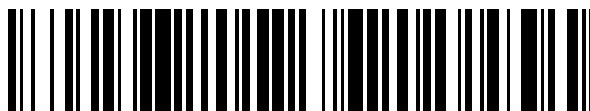


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 752**

51 Int. Cl.:

C07H 19/23 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2007 E 07003374 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1842923**

54 Título: **Derivados metanosulfonilaminoindol y sondas oligonucleótidas marcadas que los contienen**

30 Prioridad:

20.02.2006 EP 06003366

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

20.10.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERGMANN, FRANK;
HEINDL, DIETER;
JOSEL, HANS-PETER;
KESSLER, DIRK;
LAMPERT, GUNTER y
WEILKE, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 548 752 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

Derivados metanosulfonilaminoindol y sondas oligonucleótidas marcadas que los contienen

5 Campo de la invención

La presente invención reafirma los nucleósidos indol sustituidos como bloques constructivos terminales y también internos de sondas oligonucleótidas marcadas para la detección, análisis y cuantificación de ácidos nucleicos. El sustituyente comprende un conector y un grupo detectable o un conector y un grupo reactivo para el marcaje posterior a la síntesis. Dichos nucleósidos modificados proporcionan acceso a un amplio campo de aplicación. Estos nuevos nucleósidos indol sustituidos pueden utilizarse como reactivos de marcaje para la preparación sencilla de, por ejemplo, sondas de hibridación optimizadas, sondas Taqman o sondas de baliza molecular.

15 Antecedentes tecnológicos

El incremento constante del número de secuencias genómicas descodificadas y mapeadas de flora y fauna es una demostración impresionante de la importancia actual de las técnicas del ADN. Sin embargo, lo importante no es la mera secuenciación del ADN. Con el incremento del conocimiento en el campo de la genómica y la proteómica, crece el interés científico en el impacto de efectos específicos, por ejemplo mutaciones, sobre el futuro de células u organismos. Por una parte, debido a que los ácidos nucleicos con frecuencia se encuentran presentes en concentraciones muy bajas y, por otra, con frecuencia se encuentran en presencia de muchas otras sustancias sólidas y/o disueltas, por ejemplo tras la lisis de células, resultan difíciles de aislar o de medir.

Se han establecido diversos métodos para la detección, análisis y cuantificación mediante hibridación del ácido nucleico diana con una sonda detectable (por ejemplo la hibridación southern, la transferencia por puntos, los ensayos en gel o la PCR).

La herramienta principal del trabajo relacionado con los ácidos nucleicos, por ejemplo para la amplificación de ácidos nucleicos poliméricos, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En los últimos años ha crecido notablemente nuestro conocimiento y las aplicaciones de la PCR.

Un procedimiento de PCR consiste en general de tres etapas: la preparación de muestras, la amplificación y el análisis del producto. Aunque estas etapas habitualmente se llevan a cabo secuencialmente, la amplificación y el análisis pueden realizarse simultáneamente. Pueden añadirse pigmentos de ADN o sondas fluorescentes a la mezcla de PCR antes de la amplificación y utilizarse para analizar los productos de PCR durante la amplificación. La amplificación y análisis concurrentes de la muestra dentro del mismo tubo sin variar el instrumento reduce el tiempo de manipulación de las muestras y minimiza el riesgo de contaminación del producto para las reacciones posteriores. Este enfoque de combinación de amplificación y análisis se conoce como PCR "en tiempo real" (patente US nº 6.174.670).

Otras reacciones de amplificación posibles son la reacción en cadena de la ligasa (LCR, Wu D.Y. y Wallace R.B., *Genomics* 4:560-569, 1989; Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193, 1991; patente US nº 5.494.810), la reacción en cadena de la polimerasa-ligasa (Barany F., *PCR Methods Appl.* 1:5-16, 1991); Gap-LCR (documento nº WO 90/01069, patente US nº 6.004.286); reacción de reparación de cadena (patente nº EP 0 439 182 A2); 3SR (Kwoh D.Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177, 1989; Guatelli J.C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878, 1990; documento nº WO 92/08808) y NASBA (patente US nº 5.130.238). Además, la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, patentes US nº 5.270.184 y nº 5.455.166), la amplificación mediada por transcripción (TMA) y la amplificación Q-beta (para una revisión, ver, por ejemplo, Whelen A.C. y Persing D.H., *Annu. Rev. Microbiol.* 50:349-373, 1996; Abramson R.D. y Myers T.W., *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:41-47, 1993), así como la amplificación de ácidos nucleicos isotérmica y química iniciada por cebador (ICAN, Shimada M. *et al.*, *Rinsho Byori.* 51:1061-1067, 2003) y la amplificación en cascada por círculo rodante (CRCA, Thomas D.C. *et al.*, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 123:1170-1176, 1999).

Para la técnica de ácidos nucleicos anteriormente indicada resultan necesarios (desoxi)-oligonucleótidos sintéticos que han sido dotados de un marcaje detectable, por ejemplo para llevar a cabo un amplio espectro de diversos métodos biológicos moleculares y diagnósticos moleculares.

Se conocen de la técnica métodos para la síntesis de secuencias de oligonucleótidos de cadena sencilla y de análogos de oligonucleótidos (por ejemplo *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Gait, ed., IRL Press, Oxford, 1984; Kuijpers W.H.A., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 18:5197-5205, 1990; Dueholm K.L., *J. Org. Chem.* 59:5767-5773, 1994; Agrawal S. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, volumen 20).

El primer método eficaz y ampliamente aplicable para la síntesis de oligonucleótidos y polinucleótidos fue el método de fosfotriéster (ver, por ejemplo, Letsinger R.L. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 91:3360-3365, 1969). Para evitar reacciones secundarias tales como la ramificación durante la síntesis, se han protegido los grupos reactivos con, por

ejemplo, el grupo beta-cianoetilo o el grupo ortoclorofenilo. Como activador para la etapa de acoplamiento se ha utilizando cloruro de mesitil-sulfonilo y mesitil-sulfonil-nitrotriazol.

