

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 088**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2011** **E 11773415 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014** **EP 2630255**

54 Título: **Conjugado entre una fase sólida tiofílica y un oligonucleótido que comprende un tioxonucleótido**

30 Prioridad:

22.10.2010 EP 10188515

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

04.12.2014

73 Titular/es:

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

BUDOW, SIMONE;
DING, PING;
HEINDL, DIETER;
NICHTL, ALFONS y
SEELA, FRANK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 524 088 T3

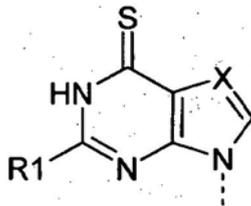
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Conjugado entre una fase sólida tiofílica y un oligonucleótido que comprende un tiooxonucleótido

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a un conjugado de oligonucleótido-fase sólida, en el que la fase sólida es tiofílica, en el que el oligonucleótido comprende por lo menos una tiooxonucleobase según la fórmula I:



10 en la que X es CH o N, en la que R¹ es H o NH₂, en la que --- indica un enlace covalente, y en el que dicho oligonucleótido se une a dicha fase sólida mediante el átomo de azufre de dicho tiooxonucleótido. Da a conocer además un método para producir dicho conjugado, así como diversos usos para dicho conjugado de oligonucleótido-metal.

15 La conjugación de biomoléculas con superficies sólidas es una etapa crucial, por ejemplo en muchas aplicaciones diagnósticas, tales como en un inmunoensayo o en una matriz de ácidos nucleicos, requiriendo ambos la unión de una biomolécula a una fase sólida. Se encuentran disponibles materiales bastante diferentes de fase sólida para las diversas aplicaciones diferentes, tales como las superficies o partículas de poliestireno o látex, aunque también superficies recubiertas de metal, partículas metálicas y puntos cuánticos, entre otros.

20 Entre las nanopartículas metálicas accesibles, los puntos cuánticos y las nanopartículas de oro (NPAu) han ganado particular atención debido a que son químicamente inertes y la facilidad de modificación superficial (Mitchell, G.P. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 121:8122-8123, 1999; Mahtab, R. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 117:9099-9100, 1995; Mahtab, R. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 122:14-17, 2000; Reynolds III, R.A. *et al.*, Pure Appl. Chem. 72:229-235, 2000; Thanh, N.T. *et al.*, Anal. Chem. 74:1624-1628, 2002; Csáki, A. *et al.*, Exp. Rev. Mol. Diagn. 2:187-193, 2002; Thaxton, C.S. y Mirkin, C.A., en: Nanobiotechnology, Niemeyer, C.M. y Mirkin, C.A. (eds.), Wiley-VCH, Weinheim, páginas 288 a 307, 2004).

30 Resulta posible, por ejemplo, acoplar ADN a nanopartículas de oro. El sistema de conjugados de ADN-nanopartículas de oro (ADN-NPAu) combina las propiedades favorables de los coloides de oro con las del ADN. La molécula de ADN presenta (i) propiedades de reconocimiento molecular únicas, (ii) resulta fácilmente accesible por la síntesis automática de ADN o la polimerización enzimática, (iii) los oligonucleótidos de cadena sencilla presentan la capacidad de formar agregados multicadena, permitiendo la construcción de dispositivos a nanoescala (Seeman, N.C., Nature 421:427-431, 2003; Niemeyer, C.M., Curr. Opin. Chem. Biol. 4:609-618, 2000; Gothelf, K.V. *et al.*, Org. Biom. Chem. 3:4023-4037, 2005; Seela, F. y Budow, S., Helv. Chim. Acta 89:1978-1985, 2006; Seela, F. *et al.*, Org. Biomol. Chem. 5:1858-1872, 2007; Seela, F. *et al.*, Chem. Biodiv. 2:84-91, 2005).

40 Las nanopartículas de oro o las superficies de oro que han sido funcionalizadas con oligonucleótidos son elementos cruciales para diferentes aplicaciones, por ejemplo para biosensores utilizados para diagnósticos *in vitro*, para la obtención de imágenes *in vivo*, como portador de fármacos, y para construir nanoestructuras definidas. Existe una literatura extensiva sobre la utilización de conjugados de oligonucleótidos y oro, que se revisa parcialmente en: Letsinger, R.L. *et al.*, Chemistry of Oligonucleotide -Gold Nanoparticle Conjugates, en: Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements, Vol. 144-146, páginas 359 a 362, 1999; Ingenious nanoprobos in bioassays, Chan, Cangel Pui-ye, Bioanalysis 11:5-133, 2009; y Biosensors based on gold nanoparticle labeling, Moeller, R., Annual Review of Nano Research 1:429-466, 2006.

45 La facilidad de producción de un oligonucleótido de interés y la robusta química de la conjugación de dichos oligonucleótidos con, por ejemplo, una partícula de oro, es la base que presta apoyo al amplio abanico de aplicaciones de las partículas de oro recubiertas con oligonucleótidos.

50 El protocolo convencional para la unión de oligonucleótidos a superficies de nanopartículas de oro (NPAu) utiliza oligonucleótidos modificados en los extremos 5' ó 3' con un grupo tiol (Mirkin C.A. *et al.*, Nature 382:607, 1996). Los oligonucleótidos de cadena sencilla se funcionalizan en su extremo 5' ó 3', respectivamente, con conectores acíclicos que portan grupos tiol. A continuación se utiliza la función tiol para la inmovilización covalente con las

NPAu. Sin embargo, dicha modificación, tras la síntesis de oligonucleótidos, requiere una etapa adicional de acoplamiento/manipulación.

5 Determinados otros métodos de conjugación de oligonucleótidos con superficies de nanopartículas de oro (NPAu) se basan en la utilización de oligonucleótidos con modificación de tiol. En estos métodos, se introducen grupos tiol durante la síntesis de los oligonucleótidos mediante la utilización de fosforamiditas "modificadoras de tiol", las cuales se encuentran disponibles comercialmente. El grupo tiol se protege con un grupo tritilo que requiere condiciones de desprotección especiales utilizando nitrato de plata o se protege como disulfuro que se corta mediante reducción con DTT. En ambos casos, las condiciones de desprotección estándares no resultan adecuadas y debe eliminarse por
10 completo el exceso de dichos reactivos de desprotección especiales antes de la unión de los oligonucleótidos a la superficie de oro.

15 En lugar de la síntesis química de un oligonucleótido también resulta posible una síntesis enzimática. Ninguna de las fosforamiditas modificadoras de tiol es compatible con la incorporación enzimática en un oligonucleótido.

20 Para la incorporación enzimática de grupos reactivos de oro, se utiliza el compuesto 4-tio-timidina trifosfato (4-tioTTP) (Incorporation of DNA networks into microelectrode structures; Erler, C. and Mertig, M., Journal of Vacuum Science & Technology, B: Microelectronics and Nanometer Structures--Processing, Measurement, and Phenomena 27:939-943, 2009).

25 La 4 Tio T fosforamidita correspondiente se encuentra disponible comercialmente y puede utilizarse en la síntesis química de un oligonucleótido deseado que contiene tio-dT. Sin embargo, S-alkil 4 TioT es muy reactivo con los nucleófilos. Por lo tanto, los oligonucleótidos sintetizados con 4 tio T deben cortarse con NaSH en presencia de amonio. Tal como se ha indicado anteriormente, debe eliminarse por completo cualquier reactivo de desprotección remanente.

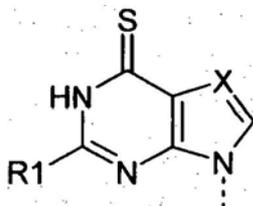
30 Sin embargo, tal como se mostrará en la sección de Ejemplos, un oligonucleótido con 4-tiotimidina (4-tioT) incorporado en el mismo no es muy estable frente a la hidrólisis bajo condiciones de desprotección estándares y en general puede encontrarse expuesto al ataque nucleofílico. A su vez lo anterior resultaría en inestabilidad de un conjugado basado en la incorporación de dicho tionucleósido.

35 Tal como resultará evidente a partir de la descripción anteriormente proporcionada de la técnica anterior, existe una necesidad de un procedimiento económico y simple para la síntesis de un oligonucleótido que comprende un tionucleótido y/o para unir dicho oligonucleótido a un metal tiofílico, tal como el oro o un punto cuántico. Un requisito de simplicidad es, por ejemplo, que el grupo que permite la unión del oligonucleótido a una superficie pueda introducirse en el oligonucleótido directamente durante la síntesis química de un oligonucleótido sin ninguna necesidad de apartarse de los protocolos estándares establecidos de síntesis de oligonucleótidos.

40 Inesperadamente se ha encontrado que un oligonucleótido que comprende uno o más grupos tiol puede sintetizarse fácilmente mediante la incorporación de una tiooxonucleobase según la fórmula I en dicho oligonucleótido.

Descripción resumida de la invención

45 La presente invención se refiere a un conjugado de oligonucleótido-fase sólida, en el que la fase sólida es tiofílica, en el que el oligonucleótido comprende por lo menos una tiooxonucleobase según la fórmula I:



50 en la que X es CH o N, en la que R¹ es H o NH₂, en la que --- indica un enlace covalente, y en el que dicho oligonucleótido se une a dicha fase sólida mediante el átomo de azufre de dicho tiooxonucleótido.

55 Se da a conocer además un método para producir un conjugado de oligonucleótido-fase sólida, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una fase sólida tiofílica seleccionada de entre el grupo que consiste de un metal tiofílico, un óxido inorgánico, sulfuro, seleniuro o telururo que comprende un metal tiofílico, por ejemplo tal como en los puntos cuánticos basados en Cd, y (b) unión de un oligonucleótido que contiene por lo menos una

tioxonucleobase según la fórmula I, tal como se ha proporcionado y definido anteriormente, a dicha fase sólida tiofílica.

- 5 Además se dan a conocer y se describen diversos usos, tales como el uso de un conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la presente invención en un método de detección basado en la hibridación de ácidos nucleicos o la utilización de un conjugado de oligonucleótido-nanopartícula como marcaje.

Descripción detallada de la invención

- 10 La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984)); Animal Cell Culture (R.L. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); Ausubel, F.M., *et al.* (editores), Current Protocols in Molecular Biology (1987) y actualizaciones periódicas; Mullis, *et al.* (editores), The Polymerase Chain Reaction" (Mullis *et al.*, editores, 1994).

- 20 A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Singleton, *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2a ed., John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1994; March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 4a ed., John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1992; Lewin, B., Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994, ISBN 0-19-854287 9; Kendrew, J., *et al.* (editores), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994, ISBN 0-632-02182-9; y Meyers, R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569 8), Mueller, S. (ed.).

Definiciones

- 30 Tal como se utiliza en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes presenta el significado asociado respectivamente en la presente sección.

- 35 Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un anticuerpo" se refiere a un anticuerpo o a más de un anticuerpo. El término "por lo menos" se utiliza para indicar que opcionalmente puede encontrarse presente uno o más objetos adicionales. A título de ejemplo, una matriz que comprende por lo menos dos áreas discretas puede comprender opcionalmente dos o más áreas de ensayo discretas.

- 40 La expresión "uno o más" se refiere a 1 a 50, preferentemente 1 a 20, resultando preferentes también 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ó 15.

- 45 Tal como es conocido por el experto en la materia, el metal tiofílico puede ser una aleación, un semiconductor o un semiconductor metálico mixto, que comprende un metal tiofílico o puede consistir esencialmente de un metal tiofílico, es decir, puede ser un metal puro.

- 50 En el caso de que el metal tiofílico sea un metal noble seleccionado de entre el grupo que consiste de cobre, oro y plata, la fase sólida metal tiofílico preferentemente consiste de dicho metal. En el caso de que se utilice un material semiconductor tiofílico como fase sólida, el metal tiofílico se encuentra comprendido dentro de dicho material pero no resulta necesario que se encuentre presente en su forma metálica pura. En dicho material semiconductor, el metal tiofílico preferentemente se encuentra presente en por lo menos 35% p/p. También resulta preferente que dicho material semiconductor comprenda por lo menos 40%, 45% ó 50% de un metal semiconductor tiofílico.

- 55 Tal como apreciará el experto en la materia en determinadas partículas de realizaciones, pueden ser la opción preferente, por ejemplo, las partículas de oro o los puntos cuánticos, mientras que para otras realizaciones puede ser la alternativa preferente una capa de un metal tiofílico o un material semiconductor tiofílico recubierto sobre un material de soporte sólido. La expresión "fase sólida" tal como se utiliza en la presente invención pretende cubrir ambas alternativas: a) una fase sólida realizada en un metal tiofílico y b) una fase sólida en la que el metal tiofílico se encuentra presente sobre la superficie de un material de soporte sólido.

- 60 Un material de soporte sólido que debe recubrirse con un metal tiofílico para formar una fase sólida no se encuentra restringido a ninguna restricción especial y puede seleccionarse, por ejemplo, de entre superficies de metal (por ejemplo de aluminio), superficies de metal depositadas al vapor con SiO₂, superficies de óxido de metal/semimetal (por ejemplo Al₂O₃ o SiO₂), superficies de vidrio, superficies de polímero, por ejemplo en forma de película,

membranas de nilón o membranas de nitrocelulosa. Sin embargo, resulta evidente para el experto en la materia que también resulten adecuados soportes de fase sólida básicamente "semisólidos" o de tipo gel.

5 La utilización de vidrio como soporte de fase sólida representa una realización preferente. El vidrio no presenta una superficie poroso y permite un recubrimiento uniforme con metal tiofílico o una capa semiconductor de un óxido o sulfuro inorgánico tiofílico. El vidrio también es mecánicamente robusto, resistente a la temperatura e insensible a condiciones de lavado rigurosas, y presenta una fluorescencia intrínseca baja. Resultan adecuados todos los tipos y variedades de vidrio, por ejemplo el vidrio de cuarzo.

10 El soporte de fase sólida de polímero puede consistir, por ejemplo, de polipropileno, metacrilato de polimetileo (PMMA), (vidrio acrílico o plexiglás) o copolímeros de cicloolefina (COC). Por ejemplo, se encuentra disponible un COC adecuado de Ticona bajo el nombre comercial "Topaz".

15 El término "conjugado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al hecho de que un oligonucleótido que comprende un tioxonucleótido se encuentra unido a un metal tiofílico comprendido en la fase sólida mediante un grupo sulfuro comprendido en dicho oligonucleótido. La naturaleza química exacta del enlace entre un metal tiofílico y un tiol todavía se encuentra bajo investigación. Sin deseo de restringirse a la teoría actual, los presentes conocimientos del enlace tiol-oro se resumen y proporcionan posteriormente.

20 El enlace oro-sulfuro es un enlace único entre los átomos de oro y azufre en un compuesto de sulfuro, habitualmente un compuesto de organosulfuro. Las sales de oro estables en agua de oro y azufre frecuentemente presentan el oro en su estado de oxidación +1 (oro áureo), formando con ligandos blandos, tales como tioéteres y tiolatos. Sin embargo, los compuestos de organosulfuro, incluso los tioéteres neutros y los tioles, también pueden unirse incluso fuertemente a las superficies de oro elemental, tales como las observadas en las nanopartículas de oro coloidal, así como las superficies sobre el oro en bruto.

25 No está muy clara la electrónica del enlace superficial tiol-Au(0), pero tiene a aproximarse a covalente debido a la elevada electronegatividad del oro (2,4 en la escala de Pauling y es bastante fuerte (126 a 146 kJ/mol)), lo que es raro para la mayoría de enlaces de superficie entre los ligandos neutros y los metales nobles de valencia cero neutros.

30 Se han propuesto numerosas hipótesis para la naturaleza de este enlace, que ha intrigado a los químicos durante siglos, pero ha resultado difícil llevar a cabo trabajo experimental que descarte una hipótesis en favor de otra. El enlace probablemente presenta interacciones dativas y puede presentar retrodonación. La energía del enlace en las interacciones oro-azufre se reduce a medida que se satura la superficie con compuestos que contienen azufre, tal como en una monocapa autoensamblada.

35 No se entiende por completo qué le ocurre al hidrógeno del sulfhidrilo en un tiol al unirse a una superficie de oro. Existen hipótesis contradictorias que sugieren que podría salir en forma de un radical protón, hidruro o hidrilo (punto H), quizá estabilizado por el oro o en última instancia en forma de hidrógeno. Un grupo que ha utilizado análisis de RMN de protones sugieren que el hidrógeno con frecuencia puede no salir en absoluto. Sin embargo, en el caso de que se utilice un exceso de tiol (es decir, que cubra más de 50% de la superficie de oro), la pérdida de hidrógeno es "rápida e irreversible".

40 La expresión "metal tiofílico" se basa en el concepto HSAB y describe el hecho de que el azufre blando se une a un metal blando correspondiente. El concepto HSAB es un acrónimo para ácidos y bases duros y blandos (de Lewis). Según el concepto HSAB, los iones de metal blando prefieren azufre blando como contraión y, por lo tanto, también se denominan tiofílicos, en contraste con los iones metálicos oxofílicos duros.

45 Tal como ya se ha ilustrado anteriormente para el metal noble tiofílico oro, la naturaleza exacta del enlace entre el átomo de azufre un grupo tioxo, por ejemplo tal como se encuentra comprendido en un oligonucleótido, es desconocida. Lo anterior no resulta crucial con la condición de que pueda seleccionarse un metal tiofílico apropiado y se alcance la unión deseada.

50 Los metales o iones metálicos tiofílicos según la presente invención preferentemente se seleccionan de entre el grupo que consiste de metales del grupo 11: (Cu, Ag, Au), grupo 12 (Cd, Hg), grupo 13 (Ga, In, Tl) y grupo 14 (Sn, Pb).

55 En una realización según la presente invención, el metal tiofílico se selecciona de entre el grupo que consiste de un metal noble tiofílico y un material semiconductor tiofílico.

En una realización, el metal tiofílico es un metal noble seleccionado de entre el grupo que consiste de cobre, plata y oro. En una realización, el metal tiofílico se selecciona de entre plata u oro. En una realización se utiliza el oro como material de fase sólida tiofílico. En una realización se utiliza la plata como material de fase sólida tiofílico.

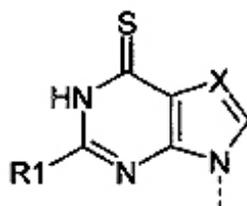
5 Tal como apreciará el experto en la materia, un material semiconductor tiofílico puede comprender uno o más metales seleccionados de entre el grupo que consiste de cadmio, galio e indio, encontrándose este metal como óxido, sulfuro o seleniuro. En una realización preferente, el material semiconductor tiofílico se basa en cadmio o galio. En una realización preferente, el material semiconductor se basa en cadmio.

10 En una realización, el material semiconductor tiofílico se encuentra presente ne forma de un nanocrystal o punto cuántico. La expresión "punto cuántico" se pretende que se interprete ampliamente como comprendiendo dichas estructuras de manera general. Los puntos cuánticos se describen en la literatura de patentes y técnica; ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.322.901, nº 5.990.749 y nº 6.274.323, y Murphy C.J., Analytical Chemistry 74:520A-526A, 2002. Un punto cuántico es una partícula semiconductor que presenta las tres dimensiones confinadas a la

15 escala de longitud de 1 a 10 nm. Entre los semiconductores inorgánicos se incluyen los elementos de grupo 14 (antiguo grupo IV) silicio y germanio, compuestos tales como GaN, GaP, GaAs, InP e InAs (colectivamente los materiales III-V), y ZnO, ZnS, ZnSe, CdS, CdSe y CdTe (materiales II-VI).

20 Los puntos cuánticos se encuentran, por ejemplo, disponibles comercialmente de Invitrogen Corp., Evident Technologies, y otros.

Uno de los elementos importantes en los que se basa la presente invención es un oligonucleótido que comprende por lo menos una tiooxonucleobase según la fórmula I:



25 en la que X es CH o N, en la que R¹ es H o NH₂ y en la que --- indica un enlace covalente.

30 Mediante el enlace covalente N9, la tiooxonucleobase según la fórmula I se encuentra unida en la parte oligonucleótido del conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la presente invención. El átomo de C del esqueleto oligonucleótido al que se encuentra unido el átomo N9 es el mismo que el átomo de C con el que habitualmente se encuentra conectado una nucleobase purina natural, es decir una adenosina o una guanosina, al esqueleto oligonucleótido. En otras palabras, las nucleobases según la fórmula I sustituyen una nucleobase purina natural, mientras que la naturaleza y el posicionamiento del enlace con el esqueleto sigue siendo la misma que una nucleobase purina natural.

