

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 085**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C07H 19/00 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C09B 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2002 E 02737392 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1430147**

54 Título: **Métodos y reactivos para detectar la inhibición de la fluorescencia**

30 Prioridad:

06.06.2001 US 876830
29.03.2002 US 113445

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.08.2013

73 Titular/es:

EPOCH BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
21720 23RD DRIVE SE, SUITE 150
BOTHELL, WA 98021, US

72 Inventor/es:

REED, MICHAEL W.;
LUKHTANOV, EUGENY ALEXANDER;
GALL, ALEXANDER A.;
DEMPCY, ROBERT O. y
VERMEULEN, NICOLAAS M. J.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 421 085 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

Métodos y reactivos para detectar la inhibición de la fluorescencia.

5 **Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

10 La invención se refiere a conjugados de oligonucleótido-inhibidor de fluorescencia-colorante fluorescente que presentan características mejoradas y a reactivos adecuados para incorporar nuevas fracciones de inhibidor de fluorescencia y colorante fluorescente a los oligonucleótidos. La invención también se refiere al uso de conjugados de oligonucleótido-inhibidor de fluorescencia-colorante fluorescente en métodos de detección de dianas de ácido nucleico.

15 Descripción del campo relacionado

Los oligonucleótidos sintéticos se han utilizado durante años como sondas de secuencia específica para dianas de ADN y ARN complementarias. Estos métodos se aplican mucho en la ciencia forense, la biología molecular y el diagnóstico médico, dado que permiten la identificación y cuantificación de dianas de ácido nucleico específicas. Los primeros usos de sondas de ADN empleaban la radioactividad (típicamente ³²P) como etiqueta, mientras que los métodos recientes utilizan moléculas reporteras que incluyen grupos quimioluminiscentes y fluorescentes. La mejora de la instrumentación ha permitido que la sensibilidad de estos métodos espectroscópicos se aproxime o incluso supere a los métodos de radioetiquetas. Los métodos de detección desarrollados recientemente emplean el procedimiento de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) en lugar de la detección directa de la intensidad de la fluorescencia para detectar la sonda de hibridación. En este tipo de ensayo, la FRET se produce entre un fluoróforo donante (reportero) y una molécula aceptadora (inhibidora de fluorescencia), cuando el espectro de absorción de la molécula inhibidora de fluorescencia se solapa con el espectro de emisión del fluoróforo donante y las dos moléculas se encuentran muy próximas. La energía del estado excitado del fluoróforo donante es transferida a la aceptadora vecina mediante una interacción dipolo-dipolo inducido por resonancia, que produce una inhibición de la fluorescencia del donante. Si la molécula aceptadora es un fluoróforo, en ocasiones su fluorescencia puede aumentar. La eficiencia de la transferencia de energía entre la molécula donante y la aceptadora depende en gran medida de la distancia que las separa. Las ecuaciones que describen esta relación son conocidas. La distancia de Forster (R₀) se describe como la distancia entre la molécula donante y la aceptadora en la que la transferencia de energía alcanza una eficiencia del 50%. También se conocen otros mecanismos de inhibición de la fluorescencia, tales como la inhibición por colisión y transferencia de carga.

Los métodos de detección típicos basados en la FRET están diseñados de forma que el fluoróforo donante y la molécula aceptadora se encuentran muy cerca y la inhibición de la fluorescencia del donante resulta eficiente. Durante el ensayo, la molécula donante y la aceptadora mantienen una separación tal que se produce la fluorescencia. Los ensayos de detección basados en la FRET han sido desarrollados en los ámbitos de la enzimología y la hibridación de ácido nucleico. Se revisan varias formas de ensayos de hibridación por FRET (Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, Inc., San Diego 1992, pp. 311 -352). La inhibición de la fluorescencia también se puede producir mediante mecanismos diferentes a la FRET, como la inhibición por colisión (véase, Wei et al., *Anal. Chem.* 66:1500-1506 (1994)).

Desde su descubrimiento, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) ha revolucionado la biología molecular. Esta técnica permite la amplificación de secuencias de ADN específicas, lo que hace posible que los ensayos sobre sondas de ADN se ejecuten con una única copia de la diana de ADN. Inicialmente los ensayos de diagnóstico basados en la PCR no se han empleado de forma rutinaria, en parte debido a los problemas asociados a la manipulación de las muestras y a una posible contaminación con ADN de origen diferente. Recientemente se han descrito nuevos ensayos homogéneos de ADN basados en la fluorescencia que pueden detectar el progreso de la PCR a medida que se produce (detección de PCR «en tiempo real»), utilizando cicladores de temperatura espectrofluorométricos. Dos populares formatos de ensayo utilizan sondas de ADN que se vuelven fluorescentes cuando se produce la amplificación del ADN (sondas fluorogénicas).

El primer formato para la PCR «en tiempo real» utiliza sondas de ADN conocidas como «balizas moleculares» (Tyagi et al., *Nat. Biotech.*, 16: 49-53 (1998)). Las balizas moleculares presentan una estructura de horquilla, en la que el colorante inhibidor de la fluorescencia y el colorante reportero mantienen un fuerte contacto entre sí en el extremo del tallo de la horquilla. Tras la hibridación con una secuencia complementaria, el bucle de la estructura de horquilla pasa a ser de cadena doble y fuerza la separación del colorante reportero y del inhibidor de la fluorescencia, generando así una señal fluorescente. Tyagi et al. documentaron el uso de los colorantes inhibidores no fluorescentes, como dabculo (fracción de 4-[[4-(dimetilamino)fenil]-diazetil]benzoico, absorbancia máx = 453 nm) empleado en combinación con colorantes reporteros fluorescentes con una longitud de onda de emisión muy variable (475-615 nm). En ese momento resultó sorprendente porque la FRET exige un solapamiento significativo

del espectro de absorción del inhibidor de fluorescencia con el espectro de emisión del reportero. En el caso de un inhibidor de fluorescencia que contenía una fracción de dabcilo (en adelante «dabcilo») y algunos colorantes fluorescentes, el solapamiento espectral era extremadamente bajo, aunque la eficiencia de la inhibición de la fluorescencia era elevada. Por tanto, se propuso que el mecanismo de inhibición de la fluorescencia para la forma de horquilla de las balizas no era la FRET, sino la inhibición por colisión. De hecho, los espectros UV del inhibidor de fluorescencia varían en la forma de horquilla de la baliza, lo que demuestra el contacto molecular y, por tanto, la inhibición por colisión. Un método de detección relacionado utiliza cebadores de horquilla como sonda fluorogénica (Nazarenko et al., *Nucl. Acid Res.* 25:2516-2521 (1997)).

El segundo formato para la PCR «en tiempo real» utiliza sondas de ADN denominadas «sondas de 5' nucleasa» (Lee et al., *Nucl. Acid Res.*, 21: 3761-3766 (1993)). Estas sondas fluorogénicas se preparan típicamente con el inhibidor de fluorescencia en el extremo 3' de una cadena simple de ADN y el fluoróforo en el extremo 5'. Durante cada ciclo de PCR, la actividad de 5' nucleasa de la Taq ADN polimerasa cliva la cadena de ADN, separando así el fluoróforo del inhibidor de fluorescencia y liberando la señal fluorescente. El ensayo de 5' nucleasa exige que la sonda se hibride con la cadena de plantilla durante el paso de extensión del cebador (60-65°C). También divulgan la detección simultánea «en tiempo real» de más de una secuencia de polinucleótidos en el mismo ensayo, utilizando más de un par de fluoróforo/inhibidor de fluorescencia. El ensayo de PCR de 5' nucleasa se ilustra en la Figura 1.

Inicialmente se pensaba que las sondas de 5' nucleasa se tenían que preparar con el inhibidor de fluorescencia (habitualmente tetrametilrodamina (TAMRA)) posicionado en un nucleótido interno muy próximo al 5' fluoróforo (habitualmente fluoresceína (FAM) o tetraclorofluoresceína (TET)) para conseguir una FRET eficiente. Más tarde se descubrió que esto no es necesario, y que el inhibidor de fluorescencia y el fluoróforo pueden estar posicionados en los extremos 3' y 5' del ODN, respectivamente. Se ha propuesto que las estructuras en espiral aleatorias que forman estas sondas fluorogénicas en solución permiten que un 3' colorante inhibidor de la fluorescencia pase dentro del radio de Forster del 5' fluoróforo durante el estado excitado de la molécula.

Anteriormente se han descrito diversos pares de donante/aceptor. Para la presente invención es importante el dabcilo, que se emplea, por ejemplo, como inhibidor de la fluorescencia de la sulfonamida de dansilo en los quimiosensores (Rothman & Still (1999) *Med. Chem. Lett.* 22:509-512).

Sorprendentemente, no se ha publicado ningún informe sobre el uso de dabcilo en sondas de 5' nucleasa u otras sondas de FRET que emplean fluoróforos de longitud de onda larga. Como se ha mencionado anteriormente, el dabcilo se empleó en las sondas tipo baliza, pero este es un mecanismo de inhibición de la fluorescencia diferente, en el que el dabcilo y el fluoróforo mantienen un fuerte contacto (inhibición por colisión). El dabcilo se empleó en péptidos fluorogénicos como inhibidor de la fluorescencia para el fluoróforo EDANS (ácido 5-[(2-aminoetil)amino]-naftaleno-1-sulfónico) que emite a longitud de onda corta (490 nm, azul) (Matayoshi et al. *Science* 247: 954-958 (1990)). EDANS también presenta un coeficiente de extinción menor que el dabcilo, por lo que no resulta sorprendente que la inhibición de la fluorescencia fuese eficiente. En la presente invención se ha descubierto por primera vez que el dabcilo se puede emplear para inhibir la fluorescencia de la fluoresceína en un mecanismo tipo FRET.

Además del ensayo de PCR de 5' nucleasa, se han desarrollado otros formatos que emplean el mecanismo de la FRET. Por ejemplo, se han modificado cebadores de la señal de cadena simple mediante el enlace a dos colorantes para formar un par de colorantes donante/aceptor de forma que la fluorescencia del primer colorante es inhibida por el segundo colorante. Este cebador de la señal contiene un sitio de restricción (Patente estadounidense nº 5.846.726) que permite que la enzima de restricción adecuada melle el cebador cuando se hibrida con una diana. Este clivaje separa los dos colorantes y se observa un cambio en la fluorescencia debido a una menor inhibición de la misma. También se han descrito reactivos de unión no nucleótidos para unir oligonucleótidos a ligandos (Patente estadounidense nº 5.696.251).

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

La Patente estadounidense nº 5.801.155 divulga que los oligonucleótidos (ODN) que presentan un ligando de unión al surco menor (MGB) unido covalentemente son más específicos de secuencia para sus dianas complementarias que los oligonucleótidos no modificados. Por otra parte, los MGB-ODN muestran un notable incremento de la estabilidad híbrida con cadenas diana de ADN complementario en comparación con los oligonucleótidos no modificados, permitiendo la hibridación con oligonucleótidos más cortos.

Los reactivos para el etiquetado fluorescente de los oligonucleótidos son fundamentales para la aplicación eficiente de los ensayos FRET anteriormente descritos. Otras aplicaciones como las micromatrices de ADN también emplean cebadores o sondas de ADN etiquetados por fluorescencia y existe la necesidad de reactivos mejorados que faciliten la síntesis del ADN fluorescente. Por lo general, los reactivos de fosoramidita y soportes sólidos se utilizan a menudo en la síntesis de ODN. No obstante, existen pocos reactivos de fosoramidita disponibles en el mercado para introducir grupos fluorescentes en los ODN.

Los grupos conectores para unir diferentes grupos de ligandos a los ODN desempeñan un papel importante en la síntesis de conjugados de oligonucleótidos. Se ha documentado un método para la síntesis de oligonucleótidos con una cola de 3'-aminohexilo (Petrie et al., *Bioconj. Chem.*, 3:85-87 (1992)), el uso de un grupo trans-4-hidroxi-L-prolinol trifuncional (Reed et al., *Bioconj. Chem.*, 2:217-225 (1991)), ácido diglicólico (Pon et al., *Nucl. Acids. Res.*, 25:3629-3635 (1997)), reactivos de 1,3-diol (Patentes estadounidenses nº 5.942.610 y 5.451.463), así como un reactivo trifuncional no nucleótido (Patente estadounidense nº 5.696.251).

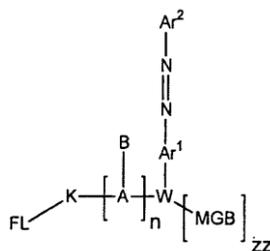
Los derivados de resorufina y cumarina se han empleado ampliamente como sustratos de enzimas para diferenciar las isoenzimas del citocromo P450 (Haugland et al., *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6ª edición, Eugene, OR, of the Several Views, pp. 235-236.1996.). En la Patente estadounidense nº 5.304.645 se han divulgado análogos de la resorufina reactivos. Los ésteres activados de los derivados de la cumarina también son conocidos en la técnica (Hirshberg et al., *Biochem.*, 37:10391-5 (1998)). La dUTP etiquetada con cumarina incorporada a las sondas se empleó para hibridaciones *in situ* (Wiegant et al., *Cytogenet. Cell Genet.*, 63:73-76 (1993)). En las Patentes estadounidenses nº 5.328.824 y 5.824.796 se han descrito fosoramiditas para introducir etiquetas en oligonucleótidos.

Muchas aplicaciones de hibridación actuales exigen más de una molécula reportera. Por otra parte, a pesar de que existen fluoróforos reporteros disponibles para su uso en pares de reportero/inhibidor de la fluorescencia, la mayoría presentan algunas características poco recomendables como, por ejemplo, que las mezclas son difíciles de separar, que tienen una carga positiva o resultan difíciles de sintetizar, que son inestables durante la síntesis de oligonucleótidos o que poseen longitudes de onda de emisión que se solapan con otros reporteros recomendables. La Solicitud de patente internacional publicada bajo la referencia WO 9964431 divulga compuestos de oligonucleótidos que presentan un inhibidor de la fluorescencia que comprende una estructura arilo-N=N y un grupo fluorescente para su uso en ensayos de hibridación.

La presente invención proporciona reactivos para sondas de oligonucleótidos que abordan estas características desfavorables y superan algunas de las dificultades o todas ellas.

Breve resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de sonda de oligonucleótidos que tiene la fórmula siguiente:



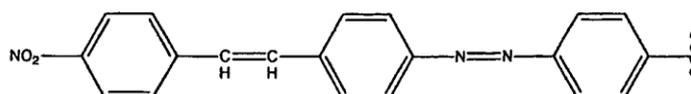
donde Ar^1 y Ar^2 son, cada uno independientemente, un grupo arilo sustituido o no sustituido, y Ar^1 o bien Ar^2 es directa o indirectamente sustituido por un grupo arilo sustituido (Ar^3), donde Ar^3 amplía la capacidad de resonancia del sistema aromático $\text{Ar}^1\text{-N=N-Ar}^2$ y, por tanto, aumenta la absorbancia de longitud de onda máxima del compuesto; MGB es un grupo de unión al surco menor; FL es un grupo fluorescente que tiene unas máximas de emisión en el rango de 400-900 nm; K es un grupo de unión cíclico o acíclico que tiene entre 1 y 30 átomos del esqueleto seleccionados entre C, N, O, S y P; W es un grupo de unión que tiene entre 3 y 100 átomos del esqueleto seleccionados entre C, N, O, S, Si y P, siendo dicho grupo de unión cíclico, acíclico, aromático o una combinación de los mismos; $[\text{A-B}]_n$ es un oligonucleótido natural o modificado donde el subíndice n es un número entero de 4 a 100; y el subíndice zz es 1.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de reactivo de fosoramidita-inhibidor de fluorescencia que tiene la fórmula siguiente:

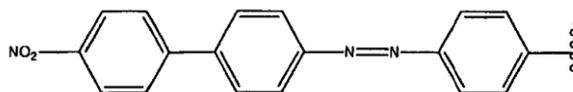


donde Ar¹ y Ar² son, cada uno independientemente, un grupo arilo sustituido o no sustituido, y Ar¹ o bien Ar² es directa o indirectamente sustituido por un grupo arilo sustituido (Ar³), donde Ar³ amplía la capacidad de resonancia del sistema aromático Ar¹-N=N-Ar² y, por tanto, aumenta la absorbancia de longitud de onda máxima del compuesto; Xi se selecciona del grupo compuesto por H, (C₁-C₁₂)alquilo, arilo, heteroarilo, y un grupo funcional protegido o no protegido; X₂ es una fracción reactiva para los nucleófilos; y W es un grupo de unión que tiene entre 3 y 100 átomos del esqueleto seleccionados de C, N, O, S, Si y P, siendo dicho grupo de unión cíclico, acíclico, aromático o una combinación de los mismos.

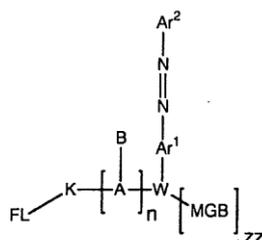
En un grupo de realizaciones de la divulgación, X₂ se selecciona de una fracción de unión a fósforo, una fracción de pentafluorofenoxilo y una fracción de succinimidilo. En otro grupo de realizaciones de la divulgación, X₁ se selecciona de OH, O-dimetoxitritilo, O-metoxitritilo, O-tritilo y un átomo de oxígeno que tiene un grupo de bloqueo lábil al ácido. En otro grupo de realizaciones, X₂ es una fosoramidita de la fórmula -O-P(N(iPr)₂)(OCH₂CH₂CN). En otro grupo de realizaciones, Ar² es sustituido por Ar³. En otro grupo de realizaciones, Ar² es sustituido indirectamente por Ar³. En otras realizaciones más, Ar² está indirectamente sustituido por Ar³ a través de un anillo o anillos aromáticos y/o de un enlace o enlaces dobles. En otras realizaciones, Ar² está indirectamente sustituido por Ar³ a través de un enlace doble seleccionado de los enlaces dobles de carbono-carbono y nitrógeno-nitrógeno. En otro grupo de realizaciones, Ar² está indirectamente sustituido por Ar³ a través de un grupo seleccionado de -(C=C)_t- y -(CR'=CR')_t; donde t es 0-5 y R' es independientemente seleccionado de entre hidrógeno, (C₁-C₈)alquilo y heteroalquilo, heteroarilo y arilo no sustituido, (arilo no sustituido)-(C₁-C₄)alquilo, y (arilo no sustituido)oxi-(C₁-C₄)alquilo. En otras realizaciones más, al menos Ar¹, Ar² o bien Ar³ es sustituido por -halógeno, -OR', -OC(O)R' -NR'R", -SR' -R', -CN, -NO₂, -CO₂R', -CONR'R", -C(O)R', -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR"C(O)₂R', -NR'-C(O)NR"R"', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R", -N₃, -CH(Ph)₂, perfluoro(C₁-C₄)alcoxilo, y perfluoro(C₁-C₄)alquilo, en un número que oscila entre cero y el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde R', R" y R"' son seleccionados, independientemente, de entre hidrógeno, (C₁-C₈)alquilo y heteroalquilo, heteroarilo y arilo no sustituido, (arilo no sustituido)-(C₁-C₄)alquilo, y (arilo no sustituido)oxi-(C₁-C₄)alquilo. En otras realizaciones, Ar² está indirectamente sustituido por Ar³ a través de un enlace doble. En otras realizaciones más, Ar²-N=N-Ar¹- tiene la estructura siguiente:



En otras realizaciones más, Ar² es directamente sustituido por Ar³. Por ejemplo, Ar²-N=N-Ar¹- tiene la estructura siguiente:

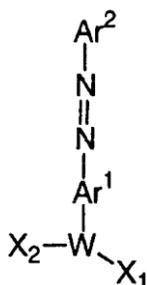


En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de sonda de oligonucleótidos que tiene la fórmula siguiente:



donde Ar¹ y Ar² son, cada uno independientemente, un grupo arilo sustituido o no sustituido; MGB es un grupo de unión al surco menor; FL es un grupo fluorescente que tiene unas máximas de emisión en el rango de 400-900 nm; K es un grupo de unión cíclico o acíclico que tiene entre 1 y 30 átomos del esqueleto seleccionados entre C, N, O, S y P; W es un grupo de unión que tiene entre 3 y 100 átomos del esqueleto seleccionados entre C, N, O, S, Si y P, siendo dicho grupo de unión cíclico, acíclico, aromático o una combinación de los mismos, donde W modula la longitud de onda de absorción de la fracción Ar¹-N=N-Ar² para aumentar la absorbancia de la longitud de onda del compuesto; [A-B]_n es un oligonucleótido natural o modificado donde el subíndice n es un número entero de 4 a 100; y el subíndice zz es 0 o 1.

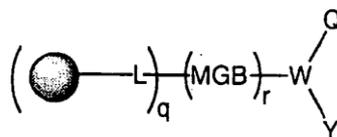
En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de reactivo de fosforamidita-inhibidor de fluorescencia que tiene la fórmula siguiente:



donde Ar¹ y Ar² son, cada uno independientemente, un grupo arilo sustituido o no sustituido; X₁ es seleccionado del grupo compuesto por H, (C₁-C₁₂)alquilo, arilo, heteroarilo, y un grupo funcional protegido o no protegido; X₂ es una fracción reactiva para los nucleófilos; y W es un grupo de unión que tiene entre 3 y 100 átomos del esqueleto seleccionados de C, N, O, S, Si y P, siendo dicho grupo de unión cíclico, acíclico, aromático o una combinación de los mismos, donde W modula la longitud de onda de absorción de la fracción Ar¹-N=N-Ar² para aumentar la absorbancia de la longitud de onda del compuesto.

En un conjunto de realizaciones, X₂ se selecciona de una fracción de unión a fósforo, una fracción de pentafluorofenoxilo y una fracción de succinimidilo. En otro grupo de realizaciones, W comprende un grupo arilo sustituido (Ar³) que está directa o indirectamente unido a Ar¹ y amplía la capacidad de resonancia del sistema aromático Ar¹-N=N-Ar² y, por tanto, aumenta la absorbancia de longitud de onda máxima del compuesto. En otra realización más, Ar¹ está indirectamente sustituido por Ar³ a través de un anillo o anillos aromáticos y/o de un enlace o enlaces dobles. En otro grupo de realizaciones, Ar¹ está indirectamente sustituido por Ar³ a través de un enlace doble seleccionado de los enlaces dobles de carbono-carbono y nitrógeno-nitrógeno. En otras realizaciones más, Ar¹ está indirectamente sustituido por Ar³ a través de un grupo seleccionado de -(C≡C)_t- y -(CR'=CR')_t- donde t es 0-5 y R' es independientemente seleccionado de entre hidrógeno, (C₁-C₈)alquilo y heteroalquilo, heteroarilo y arilo no sustituido, (arilo no sustituido)-(C₁-C₄)alquilo, y (arilo no sustituido)oxi-(C₁-C₄)alquilo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de sonda para un ensayo de hibridación que comprende la fórmula FL-ODN-(W)_d-Q, donde FL es un fluoróforo con una longitud de onda de emisión en el rango de unos 300-800 nm; ODN es un oligonucleótido; W es un grupo conector que tiene entre 3 y 100 átomos distintos a átomos de hidrógeno, seleccionados de C, N, O, S, P y Si, y es cíclico, acíclico, aromático o una combinación de los mismos, y d es 0 o 1; y Q es una fracción de inhibidor de fluorescencia que comprende la estructura -Ar¹-N=N-Ar², donde Ar¹ está unido a ODN o W, y Q tiene un rango de absorbancia más amplio que el dabcilo (4-[[4-(dimetilamino)fenil]diazetil]benzoilo, absorbancia máx. = 453 nm), donde Ar¹ y Ar² son, cada uno independientemente, un grupo arilo sustituido o no sustituido. En un grupo de realizaciones, Ar¹ o bien Ar² es directa o indirectamente sustituido por un grupo arilo sustituido (Ar³), donde Ar³ amplía la capacidad de resonancia del sistema aromático Ar¹-N=N-Ar² y, por tanto, aumenta la absorbancia de longitud de onda máxima del compuesto. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto con la fórmula siguiente:

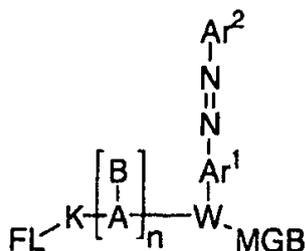


donde ● es un soporte sólido; L es un conector clivable; q es 0 o 1; MGB es un ligando de unión al surco menor; r es 0 o 1; W es un grupo conector que tiene entre 3 y 100 átomos diferentes a átomos de hidrógeno, seleccionados

de C, N, O, S, P y Si, y es cíclico, acíclico, aromático o una combinación de los mismos; Q es una fracción de inhibidor de fluorescencia que comprende la fórmula $-\text{Ar}^1-\text{N}=\text{N}-\text{Ar}^2$, donde Ar^1 está unido a W y donde Ar^1 y Ar^2 son, cada uno independientemente, un grupo arilo sustituido o no sustituido, y Ar^1 o bien Ar^2 es directa o indirectamente sustituido por un grupo arilo sustituido (Ar^3), donde Ar^3 amplía la capacidad de resonancia del sistema aromático $\text{Ar}^1-\text{N}=\text{N}-\text{Ar}^2$ y, por tanto, aumenta la absorbancia de longitud de onda máxima del compuesto; e Y se selecciona de (a) $-\text{O}-\text{J}_1$ donde J_1 es un grupo protector hidroxilo; (b) un oligonucleótido (-ODN); y (c) un conjugado de oligonucleótido-fluoróforo (-ODN-FL).

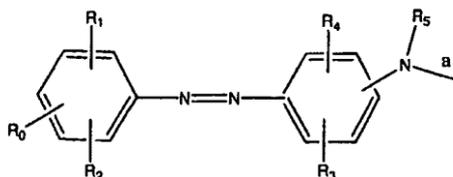
En diversas realizaciones de los dos aspectos anteriores de la divulgación, Ar^2 está indirectamente sustituido por Ar^3 a través de un anillo o anillos aromáticos y/o de un enlace o enlaces dobles. En otra realización, Ar^2 está indirectamente sustituido por Ar^3 a través de un enlace doble seleccionado de los enlaces dobles de carbono-carbono y nitrógeno-nitrógeno. En otra realización más, W comprende Ar^3 , y Ar^1 está indirectamente sustituido por Ar^3 a través de un anillo o anillos aromáticos y/o de un enlace o enlaces dobles. En otra realización, Ar^1 es indirectamente sustituido por Ar^3 a través de un enlace doble seleccionado de los enlaces dobles de carbono-carbono y nitrógeno-nitrógeno. En otra realización más, en la que q es 0. En otro grupo de realizaciones, el soporte sólido se selecciona entre vidrio, vidrio de poro controlado, materiales poliméricos, poliestireno, gránulos, vidrio revestido o un soporte que sea compatible con la síntesis de oligonucleótidos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una sonda de oligonucleótidos que tiene la fórmula siguiente:

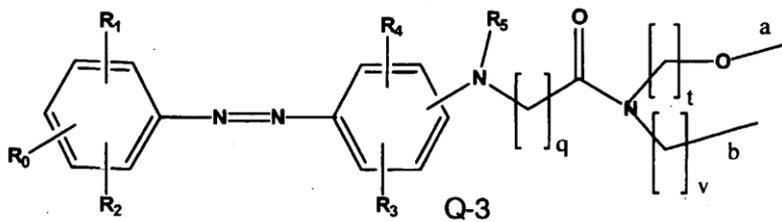
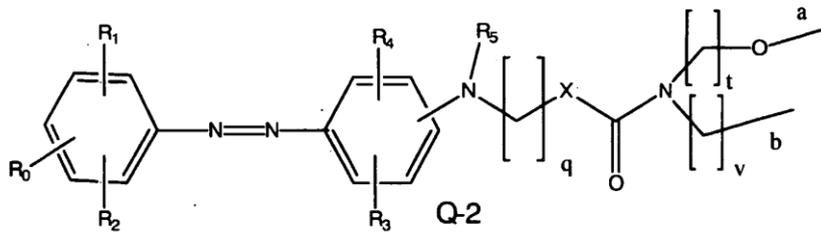
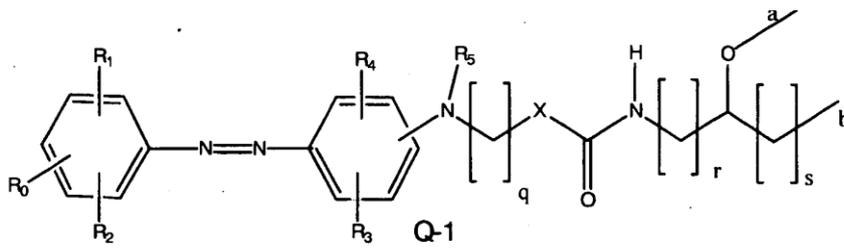


donde Ar^1 y Ar^2 representan, cada uno independientemente, un grupo arilo sustituido o no sustituido; MGB es un grupo de unión al surco menor; FL es un grupo fluorescente que tiene unas máximas de emisión en el rango de 400-900 nm; K es un grupo de unión cíclico o acíclico que tiene entre 1 y 30 átomos del esqueleto seleccionados entre C, N, O, S y P; W es un grupo de unión que tiene entre 3 y 100 átomos del esqueleto seleccionados entre C, N, O, S, Si y P, que es cíclico, acíclico, aromático o una combinación de los mismos; $[\text{A}-\text{B}]_n$ es un oligonucleótido natural o modificado que tiene de 4 a 100 bases; y el subíndice n es un número entero de 4 a 100.

En un grupo de realizaciones, Ar^1 es un grupo arilo sustituido o no sustituido seleccionado del grupo compuesto por fenilo, naftilo, 2-benzotiazolilo, 3-benzoisotiazolilo y 2-tiazolilo. En otro grupo de realizaciones, Ar^2 soporta de uno a tres sustituyentes seleccionados de nitro, ciano, halo, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^1$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$, $-\text{SO}_2\text{R}^1$, $-\text{SO}_2\text{F}$ y $-\text{SO}_2\text{NR}^1\text{R}^2$, donde cada R^1 y R^2 es independientemente H, (C_1-C_6) alquilo o hidroxí (C_1-C_6) alquilo. En otras realizaciones más, el grupo $-\text{Ar}^1-\text{N}=\text{N}-\text{Ar}^2$ es una fracción de inhibidor de fluorescencia que tiene la fórmula siguiente:

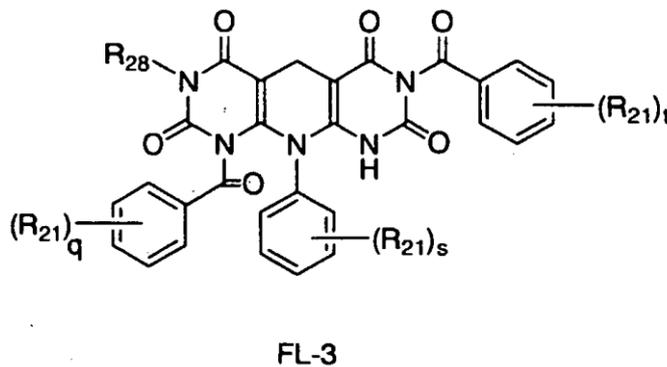
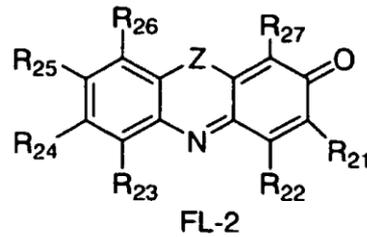
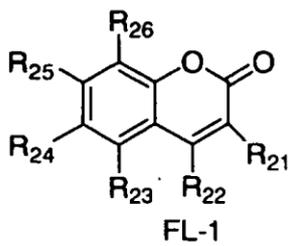


donde R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente seleccionados de H, halógeno, NO_2 , SO_3R , $\text{SO}_2\text{N}(\text{R})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$, CN, CNS, OR, $\text{OC}(\text{O})\text{R}$, SR, CF_3 , $\text{NHC}(\text{O})\text{R}$, $\text{N}(\text{R})_2$ y $\text{N}(\text{R})_3$ donde cada R es independientemente seleccionado de H, (C_1-C_8) alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos; y R_5 es -H o (C_1-C_8) alquilo, y la fracción de inhibidor de fluorescencia está unida al conector a través del enlace de valencia designado «a». En otras realizaciones más, el grupo $-\text{W}-\text{Ar}^1-\text{N}=\text{N}-\text{Ar}^2$ es una combinación de fracción de inhibidor de fluorescencia-grupo de unión que tiene una fórmula seleccionada de entre Q-1, Q-2 y Q-3:



5 donde q, r, s, t y v son, cada uno independientemente, un número entero de 1 a 20; X es -O-, -OCH₂- o -CH₂-; y la fracción de conjugado de inhibidor de fluorescencia-conector está unida a la porción [A-B]_n a través de uno de los enlaces de valencia designados como a o b; y está unida a la porción de unión al surco menor a través de los otros enlaces de valencia designados como a o b.

En otras realizaciones más, la sonda de oligonucleótidos tiene un fluoróforo, FL, seleccionado del grupo compuesto por FL-1, FL-2 y FL-3:



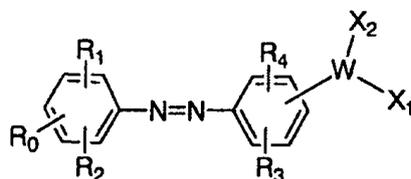
donde R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{24} , R_{25} , R_{26} y R_{27} son, cada uno de ellos, sustituyentes independientemente seleccionados de H, halógeno, NO_2 , SO_3R , $\text{SO}_2\text{N}(\text{R})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$, CN, CNS, OR, $\text{OC}(\text{O})\text{R}$, SR, CF_3 , $\text{NHC}(\text{O})\text{R}$, $\text{N}(\text{R})_2$ y $\text{N}(\text{R})_3$ donde cada R es independientemente seleccionado del grupo compuesto por H, $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos, y opcionalmente dos grupos adyacentes de R_{21} a R_{26} se combinan para formar un anillo de cinco o seis miembros que tiene de cero a tres heteroátomos como miembro del anillo, con la condición de que al menos uno de los R_{21} a R_{27} sea un enlace que une dicho fluoróforo a dicho grupo de unión K; y R_{28} es un miembro seleccionado del grupo compuesto por H y $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ alquilo.

En otras realizaciones más, las sondas de oligonucleótidos de la invención comprenden un ligando de unión al surco menor (MGB) seleccionado de análogos de uno de los elementos siguientes: CC1065, Hoeschst 33258, DAPI, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenilo (y diarilamidinas relacionadas), duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindola, y pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas.

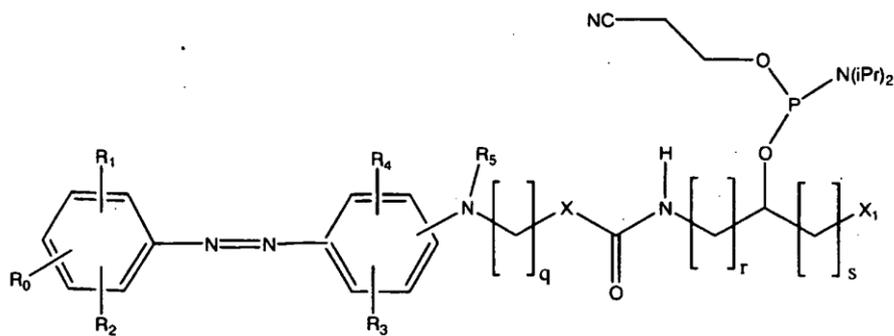
En realizaciones preferibles, las sondas tienen unidas nuevas estructuras inhibidoras de la fluorescencia (descritas a continuación), emparejadas con una fracción fluorescente covalentemente unida. El conjugado FL-ODN-Q resultante incluirá preferiblemente un ligando de unión al surco menor (MGB) que mejora las características de unión y discriminación del conjugado FL-ODN-Q-MGB resultante. Estos conjugados son particularmente útiles en ensayos de diagnóstico como el ensayo de PCR TaqMan® PCR para polimorfismos de nucleótidos únicos (y similares) en los que la discriminación de alelo específico no solamente exige sondas con diferentes moléculas reporteras fluorescentes, sino también inhibidores de fluorescencia eficientes. Los inhibidores de fluorescencia empleados en los conjugados de FL-ODN-Q-MGB son preferiblemente aquellos que proporcionan un amplio rango de longitud de onda de inhibición de la fluorescencia. Adicionalmente, los nuevos reactivos de etiquetado de las moléculas reporteras empleados para preparar estos conjugados son aquellos que tienen longitudes de onda de emisión distintivas para un análisis multicolor mejorado.

