

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 760**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2006** **E 06753367 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013** **EP 1888748**

54 Título: **Formación estable y selectiva de triples hélices y dobles hélices de tipo Hoogsteen empleando ácidos nucleicos intercalantes con torsión (TINA) y procedimiento para la preparación de TINA**

30 Prioridad:

25.05.2005 DK 200500762

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

07.01.2014

73 Titular/es:

TINA HOLDING APS (100.0%)
C/o Østjysk Innovation Abogade 15
8200 Aarhus N, DK

72 Inventor/es:

FILICHEV, VYACHELSAV V. y
PEDERSEN, ERIK BJERREGAARD

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 436 760 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

Formación estable y selectiva de triples hélices y dobles hélices de tipo Hoogsteen empleando ácidos nucleicos intercalantes con torsión (TINA) y procedimiento para la preparación de TINA

Compendio de la invención

5 La invención se refiere al campo de los oligonucleótidos y de los oligonucleótidos modificados con propiedades mejoradas, tales como la capacidad de formar hebras de triple hélice y la idoneidad para detección, diagnóstico y/o tratamiento.

10 En particular, la presente invención proporciona un nuevo monómero con apilamiento flexible de bases que se puede incorporar en un oligonucleótido proporcionando oligonucleótidos formadores de triple hélice (TFOs) capaces de unirse específicamente a secuencias con ácidos nucleicos diana bicatenarios o monocatenarios para formar triples hélices con una estabilidad térmica muy elevada. Otros aspectos son métodos para sintetizar los TFOs, así como su uso en detección, diagnóstico y tratamiento.

Antecedentes de la invención

15 En el documento WO2005083084 se han descrito seudonucleótidos intercalantes capaces de ser incorporados en la estructura principal de un oligonucleótido o un análogo de oligonucleótido. Los oligonucleótidos que comprenden los seudonucleótidos intercalantes tienen una capacidad reducida para formar triple hélice, pero tienen la capacidad de discriminar entre ADN y ARN, es decir, forman complejos más estables con ADN que con ARN.

20 Malakhov et al, 2004 (Eur. J. Org. Chem. 2004, 1298-1307) han descrito un monómero para ser incorporado en un oligonucleótido o en un análogo de oligonucleótido. El objetivo del estudio era proporcionar una base natural, es decir, una base promiscua que se pudiera encajar en una hélice de Watson-Crick en el lado opuesto a cualquiera de las bases de origen natural. No se han descrito estudios sobre la formación de triple hélice.

25 El reconocimiento específico de secuencias de ADN bicatenario (ADNbc) es un tema de gran interés en el desarrollo de herramientas basadas en oligonucleótidos en la biología molecular, la terapéutica y la bionanotecnología. Las triples hélices se forman cuando un oligonucleótido monocatenario formador de triple hélice (TFO) se une a un ADNbc a través de interacciones específicas en el surco mayor y esto ha sido el objeto de una intensa investigación para el direccionamiento de genes. Esta estrategia permite el control transcripcional, la desactivación de genes y el tratamiento selectivo de secuencias de ADN genómico con el objetivo de formar genes mutados o recombinados.

30 La afinidad de la tercera hebra de los TFOs hacia sus dianas es generalmente problemática debido a que es preciso su reconocimiento por secuencias de homopurinas de ADNbc y la formación no favorable de bases triples de Hoogsteen C⁺·G·C sensibles al pH, en condiciones fisiológicas en el motivo de unión paralelo (pirimidina). Durante la última década, se han dedicado muchos esfuerzos a modificar los TFOs para mejorar la afinidad de la unión con sus dianas, junto con el diseño de bases nucleotídicas de triple hélice que podrían aliviar la restricción de la secuencia del ADNbc. Los oligonucleótidos que poseen ácidos nucleicos modificados, tales como ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), 2'-aminoetil-oligorribonucleótidos (2'-AE-RNA) y N3' → P5' fosforamidatos que inducen una afinidad de la unión incrementada, son algunos de los TFOs modificados químicamente con más éxito. La estabilización de las estructuras de triple hélice también se ha observado tras la adición de compuestos heterocíclicos (intercalantes) que a veces poseen una cadena lateral cargada positivamente en relación con la solución acuosa que contiene las tres secuencias de oligonucleótidos. También se ha observado que un agente intercalante unido covalentemente al extremo 3' o 5' de un TFO, llevó a una estabilización térmica de triples hélices paralelas en un intervalo de +3,0 - +16,1°C, dependiendo de la longitud del enlazador y del tipo de agente intercalante. Sin embargo, se ha prestado poca atención a los agentes intercalantes fijados covalentemente, insertados como una protuberancia en el centro del TFO.

45 Este diseño podría tener varias ventajas. En primer lugar, se requiere la síntesis de una sola fosforamida de seudonucleótidos intercalantes en comparación con la síntesis de al menos cuatro monómeros de nucleótidos necesarios para los ácidos nucleicos modificados en los azúcares. En segundo lugar, varias inserciones protuberantes de un monómero intercalante en la secuencia podrían aumentar considerablemente las estabilidades de la hélice doble y la triple hélice, en comparación con una sola inserción. Por otra parte, la diferencia estructural entre los modos de unión de Watson-Crick y Hoogsteen junto con la ausencia o la presencia de 2'-OH en el ADN y el ARN, proporcionan diferentes propiedades para los distintos tipos de hélices. Por lo tanto, se espera que las inserciones protuberantes de un enlazador y la ruptura de la hélice con agentes intercalantes den lugar a propiedades únicas en hélices seleccionadas de forma apropiada. Esto ha llevado a oligonucleótidos modificados químicamente que podrían discriminar entre diferentes tipos de ácidos nucleicos monocatenarios.

55 Christensen et al. (Nucleic acids research, vol. 30, nº 22, 15 de Noviembre 2002, páginas 4918-25) y el documento WO03/051901 describen el seudonucleótido intercalante (IPN) fosforamida de (S)-1-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-3-O-(1-pirenilmetil)glicerol que se inserta en oligonucleótidos para generar ácidos nucleicos intercalantes (INA).

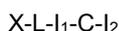
Además, Christensen et al. (Nucleic acids research, vol. 30, nº 22, 15 de Noviembre 2002, páginas 4918-25) descri-

ben un método para la preparación de tales IPNs y el documento WO03/051901 describe que tales compuestos se pueden utilizar como moduladores de la transcripción.

Descripción detallada de la invención

5 Las inserciones protuberantes de (*R*)-1-*O*-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerol en el centro de oligodesoxinucleótidos de homopirimidina (ácidos nucleicos intercalantes con torsión, TINA) obtenidas mediante la reacción de acoplamiento de Sonogashira postsintética conducen a una estabilidad térmica extraordinariamente elevada de las hélices triples y dobles de tipo Hoogsteen, mientras que las dobles hélices de tipo Watson-Crick con el mismo contenido en nucleótidos, están desestabilizadas.

10 En un primer aspecto, la presente descripción proporciona un monómero con apilamiento de bases flexible, con la estructura general:



15 en la que X es una unidad monómera de estructura principal que se puede incorporar en la estructura principal de un oligonucleótido o de un análogo de oligonucleótido, o PNA, o análogos de PNA, L es un enlazador, I_1 es un primer agente intercalante que comprende al menos un sistema conjugado esencialmente plano, que es capaz de apilarse junto con bases nucleotídicas de ADN, ARN o análogos de los mismos, C es un conjugador e I_2 es un segundo agente intercalante que comprende al menos un sistema conjugado esencialmente plano, que es capaz de apilarse junto con bases nucleotídicas de ADN, ARN o análogos de los mismos.

20 Un monómero con apilamiento de bases flexible consiste en al menos dos sistemas de agentes intercalantes I_1 e I_2 que están unidos por un conjugador C que proporciona la rigidez estructural necesaria y la flexibilidad de torsión. Este último se cree que es importante para ayudar a los agentes intercalantes a ajustarse ellos mismos en una posición apropiada dentro de la hélice de ácido nucleico.

25 En una realización preferida, la estructura principal X es capaz de ser incorporada en un oligonucleótido de ADN, ARN, HNA, MNA, ANA, LNA, CAN, INA, CeNA, TNA, (2'-NH)-TNA, (3'-NH)-TNA, α -L-Ribo-LNA, α -L-Xilo-LNA, β -D-Ribo-LNA, β -D-Xilo-LNA, [3.2.1]-LNA, Biciclo-ADN, 6-Amino-Biciclo-ADN, 5-epi-Biciclo-ADN, α -Biciclo-ADN, Triciclo-ADN, Biciclo[4.3.0]-ADN, Biciclo[3.2.1]-ADN, Biciclo[4.3.0]amida-ADN, β -D-Ribopiranosil-NA, α -L-Lixopiranosil-NA, 2'-R-ARN, 2'-OR-ARN, 2'-AE-ARN, α -L-ARN, β -D-ARN, y combinaciones y modificaciones de los mismos.

30 Los ácidos nucleicos y sus análogos proporcionan un oligonucleótido que es capaz de unirse a ácidos nucleicos complementarios a través del apareamiento de bases de Watson-Crick o de Hoogsteen o Hoogsteen inverso. X se puede incorporar en el extremo 3' y/o en el extremo 5' y/o en el centro de las secuencias. Las bases nucleotídicas modificadas, hidratos de carbono, cadenas peptídicas, perlas magnéticas, perlas de agarosa, perlas de sefarosa, vidrio, superficies de plástico, metales pesados y superficies de chips se consideran que se utilizan como modificaciones adicionales de ácidos nucleicos.

35 En otra realización, la unidad monómera de estructura principal X comprende alquilendiol, tal como etilenglicol o 1-*O*-metilenglicerol que opcionalmente tiene el alquilendiol comprendido en parte en un sistema de anillo, tal como glicona. Por ejemplo, el monómero de estructura principal X puede formar parte de anillos de cuatro, cinco o seis miembros que eventualmente tienen heteroátomos seleccionados a partir de nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno.

En una realización, el enlazador L del monómero de apilamiento de bases flexible comprende 0-60 átomos.

40 En otra realización, L comprende una cadena o un anillo o combinaciones de los mismos y/o sustituciones de los mismos.

En todavía otra realización, L comprende una cadena de alquilo o una cadena de oxaalquilo o una cadena de azaalquilo o una cadena de tialquilo o un grupo carboxamida o un grupo tiocarboxamida o un grupo sulfonamida o combinaciones de los mismos.

45 La combinación de X y L proporciona un sistema que coloca el sistema intercalante I_1 -C- I_2 en el núcleo de hélices de ácido nucleico con capacidad para apilarse con bases de ácidos nucleicos.

I_1 del monómero de apilamiento de bases flexible de la descripción es un primer agente intercalante que comprende al menos un sistema conjugado esencialmente plano, que es capaz de apilarse junto con bases nucleotídicas de ADN, ARN o análogos de los mismos.

50 En una realización preferida, I_1 es un sistema de anillo aromático monocíclico o policíclico, opcionalmente seleccionado entre el grupo de benceno, naftaleno, azuleno, sistemas de anillos heteroaromáticos bicíclicos y sustituciones de los mismos.

C del monómero con apilamiento de bases flexible de la invención es un conjugador. En una realización preferida, C se selecciona entre el grupo de un alquilo de 1 a 12 carbonos, alqueno de 2 a 12 carbonos, alquino de 2 a 25 car-

bonos o diazo o combinaciones de los mismos con una longitud no superior a 25 carbonos y/o átomos de nitrógeno.

En otra realización, C se selecciona entre el grupo que consiste en anillos aromáticos de cadena lineal o cadena ramificada o monocíclicos y sustituciones de los mismos que tienen eventualmente heteroátomos seleccionados a partir de nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno.

5 En todavía otra realización, el alquenilo de C es un acetileno o acetilenos repetitivos.

En una realización preferida, la unidad de longitud de la unidad del monómero de estructura principal X que incluye un átomo de fósforo, es inferior a 6 átomos, en donde la unidad de longitud de la estructura principal es la distancia más corta de un monómero al siguiente.

10 En una realización preferida, el resto del enlazador L tiene una longitud de al menos 2 átomos y, eventualmente, posee heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno.

I_2 del monómero con apilamiento de bases flexible es un segundo agente intercalante que comprende al menos un sistema conjugado esencialmente plano, que es capaz de apilarse junto con bases nucleotídicas de ADN, ARN o análogos de los mismos.

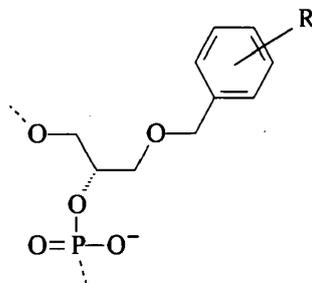
15 En una realización preferida, I_2 se selecciona entre el grupo de sistemas de anillos bicíclicos aromáticos, sistemas de anillos tricíclicos aromáticos, sistemas de anillos tetracíclicos aromáticos, sistemas de anillos pentacíclicos aromáticos y análogos heteroaromáticos de los mismos y sustituciones de los mismos.

En una realización preferida, el monómero con apilamiento de bases flexible es parte de un oligonucleótido o de un análogo de oligonucleótido.

20 En otra realización preferida, el monómero con apilamiento de bases flexible está adaptado para ser incorporado en un oligonucleótido.

En una realización preferida, el monómero con apilamiento de bases flexible adaptado para ser incorporado en un oligonucleótido se selecciona entre el grupo de una fosforamidita, una fosfordiamidita, un fosfordiéster, un fosfortriéster, un fosfonato, un H-fosfonato, un fosfito, un clorofosfito, una clorofosforamidita, una fosfonamidita, una fosfoncloridita, un trifosfato, un difosfato.

25 En todavía otra realización, el monómero con apilamiento de bases flexible de la invención se puede describir por la fórmula:



en la que R se selecciona a partir del grupo de ariletinilo.

30 Otro aspecto de la presente invención es un oligonucleótido que comprende el monómero con apilamiento de bases flexible de la invención. El oligonucleótido puede ser cualquier oligonucleótido que es capaz de un apareamiento de bases de Watson-Crick y un apareamiento de bases de Hoogsteen y un apareamiento de bases de Hoogsteen inverso. El punto importante para los oligonucleótidos de la presente invención es que son capaces de un apareamiento de bases de Watson-Crick y de un apareamiento de bases de Hoogsteen y de un apareamiento de bases de Hoogsteen inverso. Por lo tanto, cuando el monómero con apilamiento de bases flexible de la invención se incorpora
35 en un oligonucleótido, el oligonucleótido es capaz de formar una hélice triple.

Otro aspecto de la invención es un método para la preparación de un monómero con apilamiento de bases flexible que comprende las etapas de

40 Proporcionar un precursor de un monómero con apilamiento de bases flexible, en donde dicho precursor es un monómero con apilamiento de bases flexible que comprende I_1 sustituido con un halógeno o sustituido con C o sustituido con azida.

Sustituir el halógeno o el sustituyente C o el sustituyente azida del precursor de la etapa a, con C - I_2

Hacer que el precursor sustituido con C - I_2 de un monómero con apilamiento de bases flexible, se pueda adaptar para ser incorporado en un oligonucleótido.

Todavía otro aspecto de la invención es un método para la preparación de un oligonucleótido que comprende un monómero con apilamiento de bases flexible que comprende las etapas de:

Proporcionar un monómero con apilamiento de bases flexible adaptado para ser incorporado en un oligonucleótido

5 Proporcionar reactivos convencionales para la síntesis del oligonucleótido

Durante la síntesis del oligonucleótido incorporar uno o varios monómeros con apilamiento de bases flexible en el oligonucleótido

Generando de este modo un oligonucleótido que comprende un monómero de estructura principal flexible.

10 Todavía otro aspecto es un método para la preparación de un oligonucleótido que comprende un monómero con apilamiento de bases flexible que comprende las etapas de:

Proporcionar un precursor de un monómero flexible, adaptado para ser incorporado en un oligonucleótido, en donde dicho precursor es un monómero con apilamiento de bases flexible que comprende I₁ sustituido con un halógeno o sustituido con C o sustituido con azida.

Proporcionar reactivos convencionales para la síntesis del oligonucleótido

15 Durante la síntesis del oligonucleótido incorporar uno o varios precursores de los monómeros con apilamiento de bases flexible en el oligonucleótido

Después de la síntesis del oligonucleótido, el sustituyente de halógeno o el sustituyente C o el sustituyente azida en I₁ se sustituye con C - I₂

20 Generando de este modo un oligonucleótido que comprende un monómero con apilamiento de bases flexible.

Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de un oligonucleótido que comprende el monómero con apilamiento de bases flexible para la formación de una estructura de ácido nucleico de triple hélice. En comparación con la detección tradicional mediante hibridación, la detección con un TFO no requiere una etapa de desnaturalización.

25 Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es un método para formar ácidos nucleicos con hélice doble o triple que comprende las etapas:

Proporcionar un oligonucleótido según la reivindicación 16

Proporcionar un ácido nucleico diana monocatenario o bicatenario

30 Incubar el oligonucleótido de la etapa a con el ácido nucleico diana monocatenario o bicatenario de la etapa b en condiciones de formación de hélice doble o triple

Formando de este modo una estructura de ácido nucleico bicatenario o de ácido nucleico de triple hélice.

Es importante destacar que los TFOs de la presente invención son capaces de formar hélices triples a un pH de aproximadamente 7, como se desprende de la sección de ejemplos. Esta característica es muy importante para diversas aplicaciones, por ejemplo, para uso como medicamento.

