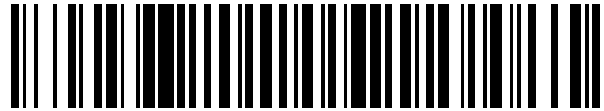


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 256**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/04** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2004 E 04817540 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 1687609**

54 Título: **Sondas fluorescentes para la detección de ADN mediante hibridación con una sensibilidad mejorada y baja señal de fondo**

30 Prioridad:

**28.10.2003 US 515523 P**

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

**18.02.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LOKHOV, SERGEY y  
LUKHTANOV, EUGENE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 529 256 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

Sondas fluorescentes para la detección de ADN mediante hibridación con una sensibilidad mejorada y baja señal de fondo.

## Antecedentes de la invención

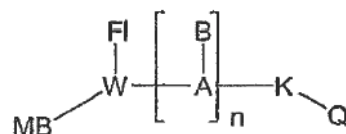
5 Las sondas de ADN son herramientas establecidas para la detección y cuantificación de secuencia. La eficiencia y la precisión de la detección de secuencias dependen tanto de la especificidad de hibridación de la sonda como de su sensibilidad. La fluorescencia es una de las formas más comunes para detectar el evento de hibridación. Los métodos que utilizan sondas fluorescentes para la detección de ácidos nucleicos se basan bien sea en una fluorescencia disparada por la hibridación de sondas intactas (por ejemplo, las balizas moleculares y sondas lineales, véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,030,787, la Patente de los Estados Unidos No. 6,214,979, la Patente de los Estados Unidos No. 5,925,517, la Patente de los Estados Unidos No.5,723,591 y la solicitud de los Estados Unidos Serie No. 10/165,410) o en una liberación de fluorescencia detenida de una sonda digerida por ADN polimerasa (por ejemplo, los métodos que utilizan *TaqMan*, *MGB-TaqMan*; *MGB* es una marca comercial de Epoch Biosciences). Para aquellos métodos que utilizan *TaqMan* y *MGB-TaqMan*, la actividad de 5'-exonucleasa de la ADN Polimerasa que se aproxima escinde una sonda entre fluoróforo y detenedor liberando así la fluorescencia. Estos tipos de sondas son adecuados para la detección de la amplificación de ADN en tiempo real. El primer tipo de sondas, sin embargo, también puede ser aplicado para la detección de secuencia post-amplificación (análisis gráfico de dispersión o de fusión térmica) o en un formato en fase sólida. Sondas fluorescentes detenidas en fase sólida se han divulgado en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,876,930 y 6,596,490, y se han utilizado para detectar ácidos nucleicos objetivo. Las sondas de hibridación divulgadas tienen bien sea bajas relaciones de señal a fondo o ratas de hibridación lentas (Xiaohong Fang et al. *J.Am.Chem.Soc.* 1999, 121: 2921-2922) y, fluorescencia de fondo inestable dependiente de la temperatura (fluorescencia en estado no hibridado), lo que las hace inadecuadas para las aplicaciones de amplificación en tiempo real.

25 Lo que se necesita en la técnica son nuevas sondas de oligonucleótidos con alta especificidad de secuencia, sensibilidad mejorada (relación de señal a fondo), señal de fondo estables (independientes de la temperatura) y rápidas ratas de hibridación. También es necesario que las sondas se puedan preparar fácilmente con una variedad de nucleótidos naturales y no naturales, marcadores fluorescentes y en diversas longitudes. La presente invención provee dichas sondas, así como los métodos para su preparación y uso.

30 La WO 03/062445A2 divulga sondas de oligonucleótidos/conjugados junto con su uso en ensayos para monitorizar la amplificación en donde la señal producida no se basa en la digestión de 5'nucleasa

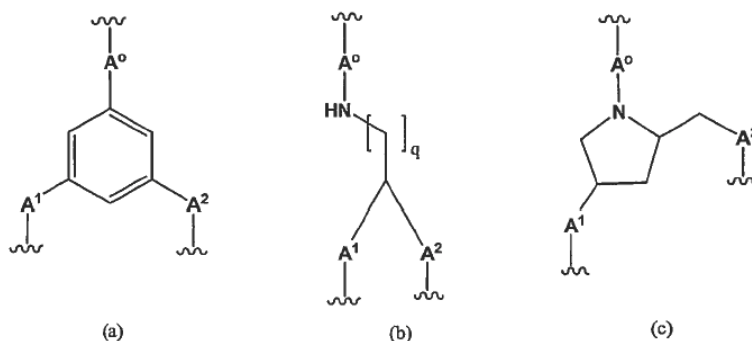
## Breve resumen de la invención

35 En un aspecto, la presente invención provee sondas de oligonucleótidos que comprenden una porción de oligonucleótido que tiene un extremo 3' y un extremo 5', una unidad estructural ligadora de surco menor unida a al menos una de dichas unidades de nucleótidos a través de un grupo enlazante el cual liga covalentemente la unidad estructural ligadora de surco menor al oligonucleótido, y un fluoróforo y detenedor, teniendo dicha sonda la fórmula;



40 en donde MB es un ligador del surco menor; Q es un detenedor; F1 es un fluoróforo;  $[\text{A-B}]_n$  representa un oligómero de ácido nucleico que tienen unidades n, en donde n es un entero de 5 a 50; cada A representa independientemente un componente de de esqueleto de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de un esqueleto de fosfato de azúcar, un esqueleto modificado de fosfato de azúcar, una cadena principal de ácido nucleico bloqueado, un esqueleto peptídico o una variante del mismo usado en la preparación de ácido nucleico; y cada B representa independientemente una base de ácido nucleico, una base modificada o un análogo de base; K es un enlace o un grupo enlazante; y W es un grupo enlazante trivalente que provee suficiente espacio entre MB, F1 y  $[\text{A-B}]_n$  de tal forma que (i) MB se une a un surco menor dúplex formado cuando dicha sonda de oligonucleótidos se hibrida con su secuencia complementaria; (ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de F1 en dicha sonda de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y (iii) cuando dicha sonda de oligonucleótidos se hibrida con dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de F1 es al menos 50% de su fluorescencia no detenida.

50 En algunas realizaciones, W provee espaciado entre MB, F1 y  $[\text{A-B}]_n$  de tal forma que en una forma no hibridada, la fluorescencia de F1 en dicha sonda de oligonucleótidos es menor de aproximadamente 10% de la fluorescencia no detenida. En otras realizaciones, W es un miembro seleccionado del grupo que consiste de:



5 en donde el subíndice q es un entero de 0 a 8; y  $A^0$ ,  $A^1$  y  $A^2$  son cada uno grupos enlazantes (por ejemplo, arilo, alquileo, alquileo sustituido, heteroalquileo, heteroalquileo sustituido y combinaciones de los mismos) que tienen de 1 a 50 átomos de la cadena principal, y las líneas onduladas indican el punto de unión a MB, FI y la porción de  $[A-B]_n$ .

10 En todavía otras realizaciones, n es un entero de 6 a 18, y dicha porción de  $[A-B]_n$  comprende al menos tres nucleótidos de guanina consecutivos en donde al menos una de las bases de nucleótidos de guanina es sustituida por PPG. Preferiblemente, la porción  $[A-B]_n$  es un ADN, ARN, quimera, un PNA o un ácido nucleico bloqueado. En aún otras realizaciones, n es un entero de 6 a 18, siendo dicha sonda complementaria a una secuencia objetivo que  
 15 tiene al menos 30% de adenina y bases de timina, en donde dicha sonda contiene al menos una base modificada suficiente para proveer un incremento de la estabilidad de la formación dúplex de al menos 3 °C, con respecto a una sonda sin dicha al menos una base modificada. En ciertas realizaciones, la sonda es complementaria a una secuencia objetivo que tiene al menos 50% de adenina y bases de timina, en donde dicha sonda contiene suficientes bases modificadas para proveer un incremento de la estabilidad de la formación dúplex de al menos 5 °C, con respecto a una sonda sin dichas bases modificadas.

En aspectos relacionados, la presente invención provee métodos y disposiciones para la utilización de las sondas descritas aquí.

En un aspecto relacionado, la presente invención provee métodos para la monitorización continua de amplificación de polinucleótidos, que comprende:

20 (a) combinar una muestra que contiene una secuencia objetivo, con uno o más cebadores de oligonucleótidos complementarios a las regiones de la secuencia objetivo, una enzima de polimerización, sustratos de nucleótidos y un conjugado de oligonucleótidos que tiene una fórmula:



25 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia que es complementaria a una porción de dicha secuencia objetivo que es amplificada, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo, W es un grupo enlazante trivalente que provee suficiente espacio entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se une en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida con dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de F1 en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y iii)  
 30 cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de F1 es al menos 50% de su fluorescencia no detenida; provee una mezcla;

(b) incubar dicha mezcla bajo condiciones favorables para la amplificación de dicho polinucleótido; y

35 (c) monitorizar continuamente dicha amplificación mediante la monitorización de la fluorescencia producida tras la hibridación conjugada al objetivo amplificado. En algunas realizaciones preferidas, la porción de MB se selecciona del grupo que consiste de análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepina. En otras realizaciones preferidas, la porción FI es un fluoróforo que tiene una longitud de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, siendo seleccionado dicho fluoróforo del grupo que consiste de cumarinas, resorufinas, xantenos, benzoxantenos, cianinas, y análogos de BODIPY. En todavía otras realizaciones preferidas, la porción Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo. En aún otras realizaciones preferidas, la porción de ODN de dicho conjugado es de 8-25 nucleótidos de longitud. En todavía otras realizaciones

preferidas, la porción de ODN de dicho conjugado es de 8-18 nucleótidos de longitud y K es un enlazador que tiene una longitud de 10-50 átomos de la cadena principal seleccionada del grupo que consiste de C, O, N, S, P y Si.

Otro aspecto relacionado de la presente invención provee métodos para monitorizar la expresión de genes que comprende:

- 5 (a) proveer una disposición de sondas de oligonucleótidos de diferentes secuencias,
- (b) incubar una población de polinucleótidos con la disposición bajo condiciones de hibridación, y
- (c) determinar a cuál de las sondas de oligonucleótidos en la disposición la población hibrida;

en donde una o más de las sondas de oligonucleótidos es un conjugado de oligonucleótidos que tiene la fórmula:



10 en donde MB es un ligador del surco menor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia que es complementaria a una porción de dicha secuencia objetivo que es amplificada, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo, W es un grupo enlazante trivalente que provee espacio suficiente entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de F1 en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de FI es al menos 50% de su fluorescencia no detenida. En algunas realizaciones preferidas, la porción de MB es seleccionada del grupo que consiste de análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y

20 análogos de pirrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepina, dicha porción FI es un fluoróforo que tiene una longitud de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, siendo seleccionado dicho fluoróforo del grupo que consiste en cumarinas, resorufinas, xantenos, benzoxantenos, cianinas y análogos de BODIPY, y dicha porción Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo. En otras realizaciones preferidas, los conjugados se unen a un soporte sólido.

25 En otro aspecto relacionado, la presente invención provee métodos para discriminar entre polinucleótidos que difieren por un nucleótido individual, comprendiendo el método:

(a) incubar por separado cada uno de al menos dos polinucleótidos con un conjugado de oligonucleótidos que tiene la fórmula:



30 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia que es complementaria a una porción de dicha secuencia objetivo que es amplificada, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo, W es un grupo enlazante trivalente que provee espacio suficiente entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de F1 en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de F1 es al menos 50% de su fluorescencia no detenida, teniendo dicho conjugado una secuencia definida en condiciones de hibridación, en donde uno de los polinucleótidos tiene una secuencia objetivo que es perfectamente complementaria a dicho conjugado de oligonucleótidos y al menos otro de los polinucleótidos tiene una secuencia objetivo que tiene un nucleótido individual no coincidente con el conjugado de oligonucleótidos; y

(b) determinar la fuerza de hibridación entre cada uno de los polinucleótidos y el conjugado de oligonucleótidos. Como se describió anteriormente, ciertas realizaciones preferidas son aquellas en las que se selecciona la porción de MB del grupo que consiste de análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina, dicha porción FI es un fluoróforo que tiene una longitud de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, siendo dicho fluoróforo seleccionado del grupo que consiste de cumarinas, resorufinas, xantenos, cianinas

benzoxantenos, y análogos BODIPY, y dicha porción de Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo.

5 En todavía otro aspecto relacionado, la presente invención provee métodos para detectar una secuencia objetivo en un polinucleótido, en donde el polinucleótido está presente en una mezcla de otros polinucleótidos, y en donde uno o más de los otros polinucleótidos en la mezcla comprenden secuencias que están relacionadas pero no idénticas a la secuencia objetivo, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la mezcla de polinucleótidos con un conjugado de oligonucleótidos que tiene la fórmula:



10 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo y W es un grupo enlazante trivalente que provee suficiente espacio entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de F1 en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de F1 es al menos 50% de su fluorescencia no detenida; y en donde el conjugado forma un híbrido estable solamente con dicha secuencia objetivo que es perfectamente complementaria a la porción de ODN de dicho conjugado, y el conjugado no forma un híbrido estable con cualquiera de los otros polinucleótidos; y

15 (b) medir la fluorescencia producida en la formación de híbridos, con lo cual la formación de híbridos indica la presencia de dicha secuencia objetivo. Las realizaciones preferidas incluyen los descritos anteriormente, particularmente en donde la porción de MB se selecciona del grupo que consiste de análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazepina, dicha porción FI es un fluoróforo que tiene una longitud de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, siendo seleccionado dicho fluoróforo del grupo que consiste de cumarinas, resorufinas, xantenos, benzoxantenos, cianinas y análogos de BODIPY, y dicha porción de Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo.

20 En todavía otro aspecto relacionado, la presente invención provee métodos para distinguir entre los polinucleótidos objetivo tipo silvestre, mutante y heterocigotos, comprendiendo dicho método:

25 (a) poner en contacto una muestra que contiene un polinucleótido objetivo con dos sondas en donde una primera sonda es específica para dicho polinucleótido objetivo tipo silvestre y una segunda sonda es específica para dicho polinucleótido objetivo mutante, cada una de dichas sondas que tienen una fórmula:



35 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo y W es un grupo enlazante trivalente que provee suficiente espacio entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de F1 en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de F1 es al menos 50% de su fluorescencia activa; y en donde el conjugado forma un híbrido estable solamente con dicha secuencia objetivo que es perfectamente complementaria a la porción de ODN de dicho conjugado, y el conjugado no forma un híbrido estable con cualquiera de los otros polinucleótidos; y

40 (b) medir la fluorescencia producida en la formación de híbridos, con lo cual la formación de híbridos indica la presencia o ausencia de cada uno de los polinucleótidos objetivo tipo silvestre, mutantes y heterocigotos. En este aspecto, las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) para cada híbrido producido entre dichas primera y segunda sondas y sus respectivos objetivos están preferiblemente dentro de aproximadamente 5°C uno del otro. En otras realizaciones seleccionadas, la porción de ODN de cada una de dichas sondas es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene de 8 a 18 bases o bases modificadas. Todavía más preferiblemente, la porción de ODN de cada una de dichas sondas es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene de 10 a 18 bases o bases modificadas. En otras realizaciones preferidas, las porciones de fluoróforo de cada una de dichas sondas se seleccionan del grupo que consiste de 5-FAM<sup>TM</sup>, 6-FAM<sup>TM</sup>, TET<sup>TM</sup>, JOE<sup>TM</sup>, HEX<sup>TM</sup>, VIC<sup>TM</sup>, NED<sup>TM</sup>, TAMRA<sup>TM</sup>,

ROX™ y YY™, o, alternativamente, es un fluoróforo fosfonato como se describe en la solicitud provisional de los Estados Unidos Serie No. 60/601,599, incorporada aquí por referencia. En todavía otras realizaciones preferidas, la porción de ODN de cada una de dichas sondas contiene al menos una base modificada, preferiblemente seleccionada de 6-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4(5*H*)-ona, 4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 1*H*-pirazolo[5,4-*d*]pirimidin-4(5*H*)-6(7)-diona, 6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 3-prop-1-inil-4,6-diaminopirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)etin-1-ol, 3-(2-aminoetil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidin-2-ona, 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, 6-amino-5-(3-aminoprop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, 5-[4-amino-3-(3-metoxiprop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol, 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxiprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 4-(4,6-Diamino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol, 6-Amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,5-dihidro-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1*H*-pirimidin-2,4-diona, 3-yodo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 3-bromo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 3-cloro-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 3-yodo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ilamina, 3-Bromo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ilamina y 3-cloro-1*H*-pirazolo [3,4-*d*]pirimidin-4-ilamina. En todavía otras realizaciones, la muestra se pone en contacto adicionalmente con un conjunto de cebadores bajo condiciones de amplificación y cada uno de dichos cebadores contiene de una a diez bases modificadas seleccionadas de las descritas aquí.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de la sonda de la invención (MB-F1-ODN-Q; SEQ ID NO: 1) que es la solución detenida e hibridada a su objetivo de ácido nucleico complementario donde el fluoróforo y el detenedor se separan espacialmente permitiendo la fluorescencia.

La Figura 2 ilustra una sonda inmovilizada de la invención (MB-F1-ODN-Q) inmovilizado a un soporte sólido. La fluorescencia de la sonda no hibridada es detenida manera eficiente. El detenedor (Q) y el Fluoróforo (FI) están en proximidad cercana. En la hibridación de la sonda a su objetivo de ácido nucleico complementario, el Q y el FI están separados espacialmente resultando en la fluorescencia. El ligando MB es un ligador del surco menor que se une en el surco menor del dúplex resultando en su estabilización

La Figura 3 compara la señal fluorescente, el fondo fluorescente y señal al fondo de cuatro sondas de la invención (SEQ ID NOS: 4, 7, 9 y 11) con la de cuatro sondas MGB Eclipse hibridadas a cuatro objetivos diferentes SEQ ID NOS: 2, 5, 8 y 10).

La Figura 4 compara la estabilidad de la señal de fondo con incremento en la temperatura de dos sondas de la invención y dos sondas MGB Eclipse cada una de las dos sondas marcadas con fluoresceína (FAM) o Yakima Yellow (YY). Secuencias de la sonda: Eclipse #1 5'-CAGAGACATACA\*CCA (SEQ ID NO: 12), Eclipse #2 5'-G\*TATGTCTCTGACTCC (SEQ ID NO: 9), Nueva sonda #1 5'-G\*TCAGAG\*ACATACA\*CC (SEQ ID NO: 4), Nueva sonda #2 5'-G\*TATGTCTCTGACTCC (SEQ ID NO: 9). A\* es 4-(4,6-Diamino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol y G\* es 6-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4(5*H*)-ona.

La figura 5a muestra el cambio de fondo fluorescente con la temperatura de un MB-FI-ODN (SEQ ID NO: 13) en solución y unida a su objetivo complementario (SEQ ID NO: 14). La figura 5b muestra los espectros de fluorescencia de MBFI-ODN y MB-FI-ODN-Q en solución y unida a su secuencia complementaria.

La Figura 6 muestra una metodología esquemática para el ensamblaje ramificado de conjugados de la invención sobre un soporte sólido.

La Figura 7 muestra una metodología esquemática para el ensamblaje lineal de conjugados de la invención sobre un soporte sólido.

La Figura 8 muestra una comparación de curvas de fusión de la actuación de la nueva sonda con la sonda MGB Eclipse. A. Representa la comparación de la nueva sonda en la columna de la izquierda con la sonda MGB Eclipse en la columna de la derecha a tres concentraciones diferentes de complemento (a)  $1 \times 10^{-7}$  M, b)  $2 \times 10^{-8}$  M y c)  $4 \times 10^{-9}$  M) como se indica en cada gráfico y una concentración constante de sonda M  $2 \times 10^{-7}$  M. B. Representa la comparación de la nueva sonda en la columna de la izquierda con la sonda MGB Eclipse en la columna de la derecha a tres concentraciones diferentes de complemento (a)  $4 \times 10^{-9}$  M, b)  $1 \times 10^{-9}$  M y c)  $1.6 \times 10^{-10}$  M) a una concentración constante de la sonda de  $2 \times 10^{-7}$  M. Nótese que la ganancia de sensibilidad se incrementó 10 veces.

La Figura 9 muestra gráficos de dispersión de genotipificación de análisis por PCR de punto final en tiempo real de 102 muestras de ADN ARNT-01. La figura 9a muestra el rendimiento de la nueva sonda conjugada de la invención donde la sonda de tipo silvestre está marcada con FAM y la sonda mutante con YY. La figura 9b muestra el

rendimiento de las sondas MGB Eclipse donde la sonda de tipo silvestre está marcada con FAM y la sonda mutante con YY.

Descripción detallada de la invención

Definiciones y abreviaturas

- 5 En los esquemas de reacción y la descripción a continuación (y anterior), las abreviaturas MB, FL, Q, CPG y ODN se refieren a "ligador del surco menor", "marcador fluorescente" o "fluoróforo", "detenedor", "vidrio de poro controlado" (como un ejemplo de un soporte sólido) y unidades estructurales o moléculas de "oligonucleótido", respectivamente, y de una manera que es evidente a partir del contexto. En ciertas fórmulas, el grupo [A-B]<sub>n</sub> se utiliza para referirse a un oligonucleótido, oligonucleótido modificado o péptido-ácido nucleico que tiene "n" bases (B) y que está enlazado a lo largo de un esqueleto de "n" azúcares, azúcares modificados o aminoácidos (A). Los términos "sonda" y "conjugado" se utilizan indistintamente y se refieren a un oligonucleótido que tiene un ligador de surco menor, adjunto, fluoróforo y detenedor.

- 15 Los términos "marcador fluorescente" o "fluoróforo" se refiere a compuestos con un máximo de emisión fluorescente entre aproximadamente 400 y 900 nm. Estos compuestos incluyen, con su máxima emisión en nm entre paréntesis, Cy2™ (506), GFP (Red Shifted) (507), YO-PRO™ -1 (509), YOYO™ -1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorX™ (519), Alexa™ (520), Rhodamine 110 (520), 5-FAM (522), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), RiboGreen™ (525), Rhodamine Green™ (527), Rhodamine 123 (529), Magnesium Green™ (531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™ -1 (533), TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPY® 530/550 (550), Dil (565), BODIPY® TMR (568), BODIPY® 558/568 (568), BODIPY® 564/570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange™ (575), Phycoerythrin R&B (575), Rhodamine Phalloidin (575), Calcium Orange™ (576), Pyronin Y (580), Rhodamine B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), Texas Red® (615), Nile Red (628), YO-PRO™ -3 (631), YOYO™ -3 (631), R-phycoyanin (642), C-Phycocyanin (648), TO-PRO™ -3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5™ (670), Thiadicyanocyanine (671), Cy5.5 (694). Fluoróforos adicionales se describen en la publicación PCT WO 03/023357 y la solicitud provisional de los Estados Unidos Serie No. 60/601,599, incorporada por referencia en su totalidad.

- 25 El término "enlazante" se refiere a una unidad estructural que es utilizada para ensamblar diversas porciones de la molécula o para unir covalentemente la molécula (o porciones de la misma) a un soporte sólido. Adicionalmente, un enlazante puede incluir porciones lineales o acíclicas, porciones cíclicas, anillos aromáticos o combinaciones de los mismos.

- 30 El término "grupo reactivo" se refiere a una unidad estructural que tiene al menos un grupo nucleofílico o al menos un grupo electrofílico (reactivo). En algunos casos, un "grupo reactivo" puede contener ambos grupos, pero en estos casos uno o ambos de los grupos es típicamente bloqueado por un grupo protector para el control de reacción no deseada (Véase TW Greene y Wuts PG, a continuación). Los ejemplos de grupos nucleofílicos incluyen -NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, -OH, o -SH. Ejemplos de grupos reactivos electrofílicos incluyen ésteres activados, acrilamidas, azidas de acilo, haluros de acilo, aldehído o cetonas, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, anhídridos, haluros de arilo, aziridinas, boronatos, ácidos carboxílicos, carbodiimidias, diazoalcanos, epóxidos, haloacetamidas, halotriazinas, imidoésteres, isocianatos, isotiocianatos, maleimidias, fosforamiditas, haluros de sililo, éster de sulfonato y haluros de sulfonilo.

- 40 El término "soporte sólido" se refiere a cualquier soporte que sea compatible con la síntesis de oligonucleótidos o adecuados para ensayos de hibridación (por ejemplo, ensayos de ADN), incluyendo, por ejemplo, vidrio, vidrio de poro controlado, materiales poliméricos, poliestireno, perlas, vidrio recubierto y similares.

- 45 El término "alquilo" se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente saturado lineal, ramificado o cíclico o una combinación de radicales de hidrocarburo monovalentes saturados cíclicos y lineales o ramificados que tienen el número de átomos de carbono indicados en el prefijo. Por ejemplo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) alquilo significa que incluye metilo, etilo, n-propilo, 2-propilo, tert-butilo, pentilo, ciclopentilo, ciclopropilmetilo y similares. Para cada una de las definiciones aquí (por ejemplo, alquilo, alqueno, alcoxi, aralquilo), cuando un prefijo no está incluido para indicar el número de átomos de carbono de la cadena principal en una porción alquilo, el radical o porción del mismo tendrá ocho o menos átomos de carbono de cadena principal. El término "heteroalquilo" se refiere a radical monovalente saturado lineal, ramificado o cíclico o una combinación de radicales monovalentes saturados cíclicos y cíclica y lineales o ramificados que tienen el número de átomos de carbono indicados en el prefijo y de uno a tres heteroátomos en lugar de átomos de carbono.

- 50 El término "alquilen" significa un radical hidrocarburo divalente saturado lineal o un radical hidrocarburo divalente saturado ramificado que tiene el número de átomos de carbono indicados en el prefijo. Por ejemplo, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) alquilen se entiende que incluye metileno, etileno, propileno, 2-metilpropileno, pentileno, y similares. El término "heteroalquilen" se refiere a un grupo alquilen que tiene el número indicado de átomos de carbono en una cadena que está interrumpida por de 1 a 5 heteroátomos (por ejemplo, O, N, S, P y Si).

El término "alqueniilo" se refiere a un radical hidrocarburo monovalente lineal o un radical hidrocarburo monovalente ramificado que tiene el número de átomos de carbono indicados en el prefijo y que contiene al menos un doble enlace. Por ejemplo, (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) alqueniilo pretende incluir, etenilo, propeniilo, y similares.

5 El término "alquinilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente lineal o un radical hidrocarburo monovalente ramificado que contiene al menos un triple enlace y que tiene el número de átomos de carbono indicados en el prefijo. Por ejemplo, (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) alquinilo pretende incluir etinilo, propinilo, y similares.

10 Los sustituyentes, cuando están presentes para los grupos alquilo, alqueniilo, alquinilo, alquileo y heteroalquileo son variados y se seleccionan de: -halógeno, oxo, tiono, -OR', -OC(O)R', -NR'R", -SR', -R', -CN, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R' -CONR'R", -C(O)R', -OC(O)NR'R", -NR'C(O)R', -NR'C(O)<sub>2</sub>R', -NR'-C(O)NR'R"', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R", perfluoro(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) alcoxi, y perfluoro(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) alquilo, en un número que varía de uno a cuatro; y donde R', R" y R"' son seleccionados independientemente de hidrógeno, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) alquilo y heteroalquilo, arilo y heteroarilo no sustituido, (arilo no sustituido)-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) alquilo, y (arilo no sustituido) oxi-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) alquilo.

15 El término "arilo" significa un radical hidrocarburo aromático monovalente o bivalente (por ejemplo, arileno) monocíclico, bicíclico o tricíclico de 6 a 14 átomos de anillo que es no sustituido o sustituido independientemente con uno a seis sustituyentes, preferiblemente uno, dos, o tres sustituyentes seleccionados de aquellos grupos que figuran a continuación. También se entiende que el término "arilo" incluye los grupos descritos anteriormente en donde uno o más heteroátomos o grupos funcionales de heteroátomos han reemplazado a un carbono del anillo, al tiempo que retiene propiedades aromáticas, por ejemplo, piridilo, quinolinilo, quinazolinilo, tienilo, y similares. Más específicamente el término arilo incluye, pero no se limita a, fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, tienilo y benzotiazolilo, 20 acridinilo y las formas sustituidas de los mismos.

25 Los sustituyentes para los grupos arilo son variados y se seleccionan de: -halogen, -OR', -OC(O)R', -NR'R", -SR', -R', -CN, -NO<sub>2</sub> -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R", -C(O)R', -OC(O)NR'R", -NR'C(O)R', -NR'C(O)<sub>2</sub>R', -NR'-C(O)NR'R"', -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NR'C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NR', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R", -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, perfluoro(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) alcoxi, y perfluoro(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) alquilo, en un número que varía desde cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde R', R" y R"' son seleccionados independientemente de hidrógeno, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) alquilo y heteroalquilo, arilo y heteroarilo no sustituidos (arilo no sustituido)-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) alquilo, y (arilo no sustituido) oxi-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) alquilo.

30 Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo puede estar opcionalmente reemplazado con un sustituyente de la fórmula -TC(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-U-, en donde T y U son independientemente -NH-, -O-, -CH<sub>2</sub>- o un enlace sencillo, y q es un entero de 0 a 2. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo puede ser opcionalmente reemplazados con un sustituyente de la fórmula -A-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-B-, en donde A y B son independientemente -CH<sub>2</sub>-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>- -S(O)<sub>2</sub>NR'- o un enlace sencillo y r es un entero de 1 a 3. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede ser opcionalmente reemplazado con un doble enlace. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden ser opcionalmente reemplazados con un sustituyente de la fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-, 35 donde s y t son independientemente enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, o -S(O)<sub>2</sub>NR'-. El sustituyente R' en -NR'- y -S(O)<sub>2</sub>NR'- se selecciona de hidrógeno o (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquilo no sustituido. Todavía adicionalmente, uno de los anillos arilo (Ar<sub>1</sub> y Ar<sub>2</sub>, a continuación) puede ser sustituido adicionalmente con otro grupo arilo sustituido para extender la capacidad de resonancia del sistema aromático, directa o indirectamente a través de grupos tales como -(GR'=CR')<sub>n</sub>- y -(C≡C)<sub>n</sub>-, donde n es 0 a 5, incrementando la máxima absorbancia de longitud de onda.

El prefijo "halo" y el término "halógeno" cuando se usa para describir un sustituyente, se refiere a -F, -Cl, -Br e -I.

45 Ciertos compuestos u oligonucleótidos de la presente invención pueden existir en una forma de sal. Tales sales incluyen sales de adición básica tales como sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico, o sal de magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos u oligonucleótidos modificados de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, las sales de adición ácida se pueden obtener poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un solvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición ácida aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos como ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, 50 dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o ácidos de fósforo y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, láctico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-toluilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge, SM, et al, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se 55 conviertan bien sea sales de adición ácida o básica.