En una aplicación de los principios resumidos anteriormente, las sondas fluorogénicas se preparan utilizando un soporte sólido de «3'-hexanol» universal (disponible de conformidad con Gamper et al. *Nucleic Acids Res.*, 21:145-150 (1993), donde una fosforamidita del inhibidor de fluorescencia de la invención se añade en el primer paso de acoplamiento (extremo 3') de la secuencia de ODN y se une un fluoróforo (FL) en el paso de acoplamiento final, resultando en sondas del conjugado 5'-FL-ODN-Q-hexanol.

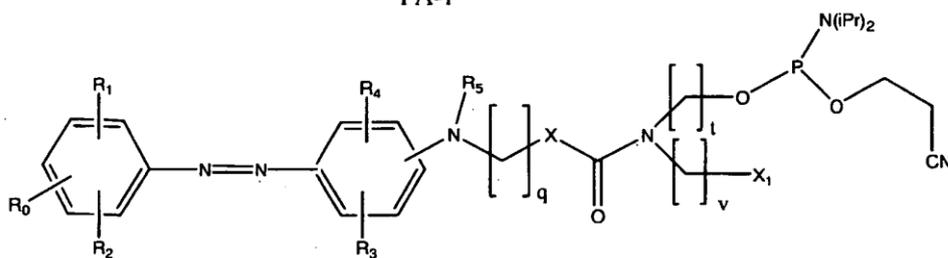
En otro aspecto, la presente divulgación proporciona reactivos de un inhibidor de la fluorescencia que tienen la fórmula siguiente:



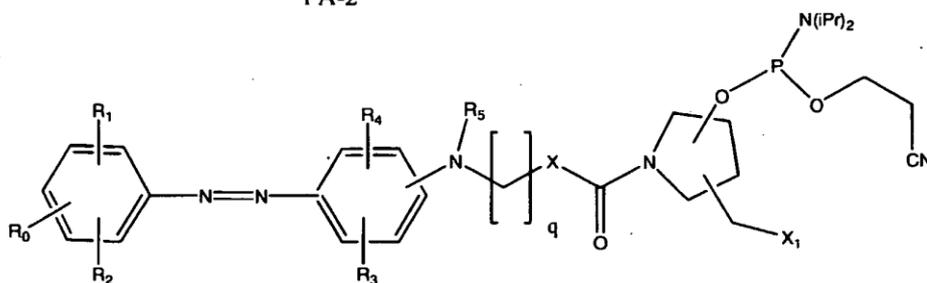
donde W es un grupo de unión que tiene entre 3 y 100 átomos de la cadena principal seleccionados de entre C, N, O, S, P y Si y que puede ser cíclico, acíclico, aromático o combinaciones de los mismos; X_1 es H, $(\text{C}_1\text{-C}_{12})$ alquilo, arilo, heteroarilo, un grupo funcional protegido o no protegido (p. ej., un éster o ácido hidroxilo, amino o carboxílico que opcionalmente está protegido con un grupo protector adecuado, conocido por los expertos en la técnica); X_2 es cualquier fracción de unión a fósforo empleada en la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, una fosforamidita de la fórmula $\text{O-P}(\text{iPr})_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})$, o alternativamente, un grupo conector unido a un soporte sólido de la fórmula $\text{O-C}(=\text{O})\text{Z}$ -soporte sólido, donde Z tiene de 1 a 30 átomos de longitud de la cadena principal y donde los átomos de la cadena principal se seleccionan de entre C, N, O, P, y S, y Z puede incluir grupos cíclicos, acíclicos o aromáticos, o combinaciones de los mismos; y R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo compuesto por H, halógeno, NO_2 , SO_3R , $\text{SO}_2\text{N}(\text{R})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$, CN, CNS, OR, $\text{OC}(\text{O})\text{R}$, SR, CF_3 , $\text{NHC}(\text{O})\text{R}$, $\text{N}(\text{R})_2$ o $\text{N}(\text{R})_3$ donde cada R es independientemente H, $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo conector clivable que está unido a un soporte sólido, o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos y opcionalmente, dos elementos seleccionados de entre R_0 , R_1 y R_2 combinados para formar un anillo de cinco o seis miembros que tiene de cero a tres heteroátomos como miembros del anillo; y opcionalmente R_3 y R_4 se combinan para formar un anillo de cinco o seis miembros que tienen de cero a tres heteroátomos como miembros del anillo. En aquellas realizaciones en las que se combinan R_3 y R_4 para formar un sistema de anillo fusionado, el grupo de unión W se puede unir al anillo de fenilo (como se ha indicado anteriormente) o al anillo formado por R_3 y R_4 . Adicionalmente, en aquellas realizaciones del presente en las que los dos grupos alquilo se unen a un átomo de nitrógeno, formando un sustituyente dialquilamino, los grupos alquilo pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, el reactivo de inhibidor de la fluorescencia-fosforamidita tiene una fórmula seleccionada entre las fórmulas designadas PA-1, PA-2 y PA-3.



PA-1



PA-2



PA-3

donde R_0 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan, cada uno de ellos independientemente, de H, halógeno, NO_2 , SO_3R , $\text{SO}_2\text{N}(\text{R})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$, CN, CNS, OR, $\text{OC}(\text{O})\text{R}$, SR, CF_3 , $\text{NHC}(\text{O})\text{R}$, $\text{N}(\text{R})_2$ o $\text{N}(\text{R})_3$, donde cada R es independientemente H, $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos; y opcionalmente, dos elementos de entre R_0 , R_1 y R_2 se combinan para formar un anillo de cinco o seis miembros que tiene entre cero y tres heteroátomos como miembros del anillo; y opcionalmente R_3 y R_4 se combinan para formar un anillo de cinco o seis miembros que tiene entre cero y tres heteroátomos como miembros del anillo; R_5 es H o $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ alquilo; los subíndices q, r, s, t y v son, cada uno de ellos independientemente, un número entero de 1 a 20; X es -O- o $-\text{CH}_2-$; y X_1 se selecciona del grupo compuesto por OH, O-dimetoxitritilo, O-metoxitritilo, O-tritilo o un átomo de oxígeno que tiene un grupo de bloqueo lábil al ácido.

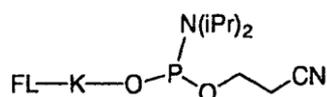
Los nuevos reactivos de inhibidores de fluorescencia se basan en la estructura 4-[4-nitrofenil]diazinil]fenilamina y/o la estructura 4-[4-nitrofenil]diazinil]-naftilamina. En general, otros inhibidores de la fluorescencia «diaz» también resulta útiles, tales como los inhibidores de la fluorescencia que tienen una estructura de $\text{Ar}^1\text{-N=N-Ar}^2$ donde Ar^1 y Ar^2 son, cada uno de ellos independientemente, grupos arilo sustituidos o no sustituidos, como fenilo, naftilo, tienilo, benzo[c]isotiazolilo, y similares. Un experto en la técnica apreciará que al menos Ar^1 o bien Ar^2 contará con un grupo funcional (p. ej., hidroxilo, amino, tiol, ácido carboxílico, carboxamida y similares) que se podrá emplear para unir el inhibidor de la fluorescencia a un oligonucleótido o grupo de unión. Adicionalmente, estas moléculas inhibidoras de la fluorescencia tienen un solapamiento espectral UV mejorado, no solamente con los grupos reporteros fluorescentes utilizados habitualmente que emiten en un rango de longitud de onda corto (unos 400-500 nm), sino también con los que tienen un rango ampliado a longitudes de onda medias (525 nm = verde), largas (670 nm = rojo) y superiores. Los cromóforos inhibidores de fluorescencia de la presente invención son no fluorescentes, se incorporan fácilmente a los reactivos de síntesis de ADN, son estables durante la síntesis automatizada de ADN y durante el almacenamiento, y presentan propiedades compatibles en ensayos de hibridación. Por otra parte, con los

colorantes reporteros fluorescentes se observan unos ratios de señal frente a ruido mejorados a lo largo de un rango de longitud de onda más amplio. Por consiguiente, la presente invención ofrece considerables ventajas sobre el uso del dabcilo (Nazerenko et al, *Nucl. Acids Res.*, 25:2516-21 (1997)) como colorante inhibidor de la fluorescencia.

5 En otro aspecto, los inhibidores de la fluorescencia «diazó» anteriormente señalados (basados en una estructura de 4-[4-nitrofenil] diazinil]fenilamina y/o 4-[4-nitrofenil]diazinil]- naftilamina, o en estructuras relacionadas) son modificados con grupos de unión (o «conectores») que no solamente permiten su fácil incorporación a las sondas de ADN fluorogénicas durante la síntesis automatizada de ADN, sino que también modulan la longitud de onda y la capacidad para inhibir la fluorescencia. En un aspecto relacionado, se proporcionan derivados de fosforamidita de estos inhibidores de la fluorescencia y son útiles para introducir fracciones de inhibidor de la fluorescencia en oligonucleótidos durante la síntesis automatizada, o para unir las fracciones de inhibidor de la fluorescencia a oligonucleótidos con cola amino.

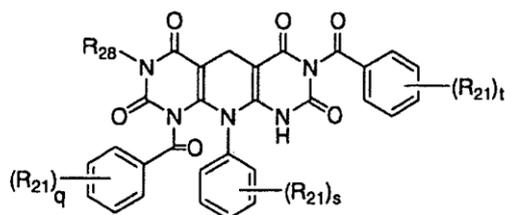
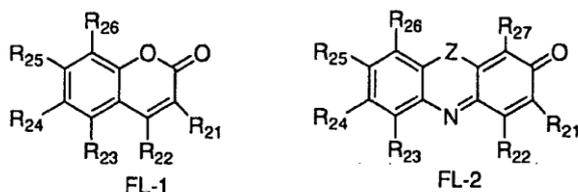
15 En otro aspecto relacionado, las nuevas moléculas inhibidoras de la fluorescencia se introducen en los oligonucleótidos empleando fosforamiditas de pirimidina y pirazolo[5,4-d]pirimidina que contienen los inhibidores de fluorescencia unidos en las posiciones 3' y 5', respectivamente.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un reactivo de fluoróforo-fosforamidita que tiene la fórmula siguiente:



20

donde K es un grupo de unión bifuncional; y FL es un fluoróforo seleccionado entre:



FL-3

25 donde R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{24} , R_{25} , R_{26} y R_{27} son, cada uno de ellos, sustituyentes independientemente seleccionados de H, halógeno, NO_2 , SO_3R , $\text{SO}_2\text{N}(\text{R})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$, CN, CNS, OR, $\text{OC}(\text{O})\text{R}$, SR, CF_3 , $\text{NHC}(\text{O})\text{R}$, $\text{N}(\text{R})_2$ y $\text{N}(\text{R})_3$ donde cada R es independientemente seleccionado entre H, (C_1-C_8) alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos, y opcionalmente dos grupos adyacentes de R_{21} a R_{26} se combinan para formar un anillo de cinco o seis miembros que tiene de cero a tres heteroátomos como miembro del anillo, con la condición de que al menos uno de los R_{21} a R_{27} sea un enlace que une dicho fluoróforo a dicho grupo de unión K; los subíndices q, s y t son números enteros del 0 al 5, y R_{28} se selecciona entre H y (C_1-C_8) alquilo. Estos reactivos fluorescentes son compatibles con la síntesis de ADN y se sintetizan o seleccionan y convierten en reactivos de fosforamidita adecuados para su incorporación a los ODN. Concretamente, los colorantes fluorescentes violetas basados en la estructura de 10-fenil-1,3,5,7,9,10-hexahidro-pirimidino[5',4'-5,6]piridino[2,3-d]pirimidina-2,4,6,8-tetraona (PPT); los colorantes fluorescentes rojos basados en 7-hidroxi-fenoxazin-3-ona (resorufina); y los colorantes fluorescentes azules basados en la estructura de la cumarina son incorporados a los reactivos de fosforamidita y se pueden emplear en la preparación de las composiciones divulgadas en el presente. Estos colorantes fluorescentes tienen excelentes propiedades para el análisis fluorescente multicolor en combinación con otros colorantes (p. ej., fluoresceína). Estos reactivos resultan útiles en diversos métodos analíticos que emplean la detección directa de la fluorescencia o bien la FRET y formatos de detección relacionados. En un aspecto relacionado de la invención, los fluoróforos basados en PPT, en cumarina y resorufina (colorantes fluorescentes) se

40

convierten en nuevos reactivos adecuados para la unión covalente «post-síntesis de nucleótidos» en el extremo 5' de los ODN. En otro aspecto, los nuevos colorantes fluorescentes se incorporan a los oligonucleótidos empleando fosforamiditas de pirimidina y pirazolo[5,4-d]pirimidina que contienen los fluoróforos unidos en las posiciones 3' y 5', respectivamente.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para hibridar ácidos nucleicos que comprende lo siguiente:

- a) incubación de un primer oligonucleótido con una sonda de oligonucleótido; e
- b) Identificación de un ácido nucleico hibridado;

donde la sonda de oligonucleótidos es una sonda como la anteriormente descrita. Preferentemente, la sonda de oligonucleótidos comprende un fluoróforo seleccionado entre FL-1, FL-2 y FL-3. En un grupo de realizaciones, el método comprende también un paso consistente en la alteración de la relación espacial entre el fluoróforo y las porciones de inhibidor de la fluorescencia de la sonda de oligonucleótidos. En concreto, la alteración puede ser resultado de la hibridación. En otras realizaciones, el método comprende también la liberación del fluoróforo de la sonda de oligonucleótidos posterior a la hibridación.

En otros aspectos más, se divulgan métodos para sintetizar y unir los nuevos inhibidores de la fluorescencia a conjugados de ODN-fluoróforo, con o sin un ligando de unión al surco menor (MGB) en la posición 3' o 5'. En un grupo de realizaciones preferentes, estos métodos emplean soportes sólidos para la síntesis automatizada de oligonucleótidos con conectores clivables. Un experto en la técnica apreciará también que los MGB se pueden unir en las posiciones internas del oligonucleótido empleando bases o grupos de unión convenientemente modificados para incorporar estos compuestos.

En otro aspecto más, se prepara una sonda de oligonucleótidos fluorogénica a partir de un soporte sólido modificado con MGB, empleando técnicas similares a las descritas en Lukhtanov et al. *Bioconjugate Chem.*, 7:564-567 (1996). En este aspecto, se añade un inhibidor de fluorescencia-fosforamidita de la divulgación en el primer paso de unión al MGB y se une un fluoróforo (FL) en el último paso de unión al ODN, para producir una sonda del conjugado 5'-FL-ODN-Q-MGB. Alternativamente, se puede sintetizar 5'-MGB-Q-ODN-FL utilizando una 5'-fosforamidita en lugar de una 3'-fosforamidita

Además, otros aspectos están dirigidos a métodos y composiciones que resultan útiles en micromatrices de ensayos de diagnóstico basados en ácido nucleico que recientemente han adquirido importancia en muchos ámbitos, como las ciencias médicas, la ciencia forense, la agricultura y el control de calidad de las aguas. Otra aplicación relacionada de los métodos y composiciones de la presente invención es en procedimientos que utilizan matrices de oligonucleótidos, como el análisis basado en matrices de la expresión genética (Eisen, *Methods of Enzym.*, 303:179-205 (1999)). En estos procedimientos se emplea una matriz ordenada de oligonucleótidos o ADN que corresponde a la totalidad o a una parte importante de los genes en muchos organismos como plataforma para la hibridación. Los métodos basados en micromatrices se emplean en los ensayos para medir la representación relativa de las especies de ARN expresadas. La cuantificación de las diferencias en la abundancia de cada especie de ARN se consigue mediante la comparación directa de dos muestras, etiquetándolas con colorantes fluorescentes espectralmente distintos, y mezclando las dos sondas para la hibridación simultánea a una matriz.

En la medida en que la aplicación de las composiciones y métodos de la presente divulgación se refiere a la detección de ácidos nucleicos, incluye, a título meramente enunciativo, métodos que implican una FRET, tales como los ensayos con balizas, cebadores de transferencia de energía universales o 5'-nucleasa. Estos métodos se dirigen habitualmente, aunque no de forma exclusiva, a la detección de secuencias de ácido nucleico generadas por PCR. Algunos de estos métodos implican la detección simultánea de más de una secuencia de ácido nucleico en el mismo ensayo. De forma similar, la invención se refiere a métodos que implican la FRET y mecanismos de inhibición de la fluorescencia relacionados en la detección de la concentración de proteínas o de la actividad enzimática.

Además, otras aplicaciones de la divulgación se refieren al etiquetado, con colorantes a base de resorufina, cumarina y PPT luminiscente, de los ácidos nucleicos, proteínas y otros materiales, entre los que se incluyen fármacos, toxinas, células, materiales microbianos, partículas, superficies de vidrio o poliméricas y similares, en un grupo reactivo, como un grupo amino, hidroxilo o sulfhidrilo. La presente divulgación se puede emplear en procesos de etiquetado de uno y dos pasos. En el proceso de etiquetado de dos pasos, un componente primario, como un oligonucleótido, es etiquetado con el reactivo capaz de introducir los nuevos colorantes basados en resorufina, cumarina y PPT de los fluoróforos, mediante reacción con un grupo reactivo del ODN (como un grupo amino, hidroxilo, carboxilo, aldehído o sulfhidrilo) y la etiqueta se utiliza para detectar un componente secundario, como una diana de oligonucleótidos.

Breve descripción de las diversas vistas de las ilustraciones

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

La Figura 2 es una gráfica que muestra los espectros UV de las sondas de ADN modificadas con colorante Red 13 y dabciilo.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el rendimiento de sondas de MGB fluorogénicas en un ensayo de PCR en «tiempo real».

La Figura 4 es una gráfica que muestra los espectros fluorescentes de las sondas de ADN que contienen colorante violeta, FAM y resorufina.

La Figura 5 ilustra la detección en tiempo real del alelo 1 de RRM1 (desapareamiento T/C) con una sonda de MGB no clivable, MGB-Q-ATATCT AGC GTT GA-FI (SEC. ID. N°: 5) (30, más abajo, donde los subíndices t, v, y m son 3, R₀ es 4-NO₂, R₁ es 2-Cl, R₂, R₃ y R₄ son H y FI es fluoresceína).

Descripción detallada de la invención

En los esquemas de reacción y la descripción que se recoge más abajo (y anteriormente), las abreviaturas MGB, FL, Q, CPG y ODN se refieren a «ligando de unión al surco menor», «etiqueta fluorescente» o «fluoróforo», «inhibidor de la fluorescencia», «vidrio de poro controlado» (como un ejemplo de soporte sólido) y fracciones o moléculas de «oligonucleótido», respectivamente, y de una manera que resulta evidente por el contexto. En determinadas fórmulas, el grupo [A-B]_n se utiliza para referirse a un oligonucleótido, oligonucleótido modificado o ácido nucleico peptídico que tiene «n» bases (B) y que está unido a lo largo de un esqueleto de «n» azúcares, azúcares modificados o aminoácidos (A).

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos empleados en la especificación y las reivindicaciones tienen los significados que se recogen a continuación:

Los términos «etiqueta fluorescente» o «fluoróforo» se refieren a compuestos con una emisión fluorescente máxima de entre unos 400 y unos 900 nm. Estos compuestos incluyen, con su emisión máxima en nm entre paréntesis, Cy2™ (506), GFP (con desplazamiento al rojo) (507), YO-PRO™ -1 (509), YOYO™ -1 (509), Calceína (517), FITC (518), FluorX™ (519), Alexa™ (520), Rodamina 110 (520), 5-FAM (522), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), RiboGreen™ (525), Rhodamine Green™ (527), Rodamina 123 (529), Magnesium Green™ (531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™ -1 (533), TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPY® 530/550 (550), Dil (565), BODIPY® TMR (568), BODIPY® 558/568 (568), BODIPY® 564/570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange™ (575), Ficoeritrina tipo R y B (575), Rodamina Faloidina (575), Calcium Orange™ (576), Pironina Y (580), Rodamina B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), Texas Red® (615), Rojo Nilo (628), YO-PRO™ -3 (631), YOYO™ -3 (631), R-ficocianina (642), C-ficocianina (648), TO-PRO™ -3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5™ (670), Tia-dicarbocianina (671), Cy5.5 (694).

El término «conector» se refiere a una fracción que se emplea para unir varias porciones de la molécula o para unir covalentemente la molécula (o porciones de la misma) a un soporte sólido. Típicamente, un conector o grupo de unión tiene grupos funcionales que se emplean para interactuar y formar enlaces covalentes con grupos funcionales de los ligados o componentes (p. ej., fluoróforos, oligonucleótidos, ligandos de unión al surco menor o inhibidores de la fluorescencia) de los conjugados descritos y utilizados en el presente. Algunos ejemplos de grupos funcionales de los grupos de unión (antes de la interacción con otros componentes) incluyen -NH₂, -NHNH₂, -ONH₂, -NHC=(O)NHNH₂, -OH, o -SH. Los grupos de unión también son las porciones de la molécula que conectan otros grupos (p. ej., fracciones de fosoramidita y similares) al conjugado. Adicionalmente, un conector puede incluir porciones lineales o acíclicas, porciones cíclicas, anillos aromáticos o combinaciones de los mismos.

El término «soporte sólido» se refiere a cualquier soporte que sea compatible con la síntesis de oligonucleótidos, incluyendo, por ejemplo, vidrio, vidrio de poro controlado, materiales poliméricos, poliestireno, gránulos, vidrio revestido y similares.

El término «alquilo» se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente saturado cíclico, ramificado o lineal, o a una combinación de radicales de hidrocarburo monovalentes, saturados ramificados, lineales o cíclicos, que tienen el número de átomos de carbono indicado en el prefijo. Por ejemplo, (C₁-C₈)alquilo significa que incluye metilo, etilo, n-propilo, 2-propilo, te/f-butilo, pentilo, ciclopentilo, ciclopropilmetilo y similares. Para cada una de las definiciones del presente (p. ej., alquilo, alquenilo, alcoxilo, aralquioxilo), cuando no se incluye un prefijo para indicar el número de átomos de carbono de la cadena principal en una porción alquilo, el radical o la porción del mismo tendrá ocho o menos átomos de carbono de la cadena principal.

El término «alquileno» significa un radical de hidrocarburo divalente saturado lineal o un radical de hidrocarburo divalente saturado ramificado que tiene el número de átomos de carbono indicado en el prefijo. Por ejemplo, (C₁-C₈)alquileno significa que incluye metileno, etileno, propileno, 2-metilpropileno, pentileno y similares.

El término «arilo» significa un radical de hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico monovalente o bivalente (p. ej., arileno) de 6 a 10 átomos de anillo que es no sustituido o sustituido independientemente por uno a cuatro sustituyentes, preferentemente uno, dos o tres sustituyentes seleccionados de los grupos que se indican más abajo. El término «arilo» también incluye los grupos anteriormente descritos en los que uno o más heteroátomos o grupos

5 funcionales de heteroátomos han sustituido a un carbono del anillo, conservando al mismo tiempo las propiedades aromáticas, p. ej., piridilo, quinolinilo, quinazolinilo, tienilo y similares. Más concretamente, el término arilo incluye, a título meramente enunciativo, fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, tienilo y benzotiazolilo, así como las formas sustituidas de los mismos.

10 Los sustituyentes de los grupos arilo son diversos y se seleccionan entre: -halógeno, -OR', -OC(O)R', -NR'R'', -SR', -R', -CN, -NO₂, -CO₂R', -CONR'R'', -C(O)R' -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR''C(O)₂R', -NR'-C(O)NR''R''', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R' -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -N₃, -CH(Ph)₂, perfluoro(C₁-C₄)alcoxilo, y perfluoro(C₁-C₄)alquilo, en un número que oscila entre cero y el número total de valencias abiertas del sistema de anillo aromático; y donde R', R'' y R''' se seleccionan independientemente entre hidrógeno, (C₁-C₈)alquilo y heteroalquilo no sustituidos, (arilo no sustituido)-(C₁-C₄)alquilo, y (arilo no sustituido)oxi-(C₁-C₄)alquilo.

20 Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden ser opcionalmente sustituidos por un sustituyente de la fórmula -T-C(O)-(CH₂)_q-U-, donde T y U son independientemente -NH-, -O-, -CH₂- o un enlace simple, y q es un número entero de 0 a 2. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden ser opcionalmente sustituidos por un sustituyente de la fórmula -A-(CH₂)_r-B-, donde A y B son independientemente -CH₂-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace simple, y r es un número entero de 1 a 3. Uno de los enlaces simples del nuevo anillo formado de este modo puede ser opcionalmente sustituido por un enlace doble. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del

25 anillo de arilo o heteroarilo pueden ser opcionalmente sustituidos por un sustituyente de la fórmula -(CH₂)_s-X-(CH₂)_t-, donde s y t son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, o -S(O)₂NR'-. El sustituyente R' en -NR'- y -S(O)₂NR'- se selecciona entre hidrógeno o (C₁-C₆)alquilo no sustituido. Adicionalmente, uno de los anillos de arilo (Ar¹ y Ar², más abajo) se puede sustituir también por otro grupo arilo sustituido, a fin de ampliar la capacidad de resonancia del sistema aromático, directa o indirectamente mediante grupos como -

30 (CR'=CR')_n- y -(C≡C)_n-, donde n es 0 a 5, incrementando la absorbancia de longitud de onda máxima.

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

35 Determinados compuestos u oligonucleótidos de la presente invención pueden existir en forma de sal. Estas sales incluyen sales por adición de base, como sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o sales de magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos u oligonucleótidos modificados de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, las sales por adición de ácido se pueden obtener poniendo en contacto la forma neutra de estos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien en estado puro o en un

40 solvente inerte apropiado. Algunos ejemplos de sales por adición de ácido aceptables incluyen las obtenidas de ácidos inorgánicos, como ácidos hidroc্লóricos, hidrobromicos, nítricos, carbónicos, monohidrogenocarbónicos, fosfóricos, monohidrogenofosfóricos, dehidrogenofosfóricos, sulfúricos, monohidrogensulfúricos, hidriódicos o fosfóricos y similares, así como las sales obtenidas de ácidos orgánicos, como ácidos acéticos, propiónicos, isobutíricos, maleicos, malónicos, lácticos, benzoicos, succínicos, subéricos, fumáricos, mandélicos, ftálicos, benzosulfónicos, p-tolilsulfónicos, cítricos, tartáricos, metanosulfónicos y similares. También se incluyen las sales de aminoácidos, como el arginato y similares, así como las sales de ácidos orgánicos, como los ácidos glucurónicos o galacturónicos y similares (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Science*, 1977, 66, 1-19). Determinados compuestos específicos de la presente invención contienen tanto funcionalidades básicas como ácidas, que permiten convertir los compuestos tanto en sales por adición de base como de ácido.

50 Las formas neutras de los compuestos se pueden regenerar poniendo en contacto la sal con una base o un ácido y aislando el compuesto precursor de la manera convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas de sales en determinadas propiedades físicas, como la solubilidad en solventes polares, pero, por lo demás, las sales son equivalentes a la forma precursora del compuesto para los fines de la presente invención.

55 Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas y solvatadas, incluyendo las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretende que queden incluidas en el ámbito de aplicación de la presente invención. Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. Por lo general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretende que queden incluidas en el ámbito de aplicación de la misma.

60

Determinados compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; se pretende que tanto las mezclas racémicas, como los diastereómeros, isómeros geométricos e

isómeros individuales queden incluidos en el ámbito de aplicación de la presente invención. Los métodos para determinar la estereoquímica y la separación de isómeros son bien conocidos en la técnica (véase la argumentación del capítulo 4 de *Advanced Organic Chemistry*, 4ª edición J. March, John Wiley and Sons, Nueva York, 1992).

Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que integran dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden ser radioetiquetados con isótopos radiactivos, como, por ejemplo, tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, sean radiactivas o no (p. ej., ^2H), queden incluidas en el ámbito de aplicación de la misma.

«Grupo protector» o «forma protegida del mismo» se refiere a una agrupación de átomos que cuando se unen a un grupo reactivo en una molécula enmascaran, reducen o impiden esa reactividad. Algunos ejemplos de grupos protectores se pueden encontrar en T.W. Greene y P.G. Wuts, *Protective Groups in Organic Chemistry*, (Wiley, 2ª ed. 1991) y Harrison y Harrison *et al.*, *Compendium of Synthetic Organic Methods*, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons. 1971-1996). Algunos grupos protectores amino representativos incluyen formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo (CBZ), fert-butoxicarbonilo (Boc), trimetilsililo (TMS), 2-trimetilsililo-etanosulfonilo (SES), tritilo y grupos de tritilo sustituidos, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), nitro-veratriloxicarbonilo (NVOC) y similares. Los grupos protectores hidroxilo representativos incluyen aquellos en los que el grupo hidroxilo está acilado o alquilado, como los éteres de bencilo y tritilo, así como los éteres de alquilo, éteres de tetrahidropirranilo, éteres de trialkilsililo y éteres de alilo.

«Opcional» u «opcionalmente» en las definiciones anteriores significa que el evento o la circunstancia que se describe a continuación puede ocurrir, aunque no necesariamente, y que la descripción incluye ejemplos en los que el evento o la circunstancia se produce y otros en los que no. Por ejemplo, «arilo opcionalmente mono- o di-sustituido por un grupo alquilo» significa que el grupo alquilo puede estar presente, aunque no necesariamente, y que la descripción incluye situaciones en las que el grupo arilo es mono- o di-sustituido por un grupo alquilo y situaciones en las que el grupo arilo no es sustituido por el grupo alquilo.

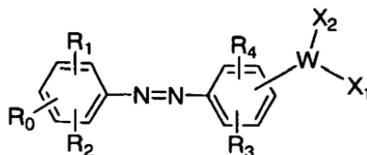
La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química orgánica, bioquímica, modificación y síntesis de oligonucleótidos, química de bioconjugados, hibridación de ácido nucleico, biología molecular, genética microbológica, ADN recombinante y técnicas relacionadas habituales en el campo. Estas técnicas se explican de forma detallada en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982); Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Gait (ed.), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press (1984); Eckstein (ed.), *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press (1991).

General

La divulgación proporciona a continuación una serie de reactivos que resultan útiles para la preparación de oligonucleótidos etiquetados, en particular para la preparación de conjugados de FL-ODN-Q-MGB. Adicionalmente, estos conjugados de fluoróforo-oligonucleótido-inhibidor de la fluorescencia-ligando de unión al surco menor pueden encontrarse en una disposición lineal (tal y como sugiere la fórmula) o en una disposición ramificada, en la que el inhibidor de la fluorescencia (Q) y el ligando de unión al surco menor (MGB) están unidos a un grupo de unión que sirve para unir el ODN, Q y MGB. Se entiende que ambas disposiciones están incluidas cuando se emplea la abreviatura lineal (FL-ODN-Q-MGB). Adicionalmente, FL, Q y MGB se pueden unir independientemente en el extremo 3', 5' o en posiciones internas del oligonucleótido, siempre que la unión no interfiera con los mecanismos inhibidores de la fluorescencia del conjugado.

Reactivos inhibidores de la fluorescencia para la síntesis de oligonucleótidos

En un aspecto, la presente divulgación proporciona reactivos inhibidores de la fluorescencia para la síntesis de oligonucleótidos con la fórmula siguiente:



donde W es un grupo de unión que tiene entre 3 y 100 átomos de la cadena principal seleccionados entre C, N, O, S, P y Si y que puede ser cíclico, acíclico, aromático o combinaciones de los mismos; X₁ es H, (C₁-C₁₂)alquilo, arilo, heteroarilo, un grupo funcional protegido o no protegido (p. ej., un éster o ácido hidroxilo, amino o carboxílico que opcionalmente está protegido con un grupo protector adecuado, conocido por los expertos en la técnica); X₂ es

cualquier fracción de unión a fósforo empleada en la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, una fosforamidita de la fórmula $O-P(N(iPr)_2)(OCH_2CH_2CN)$, o alternativamente, un grupo de unión unido a un soporte sólido de la fórmula $O-C(=O)Z$ -soporte sólido, donde Z tiene de 1 a 30 átomos de longitud de la cadena principal y donde los átomos de la cadena principal se seleccionan entre C, N, O, P, y S, y Z puede incluir grupos cíclicos, acíclicos o aromáticos, o combinaciones de los mismos; y R_0 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo compuesto por H, halógeno, NO_2 , SO_3R , $SO_2N(R)_2$, $C(O)OR$, $C(O)N(R)_2$, CN, CNS, OR, $OC(O)R$, SR, CF_3 , $NHC(O)R$, $N(R)_2$ o $N(R)_3$ donde cada R es independientemente H, (C_1-C_8) alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo de unión clivable que está unido a un soporte sólido, o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos y opcionalmente, dos elementos seleccionados entre R_0 , R_1 y R_2 se combinan para formar un anillo de cinco o seis miembros que tiene de cero a tres heteroátomos como miembros del anillo; y opcionalmente R_3 y R_4 se combinan para formar un anillo de cinco o seis miembros que tiene de cero a tres heteroátomos como miembros del anillo. En aquellas realizaciones en las que se combinan R_3 y R_4 para formar un sistema de anillo fusionado, el grupo de unión W se puede unir al anillo de fenilo (como se ha indicado anteriormente) o bien al anillo formado por R_3 y R_4 . Adicionalmente, en aquellas realizaciones del presente en las que los dos grupos alquilo se unen a un átomo de nitrógeno, formando un sustituyente dialquilamino, los grupos alquilo pueden ser iguales o diferentes.

El grupo de unión W puede ser básicamente cualquier grupo de unión que tenga entre 3 y 100 átomos, distintos de átomos de hidrógeno, seleccionados entre C, N, O, S, P y Si, y es cíclico, acíclico, aromático o una combinación de los mismos. Adicionalmente, los grupos de unión serán suficientemente robustos como para mantenerse estables en las condiciones de reacción empleadas en la síntesis de oligonucleótidos, así como en las químicas de protección/desprotección empleadas para preparar los conjugados que se describen detalladamente más adelante. La Patente estadounidense nº 5.512.667 describe un conector de prolinol, mientras que las Patentes estadounidenses nº 5.451.463 y 5.141.813 describen conectores acíclicos que se pueden emplear en la presente invención. Adicionalmente, las Patentes estadounidenses nº 5.696.251, 5.585.422 y 6.031.091 describen determinados grupos de unión tetrafuncionales que pueden ser modificados para emplearlos en la presente divulgación o utilizarse en la preparación de composiciones en las que, por ejemplo, hay dos fluoróforos presentes en el conjugado. Los grupos funcionales de los conectores incluyen nitrógeno primario y secundario, OH primario y secundario, y -SH.

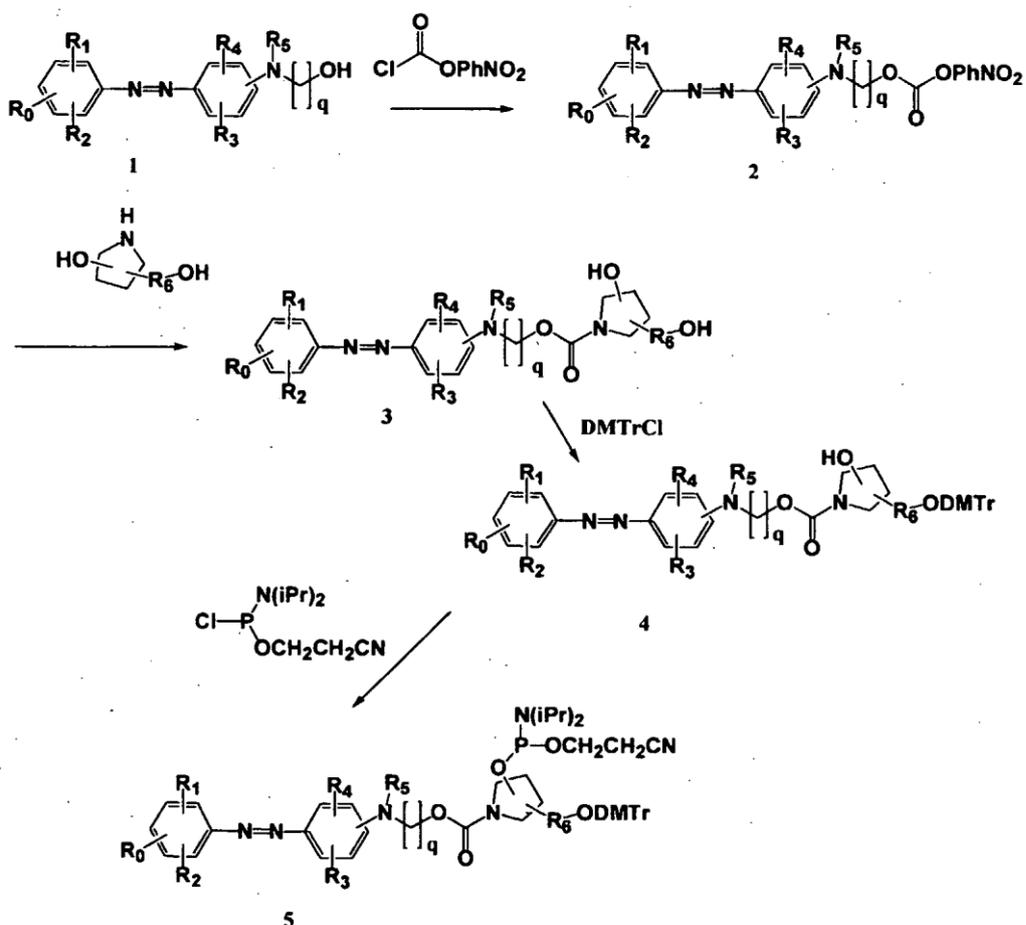
Fosforamiditas inhibidoras de la fluorescencia protegidas con dimetoxitritilo

Un tipo concreto de reactivo divulgado en el presente son las fosforamiditas que portan la molécula inhibidora de la fluorescencia (Q), así como un alcohol primario protegido con dimetoxitritilo (DMTr) (metoxitritilo, tritilo o un grupo de bloqueo lábil al ácido similar) que proporciona un punto de unión para la cadena de oligodesoxinucleótidos (ODN) creciente durante la posterior síntesis de oligonucleótidos. Algunos ejemplos de estos reactivos se ilustran en las Fórmulas 1, 2 y 3, así como en los Esquemas de reacción 1 y 2.