35 En una realización preferida, la formación de un ácido nucleico de triple hélice se utiliza para la modulación específica de la secuencia, de la actividad de un ácido nucleico diana.

40 En realizaciones preferidas, el ácido nucleico diana se selecciona entre el grupo de un gen cromosómico, un ARNm, un ARNr, un ARNt y un ARNmico o cualquier precursor de los mismos. Por lo tanto, la estructura de ácido nucleico de triple hélice puede inhibir la traducción de un ARNm, la función de un ARNr o un ARNt o el procesamiento de un ARNpre-mi a un ARNmico maduro.

En otras realizaciones preferidas, la formación de una estructura de ácido nucleico de triple hélice se utiliza para la detección específica de la secuencia, del ácido nucleico diana.

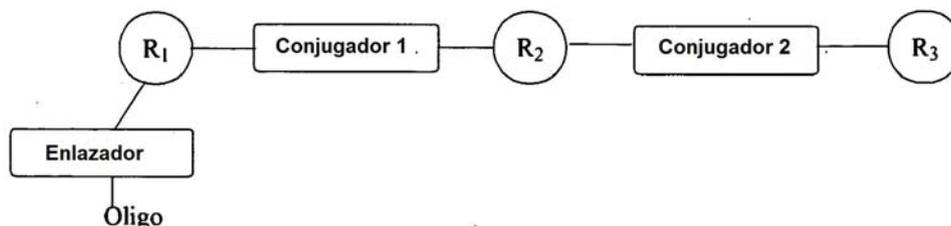
Por lo tanto, podría ser la detección de un ARNmico precursor particular o la detección de un gen-alelo particular. Tales métodos de detección, por ejemplo, tienen interés para fines de diagnóstico.

45 En otra realización, el oligonucleótido que comprende un monómero con apilamiento de bases flexible se utiliza como medicamento. El mecanismo de acción de este tipo de medicamento puede ser la inhibición de la expresión de un determinado gen, es decir, mediante un mecanismo antigénico. También podría ser una inhibición a nivel de ARNm o ARNmico.

Por lo tanto, los oligonucleótidos de la invención se pueden usar para la preparación de un medicamento.

Opciones:

1. Un oligonucleótido intercalante para la estabilización de triples cadenas, dobles cadenas de ADN y ARN natural o modificado e híbridos de los mismos que tienen la estructura general de fórmula 1.



fórmula 1

5

en la que

R_1 , R_2 y R_3 son independientemente unos de otros un sistema de anillo aromático monocíclico o policíclico,

R_1 , R_2 y R_3 pueden estar sustituidos independientemente unos de otros.

Oligo es un oligonucleótido que consiste en subunidades de ADN, ARN, HNA, MNA, ANA, LNA, CAN, INA, CeNA, TNA, (2'-NH)-TNA, (3'-NH)-TNA, α -L-Ribo-LNA, α -L-Xilo-LNA, β -D-Ribo-LNA, β -D-Xilo-LNA, [3.2.1]-LNA, Biciclo-ADN, 6-Amino-Biciclo-ADN, 5-epi-Biciclo-ADN, α -Biciclo-ADN, Triciclo-ADN, Biciclo[4.3.0]-ADN, Biciclo[3.2.1]-ADN, Biciclo[4.3.0]amida-ADN, β -D-Ribopiranosil-NA, α -L-Lixopiranosil-NA, 2'-R-ARN, 2'-OR-ARN, 2'-AE-ARN, α -L-ARN, β -D-ARN, y combinaciones y modificaciones de los mismos. Las subunidades pueden contener bases nucleotídicas, hidratos de carbono, cadena peptídica modificadas. La estructura principal del oligonucleótido puede estar modifica-

15

El enlazador comprende de 1-60 átomos y puede contener regiones cíclicas no aromáticas, en donde el Oligo está conectado a través de la unión del Enlazador con el sistema de anillo aromático R_1 que a su vez está conectado a través del Conjugador 1 que define un sistema conjugado, que comprende un sistema de anillo aromático monocíclico y/o policíclico, y/o alquilo, alquenilo y/o alquinilo, con el sistema de anillo aromático R_2 , que a su vez está conectado por el Conjugador 2 que define un sistema conjugado, que comprende un sistema de anillo aromático monocíclico y/o policíclico, y/o alquilo, alquenilo y/o alquinilo, con el sistema de anillo aromático R_3 , en donde Enlazador es una unidad monómera de estructura principal capaz de ser insertado en la estructura principal de un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico a través de restos fosfato, o restos azúcar, o bases nucleotídicas o una estructura principal de oligo modificada.

20

El sistema conjugado que comprende R_1 , Conjugador 1, R_2 , Conjugador 2 y R_3 puede adoptar un sistema no plano.

25

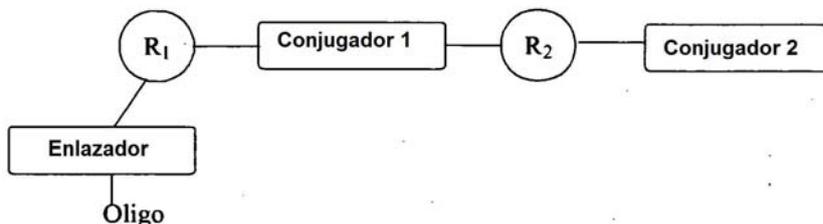
Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el Conjugador 1 y el Conjugador 2 son independientes entre sí. El Conjugador 1 consiste en un arilo, R_4 , unido a R_1 a través de x enlaces sencillos, n enlaces dobles y/o m enlaces triples y unido a R_2 a través de y enlaces sencillos, k enlaces dobles y/o l enlaces triples, en donde k, l, m, n, x e y, independientemente unos de otros, son números enteros de 0-5. El Conjugador 2 consiste en un arilo, R_5 , unido a R_2 a través de z enlaces sencillos, p enlaces dobles y/o r enlaces triples y unido a R_3 a través de v enlaces sencillos, s enlaces dobles y/o t enlaces triples, en donde p, r, s, t, v y z, independientemente unos de otros, son números enteros de 0-5. El sistema conjugado formado de este modo puede formar un sistema no plano.

30

Un oligonucleótido intercalante según la opción 2, en el que el arilo contiene heteroátomos.

Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con cualquiera de las opciones 2 y 3, en el que R_3 se ha sustituido por un solo átomo tal y como se describe en la fórmula 2. El sistema conjugado que comprende R_1 , Conjugador 1, R_2 y Conjugador 2 puede adoptar un sistema no plano.

35



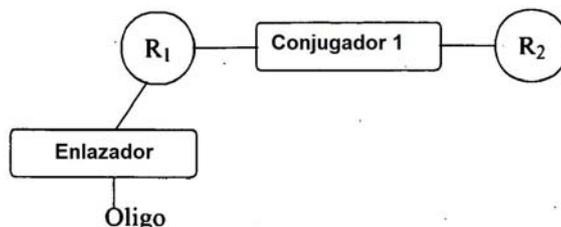
fórmula 2

Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con cualquiera de las opciones 2-4, en el que el Conjugador 1 y/o el Conjugador 2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alquilo de 1 a 12 carbonos, alqueno de 2 a 12 carbonos, alquinilo de 2 a 25 carbonos y combinaciones de los mismos.

5 Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con cualquiera de las opciones 2-5, en el que el grupo alquinilo son acetilenos repetitivos.

Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con cualquiera de las opciones 2-5, en el que el grupo alquinilo es acetileno.

Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con cualquiera de las opciones 2-7, que no contiene R₃ ni Conjugador 2 de acuerdo con la fórmula 3.

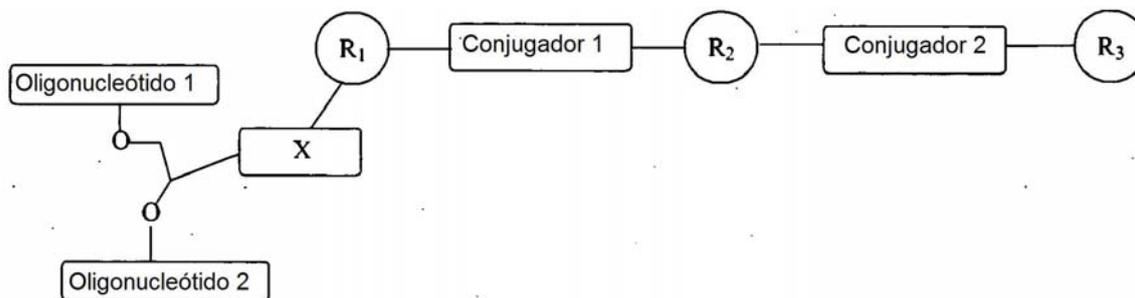


fórmula 3

10 Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con una cualquiera de las opciones anteriores, en donde el Enlazador se selecciona entre el grupo que consiste en grupos de cadena lineal o cadena ramificada o cíclicos.

Un oligonucleótido intercalante según la opción 9, en el que el grupo de cadena lineal o de cadena ramificada o cíclico tiene heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno.

15 Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con una cualquiera de las opciones anteriores, en donde el monómero de la cadena principal comprende etilenglicol (fórmula 4):

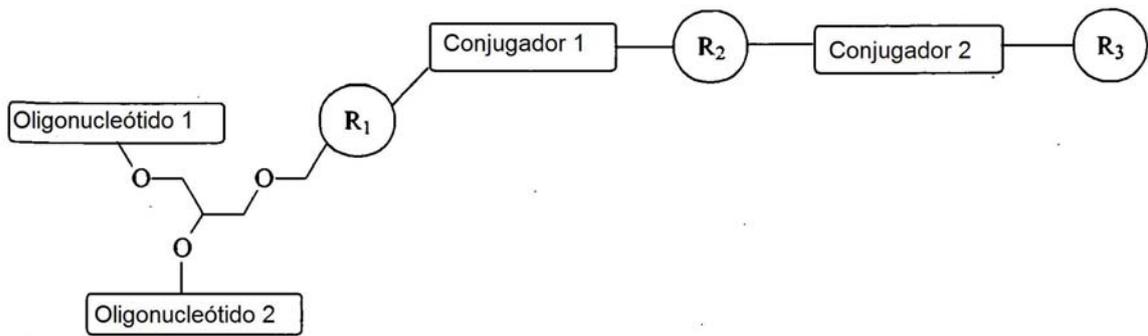


fórmula 4

en la que X consiste en grupos de cadena lineal o de cadena ramificada o cíclicos y el Oligonucleótido 1 y el Oligonucleótido 2 se definen, independientemente el uno del otro, como el Oligo en la opción 1.

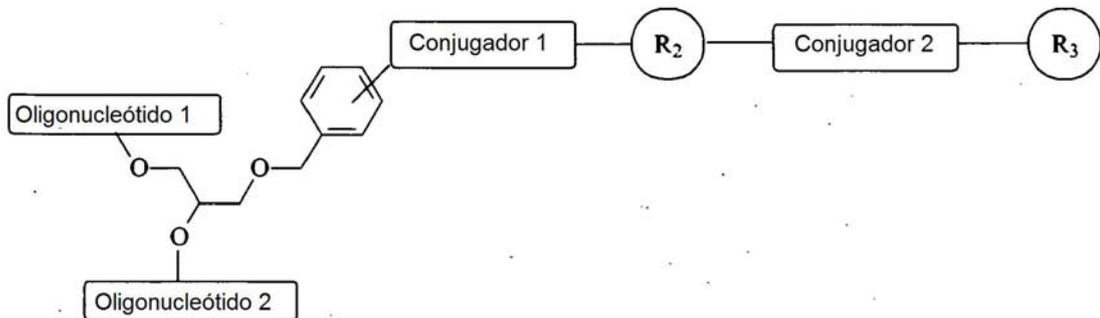
20 Un oligonucleótido intercalante según la opción 11, en el que los grupos de cadena lineal o de cadena ramificada o cíclicos tienen heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno.

Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con una cualquiera de las opciones anteriores, en el que el monómero de la cadena principal comprende 1-O-metilenglicerol (fórmula 5):



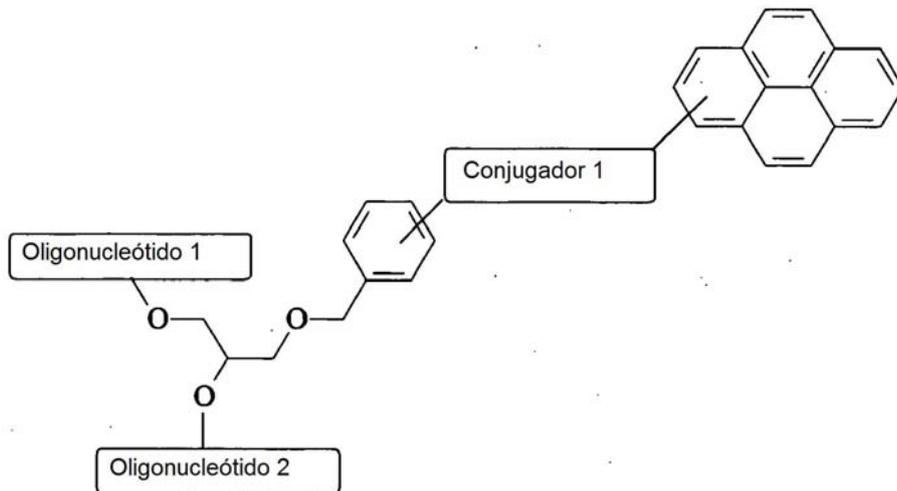
fórmula 5

Un oligonucleótido intercalante según la opción 13, en el que R₁ consiste en un anillo de fenilo sustituido en meta, orto o para (fórmula 6):



fórmula 6

- 5 Un oligonucleótido intercalante según la opción 14, en el que R₂ es pireno y no contiene R₃ ni Conjugador 2 de acuerdo con la fórmula 7.



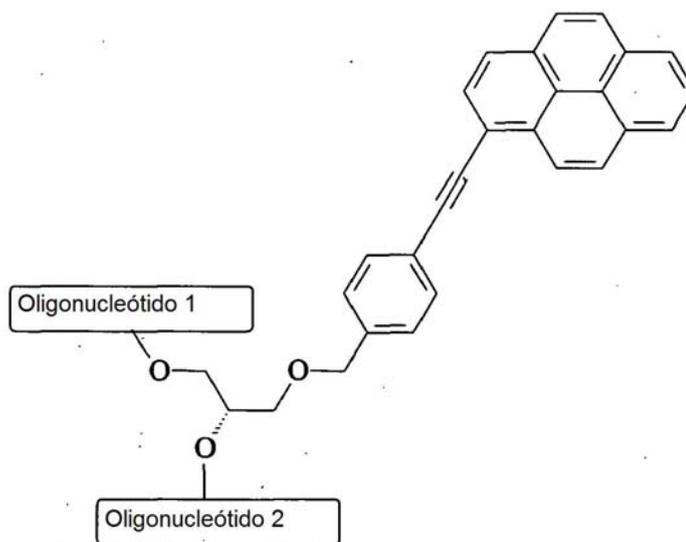
fórmula 7

Un oligonucleótido intercalante según la opción 15, en el que el Conjugador 1 consiste en acetilenos repetitivos o acetileno o arilo.

- 10 Un oligonucleótido intercalante según la opción 16, en el que el arilo contiene heteroátomos.

Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con cualquiera de las opciones 11-17, en el que el etilenglicol sustituido es un estereoisómero puro (*R*) o (*S*).

Los oligonucleótidos intercalantes definidos en la fórmula 8, en donde el Oligonucleótido 1 y el Oligonucleótido 2 se definen de forma independiente uno del otro, como Oligo en la opción 1.



fórmula 8

Un oligonucleótido intercalante de acuerdo con las opciones 1-19, en el que el Oligonucleótido 1 y el Oligonucleótido 2 son oligodesoxinucleótidos u oligorribonucleótidos de cadena sencilla ricos en pirimidina.

5 El Conjugador 1 y/o el Conjugador 2 en el oligonucleótido intercalante de acuerdo con las opciones 1-20 se ensamblan mediante síntesis postsintética de un oligonucleótido que posee solo una parte del sistema conjugado final (oligonucleótido intercalante precursor), por ejemplo, mediante una reacción de acoplamiento de Sonogashira (reacción entre arilos que tienen acetilenos terminales y halógeno-arilo en presencia de catalizador de Pd y/o CuI) o mediante una reacción de Glazer (reacción entre arilos que poseen acetilenos terminales en presencia de iones de cobre) o mediante la técnica de "química click" (reacción entre azidas orgánicas y moléculas orgánicas que poseen acetilenos terminales en presencia de iones de cobre).

10 La síntesis de acuerdo con la opción 21 se realiza sobre el oligonucleótido intercalante precursor que posee un grupo protector lábil ácido y/o básico.

La síntesis de acuerdo con la opción 21 se puede realizar sobre el oligonucleótido intercalante precursor sin protección.

15 El oligonucleótido intercalante precursor de acuerdo con las opciones 22 y 23 está fijado al soporte sólido.

Un método de acuerdo con la opción 24, en el que el soporte sólido es una superficie activada.

Un método de acuerdo con la opción 24, en el que el soporte sólido se selecciona entre el grupo que consiste en perlas magnéticas, perlas de agarosa, perlas de sefarosa, vidrio, superficies de plástico, metales pesados y superficies de chips.

