

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 512 615**

51 Int. Cl.:

**C07D 495/04** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**C07D 333/24** (2006.01)

**C07D 233/32** (2006.01)

**C07C 245/14** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2008 E 08805961 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2185565**

54 Título: **Reactivos de marcado que llevan funciones diazo y nitro, procedimientos de síntesis de tales reactivos y procedimientos de detección de moléculas biológicas**

30 Prioridad:

**11.06.2007 FR 0755639**

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

**24.10.2014**

73 Titular/es:

**BIOMERIEUX (33.3%)  
Chemin de l'Orme  
69280 Marcy-L'Etoile, FR;  
CNRS (33.3%) y  
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LAURENT, ALAIN;  
LAAYOUN, ALI y  
KOTERA, MITSUHARU**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 512 615 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

Reactivos de marcado que llevan funciones diazo y nitro, procedimientos de síntesis de tales reactivos y procedimientos de detección de moléculas biológicas

5 La presente invención se refiere a nuevos reactivos de marcado de moléculas biológicas, a un procedimiento de síntesis de dichos marcadores así como a aplicaciones para el marcado de moléculas biológicas, en particular en el campo del diagnóstico, utilizando el análisis de ácidos nucleicos.

El estado de la técnica muestra que existen numerosos métodos para marcar nucleótidos, oligonucleótidos o ácidos nucleicos.

10 Un primer método consiste en fijar el marcador sobre la base, ya sea ésta natural o modificada. Un segundo método propone fijar el marcador sobre el azúcar, también en este caso, tanto si es natural como si es modificado. Un tercer método tiene por objeto la fijación del marcador sobre el grupo fosfato.

El marcado sobre la base se ha utilizado en especial en el enfoque de marcado de los ácidos nucleicos por incorporación de nucleótidos marcados directamente.

El marcado sobre el azúcar se utiliza a menudo en el caso de sondas nucleicas preparadas por síntesis química.

15 El marcado sobre el grupo fosfato se ha utilizado también para introducir brazos funcionalizados y marcadores durante la síntesis química de los oligonucleótidos.

20 De hecho, la persona conocedora del oficio que debe efectuar un marcado de un nucleótido o de un análogo de nucleótido o de un ácido nucleico, es proclive a efectuar esta fijación sobre la base o sobre el azúcar, que le ofrecen más comodidad y alternativas. Esto es, por cierto, lo que se deduce del estudio de numerosos documentos, tales como los documentos de las patentes EP-A-0.329.198, EP-A-0.302.175, EP-A-0.097.373, EP-A-0.063.879, US-A-5.449.767, US-A-5.328.824, WO-A-93/16094, DE-A-3.910.151 y EP-A-0.567.841 para la base o EP-A-0.286.898 para el azúcar.

25 La fijación del marcador sobre el fosfato es una técnica más compleja que la técnica que consiste en funcionalizar la base o el azúcar y ha sido mucho menos utilizada, en especial debido a la débil reactividad del fosfato (véase por ejemplo Jencks W.P. et al., J. Amer. Chem. Soc., 82, 1778-1785, 1960). De la misma forma, en la revisión de O'Donnel y McLaughlin ("Reporter groups for the analysis of nucleic acid structure", p. 216-243, en "Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids", editor Hecht S.M., Oxford University Press, 1996) que trata sobre los métodos de introducción de sondas en los fragmentos de oligonucleótidos, se considera imposible la alquilación eficaz del fosfodiéster internucleotídico.

30 El documento de la solicitud de patente WO-A-99/65926 describe un procedimiento de marcado de un ácido ribonucleico (ARN), de síntesis o natural, que consiste en fragmentar el ARN y en marcar en el grupo fosfato terminal. Este documento describe un cierto número de funciones que se puede utilizar para el marcado en relación con la fragmentación, como las funciones hidroxilo, amina, hidracina, alcoxiamina, halogenuro de alquilo, halogenuro de alquilo de tipo bencílico y en particular el derivado 5-(bromometil)-fluoresceína. Estas funciones permiten marcar los ácidos nucleicos, pero es preciso asociar una etapa de fragmentación para tener un marcado eficaz ya que este marcado se produce sobre el fosfato liberado con ocasión de la fragmentación. Además, es necesario añadir un exceso importante de reactivo de marcado, respecto de la cantidad de ARN, para obtener un marcado eficaz, lo cual induce problemas de ruido de fondo generados por el marcador en exceso. Por último, este método no funciona de manera eficaz sobre la doble hélice de ADN.

40 Por tanto, hay necesidad de nuevos reactivos que sean eficaces desde el punto de vista del rendimiento de marcado, que sean específicos en cuanto a la posición de marcado y, en particular, que no afecten a las propiedades de hibridación de las bases implicadas en la formación de la doble hélice, por medio de enlaces de hidrógeno, que sean utilizables a la vez por el ADN y el ARN y, por último, que permitan marcar indiferentemente nucleótidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos naturales o preparados por transcripción, por transcripción inversa o por amplificación enzimática.

La solicitante ha propuesto ya tales nuevos marcadores que responden a las condiciones precitadas y que utilizan la función diazometilo como función reactiva para el marcado. Este es el caso, por ejemplo, en los documentos de las solicitudes de las patentes WO-A-02/090319, WO-A-02/090584 y WO-A-2005/092910.

50 Así, la función diazometilo (de fórmula  $-C(N_2)-$ ) ya ha sido utilizada para la alquilación de grupos fosfato, pero se presenta un cierto número de problemas. Por una parte, los reactivos que incorporan al menos una función diazo en general son inestables *per se*, lo que plantea problemas para la utilización de estos reactivos en un kit de marcado, lo cual es un defecto insalvable si el producto marcado tiene por función poner en evidencia la presencia de una molécula blanco biológica en una muestra cualquiera.

Por último, los reactivos que llevan la función diazometilo y asociados a ciertos marcadores, tales como la biotina, son poco solubles en agua, lo que conduce a utilizar disolventes orgánicos miscibles en agua para el acoplamiento con moléculas biológicas, que no son solubles más que en agua o en tampones acuosos. Pero estos disolventes, si se utilizan en una concentración demasiado importante en la reacción de marcado, implican el riesgo de provocar la precipitación de las biomoléculas. En consecuencia, conviene poder disponer de reactivos de marcado suficientemente solubles en los medios acuosos.

Los reactivos de marcado preconizados en los documentos de las patentes WO-A-02/090319, WO-A-02/090584 (moléculas de primera generación) y WO-A-2005/092910 (moléculas de segunda generación) mencionados previamente en el texto resuelven también estos problemas técnicos. Se invita al lector a referirse a estos documentos para cualquier explicación complementaria que faltase, por omisión involuntaria, en el texto que expone la presente invención.

La presente invención es una mejora consecuente de las moléculas existentes. En efecto, las moléculas de primera y de segunda generación tienen el inconveniente de ser inestables químicamente, incluso si este punto se ha mejorado respecto a lo que ya existía antes. Así, el marcado continúa teniendo un buen rendimiento puesto que los resultados obtenidos son muy buenos durante más de un año. Además su síntesis continúa siendo relativamente compleja. Las moléculas de tercera generación son mucho más estables y más fáciles de sintetizar, lo que presenta ventajas considerables en términos de la fecha de caducidad de los kits que contienen estas moléculas y de la industrialización de las síntesis.

Las moléculas de primera y de segunda generación son estables funcionalmente durante un año si se conservan a baja temperatura en un disolvente orgánico anhidro. Las moléculas de tercera generación son mucho más estables funcionalmente y químicamente ya sea en medio líquido o en medio seco. Por lo tanto, se pueden manipular en medio acuoso después de haber sido conservadas en seco, por ejemplo por secado o liofilización, durante un período de tiempo mucho más largo (entre 10 y 100 veces más), lo que no es el caso de las moléculas de primera o de segunda generación, que no resisten la liofilización.

Esta valorización industrial de las moléculas de tercera generación es especialmente importante en los dispositivos integrados o en los microsistemas, donde la química implicada debe ser robusta y de alto rendimiento, sin que se deba incriminar en caso de problemas la estabilidad de ciertos reactivos.

Sin embargo, incluso si estas moléculas y estos procedimientos de marcado son particularmente eficaces, la solicitante ha logrado encontrar nuevas moléculas y nuevos procedimientos que mejoran aún la eficacia del marcado. La presente invención aporta una solución con el fin de responder al problema de la estabilidad de las moléculas de la primera y de la segunda generaciones. Así, dos nuevas funcionalidades moleculares se han asociado para crear estos nuevos reactivos. Se definen de la siguiente manera:

- la función diazometilo posee en alfa un grupo aromático, el mismo sustituido una o varias veces por un grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en posición meta, para u orto;
- la función diazo posee en alfa' el grupo que permite la detección. Este grupo puede ser la biotina o cualquier otro grupo que permita la detección.

Este segundo punto es una característica totalmente original respecto de las moléculas de la primera y de la segunda generaciones puesto que antes el grupo que permitía la detección estaba siempre ligado a la parte aromática, no estando ocupada la posición alfa' en el mejor de los casos más que por al menos un sustituyente no funcional.

Es de notar que incluso si la posición orto de la función diazo respecto del grupo nitro, ambos llevados por el ciclo, mejora los rendimientos de estabilidad de las moléculas según la invención, las posiciones meta y para conducen a compuestos diazo más estables y son las posiciones de sustitución utilizadas de manera preferente. Sin embargo, es completamente posible mejorar todavía más la estabilidad de las moléculas cuya función diazo está en posición orto respecto del grupo nitro añadiendo medios de estabilización, siendo entonces el problema que la síntesis es más compleja.

Las definiciones de los términos y expresiones: "estructura multimérica", "marcador detectable", "sistemas indirectos", "fluoróforos" y otros marcadores de interés; "conjugación", "molécula biológica", "ácido nucleico", "técnica de amplificación enzimática", "disolución sensiblemente acuosa", "disolución homogénea", "soporte sólido" y "etapa de purificación" se dan en el documento de la solicitud de patente WO-A-2005/092910; se invita al lector a referirse a dicho documento en caso de necesidad.

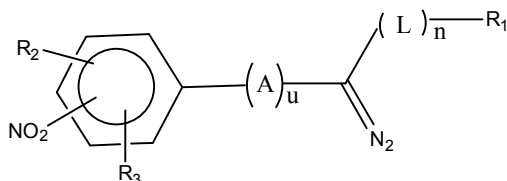
Asimismo, las técnicas de:

- la química de injertado y
- la introducción de fosfato en el extremo 3' o 5' de los ácidos nucleicos

se describen también en ese documento de solicitud de patente citado antes y el lector puede encontrar en ese documento todas las informaciones necesarias para la comprensión completa de la presente invención.