En el Esquema de reacción 1, el compuesto de partida es una 4-(fenildiazenil)fenilamina sustituida 1 que tiene un grupo hidroxilo primario. Estos materiales de partida están disponibles en el mercado o se pueden sintetizar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la sal de 4-nitrobenceno-diazonio se puede hacer reaccionar con 2-(2-cloroanilino)etanol para obtener 2-[2-cloro-4-(4-nitrofenilazo)anilino]etanol (véase la Patente estadounidense nº 2.264.303). El 2-[2-cloro-4-(4-nitrofenilazo)anilino]etanol se encuentra dentro del ámbito de aplicación del compuesto 1 ilustrado en el Esquema de reacción 1.

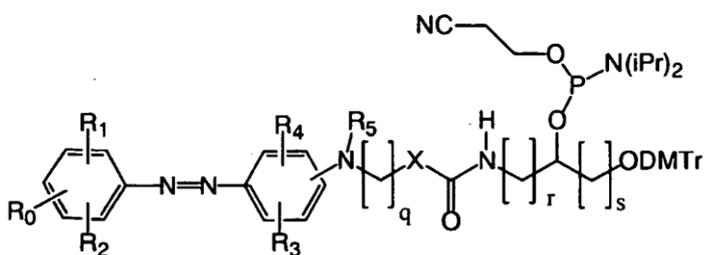
Otros ejemplos de materiales de partida disponibles en el mercado (o de sus precursores) son los siguientes: 2-(etil{4-[(4-nitrofenil)diacenil]fenil}amino)etan-1-ol y 2-(etil{4-[(2-metoxi-4-nitrofenil)diacenil]fenil}amino)etan-1-ol.

Volviendo al Esquema de reacción 1, el compuesto 1 se hace reaccionar con p-nitrofenilcloroformiato para obtener el carbonato 2. La reacción de 2 con pirrolidindioles sustituidos proporciona un diol intermedio 3. El pirrolidindiol es un reactivo trifuncional que tiene un grupo amino, y un grupo hidroxilo primario y uno secundario. Un ejemplo de un pirrolidindiol, así como ejemplos de otros reactivos trifuncionales que tienen un amino, un grupo hidroxilo primario y uno secundario, se describen en la Patente estadounidense nº 5.512.667. El diol 3 se hace reaccionar primero con cloruro de dimetoxitritilo (DMTrCl) para bloquear el grupo hidroxilo primario del reactivo trifuncional y producir un intermedio 4. El intermedio 4, que todavía tiene un grupo hidroxilo secundario libre en el reactivo trifuncional, se hace reaccionar a continuación con 2-cianoetil diisopropilcloro-fosforamidita para obtener el reactivo de fosforamidita 5 protegido con dimetoxitritilo. En los compuestos mostrados en el Esquema de reacción 1, los símbolos se definen como sigue: R_0 , R_1 , R_2 , R_3 , y R_4 son independientemente H, halógeno, NO_2 , SO_3R , $SO_2N(R)_2$, $C(O)OR$, $C(O)N(R)_2$, CN, CNS, OR, $OC(O)R$, SR, CF_3 , $NHC(O)R$, $N(R)_2$ o $N(R)_3$ donde cada R es independientemente H, (C_1-C_8) alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos; R_5 es H, (C_1-C_8) alquilo, arilo (y heteroarilo); R_6 es un grupo de unión que tiene entre 1 y 15 átomos de la cadena principal seleccionados entre C, N, O, P y S, preferentemente un grupo CH_2 o CH_2CH_2 ; y $q=1$ a 20. El reactivo de fosforamidita 5 protegido con dimetoxitritilo es adecuado para la unión a oligonucleótidos en fases también conocidas en síntesis rutinaria de ODN.

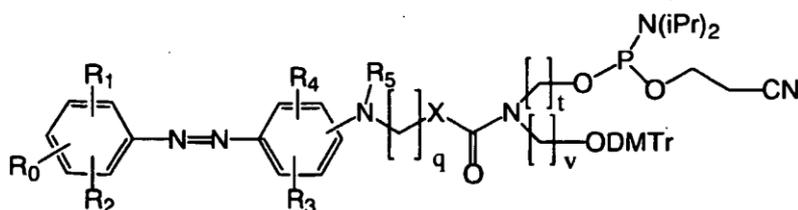


ESQUEMA DE REACCIÓN 1

5 Las reacciones descritas en el Esquema de reacción 1 se pueden aplicar a la preparación de otros inhibidores de la fluorescencia activados que comienzan por otros grupos de unión que tienen un grupo amino y dos grupos hidroxilo. Por consiguiente, las fosoramiditas de la Fórmula 1 y la Fórmula 2 se pueden sintetizar, donde q, R₀, R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅, se definen como anteriormente; r y s son, cada uno independientemente, números enteros entre 1 y 20; X es -O- o -CH₂-; y t y v son, cada uno de ellos independientemente, números enteros entre 1 y 20.

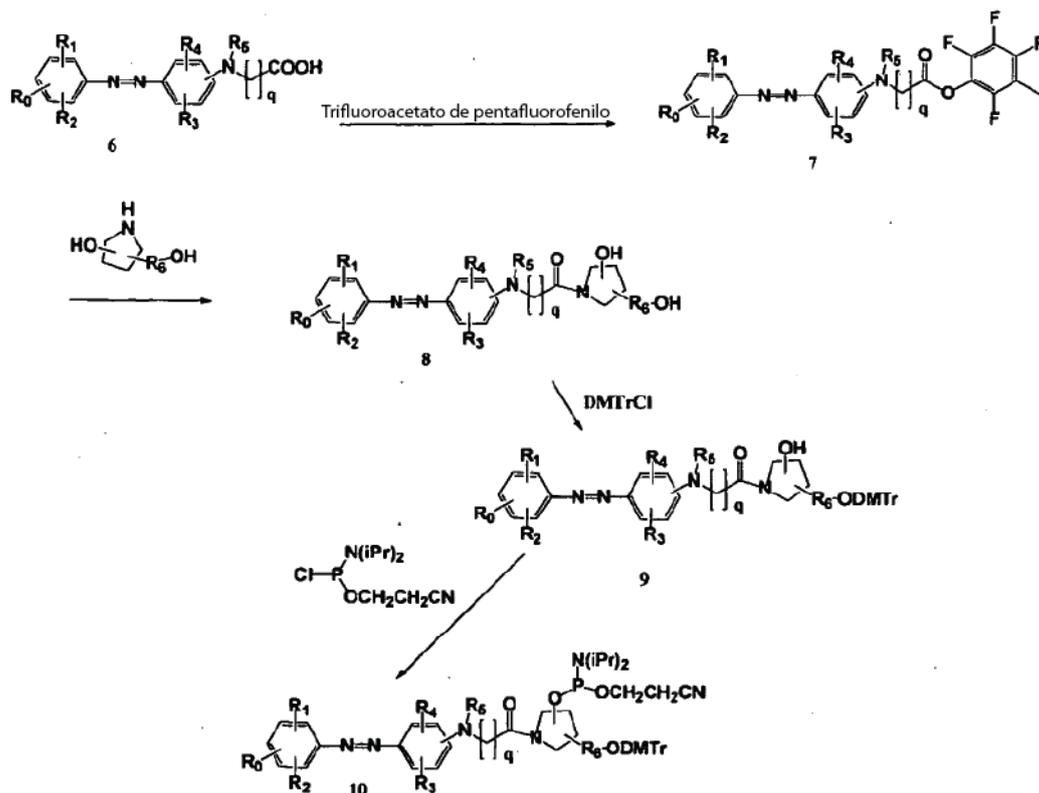


Fórmula 1



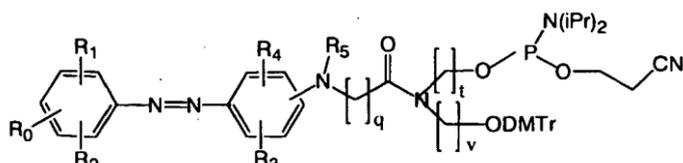
Fórmula 2

El esquema de reacción 2 divulga la síntesis de otro ejemplo de reactivo de fosoramidita 10 que porta la fracción inhibidora de la fluorescencia 4-(fenildiazenil)-fenil-amina sustituida e incluye un grupo de unión a pirrolidindiol. En este esquema sintético, el material de partida es un compuesto de 4-(fenildiazenil)fenilamina sustituido 6 que tiene un grupo carboxilo libre. El compuesto 6 (disponible en el mercado o elaborado conforme a la bibliografía química) se hace reaccionar con pentafluorofenil trifluoroacetato para producir un éster activo 7, que posteriormente se hace reaccionar para unir la fracción de 4-(fenildiazenil)-fenilamina sustituida al nitrógeno del anillo de una fracción de pirrolidindiol que tiene un grupo hidroxilo primario libre y uno secundario libre, obteniendo el compuesto 8. El tratamiento de 8 con DMTrCl seguido de la reacción con 2-cianoetil diisopropilclorofosoramidita proporciona el reactivo de fosoramidita 10 protegido con dimetoxitritilo. En el Esquema de reacción 2, los símbolos se definen igual que en el Esquema de reacción 1.



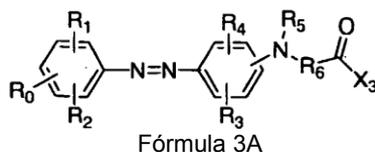
ESQUEMA DE REACCIÓN 2

En otro ejemplo más, utilizando las reacciones descritas en el Esquema de reacción 2, comenzando con una 4-(fenildiazenil)fenilamina sustituida (compuesto 6) y utilizando un reactivo no cíclico (que tiene una función amino y dos hidroxilo), en lugar del pirrolidindiol mostrado en el Esquema 2, se sintetiza la fosoramidita protegida con dimetoxitritilo de la Fórmula 3, donde q, R₀, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, y R₆ se definen igual que antes y t y v son, independientemente, de 1 a 20.



Fórmula 3

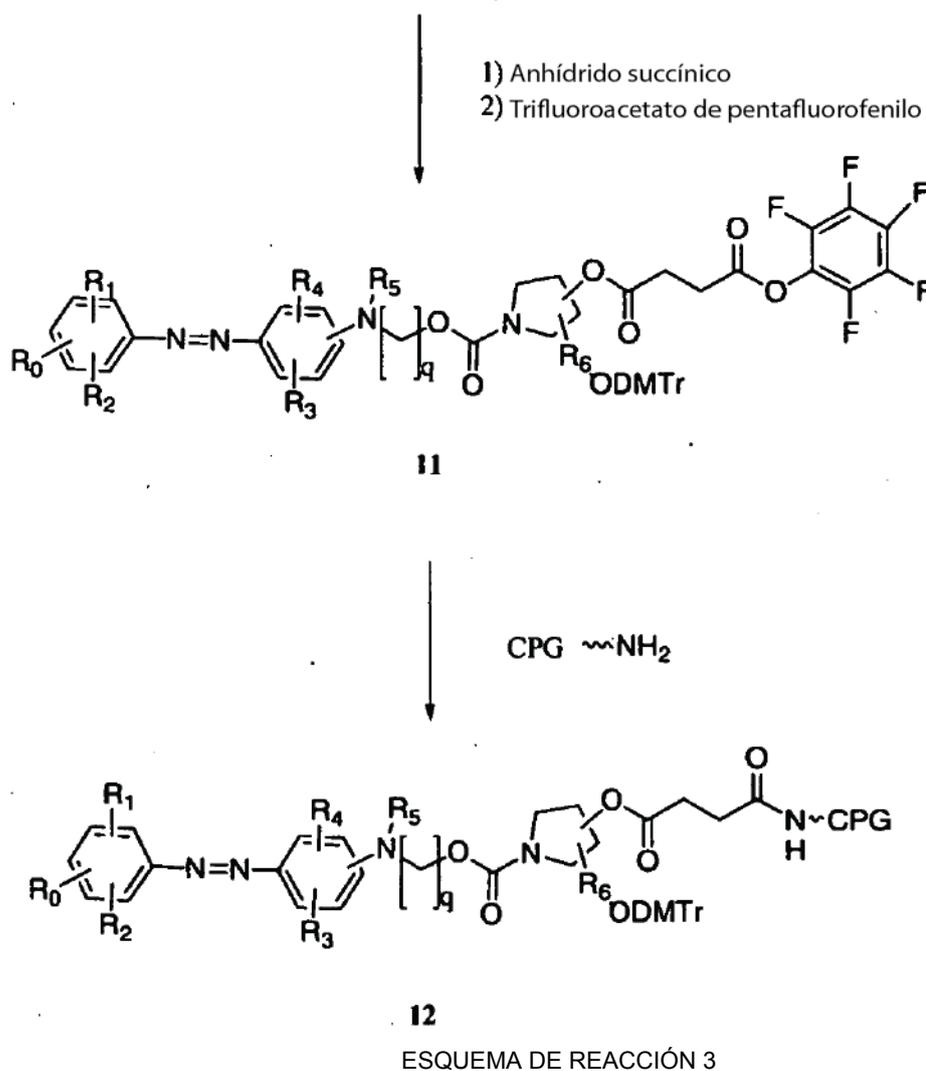
Volviendo al Esquema de reacción 2, un experto en la técnica entenderá que determinados compuestos intermedios, como el compuesto 7, resultan útiles en la modificación posterior a la síntesis de oligonucleótidos o conjugados de oligonucleótidos. Por ejemplo, el compuesto 7 y los ésteres activados relacionados se pueden utilizar para modificar un grupo funcional reactivo, como un grupo aminoalquilo, con posterioridad a la síntesis. Los reactivos útiles para esta modificación tienen la fórmula que se proporciona a continuación como Fórmula 3A:



5 donde los símbolos R_0 , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , y R_6 son como se ha descrito anteriormente y X_3 es un grupo saliente como pentafluorofenilo, succinimidilo u otro grupo similar que hace que la fracción de carbonilo sea más reactiva a los nucleófilos (p. ej., compuestos con grupos reactivos como $-NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $-SH$ y $-NHC(O)NHNH_2$).

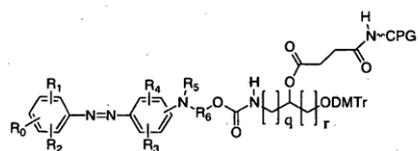
10 **Inhibidores de la fluorescencia unidos a un soporte sólido a través de un conector protegido (o de forma similar) adecuado para la síntesis de ODN**

En un aspecto relacionado, se proporciona una segunda clase de compuestos o reactivos adecuados para introducir las moléculas inhibidoras de la fluorescencia en los ODN, que tienen un soporte sólido unido del tipo empleado para la síntesis de ODN (por ejemplo, vidrio de poro controlado (CPG)) y un conector que une el inhibidor de la fluorescencia con el soporte sólido. El conector tiene una función hidroxilo que está protegida, habitualmente a través de un grupo dimetoxitritilo que se elimina durante la síntesis cuando se une el primer nucleótido al conector. Por lo general, se pueden utilizar los mismos intermedios de inhibidor de la fluorescencia/conector anteriormente descritos en el Esquema de reacción 1 para preparar estos reactivos (empleando, por ejemplo, gránulos de CPG) con la estructura de ejemplo 12, mostrada en el Esquema de reacción 3.

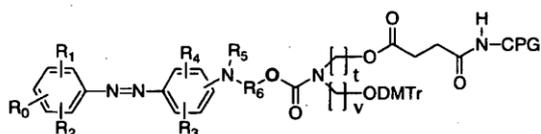


El grupo hidroxilo secundario del intermedio 4 (mostrado en el Esquema 1) se hace reaccionar con anhídrido succínico y, a continuación, con pentafluorofenil trifluoroacetato para obtener el éster activo 11. A continuación, el éster activo 11 se hace reaccionar con el grupo amino libre unido al soporte sólido (gránulo de CPG) para proporcionar el soporte sólido modificado 12. A pesar de que el soporte sólido modificado 12 del ejemplo incluye el «conector» obtenido de pirrolidindiol, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que también se pueden preparar soportes sólidos modificados análogos, incluyendo otros conectores y estructuras relacionadas, como los conectores mostrados en las Fórmulas 1, 2 y 3, sustancialmente de conformidad con el Esquema de reacción 3, resultando en composiciones de soporte sólido modificado que incluyen la fracción inhibidora de la fluorescencia, como las mostradas en la Fórmula 4 y la Fórmula 5.

Las composiciones del soporte sólido modificado, incluyendo la fracción inhibidora de la fluorescencia de la estructura 12 y de la Fórmula 4 y la Fórmula 5 son útiles para preparar conjugados de 3'-inhibidor de la fluorescencia, que a su vez permiten introducir un fluoróforo en el extremo 5' con la fosoramidita adecuada, o con posterioridad a la síntesis con un fluoróforo que contiene un grupo reactivo. En el Esquema de reacción 3 y en la Fórmula 4 y la Fórmula 5, los símbolos se definen como antes. Debe entenderse que también se pueden preparar otros soportes sólidos (como poliestireno) y otros sistemas de conector clivables (además del conector de succinato mostrado), de conformidad con estas enseñanzas generales, y que también se encuentran en el ámbito de aplicación de la invención.



Fórmula 4

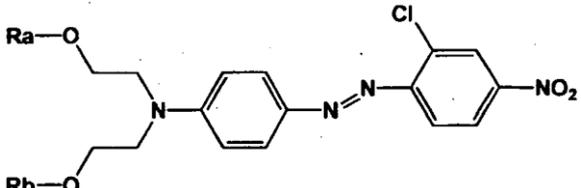
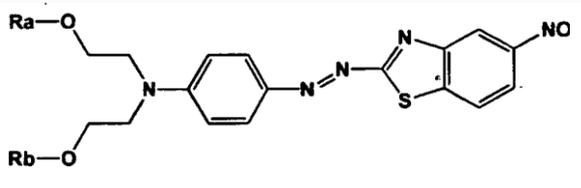
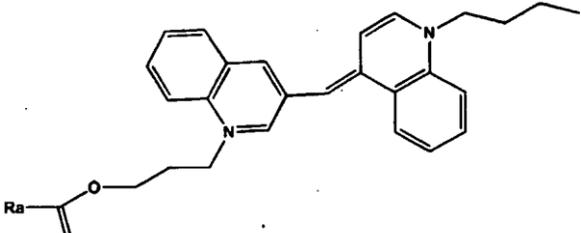


Fórmula 5

Los esquemas de reacción anteriormente proporcionados pueden ser adaptados por un experto en la técnica para incorporar diversos compuestos diazo. Resultan particularmente útiles los compuestos diazo mostrados en la tabla siguiente (donde cada Ra y Rb representan independientemente un grupo funcional o un grupo funcional protegido para unir el inhibidor de la fluorescencia a un conjugado o grupo de unión).

Tabla 1

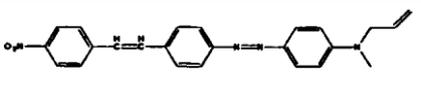
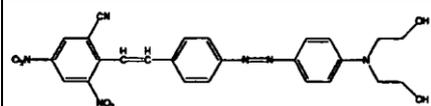
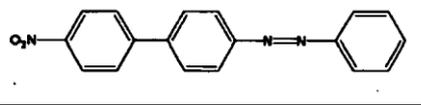
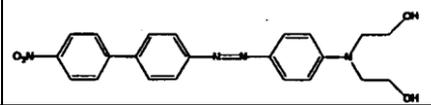
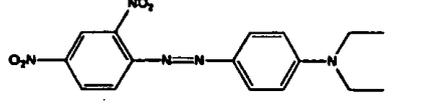
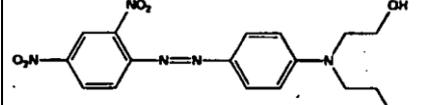
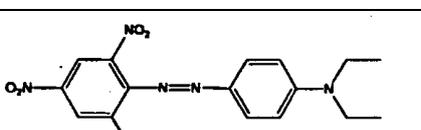
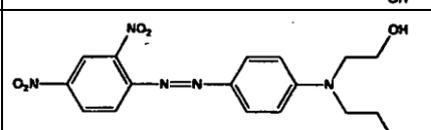
Estructura	λ_{max} nm	ϵ M ⁻¹ cm ⁻¹
	453	~40,000

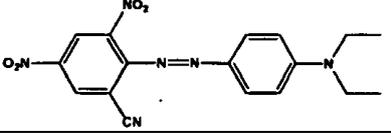
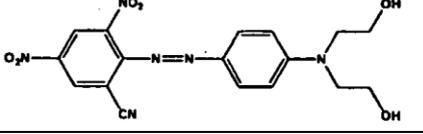
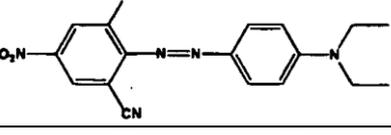
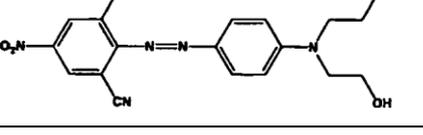
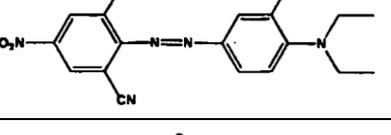
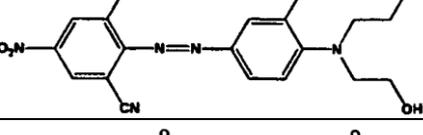
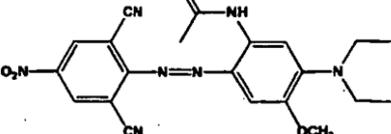
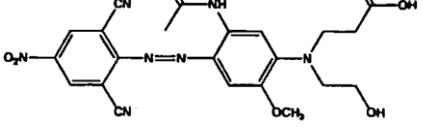
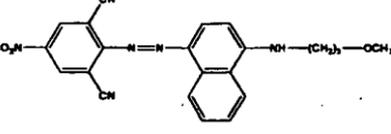
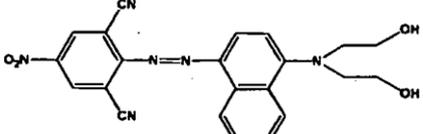
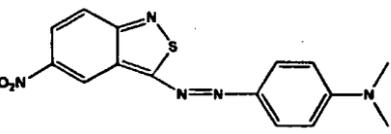
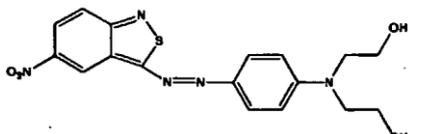
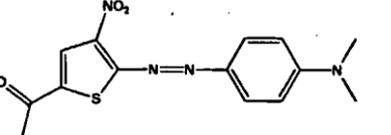
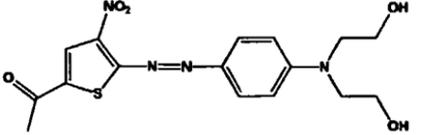
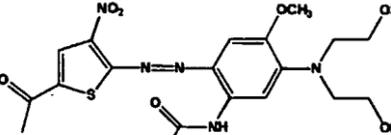
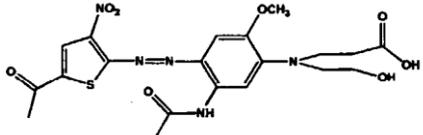
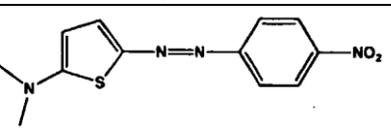
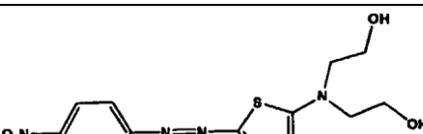
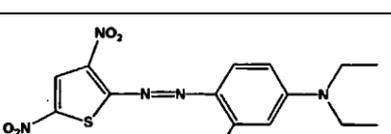
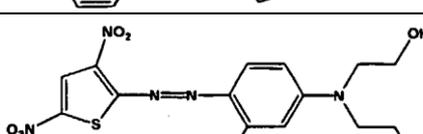
	522	-40,000
	538	~40,000
	595	>150,000

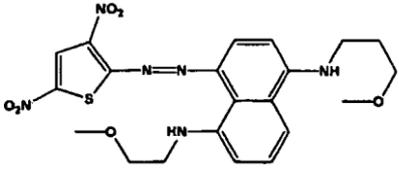
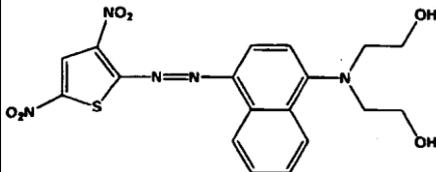
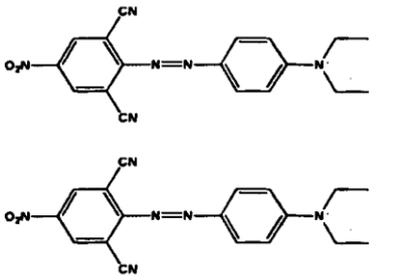
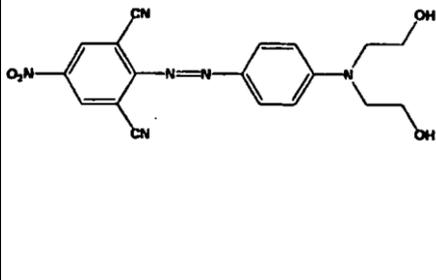
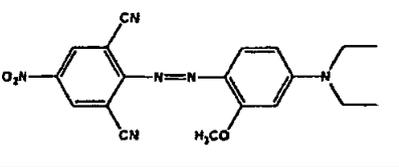
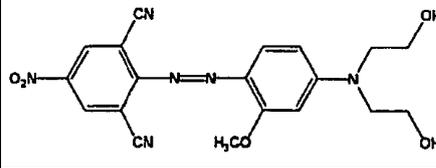
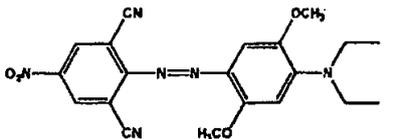
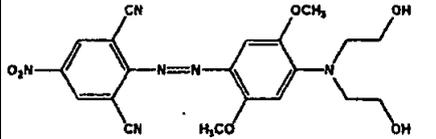
Se observó una variación de la absorbancia λ_{max} a una longitud de onda mayor al aumentar la conjugación (p. ej., añadiendo más anillos y/o enlaces dobles) además de las sustituciones.

- 5 La Tabla 2 contiene estructuras adicionales de inhibidores de la fluorescencia que se pueden modificar fácilmente, por ejemplo, conforme a la estructura relacionada que tiene grupos funcionales adecuados para la introducción en sondas, basándose en las reacciones químicas conocidas citadas (véase, por ejemplo, Thiel et al., *J. furprakt. Chemie*, 328:497-514 (1986); Patentes estadounidenses n° 4.324.721 y 4.054.560; Timm, *Melliand Textilberichte*, 9:1090-1096 (1969); Hallas, *J.S.D.C.* 285-294 (1979); Beyer et al., *J Prakt. Chem.*, 24:100-104 (1964); Hutchings et al., *Chem. Europ. J.* 3:1719-1727 (1997) y Morley et al., *J. Phys. Chem. A.*, 102:5802-5808 (1998); Haak et al., *J. Chem. Res. Miniphnt* 10:2701-2735 (1998) y Ruggli et al., *Helv. Chim. 5 Acta*, 26:814-826 (1943). Se pueden preparar estructuras adicionales con diferentes combinaciones de sustituyentes en diversas posiciones, basándose en compuestos y métodos conocidos en el campo de la química de los colorantes (resumidos en el Color Index, Número 3 del CDD-ROM, páginas 4009-4324; Society of Dyers and Colourists, Bradford, Inglaterra; <http://www.sdc.org.uk>).

Tabla 2

Bibliografía de estructuras	λ_{max} nm; ϵ M ⁻¹ cm ⁻¹ ; Solv ente	Conector-estructura modificada
	464	
	440	
	540; 40.000 MeOH	
	549 37.000 EtOH	

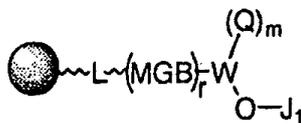
	590 48.978 CHCl ₃	
	601 40.738 CHCl ₃	
	623 48.000 CHCl ₃	
	656 100.000 CHCl ₃	
	656 53.043	
	598	
	582	
	652	
	554 50.000	
	673,5	

	809	
	592 46.000	
	601 51.000	
	623 48.000	

Los inhibidores de la fluorescencia anteriores cubren aproximadamente el rango de 400-800 nm y muchos demuestran una inhibición de la fluorescencia mejorada cuando se unen a un MGB. A pesar de que las versiones modificadas ilustran $-N(CH_2CH_2OH)_2$ como un grupo de unión preferente a utilizar para unir el inhibidor de la fluorescencia a los nucleótidos, el MGB o el soporte sólido, otros ejemplos de conectores adecuados son conocidos en la técnica o se proporcionan en el presente.

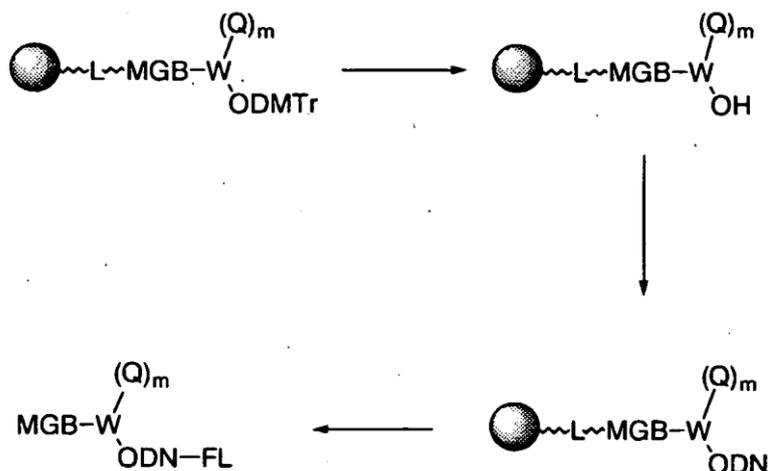
Reactivos inhibidores de la fluorescencia de ligandos de unión al surco menor para la síntesis de oligonucleótidos

En otro aspecto de la invención, se une un ligando de unión al surco menor (MGB) a un soporte sólido (p. ej., vidrio de poro controlado (CPG)), a través de un conector clivable. Una fracción inhibidora de la fluorescencia, basada en el tipo de estructura $Ar^1-N=N-Ar^2-$, se une a través de una molécula conectora (W) al MGB. La molécula conectora también contiene un grupo hidroxilo bloqueado con el grupo de bloqueo DMTr (o similar). Por consiguiente, la presente divulgación proporciona soportes sólidos modificados que tienen la estructura siguiente:



Donde la esfera sombreada representa cualquier soporte sólido que resulte útil en la síntesis de oligonucleótidos, L representa un conector clivable, MGB es un ligando de unión al surco menor y el subíndice es 0 o 1; W es un grupo de unión que tiene entre 3 y 100 átomos, distintos de átomos de hidrógeno, seleccionados entre C, N, O, S, P y Si, y es cíclico, acíclico o una combinación de cíclico y acíclico; Q es un inhibidor de la fluorescencia y el subíndice es 0 o 1, lo que indica que el inhibidor de la fluorescencia es opcional, y $-O-J_1$ es un grupo hidroxilo bloqueado con grupo protector (preferentemente un grupo protector de dimetoxitritilo). Después de retirar el grupo protector, se puede sintetizar un oligonucleótido en un sintetizador de oligonucleótidos automatizado mediante la unión por etapas de unidades de nucleótidos al grupo hidroxilo. Entonces se puede introducir un fluoróforo en el extremo 5' con la fosoramidita apropiada, o con posterioridad a la síntesis con un fluoróforo que contiene un grupo reactivo, para producir un ODN que tiene unida una fracción fluorescente (FL), un inhibidor de la fluorescencia (Q) y un MGB (FL-ODN-Q-MGB). Un experto en la técnica apreciará en los esquemas del presente que, a pesar de que los conjugados

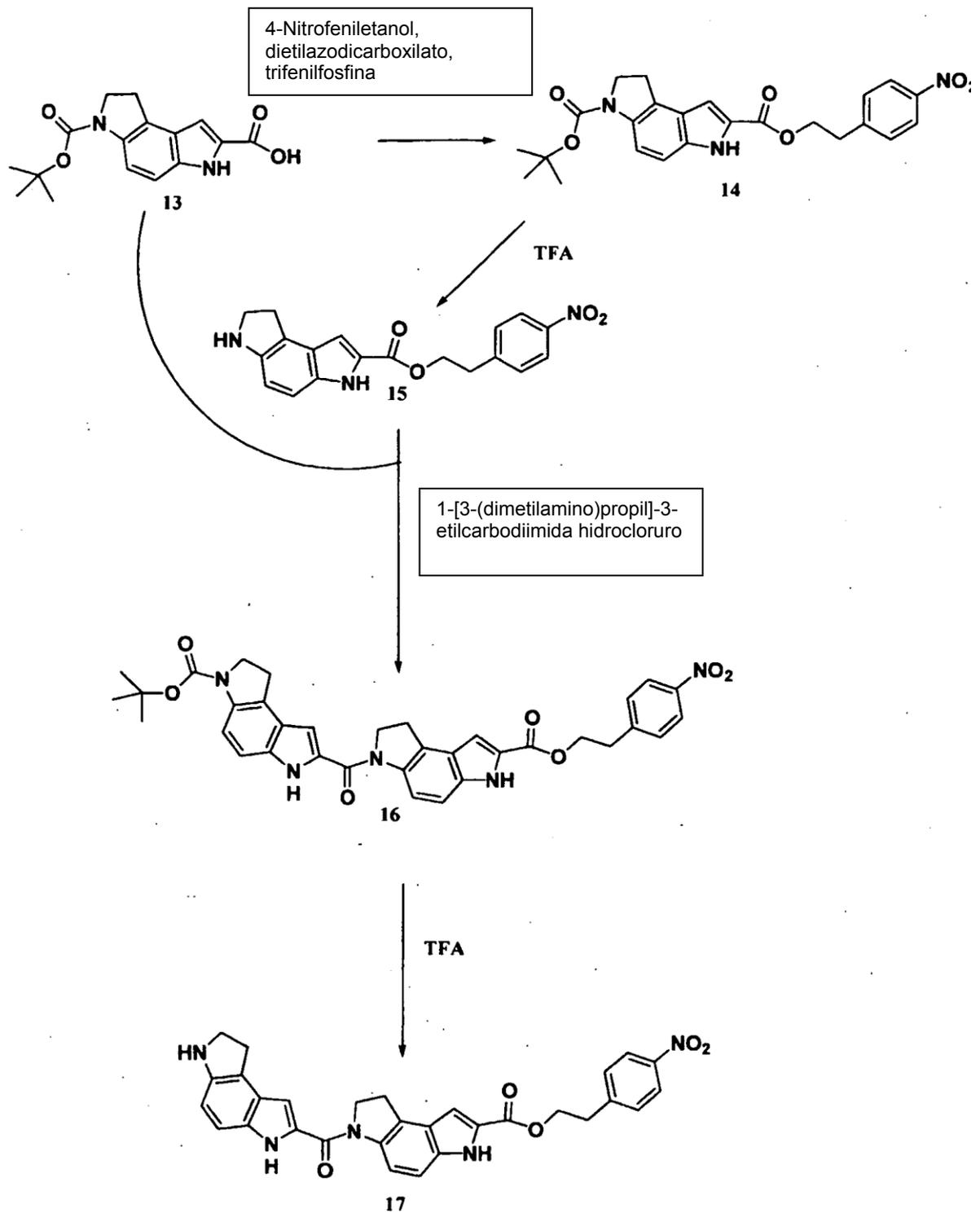
de FL-ODN-Q-MGB se pueden describir de forma lineal, el inhibidor de la fluorescencia (Q) y el ligando de unión al surco menor (MGB) también se pueden unir a un grupo de unión común y proporcionar una fórmula de estructura «ramificada» como la que se ilustra a continuación.