20 El oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20 se obtiene mediante síntesis de oligonucleótidos por etapas usando el monómero del Enlazador conectado al sistema conjugado final o a una parte del sistema conjugado final. El Enlazador posee al menos dos grupos reactivos, dichos grupos reactivos pueden reaccionar opcionalmente con la cadena en crecimiento de un oligonucleótido o de un análogo de oligonucleótido. Dicho monómero es capaz de reaccionar con una cadena en crecimiento de un nucleótido unido a un soporte, un oligonucleótido, un análogo de nucleótido o un análogo de oligonucleótido y opcionalmente alargar adicionalmente dicho oligonucleótido u análogo de oligonucleótido mediante la adición de uno o varios nucleótidos, análogos de nucleótidos al análogo de oligonucleótido en una secuencia deseada; y escindir dicho oligonucleótido o análogo de oligonucleótido de dicho soporte sólido; y escindir los grupos protectores lábiles básicos/ácidos, obteniendo de este modo el oligonucleótido intercalante.

25 El oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20 es capaz de formar una triple hélice de Hoogsteen o de Hoogsteen inverso con una de las cadenas de la doble hélice, siendo la doble hélice ADN bicatenario, ARN bicatenario o híbridos de los mismos. Las partes Oligo del oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20 son capaces de formar una doble hélice de Hoogsteen, una doble hélice de Hoogsteen inverso o una doble hélice de Watson-Crick con una de las cadenas sencillas, siendo la cadena sencilla ADN, ARN o híbridos de los mismos.

30 Las triples hélices de Hoogsteen y las dobles hélices de Hoogsteen muestran estabilidades térmicas mayores, cuando el monómero que comprende R₁, Conjugador 1, y R₂ y, eventualmente, Conjugador 2 y R₃ de acuerdo con las opciones 1 a 20, forma una protuberancia.

35 Los oligonucleótidos intercalantes de las opciones 1-20 se conjugan con agentes que reaccionan con ADN. Los

agentes que reaccionan con ADN son agentes mutagénicos capaces de dirigir la mutagénesis, o son agentes de re-
 ticulación fotoinducibles, o son agentes radiactivos, o son grupos alquilantes, o son moléculas que pueden reclutar
 enzimas celulares que dañan el ADN.

5 Una composición farmacéutica adecuada para uso en la terapia antisentido y la terapia antigénica, cuya composición
 contiene oligonucleótidos intercalantes de las opciones 1-20.

Un método para el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por la presencia de oligonucleótidos de do-
 ble hélice no deseados, cuyo método comprende administrar a un sujeto que requiera tal tratamiento una cantidad
 eficaz del oligonucleótido de las opciones 1-20 o una composición farmacéutica de los mismos.

10 Un método para llevar a cabo una ligación quimioselectiva utilizando los oligonucleótidos intercalantes de las opcio-
 nes 1-20, conjugados con grupos que reaccionan con ADN sobre un molde que comprende ADN, ARN o híbridos de
 los mismos. Los grupos que reaccionan con ADN son grupos químicos capaces de reaccionar con otros grupos quí-
 micos en condiciones apropiadas.

Un método según la opción 33 en el que la ligación quimioselectiva es bioortogonal.

15 Un método según la opción 34, en el que uno de los grupos que reaccionan con ADN es azida o acetileno o fosfano
 terminal.

El oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20 se puede utilizar para la purificación de plásmidos de ADN (ADN
 bicatenario).

El oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20 puede inhibir la transcripción.

20 El oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20 se puede utilizar para la Hibridación Fluorescente In Situ (FISH)
 y análogos de este método, por ejemplo, Hibridación Fluorescente In Situ multiplex (multicolor) (M-FISH), FISH con-
 vencional, COMBO-FISH, etc.

El oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20 se puede utilizar para la reparación de genes.

25 El oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20 se puede utilizar en una nanomáquina de ácidos nucleicos ba-
 sada en una transición de doble hélice a triple hélice, en donde los ácidos nucleicos se definen como el Oligo en la
 opción 1.

El oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20 se puede utilizar en una nanomáquina de ácidos nucleicos que
 se basa en una transición de doble hélice paralela a doble hélice antiparalela, en donde los ácidos nucleicos se defi-
 nen como el Oligo en la opción 1.

30 El oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20, en el que las propiedades fluorescentes se alteran tras la hibri-
 dación con un ADN, ARN correspondiente y análogos de los mismos,.

Un sistema en el que el oligonucleótido intercalante de las opciones 1-20 está fijado al soporte sólido.

Un sistema de acuerdo con la opción 43, en el que el soporte sólido es una superficie activada.

35 Un sistema de acuerdo con la opción 43, en el que el soporte sólido es uno seleccionado entre el grupo que consiste
 en perlas magnéticas, perlas de agarosa, perlas de sefarosa, vidrio, superficies de plástico, metales pesados y su-
 perficies de chips.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

Los gráficos de las primeras derivadas de la temperatura de fusión de la triple hélice registrada a 260 nm frente al
 aumento de la temperatura (1°C/min) en cacodilato de sodio 20 mM, NaCl 100 nM, MgCl₂ 10 nM, pH 7,2.

40 Figura 2-6

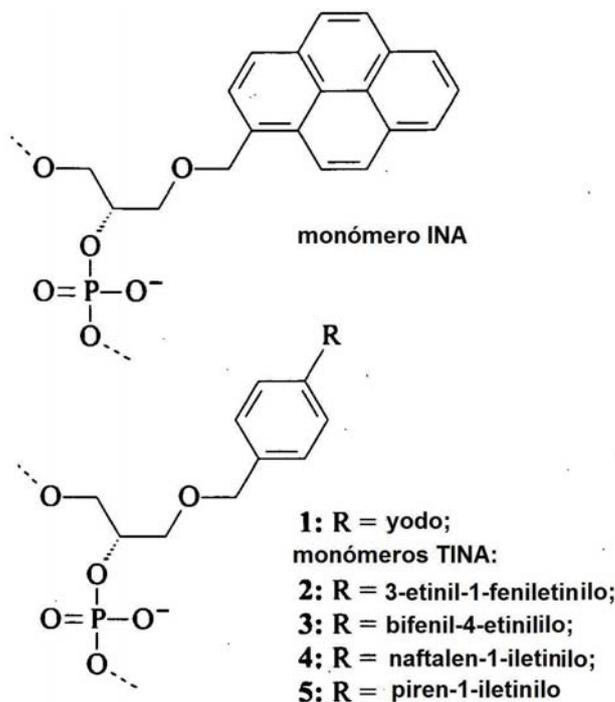
Espectros de la fluorescencia de hebras sencillas, dobles hélices antiparalelas y paralelas y triples hélices paralelas.
 Las condiciones de medición: 1 μM of cada hebra en un tampón a 10°C (cacodilato de sodio 20 mM, NaCl 100 mM,
 MgCl₂ 10 mM, pH 6,0), excitación: 373 nm (hendidura de excitación 4,0 nm), emisión: 380-600 nm (hendidura de
 45 emisión 2,5 nm para A, B, E, y 0,0 nm para C y D). ON6 y ON12 se utilizaron como referencias en los espectros re-
 gistrados en diferentes condiciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Recientemente, nos hemos referido a la síntesis y a las propiedades de varios ácidos nucleicos intercalantes diseñados para dobles hélices de tipo Watson-Crick (Esquema 1).^[9] Inserciones protuberantes de (*R*)-1-*O*-(1-pirenilmetil)glicerol en el centro de los oligodesoxinucleótidos (INA[®]) dieron como resultado afinidades significativamente incrementadas hacia ADNmc complementario, mientras que dobles hélices de INA/ARN y triples hélices de tipo Hoogsteen se desestabilizaron.^[9a,e] Se tiene que mencionar que esta sensibilidad con falta de coincidencia en la formación de dobles hélices se mantuvo después de las inserciones protuberantes de agentes intercalantes en los oligodesoxinucleótidos.^[9b] La única combinación de enlazador flexible, corto de glicerol que distorsionaba la estructura principal de fosfato y el agente intercalante adecuado que estabilizaba la doble hélice de INA/ADN mediante desolvatación y mediante apilamiento de bases nucleotídicas, condujo a una molécula valiosa que se utiliza ahora en la biología química de ácidos nucleicos.

Decidimos explorar este tipo de agentes intercalantes para el diseño de TFO. Con el fin de mejorar la estabilidad del TFO usando un enlazador corto y flexible, la estructura aromática de los agentes intercalantes debería ser lo suficientemente larga para colocar un agente intercalante en la parte de ADNbc de la triple hélice. Por lo tanto (*R*)-1-*O*-(4-poliaril-fenil)metilglicerol podría ser una buena opción, ya que el fenilo también podría imitar una base nucleotídica en la parte del TFO de triple hélice. El agente intercalante poliarilo también se puede fijar a este fenilo a través de un puente de acetileno que proporciona la rigidez estructural necesaria y la flexibilidad de torsión y todavía seguiría manteniendo unidas las estructuras aromáticas. El propio enlace de acetileno se cree que mejora las propiedades intercalantes. De acuerdo con la formación del modelo molecular de (*R*)-1-*O*-[4-(1-pireniletinil)-fenilmetil]glicerol con MacroModel 8.0, existe una torsión de los residuos 1-pirenilo y fenilo alrededor del triple enlace con un ángulo de torsión de 15,3°. Se cree que esta capacidad de torsión puede ayudar al agente intercalante a ajustarse en una posición apropiada dentro del ADNbc. Por lo tanto, nos referimos a este tipo de ácidos nucleicos como ácidos nucleicos intercalantes con torsión (TINA, Esquema 1). Aquí nos referimos a la derivatización postsintética en columna de tipo Sonogashira de oligodesoxinucleótidos que conduce a diferentes TINAs, en los que se constató que tenían afinidades extraordinariamente altas en dobles hélices y triples hélices de tipo Hoogsteen. También se presentan estudios de la estabilidad térmica y la fluorescencia de hélices de ácidos nucleicos con inserción de TINA como una protuberancia formada de acuerdo con cualquiera de los modos de unión de Watson-Crick o de Hoogsteen.

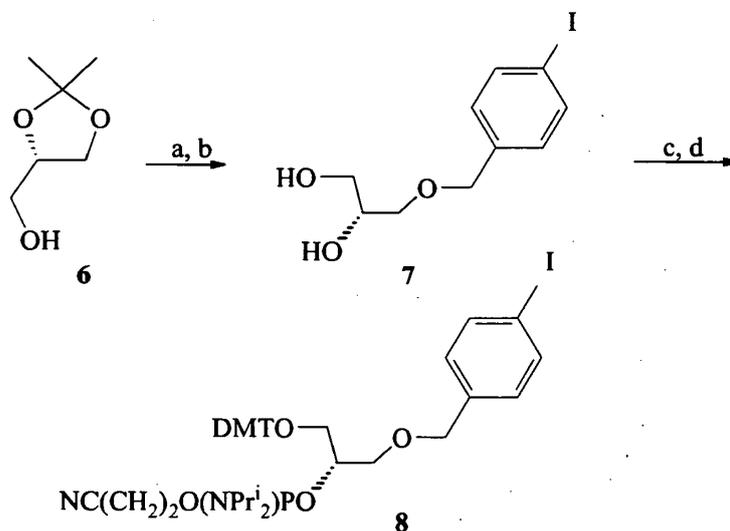


Esquema 1 Estructuras químicas de monómeros de ácido nucleico intercalante (INA) y de ácido nucleico intercalante con torsión (TINA)

La modificación *postsintética* del oligonucleótido es una alternativa mejor a la preparación rutinaria y lenta de varios seudonucleósidos fosforamiditas, que son necesarios para la selección del candidato adecuado para TINA. Ha habido varios informes dedicados a la modificación catalizada con paladio(O) de oligonucleótidos durante la síntesis en fase sólida. Se observó que las condiciones de acoplamiento de Sonogashira eran compatibles con la síntesis de ADN y no se observaron reacciones colaterales en bases nucleotídicas que poseían grupos protectores. De acuerdo con los protocolos conocidos, la síntesis de ADN se detiene después de la incorporación de 5'-*O*-DMT-2'-desoxi-5-yodouridina en el extremo 5' de la secuencia, seguida de tratamiento del soporte de oligonucleótido en condiciones de

Sonogashira. A continuación, la síntesis de oligonucleótidos continúa hasta el final. Sin embargo, no todos los grupos funcionales podrían resistir después de inserciones durante la síntesis continuada de oligonucleótidos. Existe el riesgo de que la eficacia del acoplamiento de los fosoramidatos convencionales disminuya después de una derivatización en columna, lo que también hemos observado en nuestros experimentos descritos a continuación. A pesar del hecho de que algunos acoplamientos organometálicos se aplicaron para una modificación postsintética del oligonucleótido, las reacciones de tipo Sonogashira postsintéticas en el nucleósido convertible 2'-desoxi-5-yodouridina situado en el centro de la secuencia, no tuvieron éxito. En su lugar, nos arriesgamos a utilizar (*R*)-1-*O*-(4-yodobencil)glicerol en reacciones de tipo Sonogashira después de su incorporación en el centro de los oligos. Se empleó una variedad de estructuras aromáticas con triple enlace terminal (2-5) en este contexto (Esquema 1).

La fosoramidita 8 requerida se sintetizó en cuatro etapas desde bromuro de 4-yodobencilo y (*S*)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol con 47% de rendimiento global (Esquema 2, véase la información complementaria para los detalles experimentales). La eficacia del acoplamiento del compuesto 8 durante la síntesis de ADN a escala 0,2 μ mol, usando unas condiciones de acoplamiento de nucleótidos convencionales (acoplamiento 2 min, 4,5-dicianoimidazol como activador) y un incremento del tiempo de desprotección (100 s), se estimó en más del 99%. Después de la síntesis de ADN, los soportes de CPG con DMT en oligonucleótidos que poseían restos 4-yodofenilo, se trataron con una mezcla de reactivos de acoplamiento de Sonogashira que contenía Pd(PPh₃)₄ o Pd(PPh₃)₂Cl₂ (7,5 mM), una estructura aromática que poseía un acetileno terminal (22,5 mM), y CuI (7,5 mM) en DMF/Et₃N seco (3,5/1,5, 500 μ L) en jeringas de 1 mL en condiciones secas a temperatura ambiente. Era importante lavar los soportes y las jeringas con argón en lugar de nitrógeno antes de la reacción de acoplamiento, con el fin de evitar una dimerización oxidativa de Glazer. La conversión era mejor cuando la mezcla de reacción de Sonogashira se preparaba directamente en la jeringa de plástico para cada oligo individual, en lugar de preparar la mezcla de reacción de Sonogashira a granel para varias reacciones de acoplamiento. Después de la reacción de acoplamiento (3-4 h), los CPGs se lavaron con DMF (2x0,5 mL) y CH₃CN (2x1 mL), y se secaron. A continuación, los oligonucleótidos se escindieron separándolos del soporte de CPG con 32% de NH₄OH (2 h), y se desprotegeron a 55°C (durante una noche). Debido a la diferente capacidad lipófila, el oligómero sin reaccionar y el TINA diana fueron separados mediante HPLC semipreparativa en una columna C₁₈. En el caso de picos solapantes (estructura 2) se aplicó un programa de HPLC más largo (véase la información complementaria). Después de la primera separación, los oligonucleótidos con DMT se trataron con 10% de AcOH, se purificaron de nuevo en HPLC y se precipitaron en etanol. Se encontró que los TFOs finales tenían una pureza superior al 90% para los oligodesoxinucleótidos que contenían pirimidina pura y de 85-88% para los oligodesoxinucleótidos con purinas, tal y como se determinó mediante HPLC de intercambio iónico. La composición se verificó mediante MALDI-TOF.



Esquema 2. Síntesis de la fosoramidita 8. Reactivos y condiciones: (a) bromuro de 4-yodobencilo, KOH, tolueno; (b) 80% de CF₃COOH ac., ta, 100% en dos etapas; (c) DMTCl, piridina, ta, 70%; (d) NC(CH₂)₂OP(NPr₂)₂, tetrazolida de diisopropilamonio, CH₂Cl₂, 0°C hasta ta, una noche, 67%.

La conversión durante el acoplamiento de Sonogashira dependía de la reactividad de los acetilenos y de la secuencia del oligo. Tal y como se puede determinar a partir de una variedad de experimentos con 1-etinilpireno, un tratamiento más con la mezcla de reacción de nuevo aporte era más eficaz que un tiempo de reacción prolongado (4-16 h). Se formó una menor cantidad de productos residuales de Glazer poco solubles y se observó mejor una mejor derivatización del oligo con Pd(PPh₃)₄ que con Pd(PPh₃)₂Cl₂ como catalizador en el caso de 1-etinilpireno. La presencia de purinas en la secuencia daba como resultado una menor conversión (50-60%) en el TINA diana, incluso después de un tratamiento doble del soporte con el oligonucleótido mediante la mezcla de reactivos para acoplamiento de Sonogashira que contenía 1-etinilpireno, en comparación con las secuencias de homopirimidina (80-85%) después de un solo tratamiento. Esto también parece ser cierto para otros acetilenos aromáticos, debido a que en una

secuencia que contiene purina no se obtuvieron oligonucleótidos diana usando 4-etinilbifenilo, considerado el compuesto menos reactivo entre los acetilenos sometidos a ensayo. En la síntesis de ON14 hemos observado que el tratamiento de un oligonucleótido completo con una mezcla de reacción de Sonogashira con 1-etinilpireno dio lugar a un oligómero más puro que la interrupción de la síntesis de ADN después de la segunda inserción del compuesto 8, seguida por la reacción de Sonogashira y la síntesis de ADN continuada. En el último caso, oligómeros cortos que poseían pirenos contaminaron el TINA final tal como se determinó mediante HPLC de intercambio iónico.

