

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 420**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2006 E 06847298 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1973927**

54 Título: **Oligonucleótidos catiónicos, procedimientos automáticos para preparar los mismos y sus usos**

30 Prioridad:

15.12.2005 US 750346 P

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

19.12.2013

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE - CNRS (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR y
POLYPLUS TRANSFECTION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BEHR, JEAN-PAUL;
KOTERA, MITSUHARU;
PONS, BÉNÉDICTE;
VOIRIN, EMILIE y
REMY, JEAN-SERGE**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 435 420 T3

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

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos catiónicos, procedimientos automáticos para preparar los mismos y sus usos

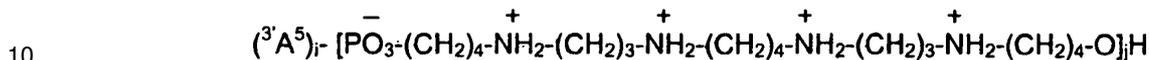
- 5 **[0001]** La invención se refiere a oligonucleótidos catiónicos, es decir a moléculas de oligonucleótido-oligocación, también denominados oligonucleótidos catiónicos en la descripción (con independencia de su carga global) que se pueden sintetizar por etapas en un sintetizador de oligonucleótidos. También atañe a sus aplicaciones de uso en biología molecular, diagnósticas y terapéuticas.
- 10 **[0002]** Los oligonucleótidos encuentran un número extremadamente grande de aplicaciones en biología molecular y diagnóstico, y pueden llegar a ser una clase muy selectiva de fármacos para el tratamiento de una gran paleta de enfermedades.
- [0003]** Los oligonucleótidos son polianiones que ejercen su actividad específica tras la hibridación a una secuencia complementaria transportada por otro ácido nucleico polianiónico.
- 15 **[0004]** Como candidatos a fármacos, deben ser capaces de atravesar la membrana celular aniónica.
- [0005]** Simples consideraciones electrostáticas implican que la energía de hibridación y la unión celular podrían beneficiarse de la adición de grupos catiónicos a la estructura de los oligonucleótidos.
- 20 **[0006]** Con este objetivo se han explorado muchos abordajes sintéticos para introducir residuos de amonio o de guanidinio en oligonucleótidos: sustitución de la estructura de fosfato, modificación de la ribosa o la base nucleica y conjugación final de un polication. No obstante, la especificidad de hibridación, la actividad enzimática de procesamiento de ácido nucleico así como la toxicidad de los metabolitos atañe en todo punto al abordaje de bloqueo, en el que el polication se añade a un oligonucleótido de otro modo natural, como mejor solución. Por desgracia, la síntesis automática escalonada de conjugados peptídicos catiónicos-oligonucleótido todavía no es una rutina. Por otro lado, la química de conjugación entre bloques grandes preformados no es directa, especialmente en agua, donde "super" zwitteriones producen problemas intratables de solubilidad, purificación y caracterización.
- 25 **[0007]** Los inventores han descubierto que era posible una síntesis online dirigida por ordenador de moléculas de oligonucleótido-oligocación introduciendo viales que contienen derivados oligocaciónicos protegidos y adecuadamente activados en un sintetizador de oligonucleótidos además de los de las cuatro bases naturales.
- 30 **[0008]** Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar nuevos oligonucleótidos catiónicos.
- [0009]** Otro objeto de la invención es proporcionar una síntesis automática de alto rendimiento de dichos oligonucleótidos catiónicos.
- 40 **[0010]** En un objeto adicional, la invención se refiere a las aplicaciones de dichos oligonucleótidos catiónicos, en particular en biología molecular, diagnóstico y terapéuticas.
- 45 **[0011]** Por tanto, la invención se refiere a moléculas mixtas de oligocación-oligonucleótido que se pueden sintetizar mediante química de fosforoamidita automática, es decir polifosfodiésteres.
- [0012]** Más particularmente, los oligonucleótidos catiónicos $A_i B_j H$ de la invención tienen restos oligonucleotídicos A_i y restos oligocaciones B_j , en los que
- 50 A_i es un residuo oligonucleotídico de i unidades, siendo $i = 5$ a 50 con bases nucleotídicas naturales o no naturales y/o grupos de pentafuranosilo y/o enlaces fosfodiéster nativos,
 B_j es un resto oligocaciónico orgánico de j unidades, siendo $j = 1$ a 50 , en la que B se selecciona del grupo que consiste en
- 55
 - $-HPO_3-R^1-(X-R^2)_n-X-R^3-O-$, en la que R^1, R^2 y R^3 , idénticos o diferentes, son X alquileo inferior, X es NH o $NC(NH_2)_2$, n varía de 1 a 5 y $n1 = 2$ a 20 ,
 - $-HPO_3-R^4-CH(R^5 X^1)-R^6-O-$, en la que R^4 es alquileo inferior, R^5 y R^6 , idénticos o diferentes, son alquileo inferior y X^1 es putrescina, espermidina o residuo de espermina,
- 60 **[0013]** "Alquilo inferior" y "alquileo inferior", como se usa en la descripción y las reivindicaciones, designan un radical alquilo o alquileo C1-C5 opcionalmente sustituido lineal o ramificado, respectivamente.
- [0014]** A se selecciona de, por ejemplo, el grupo que comprende desoxirribo, ribo, nucleótidos bloqueados (LNA) así como sus modificaciones o sustituciones químicas tales como fosforotioato (también denominado tiofosfato), 2'-fluoro, 2'-O-alquilo o un grupo marcador tal como un agente fluorescente.
- 65

[0015] Moléculas mixtas de oligonucleótido-oligocación de la invención tienen la secuencia ${}^3A^5$ - B.

[0016] Otras moléculas de la invención tienen la secuencia B - ${}^3A^5$.

5 [0017] Otras moléculas más de la invención tienen la secuencia B - ${}^3A^5$ - B o ${}^3A^5$ - B - ${}^3A^5$.

[0018] Dicha secuencia se ilustra en los ejemplos mediante una molécula de oligonucleótido-espermina que tiene la estructura siguiente:



en la que A, i y j son como se ha definido con anterioridad.

15 [0019] Moléculas en las que A es un nucleótido fosforotioato son particularmente ventajosos a la luz de sus aplicaciones biológicas, ya que los oligonucleótidos de fosforotioato no se hidrolizan en fluidos biológicos.

20 [0020] Los oligonucleótidos catiónicos definidos anteriormente forman complejos rápidos y estables con su secuencia complementaria en un contexto de sustitución de hebra e incluso en un contexto de invasión de hebra en plásmido, como se ilustra mediante los ejemplos.

[0021] Debido a la conjugación final, la selectividad de la secuencia sigue siendo tan alta como para los nucleótidos naturales.

25 [0022] De acuerdo con esto, los oligonucleótidos catiónicos de la invención son de gran interés para reactivos de investigación de biología molecular y aplicaciones diagnósticas, tales como PCR, PCR en tiempo real, genotipado, hibridación *in situ* y circuitos de ADN.

[0023] Dichas aplicaciones también están cubiertas por la invención y comprenden el uso de moléculas de oligonucleótido-oligocación como las definidas anteriormente.

30 [0024] Al contrario que los oligonucleótidos aniónicos, en los ejemplos se ha demostrado que los oligonucleótidos catiónicos de la invención entran de forma espontánea en el citoplasma y el núcleo de las células vivas.

35 [0025] A la luz de sus propiedades de hibridación y permeación celular potenciadas, también son útiles para enfoques terapéuticos, tales como los mediados por la degradación antisentido u de ARNsi del ARN mensajero, mediante salto de exones durante la maduración del ARN mensajero, mediante formación de triple hélice con cromatina, mediante invasión de hebra de cromatina (corrección génica).

40 [0026] Por tanto, la invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de moléculas de oligonucleótido-oligocación tal como se ha definido anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 [0027] Por tanto, la invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de moléculas de oligonucleótido-oligocación tal como se ha definido anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 [0028] Las moléculas mixtas oligonucleótido-oligocación definidas anteriormente se sintetizan de forma ventajosa por etapas en un sintetizador de oligonucleótidos, mediante la vía de fosforoamidita, de acuerdo con un procedimiento que comprende

- introducir viales que contienen oligocaciones activados y protegidos B en un sintetizador de oligonucleótidos, además de viales de los oligonucleótidos A como se ha definido anteriormente, o lo contrario,
- detener la síntesis cuando se obtiene la longitud deseada,
- escindir los oligómeros del soporte sólido, y
- 55 - eliminar los grupos protectores.

60 [0029] La invención está estrechamente relacionada con los reactivos de fosforoamidita usados en la síntesis automática para la construcción del bloque B con varios oligocaciones. Los siguientes reactivos de fosforoamidita se pueden usar para este objetivo $\text{P(OR}^9\text{)(N(R}^{10}\text{)}_2\text{)-O-R}^1\text{-(X-R}^2\text{)}_{n1}\text{-X-R}^3\text{-O-Prot}$, en la que R^1 , R^2 , R^3 , n y $n1$ son como se ha definido anteriormente, X es NH o $\text{NC(NH}_2\text{)}_2$ adecuadamente protegidos, R^9 es $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, o alquilo inferior, R^{10} es alquilo inferior o $-\text{N(R}^{10}\text{)}_2$ es un grupo pirrolidino, piperidino o morfolino y Prot es un grupo protector usado en la síntesis de oligonucleótidos, tales como DMT, MMT;

$\text{P(OR}^9\text{)(N(R}^{10}\text{)}_2\text{)-O-R}^4\text{-CH(R}^5\text{X}^1\text{)-R}^6\text{-O-Prot}$, en la que R^4 , R^5 , R^6 son alquilo inferior, X^1 es putrescina, espermidina o espermina protegidos adecuadamente, R^9 y R^{10} como se ha definido correctamente en lo que antecede;

65 $\text{P(OR}^9\text{)(N(R}^{10}\text{)}_2\text{)-O-R}^7\text{-(aa)}_{n2}\text{-R}^8\text{-O-Prot}$, en la que R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , $n2$ y Prot son como se ha definido en lo que

antecede, $(aa)_{n2}$ es un péptido que contiene aminoácidos naturales con cadenas laterales catiónicas adecuadamente protegidas, tales como arginina, lisina, ornitina, histidina, ácido diaminopropiónico y $n2= 2$ a 20 .

5 **[0030]** NH o NC $(NH_2)_2$ adecuadamente protegido significa que los grupos protectores están presentes en el residuo amino o guanidina, respectivamente, para hacer que su funcionalidad sea inerte a las condiciones de reacción química a las que esta expuesto el reactivo.

10 **[0031]** Dicho grupo protector son, por ejemplo, grupos ftalimida (PHTH), trifluoroacetato, aliloxicarbonilo (Alloc), benciloxicarbonilo (CBZ), clorobenciloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo (Boc), fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) e isonicotiniloxi (i-Noc).

[0032] De acuerdo con una realización de la invención, a la síntesis por etapas de la secuencia de oligonucleótidos le sigue la síntesis por etapas del resto oligocación para obtener compuestos que tienen la secuencia $(^3A^5 - B)$.

15 **[0033]** De acuerdo con otra realización se realizan etapas inversas, la síntesis por etapas del resto oligocación seguida de la síntesis por etapas de la secuencia de oligonucleótidos para obtener compuestos que tienen la secuencia $(B - ^3A^5)$.

20 **[0034]** De acuerdo con otra realización más se sintetizan secuencias mixtas.

[0035] En particular, las secuencias oligonucleotídicas tapadas en ambos extremos $(B - ^3A^5 - B)$ pueden resistir a las exonucleasas en fluidos biológicos y las secuencias interrumpidas por cationes $(^3A^5 - B - ^3A^5)$ permiten llegar a las secuencias de ácido nucleico adyacentes.