35 El tiooxonucleótido basado en la nucleobase de fórmula I puede encontrarse presente en el extremo 5' y/o 3' de un oligonucleótido o puede ser parte de una secuencia de interés. En el último caso, en otras palabras, la tiooxonucleobase según la fórmula I sustituye una o más de las nucleobases presentes de otra manera en una secuencia oligonucleótida de interés.

40 Tal como apreciará el experto en la materia, la característica clave del oligonucleótido comprendido en un conjugado según la presente invención es la nucleobase según la fórmula I comprendida en el mismo. Esta nucleobase media, por ejemplo, en la unión de dicho oligonucleótido a una fase sólida tiofílica.

45 El tipo de esqueleto al que se conecta la nucleobase mediante el átomo de N9 mediante enlace covalente puede variar de muchas maneras diferentes. El oligonucleótido que es parte de un complejo según la presente invención o que se utiliza para recubrir un metal tiofílico en un método según la presente invención puede presentar un esqueleto de fosforribosa estándar, en el que la fracción de azúcar ribosilo se selecciona de entre el grupo que consiste de 2'-desoxi-D-ribosa, 2',3'-dideoxi-D-ribosa y D-ribosa, o puede presentar cualquier esqueleto no estándar apropiado.

50 Los oligonucleótidos con un esqueleto no estándar preferentemente comprenden un análogo ribosilo seleccionado de entre el grupo que consiste de: 2'-desoxi-L-ribosa, 2'-O-metilo, 2'-fluoro-ARN o puede presentar un esqueleto seleccionado de entre ácidos nucleicos bloqueados (ACB), ácidos nucleicos hexitol (ANH), ácido nucleico ciclohexenilo (ANCe), ácido nucleico altritol (ANA), ácidos péptido-nucleicos (APN), ácidos nucleicos glicol (ANG), ácidos nucleicos treosa (ANT) y oligonucleótidos morfolino.

55

El término nucleósido (o tioxonucleósido) tal como se utiliza en la presente invención no se encuentra limitado a nucleósido con 2'-desoxi-D-ribosa, 2',3'-dideoxi-D-ribosa y D-ribosa estándar como unidad sacárida, sino que también incluye cualquier combinación de una nucleobase estándar (o la nucleobase heterocíclica según la fórmula I) con un análogo ribosilo o un análogo estructural de una unidad sacárida, tal como se utiliza, por ejemplo, en los

5 ácidos nucleicos bloqueados (ANB), los ácidos nucleicos hexitol (ANH), los ácidos nucleicos ciclohexenilo (ANCe), los ácidos nucleicos altritol (ANA), los ácidos péptido-nucleicos (APN), los ácidos nucleicos glicol (ANG), los ácidos nucleicos treosa (ANT) y los oligonucleótidos morfolino.

10 En el caso de que se encuentre presente una nucleobase según la fórmula I en un oligonucleótido, éste puede unirse a soportes sólidos tiofílicos. Lo anterior resulta cierto para los nucleótidos basados en fracciones esqueléticas estándares de ribosilo, así como para oligonucleótidos basados en estructuras esqueléticas no estándares tales como las indicadas anteriormente, así como para quimeras de oligonucleótidos con diferentes tipos de esqueleto en un oligonucleótido dado.

15 Para la incorporación de nucleótidos con una nucleobase de fórmula I en un oligonucleótido mediante síntesis en fase sólida, los monómeros correspondientes (por ejemplo fosforoamiditas) pueden sintetizarse mediante la utilización de procedimientos que son bien conocidos para la síntesis de oligonucleótidos estándares de ADN y ARN o para la síntesis de monómeros para oligonucleótidos de esqueleto modificado.

20 Resultan preferentes por motivos económicos y facilidad de síntesis las beta-cianoetil-fosforoamiditas de nucleósidos con una nucleobase protegida según la fórmula I con 2'-desoxirribosa como la unidad sacárida. También resultan preferentes las 3'-fosforoamiditas para la síntesis 3'->5'.

25 Para la incorporación de nucleótidos con una nucleobase de fórmula I en un oligonucleótido mediante métodos enzimáticos utilizando una polimerasa o una transferasa terminal, debe sintetizarse el trifosfato correspondiente. Es conocida la incorporación de nucleósidos trifosfato modificados, pero se encuentra limitada a estructuras seleccionadas (por ejemplo pueden ensamblarse ANH y ANA con polimerasas además de los nucleótidos de sacárido ribosilo-trifosfato normales). Resultan preferentes para la síntesis enzimática los trifosfatos con D-ribosa-2'-desoxi-D-ribosa y 2',3'-dideoxi-D-ribosa como unidad sacárida del nucleósido trifosfato.

30 La expresión "nucleótido basado en un nucleósido" se utiliza para clarificar que el nucleósido de fórmula I debe ser activado, por ejemplo fosforilado, para la incorporación en un oligonucleótido y tras incorporarse en un oligonucleótido representa un nucleótido. En este caso dicho nucleótido se afirma que deriva o se basa en el nucleósido con una nucleobase de fórmula I.

35 El término "oligonucleótido", tal como se utiliza en la presente memoria, generalmente se refiere a polinucleótidos cortos generalmente de cadena sencilla que comprenden por lo menos 8 nucleótidos y como máximo aproximadamente 1.000 nucleótidos. En una realización preferente, un oligonucleótido presenta una longitud de por lo menos 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21, 24, 27 ó 30 nucleótidos. En una realización preferente, un oligonucleótido

40 presenta una longitud de por lo menos 1000, 500, 300, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 ó 30 nucleótidos. La descripción proporcionada posteriormente para los polinucleótidos es igualmente y totalmente aplicable a los oligonucleótidos.

45 El término oligonucleótido es muy amplio y se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN y análogos y modificaciones de los mismos.

50 En el caso de que deban incorporarse tionucleótidos, durante la síntesis en fase sólida de oligonucleótidos sólo se utilizarán bloques constructivos monoméricos y condiciones modificadoras (por ejemplo utilizando un oxidante diferente al descrito en el documento nº WO 2007/059816) que puedan combinarse en una reacción de síntesis con los bloques constructivos tionucleósido monoméricos.

55 El término oligonucleótido incluye oligonucleótidos con bases naturales que se sustituyen en la nucleobase, por ejemplo con metilo, propargilo o halógeno, o en los que se une a la nucleobase una fracción colgante o un grupo funcional. En caso necesario, puede realizarse una modificación de la estructura de nucleótido antes o después del ensamblaje del polímero. Puede modificarse adicionalmente un oligonucleótido tras la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse con componentes no nucleotídicos. Los componentes no nucleosídicos son espaciadores y conectores no

60 funcionalizados o que están funcionalizados con un grupo reactivo como -NH₂, -N₃-OH, -COOH, -C=C, ONH₂ o un conector con una fracción colgante. Las fracciones colgantes son proteínas (por ejemplo nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos, poli-L-lisina, etc.), intercalantes (por ejemplo acridina, psoralén, etc.), ligantes de surco menor (por ejemplo distamicina), quelantes (por ejemplo metales, incluyendo metales radioactivos y boro), pigmentos fluorescentes o no fluorescentes (por ejemplo coumarinas, fluoresceínas, rodaminas, oxazinas, pigmentos 4,4-

difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (Bodipy), azopigmentos, poliazopigmentos, cianinas, merocianinas, estilbenos, perilenos, pirenos, ftalocianinas) y haptenos (como biotina y digoxigenina).

5 El término oligonucleótido incluye oligonucleótidos con bases estándares y/o con análogos de bases (análogos que muestran el mismo patrón de unión de hidrógenos que las bases naturales) como nucleósidos C (formicina, pseudouridina), 7-deazapurinas, 7-deaza-8-azapurinas y 6-azapirimidinas. Dichos análogos de bases también pueden sustituirse adicionalmente, por ejemplo como 7 Br 7-deaza-dG.

10 Las bases no estándares, por ejemplo bases universales como nitroindol, nitropirrol y sustitutos de bases que no se unen a hidrógeno (por ejemplo difluorofenilo) y bases no naturales que son capaces de formar un tercer par de bases (como iso-dG o iso-dC) también son modificaciones que son compatibles con el método de inmovilización según la invención.

15 El término oligonucleótido incluye los oligonucleótidos con modificaciones del esqueleto, por ejemplo oligonucleótidos con desoxirribosa sustituida (por ejemplo 2'-fluoro o metoxi), con análogos de azúcar como azúcares bicíclicos (conocidos como ANB) ó 6 análogos de azúcares cíclicos, por ejemplo hexitol (conocido como ANH), así como esqueletos con enlaces internucleosídicos modificados, tales como metilfosfonato, fosforoamiditas y fosforotioato. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos.

20 El término oligonucleótido incluye además oligonucleótidos ramificados, en los que por lo menos tres oligonucleótidos se encuentran unidos entre sí mediante una unidad ramificada. Se encuentran disponibles comercialmente diferentes monómeros para la síntesis de oligonucleótidos ramificados (por ejemplo 1-[5-(4,4'-dimetoxitritiloxi)pentilamido]-3-[5-fluorenometoxicarboniloxipentilamido]-propil-2-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita).

25 En una realización, se encuentran presentes grupos adicionales en el oligonucleótido como modificaciones que también son capaces de reaccionar con superficies tiofílicas, por ejemplo como fosforotioato o un grupo tiol en un espaciador no nucleotídico dichas modificaciones se encuentran situadas en estrecha proximidad a los tionucleósidos con el fin de que no presenten sitios reactivos diferentes que puedan reaccionar con superficies tiofílicas. En el caso de que se incorporen tionucleótidos como trifosfato durante la síntesis enzimática utilizando una polimerasa, el número y el tipo de modificaciones de nucleótidos en el amplificado se encontrarán limitados por la aceptación por parte de la polimerasa de dichos nucleótidos trifosfato modificados. Se incorporan bien (d)CTP y (d)UTP sustituidos en posición 5, 7-deaza-(d)-GTP y 7-deaza-(d)ATP sustituidos en posición 7, en los que los sustituyentes son sustituyentes no voluminosos (por ejemplo similares en 5-Br-dUTP, 5-etinil-dUTP, 5-aminoalil-dUTP) o fracciones colgantes pequeñas (por ejemplo marcajes o haptenos) o un grupo funcional preferentemente con una fracción -NH₂, -N₃ y -C=C conectada mediante un espaciador de 6 a 30 átomos a la posición 5 ó 7.

35 Si se desea, dichos grupos funcionales pueden modificarse adicionalmente mediante, por ejemplo, la unión de una proteína a los mismos con el fin de obtener una modificación con una fracción colgante grande.

40 El término "matriz" o "micromatriz", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables, preferentemente sondas polinucleótidas (por ejemplo oligonucleótidos), sobre un sustrato. El sustrato puede ser un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio, o un sustrato semisólido, tal como una membrana de nitrocelulosa. Las secuencias de nucleótidos pueden ser de ADN, ARN o cualesquiera permutaciones de los mismos.

45 Una "secuencia diana", "ácido nucleico diana" o "proteína diana", tal como se utiliza en la presente memoria, es un polinucleótido o proteína de interés, la detección del cual se desea. Generalmente, un "molde", tal como se utiliza en la presente memoria, es un polinucleótido que contiene la secuencia de nucleótidos diana. En algunos casos, las expresiones "secuencia diana", "ADN molde", "polinucleótido de molde", "ácido nucleico diana", "polinucleótido diana", y variaciones de las mismas, se utilizan intercambiabilmente.

50 La "amplificación", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente al procedimiento de producción de múltiples copias de una secuencia deseada. La expresión "múltiples copias" se refiere a por lo menos 2 copias. Una "copia" no se refiere necesariamente a una complementariedad o idéntidad de secuencias perfecta con la secuencia molde. Por ejemplo, las copias pueden incluir análogos de nucleótidos, tales como desoxiinosina, alteraciones de la secuencia deliberadas (tales como alteraciones de la secuencia introducidas mediante un cebador que comprende una secuencia que es hibridable, pero no complementaria, con el molde) y/o errores de secuencia que se producen durante la amplificación.

60 La expresión/cantidad de un gen, proteína o marcador biológico en una primera muestra es alto o se encuentra incrementado en comparación con la expresión/cantidad en una segunda muestra en el caso de que el nivel de expresión/cantidad del gen, producto génico, por ejemplo la proteína o marcador biológico en la primera muestra,

5 sea mayor que el nivel de expresión/cantidad del gen, producto génico, por ejemplo la proteína o marcador biológico, en la segunda muestra. En una realización, el incremento de nivel de expresión/cantidad del gen, producto génico, por ejemplo proteína o marcador biológico, en la primera muestra es por lo menos aproximadamente 1,5X, 1,75X, 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 25X, 50X, 75X ó 100X el nivel de expresión/cantidad del gen respectivo, producto génico, por ejemplo la proteína o marcador biológico en la segunda muestra.

10 La expresión/cantidad de un gen, proteína o marcador biológico en una primera muestra es bajo o se encuentra reducido en comparación con la expresión/cantidad en una segunda muestra en el caso de que el nivel de expresión/cantidad del gen, producto génico, por ejemplo la proteína o marcador biológico en la primera muestra, sea mayor que el nivel de expresión/cantidad del gen, producto génico, por ejemplo la proteína o marcador biológico, en la segunda muestra. En una realización, la reducción de nivel de expresión/cantidad del gen, producto génico, por ejemplo proteína o marcador biológico, en la primera muestra es por lo menos aproximadamente 1,5X, 1,75X, 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 25X, 50X, 75% ó 100X el nivel de expresión/cantidad del gen respectivo, producto génico, por ejemplo la proteína o marcador biológico, en la segunda muestra.

15 Los niveles de expresión/cantidad pueden determinarse basándose en cualquier criterio adecuado conocido de la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, el ARNm, el ADNc, las proteínas, los fragmentos de proteína y/o las copias génicas. Los niveles de expresión/cantidades pueden determinarse cualitativa y/o cuantitativamente. En una realización, las muestras se normalizan para ambas diferencias, de cantidad de ARN o proteína analizada y de variabilidad en la calidad de las muestras de ARN o proteína utilizadas. Dicha normalización puede llevarse a cabo midiendo e incorporando la expresión de determinados genes normalizadores, incluyendo genes de mantenimiento bien conocidos, tales como GAPDH. Alternativamente, la normalización puede basarse en la señal media o la mediana de la señal de todos los genes analizados o de un subgrupo grande de los mismos (enfoque de normalización global). Gen a gen, la cantidad normalizada medida de ARNm o proteína tumoral del paciente se compara con la cantidad medida en un juego de referencia. Los niveles de expresión normalizados de cada ARNm o proteína por cada tumor analizado por cada paciente pueden expresarse como porcentaje del nivel de expresión medido en el juego de referencia. El nivel de expresión medido en una muestra de paciente particular que debe analizarse se encontrará en cierto percentil dentro de este intervalo, que puede determinarse mediante métodos bien conocidos de la técnica.

30 La "detección" incluye cualesquiera medios de detección, incluyendo las detecciones directa e indirecta.

35 El término "muestra" o "muestra de ensayo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una composición que se obtiene o que se deriva de un sujeto de interés que contiene una entidad celular y/o otra entidad molecular que debe caracterizarse y/o identificarse, por ejemplo basándose en las características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. En una realización, la definición comprende sangre y otras muestras líquidas de origen biológico y muestras de tejido, tales como espécimen de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos. La fuente de la muestra de tejido puede ser tejido sólido, tal como de una muestra de órgano o tejido fresca, congelada y/o conservada, o de biopsia o aspirado; sangre o cualesquiera constituyentes de la sangre; líquidos corporales, y células de cualquier momento de la gestación o del desarrollo del sujeto o plasma. Las muestras pueden obtenerse de un sujeto antes del inicio del tratamiento (por ejemplo el tratamiento del cáncer) o tras el inicio del tratamiento (por ejemplo el tratamiento del cáncer). Las muestras pueden obtenerse en 24 horas, 7, 10, 14, 28, 42 ó 56 días después del inicio de tratamiento (por ejemplo el tratamiento del cáncer). El término "muestra", o "muestra de ensayo" incluye muestras biológicas que han sido manipuladas de cualquier manera tras su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, la solubilización, o el enriquecimiento en determinados componentes, tal como proteínas o polinucleótidos, o la inclusión en una matriz semisólida o sólida con fines de realización de secciones. Para los fines de la presente memoria, una "sección" de una muestra de tejido se refiere a una parte o trozo individual de una muestra de tejido, por ejemplo una sección delgada de tejido o células cortadas de una muestra de tejido.

50 Entre las muestras se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las células o líneas celulares cultivadas o primarias, los sobrenadantes celulares, los lisados celulares, las plaquetas, el suero, el plasma, el líquido vítreo, el líquido linfático, el líquido sinovial, el líquido folicular, el líquido seminal, el líquido amniótico, la leche, la sangre completa, las células derivadas de la sangre, la orina, el líquido cerebroespinal, la saliva, el esputo, las lágrimas, el sudor, el moco, los lisados tumorales y el medio de cultivo de tejidos, extractos de tejidos tales como tejido homogeneizado, tejido tumoral, extractos celulares y combinaciones de los mismos. En una realización, la muestra es una muestra clínica. En otra realización, la muestra se utiliza en un ensayo diagnóstico. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene de un tumor primario o metastásico. La biopsia de tejido se utiliza con frecuencia para obtener un trozo representativo de tejido tumoral. Alternativamente, pueden obtenerse células tumorales indirectamente en forma de tejidos o líquidos que es conocido o se cree que contienen las células tumorales de interés. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras de lesiones de cáncer pulmonar mediante resección, broncoscopia, aspiración con aguja delgada, cepillado bronquial o de esputo, líquido pleural o sangre.

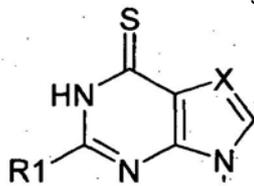
Un "cebador" es generalmente un polinucleótido de cadena sencilla corto, generalmente con un grupo 3'-OH libre, que se une a una diana potencialmente presente en una muestra de interés mediante hibridación con una secuencia diana, y después induce la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana. Las secuencias exactas de los cebadores o sondas externos e internos son seleccionadas por el experto en la materia de acuerdo con el problema analítico real. Por ejemplo, puede implicar secuencias que se hibridan con secuencias de ADN que son específicas de los microorganismos que deben detectarse o diferenciarse. Por ejemplo, pueden determinarse las secuencias específicas de organismo mediante comparaciones de bases de datos de secuencias y, en caso necesario, la "alineación". Básicamente no existe ninguna limitación al ADN o ácidos nucleicos en general utilizados como sondas. Debido a sus conocidas ventajas, también resulta posible utilizar híbridos de ADN-APN (ácido péptido-nucleico) o quimeras. También pueden utilizarse ácidos nucleicos modificados (por ejemplo dI, dl-biotina, dU, dU-biotina).

El término "correlacionar" o "correlacionado" se refiere a la comparación, de cualquier manera, entre el rendimiento y/o los resultados de un primer análisis o protocolo y el rendimiento y/o los resultados de un segundo análisis o protocolo. Por ejemplo, pueden utilizarse los resultados de un primer análisis o protocolo al llevar a cabo un segundo protocolo, y/o pueden utilizarse los resultados de un primer análisis o protocolo para determinar si debería llevarse a cabo un segundo análisis o protocolo. Con respecto a la realización de análisis o protocolo de expresión génica, pueden utilizarse los resultados del análisis o protocolo de expresión génica para determinar si debería llevarse a cabo un régimen terapéutico específico.

El término "marcaje" utilizado en la presente memoria se refiere a un conjugado según la presente invención fusionado directa o indirectamente con un reactivo, tal como una sonda de ácidos nucleicos o un anticuerpo, facilitando de esta manera la detección del reactivo con el que se encuentra conjugado o fusionado. En el caso de que, por ejemplo un conjugado de oligonucleótido-oro según la presente invención, se fusione con un anticuerpo, dicho anticuerpo puede detectarse mediante el marcaje, es decir, el oro comprendido en el conjugado de oligonucleótido-oro.

El conjugado según la presente invención y el uso del mismo:

En una realización, la presente invención se refiere a un conjugado de oligonucleótido-fase sólida, en el que la fase sólida comprende por lo menos una tioxonucleobase según la fórmula I:



en la que X es CH o N, en la que R¹ es H o NH₂, en la que --- indica un enlace covalente, y en el que dicho oligonucleótido se une a dicha fase sólida mediante el átomo de azufre de dicho tioxonucleótido.