Además, a semejanza de las moléculas de la primera y segunda generaciones, la función diazometilo que llevan estas moléculas de tercera generación permite injertar de manera covalente los ácidos nucleicos sobre el soporte. El injerto es simple, el enlace es estable, en especial comparado con la adsorción, y permite realizar un acoplamiento del ácido nucleico sobre el soporte sólido, lo que facilita todavía más las etapas de hibridación posteriores disminuyendo el impedimento estérico.

Esta nueva familia de moléculas se denomina diazo-cetona-biotina (DCB) y está representada por el reactivo de marcado relativamente estable a la temperatura, que tiene la fórmula (A) siguiente:

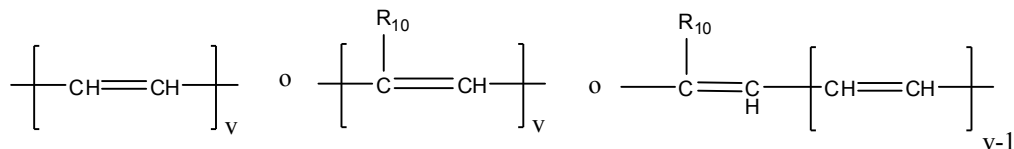


Esta molécula de tercera generación DCB tiene un brazo espaciador L, denominado "linker" y un marcador R<sub>1</sub> que podría estar constituido por un grupo detectable, como la biotina, un hapteno, un fluoróforo, un grupo fluorescente, un grupo luminiscente etc

L es un brazo de enlace o unión que tiene un encadenamiento lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 1. De manera ventajosa, y cualquiera que sea la forma de realización o variante evocada precedentemente del reactivo, L comprende un motivo o unidad de repetición  $-(O-CH_2-CH_2)-$ , repetido de 1 a 20 veces, preferentemente de 1 a 10 veces y aún más preferentemente de 2 a 5 veces.

A es un brazo de enlace o unión que tiene al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el ciclo aromático y u es un número entero comprendido entre 0 y 2, preferentemente es 0 o 1.

En un modo particular de realización, A es un brazo de enlace que tiene al menos un doble enlace de tipo etilénico que permite la conjugación de la función diazometilo con el ciclo aromático. El brazo de enlace A tiene por función alejar la función diazometilo del ciclo para disminuir el impedimento estérico conservando a la vez la estabilidad de la función diazometilo. Se entiende por "conjugación" la deslocalización electrónica del ciclo aromático a lo largo de la cadena carbonada del brazo de enlace A. A título de ejemplo, el brazo A puede tener la siguiente estructura:

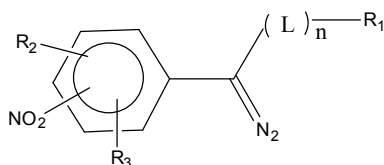


en la cual:

- v es un número entero comprendido entre 1 y 10; v es preferentemente igual a 1 o a 2;
- R<sup>10</sup> es H o un grupo alquilo, preferentemente es H, metilo o etilo

Los radicales R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan, de manera independiente uno del otro: H, NO<sub>2</sub>, Cl, Br, F, I, R<sup>2</sup>-(L)<sub>n</sub>-Y-X, OR, SR, NR<sub>2</sub>, R, NHCOR, CONHR o COOR, con R = grupo alquilo o arilo.

Según un segundo modo de realización, el reactivo de marcado tiene una fórmula (C) como la descrita a continuación:

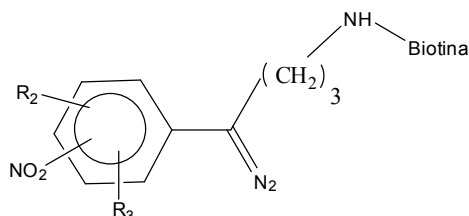


en la cual:

- R<sub>1</sub> representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí mediante al menos una estructura multimérica;

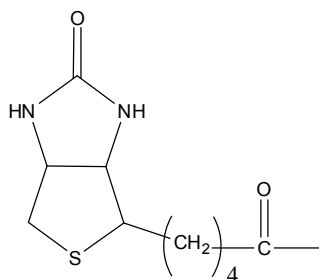
- $R_2$  y  $R_3$  representan, de manera independiente uno del otro: H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $\text{R}^2-(\text{L})_n\text{-Y-X}$ , OR, SR,  $\text{NR}_2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$  o  $\text{COOR}$ , con R = grupo alquilo o arilo;
- L es un brazo de enlace que tiene un encadenamiento lineal de al menos dos enlaces covalentes y
- n es un número entero igual a 1.

5 Según un tercer modo de realización, el reactivo de marcado tiene la fórmula (E) que se describe a continuación:



Cualquiera que sea el modo de realización, el reactivo se caracteriza en especial por el hecho de que el grupo nitro está en meta o en para.

En un modo interesante de realización, el grupo  $R_1$  está constituido por un resto D-biotina de fórmula (F):



10

La invención se refiere también a un procedimiento de síntesis de un reactivo de marcado tal como el descrito previamente en el texto; este procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) se hace reaccionar un derivado de ácido carboxílico con el enolato de una lactona (reacción de tipo Claisen) para formar un precursor cíclico;
- 15 b) a continuación dicho precursor cíclico se abre con un ácido halogenado para formar una cetona aromática halogenada;
- c) la función carbonilo de la cetona aromática halogenada se protege con un grupo protector para formar un precursor protegido;
- 20 d) dicho precursor protegido se somete a una reacción de aminación (de tipo Gabriel) para formar un precursor aminado;
- e) dicho precursor aminado se desprotege para liberar la función amina; dicha función amina se hace reaccionar con un marcador detectable cuya función carboxílica se activa para formar un precursor que tiene un marcador detectable;
- 25 f) el precursor marcado se somete a una reacción de desprotección de la función carbonilo, para formar un precursor marcado y carbonilado y, por último,
- g) el precursor marcado y carbonilado se transforma en un reactivo de marcado, tal como el descrito anteriormente, mediante una transformación de la función carbonilo en una función diazo (del tipo Banworth Stevens).

30 En un modo de realización, el procedimiento para el marcado de una molécula biológica, en particular un ácido nucleico, comprende poner en contacto en disolución homogénea, en un tampón sensiblemente acuoso, una molécula biológica y un reactivo, tal como se ha descrito precedentemente.

La invención se refiere también a una molécula biológica marcada susceptible de obtenerse mediante el procedimiento descrito precedentemente.

La invención se refiere también a un procedimiento de marcado y de fragmentación de un ácido nucleico sencillo o de doble hélice que comprende las siguientes etapas:

- fragmentar el ácido nucleico;
- unir un marcador sobre al menos uno de los fragmentos mediante un reactivo de marcado escogido entre los reactivos, tal como se ha descrito precedentemente,

de forma que dicho reactivo se acopla de manera covalente y mayoritaria sobre al menos un fosfato de dicho fragmento.

Según un modo de realización, el procedimiento se caracteriza por el hecho de que la fragmentación y el marcado se efectúan en dos etapas.

Según otro modo de realización, el procedimiento se caracteriza por el hecho de que la fragmentación y el marcado se efectúan en una etapa.

Cualquiera que sea el modo de realización, el procedimiento se caracteriza por el hecho de que el marcado se efectúa en disolución homogénea sensiblemente acuosa.

Cualquiera que sea el modo de realización, el procedimiento se caracteriza por el hecho de que la fragmentación se efectúa por vía enzimática, física o química.

La invención se refiere también a los ácidos nucleicos marcados susceptibles de obtenerse mediante el procedimiento, según uno cualquiera de los modos de realización descritos previamente en el texto.

La invención se refiere asimismo a un kit de detección de un ácido nucleico objetivo que comprende un ácido nucleico marcado, tal como el mencionado previamente.

Igualmente, la invención se refiere a un soporte sólido sobre el cual se fija un reactivo, tal como se describe precedentemente.

La invención se refiere también a un procedimiento de captura de ácidos nucleicos que comprende las siguientes etapas:

- se dispone de un soporte sólido sobre el cual se fija directa o indirectamente al menos una molécula biológica o un ácido nucleico; la molécula biológica o el ácido nucleico tienen una función diazometilo;
- se pone en contacto una muestra biológica susceptible de contener ácidos nucleicos libres y
- se lava el soporte sólido donde la molécula o las moléculas se fijan de manera covalente al menos a un ácido nucleico.

Los ejemplos y las figuras adjuntos a este documento representan modos particulares de realización.

La figura 1 representa un esquema de reacción que muestra el marcado de un ácido nucleico de una sola hélice, ya esté en forma de ARN o de ADN, por una molécula según la invención.

La figura 2 representa en esquema de reacción del procedimiento de síntesis de una molécula de meta nitro DCB.

La figura 3 representa en esquema de reacción del procedimiento de síntesis de una molécula de para nitro DCB.

La figura 4 representa la estabilidad comparada en medio líquido de los DCB respecto de una molécula de [Bio-EG3]2-PDAM de segunda generación (denominada en lo que sigue BBP) y descrita en el documento de la solicitud WO-A-02090319.

La figura 5 representa la estabilidad comparada de los DCB, en forma seca, respecto de una BBP.

La figura 6 representa los resultados de marcado de un amplicon ARN después de purificación con ayuda de los marcadores BBP, meta nitro DCB y para nitro DCB, estando cada uno de los marcadores a una concentración de 45 mM.

La figura 7 representa los resultados de marcado de un amplicon ARN sin purificación con ayuda de los marcadores BBP, meta nitro DCB y para nitro DCB, estando cada uno de los marcadores a una concentración de 2 mM y en presencia de 3 mM de HCl.

La figura 8 representa los resultados de marcado en función del tiempo de un amplicon ARN con ayuda de los marcadores BBP, meta nitro DCB y para nitro DCB, estando cada uno de los marcadores a una concentración de 3 mM y en presencia de 3 mM de HCl.

La figura 9 representa la comparación de la eficacia de marcado de un amplicon de ARN en función de la técnica empleada, ya sea ULS (sistema de etiquetado universal, por sus siglas en inglés) de Kreatech o según la presente invención.

La figura 10 es un recapitulativo de las moléculas utilizadas en la presente solicitud de invención.

