volvió una disolución transparente. Nota: se observó la formación de productos secundarios si se continúa el reflujo después de la conversión completa a **(5)**. La reacción se extinguió mediante la adición de 1,34 ml de ácido acético en cuanto un componente, que se corresponde con el producto deseado, se observó mediante TLC. La disolución se evaporó y el residuo precipitó en metanol-éter-hexano. El sólido se filtró y se secó: 6,8 g (104%) de rendimiento del producto bruto (que contiene acetato de sodio).

*(2R,5R)-5-(4-amino-3-yodopirazolo[3,4-d]pirimidinil)-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (9)*

10 El compuesto **(8)** (6,8 g, 17,35 mmol) se agitó en 200 ml de hidróxido de amonio concentrado (recipiente sellado) a temperatura ambiente durante 36 h. La mezcla se evaporó y el residuo se precipitó en acetoneitrilo-éter. El sólido se filtró y se secó: 5,36 g (82%) de rendimiento. Los datos de RMN y espectrales de este compuesto son idénticos a

15 **Fase 2:** Preparación de 4-metoxibenzoato de 3-{4-((1E)-1-aza-2-metilprop-1-enil)-1-((2R,5R)-5-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-4-[[bis(metiletil)amino]-(2-cianoetoxi)fosfinooxi]oxolan-2-il]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]prop-2-ilnilo (**13**; R<sup>1</sup> = -OCOPhCH<sub>3</sub>)

*4-metilbenzoato de 3-{1-((2R,5R)-4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il)-4-aminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il}prop-2-ilnilo (10; R<sup>1</sup> = -OCOPhCH<sub>3</sub>)*

20 A una mezcla de **(9)** (2,40 g, 6,37 mmol), CuI (124 mg, 0,648 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (380 mg, 0,331 mmol) y trietilamina (1,32 ml) en 12 ml de DMF anhidra se le añadió 4-metilbenzoato de prop-2-inilo (1,87 g, 11,85 mmol). La mezcla se agitó bajo una atmósfera de argón durante 12 h y luego se evaporó hasta la sequedad. El residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con metanol al 5% en acetato de etilo. Las fracciones del producto puro se evaporaron para producir una espuma: 2,29 g (85%) de rendimiento; TLC (metanol al 10% en acetato de etilo), R<sub>f</sub> = 0,43; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) 8,26 (1H, s, 6-H), 7,92 y 7,37 (4H, 2 x d, J = 8,5 Hz, toluoil-Hs), 6,55 (1H, t, J = 6,3 Hz, 1'-H), 5,29 (2H, s, alquilil-CH<sub>2</sub>), 5,28 (1H, d, J = 4,7 Hz, 3'-OH), 4,76 (1H, t, J = 5,7 Hz, 5'-OH), 4,41 (1H, m, 3'-H), 3,81 (1H, m, 4'-H), 3,49 y 3,56 (2H, 2 x m, 5'-Hs), 2,76 y 2,24 (2H, 2 x m, 2'-Hs), 2,39 (3H, s, toluoil-CH<sub>3</sub>).

*4-metilbenzoato de 3-{4-((1E)-1-aza-2-metilprop-1-enil)-1-((2R,5R)-4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il}prop-2-inilo (11; R<sup>1</sup> = -OCOPhCH<sub>3</sub>)*

30 El compuesto **(10)** (1,76 g, 4,16 mmol) se agitó en una disolución de 5,0 ml de N,N-dimetilacetamida, 1,9 ml de N,N-dimetilacetamida dimetil acetal y 2,0 ml de trietilamina anhidra durante 15 h a temperatura ambiente. Los disolventes se evaporaron y el residuo se evaporó dos veces en xilenos, para producir **(11)** como una espuma: TLC (metanol al 10% en acetato de etilo), R<sub>f</sub> = 0,29; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,51 (1H, s, 6-H), 7,90 y 7,37 (4H, 2 x d, J = 8,3 Hz, protones de toluoil), 7,28, 7,14 y 6,74 (13H, d y 2 m, J = 7,1 Hz para el doblete, protones de tritilo), 6,63 (1H, m, 1'-H), 5,32 (1H, d, J = 5,0 Hz, 3'-OH), 5,24 (2H, s, alquilil-CH<sub>2</sub>), 4,56 (1H, m, 3'-H), 3,93 (1H, m, 4'-H), 3,68 (6H, s, metoxi Hs), 3,32 y 3,11 (6H, 2 x s, N-metilos), 3,09-2,95 (2H, m, 5'-Hs), 2,81 y 2,32 (2H, 2 x m, 2'-Hs), 2,40 (3H, s, -Me), 2,19 (3H, s, toluoil-Me).

*4-metilbenzoato de 3-{4-((1E)-1-aza-2-metilprop-1-enil)-1-((2R,5R)-5-[[bis(4-metoxifenil)fenil]metoxi]metil]-4-hidroxi-oxolan-2-il]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il}prop-2-inilo (12; R<sup>1</sup> = -OCOPhCH<sub>3</sub>)*

40 A una disolución de **(11)** en 25 ml de piridina anhidra se le añadió cloruro de dimetoxitritilo (1,67 g). La disolución resultante se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y después se vertió en 250 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. La mezcla se extrajo con acetato de etilo y el extracto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con metanol al 5% en acetato de etilo. Las fracciones de producto puro se reunieron y se evaporaron para producir **(12)** como una espuma: 2,06 g (62%) de rendimiento para el proceso en dos etapas.

45 *4-metoxibenzoato de 3-{4-((1E)-1-aza-2-metilprop-1-enil)-1-((2R,5R)-5-[[bis(4-metoxifenil)fenil]metoxi]metil]-4-[[bis(metiletil)amino]-(2-cianoetoxi)fosfinooxi]oxolan-2-il]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il}prop-2-inilo (13; R<sup>1</sup> = -OCOPhCH<sub>3</sub>),*

o

50 *3'-[[2-cianoetil]-N,N-diisopropilfosforamidita] de 1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitrietilmetil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-4-[[dimetilamino]prop-1-enil]-3-(prop-2-inil-4-metilbenzoatoe)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (13)*

A una disolución de **(12)** (2,03 g, 2,56 mmol) en 60 ml de cloruro de metileno anhidro, que contenía 1,33 ml de N,N-diisopropiletilamina, se le añadió cloro(2-cianoetoxi)-(N,N-diisopropilamino)fosfina (1,0 ml) bajo una atmósfera de argón. La disolución se agitó durante 1,0 h a temperatura ambiente y después se trató con 2,0 ml de metanol. La disolución se diluyó con 250 ml de acetato de etilo y se lavó con 200 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al

5%. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con trietilamina al 2% en acetato de etilo. Las fracciones puras se reunieron y se evaporaron. La fosforamidita (**13**) precipitó en éter-hexanos: 1,82 g (71%) de rendimiento; TLC (metanol al 5% en acetato de etilo),  $R_f = 0,32$ ; RMN de  $^{31}\text{P}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  147,90 y 147,22.

### 5 Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la preparación de N-{3-[1-((2R,5R)-5-{bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil)-4-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinooxi]oxolan-2-il]-6-amino-4-oxo-(5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)]propil}-2,2,2-trifluoroacetamida (**22**).

#### 3-yodo-4-metoxipirazolo[3,4-d]pirimidin-6-ilamina (**14**)

10 Se suspendió 4-metoxipirazolo[3,4-d]pirimidin-6-ilamina (6,75 g, 40,87 mmol) en una disolución acuosa que contenía acetato de sodio (6,0 g, 44,09 mmol) y monocloruro de yodo (9,12 g, 56,17 mmol) y se agitó a 100 °C en un recipiente de reacción sellado durante 24 h. La mezcla resultante se enfrió hasta la temperatura ambiente y se trató con una disolución de metabisulfito de sodio (3,6 g, 18,94 mmol) en 24 ml de agua. El sólido que se formó se filtró, se enjuagó con agua y se secó: 6,93 g (58%) de rendimiento; TLC (metanol al 10% en acetato de etilo),  $R_f = 0,57$ ;  
15 RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13,08 (1H, s a, protón N-1), 10,58 (1H, s, protón N-5), 6,60 (2H, s a, 6-amino).

#### 4-metilbenzoato de [(2R,5R)-5-(6-amino-3-yodo-4-metoxipirazolo[3,4-d]pirimidinil)-3-(4-metilfenilcarbonilo)oxolan-2-il]metilo (**15**)

A una suspensión de (**14**) (6,68 g, 22,95 mmol) en 150 ml de metanol se le añadieron 8,05 ml de hidróxido de potasio metanólico 2,85 M. La mezcla se agitó durante un minuto y luego se diluyó con 100 ml de tolueno y se evaporó. La sal potásica sólida de (**1**) se secó al vacío. La sal potásica se suspendió en 75 ml de DMF anhidra y después se diluyó con 420 ml de acetonitrilo anhidro. Se añadió inmediatamente 1-cloro-1,2-didesoxi-3,5-di-O-toluoilribofuranosa (8,95 g, 22,95 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón durante 1 h, y después se filtró. El filtrado se evaporó y la espuma residual se recristalizó dos veces en metanol: 6,59 g (45%) de rendimiento; TLC (acetato de etilo/hexano 1:1),  $R_f = 0,52$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,93 y 7,37 (8H, m y d,  $J = 7,9$  Hz para el d, aromático), 7,10 (2H, s a, 6-amino), 6,51 (1H, t,  $J = 6,6$  Hz, 1'-H), 5,69 (1H, m, 3'-H), 4,44 (3H, m, 4'- y 5'-Hs), 3,99 (3H, s, 4-metoxi), 3,19 y 2,63 (2H, 2 x m, 2'-Hs), 2,40 y 2,38 (6H, 2 x s, protones de toluoimetilo).

#### [(2R, 5R)-5-(6-amino-3-yodo-4-metoxipirazolo[3,4-d]pirimidinil)-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (**16**)

A una suspensión de (**15**) (32,4 g, 50,40 mmol) en 600 ml de metanol se le añadieron 12,5 ml de metóxido de sodio 1 M en metanol. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 18 h y después se enfrió en una nevera (-10 °C). Los cristales de (**3**) que se formaron se filtraron y se enjuagaron con metanol enfriado en hielo: 10,95 g de rendimiento. Se añadió ácido acético (12,5 ml) al filtrado y el volumen se redujo a aproximadamente 300 ml. Se dejó la disolución en reposo en la nevera durante la noche y se recogió otra cosecha de cristales (3,95 g). El filtrado se evaporó hasta la sequedad y el aceite residual se trituró con éter. El sólido que se formó se filtró, se secó y se recristalizó en agua hirviendo: 2,03 g. Rendimiento total = 16,93 g (83%); TLC (metanol al 10% en acetato de etilo,  $R_f = 0,23$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,02 (2H, s a, 6-amino), 6,33 (1H, t,  $J = 6,1$  Hz), 5,24 (1H, d,  $J = 4,4$  Hz, 3'-OH), 4,73 (1H, t,  $J = 5,6$  Hz, 5'-OH), 4,36 (1H, m, 3'-H), 3,99 (3H, s, 4-metoxi), 3,75 (1H, m, 4'-H), 3,51-3,32 (2H, m, 5'-Hs), 2,79 y 2,17 (2H, 2 x m, 2'-Hs). Anal. calc. para  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_4 \cdot 0,3 \text{H}_2\text{O}$ : C, 32,02; H, 3,57; N, 16,98. Encontrado: C, 32,13; H, 3,35; N, 16,77.

#### 1-[(2R,5R)-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-6-amino-3-yodo-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona (**17**)

Una suspensión de (**16**) (16,84 g, 41,36 mmol) en 1,5 l de una disolución de hidróxido de sodio 1 N se calentó a reflujo. La mezcla se volvió una disolución homogénea y se enfrió hasta 25 °C utilizando un baño de agua helada. Se añadió ácido acético (90 ml) y la disolución se almacenó a 5 °C durante la noche. Los cristales que se formaron se filtraron, se enjuagaron con agua enfriada en hielo y se secaron: 7,47 g de rendimiento de (**4**). El filtrado se evaporó hasta un volumen de aproximadamente 500 ml y se almacenó a 5 °C durante la noche. Se recogió una segunda cosecha de cristales (3,75 g). El filtrado se evaporó hasta aproximadamente 200 ml. El acetato de sodio que se formó se retiró mediante filtración y el filtrado se almacenó a 5 °C durante la noche. Se recogió otra cosecha de cristales (2,25 g). Rendimiento total: 13,47 g (83%); TLC (n-butanol/agua/ácido acético 5:3:2),  $R_f = 0,74$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,22 (1H, t,  $J = 6,3$  Hz, 1'-H), 4,33 (1H, m, 3'-H), 3,73 (1H, m, 4'-H), 3,47 y 3,36 (2H, 2 x m, 5'-Hs), 2,63 y 2,12 (2H, 2 x m, 2'-Hs). Anal. calc. para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_4 \cdot 0,7 \text{H}_2\text{O}$ : C, 29,60; H, 3,33; N, 17,26. Encontrado: C, 29,81; H, 3,02; N, 17,00.

#### N-(3-{1-[(2R,5R)-4-(hidroximetil)oxolan-2-il]-6-amino-4-oxo-(5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)]prop-2-inil}-2,2,2-trifluoroacetamida (**18**)

A una mezcla de (**17**) (6,00 g, 15,26 mmol), CuI (297 mg, 1,56 mmol) y tetrakis[trifenilfosfina]paladio(0) en 30 ml de DMF anhidra se le añadió trietilamina anhidra (3,14 ml), seguido de trifluoroacetamida de propargilo (4,29 g, 28,41 mmol). La disolución de reacción se agitó bajo una atmósfera de argón durante 40 h. La DMF se retiró mediante

evaporación y el aceite residual se tritó en cloroformo. El sólido de **(5)** bruto que se formó se filtró, se enjuagó con cloroformo y se secó. El sólido se disolvió en un volumen mínimo de DMF, se absorbió sobre gel de sílice y se evaporó. La mezcla seca se cargó en una columna de gel de sílice y se eluyó con metanol al 10% en acetato de etilo. Las fracciones del producto se reunieron y se evaporaron. El residuo precipitó en acetato de etilo/éter: 4,0 g (63%) de rendimiento; TLC (metanol al 20% en acetato de etilo),  $R_f = 0,59$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,79 (1H, s,  $\text{N}_5\text{-H}$ ), 10,16 (1H, t,  $J = 5,2$  Hz, trifluoroacetimido N-H), 6,77 (2H, s a, 6-amino), 6,28 (1H, t,  $J = 6,3$  Hz, 1'-H), 5,23 (1H, d,  $J = 4,1$  Hz, 3'-OH), 4,72 (1H, t,  $J = 5,1$  Hz, 5'-KOH), 4,32 (3H, m,  $-\text{CONH}-\text{CH}_2-$  y 3'-H), 3,75 (1H, m, 4'-H), 3,50-3,29 (2H, 2 x m, 5'-Hs), 2,65 y 2,15 (2H, 2 x m, 2'-Hs). Anal. calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_5 \cdot 0,74 \text{H}_2\text{O}$ : C, 41,93; H, 3,87; N, 19,56. Encontrado: C, 42,33; H, 3,64; N, 19,13.