25 **[0036]** Usando aminas de origen natural, como la espermina, o péptidos tales como oligoargininas, se evita la potencial toxicidad de los metabolitos. De hecho, la espermita está presente a una concentración milimolar en las células y su alquilación terminal es inocua. Además, en muchas proteínas nucleares están presentes secuencias peptídicas básicas.

30 **[0037]** Los oligocaciones B activados y protegidos se obtienen de forma ventajosa protegiendo los grupos amino de una poliamina, seguido de hidroxialquilación α,ω -bis, lo que conduce a dioles compatibles con la síntesis de oligonucleótidos.

35 **[0038]** La clásica química de elongación de DMT y fosforoamidita se implementa de forma ventajosa junto con grupos protectores de TFA lábiles a bases.

[0039] Los dioles químicamente protegidos son productos nuevos y entran dentro del alcance de la invención.

40 **[0040]** La invención se refiere en particular a los intermedios seleccionados del grupo que comprende $[P(OR^9)(N(R^{10})_2)-O-R^1-(X-R^2_n)_{n1}-XR^3-O-Prot]$, en la que R^1 , R^2 , R^3 , n y $n1$ son como se ha definido anteriormente, X es NH o NC $(NH_2)_2$ adecuadamente protegidos, R^9 es $-CH_2CH_2CN$, o alquilo inferior, R^{10} es alquilo inferior o $-N(R^{10})_2$ es un grupo pirrolidino, piperidino o morfolino y Prot es un grupo protector usado en la síntesis de oligonucleótidos, tales como DMT, MMT;

45 $P(OR^9)(N(R^{10})_2)-O-R^4-CH(R^5X^1)-R^6-O-Prot$, en la que R^4 , R^5 , R^6 son alquilo inferior, X^1 es putrescina, espermidina o espermina protegidos adecuadamente, R^9 y R^{10} como se ha definido en lo que antecede;

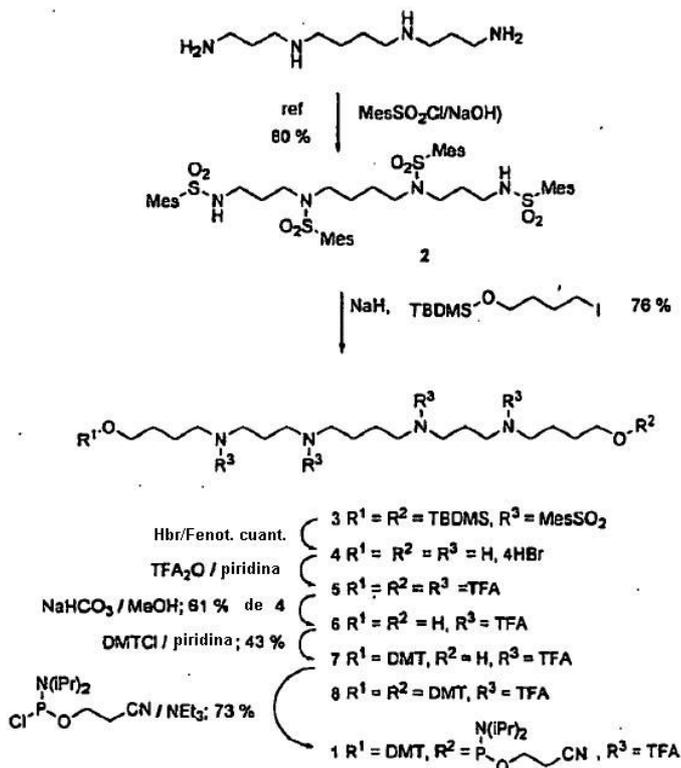
50 **[0041]** Otras características y ventajas de la invención se proporcionan en lo sucesivo en el presente documento. En particular, la síntesis de secuencias oligonucleotídicas decámeros (A_{10}) con espermina (S), designados en lo sucesivo como $A_{10}S_n$, se proporcionará a modo de ilustración sin limitar la invención. En los ejemplos, se preferirá a las Figura 1 a 14, que representa, respectivamente:

- Figura 1, Análisis HPLC de oligonucleótidos catiónicos $N_{10}S_n$ ($n=1-2$) en una columna de fase inversa,
- Figura 2, Análisis HPLC de oligonucleótidos purificados $N_{10}S_n$ ($n=1-6$) en una columna de intercambio aniónico,
- 55 - Figura 3, análisis de la movilidad electroforética de $N_{10}S_n$ ($n=1-6$) mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida),
- Figura 4, intercambio espontáneo de N_{10} con $N_{10}-C_{10}$ a varias temperaturas,
- Figura 5, intercambio de hebra entre N_{10} y $N_{10}S_n$ revelado mediante electroforesis en gel de poliamida
- Figura 6, temperaturas de fusión de $N_{10}S_n$. Dúplex de C_{10} (en los que C es el nucleótido complementario a N).
- 60 - Figura 7: Resultados comparativos de las temperaturas de fusión de los dúplex formados por $N_{10}S_n$ ($n=0-6$) con $^5GTGGCATCGC^3$ y con $^5GTGGCGTCGC^3$
- Figura 8, Análisis ES-EMa de oligonucleótidos purificados $N_{10}S_n$ ($n=1-6$),
- Figura 9, Restos en la HPLC de oligonucleótidos fosforotioato $N_{12}S_{11}F$ (9A) y $N_{12}S_2F$ (9B),
- Figura 10, espectros MALDI-TOF de $N_{12}S_2F$ (10 A) y $N_{12}S_{11}F$ (10 B),
- 65 - Figura 11, Restos en la HPLC de $N_{14}S_4F$ (11A) y $N_{20}S_5F$ (11B), respectivamente
- Figura 12, Espectros MALDI-TOF de $N_{14}S_4F$ (12A) y $N_{20}S_5F$ (12B),

- Figura 13, Invasión de hebra de los plásmidos pGL2 y pGL3 por N₁₄S_nF (13A) y N₂₀S_nF (13B).
- Figuras 14A y 14B, penetración del oligonucleótido catiónico F-S₁₈N₁₉ en células HeLa.

Ejemplo 1: Síntesis de sintón de fosforoamidita espermina

5 **[0042]** La fosforoamidita 1 unida a espermina se sintetizó a partir de espermina como se muestra en el Esquema 1 siguiente:



10 (Mes = 2,4,6-trimetifenil; TBDMS = t-butildimetilsilil; TFA = CF₃CO-; DMT = 4, 4'-dimetoxitritilo)

15 **[0043]** Tetrakis(mesitylsulfonyl)espermina 2, preparada a partir de espermina, se bis-alquiló a 3. Después de completar la desprotección de 3 en condiciones ácidas, el tetrabromuro de bis(C4-OH)espermina bruto se protegió completamente mediante anhídrido trifluoroacético en piridina, después los dos grupos éster terminales 5 se hidrolizaron en condiciones neutras en diol 6. Se realizó mono trifulación de 5 de un modo estadístico usando un equivalente molar de reactivo DMTCI, dando 7 con un rendimiento del 43 %. El diol 6 sin reaccionar y el compuesto de bis-tritilo 8 se recuperó y reequilibró en condiciones ácidas suaves (ácido trifluoroacético en diclorometano), dando 7. La fosfitilación de 7 dio la fosforoamidita 1 deseada.

20 **[0044]** N¹,N⁴,N⁹,N¹²-Tetrakis (mesitilsulfonyl)espermina (2): Este compuesto se preparó de acuerdo con la referencia: Bergeron et al. J. Med. Chem. 2001, 44, 232-244.

25 **[0045]** N¹,N¹²-Bis[4-(t-butildimetilsililoxi)butil]-N⁴,N⁹,N¹²-tetrakis(mesitylsulfonyl)-espermina (3): A una solución de 2 (9,31 g, 10,0 mmol) en DMF (20 ml) se añadió hidruro sódico (60 %, 1,0 g, 25 mmol) en porciones con agitación en N₂ a 0 °C. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió t-butil(4-yodobutoxi)dimetilsilano (7,86 g, 25 mmol) en una porción. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente y después se repartió entre H₂O-CH₂Cl₂ (100 ml/100 ml). Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo tres veces con CH₂Cl₂ (50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución de NaHSO₃ (1M) y después se secó sobre MgSO₄. Tras la evaporación, el residuo pastoso se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con AcOEt:ciclohexano a 1:4 como eluyente. Las fracciones que contienen 3 se evaporaron en un aceite pastoso que se lavó después con pentano frío para eliminar la impureza más rápida y después se bombeó al vacío para dar 9,97 g (76%) de 3 como un aceite: TLC (AcOEt/ciclohexano 1:4): R_f = 0,28, - IR (KRS - 5): 2937, 1604, 1471, 1320, 1151, 1101, 838, 777, 657, 578 cm⁻¹, RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = - 0,01 (s, 12 H), 0,85 (s, 18 H), 1,20 - 1,45 (m, 12 H), 1,62 (m, 4 H), 2,28 (s, 6 H), 2,29 (s, 6 H), 2,53 (s, 12 H), 2,54 (s, 12 H), 2,90 - 3,10 (m, 16 H), 3,42 (t, J = 6,1 Hz, 4 H), 6,91 (s, 4 H), 6,92 (s, 4 H), - RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 4,7, 18,9, 21,6, 23,4, 23,5, 24,1, 24,9, 25,7, 26,6, 30,4, 43,5, 43,6, 45,6, 45,7, 62,9, 132,59, 132,64, 133,8, 140,7, 143,0, 143,1 - EM - ESI (MeOH): m/z = 1325,85 [M + Na]⁺, 1303,83 [M + H]⁺, - C₆₆H₁₁₀N₄O₁₀S₄Si₂ (Pm = 1304,03) calcd, C 60,79, H 8,50, N

4,30, S 9,84; hallado C 60,74, H 8,55, N 4,21, S 9,63.

5 **[0046]** Tetrahidrobromuro de N^1, N^{12} -Bis(4-hidroxitil)espermina (4): A una solución en 3 (9,87 g, 7,57 mmol) y fenol (29,0 g, 0,31 mol, 40 equiv.) en CH_2Cl_2 (80 ml.) se añadió bromuro de hidrógeno en ácido acético (solución de 33 % en peso, 80 ml, 1,4 mol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Al enfriar con un baño de hielo se añadió agua fría (100 ml) con agitación. Se separó la capa orgánica y se extrajo tres veces con agua (20 ml). Las capas acuosas combinadas se lavaron cinco veces con CH_2Cl_2 (30 ml) y se evaporaron hasta sequedad. El residuo sólido húmedo resultante se suspendió en éter, se trituró con espátula y se descartó la capa de éter del sobrenadante. Estas operaciones se repitieron (cinco veces) hasta que se obtuvo una suspensión

10 sólida. Tras la evaporación y el secado al vacío, el compuesto 4 se obtuvo como un sólido (5,32 g). Este material bruto se usó sin purificación adicional. RMN de ^1H (300 MHz, D_2O): $\delta = 1,75 - 2,1,0$ (m, 12 H), 2,27 (m, 4 H), 3,15 - 3,35 (m, 16 H), 3,76 (t, $J = 12,2$ Hz, 4 H), - RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O): $\delta = 22,9, 23,2, 23,4, 29,0, 45,0, 45,2, 47,7, 48,3, 61,5$. - EM - ESI (MeOH): $m/z = 347,39$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