5 En los ejemplos descritos a continuación, se utilizarán las siguientes abreviaturas:

- Ar: aromático
- s: singlete
- d: doblete
- t: triplete
- 10 • qu: quintuplete
- m: masivo
- M: multiplete
- HPLC: cromatografía líquida a alta presión
- CCF: cromatografía en capa fina
- 15 • RMN: resonancia magnética nuclear
- Rdt: rendimiento
- Rf o TR: tiempo de retención
- DMSO-d6: dimetilsulfóxido deuterado
- DMCF: formiato de dimetil-ciclohexilamonio
- 20 • CDCl<sub>3</sub>: cloroformo deuterado
- DMF: dimetilformamida
- DCM: diclorometano
- MeOH: metanol
- ACN: acrilonitrilo
- 25 • Agua MilliQ: agua ultrapura de tipo Millipore
- DMAC: dimetilaminocinamaldehído.

**Condiciones generales para la síntesis y el análisis de los compuestos DCB:**

Estas condiciones son aplicables a los ejemplos 1, 2, 3 y 4 siguientes.

30 Condiciones HPLC (marca HPLC WATERS Alliance 2795, detector de matriz de diodos PDA 996, programa Empower versión 2 y columna WATERS XTerra MS C18 4,6 x 30 2,5 µM):

1º. Método básico:

Eluyente A: agua milliQ

Eluyente B: ACN

35 Eluyente C: amoníaco a 500mM pH 12

Es decir un gradiente lineal de 1 a 64 % de acetonitrilo (5 mM constantes de amoníaco a pH = 9) en 20 minutos.

2º. Método DMCF (formiato de dimetilciclohexilamonio)

Eluyente A: agua milliQ

Eluyente B: ACN

Eluyente C: DMCF a 500 mM pH = 7

Es decir un gradiente lineal de 1 a 64 % de acetonitrilo a 5 mM de DMCF a pH = 7 en 20 minutos.

- 5 La disolución de DMCF a una concentración de 500 mmol/l se prepara a partir de 37 ml de dimetilciclohexilamina, de 9,4 ml de ácido fórmico puro y de 200 ml de agua. Se ajusta el pH a 7 y se completa hasta 500 ml con agua.

3° Condiciones generales de la síntesis:

Los análisis por cromatografía de capa fina se han realizado en placas de sílice ALUGRAM® MACHEREY-NAGEL SIL G/UV<sub>254</sub> 4 x 8 cm con una detección UV a 254 nm o con DMAC para los productos biotinilados.

- 10 La purificación de los productos se ha efectuado mediante cromatografía en gel de sílice Silica Gel 60 FLUKA (40-63 µm). Las condiciones de separación mediante cromatografía "flash" (impulsada por argón) respetan estrictamente las condiciones descritas por Clark Still et al. (Clark Still, W.; Kahn, M.; Mitra, A., *J. Org. Chem.* 1978, 43, 2923-2925), a saber una altura fija de sílice de 15 cm impulsada a un caudal de 5 cm/min, dependiendo el diámetro de la columna de la cantidad y de los Rf de los productos a purificar.
- 15 Los espectros RMN se han registrado en un espectrómetro Brüker de 200 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm respecto del pico del disolvente tomado como referencia interna (CDCl<sub>3</sub>: 7,24 ppm; DMSO-d<sub>6</sub>: 2,49 ppm; D<sub>2</sub>O: 4,80 ppm a 25 °C). Los espectros se describen con las abreviaturas: s = singlete; d = doblete; t = triplete; q = cuadruplete; qu = quintuplete; m = masivo; M = multiplete.
- 20 Los espectros de masas (EM) se han obtenido con un aparato de trampa de iones LCQ (ThermoFinnigan, San Jose, California, Estados Unidos) mediante métodos de ionización "electrospray" en modo positivo por infusión a través de un tubo de sílice de 2 a 10 µl/min. Los principales disolventes utilizados son DCM y MeOH.

**Ejemplo 1: síntesis de la meta nitro DCB**

Objetivo

Demostrar la factibilidad de la síntesis de una molécula DCB: la meta nitro DCB.

- 25 Modo operatorio:

La síntesis propiamente dicha se presenta en la figura 2. Comienza con una molécula de meta-nitrocloruro de bencilo (cloruro de 3-nitrobenzoilo), que es un producto disponible comercialmente (Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Francia)

Molécula 1

- 30 Se pone en suspensión en clorobenceno (33 ml) etóxido de magnesio (5,41 g; 0,0473 mol), seguido de α-acetil-γ-butirolactona (5,29 ml; 0,0492 mol); el conjunto se pone en atmósfera de argón, se agita y se calienta a 75 °C durante 3 h. Después de haber enfriado el medio de reacción hasta temperatura ambiente y de haber añadido el cloruro de 3-nitro-benzoilo (10 g; 0,0539 mol) en disolución de clorobenceno (16,4 ml) se calienta el conjunto a 40 °C durante 2 horas.
- 35 La mezcla se enfría a 10 °C antes de hidrolizarla con 25 ml de ácido sulfúrico 1 M, se deja decantar y se recupera la fase orgánica (fase superior) para lavarla con una disolución de hidrogenocarbonato de sodio al 5 %. A continuación, se evapora la fase orgánica a seco bajo presión reducida para finalmente purificarla en una columna de gel de sílice de 7 cm de diámetro y de 10,5 cm de altura, con una velocidad de elución de 5 cm/min. En un primer momento se pasa como eluyente una mezcla 70/30 de ciclohexano / acetato de etilo, seguida de una mezcla 50/50. Se juntan las fracciones que contienen el producto esperado y se evaporan a seco para obtener el producto 1 (8,17 g; Rdt = 73,5 %), que se emplea directamente en la siguiente reacción.
- 40

Eluyente CCM: diclorometano / metanol: 95 / 5

HPLC: método DMCF; TR = 7,7 minutos

Molécula 2

- 45 Se pone en suspensión la molécula 1 (5,50 g; 0,0234 mol) en una disolución al 48 % de ácido bromhídrico acuoso (33 ml; 6 v), la cual se lleva a reflujo durante 2 h. Después de haber enfriado la disolución a temperatura ambiente, se extrae la fase acuosa con 3 veces 30 ml de diclorometano. La fase orgánica se contra-extrae con



## ES 2 512 615 T3

hidrogenocarbonato de sodio al 5 % y luego se seca con sulfato de sodio, se filtra y se evapora. Se obtiene el producto 2 (6,06 g; Rdt = 95,8 %).

Eluyente CCM: diclorometano / metanol: 95 / 5

HPLC: método DMCF o básico; TR = 13,6 minutos

5 RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 2,416 ppm (qu, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Br); 3,426 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 3,279 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>CO); 7,738 ppm (t, 1H, Ar); 8,328 (d, 1H, Ar); 8,457 (d, 1H, Ar); 8,837 (s, 1H, Ar).

Molécula 3

10 En un matraz montado con un Dean Stark, se mezclan el compuesto 2 (4,00 g; 14,7 mmol), etilenglicol (2,87 ml; 51,4 mmol), ácido paratoluensulfónico (139,6 mg; 7,35 mmol) y tolueno (50 ml; 12,5 v) y se lleva luego la mezcla a reflujo durante 7 h en total (5 horas y media a la temperatura de consigna de 130 °C y luego 1 hora y media a 150 °C). La reacción es total; se evapora el tolueno a presión reducida, se retoma el producto con 70 ml de acetato de etilo y se lava con dos veces 50 ml de una disolución de hidrogenocarbonato de sodio de 250 mmol/l y luego con dos veces 50 ml de agua; la fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora hasta seco antes de ser purificada mediante cromatografía sobre gel de sílice (□ = 7 cm, h = 7 cm, d = 5 cm/min) utilizando como eluyente una mezcla de ciclohexano / acetato de etilo 85 / 15. Tras esta columna se obtiene el compuesto 3 (3,70 g; Rdt = 79,6 %).

Eluyente CCM: ciclohexano / acetato de etilo: 85 / 15

HPLC: método básico; TR = 15,3 minutos

20 RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 1,90 – 2,10 ppm (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Br); 3,425 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 3,798 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>-O); 4,081 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>-O); 7,561 ppm (t, 1H, Ar); 7,75-7,85 ppm (m, 1H, Ar); 8,10-8,25 (m, 1H, Ar); 8,30-8,35 (m, 1H, Ar).

Molécula 4

25 Se disuelve el producto 3 (3,70 g; 11,7 mmol) en DMF (40 ml; 0,3 M) antes de añadir la ftalimida de potasio (3,25 g; 17,5 mmol) en una vez y de calentar 15 minutos a 155 °C. Se evapora el DMF a presión reducida, luego se retoma el residuo de evaporación con 60 ml de diclorometano, se lava con 60 ml de una disolución de sosa a una concentración de 0,1 mol/l, se contra-extrae la fase acuosa con 30 ml de diclorometano, se juntan las dos fases orgánicas para secarlas sobre un lecho de sulfato de sodio antes de filtrar y de evaporar a seco la disolución destilando el disolvente. Se retoma el residuo obtenido con etanol (55 ml; 12 v) y se lleva a reflujo 20 minutos (la solubilización no es total), antes de enfriarlo a 10 °C; el producto precipita y se escurre sobre un vidrio fritado; el producto 4 se lava con dos veces 9,2 ml de etanol y luego se seca a vacío (3,99 g; Rdt = 89,1 %)

30 HPLC: método básico; TR = 14,9 minutos

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,604 – 2,005 ppm (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N); 3,677-3,783 ppm (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O); 4,019 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N); 7,500 ppm (t, 1H, Ar); 7,600-8,000 (m, 4H, ftalimida); 8,150 (d, 1H, Ar); 8,300 (s, 1H, Ar).

Molécula 5

35 Se pone en suspensión la sustancia 4 (3,987 g; 10,4 mmol) en metanol (210 ml; 53 v) antes de añadir a temperatura ambiente la hidracina (15,2 ml; 313 mmol). La reacción termina después de 20 minutos. Se evapora a seco el Mediano de reacción; luego, se retoma el mismo con 100 ml de acetato de etilo y se lava con 100 ml de agua; se extrae la fase acuosa obtenida con dos veces 100 ml de acetato de etilo seguido de tres veces 100 ml de diclorometano. Se juntan todas las fases orgánicas, se evaporan a presión reducida y se depositan en una columna de gel de sílice (□ = 5 cm, h = 15 cm, d = 5 cm/min) utilizando como eluyente una mezcla diclorometano / metanol / amoníaco 90 / 10 / 1.

40 Al final se obtiene el compuesto 5 (2,11 g; Rdt = 80,1 %)

Eluyente CCM: diclorometano / metanol / amoníaco : 90 / 10 / 3

HPLC: método básico; TR = 4,8 minutos

45 RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 1,464 – 1,666 ppm (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 1,904 – 1,985 ppm (M, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 2,689 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3,753-4,115 ppm (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O); 7,540 ppm (t, 1H, Ar); 7,837 ppm (d, 1H, Ar); 8,147 ppm (d, 1H, Ar); 8,331 ppm (s, 1H, Ar).