10 *N*-{3-[1-[(2*R*,5*R*)-4-(hidroximetil)oxalan-2-il]-6-amino-4-oxo-(5-hidropirazolo[5-4-*d*]piriminin-3-il)]propil}-2,2,2-trifluoroacetamida (**19**)

A una disolución de **(18)** (1,0 g, 2,40 mmol) en 100 ml de metanol que contenía 0,12 g de hidróxido de paladio al 20% (preactivado con ácido fórmico) se le añadieron 2,0 ml de tampón formiato de trietilamonio 4 M (pH 6,5). La mezcla se agitó bajo 241,32 kPa de gas hidrógeno durante 18 h (durante algunos de los ensayos fue necesario añadir más catalizador para la reducción completa). La mezcla se filtró a través de Celite y el filtrado se evaporó. El aceite residual se cristalizó en agua: 0,79 g (78%) de rendimiento; TLC (metanol al 20% en acetato de etilo),  $R_f = 0,52$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,59 (1H, s,  $\text{N}_5\text{-H}$ ), 9,47 (1H, t a, trifluoroacetimido N-H), 6,64 (2H, s a, 6-amino), 6,27 (1H, t,  $J = 6,3$  Hz, 1'-H), 5,18 (1H, d,  $J = 4,4$  Hz, 3'-OH), 4,75 (1H, t,  $J = 5,9$  Hz, 5'-OH), 4,36 (1H, m, 3'-H), 3,75 (1H, m, 4'-H), 3,48 y 3,61 (2H, 2 x m, 5'-Hs), 3,22, 2,68 y 1,87 (6H, 3 x m, protones de propilmetileno), 2,68 y 2,12 (2H, 2 x m, 2'-Hs); Anal. calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_5 \cdot 0,90 \text{H}_2\text{O}$ : C, 41,27; H, 4,80; N, 19,25. Encontrado: C, 41,57; H, 4,50; N, 19,11.

*N*-{3-[(1*E*)-1-aza-2-(dimetilamino)prop-1-enil]-[(2*R*,5*R*)-4-(hidroximetil)oxalan-2-il]-6-amino-4-oxo-(5-hidropirazolo[5-4-*d*]piriminin-3-il)]propil}-2,2,2-trifluoroacetamida (**20**)

A una disolución de **(19)** (0,80 g, 1,98 mmol) en 5,0 ml de DMF anhidra se le añadió N,N-dimetilformamida dimetil acetal (3,1 ml). La disolución se agitó durante 2,0 h bajo una atmósfera de argón y después se evaporó. El residuo se evaporó dos veces en xilenos y después se colocó al vacío. El sólido amorfo **(20)** que se formó se tritó con éter y se recogió: 773 mg (82%) de rendimiento; TLC (metanol al 20% en acetato de etilo),  $R_f = 0,47$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11,22 (1H, s a,  $\text{N}_5\text{-H}$ ), 9,47 (1H, t,  $J = 5,5$  Hz, trifluoroacetimido N-H), 8,67 (1H, s,  $\text{N}=\text{CH}-\text{N}$ ), 6,42 (1H, t,  $J = 6,5$  Hz, 1'-H), 5,22 (1H, d,  $J = 4,3$  Hz, 3'-OH), 4,75 (1H, t,  $J = 6,1$  Hz, 5'-OH), 4,40 (1H, m, 3'-H), 3,77 (1H, m, 4'-H), 3,50 y 3,38 (2H, 2 x s, 5'-Hs), 3,18 y 3,05 (6H, 2 x s, N,N-dimetil Hs), 3,22, 2,72 y 1,89 (6H, 3 x m, propil metileno Hs), 2,72 y 2,15 (2H, 2 x m, 2'-Hs); Anal. calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_7\text{O}_5 \cdot 0,40 \text{H}_2\text{O}$ : C, 44,80; H, 5,18; N, 20,32. Encontrado: C, 45,02; H, 4,96; N, 19,94.

*N*-{3-[1-[(2*R*,5*R*)-5-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-4-hidroxioloxan-2-il]-6-amino-4-oxo-(5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)]propil}-2,2,2-trifluoroacetamida (**21**)

A una disolución de **(20)** (723 mg, 1,52 mmol) en 9,0 ml de piridina anhidra se le añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,61 g, 1,80 mmol). La disolución de reacción se agitó durante 3,0 h bajo una atmósfera de argón y después se vertió en 100 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. La disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml) y los extractos secados (sulfato de sodio) se evaporaron. El producto bruto se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de disolvente de metanol al 0-5% en acetato de etilo (trietilamina al 2%). Las fracciones del producto se evaporaron produciendo **(21)** como un sólido amorfo: 724 mg (61%) de rendimiento; TLC (metanol al 5% en acetato de etilo),  $R_f = 0,39$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11,27 (1H, s,  $\text{N}_5\text{-H}$ ), 9,43 (1H, t,  $J = 5,3$  Hz, trifluoroacetimido N-H), 8,71 (1H, s,  $\text{N}=\text{CH}-\text{N}$ ), 7,32, 7,17 y 6,76 (13H, 3 x m, aromático), 6,45 (1H, t,  $J = 6,3$  Hz, 1'-H), 5,26 (1H, d,  $J = 5,3$  Hz, 3'-OH), 4,45 (1H, m, 3'-H), 3,90 (1H, m, 4'-H), 3,70 (6H, s, OMe Hs), 3,18 y 3,05 (10H, 2 x s, N,N-dimetilo, 5'-Hs y  $\text{CONH}-\text{CH}_2$ ), 2,62 y 1,65 (4H, 2 x m, metileno Hs), 2,62 y 2,20 (2H, 2 x m, 2'-Hs). Anal. calc. para  $\text{C}_{39}\text{H}_{42}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_7 \cdot 0,30 \text{H}_2\text{O}$ : C, 59,81; H, 5,48; N, 12,52. Encontrado: C, 59,80; H, 5,39; N, 12,63.

*N*-{3-[1-[(2*R*,5*R*)-5-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-4-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinooxi]oxolan-2-il]-6-amino-4-oxo-(5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)]propil}-2,2,2-trifluoroacetamida (**22**)

A una disolución de **(21)** (700 mg, 0,900 mmol) en 22 ml de cloruro de metileno anhidro, que contenía 0,47 ml de diisopropiletilamina, se le añadió N,N-diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo (0,34 ml, 1,52 mmol). Después de agitar durante 30 min bajo una atmósfera de argón a 25 °C, la disolución se trató con 3,0 ml de metanol y se diluyó con 200 ml de acetato de etilo. La disolución se lavó con 100 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5% y se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó. El producto bruto se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con trietilamina al 2% en acetato de etilo. Las fracciones del producto se evaporaron, y el residuo precipitó en éter-hexano: 583 mg (66%) de rendimiento; TLC (acetato de etilo),  $R_f = 0,38$ ; RMN de  $^{31}\text{P}$  (DMSO- $d_6$ , referencia al ácido fosfórico al 85%)  $\delta$  145,50 y 144,72.

#### Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra la preparación de 3-[[5-(4,6-bis((1E)-1-aza-2-[bis(2-metilpropil)amino]vinil)-3-prop-1-inilpirazolo[3,4-d]pirimidinil)-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]oxolan-3-ilo]etil(metiletil)amino]fosfino]propanitrilo (**26**).

5 *5-(4,6-bis((1E)-1-aza-2-[bis(2-metilpropil)amino]vinil)-3-prop-1-inilpirazolo[3,4-d]pirimidinil)-2 (hidroximetil)oxolan-3-ol (24)*

El compuesto (**23**) (1 mmol) puede agitarse durante 5 h a temperatura ambiente con (dimetoximetil)bis(2-metilpropil)amina (0,5 ml, 3,37 mmol). La mezcla de reacción puede reducirse al vacío y el compuesto protegido puede purificarse sobre gel de sílice para producir (**24**) (Vincent et al.).

10 *5-(4,6-bis((1E)-1-aza-2-[bis(2-metilpropil)amino]vinil)-3-prop-1-inilpirazolo[3,4-d]pirimidinil)-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]oxolan-3-ol (25)*

15 A una disolución de (**24**) (1,50 mmol) en 9,0 ml de piridina anhidra puede añadirse cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,61 g, 1,80 mmol). La disolución de reacción puede agitarse durante 3,0 h bajo una atmósfera de argón y después puede verse en 100 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. La disolución acuosa puede extraerse con acetato de etilo (2 x 200 ml) y los extractos pueden secarse (sulfato de sodio) y evaporarse. El producto bruto puede purificarse mediante una cromatografía en gel de sílice con un gradiente apropiado para producir (**25**).

*3-[[5-(4,6-bis((1E)-1-aza-2-[bis(2-metilpropil)amino]vinil)-3-prop-1-inilpirazolo[3,4-d]pirimidinil)-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]oxolan-3-ilo]etil(metiletil)amino]fosfino]propanitrilo (26)*

20 A una disolución de (**25**) (0,900 mmol) en 22 ml de cloruro de metileno anhidro, que contenía 0,47 ml de diisopropiletilamina, se le puede añadir N,N-diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo (0,34 ml, 1,52 mmol). La disolución puede agitarse durante 30 min bajo una atmósfera de argón a 25 °C y puede tratarse con 3,0 ml de metanol y diluirse con 200 ml de acetato de etilo. La disolución puede lavarse después con 100 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5% y secarse sobre sulfato de sodio y evaporarse. El producto bruto puede purificarse mediante una cromatografía en gel de sílice con un gradiente apropiado para producir (**26**).

## 25 Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra la síntesis de 5-[4,6-diamino-3-(2-metoxietinil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (**27**).

*5-[4,6-diamino-3-(2-metoxietinil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (27)*

30 A una mezcla de 4,6-diamino-1-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (4,2 g, 10,71 mmol), CuI (211 mg, 1,10 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (635 mg, 0,553 mmol) y trietilamina (2,2 ml) en 20 ml de DMF anhidra se le añadió metil propargil éter (1,82 ml). La mezcla se agitó bajo una atmósfera de argón durante 16 h y luego se evaporó hasta la sequedad. El residuo cristalizó en metanol: 3,20 g (89%) de rendimiento; TLC (metanol al 30% en acetato de etilo), R<sub>f</sub> = 0,63; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,44 (2H, d a, amino), 6,32 (1H, t, J = 6,6 Hz, 1'-H), 6,33 (2H, s a, amino), 5,20 (1H, d, J = 4,1 Hz, 3'-OH), 4,75 (1H, t a, 5'-OH), 4,40 (2H, s, metileno), 4,36 (1H, m, 3'-H), 3,76 (1H, m, 4'-H), 3,47 y 3,32 (2H, 2 x m, 5'-Hs), 3,32 (3H, s, metoxi), 2,68 y 2,14 (2H, 2 x m, 2'-Hs).

35 *Síntesis de 1-metoxiprop-1-in-5-{6-[(1E)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]-4-[(1Z)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]pirazolo[3,4-d]pirimidinil}-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (28)*

40 El compuesto (**27**) (3,1 g, 9,28 mmol) se agitó en una disolución de 30 ml de N,N-dimetilformamida y 15 ml de N,N-dimetilformamida dimetil acetal durante 14 h a 45 °C. Los disolventes se evaporaron y el residuo se evaporó dos veces en xilenos para producir (**28**) como una espuma que precipitó en acetato de etilo-éter: 2,8 g (68%) de rendimiento; TLC (metanol al 50% en acetato de etilo), R<sub>f</sub> = 0,36.

*Síntesis de 3-[[5-{6-[(1E)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]-4-[(1Z)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]pirazolo[3,4-d]pirimidinil}-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]oxolan-3-ilo]etil(metiletil)amino]fosfino]propanitrilo (29)*

45 A una disolución de (**28**) (2,7 g, 6,08 mmol) en 45 ml de piridina anhidra se le añadió cloruro de dimetoxitritilo (2,4 g). La disolución resultante se agitó durante 3 h a temperatura ambiente y después se vertió en 200 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. La mezcla se extrajo con acetato de etilo y el extracto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de metanol al 0-40% en acetato de etilo. Las fracciones del derivado de 5'-O-DMT puras se reunieron y se evaporaron para producir una espuma: 1,0 g (22%) de rendimiento.

50 A una disolución del derivado de DMT (0,98 g, 1,31 mmol) en 16 ml de cloruro de metileno anhidro, que contenía 0,70 ml de N,N-diisopropiletilamina, se le añadió diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo (0,50 ml) bajo una atmósfera de argón. La disolución se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y después se trató con 1,0 ml de

metanol. La disolución se cargó directamente sobre una columna de gel de sílice y se eluyó con un gradiente de metanol al 0-20% en acetato de etilo (trietilamina al 2%). Las fracciones puras se reunieron y se evaporaron para producir una espuma: 0,25 g (20%) de rendimiento.

### Ejemplo 6

5 Este ejemplo ilustra la preparación de 3-[[5-{4-[(1Z)-1-aza-2-(metilamino)vinil]-3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil]-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-oxolan-3-iloxi]-bis(metiletil)amino]fosfinoxi]propannitrilo (**35**) (véase el esquema de reacción 8).

#### *(2-furilmtoximetilen)metan-1,1-dicarbonitrilo (30)*

10 A una disolución enfriada en hielo que contenía cloruro de metileno anhidro (500 ml), trietilamina (100 ml) y malonitrilo (30 g, 454 mmol) se le añadió cloruro de 2-furanilo (50 g, 383 mmol) mediante una adición gota a gota a lo largo de un periodo de 20 min. Entonces se continuó la agitación durante una hora más a temperatura ambiente. La disolución de reacción se lavó con 1,5 l de una disolución de HCl 2 N enfriada en hielo y después con 1,5 l de agua. La fase orgánica se evaporó produciendo un aceite.

15 Una porción del producto de aceite (4,6 g, 28,75 mmol) se disolvió en una disolución que consistía en 40 ml de dioxano y 4,0 ml de agua. Se añadió sulfato de dimetilo (15 ml) y bicarbonato de sodio (15 g), y la disolución de reacción se agitó durante 2,5 h a 80 °C. La mezcla entonces se disolvió en 100 ml de agua y el producto se extrajo con 200 ml de acetato de etilo. La disolución orgánica se lavó con 100 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%, seguido de 100 ml de agua. La disolución se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para producir un aceite que solidificó al vacío: 2,72 g de rendimiento; TLC (acetato de etilo/hexano 1:1),  $R_f = 0,42$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,25 (1H, m, aromático), 7,63 (1H, m, aromático), 6,92 (1H, m, aromático), 4,23 (3H, s, metoxi).

#### *2-amino-4-(2-furil)furan-3-carbonitrilo (31)*

25 Se añadió hidrazina monohidrato (3,4 ml, 80 mmol) gota a gota a una disolución enfriada en hielo de (**30**) (2,72 g, 15,63 mmol) en 75 ml de metanol a lo largo de un periodo de 15 min. La disolución entonces se evaporó hasta la sequedad para producir un aceite que solidificó al vacío. El sólido se trituró en éter, se filtró y se secó: 2,2 g (81%) de rendimiento; TLC (acetato de etilo),  $R_f = 0,81$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,77 (1H, s, furanilo), 6,80 (1H, m, furanilo), 6,61 (1H, m, furanilo), 6,41 (2H, s a, amina).