15 **[0047]** N^1, N^{12} -Bis(4-(trifluoroacetoxi)butil)- N^1, N^4, N^8, N^{12} -tetrakis(trifluoroacetil) espermina (5) (de 4 con $\text{TFA}_2\text{O}/\text{NEt}_3$): A una suspensión de 4 (5,3 g, 7,6 mmol) en CH_2Cl_2 (50 ml) se añadió trietilamina (11,5 g, 114 mmol, 15 equiv.) en una porción. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y gota a gota se añadió anhídrido trifluoroacético (19,1 g, 90.9 mmol, 12 equiv.) con agitación en N_2 . La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas. Después de enfriar en un baño de hielo, la solución resultante se lavó tres veces con agua fría (20 ml), se secó en MgSO_4 y se evaporó para dar un residuo oleoso (11,7 g) que contiene como producto secundario de esta reacción (TFA) $_2\text{C}=\text{CH}-\text{NEt}_2$ (ref Schreiber, S. L., Tetrahedron Lett. 1980, 21, 1027). Esto se eliminó mediante dos cromatografías ultrarrápidas sucesivas (eluyente 1:1 - 60:40 AcOEt: ciclohexano y después 5-10 % $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), dando 5 (5,59 g, 81 %) como un aceite: TLC (AcOEt/ciclohexano 1:1): $R_f = 0,25$, - IR (KRS - 5): 2955, 1789, 1690, 1467, 1352, 1197, 1147, 759, 731, 692 cm^{-1} , RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,52-2,06$ (m, 16 H), 3,33-3,49 (m, 16 H), 3,38 (m, 4 H). - RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): Este espectro se complica mediante isomerismo rotacional de cuatro grupos amida. Sólo se describen las señales de resonancia de intensidad del siguiente modo: $\delta = 23,3, 23,9, 24,1, 24,8, 25,3, 25,6, 26,0, 26,55, 26,61, 44,4, 44,8, 45,7, 46,1, 46,4, 47,3, 48,0, 56,6, 67,3, 67,5, 116,6$ (c, $J = 288$ Hz), 156,9, 157,4, 157,8, 158,6.

30 **[0048]** N^1, N^{12} -Bis(4-hidroxitil)- N^1, N^4, N^8, N^{12} -tetrakis(trifluoroacetil)espermina (6): A una solución de 5 (5,39 g, 5,84 mmol) en MeOH (50 ml), NaHCO_3 (0,1 g, sólido) se añadió en una porción y la suspensión resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras la evaporación, el residuo oleoso se disolvió en CH_2Cl_2 (dando una suspensión de algo NaHCO_3 fibroso) y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con 5-10 % MeOH/ CH_2Cl_2 para dar 3,61 g (85 %) de 6 como un aceite: TLC (MeOH 5 %/ CH_2Cl_2): $R_f = 0,14$. (MeOH 10 %/ CH_2Cl_2): $R_f = 0,45$. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,51 - 2,02$ (m, 18 H), 3,33 - 3,51 (m, 16 H), 3,68 (m, 4 H). - EM-ESI (MeOH): $m/z = 753,33$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$. - $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{F}_{12}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Pm = 748,60) calcd. C 41,72, H 5,39, N 7,48, F 30,45; hallado C 41,97, H 5,26, N 7,37, F 30,14.

40 **[0049]** Preparación de 6 a partir de 4 (con $\text{TFA}_2\text{O}/\text{piridina}$, después NaHCO_3): A una suspensión de 4 (15,3 g, 22,8 mmol) en CH_2Cl_2 (100 ml) y piridina (44 ml, 0,54 mmol), se añadió, gota a gota, anhídrido trifluoroacético (46 ml, 0,33 mol) con refrigeración en un baño de hielo y con agitación en N_2 . La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El exceso de anhídrido trifluoroacético se descompone mediante la adición de agua fría (100 ml) con refrigeración en un baño de hielo, después la solución resultante se extrajo con CH_2Cl_2 (cuatro veces 100 ml + 50 ml + 25 ml x 2). Los extractos combinados se lavaron con agua fría (50 ml x 3), se secaron en MgSO_4 y después se evaporaron, dando 5 bruto (19,4 g, 92 %) como un aceite. Este aceite se liofilizó en MeOH (100 ml). Se añadió NaHCO_3 (sólido, 0,1 g) y la suspensión se agitó durante la noche. Tras la evaporación del disolvente, el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con 5-7 % MeOH/ CH_2Cl_2 como eluyente, para dar 10,1 g (61 %) de 6 como un aceite:

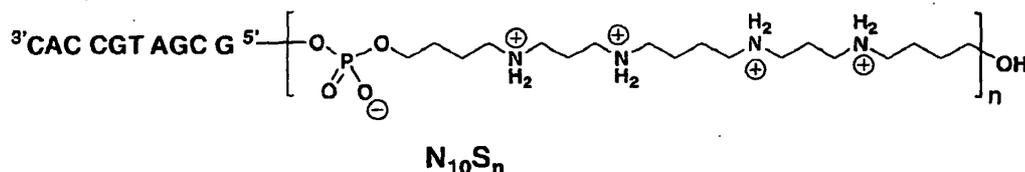
50 **[0050]** N^1 -[4-(Dimetoxitritiloxi)butil]- N^{12} -(4-hidroxitil)- N^1, N^4, N^8, N^{12} -tetrakis(trifluoro-acetil) espermina (7): A una solución de 6 (1,46 g, 2,00 mmol) en piridina (3 ml) se añadió DMTCl (757 mg, 2,23 mmol) usando 1 ml de piridina para aclarar. La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en N_2 y después se retiró repetidamente la piridina mediante coevaporación con tolueno. El residuo se purificó mediante dos cromatografías ultrarrápidas sucesivas (eluyente 2 - 5 % MeOH/ CH_2Cl_2 y después 10- 15 % acetona/ CH_2Cl_2), dando 7 (879 mg, 43 %) como espuma y derivado de bis-DMT 8 (648 mg, 24 %). También se recuperó el diol de partida 6 (350 mg, 24 %). Datos de 7: TLC (acetona/ CH_2Cl_2 1:9): $R_f = 0,20$. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,51 - 2,03$ (m, 17 H), 3,11 (m, 2 H), 3,32 - 3,51 (m, 16 H), 3,71 (m, 2 H), 3,81 (s, 6H), 6,84 (m, 4 H), 7,19 - 7,46 (m, 9 H). - EM-ESI (MeOH): $m/z = 1055,52$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$. - $\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{F}_{12}\text{N}_4\text{O}_8$ (Pm = 1032,95) calcd. C 54,65, H 5,46, N 5,42, F 22,07; hallado C 54,46, H 5,58, N 5,37, F 21,63.

60 **[0051]** Compuesto (7) a partir de diol (6) y derivado de bis-DMT (8): A una solución de 6 (1,4 g, 1,9 mmol) y 8 (2,5 g, 1,9 mmol) en CH_2Cl_2 se añadió ácido trifluoroacético (50 μl , 0,6 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La solución se lavó tres veces con una solución de Na_2CO_3 1 M, se secó en MgSO_4 y se evaporó. El residuo se separó mediante cromatografía ultrarrápida (diámetro de la columna: 50 mm, altura de SiO_2 : 15 cm) usando sucesivamente 5 % de AcOEt/ CH_2Cl_2 (750 ml), 33 % de AcOEt/ CH_2Cl_2 (500 ml), 7 % de MeOH/ CH_2Cl_2 (500 ml) y 10 % de MeOH/ CH_2Cl_2 (500 ml), dando 8 (1,1 g), 7 (1,2 g) y 6 (1,3 g).

[0052] Fosforoamidita unida a espermina (1): A una solución de 7 (844 mg, 817 μmol) y trietilamina (230 μl , 1,65 mmol, 2 equiv.) en CH_2Cl_2 (4 ml), se añadió 2-cianoetil-(*N,N*-diisopropilamino)clorofosfito (205 μl , 0,92 mmol, 1,1 equiv.) y la mezcla se agitó en N_2 a temperatura ambiente durante 40 min. La mezcla de reacción se pasó a través de una columna de SiO_2 (diámetro: 20 mm, altura 15 cm) saturada con NEt_3 (NEt_3 1 % en CH_2Cl_2 :ciclohexano 1:2; 400 ml) usando NEt_3 1 % en CH_2Cl_2 :ciclohexano 1:2 (125 ml) y después NEt_3 1 % en CH_2Cl_2 :ciclohexano 1:1 100 ml, dando 1 (735 mg, 73 %) como un aceite: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ = 1,13 - 1,35 (m, 12 H), 1,51 - 2,06 (m, 16 H), 2,66 (t, J = 6,4 Hz, 2 H), 3,11 (m, 2 H), 3,32 - 3,98 (m, 20 H), 3,81 (s, 6H), 6,84 (m, 4 H), 7,15-7,51 (m, 9 H). RMN- ^{31}P (81 MHz, CDCl_3): 148,06, 148,13, 148,19, 148,3 (división debido al isomerismo rotacional de la amida).

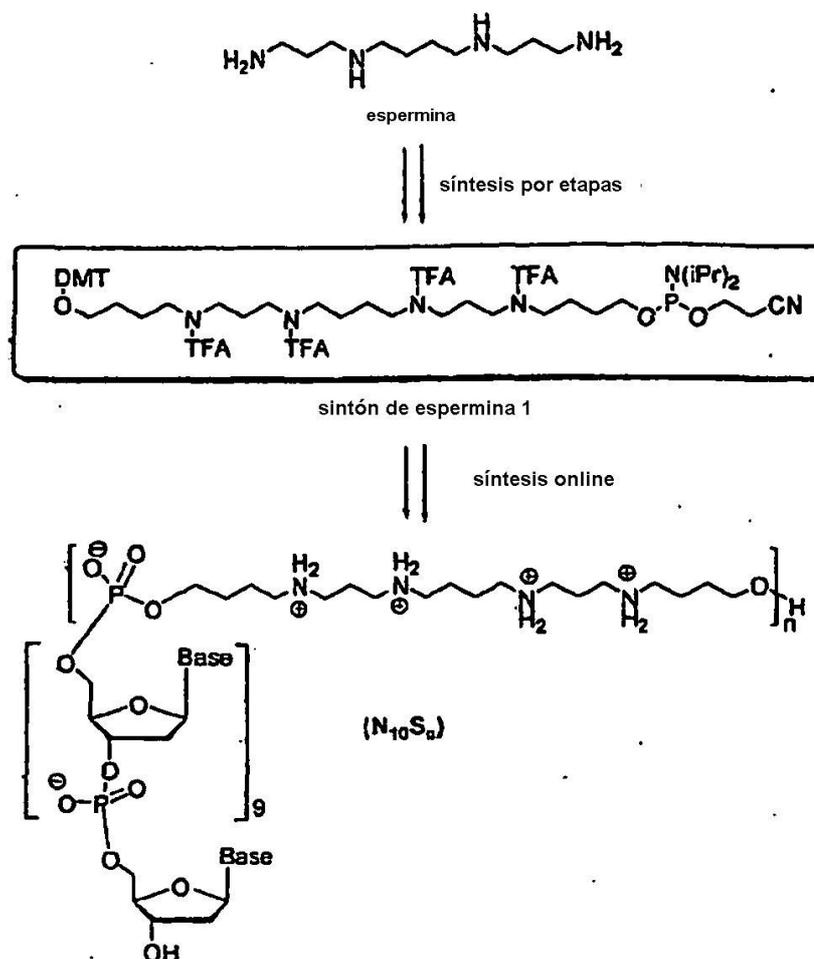
10 Ejemplo 2: Síntesis, purificación y caracterización de oligonucleótidos decámeros que tienen la fórmula

[0053]



15 **[0054]** En lo sucesivo en el presente documento dichos oligonucleótidos se designarán como N_{10}S_n (N_{10} = resto oligonucleotídico; S= residuo de espermina y n = 1 - 6).