Las formas neutras de los compuestos pueden ser regeneradas poniendo en contacto la sal con una base o un ácido y aislando el compuesto original de la manera convencional. La forma original del compuesto difiere de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en solventes polares, pero por otra parte las sales son equivalentes a la forma original del compuesto para los fines de la presente invención.

5 Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y están destinadas a ser abarcadas dentro del alcance de la presente invención. Pueden existir ciertos compuestos de la presente invención en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretende que estén dentro del alcance  
10 de la presente invención.

Ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales están destinados a ser abarcadas dentro del alcance de la presente invención. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y la separación de isómeros son bien conocidos en la técnica (véase la discusión en el Capítulo 4 de "Advanced Organic  
15 Chemistry", 4th edition J. March, John Wiley and Sons, New York, 1992).

Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen tales compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radiactivos, tales como por ejemplo tritio ( $^3\text{H}$ ), yodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ) o carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sea radiactivo o no (por ejemplo,  $^2\text{H}$ ),  
20 están destinadas a ser abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

"Grupo protector" o "forma protegida del mismo" se relaciona con una agrupación de átomos que cuando se une a un grupo reactivo en una máscara de molécula, reduce o previene la reactividad. Ejemplos de grupos protectores se pueden encontrar en T.W. Greene and P.G. Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, (Wiley, 2nd ed. 1991) y Harrison and Harrison et al., Compendium of Synthetic Organic Methods, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons. 1971-  
25 1996). Los grupos protectores de amino representativos incluyen formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo (CBZ), tert-butoxicarbonilo (Boc), trimetil sililo (TMS), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (SES), tritilo y grupos tritilo sustituidos, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), nitro-veratriloxicarbonilo (NVOC) y los grupos protectores de hidroxilo como representativos incluyen aquellos en los que el grupo hidroxilo es o bien acilado o alquilado tales como éteres de bencilo y tritilo, así como éteres de alquilo, éteres de tetrahidropiraniolo, éteres de trialkilsililo y éteres de alilo. En general, los grupos protectores preferidos son aquellos que se pueden eliminar en condiciones ácidas o condiciones básicas, o aquellos grupos que se pueden eliminar mediante el uso de una fuente de luz particular (por ejemplo, grupos protectores "sensibles a la luz"). Adicionalmente, la selección de un grupo protector apropiado se hace con la debida consideración a otra funcionalidad en la molécula de modo que, o bien la incorporación o la eliminación del grupo protector no interfiere o de otra manera afecta significativamente el resto de  
30 la molécula.

"Opcional" u "opcionalmente" en las definiciones anteriores significa que puede ocurrir, pero no necesariamente, el evento o circunstancia descrito subsecuentemente, y que la descripción incluye casos donde el evento o circunstancia ocurre y casos en que no lo hace. Por ejemplo, "arilo mono- o di- sustituido opcionalmente con un grupo alquilo" significa que el grupo alquilo puede, pero no necesita, estar presente, y la descripción incluye situaciones donde el grupo arilo es mono- o disustituido con un grupo alquilo y situaciones donde el grupo arilo no es sustituido con el grupo alquilo.  
40

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales en química orgánica, bioquímica, síntesis y modificación de oligonucleótidos, química de bioconjugados, hibridación de ácidos nucleicos, biología molecular, microbiología, genética, ADN recombinante, y campos relacionados tal como son dentro de la experiencia de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Gait (ed.), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1984); Eckstein (ed.), OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1991).  
45  
50

El término "sonda Eclipse™" se refiere, en general, a una sonda MB-Q-5'-ODN-FI. El ligando MB es triamida del ácido dihidropirrolindol- carboxílico. En contraste, una sonda "TaqMan® MGB™" se refiere a una sonda MB-Q-3'-ODN-FI. Eclipse™ y MGB™ son marcas registradas de Epoch Biosciences, Inc., Bothell, WA; y TaqMan® es una marca registrada de Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA.

55 General

Conjugados de oligonucleótidos ligadores del surco menor (o "sondas") han sido descritos recientemente (véase el documento WO 99/51621). Estos conjugados forman dúplex hiperestabilizados con ADN complementario. En

particular, la especificidad de secuencia de sondas cortas MB es excelente para aplicaciones de alta temperatura, tales como PCR. Las sondas fluoróforo de oligonucleótidos detenedoras ligadoras del surco menor en 5' (MB-Q-5'-ODN-FL) divulgadas en la WO 03/062445 desplegaron un rango dinámico de 7 órdenes de magnitud, con una sensibilidad final de mejor que 5 copias por muestra en las reacciones de amplificación por PCR en tiempo real.

5 Bastante sorprendentemente, las sondas que contienen un grupo fluoróforo ligador del surco menor en un extremo y un detenedor en el otro extremo muestran sensibilidad mejorada y señal de fondo reducida significativamente (fluorescencia de la sonda no hibridada) en comparación con las sondas del documento WO 03/062445 y son particularmente útiles para métodos de ensayo utilizando 2'-ribodesoxinucleótidos fluorogénicos. Estas sondas fluorescen tras la hibridación con el objetivo complementario, como se ilustra en la Figura 1 con la señal de fondo

10 10-50 veces más baja que para las sondas divulgadas en la WO 03/062445 (Figura 3). Además las sondas de la invención tienen señal de fondo significativamente más estable (temperatura independiente) en comparación con las sondas divulgadas en la WO 03/062445 (véase la Figura 4). Esta propiedad es particularmente útil para aplicaciones que involucran el análisis del perfil de fusión tales como análisis de polimorfismo de nucleótido individual post PCR.

Se ha encontrado previamente que el grupo detenedor 5'-MB previene la digestión de la nucleasa 5' por la Taqpolimerasa durante la amplificación homogénea. Las nuevas sondas tienen resistencia similar a la 5'nucleasa cuando MB-FI- está unida al extremo 5'. Por lo tanto, las nuevas sondas pueden usarse en ensayos donde la resistencia a la 5'-nucleasa es esencial. Las sondas 3'-MB-FL pueden usarse en ensayos que requieren la degradación parcial o completa de la sonda para la generación de señal, tal como TaqMan. Tanto la 5'- como la 3'-MB-FI-ODN-Q también pueden ser utilizadas en los ensayos de post PCR en tiempo no real. Ensayos basados en fase sólida (tales como los arreglos de ADN) son todavía otras aplicaciones para las sondas de la presente invención (Figura 2).

Las sondas/conjugados MB-FI-ODN-Q de la presente invención están construidas de tal manera que la sonda existe en al menos una conformación de cadena sencilla cuando no es hibridada. En la forma de bobina aleatoria no hibridada el detenedor y el MB están lo suficientemente cerca del fluoróforo para detener la fluorescencia del fluoróforo. Las sondas también son construidas de tal manera que tanto el ligador del surco menor (Figura 5a) y el detenedor (Figura 5b) participan en la detención de la fluorescencia.

Cuando se hibrida a un polinucleótido objetivo, las sondas/conjugados adoptan una conformación de tal forma que el MB se oculta en el surco menor del ADN y el detenedor no está posicionado lo suficientemente cerca del fluoróforo para detener su fluorescencia. Con la adopción de estas conformaciones hibridadas y sin hibridar, la sonda exhibe intensidades de señal de fluorescencia sustancialmente diferentes cuando la sonda es hibridada y sin hibridar. Como resultado, es posible determinar si la sonda es hibridada o no hibridada sobre la base de un cambio en la intensidad de fluorescencia de la sonda, y el uso de tales sondas permite la detección de objetivos de ácidos nucleicos en ensayos homogéneos (como reacción de amplificación por PCR) o no homogéneos (ensayos de ADN).

Los conjugados detenedores del oligonucleótido del fluoróforo ligador del surco menor de la presente invención puede estar en una disposición lineal (como se sugiere por la fórmula MB-FI-ODN-Q o en una disposición ramificada en el que el fluoróforo y el ligador del surco menor están unidos a un grupo enlazante que sirve para unir ODN, FI y MB. Cada una de las disposiciones está destinada a ser incluida cuando se utiliza la abreviatura lineal (MB-F1-ODN-Q). Adicionalmente, mientras que las porciones MB y FI están unidas en un extremo del oligonucleótido, la porción detenedora puede estar unida en el otro extremo, o una posición interna del oligonucleótido, siempre que tal unión no interfiera con los mecanismos de detención del conjugado. En general, esto se puede lograr mediante el uso de un grupo enlazante adecuado (véase los Ejemplos más abajo) o enlazadores de base, tales como 5-aminopropiluridina. Como resultado, la presente invención provee un número de realizaciones preferidas en las que los enlaces entre ODN y Q son seleccionados para proveer distancias de separación adecuadas entre el detenedor y las unidades estructurales del fluoróforo, sin comprometer las capacidades de hibridación de la porción del oligonucleótido.

Como se señaló anteriormente, los conjugados (o sondas) de la presente invención son útiles en una variedad de ensayos de detección basados en la hibridación, pero encuentran utilidad particular en la detección en "tiempo real" de la amplificación de oligonucleótidos, a menudo llevada a cabo a través de PCR. Adicionalmente, las sondas y los conjugados de la presente invención son útiles en la detección de la post amplificación de oligonucleótidos objetivo.

## 50 Descripción de las realizaciones

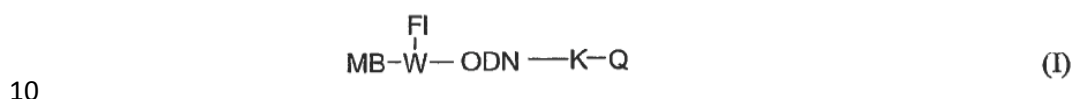
### Sondas y Conjugados

En vista de lo anterior, la presente invención provee en un aspecto sondas de oligonucleótidos (o conjugados de oligonucleótidos, de aquí en adelante "sondas/conjugados", "sondas" o "conjugados") las cuales se observan más generalmente como sondas o conjugados MB-FI-ODNQ. Como se señaló anteriormente, se entiende que esta descripción lineal de las sondas indica que un ligador del surco menor y fluoróforo o agente de emisión están unidos a un extremo de la porción de oligonucleótido, y un detenedor está unido al otro extremo de la porción de oligonucleótido. Para cualquiera de estas porciones unidas covalentemente, la conexión puede ser bien sea directa o a través de un grupo enlazante. En muchas realizaciones, se prefieren los grupos de enlace para proveer

suficiente espacio entre porciones interactivas (por ejemplo, fluoróforo y detenedor) o porciones de reactivos (por ejemplo, ligadores del surco menor que están previstos para unirse de manera no covalente en el surco menor formado por hibridación de la sonda a una secuencia objetivo).

- 5 Mientras que la mayoría de los componentes descritos aquí para las sondas o conjugados han sido descritos en solicitudes relacionadas (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,339,147, 6,486,303, y 6,472,153; y publicaciones PCT WO 01/64958 y WO 03/062445), el orden de ensamblaje y los grupos de enlace utilizados para alcanzar los efectos beneficiosos para la presente invención establecen nuevos criterios para las relaciones espaciales y la flexibilidad.

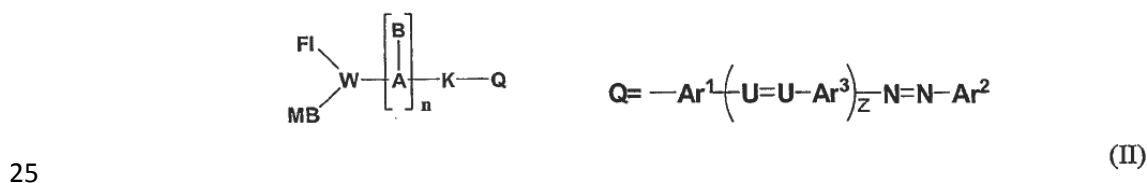
De acuerdo con lo anterior, en un grupo de realizaciones, la sonda o conjugado MB-FI-ODN-Q tiene la fórmula:



en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, W es un grupo enlazante trivalente, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es un enlace o un grupo enlazante y FI es un fluoróforo.

- 15 Más particularmente, cuando K es un grupo enlazante, por lo general tiene de 1 a 50 átomos en la cadena principal (contando solamente los átomos entre el componente ODN y el componente Q que está unido en una línea continua, incluyendo todos los átomos del anillo, pero incluyendo ninguno de los átomos o grupos colgantes) que son seleccionados de C, O, N, S, P y Si. El grupo enlazante W representará generalmente un enlazador trivalente que tiene de aproximadamente 3 a 100 átomos de la cadena principal, seleccionados de C, O, N, S, P y Si. Adicionalmente, W puede contener una cadena alifática ramificada, una cadena de heteroalquilo, una o más estructuras de anillo sustituidas, o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, W representa una
- 20 unidad estructural trifuncional tal como un grupo amino con o sin grupos de enlace pendiente funcionalizados. De acuerdo con lo anterior, mientras que W se provee como un grupo enlazante, será en algunas realizaciones un grupo que puede ser considerado como parte de la FI. Se discutirá en más detalle a continuación cada uno de los grupos de enlace, así como otros componentes.

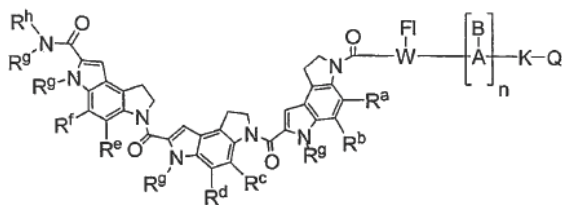
En un grupo de realizaciones preferidas adicionales, la sonda/conjugado de oligonucleótidos tiene la fórmula:



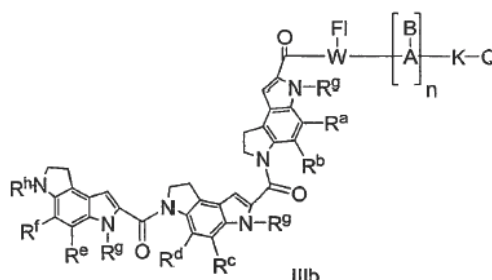
- 30 en la cual MB, W, K y FI tienen los significados provistos anteriormente, [A-B]<sub>n</sub> representa un oligómero de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, ANP o cualquier combinación de los mismos, incluyendo aquellos con bases y azúcares modificados), en donde A representa un esqueleto de fosfato de azúcar, esqueleto de fosfato de azúcar modificado, esqueleto de ácido nucleico bloqueado, esqueleto peptídico o una variante de los mismos usado en la preparación de ácido nucleico; y B representa una base de ácido nucleico, una base modificada o un análogo de base como se describe en más detalle a continuación. El subíndice n es un entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 100, preferiblemente de 6 a aproximadamente 50 y más preferiblemente de 8 a aproximadamente 25.

- 35 Volviendo a la fórmula II, el símbolo Q tiene la fórmula Ar<sup>1</sup>-(U=U-Ar<sup>3</sup>)<sub>z</sub>-N=N-Ar<sup>2</sup>. Los símbolos Ar<sup>1</sup>, Ar<sup>2</sup> y Ar<sup>3</sup> representan grupos arilo. Q tiene al menos un fuerte grupo donador de electrones, tal como alcoxi, hidroxi, amino, alquilamino, dialquilamino, arilamino y similares, y al menos un fuerte grupo extractor de electrones tal como nitro, ciano, carbonilo, carboxi, sulfonilo, trifluorometilo y similares. Ar<sup>1</sup>, Ar<sup>2</sup> y Ar<sup>3</sup> adicionalmente pueden ser sustituidos con alquilo, alquilo cíclico, arilo, arilo sustituido, halógeno. El subíndice z es un entero de 0 o 1, preferiblemente 0. Cuando z es 1, U se selecciona independientemente de CH, C(R) y N, en la que R es un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) alquilo. K está conectado con uno de Ar<sup>1</sup>, Ar<sup>2</sup> o Ar<sup>3</sup> ya sea directamente o a través de sustituyentes. Los grupos arilo preferidos para cada uno de Ar<sup>1</sup>, Ar<sup>2</sup> y Ar<sup>3</sup> son grupos fenilo.
- 40

En todavía otras realizaciones preferidas, la sonda/conjugado de oligonucleótidos tiene la fórmula:



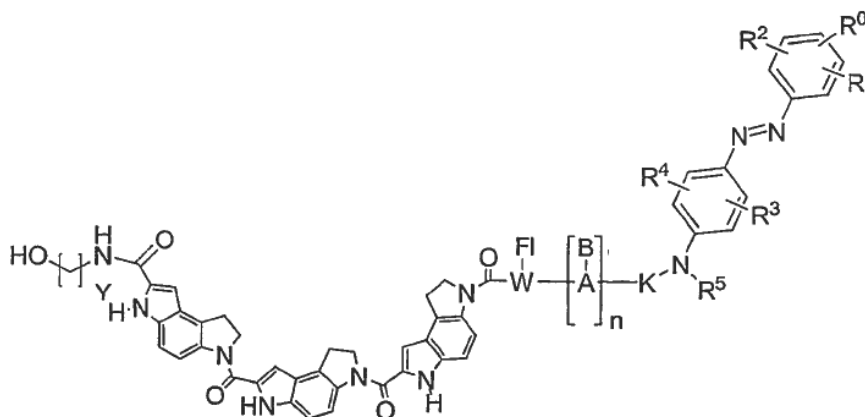
IIIa



IIIb

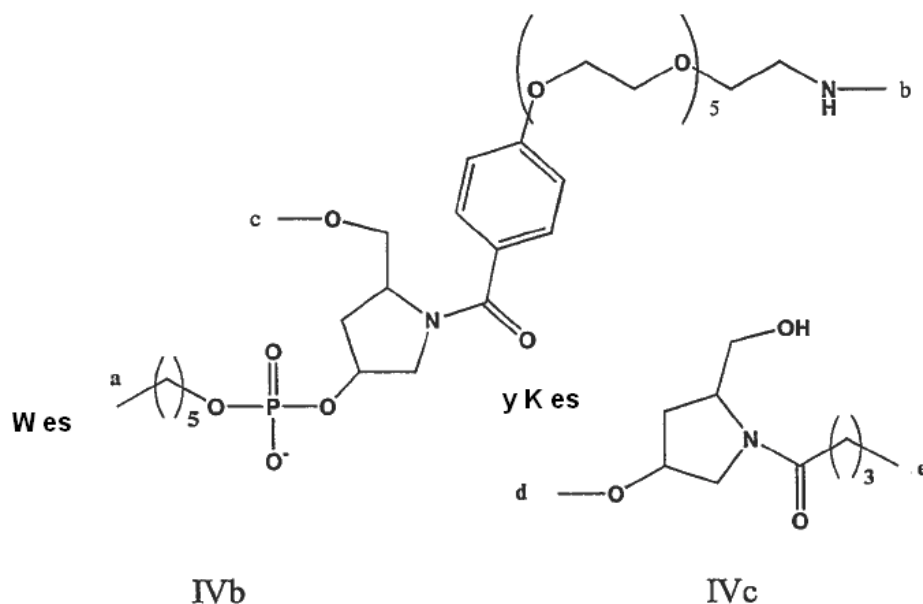
- 5 en la cual  $Ar^1$ ,  $Ar^2$ ,  $W$ ,  $K$ ,  $Fl$ ,  $A$ ,  $B$  y el subíndice  $n$  tienen los significados provistos anteriormente, y en donde los símbolos  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  y  $R^f$  representan sustituyentes seleccionados de H, halógeno,  $(C_1-C_8)$  alquilo,  $Or^g$ ,  $N(R^g)_2$ ,  $N+(R^g)_3$ ,  $SR^g$ ,  $COR^g$ ,  $CO_2R^g$ ,  $CON(R^g)_2$ ,  $(CH_2)_{0-6}SO_3^-$ ,  $(CH_2)_{0-6}CO_2^-$ ,  $(CH_2)_{0-6}OPO_3^{2-}$ , y  $NHC(O)(CH_2)_{0-6}CO_2^-$ , y ésteres y sales de los mismos, en donde cada  $R^g$  es independientemente H o  $(C_1-C_8)$  alquilo. El símbolo  $R^h$  representa H o un grupo (típicamente el vestigio de un grupo enlazante utilizado en la síntesis en fase sólida) que tiene de 1-30 átomos seleccionados de C, N, O, P, S y el cual puede ser cíclico, acíclico, o una combinación de los mismos, y con átomos de hidrógeno adicionales para llenar las valencias disponibles. El símbolo  $Q$  tiene el significado provisto anteriormente.

- 10 En todavía realizaciones preferidas adicionales, la sonda/conjugado de oligonucleótidos tiene la fórmula:



- 15 en la cual  $W$ ,  $K$ ,  $Fl$ ,  $A$ ,  $B$  tienen los significados provistos anteriormente, y en donde al menos uno de los símbolos  $R^0$ ,  $R^1$  y  $R^2$  representan grupo extractor de electrones;  $R^3$  y  $R^4$  representan H o halógeno, alquilo, oxialquilo, alquiloxi; símbolo  $R^5$  representa alquilo o hidroxialquilo, y el subíndice  $n$  es un número entero de 1 a 20. En una forma de realización particularmente preferida,  $R^0 = NO_2$ ;  $R^1 = Cl$ ;  $R^2 = R^3 = R^4 = H$ ;  $R^5 = CH_3$ ; y  $Y = 5$ .

En un grupo particularmente preferido de realizaciones, los enlazadores  $W$  y  $K$  tienen las fórmulas:



en donde a, b, c, d y e son puntos de unión para el ligando MB, fluoróforo, extremos terminales ODN y el detenedor, respectivamente.

5 En ciertas realizaciones preferidas para cada uno de los grupos anteriores, K y W se seleccionan para proveer un potenciador de la fluorescencia particular para la sonda/conjugado, y dependerá de la longitud de la porción del oligonucleótido de la sonda. De acuerdo con lo anterior, para las sondas que tiene 18 o más nucleótidos (incluyendo los nucleótidos modificados o análogos), K puede ser un enlace o un grupo enlazante de hasta aproximadamente 20 átomos de longitud. Más preferiblemente, K es un grupo prolinol. En realizaciones particularmente preferidas, K es un enlazador prolinol sustituido tal como IVc. Para conjugados de oligonucleótido que tienen menos de 10 aproximadamente 18 nucleótidos (incluyendo los nucleótidos modificados o análogos), se prefieren los grupos K más largos (por ejemplo, 15, 20, 30, 40 o más átomos de la cadena principal).

15 Como se provee en la fórmula I, la letra W representa un grupo enlazante trifuncional. De acuerdo con lo anterior, para las sondas que tienen 5 o más nucleótidos (incluyendo los nucleótidos modificados o análogos), W puede abarcar una variedad de estructuras con el fin de proveer una fijación, flexibilidad y espaciado adecuado entre el ODN, FI y MB. W puede ser un grupo enlazante de hasta aproximadamente 100 átomos de longitud seleccionados de C, N, S, P, Si y O, y átomos de hidrógeno adicionales para llenar las valencias disponibles (discutido en más detalle más abajo).

20 Otras sondas o conjugados preferidos son aquellos en cada una de las fórmulas I, II, IIIa y IIIb, y IV en donde la porción de ODN es seleccionada para tener tres o más bases de guanina consecutivas en donde al menos una de las bases de guanina es reemplazada con una base modificada, preferentemente PPG. Aún más preferiblemente, la porción de ODN es un ARN, una quimera, un ANP o un ácido nucleico bloqueado.

25 Todavía otras sondas o conjugados preferidos son aquellos en cada una de las fórmulas I, II, IIIa y IIIb, y IV en donde la porción de ODN es seleccionada para que sea complementaria a una secuencia objetivo que tiene 30% o más bases A y T, en donde el ODN contiene al menos una base modificada suficiente para proveer un incremento en la estabilidad del dúplex (sonda/híbrido objetivo) de al menos aproximadamente 3 °C. Más preferiblemente, la porción de ODN es seleccionada para ser complementaria a una secuencia objetivo que tiene 50% o más bases A y T, en donde el ODN contiene suficientes bases modificadas para proveer un incremento en la estabilidad del dúplex (sonda/ híbrido objetivo) de al menos aproximadamente 5 °C. Todavía más preferiblemente, la porción de ODN es un ADN, un ARN, una quimera, un ANP o un ácido nucleico bloqueado.

30 Las sondas y conjugados de la presente invención son preparados generalmente usando métodos en fase sólida conocidos por los expertos en la técnica. El montaje puede llevarse a cabo bien sea en la dirección 5' a 3', o 3' a 5', usando, por ejemplo, reactivos de fosoramidita apropiados para el acoplamiento de los monómeros de ODN, los fluoróforos, detenedores y ligadores de surco menor. Otros métodos para el ensamblaje incluyen condensaciones de grupos funcionales bien conocidas para preparar, por ejemplo, enlaces éster, enlaces amida, enlaces disulfuro, enlaces éter, enlaces tioéter y similares. En general, los materiales de partida están disponibles comercialmente, o pueden ser preparados de una manera directa a partir de materiales de partida disponibles comercialmente, usando manipulaciones de grupos funcionales adecuados como se describe en, por ejemplo, March, et al., ADVANCED

ORGANIC CHEMISTRY - Reactions, Mechanisms and Structures, 4th ed., John Wiley & Sons, New York, NY, (1992).

5 Volviendo a las disposiciones más generales para las sondas/conjugados de la presente invención, la discusión que sigue ilustra los tipos de oligonucleótidos, agentes de detención o detenedores, ligadores de surco menor, fluoróforos y grupos de enlace que pueden ser utilizados aquí.

#### Oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados

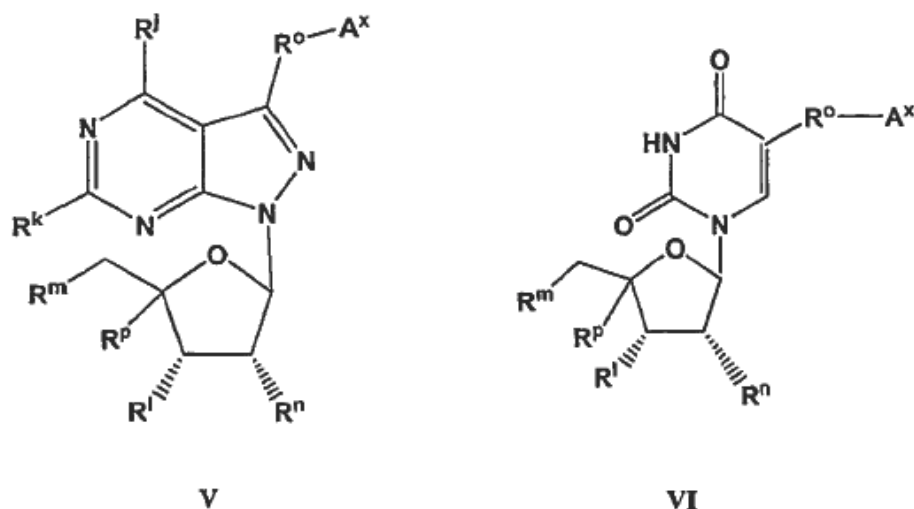
10 Los términos oligonucleótido, polinucleótido y ácido nucleico se utilizan de manera intercambiable para referirse a polímeros de cadena sencilla o doble de ADN o ARN (o ambos), incluyendo polímeros que contienen nucleótidos modificados o de origen no natural, o para cualquier otro tipo de polímero capaz de apareamiento de bases estables para ADN o ARN, incluyendo, pero no limitándose a, ácidos nucleicos de péptidos los cuales son divulgados por Nielsen et al. Science 254:1497-1500 (1991); oligómeros de ADN biciclo (Bolti et al, Nucleic Acids Res. 24: 4660-4667 (1996)) y las estructuras relacionadas. En una realización de los conjugados de la presente invención, una unidad estructural MB y un fluoróforo están unidos en el extremo 5' del oligómero y un agente de detención está unido en el extremo 3'.

15 Son preferidos en la presente invención oligonucleótidos de ADN que son de cadena sencilla y tienen una longitud de 100 nucleótidos o menos, más preferiblemente 50 nucleótidos o menos, aún más preferiblemente 30 nucleótidos o menos y lo más preferiblemente 20 nucleótidos o menos con un límite inferior de aproximadamente 5 nucleótidos.

20 Conjugados de oligonucleótido que contiene un par fluoróforo/detenedor con un ligador del surco menor también puede comprender una o más bases modificadas, además de las bases de origen natural, adenina, citosina, guanina, timina y uracilo. Se consideran bases modificadas aquellas que difieren de las bases de origen natural mediante la adición o eliminación de uno o más grupos funcionales, las diferencias en la estructura de anillo heterocíclico (esto es, la sustitución de carbono por un heteroátomo, o viceversa), y/o unión de uno o más estructuras de brazo enlazadores a la base. Nucleótidos modificados preferidos son aquellos basados en una estructura de pirimidina o una estructura de purina, siendo esta última más preferiblemente 7-deazapurinas y sus derivados y pirazolopirimidinas (descrito en PCT WO 90/14353); y también se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,127,121. Se describen bases universales e indiscriminadas en la solicitud copendiente 60/508,792 (Incorporada como referencia en su totalidad)

30 Las bases modificadas más preferidas para uso en la presente invención incluyen el análogo de guanina 6-amino-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidin-4(5H)-ona (ppG o PPG, también Súper G) y el análoga de adenina 4-amino-1H-pirazolo [3,4-d] pirimidina (ppA o PPA). También puede ser utilizado el análogo de la xantina 1H-pirazolo [5,4-d] pirimidin-4 (5H)-6(7H)-diona (ppX). 3-prop-1-inilpirazolo [3,4-d] pirimidina-4,6-diamino, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPA representan otras bases modificadas preferidas para uso en la presente invención. Estos análogos de bases, cuando están presentes en un oligonucleótido, refuerzan la hibridación y mejoran la discriminación no coincidente. Todas las formas tautoméricas de bases de origen natural, bases modificadas y análogos de bases pueden ser incluidos en los conjugados de oligonucleótidos de la invención. Otras bases modificadas útiles en la presente invención incluyen 6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, PPPG; 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, HOPPPG; 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, NH<sub>2</sub>PPPG; 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, PPPA; 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, HOPPPA; 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-d]pirimidina, NH<sub>2</sub>PPPA; 3-prop-1-inilpirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamino, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPA; 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)etin-1-ol, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPAOH; 3-(2-aminoetil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPAH<sub>2</sub>; 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, PU; 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, HOPU; 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidin-2-ona, PC; 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, HOPC; y 6-amino-5-(3-aminoprop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, NH<sub>2</sub>PC; 5-[4-amino-3-(3-metoxiprop-1-inil)pirazol[3,4-d]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol, CH<sub>3</sub>OPPPA; 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxiprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona, CH<sub>3</sub>OPPPG; 4,(4,6-Diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol, Súper A; 6-Amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,5-dihidro-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona; 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1H-pirimidin-2,4-diona, Súper T; 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPAI); 3-bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPABr); 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPACl); 3-Yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPAI); 3-Bromo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPABr); y 3-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilamina (PPACl). En algunas realizaciones, la base modificada señalada anteriormente también puede incluir bases universales. La base universal puede incluir aquellas divulgadas por Loakes, Nucl. Acids Res., 29: 2437-2447 (2001); Wu et al, JACS, 22: 7621-7632 (2000) y Seela et al, Nucl. Acids Res., 28: 3224-3232 (2001), incorporadas como referencia.