#### *3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (32)*

30 El compuesto (**31**) (25,7 g, 148 mmol) se agitó en 250 ml de formamida a 190 °C durante 4 h. La disolución entonces se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con 1,2 l de agua y se enfrió en un baño de hielo. El sólido que se formó se filtró y se secó: 22 g (74%) de rendimiento; TLC (metanol al 5% en acetato de etilo),  $R_f = 0,25$ .

#### *4-metilbenzoato de [5-(4-amino-3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil)-3-(4-metilfenilcarboniloxi)-2-oxoetil]oxolan-2-il]metilo (33)*

35 El compuesto (**32**) (10 g, 49,7 mmol) se agitó en 200 ml de una disolución de KOH metanólico 0,29 M durante 5 min. La mezcla se evaporó hasta la sequedad y el residuo entonces se disolvió en 40 ml de DMF anhidra caliente. La disolución se enfrió hasta la temperatura ambiente y después se diluyó con 230 ml de acetonitrilo anhidro. El derivado de cloroazúcar (23 g, 59,14 mmol) se añadió inmediatamente y la mezcla se agitó durante 45 min y después se evaporó hasta la sequedad. El residuo se disolvió en 800 ml de acetato de etilo y se lavó con agua (2 x 800 ml). La disolución orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El producto bruto se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de hexano al 30-0% en acetato de etilo. Las fracciones del producto puro se evaporaron y el residuo cristalizó en metanol caliente: 3,4 g (12%) de rendimiento; TLC (acetato de etilo),  $R_f = 0,47$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,27 (1H, s, 6-H), 7,96 (1H, m, furanilo), 7,95, 7,84, 7,36 y 7,23 (8H, 4 x d, toluóilo aromático), 6,83 (1H, m, furanilo), 6,80 (1H, t,  $J = 6,3$  Hz, 1'-H), 6,70 (1H, m, furanilo), 5,86 (1H, m, 3'-H), 4,64-4,42 (3H, m, 4'-H y 5'-Hs), 3,28 y 2,76 (2H, 2 x m, 2'-Hs), 2,39 y 2,36 (6H, 2 x s, toluoilmetilos).

#### *5-{4-[(1Z)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]-3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil}-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (34)*

45 Una suspensión de (**33**) (3,36 g, 6,08 mmol) en 17 ml de una disolución de metóxido de sodio metanólico 0,12 M se sometió a reflujo durante 30 min. La disolución resultante se enfrió hasta la temperatura ambiente y se neutralizó mediante la adición de 0,12 ml de ácido acético. La disolución se evaporó hasta la sequedad y el producto precipitó en metanol-éter, y después recristalizó en agua hirviendo: 1,63 g (85%) de rendimiento del nucleósido desprotegido.

50 Todo el producto de nucleósido anterior se agitó en una disolución que consistía en 30 ml de DMF anhidra y 15 ml de N,N-dimetilformamida dimetil acetal durante 5 h. La disolución se evaporó hasta la sequedad y el residuo entonces se evaporó dos veces en xilenos para producir una espuma: 1,89 g (99%) de rendimiento; TLC (metanol al 20% en acetato de etilo),  $R_f = 0,45$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,98 y 8,46 (2H, 2 x s, formamidin C-H y 6-H), 7,97 (1H, m, furanilo), 7,81 (1H, m, furanilo), 6,65 (2H, m, 1'-H y furanilo), 5,30 (1H, d,  $J = 4,5$  Hz, 3'-OH), 4,79 (1H, t,  $J = 5,5$

Hz, 5'-OH), 4,51 (1H, m, 3'-H), 3,85 (1H, m, 4'-H), 3,57 y 3,40 (2H, 2 x m, 5'-Hs), 3,26 y 3,21 (6H, 2 x s, protones N-Me), 2,88 y 2,30 (2H, 2 x m, 2'-Hs).

*3-[(5-{4-[(1Z)-1-aza-2-(metilamino)vinil]-3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil}-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]oxolan-3-iloxi)-[bis(metiletil)amino]fosfinooxi]propanitrilo (35)*

- 5 Se añadió cloruro de dimetoxitritilo (2,01 g) a una disolución de (34) (1,84 g, 4,95 mmol) disuelto en 30 ml de piridina seca. La disolución de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente y después se vertió en 200 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. El producto se extrajo con 300 ml de acetato de etilo y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó. El residuo se purificó utilizando una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de metanol al 0-5% en acetato de etilo. Las fracciones del producto puro se evaporaron para producir una espuma: 2,26 g (68%) de rendimiento del derivado de 5'-O-DMT.

- 10 A una disolución del derivado de DMT (2,18 g, 3,23 mmol) disuelto en 40 ml de cloruro de metileno seco, que contenía 1,75 ml de N,N-diisopropiletilamina, se le añadieron 1,25 ml de diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo. La disolución se agitó bajo una atmósfera de argón durante 15 min a temperatura ambiente, y después se trató con 5 ml de metanol. La disolución resultante se diluyó con 500 ml de acetato de etilo y se lavó con 400 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. La disolución orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de metanol al 5-10% en acetato de etilo (trietilamina al 2%). Las fracciones de producto puro se evaporaron para producir una espuma: 1,62 g (57%) de rendimiento; RMN de <sup>31</sup>P (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 147,81 y 147,16.

### Ejemplo 7

- 20 Este ejemplo ilustra la preparación de 3-[(5-{6-[(1E)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]-4-[(1Z)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]-3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil}-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]oxolan-3-iloxi)-[bis(metiletil)amino]fosfinooxi]propanitrilo (39, véase el esquema de reacción 9).

*3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-díamina (36)*

- 25 Una mezcla de (31) finamente triturado (10,0 g, 57,47 mmol) y carbonato de guanidina (16,6 g, 91,95 mmol) se calentó a 230 °C durante 45 min. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y el sólido se trituró en 100 ml de agua hirviendo. El sólido ((36) puro) se filtró, se enjuagó con agua y se secó: 11,1 g (89%) de rendimiento; TLC (metanol al 40% en acetato de etilo), R<sub>f</sub> = 0,66; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12,68 (1H, s a, N-H), 7,86 (1H, m, furanilo), 6,93 (2H, s a, -NH<sub>2</sub>), 6,85 (1H, d, J = 3,5 Hz, furanilo), 6,65 (1H, m, furanilo), 6,10 (2H, s a, -NH<sub>2</sub>).

*5-(4,6-díamino-3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil)-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (37)*

- 30 El compuesto (36) (10,5 g, 48,61 mmol) se agitó en 200 ml de una disolución de KOH metanólico 0,29 M durante 5 min. La mezcla se evaporó hasta la sequedad y el residuo entonces se disolvió en 105 ml de DMF anhidra caliente. La disolución se enfrió hasta la temperatura ambiente y después se diluyó con 620 ml de acetonitrilo anhidro. El derivado de cloroazúcar (23 g, 59,14 mmol) se añadió inmediatamente y la mezcla se agitó durante 40 min y después se filtró. El filtrado se evaporó hasta la sequedad y el residuo se cromatografió a través de una columna de gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo. Las fracciones de los nucleósidos se evaporaron para producir 2,8 g (rendimiento del 10%) del nucleósido toluoil-prottegido como una mezcla de alfa- y beta-anómeros. La mezcla se sometió a reflujo en 40 ml de metóxido de sodio metanólico 0,19 M durante 45 min. La disolución de reacción se colocó en una nevera durante la noche para producir una cosecha de cristales que se corresponden con el beta-anómero puro (37): 690 mg de rendimiento; TLC (metanol al 20% en acetato de etilo), R<sub>f</sub> = 0,32; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,90 (1H, m, furanilo), 6,99 (2H, s a, amino), 6,86 (1H, d, J = 4,1 Hz, furanil), 6,68 (1H, m, furanilo), 6,41 (1H, t, J = 6,6 Hz, 1'-H), 6,26 (2H, s a, amino), 5,21 (1H, d, J = 4,4 Hz, 3'-OH), 4,82 (1H, t, J = 5,8 Hz, 5'-OH), 4,42 (1H, m, 3'-H), 3,79 (1H, m, 4'-H), 3,52 y 3,41 (2H, 2 x m, 5'-Hs), 2,75 y 2,18 (2H, 2 x m, 2'-Hs).

*5-{6-[(1E)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]-4-[(1Z)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]-3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil}-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol (38)*

- 45 Una disolución de (37) (0,68 g, 2,05 mmol) en 30 ml de DMF anhidra y 15 ml de N,N-dimetilformamida dimetil acetal se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La disolución se evaporó hasta la sequedad y el residuo se evaporó dos veces en xilenos para producir una espuma: 0,90 g (99%) de rendimiento; TLC (metanol al 50% en acetato de etilo), R<sub>f</sub> = 0,38; RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,93 y 8,77 (2H, 2 x s, formamidin C-Hs), 7,94 (1H, m, furanilo), 7,76 (1H, m, furanilo), 6,62 (1H, m, furanilo), 6,60 (1H, t, J = 6,6 Hz, 1'-H), 5,25 (1H, d, J = 4,4 Hz, 3'-OH), 4,84 (1H, t, J = 5,9 Hz, 5'-OH), 4,47 (1H, m, 3'-H), 3,83 (1H, m, 4'-H), 3,56 y 3,41 (2H, 2 x m, 5'-Hs), 3,25, 3,18, 3,16 y 3,03 (12H, 4 x s, N-metilos), 2,82 y 2,22 (2H, 2 x m, 2'-Hs).

*3-[(5-{6-[(1E)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]-4-[(1Z)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]-3-(2-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidinil}-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]oxolan-3-iloxi)-[bis(metiletil)amino]fosfinooxi]propanitrilo (39)*

Se añadió cloruro de dimetoxitritilo (0,85 g) a una disolución de (**38**) (0,90 g, 2,04 mmol) en 12 ml de piridina seca. La disolución de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y después se vertió en 200 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. El producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 300 ml) y los extractos orgánicos reunidos se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron. El residuo se purificó utilizando una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de metanol al 20-30% en acetato de etilo. Las fracciones del producto puro se evaporaron para producir una espuma: 286 mg de rendimiento del derivado de 5'-O-DMT.

A una disolución del derivado de DMT (286 mg, 0,384 mmol) disuelto en 5 ml de cloruro de metileno seco, que contenía 0,23 ml de N,N-diisopropiletilamina, se le añadieron 0,17 ml de diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo. La disolución se agitó bajo una atmósfera de argón durante 15 min a temperatura ambiente, y después se trató con 0,5 ml de metanol. La disolución resultante se diluyó con 100 ml de acetato de etilo y se lavó con 75 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. La disolución orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de metanol al 0-30% en acetato de etilo (trietilamina al 2%). Las fracciones de producto puro se evaporaron para producir una espuma: 230 mg (12%) de rendimiento; RMN de  $^{31}\text{P}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  147,77 y 147,08.

### 15 Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra la preparación de 4-metilbenzoato de 4-[1-(5-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-4-[[bis(metiletil)amino]-(2-cianoetoxi)fosfinooxi]oxolan-2-il)-2,4-dioxo-1,3-dihidropirimidin-5-il]but-3-inilo (**42**, véase el esquema de reacción 10)

#### *Síntesis de p-toluato de 3-butin-1-ilo (40)*

20 En un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con un barra de agitación magnética y bajo una atmósfera inerte se disolvió 3-butin-1-ol (50,3 g, 0,718 mol) con piridina anhidra (200 ml) y la disolución se enfrió en un baño de agua helada. A la suspensión fría se le añadió, utilizando un embudo de adición, cloruro de *p*-toluilo (136,3 g, 0,86 mol, 1,2 eq.) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche.

25 A la mezcla se le añadió éter dietílico (350 ml) y agua (100 ml). La capa orgánica se separó, y la disolución acuosa se lavó con éter dietílico (150 ml). Las fracciones orgánicas se reunieron y se lavaron con HCl al 10% (3 x 100 ml), una disolución de NaHCO<sub>3</sub> saturado (2 x 100 ml) y agua (1 x 50 ml). La disolución resultante se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó para producir 142 g (rendimiento cuantitativo) de (**40**) como un sólido blancuzco. El producto puede recristalizar en hexano o metanol, pero era lo suficientemente puro para llevarlo a la siguiente etapa. RMN de  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 7,95 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,24 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 4,41 (t, 2H, J = 6,8 Hz), 2,67 (dd, 2H, J<sub>1</sub> = 2,6, J<sub>2</sub> = 6,8 Hz), 2,40 (s, 3H), 2,03 (t, 1H, J = 2,4 Hz).

#### *5'-DMT-5-[4-(p-toluiloxi)butinil]-2'-desoxiuridina (41)*

35 Una mezcla de 5-yodo-2'-desoxiuridina (4,0 g, 11,30 mmol), 4-(*p*-toluiloxi)butino (**40**) (5,7 g, 30,3 mmol), CuI (222 mg, 1,16 mmol), tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,67 g, 0,583 mmol) y trietilamina (2,0 ml) se agitó en 30 ml de DMF anhidra bajo una atmósfera de argón durante 16 h. La mezcla se evaporó hasta la sequedad y el aceite residual solidificó tras agitar en 100 ml de éter. Este sólido se filtró y se secó al vacío.

40 Una porción del producto bruto (1,5 g) se disolvió en 20 ml de piridina anhidra y se trató con cloruro de dimetoxitritilo (1,3 g). La disolución se agitó durante 2,0 h bajo una atmósfera de argón y después se vertió en 150 ml de una disolución de bicarbonato de sodio al 5%. El producto se extrajo con 200 ml de acetato de etilo. El extracto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante una cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de hexano al 30-0% en acetato de etilo. Las fracciones del producto se evaporaron para producir una espuma: 957 mg de rendimiento; TLC (hexano al 30% en acetato de etilo), R<sub>f</sub> = 0,37; RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11,66 (1H, s, N-H), 7,9-6,8 (18H, protones aromáticos), 6,11 (1H, t, J = 6,6 Hz, 1'-H), 5,35 (1H, s a, 3'-OH), 4,29 (1H, m, 3'-H), 4,15 (2H, t, J = 6,8 Hz, butinmetileno), 3,92 (1H, m, 4'-H), 3,71 (6H, s, grupos metoxi), 3,24 y 3,07 (2H, 2 x m, 5'-Hs), 2,64 (2H, t, J = 6,8 Hz, butinmetileno), 2,37 (3H, s, toluilmetilo), 2,23 (2H, m, 2'-Hs).

#### *4-metilbenzoato de 4-[1-(5-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-4-[[bis(metiletil)amino]-(2-cianoetoxi)fosfinooxi]oxolan-2-il)-2,4-dioxo-1,3-dihidropirimidin-5-il]but-3-inilo (42)*

50 A una disolución del derivado de DMT anterior (0,92 g, 1,28 mmol) en 15 ml de cloruro de metileno anhidro, que contenía 0,75 ml de N,N-diisopropiletilamina, se le añadió diisopropilclorofosforamidita de 2-cianoetilo (0,56 ml). La disolución se agitó durante 30 min a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, y después se trató con 1,0 ml de metanol. La disolución se evaporó hasta un volumen de aproximadamente 5 ml y se cargó directamente en una columna de gel de sílice y se eluyó con hexano al 40% en acetato de etilo (trietilamina al 2%). Las fracciones puras se reunieron y se evaporaron para producir una espuma: 0,91 mg de (**42**) (78% de rendimiento); RMN de  $^{31}\text{P}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  147,72 y 147,39.