Se ha encontrado que la utilización de un tioxonucleótido basado en una tioxonucleobase según la fórmula I en la síntesis de un oligonucleótido es compatible con los procedimientos rutinarios de síntesis. El tioxonucleótido basado en un nucleósido de fórmula I puede utilizarse en, por ejemplo, la síntesis química de un oligonucleótido y pueden escindirse grupos de protección siguiendo protocolos estándares. Además, pueden unirse firmemente a una fase sólida tiofílica oligonucleótidos que comprenden uno o más nucleótidos según la fórmula I.

Un oligonucleótido en el que el tioxonucleótido es un 6-deaza-tioxonucleótido presenta la ventaja adicional de que es todavía más estable frente a cualquier ataque nucleofílico que el nucleótido 6-aza. Por lo tanto, en una realización preferente, X en la fórmula I es CH.

Los metales o iones metálicos tiofílicos según la presente invención preferentemente se seleccionan de entre el grupo que consiste de los metales de grupo 11 (Cu, Ag, Au), grupo 12 (Cd, Hg), grupo 13 (Ga, In, Tl) y grupo 14 (Sn, Pb).

En una realización según la presente invención, el metal tiofílico se selecciona de entre el grupo que consiste de un metal noble tiofílico y un material semiconductor tiofílico. En una realización, el conjugado de oligonucleótido-fase sólida comprende un oligonucleótido que contiene una o más tioxonucleobases de fórmula I y una fase sólida tiofílica seleccionada de entre el grupo que consiste de un metal noble tiofílico o un material semiconductor que comprende un metal tiofílico.

En una realización, el metal tiofílico comprendido en el conjugado de oligonucleótido-fase sólida de la presente invención es un metal noble seleccionado de entre el grupo que consiste de cobre, plata y oro. En una realización, el

metal tiofílico se selecciona de entre plata u oro. En una realización se utiliza el oro como material de fase sólida tiofílico. En una realización se utiliza la plata como material de fase sólida tiofílico.

5 Tal como apreciará el experto en la materia, un material semiconductor tiofílico puede comprender uno o más metales seleccionados de entre el grupo que consiste de cadmio, galio e indio, encontrándose este metal como óxido, sulfuro, telururo o seleniuro. En una realización preferente, el material semiconductor tiofílico comprendido en el conjugado de oligonucleótido-fase sólida de la presente invención está basado en cadmio o galio. En una realización preferente, el material semiconductor se basa en el cadmio.

10 En una realización, el material semiconductor tiofílico comprendido en el conjugado de oligonucleótido-fase sólida de la presente invención se encuentra presente en forma de un nanocristal o punto cuántico.

15 Debido a que el nucleótido basado en una nucleobase de fórmula I puede incorporarse fácilmente en un oligonucleótido durante la síntesis, ahora resulta posible insertar dicho nucleótido en cualquier posición deseada y en el caso de que dos o más nucleótidos basdos en una nucleobase de fórmula I deban incorporarse, ello puede llevarse a cabo a cualquier distancia deseada de uno de dichos nucleótidos a uno vecino. En una realización, el conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la presente invención se forma entre un sólido tiofílico y un oligonucleótido que comprende por lo menos dos nucleobases según la fórmula I. También resulta preferente que estos dos nucleótidos con nucleobases según la fórmula I se separen por como mínimo otro nucleótido y se encuentran presentes en posiciones predefinidas en dicho oligonucleótido.

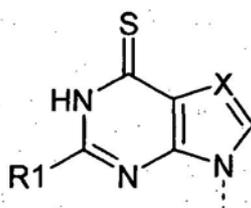
20 En una realización, el conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la presente invención se forma entre un sólido tiofílico y un oligonucleótido que comprende por lo menos una nucleobase según la fórmula I, en el que dicho oligonucleótido presenta una longitud de por lo menos 8 nucleótidos.

25 En una realización, el conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la presente invención se forma entre una fase sólida tiofílica y un oligonucleótido que comprende por lo menos un nucleótido con una nucleobase según la fórmula I, en el que dicho oligonucleótido presenta una longitud de como máximo 1.000 nucleótidos.

30 En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprendido en un conjugado según la presente invención presenta una longitud de por lo menos 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21, 24, 27 ó 30 nucleótidos, respectivamente. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprendido en un conjugado según la presente invención presenta una longitud no superior a 1.000, 500, 300, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 ó 30 nucleótidos, respectivamente.

35 **El método según la presente invención:**

40 En una realización, la presente invención se refiere a un método para producir un conjugado de oligonucleótido-fase sólida, comprendiendo el método las etapas de (a) proporcionar una fase sólida que comprende un metal tiofílico, y (b) unir un oligonucleótido que contiene por lo menos un tiooxonucleótido que comprende una nucleobase según la fórmula I:



45 en la que X es CH o N, en la que R¹ es H o NH₂ y en la que --- indica un enlace covalente, a dicha fase sólida tiofílica.

En una realización preferente, el método para producir un conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la presente invención se pone en práctica con un oligonucleótido que comprende un nucleótido basado en un nucleósido de fórmula I, en la que X en la fórmula I es CH.

50 Dicho método para producir un conjugado de oligonucleótido-fase sólida tal como se da a conocer en la presente memoria se ilustra esquemáticamente en la figura 1.

55 Los metales tiofílicos o los iones metálicos según la presente invención preferentemente se seleccionan de entre el grupo que consiste de metales de grupo 11 (Cu, Ag, Au), grupo 12 (Cd, Hg), grupo 13 (Ga, In, Tl) y grupo 14 (Sn, Pb).

En una realización, el método dado a conocer en la presente invención se pone en práctica con un metal tiofílico seleccionado de entre el grupo que consiste de un metal noble tiofílico y un material semiconductor tiofílico.

5 En una realización, el metal tiofílico utilizado en un método según la presente invención es un metal noble seleccionado de entre el grupo que consiste de cobre, plata y oro. En una realización, el metal tiofílico se selecciona de entre plata u oro. En una realización se utiliza el oro como material de fase sólida tiofílico. En una realización se utiliza la plata como material de fase sólida tiofílico.

10 En una realización preferente, el material semiconductor tiofílico utilizado en un método según la presente invención para la producción de un conjugado de oligonucleótido-fase sólida se selecciona de entre cadmio o galio. En una realización preferente, el material semiconductor tiofílico utilizado en un método según la presente invención para la producción de un conjugado de oligonucleótido-fase sólida es el cadmio.

15 En una realización, el material semiconductor tiofílico utilizado en un método según la presente invención para la producción de un conjugado de oligonucleótido-fase sólida se encuentra presente en forma de un nanocrystal o un punto cuántico.

20 En una realización, el método según la presente invención para la producción de un conjugado de oligonucleótido-fase sólida se pone en práctica con un oligonucleótido que comprende por lo menos un nucleótido con una nucleobase según la fórmula I, en el que dicho oligonucleótido presenta una longitud de por lo menos 8 nucleótidos.

25 En una realización, el método según la presente invención para la producción de un conjugado de oligonucleótido-fase sólida se pone en práctica con un oligonucleótido que comprende por lo menos un nucleótido con una nucleobase según la fórmula I, en el que dicho oligonucleótido presenta una longitud de por lo menos 1.000 nucleótidos.

La utilización de un conjugado según la presente invención:

30 Un conjugado de oligonucleótido-fase sólida tal como se describe en la presente invención puede utilizarse para muchos propósitos bastante importantes.

35 Tal como resultará directamente evidente para el experto en la materia, en una realización se utiliza un conjugado de oligonucleótido-fase sólida tal como se describe en la presente invención en un método de detección basado en la hibridación de ácidos nucleicos. Dicho uso es de importancia primordial para aplicaciones multiplex o en un biosensor.

40 En una realización, la fase sólida en un conjugado de oligonucleótido-fase sólida tal como se describe en la presente invención es una nanopartícula seleccionada de entre el grupo que consiste de una nanopartícula de oro y material semiconductor tiofílico presente como nanocrystal y que se utiliza como marcaje. Dicho uso es análogo a los usos descritos, por ejemplo, para la detección electroquímica de la hibridación (Kafka J: *et al.*, *Electrochimica Acta* 53:7467-7474, 2008) o para la detección mediante resonancia del plasmón superficial (Milkani E. *et al.*, *Biosensors & Bioelectronics* 25:1217-1220, 2010).

45 Un oligonucleótido en el que la tiooxonucleobase de fórmula I es un 6-deaza-tiooxonucleótido que puede sintetizarse fácilmente y es estable frente a cualquier ataque nucleofílico.

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

50 Leyendas de las figuras:

Figura 1: la ruta de reacción para la formación de un conjugado de oligonucleótido-oro (NPAu) entre un oligonucleótido que comprende un ejemplo seleccionado de un tiooxonucleósido con una nucleobase según la fórmula I como molécula de anclaje se proporciona esquemáticamente.

55 **Figura 2:** las etapas en la síntesis de bloques constructivos para la síntesis química de un oligonucleótido basado en 7-deaza-6-tioguanosina se ilustran esquemáticamente.

Figura 3: el perfil de elución de HPLC de los productos de hidrólisis enzimática del oligonucleótido **7** obtenido tras la digestión enzimática se muestra en la parte izquierda de la figura (a); el perfil de elución de HPLC de una mezcla artificial que comprende los productos de hidrólisis esperados teóricamente del oligonucleótido **7** y el tionucleósido **1** se muestran en la parte derecha (b) de la figura.

60 **Figura 4:** espectros de UV-VIS de: (a) la solución de NPAu no modificada (línea superior, partiendo del extremo izquierdo), conjugado de ADN-NPAu **Au8** utilizando el tionucleósido **1** (línea intermedia) y el conjugado ADN-NPAu **Au24** que contiene un conector tiolhexilo (línea inferior); (b) espectros de UV-VIS de conjugados de ADN-NPAu

Au8•Au9 que portan oligonucleótidos complementarios medidos en diferentes intervalos de tiempo, de 0 min., 4 h y 12 h, respectivamente.

Figura 5: se proporcionan en la parte (a) perfiles de fusión del dúplex de oligonucleótidos libre **8•9** observado en 260 nm y perfiles de fusión de los ensamblajes **Au8•Au9** y **Au24•Au25**, respectivamente, registrados en 520 nm. En la parte (b) se proporcionan los perfiles de fusión de los ensamblajes **Au8•Au9**, **Au15•Au16** y **Au17•Au18**, respectivamente, todos registrados en 520 nm.

Figura 6: cromatogramas de HPLC de fase inversa referidos a la estabilidad frente a la hidrólisis de 4-tio-2'-desoxitimidina (compuesto 26; indicado en la presente figura como **1**). (a) perfil de HPLC de 4-tio-2'-desoxitimidina (**1**). (b) Perfil de HPLC obtenido tras el tratamiento de **1** con solución acuosa al 25% de amonio a 60°C durante 16 h. Se analizaron los compuestos mediante HPLC de fase inversa en 260 nm en una columna RP-18 (250x4 mm). Gradiente: 0-15 min. 0% a 30% de B en A, 30-40 principal 30% a 40% de B en A, 40-45 min. 40% a 0% de B en A; caudal: 0,7 cm³min⁻¹. 5 en la presente figura es 5-metil-2'-desoxicitina; verificada mediante experimentos de HPLC de coinyección.

Figura 7: cromatogramas de HPLC de fase inversa referidos a la estabilidad frente a la hidrólisis de 2-tio-2'-desoxitimidina (compuesto 27; indicado en la presente figura como **2**). (a) perfil de HPLC de 2-tio-2'-desoxitimidina (**2**). (b) Perfil de HPLC obtenido tras el tratamiento de **2** con solución acuosa al 25% de amonio a 60°C durante 16 h. Se analizaron los compuestos mediante HPLC de fase inversa en 260 nm en una columna RP-18 (250x4 mm). Gradiente: 0-15 min. 0% a 30% de B en A, 30-40 min. 30% a 40% de B en A, 40-45 min. 40% a 0% de B en A, caudal: 0,7 cm³ min⁻¹.

Figura 8: cromatogramas de HPLC de fase inversa referidos a la estabilidad frente a la hidrólisis de 6-tio-2'-desoxiguanosina (compuesto 28; indicado en la presente figura como **3**). (a) perfil de HPLC de 6-tio-2'-desoxiguanosina (**3**). (b) Perfil de HPLC obtenido tras el tratamiento de **3** con solución acuosa al 25% de amonio a 60°C durante 16 h. Se analizaron los compuestos mediante HPLC de fase inversa en 260 nm en una columna RP-18 (250x4 mm). Gradiente: 0-15 min. 0% a 30% de B en A, 30-40 min. 30% a 40% de B en A, 40-45 min. 40% a 0% de B en A; caudal: 0,7 cm³min⁻¹. 6 en la presente figura es 2,6-diaminopurina-2'-desoxirribonucleósido; verificada mediante experimentos de HPLC de coinyección.

Figura 9: cromatogramas de HPLC de fase inversa referidos a la estabilidad frente a la hidrólisis de 7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina (compuesto 1; indicado en la presente figura como **4**). (a) perfil de HPLC de 7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina (**4**). (b) Perfil de HPLC obtenido tras el tratamiento de **4** con solución acuosa al 25% de amonio a 60°C durante 16 h. Se analizaron los compuestos mediante HPLC de fase inversa en 260 nm en una columna RP-18 (250x4 mm). Gradiente: 0-15 min. 0% a 30% de B en A, 30-40 min. 30% a 40% de B en A, 40-45 min. 40% a 0% de B en A; caudal: 0,7 cm³min⁻¹. 7 en la presente figura es 2,6-diaminopurina-7-deazapurina 2'-desoxirribonucleósido; verificada mediante experimentos de HPLC de coinyección.

Figura 10: en la presente figura se muestran los diferentes bloques constructivos de fosforoamiditas para varios tioxonucleótidos diferentes utilizados en la síntesis de oligonucleótidos.

Figura 11: en la presente figura, se resumen los compuestos químicos clave, las secuencias utilizadas, así como las diversas partículas de oro recubiertas con una secuencia de interés con el fin de facilitar una vista general y la alineación.

Ejemplos

Información general sobre métodos y reactivos

Todos los compuestos químicos se obtuvieron de Acros, Fluka o Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Alemania). El modificador de 5'-mercapto llamado 6-(trifenilmetil)-S-(CH₂)₆ O-2-cianoetil diisopropilfosforamidita se obtuvo de Glen Research (Virginia, USA). Los solventes eran de grado de laboratorio. Se llevó a cabo cromatografía de capa fina (CCF) en láminas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F254, capa de 0,2 mm (0,2 mm; Merck, Darmstadt, Alemania). Se llevó a cabo cromatografía de columna flash (CF) a 0,4 bar en gel de sílice 60 H (VWR, Darmstadt, Alemania). Espectros de UV-Vis: espectrofotómetro U3200 (Hitachi, Japón); λ_{max} en nm, ε en dm³ mol⁻¹. Se llevó a cabo HPLC de fase inversa en una columna PR-18 de 250x4 mm

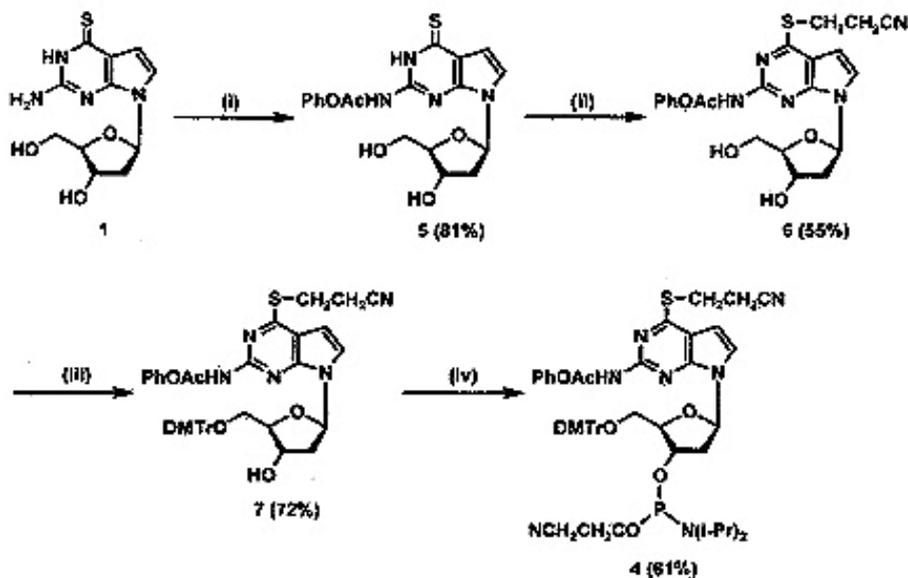
(Merck) con una bomba de HPLC Merck-Hitachi (modelo L-6250) conectada a un monitor de longitud de onda variable (modelo 655A). Espectros de RMN: espectrómetro Avance-DPX-300 (Bruker, Rheinstetten, Alemania); los desplazamientos químicos (δ) se proporcionan en ppm respecto a SiMe₄ interno (¹H, ¹³C). Se registraron los espectros de masas de MALDI-TOF con el espectrómetro Voyager DE PRO de Applied Biosystems con ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA) como matriz. Los microanálisis se llevaron a cabo mediante Mikroanalytisches Labor Beller (Göttingen, Alemania). Se midieron las curvas de temperatura de fusión con un espectrofotómetro de UV-VIS Cary-100 Bio (Varian, Australia) dotado de un controlador termoelectrónico Cary. Se utilizó agua nanopura (resistencia < 0,055 mS/cm) de MembraPure Water System (Astacus) para todos los experimentos.

Ejemplo 1:

Oligonucleótidos con sustituyentes tio

1.1 Síntesis de bloques constructivos

5 La síntesis de bloques constructivos también se proporciona esquemáticamente en la figura 2 y Esquema 2, a continuación.



Esquema 2. Reactivos y condiciones: (i) Me_3SiCl , cloruro de fenoxiacetilo, piridina, NH_3 aq., 4 h, t.a.; (ii) 3-bromopropionitrilo, K_2CO_3 anh., DMF, durante la noche, t.a.; (iii) DMTr-Cl, piridina, 3 h, t.a.; (iv) cloridita de (2-cianoetil)diisopropilfosforamido, *N,N*-diisopropiletilamina, CH_2Cl_2 anh., 20 min., t.a.

7-(2-Desoxi- β -D-*eritro*-pentofuranosil)-2-fenoxiacetamino-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidín-4(3*H*)-tiona (2).

10 Se coevaporó el compuesto **1** (1,6 g, 5,50 mmoles) con piridina seca (3x8,0 ml) y después se suspendió en piridina (15 ml). Se añadió cloruro de trimetilsililo (3,6 ml, 28,17 mmoles) mediante una jeringa seca y se agitó la reacción durante 1 hora. Se añadió cloruro de fenoxiacetilo (1,1 ml, 7,96 mmoles) mediante una jeringa seca y se agitó la
 15 reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. Se enfrió el recipiente de reacción en un baño de hielo y se añadió agua (5 ml) bajo agitación. Tras 15 min., se añadió solución acuosa conc. de amonio (5 ml) y se agitó la suspensión durante 15 min. adicionales. Se evaporó el solvente y se aplicó el residuo a CF (gel de sílice, columna de 8x15 cm, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 50:1 \rightarrow 25:1). Se evaporó la zona principal, proporcionando **2** en forma de una espuma incolora (1,9 g, 80,9%); p.f.: 205°C; $R_f=0,53$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1). UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 333 nm (47600). RMN- ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2,15-2,22 (m, 1H, $\text{H}_{\alpha-2'}$), 2,38-2,47 (m, 1H, $\text{H}_{\beta-2'}$), 3,52 (m, 2H, H-5'), 3,82 (m, 1H, H-4'), 4,35 (m, 1H, H-3'), 4,88 (s, 2H, Pac- CH_2), 4,95 (t, $^3J(\text{H,H}) = 5,3$ Hz, 1H, 5'-OH), 5,30 (d, $^3J(\text{H,H}) = 3,6$ Hz, 1H, 3'-OH), 6,41 (m, 1H, H-1'), 6,64 (d, $^3J(\text{H,H}) = 3,7$ Hz, 1H, H-5), 6,96-7,00 (m, 3H, fenoxi), 7,28-7,34 (m, 2H, fenoxi), 7,49 (d, $^3J(\text{H,H}) = 3,7$ Hz, 1H, H-6), 11,99 (s, br, 1H, N-H), 12,88 (s, br, 1H, CONH). Anal. calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ (416,45): C, 54,80; H, 4,84; N, 13,45. Observado: C, 54,74; H, 4,90; N, 13,40.