Molécula 6

Se disuelve la biotina (6,00 g; 24,5 mmol) en DMF anhidra (60 ml; 10 v) y luego se añade bajo argón la piridina (2,44 ml; 30,0 mmol) seguida del trifluoroacetato de pentafluorofenilo (5,258 ml; 30,5 mmol); se calienta la mezcla durante 30 minutos a 40 °C y luego se deja que vuelva a temperatura ambiente durante la noche. Tras control, la reacción termina, se evapora la DMF y se retoma con 200 ml de diclorometano; el producto permanece en suspensión, se escurre, se enjuaga la torta con tres veces 5 ml de diclorometano y luego se seca en la estufa a vacío a 25 °C. Se obtiene un producto muy limpio en CCM (6,18 g; Rdt = 61,3 %).

Eluyente CCM: diclorometano / metanol: 90 / 10

HPLC: método básico; TR = 10,0 minutos

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 1,2 – 1,8 ppm (m, 6H); 2,3 – 3,4 ppm (m, 5H); 4,0 – 4,4 ppm (m, 2H); 6,1 – 6,6 ppm (m, 2H)

Molécula 7

Se disuelve el reactivo 5 (500 mg; 1,98 mmol) en una mezcla de DMF (5 ml; 10 v) a 60 °C y de trietilamina (2,22 ml; 15,8 mmol); paralelamente, se disuelve también el compuesto 6 en 4,9 ml de DMF a 60 °C. Se vierte la disolución de 6 sobre la disolución de 5 y se deja agitar una noche a temperatura ambiente. Se evapora a seco sin tratamiento complementario.

Molécula 8

Se pone a reaccionar la sustancia 7 (948 mg; 1,98 mmol) con ácido acético al 80 % (5 ml; 5,3 v) a reflujo durante 16 horas (nota: se puede utilizar ácido clorhídrico 6 M, mucho más reactivo). Se sigue la reacción por HPLC; es preciso que sea total. Se evapora el ácido acético por destilación a vacío y luego se retoma el residuo con 500 ml de mezcla de diclorometano / metanol en proporciones 90 / 10 y se lava con 250 ml de disolución de hidróxido de sodio 0,1 M. La fase orgánica así purificada se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora a seco. Se recupera el compuesto 8 (244,8 mg; 28,4 %). El producto se utiliza en bruto, tal cual, sin tratamiento adicional.

Eluyente CCM: no utilizado, imposible diferenciar el producto de partida del producto de llegada

HPLC: método básico, TR = 9,9 minutos

Molécula 9

Se retoma el compuesto 8 en una mezcla de DMF (2,49 ml; 12,3 v) y de metanol (12,5 ml; 51 v) y se añade a la misma ácido acético (640 µl; 11,1 mmol); el producto de partida no es soluble. Finalmente se pone hidracina (271 µl; 5,57 mmol), se solubiliza el reactivo y la disolución se hace amarilla. Después de 5 horas de agitación a temperatura ambiente, se evaporan todos los disolventes, se les co-evapora con tres veces 10 ml de agua. Se retoma el material en bruto de reacción en un tubo de 15 ml con 8 ml de agua milliQ a 5 °C, el producto precipita, se agita 30 segundos, luego se centrifuga el tubo a 8500 rpm durante 3 minutos, se aspira el sobrenadante y se vuelve a comenzar la operación dos veces. Después del último lavado se verifica el pH del agua; si está a 7, ya no hay trazas de ácido.

HPLC: método básico, TR = 8,4 minutos

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 1,1 – 1,9 ppm (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-); 2,085 ppm (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>); 2,50 – 2,90 ppm (m, 4H, biotina); 3,00 – 3,20 ppm (m, 3H); 3,30 – 3,40 ppm (m, 2H); 4,0 – 4,4 ppm (m, 2H, biotina); 6,30 y 6,50 ppm (2s, 2H, NH biotina); 7,23 ppm (s, 2H, NH); 7,866 ppm (d, 2H, Ar); 8,155 (s, 2H, Ar).

Molécula 10

Se añade el polvo 9 (250 mg, 0,56 mmol) a DMF (4,65 ml; 18,6 v) y se enfría a -5°C para añadirle la tetrametilguanidina (571 µl; 4,53 mmol), seguida de tamicos moleculares de 3Å (957 mg) y óxido de manganeso (3,03 g; 45,3 mmol). Se deja agitar la mezcla bajo atmósfera de argón durante 40 minutos a -5°C y luego se filtra el medio de reacción a través de un tapón de 1 cm de celita; el tapón se enjuaga a continuación con metanol hasta que el filtrado se hace incoloro. Se recupera este filtrado y se evapora a presión reducida (temperatura del baño: 35 °C máximo). Se retoma el residuo de evaporación en un tubo de 15 ml con 4 ml de mezcla 90 / 10 de diclorometano / metanol y luego se lava con 4 ml de una disolución de hidrogenocarbonato de sodio 0,1 M. Se elimina el sobrenadante, tras centrifugación. Se añaden a la fase de diclorometano 350 µl de metanol y 4 ml de hidrogenocarbonato de sodio, se mezcla, se decanta, se elimina la fase acuosa, se seca la fase orgánica final con carbonato de sodio anhidro, se filtra y el filtrado se evapora a seco a presión reducida. Se obtiene un polvo naranja (196,8 mg; Rdt = 79,3 % en las dos últimas etapas).

HPLC: método básico, TR = 11,05 minutos

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 1,1 – 1,9 ppm (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-); 2,058 ppm (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>); 2,4 – 3,4 ppm (m, 7H); 3,0 – 3,2 ppm (m, 5H); 4,0 – 4,3 ppm (m, 2H, biotina); 6,33 y 6,40 ppm (2s, 2H, NH biotina); 7,36 ppm (d, 1H, Ar); 7,50 – 7,70 ppm (m, 2H, Ar+NH); 7,80 – 7,90 ppm (m, 3H, Ar).

Resultados y conclusiones:

Hemos mostrado que la síntesis de una tercera generación de moléculas era posible. Esta síntesis es mucho más sencilla que las asociadas a las generaciones de moléculas precedentes.

5 Así, las moléculas de segunda generación necesitan una síntesis en once etapas relativamente complejas y laboriosas.

Por otra parte, la vía de síntesis de las moléculas de segunda generación es poco versátil. La nueva vía de síntesis que es el objeto de la invención es mucho más versátil; es decir, se pueden usar otros sustratos aromáticos siguiendo la misma vía para aumentar la diversidad de las moléculas finales.

**Ejemplo 2: síntesis de la para nitro DCB**10 Objetivo

Demostrar la factibilidad de la síntesis de una molécula DCB: la para nitro DCB.

Modo operatorio:

15 La síntesis propiamente dicha se presenta en la figura 3. El producto de partida es el para-nitrocloruro de bencilo (Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Francia). Las diferentes moléculas sintetizadas después a partir de dicho producto siguen exactamente los modos operatorios descritos en el ejemplo 1

## Molécula 11

Eluyente CCM: diclorometano / metanol: 95 / 5

HPLC: método básico; TR = 1,8 minutos

20 RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 2,40 – 2,90 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O); 4,432 ppm (M, 2H, CH<sub>2</sub>O); 5,153 ppm (t, 1H, C=O-CH-C=O); 8,303 ppm (d, 2H, Ar); 8,382 (d, 2H, Ar).

EM: [M-H<sup>+</sup>] a m/z = 234,3.

## Molécula 12

Eluyente CCM: diclorometano / metanol: 95 / 5

HPLC: método básico; TR = 13,9 minutos

25 RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 2,189 ppm (qu, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Br); 3,177 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 3,624 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CO); 8,217 ppm (d, 2H, Ar); 8,334 (d, 2H, Ar).

## Molécula 13

Eluyente CCM: ciclohexano / acetato de etilo: 85 / 15

HPLC: método básico; TR = 15,5 minutos

30 RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 1,80 – 2,10 ppm (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Br); 3,415 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 3,767 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>-O); 4,077 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>-O); 7,669 ppm (d, 2H, Ar); 8,186 (d, 2H, Ar).

## Molécula 14

HPLC: método básico; TR = 15,1 minutos

35 RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,50 -1,65 ppm (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N); 3,65 – 3,70 ppm (m, 4H, CH<sub>2</sub>O y CH<sub>2</sub>N); 4,00 – 4,10 ppm (M, 2H, CH<sub>2</sub>-O); 7,55 – 7,65 (M, 2H, Ar); 7,65 – 7,75 ppm (M, 2H, ftalimida); 7,80 – 7,90 ppm (M, 2H, ftalimida); 8,192 ppm (M, 21H, Ar).

## Molécula 15

Eluyente CCM: diclorometano / metanol / amoníaco: 90 / 10 / 3

HPLC: método básico; TR = 5,0 minutos

40 RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 1,30 – 1,60 ppm (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 1,80 - 2,00 ppm (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 2,678 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3,769 ppm (M, 2H, O-CH<sub>2</sub>); 4,060 ppm (M, 2H, O-CH<sub>2</sub>); 7,66 ppm (M, 2H, Ar); 8,177 ppm (M, 2H, Ar).

## Molécula 17

HPLC: método básico; TR = 9,1 minutos

Eluyente CCM: diclorometano / metanol: 90 / 10

## Molécula 18

5 Eluyente CCM: no utilizado, imposible diferenciar el producto de partida del de llegada

HPLC: método básico; TR = 9,0 minutos

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 1,2 – 1,7 ppm (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-); 2,093 ppm (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>); 2,4 – 3,0 ppm (m, 2H, biotina); 3,0 – 3,2 ppm (m, 5H); 4,0 – 4,4 ppm (m, 2H, biotina); 6,34 y 6,40 ppm (2s, 2H, NH biotina); 7,70 – 7,90 ppm (m, 2H, Ar+NH); 8,20 – 8,50 ppm (m, 2H, Ar); 8,63 ppm (s, 1H, Ar)

## 10 Molécula 19

HPLC: método básico; TR = 8,2 minutos

## Molécula 20

HPLC: método básico; TR = 10,7 minutos

15 RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): 1,2 – 1,9 ppm (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-); 2,066 ppm (t, 2H, CO-CH<sub>2</sub>); 2,5 – 3,0 ppm (m, 4H); 3,0 – 3,2 ppm (m, 2H); 4,00 – 4,40 ppm (m, 2H, biotina); 6,36 y 6,42 ppm (2s, 2H, NH biotina); 7,19 ppm (d, 2H, Ar); 7,875 ppm (t, 1H, NH); 8,133 ppm (d, 2H, Ar)

Resultados y conclusiones

20 Las etapas de síntesis de la molécula de para nitro DCB son idénticas a las descritas precedentemente para la síntesis de la molécula de meta nitro DCB; basta para ello con comenzar con una molécula de para-nitrocloruro de bencilo, denominada cloruro de 4-nitrobenzoilo, en lugar de la molécula de meta-nitrocloruro de bencilo, denominada cloruro de 3-nitrobenzoilo.