5 Habitualmente se preparan (desoxi-)oligonucleótidos sintéticos en una fase sólida con ayuda de reacciones de fosforamidita. Como fase sólida habitualmente se preparan perlas de vidrio que presentan poros de un tamaño definido (abreviadas a continuación como VPC=vidrio de poro controlado). El primer monómero se une al soporte mediante un grupo escindible de manera que el oligonucleótido puede liberarse mediante el corte de dicho grupo tras completar la síntesis en fase sólida. El primer monómero adicionalmente contiene un grupo hidroxilo protegido, mientras que habitualmente se utiliza dimetoxitritilo (DMTr) como el grupo protector. El grupo protector puede eliminarse mediante tratamiento ácido. A continuación, los derivados 3'-fosforamidita de (desoxi-)ribonucleótidos también dotados de un grupo protector DMTr se acoplan en un procedimiento cíclico a cada grupo reactivo sucesivo tras liberarlo del grupo protector DMTr.

15 Según la técnica anterior pueden utilizarse materiales de soporte trifuncionales para preparar oligonucleótidos que se marcan en el extremo 3'. Para ello, se proporciona un espaciador trifuncional con dos grupos hidroxilo reactivos y un grupo reactivo adicional, preferentemente un grupo amino. El marcaje detectable se une al grupo amino reactivo del espaciador trifuncional. Sin embargo, alternativamente el marcaje detectable no sólo se acopla al espaciador trifuncional mediante un grupo amino reactivo sino también mediante un tercer grupo hidroxilo o un grupo SH (patente US nº 5.451.463, documento nº WO 92/11388). En una tercera etapa, el espaciador trifuncional se une mediante su grupo hidroxilo que todavía se encuentra libre al grupo de unión del material de fase sólida que ha sido dotado de un enlace escindible.

20 Alternativamente, el marcaje detectable no se acopla hasta la síntesis misma de oligonucleótidos (patente US nº 5.141.837). Sin embargo, debido a que lo anterior requiere múltiples reacciones independientes de acoplamiento, dicho procedimiento de producción resulta laborioso, costoso y no puede automatizarse.

Las fosforamiditas marcadas en las que se une el grupo marcador a la fosforamidita mediante un conector C₃-C₁₂ habitualmente se utilizan para sintetizar oligonucleótidos marcados en el extremo 5'.

30 Por lo tanto, también pueden introducirse marcajes detectables internamente mediante la estrategia de fosforamiditas (Wojczewski C. *et al.*, Synlett. 10:1667-1678, 1999). Pueden utilizarse los mismos espaciadores trifuncionales para lo anterior, así como para la síntesis de materiales de CPG. En lugar de unir uno de los grupos hidroxilo a la fase sólida, dicho grupo hidroxilo se convierte en una fosforamidita en dicho procedimiento. La fosforamidita resultante puede utilizarse para la síntesis de oligonucleótidos como una amidita estándar. En principio, dichas fosforamiditas también pueden utilizarse para el marcaje interno mediante la sustitución de una fosforamidita de nucleósido estándar por una fosforamidita marcada con fluoróforo durante el ciclo de síntesis. Sin embargo, preferentemente se utiliza para el marcaje 5' debido a que el marcaje interno interrumpe el apareamiento de bases en la cadena.

40 Los oligonucleótidos dotados de un marcaje fluorescente, tal como fluoresceína, con frecuencia se utilizan en biología molecular, tal como para la medición en tiempo real de las reacciones de PCR (documento nº WO 97/46707). Los pigmentos fluorescentes pueden acoplarse con, por ejemplo, el grupo amino del espaciador trifuncional de diferentes maneras según la técnica anterior.

45 Por una parte, el pigmento fluorescente se introduce como isotiocianato que reacciona con el grupo amino de un conector o la nucleobase para formar un enlace tiourea. En un procedimiento alternativo, el éster de N-hidroxisuccinimida (éster de NHS) de un fluoróforo-ácido carboxílico se hace reaccionar con el grupo amino libre del espaciador para formar un enlace amida. Alternativamente, el conector se termina con un grupo carboxilo y seguidamente se hace reaccionar con un marcaje amino-modificado.

50 Aparte de dichos métodos químicos para la preparación de oligonucleótidos marcados, se conocen métodos enzimáticos. Por ejemplo, puede introducirse un marcaje terminal utilizando el enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal, que introduce un nucleótido adicional en el extremo de una cadena polidesoxinucleótida existente. Este nucleótido introducido enzimáticamente porta la entidad de señal (ver, por ejemplo, la patente EP nº 0 122 6149).

55 El gran éxito de los métodos en tiempo real está estrechamente asociado a la detección de un cambio de una señal informadora. Este cambio de señal surge de la interacción de la molécula de sonda con la molécula diana.

60 El seguimiento de la fluorescencia durante cada ciclo de PCR inicialmente comportaba la utilización de bromuro de etidio (Higuchi R. *et al.*, Bio/Technology 10:413-417, 1992; Higuchi R. *et al.*, Bio/Technology 11:1026-1030, 1993; patente US nº 5.994.056). En ese sistema, la fluorescencia se mide una vez por ciclo como medida relativa de la concentración de producto. El bromuro de etidio detecta el ADN de doble cadena; en caso de hallarse presente el molde, la intensidad de la fluorescencia se incrementa con el ciclado térmico. Se han desarrollado otros sistemas de fluorescencia que son capaces de proporcionar datos adicionales sobre la concentración y secuencia del ácido nucleico.