4-[(2-Cianoetil)tio]-7-(2-desoxi- β -D-*eritro*-pentofuranosil)-2-fenoxiacetamino-7*H* pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (3).

25 Se añadió 3-bromopropionitrilo (4,0 ml, 48,07 mmoles) y K_2CO_3 anhidro (3,0 g, 21,71 mmoles) a 25 ml de dimetilformamida (DMF) seca y la mezcla se agitó vigorosamente. Se disolvió el compuesto **2** (1,9 g, 4,45 mmoles) en 5 ml de DMF seco y se añadió gota a gota a la solución bajo agitación en 30 min. La mezcla se mantuvo bajo
 30 agitación durante la noche. Se eliminó la DMF mediante coevaporación con xileno y el residuo se aplicó a CF (gel de sílice, columna de 8x15 cm, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 500:1 \rightarrow 100:1). Tras la evaporación, la zona principal rindió **3** en forma de un sólido incoloro (1,2 g, 54,7%); $R_f = 0,22$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5). UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 301 nm (26700); 244 nm (73300). RMN- ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2,22 (m, 1H, $\text{H}_{\alpha-2'}$), 2,50 (m, 1H, $\text{H}_{\beta-2'}$), 3,16 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CN}$), 3,51-3,56 (m, 4H, H-5', H-5'', $\text{CH}_2\text{-S}$), 3,84 (m, 1H, H-4'), 4,37 (m, 1H, H-3'), 4,94 (t, $^3J(\text{H,H}) = 5,4$ Hz, 1H, 5'-OH), 5,00 (s, 2H,

Pac-CH₂), 5,32 (d, ³J(H,H) = 5,3 Hz, 1H, 3'-OH), 6,55 (m, 2H, H-5; H-1'), 6,95 (m, 3H, fenoxi), 7,31 (m, 2H, fenoxi), 7,65 (d, ³J(H,H) = 3,9 Hz, 1H, H-6), 10,69 (s, 1H, CO-NH). Anal. calculado para C₂₂H₂₃N₅O₅S (469,51): C, 56,28; H, 4,94; N, 14,92. Observado: C, 56,18; H, 4,98; N, 14,89.

5 **4-[(2-Cianoetil)tio]-7-(2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil)-2-fenoxiacetamino-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (4).**

Se coevaporó el compuesto 6 (469,5 mg, 1,00 mmol) con piridina anhidra (3x5,0 ml) y después se disolvió en piridina (5,0 ml). A esta solución se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitrietilmetilo (DMT-Cl) (440,5 mg, 1,30 mmoles) y la mezcla se agitó a t.a. durante 3 h. La reacción se desactivó mediante la adición de MeOH y la mezcla se evaporó a sequedad. La mezcla se disolvió en CH₂Cl₂ (3,0 ml) y se sometió a CF (columna de 4x10 cm, elución con CH₂Cl₂/acetona, 20:1), proporcionando 4 en forma de una espuma incolora (555,8 mg, 72%); R_f=0,61 (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5). UV (MeOH): λ_{max} (ε) = 302 nm (14400); 240 nm (53500). RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2,29 (m, 1H, H_α-2'), 2,59 (m, 1H, H_β-2'), 3,16 (m, 4H, CH₂-CN, H-5', H-5''), 3,54 (m, 2H, CH₂-S), 3,71 (s, 6H, OCH₃), 3,95 (m, 1H, H-4'), 4,37 (m, 1H, H-3'), 5,00 (s, 2H, Pac-CH₂), 5,37 (d, ³J(H,H) = 4,2 Hz, 1H, 3'-OH), 6,52-6,56 (m, 2H, H-5, H-1'), 6,78-7,35 (m, 18H, fenoxi), 7,46 (d, ³J(H,H) = 3,6 Hz, 1H, H-6), 10,69 (s, 1H, CO-NH). Anal. calculado para C₄₃H₄₁N₅O₇S (771,27): C, 66,91; H, 5,35; N, 9,07. Observado: C, 67,05; H, 5,20; N, 9,17.

20 **4-[(2-Cianoetil)tio]-7-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-2-fenoxiacetamino-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina 3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidil] (5).**

Se disolvió el compuesto 4 (555,8 mg, 0,72 mmoles) en CH₂Cl₂ anhidro (3,0 ml) bajo Ar y se hizo reaccionar con cloridita de (2-cianoetil)diisopropilfosforamido (225 ml, 0,95 mmoles) en presencia de Pr₂EtN (220 ml, 1,27 mmoles) a temperatura ambiente. Tras 20 min., la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y la solución se lavó con una solución acuosa al 5% de NaHCO₃, seguido de solución hipersalina. La solución orgánica se secó sobre NaSO₄ anhidro, se filtró y se concentró. Se sometió el residuo a CF (columna de 4x10 cm, CH₂Cl₂/acetona, 25:1), rindiendo 5 en forma de una espuma incolora (429,1 mg, 61,3%); R_f=0,64 (CH₂Cl₂/acetona, 95:5). RMN-³¹P (300 MHz, CDCl₃-d₆): δ = 148,6; 148,7.

30 Todos los compuestos se caracterizaron mediante los espectros de UV, y de RMN de ¹H y ¹³C, así como mediante análisis elemental (Tabla 1 y parte experimental). Las asignaciones de los desplazamientos químicos de RMN de ¹³C de la fracción sacárida y los grupos protectores se realizaron basándose en los espectros acoplados-desacoplados en combinación con datos ya publicados (Christopherson M.S. y Broom A.D., Nucleic Acids Res. 19:5719-5724, 1991).

35 **Tabla 1. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C (δ) de derivados 6-tio-7-deaza-2'-desoxiguanosina^a**

Comp.	C(2)b C(2)c	C(4)b C(6)c	C(4a)b C(5)c	C(5)b C(7)c	C(6)b C(8)c	C(7a)b C(4)c	C(1')	C(2')	C(3')	C(4')	C(5')
1	152,2	175,7	113,1	104,4	120,2	147,1	82,2	-d	71,0	87,1	61,9
2	145,4	174,8	116,8	104,7	122,7	143,4	82,5	-d	70,6	87,1	61,5
3	151,0	167,3	119,5	99,5	125,0	149,2	82,6	-d	70,9	87,4	61,8
4	151,2	167,3	99,5	112,3	120,9	149,2	82,8	-d	67,2	85,5	55,1

^a Medido en DMSO-d₆ a 298°K. ^b Numeración sistemática. ^c Numeración de purinas. ^d Superpuesto a la señal de DMSO

1.2 Síntesis, purificación y caracterización de los oligonucleótidos

40 **1.2.1 Síntesis de oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador de ADN automático, modelo 392-08 (ABI 392, Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania) a escala de 1 mmol utilizando fosforamiditas estándares, así como la fosforamidita 5 según el procedimiento estándar para la síntesis en fase sólida de oligonucleótidos tal como se ha descrito anteriormente (Seela F., Budow S., Helv. Chim. Acta 89:1978-1985, 2006). Tras el corte del soporte sólido, los oligonucleótidos se desprotegeron en solución acuosa al 25% de amonio durante 12 a 16 h a 60°C.

1.2.2 Purificación de oligonucleótidos

50 La purificación de los oligonucleótidos que contenían el tionucleósido 1 en primer lugar se llevó a cabo en HPLC de fase inversa en el modo de DMT-on (Merck-Hitachi-HPLC, columna RP-18, sistema de gradiente [A: (Et₃NH)OAc 0,1 M (pH 7,0)/MeCN 95:5; B: MeCN]: 3 min., 20% de B en A, 12 min., 20% a 50% de B en A y 25 min., 20% de B en A

5 con un caudal de 1,0 ml/min. Las soluciones se secaron y se trataron con $\text{CHCl}_2\text{COOH-CH}_2\text{Cl}_2$ al 25% (400 ml) durante 5 min. a 0°C para eliminar los residuos de 4,4'-dimetoxitritilo. Los oligómeros destritolados se purificaron nuevamente mediante HPLC de fase inversa [gradiente: 0-20 min. 0% a 20% de B en A; caudal: 1 ml/min]. Los oligómeros se desalaron en una columna corta (RP-18, gel de sílice) y se liofilizaron en un evaporador Speed-Vac, rindiendo sólidos incoloros que se congelaron a -24°C. HPLC (gradiente: 0-25 min. 0% a 20% de B en A; caudal: 1,0 ml/min).

1.2.3 Caracterización de los oligonucleótidos mediante espectrometría de masas

10 Se registraron los espectros de masas de MALDI-TOF con el espectrómetro Voyager DE PRO de Applied Biosystems con ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA) como matriz.

15 Los oligonucleótidos se caracterizaron tras la desprotección completa y la purificación mediante HPLC, seguido del desalado. En todos los casos las masas calculadas concordaban satisfactoriamente con los valores medidos (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio y masas moleculares determinadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Oligonucleótido	[M - H] ⁻ (Da)	
	Calc.	Observado
5'-d(AGT ATT GAC CTA A1T ATT GAC CTA) (6)	7365	7364
5'-d(AGT ATT 1AC CTA) (7)	3660	3659
5'-d(1-T10-TAG GTC AAT ACT) (8)	7030	7030
5'-d(1-T10-AGT ATT GAC CTA) (9)	7030	7030

Espaciador T₁₀ = TTT TTT TTT T.

1.2.4 Caracterización de los oligonucleótidos mediante digestión enzimática

20 Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de los oligonucleótidos tal como han descrito Seela y Becher (Seela F., Becher G., *Nucleic Acids Res.* 29:2069-2078, 2001) con fosfodiesterasa de veneno de serpiente (EC 3.1.15.1, *Crotallus adamameus*) y fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1, *Escherichia coli* de Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en tampón de Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) a 37°C y se llevó a cabo en HPLC de fase inversa. Los perfiles de elución de HPLC de (a) los productos de hidrólisis enzimática del oligonucleótido **7** obtenidos tras la digestión enzimática y (b) la mezcla artificial de los productos de hidrólisis esperados teóricamente del oligonucleótido **7** y el tionucleósido **1** se muestran en la figura 3. Las condiciones de la columna y de elución eran: RP-18 (200x10 mm); gradiente [A: 0,1 M (Et₃NH)OAc (pH 7,0)/MeCN 95:5; B: MeCN]: 25 min. A, 40 min. 0-65% B en A para (a) y (b); 100% de A para (c) y (d); caudal: 0,7 ml/min.

30 Tal como resulta evidente a partir de la comparación entre la figura 3(a) y la figura 3(b), respectivamente, la fosfodiesterasa de veneno de serpiente no corta el tionucleótido **1**.

Ejemplo 2:

35 **Síntesis de nanopartículas de oro modificadas y caracterización de las mismas**

2.1 Preparación de la solución de nanopartículas de oro

40 Las soluciones de nanopartículas de oro de 15 nm se prepararon a partir de una solución de H₂AuCl₄ mediante reducción de citrato, tal como se publicó originalmente en Turkevich J. *et al.*, *Discuss. Faraday Soc.* 11:55, 1951, y describieron posteriormente Letsinger y Mirkin (Storhoff, J.J. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 120:1959-1964, 1998, y Jin, R. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125:1643, 2003). Todo el material de vidrio se lavó en agua regia (3 partes de HCl, 1 parte de HNO₃), se enjuagó con agua nanopura y después se secó en el horno antes de utilizarlo. Se llevó H₂AuCl₄ acuoso (1 mM, 250 ml) a reflujo bajo agitación. A continuación se añadió rápidamente citrato trisódico 38,8 mM (25 ml). El color de la solución cambió de amarillo a rojo y se continuó con el reflujo durante 15 min. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, la solución roja se filtró a través de un filtro de 1 micrómetro de Micron Separations Inc.

2.2 Preparación de la solución de nanopartículas de oro modificadas utilizando oligonucleótidos, utilizando el nucleósido 1

Las nanopartículas de oro (~ 6 nm) se funcionalizaron con diversos oligonucleótidos que contenían nucleósido **1** en diferentes posiciones en su secuencia. Los conjugados de ADN-NPAu se prepararon mediante la mezcla de 1 ml de la solución de nanopartículas de oro con soluciones purificadas de oligonucleótidos (concentración final de oligonucleótido: 3 μ M). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo a temperatura ligeramente elevada (40°C). Tras dejar reposar durante 20 h, se añadieron 5 ml de una solución de tampón de NaCl 2 M, fosfato 0,2 mM (pH 7,0) bajo agitación constante con el fin de llevar la solución coloidal a 0,01 M de NaCl, dejando en reposo durante 6 a 8 h. A continuación se salaron los coloides a 0,02 M y se dejaron envejecer durante otras 6 a 8 h y después se salaron a 0,05 M y se dejaron en reposo durante 6 a 8 h y finalmente se salaron a NaCl 0,1 M. A continuación, las soluciones de ADN-nanopartículas de oro se centrifugaron y se separó el sobrenadante clarificado para eliminar los oligonucleótidos no unidos. El precipitado se redispersó en 1 ml de una solución tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM (pH 7,0). Tras la incubación (24 h, 40°C), se lavaron nuevamente las soluciones de conjugado con el mismo tampón, rindiendo finalmente 1 ml del conjugado de ADN-NPAu.

15 **Ejemplo 3:**

Hibridación de conjugados de ADN-nanopartículas de oro utilizando tionucleósido 1 como conector

En un experimento típico, se mezcló 0,5 ml de solución tampón de NaCl 0,1 M y fosfato 10 mM, pH 7, que contenía el conjugado de ADN-NPAu y 0,5 ml de solución tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM, pH 7, que contenía el conjugado de ADN-NPAu con el oligonucleótido complementario (concentraciones iguales). La solución que contenía ambos conjugados de ADN-NPAu se dejó bajo incubación durante la noche. Durante esta incubación, se produjo la hibridación lenta de los conjugados de NPAu con oligonucleótido complementario, lo que se puso de manifiesto por el lento desplazamiento al rojo y el ensanchamiento de la banda de resonancia del plasmón concomitantemente con un cambio de color de rojo a violeta. Finalmente, se observó la precipitación de la red de ADN-nanopartículas de oro, resultando en un sobrenadante transparente y un precipitado oscuro. Tras agitación intensiva de la solución de ADN-NPAu, el precipitado puede redispersarse, conduciendo a una solución violeta con un máximo de UV/VIS de aproximadamente 564 nm.

30 **Ejemplo 4:**

Inmovilización de oligonucleótidos sobre superficies de oro

4.1 Hibridación de oligonucleótidos

Propiedades de hibridación de oligonucleótidos dúplex utilizando el tionucleósido 1 en solución. En principio puede seleccionarse cualquier posición en la secuencia oligonucleótida al utilizar 7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina (**1**) como grupo de anclaje para la unión de un oligonucleótido a una nanopartícula de oro. Por lo tanto, se seleccionaron para la incorporación varios sitios de modificación diferentes. Es bien conocido que la voluminosidad del átomo de azufre puede interferir en la hibridación. Para la clarificación se llevaron a cabo estudios de hibridación con oligonucleótidos libres que incorporaban compuesto **1**. Una única sustitución del nucleósido **1** en el centro o en la periferia del dúplex 12-mero redujo la estabilidad del dúplex en comparación con el dúplex no modificado parental 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (**10**) • 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (**11**) (Tabla 3). El efecto es más pronunciado al incorporar **1** en el centro del oligonucleótido dúplex (**10•7**: $\Delta T_m = -7^\circ\text{C}$) que en la periferia (**10•12**: $\Delta T_m = -3^\circ\text{C}$). Múltiples modificaciones conducen a una desestabilización adicional significativa ($\Delta T_m = -30^\circ\text{C}$ para **13•14**) (Tabla 3). Consistentemente, la incorporación de dos tionucleósido (**1**) en el centro o en la periferia de los dúplex 24-meros (**21•22**, **23•6**) produce una fuerte reducción de la estabilidad del dúplex en comparación con el dúplex parental no modificado (**19•20**). Por el contrario, en los dúplex **8•9**, **15•16** y **17•18** que contenían una o múltiples incorporaciones de tionucleósido **1** como extremos protuberantes, no se observó ninguna desestabilización de los dúplex.

Tabla 3. Valores de T_m y datos termodinámicos de oligonucleótidos dúplex que contenían nucleósido 1 frente a nucleósidos canónicos o como extremos protuberantes^a

Dúplex	ΔT_m [$^\circ\text{C}$]	ΔT_m^b [$^\circ\text{C}$]
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (10) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (11)	47	-
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (10) 3'-d(ATC CA1 TTA TGA) (7)	40	-7
5'-d(TAG GTC AAT ACT) (10) 3'-d(ATC CAG TTA T1A) (12)	44	-3
5'-d(TA1 1TC AAT ACT) (13) 3'-d(ATC CA1 TTA T1A) (14)	17	-30
5'-d(1T10 TAG GTC AAT ACT) (8) 3'-d(ATC CAG TTA TGA T10 1) (9)	48	+1
5'-d(11T10 TAG GTC AAT ACT) (15) 3'-d(ATC CAG TTA TGA T10 11) (16)	47	0

5'-d(111T10 TAG GTC AAT ACT) (17)	47	0
3'-d(ATC CAG TTA TGA T10 111) (18)		
5'-d(TAG GTC AAT ACT TAG GTC AAT ACT) (19)	65	-
3'-d(ATC CAG TTA TGA ATC CAG TTA TGA) (20)		
5'-d(TA1 GTC AAT ACT TAG GTC AAT ACT) (21)	55	-10
3'-d(ATC CAG TTA TGA ATC CAG TTA T1A) (22)		
5'-d(TAG GTC AAT ACT TA1 GTC AAT ACT) (23)	53	-12
3'-d(ATC CAG TTA T1A ATC CAG TTA TGA) (6)		

^a Medido a 260 nm en tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM (pH 7,0) con concentración de cadenas sencillas de 5 μ M.

^b ΔT_m se calculó como $a s T_m^{\text{desapaream. de bases}} - T_m^{\text{desapaream. de bases}}$. Espaciador $T_{10} = \text{TTT TTT TTT T}$.

4.2 Preparación de la solución de conjugados de oligonucleótido-nanopartícula de oro

5 Se preparó una solución de nanopartículas de oro de 15 nm a partir de una solución de HAuCl_4 mediante reducción de citrato según el protocolo informado por Turkevich y posteriormente descrito por Letsinger y Mirkin (Elghanian R. *et al.*, Science 277:1078-1081, 1997; Mirkin C.A. *et al.*, Nature 283:607-609, 1996; Turkevich J. *et al.*, Discuss. Faraday Soc. 11:55, 1951). La concentración de nanopartículas se determinó que era de aproximadamente 6,0 nM, utilizando $\epsilon_{520} = 4,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (UV/VIS_{max}: 520 nm) (Demers, L.M. *et al.*, Anal. Chem. 72:5535-5541, 2000). El espectro de UV/VIS de la solución de nanopartículas de oro no modificadas se muestra en la figura 4a. Las NPAu no modificadas se funcionalizaron con los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos de cadena sencilla utilizados para la conjugación con NPAu.

Oligonucleótidos

5'-d(1T10 TAG GTC AAT ACT) (8)
5'-d(1T10 AGT ATT GAC CTA) (9)
5'-d(11T10 TAG GTC AAT ACT) (15)
5'-d(11T10 AGT ATT GAC CTA) (16)
5'-d(111T10 TAG GTC AAT ACT) (17)
5'-d(111T10 AGT ATT GAC CTA) (18)
5'-d(TA1 GTC AAT ACT TAG GTC AAT ACT) (21)
5'-d(A1T ATT GAC CTA AGT ATT GAC CTA) (22)
5'-d(TAG GTC AAT ACT TA1 GTC AAT ACT) (23)
5'-d(AGT ATT GAC CTA A1T ATT GAC CTA) (6)
5'-d(Tritil-S-(CH ₂) ₆ -T10 TAG GTC AAT ACT) (24)
5'-d(Tritil-S-(CH ₂) ₆ -T10 AGT ATT GAC CTA) (25)

Espaciador $T_{10} = \text{TTT TTT TTT T}$.