**Ejemplo 3: Demostración de la estabilidad de la meta o para nitro DCB respecto de una molécula de BBP (bis-bio-PDAM) en medio líquido y a temperatura ambiente**Objetivo

25 Demostrar la estabilidad en medio líquido de las moléculas de DCB en comparación con una molécula de segunda generación. Para ello se realiza un estudio de estabilidad acelerada en condiciones extremas en las que los compuestos se conservan a 125 mM en una mezcla de DMSO y metanol (96 / 4) a temperatura ambiente (22 °C +/- 1 °C). Hay que notar que éstas son condiciones extremas de conservación.

Modo operatorio

30 Se solubilizan los tres compuestos meta nitro DCB, para nitro DCB y BBP, representados en la figura 10, a 125 mM en una mezcla DMSO / metanol 96 / 4 y se conservan a temperatura ambiente (22 °C más o menos 1 °C). Se inyectan entonces 2 µl de estas disoluciones de manera regular en un equipo HPLC (método básico, marca HPLC Waters), con el fin de medir la degradación del producto principal por integración del conjunto de los picos del cromatograma (PDA Max Plot en el programa Empower 2). Se reporta entonces la evolución de la pureza del compuesto inicial en función del tiempo, como está representado en la figura 4.

Resultados y conclusiones

40 Se demuestra sin ambigüedad que el BBP se degrada en algunos días (< 10 % de pureza al cabo de 10 días) mientras que las DCB permanecen mucho más estables (> 40 % de pureza tras 2 meses de conservación para el para nitro DCB). La combinación del motivo o unidad de repetición nitro-aril en alfa y del marcador en alfa' de la función diazo estabiliza esta última, a la vez por una deslocalización electrónica y por un efecto estérico que hacen la función diazo menos susceptible a la hidrólisis.

**Ejemplo 4: Demostración de la estabilidad de la meta o para nitro DCB respecto de una molécula BBP, en forma seca y a 4 °C**Objetivo

45 Demostrar la estabilidad en seco de las moléculas DCB en comparación con una molécula BBP de segunda generación

Modo operatorio

- 5 Los tres compuestos meta nitro DCB, para nitro DCB y BBP se solubilizan a 250 mM en una disolución de Tris HCl 10 mM pH 7,5 y de trehalosa al 10 %. Las disoluciones se liofilizan durante una noche en partes alícuotas de 50 nmol. A continuación, se conservan los productos secos a 4 °C. De manera regular, se solubilizan estas alícuotas en metanol y se inyectan en un equipo HPLC (Waters) 15 µl de estas disoluciones, con el fin de medir la degradación del producto principal por integración del conjunto de los picos del cromatograma (PDA Max Plot en el programa Empower). Se reporta entonces la evolución de la pureza del compuesto inicial en función del tiempo, como está bien representado en la figura 5.

Resultados y conclusiones

- 10 De la misma manera que en el ejemplo 3, pero de forma todavía más notable, se demuestra que el BBP no soporta la liofilización (degradación > 60 % durante esta etapa) mientras que las DCB permanecen perfectamente estables y en particular, la meta nitro DCB. Una vez más se demuestra que la combinación de la unidad de repetición nitro-arilo en alfa de la función diazo y del marcador en alfa' estabiliza de manera considerable esta función haciéndola menos susceptible a la hidrólisis.
- 15 **Ejemplo 5: marcado de ácidos nucleicos por la meta o la para nitro DCB respecto de una molécula de BBP con purificación intermedia**

Objetivo

Demostrar la eficacia del marcado de los ácidos nucleicos con moléculas DCB en comparación con una molécula de segunda generación (BBP).

- 20 Para ello, se marcan con biotina mediante reacción con las DCB amplicones de ARN, fragmentos de la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis* de 174 bases, obtenidos de una reacción de amplificación (NASBA, kit Nuclisens Basic Kit de bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos). Los productos de la reacción de marcado se detectan por hibridación en un chip o micromatriz de ADN de Affymetrix (Custom DNA Chip Combo Myco descrito en J. Clin. Microbiol., 37 (1), páginas 49 – 55, A. Troesch et al., 1999).

Modo operatorio

En un tubo se mezclan:

- 18 µl de disolución de marcador de 250 mM (DMSO / metanol, 96 / 4), ya sea bien DCB o bien BBP;
- 12 µl de DMSO;
- 15 µl de tampón NASBA 0,5X (kit "Nuclisens Basic Kit Easy Q bioMérieux");
- 30 • 35 µl de Tris HCl 1 M;
- 5 µl de NASBA 0,1X (reacción de amplificación NASBA diluida diez veces, amplicón de 174 bases);
- 15 µl de HCl 20 mM o 15 µl de agua y
- 15 µl de agua con el fin de usarlo como testigo sin HCl.

La disolución se mezcla con vórtice y luego se incuba 10 minutos a 65 °C.

35 Purificación de los ácidos nucleicos:

Los ácidos nucleicos marcados se han purificado en columna QiaQuick (kit de purificación PCR QiaQuick, Qiagen, Hilden, Alemania), utilizando el protocolo de purificación recomendado por el fabricante. El volumen de elución es de 100 µl.

Hibridación en chip o micromatriz de ADN:

- 40 Tras la purificación, se transfieren los ácidos nucleicos marcados a 400 µl de tampón de hibridación. Las muestras se hibridan en las micromatrices de ADN concebidas para el análisis de la secuencia M20940 "GenBank" del ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Este chip o micromatriz de ADN está descrito por A. Troesch *et al.* y publicado en J. Clin. Microbiol., 37 (1), páginas 49 – 55, 1999.

- 45 Las etapas de hibridación se han realizado en las estaciones fluidicas FS 450 (Affymetrix, Santa Clara, California, Estados Unidos), utilizando el protocolo de hibridación y los tampones descritos en la publicación antes citada de A. Troesch *et al.*

La hibridación se revela por el acoplamiento de la estreptavidina (SA) marcada con ficoeritrina (PE), que interacciona con la biotina de los marcadores utilizados en las siguientes condiciones: 300 µl de agua pura ; 300 µl de tampón Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1 M / tween 20 0,05 % / antiespumante 0,005 %; 6 µl de BSA (50 mg/ml); 6 µl de SA-PE (300 µg/ml).

5

*Lectura de la micromatriz de ADN:*

La lectura de la fluorescencia emitida en la superficie de la micromatriz de ADN tras el marcado y la hibridación, así como la generación de los datos en términos de intensidad de señal y de porcentaje de homología se realizan por los sistemas de lectura y el programa proporcionados por Affymetrix (Scanner Gene Chip Array y programa GCOS). El sistema de lectura proporciona intensidades en señal y en ruido de fondo expresadas en ufr (“unidades de fluorescencia relativa”). El porcentaje de homología (% BC igual a % Right en la figura 6, así como posteriormente en las figuras 7 y 9) viene dado respecto de una secuencia de referencia que en este caso es la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

10

15

Los resultados, en términos de intensidad mediana de la señal (Median), de ruido de fondo (Med Bgd) y de porcentaje de homología (% Right) se dan en el gráfico de la figura 6 para los marcadores BBP, meta nitro DCB y para nitro DCB.

Resultados y conclusiones

De manera general, lo que se busca, de manera prioritaria, es un porcentaje de homología superior al 90 %. En segundo lugar, lo que se desea es una señal específica elevada y un ruido de fondo débil.

20

Este ejemplo muestra que, en ausencia de ácido clorhídrico añadido, el marcador meta nitro DCB presenta los mejores resultados. En presencia de 3 mM de ácido clorhídrico añadidos, los marcadores meta nitro DCB y para nitro DCB presentan mejores resultados que el marcador BBP de referencia.

25

En todos los casos, y teniendo en cuenta la muy grande estabilidad de las DCB, estos últimos marcadores muestran su superioridad respecto de las moléculas de generaciones precedentes, ya que su capacidad de marcado es al menos igual si no superior a la de la molécula de referencia BBP de segunda generación.

**Ejemplo 6. Marcado de ácidos nucleicos por la meta o la para nitro DCB respecto de una molécula de BBP sin purificación intermedia.**

Objetivo

30

Se busca demostrar lo mismo que en el ejemplo 5, pero situándose en condiciones desfavorables, en las que el exceso de marcador no se ha purificado.

Modo operatorio

En un tubo de 1 ml se mezclan:

35

- 5 µl de disolución de marcador con 8 mM (DMSO / metanol, 96 / 4), ya sea bien DCB o bien BBP;
- 5 µl de NASBA 0,1X (kit Nuclisens Basic Kit de bioMérieux);
- 5 µl de Tris HCl 1 M y
- 5 µl de HCl 20 mM

La disolución se mezcla con vórtice y luego se incuba a 65 °C durante 10 minutos. Los ácidos nucleicos así marcados no se purifican, sino que se hibridan directamente.

*Hibridación en micromatriz de ADN:*

40

Los ácidos nucleicos marcados se transfieren sin purificación a 480 µl de tampón de hibridación. Las muestras se hibridan en las micromatrices de ADN de la misma forma que en el ejemplo precedente.

*Lectura de la micromatriz de ADN:*

Los resultados, en términos de intensidad, de ruido de fondo y de porcentaje de homología, se presentan en el gráfico de la figura 7, para los marcadores BBP, meta nitro DCB y para nitro DCB.

45

Resultados y conclusiones

Este ejemplo muestra que los marcadores meta nitro DCB y para nitro DCB presentan, debido a su estructura, ruidos de fondo aminorados respecto de la molécula de referencia BBP. Las señales específicas también se mejoran (en especial para la para nitro DCB) y el porcentaje de homología, relativamente bajo para el BBP, se hace muy importante para la meta nitro DCB.

- 5 Una vez más, se demuestra la superioridad de las moléculas de tercera generación respecto de las de las generaciones precedentes.

**Ejemplo 7: Evaluación de la estabilidad durante 24 h de un amplicon marcado con meta o para nitro DCB**

Objetivo:

- 10 Se pretende demostrar que un amplicon de ARN marcado se puede hibridar hasta 24 h en una micromatriz de ADN sin perder su intensidad de fluorescencia. Lo cual demuestra la estabilidad del enlace ARN-marcador.