55

**Ejemplo 9**

Este ejemplo ilustra la mayor capacidad de los oligonucleótidos modificados para discriminar entre secuencias diana relacionadas.

5 En este ejemplos, se prepararon oligonucleótidos modificados que contenían PPPA, PPG y un ligante del surco menor. Tal como ilustra la figura 3, el uso de un MGB junto con PPPA y PPG aumenta la  $T_m$  y permite el diseño de sondas más cortas compatibles con las temperaturas de extensión de la PCR. Estos oligonucleótidos modificados también producen una mayor discriminación de desapareamientos. En un primer diseño de una sonda 18-mera de fluoresceína-ODN-extintor Red 13-MGB para PCR a tiempo real, se observó una mala discriminación de un desapareamiento de A/T, tal como se muestra en la figura 3A. El rediseño de la sonda contra la hebra opuesta, poniendo el desapareamiento bajo el MGB y sustituyendo PPPA por A y PPG por G como se indica, permite un acortamiento de la sonda hasta un 15-mero. Esta sonda ahora consigue una buena discriminación de desapareamientos, tal como se muestra en la figura 3B.

15 Se realizó una investigación termodinámica de la discriminación de desapareamientos con un conjunto de oligonucleótidos hibridados con un conjunto de dianas perfectamente apareadas o que contenían un solo desapareamiento. Las secuencias diana contienen a) A normales, b) PPPA, c) A normales y un 3'-MGB, y d) PPPA y un 3'-MGB, respectivamente. Las secuencias para las sondas y las dianas se muestran a continuación en la tabla 3a y 3b. La determinación de las  $T_m$  y el cálculo de

**Tabla 3a y 3b.**

**Secuencias de las sondas y de las dianas**

<b>A. Secuencias de las sondas - Desapareamiento subrayado</b>			
<b>Número</b>	<b>Desapareamiento</b>	<b>Secuencia de la sonda</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
1	Complemento	AAAGTTATGTCTACTTACAGAAA	17
2	A/C	AAAG <u>C</u> TATGTCTACTTACAGAAA	18
3	A/C	AAAGT <u>C</u> ATGTCTACTTACAGAAA	19
4	T/G	AAAGTT <u>G</u> TGTCTACTTACAGAAA	20
5	A/C	AAAGTTAC <u>G</u> TCTACTTACAGAAA	21
6	C/A	AAAGTTATAT <u>T</u> CTACTTACAGAAA	22
7	A/C	AAAGTTATG <u>C</u> CTACTTACAGAAA	23
8	T/G	AAAGTTATGT <u>I</u> TACTTACAGAAA	24
9	A/C	AAAGTTATGTCC <u>A</u> CTTACAGAAA	25
10	T/G	AAAGTTATGTCTG <u>C</u> TTACAGAAA	26
11	G/T	AAAGTTATGTCTA <u>I</u> TTACAGAAA	27
12	A/C	AAAGTTATGTCTAC <u>C</u> TACAGAAA	28
13	A/C	AAAGTTATGTCTACT <u>C</u> ACAGAAA	29
14	T/G	AAAGTTATGTCTACTT <u>G</u> CAGAAA	30
<b>B. Secuencias diana - A' = PPPA</b>			
1	GTAAGTAGACATAAC		31
2	GTA'A'GTA'GA'CA'TA'A'C		32
3	GTAAGTAGACATAAC-MGB		33
4	GTA'A'GTA'GA'CA'TA'A'C-MGB		34

**Tabla 3c. Comparación termodinámica de la discriminación de desapareamientos en términos de incremento en la energía libre a 50 °C, en el que  $\Delta\Delta G_{50}^{\circ} = R^{\circ}\ln(K_{\text{apaream}}/K_{\text{desaparam}})$**

Número	Desapareamiento	A	PPPA	MGB	MGB+PPPA
2	A/C	2340	2930	2870	5320
3	A/C	2560	3280	4100	6320
4	T/G	1950	1810	4200	5900
5	A/C	3520	3760	3830	4980
6	C/A	5030	5340	4190	5970
7	A/C	3000	3370	4310	5260
8	T/G	3040	3260	3070	4820
9	A/C	3290	3440	3810	5630
10	T/G	1800	1950	2090	3350
11	G/T	3340	3120	3630	5070
12	A/C	2940	3620	2550	4490
13	A/C	2360	3210	1820	3980
14	T/G	1600	2010	2000	2480

5  $\Delta\Delta G_{50}^{\circ}$  se describe en el ejemplo 9. La tabla 3c demuestra claramente una mayor discriminación de desapareamientos cuando PPPA se sustituye por A, y una discriminación de desapareamientos aún mayor cuando PPPA se combina con MGB.

10 La comparación de la discriminación termodinámica de las pares de bases desapareadas formadas en MGB-ODN que contienen HO-PPPA/HO-PU con PPPA/PU a 37 °C se muestra en la tabla 4. Los ODN que contienen las bases modificadas en combinación con MGB se hibridaron con sus complementos. Los desapareamientos están subrayados en las secuencias que aparecen en la tabla 4. Tal como se muestra en esta tabla, la sustitución de HO-PPPA y HO-PU, comparado con PPPA y PU, demostró en general aumentar la discriminación de desapareamientos.

**Tabla 4. Comparación de la discriminación termodinámica de pares de bases desapareadas formadas con HOPPPA o HOPU frente a PPPA y PU en los dúplex 8-meros (+MGB)**

	Secuencia del dúplex (y SEQ ID NO:)	PPPA/PU	HOPPPA/HOPU		Secuencia del dúplex (y SEQ ID NO:)	PPPA/PU	HOPPPA/HOPU
		$\Delta\Delta G$ cal/mol	$\Delta\Delta G$ cal/mol			$\Delta\Delta G$ cal/mol	$\Delta\Delta G$ cal/mol
Apar.	CGUCACUG -MGB AGCTGTGACT (35)			Apar.	UAUUUUUG-MGB AATAATAACC (45)		
1	CG <u>U</u> CACUG -MGB AGC <u>I</u> GTGACT (36)	4250	4350	10	UA <u>U</u> UUUUUG-MGB AAT <u>I</u> AATAACC (46)	4400	5000

15

ES 2 391 213 T3

(Cont.)

2	CGU <u>C</u> ACUG -MGB AGC <u>G</u> GTGACT (37)	3450	3540	11	UAUU <u>A</u> UUG-MGB AAT <u>G</u> ATAACC (47)	3740	3760
3	CGU <u>C</u> ACUG -MGB AGC <u>C</u> GTGACT (38)	4860	4530	12	UAUU <u>A</u> UUG-MGB AAT <u>C</u> ATAACC (48)	6630	6840
4	CGU <u>C</u> ACUG -MGB AGCAG <u>A</u> GACT (39)	4870	4850	13	UAW <u>A</u> WG-MGB AATA <u>A</u> AACC (49)	5090	5730
5	CGU <u>C</u> ACUG -MGB AGCAG <u>G</u> GACT (40)	4190	4360	14	UAUU <u>A</u> UUG-MGB AATA <u>A</u> GACC (50)	5920	6520
6	CGU <u>C</u> ACUG -MGB AGCAG <u>C</u> GACT (41)	3930	3940	15	UAUU <u>A</u> UUG-MGB AATA <u>A</u> CAACC (51)	4120	4530
7	CGU <u>C</u> ACUG -MGB AGCA <u>A</u> TGACT (42)	2600	2300				
8	CGU <u>C</u> ACUG -MGB AGCA <u>I</u> TGACT (43)	4360	4210				
9	CGU <u>C</u> ACUG -MGB AGCA <u>T</u> GACT (44)	4420	4610				
ΔΔG se calculó a 37 °C							

**Ejemplo 10**

5 Este ejemplo ilustra los estudios de fundido de UV realizados utilizando los oligonucleótidos de la presente invención.

Los híbridos formados entre ODN no modificados o MGB-sondas y sus complementos se fundieron a una velocidad de 0,5 °C/min, sobre un espectrofotómetro Lambda 2S (Perkin-Elmer) con un programador de temperatura de múltiples células automático PTP-6. Los datos de T<sub>m</sub> se prepararon utilizando 0,5 x tampón SSPE (Sigma, pH 7,4).

Cada ODN (1  $\mu\text{M}$  de cada hebra) se mezcló con el complemento para producir una proporción de 1:1. Antes del fundido, las muestras se desnaturalizaron a 100 °C y después se enfriaron hasta 10 °C a lo largo de un periodo de 10 min. Se calculó la discriminación de desapareamiento para cada tipo de dúplex en términos de  $\Delta\Delta G$  a 50 °C utilizando la ecuación:

$$5 \quad \Delta\Delta G_{50}^{\circ} = R \ln(K_{\text{apaream}}/K_{\text{desapaream}}).$$

El término  $K_{\text{apaream}}/K_{\text{desapaream}}$  puede determinarse utilizando las fracciones relativas de los dúplex y hebras sencillas calculadas a partir de las curvas de fusión a 50° C (véase, Lohkov, S.G. y Pysnyi, FEBS Letters, 420:134-138 (1997)).

**Ejemplo 11**

10 Este ejemplo ilustra la hibridación del ADN a micromatrices de vidrio de oligonucleótidos preparadas como se describe en la solicitud n° de serie 09/364.320, en tramitación junto con la presente, y además optimizados para sondas de MGB 8-10-meras.

15 El ADN (oligonucleótido o amplicón de PCR) a  $1-5 \times 10^{-7}$  M en 5 x SSPE, Triton X-100 al 0,1%, formamida al 10% se hibridó con la micromatriz en cámaras de marco sellado (MJ Research) bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 55 °C, enfriamiento lento a 0,1 °C/seg hasta 35 °C, 60 minutos a 55 °C. Los portaobjetos entonces se lavaron con 0,5 x SSPE durante 5 minutos a 45 °C. Los portaobjetos se secaron bajo una corriente de aire y se barrieron utilizando un escáner fluorescente Array Works (Applied Precision). El procedimiento de lavado puede repetirse bajo condiciones más rigurosas si es necesario.

**Ejemplo 12**

20 Este ejemplo ilustra un ensayo de extensión de cebadores de una sola base.

25 Se reunieron ADN molde monocatenario y un cebador 6-mero (20  $\mu\text{M}$  de cada uno), 1 x tampón Thermpol (New England Biolabs), cloruro de manganeso 10 mM (USB), y se incubaron durante 5 minutos a 50 °C. Entonces se añadieron  $\alpha^{32}\text{P}$  ddATP 5  $\mu\text{Ci}$  y 8 unidades de polimerasa de Bst (NEB), obteniéndose un volumen total de 10  $\mu\text{l}$ , y se incubó durante 1 minuto a 50 °C. Después de la incubación se añadieron 6  $\mu\text{l}$  de disolución de detención (formamida al 65%, EDTA 20 mM) y las reacciones se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron 1:10 en tinte desnaturalizante (formamida al 35%, xilencianol al 0,05%, azul de bromofenol al 0,05%, EDTA 1 mM) y se analizaron partes alícuotas mediante una electroforesis sobre un gel de poliacrilamida al 10% desnaturalizante.

30 El uso de bases modificadas en los ensayos de extensión de cebadores para la tipificación de SNP se ilustra en la tabla 5. La extensión de cebadores con la polimerasa de Bst (NEB) se evaluó con un cebador sustituido con diferentes bases modificadas y se midió la cantidad de producto basándose en la radiactividad incorporada utilizando una electroforesis en gel.

Tabla 5.

Comparación de la incorporación de $^{32}\text{P}$ en el producto de la extensión de cebadores mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando el molde AAC CAC TCT GTC CTA (SEQ ID NO:52)	
Cebador	Señal relativa
TGAGAC	++
$\text{U}^{\text{prop}}$ GAGAC	+
$\text{U}^{\text{prop}}\text{G}^{\text{prop}}$ AGAC	+++
$\text{U}^{\text{prop}}\text{G}^{\text{prop}}\text{A}^{\text{prop}}$ GAC	+++++
$\text{U}^{\text{prop}}\text{G}^{\text{prop}}\text{A}^{\text{prop}}\text{G}^{\text{prop}}$ AC	+++++
$\text{U}^{\text{prop}}\text{G}^{\text{prop}}\text{A}^{\text{prop}}\text{G}^{\text{prop}}$ C	+
$\text{U}^{\text{prop}}\text{G}^{\text{prop}}\text{A}^{\text{prop}}\text{G}^{\text{prop}}\text{A}^{\text{prop}}$ C	0,5+

**Ejemplo 13**

35 Este ejemplo ilustra el uso del algoritmo descrito en la memoria descriptiva para predecir la  $T_m$  de los oligonucleótidos modificados que contienen PGB con y sin un ligante del surco menor (CDPI<sub>3</sub>).

Utilizando los parámetros termodinámicos en la tablas 2a/2b y la fórmula de corrección para la contribución de los MGB, puede calcularse la  $T_m$  de oligonucleótidos PPG con y sin un MGB con procedimientos algorítmicos como se describió anteriormente. Los parámetros termodinámicos de los pares vecinos más próximos que no contienen G no cambian cuando los oligonucleótidos están sustituidos con PPG. De forma similar, los parámetros termodinámicos de los pares vecinos más próximos no cambian cuando los oligonucleótidos que contienen MGB están sustituidos con PPG. La tabla 6 ilustra la capacidad del algoritmo para predecir la  $T_m$  de oligonucleótidos que contienen PPG solos o en combinación con un ligante del surco menor (CDPI<sub>3</sub>). En la tabla 6, todos los G están sustituidos por PPG.