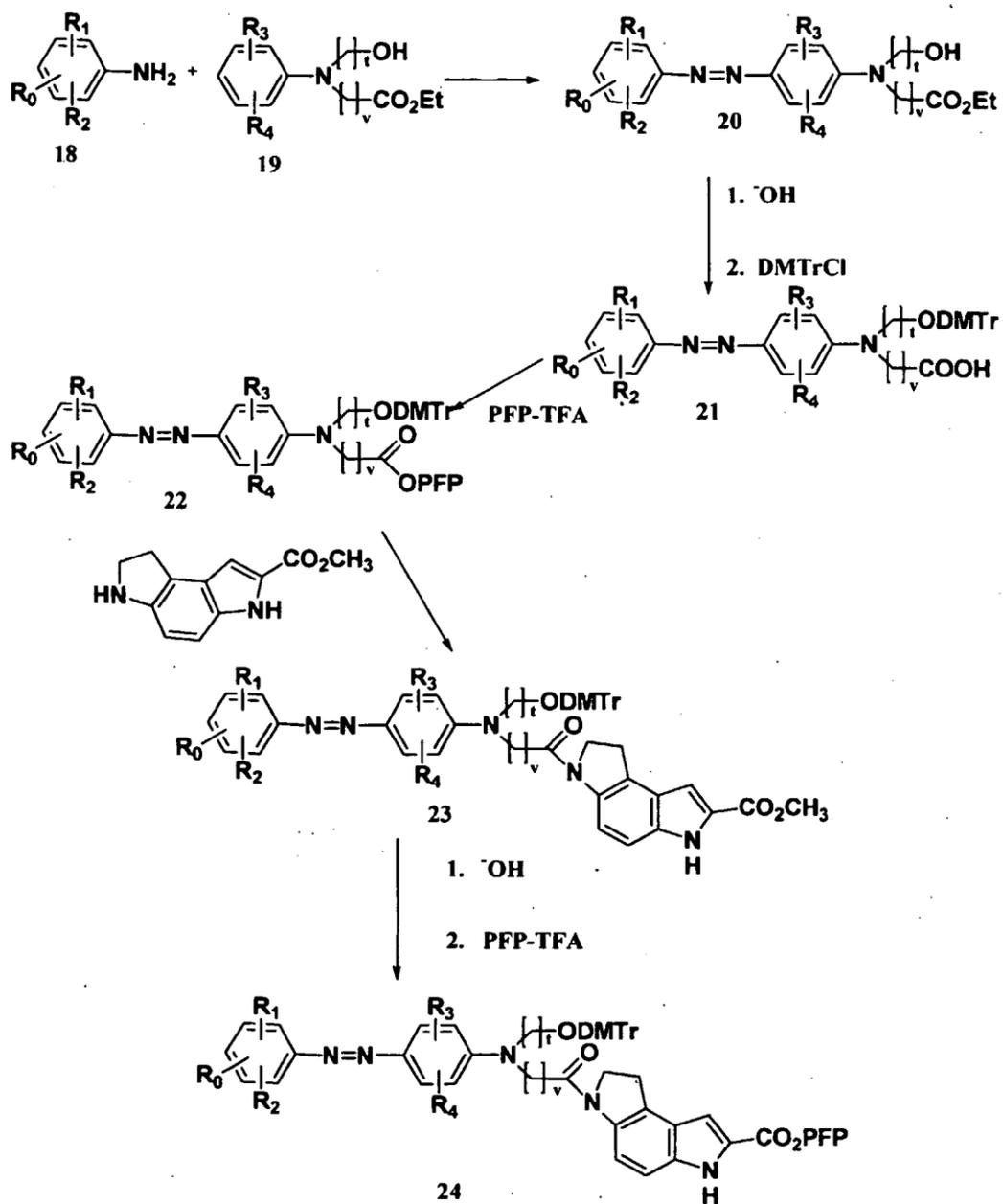
5 En general, la síntesis de MGB y su unión a los ODN es bien conocida (véase, por ejemplo, la Patente estadounidense nº 5.801.155; y las solicitudes copendientes Ser. nº 09/539.097 y 09/141.764). Un 5'-MGB-Q-ODN-FL se obtiene mediante síntesis, utilizando una 5'-fosforamidita en lugar de una 3'-fosforamidita. Las 5'-fosforamiditas están disponibles en el mercado y las 5'-fosforamiditas de base modificada se pueden preparar
10 utilizando métodos bien conocidos.

En una realización preferible, el MGB es ácido 3-[[3-(pirrolo[4,5-e]indolin-7-icarboxil)pirrolo[4,5-e]indolin-7-il]carboxil]pirrolo[3,2-e]indolin-7-carboxílico (DPI₃). La síntesis del «agregado» FL-ODN-Q-DPb unido covalentemente requiere cinco fases, que se describen a continuación. La primera fase, mostrada en el Esquema de reacción 4, es la síntesis de un intermedio, 2-(4-nitrofenil)etil 3-(pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxil)pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato (DPI₂-NPC) 17. La segunda fase, mostrada en el Esquema de reacción 5, es la síntesis de Q-DMTr-DPI-CO₂PFP 24 donde se une un inhibidor de la fluorescencia a través de un conector a una unidad de ácido pirrolo[3,2-e]indolin-7-carboxílico (DPI). Aquí, y en los esquemas de reacción, PFP significa el grupo pentafluorofenil o pentafluorofeniloxi, según lo exija el contexto. En la tercera fase, mostrada en el Esquema de reacción 6, DMTr-Q-DPI₃-PFP 25a se sintetiza a partir de 17 y 24. En la cuarta fase, 25a se une a CPG para obtener un DMTr-Q-DPI₃-CPG 29, y en la quinta fase, se emplea 29 en un sintetizador de oligonucleótidos automatizado para unir por etapas las unidades de nucleótidos, a fin de proporcionar, una vez retirado el CPG, el producto FL-5'-ODN-3'-Q-DPI₃ 30.
15
20

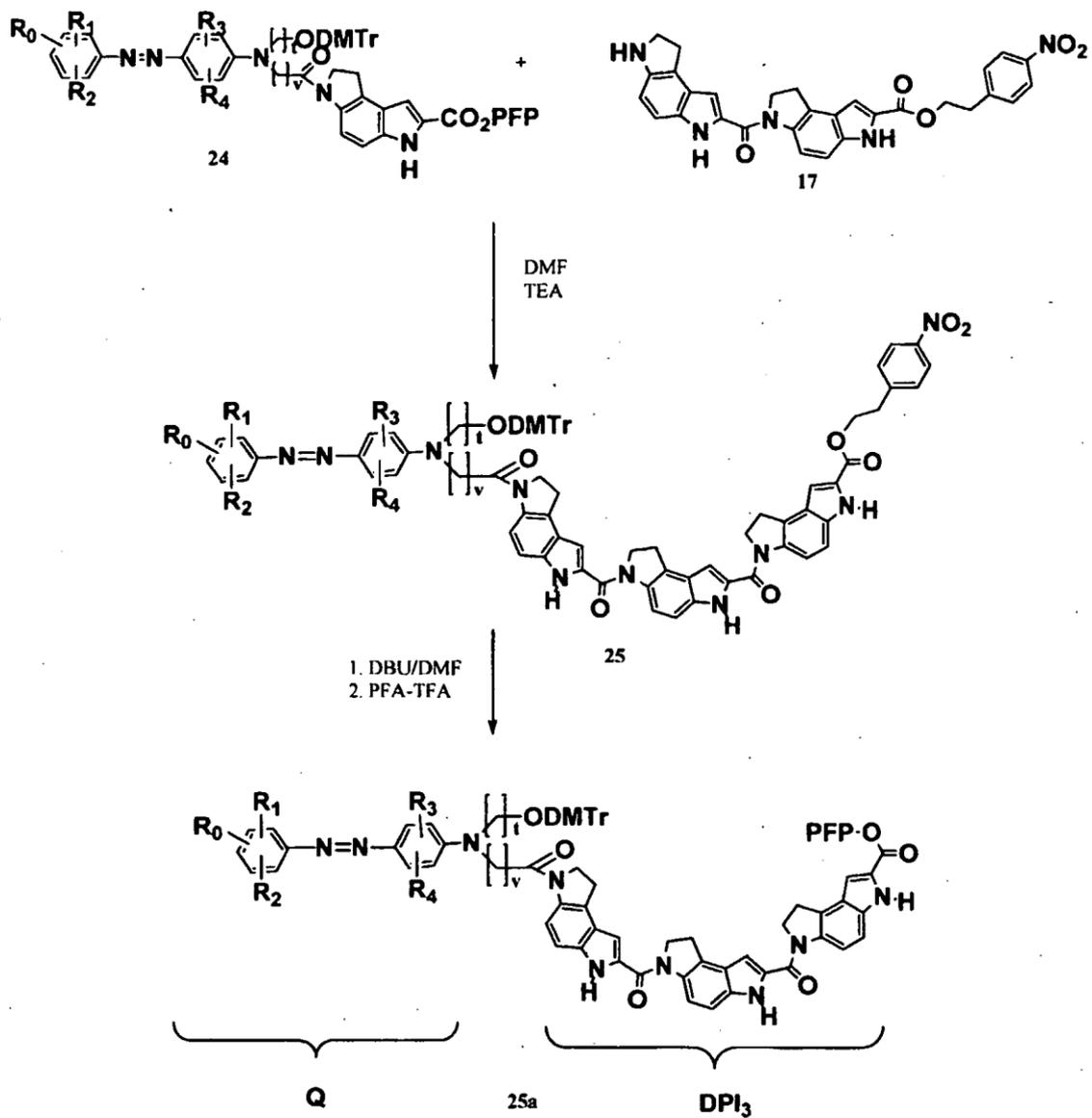
Las fases cuarta y quinta de este proceso sintético se muestran en el Esquema de reacción 7. Las condiciones experimentales para esta secuencia (fases 1 a 5) se describen a continuación.
25



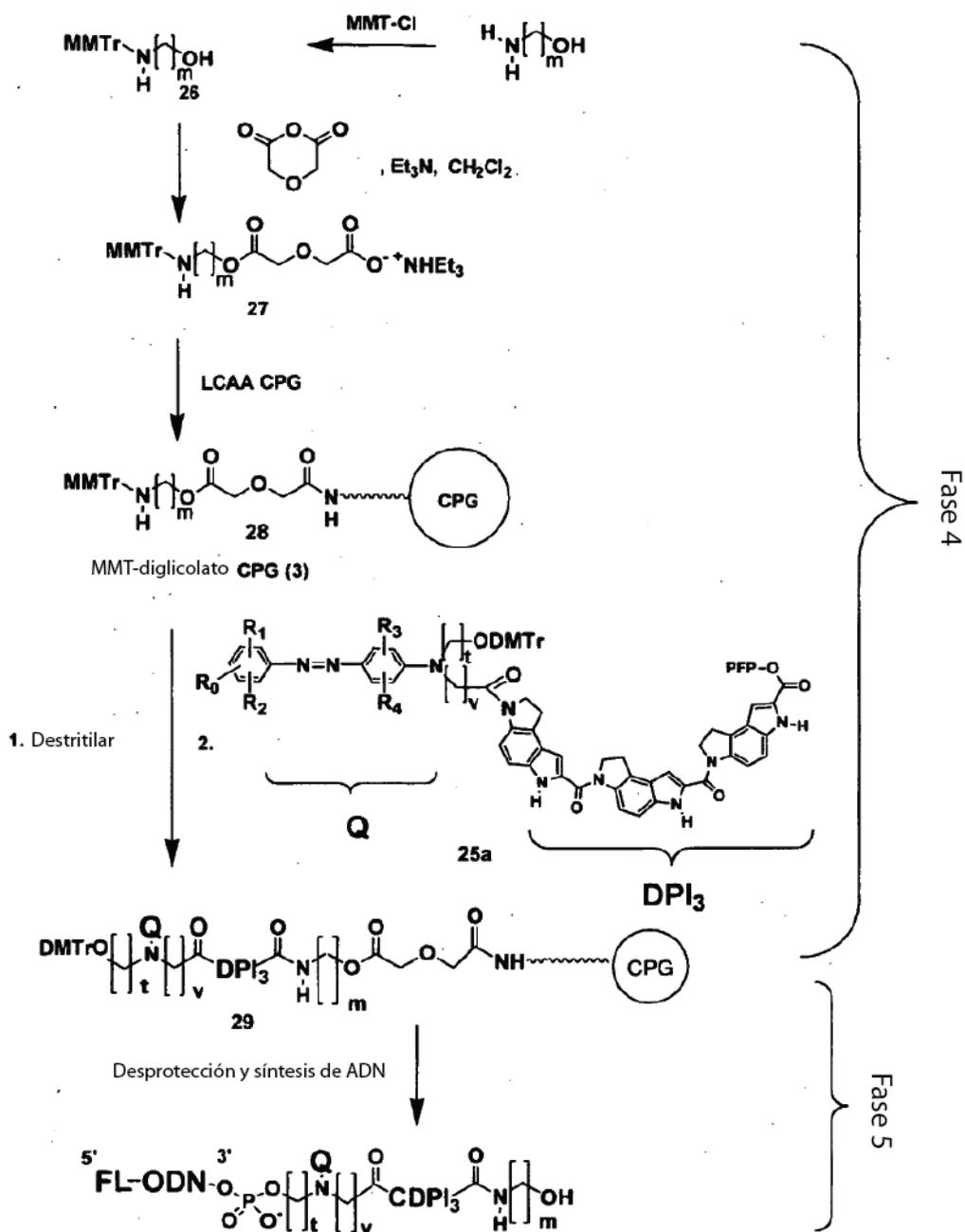
ESQUEMA DE REACCIÓN 4



ESQUEMA DE REACCIÓN 5



ESQUEMA DE REACCIÓN 6



5

ESQUEMA DE REACCIÓN 7

Ahora se describirán estas fases o reacciones de forma más detallada. La fracción de Q-DPI₃ 25 (fase 3) se sintetiza mediante la reacción de dos intermedios, 17 y 24, como se muestra en el Esquema de reacción 6. El primer intermedio, DPI₂-NPE 17, se prepara como se muestra en el Esquema 4. Se hizo reaccionar DPI-tBoc 13 con p-nitrofeniletanol en presencia de dietilazodicarboxilato (DEAD) y trifetilfosfina para obtener el diéster 14. Posteriormente, el compuesto 14 fue tratado con ácido trifluoroacético (TFA) para obtener 15 y conjugado con 13 en presencia de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida hidroclicloruro para proporcionar el éster 4-nitrofenil de DPI₂16 con un rendimiento adecuado. La reacción de 16 con TFA proporciona el éster p-nitrofenetil de DPI₂ 17. El segundo intermedio, DPI-Q 24 (fase 2), se sintetiza como se muestra en el Esquema de reacción 5. Se diazotiza una nitroanilina sustituida 18 (disponible en el mercado o de acuerdo con la bibliografía química) en presencia de ácido

nitroso y se une a una anilina sustituida 19 (disponible en el mercado o de acuerdo con la bibliografía química) para formar la molécula inhibidora de la fluorescencia intermedia azo 20. La hidrólisis alcalina del éster etílico 20 seguida del tratamiento con DMTrCl proporciona DMTr-Q 21, que es posteriormente activado con pentafluorofenil trifluoroacetato para obtener 22. La reacción de 22 con el éster DPI-metílico proporciona el éster metílico Q-DMTr-DPI 23. El compuesto 23 es posteriormente tratado con álcali para hidrolizar el éster metílico y después activado con PFP-TFA para obtener el éster de PFP Q-DMTr-DPI 24. En el Esquema de reacción 5, los símbolos R₀, R₁ a R₄, v y t se definen como antes.

Con respecto al Esquema de reacción 6 (donde los símbolos también se definen como antes), DMTr-Q-DPI₃-PFP 25a (tercera fase) se sintetiza primero haciendo reaccionar el inhibidor de la fluorescencia activado 24 (DMTr-Q-DPI PFP) con DPI₂-NPC 17 para obtener el éster p-nitrofeniletíl 25, que se convierte en el éster activo 25a, primero mediante el tratamiento con base como 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) para eliminar la fracción de p-nitrofeniletíl y, a continuación, con 2,3,4,5,6-pentafluorofenil trifluoroacetato (PFP-TFA).

La síntesis de DMTr-Q-DPI₃-CPG 29 (fase cuatro) se muestra en el Esquema de reacción 7. En esta secuencia sintética, la molécula inhibidora de la fluorescencia mejorada se une a través de un conector de diglicolato clivable a gránulos de vidrio de poro controlado (CPG). Concretamente, se hace reaccionar aminopropanol, o un homólogo del mismo, sucesivamente con monometoxitritilo cloruro (MMTr-Cl) y, a continuación, con anhídrido diglicólico para formar un aminopropanol bloqueado con MMT 26 (o un homólogo) y MMT-diglicolato 27, respectivamente. El símbolo m se define como un número entero que tiene los valores 2 a 20. Para el aminopropanol preferente en el presente, m es 3. Los restantes símbolos de este esquema se definen como antes. La reacción de 27 con CPG de aminoalquilo de cadena larga en presencia de agentes activadores (HOBT y HBTU), produce el MMT-diglicolato-CPG 28, que se convierte tras la destilación y reacción con 25a en DMTr-Q-DPI₃-CPG 29.

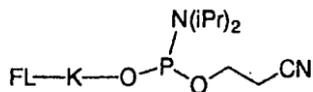
En la fase 5, mostrada aún en el Esquema de reacción 7, la síntesis de oligonucleótidos se realiza con la ayuda de un sintetizador de ADN automatizado y se une un fluoróforo en el extremo 5' del ODN, utilizando un fluoróforo-fosforamidita o un fluoróforo que contiene un grupo reactivo, para producir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

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

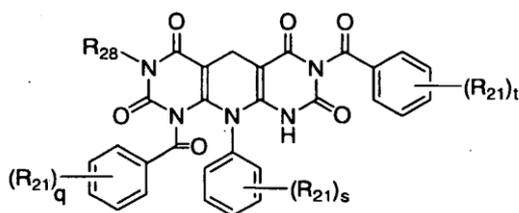
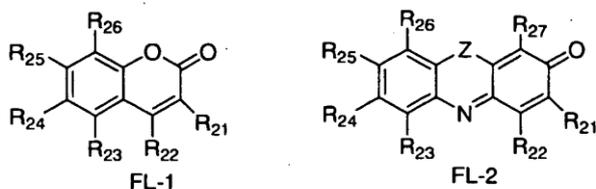
Reactivos de fluoróforo

Los colorantes fluorescentes que tienen longitudes de onda de emisión más cortas que el colorante fluorescente verde FAM resultan útiles en los ensayos basados en una sonda de ADN que se describen a continuación. Por lo general, estos colorantes han sido menos populares para su uso en sondas, dado que la excitación con fuentes de luz láser resulta menos viable que con longitudes de onda superiores.

En un grupo de realizaciones, la presente divulgación proporciona reactivos de fosforamidita-fluoróforo que resultan útiles para introducir un fluoróforo adecuado en una sonda de oligonucleótidos. Los reactivos tienen la fórmula siguiente:



donde K es un grupo de unión; y FL es un fluoróforo seleccionado entre el grupo compuesto por:

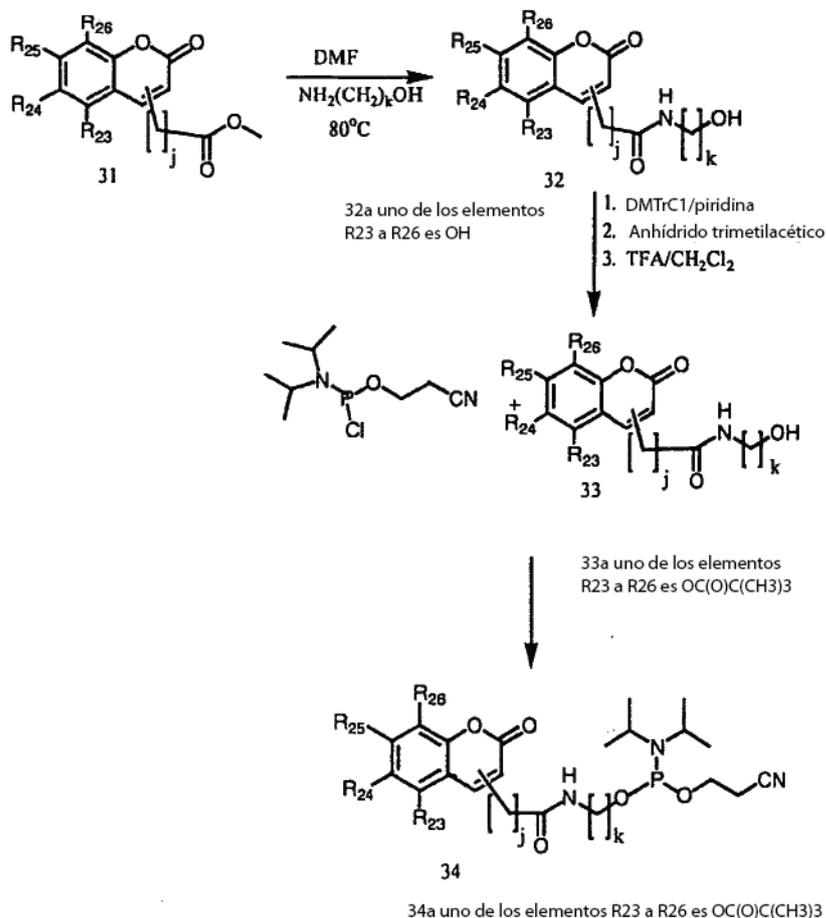


donde Z es O o S, y R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{24} , R_{25} , R_{26} and R_{27} son, cada uno de ellos independientemente, seleccionados entre H, halógeno, NO_2 , SO_3R , $\text{SO}_2\text{N}(\text{R})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$, CN, CNS, OR, $\text{OC}(\text{O})\text{R}$, SR, CF_3 , $\text{NHC}(\text{O})\text{R}$, $\text{N}(\text{R})_2$ o $\text{N}(\text{R})_3$, donde cada R es independientemente H, $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos. Por otra parte, al menos uno de los elementos R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{24} , R_{25} , R_{26} y R_{27} , y R_{27} es -L-X, donde L es un conector de 1 a 20 átomos, acíclico, cíclico o una combinación de los mismos, que contiene C, N, O, S, Si y P; y X es una fosforamidita o un grupo reactivo (p. ej., éster de pentafluorofenilo); y dos grupos adyacentes cualquiera (R_{21} a R_{26}) se pueden combinar para formar una estructura de anillo de cinco o seis miembros fusionados que es saturada o insaturada, y puede contener cualquiera de los elementos C, N, S y O como vértices del anillo. R_{28} es un miembro seleccionado entre H y un $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ alquilo sustituido o no sustituido.

En la fórmula anterior, el grupo de unión bifuncional K puede ser básicamente cualquier grupo de unión que proporcione una separación suficiente para que se produzca la reacción de la fracción de fosforamidita cuando se emplee la composición para introducir el FL en una composición o un conjugado de oligonucleótidos. Típicamente, el grupo de unión tiene entre 3 y 50 átomos de la cadena principal seleccionados entre C, N, O, S, P y Si, con las restantes valencias ocupadas por átomos de hidrógeno. Existen diversos grupos de unión heterobifuncionales disponibles en el mercado que se pueden emplear en la presente invención. Otros grupos de unión adecuados se describen en el presente.

Reactivos de fosforamidita de cumarina

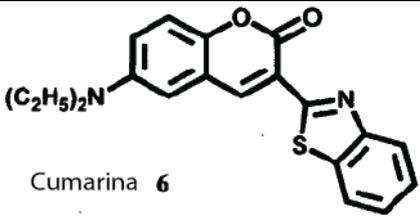
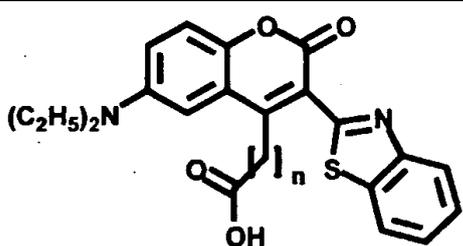
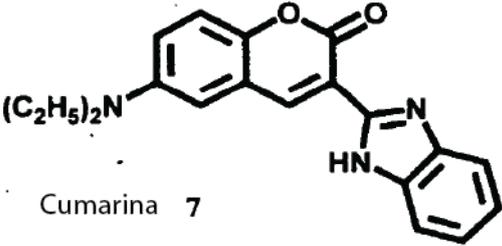
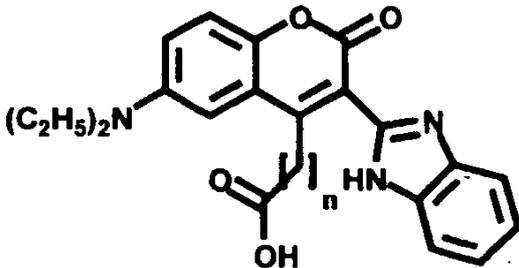
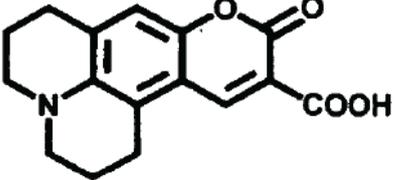
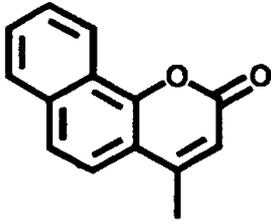
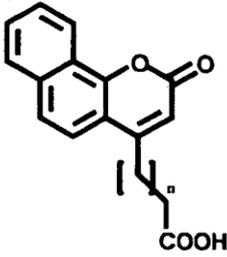
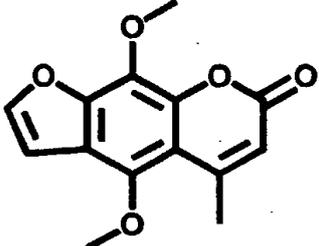
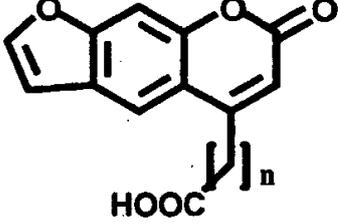
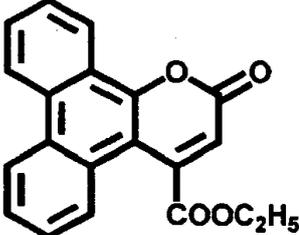
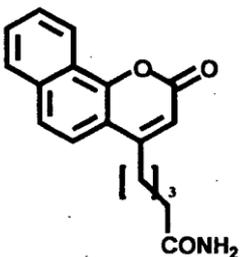
En un grupo de realizaciones preferibles, la divulgación proporciona reactivos de fosforamidita de cumarina (p. ej., los compuestos anteriores en los que el FL es FL-1). Un ejemplo de este reactivo de fosforamidita que contiene un fluoróforo preferible de cumarina y que es adecuado para la síntesis de ADN se muestra en el Esquema de reacción 8, como compuesto 34. En el reactivo de fosforamidita 34, cada uno de los elementos R_{23} a R_{26} se selecciona, independientemente, de los grupos proporcionados anteriormente; y j y k son, independientemente, de 1 a 10. En una realización preferible, el reactivo 34 incluye un cromóforo de cumarina que emite luz a unos 458 nm. Las sondas de ADN que contienen este cromóforo de cumarina se prepararon y produjeron las propiedades de emisión fluorescente deseadas.



ESQUEMA DE REACCIÓN 8

- 5 Con respecto al Esquema de reacción 8, en términos generales y también en un ejemplo que proporciona el reactivo de fosforamidita específico 34a, se obtiene un éster metílico de (2-oxo-2H-cromen-4-il)-alquilcarboxilo (31) de hidroxilo sustituido, de acuerdo con la publicación de Baker et al. (*J. Chem. Soc.*; 170,173 (1950)). El compuesto 31 se convierte en el derivado de alcohol 32 (concretamente en 32a donde uno de los elementos R₂₃ a R₂₆ es -OH y los restantes grupos R son H) mediante reacción con un aminoalcohol a 80°C. La reacción de 32 primero con DMTrCl y después con anhídrido trimetilacético, seguida de la eliminación del grupo de bloqueo DMTr, proporciona un derivado de pivalato 33, en el ejemplo específico 33a, donde uno de los elementos R₂₃ a R₂₆ es -OC(=O)C(CH₃)₃ y los restantes grupos R son H. La reacción de 33 con 2-cianoetil diisopropilclorofosforamidita proporciona el reactivo 34 (concretamente el 34a). El reactivo 34 se emplea para incorporar el fluoróforo con cumarina al extremo 5'-terminal de las sondas de ADN. Cabe señalar que la eliminación de los grupos de protección durante la síntesis de oligonucleótidos automatizada se produce correctamente, proporcionando un elevado rendimiento. Los símbolos j y k del Esquema 8 se definen como 0 a 20 y 1 a 20, respectivamente.
- 10
- 15

También se conocen otras cumarinas que se pueden modificar para proporcionar los reactivos de fosforamidita anteriores.

Cumarina	Cumarina modificada
<p data-bbox="240 376 411 488">(C₂H₅)₂N Cumarina 6</p> 	
<p data-bbox="233 678 435 813">(C₂H₅)₂N Cumarina 7</p> 	
 <p data-bbox="296 1104 491 1137">Cumarina 343</p>	
	
	
	

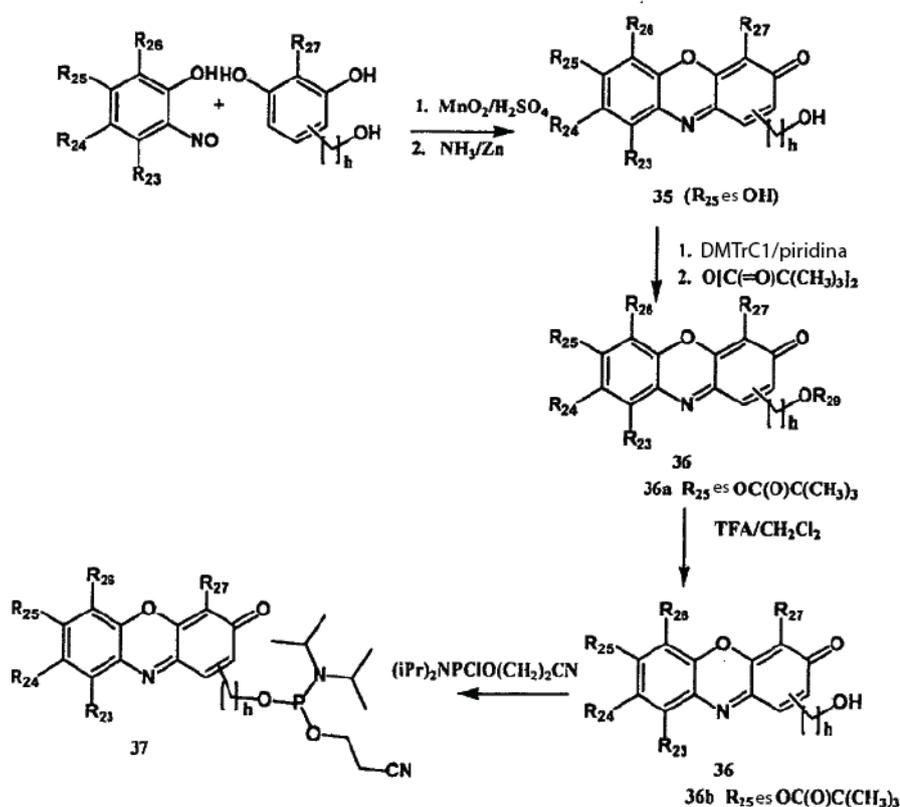
Véase, por ejemplo, *Bull. Chem. Soc. Japan*. 71 (7): 1719-1724 (1998); Kartha et al., *Proc. Indian Acad. Sci. Sect. A*, 18:28 (1943); Atta et al., *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* 80:109-116 (1993); Patente estadounidense nº 5.696.157; Nicolaidis et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2:283-290 (1992); y Saleh et al., *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* 48:285-288 (1990).

5

Fosforamidita de resorufina

Otra nueva clase de reactivos de síntesis de ADN (véanse las fosforamiditas del fluoróforo en las que FL es FL-2) se basa en el cromóforo 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona presente en el compuesto precursor (resorufina) y tiene una longitud de onda de emisión (595 nm) que se distingue fácilmente de la emisión FAM. De acuerdo con la divulgación, el cromóforo se sintetiza de forma que incorpore una estructura de conector para una mayor funcionalización con los reactivos de fosforamidita deseados. La preparación de ejemplos preferibles de estos reactivos 37 adecuados para la síntesis de ADN se muestra en el Esquema de reacción 9. Por lo general, en los reactivos de la fórmula 37, cada uno de los elementos R₂₃, R₂₄, R₂₅, R₂₆ and R₂₇ son, cada uno de ellos independientemente, seleccionados entre H, halógeno, NO₂, SO₃R, SO₂N(R)₂, C(O)OR, C(O)N(R)_a, CN, CNS, OR, OC(O)R, SR, CF₃, NHC(O)R, N(R)₂ o N(R)₃, donde cada R es independientemente H, (C₁-C₈)alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos; y h=1 a 20. R₂₉ en el esquema es H o DMTr.

15



20

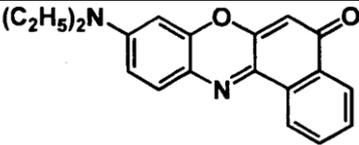
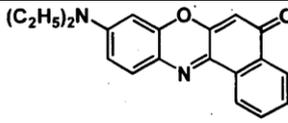
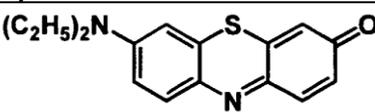
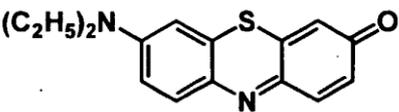
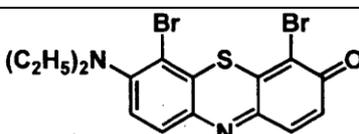
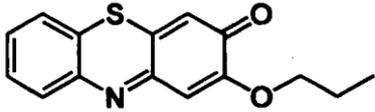
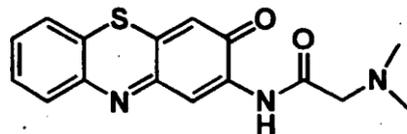
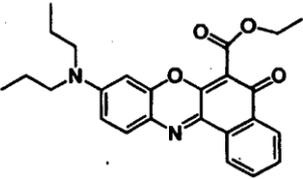
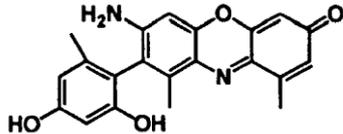
ESQUEMA DE REACCIÓN 9

Como se muestra en el ejemplo del Esquema 9, en términos generales y también para un ejemplo específico, la reacción de un derivado de nitrosorecorcinol (disponible en el mercado o sintetizado de acuerdo con la técnica actual) y de 4-(3- hidroxipropil)benceno-1,3-diol (obtenido de acuerdo con Forchiassin et al., *J. Heterocyc. Chem.* 20:493-494 (1983)) y MnO₂ produjo un derivado de resazurina contaminado con algo de derivado de resorufina. Esta mezcla fue tratada con NH₄OH y polvo de Zn para producir el derivado de resorufina 35 (concretamente 35a, donde R₂₅ es OH y los restantes grupos R son H) contaminado con 2,3,4-trihidro-2H-pirano[3,2-b]fenoxazin-9-ona como principal impureza. Esta última mezcla se trató con DMTrCl y piridina, y después con anhídrido de ácido trimetilacético. El producto 36 se sometió después a purificación mediante cromatografía en gel de sílice para obtener el derivado protegido con DMTr de 36 a (donde R₂₅ es -OC(=O)C(CH₃)₃, R₂₉ es DMTr, y los restantes grupos R son H). El derivado de DMTr puro se trató con TFA/CH₂Cl₂ para producir un único producto 36b tras la cromatografía en gel de sílice. El tratamiento de 36 (donde R₂₅ es -OC(=O)C(CH₃)₃ y R₂₉ es H) con 2-cianoetil diisopropilclorofosforamidita proporcionó el reactivo de fosforamidita deseado 37 (concretamente 37a, donde R₂₅ es

30

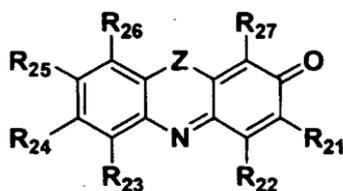
-OC(=O)C(CH₃)₃, y los restantes grupos R son H), que se puede emplear para introducir el fluoróforo en un ODN deseado.