Modo operatorio:

En un tubo se mezclan:

- 5 µl de disolución de marcador (meta nitro DCB o para nitro DCB) de 10 mM en mezcla DMSO / metanol (96 / 4);
- 15 • 5 µl de producto de amplificación NASBA 0,1X (kit Nuclisens Basic Kit de bioMérieux);
- 5 µl de Tris HCl 1 M y
- 5 µl de agua

La disolución se mezcla con vórtice y luego se incuba a 65 °C durante 10 minutos.

*Purificación de los ácidos nucleicos:*

- 20 Los ácidos nucleicos marcados se han purificado en columna QiaQuick (kit de purificación PCR, Qiagen), utilizando el protocolo de purificación recomendado por el fabricante. El volumen de elución es de 100 µl.

*Hibridación en micromatriz de ADN:*

- 25 Tras la purificación, se transfieren los ácidos nucleicos marcados a 400 µl de tampón de hibridación. Las muestras se hibridan en las micromatrices de ADN concebidas para el análisis de la secuencia M20940 "GenBank" del ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Este chip o micromatriz de ADN está descrito por A. Troesch *et al.* y publicado en J. Clin. Microbiol., 37 (1), páginas 49 – 55, 1999.

Las etapas de hibridación se han realizado inyectando 80 µl de mezcla de hibridación en la micromatriz y manteniendo luego ésta en un horno de hibridar a 45 °C durante 0,5 horas, 2 horas, 6,5 horas o 24 horas.

- 30 La hibridación se revela por el acoplamiento de la estreptavidina (SA) marcada con ficoeritrina (PE), que interacciona con la biotina de los marcadores utilizados en las siguientes condiciones: 300 µl de agua pura ; 300 µl de tampón Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1 M / tween 20 0,05 % / antiespumante 0,005 %; 6 µl de BSA (50 mg/ml); 6 µl de SA-PE (300 µg/ml).

*Lectura de la micromatriz de ADN:*

- 35 La lectura de la fluorescencia emitida en la superficie de la micromatriz de ADN tras el marcado y la hibridación, así como la generación de los datos en términos de intensidad de señal y de porcentaje de homología se realizan por los sistemas de lectura y el programa proporcionados por Affymetrix. El sistema de lectura proporciona intensidades en señal y en ruido de fondo expresadas en ufr ("unidades de fluorescencia relativa"). El porcentaje de homología viene dado respecto de una secuencia de referencia que en este caso es la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

- 40 Los resultados, en términos de intensidad mediana de la señal (Median), en función de la duración de hibridación, se dan en la figura 8 para los marcadores meta nitro DCB (también denominada m-NO<sub>2</sub>-DCB) y para nitro DCB (también denominada p-NO<sub>2</sub>-DCB). Muestran que la señal de fluorescencia permanece estable e que incluso tiene tendencia a subir en función de la duración de hibridación.

Resultados y conclusiones:

- 45 Este ejemplo muestra que los amplicones marcados con la meta nitro DCB o la para nitro DCB permanecen perfectamente estables en el curso de la hibridación que se puede prolongar durante 24 h (interés particular para las hibridaciones largas y expresión de los genes en cancerología); véase la figura 8.

Incluso se observa un aumento de la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo que se debe a una mejor hibridación de los amplicones (la cinética de hibridación es lenta).

De este modo, se demuestra la estabilidad del enlace marcador – ácido nucleico.

5 **Ejemplo 8: Comparación de la eficacia de marcado de las moléculas descritas en la presente invención con la de una tecnología disponible comercialmente (ULS RNA Labelling Kit, Kreatech, Países Bajos)**

Modo operatorio:

Se preparan los amplicones de ARN mediante una amplificación NASBA como se ha descrito precedentemente y se marcan con las moléculas BBP, p-NO<sub>2</sub>-DCB y m-NO<sub>2</sub>-DCB.

10 En un tubo, se mezclan:

- 5 µl de NASBA 1X (kit Nuclisens Basic Kit de bioMérieux);
- 5 µl de disolución de marcador de 20 mM (BBP, p-NO<sub>2</sub>-DCB o m-NO<sub>2</sub>-DCB en mezcla DMSO / metanol (96 / 4));
- 5 µl de Tris HCl 1 M pH 7,4 y
- 15 • 5 µl de agua

La disolución se mezcla con vórtice y luego se incuba a 65 °C durante 10 minutos.

Para el marcado con el kit comercial de Kreatech, se ha seguido el protocolo recomendado por el proveedor. En resumen, se mezclan:

- 20 µl de NASBA 1X (kit Nuclisens Basic Kit de bioMérieux);
- 20 • 1 µl de disolución de marcador;
- 3 µl de tampón 10x y
- 6 µl de agua

La disolución se incubó a 85 °C durante 30 minutos.

*Purificación de los ácidos nucleicos:*

25 Los ácidos nucleicos marcados con ayuda de las moléculas BBP, p-NO<sub>2</sub>-DCB o m-NO<sub>2</sub>-DCB se han purificado en columna QiaQuick (kit de purificación PCR, Qiagen), utilizando el protocolo de purificación recomendado por el fabricante. El volumen de elución es de 100 µl.

30 Para los ácidos nucleicos marcados con ayuda del kit comercial, se ha utilizado la purificación recomendada y proporcionada por Kreatech. El volumen final es de 30 µl a los cuales se les añaden 100 µl de una disolución de bloqueo recomendada por esta empresa.

*Hibridación en micromatriz de ADN:*

35 Tras la purificación, se transfieren los ácidos nucleicos marcados a 400 µl de tampón de hibridación (BBP, p-NO<sub>2</sub>-DCB o m-NO<sub>2</sub>-DCB) o a 370 µl de tampón de hibridación (Kreatech). Dichos ácidos nucleicos se hibridan en las micromatrices de ADN concebidas para el análisis de la secuencia M20940 “GenBank” del ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*.

Este chip o micromatriz de ADN está descrito en la publicación de A. Troesch *et al.*, J. Clin. Microbiol., 37 (1), páginas 49 – 55, 1999. Las etapas de hibridación se han realizado en las estaciones fluidicas (Affymetrix FS 450) utilizando el protocolo de hibridación y los tampones descritos en esa publicación de A. Troesch *et al.*

40 La hibridación se revela por el acoplamiento de la estreptavidina (SA) marcada con ficoeritrina (PE), que interacciona con la biotina de los marcadores utilizados en las siguientes condiciones: 300 µl de agua pura; 300 µl de tampón Tris 100 mM pH 7 / NaCl 1 M / tween 20 0,05 % / antiespumante 0,005 %; 6 µl de BSA (50 mg/ml); 6 µl de SA-PE (300 µg/ml).

*Lectura de la micromatriz de ADN:*



5 La lectura de la fluorescencia emitida en la superficie de la micromatriz de ADN tras el marcado y la hibridación, así como la generación de los datos en términos de intensidad de señal y de porcentaje de homología se realizan por los sistemas de lectura y el programa proporcionados por Affymetrix (Gene Chip Array y programa GCOS). El sistema de lectura proporciona intensidades de señal y de ruido de fondo expresadas en ufr (“unidades de fluorescencia relativa”). El porcentaje de homología está dado respecto de una secuencia de referencia que en este caso es la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis*. En la figura 9, se dan los resultados en términos de intensidad mediana de señal, (Median), de ruido de fondo (Med Bgd) y de porcentaje de homología (%BC), para los marcadores BBP, m-NO<sub>2</sub>-DCB y p-NO<sub>2</sub>-DCB, así como para el kit de la competencia.

10 Resultados y conclusiones

15 Se constata que la tecnología que utiliza los marcadores de cis-platino de Kreatech (aplicada exactamente en las condiciones descritas por el proveedor) tiene un potencial de marcado notablemente inferior a la solución técnica aportada por la presente invención, puesto que es preciso añadir más de cuatro veces la concentración de ARN para tener una señal claramente destacada del ruido de fondo en el caso de Kreatech (figura 9), pero que en todos los casos es más de diez veces más débil que el marcado realizado con las moléculas DCB o BBP.

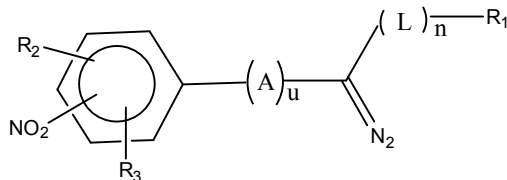
En todos los casos, se mantiene el mismo porcentaje de identificación (% BC).

En consecuencia, el marcado en los enlaces internucleosídicos en comparación con otra técnica de marcado permite una sensibilidad de detección mucho mejor y ello cualesquiera que sean las generaciones de moléculas.

20

**REIVINDICACIONES**

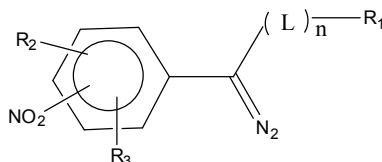
1. Reactivo de marcado de fórmula (A):



5 en la cual:

- $R_1$  representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí mediante al menos una estructura multimérica;
- $R_2$  y  $R_3$  representan, de manera independiente uno del otro: H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R_4\text{-(L)}_n\text{-Y-X}$ , OR, SR,  $\text{NR}^2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$  o  $\text{COOR}$ , con R = grupo alquilo o arilo y  $R_4$  representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí mediante al menos una estructura multimérica;
- L es un brazo de enlace que tiene un encadenamiento lineal de al menos dos enlaces covalentes y
- n es un número entero igual a 1;
- A es un brazo de enlace que tiene al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el ciclo aromático;
- u es un número entero comprendido entre 0 y 2 y
- -Y-X- representa  $\text{-CONH-}$ ,  $\text{-NHCO-}$ ,  $\text{CH}_2\text{O-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{S-}$ .

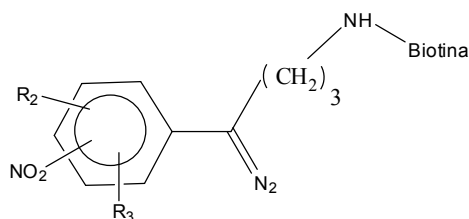
2. Reactivo de marcado, según la reivindicación 1, de fórmula (C):



20 en la cual:

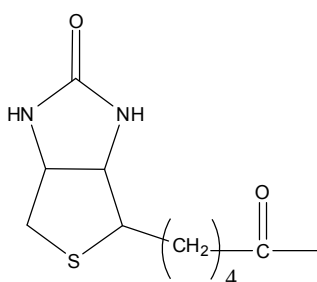
- $R_1$  representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí mediante al menos una estructura multimérica;
- $R_2$  y  $R_3$  representan, de manera independiente uno del otro: H,  $\text{NO}_2$ , Cl, Br, F, I,  $R_4\text{-(L)}_n\text{-Y-X}$ , OR, SR,  $\text{NR}^2$ , R,  $\text{NHCOR}$ ,  $\text{CONHR}$  o  $\text{COOR}$ , con R = grupo alquilo o arilo y  $R_4$  representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí mediante al menos una estructura multimérica;
- L es un brazo de enlace que tiene un encadenamiento lineal de al menos dos enlaces covalentes y
- n es un número entero igual a 1 y
- -Y-X- representa  $\text{-CONH-}$ ,  $\text{-NHCO-}$ ,  $\text{CH}_2\text{O-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{S-}$ .