55 En otro grupo de realizaciones preferidas, las bases modificadas son utilizadas para introducir los ligandos directa o indirectamente en la sonda usando una de las fosforamidas que tienen las fórmulas V y VI:



en donde  $A^x$  es ligando seleccionado de un grupo que incluye fluoróforos, detenedores o enlazadores de surco menor.  $R^j$  y  $R^k$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de H,  $NH_2$  y un grupo amino protegido;  $R^n$  es un miembro seleccionado del grupo que consiste de H, F y  $OR^{ml}$  en donde  $R^{ml}$  es un miembro seleccionado del grupo que consiste de H,  $(C_1-C_8)$  alquilo y un grupo protector de hidroxilo;  $R^p$  es un miembro seleccionado del grupo de H,  $(C_1-C_8)$  alquilo, o es combinado opcionalmente con  $R^n$  para formar un anillo de cinco a siete miembros, que tiene de uno a tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste de O, S y N;  $R^l$  es un miembro seleccionado del grupo que consiste de OH, un grupo hidroxilo protegido y  $O-P^1$ , en donde  $P^1$  es un grupo fosoramidita o H-fosfonato;  $R^m$  es un miembro seleccionado del grupo que consiste de OH, un grupo hidroxilo protegido y  $O-P^2$ , en donde  $P^2$  es una fosoramidita, H-fosfonato, monofosfato, difosfato o trifosfato;  $R^o$  es un enlazador con aproximadamente de 2 a 30 átomos principales, seleccionados de C, H, N, O, S y P, y puede contener grupos alquilo, alquilenilo, alqueniilo, alquinilo y arilo solos o en combinación.

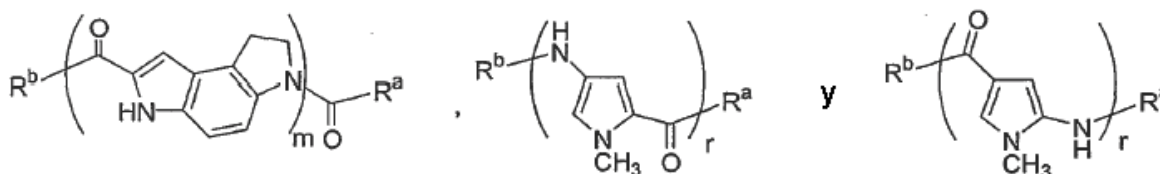
Además de las bases modificadas mencionadas anteriormente, los oligonucleótidos de la invención pueden tener un esqueleto de azúcar o unidades estructurales glicosídicas, preferiblemente 2-desoxiribofuranosidas en donde todos los enlaces internucleótidos son los enlaces fosfodiéster de origen natural. En realizaciones alternativas sin embargo, los grupos 2-desoxi- $\beta$ -D-ribofuranosa son reemplazados con otros azúcares, por ejemplo,  $\beta$ -D-ribofuranosa. Además, la  $\beta$ -D-ribofuranosa puede estar presente en donde el 2-OH de la unidad estructural de ribosa es alquilada con un grupo  $C_{1-6}$  alquilo (2-(O- $C_{1-6}$  alquilo) ribosa) o con un grupo  $C_{2-6}$  alqueniilo (2-(O- $C_{2-6}$  alqueniilo) ribosa), o es reemplazado por un grupo fluoro (2-fluororribosa). Azúcares formadores de oligómeros relacionados útiles en la presente invención son aquellos que están "bloqueados", esto es, contienen un puente de metileno entre C-4' y un átomo de oxígeno en C-2'. Otras unidades estructurales de azúcar compatibles con la hibridación del oligonucleótido también se pueden utilizar, y son conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a,  $\alpha$ -D-arabinofuranósidos,  $\alpha$ -2'-desoxiribofuranósidos o 2',3'-didesoxi-3'-aminoribofuranósidos. Los oligonucleótidos que contienen  $\alpha$ -D-arabinofuranósidos se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,177,196. Los oligonucleótidos que contienen 2',3'-didesoxi-3'-aminoribofuranósidos se describen en Chen et al. *Nucleic Acids Res.* 23: 2661-2668 (1995). También se han descrito procedimientos sintéticos para los ácidos nucleicos bloqueados ((Singh et al, *Chem. Comm.*, 455-456 (1998); Wengel J., *Acc. Chem. Res.*, 32:301-310 (1998)) y oligonucleótidos que contienen 2'-halógeno-2'-desoxiribofuranósidos (Palissa et al, *Z. Chem.* 27:216 (1987)). El esqueleto de fosfato de los oligonucleótidos modificados descritos aquí también puede ser modificado de tal manera que los oligonucleótidos contengan enlaces de fosforotioato y/o metilfosfonatos y/o fosforoamidatos (Chen et al, *Nucl Acids Res.*, 23:2662-2668 (1995)). Las combinaciones de enlaces oligonucleotídicos están también dentro del alcance de la presente invención. Todavía otras modificaciones del esqueleto son conocidas por los expertos en la técnica.

En otro grupo de realizaciones, las bases modificadas descritas aquí son incorporadas en ANP y quimeras de ADN/ANP para equilibrar  $T_m$ s y proveer oligonucleótidos modificados que tienen una discriminación no coincidente mejorada. Diversas formas modificadas de ADN y análogos de ADN han sido utilizadas en los intentos de superar algunas de las desventajas de la utilización de moléculas de ADN como sondas y cebadores. Entre estos están los ácidos nucleicos peptídicos (los ANP, también conocidos como ácidos nucleicos de poliamida). Nielsen et al. *Science* 254: 1497-1500 (1991). Los ANP contienen unidades de bases heterocíclicas, como los encontrados en ADN y ARN, que están enlazados por un esqueleto de poliamida, en lugar del característico esqueleto de azúcar-fosfato del ADN y ARN. Los ANP son capaces de hibridación con secuencias de ADN y ARN objetivo complementarias y, de hecho, hibridan más fuertemente que una sonda de ácido nucleico correspondiente. La síntesis de oligómeros de ANP y monómeros reactivos utilizados en la síntesis de oligómeros de ANP se han descrito en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,539,082; 5,714,331; 5,773,571; 5,736,336 y 5,766,855. Se

- han resumido metodologías alternativas para ANP y síntesis quimera de ADN/ANP y monómeros para la síntesis de ANP. Uhlmann et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 2796-2823 (1998). De acuerdo con lo anterior, el uso de cualquier combinación de bases normales, bases de pirazolo[3,4-d]-pirimidina no sustituida (por ejemplo, PPG y PPA), pirazolo [3,4-d]pirimidinas sustituidas en 3, purina modificada, pirimidina modificada, pirimidinas sustituidas en 5,
- 5 bases universales/ discriminativas, modificación de azúcar, modificación del esqueleto o ligador del surco menor para equilibrar la  $T_m$  de un ADN, ANP o quimera de ADN/ANP está en el alcance de esta invención. Los métodos sintéticos necesarios para la síntesis de las unidades monoméricas de base modificadas requeridos para el ácido nucleico, ANP y síntesis de quimeras de ANP/ADN están disponibles en la técnica, véase métodos en esta solicitud y en Uhlmann et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 2796-2823 (1998).
- 10 Para los usos descritos aquí, y como se señaló anteriormente, los oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados tendrán preferiblemente de 5 a 100 bases, más preferiblemente de 5 a 50 bases, todavía más preferiblemente, de 5 a 30 bases, y aún más preferiblemente, de 5 a 20 bases. En algunas realizaciones, las porciones de oligonucleótidos de las sondas/conjugados tendrán 5 a 15 bases. En algunas realizaciones, las porciones de oligonucleótidos tendrán 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 bases o bases modificadas.
- 15 La capacidad para diseñar sondas y cebadores en una manera predecible utilizando un algoritmo, que puede dirigir el uso o la incorporación de bases modificadas, ligador del surco menor, fluoróforos y/o detenedores, con base en sus propiedades termodinámicas se han descrito en la solicitud copendiente Serie No. 10/032,307, presentada el 21 de Diciembre de 2001. De acuerdo con lo anterior, el uso de cualquier combinación de bases normales, bases de pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituida (por ejemplo, PPG y PPA), pirazolo[3,4 -d] pirimidinas sustituidas en 3, purina modificada, pirimidina modificada, pirimidinas sustituidas en 5, bases universales/discriminativas, modificación de
- 20 azúcar, modificación del esqueleto o una unión de surco menor para equilibrar la  $T_m$  (por ejemplo, dentro de aproximadamente 5-8 °C) de un producto hibridado con un ácido nucleico, ANP o quimera de ADN/ANP es contemplado por la presente invención.
- Enlazadores del surco menor
- 25 Las sondas/conjugados de la presente invención también tendrán un enlazador del surco menor unido covalentemente (MB). Una variedad de enlazadores del surco menor adecuados se han descrito en la literatura. Véase, por ejemplo, Kutayavin, et al. Patente de los Estados No. 5,801,155; Wemmer, D.E., y Dervan P.B., *Current Opinon in Structural Biology*, 7:355-361 (1997); Walker, W.L., Kopka, J.L. y Goodsell, D.S., *Biopolymers*, 44:323-334 (1997); Zimmer, C & Wahnert, U. *Prog. Biophys. Molec. Bio.* 47:31-112 (1986) y Reddy, B.S.P., Dondhi, S.M., y Lown, J. W., *Pharmacol. Therap.*, 84:1-111 (1999).
- 30 Los métodos adecuados para juntar enlazadores del surco menor (así como grupos indicadores tales como fluoróforos y detenedores descritos a continuación) a través de enlazadores a oligonucleótidos se describen en, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. RE 38,416; 5,512,677; 5,419,966; 5,696,251; 5,585,481; 5,942,610 y 5,736,626.
- 35 El MB es generalmente unido bien sea a una base interna (Patentes de los Estados Unidos Nos. RE 38,416 y 6,084,102), el extremo 3' o 5' de la porción de oligonucleótido a través de un grupo enlazante adecuado. La unión al extremo 5' no sólo provee un beneficio de la estabilidad del híbrido, sino que también inhibe la digestión de nucleasa de la sonda durante las reacciones de amplificación.
- 40 La ubicación de un MB dentro de un conjugado de oligonucleótidos de MB también puede afectar las propiedades discriminatorias de tal conjugado. Una región no emparejada dentro de un dúplex dará lugar a cambios en la forma del surco menor en las proximidades de las bases mal emparejadas. Puesto que los MB encajan mejor dentro del surco menor de un dúplex de ADN perfectamente coincidente, los no coincidentes que resultan en cambios en la forma en el surco menor reducirían la fuerza de enlace de un MB a una región que contiene una falta de coincidencia. Por lo tanto, la capacidad de un MB para estabilizar un híbrido tal se reduciría, incrementando así la
- 45 capacidad de un conjugado de oligonucleótidos de MB para discriminar una falta de coincidencia de un dúplex perfectamente coincidente. Por otro lado, si una falta de coincidencia se encuentra fuera de la región complementaria a un conjugado de oligonucleótidos de MB, se espera que la capacidad discriminatoria para los oligonucleótidos no conjugados y conjugados de MB *de igual longitud* sea aproximadamente la misma. Puesto que la capacidad de una sonda de oligonucleótidos para discriminar pares de bases individuales no coincidentes depende de su longitud, los oligonucleótidos más cortos son más eficaces en desajustes exigentes. La ventaja primaria de la utilización de oligonucleótidos de MB conjugados en este contexto reside en el hecho de que se pueden utilizar los oligonucleótidos mucho más cortos en comparación con los utilizados en la técnica anterior (esto es, 20 méros o más cortos), que tienen un mayor poder de discriminación, debido al efecto estabilizador pronunciado de la conjugación de MB.
- 50
- 55 En un grupo de realizaciones, el MB se selecciona del grupo que consiste de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepinas.



Ligadores del surco menor preferidos adicionales son aquellos seleccionados de las fórmulas:



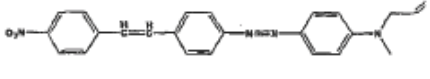
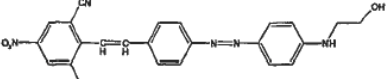
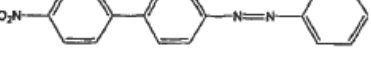
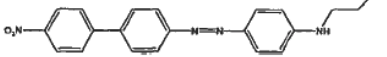
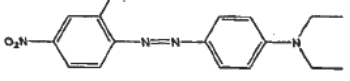
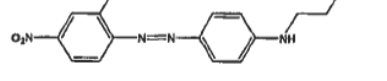
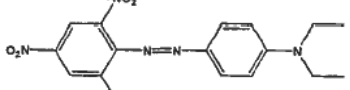
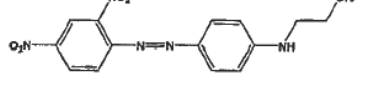
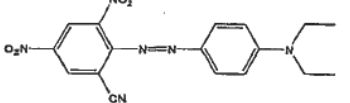
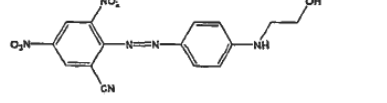
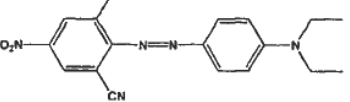
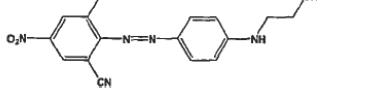
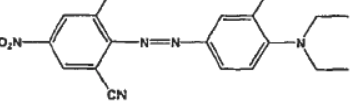
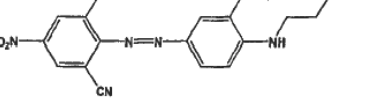
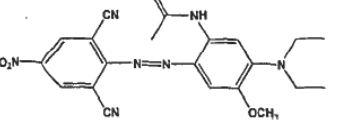
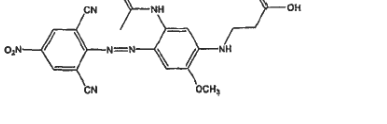
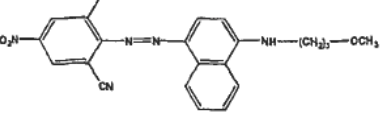
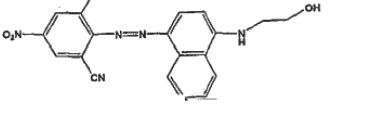
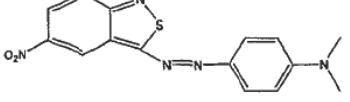
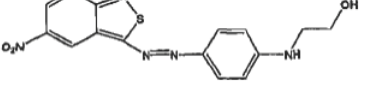
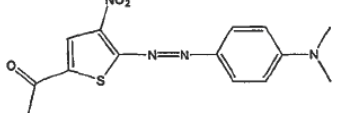
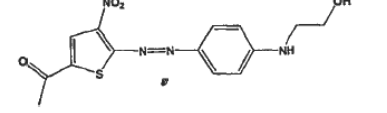
5 en donde el subíndice m es un entero de 2 a 5; el subíndice r es un entero de 2 a 10; y cada  $R^a$  y  $R^b$  es independientemente un grupo enlazante al oligonucleótido (bien sea directa o indirectamente a través de un fluoróforo), H,  $-OR^c$ ,  $-NR^d$ ,  $-COOR^c$  o  $-CONR^d$ , en donde cada  $R^c$  y  $R^d$  es seleccionado de H,  $(C_1-C_{12})$  heteroalquilo,  $(C_2-C_{12})$  heteroalquenilo,  $(C_2-C_{12})$  heteroalquinilo,  $(C_1-C_{12})$  alquilo,  $(C_2-C_{12})$  alquenilo,  $(C_2-C_{12})$  alquinilo, arilo( $C_1-C_{12}$ ) alquilo y arilo, con la condición de que uno de  $R^a$  y  $R^b$  representa un grupo enlazante a ODN o FI. Cada uno de los anillos puede ser sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de H, halógeno,  $(C_1-C_9)$  alquilo,  $OR^g$ ,  $N(R^g)_2$ ,  $N^+(R^g)_3$ ,  $SR^g$ ,  $COR^g$ ,  $CO_2R^g$ ,  $CON(R^g)_2$ ,  $(CH_2)_{0-6}SO_3^-$ ,  $(CH_2)_{0-6}CO_2^-$ ,  $(CH_2)_{0-6}OPO_3^{2-}$ , y  $NHC(O)(CH_2)_{0-6}CO_2^-$ , y ésteres y sales de los mismos, en donde cada  $R^g$  es independientemente H o  $(C_1-C_8)$  alquilo.

Ligadores del surco menor particularmente preferidos incluyen el trímero de 1,2-dihidro-(3H)pirrolo[3,2-e] indol-7-carboxamida (CDPI<sub>3</sub>), el pentámero de N-metilpirrolo-4-carbox-2-amida (MPC<sub>5</sub>) y otros ligadores del surco menor que presentan un incremento de la discriminación no coincidente. Las unidades estructurales de MB adicionales que se encontrarán en uso en la práctica de la presente invención se divulgan en la Patente de los Estados Unidos coposeída No. 5,801,155 y la patente de los Estados Unidos No. 6,727,356. En ciertas realizaciones, los MB pueden tener unidos grupos potenciadores de la solubilidad en agua (por ejemplo, azúcares, aminoácidos, ácido carboxílico o sustituyentes de ácido sulfónico, y similares). Véase la solicitud copendiente de los Estados Unidos Serie No. 10/507,267 (basado en PCT/US03/07467).

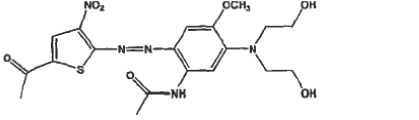
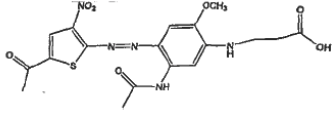
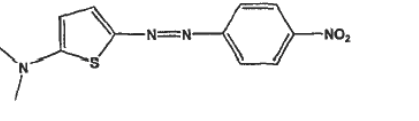
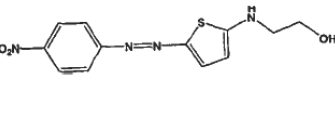
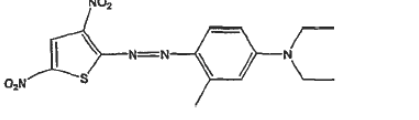
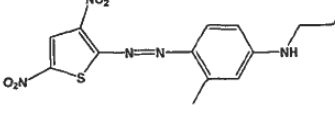
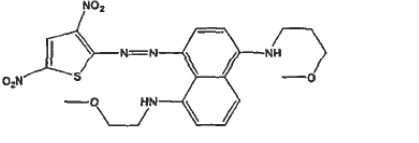
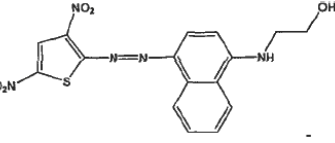
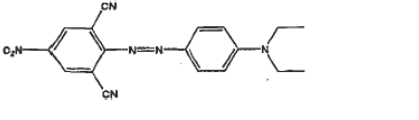
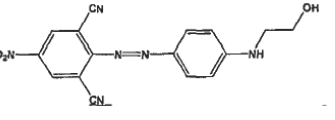
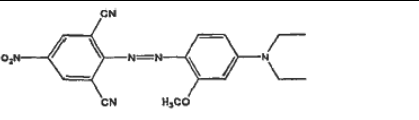
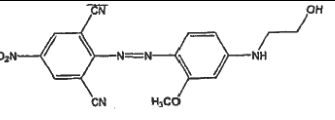
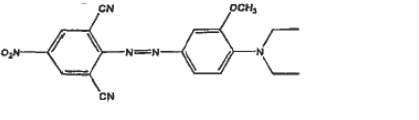
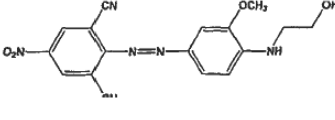
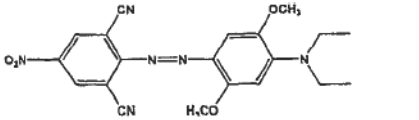
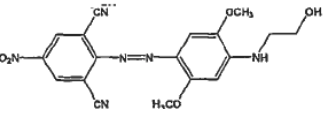
#### Detenedores

20 Métodos de detección desarrollados recientemente emplean el proceso de transferencia de energía por resonancia en fluorescencia (FRET) para la detección de la hibridación de la sonda en lugar de la detección directa de la intensidad de fluorescencia. En este tipo de ensayo, la FRET se produce entre un fluoróforo donante (informador) y una molécula aceptora (detenedora) cuando el espectro de absorción de la molécula detenedora se superpone con el espectro de emisión del fluoróforo donante y las dos moléculas están en estrecha proximidad. La energía del estado excitado del fluoróforo donante se transfiere al aceptor vecino por una interacción en dipolo inducida por dipolo en resonancia, lo que resulta en la detención de la fluorescencia donante. Si la molécula aceptora es un fluoróforo, su fluorescencia a veces puede ser incrementada. La eficiencia de la transferencia de energía entre las moléculas donantes yceptoras es altamente dependiente de la distancia entre las moléculas. Se conocen las ecuaciones que describen esta relación. La distancia Forster ( $R_0$ ) se describe como la distancia entre las moléculas donantes yceptoras, donde la transferencia de energía es eficiente en un 50%. También son conocidos otros mecanismos de detención de fluorescencia, tales como, la detención de transferencia por colisión y carga. Hay una amplia orientación en la técnica para seleccionar detenedores y pares de fluoróforos y sus uniones a oligonucleótidos (Haugland, R.P., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, Sixth Edition, Molecular Probes, Eugene, OR, 1996; Patentes de los Estados Unidos Nos. 3,996,345 y 4,351,760 y similares). Detenedores preferidos se describen en la Patente de los Estados Unidos coposeída No. 6,727,356, incorporada aquí como referencia. Más particularmente, la Tabla 1 siguiente contiene estructuras de detenedores que se pueden modificar fácilmente para las estructuras que tienen grupos funcionales adecuados (por ejemplo, Q-K- con sitios de unión para las porciones de ODN) para la introducción en sondas, con base en las reacciones químicas conocidas citadas (véase por ejemplo, Thiel, et al., J. fur prakt. Chemie, 328:497-514 (1986); Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,324,721 y 4,054,560; Timm, Melliand Textilberichte, 9:1090-1096 (1969); Hallas, J.S.D.C. 285-294 (1979); Beyer, et al., J Prakt. Chem., 24:100-104 (1964); Hutchings, et al., Chem. Europ. J. 3:1719-1727 (1997) y Morley, et al., J. Phys. Chem. A., 102:5802-5808 (1998); Haak, et al., J. Chem. Res. Miniprint 10:2701-2735 (1998) y Ruggli et al., He/v. Chim. Acta, 26:814-826 (1943). Estructuras adicionales (por ejemplo, colorantes mono- y bis-azo) con diferentes combinaciones de sustituyentes en diversas posiciones se pueden preparar basadas en compuestos y métodos conocidos en el campo de la química de colorantes (que se resumen en the Color Index, Issue 3 on CDD-ROM, pages 4009-4324; Society of Dyers and Colourists, Bradford, England; <http://www.sdc.org.uk>; y véase también la WO 01/86001 y la US 6,790,945 incorporada como referencia).

Tabla 1

Literatura de la Estructura	$\lambda_{\max}$ nm; $\epsilon M^{-1}cm^{-1}$ ; Solvente	Estructura modificada del enlazador Q-K-
	464	
	440	
	540; 40,000 MeOH	
	549 37,000 EtOH	
	590 48,978 CHCl <sub>3</sub>	
	601 40,738 CHCl <sub>3</sub>	
	623 48,000 CHCl <sub>3</sub>	
	656 100,000 CHCl <sub>3</sub>	
	656 53,043	
	598	
	582	

(continuación)

Literatura de la Estructura	$\lambda_{\text{max}}$ nm; $\epsilon M^{-1}cm^{-1}$ ; Solvente	Estructura modificada del enlazador Q-K-
	652	
	554 50,000	
	673.5	
	809	
	592 46,000	
	601 51,000	
	623 48,000	
	632 Predicho	

5 Los anteriores detenedores cubren el rango de aproximadamente 400 a 800 nm, y muchos demuestran detención mejorada cuando se unen a un conjugado MB-FI-ODN-Q. Mientras que las versiones modificadas ilustran NH (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) como un grupo enlazante preferido para ser usado para acoplar el detenedor a oligonucleótidos o soporte sólido, ejemplos de otros enlazadores adecuados son conocidos en la técnica o se proveen aquí o pueden ser preparados a partir de detenedores derivados tales como los de la Tabla 1.

10 Detenedores preferidos para cada uno de los aspectos de la invención presente son seleccionados de aquellos en la tabla anterior, así como detenedores bis azo (Patente de los Estados Unidos No. 6,790,945) y los colorantes de Biosearch Technologies, Inc. (provistos como detenedores Black Hole™: BH-1, BH-2 y BH-3), Dabcilo, TAMRA y rodamina de carboxitetrametilo.

Fluoróforos

Los fluoróforos útiles en la presente invención son en general colorantes orgánicos fluorescentes que han sido derivados para unir al enlazador trifuncional W (fórmula II). Un experto en la técnica apreciará que sean seleccionados fluoróforos adecuados en combinación con un detenedor, el cual típicamente es también un colorante orgánico y puede o puede no ser fluorescente.

5 Hay una gran cantidad de orientación práctica disponible en la literatura para seleccionar pares de fluoróforos-detenedores apropiados para sondas particulares. Véase, por ejemplo, Clegg (citado anteriormente) Pesce et al., editors, FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, New York, 1970); y similares. La literatura también incluye referencias que proveen listas exhaustivas de moléculas fluorescentes y cromogénicas (detención) y sus propiedades ópticas relevantes para la selección de pares de fluoróforo-detenedor, por ejemplo, Beriman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2ND EDITION (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, INDICATORS (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE (Interscience Publishers, New York, 1949); y similares. Adicionalmente, también son bien conocidos los métodos para derivar fluoróforos y detenedores para la unión covalente a través de grupos reactivos comunes. Véase, por ejemplo, Haugland (citada anteriormente); Ullman et al., Patente de los Estados Unidos No. 3,996,345; Khanna et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,351,760; y similares.

20 Fluoróforos preferidos son aquellos basados en colorantes xantherie, una variedad de los cuales está disponible comercialmente con sustituyentes útiles para la unión de bien sea un grupo enlazante o para la unión directa a un oligonucleótido. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas, que tienen un grupo amino en la posición  $\alpha$ - o  $\beta$ . Incluidos entre tales compuestos de naftilamino están 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftaleno sulfonato y 2-p-toluidinil-6-naftaleno sulfonato. Otros colorantes incluyen 3-fenil-7-isocianatocumarina, acridinas, tales como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; N-(p-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; benzoxadiazoles, estilbenos, pirenos, y similares. Todavía otros fluoróforos adecuados incluyen los colorantes de resorufina, colorantes de rodamina, colorantes de cianina y colorantes BODIPY.

25 Estos colorantes y metodologías de enlace adecuados para la unión a oligonucleótidos están descritos en muchas referencias, por ejemplo, Khanna et al. (citada anteriormente); Marshall, Histochemical J., 7:299-303 (1975); Menchen et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,188,934; Menchen et al., Solicitud de Patente Europea 87310256.0; y Bergot et al., Solicitud Internacional PCT/LTS90/05565.

Más particularmente, los fluoróforos descritos aquí pueden ser unidos a las porciones de oligonucleótidos, utilizando, por ejemplo, métodos químicos o enzimáticos. A modo de ejemplo, los métodos para la incorporación de grupos químicos reactivos en oligonucleótidos, en sitios específicos, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los oligonucleótidos que contienen un grupo químico reactivo, que se encuentra en un sitio específico, se pueden combinar con un marcador unido a un grupo reactivo complementario (por ejemplo, un oligonucleótido que contiene un grupo reactivo nucleófilo puede hacerse reaccionar con un marcador unido a un grupo reactivo electrofílico) para acoplar un marcador a una sonda mediante técnicas químicas. Marcadores de ejemplo y métodos para la fijación de un marcador a un oligonucleótido se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,824,796; Patente de los Estados Unidos No. 5,210,015; Kessler (ed.), Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules, Springer-Verlag, Berlin, 1992; Kricka (ed.) Nonisotopic ADN Probe Techniques, Academic Press, San Diego, 1992; Howard (ed.) Methods in Nonradioactive Detection, Appleton & Lange, Norwalk, 1993. La marcación química no específica de un oligonucleótido se puede lograr mediante la combinación del oligonucleótido con una sustancia química que reacciona, por ejemplo, con un grupo funcional particular de una base de nucleótidos, y simultánea o subsecuentemente hacer reaccionar el oligonucleótido con un marcador. Véase, por ejemplo, Draper et al. (1980) Biochemistry 19:1774-1781. La incorporación enzimática del marcador en un oligonucleótido se puede lograr mediante la realización de la modificación enzimática o polimerización de un oligonucleótido utilizando precursores marcados, o mediante la adición enzimática de un marcador a un oligonucleótido ya existente. Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,449,767. Ejemplos de enzimas modificadoras incluyen, pero no se limitan a, ADN polimerasas, transcriptasas reversas, ARN polimerasas, etc. Ejemplos de enzimas que son capaces de agregar un marcador a un oligonucleótido ya existente incluyen, pero no se limitan a, quinasas, terminal transferasas, ligasas, glicosilasas, etc.

55 Para cada uno de los aspectos de la presente invención, los fluoróforos preferidos se seleccionan de colorantes Cy, análogos de BODIPY, 5-FAM<sup>TM</sup>, 6-FAM<sup>TM</sup>, TET<sup>TM</sup>, JOE<sup>TM</sup>, HEX<sup>TM</sup>, VIC<sup>TM</sup>, NED<sup>TM</sup>, TAMRA<sup>TM</sup>, ROX<sup>TM</sup>, Bothell Blue<sup>TM</sup> y Yakima Yellow<sup>TM</sup> (YY). Estos fluoróforos están generalmente disponibles de fuentes comerciales tales como Glen Research, Sterling, VA, Molecular Probes, Eugene, OR, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA and Epoch Biosciences, Inc., Bothell, WA.