15 Los conjugados de ADN-NPAu **Au8** y **Au18**, así como **Au21** y **Au6**, respectivamente (Tablas 3 y 4, respectivamente) **16** se prepararon mediante la mezcla de 1 ml de la solución de nanopartículas de oro con la solución acuosa del oligonucleótido purificado (1 a 5 ml), rindiendo una concentración final de oligonucleótidos de 3 mM. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo a una temperatura ligeramente elevada (40°C). Tras dejar reposar durante 24 h, se añadieron 5 μ l de una solución tampón de NaCl 2 M, fosfato 0,2 mM (pH 7,0), bajo agitación constante, llevando la solución de ADN-NPAu a una concentración de NaCl de 0,01 M. Se incremento escalonadamente la concentración de NaCl de la solución de ADN-NPAu con tampón fosfato (NaCl 2 M, tampón fosfato 0,2 mM, pH 7,0) hasta una

20 concentración final de NaCl de 0,1 M. Los conjugados de ADN-NPAu se lavaron dos veces con tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM (pH 7,0) para eliminar los oligonucleótidos no unidos. Finalmente, los conjugados de ADN-NPAu se dispersaron en 1 ml de la solución tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM (pH 7,0). Durante todo el procedimiento las soluciones de ADN-nanopartículas de oro mantuvieron un color rojo profundo. Además, los conjugados de ADN-NPAu resultantes **Au8**, **Au18** y **Au21**, **Au6**, respectivamente, mostraron la resonancia del plasmón esperada en

25 aproximadamente 525 nm, indicando un estado no agregado (Tabla 5, figura 4a). A título comparativo, los oligonucleótidos **24** y **25** que incorporaban un conector 5'-hexiltiol se conjugaron con NPAu ((\rightarrow **Au24**, **Au25**, respectivamente, Tabla 5) utilizando el protocolo convencional publicado anteriormente por otros (Hurst S.J. *et al.*, Anal. Chem. 78:8313-8318, 2006; Seela F. *et al.*, Chem. Biodiv. 2:84-91, 2005). El espectro de UV/VIS del conjugado de ADN-NPAu **Au8** utilizando **1** como molécula de anclaje mostraba una resonancia del plasmón (526

nm) que era muy próxima a la observada para el conjugado **Au24** (523 nm) utilizando como grupo de anclaje el conector hexiltiol disponible comercialmente (figura 4).

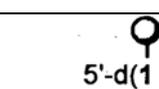
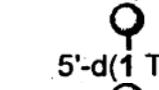
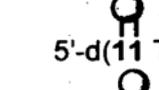
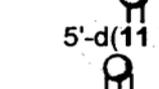
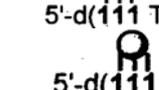
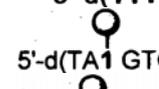
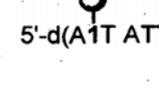
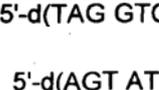
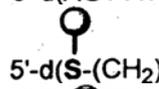
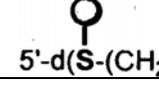
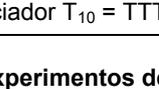
5 Resulta interesante observar que los espectros de UV/VIS registrados para los conjugados de ADN-NPAu **Au21** y **Au6**, respectivamente, en los que los oligonucleótidos se unen a las NPAu a través de una posición interior del tionucleósido 1, son cualitativamente idénticos a los observados para los conjugados de ADN-NPAu **Au8** y **Au18**, así como **Au24** y **Au25**, respectivamente, con moléculas de anclaje localizadas en una posición terminal (Tabla 5).

10 Se observó que todos los conjugados de ADN-NPAu eran estables en solución tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM (pH 7,0); no se observó ninguna agregación de las partículas acompañada de desplazamiento del máximo de UV/VIS. Lo anterior es una propiedad importante, ya que la solución de nanopartículas de oro no funcionalizadas experimenta una agregación irreversible seguida de precipitación en soluciones tampón que contienen NaCl en unos pocos minutos (Mirkin C.A. *et al.*, Nature 283:607-609, 1996).

15 Ambos resultados, (i) el máximo de UV/VIS aproximadamente en 523-526 nm, e (ii) la estabilidad en solución tampón de NaCl 0,1 M, fosfato, pueden considerarse pruebas fuertes de la unión covalente de los oligonucleótidos mediante la 7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina (1). De esta manera, cualquier posición del compuesto 1, en el extremo 5' ó 3' del oligonucleótido o en una posición interna, permite la construcción de conjugados de ADN-NPAu estables.

20

Tabla 5. Conjugados de partículas de oro que comprenden diversos tipos de oligonucleótidos y el máximo de absorción de UV/VIS.

Conjugados de oligonucleótido-nanopartícula de oro	máx. de VIS Absorción [nm]
 5'-d(1 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au8)	526
 5'-d(1 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA) (Au9)	525
 5'-d(11 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au15)	525
 5'-d(11 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA) (Au16)	526
 5'-d(111 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au17)	526
 5'-d(111 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA) (Au18)	525
 5'-d(TA1 GTC AAT ACT TAG GTC AAT ACT) (Au21)	526
 5'-d(A1T ATT GAC CTA AGT ATT GAC CTA) (Au22)	525
 5'-d(TAG GTC AAT ACT TA1 GTC AAT ACT) (Au23)	525
 5'-d(AGT ATT GAC CTA A1T ATT GAC CTA) (Au6)	525
 5'-d(S-(CH ₂) ₆ -T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au24)	523
 5'-d(S-(CH ₂) ₆ -T ₁₀ AGT ATT GAC CTA) (Au25)	523

Espaciador T₁₀ = TTT TTT TTT T.

4.3 Experimentos de hibridación de conjugados ensamblados de ADN-nanopartículas de oro

En la presente serie de experimentos, se investigaron las propiedades de hibridación de los conjugados de ADN-NPAu que incorporan tionucleósido **1** y se compararon con las observadas en los conjugados de ADN-NPAu que portaban conectores 5'-hexiltiol. En un experimento típico, se mezclan entre sí dos sondas de conjugado de ADN-NPAu que portan oligonucleótidos con secuencias complementarias (concentraciones iguales en NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM, pH 7,0), por ejemplo los conjugados de ADN-NPAu **Au8** y **Au9**. Se dejó la mezcla bajo incubación. Durante ésta, se produjo la hibridación lenta de los oligonucleótidos complementarios que se unían a las nanopartículas de oro; puesta de manifiesto por el desplazamiento al rojo del máximo de VIS (**Au8•Au9**: 526 nm → 546 nm) y el ensanchamiento de la banda de resonancia del plasmón concomitantemente a un cambio de color rojo a violeta (figura 4b). Finalmente, se observó la precipitación de la red de ADN-nanopartículas de oro, resultando en un sobrenadante transparente y un precipitado rojo oscuro. La muestra hibridaba era bastante estable; podía redispersarse pero se mantenía de color violeta incluso tras agitación intensa. De esta manera, incluso tras agitación intensa del precipitado de ADN-NPAu, se obtiene una solución violeta con un máximo de UV/VIS de 564 nm (**Au8•Au9**).

15 4.4 Experimentos de fusión con conjugados hibridados de ADN-NPAu

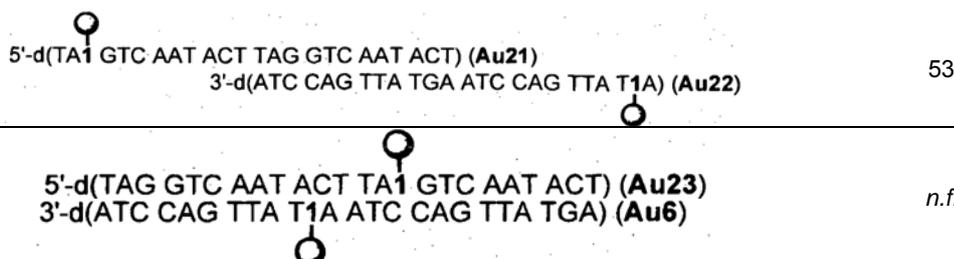
Los experimentos de fusión se llevaron a cabo con los ensamblajes formados por conjugados de ADN-NPAu que portaban oligonucleótidos complementarios. Para lo anterior, se calentaron (15°C → 75°C) las soluciones de conjugado de ADN-NPAu agregadas y se observó el cambio de absorción de VIS a 520 nm bajo agitación de la solución de ADN-NPAu. Se determinaron los valores de T_m mediante la selección del máximo de la primera derivada de una transición de fusión y se listan en la Tabla 6.

En la figura 5a se muestra un perfil de fusión agudo típico de **Au8•Au9**, indicando un valor de T_m de 54°C para la red entrelazada tridimensional de nanopartículas de Au ensambladas por el dúplex **8•9**. A título comparativo, se investigó la disociación de la red formada por los conjugados **Au24** y **Au25** utilizando oligonucleótidos complementarios con conector tiolhexilo bajo exactamente las mismas condiciones indicadas para el ensamblaje **Au8•Au9**. Para **Au24•Au25** se determinó un valor de T_m de 53°C (Tabla 6).

Se detectaron ambos ensamblajes, utilizando un conector tiolhexilo (**Au24•Au25**) o tionucleósido **1** (**Au8•Au9**), perfiles e fusión con una transición de fusión muy estrecha (intervalo de aproximadamente 4°C), tal como se demuestra en la figura 5a, mientras que la fusión del oligonucleótido dúplex **8•9** se produce en un intervalo de temperaturas mucho más amplio (aproximadamente 20°C) (figura 5a). Este resultado es consistente con observaciones realizadas anteriormente por otros que informan de que los oligonucleótidos unidos covalentemente a nanopartículas de oro muestran propiedades de fusión altamente cooperativas del dúplex en red, lo que se refleja en una transición de fusión más estrecha (Jin R. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 125:1643-1654, 2003; Taton T.A. *et al.*, Science 289:1757-1760, 2000).

Tabla 6. Valores de T_m de ensamblajes de ADN-NPAu^{a,b,c}.

Conjugados de ADN-NPAu	T_m [°C]
 5'-d(S-(CH ₂) ₆ T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au24) 3'-d(ATC CAG TTA TGA T ₁₀ -(CH ₂) ₆ -S) (Au25)	53
 5'-d(1 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au8) 3'-d(ATC CAG TTA TGA T ₁₀ 1) (Au9)	54
 5'-d(11 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au15) 3'-d(ATC CAG TTA TGA T ₁₀ 11) (Au16)	50
 5'-d(111 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au17) 3'-d(ATC CAG TTA TGA T ₁₀ 111) (Au18)	51



^a Medido a 520 nm en tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM (pH 7,0) con $A_{520}=2,1$ para cada solución de conjugado de ADN-NPAu.

^b O= nanopartícula de oro de 15 nm de diámetro. °Espaciador T₁₀ = TTT TTT TTT T. *n.f.* no se observa fusión.

Además, se dejó que los NPAu funcionalizados con múltiples tionucleósidos 5'-protuberantes **1** se hibridasen con conjugados de ADN-NPAu que portaban el oligonucleótido complementario (\rightarrow **Au15•Au16**, **Au17•Au18**). Tal como se muestra en la Tabla 6, estos ensamblajes de conjugados muestran valores de T_m muy similares (**Au15•Au16**: $T_m = 50^\circ\text{C}$; **Au17•Au18**: $T_m = 51^\circ\text{C}$). En comparación con el valor de T_m observado para el ensamblaje **Au8•Au9** utilizando sólo un tionucleósido. (1) Por cada cadena de oligonucleótido, estos valores son 3-4°C más bajos aunque todavía se encuentran en el mismo rango. Los perfiles de fusión de **Au8•Au9**, **Au15•Au16** y **Au17•Au18** que indican el estrecho intervalo de transición de fusión (aproximadamente a 4°C) se muestran en la figura 5b.

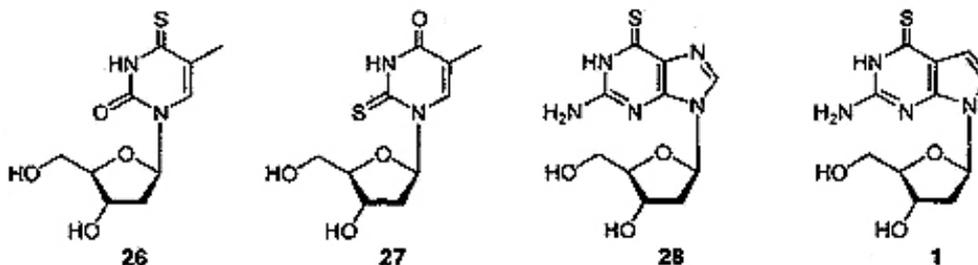
El comportamiento de fusión de los ensamblajes de ADN-NPAu que portan los oligonucleótidos 24-meros que utilizan tionucleósidos **1** como molécula de anclaje en diferentes posiciones internas en su secuencia también fueron investigados (**Au21•Au22**, **Au23•Au6**). Estos oligonucleótidos están compuestos de una secuencia de reconocimiento repetida 2 veces que permite la formación de 24 pares de bases o una hibridación parcial (12 pares de bases). Se detectó un valor de T_m de 53°C para el ensamblaje **Au21•Au22** con el tionucleósido **1** situado en la periferia de las secuencias oligonucleótidas 24-meras. Este valor de T_m apunta a una hibridación parcial de los oligonucleótidos dentro del ensamblaje de ADN-NPAu, tal como (i) un dúplex totalmente correspondiente con extremos fragmentados y apareamiento de bases únicamente en el centro del dúplex, o (ii) una hibridación parcial del dúplex dejando los nucleósidos no apareados como espaciadores entre el sitio de reconocimiento y la nanopartícula de oro, tal como se muestra en la Tabla 6, entrada 5.

Por el contrario, los conjugados de ADN-NPAu estrechamente relacionados **Au23** y **Au6** que también utilizan oligonucleótidos complementarios pero con el compuesto **1** situado en el centro de cada oligonucleótido no pueden formar una red entrelazada de ADN-NPAu. Incluso tras la incubación durante la noche no se produjo un cambio de color de la solución de conjugado combinado y no se observó ningún desplazamiento del máximo de VIS. De esta manera, no se produjo agregación. Este resultado demuestra que una distancia entre el sitio de reconocimiento y la nanopartícula de oro resulta necesaria para la formación de un ensamblaje.

Ejemplo 5:

Estabilidad de diversos tioxonucleósidos bajo condiciones de desprotección

La estabilidad del grupo tio-oxo de varios nucleósidos (**1**, **26-28**) se sometió a ensayo en solución alcalina (condiciones estándares de desprotección de oligonucleótido: solución acuosa al 25% de NH₃, 14 a 16 h, 60°C).



Se realizó un seguimiento de la estabilidad de la hidrólisis de los tioxonucleósidos **1**, **26-28** bajo condiciones estándares de desprotección (solución acuosa al 25% de NH₃, 14 a 16 h, 60°C) mediante HPLC de fase inversa (RP-18, 250x4 mm). Se disolvieron los nucleósidos **1** y **26** a **28** (aproximadamente 1 mg cada uno) en 1 ml de

solucion acuosa al 25% de amonio en un recipiente sellado y se incubaron a 60°C. Tras 16 h de incubación se eliminó el amonio acuoso mediante evaporación y el residuo se redisolvió en 1 ml de tampón A de HPLC. Se inyectaron 50 µl de cada muestra en el aparato de HPLC y se registraron los espectros a 260 nm. Se utilizó el sistema de gradiente de solventes siguiente: [A: 0,1 M (Et₃NH)OAc (pH 7,0)/MeCN 95:5; B: MeCN; gradiente: 0-15 min. 0% a 30% de B en A, 30-40 min. 30% a 40% de B en A, 40-45 min. 40% a 0% de B en A, caudal: 0,7 cm³ min⁻¹]. Se llevó a cabo la cuantificación de los constituyentes basándose en las áreas de los picos, que se dividieron por los coeficientes de extinción de los nucleósidos (ϵ_{260}) en el tampón A de HPLC.

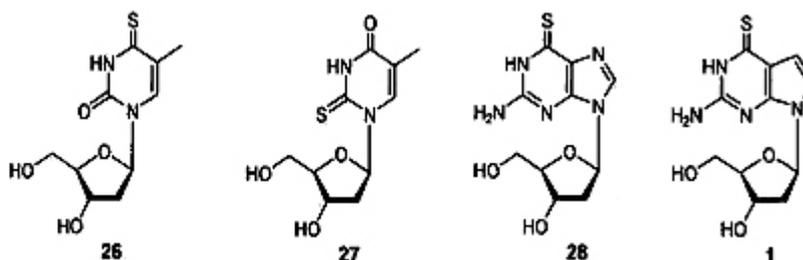
Se utilizaron los coeficientes de extinción de los nucleósidos (ϵ_{260}) siguientes: **26** (1500), **27** (6300), **28** (7300) y **1** (10100).

Tal como se pone de manifiesto a partir de la Tabla 7, así como de las figuras 6 a 9 correspondientes, los nucleósidos **27**, **28** y **1** muestran una estabilidad decente, mientras que se observó que el nucleósido **26** era bastante inestable.

Tabla 7. Conversión de los tioxonucleósidos 1 y 26 a 28 tras la incubación en solución acuosa de amonio durante 16 h a 60°C.

Conversión de nucleósido en %

26	32,1
27	<1%
28	8,6
1	7,3



Ejemplo 6:

Conjugación de diversos oligonucleótidos que incorporan diferentes tioxonucleósidos, con nanopartículas de oro

6.1 Síntesis, purificación y caracterización de los oligonucleótidos.

Se sintetizó una serie de oligonucleótidos (8-9, 32-37) que contenía los nucleósidos **1** y **26 a 28** (ver la Tabla 8) en fase sólida a escala de 1 µm utilizando las fosforoamiditas habituales y las fosforoamiditas **5** y **38 a 40** (ver la figura 10) siguiendo el protocolo para la reacción de 3'-(2-cianoetil)-fosforoamidita. Tras la escisión del soporte sólido, los oligonucleótidos que contenían **27** ó **1** fueron desprotegidos en solución acuosa al 25% de NH₃ durante 14 a 16 h a 60°C (condiciones estándares de desprotección). Los oligonucleótidos que incorporaban **26** ó **28** se desprotegeron en solución acuosa al 25% de NH₃ que contenía NaSH 50 mM durante la noche a temperatura ambiente (condiciones recomendadas del fabricante). Los oligonucleótidos que contenían DMT se purificaron en HPLC de fase inversa en el modo de DMT-on (Merck-Hitachi-HPLC, columna RP-18), con el sistema de gradiente siguiente [A: 0,1 M (Et₃NH)OAc (pH 7,0)/MeCN 95:5; B: MeCN]: 3 min., 20% de B en A, 12 min., 20%-50% de B en A y 25 min., 20% de B en A, caudal: 1,0 ml/min. Se evaporó el solvente y los oligonucleótidos se trataron con Cl₂CHCOOH/CH₂Cl₂ al 2,5% (400 ml) durante 5 min. a 0°C para eliminar los residuos de 4,4'-dimetoxitritilo. Los oligómeros destrilitados se purificaron nuevamente mediante HPLC de fase inversa [gradiente: 0-20 min. 0% a 20% de B en A; caudal: 1 ml/min]. Se desalaron los oligómeros en una columna corta (RP-18, gel de sílice) utilizando H₂O para la elución de la sal, mientras que los oligómeros se eluyeron con MeOH/H₂O (3:2). Los oligonucleótidos fueron liofilizados en un evaporador Speed-Vac, rindiendo sólidos incoloros que se congelaron a -24°C.

Se determinaron las masas moleculares de los oligonucleótidos **8** y **9**, y **32 a 37** mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en el modo negativo lineal. Las masas detectadas eran idénticas a los valores calculados (Tabla 8).

Tabla 8. Oligonucleótidos de cadena sencilla utilizados para la conjugación con NPAu.

Oligonucleótidos	PM (calc.)	PM (obs.)
5'-d(26 -T10-TAG GTC AAT ACT) (32)	7006,68	7007,16
5'-d(26 -T10-AGT ATT GAC CTA) (33)	7006,68	7006,38
5'-d(27 -T10-TAG GTC AAT ACT) (34)	7006,68	7006,71

5'-d(27-T10-AGT ATT GAC CTA) (35)	7006,68	7007,20
5'-d(28-T10-TAG GTC AAT ACT) (36)	7031,69	7032,49
5'-d(28-T10-AGT ATT GAC CTA) (37)	7031,69	7032,96
5'-d(1-T10-TAG GTC AAT ACT) (8)	7030,17	7030,81
5'-d(1-T10-AGT ATT GAC CTA) (9)	7030,17	7031,08

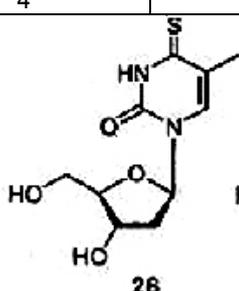
Espaciador T₁₀ = 5'-d(TTT TTT TTT T).