20 **[0055]** *Síntesis automática:* Se sintetizó una serie de oligonucleótidos decámeros de secuencias idénticas N_{10} = $^3\text{CACCGTAGCG}^5$ con un número creciente de residuos de espermina S usando química de cianoetilfosforoamidita estándar en fase sólida en un sintetizador Expedie DNA de acuerdo con el esquema siguiente:



siendo el último resto N un nucleósido de acuerdo con la clásica síntesis de oligonucleótidos.

[0056] Los reactivos usados para la síntesis de ADN automática se adquirieron en Glen Research (Eurogentec).

[0057] Durante la síntesis automática se usó el ciclo de acoplamiento estándar de 1 μ mol a excepción del acoplamiento de la fosforoamidita de espermina 1, que se realizó con un tiempo de acoplamiento prolongado (15 min) y usando una solución de fosforoamidita ligeramente más concentrada (90 mg de amidita en 1 ml de acetonitrilo).

[0058] Se recogieron las fracciones de tritilo, se diluyeron y se analizaron en un espectrofotómetro para determinar los rendimientos del acoplamiento por etapas.

[0059] Los rendimientos de acoplamiento de los cuatro nucleótidos naturales superaron el 97%, mientras que los rendimientos del acoplamiento de la fosforoamidita espermina estaban entre 90 y 96% en las condiciones de acoplamiento anteriores.

[0060] En todos los casos se usó el modo DMT-ON (ON= oligonucleótido), manteniendo el grupo de DMT en el extremo 5' sin escindir en los oligómeros con fines de purificación-identificación.

[0061] Tratamiento postsintético: Tras la síntesis automática, la escisión del soporte sólido y la desprotección completa de los oligómeros se realizaron usando condiciones estándar (tratamiento con amoniaco acuoso concentrado durante 90 minutos a temperatura ambiente para escisión y después durante la noche a 55 °C para desprotección).

[0062] *Purificación:* Los primeros dos oligonucleótidos aniónicos $N_{10}S_1$ y $N_{10}S_2$ se purificaron inicialmente en DMT mediante procedimiento HPLC estándar en una columna nucleosil C-18 de fase inversa (Macherey-Nagel 10 x 250 mm) con un gradiente lineal de acetonitrilo (5 - 35 % en 20 minutos) en solución de acetato amónico 20 mM (pH 7). Después, los oligonucleótidos purificados se destritaron mediante tratamiento con AcOH/H₂O = 4/1 (500 ml) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras la dilución con agua (5 ml), se eliminó el DMT-OH mediante extracción en éter (3 x 2ml) y la fase acuosa se concentró, dando los oligómeros.

[0063] El análisis HPLC de los oligonucleótidos $N_{10}S_1$ y $N_{10}S_2$ se proporciona en la Figura 1, una columna nucleosil C-18 de fase inversa (Macherey-Nagel 4,6 x 250 mm) con un gradiente lineal de acetonitrilo (5 - 35 % en 20 minutos) en solución de acetato amónico 20 mM (pH 7). a) $N_{10}S_1$, bruto, DMT-ON; b) $N_{10}S_1$, purificado c) $N_{10}S_2$, bruto, DMT-ON; d) $N_{10}S_2$, purificado. *Benzamida; **Secuencias truncadas.

[0064] El oligómero neutro $N_{10}S_3$ y los oligómeros catiónicos $N_{10}S_4$, $N_{10}S_5$ y $N_{10}S_6$ (con o sin grupo DMT) se purificaron usando las columnas Poly-Pak II™ (Glen Research/Eurogentec) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante a excepción de la última elución de oligonucleótido, que se realizó con acetonitrilo/amoniaco acuoso concentrado/agua (20:4:80). Las fracciones que contienen el oligonucleótido se pudieron revelar usando una placa de TLC. Después de reunir las fracciones, los disolventes se eliminaron mediante liofilización. Los oligómeros obtenidos de este modo se contaminaron generalmente con benzamida. Se eliminó mediante extracción con éter (tres veces) tras la disolución en solución de amoniaco acuoso diluido (50 mM). Los oligonucleótidos purificados se disolvieron en solución de amoniaco acuoso diluido (50 mM) y su concentración se determinó usando el siguiente coeficiente de extinción (260 nm, mol³dm⁻³cm⁻¹):

$$\epsilon = (15,4 N_A + 11,5 N_G + 7,4 N_C + 8,7 N_T) \times 0,9 \times 10^3.$$

[0065] El análisis de HPLC de los oligonucleótidos purificados se proporciona en la Figura 2: Columna de intercambio aniónico (Dionex PA-100 9 x 250 mm) con un gradiente lineal de NaCl (100 - 350 mM en 10 min) /NaOH 25mM (pH 12,4): a) $N_{10}S_1$, b) $N_{10}S_2$, c) $N_{10}S_3$, d) $N_{10}S_4$, e) $N_{10}S_5$, f) $N_{10}S_6$.

[0066] Debido a la química de conjugación usada, cada poliamina viene con un grupo fosfato, de modo que contribuye a una carga neta catiónica adicional. Por tanto, los siete oligonucleótidos ($(N_{10}S_n)^{3n-9}$, n=0...6, con cargas globales -9,-6,-3,0,+3,+8,+9 cuando estaban completamente ionizados estaban disponibles en cantidades que varían de 80 a 250 nanomoles.

Movilidad electroforética:

[0067] Su migración en un campo eléctrico a Ph7 se estudió mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) y se reveló mediante tinción especular de plata. Los compuestos (0,5 nmol) en 10 μ l de tampón de carga (HERPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150mM, glicerol) se cargaron en un gel de poli(acrilamida) no desnaturalizante (15% en TAE pH 7). La electroforesis se realizó a 5 V/cm durante 17 horas a 4 °C. La tinción con plata se realizó de acuerdo con Rabilloud et al, Electrophoresis, 1987,9, 288 - 291. Los resultados se proporcionan en la Figura 3. El oligonucleótido N_{10} (calle 1) sin espermina se movía rápido hacia el ánodo y mostró una únicamente leve tinción de plata en condiciones en las que se revelaron los oligonucleótidos que contiene poliamina.

Intercambio espontáneo de N_{10} con $N_{10}\cdot C_{10}$

5 [0068] El oligonucleótido C_{10} (en el que C es el nucleótido complementario a N) (50 pmol o 500 pmol) se añadió a la solución dúplex $N_{10}\cdot C_{10}^*$ fluorescente (50 pmol en HEPES 10mM pH 7,4, NaCl 150mM). Las mezclas se incubaron 4 horas a 37 °C, 20 °C o 10 °C y se cargaron en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante (15% en TAE, pH 7). La electroforesis se realizó a 4 °C durante 17 horas a 5 V/cm. La fluorescencia C_{10}^* se detectó mediante escaneo del gel usando un Typhoon 8600 Imager. Como muestran los resultados proporcionados en la Figura 4, el intercambio espontáneo de N_{10} con $N_{10}\cdot C_{10}$ no es significativo a 10 °C.

10 *Intercambio de hebra entre N_{10} y $N_{10} S_n$*

[0069] La capacidad de intercambio de hebra de $N_{10}S_n$ hacia el dúplex natural $N_{10}\cdot C_{10}$ se estudió en condiciones salinas fisiológicas.

15 [0070] Se añadieron conjugados de espermita $N_{10}S_n$ (50 o 500 pmol) a una solución de dúplex $N_{10}\cdot C_{10}^*$ fluorescente (50 pmol en HEPES 10mM, pH 7,4, NaCl 150mM). Las mezclas se incubaron 4 horas a 10 °C y se cargaron en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante (15% en TAE, pH 7). La electroforesis se realizó a 4 °C durante 17 horas a 5 V/cm. La fluorescencia se detectó mediante escaneo del gel usando un Typhoon 8600 Imager.

20 [0071] La conjugación de espermina tuvo un efecto profundo sobre la reacción de intercambio de hebra como se muestra en la Figura 5. La banda correspondiente a $N_{10}\cdot C_{10}^*$ se hizo más débil a medida que el número de residuos de espermina del $N_{10}S_n$ competidor aumentaba, a favor de un complejo de $N_{10}S_n\cdot C_{10}^*$ menos aniónico y más lento. Este efecto fue especialmente pronunciado para $N_{10}S_3$, es decir para los conjugados que ya no son portadores de una carga negativa formal. De hecho, la espermina pinza las estructuras de ADN dúplex formando una red entre hebras de los enlaces de hidrógeno bidentados NH_2^+ en la ranura menor, por lo que favorecerá a la unión de $N_{10}S_n$ por encima de N_{10} . Puede actuar un factor cinético favorable adicional cuando el intercambio de hebra se produce en un complejo electrostático $(N_{10}S_n)^{3n-9}/(N_{10}\cdot C_{10})^{18-}$ preformado, que puede ser el caso para $n>3$.

30 *Temperaturas de fusión de los dúplex $N_{10}S_n\cdot C_{10}$*

[0072] Las estabildades de los ácidos nucleicos bicatenario se compararon midiendo su temperatura de fusión, es decir la temperatura a la cual las hebras complementarias se separan de forma cooperativa. La densidad óptica (DO) de los mismos leyó a 260 nm de las soluciones de $N_{10}S_n\cdot C_{10}$ frente a la temperatura T.

35 [0073] Las temperaturas de fusión T_m se midieron en HEPES 10 mM a pH 7,4 (línea negra, rombos) y en HEPES 10 mM pH 7,4 + 150 mM NaCl (línea gris, círculos). Los perfiles de fusión de todos los dúplex (3,75 nmol en 1 ml de tampón) se obtuvieron usando un espectrofotómetro CARY 4000 equipado con una unidad de control de la temperatura calentando gradualmente las muestras (1 °C/min) al tiempo que se registra su absorbancia a 260 nm. La fusión del dúplex tiene como resultado un desplazamiento hipercrómico y la T_m es la temperatura a la cual la primera curva derivada $dO.D./dT = f(T)$ alcanza su máximo. Los resultados se proporcionan en la Figura 5.

40 [0074] El dúplex natural se fundió a $T_m = 30^\circ C$ en HEPES 10 mM a pH 7,4 (Figura 5). La conjugación de cantidades crecientes de esperminas condujo a incrementos importantes de la T_m . $N_{10}S_6\cdot C_{10}$ se fundió a $T_m = 75,2^\circ C$, unos $45^\circ C$ más alta que la del dúplex natural. La curva de $T_m = f(n)$ mostró una forma sigmoidea con una inflexión para el oligonucleótido $N_{10}S_3$ neutro.

50 [0075] Las temperaturas de fusión también se registraron en condiciones salinas fisiológicas. La curva de $T_m = f(n)$ apareció muy amortiguada y, de forma extraordinaria, cruzaba la curva anterior para $N_{10}S_3$. Por tanto, para $n<3$, los oligonucleótidos $N_{10}S_n$ y C_{10} son aniónicos y se repelen en el dúplex, lo que los incrementos de la concentración de sal en la solución protegen de las fuerzas repulsivas y, por tanto, aumentan la T_m . Para $n>3$ $N_{10}S_n$ se hace catiónica y atrae a C_{10} ; aquí, la protección electrostática inducida por sal disminuye la estabilidad.

[0076] Para el $N_{10}S_3$ neutro, la estabilidad de dúplex es independiente de la concentración de la sal.

55 [0077] *Comparación* de las temperaturas de fusión de los dúplex formados por $N_{10}S_n$ ($n=06$) con $^5GTGGCATCGC^3$ y con $^5GTGGCGTCGC^3$

60 [0078] Se analizó una discriminación de error de concordancia de un único par de bases de los conjugados oligonucleótido-espermina. Dentro del contexto de la secuencia de $C_{10} = ^5GTGGCATCGC^3$, los datos bibliográficos recomendaron una conversión A a G localizada centralmente como el análisis más riguroso.