Muy recientemente se ha informado sobre una reacción de acoplamiento de Sonogashira exenta de cobre, con PdCl₂ en agua, en presencia de pirrolidina. La compatibilidad con el agua, las condiciones aerobias y trazas de productos de homoacoplamiento son las grandes ventajas de este método. Aplicamos unas condiciones análogas sobre ON2 totalmente desprotegido. Sin embargo, después del tratamiento de ON2 con 1-etinilnaftaleno y PdCl₂ en agua/pirrolidina (1:1) a 50°C o 20°C durante una noche, no se observó ningún rastro de los ácidos nucleicos deseados después de la purificación mediante HPLC.

La estabilidad térmica de las triples hélices y las dobles hélices de ADN/ADN y ADN/ARN con los oligonucleótidos sintetizados se evaluó por medio de experimentos de desnaturalización térmica. Las temperaturas de fusión (T_m , °C) determinadas como la primera derivada de curvas de fusión, se enumeran en las Tablas 1-4. Las secuencias que poseían diferentes TINAs se estudiaron en apareamiento de bases de tipo Hoogsteen dependiente del pH, tanto en triple hélice paralela frente a la doble hélice D1 como en ADNbc paralelo frente a ON15 (Tabla 1). Las mismas secuencias (ON1-14) fueron utilizadas para las dobles hélices antiparalelas de Watson-Crick de ADN/ADN frente a ON16. Para el último tipo de dobles hélices también se utilizaron secuencias mixtas de pirimidina/purina similares a las descritas anteriormente para INA, para oligonucleótidos TINA para la hibridación con ADNmc y ARNmc (Tabla 4).

Como puede desprenderse de los datos de T_m en la Tabla 1, se observó una considerable desestabilización de la triple hélice y la doble hélice de tipo Hoogsteen en ON2 con (*R*)-1-*O*-(4-yodofenilmetil)glicerol como una protuberancia en el centro de la secuencia, en comparación con los complejos de tipo silvestre a pH 6,0 (ON1 frente a D1 y ON15). La sustitución del yodo con sustituyentes de arilo proporcionó triples hélices más estables (ON3-ON6 frente a D1, pH 6,0). El valor más elevado de T_m 46,0°C se observó para el sustituyente 1-pireniletinilo a pH 6,0, el cual se corresponde a $\Delta T_m = 19,0^\circ\text{C}$ en comparación con la triple hélice de tipo silvestre. Incluso a un pH de 7,2, una sola incorporación de 5 dio lugar a una estabilización considerable de la triple hélice (ON6/D1), a pesar de un alto contenido en citosina (36%). A este pH no se pudo detectar ninguna hibridación en la triple hélice de tipo silvestre (Figura 1). Para las dobles hélices paralelas a pH 6,0, la estabilización de 3,0°C y 14,5°C por modificación se detectó para 1-naftaleniletinilo (ON5) y 1-pireniletinilo (ON6), respectivamente. Como era de esperar, a menor pH (pH = 5,0) se encontraron dobles hélices paralelas más estables, debido a la protonación de la citosina. Se podría concluir que la fijación de las estructuras aromáticas en la posición 4 del anillo de fenilo en (*R*)-1-*O*-(fenilmetil)glicerol dio como resultado el aumento de la afinidad de hibridación en hélices de tipo Hoogsteen. Curiosamente, los anillos de naftaleno y pireno proporcionaron una estabilización considerablemente mejor que 4-bifenilo y benceno. Esto apoya la idea de que las estructuras aromáticas con una gran superficie, tales como pireno, se prefieren para la fijación a (*R*)-1-*O*-(4-fenilmetil sustituido)glicerol antes que pequeñas estructuras aromáticas para lograr una buena unión en hélices de tipo Hoogsteen.

Se observó una desestabilización del ADNbc antiparalelo en todos los oligodesoxinucleótidos modificados estudiados, excepto cuando el agente intercalante 5 se colocaba en el extremo 5' (ON10/ON16) en comparación con el ADNbc de tipo silvestre (ON1/ON16, Tabla 1). El efecto estabilizador en este último caso puede atribuirse al apilamiento de un sistema policíclico aromático sobre la base nucleotídica adyacente (el efecto tapadera), mientras que el efecto del enlazador acíclico es marginal. La afinidad de la hibridación también era dependiente de la estructura de TINA. Las dobles hélices menos desestabilizadas se formaron con 4 y 5, mientras que la desestabilización del ADNbc era mayor para las estructuras 1-3 incorporadas como una protuberancia en el centro de la secuencia. Ya en este estadio, se puede concluir que TINA incorporado como una protuberancia en las hélices mejora la estabilidad de las hélices de tipo Hoogsteen y no las dobles hélices de tipo Watson-Crick. Así, una sola inserción de (*R*)-1-*O*-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerol como una protuberancia en una triple hélice paralela menos estable (ON6/D1) a pH 6,0, estabiliza la triple hélice hasta el nivel de una doble hélice de Watson-Crick (ON6/ON16) con el mismo contenido en nucleótidos. La estabilidad térmica de los diferentes TINAs, nos llevó a investigar más de cerca las propiedades del TINA que contiene 1-pireniletinilo.

Alguna fluctuación en la estabilidad térmica de las triples hélices y dobles hélices de Hoogsteen fue observada al colocar 1-pireniletinilo en diferentes posiciones en el TFO. Cuando la citosina estaba próxima de los lados 5' o 3' (ON7-ON9), tanto la triple hélice paralela como la doble hélice paralela estaban menos estabilizadas que cuando 5 se colocaba entre dos timidinas a pH 6,0 (ON6). Esto podría ser un resultado de la interacción de la estructura aromática con el par C⁺-G cargado positivamente. Curiosamente, a pH 7,2, cuando la citosina no estaba protonada, se detectó la menor afinidad de hibridación de la triple hélice hacia TFO con 5 en el extremo fluctuante 5' (ON10) entre los TFOs sometidos a ensayo con una sola inserción de 1-pireniletinilo (ON6-ON10). Fue una sorpresa que el efecto tapadera estuviera ausente en este caso. Esto podría ser una consecuencia de una estabilidad generalmente menor en regiones ricas en C de TFO con el ADNbc diana en condiciones fisiológicas. Sin embargo, una observación importante es que una afinidad en la hibridación eficaz se puede lograr colocando 5 en el centro de la región rica en C (ON9) en medios neutros. Se puede especular si la intercalación hará que la protonación sea más probable en la estructura de triple hélice a pH fisiológico porque el agente intercalante está separando dos estructuras triples con car-

ga positiva.

La dependencia de la distancia entre varias inserciones protuberantes del agente intercalante pireno 5, sobre la estabilidad térmica se investigó usando ON11-ON14 (Tabla 1). En caso de transiciones solapantes de triple hélice y doble hélice, los experimentos de fusión se realizaron a 373 nm. Sin embargo, a veces se observaron transiciones no muy bien definidas a 373 nm. En estos casos las temperaturas de fusión supuestas a pH 6,0 de las triples hélices a temperaturas próximas a las de las dobles hélices, se basaron en la comparación con fusiones a pH 7,2 que se midieron a 260 nm. Cuando el agente intercalante 5 se insertó como el vecino más próximo (ON12), la triple hélice y la doble hélice de Hoogsteen se estabilizaron en comparación con ON1 no modificado a pH 6,0. Sin embargo, las estabilidades en ambos casos eran menores que con la inserción aislada de 5 (ON6) y no se observó la formación de triple hélice a pH 7,2. Esto podría ser debido a la gran interrupción de las hélices dobles y triples por dos enlazadores de (*R*)-1-*O*-metilglicerol protuberantes, situados muy cerca uno del otro. Cuando las dos inserciones de 5 estaban separadas por dos o tres bases nucleotídicas (ON13 y ON14, respectivamente), los complejos con D1 y ON15 eran más estables que los que tenían inserciones únicas. A pH 7,2 la T_m de las triples hélices era incluso superior a la temperatura fisiológica de 37°C (véase ON14/D1 en la Figura 1). Como las dobles inserciones de 5 en el centro, las inserciones dobles con una inserción en el extremo 5' de seis pares de bases entre las inserciones (ON11), estabilizaban considerablemente la doble hélice y la triple hélice de tipo Hoogsteen a pH 6,0. En contraposición a las hélices de Hoogsteen, dobles hélices antiparalelas con inserciones dobles de 5 (ON12-14/ON16) mostraban estabilidades disminuidas en comparación con la doble hélice de tipo silvestre ON1/ON16, especialmente cuando una o tres bases nucleotídicas estaban entre las dos inserciones. Al comparar las estabilidades térmicas de dobles hélices paralelas y antiparalelas con inserciones dobles de 5 a pH 5,0, las dobles hélices de Hoogsteen ON11/ON15 y ON14/ON15 eran aún más estables que las dobles hélices correspondientes de Watson-Crick (ON11/ON16 y ON14/ON16). La estabilización de las triples hélices paralelas y las dobles hélices paralelas tras la adición de un agente intercalante fue descrita por primera vez para los derivados de benzopiridoindol (BPI). La reorganización de la doble hélice de ADN que no se aparea perfectamente de Watson-Crick en una doble hélice de ADN de Hoogsteen perfectamente apareada, se ha detectado cuando se añadió BPI a la solución acuosa de los oligodesoxinucleótidos. Un efecto similar está previsto en una doble hélice paralela completamente apareada con inserciones de 5 en los oligodesoxinucleótidos.

La extraordinaria estabilización de las triples hélices paralelas se observó a pH 5,0. El alto contenido en citosinas en el TFO desplazó la temperatura de fusión de la triple hélice no modificada ($T_m = 55,0^\circ\text{C}$) a cerca de la temperatura de fusión de la doble hélice. Sin embargo, este valor era todavía inferior al de la temperatura de fusión de la doble hélice a pH 5,0 ($T_{m(D1)} = 56,5^\circ\text{C}$). Una inserción protuberante aislada de un derivado 4 de 1-naftaleniletinilo en el TFO, aumentaba ligeramente la estabilidad de la triple hélice ($\Delta T_{m(ON5/D1-ON1/D1)} = 2,0^\circ\text{C}$). Sin embargo, la inserción protuberante de 5 en todos los casos causó la disociación de todo el complejo a temperaturas que eran más elevadas que la T_m del ADNbc (D1). El estado de transición evidente de ON11 se observó a 373 nm a la misma temperatura que a 260 nm, lo que confirma que la triple hélice y la doble hélice se fusionan entre sí. Se observó la misma dependencia de la estabilidad térmica para la doble inserción de 5 en TFO a pH 6,0 que fue observada a pH 5,0. Por lo tanto, la doble inserción de 5 como vecinos más próximos (ON12) y las inserciones de 5 en el centro y en el extremo 5' (ON11) eran las triples hélices menos y más estabilizadas, respectivamente. A pH 5,0, la triple hélice ON14/D1 era más estable a 16,5°C y 20,5°C que las dobles hélices paralelas y antiparalelas correspondientes, respectivamente. Es importante destacar que, incluso a pH 7,2, el oligonucleótido ON14 forma una triple hélice de tipo Hoogsteen más estable ($T_m = 43,0^\circ\text{C}$, ON14/D1) que el ADNbc correspondiente de Watson Crick ($T_m = 38,0^\circ\text{C}$, ON14/ON16). A pH 7,2 la temperatura de fusión de la doble hélice paralela (ON14/ON15) se supone que es menor que 38,0°C observada a pH 6,0, ya que esta doble hélice es sensible al pH. Estos datos muestran claramente la capacidad de los oligonucleótidos con múltiples inserciones de 5 en el centro de la secuencia separadas por tres bases, para discriminar bien entre ADNbc y ADNmc.

La sensibilidad frente a desapareamientos se estudió en triples hélices y dobles hélices paralelas con una inserción protuberante de 5 en el centro y en el extremo 5' de la secuencia (Tabla 2). En caso de triples hélices, la sensibilidad frente al desapareamiento era dependiente del sitio de inserción del agente intercalante. El menor valor de $\Delta T_m = 11,5^\circ\text{C}$ entre triples hélices apareadas y mal apareadas se detectó cuando la adenina fue sustituida por guanina en la cadena de purina en el sitio 3' del agente intercalante (ON6/D3 y ON11/D3, Tabla 2). En todos los demás casos, la caída de la T_m estaba en un intervalo de 14,0 a 22,0°C. Las dobles hélices desapareadas paralelas con una sola inserción de 5 estaban desestabilizadas en el intervalo de 8,0 a 13,0°C, que estaba en el mismo intervalo que las dobles hélices paralelas de tipo silvestre desapareadas. En comparación, la doble hélice sin modificar menos sensible a desempareamientos mostraba una ΔT_m de 9°C a pH 6,0 ($\Delta T_{m(ON1/ON15)} - T_{m(ON1/ON18)}$).

Estudiamos las características luminiscentes del TFO que poseía (*R*)-1-*O*-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerol (5), que era el TINA más eficaz para formar triples hélices y para discriminar desapareamientos de la doble hélice. La introducción de 5 en oligonucleótidos dio como resultado un espectro de fluorescencia monómera característico, con máximos a 400 y 421 nm después de una excitación a 373 nm (Figura 2, curva negra), que era similar a los datos publicados anteriormente para 4-[4-(1-pireniletinil)fenil]-1,3-butanodiol insertado en el ADN.^[18] En todos los casos se detectó un desplazamiento de 4 nm de la fluorescencia monómera después de la formación de dobles hélices o triples hélices. La formación de la triple hélice que se apareaba totalmente llevó a un aumento de aproximadamente 1,5 veces de la fluorescencia monómera (Figura 2, ON6/D1) en comparación con ON6 de cadena sencilla. Para las triples hélices que no estaban perfectamente apareadas, la intensidad de la fluorescencia dependía de la secuencia

del ADNbc. Así se detectó casi un aumento doble en un sitio de inversión TA (ON6/D2), en comparación con ON6. Por el contrario, cuando una base de citosina o guanina se desapareaba en el ADNbc con el TFO cerca de la inserción de 5 (D3 y D4), se observaba una disminución de la fluorescencia monómera en comparación con la triple hélice perfectamente apareada (Figura 2). Especialmente la guanina proporcionó un gran efecto con una intensidad fluorescente dos veces menor en la triple hélice desapareada ON6/D3.

Curiosamente, se detectó un aumento considerable en la fluorescencia monómera después de la formación de la doble hélice antiparalela (ON6/ON16, Figura 4), mientras que la formación de la doble hélice paralela (ON6/ON15) dio lugar solo a un ligero aumento de la fluorescencia, en comparación con la fluorescencia de la cadena sencilla (Figura 4). Cuando un segundo residuo de 4-(1-pireniletil)fenilo aparecía como el vecino más próximo en ON12, la fluorescencia monómera de la cadena sencilla disminuía aproximadamente tres veces (Figura 4, comparación de ON6 y ON12), y una fluorescencia de excímero con un máximo a 500 nm y con una intensidad que era la mitad que la que se podría observar para la fluorescencia monómera (Figura 3). Se observó una disminución considerable de la fluorescencia monómera y una desaparición de la banda de excímero para el mismo oligo en una triple hélice apareada (Figura 3, ON12/D1). Esto significa que los restos pireno no podrían comunicarse entre sí después de la unión a ADNbc en el entorno de la hélice triple. Del mismo modo, la banda de excímero desaparecía cuando ON12 formaba un ADNbc de Hoogsteen apareado con ON15 (Figura 3). Por el contrario, se observó una intensidad de fluorescencia monómera muy elevada y un aumento de la fluorescencia de excímero para la doble hélice antiparalela (ON12/ON16) cuando se comparaba con las intensidades de la fluorescencia de ON12 de cadena sencilla (Figura 4). Esto indica que los dos pirenilos en la misma hebra tenían todavía un contacto íntimo entre sí, después de la formación del ADNbc de Watson-Crick, aunque esto no parece ser el caso en el ADNbc de tipo Hoogsteen. De esta manera las diferentes propiedades de TINA frente a las hélices de tipo Watson-Crick y Hoogsteen se reflejan por las propiedades de la fluorescencia y de la hibridación. Por otra parte, los datos de la fluorescencia de (R)-1-O-[4-(1-pireniletil)fenilmetil]glicerol (5), como vecino más próximo protuberante en una cadena rica en pirimidina, se pueden resumir de la siguiente manera: un ON12 monocatenario: fluorescencia monómera media a 400 y 421 nm y banda de excímero a 500 nm; triple hélice paralela de ON12/D1: fluorescencia monómera baja y ninguna banda de excímero; doble hélice paralela de ON12/ON15: fluorescencia monómera media y ninguna banda de excímero; doble hélice antiparalela de ON12/ON16: fluorescencia monómera elevada y banda de excímero.