65

En PCR en tiempo real cinética, se realiza un seguimiento de la formación de los productos de PCR en cada ciclo de la PCR. La amplificación habitualmente se mide en termocicladores que presentan dispositivos adicionales para medir señales de fluorescencia durante la reacción de amplificación. En general, existen diferentes formatos para la detección en tiempo real del ADN amplificación, de entre los cuales los siguientes son bien conocidos y se utilizan comúnmente en la técnica: formato de pigmento de unión al ADN: debido a que la cantidad de producto de amplificación de doble cadena habitualmente excede la cantidad de ácido nucleico originalmente presente en la muestra que debe analizarse, pueden utilizarse pigmentos específicos de ADN de doble cadena, que al excitarse con una longitud de onda apropiada muestran una fluorescencia incrementada únicamente en el caso de que se unan a ADN de doble cadena. Preferentemente sólo pueden utilizarse aquellos pigmentos tales como Sybr verde I, por ejemplo, que no afectan a la eficiencia de la reacción de PCR (patente US nº 6.174.670).

Todos los demás formatos conocidos de la técnica requieren el diseño de una sonda de hibridación marcada fluorescente que sólo emita fluorescencia con la unión a su ácido nucleico diana.

Sonda Taqman: se marca una sonda de hibridación de cadena sencilla con dos componentes. Al excitar el primer componente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere al segundo componente, el denominado inhibidor, según el principio de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET). Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación se une al ADN diana y es degradada por la actividad de exonucleasa 5'-3' de la polimerasa Taq durante la posterior etapa de elongación. En consecuencia, el componente fluorescente excitado y el inhibidor se encuentran espacialmente separados entre sí y, de esta manera, puede medirse una emisión de fluorescencia del primer componente (patente US nº 5.538.848).

Balizas moleculares: estas sondas de hibridación también se marcan con un primer componente y con un segundo componente inhibidor; los marcajes preferentemente se encuentran situados en ambos extremos de la sonda. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes son espacialmente contiguos en solución. Tras la hibridación con los ácidos nucleicos diana, se separan ambos componentes de manera que tras la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, puede medirse la emisión de fluorescencia del primer componente (patente US nº 5.118.801).

Sondas de hibridación FRET: el formato de ensayo de sonda de hibridación de FRET resulta especialmente útil para todo tipo de ensayos de hibridación homogénea (Matthews J.A. y Kricka L.J., Anal. Biochem. 169:1-25, 1988). Se caracteriza por una pareja de dos sondas de hibridación de cadena sencilla, que se utilizan simultáneamente y que son complementarias a sitios contiguos de la misma cadena del ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondas se marcan con diferentes componentes fluorescentes. Al excitarse con luz de una longitud de onda adecuada, el primer componente transfiere la energía absorbida al segundo componente según el principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, de manera que puede medirse una emisión de fluorescencia del segundo componente al unirse ambas sondas de hibridación a posiciones contiguas de la molécula diana que debe detectarse.

Al hibridarse a la secuencia diana, las sondas de hibridación deben encontrarse muy próximas entre sí, en una disposición de cabeza con cola. Habitualmente el hueco entre el extremo 3' marcado de la primera sonda y el extremo 5' marcado de la segunda sonda es tan pequeño como resulte posible, es decir, 1 a 5 bases. Lo anterior permite que el donante de FRET y el compuesto aceptor de FRET sean estrechamente contiguos.

Aparte de la PCR y PCR en tiempo real, las sondas de hibridación de FRET y las balizas moleculares se utilizan para el análisis de las curvas de fusión. En dicho ensayo, el ácido nucleico diana en primer lugar se amplifica en una reacción de PCR típica con cebadores de amplificación adecuados. Las sondas de hibridación pueden encontrarse ya presentes durante la reacción de amplificación o añadirse posteriormente. Tras completarse la reacción de PCR, se incrementa constitutivamente la temperatura de la muestra y se detecta la fluorescencia con la condición de que se haya unido la sonda de hibridación al ADN diana. A la temperatura de fusión, las sondas de hibridación resultan liberadas de su diana y la señal fluorescente se reduce inmediatamente hasta el nivel de fondo. Se realiza un seguimiento de esta reducción con un gráfico apropiado de fluorescencia frente a la temperatura-tiempo de manera que puede determinarse un primer valor de derivada en el que se observa el máximo de reducción de la fluorescencia. Alternativamente resulta posible utilizar un cebador marcado fluorescente y sólo una sonda oligonucleótida marcada (Bernard P.S. *et al.*, Anal. Biochem. 235:101-107, 1998).

Formato de sonda de marcaje único (SMU): este formato de detección consiste de un único oligonucleótido marcado con un único pigmento fluorescente en el extremo 5' o 3' (documento nº WO 02/14555). Pueden utilizarse dos diseños diferentes para el marcaje de oligonucleótidos: sondas inhibidoras G y sondas des-inhibidoras de nitroindol.

En la realización de inhibición G, el pigmento fluorescente se une a una C en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. En el caso de que se encuentren situadas dos G en la cadena diana frente a C y en posición 1 aparte de la sonda oligonucleótida complementaria, la fluorescencia se reducirá significativamente al hibridarse la sonda con la diana.

En la realización de des-inhibición de nitroindol, el pigmento fluorescente se une al nitroindol en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. El nitroindol reduce la señalización fluorescente de la sonda libre. La fluorescencia se incrementa al hibridarse la sonda con el ADN diana debido a un efecto de des-inhibición.

- 5 En la solicitud de patente US nº 2003/0022177, Wittwer *et al.* introdujeron principalmente los análogos de bases para la modificación de los extremos terminales de las sondas oligonucleótidas.

Los productos de PCR pueden cuantificarse de dos maneras fundamentalmente diferentes.