[0079] Las temperaturas de fusión T_m se midieron en HEPES 10 mM pH 7,4 + NaCl 150 mM. Los perfiles de fusión de todos los dúplex (3,75 nmol en 1 ml de tampón) se obtuvieron usando un espectrofotómetro CARY 4000 equipado con una unidad de control de la temperatura calentando gradualmente las muestras (1 °C/min) al tiempo que se registra su absorbancia a 260 nm. T_m es la temperatura en la que la primera curva derivada $dO.D./dT = f(T)$ alcanza su máximo. Los resultados se dan en la Figura 7 (los rombos corresponden a $^5GTGGCATCGC^3$ y los

triángulos a $5'$ GTGGCGTCGC $3'$).

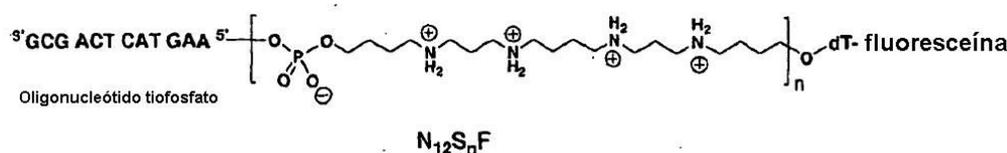
[0080] La temperatura de transición del dúplex $N_{10} \cdot C_{10}$ natural en NaCl 150 mM entró de $50,6^\circ\text{C}$ a $42,9^\circ\text{C}$, es decir $DT_m = 7,7^\circ\text{C}$ cuando había apareamiento erróneo. En principio, el incremento de la estabilidad por fuerzas electrostáticas de fin-conjugado inespecíficas no debería alterar la especificidad de los pares de bases, que se expresa como $\Delta\Delta G$. De hecho, esto se observó como el oligonucleótido diana complementario y de apareamiento erróneo mostró curvas casi paralelas $T_m = f(n)$ con una ΔT_m media = $7,9^\circ\text{C}$.

[0081] Análisis ES-EM de oligonucleótidos purificados $N_{10}S_n$

[0082] Los oligonucleótidos se disolvieron en acetonitrilo acuoso al 50% (v/v) que contenía 1% de trietilamina a una concentración final de 5×10^{-5} M. Se introdujeron alícuotas de 100 ml de la fuente de iones de un espectrómetro de masas Applied Biosystems Mariner 5155 a un caudal de 5 ml/min. Los resultados se proporcionan en la Figura 8 (insertos: espectros son deconvolución): a) $N_{10}S_1$, b) $N_{10}S_2$, c) $N_{10}S_3$, d) $N_{10}S_4$, e) $N_{10}S_5$, f) $N_{10}S_6$. La ionización de los oligómeros neutros y catiónicos $N_{10}S_{3-6}$ se hizo más difícil y fue necesario acumular varios espectros para obtener una proporción señal-ruido aceptable.

Ejemplo 3: Síntesis, purificación y caracterización de oligonucleótidos tiofosfato de 12 unidades que tienen la fórmula

[0083]



[0084] Dichos oligonucleótidos se designarán después como $N_{12}S_nF$ (N = resto oligonucleotídico tiofosfato de 12 unidades; S = residuo de espermina y $n = 2 - 11$); F = fluoresceína conjugada con timina.

[0085] *Síntesis automática:* Oligonucleótidos tiofosfato de doce unidades de secuencia $N_{12} = 3'GCGACTCATGAA5'$ con dos u 11 residuos de espermina S se sintetizaron usando química de cianoetil fosforoamidita de fase sólida en un sintetizador de ADN Expedite DNA. Se usaron fosforoamiditas CE ultrasuaves y soportes ultrasuaves (Glen Research / Eurogentec) con el fin de evitar la escisión de los oligómeros durante el procesamiento. Se usó un reactivo sulfurizante estándar (Glen Research/Eurogentec) para generar los enlaces fosforotioato en el resto oligonucleotídico de 12 unidades. Para el marcaje en el extremo $5'$ se usó fluoresceína-dT fosforoamidita (Glen Research/Eurogentec). El acoplamiento de fosforoamidita espermina se realizó usando el protocolo de acoplamiento descrito en el ejemplo 2.

[0086] Se recogieron las fracciones de tritilo, se diluyeron y se analizaron en un espectrofotómetro para determinar los rendimientos del acoplamiento por etapas.

[0087] En todos los casos se usó el modo DMT-ON manteniendo el grupo de DMT en el extremo $5'$ sin escindir en los oligómeros con fines de purificación-identificación.

[0088] *Tratamiento postsintético:* Tras la síntesis automática, la escisión del soporte sólido y la desprotección completa de los oligómeros se realizaron mediante tratamiento con amoníaco acuoso concentrado durante la noche a temperatura ambiente.

[0089] *Purificación:* Los compuestos DMT-ON $N_{12}S_2F$ y $N_{12}S_{11}F$ se purificaron usando columnas Poly-Pak II™ (Glen Research/Eurogentec) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

[0090] Los oligonucleótidos purificados $N_{12}S_nF$ ($n = 2, 11$) se analizaron en una columna de intercambio aniónico (SAX1000-8) en condiciones básicas acuosas (amoníaco 100 mM, pH 11) usando un gradiente de NaCl (0,75 - 2,5 M en 20 min). Los restos en HPLC se muestran en la Figura 9 (A: $N_{12}S_{11}F$, B: $N_{12}S_2F$).

[0091] Análisis MALDI-TOF EM de oligonucleótidos purificados.

[0092] Los oligonucleótidos se disolvieron en 500 μl de agua desionizada. La muestra y la matriz de HPA se mezclaron en la placa. Una vez cristalizada, la muestra se analizó con un aparato de EM BRUKER Ultraflex. Los resultados se muestran en la FIG. 10A: $N_{12}S_2F$ calc 5460, hallado 5459 (superior) y la Figura 10B: $N_{12}S_{11}F$ calc : 9135; hallado: 9125 (inferior).

5 **[0101]** Por tanto, la invención proporciona una síntesis automática versátil, síntesis de oligonucleótidos catiónicos que forman complejos rápidos y estables con su secuencia complementaria incluso en el contexto de la invasión de hebra. Debido a la conjugación final, la selectividad de la secuencia sigue siendo tan alta como para los oligonucleótidos naturales. Además, gracias a su naturaleza catiónica, la liberación intracelular no requiera una formación de complejo con moléculas vehículo catiónicas. En conjunto, estas propiedades hacen de los conjugados oligonucleótido-oligocatión alternativas atractivas a los oligonucleótido para aplicaciones de biología molecular, diagnóstico así como terapéuticas.

REIVINDICACIONES

1. Moléculas de oligonucleótido-oligocación $A_i B_j H$ que se pueden sintetizar mediante química de fosforoamidita automática A_i y restos oligocaciones B_j , en los que

. A_i es un residuo oligonucleotídico de i unidades, siendo $i = 5$ a 50 con bases nucleotídicas naturales o no naturales y/o grupos de pentafuranosilo y/o enlaces fosfodiéster nativos, así como sus modificaciones y sustituciones químicas,

. B_j es un resto oligocación orgánico de j unidades, siendo $j = 1$ a 50 , en la que B se selecciona del grupo que consiste en

- $-HPO_3-R^1-(X-R^2_n)_{n1}-X-R^3-O-$, en la que R^1, R^2 y R^3 , idénticos o diferentes, son alquileo inferior, X es NH o $NC(NH_2)_2$, n varía de 1 a 5 y $n1 = 2$ a 20 ,
- $-HPO_3-R^4-CH(R^5X^1)-R^6-O-$, en la que R^4 es alquileo inferior, R^5 y R^6 , idénticos o diferentes, son alquileo inferior y X^1 es putrescina, espermidina o residuo de espermina,

en el que el alquileo inferior es un radical alquileo C1-C5 lineal o ramificado opcionalmente sustituido.

2. Las moléculas de la reivindicación 1, en las que el oligonucleótido se selecciona en el grupo que comprende desoxirribo, ribo, nucleótidos bloqueados (LNA) así como sus modificaciones o sustancias químicas.

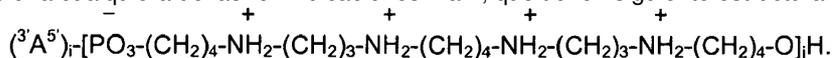
3. Las moléculas de la reivindicación 2, en las que las modificaciones o sustituciones son fosforotioato, 2'-flúor-2'-O-alquilo o un agente fluorescente.

4. Las moléculas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tienen la secuencia ${}^3A^5 - B$.

5. Las moléculas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tienen la secuencia $B - {}^3A^5$.

6. Las moléculas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tienen secuencias ${}^3A^5 - B$ o ${}^3A^5 B {}^3A^5$ así como sus combinaciones.

7. Las moléculas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tienen siguiente estructura:



8. Un procedimiento para obtener moléculas de oligonucleótidos-oligocación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, mediante el uso de una síntesis por etapas en un sintetizador de oligonucleótidos, por la vía de la fosforoamidita, que comprende:

- introducir viales que contienen oligocaciones activados y protegidos B en un sintetizador de oligonucleótidos, además de viales de los oligonucleótidos A , o lo contrario,
- detener la síntesis cuando se obtiene la longitud deseada,
- escindir los oligómeros del soporte sólido, y
- eliminar los grupos protectores.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que los reactivos de fosforoamidita se seleccionan del grupo que consiste en:

- $P(OR^9)(N(R^{10})_2)-O-R^1-(X-R^2_n)_{n1}-X-R^3-O-Prot$, en la que R^1, R^2, R^3, n y $n1$ son como se ha definido anteriormente, X es NH o $NC(NH_2)_2$ adecuadamente protegidos, R^9 es $-CH_2CH_2CN$, o alquilo inferior, R^{10} es alquilo inferior o $-N(R^{10})_2$ es un grupo pirrolidino, piperidino o morfolino y $Prot$ es un grupo protector usado en la síntesis de oligonucleótidos, tales como DMT, MMT;
- $P(OR^9)(N(R^{10})_2)-O-R^4-CH(R^5X^1)-R^6-O-Prot$, en la que R^4, R^5, R^6 son alquileo inferior, X^1 es putrescina, espermidina o espermina protegidos adecuadamente, R^9 y R^{10} como se ha definido en lo que antecede;

en el que el alquilo y el alquileo inferior son un radical alquileo C1-C5 lineal o ramificado opcionalmente sustituido.

10. El procedimiento de la reivindicación 8 o 9, en el que a la síntesis por etapas de la secuencia de oligonucleótidos le sigue la síntesis por etapas del resto oligocación para obtener compuestos que tienen la secuencia $({}^3A^5 - B)$.

11. El procedimiento de la reivindicación 8 o 9, en el que a la síntesis por etapas del resto oligocación le sigue la síntesis por etapas de la secuencia oligonucleotídica para obtener compuestos que tienen la secuencia $(B - {}^3A^5)$.