6.2 Procedimiento general para la preparación de conjugados de oligonucleótido-nanopartícula de oro que utilizan tiooxo-nucleósidos como anclaje molecular.

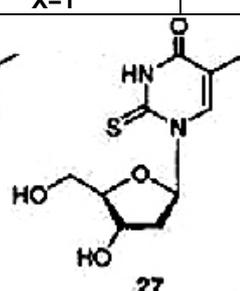
5 Se preparó una solución de nanopartículas de oro de 15 nm a partir de una solución de HAuCl₄ mediante reducción de citrato según el protocolo informado por Turkevich y posteriormente descrito por Letsinger y Mirkin (Mirkin C.A. *et al.*, Nature 283:607-609, 1996; Elghanian R. *et al.*, Science 277:1078-1081, 1997; Turkevich J. *et al.*, Faraday Soc. 11:55-75, 1951). Las nanopartículas de oro (~3 nM) se funcionalizaron con los oligonucleótidos 8 y 9, y 32 a 37 que
10 contenían uno de los tiooxonucleósidos 1, y 26 a 28 en los extremo 5' (Tabla 2). Se prepararon los conjugados de ADN-NPAu mediante la mezcla de 1 ml de la solución de nanopartículas de oro con soluciones purificadas de oligonucleótidos (concentración final de oligonucleótido: 3 µM). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo a temperatura ligeramente elevada (40°C). Tras dejar en reposo durante 20 h, se añadieron 5 ml de una solución
15 tampón de NaCl 2 M, fosfato 0,2 mM (pH 7,0) bajo agitación constante para incrementar la concentración de NaCl de la solución de nanopartículas a 0,01 M. Las soluciones se incubaron durante 6 a 8 h a 40°C. Este procedimiento se repitió tres veces para incrementar la concentración de NaCl de la solución de conjugado de nanopartículas escalonadamente de 0,02 M, 0,05 M y finalmente a 0,1 M de NaCl. Entre medio se dejó en todos los casos que las soluciones envejeciesen durante 6 a 8 h a 40°C. A continuación, se centrifugaron las soluciones de ADN-nanopartículas de oro (8.000 rpm) y se separó el sobrenadante transparente para eliminar los oligonucleótidos no
20 unidos. El precipitado se redispersó en 1 ml de una solución tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM (pH 7,0). Tras la incubación (24 h, 40°C), se lavaron nuevamente las soluciones de nanopartículas con el mismo tampón (tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM, pH 7,0), rindiendo finalmente 1 ml de los conjugados de ADN-NPAu Au8 y Au9 y Au32 a Au37.

Tabla 9. Aplicabilidad de los tiooxonucleósidos 1 y 26 a 28 a la formación de conjugados de nanopartículas de oro.

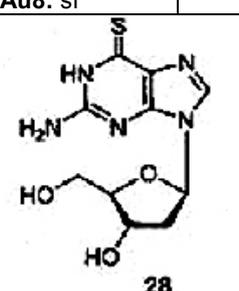
Entrada	Nucleósido	Conjugado	Conjugado	Hibridación de conjugados complementarios ^c
1	X=26	Au32: sí ^a / no ^b	Au33: sí ^a / no ^b	sí
2	X=27	Au34: sí ^a / no ^b	Au35: sí ^a / no ^b	no
3	X=28	Au36: sí ^{a,b}	Au37: sí ^{a,b}	sí*
4	X=1	Au8: sí ^{a,b}	Au9: sí ^{a,b}	sí



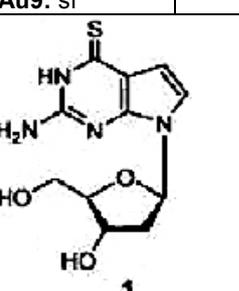
26



27



28



1

^aSe obtuvieron conjugados estables de oligonucleótido-nanopartícula de oro en tampón de NaCl 0,1 M y fosfato 10 mM, pH 7,0. ^bSe obtuvieron conjugados estables de oligonucleótido-nanopartícula de oro en tampón de NaCl 0,2 M y fosfato 10 mM, pH 7,0. ^cEl experimento de hibridación se llevó a cabo en tampón de NaCl 0,1 M y fosfato 10 mM, pH 7,0, con incubación durante la noche. *La formación de la red de ADN-nanopartículas de oro se produjo mucho más lentamente y requirió varios días. Espaciador T₁₀ = 5'-d(TTT TTT TTT T). s=nanopartícula de oro de 15 nm de diámetro.

6.2.1 Datos experimentales para la 4-tio-2'-desoxitimidina

Los espectros de UV-VIS de los oligonucleótidos **32** y **33** que contenían 4-tio-2'-desoxitimidina (**26**) muestran la absorción de UV característica a 337 nm debido al grupo tiooxo del nucleósido **26** (valor informado en la literatura para **26**: 335 nm; Fox, J.J. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 81:178-187, 1959) (figura 9a). Se prepararon ADN-NPAu que utilizan el oligonucleótido **32** ó **33** tal como se ha indicado anteriormente. Los conjugados de ADN-NPAu resultantes **Au32** y **Au33** mostraban resonancia del plasmón a 524 nm, indicando un estado no agregado. La estabilidad de los conjugados de ADN-NPAu **Au32** y **Au33** se sometió a ensayo adicionalmente en una solución tampón de NaCl 0,2 M, fosfato 10 mM, pH 7. Tras la incubación durante la noche en presencia de NaCl 0,2 M en una cubeta de vidrio, ambos conjugados mostraban resonancia del plasmón a 524,5 nm. Sin embargo, se observó que una cantidad significativa del conjugado de ADN-NPAu se adhería a la superficie de vidrio de la cubeta. Debido a ello, la altura de la absorbancia de la solución de conjugado de ADN-NPAu se redujo en aproximadamente 36% respecto al valor original. Basándose en este resultado, los conjugados de ADN-NPAu que utilizaban 4-tio-2'-desoxitimidina (**26**) como molécula de anclaje se clasificaron como **no estables** en presencia de NaCl 0,2 M (ver la Tabla 9, entrada 1).

A continuación, se investigaron las propiedades de hibridación de los conjugados de oligonucleótido-NPAu que incorporan tionucleósido **26**. En un experimento típico, se mezclaron 0,5 ml de solución tampón de NaCl 0,1 M y fosfato 10 mM, pH 7, que contenía el conjugado de ADN-NPAu **Au32** y 0,5 ml de solución tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM, pH 7, que contenía el conjugado de ADN-NPAu **Au33** (concentraciones iguales). La solución que contenía los conjugados de ADN-NPAu **Au32** y **Au33** se dejó bajo incubación durante la noche. Durante esta incubación, se produjo la hibridación lenta de los conjugados de NPAu **Au32** y **Au33** con oligonucleótido complementario, lo que se puso de manifiesto por el lento desplazamiento al rojo (524 nm → 548 nm) y el ensanchamiento de la banda de resonancia del plasmón concomitantemente con un cambio de color de rojo a violeta. Finalmente, se observó la precipitación de la red de ADN-nanopartículas de Oro, resultando en un sobrenadante transparente y un precipitado oscuro. Tras agitación intensiva de la solución de ADN-NPAu, el precipitado puede redispersarse, conduciendo a una solución violeta con un máximo de UV/VIS de 548 nm.

6.2.2 Datos experimentales para la 2-tio-2'-desoxitimidina

Los espectros de UV de los oligonucleótidos **34** y **35** mostraban únicamente un máximo de absorción en 264 nm (valor informado en la literatura para **27**: 264 nm; Vorbrueggen H. *et al.*, Chem. Ber. 106:3039-306,1, 1973). Se prepararon ADN-NPAu que utilizan el oligonucleótido **34** ó **35** tal como se ha indicado anteriormente. Los conjugados de ADN-NPAu resultantes **Au-16** y **Au-17** mostraban resonancia del plasmón en 524 nm, indicando un estado no agregado en una solución tampón de NaCl 0,1 M y fosfato 10 mM, pH 7. Sin embargo, en presencia de NaCl 0,2 M (tampón de fosfato 10 mM, pH 7), se produjo la agregación (la solución se volvió negra) seguido de la precipitación de manera inmediata. Basándose en este resultado, los conjugados de ADN-NPAu que utilizaban 2-tio-2'-desoxitimidina (**27**) como molécula de anclaje se clasificaron como **no estables** en presencia de NaCl 0,2 M (ver la Tabla 9, entrada 2).

A continuación, se investigó la hibridación de los conjugados de oligonucleótido-NPAu que incorporan tionucleósido **27**. En un experimento típico, se mezclaron 0,5 ml de solución tampón de NaCl 0,1 M y fosfato 10 mM, pH 7, que contenía el conjugado de ADN-NPAu **Au34** y 0,5 ml de solución tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM, pH 7, que contenía el conjugado de ADN-NPAu **Au35** (concentraciones iguales). La solución que contenía los conjugados de ADN-NPAu **Au34** y **Au35** se dejó bajo incubación durante la noche. No se observó cambio de color de la solución de conjugado de ADN-NPAu. El espectro de UV/VIS de la solución de ADN-NPAu que contenía los conjugados complementarios **Au34** y **Au35** mostró resonancia del plasmón a 524 nm, indicando un estado no agregado.

6.2.3 Datos experimentales para la 6-tio-2'-desoxiguanosina

Los espectros de UV-VIS de los oligonucleótidos **36** y **37** que contenían 6-tio-2'-desoxiguanosina (**28**) mostraban la absorción de UV característica a 343 nm debido al grupo tiooxo del nucleósido **28** (valor informado en la literatura para **28**: 341 nm; Iwamoto R.H. *et al.*, J. Med. Chem. 6:684-688, 1963). Se prepararon ADN-NPAu que utilizan el oligonucleótido **36** ó **37** siguiendo el procedimiento tal como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, los presentes inventores encontraron que la preparación de conjugados de ADN-NPAu con **36** ó **37** presentaba problemas. La conjugación de los oligonucleótidos **36** y **37** con NPAu fracasó en varias ocasiones (tasa de fracaso de 50%). Además, resultó necesario reducir significativamente la velocidad de centrifugación de 8.000 rpm (velocidad estándar) a 5.800 rpm, ya que en caso contrario no resultaba posible redispersar el precipitado.

Los conjugados de ADN-NPAu resultantes **Au36** y **Au37** mostraban resonancia del plasmón a 524 nm, indicando un estado no agregado. La estabilidad de los conjugados de ADN-NPAu **Au36** y **Au37** se sometió a ensayo adicionalmente en una solución tampón de NaCl 0,2 M, fosfato 10 mM, pH 7 (figura 13). Tras la incubación durante la noche en presencia de NaCl 0,2 M en una cubeta de vidrio, ambos conjugados mostraban resonancia del plasmón a 525 nm. Sólo se adhería una cantidad reducida de los conjugados de ADN-NPAu a la superficie de vidrio de la cubeta. La altura de la absorbancia de la solución de conjugado de ADN-NPAu se redujo en aproximadamente 10% a 14% respecto al valor original (figura 13). Basándose en este resultado, los conjugados de ADN-NPAu que

utilizaban 6-tio-2'-desoxiguanosina (**28**) como molécula de anclaje se clasificaron como **estables** en presencia de NaCl 0,2 M (ver la Tabla 9, entrada 3).

5 A continuación, se investigaron las propiedades de los conjugados de oligonucleótido-NPAu que incorporaban tionucleósido **28**. En un experimento típico, se mezclaron 0,5 ml de solución tampón de NaCl 0,1 M y fosfato 10 mM, pH 7, que contenía el conjugado de ADN-NPAu **Au36** y 0,5 ml de solución tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM, pH 7, que contenía el conjugado de ADN-NPAu **Au37** (concentraciones iguales). La solución que contenía los conjugados de ADN-NPAu **Au36** y **Au37** se dejó bajo incubación durante la noche. Sólo se observó un ligero cambio de color de la solución de conjugado de ADN-NPAu. El espectro de UV/VIS de la solución de ADN-NPAu que contenía los conjugados complementarios **Au36** y **Au37** mostró un desplazamiento al rojo (524 nm → 538 nm) de la banda de resonancia del plasmón, una reducción de la absorción y un ligero ensanchamiento de la banda de resonancia del plasmón, pero los presentes inventores no observaron precipitación de los ADN-NPAu tal como se ha descrito para 4-tio-2'-desoxitimidina (**26**) ó 7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina (**1**) tras una noche de incubación (ver las secciones 6.2.1 y 6.2.4). Tras sólo unos días (aproximadamente 1 semana), se observó la precipitación de la red de ADN-nanopartículas de oro, resultando en un sobrenadante transparente y un precipitado oscuro. Tras agitación intensiva de la solución de ADN-NPAu, el precipitado puede redispersarse, conduciendo a una solución violeta con un máximo de UV/VIS de 549,5 nm.

20 6.2.4 Datos experimentales para la 7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina

Los espectros de UV-VIS de los oligonucleótidos **8** y **9** que contenían 7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina (**1**) mostraban la absorción de UV característica a 345 nm debido al grupo tiooxo del nucleósido **1** (valor informado en la literatura para **1**: 345 nm; Seela F. *et al.*, Liebigs Ann. Chem. 1:15, 1987). Se prepararon ADN-NPAu que utilizan el oligonucleótido **8** ó **9** tal como se ha indicado anteriormente. Los conjugados de ADN-NPAu resultantes **Au8** y **Au9** mostraban resonancia del plasmón a 524 nm, indicando un estado no agregado. Los conjugados de ADN-NPAu **Au8** y **Au9** también se redispersaron en una solución tampón de NaCl 0,2 M y fosfato 10 mM, pH 7.

Tras la incubación durante la noche en presencia de NaCl 0,2 M en una cubeta de vidrio, ambos conjugados mostraban resonancia del plasmón en 524,5 nm. Sólo se adhería una cantidad reducida de los conjugados de ADN-NPAu a la superficie de vidrio de la cubeta. La altura de la absorbancia de la solución de conjugado de ADN-NPAu se redujo en aproximadamente 10% a 14% respecto al valor original. Basándose en este resultado, los conjugados de ADN-NPAu que utilizaban 7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina (**1**) como molécula de anclaje se clasificaron como **estables** en presencia de NaCl 0,2 M (ver la Tabla 9, entrada 4).

35 A continuación, se investigaron las propiedades de hibridación de los conjugados de oligonucleótido-NPAu que incorporan tionucleósido **1**. En un experimento típico, se mezclaron 0,5 ml de solución tampón de NaCl 0,1 M y fosfato 10 mM, pH 7, que contenía el conjugado de ADN-NPAu **Au8** y 0,5 ml de solución tampón de NaCl 0,1 M, fosfato 10 mM, pH 7, que contenía el conjugado de ADN-NPAu **Au9** (concentraciones iguales). La solución que contenía los conjugados de ADN-NPAu **Au8** y **Au9** se dejó bajo incubación durante la noche. Durante esta incubación, se produjo la hibridación lenta de los conjugados de NPAu **Au8** y **Au9** con oligonucleótido complementario, lo que se puso de manifiesto por el lento desplazamiento al rojo (524 nm → 567 nm) y el ensanchamiento de la banda de resonancia del plasmón concomitantemente con un cambio de color de rojo a violeta. Finalmente, se observó la precipitación de la red de ADN-nanopartículas de Oro, resultando en un sobrenadante transparente y un precipitado oscuro. Tras agitación intensiva de la solución de ADN-NPAu, el precipitado puede redispersarse, conduciendo a una solución violeta con un máximo de UV/VIS de 567 nm.

50 A partir de los experimentos resumidos anteriormente, ver especialmente la Tabla 9, aparentemente el conjugado de oligonucleótido-oro, en el que el oligonucleótido comprende un tioxonucleótido basado en un nucleósido según la fórmula I (por ejemplo las sustancias **1** y **28** de la Tabla 9), es, por lo menos en determinados aspectos técnicos, superior a un conjugado de oligonucleótido-oro, en el que el oligonucleótido comprende un tioxonucleótido tal como es conocido de la técnica anterior (por ejemplo las sustancias **26** y **27**, respectivamente, de la Tabla 9).

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Conjugado entre una fase sólida tiofílica y un oligonucleótido que comprende un tioxonucleótido

<130> 27094 WO

60

<150> EP10188515

<151> 2010-10-22

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida

<220>
 <221> modified_base

15 <222> (14) .. (14)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)

<400> 1
 agtattgacc taahtattga ccta 24

20 <210> 2
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida

<220>
 <221> modified_base

30 <222> (7) .. (7)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)

<400> 2
 agtatthacc ta 12

35 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia oligonucleótida

45 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)

50 <400> 3
 httttttt ttagtcaat act 23

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> Roche Diagnostics GmbH
 F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Conjugado entre una fase sólida tiofílica y un oligonucleótido que comprende un tiooxonucleótido

60 <130> 27094 WO

<150> EP10188515

<151> 2010-10-22

<160> 26

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 24
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia oligonucleótida

15 <220>
 <221> modified_base
 <222> (14)..(14)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)

20 <400> 1
 agtattgacc taahtattga ccta 24

<210> 2
 <211> 12

25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia oligonucleótida

30 <220>
 <221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)

35 <400> 2
 agtatthacc ta 12

<210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida

45 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)

50 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)

<400> 3
 httttttt ttaggtcaat act 23

55 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)
 5
 <400> 4
 httttttt tagtattgac cta 23
 <210> 5
 10 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia oligonucleótida
 <400> 5
 taggtcaata ct 12
 20 <210> 6
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 <400> 6
 agtattgacc ta 12
 30 <210> 7
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 <220>
 40 <221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)
 <400> 7
 45 ahtattgacc ta 12
 <210> 8
 <211> 12
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 55 <220>
 <221> modified_base
 <222> (3) .. (4)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)
 60 <400> 8
 tahhtcaata ct 12

<210> 9
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 <220>
 10 <221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)
 <220>
 15 <221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)
 <400> 9
 20 ahtatthacc ta 12
 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 <220>
 30 <221> modified_base
 <222> (1)..(2)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)
 <400> 10
 35 hhttttttt tttagtcaa tact 24
 <210> 11
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 <220>
 45 <221> modified_base
 <222> (1)..(2)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)
 <400> 11
 50 hhttttttt ttagtattga ccta 24
 <210> 12
 55 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Secuencia oligonucleótida
 <220>
 <221> modified_base

<222> (1)..(3)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)

5 <400> 12
 hhhtttttt ttttagtca atact 25

10 <210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia oligonucleótida

15 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)

20 <400> 13
 hhhtttttt ttttagtattg accta 25

25 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida

<400> 14
 taggtcaata cttaggtcaa tact 24

35 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> taggtcaatacttaggtcaatact

<400> 15
 agtattgacc taagtattga ccta 24

45 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida

<220>
 <221> modified_base

55 <222> (3)..(3)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)

60 <400> 16
 tahgtcaata cttaggtcaa tact 24

<210> 17
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 5
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (2)..(2)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)
 10
 <400> 17
 ahtattgacc taagtattga ccta 24
 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 20
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> "h" indica compuesto 1 (7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina)
 25
 <400> 18
 taggtcaata cttahgtcaa tact 24
 <210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> "h" indicates Tritil-S-(CH₂)₆
 httttttt ttaggtcaat act 23
 40
 <210> 20
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> "h" indicates Tritil-S-(CH₂)₆
 <400> 20
 httttttt tagtattgac cta 23
 55
 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 60

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 5
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> "h" indica compuesto 26 (4-tio-2'-desoxitimidina)
 10
 <400> 21
 httttttt ttagtcaat act 23
 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 20
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> "h" indica compuesto 26 (4-tio-2'-desoxitimidina)
 25
 <400> 22
 httttttt tagtattgac cta 23
 30
 <210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 40
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> "h" indica compuesto 27 (2-tio-2'-desoxitimidina)
 45
 <400> 23
 httttttt ttagtcaat act 23
 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleótida
 55
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> "h" indica compuesto 27 (2-tio-2'-desoxitimidina)
 60
 <400> 24
 httttttt tagtattgac cta 23
 <210> 25
 <211> 23

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia oligonucleótida

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
10 <223> "h" indica compuesto 28 (6-tio-2'-desoxiguanosina)

<400> 25
httttttt ttagtcaat act 23

15 <210> 26
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia oligonucleótida

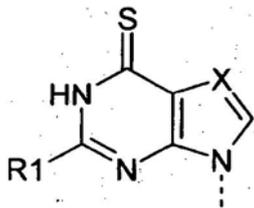
<220>
<221> modified_base
25 <222> (1)..(1)
<223> "h" indica compuesto 28 (6-tio-2'-desoxiguanosina)

<400> 26
httttttt tagtattgac cta 23

30

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de oligonucleótido-fase sólida, en el que la fase sólida comprende un metal tiofílico, en el que el oligonucleótido comprende por lo menos una tioxonucleobase según la fórmula I:



5 en la que X es CH o N, en la que R¹ es H o NH₂, en la que --- indica un enlace covalente, y en el que dicho oligonucleótido se une a dicha fase sólida mediante el átomo de azufre de dicho tioxonucleótido.