#### Grupos enlazantes

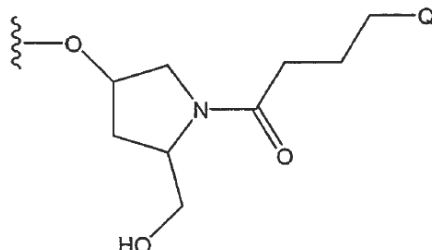
Una variedad de grupos y métodos de enlazantes son conocidos por los expertos en la técnica para la unión de fluoróforos, detenedores y ligadores del surco menor a los terminales 5' o 3' de oligonucleótidos. Véase, por ejemplo,

5 Eckstein, editor, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman et al., Nucleic Acids Research, 15:5305-5321 (1987); Sharma et al., Nucleic Acids Research, 19:3019 (1991); Giusti et al., PCR Methods and Applications, 2:223-227 (1993), Fung et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,757,141; Stabinsky, Patente de los Estados Unidos No. 4,739,044; Agrawal et al., Tetrahedron Letters, 31:1543-1546 (1990); Sproat et al., Nucleic Acids Research, 15:4837 (1987); Nelson et al., Nucleic Acids Research, 17:7187-7194 (1989); y similares. Todavía otros grupos enlazantes disponibles comercialmente pueden ser usados que pueden ser unidos un oligonucleótido durante la síntesis, por ejemplo, disponibles de Glen Research. Otras metodologías para unir un fluoróforo a una porción de oligonucleótido involucran el uso de la química de la fosforamidita en la conclusión de la síntesis en fase sólida por medio de colorantes derivados con una unidad estructural de fosforamidita. Véase, por ejemplo, Woo et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,231,191; Hobbs, Jr., Patente de los Estados Unidos No. 4,997,928; Reed, et al., publicación PCT No. WO 01/42505; Patente de los Estados Unidos No. 6,653,473 y Solicitud de los Estados Unidos Serie No. 10/026,374.

15 Mientras que un número de métodos enlazantes generales están disponibles, la selección de ciertos grupos enlazantes constituyen un aspecto de la invención, cuando la selección es hecha en combinación con otros factores tales como la longitud de los oligonucleótidos, ligadores del surco menor, los pares de fluoróforo-detenedor, y similares.

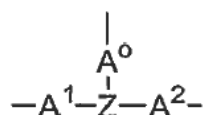
20 Las sondas y conjugados de la presente invención generalmente tienen uno o dos tipos de grupos enlazantes. Tal como se establece en la fórmula I, la letra K representa un grupo enlazante divalente, mientras que la letra W representa un grupo enlazante trivalente. Los grupos enlazantes particulares se seleccionan generalmente por su facilidad de síntesis, de utilidad en la síntesis en fase sólida, la estabilidad durante la construcción de la sonda y el uso, y los parámetros físicos que cada uno imparte a la sonda o conjugado tales como proporcionar una separación adecuada entre el fluoróforo y el detenedor; o proveer una unión de longitud adecuada para permitir que la porción de ligadores del surco menor interactúe no covalentemente con el surco menor formado tras la hibridación de la sonda.

25 Más particularmente, K es un enlace directo entre el detenedor y la porción de oligonucleótido de la sonda/conjugado, o es un grupo enlazante divalente que tiene de 1 a 30 átomos de la cadena principal que se selecciona entre C, O, N, S, P y Si. La estructura preferida de K se representa por la fórmula:



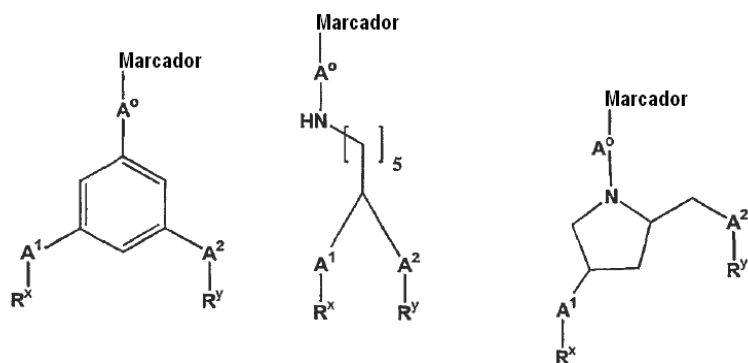
30 en donde Q representa una unidad estructural detenedora, que tiene el significado provisto anteriormente y la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la sonda o conjugado.

El grupo enlazante trivalente W puede abarcar una variedad de estructuras con el fin de proveer una unión y flexibilidad adecuadas entre el ODN, F1 y MB. En un grupo de realizaciones, W es una funcionalidad trivalente que tiene la fórmula:



35 en donde Z es una unidad estructural cíclica o acíclica que tiene de 1 a 10 átomos seleccionados de C, N, S, P, Si y O; arilo y, los componentes  $A^0$ ,  $A^1$  y  $A^2$  se seleccionan independientemente de un enlace o una porción enlazante/espaciadora que tiene de 1 a aproximadamente 50 átomos seleccionados de C, N, S, P, Si y O, y los átomos de hidrógeno adicionales para llenar la valencias disponibles. Adicionalmente, cada uno de  $A^0$ ,  $A^1$  y  $A^2$  puede tener componentes cíclicos, (lineales o ramificados) componentes alquilo acíclicos (incluyendo componentes alquilo insaturados), componentes arilo, o una combinación de los mismos.

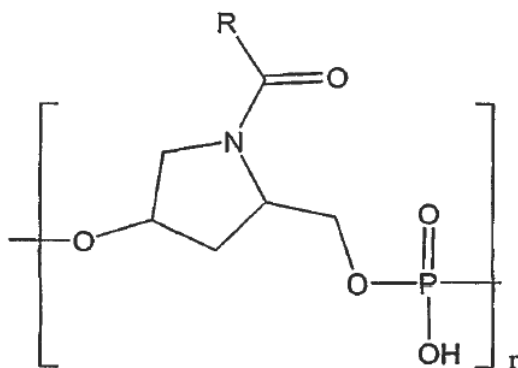
Enlazantes de tintes preferidos



5 en donde cada uno de  $A^0$ ,  $A^1$  y  $A^2$  se han definido anteriormente; el marcador es generalmente un detenedor,  $R^x$  y  $R^y$  son sitios de unión al resto de la sonda o conjugados. Por ejemplo,  $R^x$  y  $R^y$  pueden ser porciones de MB y porciones de ODN (o  $[A-B]_n$ ) de la sonda conjugada. Sin embargo, la presente invención también está dirigida a reactivos útiles en la preparación de las sondas/conjugados descritos aquí. De acuerdo con lo anterior, en algunos aspectos de la invención, cada uno de  $R^x$  y  $R^y$  se seleccionan independientemente de H, fosforamidita, éster de PFP, éster de NHS, soporte sólido y un átomo bloqueado con un grupo protector compatible con la síntesis de oligonucleótidos. Un experto en la técnica apreciará que cada uno de los anillos en las fórmulas anteriores (para W) puede ser sustituido con uno más sustituyentes seleccionados de H, halógeno,  $(C_1-C_8)$  alquilo,  $OR^g$ ,  $N(R^g)_2$ ,  $N^+(R^g)_3$ ,  $SR^g$ ,  $COR^g$ ,  $CO_2R^g$ ,  $CON(R^g)_2$ ,  $(CH_2)_{0-6}SO_3^-$ ,  $(CH_2)_{0-6}CO_2^-$ ,  $(CH_2)_{0-6}OPO_3^{2-}$ , y  $NHC(O)(CH_2)_{0-6}CO_2^-$ , y ésteres y sales de los mismos, en donde cada  $R^g$  es independientemente H o  $(C_1-C_8)$  alquilo.

10

Las valencias del enlazador, que se conectan al ligador del surco menor y ODN, en la estructura I pueden tener grupo enlazante adicional, tal como

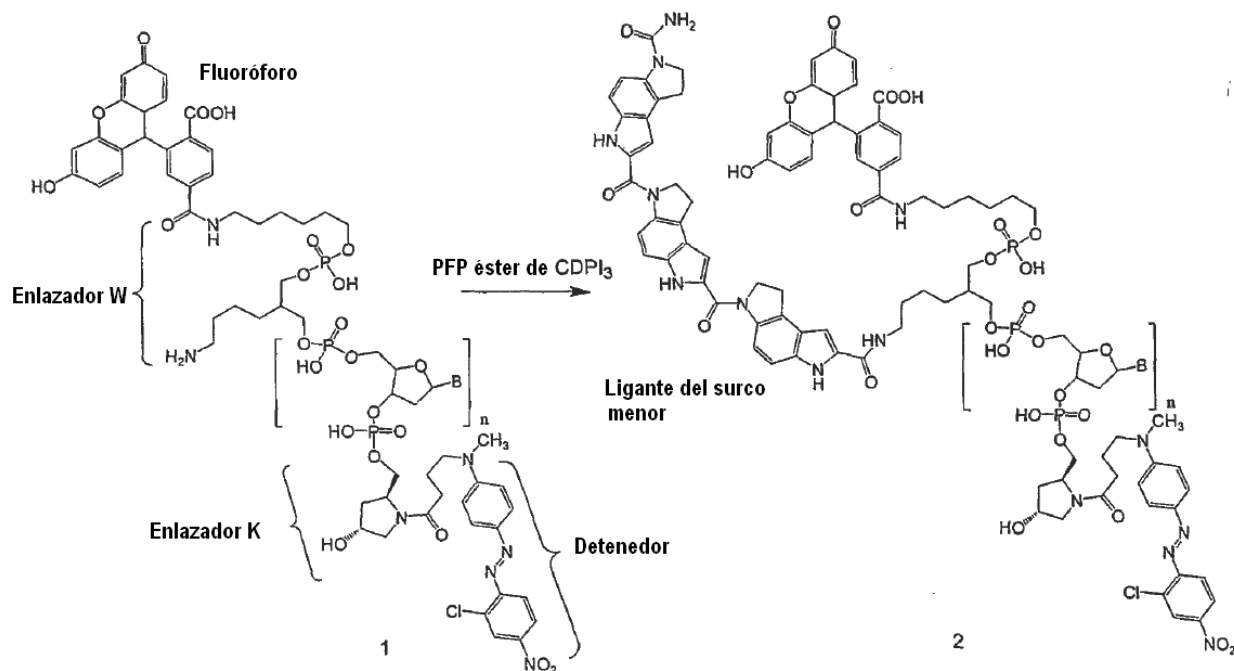


15 en donde el subíndice  $r$  es un entero de 0 a 5, preferiblemente 1, lo más preferiblemente 2.  $R$  es alquilo, preferiblemente metilo.

Preparación de intermediarios y conjugados de oligonucleótidos

Los esquemas de reacción 1-8 proveen métodos ilustrativos para la preparación de conjugados de MB-F1-ODN-Q y un número de intermediarios que son útiles en la presente invención. Los esquemas ilustran la preparación de soporte sólido, y derivados de fosforamidita enlazantes que se pueden utilizar en, por ejemplo, sintetizadores automáticos para la preparación de las sondas de la invención.

20



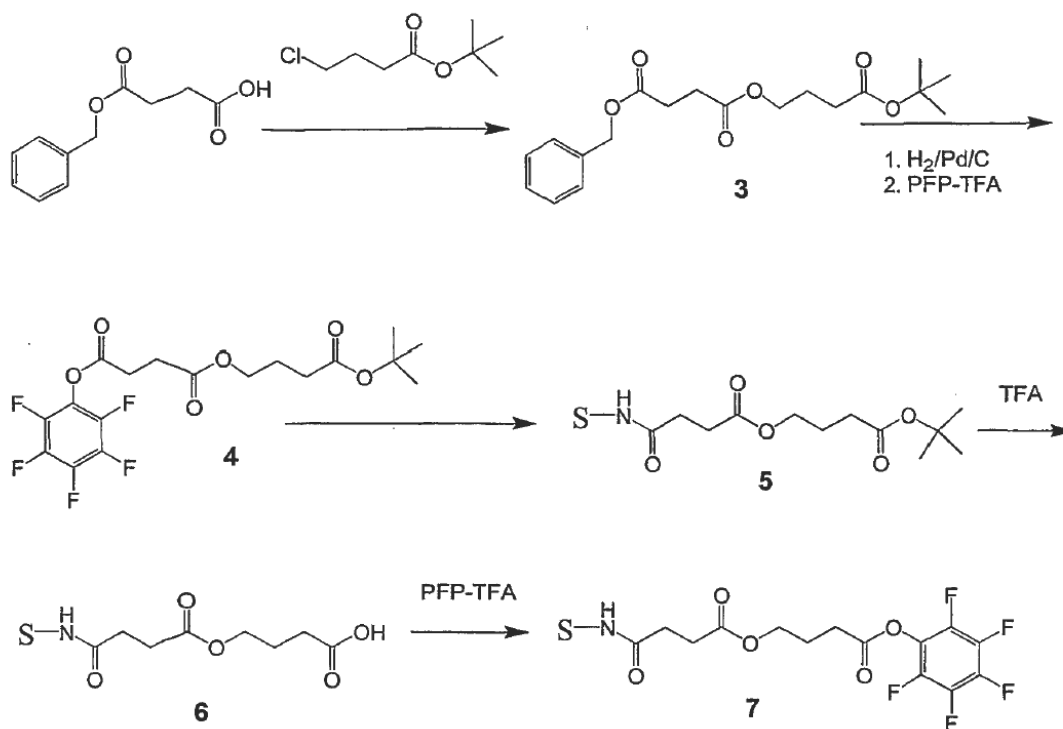
Esquema de Reacción 1

El esquema 1 ilustra una metodología postsíntesis para preparar un conjugado MB-W(-FL)-ODN-KQ 2 a partir de un NH<sub>2</sub>-W(-F1)-ODN-KQ1, sintetizado por métodos conocidos en la técnica. El grupo amino en W en conjugado 1 se derivó a partir de un éster activado de CDPI<sub>3</sub> como se describe (Lukhtanov et al, Bioconj. Chem., 6:418-426 (1995)) para producir oligonucleótido modificado (2). El fluoróforo era fluoresceína y el detenedor era el Detenedor Eclipse (Epoch Biosciences, Bothell, WA). En este ejemplo particular, el ligando MB y el fluoróforo se localizan en el extremo 5' de la sonda de ADN y el detenedor en el extremo 3'. La orientación reversa también es posible si se utilizan 5'-fosforamiditas para sintetizar el precursor de sonda de cola amino.

La Figura 6, ilustra una metodología para automatizar el ensamble de las sondas (conjugados) de la invención en un sintetizador de oligonucleótidos comercial. Este esquema provee sondas con la misma orientación y estructuras enlazadoras con ligando MB, fluoróforo y el detenedor como en el Esquema de Reacción 1. En este metodología un ligando MB está unido al soporte sólido (S) a través de un enlaceador escindible. El MB también tiene un segundo enlaceador terminado en dihidroxi en el extremo distal de la unidad estructural MB, en el que uno de los grupos hidroxilo es DMTr (dimetoxitritilo) protegido y el otro es o bien libre o protegido con un grupo (R) que se puede eliminar sin desproteger el grupo DMTr. Usando este soporte, un fluoróforo se incorpora primero en el grupo hidroxilo libre (o diferente de DMTr protegido) usando un reactivo fosforamidita fluoróforo. En la segunda se realiza la síntesis de oligonucleótidos normales, utilizando bases de fosforamidita disponibles comercialmente, con la incorporación final de la unidad estructural detenedora utilizando reactivos de fosforamidita detenedores conocidos. Finalmente, en la tercera etapa, las sondas totalmente ensambladas son desprotegidas y escindidas del soporte sólido usando condiciones de desprotección estándar o ajustadas.

Los esquemas de reacción 2 y 3 proveen un método para la preparación de un soporte sólido de MB con un enlaceador escindible usado en la síntesis de conjugados de MB-F1-ODN-Q como se ilustra en la Figura 6. Más particularmente, estos esquemas ilustran la síntesis de un soporte sólido con un enlaceador escindible (Esquema de Reacción 2) el cual está acoplado a un reactivo MB que contiene un grupo enlazante dihidroxi bloqueado. Más en particular, estos esquemas ilustran la preparación del soporte sólido de MB deseado 14 requerido para la síntesis de oligonucleótidos automatizada en un sintetizador.

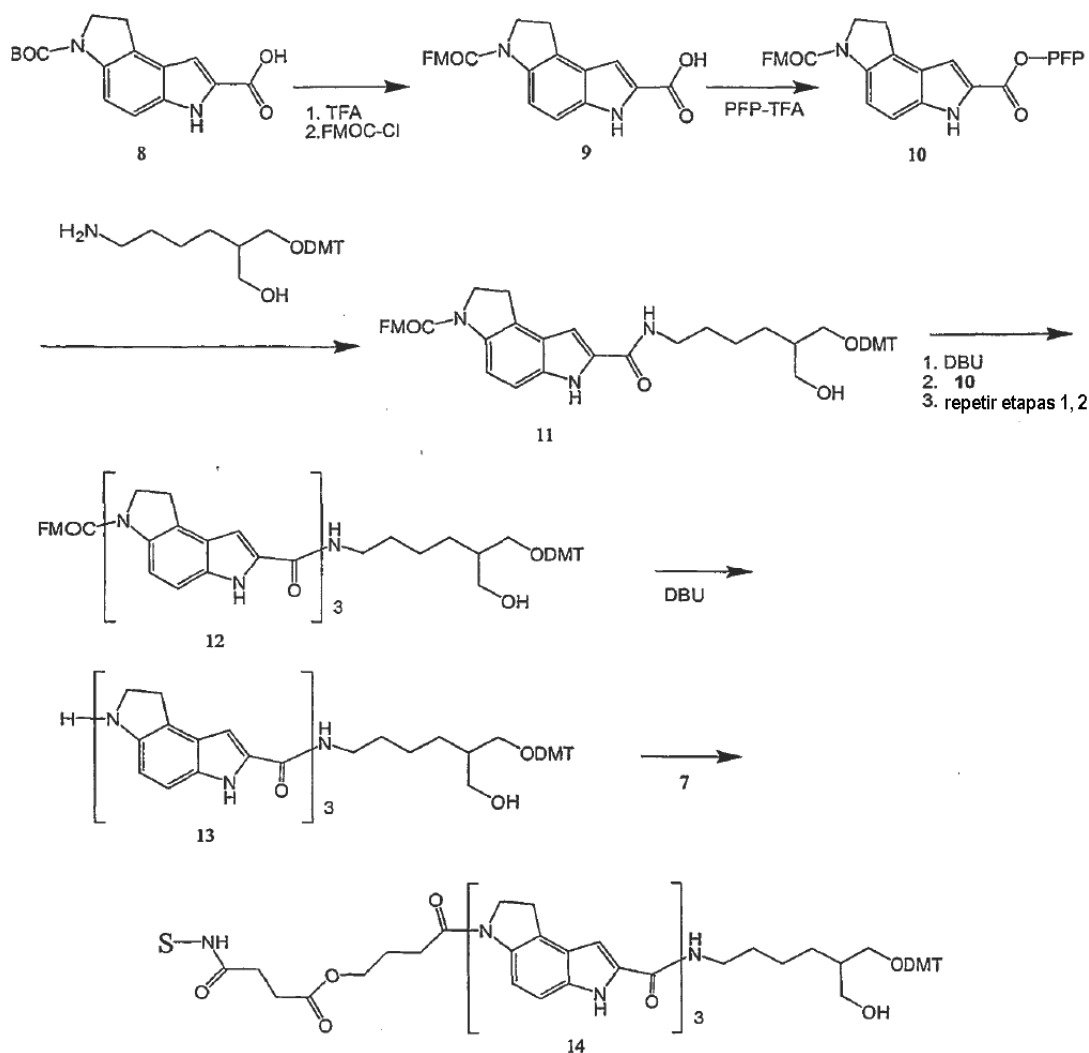
En la primera porción (Esquema de Reacción 2) el soporte sólido pentafluorofenil activado 7 se sintetizó a partir de succinato de monobencilo. El intermediario 3 se sintetizó a partir de succinato de monobencilo (J. Org Chem., 66:4115-4121 (2001)) mediante la reacción con 4clorobutirato de tert-butilo (preparado a partir de cloruro de 4-clorobutirilo y tert-butanol). El grupo bencilo se eliminó mediante hidrogenación catalítica y luego el grupo carboxilo libre se hizo reaccionar con trifluoroacetato de pentafluorofenilo (PFP-TFA) para proveer éster de PFP 4. Usando este éster de PFP, el soporte sólido modificado amino-se convirtió en apoyo de tert-butil-protegido 5. Finalmente, el grupo carboxilo terminal se desprotegió para proveer el soporte sólido 6 y se convierte a éster de PFP para dar soporte activado PFP-7.



Esquema de Reacción 2

En la segunda parte (Esquema de Reacción 3) el soporte sólido de MB **14** requerido para la síntesis de oligonucleótidos automatizada fue sintetizado a partir de t-Boc protegido derivado de monómero DPI. El Fmoc protegido derivado de monómero DPI **9** fue preparado por la eliminación del grupo protector Boc con ácido trifluoroacético a partir del derivado DPI **8**, seguido por la reacción con cloruro de 9-fluoronilmetoxicarbonilo (Fmoc-Cl). Este material se hizo reaccionar sucesivamente con PFPTFA y el 2-(5-aminopentil)propano-1,3-diol protegido con DMTr para producir el Fmoc-DPI PFP-éster **10** y el derivado DPI enlazado a diol **11**. El grupo Fmoc de **11** se eliminó y se acopló con un segundo Fmoc-DPI PFP-éster para producir el intermediario Fmoc DPI<sub>2</sub>. Una desprotección y acoplamiento adicionales proveyeron ligando MGB protegidos por Fmoc (triamida de dihidrociclopirroloindol DPI<sub>3</sub> **12**; MGB es una marca comercial de Epoch Biosciences). La eliminación del grupo Fmoc de **12** produjo el ligando de DPI<sub>3</sub> que contiene amina **13**. La reacción del soporte sólido **7** y el intermedio de DPI<sub>3</sub> **13** produjo el soporte sólido DPI<sub>3</sub> **14** con un enlazador escindible. El soporte sólido **14** fue utilizado para sintetizar conjugados de MGB-F1-ODN-Q con diversas combinaciones **F1** y Q. Una combinación preferida fue sintetizada con fluoresceína como un fluoróforo y el Detenedor Eclipse Dark (disponible de Glen Research, Sterling, Virginia).





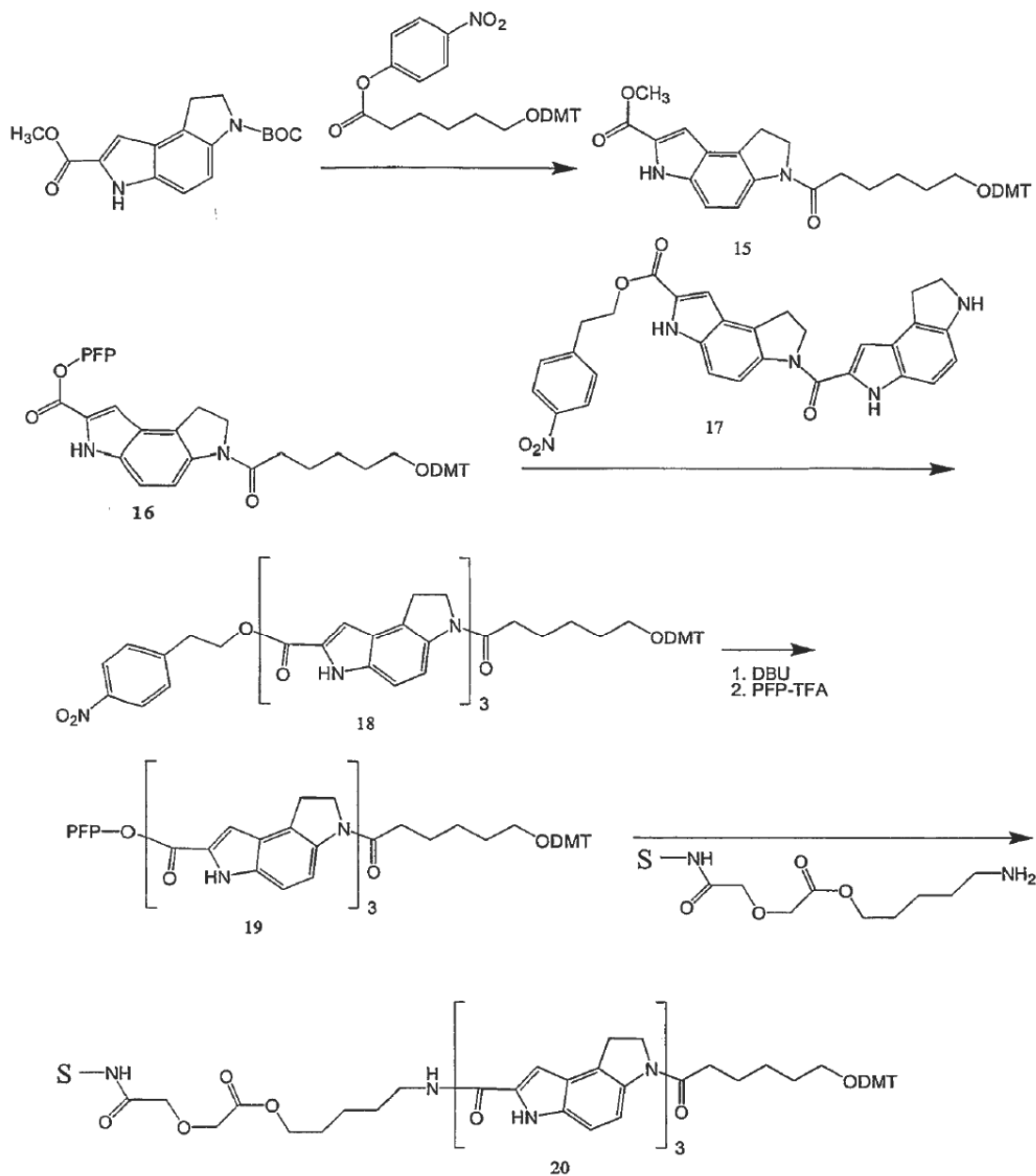
Esquema de Reacción 3

La Figura 7 muestra esquemáticamente una forma particularmente preferida para ensamblar los conjugados de MB-F1-ODN-Q en un sintetizador. En esta metodología un ligando MB está unido al soporte sólido (S) a través de un enlazador escindible. El MB también termina en un segundo enlazador en el extremo distal de la unidad estructural MB, en donde un grupo hidroxilo es DMTr (dimetoxitritilo) protegido. En la primera etapa, usando este soporte desbloqueado, es unido una fosforamidita fluoróforo trifuncional que contiene grupo hidroxilo protegido DMTr. En la segunda etapa, se lleva a cabo la síntesis normal de oligonucleótido, usando bases de fosforamidita disponibles comercialmente, con la incorporación final de la unidad estructural detenidora utilizando reactivos de fosforamidita detenedores conocidos. Finalmente, en la tercera etapa, las sondas totalmente ensambladas son desprotegidas y escindidas del soporte sólido usando condiciones de desprotección estándar o ajustadas.

Los esquemas de reacción 4 y 5 proveen un método preferido para la preparación de un soporte sólido MB con un enlazador escindible usado en la síntesis de conjugados MB-F1-ODN-Q como se ilustra en la Figura 7. Más particularmente, estos esquemas ilustran la síntesis de un soporte sólido con un enlazador escindible (Esquema de Reacción 4) que está acoplado a un reactivo MB que contiene un grupo enlazante hidroxilo bloqueado **20** útil para la síntesis de oligonucleótidos automatizado en un sintetizador.

En la primera porción (Esquema de Reacción 4) soporte sólido bloqueado de DMT **20** se sintetizó a partir de metil éster de la unidad estructural DPI **8**. El Intermediario **15** se sintetizó mediante la introducción del enlazador de ácido DMT-hidroxihexanoico en el terminal N de la unidad estructural DPI mediante la reacción de metil éster de **8** con 6-O-dimetoxitritil-hexanoil 4-nitrofenil éster. La saponificación del metil éster **15** y la reacción con PFP-TFA produjo DMTr-hidroxihexanoil-DPI PFP éster **16** el cual después se hizo reaccionar con DPI<sub>2</sub> nitrofenil éster **17** (véase la Publicación de Patente de los Estados Unidos 20020034754) para dar el DMTrhidroxihexanoil- DPI<sub>3</sub> NPE éster **18**. La eliminación del grupo NPE con 1,8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-eno (DBU), y la activación del grupo carboxi libre

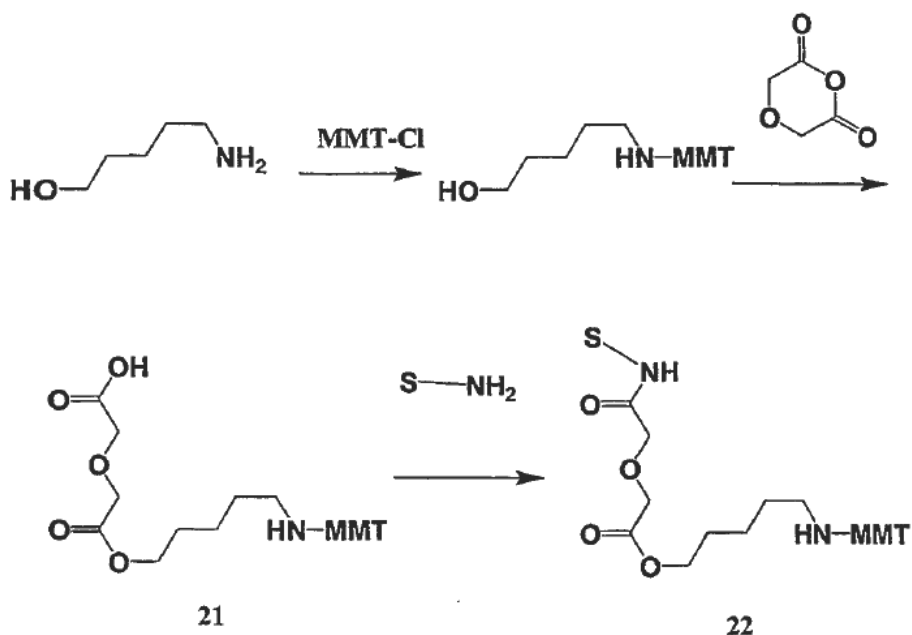
5 con PFP-TFA generó DMTr-hidroxihexanoil-DPI3 PFP éster **19** adecuado para el acoplamiento con un soporte sólido amino modificado apropiado para proveer soporte sólido de DMT-hidroxihexanoil-DPI3 **20**. En este ejemplo particular de un soporte sólido modificado con amino, el soporte sólido de MMT-aminopentil diglicolato **22** se utilizó después de la desprotección del grupo MMT. Un experto en la técnica apreciará que esencialmente puede ser usado cualquier soporte sólido utilizado en la técnica para sintetizar oligonucleótidos, incluyendo por ejemplo, vidrio de poro controlado, poliestireno, nailon y similares.