5 En la siguiente tabla se muestran otros fluoróforos tipo resorufina que se pueden convertir en reactivos de fosforamidita apropiados.

Colorante de resorufina	Sitios de unión del conector
 <p>Rojo Nilo</p>	 <p>Unir conector a alguno de los anillos de fenilo o los grupos alquilo</p>
	 <p>Unir conector al anillo de fenilo, el anillo de quinona, el grupo alquilo o a través de una lactona (véanse los métodos de la lactona más arriba)</p>
	
	<p>Unir conector al anillo de fenilo, el anillo de quinona o el sustituyente de alcoxilo (absorción UV máxima 494 nm)</p>
	<p>Unir conector al anillo de fenilo, el anillo de quinona o la cadena lateral amida.</p>
	<p>Unir conector a alguno de los anillos de fenilo fusionados o a los sustituyentes de amino o éster (absorción UV máxima 569)</p>
	<p>Unir conector a alguno de los grupos hidroxilo, amino o metilo, o a otras posiciones de los anillos de fenilo o quinona (absorción UV máxima 566)</p>

10 Otros compuestos adecuados para la elaboración en el presente de reactivos de fosforamidita tipo resorufina se describen en, por ejemplo, la solicitud copendiente Ser. nº 09/457.616; la Patente estadounidense nº 4.954.630; Pashkevich et al., *Chem. Heterocycl. Compd, Engl. Transl.* 11:308-312 (1975); Morrison et al., *Photochem. Photobiol.*, 66:245-252 (1997); Afans'eva et al., *Chem. Heterocycl. Compd., Engl. Transl.* 174-177 (1983); Chem. Abstracts 16329 (1955); Long et al., *J. Heterocycl. Chem.* 36:895-900 (1999); y Musso et al., *Chem. Ber.*, 96:1936-1944 (1963).

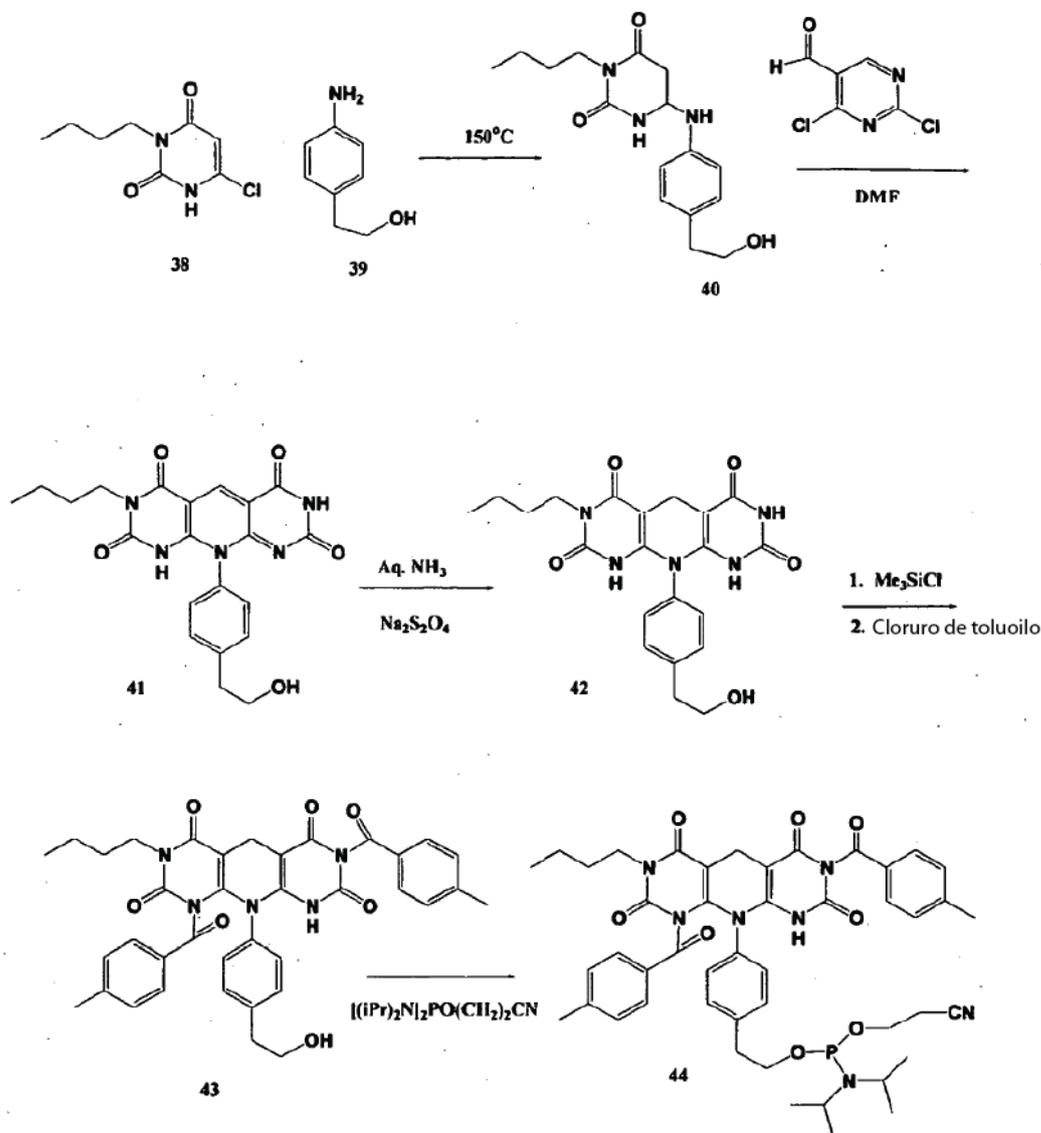
15 En un grupo de realizaciones, la presente invención proporciona reactivos de fosforamidita de resorufina que tienen la fórmula siguiente:



5 donde Z es O o S, y R₂₁, R₂₂, R₂₃, R₂₄, R₂₅, R₂₆ y R₂₇ son, cada uno de ellos independientemente, seleccionados entre H, halógeno, NO₂, SO₃R, SO₂N(R)₂, C(O)OR, C(O)N(R)₂, CN, CNS, OR, OC(O)R, SR, CF₃, NHC(O)R, N(R)₂ o N(R)₃, donde cada R es independientemente H, (C₁-C₈)alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos. Por otra parte, al menos uno de los elementos R₂₁, R₂₂, R₂₃, R₂₄, R₂₅, R₂₆ y R₂₇ es -L-X, donde L es un conector de 1 a 20 átomos, acíclico, cíclico o una combinación de los mismos, que contiene C, N, O, S, Si y P; y X es una fosforamidita o un grupo reactivo (p. ej., éster de pentafluorofenilo); y dos grupos adyacentes cualquiera (R₂₁ a R₂₆) se pueden combinar para formar una estructura de anillo fusionada que es saturada o insaturada, y puede contener cualquiera de los elementos C, N, S y O como vértices del anillo.

10 Fosforamidita de PPT

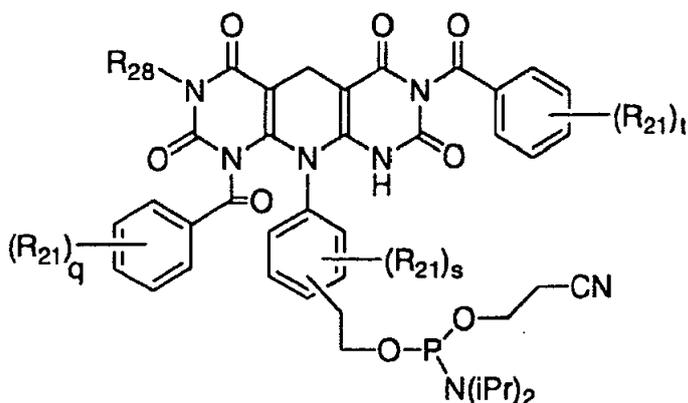
15 La síntesis de un reactivo de fosforamidita que incorpora un colorante fluorescente morado PPT 44 que tiene longitudes de onda de excitación y emisión de 384 y 400 nm, respectivamente, se muestra en el Esquema de reacción 10 y en el Ejemplo 10.



ESQUEMA DE REACCIÓN 10

- De acuerdo con este esquema, se hace reaccionar 6-cloro-3-n-butiluracilo 38 y 2-(4-aminofenil)etanol 39 para producir el derivado de uracilo de fenilo sustituido 40. Los compuestos 38 y 39 se pueden obtener de acuerdo con los métodos de la bibliografía y con métodos generales conocidos por los expertos en la técnica. La reacción de 40 con 5-formil-4,6-dicloro pirimidina en DMF a temperatura ambiente proporciona el heterociclo tricíclico 41. La reducción de 41 en NH₃/Na₂S₂O₄ produce 42 que posteriormente se bloquea como el derivado de toluoilo 43. En el paso final, se hace reaccionar 43 con 2-cianoetil diisopropilclorofosforamidita para producir el reactivo de fosforamidita de cianoetil PPT 44, que se puede emplear para introducir el fluoróforo de PPT en un ODN.

En realizaciones relacionadas, la presente divulgación proporciona reactivos de fosforamidita de PPT que tienen la fórmula siguiente:



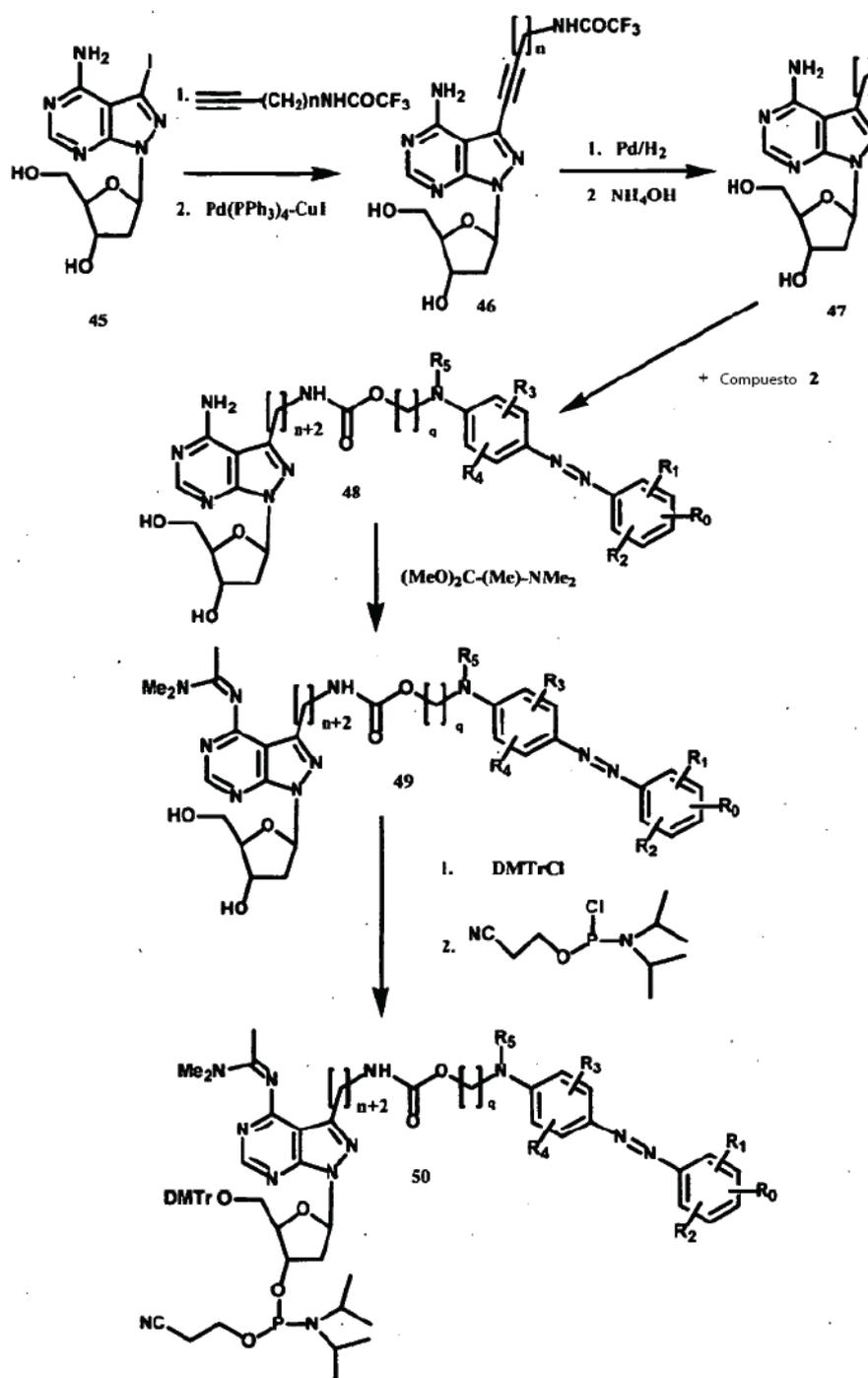
5 donde cada R_{21} se selecciona independientemente de H, halógeno, NO_2 , SO_3R , $\text{SO}_2\text{N}(\text{R})_2$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$, CN, CNS, OR, $\text{OC}(\text{O})\text{R}$, SR, CF_3 , $\text{NHC}(\text{O})\text{R}$, $\text{N}(\text{R})_2$ o $\text{N}(\text{R})_3$, donde cada R es independientemente H, $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ alquilo, arilo (y heteroarilo), o un grupo de bloqueo compatible con la síntesis de oligonucleótidos; y dos grupos adyacentes R_{21} cualquiera se pueden combinar para formar una estructura de anillo de cinco o seis miembros fusionados que es saturada o insaturada, y que puede contener cualquiera de los elementos C, N, S y O como vértices del anillo. R_{28} es un miembro seleccionado entre H y un $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ alquilo sustituido o no sustituido.

10 Varios de los anteriores fluoróforos con cumarina, resorufina y PPT están disponibles con un sustituyente del grupo alquilcarboxilo que sirve como material de partida para la síntesis de los correspondientes reactivos de fosforamidita. Por consiguiente, estos compuestos se pueden activar en el grupo alquilcarboxilo como los ésteres de pentafluorofenilo. Los ésteres activados se emplean para unir estos colorantes a oligonucleótidos modificados con amina.

15 De forma similar, en otras realizaciones más, los fluoróforos o inhibidores de la fluorescencia etiquetados con dUPT se obtienen, por ejemplo, de acuerdo con las enseñanzas de la Patente estadounidense nº 5.328.824. Por otra parte, la fosforamidita de los fluoróforos o inhibidores de la fluorescencia etiquetados con pirazolo[3,4-d]pirimida 7-marcados se sintetizan de acuerdo con las enseñanzas de la Patente estadounidense 5.824.796, y se pueden emplear para el etiquetado de oligonucleótidos.

20 **Reactivos basados en colorante rojo PG y otros reactivos de fosforamidita para la síntesis de oligonucleótidos**

25 En otra realización, el inhibidor de la fluorescencia del colorante rojo 13 se une a la posición 3 de las pirazolo[5,4-d]pirimidinas (PP) o en la posición 5 de una pirimidina. Con respecto ahora al Esquema 11 en sí, el material de partida es 5-(4-amino-3-yodopirazolo[5,4-d]pirimidinil)-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol 45, que está disponible de acuerdo con Seelaetal. *J. Chem. Soc., Perkin. Trans.*, 1 (1999, 479-488). El compuesto 45 se hace reaccionar primero con N-propinil-2,2,2-trifluoroacetato (o un homólogo del mismo donde en el esquema n es de 1 a 10) y, a continuación, con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4\text{-CuI}$ para proporcionar el derivado de alquino 46. La reducción con Pd/H_2 de 46 seguida del tratamiento con hidróxido de amonio proporciona el derivado de aminoalquilo 47 (PPA'). La reacción de PPA' con el compuesto 2 (disponible como se divulga en relación con el Esquema de reacción 1) proporcionó el PPA'-Rojo 13 sustituido 48. La reacción de 48 con (1,1-dimetoxietil)dimetil-amina bloquea el grupo amino de la pirazolo[5,4-d]pirimidina para producir 49. El compuesto 49 se hace reaccionar primero con DMTrCl y, a continuación, con 2-cianoetil diisopropilclorofosforamidita para proporcionar la fosforamidita de PPA'-Rojo 13 bloqueada con DMTrCl 50.

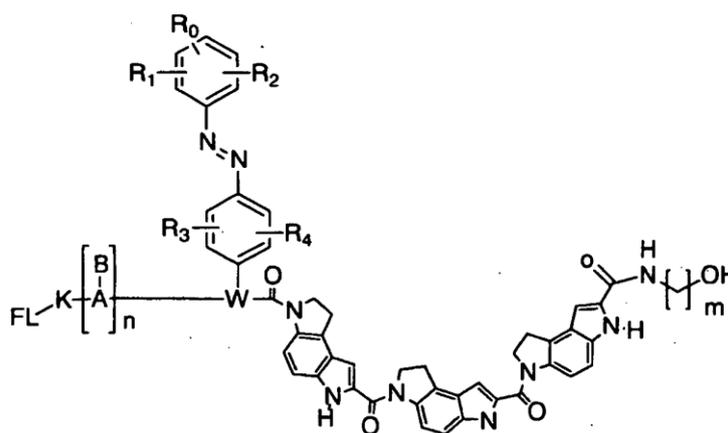


ESQUEMA DE REACCIÓN 11

- 5 En otras realizaciones más que se inician con el desoxirribósido de 6-amino-5-hidroxi-3-yodo-pirazolo[5,4-d]pirimidin-4-ona (3-yodo-PPG), el reactivo de fosforamidita que contiene el colorante Rojo 13 covalentemente unido a la fracción de 3-yodo-PPG se sintetiza con reacciones análogas a las mostradas en el Esquema de reacción 11. De modo similar, comenzando con 5-aminopropildesoxiuridina, se sintetiza el reactivo de fosforamidita que contiene el colorante Rojo 13 covalentemente unido a 5-aminopropil-desoxiuridina.
- 10 Los expertos en la técnica apreciarán claramente a la luz de la anterior divulgación que las fosforamiditas basadas en pirazolopirimidina-Rojo-13 o uridina-Rojo 13 dentro del ámbito de aplicación de la presente invención pueden contener diversos conectores entre las bases de pirazolopirimidina y uracilo y los inhibidores de la fluorescencia de

donde los símbolos FL, K, A, B, n, W, Ar¹, y Ar² tienen los significados anteriormente proporcionados, y los símbolos R_a, R_b, R_c, R_d, R_e y R_f representan sustituyentes seleccionados de H, halógeno, (C₁-C₈)alquilo, OR_g, N(R_g)₂, N⁺(R_g)₃, SR_g, COR_g, CO₂R_g, CON(R_g)₂, (CH₂)_mSO₃⁻, (CH₂)_mCO₂, (CH₂)_mOPO₃⁻², y NHC(O)(CH₂)_mCO₂⁻, y ésteres y sales de los mismos, donde cada R_g es independientemente H o (C₁-C₈)alquil, y el subíndice m es un número entero de 1 a 10. El símbolo Rh representa H o un grupo (típicamente el vestigio de un grupo de unión empleado en la síntesis de fase sólida) que tiene entre 1 y 30 átomos del esqueleto seleccionados entre C, N, O, P, y S, que es cíclico, acíclico o una combinación de los mismos, y que tiene otros átomos de hidrógeno adicionales para llenar las valencias disponibles.

En un grupo de realizaciones relacionadas, el inhibidor de la fluorescencia Ar¹-N=N-Ar² se une a R_h en lugar de W. En otro grupo de realizaciones preferibles, las sondas de la presente invención se representan mediante la Fórmula 6:



FÓRMULA 6

donde los símbolos FL, K, A, B, W, R₀, R₁, R₂, R₃ y R₄ tienen los significados anteriormente indicados y m es un número entero de 1 a 10.

En una realización particularmente preferible, la sonda tiene la fórmula mostrada en la Fórmula 6, donde W es - (CH₂)₃N(-)-(CH₂)₃-; R₀ = NO₂; R₁ = -Cl; R₂ = R₃ = R₄ = H; K es un conector de (C₁-C₆)alqueno y m = 5. La porción W-(Q)-MGB de la molécula se une típicamente al extremo 3' del oligonucleótido, pero también se puede unir al extremo 5' realizando la síntesis con una 5'-fosforamidita en lugar de los reactivos de 3' fosforamidita empleados más habitualmente.

Las síntesis de quimeras de APN y APN/ADN son conocidas en la técnica y por lo general se pueden preparar conforme a las publicaciones de Uhlmann et al., *Angew. Chem. Inter. Ed.*, 37:2796-2823 (1998); Mayfield et al., *Anal. Biochem.*, 401-404 (1998). Las síntesis de oligonucleótidos que contienen una o más bases de ácido nucleico bloqueadas se pueden preparar como se describe en Kyaemo et al., *J. Org. Chem.* 65:5167-5176 (2000).

Las sondas de conjugado de la presente invención que contienen un par inhibidor de la fluorescencia-reportero fluorescente se pueden emplear conjuntamente con la amplificación de polinucleótidos diana, frecuentemente en métodos que utilizan la PCR, tal como describe, por ejemplo, Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:7276-7280(1991) y Wittwer et al., *Biotechniques* 22:176-181 (1997). Por lo general, el sitio de unión de la sonda de conjugado se encuentra entre los cebadores de la PCR empleados para amplificar el polinucleótido diana.

El uso de las sondas de oligonucleótidos de conjugado de acuerdo con la presente invención para la detección de secuencias de oligonucleótidos diana ofrece varias ventajas con respecto a las combinaciones y grupos de inhibidores de la fluorescencia reporteros empleados anteriormente en la técnica. Por ejemplo, las sondas que incluyen la estructura de inhibidor de la fluorescencia de 4-[4-nitrofenil]diazinil]fenilamina de acuerdo con la presente invención proporcionaron unos ratios superiores de señal frente a ruido (S/N) en las sondas en las que FAM o TAMRA actuaban como reporteros que en las sondas que empleaban el dabcilo como inhibidor de la fluorescencia. Por otra parte, los inhibidores de la fluorescencia empleados de acuerdo con la invención muestran un rango de absorbancia más amplio que el dabcilo, lo que permite la inhibición de la fluorescencia eficiente de una amplia serie de fluoróforos. Por otra parte, las sondas del conjugado MGB-oligonucleótido ofrecen unas características de hibridación mejoradas y un inhibidor de la fluorescencia mejorado proporciona un incremento de unas 30 veces en el ratio S/N con TAMRA en comparación con una sonda estándar (no DPI₃) con dabcilo. Por otra parte, la unión de un ligando de unión al surco menor a oligonucleótidos que contienen un par de inhibidor de la fluorescencia/fluoróforo

permite que el inhibidor de la fluorescencia inhiba la fluorescencia de los fluoróforos fuera de su rango de absorbancia típico. Por último, ahora hay determinados reactivos disponibles (como los proporcionados en el presente) que se pueden emplear para introducir el inhibidor de la fluorescencia en la composición de la sonda durante la síntesis de oligonucleótidos automatizada, mientras que otros reactivos (p. ej., fosforamidita de dabculo) están disponibles en el mercado (Glen Research, Sterling, VA).

En la presente invención, un oligonucleótido comprende una pluralidad de unidades de nucleótidos, un extremo 3' y un extremo 5'. El oligonucleótido puede contener una o más bases modificadas, distintas de las bases de pirimidina y purina normales, además de conectores internucleótidos modificados, capaces de unirse específicamente al polinucleótido diana a través del emparejamiento de bases Watson-Crick o similares. Por otra parte, los oligonucleótidos pueden incluir oligonucleótidos peptídicos (APN) o quimeras de APN/ADN, cuya síntesis es conocida y se puede realizar, por ejemplo, conforme a las publicaciones de Uhlmann et al., *Angew. Chem. Inter. Ed.*, 37:2796-2823 (1998) y Mayfield et al., *Anal. Biochem.*, 401-404 (1998).

En un grupo de realizaciones, las sondas de oligonucleótidos de la invención tendrán un número suficiente de enlaces de fosfodiéster adyacentes al extremo 5' como para que la actividad 5'-3' exonucleasa permita el clivaje eficiente entre los componentes del inhibidor de la fluorescencia y el fluoróforo de la sonda. Un número adecuado de enlaces de fosfodiéster en este sentido es aproximadamente entre 1 y 100, pero preferiblemente entre 3 y 40. En otras realizaciones, los conjugados que contienen pares de fluoróforo e inhibidor de la fluorescencia proporcionarán una señal adecuada tras la hibridación al ácido nucleico diana, con clivaje de la sonda. El material amplificado se puede detectar con conjugados 5'-MGB-Q-ODN-FI (véase el Ejemplo 16 y la Figura 5) en los que la diana se amplifica mediante PCR y la detección se realiza en tiempo real sin clivaje del conjugado. El ejemplo siguiente ilustra también la capacidad del 5'-MGB para evitar que la actividad 5'-nucleasa de la polimerasa clive esta sonda y también que el MGB en combinación con el inhibidor de la fluorescencia inhiba de forma efectiva a un fluoróforo con una emisión máxima de 520 nm cuando la sonda no está hibridada con su diana complementaria. Este método también se puede emplear como ensayo de evaluación en lugar de un procedimiento en tiempo real.

Ensayos y métodos de hibridación

Las composiciones de la presente invención se pueden emplear con diversas técnicas, tanto actualmente en uso como por desarrollar, que implican la hibridación de un oligonucleótido a otro ácido nucleico. Estas incluyen, a título meramente enunciativo, técnicas en las que la hibridación de un oligonucleótido a un ácido nucleico diana es el criterio de valoración; técnicas en las que la hibridación de uno o más oligonucleótidos a un ácido nucleico diana precede a uno o más pasos de elongación mediados por polimerasa que emplean el oligonucleótido como cebador y el ácido nucleico diana como plantilla; técnicas en las que la hibridación de un oligonucleótido con un ácido nucleico diana se emplea para bloquear la extensión de otro cebador; técnicas en las que la hibridación de un oligonucleótido con un ácido nucleico diana está seguida de la hidrólisis del oligonucleótido para liberar una etiqueta unida; y técnicas en las 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, así como los factores que influyen en el grado y la especificidad de la hibridación, como la temperatura, la fuerza iónica y la composición del solvente, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*; Innis et al. (eds.) *PCR Protocols*, Academic Press, San Diego, 1990; Hames et al. (eds.) *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1985; y van Ness et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 79:5143-5151.

Adicionalmente, los compuestos descritos en el presente se pueden utilizar para detectar dianas poliméricas, como ácidos nucleicos, empleando técnicas utilizadas, por ejemplo, para la expresión genética, la detección de SNP, los métodos de secuenciación, la detección FRET (ensayos TaqMan, balizas moleculares, balizas lineales), métodos basados en matrices, extensión del cebador, métodos enzimáticos y similares.

Sondas de hibridación

En una aplicación de la presente divulgación, uno o más conjugados de FL-oligonucleótido son empleados como sonda(s) para identificar un ácido nucleico diana, sometiendo a ensayo la hibridación entre la(s) sonda(s) y el ácido nucleico diana. Una sonda se puede etiquetar con cualquier etiqueta detectable de la presente invención o puede tener la capacidad para etiquetarse antes o después de la hibridación, por ejemplo conteniendo un grupo reactivo capaz de asociarse con una etiqueta o capaz de hibridarse con una sonda etiquetada secundaria, sea antes o después de la hibridación con la diana. Como base de esta técnica, cabe destacar que las condiciones para la hibridación de sondas de ácido nucleico son bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987,1988,1989,1990,1991,1992,1993,1994,1995,1996); Hames et al. (eds.) *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1985; y van Ness et al. *Nucleic Acids Res.* 79:5143-5151 (1991).

La hibridación se puede someter a ensayo (es decir, se pueden identificar los ácidos nucleicos hibridados) distinguiendo la sonda hibridada de la sonda libre mediante uno de los diversos métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Entre ellos se incluye, a título meramente enunciativo, la unión de un ácido nucleico diana a un soporte sólido, sea directa o indirectamente (mediante hibridación a una segunda sonda unida al soporte o por la interacción entre los ligandos unidos a la superficie y conjugados con la sonda), seguida de la hibridación directa o indirecta con la sonda, y del lavado para eliminar la sonda no hibridada; determinación de la resistencia a la nucleasa; determinación de la densidad flotante; métodos de afinidad específicos para dúplex de ácido nucleico (p. ej., cromatografía con hidroxapatita); interacciones entre múltiples sondas hibridadas con el mismo ácido nucleico diana; y otras técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Falkow et al., Patente estadounidense nº 4.358.535; Urdea et al., Patentes estadounidenses nº 4.868.105 y 5.124.246; Freifelder, *Physical Biochemistry*, Segunda edición, Freeman & Co., San Francisco, 1982; Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*; y Hames et al., *supra*.

Ensayos utilizando sondas etiquetadas, sondas hidrolizables y cebadores etiquetados

Otras aplicaciones para los conjugados de oligonucleótidos que contienen un fluoróforo y un inhibidor de la fluorescencia se encuentran en los ensayos en los que se hibrida una sonda etiquetada con una diana y/o un producto de extensión de una diana, y se efectúa un cambio en el estado físico de la etiqueta como consecuencia de la hibridación. Una sonda es una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridarse con una secuencia diana de una segunda molécula de ácido nucleico. A modo de ejemplo, un ensayo de este tipo, el ensayo de sonda hidrolizable, se beneficia del hecho de que muchas enzimas de polimerización, como las polimerasas de ADN, posean actividades exonucleolíticas 5'-3' intrínsecas. Por consiguiente, si una sonda se hibrida con una secuencia que puede servir como plantilla para la polimerización (por ejemplo, si una sonda se hibrida con una región de ADN ubicada entre dos cebadores de amplificación, durante el transcurso de una reacción de amplificación), una enzima de polimerización que ha iniciado la polimerización en un cebador de amplificación corriente arriba es capaz de digerir la sonda exonucleolíticamente. Cualquier etiqueta unida a esta sonda será liberada, si la sonda se hibrida con su diana y si la amplificación se produce en la región en la que se hibrida la sonda. La etiqueta liberada se separa de la sonda etiquetada y se detecta mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, dependiendo de la naturaleza de la etiqueta. Por ejemplo, los fragmentos etiquetados radiactivamente se pueden separar mediante cromatografía en capa fina y detectarse mediante autorradiografía; mientras que los fragmentos etiquetados fluorescentemente se pueden detectar mediante irradiación a las longitudes de onda de excitación apropiadas con observación a las longitudes de onda de emisión apropiadas. Esta técnica básica se describe, por ejemplo, en la Patente estadounidense nº 5.210.015.

En una variación de esta técnica, una sonda contiene tanto una etiqueta fluorescente como un agente inhibidor de la fluorescencia, que inhibe la emisión de fluorescencia de la etiqueta fluorescente. En este caso, la etiqueta fluorescente no resulta detectable hasta que se ha alterado su relación espacial con el agente inhibidor de la fluorescencia, por ejemplo mediante liberación exonucleolítica de la etiqueta fluorescente de la sonda. De este modo, antes de la hibridación con su secuencia diana, la sonda etiquetada con el inhibidor de la fluorescencia/fluoróforo dual no emite fluorescencia. Después de la hibridación con su diana de la sonda etiquetada con el fluoróforo/inhibidor de la fluorescencia, se convierte en un sustrato para la actividad exonucleolítica de una enzima polimerizante que ha iniciado la polimerización en un cebador en sentido ascendente. La degradación exonucleolítica de la sonda libera la etiqueta fluorescente de la sonda y, de este modo, de los alrededores del agente inhibidor de la fluorescencia, permitiendo la detección de una señal fluorescente tras la irradiación a las longitudes de onda de excitación apropiadas. Este método ofrece la ventaja de que la etiqueta liberada no tiene que separarse de la sonda intacta. Múltiples planteamientos utilizan múltiples sondas, siendo cada una de ellas complementaria de una secuencia diana diferente y portadora de una etiqueta diferenciable, lo que permite el ensayo de varias secuencias diana de forma simultánea.

El uso de conjugados FL-ODN-Q-DPI₃ en este y otros métodos relacionados permite aplicar una mayor velocidad, sensibilidad y capacidad discriminatoria a estos ensayos. En particular, la capacidad mejorada de los conjugados de MGB-oligonucleótido para permitir la discriminación entre un híbrido perfecto y un híbrido que contiene el desapareamiento de una única base facilita el uso de ensayos de sonda hidrolizable en la identificación de polimorfismos de nucleótidos simples y similares, tal y como se describe en la publicación WO 995162A2. Los Ejemplos 15 y 16 ilustran la utilidad de los conjugados FL-ODN-Q-DPI₃ en este tipo de ensayos. Las composiciones y métodos de la invención son capaces de discriminar desapareamientos de nucleótidos simples y también son capaces de discriminar entre secuencias que presentan múltiples desapareamientos entre sí.

La realización de otra aplicación utiliza un cebador de auto sonda con una cola integrada, donde el inhibidor de la fluorescencia/fluoróforo está presente en la horquilla, que puede sondar el producto de extensión del cebador y, después de la amplificación, se hibrida con el amplicón de forma que fluoresce. El sondeo de una secuencia diana se puede convertir de este modo en un evento unimolecular (Whitcombe et al., *Nat. Biotech.* 77:804-807 (1999)).

Transferencia de energía de fluorescencia

En otras aplicaciones, las composiciones de la divulgación, como conjugados de oligonucleótidos que contienen un par de fluoróforo/inhibidor de la fluorescencia (FL-ODN-Q o FL-ODN-Q-MGB), se emplean en diversas técnicas que implican múltiples sondas de etiquetado fluorescente. En algunos de estos ensayos, los cambios en las propiedades de una etiqueta fluorescente se emplean para controlar la hibridación. Por ejemplo, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) se ha empleado como un indicador de la hibridación de oligonucleótidos. En una realización de esta técnica, se emplean dos sondas, conteniendo cada una de ellas una etiqueta fluorescente y una molécula inhibidora de la fluorescencia, respectivamente. La etiqueta fluorescente es donante y el inhibidor de la fluorescencia es aceptor, donde las longitudes de onda de emisión del donante solapan las longitudes de onda de absorción del aceptor. Las secuencias de las sondas se seleccionan de forma que se hibridan con regiones adyacentes de un ácido nucleico diana, acercando mucho de este modo al donante y al aceptor de la fluorescencia, si la diana está presente. En presencia de un ácido nucleico diana, la irradiación a longitudes de onda correspondientes a las longitudes de onda de absorción del donante de fluorescencia resultará en la emisión del aceptor de fluorescencia. Estos tipos de ensayo ofrecen la ventaja de que son ensayos homogéneos, que proporcionan una señal positiva sin necesidad de eliminar la sonda que no ha reaccionado. Para obtener más información y ejemplos de los ensayos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la Publicación de patente europea 070685; Agrawal & Zamecnik, *Nucl. Acids Res.* 18:5419-5423 (1990); y Cardullo *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8790-8794. Otras aplicaciones de las novedosas composiciones de la presente invención son las de las técnicas en las que se miden las interacciones entre dos oligonucleótidos diferentes que se hibridan con el mismo ácido nucleico diana y técnicas relacionadas. La selección de los pares de donante de fluorescencia/aceptor de fluorescencia apropiados resultará evidente para un experto en la técnica, basándose en el principio de que, para un determinado par, las longitudes de onda de emisión del donante de fluorescencia solaparán las longitudes de onda de absorción del aceptor. La capacidad mejorada de los conjugados de DPI₃-oligonucleótido para distinguir híbridos perfectos de híbridos que contienen el desapareamiento de una única base facilita el uso de las técnicas basadas en la FRET en la identificación de polimorfismos de nucleótidos simples y similares.

En otra aplicación de las novedosas composiciones de la divulgación, la fluorescencia del conjugado FL-ODN-Q es inhibida en su estado natural. Sin embargo, después de la hibridación con la diana prevista, la disposición espacial del fluoróforo y las fracciones inhibidoras de la fluorescencia varían de forma que se produce la fluorescencia. Para esta técnica básica, véase, por ejemplo Tyagi *et al.*, *Nat. Biotech.* 16:49-53 (1998); y la Patente estadounidense nº 5.876.930.