10 2. Conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la reivindicación 1, en el que X en la fórmula I es CH.

3. Conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la reivindicación 1 ó 2, en el que la fase sólida tiofílica se selecciona de entre el grupo que consiste de un metal noble tiofílico o un nanocrystal semiconductor que comprende un metal tiofílico.

15 4. Conjugado de oligonucleótido-fase sólida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fase sólida tiofílica es un metal noble seleccionado de entre el grupo que consiste de oro y plata.

5. Conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la reivindicación 4, en el que el metal es oro.

20 6. Conjugado de oligonucleótido-fase sólida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la fase sólida es una nanopartícula de oro.

7. Conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la reivindicación 4, en el que el metal es oro presente como una capa sobre un soporte sólido.

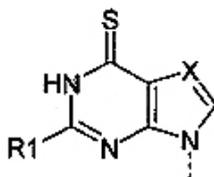
25 8. Conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la reivindicación 1, en el que la fase sólida tiofílica es un material semiconductor tiofílico.

30 9. Conjugado de oligonucleótido-fase sólida según la reivindicación 8, en el que el material semiconductor tiofílico se encuentra presente en forma de un nanocrystal.

10. Conjugado de oligonucleótido-fase sólida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el oligonucleótido presenta una longitud de por lo menos 8 nucleótidos.

35 11. Método para producir un conjugado de oligonucleótido-fase sólida, comprendiendo el método las etapas de:

a) proporcionar una fase sólida que comprende un metal tiofílico y b) unir un oligonucleótido que contiene por lo menos una tioxonucleobase según la fórmula I:



40 en la que X es CH o N, en la que R¹ es H o NH₂ y en la que --- indica un enlace covalente, a dicho metal tiofílico mediante el átomo de azufre de dicho tioxonucleótido.

12. Método según la reivindicación 11, en el que en el oligonucleótido el tioxonucleótido basado en un nucleósido de fórmula I es un 7-deazanucleótido, es decir, en el que X es CH.

45 13. Método según la reivindicación 11 ó 12, en el que el oligonucleótido presenta una longitud de por lo menos 8 nucleótidos.

14. Utilización *in vitro* de un conjugado de oligonucleótido-fase sólida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en un método de detección basado en la hibridación de ácidos nucleicos.
- 5 15. Utilización *in vitro* de un conjugado de oligonucleótido-nanopartícula según la reivindicación 6 ó 9 como marcaje.