**Tabla 6.** Comparación de  $T_m$  experimentales con las  $T_m$  predichas utilizando los parámetros termodinámicos de los vecinos más cercanos para oligonucleótidos que contienen PPG y oligonucleótidos que contienen PPG unidos a un MGB

5'-secuencia de la sonda-3'	Estabilidad del dúplex ODN °C			Estabilidad del dúplex ODN-MGB °C			SEQ ID NO:
	$T_{m_{exp}}$	$T_{m_{calc}}$	Err	$T_{m_{exp}}$	$T_{m_{calc}}$	Err	
CTGTAAGTAGATATAAC	<b>51,84</b>	53,23	1,39	<b>65,88</b>	66,69	0,81	53
GGCAAGATATATAG	<b>50,21</b>	49,81	-0,40	<b>66,37</b>	65,56	-0,81	54
GTGACGCAGATTCC	<b>61,27</b>	61,06	-0,21	<b>76,97</b>	75,19	-1,78	55
GTAAGTAGACATAAC	<b>52,12</b>	51,78	-0,34	<b>64,64</b>	63,31	-1,33	56
CAGGGAGCTTTGGA	<b>59,9</b>	60,22	0,32	<b>74,39</b>	71,47	-2,92	57
CACTCGTGAAGCTG	<b>60,85</b>	59,49	-1,36	<b>74,04</b>	72,26	-1,78	58
GTAAGTAGGCATAAC	<b>55,74</b>	55,47	-0,27	<b>66,91</b>	66,00	-0,91	59
CCGGATGTAGGATC	<b>57,52</b>	59,05	1,53	<b>69,3</b>	70,03	0,73	60
GATTACCTGGATTT	<b>50,64</b>	50,32	-0,32	<b>62,29</b>	62,33	0,04	61
CCGTCAATGGTCAC	<b>58,66</b>	60,01	1,35	<b>70,13</b>	69,91	-0,22	62
CAGCACGTAGCC	<b>57,31</b>	58,07	0,76	<b>69,29</b>	67,60	-1,69	63
CGGCTACGTGCTGG	<b>65,19</b>	66,01	0,82	<b>76,12</b>	74,79	-1,33	64
CGGCTACATGCTGG	<b>61,14</b>	61,95	0,81	<b>71,56</b>	72,99	1,43	65
CTAAATCTGCCG	<b>50,4</b>	48,09	-2,31	<b>62,08</b>	60,19	-1,89	66
TCTGGATGATGGGCA	<b>61,74</b>	61,95	0,21	<b>71,65</b>	72,13	0,48	67
GTTCATGGGTGTAAT	<b>57,51</b>	57,77	0,26	<b>66,94</b>	68,79	1,85	68
CGGAGGTAGGATCA	<b>59,24</b>	59,46	0,22	<b>69,46</b>	70,93	1,47	69
CCACCCGCCTCAG	<b>60,73</b>	61,14	0,41	<b>71,43</b>	70,74	-0,69	70
CACAGGAGTGTTGG	<b>63,07</b>	64,40	1,33	<b>72,28</b>	72,92	0,64	71
CGGACCAGTGCCTG	<b>68,1</b>	67,58	-0,52	<b>77,92</b>	76,80	-1,12	72
TCGGACCAGTGCGT	<b>65,04</b>	66,00	0,96	<b>74,94</b>	75,62	0,68	73
AACGGGGTACGATA	<b>57,93</b>	57,11	-0,82	<b>67,79</b>	67,08	-0,71	74
CAGTTGAGATTCTAAGAC	<b>60,06</b>	60,15	0,09	<b>67,15</b>	67,43	0,28	75
AGGGGCGTCTTG	<b>60,78</b>	58,57	-2,21	<b>71,62</b>	72,76	1,14	76
GTAAGTAGGCATAGC	<b>58,34</b>	58,95	0,61	<b>65,95</b>	66,99	1,04	77
TGCCCAGCCCCAG	<b>63,13</b>	63,40	0,27	<b>71,28</b>	71,32	0,04	78

CCAACACTCGTGAA	<b>54,87</b>	56,14	1,27	<b>62,07</b>	63,54	1,47	79
GTAAGTAGACACAGC	<b>59,48</b>	58,41	-1,07	<b>65,79</b>	66,27	0,48	80
TCGGACCAGTGC	<b>58,02</b>	58,55	0,53	<b>65,99</b>	66,35	0,36	81
CGATCACGCTGGC	<b>62,12</b>	62,75	0,63	<b>69,18</b>	71,81	2,63	82
GTCCTGGGGGTGG	<b>65,19</b>	64,54	-0,65	<b>72,78</b>	72,53	-0,25	83
GTAAGTAGGTGTGAC	<b>60,7</b>	59,70	-1,00	<b>66,92</b>	67,00	0,08	84
GGTTGTACGGGTTACG	<b>68,38</b>	68,81	0,43	<b>74,16</b>	75,38	1,22	85
GGACCAGTGCCTGA	<b>66,84</b>	65,46	-1,38	<b>73,38</b>	71,53	-1,85	86
GTAAGTAGACGCAGC	<b>62,91</b>	62,44	-0,47	<b>68</b>	67,82	-0,18	87
GTAAGTAGGCGCAGC	<b>65,52</b>	65,91	0,39	<b>69,8</b>	70,34	0,54	88
GTAAGTAGGCGCGGC	<b>68,71</b>	68,96	0,25	<b>72,26</b>	72,76	0,50	89
GGTTCCCGAGCG	<b>62,15</b>	61,14	-1,01	<b>65,75</b>	64,22	-1,53	90

5 La precisión del algoritmo de predicción es de aproximadamente +/- 1 y +/- 2 para oligonucleótidos que contienen PPG y oligonucleótidos-MGB que contienen PPG, respectivamente. Por consiguiente, puede obtenerse una secuencia de interés a partir de una fuente, tal como Genbank, y entonces puede ajustarse una ventana de  $T_m$  como requisito para un conjunto de sondas o cebadores. Utilizando el anterior algoritmo y la información acerca de los parámetros de los vecinos más cercanos puede calcularse una colección de secuencias de sondas o cebadores con las  $T_m$  deseadas.

10 Como alternativa, el algoritmo puede emplearse para seleccionar los parámetros del vecino más cercano a partir de una selección de bases modificadas, y para calcular la estabilidad de más de una secuencia de la misma longitud para obtener la misma estabilidad termodinámica predeterminada, utilizando las bases modificadas seleccionadas.

15 Además, el algoritmo puede utilizarse para seleccionar una o más bases modificadas que permitan el diseño de oligonucleótidos de la misma longitud de pares de bases y sustancialmente la misma estabilidad ( $T_m$ ). Estas bases modificadas pueden seleccionarse a partir de una base de datos que contenga los parámetros termodinámicos predeterminados de los vecinos más cercanos a partir de una colección de purinas modificadas y/o pirimidinas modificadas. Preferiblemente, la base de datos contiene los parámetros de los vecinos más cercanos de pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituidas y/o pirimidinas 5-sustituidas.

#### Ejemplo 14

Este ejemplo ilustra el uso de oligonucleotidos modificados en un ensayo Invader™.

20 El ensayo basado en cleavasa mostrado en la figura 4 detecta secuencias de ADN y ARN específicas para romper un complejo formado por la hibridación de dos oligonucleótidos solapantes a una diana. La enzima rompe la "aleta" que sobresale, que actúa como sonda invasora en la sonda de módulo de detección, en que la ruptura libera una señal de fluorescencia. La primera ruptura se produce sólo cuando el desapareamiento de una sola base en el invasor es un apareamiento perfecto. No se produce reacción con una diana desapareada B. La "aleta" escindida actúa como invasor en el módulo de detección, conduciendo a la liberación de fluorescencia en la segunda etapa de ruptura.

**Tabla 7a y 7b:** Comparación del sistema de amplificación basado en cleavasa con diferentes bases modificadas sustituidas en las sondas genómicas e invasoras.

Tabla 7a

nº	Sonda <sup>1</sup>	Bases modificadas sustituidas en la secuencia de la sonda <sup>2</sup>	Longitud
1	Módulo	Ninguna	41
2	Invasora T	Ninguna	59

3	Invasora M1	Cinco bases A24	32
4	Genómica T	Ninguna	43
5	Genómica M1	Seis bases A14	35
6	Genómica M2	Cinco bases A24	31
<sup>1</sup> Las sondas no modificadas y las condiciones de ensayo son similares a las descritas en Hall et al., PNAS, 97:8272-8277 (2000). <sup>2</sup> A14 es un hidroxipropinilPPA y A24 es un 3-yododiaminoPPA.			

Tabla 7b

Sonda genómica	Proporción de señal final de apareamiento/desapareamiento	$\Delta R RFU^3$
4	5	4100
5	10	8000
6	7	11900
<sup>3</sup> $\Delta F$ es la diferencia final en la fluorescencia entre apareamientos y desapareamientos en unidades de fluorescencia relativas.		

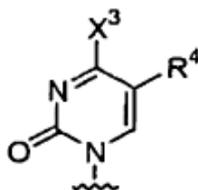
5 La tabla 7a muestra una comparación del efecto de diferentes bases modificadas cuando se sustituyen en las sondas invasora y genómica. La invasora T tradicional (2) fue sustituida con 3-yododiaminoPPPA para producir la invasora M1, que ahora tiene una longitud de 32 con una  $T_m$  a la del 59-mero (2). De manera similar, la sonda genómica tradicional (4) fue sustituida con 3-hidroxipropinilPPPA y 3-yododiaminoPPPA para producir (5) y (6), respectivamente. Ambas sondas son sustancialmente más cortas que la tradicional (4). Utilizando la invasora M1 (3)

10 en combinación con las sondas genómicas 4-6 de modo individual produce una mejor actuación (tabla 7b) de ambas sondas genómicas que contienen las bases modificadas (5 y 6), comparado con la sonda genómica tradicional (4). Tal como se muestra, las proporciones de señal finales de apareamiento/desapareamiento y la fluorescencia final muestran aumentos, comparado con la sonda genómica no modificada.

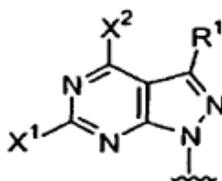
## REIVINDICACIONES

1.- Un oligonucleótido modificado que comprende al menos una base de la base de pirimidina 5-sustituida y al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida, en el cual dicha al menos una base de pirimidina 5-sustituida tiene una fórmula que consiste en:

5



en la que al menos un base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida está que consiste en



10

en la que cada uno de los grupos  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, OH,  $NH_2$  y un grupo amino protegido; y

15 cada uno de dichos grupos  $R^1$  y  $R^4$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en heteroalquilo ( $C_1-C_{12}$ ), heteroalqueno ( $C_2-C_{12}$ ), heteroalquinilo ( $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -O-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -S-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil (alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil (alqueno  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil (alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), aril (alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril (alqueno  $C_2-C_{12}$ ), aril (alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y las formas protegidas de los mismos,

20 2.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 1, que comprende además un ligante del surco menor unido de modo covalente.

3.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 1, que comprende además al menos un grupo indicador unido de modo covalente.

25 4.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 1, que comprende además al menos un extintor unido de modo covalente.

5.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 3, en el que dicho grupo indicador es un fluoróforo.

6.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 3, en el que dicho grupo indicador es un fluoróforo, y dicho oligonucleótido modificado comprende además un extintor unido.

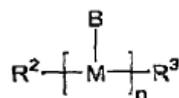
7.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 1, que comprende de 4 a 70 bases.

30 8.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 1, que comprende de 4 a 70 bases, y que comprende además un ligante del surco menor unido.

9.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 1, que comprende de 4 a 70 bases, y que comprende además un fluoróforo unido y un extintor.

35 10.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 2, que comprende de 4 a 70 bases, y que comprende además un fluoróforo unido y un extintor.

11.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:

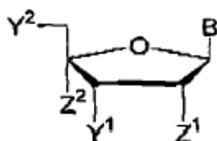


R<sup>2</sup> representa un primer extremo de dicho oligonucleótido modificado;  
 R<sup>3</sup> representa un segundo extremo de dicho oligonucleótido modificado;

5 el subíndice n es un número entero de 4 a 70;  
 cada B es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en adenina, timina, citosina, guanina, uracilo, una pirimidina -5-sustituida, y una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida; y cada M es un miembro seleccionado del grupo que consiste en un azúcar formador de oligómero y un aminoácido formador de ácidos nucleicos peptídicos.

10 12.- Un oligonucleótido modificado de la reivindicación 11, en el que al menos un M es un azúcar formador de oligómero bloqueado

13.- El uso de compuesto para preparar el oligonucleótido modificado de la reivindicación 1, teniendo el compuesto la fórmula:



15 en la que:

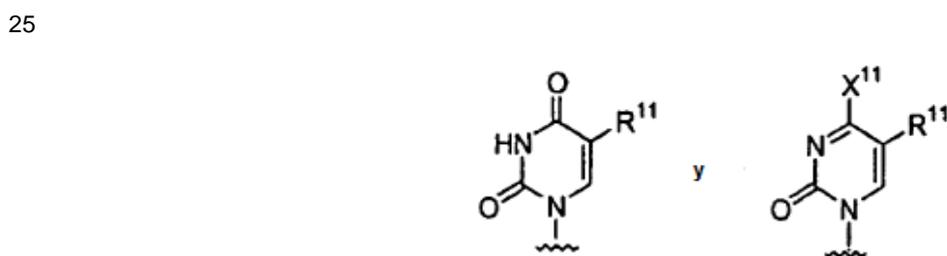
Z<sup>1</sup> es un miembro seleccionado del grupo que consiste en H, F y OR<sup>a</sup>, en el que R<sup>a</sup> es un miembro seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) y un grupo protector de hidroxilo;

20 Z<sup>2</sup> es un miembro seleccionado del grupo que consiste en H y alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), u opcionalmente Z<sup>2</sup> se combina con Z<sup>1</sup> para formar un anillo de cinco o siete miembros;

Y<sup>1</sup> es O-P<sup>1</sup>, en el que P<sup>1</sup> es una fosoramidita o un grupo H-fosfonato;

Y<sup>2</sup> es un miembro seleccionado del grupo que consiste en OH, y un grupo hidroxilo protegido; O-P<sup>1</sup> en el que P<sup>2</sup> es un fosoramidita, H-fosfonato, monofosfato, difosfato o trifosfato; y

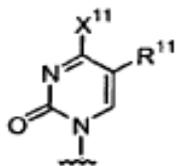
B es un nucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en:



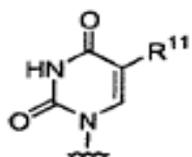
en las que

30 X<sup>11</sup> se seleccionan del grupo que consiste en H, NH<sub>2</sub> y un grupo amino protegido;  
 R<sup>11</sup> se selecciona a del grupo que consiste en las formas protegidas o desprotegidas de 3-hidroxi-prop-1-inilo, 3-aminoprop-1-inilo, 3-metoxiprop-1-inilo, 4-hidroxi-1-butinilo, 3-(hidroximetil)-4-hidroxi-1-butinilo.

14.- El uso de la reivindicación 13, en el cual B es



15.- El uso de la reivindicación 13, en el cual B es



5

16.- El uso de la reivindicación 14, en el cual X<sup>11</sup> es HN<sub>2</sub>.

17.- El uso de la reivindicación 16, en el cual Y<sup>11</sup> es O-P<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup> es un hidroxil protegido, Z<sup>1</sup> es H, R<sup>11</sup> se selecciona del grupo que consiste en 3-hidroxiprop-1-ilo, 3-aminoprop-1-ilo, 4-hidroxil-1-butinilo y 3-(hidroximetil)-4-hidroxil-1-butinilo.

10

18.- El uso de la reivindicación 17, en el que Y<sup>1</sup> es -O-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita] e Y<sup>2</sup> es -O-(4,4'-dimetoxitritilo).

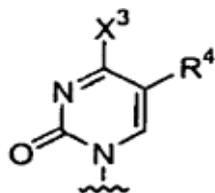
19.- El uso de la reivindicación 15, en el que Y<sup>1</sup> es O-P<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup> es un hidroxil protegido, Z<sup>1</sup> es H, R<sup>11</sup> se selecciona del grupo que consiste en 3-hidroxiprop-1-ilo, 3-aminoprop-1-ilo, 4-hidroxil-1-butinilo y 3-(hidroximetil)-4-hidroxil-1-butinilo.

15

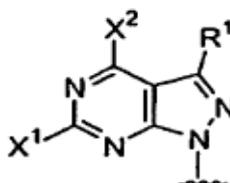
20.- Un compuesto de la reivindicación 19, en el que Y<sup>1</sup> es -O-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita] e Y<sup>2</sup> es -O-(4,4'-dimetoxitritilo).