Debe entenderse que además de los fluoróforos que se encuentran de acuerdo con la presente invención y que resultan particularmente útiles con los inhibidores de fluorescencia de la invención, fluoróforos que se incorporan a los ODN conforme a la invención, un experto en la técnica puede seleccionar fluoróforos adicionales para su uso en combinación con los inhibidores de la fluorescencia de la presente invención, basándose en las propiedades ópticas descritas en la bibliografía, como las referencias siguientes: Haugland *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Sexta edición, Eugene, OR, pp. 235-236. 1996; Beriman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2^a Ed., Academic Press, Nueva York, 1971; Du *et al.*, "PhotochemCAD. A Computer-Aided Design and Research Tool in Photochemistry", *Photochem. Photobiol.* 68:141-142 (1998). Por tanto, el uso de los novedosos conjugados de ODN-inhibidor de la fluorescencia, en combinación con estos fluoróforos conocidos, se considera dentro del ámbito de aplicación de la invención.

En otra aplicación, el ligando de unión al surco menor, DPI₃, se une a un inhibidor de la fluorescencia en un conjugado FL-ODN-Q-CDPI₃ para mejorar los ratios de señal frente a ruido (véase la Tabla 4, más abajo). Los inhibidores de la fluorescencia preferibles son los inhibidores de la Fórmula 6 y, más preferiblemente, los inhibidores de la fluorescencia son aquellos proporcionados en los conjugados de las fórmulas 8-11,12-16 (en la Tabla 4) y también ilustrados como conjugado 30 (en el Esquema de reacción 7).

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

Otra aplicación de los novedosos pares de fluoróforo/inhibidor de la fluorescencia de la invención consiste en incorporar el par en sustratos enzimáticos, en los que la fluorescencia es inhibida debido a la proximidad del fluoróforo y el inhibidor de la fluorescencia. No obstante, después de que una enzima clive el sustrato, el fluoróforo y el inhibidor de la fluorescencia se separan y se observa la fluorescencia. Un ejemplo de esta técnica se describe a continuación, utilizando la enzima fosfodiesterasa. Un experto en la técnica apreciará claramente que se pueden construir sustratos adecuados que contienen los inhibidores de la fluorescencia y los fluoróforos novedosos para las enzimas que clivan sustratos.

Matrices de oligonucleótidos

En otra aplicación, los conjugados de oligonucleótidos de la presente invención se utilizan en procedimientos que emplean matrices de oligonucleótidos o conjugados de oligonucleótidos. Las técnicas de secuenciación por hibridación, el análisis del polimorfismo de nucleótidos simples (SNP) y el análisis basado en matrices de la expresión genética (véase, Hacia et al., *Nat. Genet.* 22:119-120 (1999)) son bien conocidos y se pueden adaptar fácilmente para utilizar los conjugados de la presente invención. Por ejemplo, una matriz ordenada de oligonucleótidos de diferentes secuencias conocidas (o sus conjugados) se emplea como plataforma para la hibridación a uno o más polinucleótidos, ácidos nucleicos o poblaciones de ácidos nucleicos de ensayo. La determinación de los oligonucleótidos que se hibridan y la alineación de sus secuencias conocidas permite reconstruir la secuencia del polinucleótido de ensayo. Para una descripción de estas técnicas, véanse, por ejemplo, las Patentes estadounidenses 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 matrices incluyen, a título meramente enunciativo, nitrocelulosa, vidrio, obleas de silicio y fibras ópticas.

Consideraciones estructurales

Los términos oligonucleótido, polinucleótido y ácido nucleico se emplean de forma intercambiable para referirse a polímeros de cadena simple de ADN o ARN (o ambos), incluyendo los polímeros que contienen nucleótidos modificados o no naturalmente presentes, o a cualquier otro tipo de polímero con capacidad para un emparejamiento de bases estable a ADN o ARN, incluyendo, a título meramente enunciativo, los ácidos nucleicos peptídicos que se divulgan en Nielsen et al., *Science* 254:1497-1500 (1991); oligómeros de ADN biciclo (Bolli et al., *Nucleic Acids Res.* 24:4660-4667 (1996)) y estructuras relacionadas. Una o más fracciones de MGB y/o una o más etiquetas fluorescentes, y agentes inhibidores de la fluorescencia se pueden unir en el extremo 5', el extremo 3' o una porción interna del oligómero. Un MGB preferible de acuerdo con la invención es DPI3 y el inhibidor de la fluorescencia preferible es la amida de rojo 13.

En la presente divulgación son preferibles los oligonucleótidos de ADN que son de cadena simple y que tienen una longitud de 100 nucleótidos o menos, más preferiblemente de 50 nucleótidos o menos, todavía más preferiblemente de 30 nucleótidos o menos y más preferiblemente de 20 nucleótidos o menos con un límite inferior aproximado de 5 nucleótidos.

Los conjugados de oligonucleótidos que contienen un par de fluoróforo/inhibidor de la fluorescencia con o sin un MGB pueden comprender también una o más bases modificadas, además de las bases naturalmente presentes adenina, citosina, guanina, timina y uracilo. Las bases modificadas se consideran aquellas que difieren de las bases naturalmente presentes por la adición o delección de uno o más grupos funcionales, diferencias en la estructura de anillo heterocíclico (es decir, sustitución de carbono por un heteroátomo o viceversa) y/o uniones de una o más estructuras sustituyentes a la base. Los nucleótidos modificados que se pueden incluir en los conjugados de ODN de la invención incluyen 7-deazapurinas y sus derivados y pirazolopirimidinas y sus derivados (descritos en la PCT WO 90/14353); y en las Solicitudes de patente estadounidenses de propiedad conjunta y copendientes con los números de serie 09/054.630 y 09/796.988.

Los análogos de bases preferibles de este tipo incluyen el análogo de guanina 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG o PPG) y el análogo de adenina 4-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (ppA o PPA), análogos sustituidos de PPA entre los que se incluyen 4-(4-aminopirazolo[3,4-dipirimidin-3-il]but-3-in-1-ol, HOBuPPA; 6-amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ol, HOBuPPG; y 4-(4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)but-3-in-1-ol, (NH₂)₂BuPPAOH, así como cinco pirimidinas sustituidas entre las que se incluyen 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, HOBuU; 6-amino-5-(4-hidroxi-but-1-inil)-3-hidropirimidin-2-ona, HOBuC; y 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, PU. También resulta útil el análogo de xantina 1H-pirazolo[5,4-d]pirimidin-4(5H)-6(7H)-diona (ppX). Estos análogos de bases, cuando se encuentran presentes en un oligonucleótido, refuerzan la hibridación y mejoran la discriminación de los desapareamientos. Todas las formas tautoméricas de bases naturalmente presentes, bases modificadas y análogos de bases se pueden incluir en los conjugados de oligonucleótidos de la invención.

De modo similar, los azúcares modificados o análogos de azúcar pueden estar presentes en una o más de las subunidades de nucleótidos de un conjugado de oligonucleótidos de acuerdo con la invención. Las modificaciones del azúcar incluyen, a título meramente enunciativo, la unión de sustituyentes al átomo de carbono 2', 3' y/o 4' del azúcar, diferentes formas epiméricas del azúcar, diferencias en la configuración α - o β - del enlace glicosídico y otros cambios anoméricos. Las fracciones de azúcar incluyen, a título meramente enunciativo, pentosa, desoxipentosa, hexosa, desoxihexosa, ribosa, desoxirribosa, glucosa, arabinosa, pentofuranosa, xilosa, lixosa y ciclopentilo. Los azúcares formadores de oligómeros relacionados que resultan útiles en la presente invención son aquellos que están «bloqueados», es decir, que contienen un puente de metileno entre C-4' y un átomo de oxígeno de C-2'. También se pueden emplear otras fracciones de azúcar compatibles con la hibridación del oligonucleótido, que son conocidas por los expertos en la técnica y entre las que se incluyen, a título meramente enunciativo, α -D-arabinofuranosidas, α -2'-

desoxirribofuranosidas o 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranosidas. Los oligonucleótidos que contienen α -D-arabinofuranosidas se pueden preparar como se describe en la Patente estadounidense nº 5.177.196.

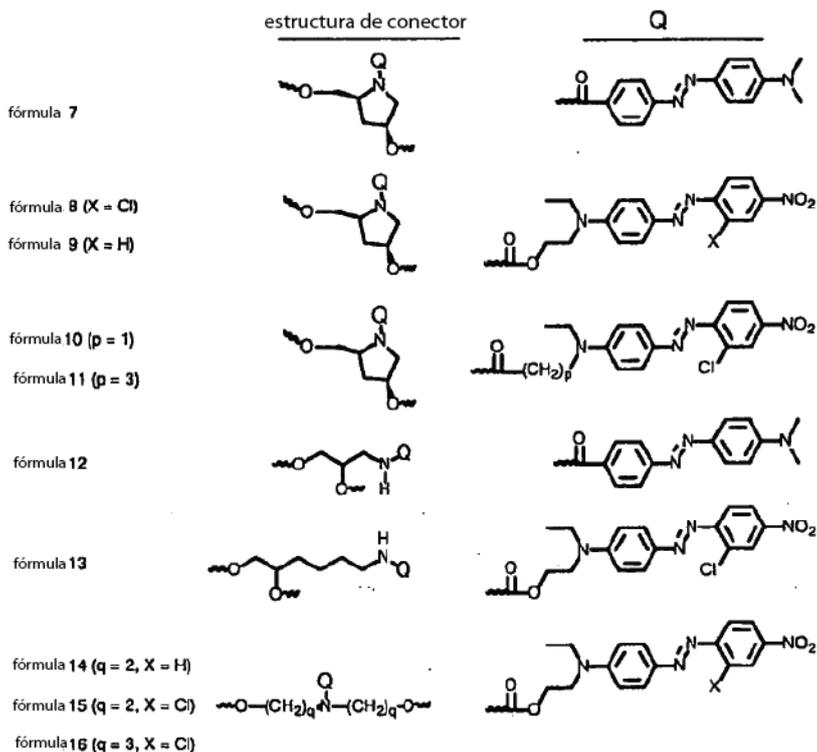
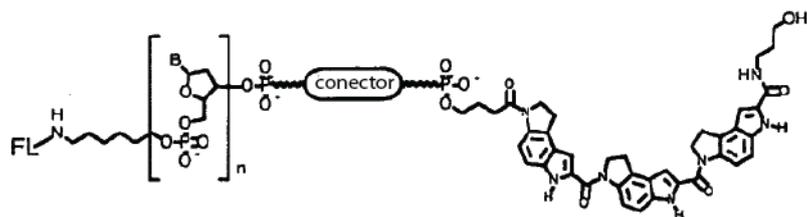
5 Los enlaces internucleótidos modificados también pueden estar presentes en los conjugados de oligonucleótidos de la invención. Estos enlaces modificados incluyen, a título meramente enunciativo, péptido, fosfato, fosfodiéster, fosfotriéster, alquilfosfato, alcanofosfonato, tiofosfato, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, fosforamidato sustituido y similares. Varias otras modificaciones de bases, azúcares y/o enlaces internucleótidos, que son compatibles con el uso en oligonucleótidos actuando como sondas y/o cebadores, serán evidentes para los expertos en la técnica.

10 Determinadas realizaciones preferibles de la divulgación implican la síntesis de numerosas fosforamiditas con diversos cromóforos inhibidores de la fluorescencia, basados en las estructuras de colorantes conocidos y sus análogos (véase, the Color Index, Número 3 de CDD-ROM, páginas 4009-4324; Society of Dyers and Colourists, Bradford, Inglaterra; <http://www.sdc.org.uk>) y conectores y su incorporación al extremo 3' de ODN de MGB fluorogénicos como los mostrados en el Esquema de reacción 3. También se incorporaron diferentes grupos reporteros fluorescentes (mostrados en el Esquema de reacción 7) a las sondas de oligonucleótidos, que se describen en la sección EXPERIMENTAL. Las propiedades fluorogénicas de estos conjugados de ODN se describen en la Tabla 4. En otras realizaciones, las moléculas MGB, debido a sus propiedades de hibridación mejoradas recomendables, se incorporaron a oligonucleótidos que contenían tanto un fluoróforo como un inhibidor de la fluorescencia, sin pérdida en la especificidad de la hibridación, la inhibición de la fluorescencia y la señal fluorescente. El residuo inhibidor de la fluorescencia aromático plano unido al residuo aromático adyacente DPI₃ presenta estrictos requisitos geométricos, dado que el conector entre el oligonucleótido y el residuo de DPI₃ debe ser lo suficientemente flexible como para permitir el posicionamiento de DPI₃ en el surco menor después de la formación dúplex de ADN.

25 **Características de los reactivos de la divulgación**

30 Una serie de conjugados de FL-ODN-Q-DPI₃ sintetizados con los reactivos y métodos de la invención se muestran en las Fórmulas 7 a 16, donde n especifica el número de bases del oligonucleótido y FL es FAM o TAMRA. «B» significa una base heterocíclica unida a la fracción de azúcar desoxirribosa.

Tabla 4



FÓRMULAS 7-16

- 5 Los inhibidores incorporados a los compuestos representados por las Fórmulas 7-16 son 2-[4-(4-nitrofenilazo)-N-etilfenilamino]etanol (Disperse Red 1), 2-[4-(2-cloro-4-nitrofenilazo)-N-etilfenilamino]etanol (Disperse Red 13) y ácido 2-[4-(dimetilamino)fenilazo]benzoico, disponibles en el mercado e identificados en esta invención como Rojo 1, Rojo 13 y dabcilo, respectivamente.

10 **Propiedades UV de los conjugados de oligonucleótidos con Rojo 13 y dabcilo**

La Figura 2 muestra las propiedades de absorción del cromóforo Rojo 13 (Fórmula 8, sin DPI₃) en comparación con el dabcilo (Fórmula 7, sin DPI₃), cuando se incorpora al extremo 3' de una sonda de ADN no modificada de otro modo. La absorción más amplia (especialmente a longitudes de onda largas) del cromóforo Rojo 13 supone una amplia ventaja. Cabe señalar que el λ_{max} de Rojo 13 es de 522 nm mientras que el λ_{max} del dabcilo es de 479 nm. La absorción de Rojo 13 resulta ideal para inhibir la fluorescencia de la fluoresceína (emisión máx. = 525 nm), pero también se solapa con la emisión de fluorescencia de otros colorantes láser comunes.

20 **Propiedades de inhibición de la fluorescencia de las sondas de DPI₃ con diversos inhibidores de la fluorescencia y conectores.**

Para las 10 sondas fluorogénicas descritas en las Fórmulas 7 a 16, se midió la fluorescencia de una solución estándar de cada sonda, antes y después de la digestión con fosfodiesterasa (PDE) de veneno de serpiente, tal como se describe en la sección EXPERIMENTAL. Este ensayo de PDE permite comparar las propiedades de inhibición de la fluorescencia de cada sonda. La fluorescencia de la sonda digerida (señal) dividida por la fluorescencia inicial (ruido) proporcionó un ratio de señal frente a ruido (S/N), presentada en la Tabla 5. Los

números de S/N más elevados reflejan una inhibición de la fluorescencia más eficiente (menor fondo fluorescente) de la sonda intacta.

Tabla 5

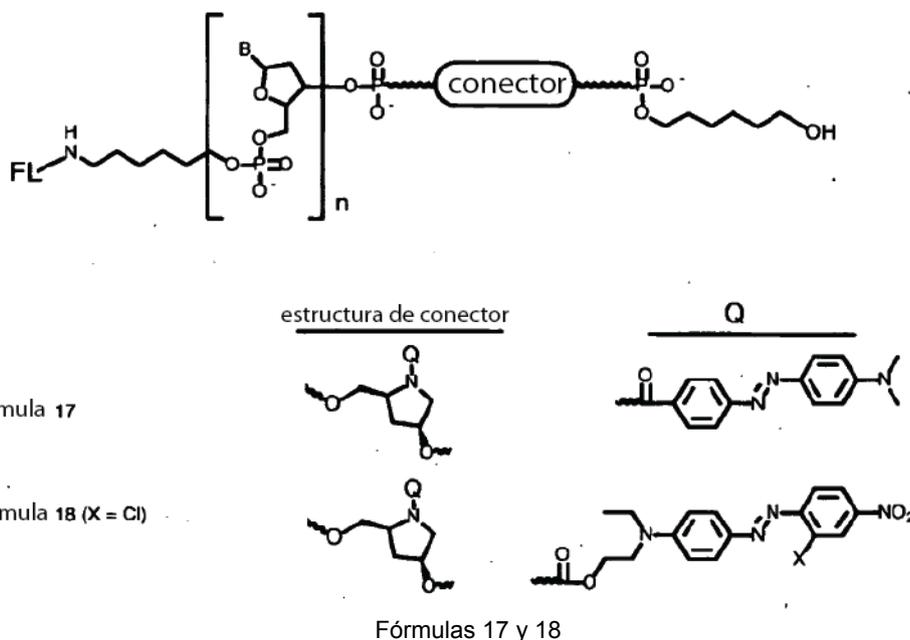
5 EFECTO DE LOS DIFERENTES INHIBIDORES DE LA FLUORESCENCIA Y CONECTORES SOBRE LAS SONDAS FLUOROGÉNICAS MOSTRADAS EN LAS FÓRMULAS 7-16¹

Fórmula # (inhibidor de la fluorescencia)	S/N (FL = FAM)	S/N (FL = TAMRA)
7 (Dabcilo)	16	13
8 (Rojo 13)	21	21
9 (Rojo 1)	24	21
10 (Rojo 13)	13	33
11 (Rojo 13)	27	21
12 (Dabcilo)	13	7
13 (Rojo 13)	23	21
14 (Rojo 1)	19	3
15 (Rojo 13)	24	4
16 (Rojo 13)	22	24

10 ¹ La señal frente al ruido (S/N) se determinó empleando el ensayo de fosfodiesterasa descrito en el Ejemplo 13. La secuencia de ODN era 5'-gagggatgtaaaaat (SEC. ID. N° 1). Los fluoróforos (R₂) estudiados aquí son 6-carboxifluoresceína (6-FAM) o 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA).

15 Los datos de la Tabla 5 ponen de manifiesto que el cromóforo Rojo 13 y el cromóforo Rojo 1, estrechamente relacionados, son mejores inhibidores de la fluorescencia tanto para FAM como para TAMRA, con diversos conectores, que el dabcilo. El conector puede afectar a la inhibición de la fluorescencia por el cromóforo Rojo 13. Por ejemplo, la Fórmula 14 y la Fórmula 15 funcionaron bien con FAM, aunque presentaron una escasa eficiencia de inhibición de la fluorescencia con TAMRA. Resulta sorprendente en cierto modo que el dabcilo funcionase tan bien, especialmente para las sondas de TAMRA. Como se describe a continuación, la inhibición de la fluorescencia efectiva por FRET con dabcilo es un caso específico para las sondas de MBG.

20



25 **Comparación de las propiedades de inhibición de la fluorescencia de las sondas de DPI₃ y las sondas sin DPI₃.**

Para ilustrar mejor las ventajas del cromóforo inhibidor de la fluorescencia Rojo 13, se compararon las sondas fluorogénicas con un grupo de bloqueo de 3'-hexanol (sin MGB). Se compararon la estructura y las propiedades

fluorescentes de 13 con sondas fluorogénicas con la misma secuencia, empleando el ensayo de PDE. En este estudio se empleó un detector sensible al rojo (Tabla 6), mientras que en el estudio mostrado en la Tabla 5 se empleó un detector sensible al azul (los S/N de ODN idénticos son diferentes porque los distintos detectores poseen sensibilidades diferentes para el mismo fluoróforo). Las siguientes variables estructurales se resumen en la Tabla 6: tipo de sonda (no MGB frente a MGB), inhibidor de la fluorescencia (dabcilo frente a Rojo 13 frente a amida de Rojo 13) y colorante reportero (FAM frente a TAMRA).

Tabla 6

PROPIEDADES FLUORESCENTES DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS CON DIVERSOS INHIBIDORES DE LA FLUORESCENCIA/FLUORÓFOROS¹

Fórmula #	Tipo de sonda	Inhibidor de la fluorescencia	FAM (S/N)	TAMRA (S/N)
17	no DPI ₃	dabcilo	4,7	3,9
18	no DPI ₃	Rojo 13	11,6	5,8
7	DPI ₃	dabcilo	23	23,5
8	DPI ₃	Rojo 13	35	108
30 (R ₁ =2-Cl, t=v=3)	DPI ₃	Amida de Rojo 13	48	97

¹ La señal frente al ruido (S/N) se determinó empleando el ensayo de fosfodiesterasa anteriormente descrito. La secuencia de ODN fue 5'-gagggatgtaaaaat (SEC. ID. N° 1). La estructura del conector de los inhibidores de la fluorescencia (Q) de dabcilo o Rojo 13 se muestra en las Fórmulas 7 y 8, respectivamente. La estructura del conector de la amida de Rojo 13 se muestra en 30, en el Esquema de reacción 7, R₀ es 4-NO₂, R₁=2-Cl, R₂=R₃=R₄=-H; t=v=3.

Como se puede apreciar en los datos de la Tabla 5, para las sondas que no contienen DPI₃, el inhibidor de la fluorescencia del colorante Rojo 13 funciona mejor que el dabcilo tanto para FAM como para TAMRA. En las sondas que contienen DPI₃, el colorante Rojo 13 funciona mejor en combinación con FAM y mucho mejor en combinación con TAMRA. Tanto 8 como 30 funcionan mejor en las sondas que contienen DPI₃ con ambos fluoróforos, y 30 muestra la mejor ratio S/N para FAM. Como resultado, el cromóforo Rojo 13 es un inhibidor de la fluorescencia más eficiente que el dabcilo para los grupos reporteros fluorescentes de longitud de onda larga. Para el fluoróforo empleado más habitualmente (FAM), se observó un incremento de 2,5 veces en el S/N para las sondas estándar (no DPI₃). Esta inhibición de la fluorescencia mejorada del Rojo 13 es coherente con el aumento del solapamiento espectral que se presenta en la Figura 2 y un mecanismo de FRET estándar. El aumento del S/N tanto de 8 como de 30 cuando se incorpora a las sondas de DPI₃ es radical y sorprendente. La combinación del inhibidor de la fluorescencia Rojo 13 con DPI₃ resultó en un incremento de 10 veces del S/N para la inhibición de la fluorescencia de FAM y en un incremento de 28 veces del S/N para la inhibición de la fluorescencia de TAMRA.

Resulta sorprendente que el residuo de DPI₃ ayude a mejorar la inhibición de la fluorescencia por parte de los cromóforos dabcilo y Rojo 13. Sin pretender vincularse a una teoría, en el presente se postula que la conformación abobinada aleatoria de la sonda fluorogénica en solución está más estructurada en las sondas de DPI₃, de forma que la distancia media entre el fluoróforo y el inhibidor de la fluorescencia es menor que en las sondas sin MGB. Esta distancia media menor en las sondas de DPI₃ (bobina más apretada) daría lugar a una FRET más eficiente. Se desconoce la naturaleza exacta de esta interacción, aunque los espectros UV de los cromóforos del colorante y el inhibidor de la fluorescencia no se ven afectados por el DPI₃. Esto contrasta con las sondas de horquilla fluorogénica, donde los espectros UV se modifican como consecuencia de la conformación restringida (inhibición de la fluorescencia por colisión).

Rendimiento de las sondas de DPI₃ fluorogénicas en un ensayo de PCR en «tiempo real».

Las sondas de DPI₃ preparadas con 5'-fluoresceína y conector de amida de Rojo 13 se testaron en el ensayo de 5'-nucleasa para comprobar si las propiedades de hibridación eran compatibles con el sistema de conector. Como se muestra en la Figura 3, tanto el dabcilo como el Rojo 13 funcionaron como inhibidores para la fluoresceína del ensayo de 5'-nucleasa cuando se emplearon en sondas de MGB. El Rojo 13 se comportó mejor que el dabcilo, tal y como se pone de manifiesto por una menor fluorescencia inicial (fondo) y una elevada meseta tras la PCR. Los fluorímetros de ciclo térmico actualmente disponibles en el mercado no son capaces de leer los colorantes de longitud de onda más larga en la PCR en tiempo real, pero se demostró que el cromóforo Rojo 13 proporciona un buen S/N con las sondas que contienen TAMRA en un análisis de evaluación tras la PCR.

Según otro método general, los conjugados de 5'-fluoróforo-ODN-Q-MGB de la presente invención ofrecen un rendimiento mejorado en los ensayos diseñados para detectar dianas de ADN mediante hibridación directa. Una

descripción básica de este método se encuentra en la Patente estadounidense nº 5.876.930. En este formato de ensayo, las sondas no hibridadas (de fluorescencia inhibida por FRET) se hicieron fluorescentes después de formar una estructura dúplex rígida, separando así al inhibidor de la fluorescencia del fluoróforo.

5 **El cromóforo Rojo 13 inhibe la fluorescencia de una amplia gama de grupos reporteros fluorescentes**

Se preparó una serie de sondas de DPI₃ con la amida de Rojo 13, con varios grupos reporteros fluorescentes diferentes, para examinar el rango efectivo de la inhibición de la fluorescencia. Las sondas se digirieron con PDE de la forma habitual y demostraron un buen S/N para los colorantes que emiten de 458 a 665 nm.

Tabla 7

RENDIMIENTO DE LAS SONDAS DE DPI₃ FLUOROGÉNICAS CON DIVERSOS FLUORÓFOROS.

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

La estructura de las sondas fluorogénicas fue FL-ODN-Q-CDPI₃, donde Q era la amida de Rojo 13 y la secuencia de ODN era 5'-GTC CTG ATT TTA C (SEC. ID. Nº 2). Los fluoróforos FAM, TAMRA, cy3 y cy5 se incorporaron empleando reactivos de fosforamidita disponibles en el mercado. Los fluoróforos de cumarina y resorufina se incorporaron empleando fosforamiditas 34 y 37, que se prepararon como se describe debajo.

La emisión fluorescente se separa bien de FAM, como se muestra en los espectros solapados de la Figura 4. Como se muestra en la Tabla 7, la fluorescencia de la resorufina también se inhibe con el cromóforo Rojo 13. Así, la fosforamidita de resorufina ofrece excelentes propiedades para su uso en sondas FRET y en combinación con FAM para el análisis multicolor.

Como se muestra en la Tabla 7, la fluorescencia de la cumarina también es inhibida por el cromóforo Rojo 13. De este modo, el reactivo de fosforamidita de cumarina se puede incorporar en sondas FRET y, en particular, en combinación con FAM para el análisis multicolor.

Sustratos enzimáticos basados en la FRET

Las moléculas inhibidoras de la fluorescencia mejoradas se pueden emplear en otros sistemas de ensayo basados en la FRET. De acuerdo con otra aplicación general de la invención, una molécula inhibidora de la fluorescencia y un fluoróforo se unen a un sustrato enzimático, que, a través de su acción catalítica sobre este conjugado de Q-sustrato-fluoróforo, cliva y separa el Q y las moléculas del fluoróforo. Por ejemplo, el éster activado de pentafluorofenilo 11 mostrado en el Esquema de reacción 3 se puede emplear para etiquetar residuos de lisina de los péptidos para estudiar las enzimas proteolíticas.

EJEMPLOS

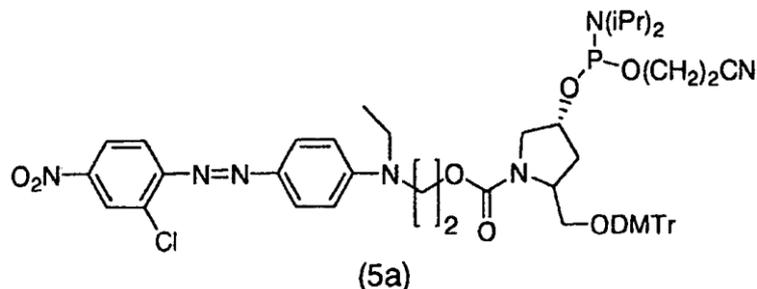
Cualquier ejemplo no perteneciente al ámbito de aplicación de las reivindicaciones se ofrece exclusivamente con fines comparativos.

Experimental general

Todas las reacciones sensibles al aire y al agua se realizaron bajo una ligera presión positiva de argón. Los solventes anhidros se obtuvieron de Aldrich (Milwaukee, WI). La cromatografía flash se realizó gel sobre sílice de malla 230-400. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de punto de fusión Mel-Temp, con capilaridad abierta, y no se han corregido. El análisis elemental fue realizado por Quantitative Technologies Inc. (Boundbrook, NJ). Los espectros de absorción UV-visibles se registraron en el rango de 200-400-nm en un espectrofotómetro UV-2100 (Shimadzu) o Lambda 2 (Perkin Elmer). Los espectros NMR de ¹H se realizaron a 20°C en un espectrofotómetro Bruker WP-200 o Varian XL-200; los cambios químicos se registraron en ppm de campo bajo de Me₄Si. La cromatografía en capa fina se realizó en placas de gel de sílice con base de aluminio 60 F-254 (EM Reagents).

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la preparación de un reactivo de fosforamidita inhibidor de la fluorescencia de acuerdo con los métodos descritos en el Esquema de reacción 1. El producto es 2-({4-[(2-Cloro-4 nitrofenil)diazenil]fenil}etilamino)-etil (2S,4R)-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-4-[[bis-(metiletil)amino](2-ciano-etoxi)fosfinooxi]pirrolidincarboxilato (5a)



2-({4-[(2-Cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil}etilamino)etil (5S,3R)-3-hidroxi-5-(hidroximetil)pirrolidincarboxilato (3a)

Una solución de 2-[4-(2-cloro-4-nitrofenilazo)-N-etilfenilamino]etanol (Disperse Red 13, Aldrich Chemical Co., 9,0 g, 25,80 mmol) y 4-nitrofenil cloroformato (Aldrich Chemical Co., 9,4 g, 46,61 mmol) en 90 ml de piridina anhidra se agitó a 70°C durante 40 min, proporcionando el intermedio 2a. Se añadió etanol (5,0 ml) a la solución de reacción seguido de trans-hidroxiprolinol (Reed et al., *Bioorg. Chem.* 2:217-225 (1991) (42 ml de una solución de 0,5 M en etanol) y trietilamina (3,2 ml). La solución resultante se agitó durante 30 min a 70°C. La solución se evaporó hasta la sequedad y el residuo se suspendió en un litro de agua y se extrajo con acetato etílico (3 x 500 ml). Los extractos agrupados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de metanol del 0-10% en acetato etílico. Las fracciones puras del producto se evaporaron y precipitaron a partir de acetato etílico-éter: 9,2 g (59%); TLC (acetato etílico), $R_f = 0,25$. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8,43 (1H, d, $J = 2,5$ Hz), 8,25 (1H, dd, $J = 9,0$ y 2,4 Hz), 7,86 (2H, d, $J = 9,1$ Hz), 7,78 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 6,96 (2H, d, $J = 9,3$ Hz), 4,88 (1H, m), 4,67 (1H, t, $J = 5,7$ Hz), 4,19 (3H, m), 3,80 (1H, m), 3,73 (2H, t, $J = 5,4$ Hz), 3,56 (2H, q), 3,46 (1H, t, $J = 4,7$ Hz), 3,27 (1H, m), 1,94 (1H, m), 1,79 (1H, m), 1,17 (3H, t, $J = 6,8$ Hz). Anal. Calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{ClN}_5\text{O}_6 + 0,2 \text{H}_2\text{O}$: C, 53,32; H, 5,37; N, 14,13. Hallado: C, 53,24; H, 5,25; N, 13,99.

2-({4-[(2-Cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil}etilamino)etil (5S,3R)-5-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxilmetil]-3-hidroxi]pirrolidin-carboxilato (4a)

A una solución de 3a (9,1 g, 18,53 mmol) en 130 ml de piridina anhidra se añadieron 6,26 g de cloruro de dimetoxitritilo. La solución se agitó durante tres horas a temperatura ambiente y, a continuación, se vertió en 300 ml de una solución de bicarbonato sódico al 5%. La mezcla se extrajo con acetato etílico (2 x 300 ml) y los extractos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y evaporaron. En residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de hexano del 20-0% en acetato etílico, seguido de un gradiente de metanol del 0-2% en acetato etílico. El eluyente de la cromatografía también contenía trietilamina al 1%. Las fracciones puras del producto se combinaron proporcionando un sólido amorfo 35: 12,66 g (86%); TLC (acetato etílico), $R_f = 0,44$. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8,45 (1H, s), 8,26 (1H, d, $J = 8,9$ Hz), 7,82 (3H, m), 7,27 (4H, m), 7,16 (5H, m), 6,95-6,79 (6H, m), 4,95 (1H, m), 4,32 (1H, m), 4,14 (1H, m), 3,99 (2H, m), 3,73 (1H, m), 3,69 (6H, s), 3,56 (1H, m), 3,40-3,30 (2H, m), 3,14 (1H, m), 2,10-1,82 (2H, m), 1,16 (3H, m), 1,06 (3H, t, $J = 6,5$ Hz). Anal. Calc. para $\text{C}_{43}\text{H}_{44}\text{ClN}_5\text{O}_8 + 0,2 \text{H}_2\text{O}$: C, 64,73; H, 5,61; N, 8,78. Hallado: C, 65,08; H, 5,70; N, 8,31.

2-({4-[(2-Cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil}etilamino)etil (2S,4R)-2-[[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-4-[[bis(metiletil)-amino](2-ciano-etoxi)fosfinooxi]pirrolidincarboxilato (5a)

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

supernatante de la reacción habitualmente no es lo bastante puro y se purifica mediante recristalización. El rendimiento es aproximadamente del 85%. (mp 191-193°C) $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 11,83 (s, 1H), 8,18 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,84 (br s, 1H), 7,64 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,25 (d, J=8,8 Hz), 6,96 (s, 1H), 4,56 (t, J=6 Hz, 2H), 4,00 (t, J=8,8 Hz, 2H), 3,21 (m, 4H), 1,51 (s, 9H). Análisis de combustión: Hallado: C, 63,16%; H, 5,56%; N, 9,45%. Calculado para 0,4 moles de agua añadida: C, 62,8%; H, 5,7%; N, 9,16%.

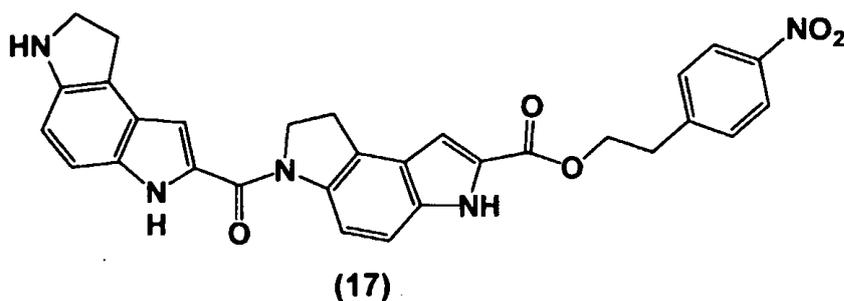
2-(4-Nitrofenil)etil pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato (15)

Se pesan dos gramos (4,43 mmol) de 14 en un matraz de fondo redondo. A continuación, en una campana de gases, se añaden 25 ml (325 mmol) de ácido trifluoroacético, se tapa el matraz y se agita. El sólido se disuelve aproximadamente en un minuto. La mezcla se agita durante una hora y, a continuación, se realiza la desprotección (se puede utilizar la HPLC como control). El ácido se evapora en un evaporador giratorio (se usa una trampa) y el producto se disuelve en 100 ml de cloruro de metileno. Esto se extrae dos veces con 100 ml que contienen entre 1/2 y 2/3 de solución de bicarbonato de sodio saturado. Las capas acuosas se extraen una vez con unos 50 ml de cloruro de metileno y esto se combina con el resto. La capa orgánica se seca sobre sulfato de sodio dos veces y se evapora para proporcionar un sólido marrón. Si se desea, este material se puede recristalizar diluyendo una solución muy concentrada en cloruro de metileno con metanol y enfriando. Habitualmente se obtienen unos rendimientos cercanos al 100%. mp 192-194°C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 11,51 (s, 1H), 8,18 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,63 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,11 (d, J=8,5 Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,70 (d, J=8,5 Hz), 5,03 (br s, 1H), 4,54 (t, J=6,4 Hz, 2H), 3,46 (t, J=8,6 Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,04 (t, J=8,6 Hz, 2H). Análisis de combustión: Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$: C, 64,94%; H, 4,88%; N, 11,96%. Hallado: C, 65,50%; H, 4,70%; N, 11,64%

2-(4-Nitrofenil)etil 3-({3-[(tert-butil)oxycarbonil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-il}carbonil)pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato (16)

Se mezclan 3,09 gramos (8,8 mmol) de 15 con 2,66 gramos (8,8 mmol) de 13 (Boger et al., *J. Org. Chem.* 52:1521 (1987)), y se añaden 46 ml de DMF. A continuación, se añaden 3,85 gramos (8,77 mmol) de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida hidroclicloruro. La mezcla se agita unas tres horas. Inicialmente la mezcla es homogénea, pero a medida que se agita, se forma un precipitado del producto. Se evapora el solvente DMF en condiciones de alto vacío y se añaden unos 100 ml de metanol. Se remueve y se filtra la mezcla en un embudo de vidrio sinterizado, y, a continuación, se lava bien con 3 x 50 ml de metanol. Después se seca en vacío. Habitualmente se obtiene un rendimiento cercano al 100%, mp: 132-134°C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 11,93 (s, NH, 1H), 11,62 (s, NH, 1H), 8,30 (br s, protón aromático, 1H), 8,27 (br s, protón aromático, 1H), 8,19 (d, protones aromáticos, J=8,3 Hz, 2H), 7,65 (d, protones aromáticos, J=8,3 Hz, 2H), 7,34 (d, J=9 Hz, protón aromático, 1H), 7,29 (d, J=9 Hz, protón aromático, 1H), 7,07 (s, protón aromático, 1H), 6,98 (s, protón aromático, 1H), 4,60 (m, protones alifáticos, 4H), 4,02 (t, J=8.5 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,40 (t, J=8 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,24 (m, protones alifáticos, 4H), 1,52 (s, 3xCH₃, 9H). Análisis de combustión: Calculado: C, 66,13%; H, 5,23%; N, 11,02%. Hallado: C, 65,94%; H, 5,19%; N, 11,07%.