30 3. Reactivo de marcado, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, de fórmula (E):



4. Reactivo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el grupo nitro está en posición meta o para.

5. Reactivo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque R<sub>1</sub> está constituido por un resto de D-biotina de fórmula (F):



6. Procedimiento de síntesis de un reactivo de marcado, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas siguientes:

- a) se hace reaccionar un derivado de ácido carboxílico con el enolato de una lactona (reacción de tipo Claisen) para formar un precursor cíclico;
- b) a continuación dicho precursor cíclico se abre con un ácido halogenado para formar una cetona aromática halogenada;
- c) la función carbonilo de la cetona aromática halogenada se protege con un grupo protector para formar un precursor protegido;
- d) dicho precursor protegido se somete a una reacción de aminación (de tipo Gabriel) para formar un precursor aminado;
- e) dicho precursor aminado se desprotege para liberar la función amina; dicha función amina se hace reaccionar con un marcador detectable cuya función carboxílica se activa para formar un precursor que tiene un marcador detectable;
- f) el precursor marcado se somete a una reacción de desprotección de la función carbonilo, para formar un precursor marcado y carbonilado y, por último,
- g) el precursor marcado y carbonilado se transforma en un reactivo de marcado, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, mediante una transformación de la función carbonilo en una función diazo (del tipo Banworth Stevens).

7. Procedimiento para el marcado de una molécula biológica, que comprende poner en contacto en disolución homogénea, en un tampón sensiblemente acuoso, una molécula biológica y un reactivo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

8. Molécula biológica marcada por el procedimiento según la reivindicación 7.

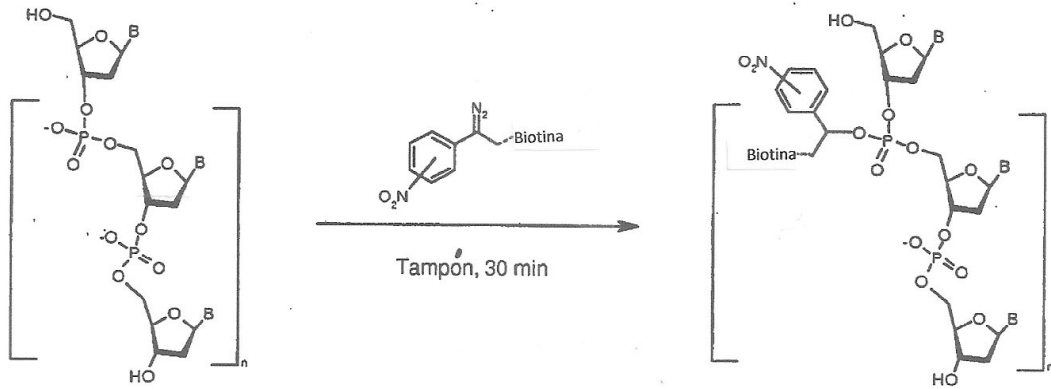
9. Procedimiento de marcado y de fragmentación de un ácido nucleico de una o de doble hélice que comprende las etapas siguientes:

- fragmentar el ácido nucleico;

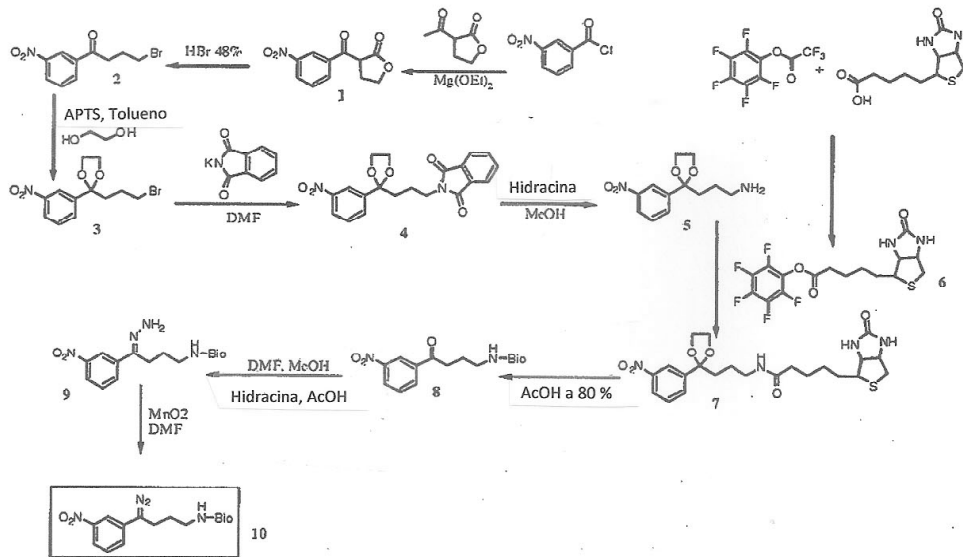
- unir un marcador sobre al menos uno de los fragmentos por intermedio de un reactivo de marcado escogido entre los reactivos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

acoplándose dicho reactivo de manera covalente y mayoritaria sobre al menos un fosfato de dicho fragmento.

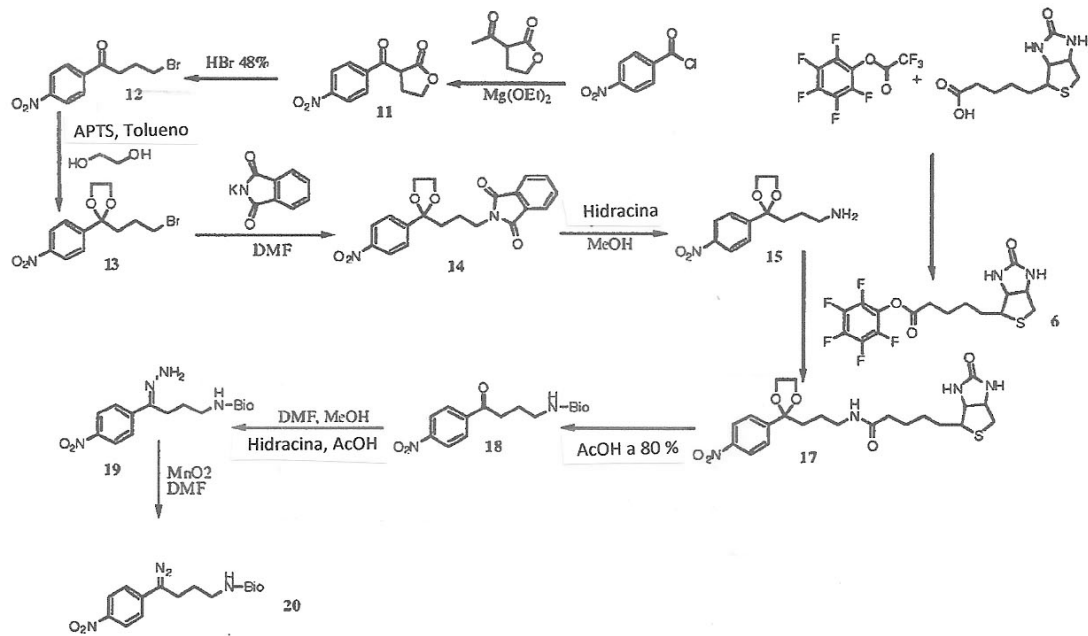
- 5 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, caracterizado porque la fragmentación y el marcado se efectúan en dos etapas.
11. Procedimiento, según la reivindicación 9, caracterizado porque la fragmentación y el marcado se efectúan en una etapa.
12. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque el marcado se efectúa en disolución homogénea sensiblemente acuosa.
- 10 13. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque la fragmentación se efectúa por vía enzimática, física o química.
14. Ácido nucleico marcado mediante el procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13.
15. Kit de detección de un ácido nucleico objetivo que comprende un ácido nucleico marcado, según la reivindicación 14.
- 15 16. Soporte sólido sobre el cual se fija un reactivo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
17. Procedimiento de captura de ácidos nucleicos que comprende las etapas siguientes:
- se dispone de un soporte sólido sobre el cual se fija directa o indirectamente al menos una molécula biológica, según la reivindicación 8 o un ácido nucleico, según la reivindicación 14; la molécula biológica o el ácido nucleico comprenden una función diazometilo;
- 20
- se pone en contacto una muestra biológica susceptible de contener ácidos nucleicos libres y
  - se lava el soporte sólido donde la o las moléculas se fijan de manera covalente al menos a un ácido nucleico.