21.- Una matriz de oligonucleótidos modificados, comprendiendo dicha matriz un soporte sólido y una pluralidad de oligonucleótidos unidos, en la que al menos el 50% de los oligonucleótidos en dicha matriz contienen una pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida y al menos una base de pirimidina 5-sustituida, en la que dicha al menos una base de pirimidina 5-sustituida tiene una fórmula que consiste en:

20



25 y dicha al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida que consiste en:



en la que

cada uno de los grupos  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, OH,  $NH_2$  y un grupo amino protegido; y

5 cada uno de dichos grupos  $R^1$  y  $R^4$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en heteroalquilo( $C_1-C_{12}$ ), heteroalqueno( $C_2-C_{12}$ ), heteroalquino( $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -O-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquino  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -S-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquino  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquino  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquino  $C_2-C_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y las formas protegidas de los mismos,

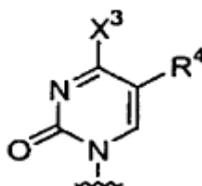
10 22.- Una matriz de oligonucleótidos modificados de la reivindicación 21, en la que dichos oligonucleótidos unidos tienen unas  $T_m$  diferente aproximadamente en 2 °C entre sí, y unas longitudes de pares de bases diferentes aproximadamente en 2 bases entre sí.

15 23.- Una matriz de oligonucleótidos modificados de la reivindicación 21, en la que dichos oligonucleótidos unidos tienen unas  $T_m$  diferentes aproximadamente en 1 °C entre sí, y unas longitudes de pares de bases diferentes aproximadamente en 2 bases entre sí.

20 24.- Una matriz de oligonucleótidos modificados de la reivindicación 21, en la que dicha matriz comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 10.000 oligonucleótidos unidos, teniendo cada uno unas  $T_m$  diferentes aproximadamente en 2 °C entre sí, y unas longitudes de pares de bases diferentes aproximadamente en 2 bases entre sí.

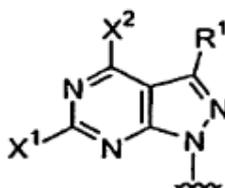
25 25.- Una matriz de oligonucleótidos modificados de la reivindicación 21, en la que dicha matriz comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 10.000 oligonucleótidos unidos, teniendo una porción de dichos oligonucleótidos unidos un ligante del surco menor unido de modo covalente.

26.- Una composición que comprende una pluralidad de oligonucleótidos modificados que tienen al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida y al menos una base de pirimidina 5-sustituida que tiene además un fluoróforo unido, en el cual al menos una base de pirimidina 5-sustituida que tiene una fórmula que consiste en



30

y dicha al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida consiste en:



en la que

35 cada uno de los grupos  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, OH,  $NH_2$  y un grupo amino protegido; y

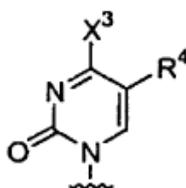
40 cada uno de dichos grupos  $R^1$  y  $R^4$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en heteroalquilo( $C_1-C_{12}$ ), heteroalqueno( $C_2-C_{12}$ ), heteroalquino( $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -O-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquino  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -S-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquino  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquino  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquino  $C_2-C_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y las formas protegidas de los mismos.

27.- Una composición de la reivindicación 23, en la que cada uno de dicha pluralidad de oligonucleótidos comprende un fluoróforo unido y un extintor unido.

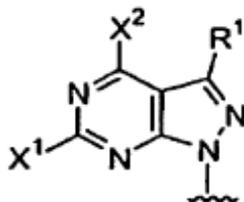
45 28.- Una composición de la reivindicación 26, en la que cada uno de dichos oligonucleótidos modificados tiene una longitud de 4 a 30 bases, y tiene unas  $T_m$  diferentes aproximadamente en 2 °C entre sí.

29.- Una composición de la reivindicación 28, en la que dicha pluralidad es de aproximadamente 6 a aproximadamente 100.

- 30.- Un procedimiento para distinguir polinucleótidos con secuencias relacionadas, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 (a) poner en contacto un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia definida que comprende al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida y al menos una pirimidina 5 sustituida, como se define en la reivindicación 1, en lugar de una base de purina, y una base de pirimidina respectivamente con al menos dos polinucleótidos, en el que uno de los polinucleótidos tiene una secuencia diana que es perfectamente complementaria con el oligonucleótido modificado y al menos uno de los otros polinucleótidos tiene una secuencia diana con al menos una base desapareada; y
- (b) determinar el grado de hibridación entre el oligonucleótido modificado y cada uno de los polinucleótidos.
- 10 31.- Un procedimiento según la reivindicación 30, en el que dicho oligonucleótido modificado comprende además un grupo indicador.
- 32.- Un procedimiento según la reivindicación 31, en el que dicho grupo indicador es un fluoróforo.
- 33.- Un procedimiento según la reivindicación 30, en el que dicho oligonucleótido modificado comprende además un ligante del surco menor.
- 15 34.- Un procedimiento según la reivindicación 30, en el que dicho oligonucleótido modificado comprende además un ligante del surco menor y un fluoróforo.
- 35.- Un procedimiento según la reivindicación 30, en el que dicho oligonucleótido modificado comprende además un ligante del surco menor, un fluoróforo y un extintor.
- 20 36.- Un procedimiento para detectar la presencia de una secuencia diana en un polinucleótido, comprendiendo el procedimiento:
- (a) incubar un polinucleótido que se va a ensayar para la presencia de la secuencia diana con un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia que es sustancialmente complementaria con la secuencia diana bajo condiciones de hibridación; e
- (b) identificar los ácidos nucleicos hibridados;
- 25 en el que dicho oligonucleótido modificado comprende al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida en lugar de un resto purina y al menos una piridina 5 sustituida en lugar de un resto pirimidina, como se define en la reivindicación 1.
- 37.- Un procedimiento según la reivindicación 36, en el que dicha incubación se realiza en presencia de una enzima cleavasa.
- 30 38.- Un procedimiento según la reivindicación 36, en el que dicho oligonucleótido modificado comprende además un grupo indicador.
- 39.- Un procedimiento según la reivindicación 38, en el que dicho grupo indicador es un fluoróforo.
- 40.- Un procedimiento según la reivindicación 39, en el que dicho oligonucleótido modificado comprende además un extintor unido.
- 35 41.- Un procedimiento según la reivindicación 36, en el que dicho oligonucleótido modificado comprende además un ligante del surco menor unido.
- 42.- Un procedimiento para la extensión de cebadores, comprendiendo el procedimiento incubar un polinucleótido que contiene una secuencia diana con uno o más cebadores oligonucleotídicos complementarios con la secuencia diana, en presencia de una enzima polimerizante y sustratos de nucleótidos bajo condiciones favorables para la polimerización, en el que al menos uno de los cebadores oligonucleotídicos contiene una base seleccionada a partir del grupo que consiste en una pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida, una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida en lugar de una base de purina y al menos una base que consiste en una base de pirimidina 5-sustituida, como se define en la reivindicación 1, en lugar de una base de pirimidina, en el que dicha al menos una base de pirimidina 5-sustituida tiene una fórmula que consiste en:



y dicha al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida que consiste en:



en la que

5 cada uno de los grupos  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, OH,  $\text{NH}_2$  y un grupo amino protegido; y

10 cada uno de dichos grupos  $R^1$  y  $R^4$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en heteroalquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ), heteroalqueno ( $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), heteroalquinilo ( $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), -O-(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ), -O-(alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), -O-(alquinilo  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), -S-(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ), -S-(alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), -S-(alquinilo  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), heterociclil (alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ), heterociclil (alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), heterociclil (alquinilo  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), aril (alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ), aril (alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), aril (alquinilo  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y las formas protegidas de los mismos.

43.- Un procedimiento según la reivindicación 42, en el que uno de dichos cebadores oligonucleotídicos se extiende con una sola base.

15 44.- Un procedimiento según la reivindicación 42, en el que al menos uno de dichos cebadores oligonucleotídicos comprende además un ligante del surco menor unido.

45.- Un procedimiento según la reivindicación 42, en el que dicha incubación es parte de una reacción de amplificación.

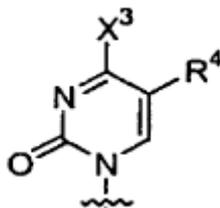
46.- Un procedimiento según la reivindicación 45, en el que dicha reacción de amplificación es una reacción en cadena de polimerasa.

20 47.- Un procedimiento según la reivindicación 42, en el que dicho oligonucleótido modificado comprende además un ligante del surco menor unido de modo covalente.

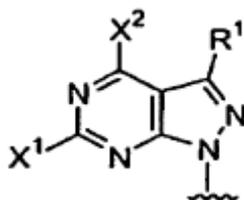
48.- Un procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, comprendiendo el procedimiento:

- 25 (a) incubar el polinucleótido con una matriz de oligonucleótidos modificados bajo condiciones de hibridación; y  
(b) determinar a cual de los oligonucleótidos modificados en la matriz hibrida el polinucleótido;

en el que una pluralidad de los oligonucleótidos modificados comprende al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida en lugar de una base de purina y al menos una base de pirimidina 5-sustituida en lugar de una base de pirimidina; en el que dicha al menos una base de pirimidina 5-sustituida tiene una fórmula que consiste en:



y dicha al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida que consiste en:



en la que

cada uno de los grupos  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, OH,  $NH_2$  y un grupo amino protegido; y

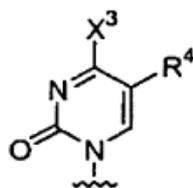
5 cada uno de dichos grupos  $R^1$  y  $R^4$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en heteroalquilo( $C_1-C_{12}$ ), heteroalqueno( $C_2-C_{12}$ ), heteroalquinilo( $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -O-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -S-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y las formas protegidas de los mismos.

10 49.- Un procedimiento según la reivindicación 48, en el que dicha matriz comprende de 10 a 100.000 oligonucleótidos modificados diferentes

50.- Un procedimiento según la reivindicación 49, en el que dicha matriz comprende de 10 a 1000 oligonucleótidos modificados diferentes.

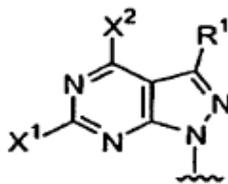
15 51.- Un procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos de una secuencia diana en un polinucleótido, comprendiendo el procedimiento:

20 (a) poner en contacto un polinucleótido que comprende la secuencia diana con al menos dos oligonucleótidos de secuencia conocida, en el que dos o más restos purina de los oligonucleótidos están reemplazados por al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida y una base de pirimidina 5-sustituida en lugar de una base de pirimidina, en la que dicha al menos una base de pirimidina 5-sustituida tiene una fórmula que consiste en:



25

y dicha al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida que consiste en:



30

en la que

cada uno de los grupos  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, OH,  $NH_2$  y un grupo amino protegido; y

35 cada uno de dichos grupos  $R^1$  y  $R^4$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en heteroalquilo( $C_1-C_{12}$ ), heteroalqueno( $C_2-C_{12}$ ), heteroalquinilo( $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -O-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -S-(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril(alqueno  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y las formas protegidas de los mismos y en el que uno de dichos al menos dos oligonucleótidos tiene una secuencia que es perfectamente complementaria con la secuencia diana y al menos otro de los oligonucleótidos tiene una secuencia diana relacionada, e incubar cada uno de los oligonucleótidos con el polinucleótido bajo condiciones de hibridación; y

40

(b) determinar el grado de hibridación entre cada uno de los oligonucleótidos y el polinucleótido.

45 52.- Un procedimiento según la reivindicación 51, en el que al menos uno de dichos oligonucleótidos modificados comprende además un grupo indicador.

53.- Un procedimiento según la reivindicación 51, en el que al menos uno de dichos oligonucleótidos modificados comprende además un ligante del surco menor.

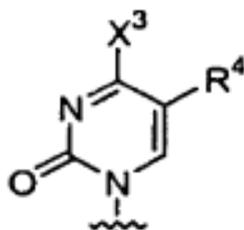
54.- Un procedimiento según la reivindicación 51, en el que al menos uno de dichos oligonucleótidos modificados comprende además un ligante del surco menor y un grupo indicador.

5 55.- Un procedimiento para estudiar la expresión génica en una célula, comprendiendo el procedimiento:

(a) incubar una población de polinucleótidos representativa de los genes expresados en la célula con una matriz de oligonucleótidos que comprende una pluralidad de oligonucleótidos modificados de diferentes secuencias bajo condiciones de hibridación; y

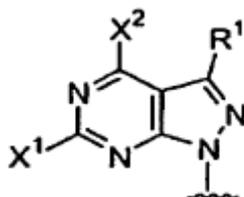
10 (b) determinar cuáles son los oligonucleótidos modificados en la matriz que se hibridan con los polinucleótidos;

en el que dichos oligonucleótidos modificados comprenden al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida en lugar de una purina y al menos una base de pirimidina 5-sustituida en lugar de una base de pirimidina, en el cual dicha al menos una base de pirimidina 5-sustituida tiene una fórmula que consiste en:



y dicha al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida que consiste en:

20



en la que

cada uno de los grupos  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, OH,  $NH_2$  y un grupo amino protegido; y

25 cada uno de dichos grupos  $R^1$  y  $R^4$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en heteroalquilo ( $C_1-C_{12}$ ), heteroalquenilo ( $C_2-C_{12}$ ), heteroalquinilo ( $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -O-(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -S-(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), aril(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y las formas protegidas de los mismos .

30

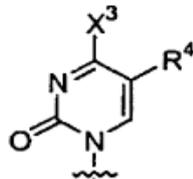
56.- Un procedimiento para identificar una mutación en una secuencia diana de un gen de interés, comprendiendo el procedimiento:

35 (a) incubar un polinucleótido que comprende la secuencia diana con una matriz de oligonucleótidos de diferentes secuencias, en el que las diferentes secuencias incluyen la secuencia diana de tipo salvaje y diferentes secuencias diana mutantes, bajo condiciones de hibridación; y

(b) determinar cuáles son los oligonucleótidos en la matriz que se hibridan con el polinucleótido;

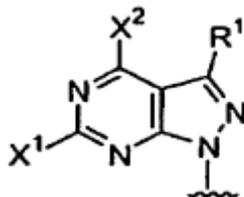
en el que dos o más restos purina en cada uno de los oligonucleótidos están reemplazados por al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina 3-sustituida y una base de pirimidina es reemplazada con una base de pirimidina 5-sustituida, en el que dicha al menos una base de pirimidina 5-sustituida tiene una fórmula que consiste en:

5



y dicha al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida que consiste en:

10



en la que

15

cada uno de los grupos  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, OH,  $NH_2$  y un grupo amino protegido; y

20

cada uno de dichos grupos  $R^1$  y  $R^4$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en heteroalquilo ( $C_1-C_{12}$ ), heteroalquenilo ( $C_2-C_{12}$ ), heteroalquinilo ( $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -O-(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), -O-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), -S-(alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), -S-(alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil (alquilo  $C_1-C_{12}$ ), heterociclil (alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), heterociclil (alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), aril (alquilo  $C_1-C_{12}$ ), aril (alquenilo  $C_2-C_{12}$ ), aril (alquinilo  $C_2-C_{12}$ ), arilo, heterociclilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y las formas protegidas de los mismos.

57.- El uso de la reivindicación 13, en el que  $Y^1$  e  $Y^2$  es un grupo fosforamidita.