- 10 La determinación de punto final de la cantidad de producto de PCR formado en la etapa de meseta de la reacción de amplificación: en el presente caso la cantidad de producto de PCR formado no se correlaciona con la cantidad del número inicial de copias, ya que la amplificación de ácidos nucleicos al final de la reacción ya no es exponencial y por el contrario se alcanza la saturación. En consecuencia, los números iniciales de copia diferentes mostraron cantidades idénticas de producto de PCR formado. Por lo tanto, habitualmente se utiliza en el presente
15 procedimiento el método de PCR competitiva o de RT-PCR competitiva. En dichos métodos se coamplifica la secuencia diana específica conjuntamente con una serie de dilución de un estándar interno de un número de copias conocido. El número inicial de copias de la secuencia diana se extrapola a partir de la mezcla que contiene una cantidad de producto de PCR idéntica de secuencia estándar y secuencia diana (Zimmermann K. y Mannhalter J.W., BioTechniques 21:280-279, 1996). Una desventaja de dicho método también es que la medición se produce en la
20 región de saturación de la reacción de amplificación.

- La cuantificación en tiempo real cinética en la etapa exponencial de la PCR: en el presente caso se realiza un seguimiento de la formación de los productos de PCR en cada ciclo de la PCR. La amplificación habitualmente se mide en termocicladores que presentan dispositivos adicionales para medir señales de fluorescencia durante la
25 reacción de amplificación. Un ejemplo típico de lo anterior es el LightCycler de Roche Diagnostics (nº de cat. 2 0110468). Los productos de amplificación se detectan, por ejemplo, mediante sondas de hibridación marcadas fluorescentes, que sólo emiten señales fluorescentes en el caso de que se encuentren unidas al ácido nucleico diana, o en determinados casos también mediante pigmentos fluorescentes que se unen a ADN de doble cadena. Se determina un umbral de señales definido para todas las reacciones que deben analizarse y se determina el
30 número de ciclos requerido para alcanzar dicho valor umbral para el ácido nucleico diana, así como para los ácidos nucleicos de referencia, tales como el gen estándar o de mantenimiento. Los números de copias absolutos o relativos de la molécula diana pueden determinarse basándose de dichos valores, obtenidos para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de referencia (Gibson U.E. *et al.*, Genome Res. 6:995-1001, 1996; Bieche I. *et al.*, Cancer Res. 59:2759-2765, 1999; documentos WO nº 97/46707, nº 97/46712 y nº 97/46714). Dichos métodos también se denominan PCR en tiempo real.
35

- Para la síntesis de sondas de ácidos nucleicos se conocen de la técnica varios compuestos y la utilización de los mismos para la incorporación como unidades monoméricas en ácidos nucleicos. Dichos compuestos proporcionan grupos funcionales y/o fracciones de unión para el enlace covalente de grupos o marcajes informadores. Durante el
40 curso de la síntesis química del compuesto oligomérico, se conecta la estructura de esqueleto del "compuesto no nucleotídico" o "nucleótido modificado" al esqueleto "oligonucleótido", por ejemplo mediante una reacción basada en fosforamidita, resultando en un enlace fosfodiéster. Un compuesto incorporado dado representa, de esta manera, un "nucleótido modificado" dentro del nuevamente generado "oligonucleótido modificado". Se une un marcaje mediante un grupo funcional, por ejemplo en una "fracción de unión", ejemplificada, aunque sin limitación, por una función amino que se encuentra presente en la estructura de esqueleto o en una "fracción de unión" que conecta el
45 esqueleto con el grupo funcional. Puede unirse covalentemente un marcaje al compuesto antes o después de la síntesis de un "oligonucleótido modificado", al eliminarse un grupo protector opcional del grupo funcional con el que se encuentra acoplado el marcaje.

- 50 La patente EP nº 0 135 587 informa de modificaciones de nucleósidos convencionales que portan un grupo informador unido a un grupo sustituyente de la base del nucleótido. La patente EP nº 0 313 219 informa de reactivos no nucleósidos caracterizados por una estructura de esqueleto hidrocarburo lineal con una fracción de unión o un grupo lateral al que puede unirse un marcaje. La patente EP nº 0 313 219 no informa de otros tipos de estructuras de esqueleto y sus propiedades particulares.
55

- La patente US nº 5.451.463 informa de reactivos no nucleótidos trifuncionales, particularmente estructuras de esqueleto basadas en 1,3-diol, que presentan un grupo de amino primario. Dichos reactivos pueden utilizarse, por ejemplo, para el marcaje terminal del extremo 3' de los oligonucleótidos. El documento nº WO 97/43451 informa de reactivos no nucleótidos basados en una estructura de esqueleto carbocíclica (C₅ a C₇).
60

- En resumen, dichas tecnologías se basan en conectores no nucleosídicos que, con la incorporación interna, resultan en la interrupción de la estructura de la sonda y del apareamiento de bases, o se basan en modificaciones de una nucleobase específica, las cuales requieren para el marcaje interno flexible la síntesis de cuatro fosforamiditas diferentes.
65

De esta manera, es un objetivo de la presente invención superar los problemas anteriormente indicados mediante la provisión de un sistema alternativo de marcaje que permitiese un marcaje sencillo así como independiente de la posición y del pigmento. En otro aspecto, el objetivo de la presente invención es proporcionar sondas mejoradas para la amplificación, detección y cuantificación de ácidos nucleicos.

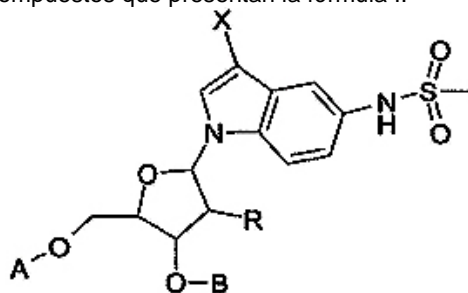
Descripción resumida de la invención

De esta manera, la invención se refiere a un nuevo compuesto detectable para el marcaje de sondas de ácidos nucleicos. El compuesto comprende un nucleósido con un indol modificado como nucleobase. Dicho nucleósido muestra propiedades sintéticas y de detección mejoradas.

Más exactamente, la invención comprende la síntesis y utilización de un nucleósido con un metanosulfonilamino-indol 3-sustituido como nucleobase. Mediante la incorporación de dicho nucleósido en un oligonucleótido, puede llevarse a cabo el marcaje tanto terminal como interno. Por lo tanto, puede llevarse a cabo un marcaje independiente de posición de los nucleótidos y, en consecuencia, de las sondas de PCR.