**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

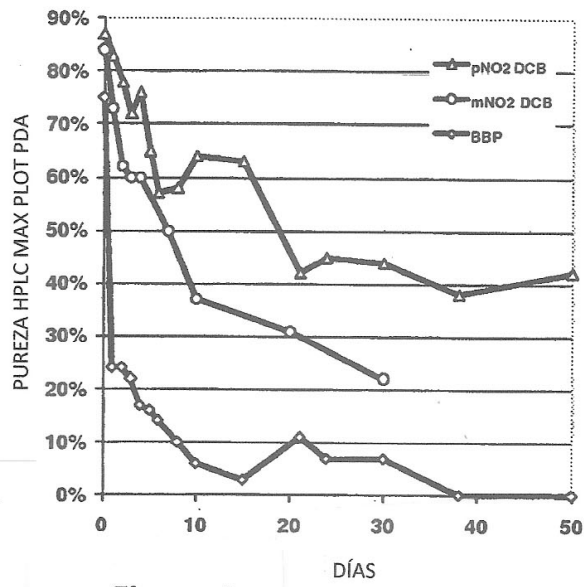
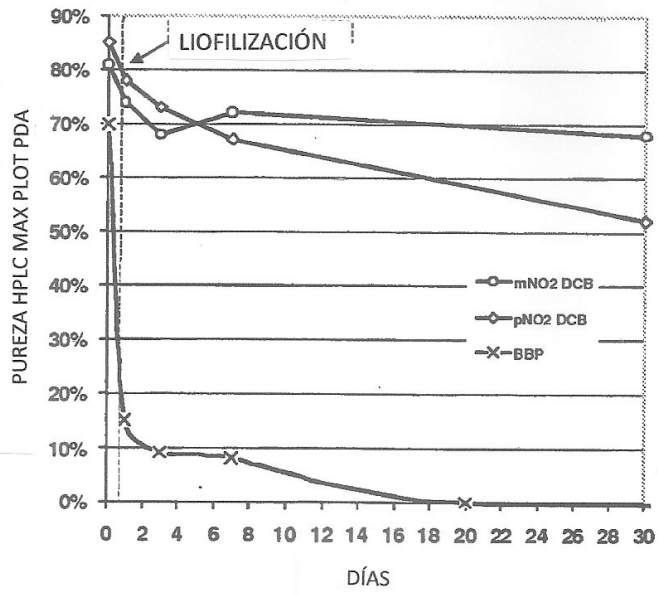
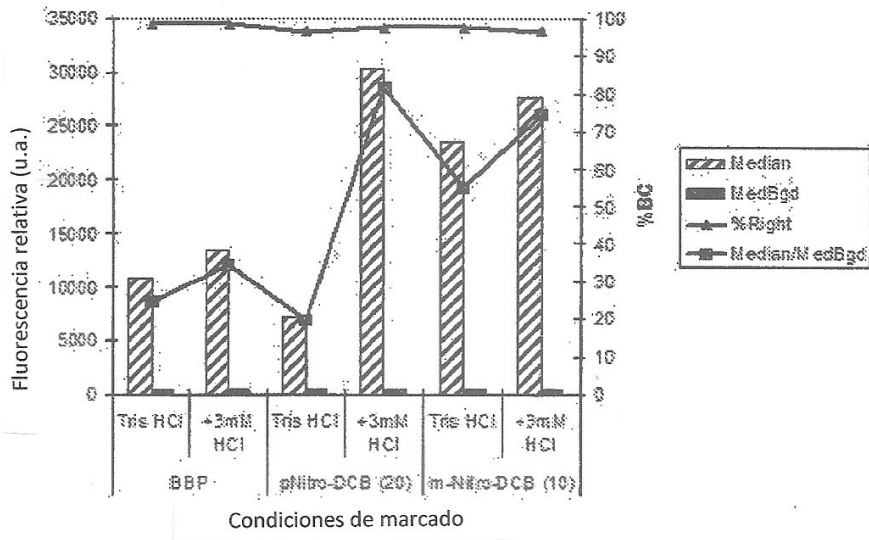


Figura 4

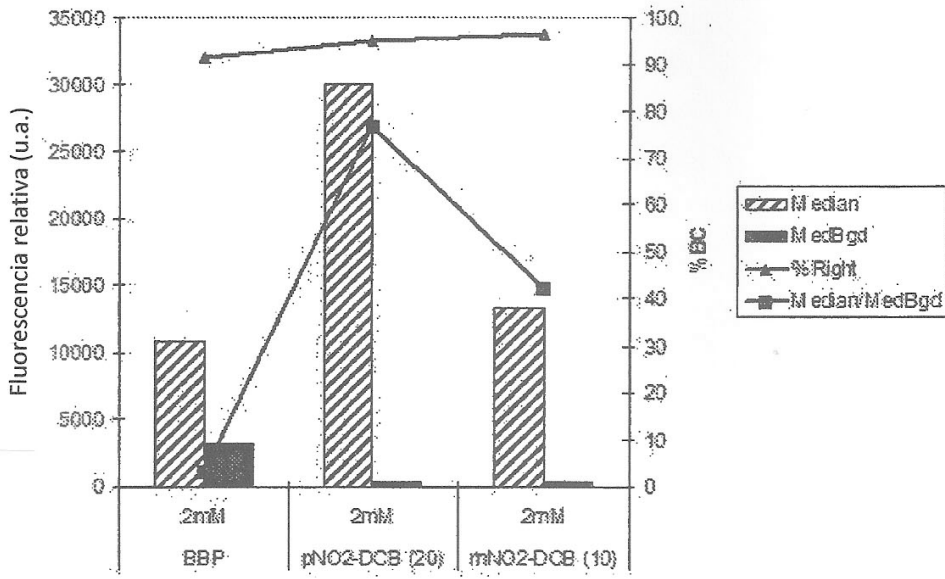
Figura 5



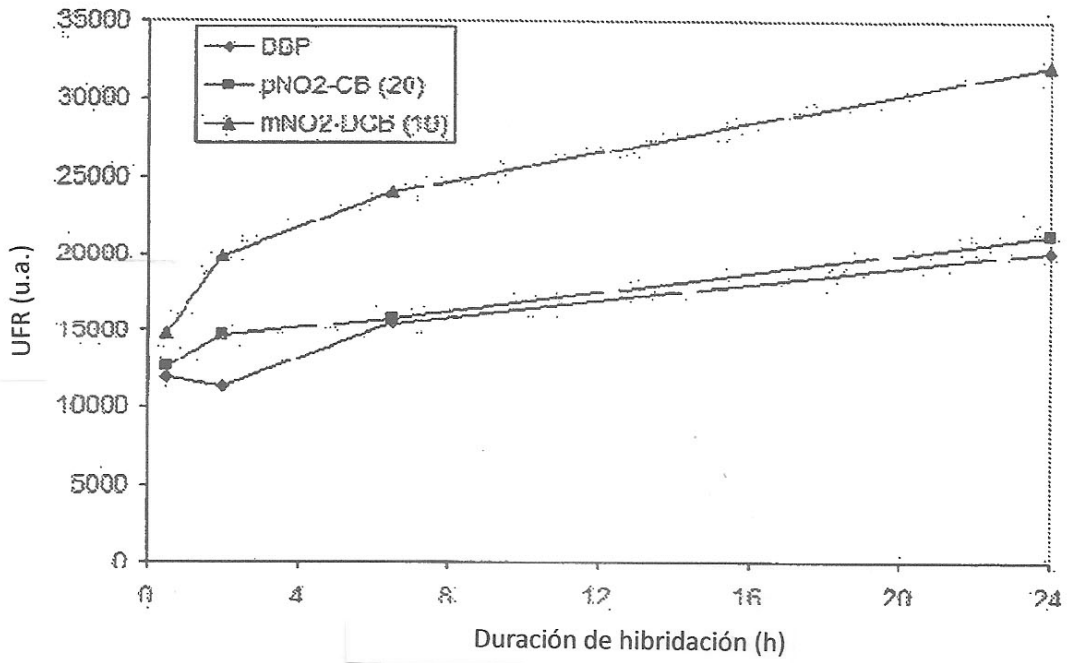


**Figura 6**

**Figura 7**

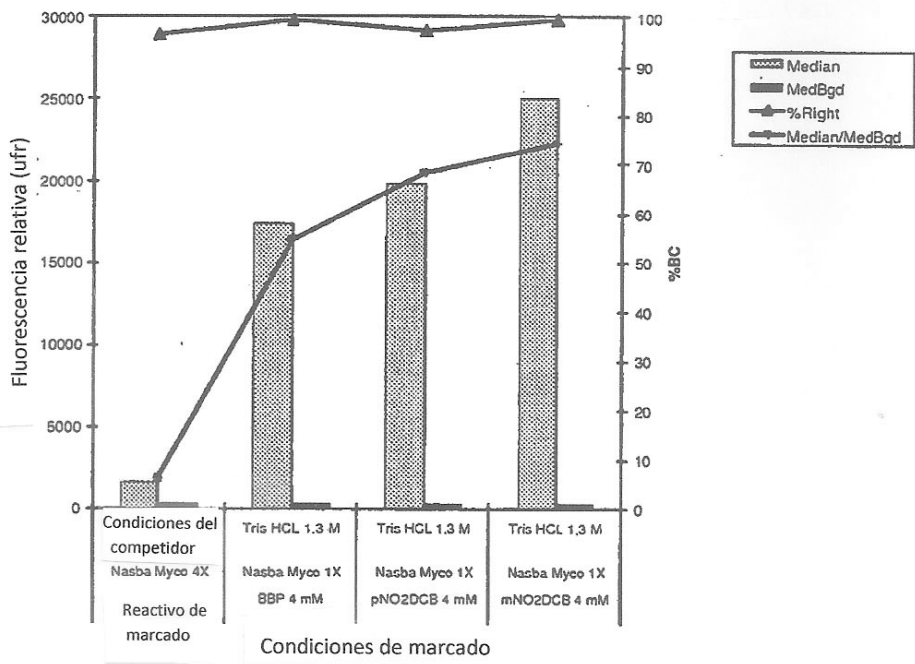


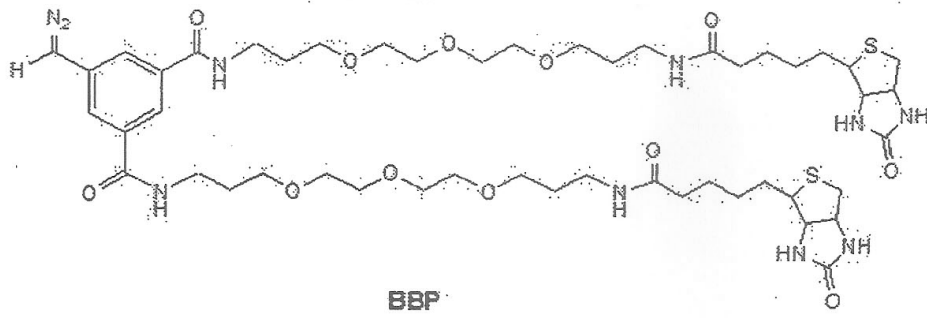
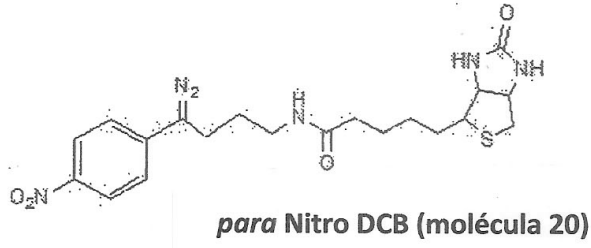
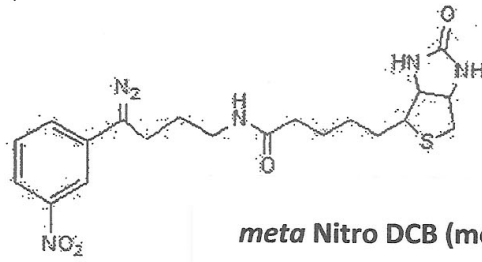




**Figura 8**

**Figura 9**





**Figura 10**