La capacidad de la estructura 5 para afectar a la estabilidad de la triple hélice paralela después de ser incorporada en la parte de doble hélice de Watson-Crick de la triple hélice, se presenta en la Tabla 3. La triple hélice se estabilizó en todos los casos cuando 5 se insertó como una protuberancia en la cadena de pirimidina de la doble hélice (ON1, ON6 y ON9 frente a D5) en comparación con la triple hélice sin modificar (ON1/D1). Dos estados de transición ($T_m = 36,5^\circ\text{C}$ y $55,5^\circ\text{C}$) se detectaron para la triple hélice ON1/D1 en el experimento de desnaturalización térmica a 373 nm [$\lambda_{\text{máx}}$ de 5], que se correspondían a las temperaturas de fusión de la triple hélice y la doble hélice, respectivamente. La detección de las temperaturas de fusión por la absorbancia a 373 nm indicaba que el agente intercalante estaba implicado en la formación de la doble hélice y la triple hélice. La inserción de 5 como protuberancias en cadenas de pirimidina de Watson-Crick y Hoogsteen opuestas entre sí (ON6/D5), no cambió la temperatura de fusión de la triple hélice en comparación con una triple hélice con un agente intercalante solo en la parte de doble hélice de la triple hélice (ON1/D5). Cuando dos restos pireno 5, uno en cada una de las hebras de pirimidina, se colocaron como protuberancias separadas por tres pares de bases (ON9/D5), la temperatura de fusión de la triple hélice era muy próxima al estado de transición de la doble hélice, lo que también se había observado anteriormente para la incorporación doble de 5 en TFO. Unas estabilidades disminuidas de la triple hélice y la doble hélice paralela comparadas con los complejos sin modificar, se observaron cuando se insertó el compuesto 5 en la cadena de purina como una protuberancia (ON1 frente a D6 y frente a ON21).

También estudiamos la afinidad de la hibridación de TINA que poseía 5 frente a secuencias mixtas de purina/pirimidina de ADNmc y ARNmc en dobles hélices de tipo Watson y Crick (Tabla 4) utilizando la misma secuencia y condiciones que se habían descrito para INA. Se observó una desestabilización considerable de TINA/ADN (ΔT_m en el intervalo de $-8,0^\circ\text{C}$ a $-15,5^\circ\text{C}$) y TINA/ARN ($\Delta T_m = -10,0^\circ\text{C}$) para 5 como una protuberancia en el centro de la secuencia, cuando se comparó con las dobles hélices de tipo silvestre. La inserción del segundo agente intercalante 5 como vecino más próximo en el ADN (ON24) produjo una mayor desestabilización de la doble hélice (ON24/ON25 y ON24/ON27). La incorporación de 5 opuestos entre sí en dos hebras mixtas complementarias de purina-pirimidina, como el complejo ON23/ON26, dio como resultado un valor de T_m de $36,0^\circ\text{C}$, que estaba en el mismo nivel de magnitud que las dobles hélices TINA/ADN (ON23/ON25 y ON22/ON26). Sin embargo, cuando INA se insertó en las mismas posiciones en dobles hélices INA/INA, eran menos estables ($T_m = 43,6^\circ\text{C}$) que INA/ADN ($T_m = 51,5^\circ\text{C}$).

Las propiedades fluorescentes de complejos con el resto 4-(1-pireniletil)fenilo en el ADNbc de Watson-Crick como una doble hélice aislada y como parte de la triple hélice, se muestran en las Figuras 4-6. La fluorescencia monómera se incrementó considerablemente cuando 5 se insertó en la cadena de purina (ON21mc) en comparación con la inserción en la cadena de pirimidina (ON6mc, Figura 5). Una intensidad de la fluorescencia ligeramente disminuida se observó al ensamblar las triples hélices y las dobles hélices con ADN sin modificar y ON21mc (datos no mostrados). Fue un descubrimiento sorprendente que la fuerte sensibilidad de la fluorescencia monómera de los restos 4-(1-pireniletil)fenilo en las secuencias de homopirimidina después de la formación de dobles hélices antiparalelas, desaparecía por completo en las secuencias mixtas (ON23/ON25, ON23/ON27 Figura 6). Esto difiere también de resultados previos notificados para inserciones protuberantes de (R)-1-O-(1-pirenilmetil)glicerol utilizando las mismas secuencias.

Cuando dos agentes intercalantes de pirenilo 5 estaban separados por un par de bases, una banda de excímero observada para el ON24mc (Figura 6), no desaparecía después de la formación de la doble hélice antiparalela (ON24/ON25 y ON24/ON27 Figura 6). Esta observación es opuesta a las observaciones anteriores para la triple hélice paralela y la doble hélice paralela con TINA y también es contraria a los resultados previamente obtenidos para INA.^[9b] La presencia de la banda de excímero después de la formación de la doble hélice antiparalela en ambas cadenas de homopirimidina y mixtas de pirimidina/purina (ON12/ON16 y ON24/ON25, respectivamente) con 5 protuberantes como vecinos más próximos, indica que dos residuos pirenilo estaban situados muy próximos y se comunicaban entre sí y no estaban completamente embebidos en las interacciones de apilamiento con los pares de bases próximos de Watson-Crick. Esto también puede explicar la disminución de la estabilidad de la doble hélice antiparalela después de la incorporación de 5 como una protuberancia.

A continuación comprobamos si un enlace de excímero podría estar formado por dobles hélices y triples hélices si dos o tres colorantes se colocaban de forma opuesta entre sí, en cada una de sus cadenas complementarias. No se observó ninguna banda de excímero en la doble hélice paralela ON21/ON6 (Figura 5) o en las dobles hélices antiparalelas ON20/ON21 (Figura 5) y ON23/ON26 (Figura 6). Este resultado se correlaciona con el trabajo que muestra cuando 4-[4-(1-pireniletinil)fenil]-1,3-butanodiol se colocan uno frente al otro en las hebras complementarias de ADNbc antiparalelo con secuencias mixtas. Solo en la triple hélice con tres restos 4-(1-pireniletinil)fenilo colocados uno frente a otro en las tres cadenas, se detectó una banda débil de excímero a 500 nm (ON6/D7, Figura 5). La conclusión es que la comunicación de los restos 4-(1-pireniletinil)fenilo colocados en diferentes hebras de las dobles hélices paralelas y antiparalelas y la triple hélice paralela está impedida, lo que produce un deslizamiento de los agentes intercalantes junto con una formación de excímero, probablemente al contrario de lo que se encontró para INA. Por lo tanto, el deslizamiento de dos restos pireno de INA situados uno frente a otro en una doble hélice, se ha observado en una estructura de RMN, y esta estructura de doble hélice ha dado lugar a la formación de una banda de excímero a 480 nm en un espectro de fluorescencia en estado estacionario después de la excitación a 343 nm (datos no publicados).

Las diferencias en los espectros de fluorescencia y las propiedades de hibridación de los dos diferentes INA y TINA con ácidos nucleicos que intercalan pirenos en dobles hélices de tipo Watson-Crick ilustran claramente la consecuencia de añadir un resto 1-feniletinilo extra a la parte aromática de (R)-1-O-(1-pirenilmetil)glicerol (INA). En este trabajo hemos mostrado también que el significado común de poca afinidad del pireno hacia triples hélices no es una característica general porque hemos logrado colocar pireno adecuadamente en la triple hélice de tipo Hoogsteen. La capacidad de los agentes intercalantes para estabilizar estructuras de triple hélice paralelas influyendo poco sobre la estabilidad del ADNbc es conocida. Por lo tanto la adición de 2-(2-naftil)quinolin-4-amina y análogos de la misma conduce a una estabilización considerable del ADN de triple hélice [$\Delta T_m = 35,6^\circ\text{C}$ para 2-(2-naftil)quinolin-4-amina] con solo un pequeño aumento de la afinidad de la hibridación del ADN de doble hélice ($\Delta T_m = 5,5^\circ\text{C}$). Un trabajo similar informó de la síntesis y las propiedades de hibridación de oligodesoxinucleótidos con perileno acoplado ya sea directamente o a través de un enlazador propilo a la posición anomérica de un residuo 2'-desoxirribosa. Una de las ventajas de TINA con restos policíclicos sobre los agentes intercalantes específicos de triple hélice monómeros es que TINA se puede insertar varias veces en posiciones deseadas de la secuencia, en lugar de utilizar un exceso del agente intercalante en la solución. Por otra parte, la elevada estabilización de la triple hélice y la doble hélice paralela junto con la desestabilización de las dobles hélices antiparalelas, tal y como se ha descrito en esta memoria para TINA, no se han observado nunca hasta ahora en otros sistemas intercalantes fijados covalentemente a los oligodesoxinucleótidos. En este contexto, TINA cuando se incorpora como inserciones múltiples protuberantes en oligodesoxinucleótidos, es una molécula única con la capacidad de discriminar ADNbc de ADNmc. Esta característica se observa claramente en ON13 y ON14 cuando se comparan sus estabilidades de triple hélice y de doble hélice antiparalela a pH 6,0 y pH 5,0 (Tabla 1). Esto da vía libre a la posibilidad de reducir el número de falsos positivos procedentes de la formación de dobles hélices cuando se va a detectar la formación de triples hélices paralelas. Esto podría ser, por ejemplo, el caso para la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de genomas en condiciones no desnaturalizantes y para la purificación de ADN plasmídico utilizando cromatografía de afinidad de triple hélice o precipitación por afinidad de triple hélice, las cuales se pueden realizar a pH 6,0 o pH 5,0. Este tipo de discriminación de la formación de triple hélice paralela sobre la formación de doble hélice no se puede lograr con oligos que forman triples hélices, tales como PNA, LNA o fosforamidatos N3'→P5' que también son conocidos por estabilizar dobles hélices antiparalelas.

Usando la modificación postsintética de tipo Sonogashira de oligonucleótidos que poseen (R)-1-O-(4-yodofenil)metilglicerol hemos escrutado varios ácidos nucleicos intercalantes con torsión (TINA) para estudiar su capacidad para aumentar la estabilidad térmica de dobles hélices y triples hélices apareadas de Hoogsteen. La inserción de (R)-1-O-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerol (5) como una protuberancia en oligodesoxinucleótidos se encontró que era el TINA más eficaz con buenas propiedades discriminatorias entre secuencias apareadas y desapareadas. Las dobles hélices de ADN/ADN y ADN/ARN de tipo Watson-Crick se desestabilizaban después de la inserción de TINA en el centro de la secuencia, en comparación con dobles hélices naturales. Creemos que TINA es el primer sistema intercalante fijado covalentemente a oligodesoxinucleótidos como una protuberancia que muestra una afinidad incrementada hacia el apareamiento de bases de tipo Hoogsteen y una afinidad disminuida hacia hélices de tipo Watson-Crick. La ruta sintética corta de la fosforamidita 8 y la modificación postsintética de Sonogashira de oligonucleótidos, son ventajas competitivas de TINA con respecto a otros ácidos nucleicos que estabilizan la triple hélice. Del estudio de dobles inserciones de TINA (5) en una cadena se podría concluir que la colocación de tres bases nu-

cleotídicas entre dos (*R*)-1-*O*-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerolos protuberantes puede ser ideal para una estabilidad térmica elevada de las hélices de ADN de Hoogsteen. Por otra parte las diferentes propiedades luminiscentes (formación de banda de excímero) después de la inserción de 5 como vecino más próximo protuberante en la secuencia de ADN de pirimidina, se podrían utilizar para detectar la formación de una triple hélice paralela, ADNbc paralelo y ADNbc antiparalelo. El aumento de la estabilidad térmica en el intervalo de 12-19°C para TINA con una sola inserción protuberante de 5, se puede aplicar para reducir la longitud requerida del TFO. Por otra parte, una buena estabilidad térmica en dobles hélices y triples hélices de tipo Hoogsteen se podría obtener a pH 7,0, incluso en presencia de varias citosinas en la secuencia (hasta 36% en el presente trabajo). Las inserciones múltiples de 5 se pueden utilizar para aumentar la temperatura de fusión de dobles hélices de Hoogsteen menos estables, hasta el nivel de las dobles hélices de Watson-Crick de la misma longitud, en condiciones adecuadas (secuencia, pH, concentración salina, etc.). Teniendo en cuenta el desarrollo de las bases nucleicas modificados con alta afinidad hacia los sitios de inversión C-G y T-A en ADNbc junto con triples hélices de cadenas alternadas, pensamos que estas mejoras en la formación de triple hélice ampliarán la aplicabilidad de TINA. La capacidad para estabilizar la triple hélice después de la inserción de 5 en las hebras de pirimidina de oligodesoxinucleótidos circulares o de fijación a ADNmc y ARNmc dianas, es también una posibilidad obvia. Como siguiente paso, los estudios se dedican a la influencia de la inserción de TINA e INA sobre la estabilidad de hélices de ácido nucleico diferentes de los complejos clásicos de Watson-Crick y Hoogsteen. Por lo tanto todavía hay una disponibilidad limitada de análogos de ácidos nucleicos que pueden estabilizar el apareamiento de bases de tipo Hoogsteen inverso, motivos *i* (pares de bases C-C⁺) o hélices cuádruples (secuencias ricas en G). Creemos que la capacidad de TINA para estabilizar triples hélices y dobles hélices paralelas junto con la discriminación de hélices de ácido nucleico de tipo Hoogsteen sobre Watson-Crick, puede hacer que TINA sea muy útil en el diseño de herramientas basadas en el ADN en biotecnología y nanotecnología en donde el reconocimiento específico, una estabilidad térmica elevada y la auto-organización o reorganización son vitales.

Tabla 1: datos de T_m [°C] para la temperatura de fusión de hélices triples y dobles, tomados a partir de curvas UV-fusión ($\lambda = 260$ nm).

| N° | Triple hélice ^a | | Doble hélice paralela ^b | | Doble hélice antiparalela ^c | |
|--------|----------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------|--|------------------------|
| | 3'-CTGCCCTTCTTTTT | 5'-GACGGGAAAGAAAAA (D1) | 5'-GACGGGGGAAAGAAAAA (ON15) | 3'-GGGAAAGAAAAA (ON16) | 5'-GACGGGGGAAAGAAAAA (ON15) | 3'-GGGAAAGAAAAA (ON16) |
| | pH 5,0 | pH 6,0 | pH 7,2 | pH 5,0 | pH 6,0 | pH 7,2 |
| ON1 | 55,0e | 27,0 | <5,0 | 29,5 | 19 | 48,0 |
| ON2 | - | 15,0 | <5,0 | - | <5,0 | 40,5 |
| ON3f | - | 26,0 | <5,0 | - | <5,0 | 42,0 |
| ON4g | - | 26,0 | <5,0 | - | 17,0 | 40,0 |
| ON5f | 57,0 | 35,0 | 13,5 | 33,5 | 22,0 | 45,0 |
| ON6f,g | 59,0e | 46,0 | 28,0 | 42,0 | 33,5 | 46,5 |
| ON7f | - | 39,5 | 21,5 | - | 30,0 | 44,5 |
| ON8f | - | 42,5 | 26,0 | - | 28,0 | 45,0 |
| ON9g | - | 41,0 | 24,0 | - | 31,5 | 45,5 |
| ON10f | 61,0 | 44,5 | 20,5 | 46,0 | 36,0 | 53,0 |
| ON11g | 65,5e | 57,0d | 35,5 | 53,5 | 45,5 | 47,0 |
| ON12k | 55,5e | 40,0 | <5,0 | 37,0 | 26,5 | 41,0 |
| ON13k | 59,5e | 56,5e | 40,0 | 41,0 | 38,0 | 45,0 |
| ON14k | 63,0e | 56,5e | 43,0 | 45,5 | 38,0 | 41,0 |

[a] c = 1,5 μ M de ON1-14 y 1,0 μ M de cada hebra de ADNbc (D1) en cacodilato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 6,0 y 7,2; T_m de la doble hélice = 56,5 (pH 5,0), 58,5°C (pH 6,0) y 57,0°C (pH 7,2); [b] c = 1,0 μ M de cada hebra en cacodilato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 6,0 o pH 5,0; [c] c = 1,0 μ M de cada hebra en cacodilato sódico 20 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 6,0 o pH 5,0; [d] Temperatura de fusión de la tercera hebra y de la doble hélice superpuestas. Estado de transición con $T_m = 54,5^\circ C$ se determinó a 373 nm; [e] Temperatura de fusión de la tercera hebra y de la doble hélice superpuestas; [f] Preparado por la mezcla de reacción de Sonogashira: $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (7,5 mM), que se corresponde a acetileno (22,5 mM), Cul (7,5 mM), DMF/ Et_3N seco (3,5/1,5, 500 μ L), 3 h; [g] Preparado por la mezcla de reacción de Sonogashira: $Pd(PPh_3)_4$ (7,5 mM), que se corresponde a acetileno (22,5 mM), Cul (7,5 mM), DMF/ Et_3N seco (3,5/1,5, 500 μ L), 3h; [k] Preparado por doble tratamiento con la mezcla de reacción de Sonogashira: $Pd(PPh_3)_4$ (7,5 mM), 1-etilpipereno (22,5 mM), Cul (7,5 mM), DMF/ Et_3N seco (3,5/1,5, 500 μ L), 3 h; [l] no determinado.