2-(4-Nitrofenil)etil 3-(pirrolo[4,5-e]indolin-7-ilcarbonil)pirrolo [4,5-e]indolin-7-carboxilato (17)



Se colocan 5 gramos de 16 en un matraz. Se añaden 100 ml de ácido trifluoroacético y se agita la mezcla. Después de una hora, se evapora el ácido en un evaporador giratorio y se añaden 100 ml de solución de bicarbonato sódico saturado y 100 ml de agua. La mezcla se agita o se somete a ultrasonidos durante aproximadamente media hora y, a continuación, se filtra y se lava con agua, después con metanol y se seca en vacío. El material puede ser recristalizado. Se disuelve en una cantidad mínima de DMF templado y, a continuación, se añade aproximadamente el triple de metanol y se somete la solución a ultrasonidos durante unos minutos. Se cristaliza un material de color crema a marrón. Esto se lava con metanol y se seca en vacío. El rendimiento se aproxima a los valores teóricos. NMR de ^1H (DMSO- d_6) δ 11,96 (s, NH, 1H), 11,71 (s, NH, 1H), 8,30 (br s, protón aromático, 1H), 8,27 (br s, protón aromático, 1H), 8,19 (d, protones aromáticos, J=8,5 Hz, 2H), 7,66 (d, protones aromáticos, J=8,3 Hz, 2H), 7,34 (m, protones aromáticos, 2H), 7,08 (s, protón aromático, 1H), 7,03 (s, protón aromático, 1H), 4,60 (m, protones alifáticos, 4H), 3,68 (t, J=8 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,40 (t, J=8 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,24 (m, protones alifáticos,

4H). Análisis de combustión: Hallado: C, 63,55%; H, 4,42%; N, 11,95%. Calculado para ½ mol de contaminante de bicarbonato sódico: C, 63,43%; H, 4,45%; N, 12,13%.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra la preparación de conjugados de Q-W-MGB de acuerdo con los Esquemas de reacción 5 y 6. Concretamente, se prepara 2,3,4,5,6-pentafluorofenil 3-[4-({3-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]propil}{4-[(2-cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil}amino) butanoil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato (24, Esquema de reacción 5).

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

Se agita una mezcla de 3-(fenilamino)propan-1-ol (Huang et al., *J. Org. Chem.*; 58(23):6235-6246(1993)) (65,6 g, 0,43 mol), etil 4-bromobutirato (104,5 g, 0,54 mol) y 100 ml de etilidipropilamina a 100°C durante una hora. La reacción se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente y se divide entre 400 ml de agua y acetato etílico (500 ml). Después se lava la capa orgánica con NaHCO₃ saturado, se salmuera y se seca sobre Na₂SO₄. El aceite obtenido después de la concentración se somete a cromatografía sobre sílice, eluyendo con EtOH/CHCl₃ al 10%. La concentración de las fracciones adecuadas proporciona 115 g (el 100%) del producto deseado, en forma de un aceite viscoso incoloro. NMR de ¹H (CDCl₃) δ 7,23 (m, 2H), 6,72 (m, 3H), 4,14 (q, J=7 Hz, 2H), 3,72 (t, J=6Hz, 2H), 3,43 (t, 7 Hz, 2H), 3,34 (t, 7 Hz, 2H), 2,35 (t, 7 Hz), 1,88 (m, 4H), 1,26 (t, 7 Hz, 3H).

Etil 4-[(4-[(2-cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil)(3-hidroxi)propil]-amino]butanoato (20)

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

Ácido 4-[(4-[(2-Cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil)(3-hidroxi)propil]-amino]-butanoico

A una solución agitada de 20 (4,48 g, 10 mmol) en 40 ml de THF se añadieron 40 ml de etanol y, a continuación, una solución de KOH (0,84 g, 15 mmol) en 20 ml de agua y 20 ml de etanol. La mezcla se agita durante toda una noche y se concentra. El residuo se suspende en 125 ml de agua, se trata con 2,6 ml (aprox. 3 eq.) de ácido acético y se enfría a 4 °C. El sólido resultante se filtra, se lava con agua y se seca. El rendimiento es cuantitativo. NMR de ¹H (DMSO-*d*₆) δ 8,42 (d, J=2.5 Hz, protón aromático, 1H), 8,23 (dd, J₁=9 Hz, J₂=2,5 Hz, protón aromático, 1H), 7,82 (d, J=9Hz, 2H), 7,90 (d, J=9Hz, 1H), 7,03 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 2H), 4,8 (br s, OH, 1H), 3,5 (m, protones alifáticos, 6H), 1,86 (t, J=6 Hz, 15 protones alifáticos, 2H), 1,72 (m, protones alifáticos, 4H).

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

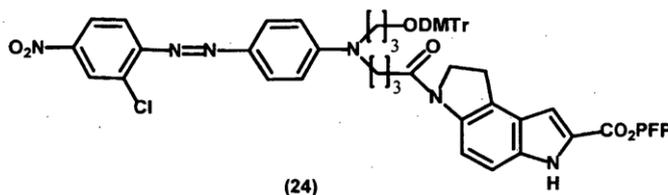
Se colocan 4,21 g (10 mmol) del ácido del paso anterior en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Se añade piridina seca (50-100 ml) y se evapora (30-40 grados) con un evaporador giratorio. El proceso se repite una o dos veces para retirar todas las trazas de agua. Se añade piridina seca (80 ml) al contenido del matraz. A continuación, se añaden 4,07 g (12 mmol) de cloruro de dimetoxitritilo. Después de agitar durante una hora, la piridina se evapora y el jarabe resultante se disuelve en unos mililitros de cloruro de metileno/metanol/trietilamina en una proporción de 18/1/1. Se prepara una columna de gel de silicio (aprox. 1,5" x 20") con un eluyente de cloruro de metileno/metanol/trietilamina en una proporción de 18/1/1 y el producto se pasa por la columna, recogiendo y combinando las fracciones apropiadas. Una vez que se han retirado los solventes por evaporación, el sólido amorfo resultante contiene algunas sales de trietilamonio además del producto deseado. La impureza no interfiere en el siguiente paso y el producto se emplea sin ninguna purificación adicional.

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

Al matraz que contiene 21 (10 mmol) se le añaden 7 ml de trietilamina y, a continuación, 100 ml de cloruro de metileno y 2,05 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (PFP-TFA). La solución se agita durante media hora. Transcurrido este tiempo, normalmente la reacción se ha completado. (TLC: 2:1 hexano/acetato etílico). Se retira el disolvente en el evaporador giratorio para obtener un jarabe que se somete a cromatografía en sílice, eluyendo con acetato etílico/hexano en una proporción de 1/3. Las fracciones apropiadas se recogen, combinan, evaporan y secan en vacío. El rendimiento es del 41%. NMR de ^1H (DMSO- d_6) δ 8,43 (d, J=2,5 Hz, protón aromático, 1H), 8,24 (dd, $J_1=9$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, protón aromático, 1H), 7,83 (d, J=9 Hz, protón aromático, 1H), 7,78 (d, J=9 Hz, protón aromático, 1H), 7,42-7,15 (m, protones aromáticos, 10H), 7,07 (m, protones aromáticos, 2H), 7,00-6,80 (m, protones aromáticos, 4H), 3,72 (s, $2\times\text{CH}_3$, 6H), 3,56 (m, protones alifáticos, 2H), 3,48 (t, J=6,3 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,08 (t, J=5 Hz, protones alifáticos, 2H), 2,89 (t, J=7 Hz, protones alifáticos, 2H), 1,95 (m, protones alifáticos, 2H), 1,86 (m, protones alifáticos, 2H).

Metil 3-[4-({3-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxilpropil]{4-[(2-cloro-4-nitrofenil)diazenil]fenil} amino)butanoil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato (23)

A una solución de 22 (3,0 g, 3,37 mmol) en 15 ml de DMF anhidra se añade trietilamina (0,75 ml) y, a continuación, metil pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato (Boger et al., *J. Org. Chem.* 52:1521 (1987)) (0,8 g, 3,7 mmol). La solución resultante se almacena a temperatura ambiente durante 20 horas. La reacción se analiza mediante HPLC para confirmar que se ha completado. Se retira la DMF en un evaporador giratorio equipado con una bomba de aceite. El residuo, un jarabe oscuro, se suspende en 50% de etilacetato/hexanos (aprox. 25 ml). La mezcla se somete a ultrasonidos para iniciar la cristalización. Los cristales se agitan durante 15 min, se recogen mediante filtrado en un embudo de vidrio sinterizado, se lavan con metanol (2 x 30 ml) y se secan en vacío. El rendimiento del producto deseado es 2,7 g (87%) en forma de un sólido de color morado oscuro. NMR de ^1H (DMSO- d_6) δ 11,93 (d, J=1,7 Hz, indol NH, 1H), 8,43 (d, J=2,5 Hz, protón aromático, 1H), 8,3-8,2 (m, protones aromáticos, 2H), 7,85-7,75 (m, protones aromáticos, 3H), 7,45-7,18 (m, protones aromáticos, 10 H), 7,05 (d, J=1,8 Hz, protón aromático, 1H), 6,97 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 2H), 6,87 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 4H), 4,12 (t, J=8 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,87 (s, éster CH_3 , 3H), 3,71 (s, CH_3 , 6H), 3,60 (br t, protones alifáticos, 2H), 3,45 (br t, protones alifáticos, 2H), 3,29 (br t, protones alifáticos, 2H), 3,08 (t, J=5 Hz, protones alifáticos, 2H), 2,5 (br t, oscurecido por señal de DMSO, protones alifáticos, 2H), 1,88 (br m, protones alifáticos, 4H).

2,3,4,5,6-pentafluorofenil 3-[4-({3-[bis(4-metoxifenil)-fenilmetoxi]-propil}{4-[(2-cloro-4-nitrofenil) diazenilfenil]-amino)butanoil]-pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato (24)**Hidrólisis del éster metílico**

A una solución de 23 (2,67 g, 2,9 mmol) en 25 ml de THF se le añade metanol (25 ml) y 5% de LiOH, monohidrato en H_2O (10 ml). La suspensión resultante se agita a 50°C (temperatura del baño) durante 90 minutos y transcurrido este tiempo se obtiene una solución transparente. El análisis de TLC no muestra ningún material de partida. El solvente se retira bajo vacío y el producto se divide entre CH_2Cl_2 y ácido cítrico frío al 10%. La fase orgánica se neutraliza con trietilamina, se seca sobre Na_2SO_4 y se concentra. El producto resultante (sólido amorfo) se seca en condiciones de vacío elevado durante al menos tres horas y se emplea en el paso siguiente sin ninguna purificación adicional.

Preparación de éster de PFP

El producto obtenido en el paso anterior se disuelve en 100 ml de DMF anhidra. Se añade trietilamina (2 ml) y, a continuación, PFP-TFA (2 ml, 4,4 mmol). La reacción se agita durante 30 minutos y se analiza mediante HPLC. No se debería observar ningún material de partida o ácido libre. La DMF se evapora y el residuo, un jarabe morado oscuro, se suspende en 100 ml de MeOH. Después de agitar durante 30 minutos, se forma un precipitado oscuro que se recoge mediante filtrado sobre un embudo de vidrio sinterizado, se lava con metanol (3 x 20 ml) y se seca bajo vacío (15-30 horas). Este procedimiento produce 2,7 g (94%) del producto deseado en forma de un sólido morado. NMR de ^1H (DMSO- d_6) δ 12,45 (d, J=1,8 Hz, indol NH, 1H), 8,43 (d, J=2,5 Hz, protón aromático, 1H), 8,38 (d, J=9 Hz, protón aromático, 1H), 8,24 (dd, $J_1=9$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, protón aromático, 1H), 7,85-7,75 (m, protones

aromáticos, 3H), 7,52-7,18 (m, protones aromáticos, 11 H), 6,97 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 2H), 6,88 (d, 5 J=9 Hz, protones aromáticos, 4H), 4,16 (t, J=8,5 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,71 (s, CH₃, 6H), 3,61 (brt, protones alifáticos, 2H), 3,47 (brt, protones alifáticos, 2H), 3,32 (br t, protones alifáticos, 2H), 3,08 (t, J=5 Hz, protones alifáticos, 2H), 2,5 (br t, oscurecido por señal de DMSO, protones alifáticos, 2H), 1,88 (br m, protones alifáticos, 4H).

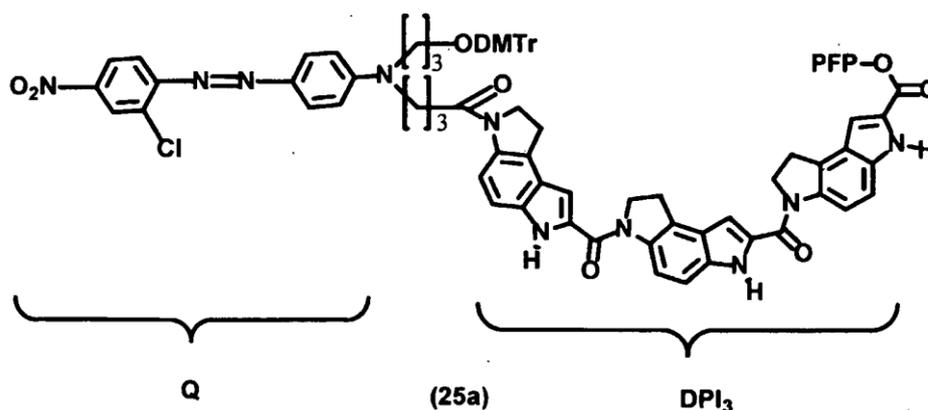
Ejemplo 5

Este ejemplo continúa el trabajo del Ejemplo 4 en la preparación de conjugados de inhibidor de la fluorescencia-ligando de unión al surco menor, como reactivos útiles en la preparación de las sondas descritas en el presente. Concretamente, se prepara 2,3,4,5,6-Pentafluorofenil 3-[[3-((3-[4-((3-[bis(4-metoxifenil)-fenilmetoxi]propil){4-[(2-cloro-4-nitrofenil)-diazenil]fenil]-amino)butanoil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-il]carbonil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-il]carbonil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato (25a donde R₁= 2-Cl y t=v=3, Esquema de reacción 6).

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

En un matraz de fondo redondo de 100 ml se pesan 1,31 g (1,22 mmol) de 24. Esto se disuelve en 25 ml de dimetilformamida. A continuación, se añaden 0,81 ml de trietilamina y finalmente 0,623 g (1,162 mmol) de 17. La mezcla de la reacción se deja durante una noche y, a continuación, la solución se concentra hasta aprox. 10 ml. El precipitado resultante se filtra, empleando un embudo de filtro de vidrio sinterizado. El sólido se lava con volúmenes generosos de metanol (agitando el lodo en el filtro con el metanol antes de aplicar el vacío) varias veces y éter. Cuando el efluente está transparente y prácticamente incoloro, el precipitado violeta oscuro se seca en vacío para obtener 1,5 g (90%) del producto deseado. NMR de ¹H (DMSO-d₆) δ 11,96 (s, indol NH, 1H), 11,76 (s, indol NH, 1H), 11,69 (s, indol NH, 1H), 8,43 (d, J=2,4 Hz, protón aromático, 1H), 8,35-8,20 (m, protones aromáticos, 4H), 8,19 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 2H), 7,85-7,75 (m, protones aromáticos, 3H), 7,66 (d, J=9Hz, protones aromáticos, 2H), 7,45-7,18 (m, protones aromáticos, 12H), 7,10 (s, protones aromáticos, 1H), 7,01 (s, protón aromático, 1H), 6,99 (m, protones aromáticos, 3H), 6,88 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 4H), 4,61 (m, protones alifáticos, 6H), 4,14 (t, J=8,5 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,71 (s, 2xCH₃O, 6H), 3,59 (m, protones alifáticos, 2H), 3,43 (m, protones alifáticos, 6H), 3,34 (m, oscurecido mediante señal de agua, protones alifáticos, 2H), 3,22 (m, protones alifáticos, 2H), 3,08 (t, J=5 Hz, protones alifáticos, 2H), 2,5 (t, oscurecido mediante señal de DMSO, COCH₂, 2H), 1,89 (br m, protones alifáticos, 4H). Análisis: Calculado: C, 68,27%; H, 4,95%; N, 10,81%. Hallado: C, 68,08%; H, 4,98%; N, 10,63%.

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



En un matraz se coloca 1,0 (0,73 mmol) del producto del paso anterior, 40 ml de THF y 2,46 g de DBU. La mezcla se agita a 50 grados durante cuatro horas y, a continuación, se retira del calor y se evapora hasta 15-20 ml. Se añaden unos 40 ml de metanol al producto y la mezcla se agita y se somete a ultrasonidos. A continuación, se filtra el precipitado con un embudo de vidrio sinterizado y se lava con otros 40-60 ml de metanol y con una cantidad similar de éter etílico, agitando cada vez el material en el filtro antes de aplicar el vacío, para que el efluente se vuelva transparente rápidamente. El producto se seca en vacío durante una hora o dos, antes de emplearlo en el paso siguiente. El material se disuelve en 20 ml de DMF en un matraz de 100 ml y se agita hasta la disolución. A continuación, se añaden 0,6 ml (4,3 mmol) de trietilamina, seguidos de 0,06 ml de PFP-TFA. La mezcla de la reacción se agita bajo argón durante toda una noche, y después se evapora hasta obtener una goma y se añaden unos 10 ml de DMF, seguidos de unos 80 ml de metanol. La mezcla se remueve y se somete a ultrasonidos y, a

continuación, se filtra el producto, que se precipita, y se seca en vacío. El producto es del 85-90%. NMR de ^1H (DMSO- d_6) δ 12,01 (s, indol NH, 1H), 11,76 (s, indol NH, 1H), 11,69 (s, indol NH, 1H), 8,43 (d, J=2,4 Hz, protón aromático, 1H), 8,40 (br s, protón aromático, 1H), 8,35-8,20 (m, protones aromáticos, 3H), 7,85-7,75 (m, protones aromáticos, 3H), 7,59 (d, J=1,2 Hz, protón aromático, 1H), 7,45-7,18 (m, protones aromáticos, 12H), 7,13 (s, protón aromático, 1H), 6,99 (m, protones aromáticos, 3H), 6,88 (d, J=9 Hz, protones aromáticos, 4H), 4,66 (m, protones alifáticos, 4H), 4,14 (t, J=8,5 Hz, protones alifáticos, 2H), 3,71 (s, $2\times\text{CH}_3\text{O}$, 6H), 3,59 (m, protones alifáticos, 2H), 3,43 (m, protones alifáticos, 6H), 3,34 (m, oscurecido mediante señal de agua, protones alifáticos, 2H), 3,08 (t, J=5 Hz, protones alifáticos, 2H), 2,5 (t, oscurecido mediante señal de DMSO, COCH_2 -, 2H), 1,89 (br m, protones alifáticos, 4H). Análisis: Hallado: C, 63,58%; H, 4,13%; N, 9,53%. Calculado, para 2,3 moles de agua: C, 63,97%; H, 4,21 %; N, 9,44%.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la preparación de la composición unida al soporte, por lo general ilustrada como 29 en el Esquema de reacción 7, y abreviada como DMTrO-Rojo 13-amida-CDPI₃-CPG.

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

Se disolvieron 4 g (53 mmol) de 3-aminopropanol agitando en 50 ml de cloruro de metileno en un matraz de fondo redondo de 250 ml secado en horno. Esta solución se detuvo y se reservó. Se disolvieron 7,7 g (24,9 mmol) de cloruro de monometoxitritilo (MMT-Cl, grado reactivo Aldrich) en otros 50 ml de cloruro de metileno. Se colocó un embudo de goteo secado en horno sobre el matraz y se añadió la solución de MMT-Cl al embudo. Posteriormente se añadió la solución de MMT-Cl a la solución del matraz durante unos 10 min (se produce algo de calor). Tras una hora, se analizó la reacción mediante TLC (1:1 v/v hexanos/acetato etílico, R_f 0.4) y se comprobó que se había completado. La visualización de manchas de TLC por pulverización de ninhidrina/calor mostró una traza de producto secundario de bis-MMT (movimiento más rápido). La mezcla de la reacción se añadió a 200 ml de agua situados sobre 200 ml de cloruro de metileno en un embudo de separación. La mezcla se agitó y se separó en dos capas; la capa acuosa se descartó y la capa orgánica se lavó con otros 200 ml de agua. La capa orgánica se secó sobre 10-20 g de sulfato de sodio y se evaporó para obtener unos 7 g de la amina tritilada en forma de un jarabe amarillo claro. Este compuesto no precisó ninguna purificación adicional y se secó durante toda la noche. Después de varios días, el jarabe se solidificó. El producto se recristalizó a partir de éter-hexanos, para obtener 4,6 g (53% de rendimiento) de 26 en forma de un sólido blanco (mp = 89,5-90,5 °C). Anal. calc. para C₂₃H₂₅NO₂: C, 79,51; H, 7,25; N, 4,03. Hallado: C, 79,48; H, 7,18; N, 3,98.

Ácido 2-[(3-[(4-Metoxifenil)difenilamino]propil)oxicarbonil]metoxi]-acético, sal de trietilamonio (27)

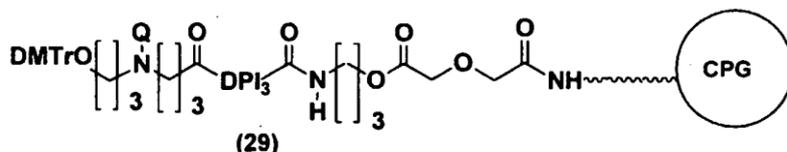
Se disolvieron 2,72 g (7,83 mmol) del alcohol (26) en 20 ml de cloruro de metileno con 1,3 ml (9,4 mmol) de trietilamina y 1,1 g (9,5 mmol) de anhídrido glicólico. La mezcla se agitó durante dos horas (se volvió homogénea). La TLC mostró una reacción limpia (R_f = 0,35 en 9:1/cloruro de metileno:metanol). Los solventes se retiraron mediante evaporación y el residuo se sometió a cromatografía en una columna de gel de sílice de 1,5 x 18 pulgadas, recubierta con un 93% de cloruro de metileno, un 5% de metanol y un 2% de trietilamina. Se combinaron las fracciones que contenían el producto y el solvente se retiró por evaporación. La coevaporación con DMF seca garantizó la eliminación de las trazas de agua y de solventes volátiles residuales. Se asumió que el rendimiento del jarabe incoloro (27) fue del 100%. El jarabe se disolvió en DMF seca para proporcionar un volumen final de 23,4 ml (aprox. 0,33 M de solución).

Síntesis de N-MMT diglicolato CPG (28)

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

Carga de MMT (:mol/g) = $A_{472} \times \text{volumen (en ml)} \times 14,3 \div \text{peso de CPG (mg)}$

Síntesis de CPG 29

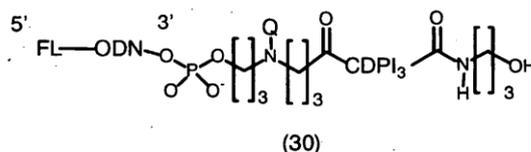


Se pesaron 4 g de N-MMT diglicolato CPG (28) en un embudo de vidrio sinterizado de porosidad media. El CPG se destriló tratando con 25 ml de TCA al 3%/DCM. Después de agitar brevemente con una espátula, la mezcla se hizo reaccionar durante 5 min. antes del filtrado (se volvió amarilla). El proceso se repitió cuatro veces hasta que el filtrado fue incoloro. El CPG se lavó con 4 x 40 ml de cloruro de metileno. Se desechó el filtrado para residuos orgánicos y se neutralizó el CPG mediante tratamiento con 40 ml de un 20% de trietilamina en acetonitrilo. Después de agitar brevemente con una espátula, la mezcla se filtró y se lavó con 2 x 40 ml de acetonitrilo y 2 x 40 ml de éter. Las trazas de éter se retiraron en vacío (bomba de aceite). El CPG destrilado se empleó inmediatamente para la siguiente reacción de inmovilización.

Se agitaron 0,259 g (180 :mol) de 25a (véase el Ejemplo 5) con 12 ml de DMSO seco en un tubo de polipropileno de 15 ml. Después de 15 min., la solución de color morado oscuro se añadió a 4 g de diglicolato destrilado CPG (en un matraz de fondo redondo de 50 ml). Esto corresponde a un ratio de producción de 45 :mol de éster de PFP por gramo de CPG. Se añadieron otros 5 ml de DMSO al tubo de polipropileno para disolver el éster de PFP residual y la solución se añadió al CPG. Se añadieron 2 ml de trietilamina y la mezcla se detuvo y se removió en un mezclador orbital durante 14 horas. Se filtró el CPG y se lavó con 2 x 50 ml de DMSO, 2 x 50 ml de acetonitrilo y 2 x 50 ml de éter. Las trazas de éter se retiraron en vacío (bomba de aceite). Los grupos amino sin reaccionar se acetilaron, tratando el CPG con 10 ml de piridina seca y 3 ml de anhídrido acético. Después de remover durante 6 h, se filtró el CPG y se lavó con 2 x 50 ml de DMF, 2 x 50 ml de acetonitrilo y 2 x 50 ml de éter. Las trazas de éter se retiraron en vacío (bomba de aceite). Se analizó el CPG para detectar la carga de DMT, tratando con 3-5 mg de CPG en 25 ml de ácido perclórico al 70%/metanol a una proporción de 1/1. La absorbancia del catión de DMT liberado se registró a 498 nm y el nivel de carga calculado fue de 45 :mol/g de CPG, empleando la ecuación siguiente:

Carga de DMT (:mol/g) = $A_{498} \times \text{volumen (en ml)} \times 14,3 \div \text{peso de CPG (mg)}$

Ejemplo 7

SÍNTESIS DE FL-ODN-ROJO 13-AMIDA-CDPI₃ (30)

Los oligonucleótidos se sintetizaron en el CPG 29 utilizando química de acoplamiento de fosoramidita estándar, salvo porque la solución de oxidación 0.1 b estándar se diluyó hasta 0,01-0,015 para evitar la yodización de la fracción de MGB. FAM y TET se incorporaron en el extremo 5' utilizando las fosoramiditas correspondientes disponibles en Glen Research.

Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra la preparación de un reactivo de fosoramidita basado en cumarina como se muestra en el Esquema de reacción 8. Concretamente se prepara 4-[[N-(6-[[Bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinooxi]hexil)carbamoil]-metil]-2-oxo-2H-cromen-7-il 2,2-dimetilpropanoato (34a).

N-(6-Hidroxihexil)-2-(7-hidroxi-2-oxo(2H-cromen-4-il))acetamida (32a)

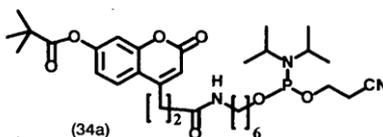
Se sintetizó el éster metílico de ácido (7-Hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)-acético (1) de acuerdo con Baker et al. {*J. Chem. Soc.*; 1950; 170, 173.}.

Se calentó una solución de 31 (2,0 g, 8,5 mmol, donde uno de los elementos R₂₃ a R₂₆ es OH) y 6-aminohexanol (4,0 g, 34,1 mmol) en 15 ml de DMF a 80°C durante 24 h. La DMF se evaporó bajo vacío para obtener la mezcla del producto y el exceso de 6-aminohexanol en forma de un jarabe viscoso. La cromatografía en sílice eluyendo con MeOH al 10%/CH₂Cl₂ y la evaporación de las fracciones de producto puras proporcionaron un sólido blanco que se lavó con éter y se secó bajo vacío. El rendimiento fue de 2,05 g (75%).

4-[[N-(6-Hidroxihexil)carbamoil]metil]-2-oxo-2H-cromen-7-il 2,2-dimetilpropanoato (33a)

A una solución de 32 a (2,0 g, 6,3 mmol) en 20 ml de piridina seca se añadió 4,4'-dimetoxitriifenilmetilo cloruro (3,0 g, 8,9 mmol). La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora. El análisis de TLC (acetato de etilo, $R_f \sim 0,7$) mostró una reacción completa (protección del grupo hidroxilo primario). A esta solución se añadió anhídrido trimetilacético (2,0 ml, 9,9 mmol) seguido de trietilamina (5 ml) y 4-(dimetilamino)piridina (0,3 g). Se agitó la mezcla durante 5 horas. El análisis de TLC mostró una protección completa del grupo fenol ($R_f \sim 0,9$, acetato etílico). Se añadió metanol para inhibir la fluorescencia del exceso de anhídrido. La piridina se retiró mediante evaporación bajo vacío y coevaporación con xileno. El producto obtenido se dividió entre acetato etílico y un 2% de NaHCO₃. La fase orgánica se concentró bajo vacío para proporcionar el 33a protegido con DMT en bruto.

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

4-[[N-(6-[[Bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinoxi]hexil)-carbamoil]metil]-2-oxo-2H-cromen-7-il 2,2-dimetilpropanoato (34a)

A una solución de 33a (0,6 g, 1,5 mmol) en 10 ml de CH₂Cl₂ anhidro se añadió trietilamina (0,4 ml) y, a continuación, 2-cianoetil diisopropil-clorofosforamidita (0,35 ml, 1,6 mmol). La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora y se trató con 0,1 ml de MeOH. El solvente se evaporó y el residuo se dividió entre acetato etílico y NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con NaCl saturado, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. El producto en bruto se sometió a cromatografía sobre sílice, eluyendo con un 5% de trietilamina en acetato etílico. La concentración de las fracciones de producto en bruto y el secado bajo vacío proporcionó 0,59 g (65%) de 34a, en forma de un aceite incoloro y viscoso.

Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra la preparación de un reactivo de fosforamidita de resorufina, de acuerdo con los métodos generales del Esquema de reacción 9, para proporcionar 8-(3-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)-fosfinoxi]propil)-7-oxofenoxazin-3-il 2,2-dimetilpropanoato (37a).

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

Una suspensión de 4-nitrosorecorcinol (4,5 g, 32,4 mmol), 4-(3-hidroxi-propil)benzeno-1,3-diol (Forchiassin, M.; Russo, C, J. *Heterocyc. Chem.* 20:493-494 (1983)) (4,0 g, 23,8 mmol) y MnO₂ (2,5 g, 17,6 mmol) en 50 ml de MeOH se enfrió hasta aprox. 0°C (baño de hielo). A esta suspensión se añadieron gota a gota 2,5 ml de H₂SO₄ conc. y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante cinco horas. El compuesto de resazurina rojo precipitado se recogió mediante filtrado, se lavó con metanol y se secó. El rendimiento fue de 5,5 g. Este producto no fue homogéneo, sino que estaba contaminado con compuesto de resorufina y sales de manganeso.

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

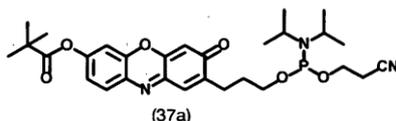
8-(3-hidroxi-propil)-7-oxofenoxazin-3-il 2,2-dimetilpropanoato (36b)

Una suspensión de 35a (2,0 g) en 50 ml de piridina se trató con 4,4'-dimetoxitriifenilmetil cloruro (5,0 g, 14,8 mmol) y se agitó durante cinco horas. La mezcla se filtró para retirar algún material insoluble y el filtrado se trató con anhídrido trimetilacético (2 ml). La solución se agitó durante quince horas y se añadió MeOH (2 ml) para inhibir la fluorescencia del exceso de anhídrido. Después de ser agitada durante tres horas, la mezcla de reacción se

concentró bajo vacío. La piridina residual se retiró mediante coevaporación con trietilamina y xileno. El producto en bruto resultante 36a se sometió a cromatografía sobre sílice, eluyendo con un 50% de etil acetato/hexano.

5 Se disolvió el derivado de DMT en 100 ml con un 10% de MeOH/CH₂Cl₂ y se trató con 0,5 ml de ácido trifluoroacético. Después de una hora, se añadió trietilamina (2 ml) y se concentró la solución. La cromatografía sobre sílice (acetato etílico) y el secado proporcionaron 0,38 g del producto deseado en forma de un sólido naranja.

8-(3-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinooxi]propil)-7-oxofenoxazin-3-il 2,2-dimetilpropanoato (37a)



10 Se disolvieron 36b (0,38 g, 1,1 mmol) en 6 ml de CH₂Cl₂ anhidro. Se añadió trietilamina (1,5 ml) y, a continuación, 2-cianoetil diisopropilclorofosforamidita (0,29 ml, 1,3 mmol). La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió MeOH (0,1 ml) y la reacción se concentró bajo vacío. El residuo obtenido se dividió entre acetato etílico y NaHCO₃. La fase orgánica se lavó con NaCl saturado, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para obtener la amidita en bruto. Se disolvió en 2 ml de éter y se añadió gota a gota a unos 50 ml de hexano. El sólido naranja resultante se recogió por filtrado, se lavó con hexano y se secó. El rendimiento fue de 0,4 g

15

Ejemplo 10

20 Este ejemplo ilustra la preparación de un reactivo de fosforamidita de PPT de acuerdo con los métodos explicados en el Esquema de reacción 10, para proporcionar 3-[[di(metiletil)amino][2-(4-{3-butil-7-[(4-metilfenil)-carbonil]-2,4,6,8-tetraoxo-1-((4-metilfenil)carbonil)(1,3,5,7,9,10-hexahidro-pirimidino[5',4'-5,6]piridino[2,3-d]pirimidin-10-il))fenil)etoxi]-fosfinooxi]propanonitrilo (PPT) (44)

3-n-Butil-6-[4-(2-hidroxietil)aminofeniluracilo (40)

25 Se calentó una mezcla de 6-cloro-3-n-butiluracilo (10,4 g, 51,3 mmol), 2-(4-aminofenil)etanol (10,0 g, 72,9 mmol) y etildisopropilamina (18 ml, 0,1 mol) con agitación bajo argón en un baño de aceite a 150 grados durante una hora y veinte minutos. La mezcla se enfrió hasta alcanzar la temperatura ambiente, se diluyó con 50 ml de agua, se trató con 10 ml de ácido acético y se agitó para la cristalización durante toda la noche. Un sólido precipitado se filtró, se lavó con ácido acético al 2%, se secó sobre filtro y se disolvió en 100 ml de etanol al 96% caliente. Se añadieron 100 ml de agua caliente a la solución, seguidos de 1,0 g de carbón vegetal. La mezcla se filtró en caliente y se cristalizó sobre hielo. Se recogió un sólido amarillo por filtrado y se secó en vacío para obtener 10,7 g de 40, mp 207-208°C, ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 0,88 (t, 3H, J = 7,3 Hz, CH₃), 1,25 (m, 2H, CH₂), 1,46 (m, 2H, CH₂), 2,70 (t, 2H, J = 6,8 Hz, CH₂), 3,60 (dd, 2H, J = 11,8, 6,8 Hz, CH₂), 3,68 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂), 4,62 (t, 1H, J = 5,3 Hz, OH), 4,73 (d, 1H, J = 1,8 Hz, 5-H), 7,10 (d, 2H, J = 8,4 Hz, ArH), 7,23 (d, 2H, J = 8,4 Hz, ArH), 7,10 (s, 1H, NH), 10,37 (s, 1H, NH).