Esquema de Reacción 4

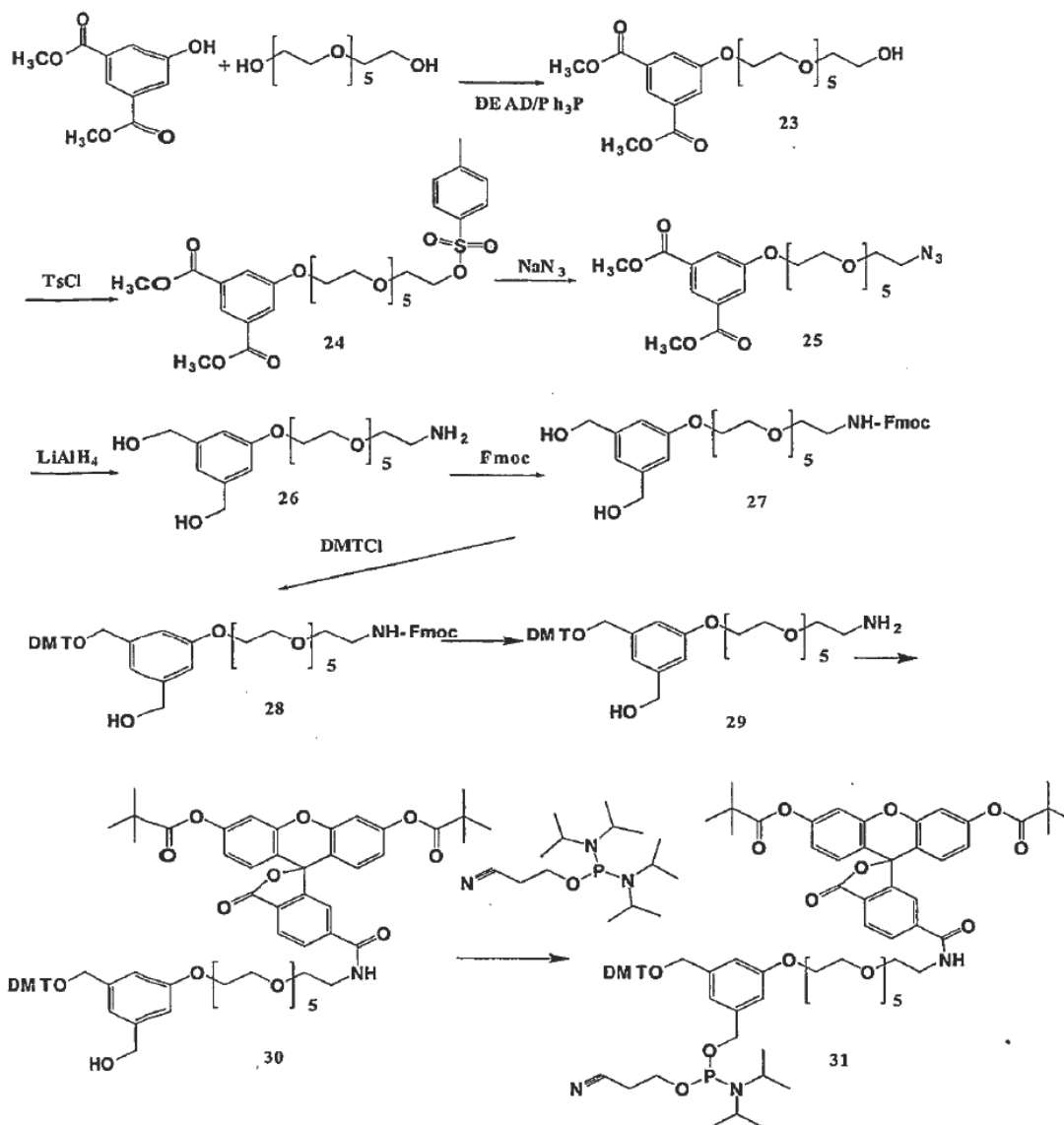
10 En la segunda parte (Esquema de Reacción 5) el soporte de diglicolato MMT-aminopentilo **22** (utilizado para preparar **20** en el Esquema de Reacción 4) se preparó a partir de 5-aminopentanol. El 5-aminopentanol estaba protegido por reacción con cloruro de monometoxitritilo (MMT-Cl) para dar MMT-aminopentanol que a su vez se hace reaccionar con anhídrido diglicólico para proveer diglicolato de MMT-aminopentilo **21**. Este intermediario se acopló con soporte sólido que contiene amina (tal como poliestireno de aminometilo o aminoalquilo de cadena larga CPG (vidrio de poro controlado)) en la presencia de reactivos de acoplamiento adecuados para la formación de unión amida para proveer el soporte de diglicolato de MMT aminopentilo requerido **22**. El grupo MMT se eliminó por

tratamiento con una solución de ácido tricloroacético en diclorometano antes de reaccionar con el éster de MB PFP **19**; en el Esquema de Reacción 4.



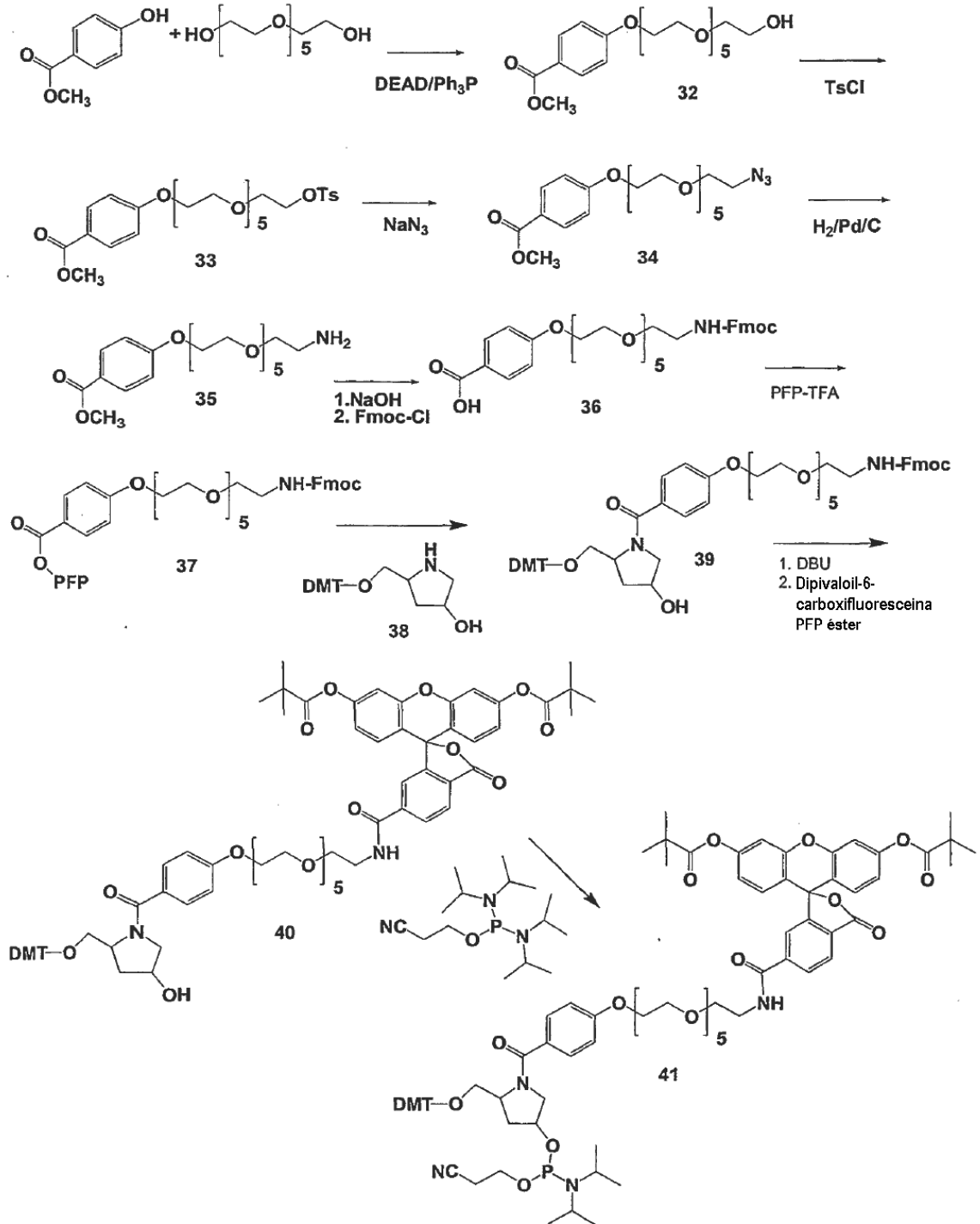
Esquema de Reacción 5

El esquema de reacción 6 provee un método ilustrativo para la síntesis de fosforamidita fluorogénico **31**. Se conjugaron dimetil éster del ácido 5-hidroxi-isoftálico y hexaetilen glicol en la presencia de azodicarboxilato de dietilo (DEAD) y trifetilfosfina para intermediario hidroxilo **23**. La reacción de 23 con cloruro de tosilo dio el éster de tosilo **24** el cual se hizo reaccionar con azida de sodio para producir el derivado de azida **25**. La reducción con LiAlH<sub>4</sub>, redujo simultáneamente los ésteres a grupos hidroximetilo y la azida a una amina primaria dando aminodiol **26**. El grupo amino de 26 fue bloqueada por reacción con cloruro de 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (FmocCl) para dar **27**, seguido por el bloqueo de uno de los grupos hidroxilo por reacción con DMTCl para producir **28**. Después de desbloqueo del grupo Fmoc, el grupo amino libre en **29** se hace reaccionar con PFP dipivaloifluorescein-6-carboxilato (Nucleoside&Nucleotides (1997) 16(1&2), 107-114) para dar **30**. En la última etapa el precursor hidroxilo **30** se convirtió a fosforamidita **31**.



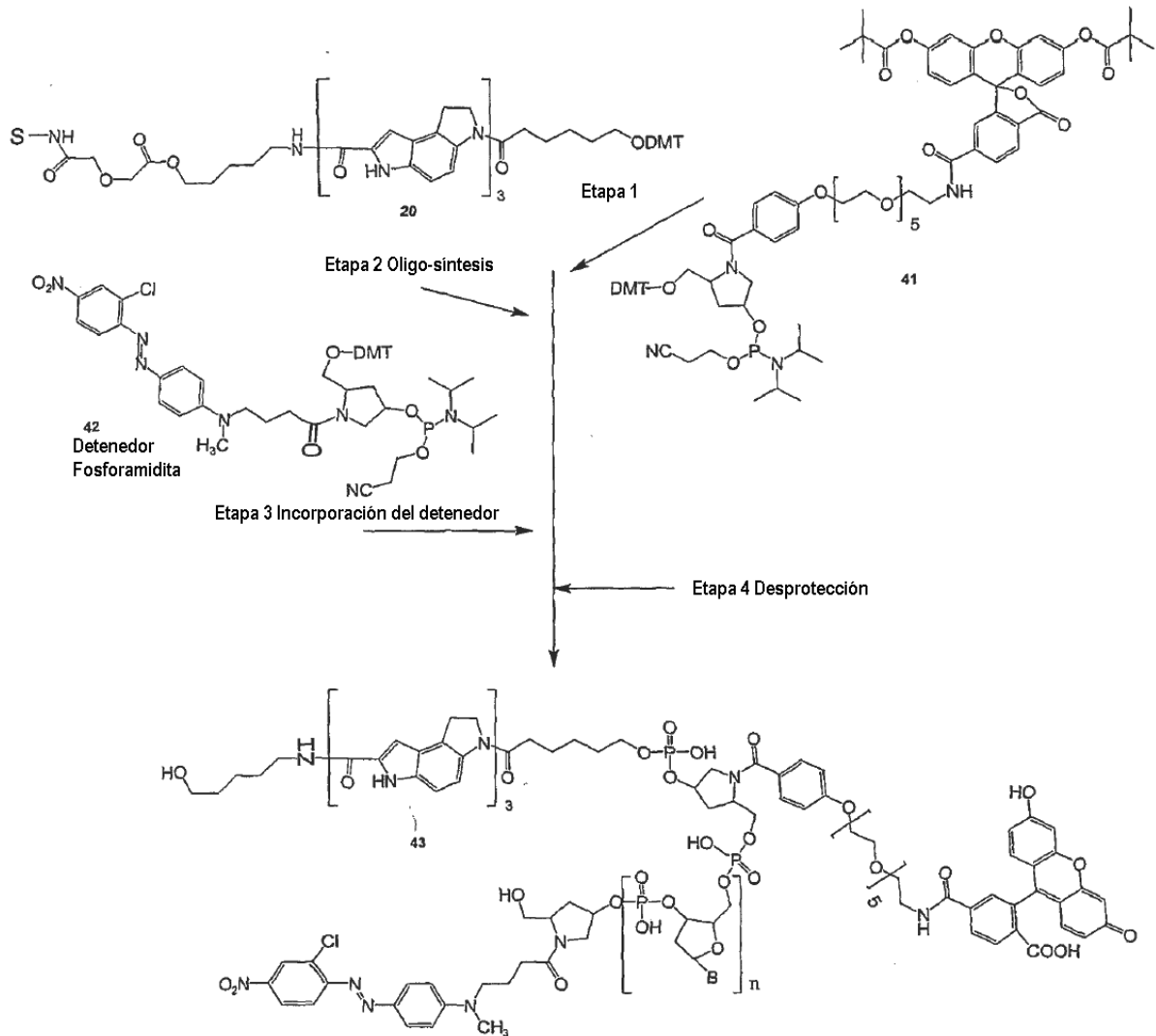
Esquema de Reacción 6

El esquema de reacción 7 ilustra la síntesis de fosforamidita fluorogénico preferido **41**. En la primera etapa se hace reaccionar 4-hidroxibenzoato de metilo con hexaetilén glicol en presencia de dietilazodicarboxilato y trifetilfosfina para proveer intermediario de hidroxí **32**. La reacción con cloruro de tosilo dio tosílato **33**. El tosílato se convirtió en azida **34** por reacción con azida de sodio. La reducción catalítica ( $\text{H}_2/\text{Pd}$  al 10% sobre carbono) produjo amina **35**. El compuesto **35** se trató con hidróxido de sodio para saponificar el grupo éster. El siguiente tratamiento con cloruro de Fmoc dio el ácido **36**. El ácido **36** se convirtió en éster de PFP **37** por reacción con PFP-TFA. El éster se hizo reaccionar con DMT-hidroxiprolinol (**38**) para dar el intermediario Fmoc **39**. El grupo amino de **39** fue liberado por tratamiento con DBU y después se hizo reaccionar con dipivaloilfluorescein-6-carboxilato de pentafluorofenilo para dar derivado hidroxí **40**. La conversión de **40** a la fosforamidita **41** sigue los métodos estándar para la introducción de una unidad estructural fosforamidita.



Esquema de reacción 7

El Esquema de Reacción 8 ilustra el ensamble paso a paso de un conjugado MB-FI-ODN-Q particularmente preferido 43 utilizando el soporte sólido 20, fosforamidita fluoresceína 41 y un Detenedor Eclipse fosforamidita 42 (disponible en Glen Research, Stirling, Virginia).



Esquema de Reacción 8

5 Todavía otros aspectos de la presente invención son los soportes sólidos derivados, detenedores, fluoróforos y ligadores del surco menor utilizados para ensamblar las sondas anteriormente descritas. En particular, son particularmente preferidos, aquellos componentes que tienen unidos grupos enlazantes (bien sea protegidos o no protegidos) y provistos típicamente como derivados de fosforamidita para uso en fase de solución o de ensamble en fase sólida (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 6,790,945, 6,084,102, WO 03/023357 y WO 01/64958).

Métodos de uso

En un aspecto relacionado, la presente invención provee métodos para la monitorización continua de amplificación de polinucleótidos, que comprende:

10 (a) combinar una muestra que contiene una secuencia objetivo, con uno o más cebadores de oligonucleótidos complementarios a las regiones de la secuencia objetivo, una enzima de polimerización, los sustratos de nucleótidos, y un conjugado de oligonucleótidos que tiene una fórmula:



5 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia que es complementaria a una porción de dicha secuencia objetivo que es amplificada, K es un enlace o un grupo enlazante, F1 es un fluoróforo, W es un grupo enlazante trivalente que provee suficiente espacio entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se une en el ligador del menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de F1 en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida del fluoróforo, más preferiblemente menos de 5%, todavía más preferiblemente menos de 2% y en las realizaciones más preferidas es menos de 1%; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida con dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de F1 es al menos 50% de su fluorescencia no detenida, más preferiblemente al menos 60%, todavía más preferiblemente al menos 80% y en las realizaciones más preferidas es de al menos 90%; para proveer una mezcla;

(b) incubar dicha mezcla en condiciones favorables para la amplificación de dicho polinucleótido; y

15 (c) monitorizar continuamente dicha amplificación mediante la monitorización de la fluorescencia producida tras la hibridación conjugada al objetivo amplificado. En algunas realizaciones preferidas, la porción de MB se selecciona del grupo que consiste de análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina. En otras realizaciones preferidas, la porción F1 es un fluoróforo que tiene una longitud de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, siendo seleccionado dicho fluoróforo del grupo que consiste en cumarinas, resorufinas, xantenos, benzoxantenos, cianinas, y análogos BODIPY. En todavía otras realizaciones preferidas, la porción Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo. En aún otras realizaciones preferidas, la porción de ODN de dicho conjugado es de 8-25 nucleótidos de longitud. En todavía otras realizaciones preferidas, la porción de ODN de dicho conjugado es de 8-15 nucleótidos de longitud y K es un enlazador que tiene una longitud de 10 a 50 átomos de la cadena principal seleccionada del grupo que consiste de C, O, N, S, P y Si.

25 Otro aspecto relacionado de la presente invención provee métodos para monitorizar la expresión del gen que comprende:

(a) proveer una disposición de sondas de oligonucleótidos de diferentes secuencias,

(b) incubar una población de polinucleótidos con la disposición bajo condiciones de hibridación, y

(c) determinar a cuál de las sondas de oligonucleótidos en la disposición hibrida la población;

en donde una o más de las sondas de oligonucleótidos es un conjugado de oligonucleótidos que tiene la fórmula:



35 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia que es complementaria a una porción de dicha secuencia objetivo que es amplificada, K es un enlace o un grupo enlazante, F1 es un fluoróforo, W es un grupo enlazante trivalente que provee suficiente espacio entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de F1 en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida del fluoróforo, más preferiblemente menos de 5%, aún más preferiblemente menos de 2% y en las realizaciones más preferidas es menos de 1%; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de F1 es al menos 50% de su fluorescencia no detenida, más preferiblemente al menos 60%, aún más preferiblemente al menos 80% y en las realizaciones más preferidas es de al menos 90%. En algunas realizaciones preferidas, la porción de MB es seleccionada del grupo que consiste de Análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina, dicha porción de F1 es un fluoróforo que tiene una emisión de longitud de onda de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, dicho fluoróforo es seleccionado del grupo que consiste de cumarinas, resorufinas, xantenos, benzoxantenos, cianinas y análogos BODIPY, y dicha porción de Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo. En otras realizaciones preferidas, los conjugados se unen a un soporte sólido.

En otro aspecto relacionado, la presente invención provee métodos para discriminar entre polinucleótidos que difieren por un nucleótido individual, comprendiendo el método:

50 (a) incubar por separado cada uno de al menos dos polinucleótidos con un conjugado de oligonucleótidos que tiene la fórmula:



5 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido  
 10 modificado que tiene una secuencia que es complementaria a una porción de dicha secuencia objetivo que es  
 15 amplificada, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo, W es un grupo enlazante trivalente que provee  
 espacio suficiente entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando  
 dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la  
 fluorescencia de F1 en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida del  
 fluoróforo, más preferiblemente menos de 5%, todavía más preferiblemente menos de 2% y en las realizaciones más  
 preferidas es menos de 1%; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo,  
 la fluorescencia de F1 es al menos 50% de su fluorescencia no detenida, más preferiblemente al menos 60%,  
 todavía más preferiblemente al menos 80% y en las realizaciones más preferidas es de al menos 90%, teniendo  
 dicho conjugado una secuencia definida bajo condiciones de hibridación, en donde uno de los polinucleótidos tiene  
 una secuencia objetivo que es perfectamente complementaria a dicho conjugado de oligonucleótidos y al menos otro  
 de los polinucleótidos tiene una secuencia objetivo que tiene una no coincidencia de un nucleótido individual con el  
 conjugado de oligonucleótidos; y

(b) determinar la fuerza de hibridación entre cada uno de los polinucleótidos y el conjugado de oligonucleótidos.  
 Como se describió anteriormente, ciertas realizaciones preferidas son aquellas en las que se selecciona la porción  
 de MB del grupo que consiste de análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina,  
 20 pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina, dicha porción de F1 es un  
 fluoróforo que tiene una emisión de longitud de onda de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm,  
 dicho fluoróforo es seleccionado del grupo que consiste de cumarinas, resorufinas, xantenos, benzoxantenos,  
 cianinas y análogos BODIPY, y dicha porción de Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de  
 colorantes mono azo y bis azo.

25 En todavía otro aspecto relacionado, la presente invención provee métodos para detectar una secuencia objetivo en  
 un polinucleótido, en donde el polinucleótido está presente en una mezcla de otros polinucleótidos, y en donde uno o  
 más de los otros polinucleótidos en la mezcla comprenden secuencias que están relacionados pero no idéntica a la  
 secuencia objetivo, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la mezcla de polinucleótidos con un conjugado de oligonucleótidos que tiene la fórmula:



30 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido  
 modificado, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo y W es un grupo enlazante trivalente que  
 provee suficiente espacio entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor  
 cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la  
 35 fluorescencia de F1 en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida del  
 fluoróforo, más preferiblemente menos de 5%, aún más preferiblemente menos de 2% y en las realizaciones más  
 preferidas es menos de 1%; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo,  
 la fluorescencia de F1 es al menos 50% de su fluorescencia no detenida, más preferiblemente al menos 60%,  
 todavía más preferiblemente al menos 80% y en las realizaciones más preferidas es de al menos 90%; y en donde el  
 40 conjugado forma un híbrido estable solamente con dicha secuencia objetivo que es perfectamente complementaria a  
 la porción de ODN de dicho conjugado, y el conjugado no forma un híbrido estable con cualquiera de los otros  
 polinucleótidos; y

(b) medir la fluorescencia producida en la formación de híbridos, con lo cual la formación de híbridos indica la  
 presencia de dicha secuencia objetivo. Las realizaciones preferidas incluyen las descritas anteriormente,  
 particularmente en donde la porción de MB se selecciona del grupo que consiste de análogos de CC1065,  
 45 lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de  
 pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina, dicha porción de F1 es un fluoróforo que tiene una emisión de longitud de onda  
 de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, dicho fluoróforo es seleccionado del grupo que consiste  
 de cumarinas, resorufinas, xantenos, benzoxantenos, cianinas y análogos BODIPY, y dicha porción de Q es un  
 miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo.

50 En todavía otro aspecto relacionado, la presente invención provee métodos para distinguir entre los polinucleótidos  
 objetivo de tipo silvestre, mutantes y heterocigotos, comprendiendo dicho método:



(a) poner en contacto una muestra que contiene un polinucleótido objetivo con dos sondas en donde una primera sonda es específica para dicho polinucleótido objetivo de tipo silvestre y una segunda sonda es específica para dicho polinucleótido objetivo mutante, cada una de dichas sondas que tienen una fórmula:



5 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es un enlace o un grupo enlazante, F1 es un fluoróforo, y W es un grupo enlazante trivalente que provee espacio suficiente entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de F1 en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida del fluoróforo, más preferiblemente menos de 5%, aún más preferiblemente menos de 2% y en las realizaciones más preferidas es menos de 1%; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de F1 es al menos 50% de su fluorescencia no detenida, más preferiblemente al menos 60%, todavía más preferiblemente al menos 80% y en las realizaciones más preferidas es de al menos 90%; y en donde el conjugado forma un híbrido estable solamente con dicha secuencia objetivo que es perfectamente complementaria a la porción de ODN de dicho conjugado, y el conjugado no forma un híbrido estable con cualquiera de los otros polinucleótidos; y

(b) medir la fluorescencia producida en la formación de híbridos, con lo cual la formación de híbridos indica la presencia o ausencia de cada uno de los polinucleótidos objetivo tipo silvestre, mutantes y heterocigotos. En este aspecto, las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) para cada híbrido producido entre dichas primera y segunda sondas y sus respectivos objetivos están preferiblemente dentro de aproximadamente 5°C uno del otro. En otras realizaciones seleccionadas, la porción de ODN de cada una de dichas sondas es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene de 8 a 18 bases o bases modificadas. Todavía más preferiblemente, la porción de ODN de cada una de dichas sondas es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene de 10 a 15 bases o bases modificadas. En otras realizaciones preferidas, las porciones de fluoróforo de cada una de dichas sondas se seleccionan del grupo que consiste de 5-FAM<sup>TM</sup>, 6-FAM<sup>TM</sup>, TET<sup>TM</sup>, JOE<sup>TM</sup>, HEX<sup>TM</sup>, VIC<sup>TM</sup>, NED<sup>TM</sup>, TAMRA<sup>TM</sup>, ROX<sup>TM</sup> y YY<sup>TM</sup>. En todavía otras realizaciones preferidas, la porción de ODN de cada una de dichas sondas contiene al menos una base modificada. En todavía otras realizaciones, la muestra se pone en contacto adicionalmente con un conjunto de cebadores bajo condiciones de amplificación y cada uno de dichos cebadores contiene de uno a diez bases modificadas seleccionadas de las descritas aquí.

30 Además de las realizaciones descritas anteriormente, los componentes preferidos (por ejemplo, MB, F1, W, ODN, K y Q) para uso en las sondas y los métodos citados son aquellos componentes que han sido descritos para las sondas y los conjugados de la invención. De acuerdo con lo anterior, las sondas y los componentes preferidos se proveen en, por ejemplo, la fórmula II, IIIa, IIIb, IVa, IVb y IVc.

## EJEMPLOS

35 Materiales y métodos

### Plantillas

Se obtuvieron ciento dos muestras de AND del Centre Etude Polymorphism Humaine (CEPH) de Coriell Institute of Medical Research (<http://locus.umdj.edu/>). Una lista de las plantillas utilizadas, está disponible en <http://snp500cancer.nci.nih.gov>.

40 Oligonucleótidos

Los cebadores PCR fueron sintetizados usando química de fosforamidita estándar. Las sondas MB-F1-5'-ODN-Q se prepararon por síntesis de ADN automatizada en un soporte de poliestireno modificado del ligador del surco menor (compuesto **20**, Esquema 4) usando fosforamiditas de 5'-β-cianoetilo (Glen Research, VA) diseñados para la síntesis de segmentos de oligonucleótidos en dirección 5'→3'. La síntesis de oligonucleótidos se realizó en un sintetizador ABI 3900 de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante utilizando una solución de yodo 0.02 M. Fosforamiditas de base modificada se sintetizaron con base en métodos divulgados previamente (WO 03022859 y WO 0164958). Las sondas MGB Eclipse se sintetizaron como se describió previamente (Afonina et al, Biotechniques, 32, 940-949 (2002)). Los colorantes que reportan 6-carboxifluoresceína (FAM), Yakima Yellow<sup>TM</sup> fueron introducidos en la última etapa de la síntesis de la sonda MB Eclipse utilizando las fosforamiditas correspondientes (Glen Research, Sterling, VA). Fosforamidita **41** se utilizó para la incorporación del grupo fluoresceína como se muestra en el Esquema de Reacción 8 en las sondas de la invención. El CPG del Detenedor Epoch Eclipse y 6-carboxifluoresceína (Glen Research, Stirling, Virginia) fueron utilizadas para la síntesis de Balizas

Moleculares. Fosforamiditas 5'DMT estándar se utilizaron para la síntesis de Balizas Moleculares. Todos los oligonucleótidos fueron purificados por HPLC en fase reversa.

La secuencia objetivo ARNT-01 muestra un polimorfismo [G/C], la sonda y cebadores designados se muestran en la Tabla 2

Tabla 2: Secuencia de sondas objetivo, cebadoras y fluorogénicas	
Porción de las secuencias objetivo de ARNT-01 ((SEQ ID NO:15); Sonda (SEQ ID NOS:16-19) y cebador se muestran en Negrita Subrayada. FAM es fluoresceína, YY es Yakima Yellow, Q es Detenedor Eclipse y MB es DPl <sub>3</sub>	
<p><u>GTGTGCTGCCAAACCA</u><b><u>TTCAGACTGTGGCTGTTCAAAA</u></b><u>CAGGAGTCACGGAGT</u><b><u>CAGA</u></b>  <u>IG/CJACATA</u><b><u>CACCCTGGCCTGTCTCACATGAGACAATAAA</u></b><u>CAGAAAGCCATCTGCT</u>  <u>GCCTCCAAGATCAAATG</u><b><u>TTTCAGTTCCTGGCCAA</u></b><u>AAAAAGAAATAGAA</u></p>	
Sondas Eclipse	Sondas nuevas
MB-Q-GTATGTCTCTGACTCC-FAM	MB-FAM-GTATGTCTCTGACTCC-Q
MB-Q-GTATGTCTCTGACTCC-YY	MB-YY-GTATGTCTCTGACTCC-Q

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se llevó a cabo bien sea en un instrumento ABI Prism® 7700 o un instrumento ABI Prism® 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se realizaron cincuenta ciclos de PCR en tres etapas (95°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 76°C durante 30 segundos) después de 2 minutos a 50°C y 2 minutos a 95°C. Las reacciones contenían sondas MB-F1-ODN-Q 0.25 µM o MB Eclipse™, cebador 100 nM complementario a la misma cadena como la sonda, cebador de cadena opuesto 1 µM, dATP 125 µM, dCTP 125 µM, TTP 125 µM, dUTP 250 µM, ADN polimerasa 0.25 U JumpStart (Sigma), 0.125U de AmpErasa Uracil *N*-glicosilasa (Applied Biosystems) en regulador de PCR IX (Tris-HCl 20 mM pH 8.7, NaCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) en una reacción de 10 µL. El incremento en la señal fluorescente se registró durante la etapa de hibridación de la reacción

10 **Ejemplo 1**

Este ejemplo demuestra la relación mejorada de señal con respecto a fondo para sondas de la invención en comparación con sondas MB Eclipse. Con el fin de hacer eso fueron medidas la señal de fluorescencia de sondas libres y sondas después de la hibridación con complementos sintéticos. Las secuencias de las sondas y los complementos sintéticos se muestran en la Figura 3. Los experimentos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse con excitación a bien sea 496 nm para FAM o a 530 nm para Yakima Yellow (YY) y una longitud de onda de emisión de éter de 518 nm para FAM o 550 nm para YY. Se utilizaron rendijas de excitación y de emisión de 5 nm. La fluorescencia de fondo se registró en una solución que contenía 0.1 µM de la sonda (bien sea MB Eclipse o la nueva sonda de la invención), NaCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.7. Para la formación dúplex se agregó 0.5 mM de complemento (concentración final). Antes de la medición de la fluorescencia de la reacción se precalentó a 60°C y luego se enfrió a 20°C.