Fig. 1

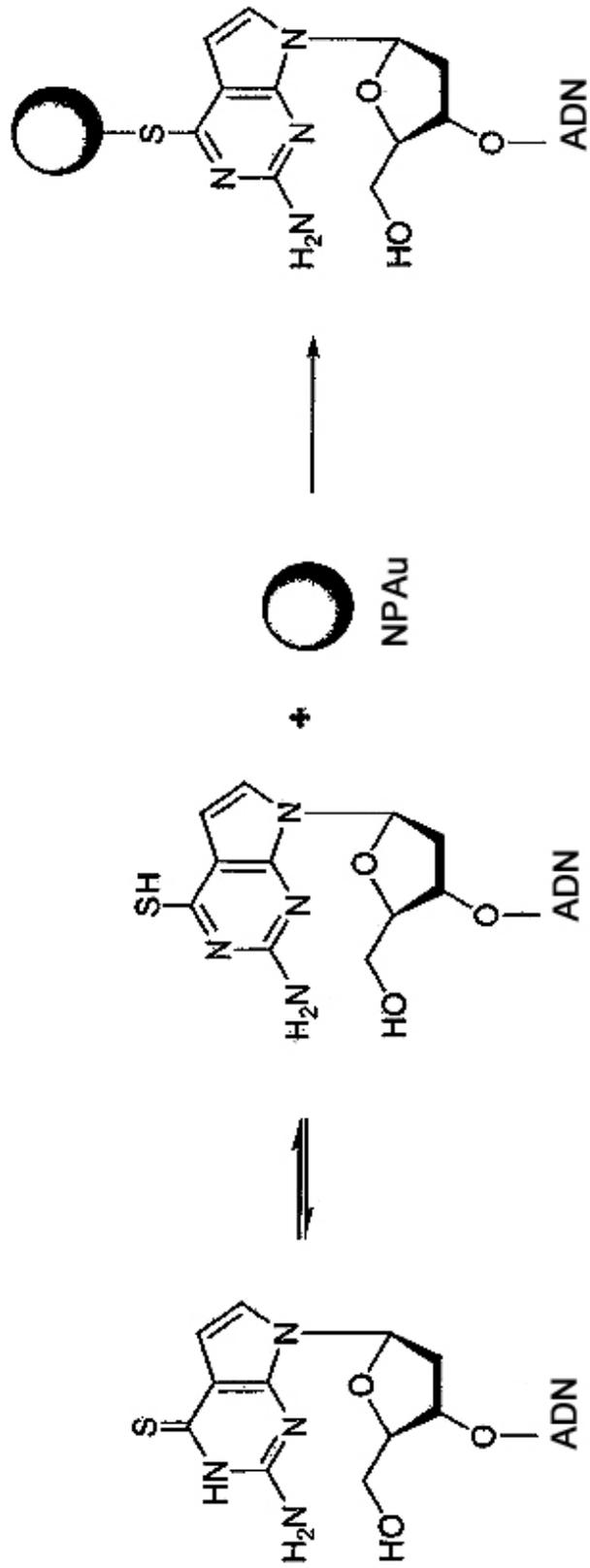


Fig. 2

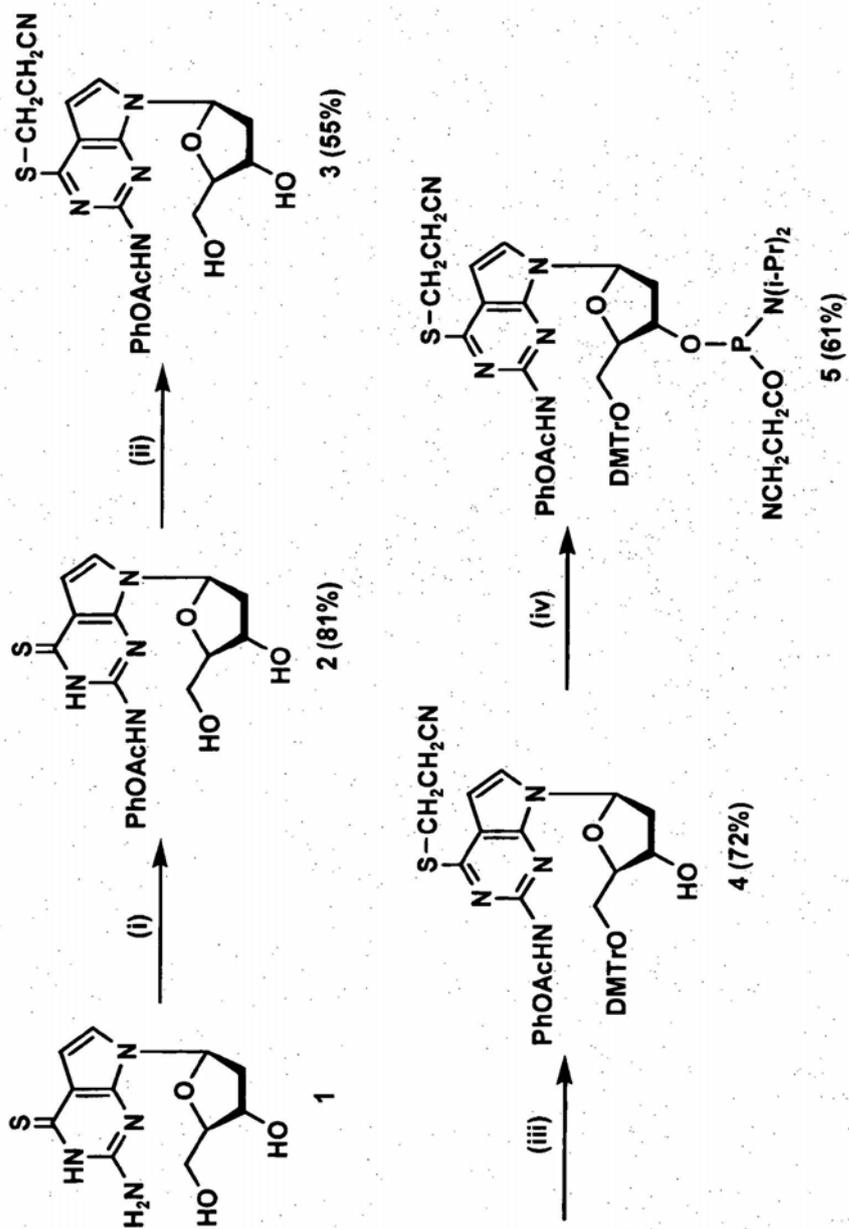


Fig. 3

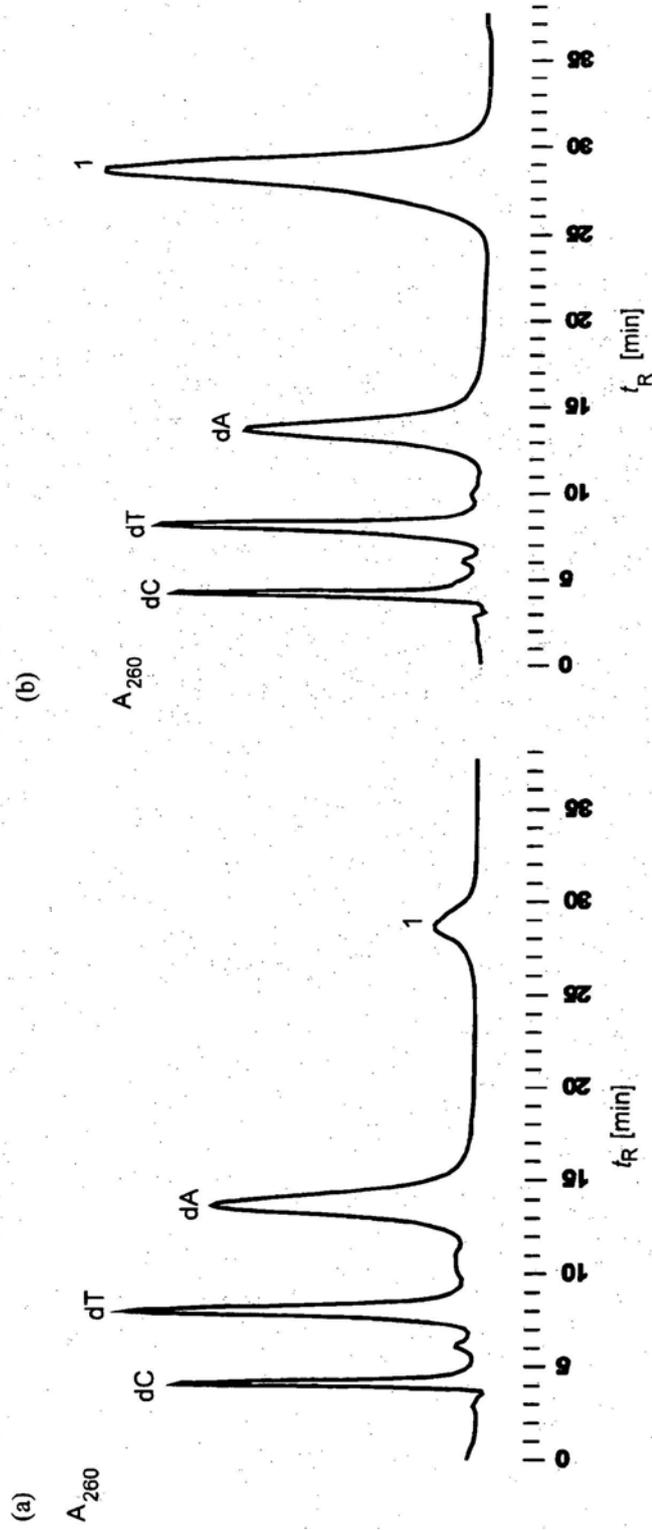


Fig. 4

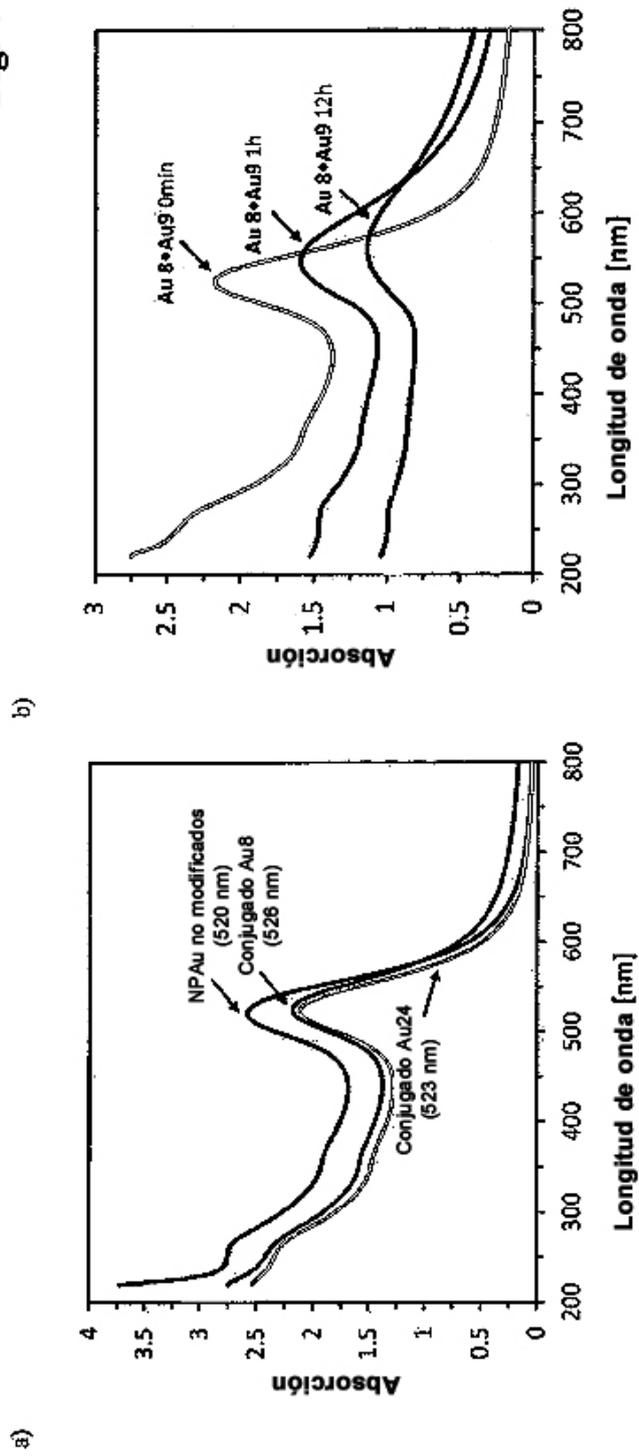


Fig. 5

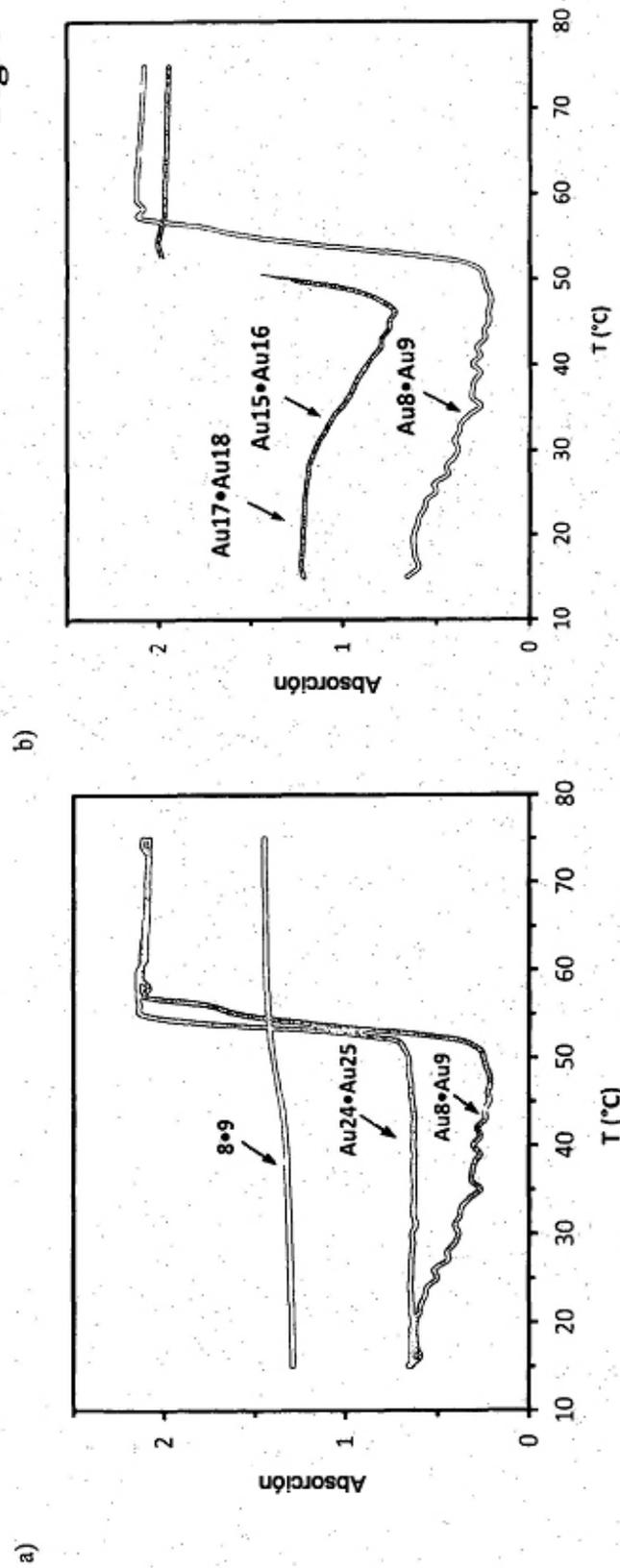


Fig. 6

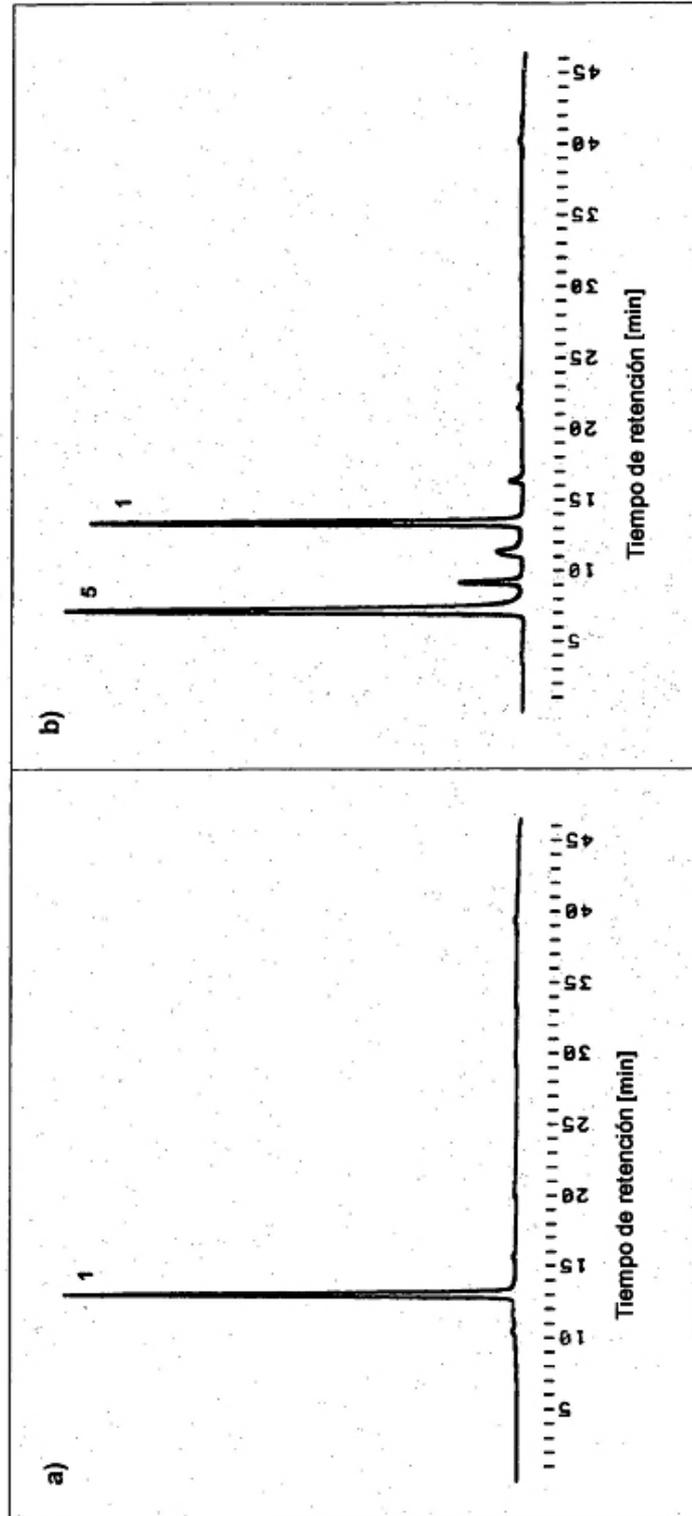


Fig. 7

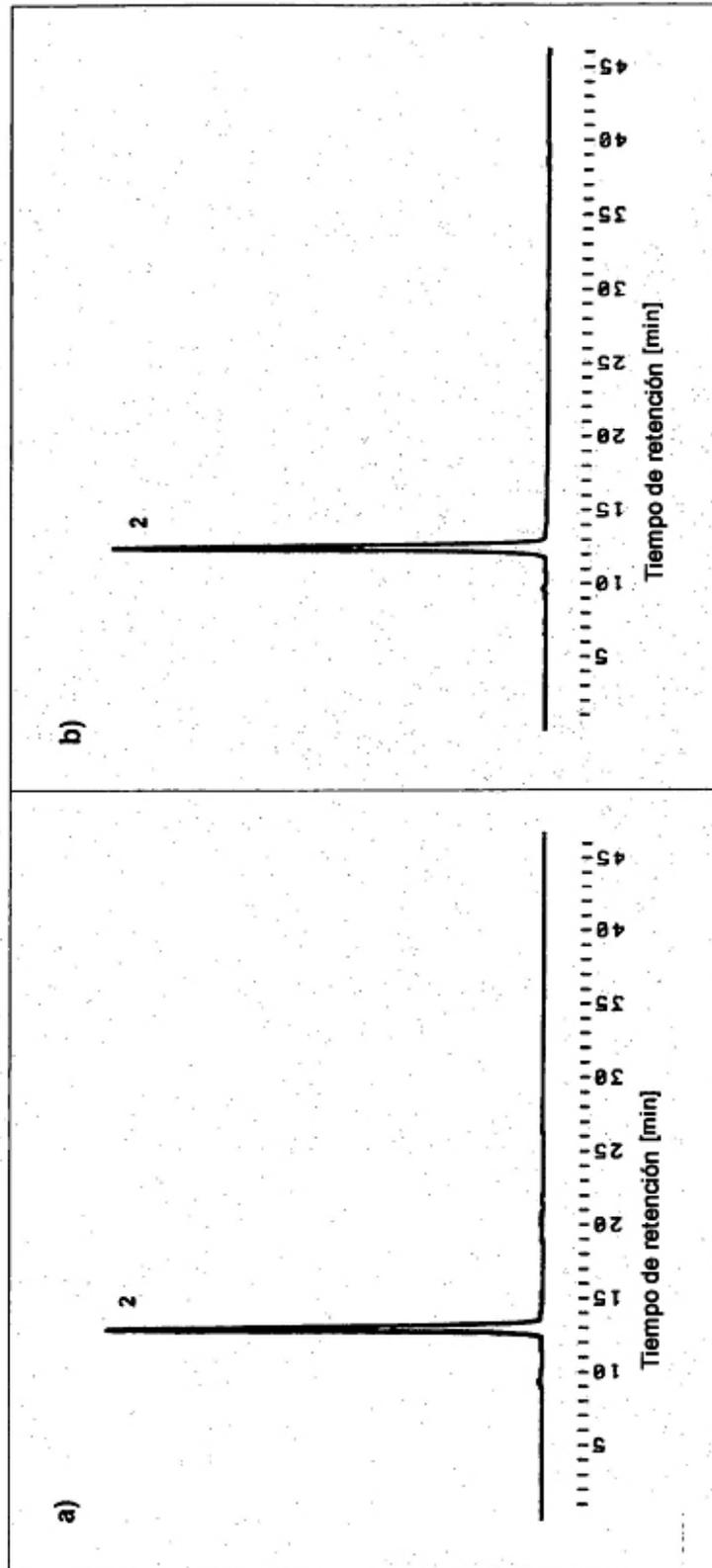


Fig. 8

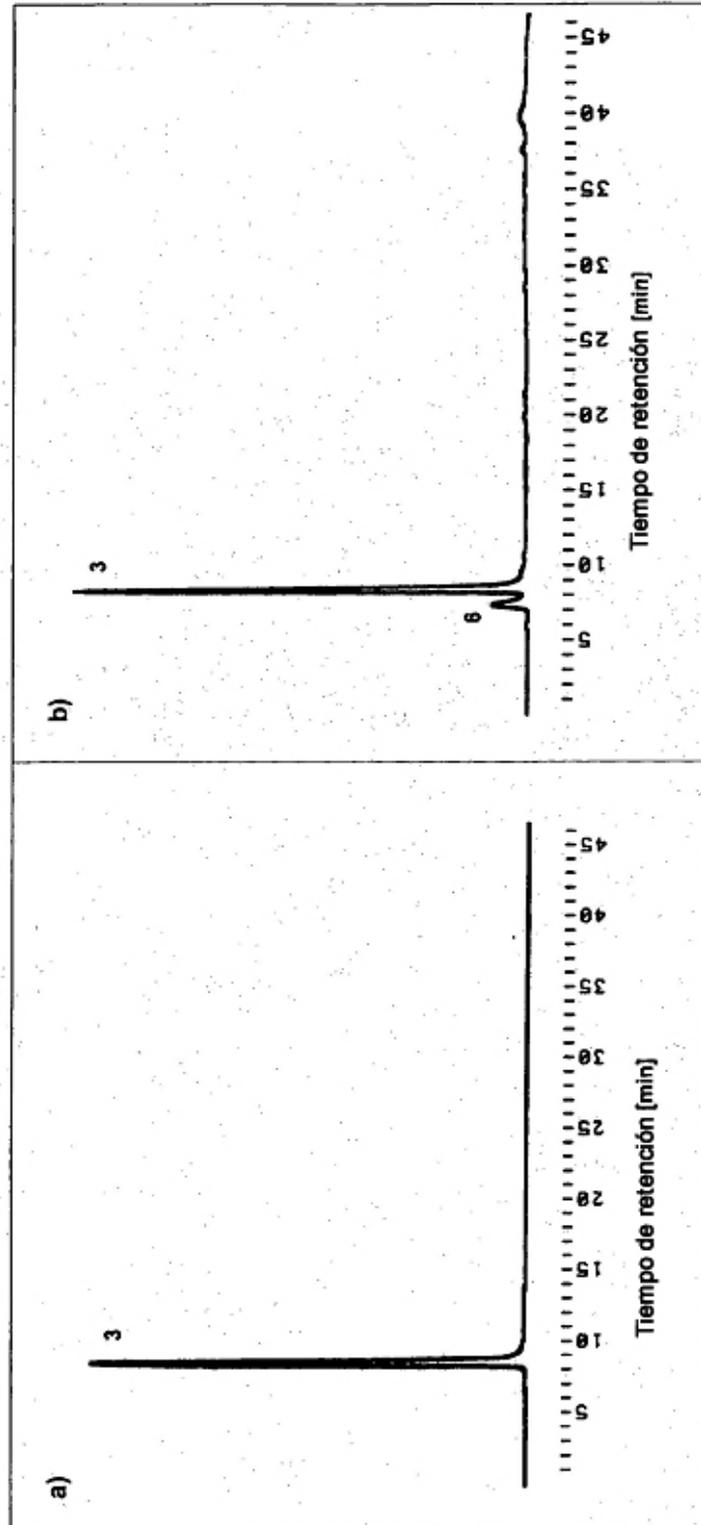


Fig. 9

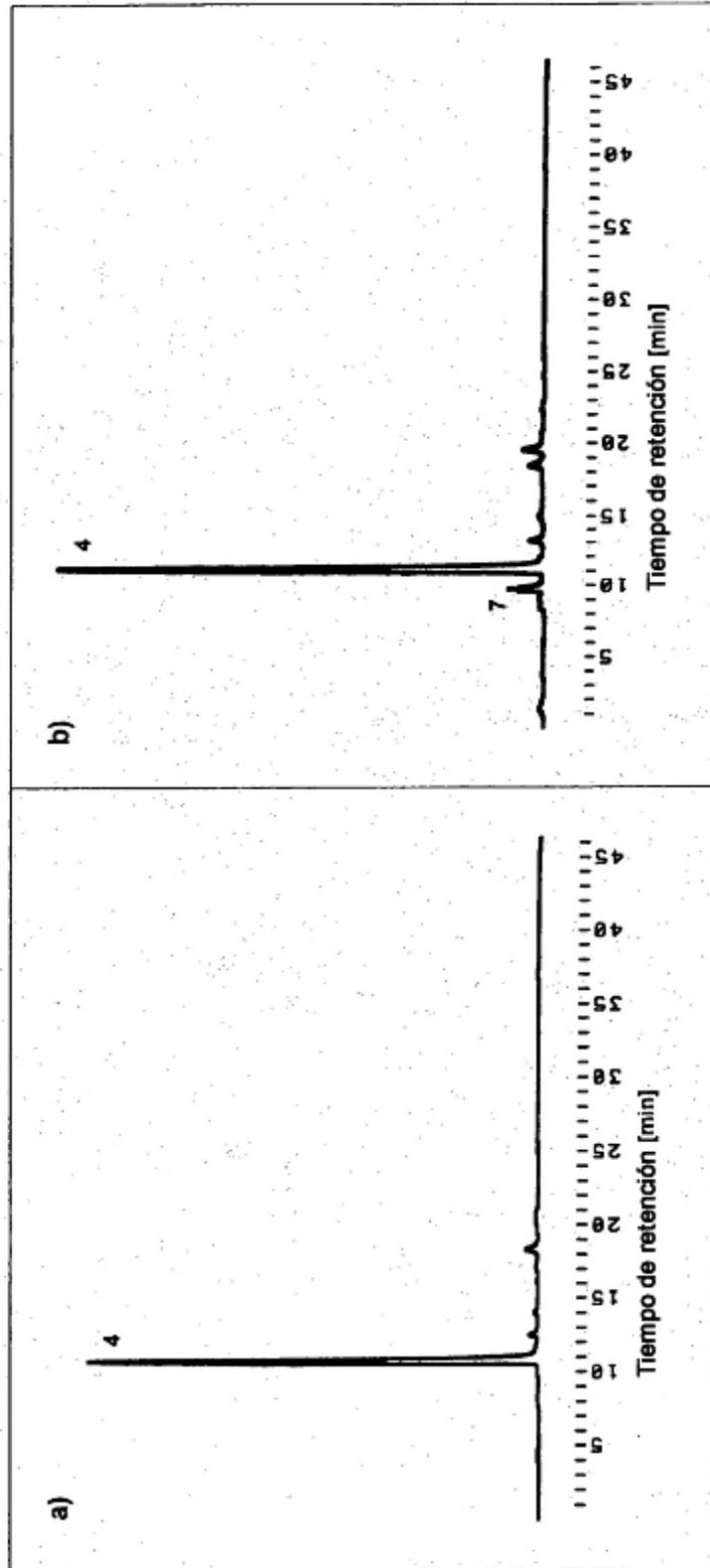


Fig. 10

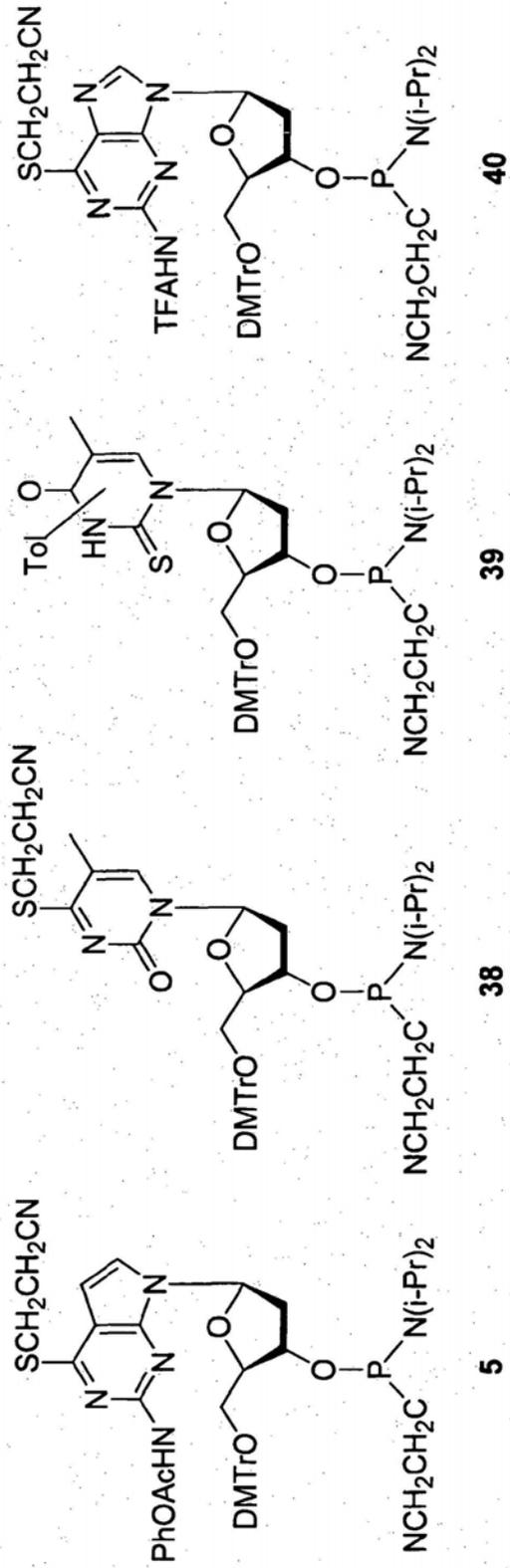


Fig. 11

Compuesto / Nombre (Sinónimo(s))	Estructura / Fórmula / Secuencia	SEC ID n°
Compuesto 1 (1, tioxonucleósido 1, nucleósido 1, tionucleósido 1)	7-deaza-6-tio-2'-desoxiguanosina	
Compuesto 2 (2)	7-(2-Deoxi-β-D- <i>eritro</i> -pentofuranosil)-2-fenoxiacetamino-7H-pirrolo[2,3- <i>d</i>]pirimidín-4(3H)-tiona	
Compuesto 3 (3)	4-[(2-Cianoetil)tio]-7-(2-desoxi-β-D- <i>eritro</i> -pentofuranosil)-2-fenoxiacetamino-7H-pirrolo[2,3- <i>d</i>]pirimidina	
Compuesto 4 (4)	4-[(2-Cianoetil)tio]-7-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D- <i>eritro</i> -pentofuranosil]-2-fenoxiacetamino-7H-pirrolo[2,3- <i>d</i>]pirimidina	
Compuesto 5 (5)	4-[(2-Cianoetil)tio]-7-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D- <i>eritro</i> -pentofuranosil]-2-fenoxiacetamino-7H-pirrolo[2,3- <i>d</i>]pirimidina 3' [(2-cianoetil)- <i>N,N</i> -diisopropilfosforamidita]	
Compuesto 26 (26, tioxonucleósido 26, nucleósido 26, tionucleósido 26)	4-tio-2'-desoxitimidina	
Compuesto 27 (27, tioxonucleósido 27, nucleósido 27, tionucleósido 27)	2-tio-2'-desoxitimidina	
Compuesto 28 (28, tioxonucleósido 28, nucleósido 28, tionucleósido 28)	6-tio-2'-desoxiguanosina	
Compuesto 38 (38)	Fosforamidita (Estructura química mostrada en la figura 10)	

Fig.11 (continuación)

Compuesto 39 (39)	Fosforamidita (Estructura química mostrada en la figura 10)	
Compuesto 40 (40)	Fosforamidita (Estructura química mostrada en la figura 10)	
oligonucleótido 6 (6)	5'-d(AGT ATT GAC CTA AIT ATT GAC CTA)	1
oligonucleótido 7 (7)	3'-d(ATC CAI TTA TGA)	2
oligonucleótido 8 (8)	5'-d(1 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT)	3
oligonucleótido 9 (9)	5'-d(1 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA)	4
oligonucleótido 10 (10)	5'-d(TAG GTC AAT ACT)	5
oligonucleótido 11 (11)	3'-d(ATC CAG TTA TGA)	6
oligonucleótido 12 (12)	3'-d(ATC CAG TTA TIA)	7
oligonucleótido 13 (13)	5'-d(TAI ITC AAT ACT)	8
oligonucleótido 14 (14)	3'-d(ATC CAI TTA TIA)	9
oligonucleótido 15 (15)	5'-d(11 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT)	10
oligonucleótido 16 (16)	5'-d(11 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA)	11
oligonucleótido 17 (17)	5'-d(111 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT)	12
oligonucleótido 18 (18)	5'-d(111 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA)	13
oligonucleótido 19 (19)	5'-d(TAG GTC AAT ACT TAG GTC AAT ACT)	14
oligonucleótido 20 (20)	3'-d(ATC CAG TTA TGA ATC CAG TTA TGA)	15
oligonucleótido 21 (21)	5'-d(TAI GTC AAT ACT TAG GTC AAT ACT)	16
oligonucleótido 22 (22)	5'-d(AIT ATT GAC CTA AGT ATT GAC CTA)	17
oligonucleótido 23 (23)	5'-d(TAG GTC AAT ACT TAI GTC AAT ACT)	18
oligonucleótido 24 (24)	5'-d(Triyl-S-(CH ₂) ₆ T ₁₀ TAG GTC AAT ACT)	19

Fig. 11 (continuación)

oligonucleótido 25 (25)	5'-d(Tritil -S-(CH ₂) ₆ T ₁₀ AGT ATT GAC CTA)	20
oligonucleótido 32 (32)	5'-d(26 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT)	21
oligonucleótido 33 (33)	5'-d(26 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA)	22
oligonucleótido 34 (34)	5'-d(27 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT)	23
oligonucleótido 35 (35)	5'-d(27 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA)	24
oligonucleótido 36 (36)	5'-d(28 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT)	25
oligonucleótido 37 (37)	5'-d(28 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA)	26
Au6 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 6)	5'-d(AGT ATT GAC CTA AIT ATT GAC CTA) (Au6)	1
Au8 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 8)	5'-d(1 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au8)	3
Au9 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 9)	5'-d(1 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA) (Au9)	4
Au15 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 15)	5'-d(11 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au15)	10
Au16 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 16)	5'-d(11 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA) (Au16)	11
Au17 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 17)	5'-d(111 T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au17)	12
Au18 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 18)	5'-d(111 T ₁₀ AGT ATT GAC CTA) (Au18)	13
Au21 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 21)	5'-d(TA1 GTC AAT ACT TAG GTC AAT ACT) (Au21)	16

Fig. 11 (continuación)

Au22 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 22)	5'-d(A1T ATT GAC CTA AGT ATT GAC CTA) (Au22)	17
Au23 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 23)	5'-d(TAG GTC AAT ACT TA1 GTC AAT ACT) (Au23)	18
Au24 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 24)	5'-d(S-(CH ₂) ₆ -T ₁₀ TAG GTC AAT ACT) (Au24)	19
Au25 (partícula de oro recubierta con oligonucleótido 25)	5'-d(S-(CH ₂) ₆ -T ₁₀ AGT ATT GAC CTA) (Au25)	20
Espaciador T ₁₀ (T ₁₀)	5'-d(TTT TTT TTT T)	