25

58.- El uso de la reivindicación 57, en el que el otro de  $Y^1$  e  $Y^2$  es un grupo hidroxil protegido.

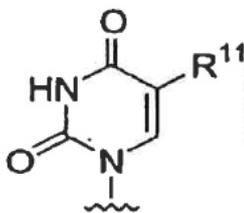
59.- El uso de la reivindicación 58, en el que el grupo hidroxil protegido es un grupo 4,4'-dimetoxitriilo.

60.- El uso de la reivindicación 57, en el que el grupo fosforamidita es -O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita

61.- el uso compuesto de la reivindicación 59, en el que el grupo fosforamidita es -O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita

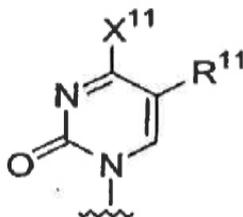
30

62.- El uso de la reivindicación 57, en el cual B es



63.- El uso de la reivindicación 62, en el cual el grupo fosforamidita es -O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita

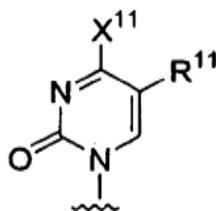
64.- El uso de la reivindicación 57, en el que B es



5

65.- El uso de la reivindicación 64, en el que el grupo fosforamidita es -O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita

66.- El uso de la reivindicación 57, en el que B es



10

y  $X^{11}$  es un grupo amino protegido

67.- El uso de la reivindicación 66, en el cual el otro de  $Y^1$  e  $Y^2$  es un grupo hidroxilo protegido.

68.- El uso de la reivindicación 67 en el cual el grupo fosforamida es -O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita.

15 69.- El uso de la reivindicación 68 en el cual el otro de  $Y^1$  e  $Y^2$  es un grupo 4,4'-dimetoxitritilo.

70.- El uso de la reivindicación 67, en el que uno o ambos de los grupos amino protegidos comprenden un grupo protector de análogo de benzoilo.

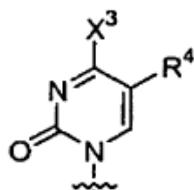
71.-El uso de la reivindicación 57 en el que  $Z^1$  es hidrógeno,  $Y^1$  es OH e  $Y^2$  es OH.

20 72.-El uso de la reivindicación 57 en el que  $Z^1$  y  $Z^2$  están combinados para formar un anillo de cinco a siete miembros.

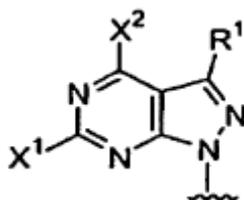
73.- Una composición que tiene una pluralidad de oligonucleótidos, comprendiendo dicha composición

un primer oligonucleótido con una primera secuencia que tiene al menos un al menos una pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida en lugar de una purina y al menos una base de pirimidina 5-sustituida en lugar de una base de pirimidina y en la que

25 la purina está reemplazada con una pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida y la pirimidina está reemplazada con pirimidina 5-sustituida en la que al menos una base de pirimidina 5-sustituida tiene una fórmula que consiste en:



y dicha al menos una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida o 3-sustituida consiste en:



5

en la que

10 cada uno de los grupos  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en H, OH,  $\text{NH}_2$  y un grupo amino protegido; y cada uno de dichos grupos  $R^1$  y  $R^4$  es un miembro seleccionado independientemente del grupo que consiste en heteroalquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ), heteroalqueno ( $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), heteroalquino ( $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), -O-(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ), -O-(alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), -O-(alquino  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), -S-(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ), -S-(alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), -S-(alquino  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), heterocicliil (alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ), heterocicliil (alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), heterocicliil (alquino  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), aril (alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ), aril (alqueno  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), aril (alquino  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ ), arilo, heterocicliilo, halógeno, -CN, -CONH<sub>2</sub> y las formas protegidas de los mismos y una primera  $T_m$ ; y un segundo oligonucleótido con una segunda secuencia y una segunda  $T_m$  en la que dicha primera  $T_m$  y dicha segunda  $T_m$  son iguales.

15

74.- Una composición de la reivindicación 73, en la cual dicha primera  $T_m$  es tá dentro de en aproximadamente 5°C de dicha segunda  $T_m$ .

20 75.- La composición de la reivindicación 73, en la cual dicho primer oligonucleótido es tá dentro de aproximadamente  $\pm 2$  bases de dicho segundo oligonucleótido.

76.- La composición de la reivindicación 73, en la cual dicha al menos una base modificada en dicha primera secuencia es un miembro seleccionado en el grupo que consiste en una base unida a un aminoácido, una base de ácido nucleico bloqueado y una base universal.

25 77.- La composición de la reivindicación 77, en la que dicha segunda secuencia tiene al menos una base modificada.

78.- La composición de la reivindicación 73, en la que dicha al menos una base modificada en dicha segunda secuencia es un miembro seleccionado en el grupo que consiste en una base unida a un aminoácido, una base de ácido nucleico bloqueado y una base universal.

30 79.- La composición de la reivindicación 77, en la que dicha al menos una base modificada en dicha segunda secuencia es un miembro seleccionado en el grupo que consiste en PPA, PPG, PPPA, PPPG, PU, PC, HOPU, HOBuU, HOBuC,  $(\text{NH}_2)_2\text{PPPA}$ ,  $(\text{NH}_2)_2\text{PPPAOH}$ ,  $(\text{NH}_2)_2\text{BuPPAOH}$ ,  $(\text{NH}_2)_2\text{PPAI}$  y HOBuPPG.

80.- La composición de la reivindicación 73, en la cual dicha primera secuencia tiene un MGB unido a la misma.

81.- La composición de la reivindicación 73, en la cual dicha segunda secuencia tiene un MGB unido a la misma.

35 82.- La composición de la reivindicación 73, en la cual al menos una base modificada en dicha primera secuencia reduce la estabilidad de dicho primer oligonucleótido.

83.- La composición de la reivindicación 73, en la cual al menos una base modificada en dicha primera secuencia aumenta la estabilidad de dicho primer oligonucleótido.

84.- La composición de la reivindicación 73, en la cual dicho primer oligonucleótido y dicho segundo oligonucleótido se distribuyen en matriz sobre una superficie.

- 85.- La composición de la reivindicación 84, en la que dicha matriz comprende un soporte sólido y una pluralidad de oligonucleótidos unidos, en la que dicha pluralidad de oligonucleótidos contiene al menos una base modificada seleccionada en el grupo que consisten en pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituidas, pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituida y pirimidinas 5-sustituidas.
- 5 86.- La composición de la reivindicación 84, en la que dicha matriz comprende un soporte sólido y una pluralidad de oligonucleótidos unidos, en la que dicha pluralidad de oligonucleótidos contiene al menos una base modificada seleccionada en el grupo que consisten en pirazolo[3,4-d]pirimidinas 3-sustituida y pirimidinas 5-sustituidas.
- 87.- La composición de la reivindicación 84, en la que dicha matriz comprende aproximadamente 10 a aproximadamente 10.000 oligonucleótidos unidos, teniendo cada uno unas  $T_m$  dentro de en aproximadamente 2 °C entre sí, y unas longitudes de pares de bases diferentes en aproximadamente 2 bases entre sí.
- 10 88.- Un procedimiento para diseñar un oligonucleótido modificado que tiene una  $T_m$  estable, comprendiendo dicho procedimiento :
- (a) proporcionar un oligonucleótido con una secuencia conocida que tiene n bases y una  $T_m$  conocida; y
- 15 (b) diseñar oligonucleótidos modificados que tienen al menos una base purina modificada y al menos una base de pirimidina, en la que la purina es reemplazada por una pirazolo[3,4-d]pirimidinas no sustituida o 3-sustituida como se define en la reivindicación 1, y la pirimidina es reemplazada por pirimidina 5-sustituida, como se define en la reivindicación 1, usando la contribución termodinámica dependiente de la secuencia de dicha al menos una base modificada, en la que dicho oligonucleótido modificado tiene menos n bases y
- 20 tiene una  $T_m$  que es igual que dicha  $T_m$ , implementada en un sistema informático.
- 89.- El procedimiento de la reivindicación 88, en el que la contribución termodinámica de dicho oligonucleótido modificado que tiene al menos una base modificada se determina usando los parámetros de los vecinos más próximos.
- 90.- El procedimiento de la reivindicación 88, en el cual dicho oligonucleótido es derivado del GenBank.
- 25 91.- El procedimiento de la reivindicación 88, en el que dicha al menos una base modificada es un miembro seleccionado en el grupo que consiste en una base unida a un aminoácido, una base de ácido nucleico bloqueado y una base universal.
- 92.- El procedimiento de la reivindicación 88, en el que dicho oligonucleótido modificado tiene un ligante del surco menor (MGB) unido al mismo.
- 30 93.- El procedimiento de la reivindicación 92, en el que el MGB está unido al oligonucleótido modificado por una molécula extintor.
- 94.- El procedimiento de la reivindicación 92, que comprende además:
- determinar:
- 35 i) la contribución termodinámica dependiente de la secuencia del MGB unido a dicho oligonucleótido, y
- ii) la contribución termodinámica dependiente de la secuencia de dicho oligonucleótido; y en el que el diseño del conjugado oligonucleótido-MGB se realiza con la ayuda de las contribuciones termodinámicas determinadas de dicho MGB y dicho oligonucleótido.
- 40 95. El procedimiento de la reivindicación 94, en el que la contribución termodinámica de dicho MGB unido a dicho oligonucleótido es determinada comparando la estabilidad de los dúplex de un primer dúplex de dicho oligonucleótido con la estabilidad de un segundo dúplex de dicho oligonucleótido con un MGB unido.
- 96.- El procedimiento de la reivindicación 94, en el que dicha  $T_m$  conocida de dicho oligonucleótido es determinada de manera empírica.
- 45 97.- El procedimiento de la reivindicación 94, en el que dicha  $T_m$  conocida de dicho oligonucleótido es determinada usando los parámetros de los vecinos más próximos.
- 98.- El procedimiento de la reivindicación 94, en el que dicha secuencia conocida que tiene n bases contribuye a dicha  $T_m$  conocida.
- 99.- El procedimiento de la reivindicación 94, en el que dicha  $T_m$  de dicho conjugado oligonucleótido-MGB es distinta en aproximadamente 5°C de dicha  $T_m$  conocida.

100. El procedimiento de la reivindicación 94, que comprende además, repetir la etapa de diseño para generar una pluralidad de conjugados oligonucleótido-MGB diferentes, teniendo cada uno una  $T_m$  que es igual a dicha  $T_m$  conocida.

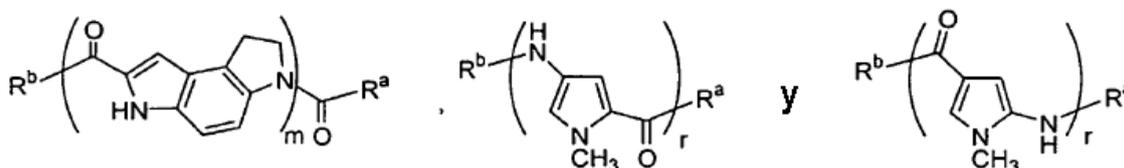
5 101.- El procedimiento de la reivindicación 100, en el que cada uno de dicha pluralidad de conjugados oligonucleótido-MGB diferentes son diferentes en aproximadamente 1-2 bases entre sí.

102.- El procedimiento de la reivindicación 100 en el que dicha pluralidad de conjugados oligonucleótido-MGB diferentes están inmovilizados en un sustrato.

103.- El procedimiento de la reivindicación 100 en el que dicha pluralidad de conjugados oligonucleótido-MGB diferentes están sintetizados en un sustrato.

10 104.- El procedimiento de la reivindicación 102 en el que dicho sustrato es un miembro seleccionado en el grupo que consiste en un vidrio, poliestireno, nailon, nitrocelulosa, vidrio, obleas de silicio, fibras ópticas y plástico.

105.- El procedimiento de la reivindicación 92, en el que dicho MGB tiene una fórmula seleccionada en el grupo que consiste en:



15 en las que  
 el subíndice m es un número entero de 2 a 5;  
 el subíndice r es un número entero de 2 a 10;  
 y cada  $R^a$  y  $R^b$  son independientemente un grupo conector con dicho oligonucleótido modificado, H,  $-OR^c$ ,  $-NR^cR^d$ ,  $-COOR^c$  o  $-CONR^cR^d$ , en los que cada  $R^c$  y  $R^d$  se seleccionan de H, heteroalquilo( $C_1-C_{12}$ ), heteroalquenoilo( $C_2-C_{12}$ ),  
 20 heteroalquinilo( $C_2-C_{12}$ ), alquilo( $C_1-C_{12}$ ), alquenoilo( $C_2-C_{12}$ ), alquinilo( $C_2-C_{12}$ ), aril(alquilo  $C_1-C_{12}$ ), y arilo.

106. El procedimiento de la reivindicación 92, en el que dicho MGB está unido al extremo 3' de dicho oligonucleótido modificado.

25 107. El procedimiento de la reivindicación 92, en el que dicho MGB está unido al extremo 5' de dicho oligonucleótido modificado.

108. El procedimiento de la reivindicación 92, en el que dicho MGB está unido a otro distinto del extremo 3' o el extremo 5' de dicho oligonucleótido modificado.

109.- El procedimiento de la reivindicación 88, en el que la dicha al menos una base modificada reduce la estabilidad de dicho oligonucleótido modificado.

30 110.- El procedimiento de la reivindicación 88, en el que la dicha al menos una base modificada aumenta la estabilidad de dicho oligonucleótido modificado.

111.- El procedimiento de la reivindicación 88, que comprende además, repetir la etapa (b) para generar una pluralidad de oligonucleótidos modificados diferentes, cada uno con una  $T_m$  que es igual a dicha  $T_m$  conocida.

35 112.- El procedimiento de la reivindicación 111, en el que dicha pluralidad de oligonucleótido modificados diferentes que tienen cada uno una  $T_m$  que es igual a dicha  $T_m$  conocida tiene al menos un oligonucleótido sin una base modificada.

113.- El procedimiento de la reivindicación 111, en el que dicha pluralidad de oligonucleótidos modificados diferentes tienen conjugados MGB unidos a los mismos.

40 114.- El procedimiento de la reivindicación 88, en el que dicha pluralidad de oligonucleótidos diferentes están inmovilizados en un sustrato.

115.- El procedimiento de la reivindicación 88, en el que el diseño de dicho oligonucleótido modificado comprende además usar la contribución termodinámica dependiente de la secuencia de las bases naturales en dicho oligonucleótido modificado.

116.- El procedimiento de la reivindicación 88, en el que dicho oligonucleótido y dicho oligonucleótido modificado tienen propiedades de hibridación similares.

117.- El procedimiento de la reivindicación 88, en el que el oligonucleótido tiene uno o más de un fluoróforo y una molécula extintor unidos al mismo.