Tabla 2: datos de T_m [°C] para la temperatura de fusión de triples hélices paralelas desapareadas^[a] y dobles hélices paralelas^[b], tomados a partir de curvas UV-fusión ($\lambda = 260$ nm), pH 6,0.

| Secuencia | | D1: | D2: | D3: | D4: |
|----------------------|---------------------|----------|----------|------|------|
| 3'-CTGCCCCTTXCTTTTTT | | X·Y= T·A | X·Y= A·T | C·G | G·C |
| 5'-GACGGGGAAYGAAAAAA | | | | | |
| ON1 | 5'-CCCCTTTCTTTTTT | 27,0 | <5,0 | <5,0 | <5,0 |
| ON6 | 5'-CCCCTT5TCTTTTTT | 46,0 | 27,0 | 34,5 | 28,5 |
| ON8 | 5'-CCCCTT5CTTTTTT | 42,5 | 28,5 | 26,5 | 26,5 |
| ON10 | 5'-5CCCCTTTCTTTTTT | 44,5 | 22,5 | 27,0 | 28,0 |
| ON11 | 5'-5CCCCTT5TCTTTTTT | 57,0 | 40,5 | 45,5 | 42,0 |
| | | ON15 | ON17 | ON18 | ON19 |
| 5'-GACGGGGAAYGAAAAAA | | Y=A | T | G | C |
| ON1 | 5'-CCCCTTTCTTTTTT | 19,0 | <5,0 | 10,0 | <5,0 |
| ON6 | 5'-CCCCTT5TCTTTTTT | 33,5 | 21,5 | 20,5 | 20,5 |
| ON8 | 5'-CCCCTT5CTTTTTT | 28,0 | 20,0 | 18,5 | 20,0 |

[a] c = 1,5 μ M de ON1-14 y 1,0 μ M de cada hebra de ADNbc en cacodilato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 6,0; [b] c = 1,0 μ M de ON1-14 y 1,0 μ M de hebra de purina.

5

Tabla 3: datos de T_m [°C] para las temperaturas de fusión de triples hélices paralelas^[a] con inserciones de 5 en la secuencia de doble hélice de Watson-Crick tomados a partir de curvas UV-fusión ($\lambda = 260$ nm), pH 6,0. Las temperaturas de fusión también se proporcionan para dobles hélices paralelas^[b] con inserción de 5 en el tramo de purina.

| Secuencia | Triple hélice | | D6: | D7: | Doble hélice paralela | |
|-----------|---------------------|--|---|--------|-----------------------|------|
| | D1 | D5: | | | ON15 | ON21 |
| | | 3'-CTGCCCTT5TCTTTTTT (ON20) ^[c] | 3'-CTGCCCTTCTTTTTT | ON20/O | | |
| | | 5'-GACGGGGAAAGAAAAA | 5'-GACGGGGAA5AGAAAAAA (ON21) ^[d] | N21 | | |
| ON1 | 5'-CCCCCTTCTTTTTT | 27,0 | 38,0 | 24,0 | 27,0 | 19,0 |
| ON6 | 5'-CCCCCTT5TCTTTTTT | 46,0 | 38,0 | 27,5 | 31,5 | 33,5 |
| ON9 | 5'-CCCSCTTCTTTTTT | 41,0 | 52,5 ^[e] | 41,5 | 43,5 | 31,5 |

[a] $c = 1,5 \mu\text{M}$ de ON1, ON6, ON9 y $1,0 \mu\text{M}$ de cada hebra de ADNbc en cacodilato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 10 mM, pH 6,0, T_m de la doble hélice = $55,0^\circ\text{C}$ (D5), $56,0^\circ\text{C}$ (D6), $57,0^\circ\text{C}$ (D7); [b] $c = 1,0 \mu\text{M}$ de ON1, ON6, ON9, ON15 y ON21 en cacodilato sódico 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 10 mM, pH 6,0; [c] Preparado por la mezcla de reacción de Sonogashira: $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7,5 mM), 1-etinilpireno (22,5 mM), CuI (7,5 mM), DMF/ Et_3N seco (3,5/1,5, 500 μL), 3 h; [d] Preparado por doble tratamiento con la mezcla de reacción de Sonogashira: $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7,5 mM), 1-etinilpireno (22,5 mM), CuI (7,5 mM), DMF/ Et_3N seco (3,5/1,5, 500 μL), 3 h; [e] Temperatura de fusión de la tercera hebra y la doble hélice superpuestas.

Tabla 4: Datos de T_m [°C] para la temperatura de fusión de la doble hélice antiparalela^[a] tomados a partir de curvas UV-fusión ($\lambda = 260$ nm).

| Nº | ON25 | ON26 ^[b] | ON27 |
|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | ADN | ADN | ARN |
| | 5'-AGCTTGCTTGAG | 5'-AGCTTG5CTTGAG | 5'-AGCUUGCUCUUGAG |
| ON22 | 3'-TCGAACGAACTC | 47,5 | 32,0 |
| ON23 ^[b] | 3'-TCGAACSGAACTC | 39,5 | 36,0 |
| ON24 ^[c] | 3'-TCGAAC5G5AACTC | 34,0 | 22,5 |
| | | | 40,5 |
| | | | 30,5 |
| | | | 25,0 |

[a] $c = 1,0 \mu\text{M}$ de cada oligonucleótido en NaCl 140 mM, tampón de fosfato sódico 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0; [b] mezcla de reacción de Sonogashira: Pd(PPh₃)₄ (7,5 mM), 1-etinilpireno (22,5 mM), CuI (7,5 mM), DMF/Et₃N seco (3,5/1,5, 500 μL), 3 h; [c] Doble tratamiento con la mezcla de reacción de Sonogashira: Pd(PPh₃)₄ (7,5 mM), 1-etinilpireno (22,5 mM), CuI (7,5 mM), DMF/Et₃N seco (3,5/1,5, 500 μL), 3 h.

5 Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian Gemini 2000 a 300 MHz para ¹H y a 75 MHz para ¹³C. Los patrones internos empleados en ¹H RMN fueron TMS (δ : 0,00) para CDCl₃; en ¹³C RMN fueron CDCl₃ (δ : 77,0). Determinaciones precisas de la masa de iones se realizaron utilizando el espectrómetro de masas de transformada de Fourier (FT) 4.7 Tesla Ultima (Ion Spec, Irvine, CA). Los iones [M + Na]⁺ se aparean por picos utilizando iones obtenidos a partir de la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico. Los análisis de cromatografía en capa fina (TLC) se llevaron a cabo empleando placas de TLC 60 F₂₅₄ adquiridas en Merck y se visualizaron con luz UV (254 nm). El gel de sílice (0,040-0,063 mm) empleado para la cromatografía en columna se adquirió en Merck. Los disolventes utilizados para la cromatografía en columna se destilaron antes del uso, mientras que los reactivos se usaron conforme adquiridos.

[0201] Ejemplo 2

15 [0202] Preparación de (S)-1-(4,4'-dimetoxitriphenilmetiloxi)-3-(4-yodobenciloxi)propan-2-ol. (S)-(+)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol (6, 1,17 g, 8,9 mmol) y bromuro de 4-yodobencilo (2,5 g, 8,4 mmol) se sometieron a reflujo en condiciones de Dean-Stark en tolueno (80 mL) en presencia de KOH (8,8 g, 154,0 mmol) durante 12 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar y se añadió H₂O (30 mL). Después de la separación de las fases, la capa acuosa se lavó con tolueno (2 x 15 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (30 mL) y se concentraron a vacío. El residuo se trató con 80% de AcOH acuoso (25 mL) durante 48 h a ta. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se coevaporó dos veces con tolueno/EtOH (30 mL, 5:1, v/v). El residuo se secó a presión reducida para proporcionar (R)-3-(4-yodobenciloxi)propano-1,2-diol (7, 100%, 2,3 g) como un aceite amarillento que se utilizó en la siguiente etapa sin una purificación adicional.

25 Este aceite (2,3 g, 8,4 mmol) se disolvió en piridina anh. (25 mL) y se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitriphenil (3,5 g, 10,4 mmol) en atmósfera de nitrógeno. Después de 24 h, se añadió MeOH (2 mL) seguido por EtOAc (150 mL) y la mezcla se extrajo con NaHCO₃ ac. sat. (40 mL x 2). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (20 mL x 2). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El residuo se coevaporó dos veces con tolueno/EtOH (25 mL, 1:1, v/v). El residuo se adsorbió sobre gel de sílice (1,5 g) en EtOAc (30 mL) y se purificó usando cromatografía en vacío en columna seca con EtOAc (0-30%, v/v) en éter de petróleo para proporcionar el compuesto (S)-1-(4,4'-dimetoxitriphenilmetiloxi)-3-(4-yodobenciloxi)propan-2-ol (70%, 3,6 g) como una espuma amarilla. ¹H RMN (CDCl₃) δ 2,42 (br.s., 1H, OH), 3,20 (m, 2H, CH(OH)CH₂OCH₂), 3,56 (m, 2H, CH₂ODMT), 3,78 (s, 6H, 2xOCH₃), 3,97 (m, 1H, CHOH), 4,43 (s, 2H, CH₂Ar), 6,78 (d, 4H, $J = 8,5$ Hz, DMT), 7,00 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, yodofenilo), 7,30-7,45 (m, 9H, DMT), 7,63 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, yodofenilo); ¹³C RMN (CDCl₃) 55,2 (OCH₃), 62,2 (CH₂ODMT), 69,9 (CH(OH)CH₂OCH₂), 71,6 (CHOH), 72,6 (CH₂-yodofenilo), 86,1 [C(Ar)₃], 93,1, 129,4, 137,4, 137,7 (yodofenilo), 113,1, 126,7, 127,8, 128,1, 130,0, 135,9, 144,7, 158,5 (DMT), HR-MALDI-MS calculado para C₃₁H₃₁IO₅Na [M+Na]⁺ m/z 633,1108, encontrado m/z 633,1116.

Ejemplo 3

40 Preparación de (S)-2-O-[2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino]-1-O-(4,4'-dimetoxitriphenilmetil)-3-O-(4-yodobencil)glicerol (compuesto 8 en el esquema 2). (S)-1-(4,4'-dimetoxitriphenilmetiloxi)-3-(4-yodobenciloxi)propan-2-ol (2,0 g, 3,3 mmol) se disolvió en atmósfera de nitrógeno en CH₂Cl₂ anh. (50 mL). Se añadió tetrazoluro de *N,N*-diisopropilamonio (0,850 g, 5,0 mmol) seguido de la adición gota a gota de 2-cianoetil tetraisopropilfosfordiamidita (1,1 g, 3,7 mmol) bajo enfriamiento externo con baño de agua helada. Después de 16 h, la TLC analítica no mostró más material de partida y la reacción se enfrió rápidamente con H₂O (30 mL). Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con H₂O (30 mL). Las capas acuosas combinadas se lavaron con CH₂Cl₂ (25 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró, se añadió gel de sílice (1,5 g) y piridina (0,5 mL) y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se purificó usando cromatografía en vacío en columna seca de gel de sílice con NEt₃ (0,5%, v/v)/EtOAc (0-25%)/éter de petróleo. Las fracciones combinadas que absorben UV se evaporaron a vacío proporcionando el compuesto final 8 (1,8 g, 67%) como una espuma que se utilizó en la síntesis de ODN. ³²RMN (CDCl₃) δ 149,8, 149,9 en relación 1:1. HR-ESI-MS. calculado para C₄₀H₄₆IO₆N₂PLi [M+Li]⁺ m/z 817,2449, encontrado m/z

817,2447.

Ejemplo 4

Preparación de (*R*)-1-*O*-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-3-*O*-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerol. A la solución de (*R*)-3-(4-yodobencilo)propano-1,2-diol (4,2 mmol) en DMF (40 mL), se añadió Et₃N (5,8 mL) y Ar se burbujeó a través de la solución durante 30 min. Posteriormente, 1-etinilpireno (1,05 g, 4,65 mmol) se disolvió en atmósfera de Ar y se añadió CuI (56 mg, 0,3 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (125 mg, 0,11 mmol) a la solución. La mezcla de reacción se agitó a ta en atmósfera de Ar durante una noche, seguido de la adición de CH₂Cl₂ (150 mL) y la extracción con solución ac. 0,3 M de sal de amonio de EDTA (2x75 mL). La capa orgánica se lavó con H₂O (3x75 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó a vacío hasta sequedad. El residuo se coevaporó dos veces con tolueno/EtOH (30 mL, 1:1, v/v), proporcionando 1-*O*-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerol como un aceite (3,1 g). El aceite se coevaporó con piridina (20 mL) y después se disolvió en piridina anh. (50 mL), se enfrió en un baño con agua helada y se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (1,45 g, 4,41 mmol) en atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se agitó a ta durante 16 h y después se añadió una porción adicional de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,5 g, 1,5 mmol). Después de 24 h, la TLC no mostraba más material de partida y la mezcla de reacción se enfrió rápidamente con MeOH (2 mL) y se diluyó con EtOAc (150 mL) y se extrajo con NaHCO₃ sat. ac. (100 mL x 2). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (50 mL x 2). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El residuo se coevaporó dos veces con tolueno/EtOH (25 mL, 1:1, v/v). El residuo se adsorbió sobre un gel de sílice (2,0 g) en EtOAc (50 mL) y se purificó usando cromatografía en vacío en columna seca con EtOAc (0-100%, v/v) en ciclohexano para proporcionar (*S*)-1-*O*-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-3-*O*-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerol (60%, 1,75 g) como una espuma amarilla. ¹H RMN (CDCl₃) δ 2,48 (d, 1H, *J* = 5,0 Hz, OH), 3,24 (m, 2H, CH(OH)CH₂OCH₂), 3,31 (m, 2H, CH₂ODMT), 3,78 (s, 6H, 2xOCH₃), 4,00 (m, 1H, CHOH), 4,58 (s, 2H, CH₂Ar), 6,80 (d, 4H, *J* = 8,5 Hz, DMT), 7,10-7,45 (m, 11H, DMT), 7,72 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, fenilo), 8,00-8,30 (m, 9H, piren-1-ilo); ¹³C RMN (CDCl₃) 55,2 (OCH₃), 64,3 (CH₂ODMT), 70,0 (CH(OH)CH₂OCH₂) 71,7 (CHOH), 72,9 (CH₂-fenilo), 86,1 [C(Ar)₃], 88,7, 94,9 (C≡C), 117,7, 127,7, 138,5, 139,4 (fenilo), 113,1, 124,5-131,8, 136,0, 144,8, 158,5 (DMT, piren-1-ilo), HR-MALDI-MS: *m/z* calculado para C₄₉H₄₀Na⁺O₅ [M+Na]⁺ 731,2768, encontrado 731,2739.

Ejemplo 5.

Preparación de (*R*)-2-*O*-[2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino]-1-*O*-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-3-*O*-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerol.

El compuesto se preparó usando el mismo procedimiento que para el compuesto 8 utilizando (*R*)-1-*O*-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-3-*O*-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerol (1,7 g, 2,4 mmol), tetrazoluro de *N,N*-diisopropilamonio (0,620 g, 3,6 mmol), 2-cianoetil tetraisopropilfosfordiamida (1,150 g, 3,8 mmol), CH₂Cl₂ anh. (50 mL) durante 24 h. El compuesto final (1,8 g, 83%) se obtuvo como una espuma que se utilizó en la síntesis de ODN. ³²P RMN (CDCl₃) δ 150,3, 150,5 en una relación de 3:2. HR-MALDI-MS: *m/z* calculado para C₅₈H₅₇N₂Na⁺O₆P [M+Na]⁺ 931,3846, encontrado 931,3814.

Ejemplo 6

Síntesis y purificación de TINAs utilizando una estrategia postsintética.

Los ODNs se sintetizaron en un sistema de síntesis de ácido nucleico de Expedite[®] Modelo 8909 de Applied Biosystems utilizando 4,5-dicianoimidazol como activador y un aumento del tiempo de desprotección (100 s) y un tiempo de acoplamiento (2 min) para una solución 0,075 M de fosforamida 8 en una mezcla 1:1 de MeCN/CH₂Cl₂ seco. Después de la síntesis de ADN, las columnas con soportes de CPG y oligonucleótidos con DMT que poseían restos 4-yodofenilo, se lavaron con argón (2 min) antes de la reacción de acoplamiento. La mezcla de reactivos de acoplamiento de Sonogashira que contenía Pd(PPh₃)₄ o Pd(PPh₃)₂Cl₂ (7,5 mM), una estructura aromática que poseía un acetileno terminal (22,5 mM), y CuI (7,5 mM) en DMF/Et₃N seco (3,5/1,5, 500 μL) se preparó en una jeringa de plástico de 1 mL en condiciones secas a temperatura ambiente. Las jeringas también se lavaron con argón antes de su uso. La jeringa con la mezcla de reactivos de acoplamiento de Sonogashira se fijó a la columna con el CPG y la otra jeringa vacía se conectó desde otro lado de la columna. El soporte de CPG con el oligonucleótido modificado se lavó varias veces con jeringas con la mezcla de reacción. Cada 45 min se repitió la última operación. Después de 3-4 h, la mezcla de reacción se retiró del soporte y las columnas se lavaron con DMF (2x0,5 mL) y CH₃CN (2x1 mL), y se secaron. En los casos de ON12-ON14, ON21 y ON24, los soportes de CPG fueron tratados una vez más con la mezcla de reacción de acoplamiento de Sonogashira recién preparada. Después, los oligonucleótidos con 5'-DMT fueron escindidos del soporte sólido (temperatura ambiente, 2 h) y se desprotegeron (55°C, durante una noche) con amoniaco acuoso al 32%. La purificación de los TINAs con 5'-*O*-DMT se llevó a cabo utilizando una HPLC semipreparativa de fase inversa sobre una columna MS C₁₈ de Waters Xterra[®]. Los ODNs se desprotegeron de DMT en 100 μl de ácido acético ac. al 10% (30 min), se diluyeron con amoniaco acuoso al 32% (1 mL) y se purificaron de nuevo mediante HPLC. Las fracciones correspondientes con ODNs se evaporaron, se diluyeron con NaOAc ac. 1 M (150 μL), y los ODN se precipitaron en etanol (550 μL). Los ODNs modificados fueron confirmados por análisis MALDI-TOF en una Estación de Investigación de Bioespectrometría Voyager Elite de PerSeptive Biosystems. La pureza de los TFOs finales se comprobó mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando el sistema LaChrom de Merck Hitachi sobre una columna GenPak-Fax (Waters).