12. El procedimiento de las reivindicaciones 8 o 9, que comprende la síntesis de secuencias mixtas.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la síntesis de secuencias oligonucleotídicas tapadas en ambos extremos ($B - {}^3A^5 - B$) o las secuencias oligonucleotídicas de catión interrumpida (${}^3A^5 - B - {}^3A^5$).
- 5 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en el que los oligocaciones B activados y protegidos se obtienen protegiendo los grupos amino de una poliamina, seguido de hidroxialquilación α,ω -bis, lo que conduce a dioles compatibles con la síntesis de oligonucleótidos.
- 10 15. Como compuestos intermedios, los reactivos de fosforoamidita $P(OR^9)(N(R^{10})_2)-O-R^1-(X-R^2)_n-R^3-O-Prot$, en la que R^1, R^2, R^3, n y $n1$ son como se ha definido anteriormente, X es NH o $NC(NH_2)_2$ adecuadamente protegidos, R^9 es $-CH_2CH_2CN$, o alquilo inferior, R^{10} es alquilo inferior o $-N(R^{10})_2$ es un grupo pirrolidino, piperidino o morfolino y Prot es un grupo protector usado en la síntesis de oligonucleótidos, tales como DMT, MMT; $P(OR^9)(N(R^{10})_2)-O-R^4-CH(R^5X^1)-R^6-O-Prot$, en la que R^4, R^5, R^6 son alquileo inferior, X^1 es espermidina o espermina, R^3 y R^{10} son como se ha definido anteriormente, en el que el alquilo inferior y el alquileo inferior son un radical alquilo o alquileo sustituido, y como se ha definido anteriormente, el alquilo inferior y el alquileo inferior son radical alquilo o alquileo C1-C5 y un radical alquilo ramificado o un radical alquileo, respectivamente.
16. Uso de una molécula de oligonucleótido-oligocación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en diagnóstico.
- 20 17. Uso de una molécula de oligonucleótido-oligocación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en PCR, en PCR en tiempo real, genotipado, hibridación *in situ*.
18. Uso de una molécula de oligonucleótido-oligocación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de circuitos de ADN.
- 25 19. Composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de moléculas de oligonucleótido-oligocación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