Dicho nucleósido puede incorporarse en cualquier posición de un oligonucleótido. De esta manera, en el caso de un pigmento estable durante la síntesis de oligonucleótidos, no se requiere ningún marcaje posterior a la síntesis. Algunos pigmentos deben protegerse para que resulten compatibles con la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo los grupos hidroxilo de la fluoresceína se protegen con pivaloilo. Además, para los pigmentos inestables durante la síntesis de oligonucleótidos, puede unirse un grupo reactivo a la nucleobase basada en indol para el marcaje posterior a la síntesis.

La presente invención comprende compuestos que presentan la fórmula I:



fórmula I

caracteriza porque:

- A y B son independientes uno de otro e independientes de R y X, y en la que A y B se seleccionan de entre el grupo que consiste de: (1) hidrógeno,
- (2) un grupo protector,
- (3) una fase sólida con un conector,
- (4) una fosforamidita,
- (5) un H-fosfonato,
- (6) un trifosfato,
- (7) un fosfato, y
- (8) una cadena de residuos nucleótidos,

con la condición de que A pero no B sea un trifosfato,

con la condición de que, en el caso de que A o B sea una fosforamidita o un H-fosfonato, el otro de A y B es un grupo protector y R no es OH,

con la condición de que únicamente uno de entre A y B es una fase sólida con un conector,

y en la que:

R=H, OH, O-alquilo, O-alquenilo, O-alquinilo, O-grupo protector o F,

X es un grupo reactivo o un grupo reactivo protegido o un conector con un grupo reactivo o un conector con un grupo reactivo protegido o una entidad de señal o una entidad de señal protegida o un conector con una entidad de señal o un conector con una entidad de señal protegida.

Una realización de la presente invención es un oligonucleótido que comprende un compuesto de fórmula I.

Otra realización de la presente invención es un oligonucleótido que comprende por lo menos dos entidades de señal basadas en un compuesto de fórmula I.

Otra realización de la presente invención es un compuesto de marcaje que comprende un compuesto de fórmula I, en la que B es un grupo fosforamidato, un H-fosfonato o un VPC y A es un grupo protector.

Otra realización de la presente invención es un método de síntesis de un oligonucleótido que comprende un compuesto de fórmula I, que comprende la etapa de incorporación de un compuesto de marcaje según la invención durante la síntesis de oligonucleótidos.

5 Otra realización de la presente invención es un método para sintetizar un oligonucleótido, que comprende un compuesto de fórmula I, que comprende las etapas de: a) incorporar un compuesto de marcaje según la invención durante la síntesis de oligonucleótidos, en el que dicho compuesto de marcaje contiene un grupo reactivo para el acoplamiento de una entidad de señal con dicho grupo reactivo, y b) acoplar una entidad de señal con dicho grupo reactivo.

10 En una realización adicional, el compuesto de fórmula I, incorporado en un oligonucleótido, comprende una entidad de señal.

15 En otra realización, un oligonucleótido que comprende un compuesto de fórmula I, se utiliza como sonda de hibridación.

En otra realización, un oligonucleótido que comprende un compuesto de fórmula I, se utiliza como un elemento de una pareja de sondas de hibridación de FRET.

20 En otra realización, se utiliza un oligonucleótido que comprende dos compuestos de fórmula I, cada uno con una entidad de señal, como sonda Taqman o sonda de baliza molecular.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a un nuevo compuesto detectable para sondas de ácidos nucleicos. El compuesto comprende un nucleósido con un metanosulfonilamino indol 3-sustituido modificado como nucleobase. Dicho nucleósido muestra propiedades sintéticas y de detección mejoradas.

30 Dentro del alcance de la presente invención algunas de las expresiones utilizadas se definen de la manera siguiente:
Un "oligonucleótido" es un oligómero lineal de subunidades monoméricas naturales o modificadas y consiste de una secuencia compuesta de dos o más subunidades monoméricas. Dichas subunidades se denominan nucleótidos. Un oligonucleótido se deriva opcionalmente de fuentes naturales, aunque con frecuencia se sintetiza químicamente. Es de cualquier tamaño.

35 El término "nucleótido" comprende en relación a la presente invención no sólo (desoxi-)oligorribonucleótidos sino también oligonucleótidos esqueléticos modificados, tales como, por ejemplo, metilfosfonatos o fosfotioatos, todos oligonucleótidos de sacáridos modificados, tales como, por ejemplo, LNA, HNA, derivados 2'-O-alquilo y todos los análogos de bases, tales como, por ejemplo, 7-deazapurinas, así como quimeras que comprenden diferentes tipos de nucleótidos y análogos de los mismos.

40 Un "análogo de oligonucleótido" se refiere a un polímero con dos o más subunidades monoméricas, en las que por lo menos uno de los monómeros no pertenece al grupo de los nucleótidos naturales A (adenina), T (timina), C (citocina), G (guanina) y U (uracilo). Dicho nucleótido no natural presenta algunos elementos estructurales en común con un nucleótido natural que le permite interactuar con los nucleótidos naturales.

45 Las expresiones "cadena de nucleótidos" y "cadena de residuos nucleótidos", que se utilizan intercambiamente en la presente solicitud, se refieren a un polímero con dos o más subunidades monoméricas, en el que estas subunidades comprenden nucleótidos y nucleótidos modificados tal como se ha definido anteriormente. La "cadena de nucleótidos" es de cualquier tamaño, preferentemente de 5 a 70 subunidades monoméricas y más preferentemente de 10 a 40 subunidades monoméricas.

50 Un "nucleósido" es un glucósido, normalmente una pentosa glucósido, en el que la aglicona, normalmente una base heterocíclica, se encuentra conectada a una fracción sacárida, normalmente una pentosa.