**Ejemplo 2**

Este ejemplo ilustra la estabilidad mejorada de la fluorescencia de fondo (fluorescencia de la sonda no hibridada) de las sondas de la invención en comparación con las sondas MGB-Eclipse como una función de la temperatura (véase la Figura 4). Los experimentos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse equipado con una célula de temperatura controlada con excitación bien sea a 496 nm para FAM o a 530 nm para Yakima Yellow (YY) y una longitud de onda de emisión de éter de 518 nm para FAM o 550 nm para YY. Se utilizaron rendijas de excitación y de emisión de 5 nm. Las soluciones contenían 0.2 mM de sonda (bien sea MB Eclipse o la nueva sonda de la invención), NaCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.7.

Secuencias de sonda (SEQ ID NOS:20-23):

30 Eclipse #1 MB-Q-5'-CAGAGACATACA\*CCA-FAM (o YY)

Eclipse #2 MB-Q-5'-G\*TATGTCTCTGACTCC-FAM (o YY)

Nueva sonda #1 MB-FAM(o YY)-5'-G\*TCAGAG\*ACATACA\*CC-Q

Nueva sonda #2 MB-FAM(o YY)-5'-G\*TATGTCTCTGACTCC-Q

G\* es PPG, A\* es base modificada de hidroxibutiril-diaminopirazolopirimidina.

35 **Ejemplo 3**

Este ejemplo demuestra a) la capacidad de ligador del surco menor conjugado para detener la fluorescencia y b) mecanismo de detención de la fluorescencia concertada que involucra tanto el ligador del surco menor y el Detenedor Eclipse (véase la Figura 5). Las condiciones experimentales fueron como se describió en los Ejemplos 1 y 2.

40 Secuencias de sonda (SEQ IS NOS: 24 y 13):

Detenedora o no detenedora de MB-FAM-5'-G\*ATGTGTCCGTGTCTC

Secuencia de complemento (SEG ID NO:14):

3'-TACCTAACTACACAGGCACAGAGAAA

**Ejemplo 4**

45 Este ejemplo ilustra sensibilidad incrementada de la nueva sonda de la invención mediante la comparación de su desempeño de fusión a una sonda MGB-Eclipse a una concentración constante de sonda de  $2 \times 10^{-7}$  M, mientras que la concentración del complemento varió entre  $1 \times 10^{-7}$  y  $2.5 \times 10^{-10}$  M.

Las secuencias de sondas y complementos se muestran a continuación:

Secuencias de la nueva sonda y complementos (SEQ ID NOS: 24 y 14):

MB-FAM-gATGTGTCCGTGTCTC-Q	Nueva sonda
TACCTAAC---TACACAGGCACAGAGAAA	Complemento 1

Secuencias de la sonda MGB Eclipse y complemento (SEQ ID NOS: 25 y 14):

MB-Q-gATGTGTCCGTGTCTC-FAM	MGB Eclipse
TACCTAAC---TACACAGGCACAGAGAAA	Complemento 1

5

El análisis de fusión fluorogénico se realizó en regulador 1x PCR en un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse usando longitud de onda de excitación de 496 nm y una longitud de onda de emisión de 518 nm, con rendija de excitación de 5 nm y rendija de emisión de 5 nm. Diferentes dúplex de sonda/complemento se formaron en la concentración de la sonda constante de  $2 \times 10^{-7}$  M, mientras que la concentración de complemento varió entre  $1 \times 10^{-7}$  y  $2.5 \times 10^{-10}$  M. La comparación de la curva de fusión para el rendimiento de la nueva sonda de la invención y la sonda MB Eclipse se muestra en la Figura 8. Esta figura muestra un incremento sustancial en la sensibilidad basado en la comparación de la curva de fusión de los desempeños de estos dos tipos de sonda.

10

#### Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra la capacidad del ensayo de sonda de la invención para determinar el genotipo. Se determinó el genotipo a ciento dos muestras de ADN no relacionadas del Centre Etude Polymorphism Humaine (CEPH) para la presencia del alelo ARNT- 01 (G/C) en comparación con el MB Eclipse y la sonda de ensayos de la invención. Las sondas correspondientes específicas para cada no coincidencia se muestran en la Tabla 2. Cada muestra se analizó con las sondas específicas del objetivo de tipo silvestre y mutante en un ensayo de PCR descrito anteriormente. El análisis de genotipificación del gráfico de dispersión de punto final por PCR de las muestras de ADN se muestra en la Figura 9. El gráfico de dispersión del ensayo de la invención (Figura 9a) determina correctamente el genotipo de todas las muestras de ADN con una separación clara entre las de control sin plantilla, de tipo silvestre, heterocigotos y de ADN mutantes. En contraste, el ensayo MB Eclipse (Figura 9b), las muestras de control sin plantilla y de ADN heterocigoto no están claramente separadas.

15

20

#### Ejemplo 6

25 Comparación cinética de hibridación de sondas de la invención y balizas

Este ejemplo muestra que las sondas de la invención hibridan significativamente más rápido que las balizas moleculares a sus respectivos objetivos. La cinética de hibridación de nuevas sondas y balizas moleculares fueron investigadas con un accesorio espectrofotómetro de cinética rápida (Applied Photophysics, Surrey, GB) sobre un rango de temperatura (30-55°C). Las concentraciones de sonda y objetivo fueron  $1 \times 10^{-7}$  y  $2 \times 10^{-7}$  M, respectivamente. Las secuencias de las sondas y objetivo son (SEQ ID NOS: 26-28):

30

MB-FAM-gTCAGAgACATACaCC-Q (Sonda de la invención),

FAM-CGGCGGAGTCAGAGACATACACCAGCCG-Q (Sonda de baliza molecular) y

GCAGGGTGGTGTATGTCTCTGACTCCGTG (Complemento objetivo). Las secuencias madre están subrayadas y "a" y "g" son Súper A y Súper G, respectivamente.

35

Las sondas fueron diseñadas con  $T_m$ s similares contra la misma plantilla. Como se muestra en la tabla a continuación, la cinética de hibridación tal como es medida por las constantes de las ratas de reacción de las sondas Pleiades fue sustancialmente más rápida que la de las balizas moleculares en todas las temperaturas investigadas. A los 45 y 55°C la sonda de la cinética de reacción de la invención fue de aproximadamente 5 y 3 veces más rápida que la de la Baliza Molecular.

40

	Sonda de la invención (P)	Baliza Molecular (M)	
Temperatura °C	Constante de la rata de reacción		Relación de la Rata de Reacción P/M
	L*Mol <sup>-1</sup> *sec. <sup>-1</sup>	L*Mol <sup>-1</sup> *sec. <sup>-1</sup>	
30	0.41x10 <sup>5</sup>	0.10x10 <sup>5</sup>	4.05
40	1.61x10 <sup>5</sup>	0.27x10 <sup>5</sup>	6.00
45	2.84x10 <sup>5</sup>	0.54x10 <sup>5</sup>	5.27
50	4.35 x10 <sup>5</sup>	1.00x10 <sup>5</sup>	4.347
55	6.51x10 <sup>5</sup>	2.45x10 <sup>5</sup>	2.66

### Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la síntesis del soporte sólido activado de PFP 7

#### 5 4-clorobutirato de tert-Butilo

Una mezcla de cloruro de 4-clorobutirilo (93 g, 0.66 mol), N,N-dimetilanilina (80 g, 0.66 mol) y tert-butanol (0.66 mol) en etil éter (100 mL) se sometió a reflujo durante 5 horas. La reacción se enfrió, se diluyó con éter y se lavó con agua, ácido cítrico al 10%, NaCl saturado y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El producto crudo obtenido después de la evaporación del solvente se destiló bajo vacío (10 mmHg). Se recogió el producto crudo (79 g, 67%) hirviendo a 57-58°C. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3,64 (t, J = 7 Hz, 2H), 2,35 (t, J = 7 Hz, 2H), 1,93 (q, 2H), 1,41 (s, 9H).

#### 3-[(tert-Butil)oxycarbonil]propil fenilmetil butano-1,4-dioato 3

Una solución de 4-clorobutirato de tert-butilo (8.9 g, 50 mmol) y monobencilsuccinato de cesio (preparado a partir de succinato de monobencilo y CsOH) (50 mmol) en 100 mL de DMF se calentó a 80°C durante 2 días. El DMF se evaporó y se sometió a cromatografía sobre sílica (hexano-acetato de etilo) para dar 2.5 g (14%) del compuesto del título 3 como un líquido incoloro. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.35 (s, 5H), 5.09 (s, 2H), 3.99 (t, J=7 Hz, 2H), 2.58 (m, 4H), 2.25 (t, J=7 Hz, 2H), 1.93 (q, 2H), 1.41 (s, 9H).

#### 3-[(tert-Butil)oxycarbonil]propil 2,3,4,5,6-pentafluorofenil butano-1,4-dioato 4

El compuesto 3 (2.0 g, 5.7 mmol) se hidrogenó durante 20 horas a 40 psi en THF (100 mL) en la presencia de 0.2 g de 10% de Pd/C. El catalizador se eliminó por filtración a través de Celite y el filtrado se concentró. El ácido se disolvió en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro. Se agregó diisopropiletilamina ((0.88 g, 6.8 mmol) seguido por trifluoroacetato de pentafluorofenilo (1.9 g, 6.8 mmol) Después de haber sido mantenido a temperatura ambiente durante 1 hora el solvente se evaporó y el residuo se sometió a cromatografía sobre sílica (acetato de etilo-hexano) para dar 2.2 g (91%) de 4 como líquido viscoso. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.05 (t, J=6 Hz, 2H), 3.04 (t, J=6 Hz, 2H), 2.72 (t, J=6 Hz, 2H), 2.26 (t, J=7 Hz, 2H), 1.78 (q, 2H), 1.38 (s, 9H).

#### 25 Preparación de soporte sólido activado de PFP 7

Se agregó CPG de alquilamina de cadena larga (LCAA) (5.0 g, 500 A, 124 umol/g) a una solución de 4 (0.53 g, 1.24 mmol) y diisopropiletilamina (1 mL) en 25 mL de DMF. El CPG se hizo rotar formando remolino durante 30 horas. Se agregaron piridina (10 mL) y anhídrido acético (5 mL) y el CPG se removió durante 1 h. El CPG se lavó con DMF y éter. El secado al vacío produjo 5.

30 El CPG 5 (5.0 g) se suspendió en 25 mL de TFA. Después de haberse hecho rotar formando remolino durante 1 hora se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El secado produjo CPG 6.

El soporte 6 (5.0 g) se suspendió en 25 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro y se trató con diisopropiletilamina (2 mL) y PFP-TFA (1 mL). El soporte se hizo rotar formando remolino durante 1 hora. El exceso de reactivos y subproductos se eliminaron por filtración y se lavaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El secado produjo CPG activado por PFP 7.

#### 35 Ejemplo 8

Ácido 3-[(Fluoren-9-ilmetil)oxicarbonil]pirrolo[3,2-e]indolina-7-carboxílico 9

- 5 El ácido 3-(tert-Butiloxicarbonil)pirrolo[3,2-e]indolina-7-carboxílico 8 (Boger et. al, J. Org. Chem. 52:1521 (1987)) (0.76 g, 2.4 mmol) se desprotegió por un tratamiento con 5 mL de TFA durante 1 hora. El TFA se evaporó y el trifluoroacetato resultante se disolvió en una mezcla de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 11% (10 mL) y 5 mL de THF. Se agregó cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (0.75 g, 2.9 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 h. La reacción se diluyó con agua (200 mL) y se extrajo con dietil éter (2x50 mL). La fase acuosa se acidificó mediante la adición de HCl 1 N a pH 1-2. El producto precipitado se recogió por centrifugación, se lavó con agua y se secó bajo vacío para producir 0.86 g (83%) de 9 como un sólido amarillo-gris.

3-[(fluoren-9-ilmetil)oxicarbonil]pirrolo[4,5-e]indolina-7-carboxilato de 2,3,4,5,6-Pentafluorofenilo 10

- 10 Se agregó trifluoroacetato de pentafluorofenilo (0.3 mL, 1.75 mmol) a una solución de ácido 9 (0.3 g, 0.7 mmol) y trietilamina (0.3 mL, 2.1 mmol) en 4 mL de DMF anhidro. Después de 1 hora DMF se evaporó y el residuo se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con acetona al 2% en cloruro de metileno. La concentración de la fracción de producto puro y secado produjo 0.29 g (70%) de éster de PFP 10 como un sólido amarillo.

Síntesis del compuesto 11

- 15 Una solución de 10 (1.2 g, 2.0 mmol) y mono-O-DMT-4-aminobutiril-1,3-propanodiol (véase, la Patente de los Estados Unidos No. 5,942,610) (1.2 g (2.66 mmol) en 20 mL de piridina se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas. La reacción se concentró redisolta en acetato de etilo, se lavó con NaCl saturado y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. el producto crudo se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con acetato de etilo. la evaporación del solvente produjo 1.6 g (93%) de compuesto deseado 11.

20 **Ejemplo 9**

Este ejemplo ilustra la preparación del soporte sólido 20

3-[6-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]hexanoil]pirrolo[4,5-e]indolina-7-carboxilato de metilo 15

- 25 Una solución de pirrolo[4,5-e]indolina-7-carboxilato de metilo (2.7 g, 12.5 mmol) preparada de acuerdo con Boger et al (J. Org. Chem. 52:1521 (1987)), 4-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]hexanoato de 4-nitrofenilo (6.9 g, 12.5 mmol) y trietilamina (2 mL) en 50 mL de DMF anhidro se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y luego se concentró. El aceite resultante se dejó a temperatura ambiente durante la noche (~15 h). El aceite se sometió a partición entre acetato de etilo y bicarbonato de sodio al 5%. La fase orgánica se lavó dos veces con bicarbonato de sodio diluido, cloruro de sodio saturado y se secó sobre sulfato de sodio. El producto crudo obtenido después de la eliminación del solvente se cristalizó a partir de acetato de etilo. El rendimiento del producto cristalino 15 fue 5.9 g (75%). <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.94 (s, 1H), 8.24 (d, J=9 Hz, 1H), 7.4-7.2 (m, 10H), 7.07 (s, 1H), 6.87 (d, J=9 Hz, 4H), 4.16 (t, J=8 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.72 (s, 6H), 3.28 (t, J=8 Hz, 2H), 2.96 (t, J=6 Hz, 2H), 2.42 (t, J=7 Hz, 2H), 1.58 (m, 4H), 1.41 (m, 2H).

3-[6-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]hexanoil]pirrolo[4,5-e]indolina-7-carboxilato de 2,3,4,5,6-pentafluorofenilo 16

- 35 Una mezcla de 15 (3.2 g, 5.06 mmol), monohidrato de hidróxido de litio (0.6 g, 14.3 mmol) MeOH (10 mL), THF (20 mL) y agua (10 mL) se agitó a 45°C durante 12 horas y se concentró. El residuo se sometió a partición entre ácido cítrico al 10% frío y acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con NaCl saturado, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se trató con 5 mL de trietilamina y se concentró para proveer 3.7 g de un material sólido. El sólido se coevaporó con DMF (2x50 mL) para eliminar el agua residual y se redisolvió en 40 mL de DMF anhidro. Se agregó diisopropiletilamina (1,5 mL) seguido de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (PFP-TFA) (0.9 mL, 5.2 mmol). Después de ser mantenido a temperatura ambiente durante la noche la reacción se concentró y se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con hexano-acetato de etilo 1:1. La concentración de las fracciones de producto puro y el secado *in vacuo* produjeron 2.5 g de 16 (69%) del compuesto del título como un sólido amorfo, amarillo pálido. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.45 (s, 1H), 8.36 (d, J=9 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.4-7.2 (m, 10H), 6.87 (d, J=9 Hz, 4H), 4.20 (t, J=8 Hz, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.34 (t, J=8 Hz, 2H), 2.97 (t, J=6 Hz, 2H), 2.44 (t, J=7 Hz, 2H), 1.59 (m, 4H), 1.42 (m, 2H).

- 45 2-(4-3-({3-([3-6-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]hexanoil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-il)carbonil}pirrolo[4,5-e]indolin-7-il)carbonil)pirrolo[4,5-e]indolin-7-carboxilato de Nitrofenil)etilo 18

- 50 A una solución de trifluoroacetato 3-(pirrolo[4,5-e]indolin-7-ilcarbonil)pirrolo[4,5-e]indolina-7-carboxilato de 2-(4-nitrofenil)etilo 17 (DPI<sub>2</sub> NPE éster, Publicación de la Patente de los Estados Unidos 20020034754) (0.91 g, 1.4 mmol) y diisopropiletilamina (0.49 mL, 2.8 mmol) en 10 mL de DMF anhidro se agregó PFP éster 16 (1.1 g, 1.4 mmol). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas para dar una suspensión espesa del producto precipitado. Se agregó metanol (50 mL) y el producto precipitado se recogió por filtración y se lavó con metanol y éter. El secado bajo vacío produjo 1.45 g (91%) del compuesto 18 como un sólido de color blancuzco. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.99 (s, 1H), 11.78 (s, 1H), 11.70 (s, 1H), 8.4-8.1 (m, 5H), 7.67 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.5-7.2 (m,

12H), 7.09 (s, 2H), 7.01 (s, 1H), 6.88 (d, J=9 Hz, 4H), 4.6 (m, 6H), 4.16 (t, J=7.5 Hz, 2H), 3.73 (s, 6H), 3.43 (m, 4H), 3.31 (t, J=8 Hz, 2H), 3.23 (t, J=6 Hz, 2H), 2.97 (t, J=6 Hz, 2H), 2.41 (t, J=6 Hz, 2H), 1.59 (m, 4H), 1.41 (m, 2H).

3-({3-[(3-(6-[bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]hexanoil)pirrolo[4,5-e]indolin-7-il)carbonil]pirrolo[4,5-e]indolin-7-il)carbonil)pirrolo[4,5-e]indolino-7-carboxilato de pentafluorofenilo **19**

5 Nitrofeniletil éster **18** (1.39 g, 1.22 mol) se desprotegió por tratamiento con 6.6 mmol de DBU en 20 mL de DMF anhidro durante 2 horas a 50°C. El DMF se evaporó y el residuo se trituró con metanol. El material insoluble se recogió por filtración, se lavó con metanol y se secó bajo vacío durante la noche. El sólido se redisolvió en 20 mL de DMF y se trató con diisopropiletilamina (1.5 mL, 8.6 mmol) y trifluoroacetato de pentafluorofenilo (1.0 mL, 5.8 mmol).  
10 Después de ser agitada a temperatura ambiente durante 2 horas el DMF se evaporó y el residuo se trituró con metanol. El producto precipitado se recogió por filtración, se lavó con metanol y se secó bajo vacío para producir 1.41 g (100%) del PFP éster deseado **19** como un sólido amarillo. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.54 (s, 1H), 11.80 (s, 1H), 11.70 (s, 1H), 8.43 (d, J=9 Hz, 1H), 8.30 (m, 1H), 8.22 (d, J=9Hz, 1H), 7.558 (s, 1H), 7.5-7.2 (m, 12H), 7.09 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.87 (d, J=9 Hz, 4H), 4.6 (m, 4H), 4.11 (t, J=7 Hz, 2H), 3.73 (s, 6H), 3.43 (m, 4H), 3.28 (t, J=8 Hz, 2H), 2.97 (t, J=6 Hz, 2H), 2.37 (t, J=6 Hz, 2H), 1.57 (m, 4H), 1.40 (m, 2H).

15 El CPG de diglicolato de N-MMT-aminopentilo **22** se preparó por analogía con análogo de aminopropilo (solicitud de patente de los Estados Unidos 2002/0034754)

5-[(4-metoxifenil)difenilamino]pentan-1-ol

Una solución de cloruro de monometoxitriilo (7.7 g, 24.9 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) se agregó a través de un embudo de adición a una solución agitada, fría (hielo/agua) de 5-amino-1-pentanol (5.2 g, 50 mmol) en otros 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro. La mezcla se calentó hasta temperatura ambiente y se dejó reaccionar durante 1 hora. La reacción se diluyó con más CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se extrajo con agua. La fase orgánica se lavó con NaCl saturado y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El producto en bruto obtenido después de la evaporación del solvente se sometió a cromatografía sobre sílica (acetato de etilo-hexano) para dar 6.1 g de 5-[(4-metoxifenil)difenilamino]pentan-1-ol

Sal de trietilamonio del ácido 2-[(5-[(4-Metoxifenil)difenilmetil]amino)pentil]oxicarbonil]metoxi)acético **21**

25 3.0 g (8 mmol) del 5-[(4-metoxifenil)difenilamino]pentan-1-ol se disolvieron en 20 mL de cloruro de metileno con 1.3 mL (9.4 mmol) de trietilamina y 1.1 g (9.5 mmol) de anhídrido diglicólico. La mezcla se agitó durante la noche y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con cloruro de metileno al 93%, metanol al 5% y trietilamina al 3%. Las fracciones que contenían productos se combinaron y el solvente se evaporó. Las trazas de agua se eliminaron por coevaporación con DMF seco. Se supone que el rendimiento del producto fue de 100%.  
30 Se disolvió en 24 mL de DMF a ~0.33 M de concentración final M.

Síntesis de CPG de diglicolato de N-MMT-aminopentilo **22**.

10 g de LCAA-CPG se combinaron con 5 mL de una solución 0.33 M de **21** en DMF (1.66 mmol) en un matraz de fondo redondo de 100 mL. Se preparó una solución de 2.5 mL of diisopropiletilamina, 0.11 g (0.8 mmol) de HOBT y 0.63 g (1.66 mmol) de HBTU y se agregó al CPG. El CPG se hizo rotar formando remolino durante 16 horas en un agitador orbital (150 rpm). El CPG se filtró en un embudo de vidrio sinterizado y se lavó con DMF (2x100 mL), acetonitrilo (2x100 mL) y éter (2x100 mL). Después de ser secado in vacuo, los grupos amino que no reaccionaron se cubrieron tratando el GPC con 40 mL de piridina y 5 mL de anhídrido acético. Después de hacer rotar hasta formar remolino durante 2 horas, el CPG se filtró y se lavó como se describió anteriormente. Después de secar in vacuo durante la noche el CPG se analizó para carga de MMT mediante el tratamiento de 3-5 mg de CPG en 25 mL de 1:1 (ácido perclórico al 70%: metanol). La absorbancia del catión de MMT liberado se registró a 472 nm y se calculó la carga de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Carga de MMT (umol/g)} = A_{472\text{nm}} \times \text{volumen (mL)} \times 14.3 / \text{peso de CPG (mg)}$$

Soporte del ligando de MGB **20**

45 4 g de CPG de diglicolato de N-MMT-aminopentilo **22** se pesaron en un embudo de vidrio sinterizado de porosidad media. El CPG fue destilado por tratamiento con 25 mL de 3% de TCA/DCM. Después de agitar brevemente con una espátula, la mezcla se hizo reaccionar durante 5 minutos antes de la filtración (se volvió amarilla). El proceso se repitió 4 veces hasta que el filtrado fue incoloro. El CPG se lavó con 4x 40 mL de cloruro de metileno. El filtrado se descartó a los residuos orgánicos, y el CPG se neutralizó mediante tratamiento con 40 mL de 20% de trietilamina en acetonitrilo. Después de agitar brevemente con una espátula, la mezcla se filtró y se lavó con 2 x 40 mL de acetonitrilo, y 2x 40 mL de éter. Las trazas de éter se eliminaron in vacuo (bomba de aceite). El CPG destilado se usó inmediatamente para la siguiente reacción de inmovilización.



El PFP éster MGB **19** (0.20 g, 180 mmol) se agitó con 12 mL de DMSO seco. Después de 15 minutos, se agregó la solución a 4 g de CPG de diglicolato destritolado (en un matraz de fondo redondo de 50 mL). Se agregaron dos mL de trietilamina y la mezcla se detuvo y se hizo rotar formando remolino en un mezclador orbital durante 14 horas. El CPG se filtró y se lavó con 2x 50 mL de DMSO, 2x 50 mL de acetonitrilo, y 2x 50 mL de éter. Las trazas de éter se eliminaron in vacuo (bomba de aceite). Grupos amino que no reaccionaron fueron acetiladas mediante el tratamiento del GPC con 10 mL de piridina seca, 1 mL de 1-metilimidazol y 1 mL de anhídrido acético. Después de hacer rotar formando remolino durante 1 hora, el CPG se filtró y se lavó con 2x 50 mL de DMF, 2x 50 mL de acetonitrilo, y 2x 50 mL de éter. Las trazas de éter se eliminaron in vacuo (bomba de aceite). El CPG se analizó para la carga de DMT mediante el tratamiento de 3-5 mg de CPG en 25 mL de 70% de ácido perclórico/metanol 1:1. La absorbancia del catión de DMT liberado se registró a 498 nm y el nivel de carga se calculó en 45 µmol/g de CPG usando la ecuación:

$$\text{Carga de DMT } (\mu\text{mol/g}) = A_{498} \times \text{volumen (en mL)} \times 14.3 \div \text{peso de CPG (mg)}$$

### Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra la preparación de fosforamidita **31**

5-{2-[2-(2-[2-(2-hidroxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi}-3-(metoxicarbonil)benzoato de metilo **23**

Se agregó dietilazodicarboxilato (22.7 g, 130 mmol) durante 3 minutos a una solución agitada de 5-hidroxiisofthalato de dimetilo (21 g, 100 mmol), hexaetilen glicol (32 g, 113 mmol) y trifetilfosfina (34 g, 130 mmol) en 250 mL de THF anhidro. Después de 2 horas la reacción se concentró y el residuo se suspendió en 200 mL de etil éter. Después de ser enfriada a 0°C durante 30 minutos el óxido de trifetilfosfina precipitado se retiró por filtración y el filtrado se concentró. La mezcla resultante se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo, primero, con acetato de etilo para separar PH<sub>3</sub>PO y subproducto de hexaetilenglicol bis-sustituido simétrico y, segundo, con MeOH al 5% en acetato de etilo para eluir el derivado de hexaetilen glicol monosustituido deseado. La evaporación del solvente y el secado bajo alto vacío proveyeron 14.8 g (31%) del compuesto del título como un aceite viscoso. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.08 (s, 1H), 7.70 (s, 2H), 4.58 (t, J= 5.5 Hz, 1H), 4.25 (m, 2H), 3.90 (s, 6H), 3.76 (m, 2H), 3.60 (m, 2H), 3.51 (m, 16H), 3.40 (m, 2H).

5-{2-[2-(2-[2-(2-azido)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi}-3-(metoxicarbonil)benzoato de metilo (**25**)

Se agregó cloruro de p-tolueno sulfonilo (7.1 g, 37.44 mmol) en una porción a una solución agitada, fría (baño de hielo/agua) de **23** (14.8 g, 31.2 mmol) en 100 mL de piridina anhidra. Después de ser mantenida a 0°C durante la noche la reacción se concentró a ~30 mL sin utilizar baño de calentamiento y se sometió a partición entre acetato de etilo (200 mL) y NaHSO<sub>4</sub> 3N (200 mL). La fase acuosa se lavó con una cantidad adicional de acetato de etilo (100 mL) y los lavados orgánicos combinados se lavaron con solución saturada de NaCl y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La concentración dio 17,8 g de tosilato crudo **24** en forma de aceite viscoso. Este producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Se agregó azida de sodio (4.0 g, 61.5 mmol) a una solución de tosilato crudo **24** (17.8 g, 28.3 mmol) en 220 mL de DMF anhidro. La reacción se agitó a 50°C durante 5 horas. El solvente se evaporó y el material residual se sometió a partición entre agua (100 mL) y acetato de etilo (200 mL). La fase orgánica se lavó con NaCl saturado y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El producto crudo obtenido después de la evaporación del solvente se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con acetato de etilo. Las fracciones que contenían el producto se concentraron y se secaron in vacuo para proveer 10.1 g (67%) de la azida deseada **25** como un aceite viscoso, incoloro. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.08 (s, 1H), 7.70 (s, 2H), 4.24 (t, J=4 Hz, 2H), 3.90 (s, 6H), 3.78 (t, J=4 Hz, 2H), 3.59 (t, J=5 Hz, 2H), 3.51 (m, 16H), 3.38 (t, J=5 Hz, 2H).

N-[2-(2-[2-(2-[2-[3,5-Bis(hidroximetil)fenoxi]etoxi)etoxi]etoxi)etil](fluoren-9-ilmetoxi)carboxamida (**27**)

Se suspendió hidruro de litio y aluminio (10.0 g, 263.5 mmol) en 250 mL de THF anhidro bajo atmósfera de argón en tres porciones. La suspensión se enfrió a 0°C (baño de hielo/agua) y se agregó lentamente una solución de azida **25** (10.1 g, 20.2 mmol) en 100 mL de THF seco (~ 5 minutos) con agitación. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se continuó la agitación durante otras 2 horas. El exceso de LiAlH<sub>4</sub> se detuvo mediante adición de agua gota a gota (muy lento al principio) (20 mL) y la mezcla de reacción se concentró para dar un material semisólido. El aminodiol deseado se aisló a partir de este material por extracción con 2-propanol y filtración. Los sólidos se lavaron con 2-propanol adicional hasta que no se detectó el producto en los lavados (4x200 mL). La concentración del extracto produjo aminodiol crudo **26** (8.2 g), que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una solución agitada, fría (baño de hielo/agua) de amina cruda **26** (8.2 g, 19.6 mmol) en 80 mL de DMF se agregó N,N-diisopropiletilamina (2.6 g, 20 mmol) seguido de cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (5.2 g, 20 mmol). La reacción se agitó a 0°C durante 30 minutos. La DMF se evaporó y el aceite resultante se sometió a partición entre acetato de etilo (300 mL) y agua (100 mL). La fase acuosa se lavó con acetato de etilo adicional. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron. La mezcla se sometió a

5 cromatografía sobre sílica eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seguido de 2.5% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y, finalmente, con 10% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La concentración de las fracciones de producto puro produjo 9.25 g (72%) del compuesto **27** como un jarabe viscoso, incoloro. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.89 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.70 (d, J=7.2 Hz, 2H), 7.42 (t, J=7.4 Hz, 2H), 7.33 (t, J=7.1 Hz, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.75 (s, 2H), 5.16 (t, J=5.8 Hz, 2H), 4.45 (d, J=5.8 Hz, 4H), 4.30 (m, 2H), 4.22 (m, 1H), 4.06 (t, J=4 Hz, 2H), 3.72 (t, J=4.7 Hz, 2H), 3.5 (m, 16H), 3.41 (t, J=6.3 Hz, 2H), 3.15 (m, 2H).