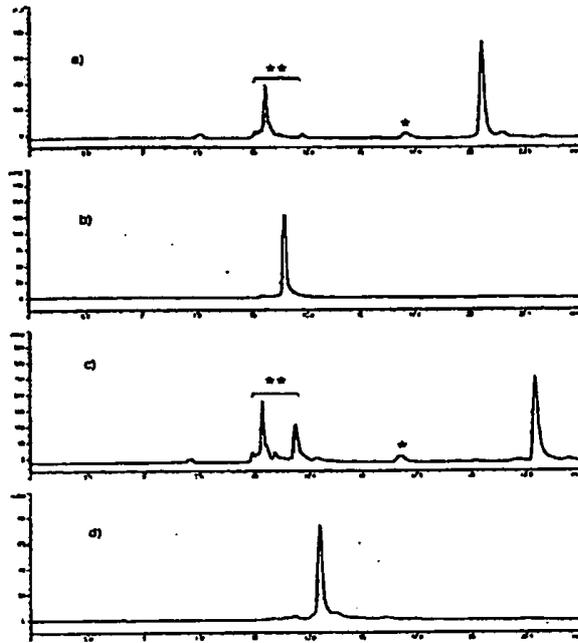


Figura 1

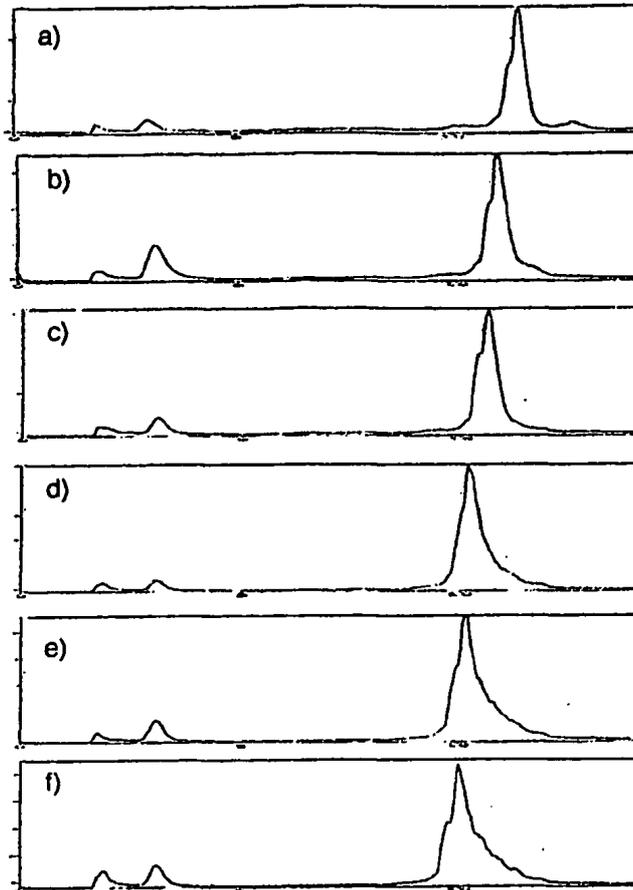


Figura 2

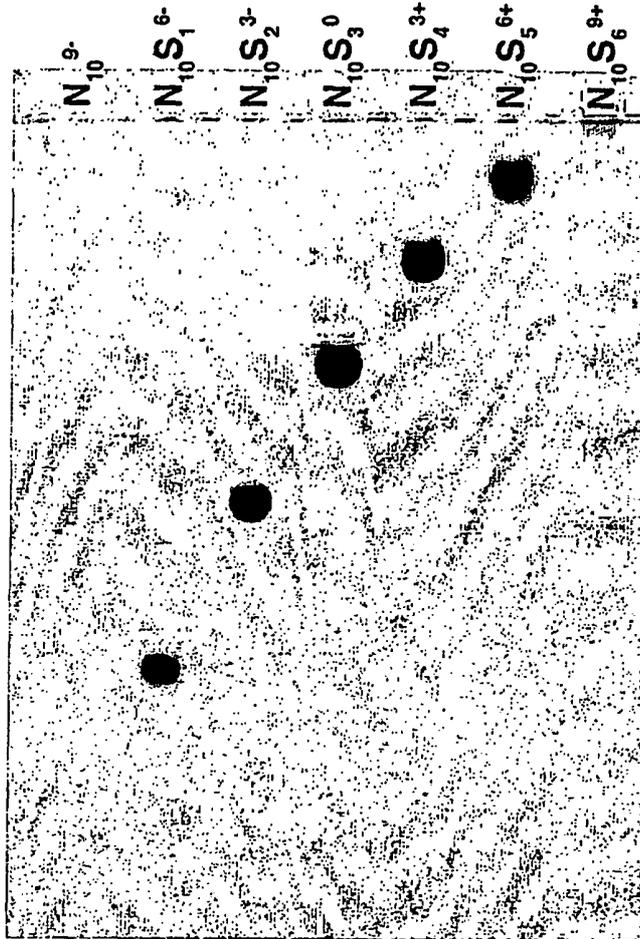


Figura 3

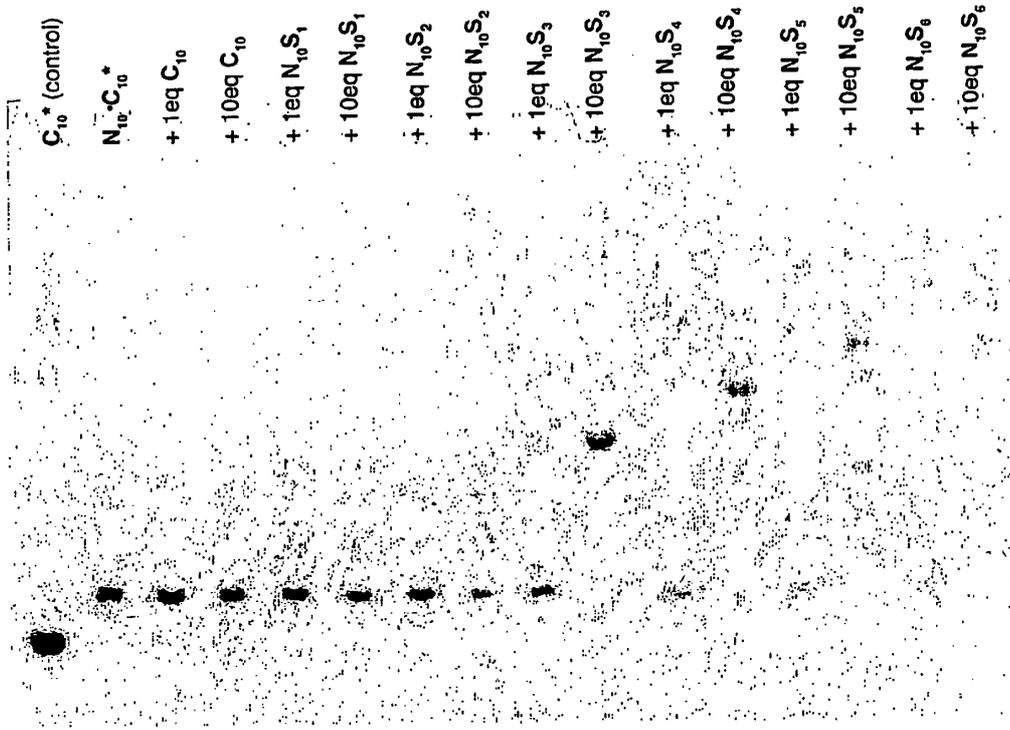


Figura 4

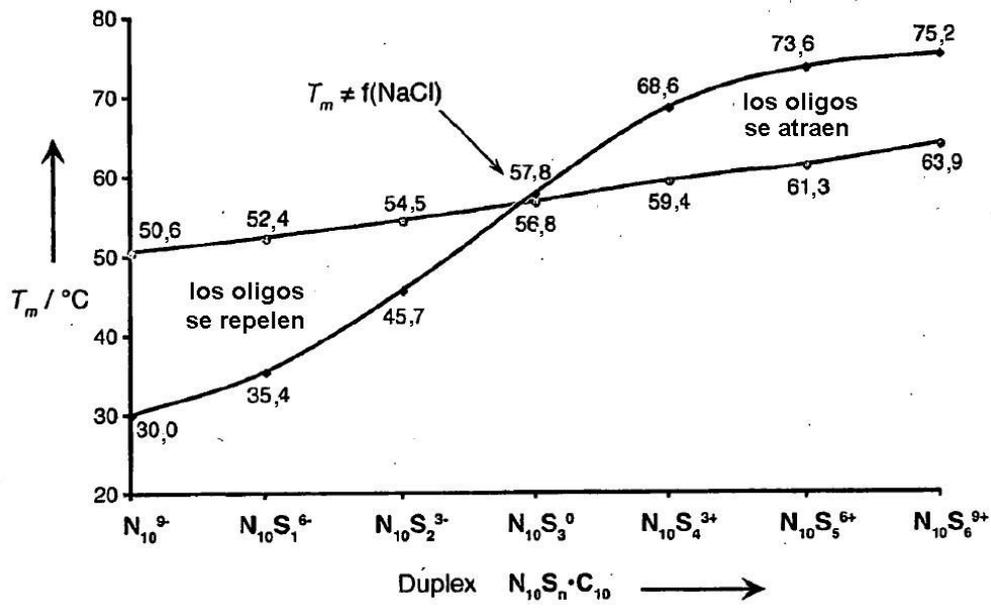


Figura 5

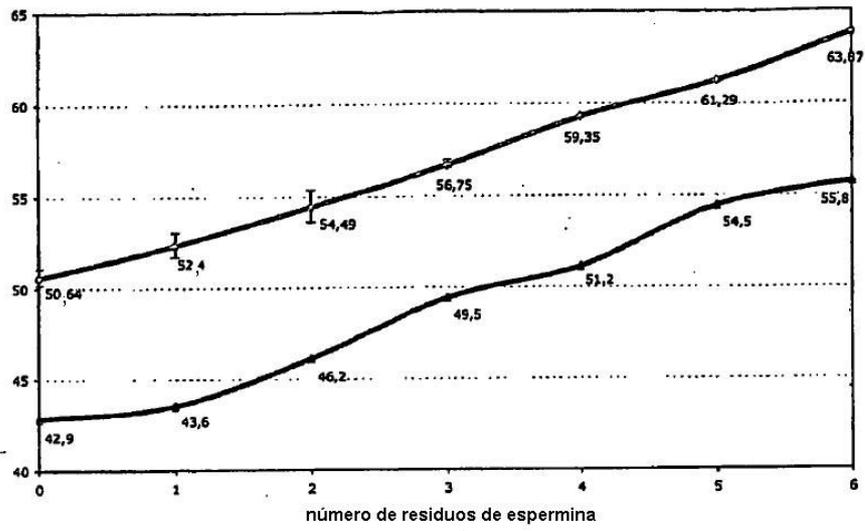


Figura 6

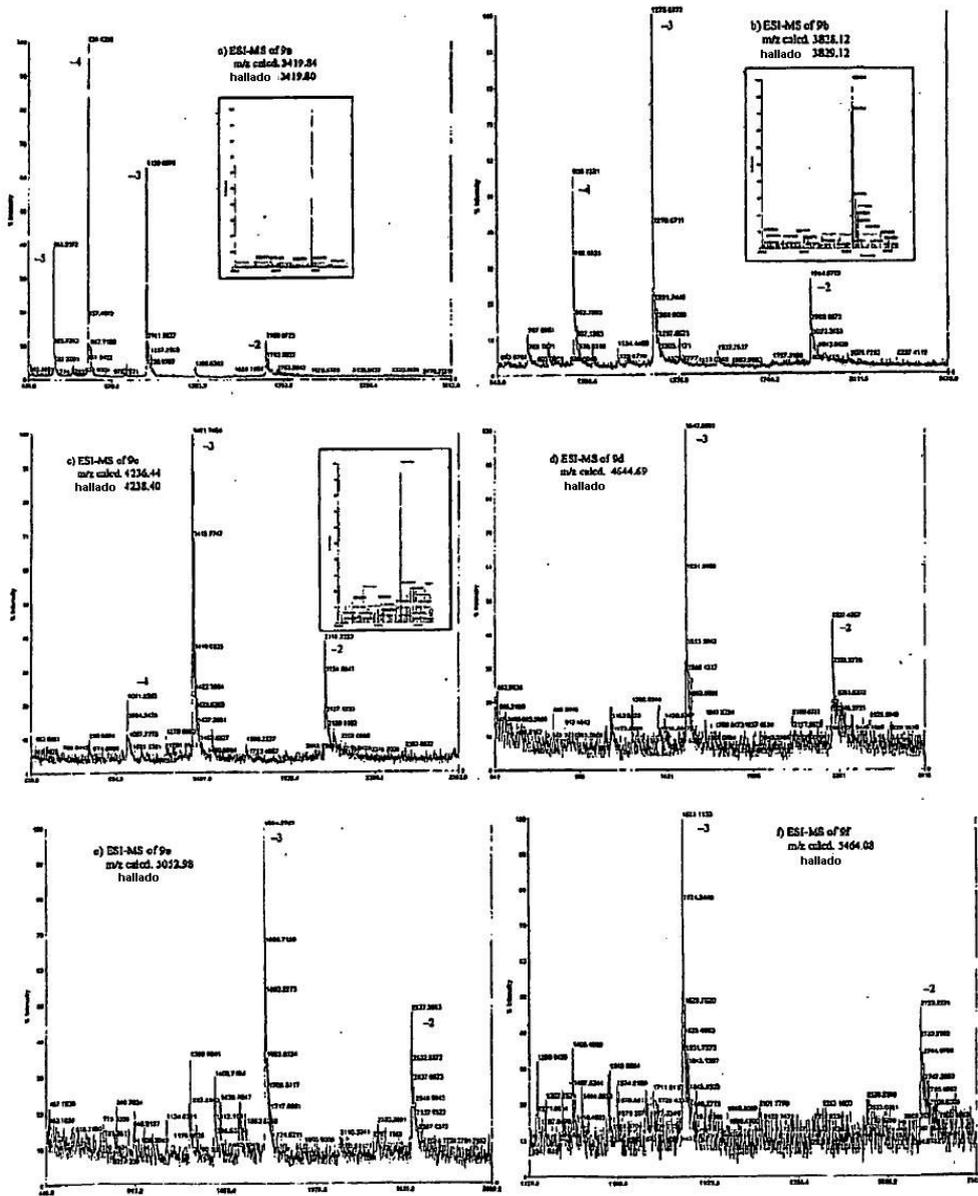


Figura 7

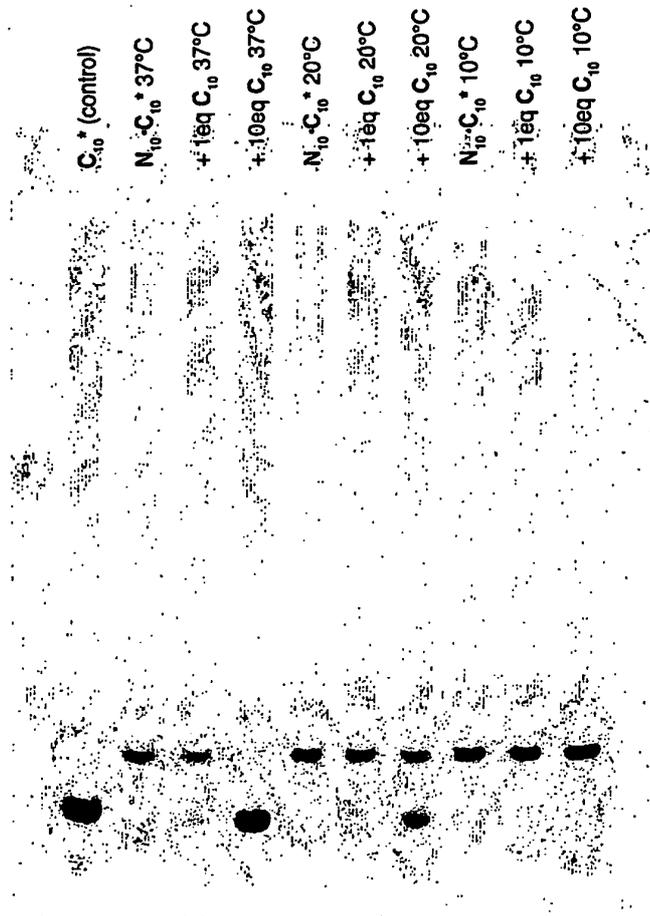


Figura 8

Figura 9

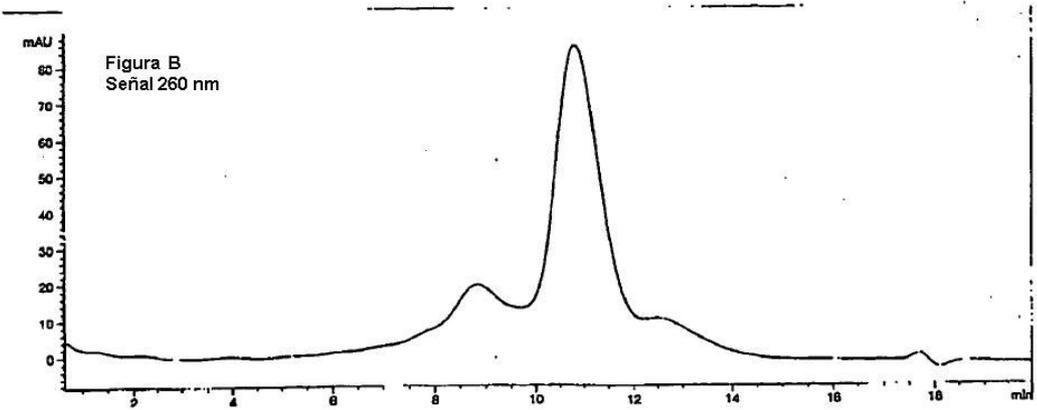
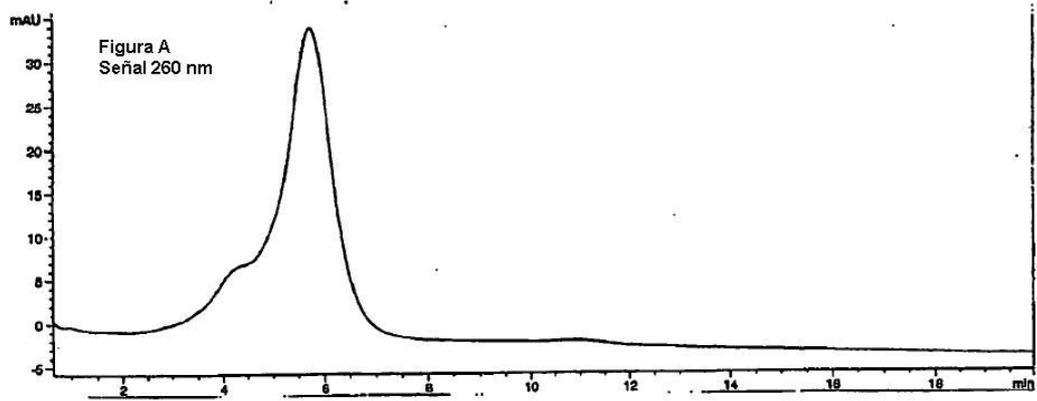