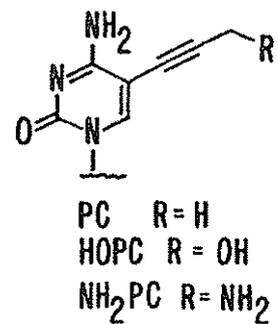
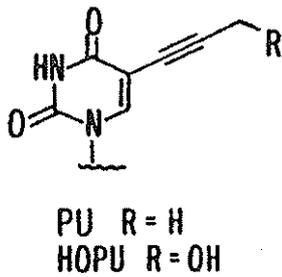
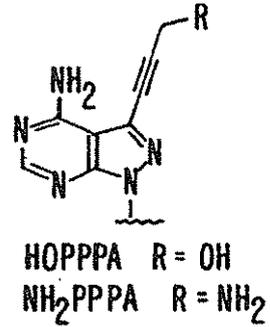
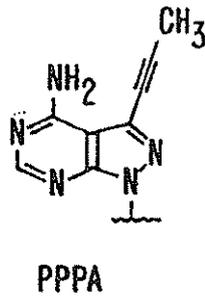
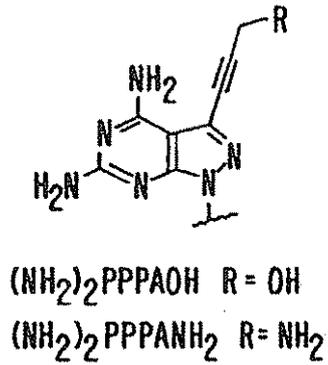
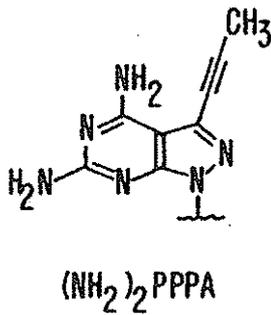
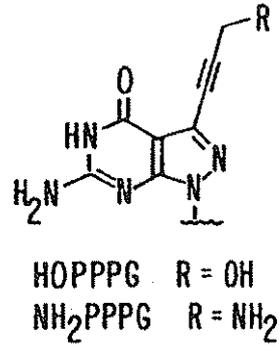
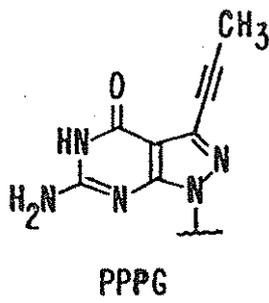


FIG. 1A.



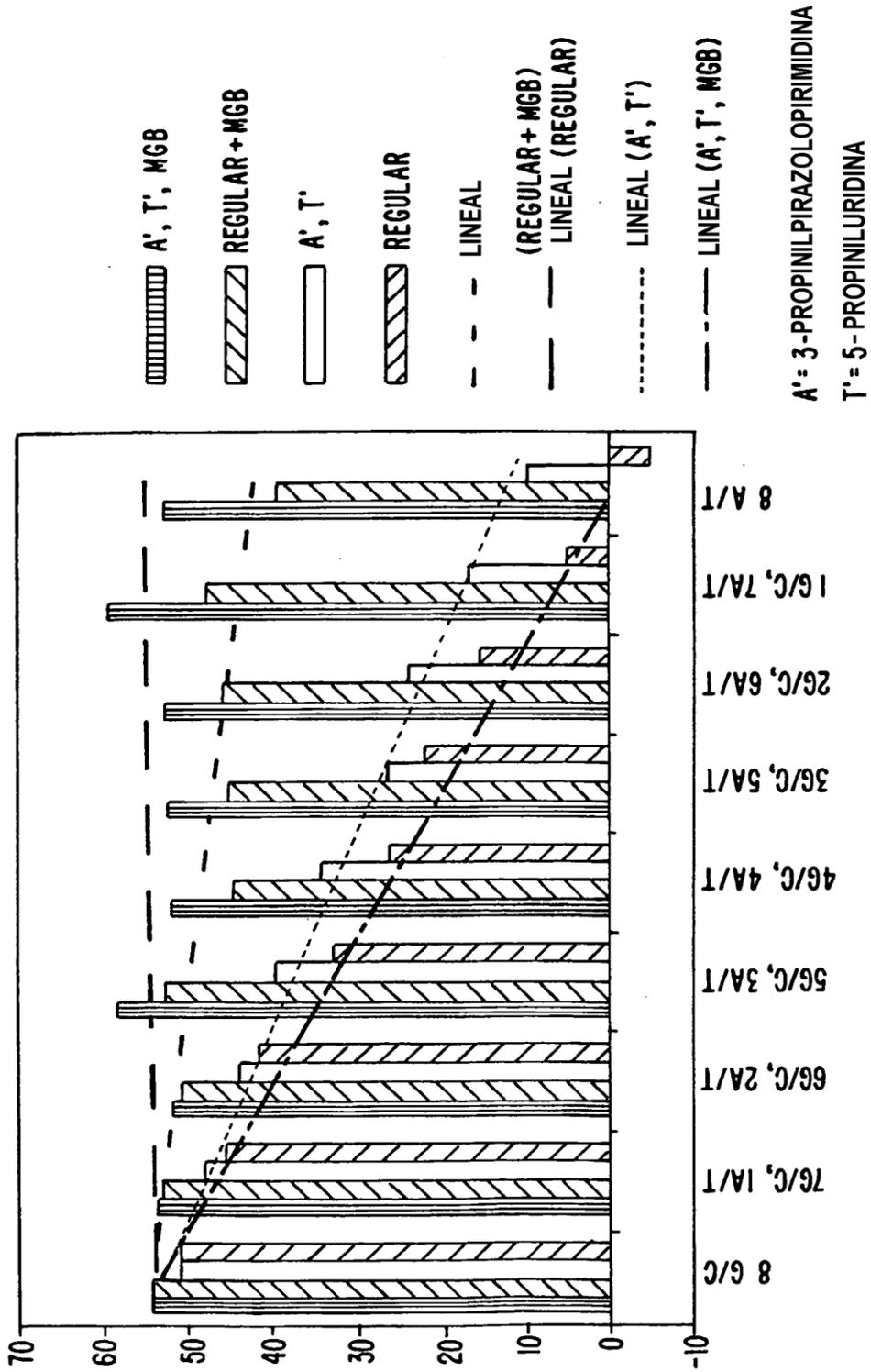


FIG. 2.

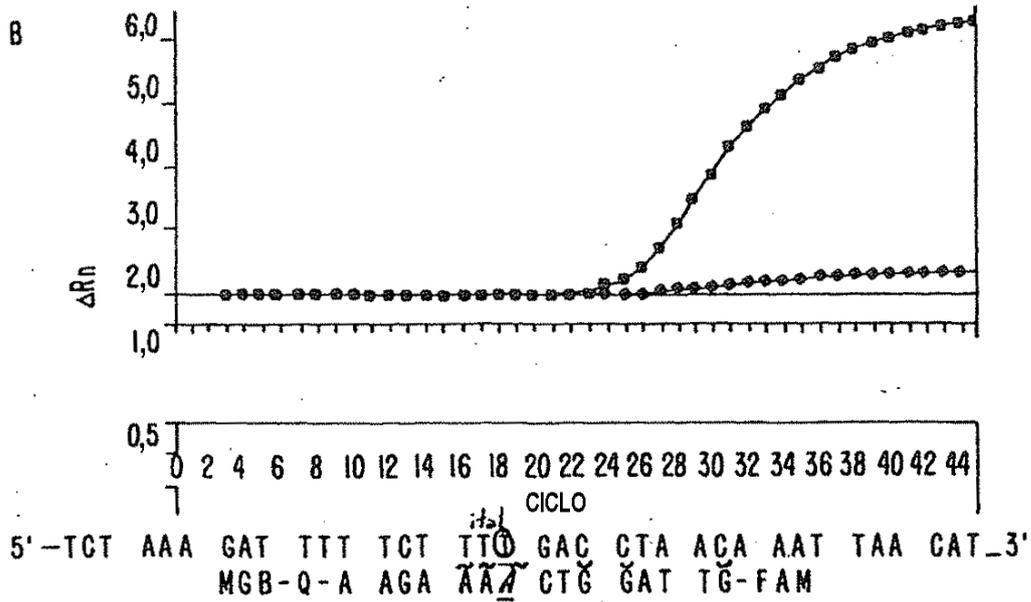
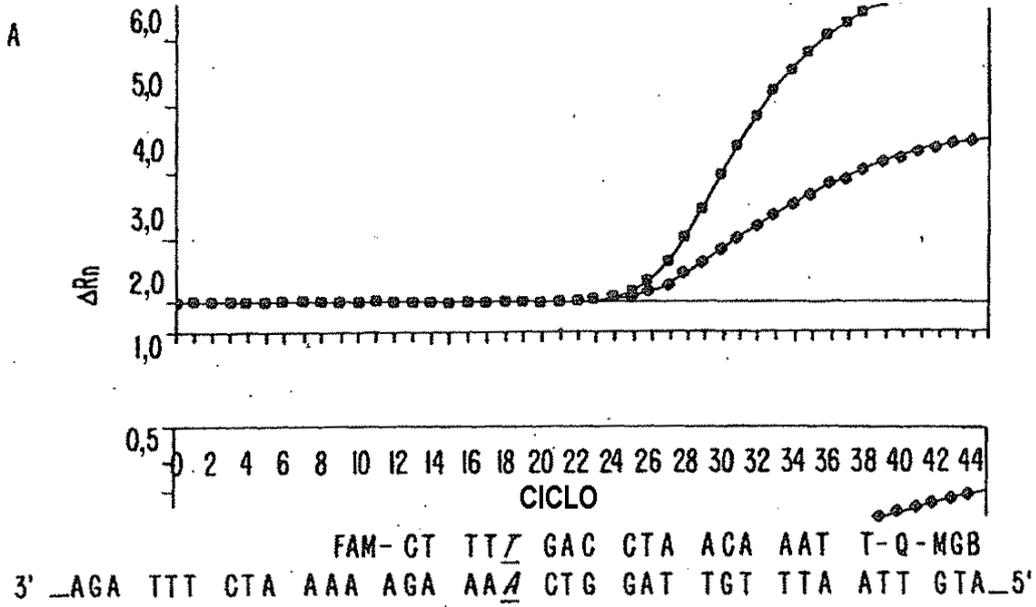
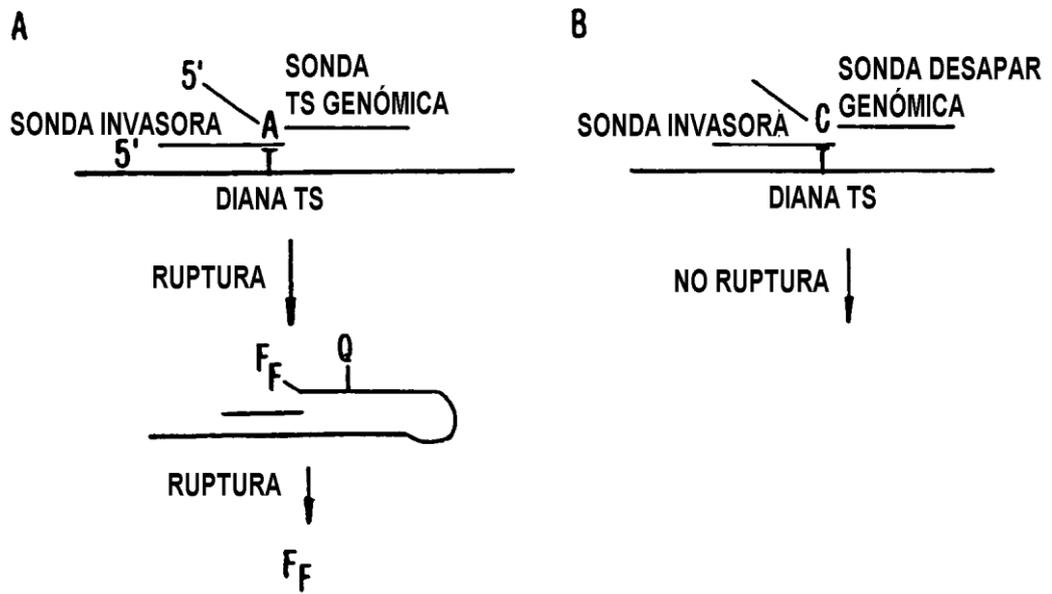
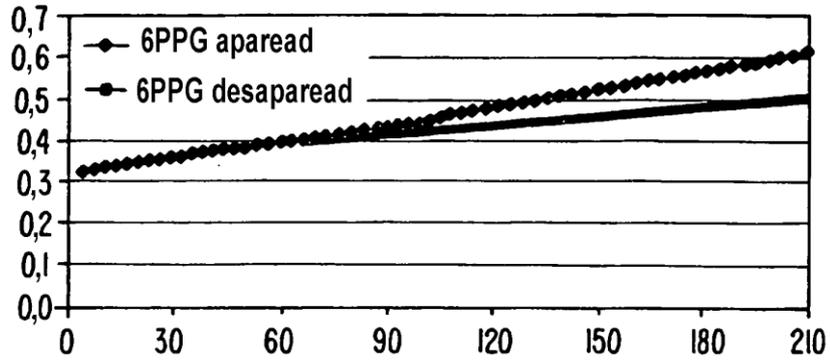


FIG. 3.

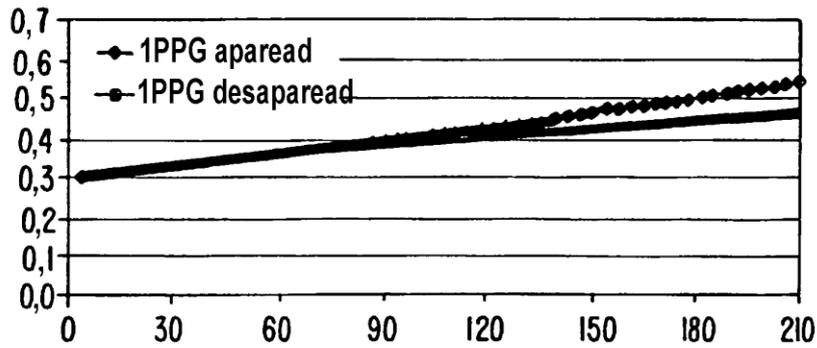


**FIG. 4.**

**A Seis G sustituidas con PPG (tg\* g\* g\* g\* g\* g\* ccttggcggctacg)**



**B Una G sustituida con PPG (tgggg\*ggccttggcggctacg)**



**C Ninguna G sustituida con PPG (tggggggccttggcggctacg)**

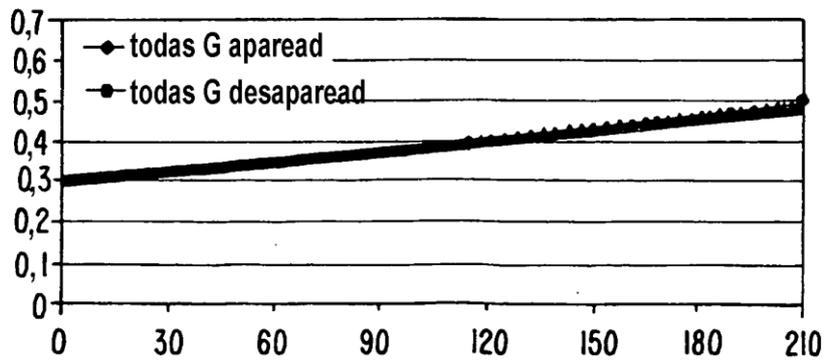


Fig.5