55 Un "grupo protector" es cualquiera de los grupos que han sido diseñados para bloquear un sitio reactivo en una molécula durante una reacción química que se lleva a cabo en otro sitio reactivo de dicha molécula. Los grupos protectores de la síntesis descrita en la presente memoria pueden ser opcionalmente cualesquiera de los indicados en, por ejemplo, Greene *et al.*, Protective Groups in Organic Chemistry, 2a ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1991.

60 Un "oligonucleótido marcado" incluye oligonucleótidos que presentan por lo menos un marcaje. El marcaje puede ser un marcaje fluorescente aunque también puede ser de cualquier otro tipo. El oligonucleótido puede contener el marcaje de diversas maneras, incluyendo en forma unida a una base del oligonucleótido, o el pigmento puede utilizarse para sustituir una base como parte de una estructura de "nucleótido virtual". En el caso de que más de un marcaje, que pueden ser del mismo tipo o de tipos diferentes, se una al oligonucleótido, por lo menos uno de los

65

marcajes se une mediante las reacciones según la invención. El otro marcaje o marcajes pueden unirse mediante otros métodos conocidos de la técnica.

5 El término "complementarias" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que forman entre ellas una estructura de bases apareadas. El término "complementarios" se refiere en el caso de los oligonucleótidos a la cadena opuesta y al comentar las bases individuales de un oligonucleótido, "complementarios" se refiere a la posición o base en la cadena opuesta. Las secuencias "generalmente complementarias" son dos secuencias de ácidos nucleicos que presentan una homología de por lo menos 80% debido a la degeneración del código genético. De esta manera, dichas secuencias presentan no correspondencias aunque presentan suficiente homología para formar entre ellas estructuras con bases apareadas.

10 Una "entidad de señal" o "marcaje detectable" se refiere a una sustancia que puede detectarse con ayuda de métodos analíticos. Lo anterior puede ser, por ejemplo, una sustancia que puede detectarse con ayuda de un espectroscopio (espectroscopía de luz visible, UV, IR o de masas), ensayos inmunológicos o con ayuda de RMN. En particular, la expresión "marcaje detectable" incluye pigmentos fluorescentes, tales como fluoresceínas, coumarinas, oxazinas, cianinas o rodaminas. Otros marcajes incluidos son moléculas inhibidoras, haptenos, biotina, marcajes de rutenio, marcajes de espín, etiquetas de masas y marcajes ópticos no lineales.

15 Una clase no exclusiva de entidades de señal son los marcajes fluorescentes (pigmentos fluorescentes), tales como coumarinas, fluoresceína y sus derivados (por ejemplo JOE, FAM, rodaminas, Alexa Fluor 488, pigmentos verde Oregon, eritrosinas, eosinas), conjugados de fluoresceína-cianina (por ejemplo Big Dyes), derivados de los pigmentos de bispirrometeno difluoruro de boro (por ejemplo BODIPY), monómeros y dímeros de cianina (por ejemplo TOTO, YOYO, TO-PRO, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7, LC-Red 705). Son marcajes fluorescentes preferentes las coumarinas y las rodaminas. Otros marcajes son, por ejemplo, la inmovilización en soportes distinguibles o el enlace a moléculas biológicas (por ejemplo biotina). Algunos marcajes requieren protección, en caso de utilizarse directamente en la síntesis de oligonucleótidos; la fluoresceína, por ejemplo, se protege en forma de bispivaloato.

20 El término "conector" representa una cadena de átomos. Dicha cadena de átomos presenta una longitud de entre 1 y 30 átomos, preferentemente de entre 4 y 20 átomos. La cadena puede contener enlaces sencillos, dobles enlaces y/o triples enlaces, y/o átomos que son parte de un carbociclo, y/o pueden sustituirse con grupos alquilo, alqueno, alquino y arilo, así como heteroátomos. El conector puede contener hasta 20 heteroátomos. El conector puede contener además una fracción reactivo para la modificación adicional. Resultan preferentes los conectores que comprenden por lo menos un enlace amida. También resultan preferentes los conectores lineales.

25 El término "carbociclo" comprende partes cíclicas de una molécula, preferentemente un conector, que puede contener entre 3 y 10 átomos de carbono. El "carbociclo" puede contener además entre 1 y 5 átomos no carbonos. Resultan preferentes los cicloalquilos que contienen entre 5 y 7 átomos.

30 La expresión "dobles y triples enlaces" se refiere a que dicha cadena puede contener uno o más dobles enlaces C-C y/o triples enlaces C-C.

La expresión "sustituido con grupos alquilo, alqueno, alquino" comprende grupos lineales, ramificados y cíclicos de C₁ a C₆ con o sin heteroátomos.

35 La expresión "sustituido con grupos arilo" comprende grupos carbocíclicos y heterocíclicos con 4 a 10 átomos anulares.

40 La expresión "sustituido con heteroátomos" comprende los sustituyentes -OH, =O, -O-alkyl, -O-alqueno, -O-alquino, -O-arilo, -NH₂, -NH-alquilo, -NH-alqueno, -NH-alquino, -NH-arilo, -SH, -SO₃H, -S(O)₂NH₂, -NH-SO₂-CH₃, -Cl, -I, -Br y -F.

45 La expresión "puede contener hasta 20 heteroátomos" se refiere a que dicha cadena lineal se encuentra opcionalmente interrumpida hasta cinco veces y/o se inicia y/o termina con urea o derivados de urea, tiourea, -O-, -NH-, -N(CH₃)-, -S-, -S(O)₂-, -S(O)₂O-, -OS(O)₂-, -S(O)₂NH-, -NHS(O)₂-, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, -NHC(O)- o -C(O)NH-. Preferentemente dicha cadena lineal se encuentra opcionalmente interrumpida o iniciada o terminada con -O-, -NH-, -NHC(O)- o -C(O)NH-.