N-(2-{2-[2-(2-[2-(5-[[Bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-3-(hidroximetil)fenoxi]etoxi]etoxi)etoxi]etoxi]etil)(fluoren-9-ilmetoxi)carboxamida (**28**)

10 Se agregó cloruro de dimetoxitritilo (6.66 g, 19.6 mmol) en una porción a una solución agitada, fría (baño de hielo/agua) de diol **27** (12.6 g, 19.7 mmol) en 175 mL de piridina anhidra. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 15 horas la reacción se concentró y se sometió a partición entre acetato de etilo y ácido cítrico al 10% frío. La fase orgánica se lavó con NaCl saturado y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El deseado mono-DMT diol sustituido **28** se aisló de la mezcla por purificación en columna de sílica gel eluyendo con un gradiente de MeOH (de 0 a 10%) en acetato de etilo. La concentración de las fracciones de producto puro y el secado bajo vacío dieron 8.0 g (43%) del compuesto del título **28** como un jarabe muy viscoso. 15 <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.89 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.69 (d, J=7.2 Hz, 2H), 7.5-7.2 (m, 13H), 6.92 (d, J=8.8 Hz, 4H), 6.89 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.19 (t, J=6 Hz, 1H), 4.47 (d, J=6 Hz, 2H), 4.29 (m, 2H), 4.21 (m, 1H), 4.05 (m, 4H), 3.74 (s+m, 8H), 3.5 (m, 16H), 3.41 (t, J=6.3 Hz, 2H), 3.14 (m, 2H).

20 5-[N-(2-{2-[2-(2-[2-(5-[[Bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-3-(hidroximetil)fenoxi]etoxi]etoxi)etoxi]etoxi]etil)carbamoi]-15-(2,2-dimetilpropanoiloxi)-1-oxospiro[3-hidroisobenzofuran-3,9'-xanteno]-12-il 2,2-dimetilpropanoato (**30**)

25 Se agregó DBU (3 mL, 20 mmol) a una solución en agitación de monoDMT-aminodiol protegido por Fmoc **28** en 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro. Después de ser agitado durante 30 minutos la mezcla de reacción se concentró y se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con, primero, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para separar el grupo protector y, segundo, con 10:5:85 (MeOH:Et<sub>3</sub>N:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para eluir el producto deseado. El solvente se evaporó y el residuo se secó bajo vacío para dar la amina **29** como un aceite viscoso.

30 Una solución de la amina **29** (2 mmol) y trietilamina (2 mmol) 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se agregó a una solución agitada, fría (0°C) de dipivaloilfluorescein-6-carboxilato de pentafluorofenilo (NUCLEOSIDE & NUCLEOTIDES (1997) 16(1&2), 107-114) en 10 mL de THF anhidro. Después ser agitada a 0°C durante 3 horas, los solventes se evaporaron y el residuo se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con un gradiente de MeOH (de 0 a 5%) en acetato de etilo. Las fracciones de producto puro se concentraron y se secaron para dar **30** (2.1 g, 85%) como un sólido amorfo incoloro. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.76 (t, J=5 Hz, 1H), 8.22 (d, J=8 Hz, 1H), 8.16 (d, J=8 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.30 (m, 9H), 6.95 (m, 9H), 6.80 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.20 (t, J=6 Hz, 1H), 4.47 (d, J=6 Hz, 2H), 4.05 (m, 4H), 3.74 (s+m, 8H), 3.6-3.3 (m, 20H), 1.31 (s, 18H).

35 5-{N-[2-(2-[2-(2-[2-[5-[[Bis(4-metoxifenil)fenilmetoxi]metil]-3-[[bis(metiletil)amino](2-cianoetoxi)fosfinoxi]metil)fenoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etil)carbamoi]-15-(2,2-dimetilpropanoiloxi)-1-oxospiro[3-hidroisobenzofuran-3,9'-xanteno]-12-il 2,2-dimetilpropanoate (**31**)

40 A una solución de **30** (2.1 g, 1.68 mmol) en 50 mL de aCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro se agregó tetrazolida de diisopropilamonio (0.43 g, 2.5 mmol) seguido por tetraisopropilfosfordiamidita de 2-cianoetilo (0.76 g, 2.5 mmol). La reacción se agitó durante la noche, se concentró y se sometió a cromatografía sobre sílica (prelavado con Et<sub>3</sub>N + EtOAc), eluyendo con acetato de etilo. La concentración de las fracciones de producto puro y el secado bajo alto vacío dieron 1.8 g (75%) de **31** como un sólido amorfo incoloro. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.76 (t, J=5 Hz, 1H), 8.22 (d, J=8 Hz, 1H), 8.15 (d, J=8 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.30 (m, 9H), 6.95 (m, 9H), 6.80 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.66 (m, 2H), 4.03 (m, 4H), 3.74 (s+m, 8H), 3.6-3.3 (m, 24H), 2.75 (t, J=6 Hz, 2H), 1.29 (s, 18H), 1.14 (t, J=7 Hz, 12); 31P NMR δ 148 (s).

### Ejemplo 11

Este ejemplo ilustra la preparación de fosforamidita **41**

Síntesis de compuesto **32**

50 Se agregó gota a gota dietilazodicarboxilato (DEAD) (20.5 mL, 0.13 mol) a una solución agitada de 4-hidroxibenzoato de metilo (15.2 g, 0.1 mol), hexa(etilenglicol) (32 g, 0.11 mol) y trifenilfosfina (34 g, 0.13 mol) en 200 mL de THF anhidro. Después de agitarse durante 2 horas la reacción se concentró y el residuo se suspendió en éter (200 mL) para precipitar óxido de trifenilfosfina. La suspensión se enfrió y el sólido se filtró. El filtrado se concentró y el aceite resultante se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con un gradiente de metanol (0-5%) en acetato de etilo. La concentración de la fracción de producto puro y el secado bajo vacío dieron 11.9 g (29%) de **32** como un

jarabe incoloro.  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.89 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.05 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 4.58 (t,  $J=5.5$  Hz, 1H), 4.17 (t,  $J=4.5$  Hz, 2H), 3.76 (t,  $J=4.5$  Hz, 2H), 3.65-3.35 (m, 20H).

#### Síntesis de compuesto 33

5 El compuesto **32** (12,9 g, 31,2 mmol) se secó por coevaporación con piridina anhidra (2x100 mL), se disolvió en 100 mL de piridina anhidra y se enfrió a 0-3°C (baño de agua-hielo). A esta solución con agitación se agregó cloruro de p-toluenosulfónico (7.1 g, 37.44 mmol) en una porción. La reacción se agitó a 0°C durante 16 horas y se concentró manteniendo el matraz de concentración frío (0-20 ° C). El residuo se sometió a partición entre acetato de etilo (200 mL) y  $\text{NaHSO}_4$  3N (200 mL). La fase orgánica se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado, NaCl y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . La concentración dio 16.1 g del tosilato deseado 33. Este material era suficientemente puro para ser utilizado en la  
10 siguiente reacción sin purificación adicional.

#### Síntesis de compuesto 34

15 La azida de sodio (4.0 g, 61.5 mmol) se agregó a una solución de **33** (16.1 g, 28.2 mmol) en 220 mL de DMF. La reacción se agitó a 50°C durante 5 horas. El solvente se evaporó y el residuo se sometió a partición entre agua (100 mL) y acetato de etilo (200 mL). La fase orgánica se lavó con NaCl saturado y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El material obtenido después de la evaporación del solvente se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con acetato de etilo. Las fracciones que contenían el producto se concentraron para dar 10.5 g (85%) de la azida 34 como un aceite incoloro, viscoso.

#### Síntesis de compuesto 35

20 Una solución de **34** (7.0 g, 15.9 mmol) en 250 mL de metanol se hidrogenó a 45 psi en la presencia de 0.5 g de Pd al 10% sobre carbono durante 1 hora. El catalizador se eliminó por filtración a través de Celita. La evaporación del solvente proveyó 6.55 g (99%) de la amina **35** como un aceite incoloro, viscoso.

#### Síntesis de compuesto 36

25 La amina **35** (6.5 g, 15.6 mmol) se disolvió en 32 mL de NaOH 1 N. Después de ser mantenido a temperatura ambiente durante 1 hora se agregaron 50 mL de agua y 15.6 mmol de  $\text{NaHCO}_3$ . La solución se enfrió a 0°C usando un baño de hielo- agua. A esta solución se agregó una solución de Fmoc-Cl (4.9 g, 18.7 mmol) en 50 mL de THF. La emulsión resultante se agitó a 0°C durante 2 horas, se concentró y se acidificó con HCl 1 N a pH 2. La mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con NaCl saturado y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . La concentración dio el jarabe viscoso que se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con un gradiente de MeOH (0-5%) en diclorometano. El rendimiento de ácido deseado **36** fue 9.1 g (93%).

#### 30 Síntesis de compuesto 37

35 A una solución de compuesto **36** (9.1 g, 14.6 mmol) y piridina (1.5 mL) en 150 mL de diclorometano anhidro se agregó 2.6 mL (15.1 mmol) de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (PFP-TFA). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 horas y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con acetato de etilo. La concentración de las fracciones de producto puro proveyeron 8.5 g (73%) de éster de PFP **37** como un aceite incoloro, viscoso.  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.10 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.87 (d,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.68 (d,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.40 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.31 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H), 7.18 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 4.25 (m, 5H), 3.77 (t,  $J=4.0$  Hz, 2H), 3.60-3.50 (m, 6H), 3.49 (s, 10H), 3.40 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H), 3.13 (m, 2H).

#### Síntesis de compuesto 39

40 Se preparó una solución de **37** (4.0 g, 5.06 mmol), piridina (0.5 mL), diisopropiletilamina (0.5 mL) y DMT-hidroxirolinol (**38**) (2.5 g, 5.6 mmol) (preparado a partir de N-Fmoc-hidroxirolina por reducción de  $\text{BH}_3$  seguido de protección de DMT del grupo hidroxilo primario) en 100 mL de diclorometano. La reacción se dejó proceder durante 50 horas hasta que casi no se encontró éster de PFP **37** por análisis de TLC (acetato de etilo). La solución se lavó con ácido cítrico al 10%, NaCl saturado y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El material obtenido después de la evaporación del solvente se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con un gradiente de metanol (0 a 5%) en diclorometano.  
45 La concentración de las fracciones de producto puro dio 4.7 g (90%) del compuesto deseado **39** como un sólido blanco, amorfo.

#### Síntesis de compuesto 40

50 Una solución de compuesto **39** (4.6 g, 4.4 mmol) en una mezcla de diclorometano (25 mL) y tietilamina (25 mL) se calentó a 50°C durante 24 horas. La reacción se concentró y se redisolvió en 60 mL de diclorometano anhidro. Se agregó diisopropiletilamina y la solución se enfrió a 0°C (baño de agua-hielo). A la solución fría se agregó en una porción dipivaloilfluorescein-6-carboxilato de pentafluorofenilo (2.9 g, 4.08 mmol). La reacción se agitó a 0°C durante 1 hora y se concentró. El material resultante se sometió a cromatografía sobre sílica eluyendo con un gradiente de

metanol (0 a 2,5%) en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se concentraron para dar 4.8 g (88%) de **40** como un sólido blanco, amorfo.

#### Síntesis de compuesto 41

- 5 A una solución de compuesto **40** (4.7 g, 3.5 mmol) en 80 mL de diclorometano anhidro se agregó 1.52 g de tetrazolida de diisopropilamonio seguido por tetraisopropilfosforodiamidita de 2-cianoetilo (2.35 g, 7.8 mmol). Después de agitar durante 3 horas, la reacción se concentró y se sometió a partición entre acetato de etilo y NaHCO<sub>3</sub> al 5%. La fase orgánica se lavó con NaCl saturado y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El material obtenido después de la evaporación del solvente se precipitó dos veces de pequeña cantidad de acetato de etilo en un gran volumen de hexano anhidro. La trituración con hexano, filtración y secado proveyeron 4.6 g (86%) de la fosforamidita deseada
- 10 **41** como un sólido blanco amorfo.

#### Listado de secuencias

- <110> Lokhov, Sergey Lukhtanov, Eugene Epoch Biosciences, Inc.
- <120> Sondas fluorescentes para la detección de ADN mediante hibridación con una sensibilidad mejorada y baja señal de fondo
- 15 <130> 17682A-008410PC
- <140> EP 04817540.0-2209
- <141> 2006-08-09
- <150> US 60/515,523
- <151> 2003-10-28
- 20 <150> WO PCT/US04/37981
- <151> 2004-10-27
- <160> 28
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- 25 <211> 15
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda enrollada aleatoriamente MB-F1-ODN-Q
- 30 <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (1)
- <223> a modificada por ligador del surco menor (MB, MGB)
- <220>
- 35 <221> base\_modificada
- <222> (15)
- <223> t modificada por detenedor Eclipse (Q)
- <400> 1

aatactgagc ttgct 15  
<210> 2  
<211> 29  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia objetivo  
<400> 2  
gtgcctcagt ctctgtatgt ggtgggacg 29  
10 <210> 3  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda MGB Eclipse  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (12)  
<223> n = 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (A\*, Súper A)  
20 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (15)  
<223> n = 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (A\*, Súper A)  
<400> 3  
25 cagagacata cncn 15  
<210> 4  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
30 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda nueva, Sonda Nueva #1  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (1)

- <223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G)  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (7)
- 5 <223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G)  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (14)  
 <223> n = 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (A\*, Súper A)
- 10 <400> 4  
 ntcaganaca tacncc 16  
 <210> 5  
 <211> 29  
 <212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia objetivo  
 <400> 5  
 gtcctcagc ctctgtatgt ggtgggacg 29
- 20 <210> 6  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>
- 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda MGB Eclipse  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (12)  
 <223> n = 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (A\*, Súper A)
- 30 <400> 6  
 cagacacata cncca 15  
 <210> 7  
 <211> 16  
 <212> ADN

- <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda nueva  
<220>
- 5 <221> base\_modificada  
<222> (1)  
<223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G)  
<400> 7  
ntcagacaca tacacc 16
- 10 <210> 8  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>
- 15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia objetivo  
<400> 8  
ccaccacata cagagactga ggcactg 27  
<210> 9  
<211> 16
- 20 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda Eclipse o nueva, Sonda Eclipse #2, Sonda nueva #2  
<220>
- 25 <221> base\_modificada  
<222> (1)  
<223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G)  
<400> 9  
ntatgtctct gactcc 16
- 30 <210> 10  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>

- <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia objetivo  
 <400> 10  
 ccaccacata cagagactga ggcactg 27  
 <210> 11
- 5 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda Eclipse o Sonda nueva
- 10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)  
 <223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G)  
 <220>
- 15 <221> base\_modificada  
 <222> (7)  
 <223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G)  
 <400> 11  
 ntatgtntct gactcc 16
- 20 <210> 12  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>
- 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda Eclipse #1  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (12)  
 <223> n = 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (A\*, Súper A)
- 30 <400> 12  
 cagagacata cncca 15  
 <210> 13  
 <211> 16  
 <212> ADN



- <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda MB-FI-ODN  
<220>
- 5 <221> base\_modificada  
<222> (1)  
<223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G)  
<400> 13  
natgtgtccg tgtctc 16
- 10 <210> 14  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>
- 15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: objetivo complementario, secuencia de complemento, Complemento 1  
<400> 14  
aaagagacac ggacacatca atccat 26  
<210> 15  
<211> 162
- 20 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: porción de secuencia objetivo de ARNT-01 con polimorfismo [G/C]  
<400> 15
- 25       gtgtgctgcc aaaccattca gactgtggct ggttcaaaac aggagtcacg gagtcagasa 60  
      catacaccac cctgcctgtc tcacatgaga caataaacag aaagccatct gctgcctcca 120  
      agatcaaatg tttcagttcc tgcgcaagaa aaagaatatag aa                   162
- <210> 16  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial:sonda fluorogénica Eclipse  
<220>

- <221> base\_modificada  
<222> (1)  
<223> g modificada por ligador del surco menor (MB) triamida dihidrociclopirroloindol (DPI-3) y detenedor Eclipse (Q)
- 5 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (16)  
<223> c modificada por 6-carboxifluoresceína (FAM)  
<400> 16
- 10 gtatgtctct gactcc 16  
<210> 17  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda fluorogénica Eclipse  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (1)
- 20 <223> g modificada por ligador del surco menor (MB) triamida dihidrociclopirroloindol (DPI-3) y detenedor Eclipse (Q)  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (16)
- 25 <223> c modificada por Yakima Yellow (YY)  
<400> 17  
gtatgtctct gactcc 16  
<210> 18  
<211> 16
- 30 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial:Sonda fluorogénica Nueva  
<220>
- 35 <221> base\_modificada

- <222> (1)  
<223> g modificada por ligador del surco menor (MB) triamida dihidrociclopirroloindol (DPI-3) y 6-carboxifluoresceína (FAM)  
<220>
- 5 <221> base\_modificada  
<222> (16)  
<223> c modificada por detenedor Eclipse (Q)  
<400> 18  
gtatgtctct gactcc 16
- 10 <210> 19  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>
- 15 <223> Descripción de Secuencia Artificial:Sonda fluorogénica Nueva  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (1)  
<223> g modificada por ligador del surco menor (MB) triamida dihidrociclopirroloindol (DPI-3) y Yakima Yellow (YY)
- 20 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (16)  
<223> c modificada por detenedor Eclipse (Q)  
<400> 19
- 25 gtatgtctct gactcc 16  
<210> 20  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial:Sonda Eclipse #1  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (1)

- <223> c modificada por ligador del surco menor (MB) y detenedor (Q)  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (12)
- 5 <223> n = 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (A\*, Súper A)  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (15)  
<223> a modificada por 6-carboxifluoresceína (FAM) o Yakima Yellow (YY)
- 10 <400> 20  
cagagacata cncca 15  
<210> 21  
<211> 16  
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial:Sonda Eclipse #2  
<220>  
<221> base\_modificada
- 20 <222> (1)  
<223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G) modificada por ligador del surco menor (MB) y detenedor (Q)  
<220>  
<221> estructura\_misc
- 25 <222> (16)  
<223> c modificada por 6-carboxifluoresceína (FAM) o Yakima Yellow (YY)  
<400> 21  
ntatgtctct gactcc 16  
<210> 22
- 30 <211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial:Sonda Nueva #1

- <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (1)
- 5 <223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G) modificada por ligador del surco menor (MB) y 6-carboxifluoresceina (FAM) o Yakima Yellow (YY)
- <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (7)
- <223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G)
- 10 <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (14)
- <223> n = 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (A\*, Súper A)
- <220>
- 15 <221> base\_modificada
- <222> (16)
- <223> c modificada por detenedor (Q)
- <400> 22
- ntcaganaca tacncc            16
- 20 <210> 23
- <211> 16
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial:Sonda Nueva #2
- <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (1)
- 30 <223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G) modificada por ligador del surco menor (MB) y 6-carboxifluoresceina (FAM) o Yakima Yellow (YY)
- <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (16)
- <223> c modificada por detenedor (Q)
- 35 <400> 23

- ntatgtctct gactcc 16  
<210> 24  
<211> 16  
<212> ADN
- 5 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia de la sonda con detenedor, sonda Nueva  
<220>  
<221> base\_modificada
- 10 <222> (1)  
<223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G) modificada por ligador del surco menor (MB) y 6-carboxifluoresceina (FAM)  
<220>  
<221> base\_modificada
- 15 <222> (16)  
<223> c modificada por Detenedor Eclipse (Q)  
<400> 24  
natgtgtccg tgtctc 16  
<210> 25
- 20 <211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial:Sonda MGB Eclipse
- 25 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (1)  
<223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G) modificada por ligador del surco menor (MB) y detenedor Eclipse (Q)
- 30 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (16)  
<223> c modificada por 6-carboxifluoresceina (FAM)  
<400> 25
- 35 natgtgtccg tgtctc 16

- <210> 26
- <211> 16
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial:sonda nueva
- <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (1)
- 10 <223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G) modificada por ligador del surco menor (MB) y 6-carboxifluoresceína (FAM)
- <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (7)
- 15 <223> n = 6-amino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4(5H)-ona (ppG, PPG, G\* o Súper G)
- <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (14)
- <223> n = 4-(4,6-diamino-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol (A\*, Súper A)
- 20 <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (16)
- <223> c modificada por detenedor (Q)
- <400> 26
- 25 ntcaganaca tacncc 16
- <210> 27
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial:sonda de Baliza Molecular
- <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (1)

<223> c modificada por 6-carboxifluoresceina (FAM)

<220>

<221> base\_modificada

<222> (27)

5 <223> g modificado por detenedor (Q)

<400> 27

cggcgagtca gagacataca ccagccg 27

<210> 28

<211> 29

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: complemento de objetivo

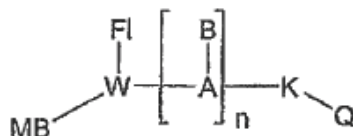
<400> 28

15 gcagggtggt gtatgtctct gactccgtg 29



REIVINDICACIONES

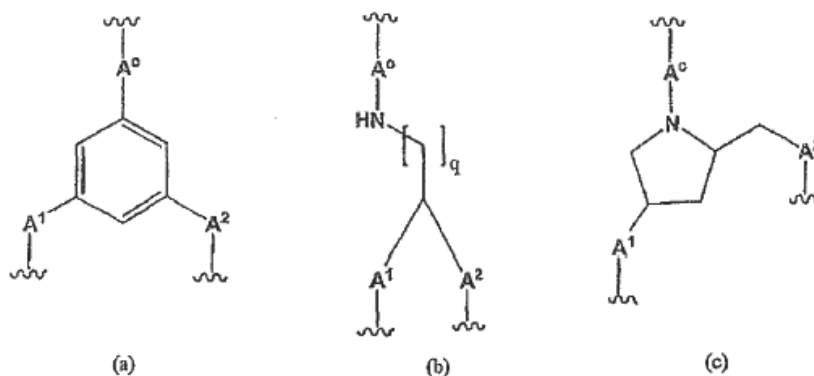
1. Una sonda de oligonucleótidos que comprende una porción de oligonucleótido que tiene un extremo 3' y un extremo 5', una unidad estructural de ligador del surco menor anexada a al menos una de dichas unidades de nucleótidos a través de un grupo enlazante el cual liga covalentemente la unidad estructural ligadora del surco menor al oligonucleótido y un fluoróforo y detenedor, teniendo dicha sonda la fórmula;



10 en donde MB es un ligador del surco menor; Q es un detenedor; Fl es un fluoróforo;  $[A-B]_n$  representa un oligómero de ácido nucleico que tienen n unidades, en donde n es un entero de 5 a 50; cada A representa independientemente un componente de esqueleto de ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de un esqueleto de fosfato de azúcar, un esqueleto modificado de fosfato de azúcar, una cadena principal de ácido nucleico bloqueado, un esqueleto peptídico o una variante del mismo usado en la preparación de ácido nucleico; y cada B representa independientemente una base de ácido nucleico, una base modificada o un análogo de base; y W es un grupo enlazante trivalente que provee suficiente espacio entre MB, Fl y  $[A-B]_n$  de tal forma que (i) MB se une a un surco menor dúplex formado cuando dicha sonda de oligonucleótidos se hibrida a su secuencia complementaria; (ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de Fl en dicha sonda de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y (iii) cuando dicha sonda de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de Fl es al menos 50% de su fluorescencia no detenida.

20 2. Una sonda de oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde W provee separación entre MB, Fl y  $[A-B]_n$  de tal manera que en una forma no hibridada, la fluorescencia de Fl en dicha sonda de oligonucleótidos es menos de 30% de la fluorescencia no detenida.

3. Una sonda de oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde W es un miembro seleccionado del grupo que consiste de:



25 en donde q es un entero de 0 a 8; y  $A^0$ ,  $A^1$  y  $A^2$  son cada uno grupos enlazantes que tiene de 1 a 50 átomos de la cadena principal con porciones seleccionadas del grupo que consiste de arilo, alquileo, alquileo sustituido, heteroalquileo, heteroalquileo sustituido y combinaciones de los mismos; y en donde las líneas onduladas indican los puntos de unión a MB, Q y  $[A-B]_n$ .

30 4. Una sonda de oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde n es un entero de 6 a 18, y dicha porción de  $[A-B]_n$  comprende al menos tres nucleótidos de guanina consecutivos en donde al menos una de las bases de nucleótidos de guanina es reemplazada por PPG.

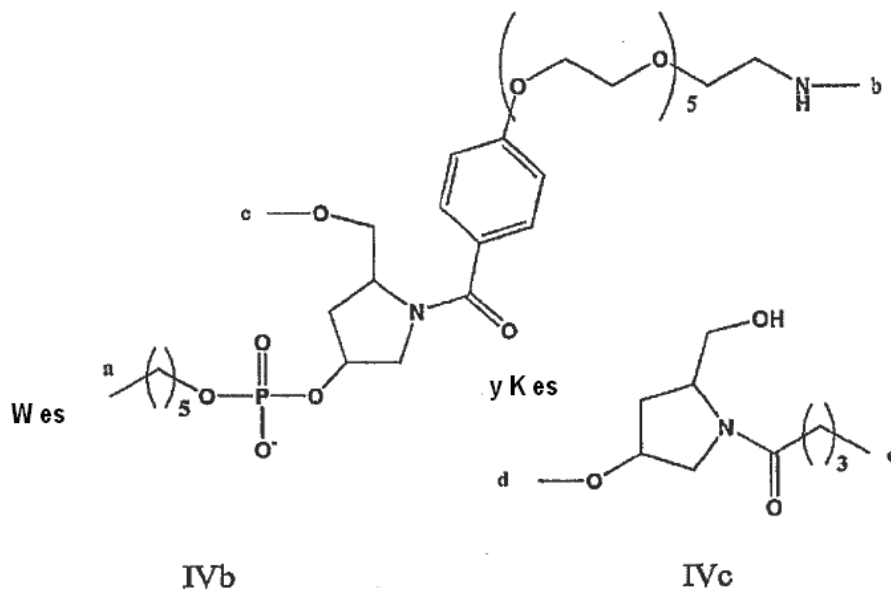
5. Una sonda de oligonucleótidos de la reivindicación 4, en donde dicha porción de  $[A-B]_n$  es un ADN, un ARN, quimera, un ANP o un ácido nucleico bloqueado.

35 6. Una sonda de oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde n es un entero de 6 a 18, siendo dicha sonda complementaria a una secuencia objetivo que tiene al menos 30% de bases de adenina y timina, en donde dicha sonda contiene al menos una base modificada suficiente para proveer un incremento de la estabilidad de la formación de dúplex de al menos 3°C, con relación a una sonda sin dicha al menos una base modificada.

7. Una sonda de oligonucleótidos de la reivindicación 6, en donde dicha porción [A-B]<sub>n</sub> es un ADN, un ARN, quimera, un ANP o un ácido nucleico bloqueado.

8. Una sonda de oligonucleótidos de la reivindicación 6, en donde dicha sonda es complementaria a una secuencia objetivo que tiene al menos 50% bases de adenina y timina, en donde dicha sonda contiene bases modificadas suficientes para proveer un incremento de la estabilidad de la formación de dúplex de al menos 5°C, con respecto a una sonda sin dichas bases modificadas.

9. Una sonda de oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde



10. Un método para la monitorización continua de amplificación de polinucleótidos, que comprende:

(a) combinar una muestra que contiene una secuencia objetivo, con uno o más cebadores de oligonucleótidos complementarios a las regiones de la secuencia objetivo, una enzima de polimerización, los sustratos de nucleótidos, y un conjugado de oligonucleótidos que tiene una fórmula:



15 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia que es complementaria a una porción de dicha secuencia objetivo que es amplificada, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo, W es un grupo enlazante trivalente que provee espacio suficiente entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de FI en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida con dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de FI es al menos 50% de su fluorescencia no detenida; provee una mezcla;

(b) incubar dicha mezcla bajo condiciones favorables para la amplificación de dicho polinucleótido; y

25 (c) monitorizar continuamente dicha amplificación monitorizando la fluorescencia producida tras la hibridación del conjugado al objetivo amplificado

11. Un método de la reivindicación 10, en donde dicha porción de MB es seleccionada del grupo que consiste de análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina.

12. Un método de la reivindicación 10, en donde dicha porción FI es un fluoróforo que tiene una longitud de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, siendo dicho fluoróforo seleccionado del grupo que consiste de cumarinas, resorufinas, xantenos, cianinas benzoxantenos, y análogos BODIPY.

5 13. Un método de la reivindicación 10, en donde dicha porción de Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo.

14. Un método de la reivindicación 10, en donde dicha porción de ODN de dicho conjugado es de 8-25 nucleótidos de longitud.

10 15. Un método de la reivindicación 10, en donde dicha porción de ODN de dicho conjugado es de 8-15 nucleótidos de longitud y K es un enlazador que tiene una longitud de 10-50 átomos de la cadena principal seleccionado del grupo que consiste de C, O, N, S, P y Si.

16. Un método de la reivindicación 10, en donde W y K tienen fórmulas IVb y IVc, respectivamente.

17. Un método para monitorizar la expresión génica que comprende:

(a) proveer una disposición de sondas de oligonucleótidos de secuencias diferentes,

(b) incubar una población de polinucleótidos con disposición bajo condiciones de hibridación, y

15 (c) determinar a cuál de las sondas de oligonucleótidos en la disposición híbrida la población;

en donde una o más de las sondas de oligonucleótidos es un conjugado de oligonucleótidos que tiene la fórmula:



20 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia que es complementaria a una porción de dicha secuencia objetivo que es amplificada, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo, W es un grupo enlazante trivalente que provee espacio suficiente entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de FI en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de FI es al menos 50% de su fluorescencia no detenida.

30 18. Un método de la reivindicación 17, en donde dicha porción de MB es seleccionada del grupo que consiste de análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina, dicha porción FI es un fluoróforo que tiene una longitud de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, siendo dicho fluoróforo seleccionado del grupo que consiste de cumarinas, resorufinas, xantenos, cianinas benzoxantenos, y análogos BODIPY, y dicha porción Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo.