Figura 10a

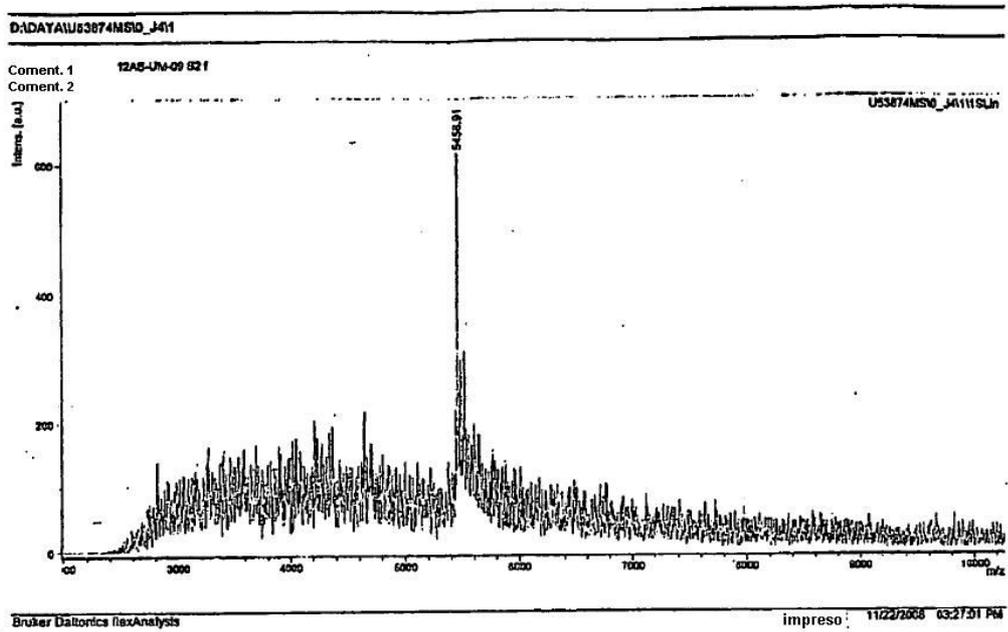


Figura 10B

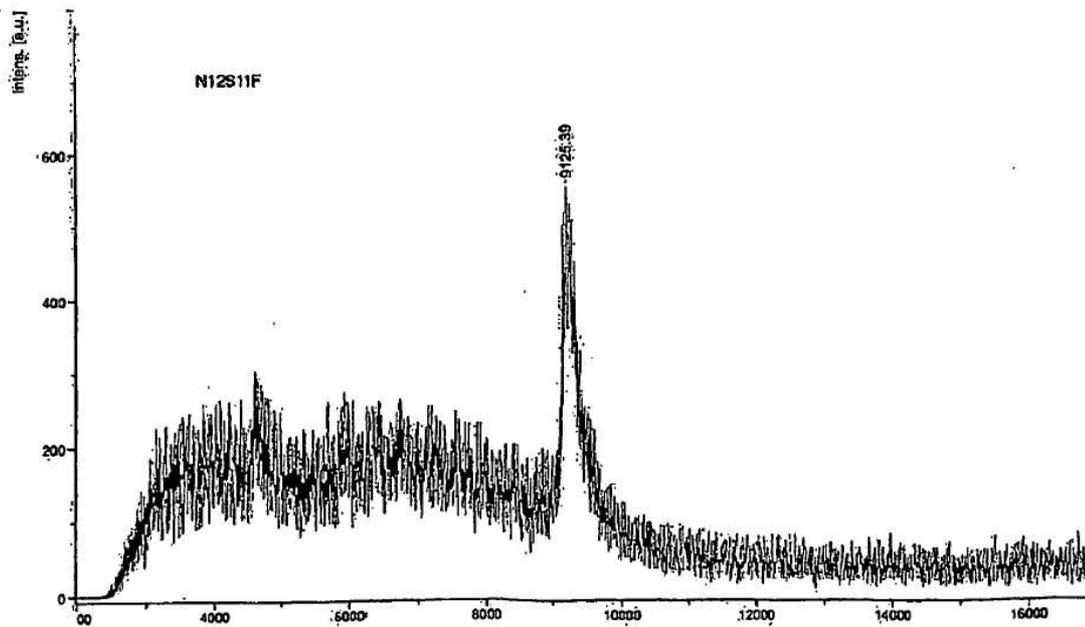


Figura 11

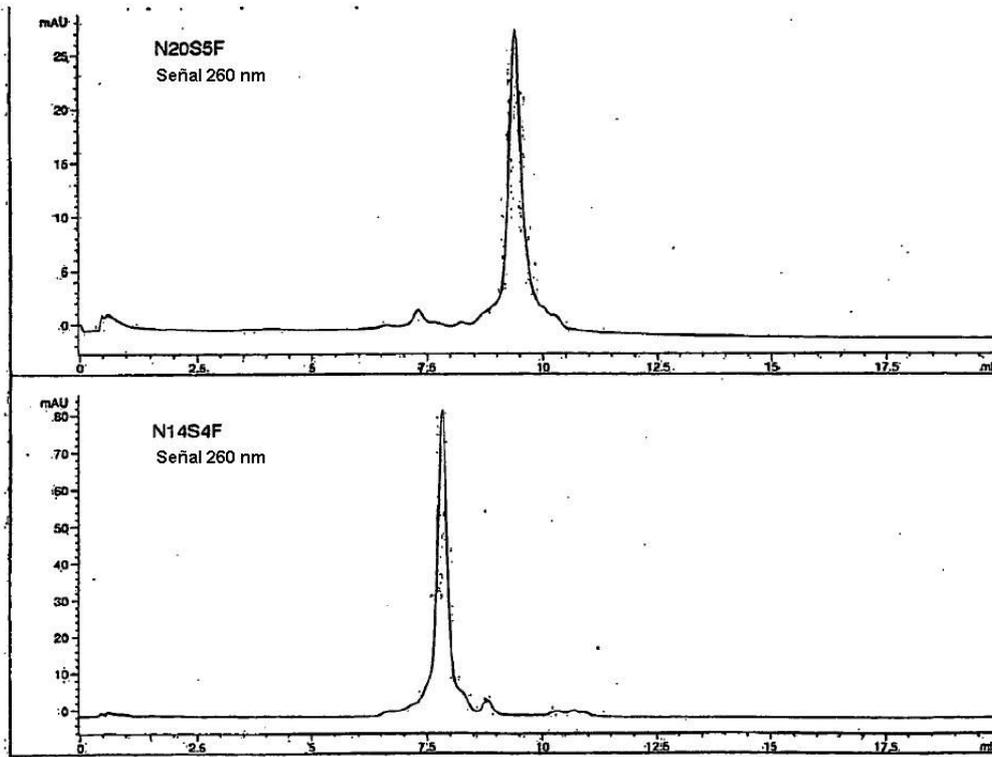


Figura 12A

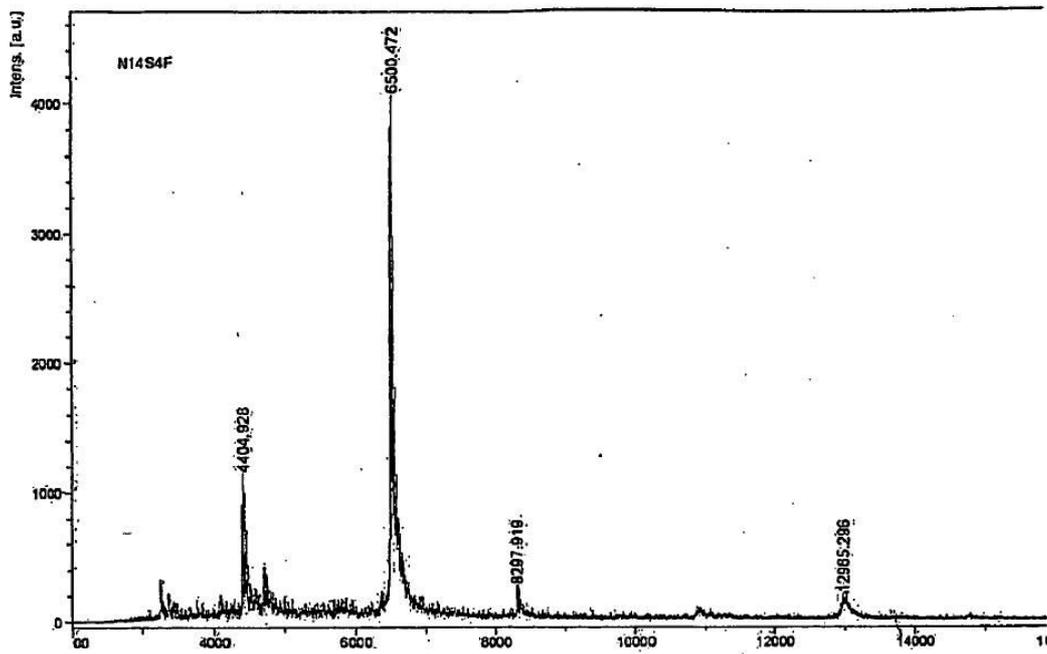


Figura 12B

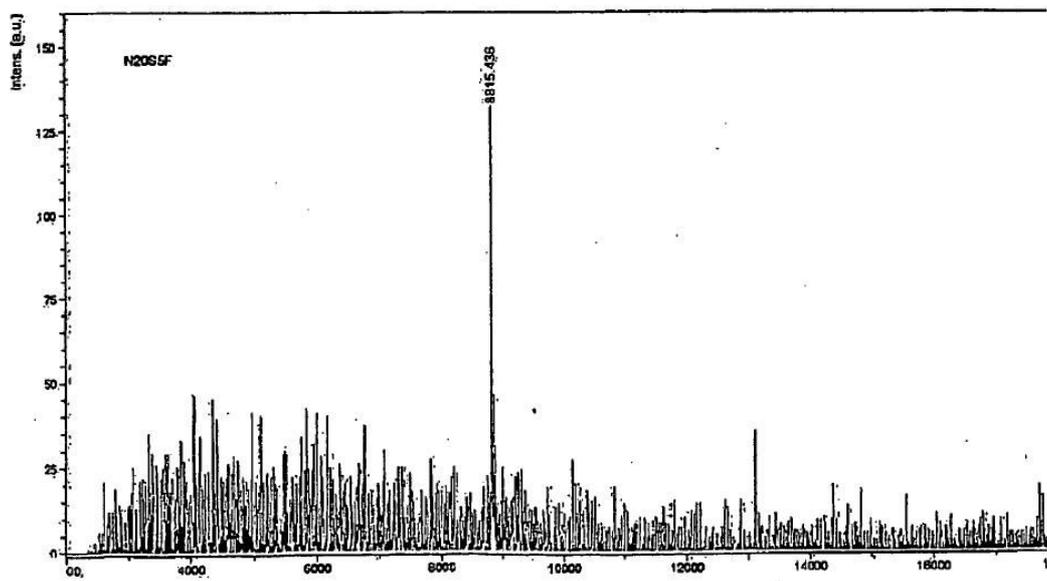


Figura 13

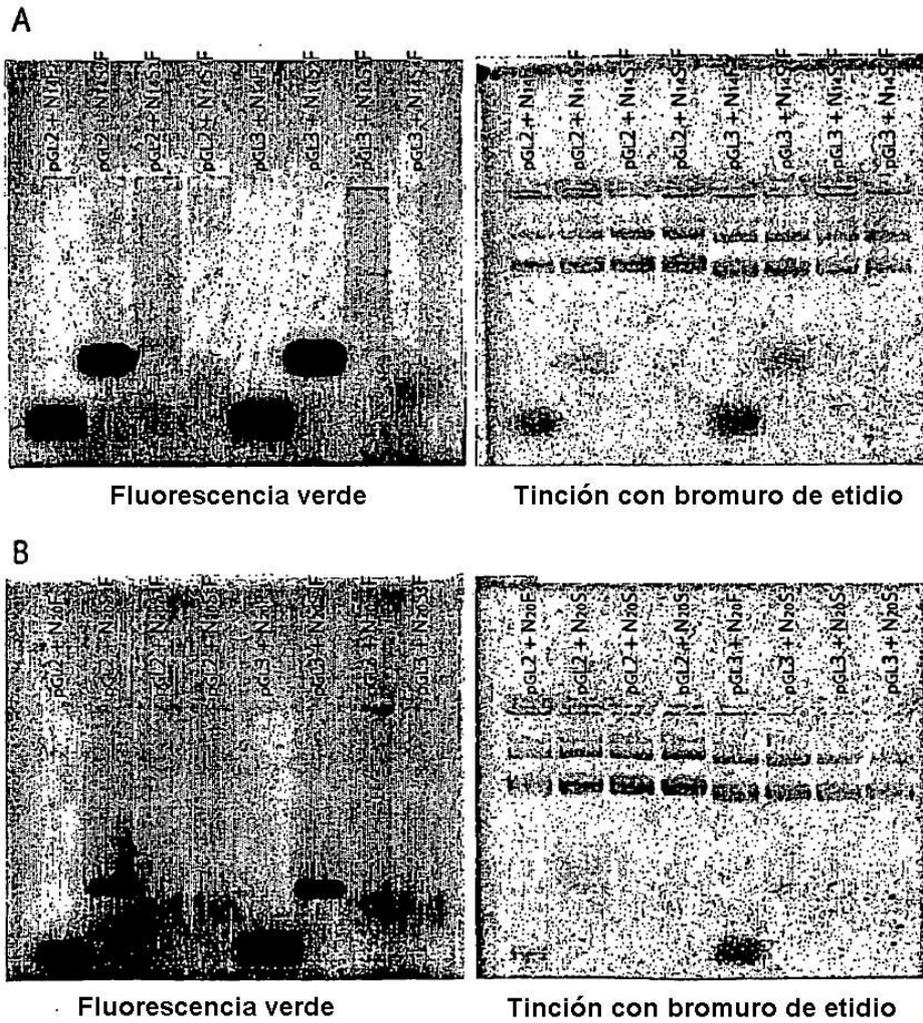


Figura 14