50 La expresión "grupo reactivo" comprende una fracción capaz de unirse a un marcaje detectable. El grupo reactivo se protege opcionalmente con grupos protectores apropiados que son compatibles con la síntesis de oligonucleótidos. Dicho grupo reactivo se selecciona de entre el grupo que consiste de N-succinimidil-oxicarbonilo, maleinimido, 4,6-dicloro-[1,3,5]triazín-2-amino-, N-benzotriazolil-oxicarbonilo, N-ftalimidil-oxicarbonilo, ácido carboxílico, alquilcarbonil-oxicarbonilo, arilcarbonil-oxicarbonilo, alcóxicarbonilo, ariloxicarbonilo, imidato, imidazolido, p-aminobenzoilo, C(O)Cl, -C(O)Br, -C(O)I, -SO₂Cl, -SO₂Br, -SO₂I, -NH₂, -N₃, -N=C=O, -N=C=S, -N₂⁺, -Cl, -Br, -I, -O-NH₂ o -N(R)-NH₂, en el que R es un residuo alquilo C₁ a C₆. Los grupos reactivos preferentes son N-succinimidil-oxicarbonilo, maleinimido, ácido carboxílico, alquilcarbonil-oxicarbonilo, arilcarbonil-oxicarbonilo, alcóxicarbonilo, ariloxicarbonilo, -NH₂, -N₃, -N=C=O,

-N=C=S, -N₂⁺, -Cl, -Br, -I, -O-NH₂, OH, SH o -N(CH₃)-NH₂. El grupo -NH₂ y las variantes y análogos del mismo son los grupos reactivos más preferentes y, en caso de utilizarse directamente en la síntesis de oligonucleótidos, dicho grupo reactivo se encuentra protegido con trifluoroacetilo. El grupo reactivo se une opcionalmente mediante un conector.

5 El término "VPC" o "vidrio de poro controlado" se refiere a soportes disponibles para la síntesis de oligonucleótidos. El término VPC comprende soportes para síntesis que se utilizan en la síntesis de oligonucleótidos estándares con el fin de unir entidades de señal, grupos reactivos, nucleobases o análogos de los mismos o un fosfato, a un oligonucleótido.

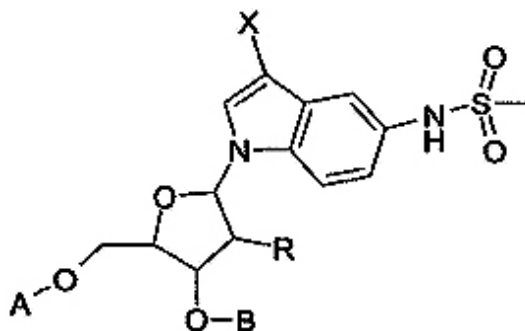
10 El término "fosforamiditas" se refiere a moléculas que presentan un átomo de fósforo trivalente que puede unirse al extremo 5'-terminal de un nucleósido o derivado de nucleósido. De esta manera, las fosforamiditas pueden utilizarse para sintetizar oligonucleótidos. Además de las fosforamiditas de (desoxi-)ribonucleótidos que se utilizan para la extensión de cadena, también existen fosforamiditas derivatizadas con un marcaje que puede utilizarse en procedimientos análogos para marcar el oligonucleótido durante, al inicio o al final de la síntesis de los oligonucleótidos (Beaucage, *Methods in Molecular Biology*, editado por S. Agrawal, vol. 20, páginas 33 a 61, 1993, también en Wojczewski C. *et al.*, *Synlett* 10:1667-1678, 1999). En principio la síntesis también puede llevarse a cabo en la dirección 5' a 3'. Lo anterior requiere un grupo fosforamido en la posición 5' y un grupo protector en la posición 3' de la fosforamido.

20 El experto en la materia podría reunir fácilmente las combinaciones apropiadas de los constituyentes anteriormente definidos según los requisitos químicos y la lógica razonable.

25 Actualmente sólo existen sistemas efectivos de marcaje covalente para los oligonucleótidos y polinucleótidos para las posiciones 3'- y 5'-terminales. En estas posiciones se incorporan los pigmentos durante la síntesis química de los oligonucleótidos. Para un marcaje interno deben sintetizarse marcajes adecuados, es decir, bases modificadas, para la totalidad de las cuatro nucleobases individualmente, por ejemplo TAMRA para la uridina (ver, por ejemplo, Walton T.A. *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 13:1155-1158, 2002).

30 Con la presente invención se proporcionan reactivos de marcaje mejorados. Estos reactivos pueden incorporarse fácilmente durante la síntesis química y enzimática en cualquier posición, es decir, en la posición 3', en la posición 5', internamente como sustituyente y como inserción (ver, por ejemplo, Verma S. y Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 67:99-134, 1998).

35 El nucleósido metanosulfonilamino indol 3-sustituido de la invención presenta la fórmula general I:



fórmula I

en la que:

40 A y B son independientes uno de otro e independientes de R y X, y en la que A y B se seleccionan de entre el grupo que consiste de:

- (1) hidrógeno,
- (2) un grupo protector,
- (3) una fase sólida con un conector,
- (4) una fosforamido,
- 45 (5) un H-fosfonato,
- (6) un trifosfato,
- (7) un fosfato, y
- (8) una cadena de residuos nucleótidos,

50 con la condición de que, en el caso de que A o B sea un trifosfato, con la condición de que, en caso de que A o B sea una fosforamido o un H-fosfonato, el otro de A y B es un grupo protector y R no es OH, con la condición de que únicamente uno de entre A y B es una fase sólida con un conector,

y en la que:

R=H, OH, O-alquilo, O-alqueno, O-alquino, O-grupo protector o F,

X es un grupo reactivo o un grupo reactivo protegido o un conector con un grupo reactivo o un conector con un grupo reactivo protegido o una entidad de señal o una entidad de señal protegida o un conector con una entidad de señal o un conector con una entidad de señal protegida.