19. Un método de la reivindicación 18, en donde dichos conjugados se unen a un soporte sólido.

20. Un método de la reivindicación 17, en donde W y K tienen las fórmulas IVb y IVc, respectivamente.

35 21. Un método para discriminar entre polinucleótidos los cuales difieren por un nucleótido sencillo, comprendiendo el método:

(a) incubar por separado cada uno de al menos dos polinucleótidos con un conjugado de oligonucleótidos que tiene la fórmula:

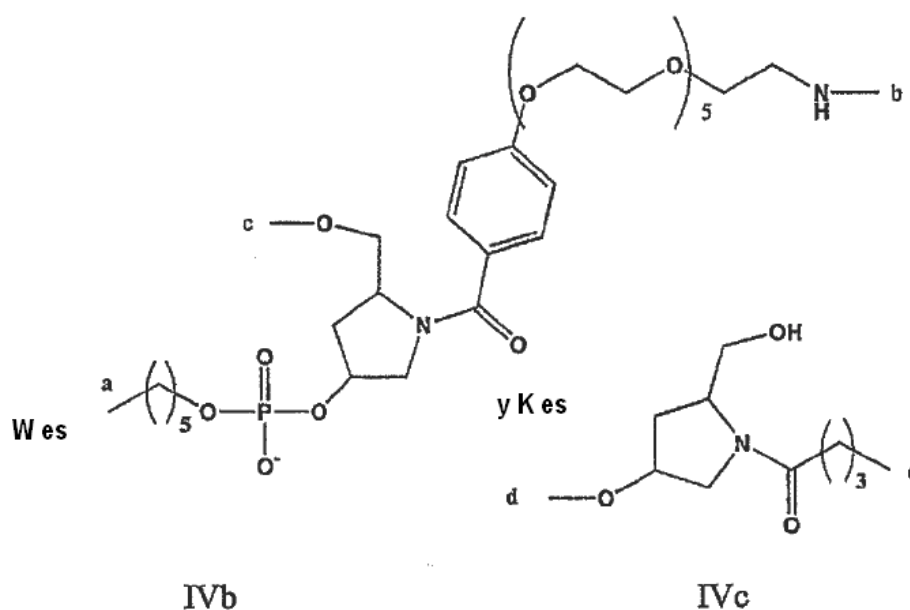


40 en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia que es complementaria a una porción de dicha secuencia objetivo que es amplificada, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo, W es un grupo enlazante trivalente que provee espacio suficiente entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la

fluorescencia de FI en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida con dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de FI es al menos 50% de su fluorescencia no detenida, teniendo dicho conjugado una secuencia definida bajo condiciones de hibridación, en donde uno de los polinucleótidos tiene una secuencia objetivo que es perfectamente complementaria a dicho conjugado de oligonucleótidos y al menos otro de los polinucleótidos tiene una secuencia objetivo que tiene una no coincidencia de un nucleótido individual con el conjugado de oligonucleótidos; y (b) determinar la fuerza de hibridación entre cada uno de los polinucleótidos y el conjugado de oligonucleótidos.

22. Un método de la reivindicación 21, en donde dicha porción de MB es seleccionada del grupo que consiste de análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina, dicha porción FI es un fluoróforo que tiene una longitud de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, siendo dicho fluoróforo seleccionado del grupo que consiste de cumarinas, resorufinas, xantenos, cianinas benzoxantenos, y análogos BODIPY, y dicha porción de Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo.

23. Un método para la reivindicación 21, en donde



24. Un método para detectar una secuencia objetivo en un polinucleótido, en donde el polinucleótido está presente en una mezcla de otros polinucleótidos, y en donde uno o más de los otros polinucleótidos en la mezcla comprenden secuencias que están relacionadas pero no son idénticas a la secuencia objetivo, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto la mezcla de polinucleótidos con un conjugado de oligonucleótidos que tiene la fórmula:



en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo y W es un grupo enlazante trivalente que provee suficiente espacio entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de FI en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida con dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de FI es al menos 50% de su fluorescencia no detenida; y en donde el conjugado forma un híbrido estable solamente con dicha secuencia objetivo que es perfectamente complementaria a la porción de ODN de dicho conjugado, y el conjugado no forma un híbrido estable con cualquiera de los otros polinucleótidos; y

(b) medir la fluorescencia producida en la formación de híbridos, con lo cual la formación de híbridos indica la presencia de dicha secuencia objetivo.

25. Un método de la reivindicación 24, en donde dicha porción de MB es seleccionada del grupo que consiste de análogos de CC1065, lexitropsinas, distamicina, netropsina, berenil, duocarmicina, pentamidina, 4,6-diamino-2-fenilindol y análogos de pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina, dicha porción FI es un fluoróforo que tiene una longitud de onda de emisión de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 800 nm, siendo dicho fluoróforo seleccionado del grupo que consiste de cumarinas, resorufinas, xantenos, cianinas benzoxantenos, y análogos BODIPY, y dicha porción de Q es un miembro seleccionado del grupo que consiste de colorantes mono azo y bis azo.
26. Un método de la reivindicación 24, en donde W y K tienen las fórmulas IVb y IVc, respectivamente.
27. Un método para distinguir entre los polinucleótidos objetivo de tipo silvestre, mutante y heterocigotos, comprendiendo dicho método:
- (a) poner en contacto una muestra que contiene un polinucleótido objetivo con dos sondas en donde una primera sonda es específica para dicho polinucleótido objetivo de tipo silvestre y una segunda sonda es específica para dicho polinucleótido objetivo mutante, teniendo cada una de dichas sondas una fórmula:



- en donde MB es un ligador del surco menor, Q es un detenedor, ODN es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado, K es un enlace o un grupo enlazante, FI es un fluoróforo y W es un grupo enlazante trivalente que provee suficiente espacio entre los componentes MB, F y ODN de tal forma que: i) MB se liga en el surco menor cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida a dicha secuencia objetivo; ii) en una forma no hibridada, la fluorescencia de FI en dicho conjugado de oligonucleótidos es menos de 10% de la fluorescencia no detenida; y iii) cuando dicho conjugado de oligonucleótidos se hibrida con dicha secuencia objetivo, la fluorescencia de FI es al menos 50% de su fluorescencia no detenida; y en donde el conjugado forma un híbrido estable solamente con dicha secuencia objetivo que es perfectamente complementaria a la porción de ODN de dicho conjugado, y el conjugado no forma un híbrido estable con cualquiera de los otros polinucleótidos; y
- (b) medir la fluorescencia producida en la formación de híbridos, con lo cual la formación de híbridos indica la presencia o ausencia de cada uno de los polinucleótidos objetivo tipo silvestre, mutantes y heterocigotos.
28. Un método de la reivindicación 27, en donde las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) para cada híbrido producido entre dichas primera y segunda sondas y sus respectivos objetivos están dentro de aproximadamente 5°C una de la otra.
29. Un método de la reivindicación 27, en donde la porción de ODN de cada una de dichas sondas es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene de 8 a 18 bases o bases modificadas.
30. Un método de la reivindicación 27, en donde la porción de ODN de cada una de dichas sondas es un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado que tiene de 10 a 15 bases o bases modificadas.
31. Un método de la reivindicación 27, en donde las porciones de fluoróforo de cada una de dichas sondas es seleccionada del grupo que consiste de 5-FAM<sup>TM</sup>, 6-FAM<sup>TM</sup>, TET<sup>TM</sup>, JOE<sup>TM</sup>, HEX<sup>TM</sup>, VIC<sup>TM</sup>, NED<sup>TM</sup>, TAMRA<sup>TM</sup>, ROX<sup>TM</sup> y YY<sup>TM</sup>.
32. Un método de la reivindicación 27, en donde la porción de ODN de cada una de dichas sondas contiene al menos una base modificada.
33. Un método de la reivindicación 32, en donde cada base modificada es seleccionada independientemente del grupo que consiste de 6-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4(5*H*)-ona, 4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 1*H*-pirazolo[5,4-*d*]pirimidin-4(5*H*-6(7*H*)-diona, 6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 3-prop-1-inil-4,6-diaminopirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)etin-1-ol, 3-(2-aminoetil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidin-2-ona, 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, 6-amino-5-(3-aminoprop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, 5-[4-amino-3-(3-metoxiprop-1-inil)pirazol[3,4-*d*]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol, 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxiprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 4-(4,6-Diamino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol, 6-Amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,5-dihidro-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1*H*-pirimidin-2,4-diona, 3-yodo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 3-bromo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 3-cloro-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 3-Yodo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ilamina, 3-Bromo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ilamina y 3-cloro-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ilamina.

34. Un método de la reivindicación 27, en donde dicha muestra se pone en contacto adicionalmente con un conjunto de cebadores bajo condiciones de amplificación y cada uno de dichos cebadores contiene de una a diez bases modificadas seleccionadas del grupo que consiste de 6-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4(5*H*)-ona, 4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 1*H*-pirazolo[5,4-*d*]pirimidin-4(5*H*)-6(7*H*)-diona, 6-amino-3-prop-1-inil-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 6-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 6-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 4-amino-3-(prop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 4-amino-3-(3-hidroxi-prop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 4-amino-3-(3-aminoprop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 3-prop-1-inil-4,6-diaminopirazolo[3,4-*d*]pirimidina, 2-(4,6-diaminopirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)etin-1-ol, 3-(2-aminoetil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 5-prop-1-inil-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, 5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2,4-diona, 6-amino-5-prop-1-inil-3-dihidropirimidin-2-ona, 6-amino-5-(3-hidroxi-prop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, 6-amino-5-(3-aminoprop-1-inil)-1,3-dihidropirimidin-2-ona, 5-[4-amino-3-(3-metoxiprop-1-inil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidinil]-2-(hidroximetil)oxolan-3-ol, 6-amino-1-[4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3-(3-metoxiprop-1-inil)-5-hidropirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 4-(4,6-Diamino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)-but-3-in-1-ol, 6-Amino-3-(4-hidroxi-but-1-inil)-1,5-dihidro-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ona, 5-(4-hidroxi-but-1-inil)-1*H*-pirimidin-2,4-diona, 3-yodo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 3-bromo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 3-cloro-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4,6-diamina, 3-Yodo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ilamina, 3-Bromo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ilamina y 3-cloro-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ilamina.

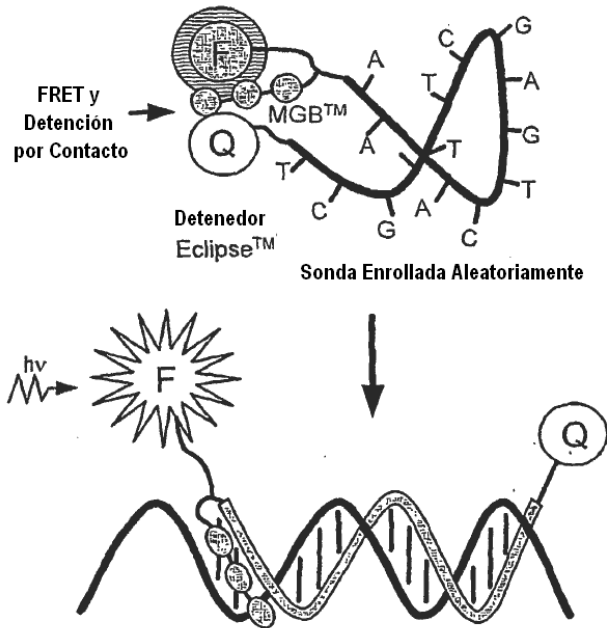


FIG. 1

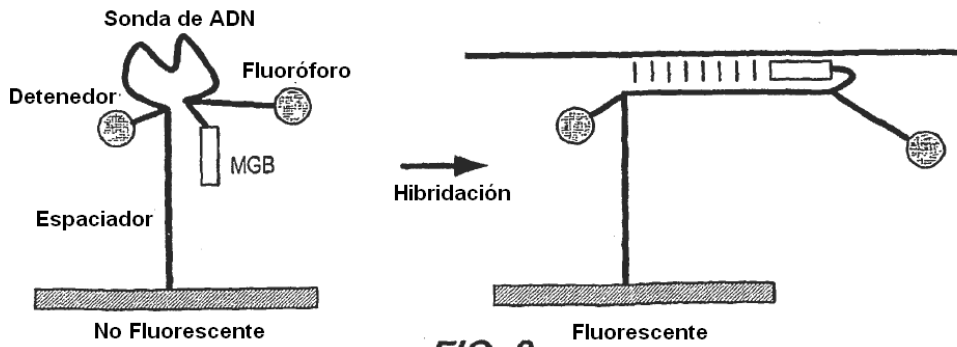


FIG. 2

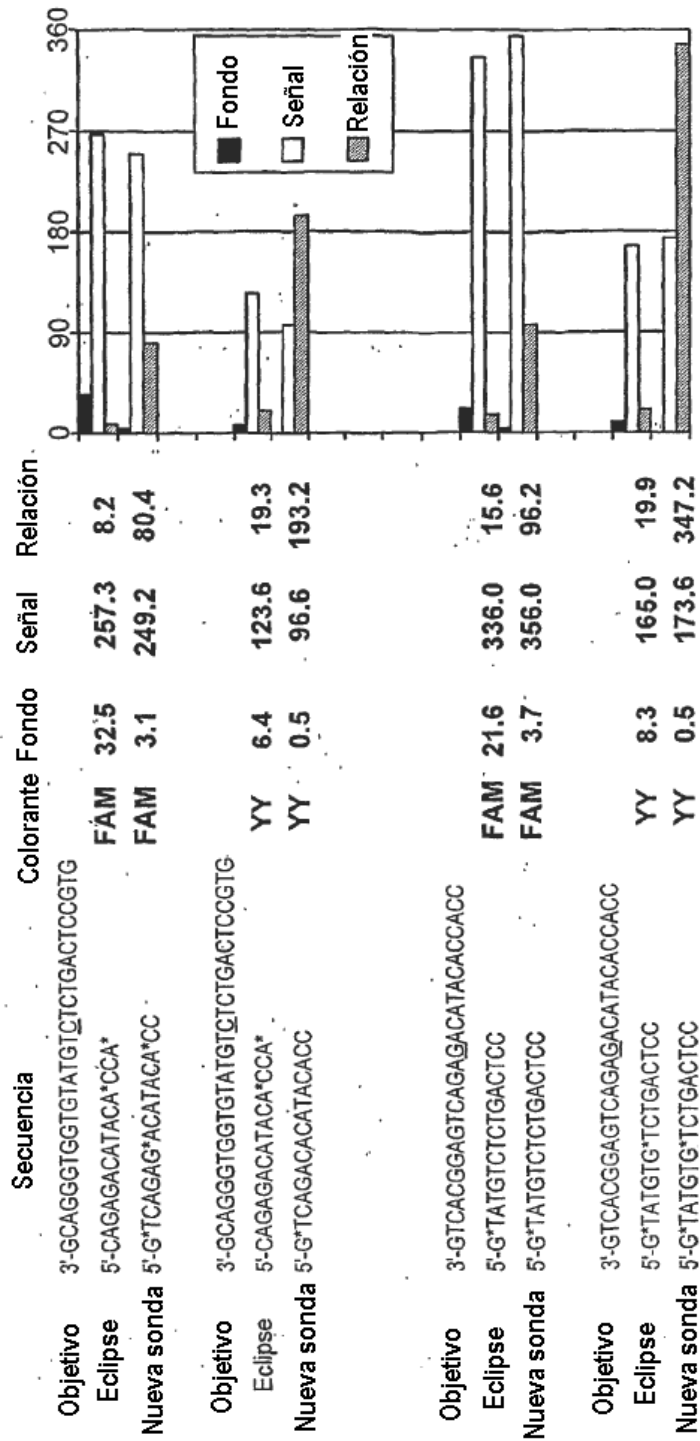


FIG. 3



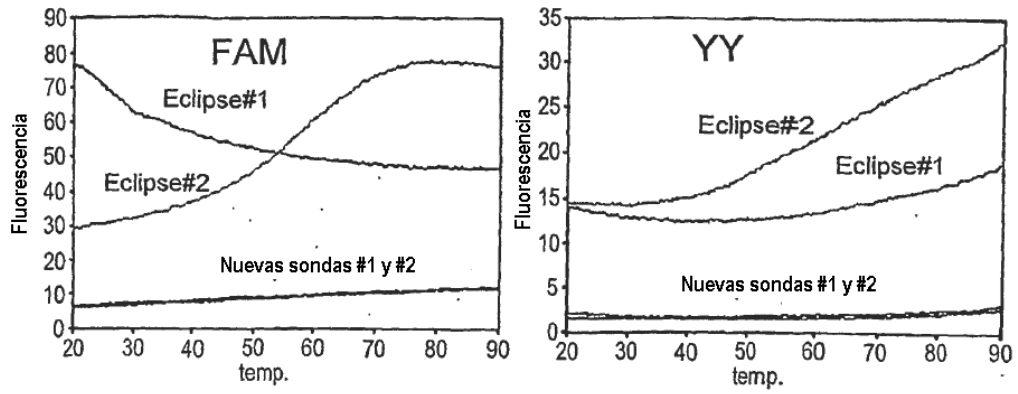


FIG. 4

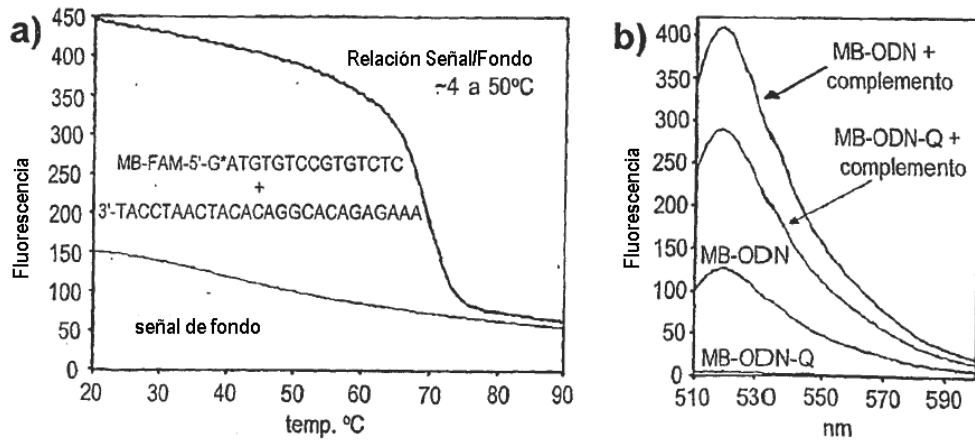


FIG. 5

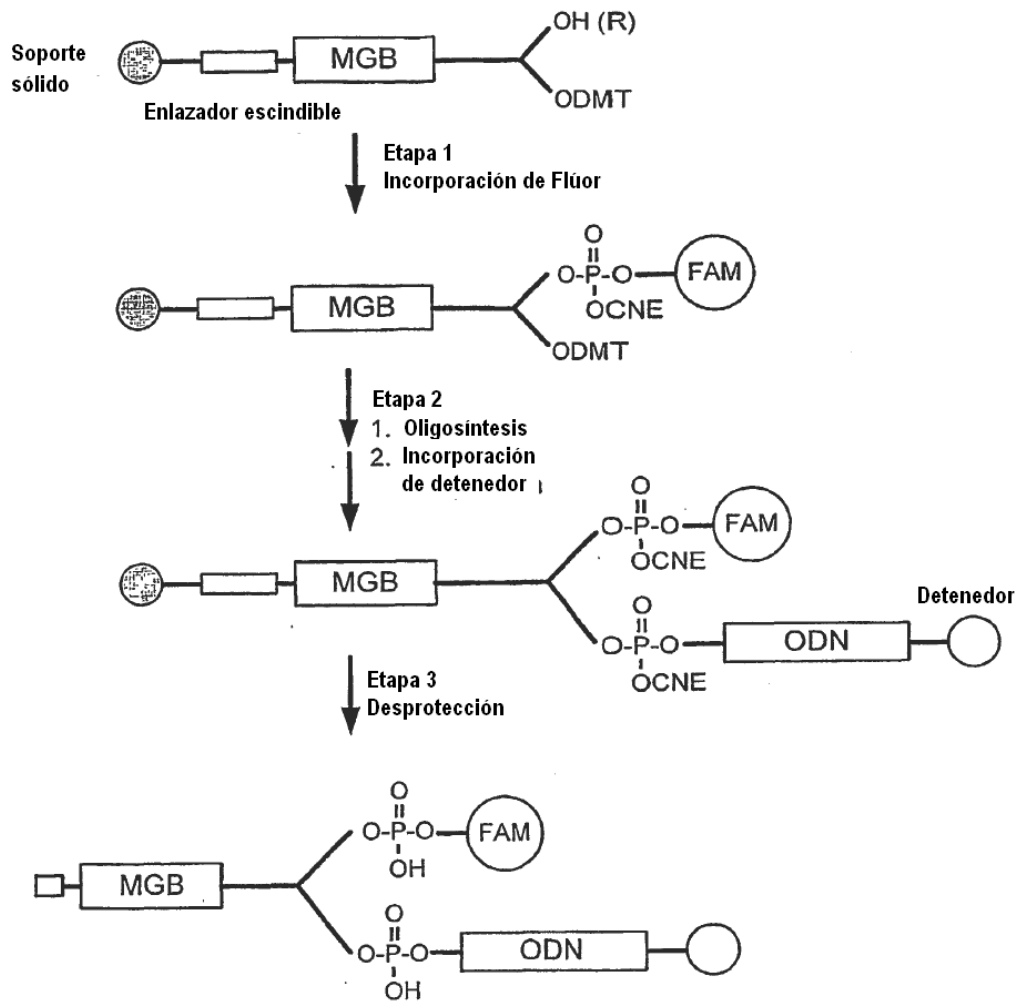


FIG. 6

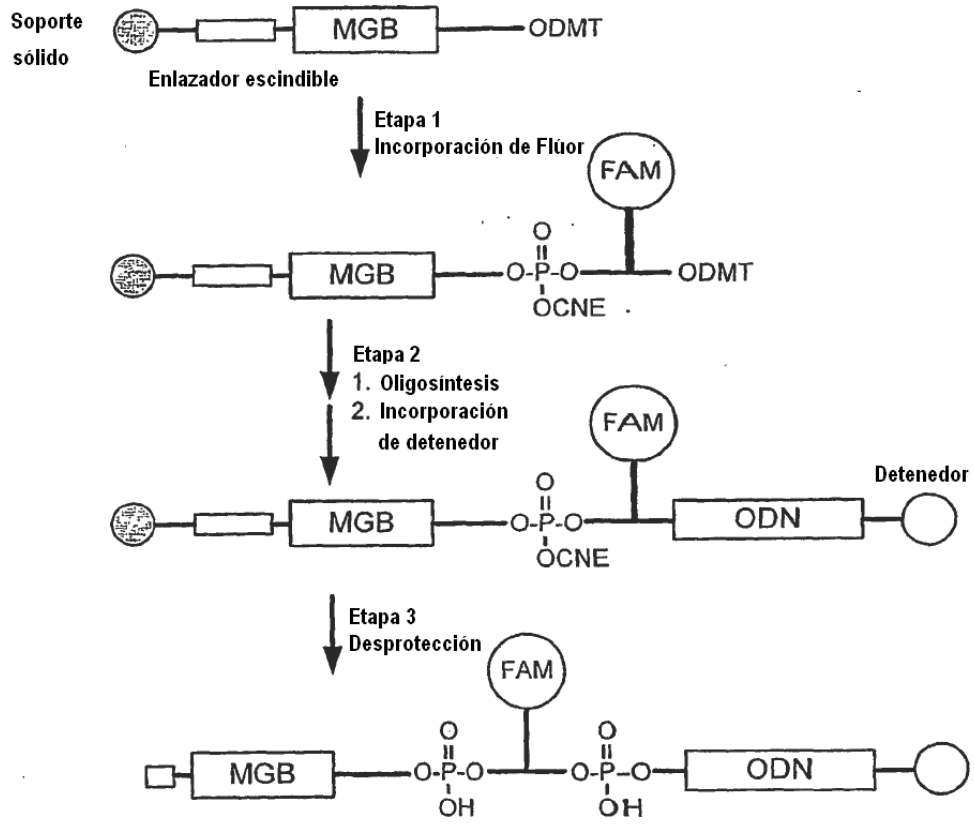


FIG. 7

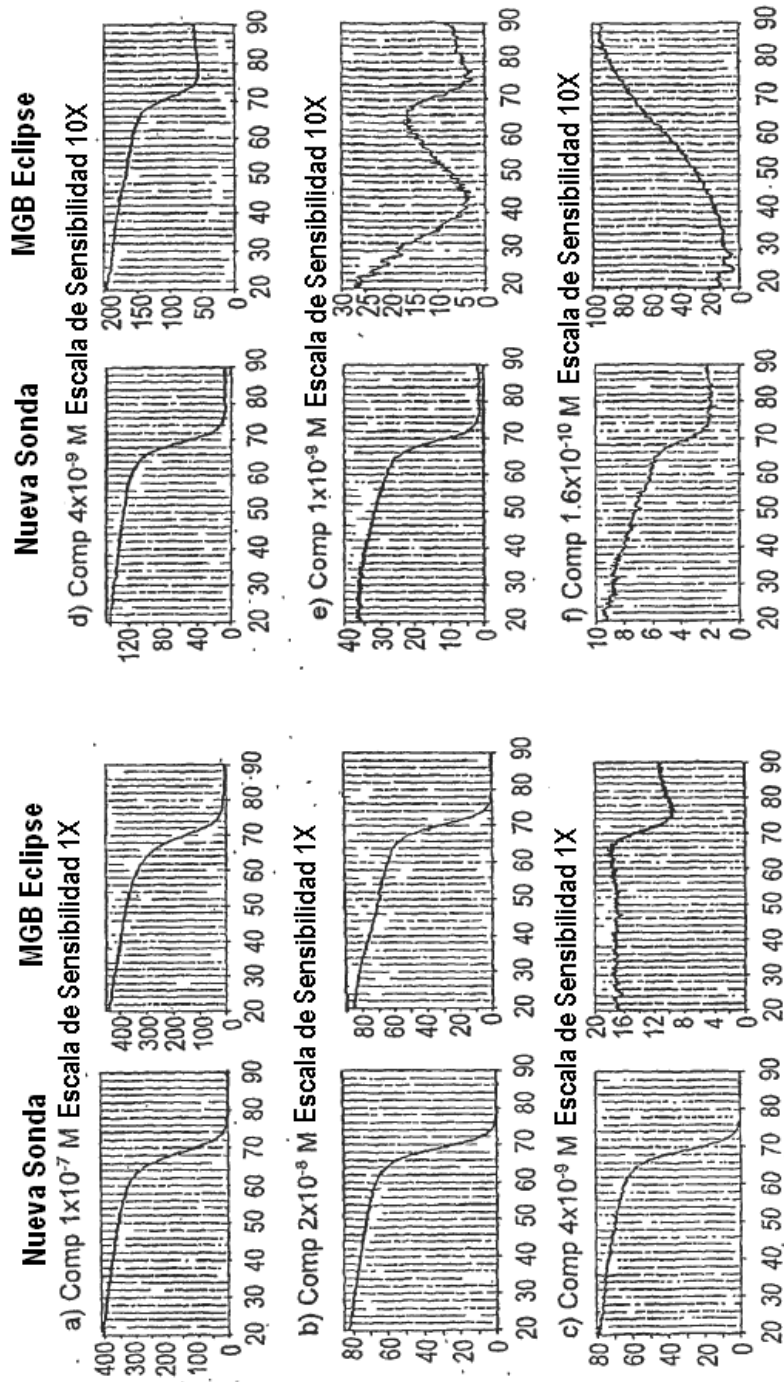
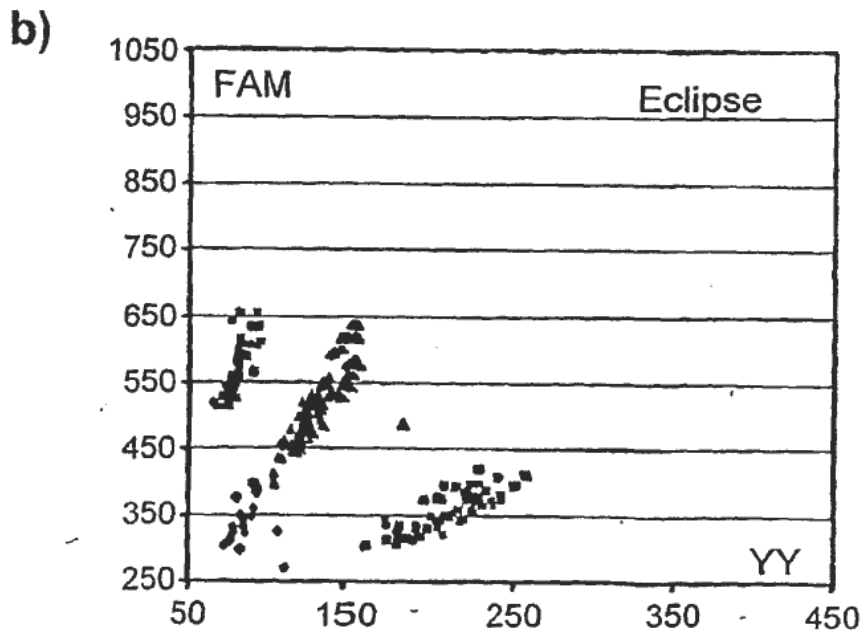
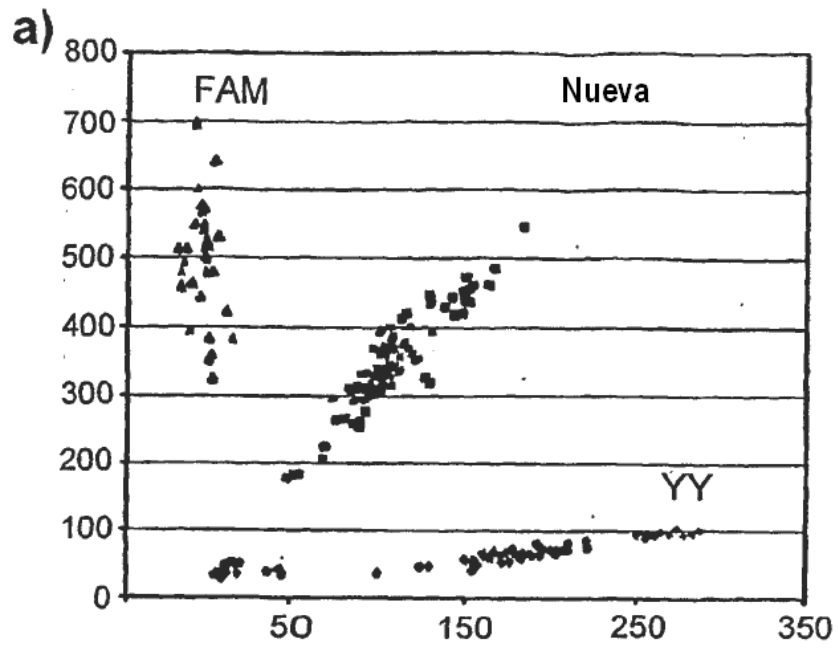


FIG. 8



**FIG. 9**