Ejemplo 7. Síntesis y purificación de TINAs empleando (*R*)-2-*O*-[2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfino]-1-*O*-(4,4'-dimetoxitrietilmetil)-3-*O*-[4-(1-pireniletinil)fenilmetil]glicerol.

Los ODNs se sintetizaron en un sistema de síntesis de ácido nucleico de Expedite® Modelo 8909 de Applied Biosystems utilizando 4,5-dicianoimidazol como activador y un aumento del tiempo de desprotección (100 s) y un tiempo de acoplamiento (2,5 min) para una solución 0,075 M de dicha fosforamidita en una mezcla 1:1 de MeCN/CH₂Cl₂ seco. Después de completar la síntesis de ADN, los oligonucleótidos con 5'-DMT fueron escindidos y separados del soporte sólido (ta, 2 h) y se desprotegeron (55°C, durante una noche) utilizando amoniaco acuoso al 32%. La purificación de los TINAs con 5'-O-DMT se llevó a cabo utilizando una HPLC semipreparativa en fase inversa sobre una columna MS C₁₈ de Waters Xterra®. Los ODNs se desprotegeron de DMT en 100 µl de ácido acético al 80% ac (30 min), se diluyeron con NaOAc ac. 1 M (150 µL) y se precipitaron en etanol (550 µL). Los ODNs modificados fueron confirmados por análisis MALDI-TOF en una Estación de Investigación de Biospectrometría Voyager Elite de PerSeptive Biosystems. La pureza de los TFOs finales se comprobó mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando el sistema LaChrom de Merck Hitachi sobre una columna GenPak-Fax (Waters).

Ejemplo 8

15 Mediciones de la temperatura de fusión.

Las mediciones de la temperatura de fusión se realizaron en un espectrómetro de UV/VIS de Perkin-Elmer Lambda 35 equipado con un programador de temperatura PTP-6. Las triples hélices se formaron mezclando en primer lugar las dos hebras de la doble hélice de Watson-Crick, cada una a una concentración de 1,0 µM, en la solución tampón correspondiente. La solución se calentó a 80°C durante 5 min, se enfrió a ta y se añadió la tercera hebra (TFO) y después se mantuvo a 15°C durante 30 min. Las dobles hélices se formaron mezclando las dos hebras, cada una a una concentración de 1,0 µM, en la solución tampón correspondiente seguido por calentamiento a 70°C durante 5 min y después enfriamiento a ta. La temperatura de fusión (T_m , °C) se determinó como el máximo de los gráficos de la primera derivada de las curvas de fusión obtenidas midiendo la absorbancia a 260 nm frente al aumento de la temperatura (1,0°C por 1 min). Un aumento más lento de la temperatura (0,5°C por 1 min) dio lugar a las mismas curvas. Los experimentos también se realizaron a 373 nm. Todas las temperaturas de fusión están dentro de la incertidumbre ±1,0°C, tal y como se determinó por experimentos repetitivos.

Ejemplo 9

Mediciones de la fluorescencia.

30 Las mediciones de la fluorescencia se realizaron en un espectrómetro de luminiscencia LS-55 de Perkin-Elmer equipado con un controlador de temperatura Julabo F25. Las triples hélices y dobles hélices se formaron de la misma manera que para las mediciones de T_m excepto que solo se utilizó 1,0 µM de TFOs en todos los casos. Los espectros se registraron a 10°C en el tampón de cacodilato de sodio 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM a pH 6,0.

Ejemplo 10

35 MALDI-TOF MS, análisis de HPLC de fase inversa (con DMT) y de intercambio iónico (sin DMT) de los oligonucleótidos sintetizados

| Oligonucleótidos | m/z [M+H] ⁺ , calculado (Da) | m/z [M+H] ⁺ , encontrado (Da) | RP-HPLC, R_t (min) ^[a] | IE-HPLC, pureza ^[d] |
|------------------|---|--|-------------------------------------|--------------------------------|
| ON2 | 4490,8 | 4489,2 | 15,1 | 90% |
| ON3 | 4489,1 | 4488,9 | 15,2 / 38,1 ^[b] | 90% |
| ON4 | 4541,1 | 4541,6 | 16,2 | 95% |
| ON5 | 4516,0 | 4518,2 | 15,8 | 95% |
| ON6 | 4589,2 | 4589,2 | 16,0 | 96% |
| ON7 | 4589,2 | 4593,0 | 16,1 | 93% |
| ON8 | 4589,2 | 4588,2 | 16,1 | 95% |
| ON9 | 4589,2 | 4588,2 | 16,3 | 97% |
| ON10 | 4589,2 | 4589,2 | 18,7 | 91% |
| ON11 | 5054,6 | 5058,9 | 18,6 | 94% |
| ON12 | 5054,6 | 5060,1 | 17,4 / 32,9 ^[c] | 93% |
| ON13 | 5054,6 | 5058,0 | 17,1 | 97% |
| ON14 | 5054,6 | 5058,2 | 17,0 | 93% |
| ON20 | 5510,8 | 5513,1 | 16,2 | 95% |

ES 2 436 760 T3

| Oligonucleótidos | m/z [M+H] ⁺ , calculado (Da) | m/z [M+H] ⁺ , encontrado (Da) | RP-HPLC, R_t (min) ^[a] | IE-HPLC, pureza ^[d] |
|------------------|---|--|-------------------------------------|--------------------------------|
| ON21 | 5802,4 | 5799,7 | 27,2 ^[c] | 86% |
| ON23 | 4081,8 | 4083,1 | 16,2 | 88% |
| ON24 | 4549,3 | 4551,2 | 17,4 | 91% |
| ON26 | 4143,8 | 4143,9 | 15,8 | 85% |

[a] Sistema de cromatografía preparativa Waters Delta Prep 4000. Tampón A [950 mL de NH₄HCO₃ 0,1 M y 50 mL de CH₃CN, (pH = 9,0)] y tampón B [250 mL de NH₄HCO₃ 0,1 y 750 mL de CH₃CN, (pH = 9,0)]. Flujo 2,5 mL/min. Gradientes: 4 min 100% de A, gradiente lineal hasta 100% de B en 11 min, 100% de B en 5 min, después gradiente lineal hasta 100% de A en 2 min y 100% de A en 3 min; [b] Sistema de cromatografía preparativa Waters Delta Prep 4000, el mismo tampón que en [a]. Flujo 1,0 mL/min. Gradientes: 5 min 100% de A, gradiente lineal hasta 70% de B en 30 min, 2 min con 70% de B, gradiente lineal hasta 100% de B en 8 min y después 100% de A en 15 min; [c] Sistema de cromatografía semipreparativa Waters Delta Prep 700. Tampón A [acetato de trietil amonio 0,05 M en H₂O (pH = 7,0)] y tampón B (75% de CH₃CN en H₂O). Flujo 2,5 mL/min. Gradientes: 2 min 100% de A, gradiente lineal hasta 70% de B en 38 min, gradiente lineal hasta 100% de B en 7 min, 100% de B en 3 min y después 100% de A en 10 min; [d] Sistema LaChrom de Merck Hitachi en columna de GenPak-Fax (Waters). Tampón A [Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM en H₂O (pH = 8,0)] y tampón B (NaCl 1 M en H₂O). Flujo 0,75 mL/min. Gradientes: 5 min 97% de A y 3% de B, gradiente lineal hasta 35% de B en 41 min, gradiente lineal hasta 75% de B en 3 min y luego 10 min 97% de A y 3% de B.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> University of Southern Denmark Filichev, Vyacheslav V. Erik, Bjerregaard Nielsen
- 5 <120> Formación estable y selectiva de triples hélices y dobles hélices de tipo Hoogsteen empleando ácidos nucleicos intercalantes con torsión (TINA) y procedimiento para la preparación de TINAs.
- <130> 40818PC01
- <160> 29
- <170> PatentIn versión 3.3
- 10 <210> 1
<211> 14
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
<223> Oligonucleótido sintético
- 15 <400> 1
ccctttct tttt 14
- 20 <210> 2
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
<223> Oligonucleótido sintético
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Agente intercalante 1

<400> 2
 ccccttntct ttttt 15

5 <210> 3
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Agente intercalante 2

15 <400> 3
 ccccttntct ttttt 15

 <210> 4
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> Agente intercalante
 <222> (7)..(7)
 <223> Agente intercalante 3

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Agente intercalante 3

30 <400> 4
 ccccttntct ttttt 15

 <210> 5
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Agente intercalante 4

40 <400> 5
 ccccttntct ttttt 15

 <210> 6
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <210> 6
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Agente intercalante 5

<400> 6
 ccccttntct ttttt 15

10
 <210> 7
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Agente intercalante 5

20
 <400> 7
 cccctttcnt ttttt 15

<210> 8
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Agente intercalante 5

30
 <400> 8
 cccctttntct ttttt 15

<210> 9
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Agente intercalante 5

<400> 9
 cccnctttct ttttt 15

45
 <210> 10

<211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Agente intercalante 5

10

<400> - 10
 nccccttct tttt 15

<210> 11
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Agente intercalante 5

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Agente intercalante 5

25

<400> 11
 ncccctntc ttttt 16

<210> 12
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Agente intercalante 5

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Agente intercalante 5

40

<400> 12
 cccctntnc ttttt 16

<210> 13
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Agente intercalante 5

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Agente intercalante 5

<400> 13
 cccctntnc ttttt 16

15
 <210> 14
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Agente intercalante 5

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Agente intercalante 5

<400> 14
 cccctntct ntttt 16

30
 <210> 15
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35
 <400> 15
 gacggggaaa gaaaaaa 17

40
 <210> 16
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 16
 ggggaaagaa aaaa 14

45
 <210> 17

<211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 17
 gacggggaat gaaaaaa 17

10

<210> 18
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15

<400> 18
 gacggggaag gaaaaaa 17

<210> 19
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 19
 gacggggaac gaaaaaa 17

25

<210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Agente intercalante 5

35

<400> 20
 tttttctnt tccccgtc 18

<210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Agente intercalante 5

45

<400> 21
 gacggggaan agaaaaa 18

5
 <210> 22
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10
 <400> 22
 ctcaagcaag ct 12

<210> 23
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial

15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Agente intercalante 5

<400> 23
 ctcaagncaa gct 13

25
 <210> 24
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Agente intercalante 5

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Agente intercalante 5

<400> 24
 ctcaangnca agct 14

40
 <210> 25
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45
 <400> 25

agcttgcttg ag 12

 <210> 26
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Agente intercalante 5

 <400> 26
 agcttgnctt gag 13

 <210> 27
 <211> 12
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 27
 agcuugcuug ag 12

 <210> 28
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 28
 gacggggaaa gaaaaaa 17

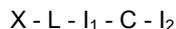
 <210> 29
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 29
 ctgccccttt cttttt 17

REIVINDICACIONES

1. Un monómero con apilamiento de bases flexible, con la estructura general



en la que

5 - X es una unidad monómera de estructura principal de un oligonucleótido o de un análogo de oligonucleótido, o PNA, o análogos de PNA y en donde X comprende alquilendiol,

- L es un enlazador que comprende una cadena de alquilo, una cadena de oxaalquilo, una cadena de azaalquilo, una cadena de tialquilo, un grupo carboxamida, un grupo tiocarboxamida, un grupo sulfonamida o combinaciones de los mismos y comprende de 0-60 átomos,

10 - I₁ es un sistema de anillo aromático monocíclico o policíclico seleccionado entre el grupo que consiste en benceno, naftaleno, azuleno y sistemas de anillos heteroaromáticos bicíclicos,

- C es un conjugador seleccionado entre el grupo de alquilo de 1 a 12 carbonos, alqueno de 2 a 12 carbonos, alquino de 2 a 25 carbonos o diazo o combinaciones de los mismos con una longitud no superior a 25 carbonos y/o átomos de nitrógeno,

15 - I₂ se selecciona entre el grupo de sistemas de anillos bicíclicos aromáticos, sistemas de anillos tricíclicos aromáticos, sistemas de anillos tetracíclicos aromáticos, sistemas de anillos pentacíclicos aromáticos y análogos heteroaromáticos de los mismos y sustituciones de los mismos.

20 2. El monómero con apilamiento de bases flexible según la reivindicación 1, en donde la unidad de longitud de la unidad monómera de estructura principal X que incluye un átomo de fósforo es menor de 6 átomos, en donde la longitud de la unidad de la estructura principal es la distancia más corta desde un monómero al siguiente.

3. El monómero con apilamiento de bases flexible según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el alquilendiol de X es etilenglicol o 1-O-metilenglicerol que opcionalmente tiene el alquilendiol comprendido en parte en un sistema de anillo, tal como glicona.

25 4. El monómero con apilamiento de bases flexible según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el alquilendiol de X es etilenglicol.

5. El monómero con apilamiento de bases flexible según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el alquino de C es acetileno o acetilenos repetitivos.

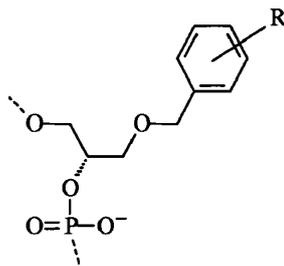
30 6. Un monómero con apilamiento de bases flexible según la reivindicación 1, en donde C se selecciona entre el grupo que consiste en anillos aromáticos de cadena lineal o de cadena ramificada o monocíclicos y sustituciones de los mismos.

7. Un monómero con apilamiento de bases flexible según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la longitud de L es de al menos 2 átomos.

8. El monómero con apilamiento de bases flexible según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde I₁ es benceno.

35 9. El monómero con apilamiento de bases flexible según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde I₂ es pireno.

10. El monómero con apilamiento de bases flexible según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de fórmula



40 en donde R es ariletinilo.

11. El monómero con apilamiento de bases flexible según cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

adaptado para ser incorporado en un oligonucleótido, en donde dicho monómero se selecciona entre el grupo de una fosforamidita, una fosfordiamidita, un fosfordiéster, un fosfortriéster, un fosfonato, un H-fosfonato, un fosfito, un clorofosfito, una clorofosforamidita, una fosfonamidita, una fosfoncloridita, un trifosfato, un difosfato.

- 5 12. Un oligonucleótido que comprende el monómero con apilamiento de bases flexible según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 10 13. Un método para la preparación de un monómero con apilamiento de bases flexible según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende las etapas de
- a. proporcionar un precursor de un monómero con apilamiento de bases flexible, en donde dicho precursor es un monómero con apilamiento de bases flexible que comprende I₁ sustituido con un halógeno o sustituido con C o sustituido con azida,
 - b. reemplazar el halógeno o el sustituyente C o el sustituyente azida del precursor de la etapa a con C - I₂
 - c. hacer que el precursor sustituido con C - I₂ de un monómero con apilamiento de bases flexible sea adaptable para ser incorporado en un oligonucleótido.
- 15 14. Un método para la preparación de un oligonucleótido según la reivindicación 12, que comprende las etapas de:
- a. proporcionar un monómero con apilamiento de bases flexible adaptado para ser incorporado en un oligonucleótido
 - b. proporcionar reactivos convencionales para la síntesis de un oligonucleótido
 - 20 c. durante la síntesis del oligonucleótido incorporar uno o varios monómeros con apilamiento de bases flexibles en el oligonucleótido
 - d. generando de este modo un oligonucleótido que comprende un monómero flexible de estructura principal.
15. Un método para la preparación de un oligonucleótido según la reivindicación 12, que comprende las etapas de:
- 25 a. proporcionar un precursor de un monómero flexible, adaptado para ser incorporado en un oligonucleótido, en donde dicho precursor es un monómero con apilamiento de bases flexible que comprende I₁ sustituido con un halógeno o sustituido con C o sustituido con azida.
 - b. proporcionar reactivos convencionales para la síntesis del oligonucleótido
 - c. durante la síntesis del oligonucleótido incorporar uno o varios precursores de los monómeros con apilamiento de bases flexibles en el oligonucleótido
 - 30 d. después de la síntesis del oligonucleótido, el sustituyente halógeno o el sustituyente C o el sustituyente azida en I₁ se sustituye con C - I₂
 - e. generando de este modo un oligonucleótido que comprende un monómero con apilamiento de bases flexibles.
- 35 16. Uso del oligonucleótido según la reivindicación 12, para la formación de una estructura de ácido nucleico bicatenaria o una estructura de ácido nucleico de triple hélice.
17. Un método para formar ácidos nucleicos bicatenarios o ácidos nucleicos de triple hélice que comprende las etapas:
- a. proporcionar un oligonucleótido según la reivindicación 12
 - b. proporcionar un ácido nucleico monocatenario o bicatenario
 - 40 c. incubar el oligonucleótido de la etapa a con el ácido nucleico diana monocatenario o bicatenario de la etapa b en condiciones de formación de una doble hélice o triple hélice
 - d. formando de este modo una estructura de ácido nucleico bicatenario o de ácido nucleico de triple hélice.
18. Un método según la reivindicación 17, en el que la formación de una estructura de ácido nucleico bicatenario o de triple hélice se utiliza para la modulación específica de secuencia de la actividad de un ácido nucleico diana.
- 45 19. Un método según la reivindicación 17, en el que la formación de una estructura de ácido nucleico bicatenario o de triple hélice se utiliza para la detección específica de secuencia del ácido nucleico diana.

20. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 18 y 19, en donde el ácido nucleico diana se selecciona entre el grupo de un gen cromosómico, un ARNm, un ARNr, un ARNt y un ARNmico.
21. El oligonucleótido según la reivindicación 12, para uso como un medicamento.
22. Uso del oligonucleótido según la reivindicación 12, para la preparación de un medicamento.

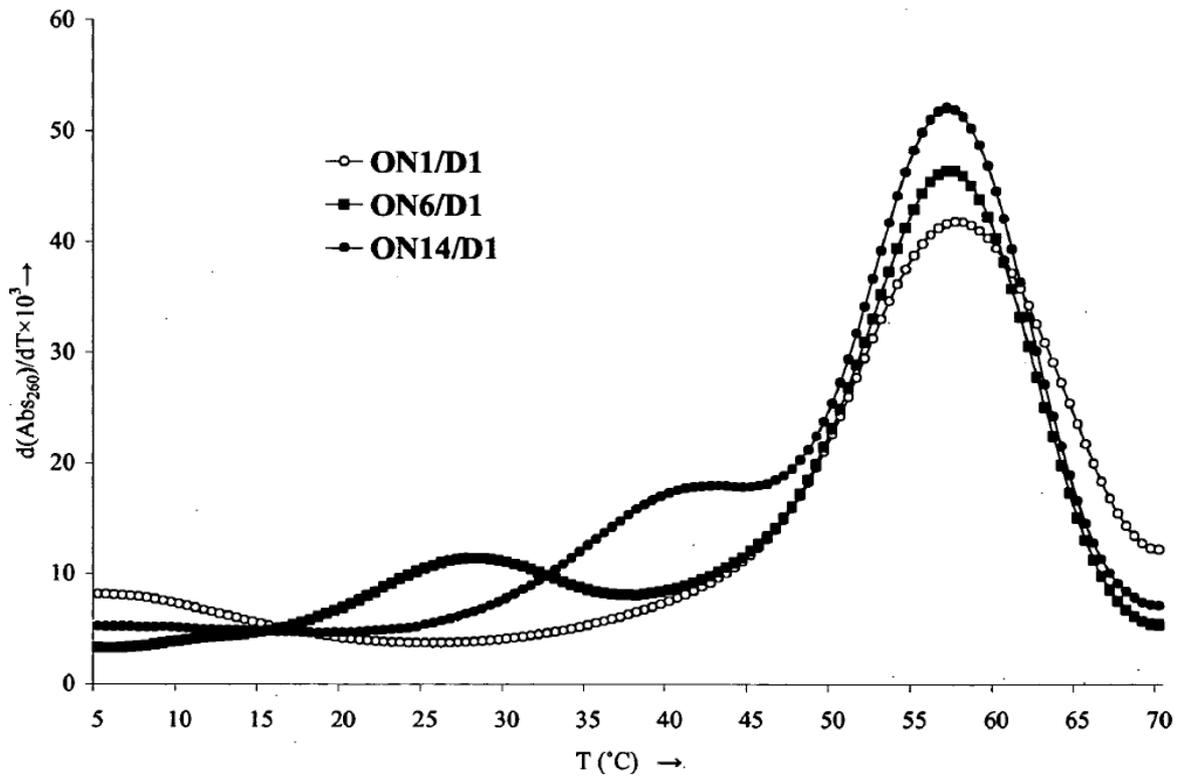


Fig. 1

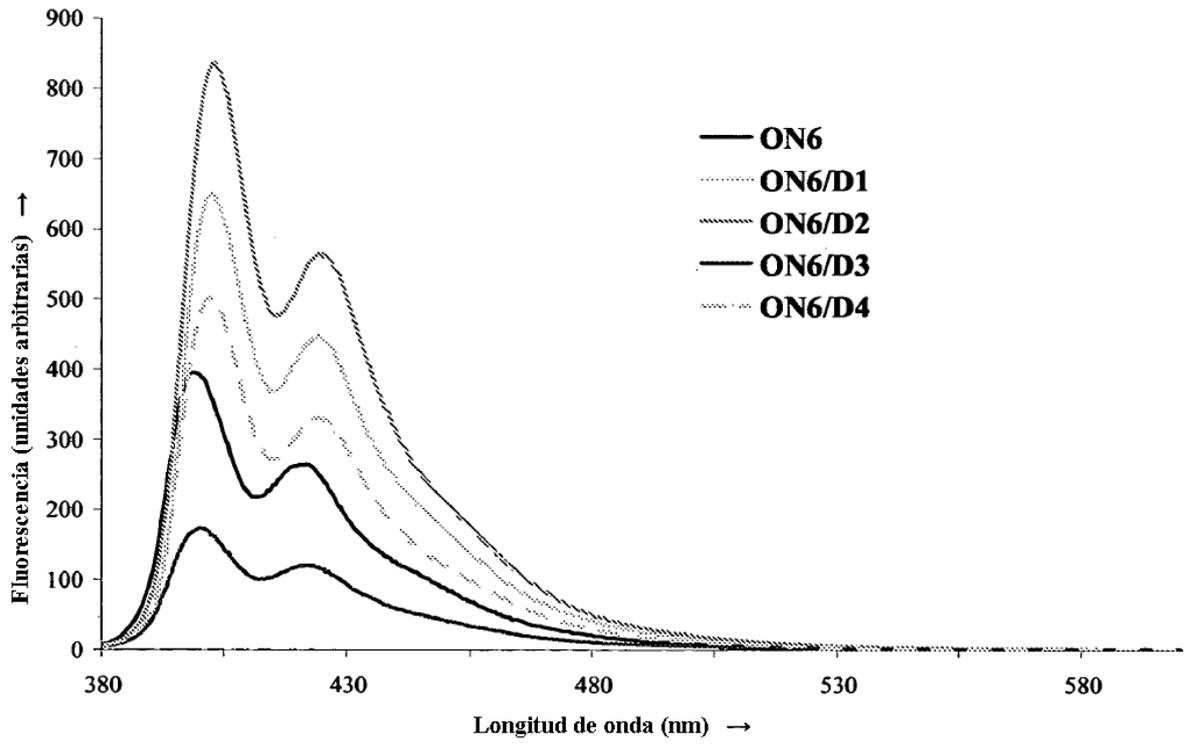


Fig. 2

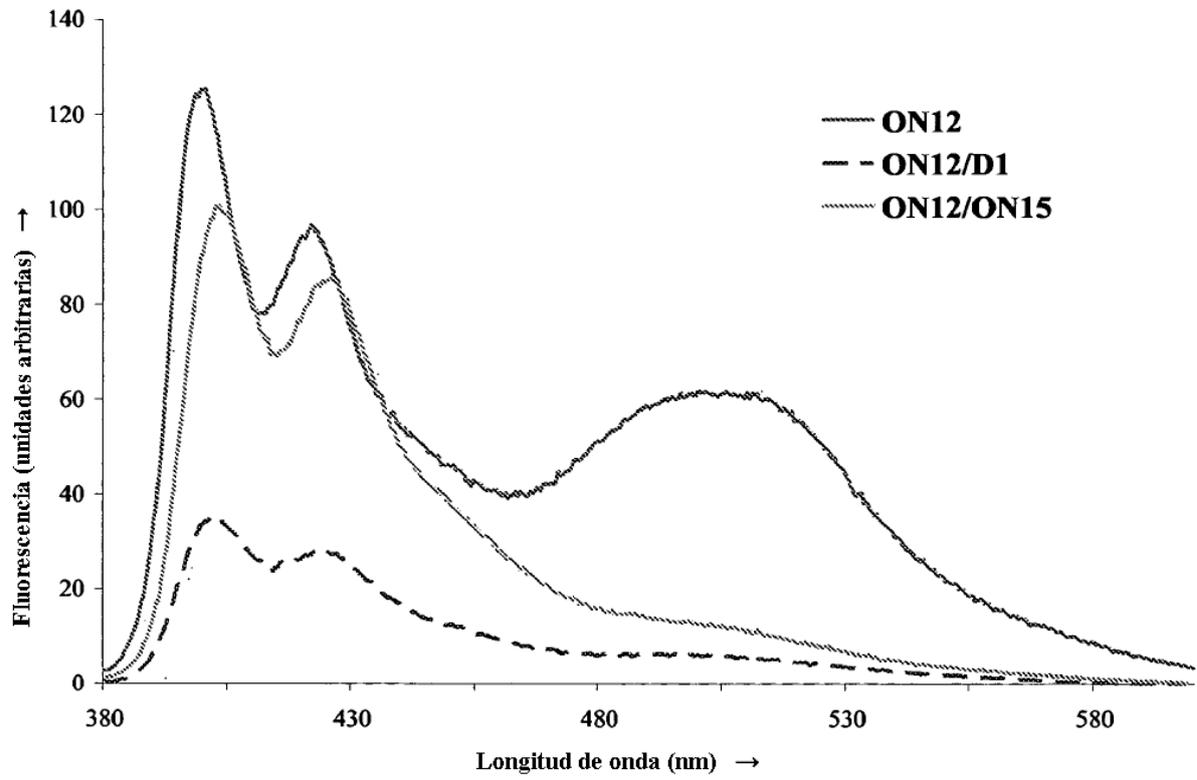


Fig. 3

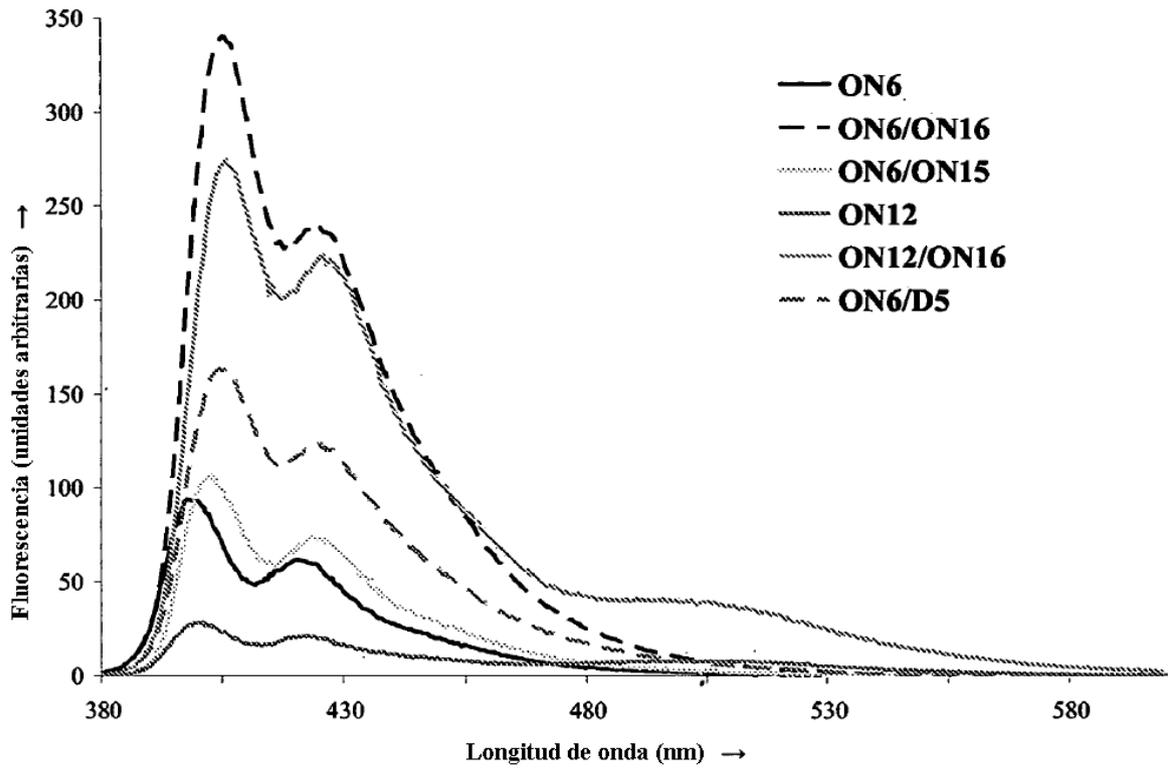


Fig. 4

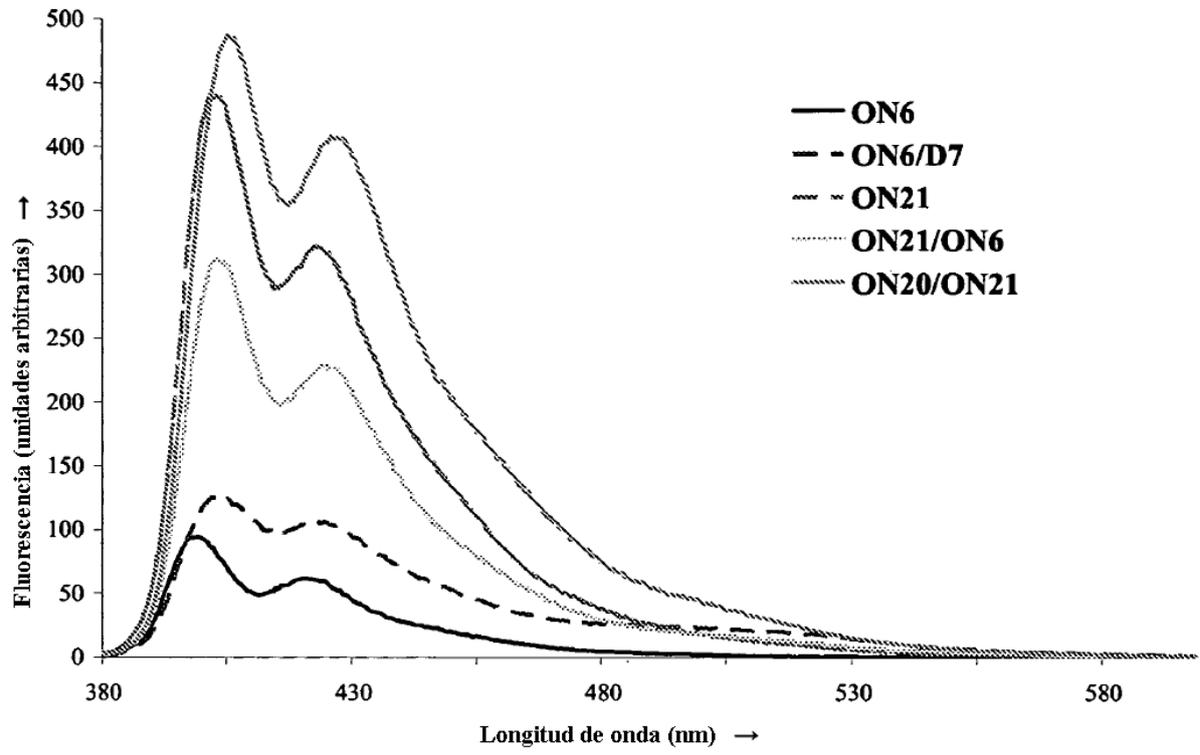


Fig. 5

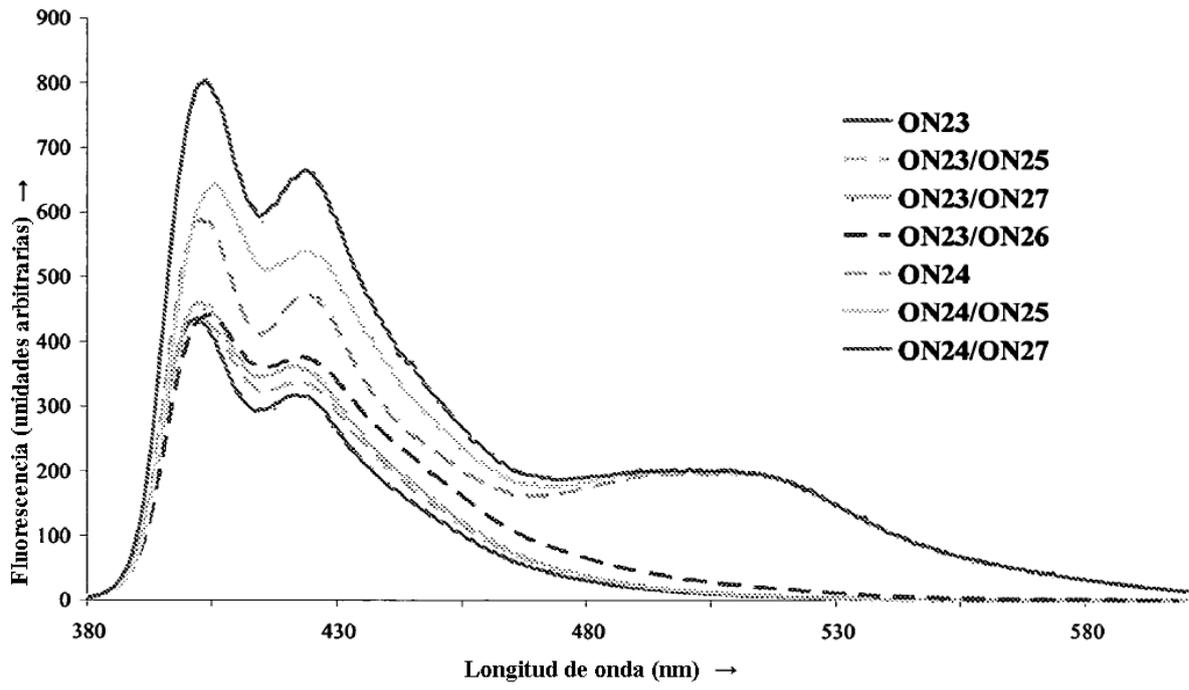


Fig. 6