35

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

40 Se agitó una solución de 40 (6,6 g, 20 mmol) y 5-formil-2,4,6-tricloropirimidina (5,85 g, 27,7 mmol) en 80 ml de DMF seca a temperatura ambiente durante ocho horas y se diluyó lentamente con 80 ml de agua. La solución produjo un sólido tras refrigeración durante dos días. El producto se aisló mediante filtrado, se lavó con etanol frío al 50% (50 ml) y etanol al 25% (50 ml) y se secó en vacío para obtener 8,16 g (96%) de 41 en forma de un sólido incoloro, mp 205-215°C (descomp). NMR de ¹H (DMSO-d₆) δ 0,88 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃), 1,27 (m, 2H, CH₂), 1,48 (m, 2H, CH₂), 2,81-2,90 (m, 2H, CH₂), 3,71-3,85 (m, 4H, CH₂), 4,50 (br, s, 5H, OH, NH, H₂O), 7,26 (d, 2H, J = 8,4 Hz, ArH), 7,44 (d, 2H, J = 8,4 Hz, ArH), 8,62 (s, 1H, 5-H).

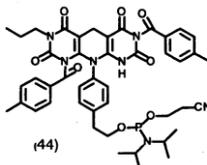
45

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

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

55

PPT 44



El sólido 42 (1,2 g, 2,82 mmol) se evaporó con piridina (10 ml), se suspendió en piridina (13 ml), se trató con Me_3SiCl (2,2 ml, 17,3 mmol) y se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción se enfrió con hielo y se trató lentamente con cloruro de toluoilo (5 ml, 28,8 mmol). La agitación continuó a temperatura ambiente durante dos horas y el solvente se evaporó. El residuo se trató con ácido acético (10 ml) y, a continuación, se añadió agua (10 ml). El aceite precipitado se extrajo con hexanos (3 x 50 ml) y el residuo que era insoluble en hexanos se evaporó con agua. El residuo se suspendió en etanol al 96% (10 ml) y se filtró para recuperar 0,3 g del material de partida. El licor madre se diluyó con agua para precipitar el derivado de bis-toluoilo en forma de aceite. El aceite se secó en vacío para obtener 0,96 g (52%) de 43 en forma de espuma sólida. Este compuesto, sin ninguna purificación adicional, se convirtió en fosoramidita por el procedimiento siguiente. El sólido se evaporó con acetonitrilo, se disolvió en 25 ml de diclorometano, se trató con tetrazolida de diisopropilamonio (0,54 g, 3,13 mmol) y, a continuación con tetraisopropilfosforodiamidita de 2-cianoetilo (0,88 g, 2,9 mmol). La mezcla de la reacción se agitó bajo argón durante una hora, se trató con metanol (1 ml), se puso en EtOAc (100 ml), se lavó con una solución de NaCl sat. y se secó sobre Na_2SO_4 . La solución se evaporó, se purificó mediante HPLC en columna de gel de sílice utilizando un sistema de gradiente 0-50% B; CH_2Cl_2 -hexanos- NEt_3 (15:30:1) (A); EtOAc (B); detectado a 320 nm. Se evaporó la fracción principal dando una espuma incolora, 0,79 g (33%) de AG1 fosoramidita 44, ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,92 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, CH_3), 1,07-1,42 (m, 14H, $4 \times \text{CH}_3$ (i-Pr), CH_2 (Bu)), 1,50-1,65 (m, 2H, CH_2 (Bu)), 2,35-2,60 (m, 2H, CH_2CN), 2,40 (s, 3H, CH_3Ar), 2,46 (s, 3H, CH_3Ar), 2,95-3,13 (m, 4H, $2 \times \text{CH}$ (i-Pr), CH_2 (Bu)), 3,45-3,60 (m, 2H, OCH_2), 3,80-4,02 (m, 4H, ArCH_2CH_2), 3,82 (s, 2H, 5- CH_2), 7,15-7,35 (m, 8H, ArH (TbI)), 7,45 (s, 1H, NH), 7,73 (br, s, 3H, NH), 7,95 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, ArH), 8,05 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, ArH). ^{31}P NMR (CDCl_3) δ (ppm, H_3PO_4) 143,2 (s).

Ejemplo 11

N-{3-[4-[(1Z)-1-AZA-2-(DIMETILAMINO)PROP-1-ENIL]-1-(5-{[BIS(4-METOXIFENIL)FENILMETOXI]METIL}-4-{[BIS(METILETIL)AMINO](2-CIANOETIL)FOSFINOXI]OXOLAN-2-IL}PIRAZOLO[5,4-D]PIRIMIDIN-3-IL}PROPILO][2-({4-[(2-CLORO-4-NITROFENIL)DIAZENIL]FENIL}-ETILAMINO)-ETOXI]CARBOXAMIDA (50) (ESQUEMA DE REACCIÓN 11)

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

A una mezcla de 45 (1,96 g, 5,20 mmol), CuI (103 mg, 0,54 mmol) y tetraquis[trifenilfosfina]paladio[0] (317 mg, 0,276 mmol) en 10 ml de DMF anhidra se le añadió trietilamina anhidra (1,1 ml) y, a continuación, propargil trifluoroacetimida (1,50g, 9,88 mmol). La mezcla de la reacción se agitó bajo argón durante 4 horas. El solvente DMF se retiró por evaporación y el aceite residual se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con metanol al 7% en acetato etílico. Las fracciones del producto se agruparon y evaporaron, produciendo una espuma: 2,16 g (99% de rendimiento).

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

A una solución de 46 (2,10 g, 5,25 mmol) en 50 ml de etanol, que contenía 0,300 mg de paladio al 5% sobre carbono (preactivado con ácido fórmico), se le añadió 1,0 ml de solución tampón de formato de trietilamonio 4 M (pH 6.5). La mezcla se agitó bajo 40 psi de gas de hidrógeno durante 18 horas. A continuación se filtró a través de Celite y el filtrado se evaporó proporcionando un sólido. 1,8 g (85% de rendimiento).

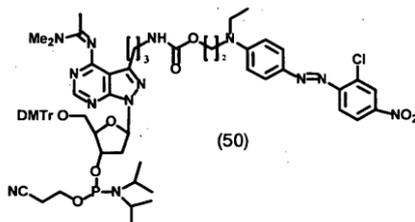
El sólido se agitó en 15 ml de hidróxido de amonio concentrado (matraz sellado) durante 12 horas y, a continuación, se evaporó hasta la sequedad. El sólido (47) se evaporó a partir de acetonitrilo seco y se almacenó bajo vacío: 1,74 g de rendimiento.

Síntesis de 48 (n=1, q=2, $\text{R}_5\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{-}$, $\text{R}_5, \text{R}_5=\text{H}$, $\text{R}_1=2\text{-Cl}$, $\text{R}_5=4\text{-NO}_2$)

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

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

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

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

Se añadió cloruro de dimetoxitritilo (0,42 g) a una solución de 49 (0,75 g, 1,03 mmol) en 10 ml de piridina seca. La solución se agitó durante cuatro horas bajo argón y, a continuación, se vertió en 200 ml de una solución de bicarbonato sódico al 5%. El producto se extrajo con 300 ml de acetato etílico. El extracto se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con metanol al 10% en acetato etílico (1% de trietilamina). Las fracciones del producto se evaporaron, produciendo una espuma: 556 mg (57% de rendimiento).

A una solución del derivado de 5'-dimetoxitritilo (540 mg, 0,567 mmol) en 15 ml de cloruro de metileno anhidro, que contenía 0,30 ml de diisopropiltilamina, se añadió 2-cianoetil N,N-diisopropilcloro-fosforamidita (0,25 ml). Después de agitar durante 30 minutos bajo argón a 25°C, la solución se trató con 1,0 ml de metanol y se diluyó con 200 ml de acetato etílico. La solución se lavó con 200 ml de una solución de bicarbonato sódico al 5%, se secó sobre sulfato sódico y se evaporó. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con metanol al 5% en acetato etílico (2% de trietilamina). Las fracciones del producto se evaporaron, produciendo una espuma: 453 mg (76% de rendimiento).

Ejemplo 12**SÍNTESIS DE SONDAS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS FLUOROGÉNICOS**

Las sondas de 3'-DPI₃ se prepararon mediante síntesis de ADN automatizada a partir de un soporte de vidrio modificado con DPI₃, empleando los métodos anteriormente descritos (Lukhtanov et al. *Biorg. Chem.*, 7: 564-567 (1996)). La síntesis de oligonucleótidos se realizó en un sintetizador ABI 394, de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante, salvo por el hecho de que se utilizó una solución de yodo 0,015 M (en lugar del estándar 0,1 M) en el paso de oxidación, para evitar la yodización de la fracción CDPI₃. Para evitar la extensión durante la PCR, se prepararon sondas sin 3'-CDPI₃ con el 3'-hidroxihexil fosfato, como se ha descrito anteriormente (Gamper et al. *Biochem.* 36: 14816-14826 (1997)). Las fosforamiditas inhibidoras de la fluorescencia se añadieron al CPG y se usaron B-cianoetilfosforamiditas y reactivos estándar (Glen Research, Sterling, VA) en la síntesis de oligonucleótidos. Se usó fosforamidita de 6-carboxifluoresceína (6-FAM) (Glen Research) para introducir los colorantes reporteros en 5'. Alternativamente, se empleó fosforamidita de TAMRA-dU (Glen Research), fosforamidita de cy3 o cy5 (Glen Research), fosforamidita de resorufina, fosforamidita de cumarina, o fosforamidita de AG para introducir el 5'-fluoróforo indicado. Se incorporó fosforamidita de 5'-hexilamina (Glen Research) a determinados ODN para la conjugación postsintética del colorante 3'-inhibidor de la fluorescencia tetrametilrodamina (TAMRA). Después de la desprotección, todos los oligonucleótidos se purificaron mediante HPLC de fase inversa y se aislaron como sales de sodio mediante concentración con butanol/precipitado con perclorato sódico (Milesi et al. *Methods Enzym.* 313: 164-173 (1999)).

Ejemplo 13**CONJUGACIÓN POSTSINTÉTICA DE ODN CON TAMRA**

Se usó el éster TAMRA NHS (Glen Research) para acilar los conectores de hexilamina en determinados ODN, de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Las sondas de CDPI₃ resultantes con dos colorantes conjugados se purificaron desnaturalizando mediante electroforesis en gel, utilizando poliacrilamida al 8%. Se escindieron las bandas deseadas y las láminas de gel se incubaron durante toda la noche a 37°C en 10 ml de Tris-HCl 100 nM, cloruro de trietilamonio 10mM, EDTA 1 mM (pH 7.8). Se aislaron los productos del extracto mediante HPLC de fase inversa, concentración con butanol y precipitado con perclorato sódico. Los gránulos se disolvieron en

agua y se determinaron las concentraciones espectrofotométricamente. Un modelo vecino más próximo (Cantor et al. Biopolymers 9: 1059-1077 (1970) se aplicó para calcular los coeficientes de extinción (ϵ_{260}) de los ODN. Para los conjugados y las sondas, los coeficientes de extinción se calcularon como una suma de ϵ_{260} para los ODN y los residuos incorporados de DPl₃ ($68.000 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$), 6-FAM ($22.800 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$), TAMRA ($34.000 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$) e inhibidor de la fluorescencia ($11.300 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$).

Ejemplo 14

DIGESTIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS MEDIANTE FOSFODIESTERASA DE VENENO DE SERPIENTE

Los oligonucleótidos se digirieron con fosfodiesterasa de veneno de serpiente (PDE) para estudiar el potencial inhibidor de la fluorescencia de diversos inhibidores. Se colocaron 200 nM de oligonucleótidos en una solución tampón que contenía 40 mM de NaCl, 20 mM de Tris (pH 8.9), 5mM de MgCl₂ y 0,025% de BSA. La fluorescencia inicial se leyó en un fluorímetro LS50B (Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA), antes de añadir la fosfodiesterasa (Pharmacia, Piscataway, NJ). Se añadieron 54 unidades de enzimas a la mezcla de reacción y se incubó a 37°C durante 16 horas. La fluorescencia final se midió de nuevo utilizando el LS50B. La ratio de la fluorescencia final frente a la fluorescencia inicial representa la ratio de señal frente a ruido (S/N) de los inhibidores de la fluorescencia. Independientemente, se controlaron las cinéticas de las reacciones de digestión utilizando el LS50B, para determinar el tiempo necesario para completar la digestión de los oligonucleótidos.

Ejemplo 15

ENSAYO DE PCR DE 5'-NUCLEASA

Se unieron oligonucleótidos conjugados con CDPl₃ a un fluoróforo, FAM, en el extremo 5' y se conjugaron diversos inhibidores de la fluorescencia mediante un conector en el extremo 3', empleando los métodos anteriormente explicados. Se realizaron ensayos de 5'-nucleasa con los oligonucleótidos anteriores, para determinar la capacidad inhibidora de la fluorescencia de los diversos inhibidores investigados. El control de la fluorescencia se realizó en un LC-24 LightCycler de Idaho Technologies. Cada reacción contenía una solución tampón de PCR (40 mM de NaCl, 20 mM de Tris HCl, pH 8.9, 5 mM de MgSO₄, 0,05% de albúmina de suero bovino), 125 mM de cada dNTP, 0,5 mM de cada cebador, 0,1 mM de sonda de CDPl₃ fluorescente, 0,5 U/10 ml de *Taq* polimerasa y 0,1 ng/10 ml de ADN sintético como plantilla. El programa de ciclación fue de 50 ciclos (o los indicados) de 2 segundos a 95°C y, a continuación, de 30 segundos a la temperatura de extensión (55-70°C).

Ejemplo 16

Este ejemplo ilustra la detección de SNP de diferentes alelos de RRM1 con un conjugado de MGB-Q-ODN-FI no clivable.

La detección por PCR en ADN genómico humano se realizó de forma asimétrica con 4 μM del cebador 1 (GTA CTT TCA ATT CAT GGA GCA TAC CT) (SEC. ID. N°: 3) y 100 nM del cebador 2 (ATG GCC TTG TAC CGA TGC TGA) (SEC. ID. N°: 4) complementario de la misma cadena que la sonda). Para el formato múltiple, se añadieron simultáneamente ambas sondas, etiquetadas con diferentes colorantes y correspondientes a diferentes alelos. La PCR en tiempo real se realizó en fluorímetros de ciclo térmico ABI Prism 7700 (PE Biosystems) o en Light Cycler (Idaho Technology). Cuando se utilizó el instrumento ABI Prism, se realizaron 60 ciclos de PCR en tres fases (95°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 76°C durante 30 segundos, o según lo indicado) después de 2 minutos a 50°C y 2 minutos a 95°C con 0,2 μM de sonda (MGB-Q-ATATCT AGC GTT GA-FAM) (SEC. ID. N°: 5), empleando 0,25 U de JumpStart DNA Polymerase (Sigma) y 0,125 U de AmpErase Uracil N-glycosylase (PE Biosystems), en solución tampón de 1X PCR (20mM de Tris-HCl pH 8.7, 50mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂) y 10 ng de ADN genómico humano en 10 μl de reacción. Para la PCR en Light Cycler, se añadió albúmina de suero bovino a la mezcla a una concentración final de 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La ciclación se realizó como sigue: 2 minutos a 50°C, 1 minuto a 95°C, seguidos de 60 ciclos de 1 segundo a 95°C, 20 segundos a 56°C y 30 segundos a 76°C, o según lo indicado. El aumento de la señal fluorescente se registró durante la fase de anillado de la reacción. Los ADN genómicos humanos de un árbol genealógico número 66 (homocigótico para la madre del alelo 1 del RRM1; homocigótico para el padre del alelo 2 del RRM1 e hijo heterocigótico) se adquirieron en Coriell Institute of Medical Research. El genotipo se determinó previamente en nuestro laboratorio, empleando polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción (Lynas, C, *Blood* 90:4235-4236(1997)) y métodos MGB-TaqMan. La lectura se realizó en diferentes canales del ABI Prism 7700 apropiados para los espectros de los colorantes o en la pantalla de visualización de componentes.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Epoch Biosciences, Inc.
 Reed, Michael W.
 Lukhtanov, Eugeny Alexander
 Gall, Alexander A.
 Dempcy, Robert O.
 Vermeulen, Nicolaas M. J.

10 <120> MÉTODOS Y REACTIVOS PARA DETECTAR LA INHIBICIÓN DE LA
 FLUORESCENCIA

15 <130> 290097.403PC

<140> PCT
 <141> 2002-06-05

20 <160> 5

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

25 <210>1
 <211>15
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de ODN

<400>1 15
 gagggatgta aaaat

35 <210>2
 <211>13
 <212>ADN
 <213>Secuencia artificial

40 <220>
 <223>Secuencia de ODN

<400>2 13
 gtcctgattt tac

45 <210>3
 <211>26
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador de PCR 2

<400> 4 21
 Atggccctgt accgatgctg a

55 <210>5
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda de MGB no clivable

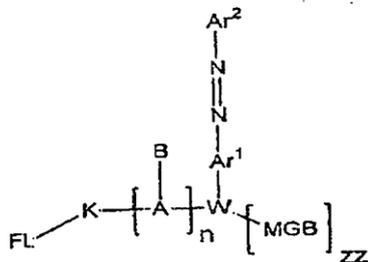
<400> 5

Atatctgcg ttga

14

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de sonda de oligonucleótidos con la fórmula siguiente:

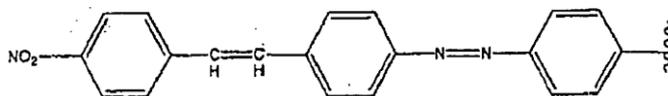


- 5 donde
 Ar¹ y Ar² son, cada uno de ellos independientemente, un grupo arilo sustituido o no sustituido, y uno de los elementos Ar¹ o Ar² es directa o indirectamente sustituido por un grupo arilo sustituido (Ar³), donde Ar³ amplía la capacidad de resonancia del sistema aromático Ar¹-N=N-Ar² y, por tanto, aumenta la absorbancia de longitud de onda máxima del compuesto;
 10 MGB es un grupo de unión al surco menor;
 FL es un grupo fluorescente que tiene una máxima de emisión en la región de 400 a 900 nm;
 K es un grupo de unión cíclico o acíclico que tiene entre 1 y 30 átomos del esqueleto seleccionados entre C, N, O, S y P;
 W es un grupo de unión que tiene entre 3 y 100 átomos del esqueleto seleccionados entre C, N, O, S, Si y P, siendo dicho grupo de unión cíclico, acíclico, aromático o una combinación de los mismos;
 15 [A-B]_n es un oligonucleótido natural o modificado donde el subíndice n es un número entero de 4 a 10; y el subíndice zz es 1.

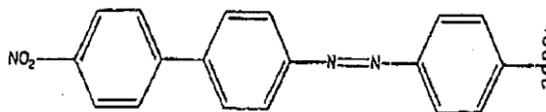
2. Un compuesto de la reivindicación 1 donde Ar² es sustituido por Ar³.
 20 3. Un compuesto de la reivindicación 2 donde Ar² es indirectamente sustituido por Ar³.
 4. Un compuesto de la reivindicación 3, donde Ar² es indirectamente sustituido por Ar³ a través de un anillo o anillos aromáticos y/o de un enlace o enlaces dobles.
 25 5. Un compuesto de la reivindicación 4, donde Ar² es indirectamente sustituido por Ar³ a través de un enlace doble seleccionado de los enlaces dobles de carbono-carbono y nitrógeno-nitrógeno.
 6. Un compuesto de la reivindicación 5, donde Ar² es indirectamente sustituido por Ar³ a través de un grupo seleccionado entre -(C≡C)_t- y -(CR'=CR')_t, donde t es 0-5 y R' es independientemente seleccionado entre hidrógeno, (C₁-C₃)alquilo y heteroalquilo, arilo y heteroarilo no sustituido, (arilo no sustituido)-(C₁-C₄)alquilo, y (arilo no sustituido)oxi-(C₁-C₄)alquilo.
 30 7. Un compuesto de la reivindicación 1, donde al menos Ar¹, Ar² o bien Ar³ es sustituido por -halógeno, -OR', -OC(O)R', -NR'R'', -SR', -R', -CN, -NO₂, -CO₂R', -CONR'R'', -C(O)R', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR''C(O)₂R', -NR'-C(O)NR''R''', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -N₃, -CH(Ph)₂, perfluoro(C₁-C₄) alcoxilo, y perfluoro(C₁-C₄)alquilo, en un número que oscila entre cero y el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde R', R'' y R''' son seleccionados, independientemente, entre hidrógeno, (C₁-C₈)alquilo y heteroalquilo, y (arilo no sustituido)oxi-(C₁-C₄)alquilo.
 35 40

8. Un compuesto de la reivindicación 7 donde Ar² es indirectamente sustituido por Ar³ a través de un enlace doble.

9. Un compuesto de la reivindicación 8, donde Ar²-N=N-Ar¹- tiene la estructura siguiente:



10. Un compuesto de la reivindicación 7 donde Ar² es directamente sustituido por Ar³.
 11. Un compuesto de la reivindicación 10, donde Ar²-N=N-Ar¹- tiene la estructura siguiente:



12. Un compuesto de la reivindicación 1, donde W comprende un grupo arilo sustituido (Ar^3) que está directa o indirectamente unido a Ar^1 y amplía la capacidad de resonancia del sistema aromático $Ar^1-N=N-Ar^2$ y, por tanto, aumenta la absorbancia de longitud de onda máxima del compuesto.
- 5
13. Un compuesto de la reivindicación 12, donde Ar^1 es indirectamente sustituido por Ar^3 a través de un anillo o anillos aromáticos y/o de un enlace o enlaces dobles.
- 10
14. Un compuesto de la reivindicación 13, donde Ar^1 es indirectamente sustituido por Ar^3 a través de un enlace doble seleccionado entre los enlaces dobles de carbono-carbono y nitrógeno-nitrógeno.
- 15
15. Un compuesto de la reivindicación 14, donde Ar^1 es indirectamente sustituido por Ar^3 a través de un grupo seleccionado entre $-(C\equiv C)_t$ y $-(CR'=CR')_t$ donde t es 0-5 y R' es independientemente seleccionado entre hidrógeno, (C_1-C_8) alquilo y heteroalquilo, arilo y heteroarilo no sustituido, (arilo no sustituido)- (C_1-C_4) alquilo, y (arilo no sustituido)oxi- (C_1-C_4) alquilo.

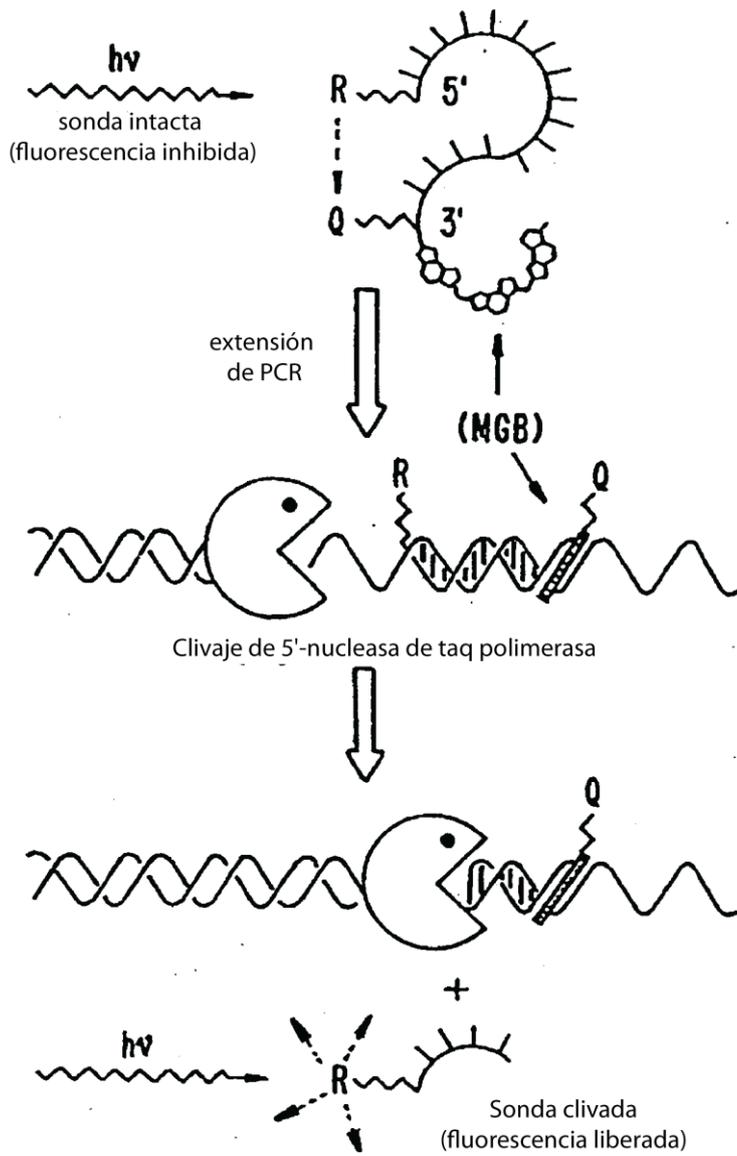


FIG. 1.

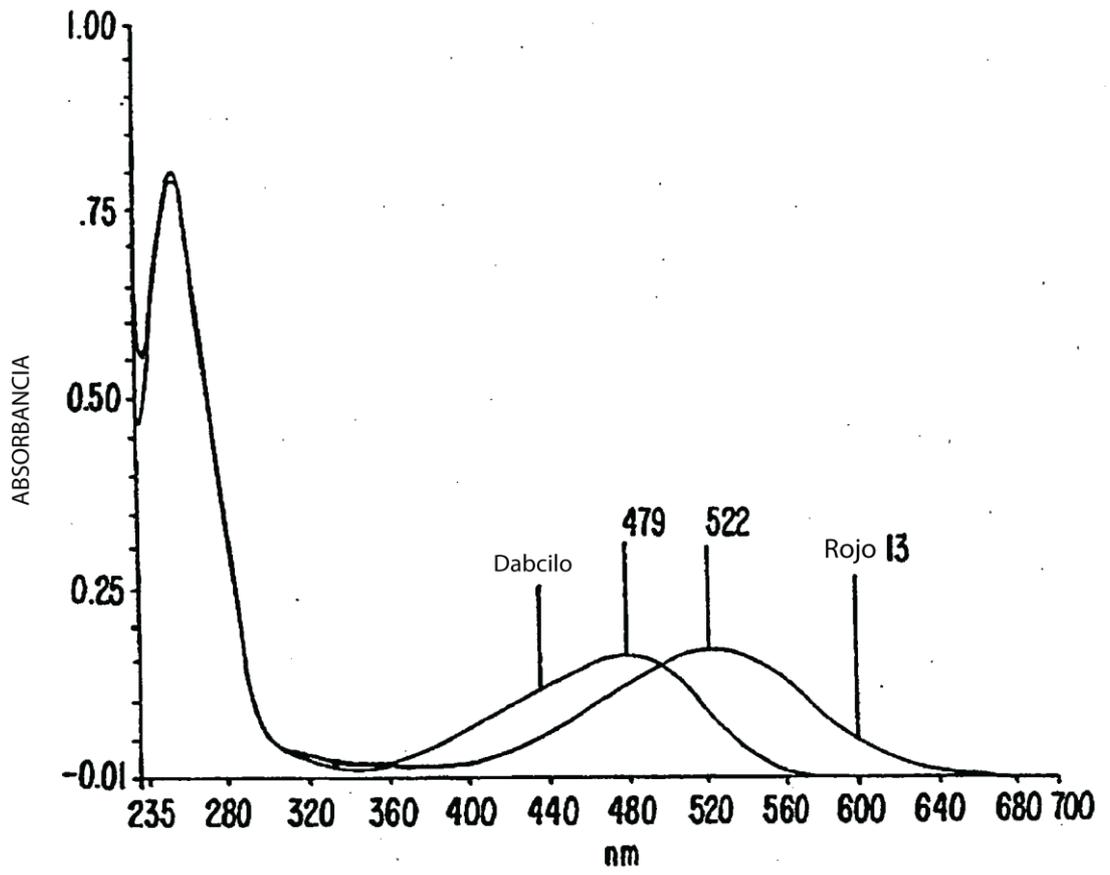


FIG. 2.

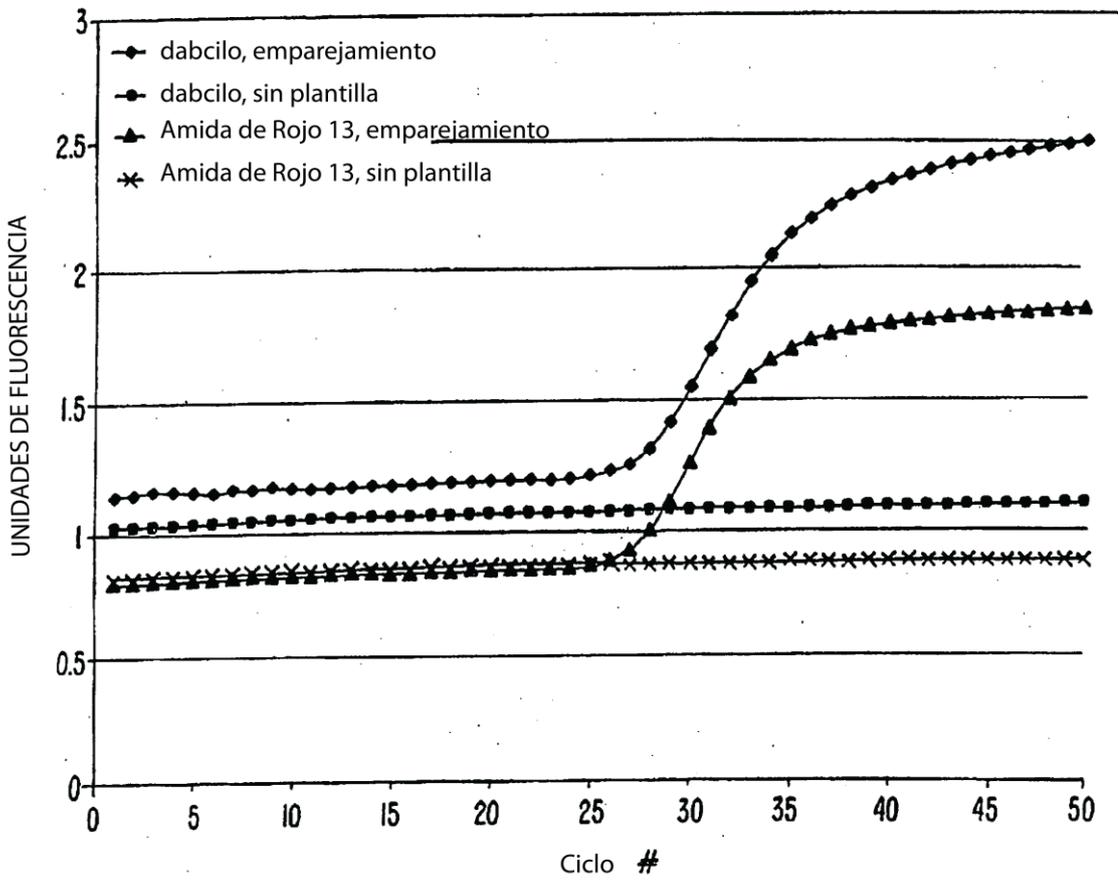


FIG. 3.

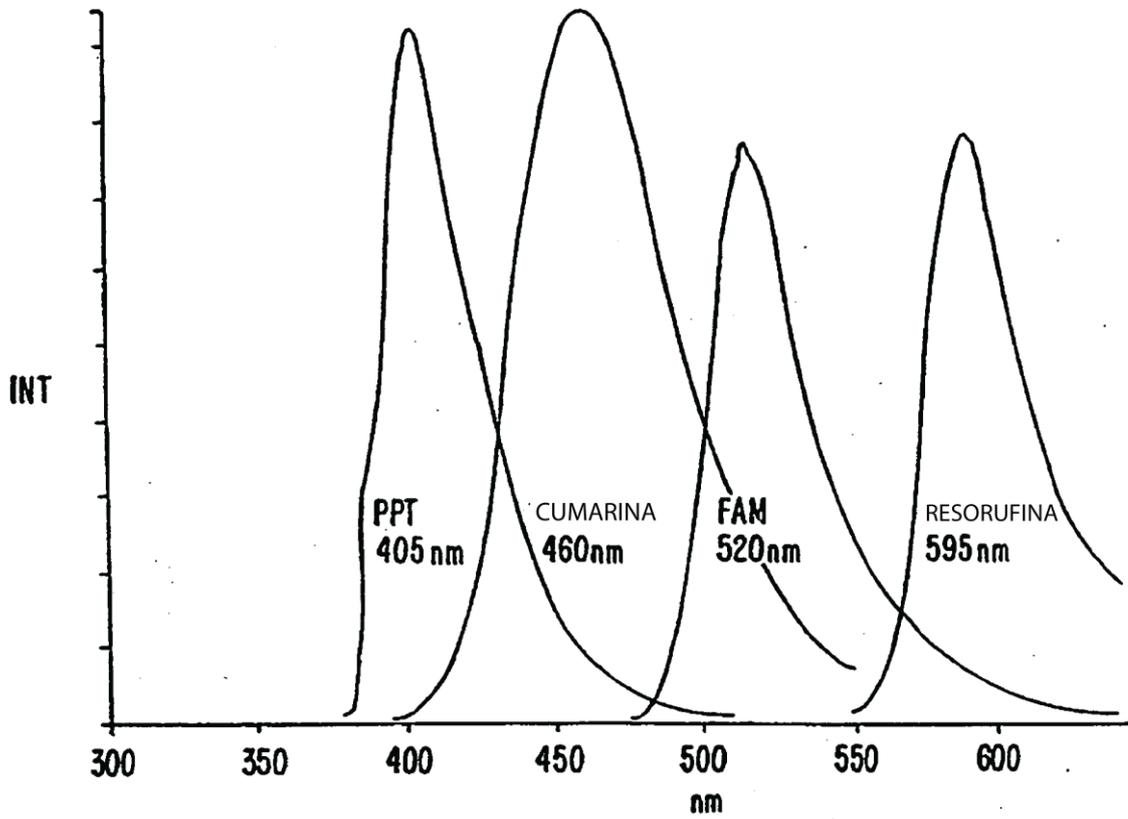


FIG. 4.

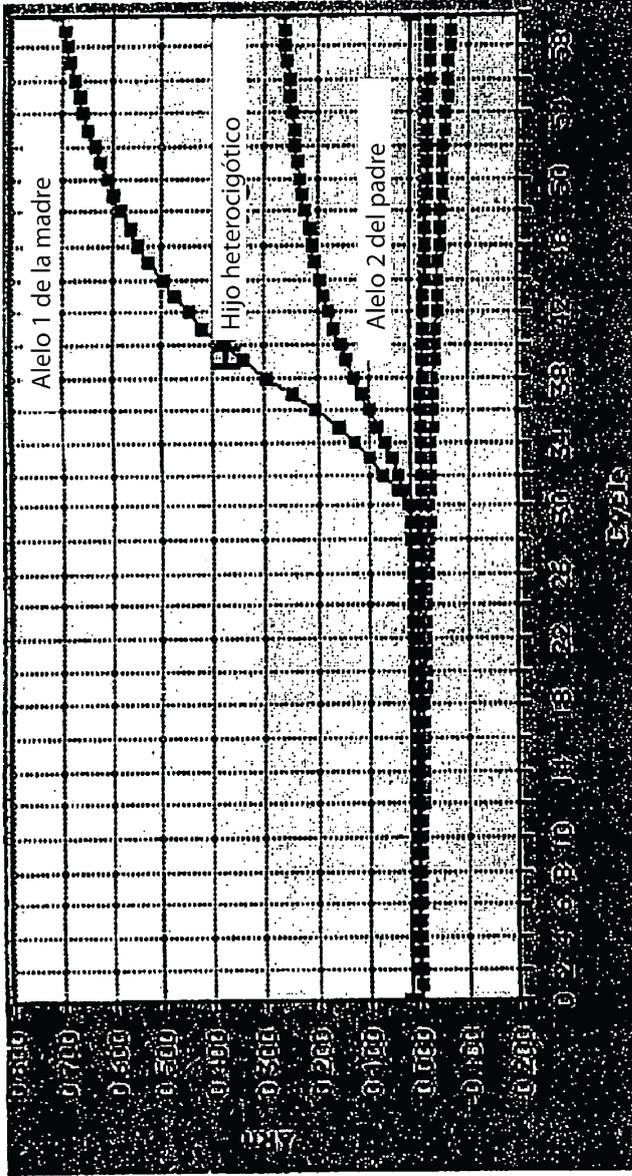


Figura 5. Detección en tiempo real del alelo 1 de RRM1 (desapareamiento T/C) con un MGB-Q-ATA TCT GTT GA-FI (30) no clivable, DONDE t=v=m=3, R0 =4-NO2, R1=2-C1, R2=R3=R4=H Y FI = fluoresceína