Los compuestos de fórmula I en la que B es un grupo fosforamidato, un H-fosfonato, o un VPC y A es un grupo protector o viceversa permiten dos rutas sintéticas alternativas para los oligonucleótidos:

a) la síntesis de oligonucleótidos en la presencia de un grupo de marcaje,

b) la síntesis de oligonucleótidos en la presencia de un grupo reactivo para modificaciones/marcajes posteriores a la síntesis.

Los compuestos de fórmula I, en la que B es un grupo fosforamidato, un H-fosfonato, o un VPC y A es un grupo protector o viceversa, es decir, A es un grupo fosforamidato, un H-fosfonato, o un VPC y B es un grupo protector, se utilizan como compuestos de marcaje en la síntesis de oligonucleótidos, es decir, como compuestos que permiten durante la síntesis de los oligonucleótidos la incorporación de un marcaje detectable o un grupo reactivo para el marcaje posterior a la síntesis del oligonucleótido sintetizado.

El método de la invención para la síntesis de oligonucleótidos comprende la etapa de incorporar un compuesto de marcaje según la invención durante la síntesis de los oligonucleótidos.

Otro método de la invención para la síntesis de oligonucleótidos comprende las etapas de: i) incorporar un compuesto de marcaje según la invención durante la síntesis de oligonucleótidos, en el que dicho compuesto de marcaje contiene un grupo reactivo para el acoplamiento de una entidad de señal con dicho grupo reactivo, e ii) el acoplamiento de una entidad de señal con dicho grupo reactivo durante o después de la síntesis de oligonucleótidos, preferentemente después de la síntesis de oligonucleótidos.

Con los compuestos de la invención resulta posible la síntesis de oligonucleótidos que comprenden un compuesto de fórmula I. Dicho oligonucleótido comprende por lo menos un compuesto de fórmula I que presenta un grupo reactivo o que presenta una entidad de señal. En una realización, dicho oligonucleótido comprende por lo menos dos compuestos de fórmula I, presentando cada uno una entidad de señal, preferentemente dicho oligonucleótido comprende uno, dos, tres o cuatro compuestos de fórmula I, presentando cada uno una entidad de señal.

Los compuestos de fórmula I son accesibles mediante la síntesis química. Un procedimiento sintético ejemplar de un compuesto de fórmula I con A=dimetoxi-tritilo (DMTr), B=un grupo fosforamidato, X=grupo reactivo con conector, se describe de manera general en las figuras 1a, 1b y 1c, así como en el Ejemplo 1.

El punto de partida de la síntesis es el 5-nitroindol, que en la primera etapa se sustituye en la posición 3 por yodo. Tras la introducción del sustituyente yodo en la posición 3, se ensambla la estructura básica de nucleósidos mediante la introducción de una desoxipentosa protegida en el átomo de N del nitroindol. Tras la desprotección de los grupos hidroxilo, se introduce una fracción conectora que porta un grupo reactivo protegido. Dicha fracción conectora comprende principalmente átomos de carbono, oxígeno y nitrógeno. La función del conector es, por una parte, proporcionar un grupo reactivo para la introducción del marcaje detectable, y por otra parte, proporcionar un espaciador flexible que permite que el marcaje detectable se oriente correctamente.

En este punto divergen las dos rutas sintéticas. En caso de que se use un marcaje que no tolera las condiciones de la síntesis de oligonucleótidos, se introduce en esta etapa el residuo fosforamidato. Se lleva a cabo la síntesis de oligonucleótido con esta fosforamidato de nucleótido no marcada que porta un grupo reactivo protegido y después de la síntesis y la desprotección, se introduce el marcaje detectable en el oligonucleótido final.

En caso de que se utilice un marcaje que tolere las condiciones de la síntesis de oligonucleótidos, el marcaje se introduce antes de la formación de la amidato.

El método de reacción de fosforamidato es bien conocido por el experto en la materia. Un grupo 3'-fósforo de un nucleótido reacciona con la fracción 5'-hidroxilo de otro. La reacción transcurre de extremo 3' a extremo 5', entre cada fosforamidato con un monómero protegido con 5'-dimetoxitritilo administrado en solución y el oligonucleótido 3'-reactivo en crecimiento unido a un sustrato inerte.

Los oligonucleótidos nacientes presentan las posiciones 5'-hidroxilo protegidas por grupos dimetoxitritilo (DMTr), que deben ser eliminados después de cada ciclo de síntesis con el fin de generar un grupo 5'-OH reactivo de la cadena oligonucleótida naciente. Para los oligonucleótidos de producto, el grupo DMTr puede ser eliminado durante la síntesis (TRITYL OFF) o dejarse (TRITYL ON), en caso de que el método de purificación de elección sea la HPLC de fase inversa.

Un ejemplo de síntesis de una fosoramidita que porta un grupo reactivo se proporciona en el Ejemplo 1a; la síntesis de una fosoramidita marcada se describe en el Ejemplo 1c. Pueden sintetizarse de manera análoga otras fosoramiditas que portan un grupo reactivo o un marcaje.

- 5 Las fosoramiditas según la invención pueden utilizarse durante la síntesis de oligonucleótidos para proporcionar oligonucleótidos, los cuales portan un marcaje o un grupo reactivo en cualquier posición del oligonucleótido.

10 El oligonucleótido puede comprender una mezcla de diferentes nucleótidos modificados y diferentes marcajes. Por ejemplo, el oligonucleótido sintetizado puede comprender uno, dos o más compuestos según la invención con o sin un marcaje. En una realización alternativa, el oligonucleótido puede comprender uno o más compuestos según la invención y simultáneamente otro u otros compuestos, presentando todos ellos un marcaje detectable, el mismo o diferentes. La combinación de los diferentes marcajes y compuestos depende de la aplicación para la que se sintetiza el oligonucleótido.

15 La síntesis de oligonucleótidos se basa en el método desarrollado por Caruthers a principios de los años ochenta (Beaucage S.L. y Caruthers, M.H., *Tetrahed. Lett.* 22:1859-1862, 1981; McBride L.J. y Caruthers M.H., *Tetrahed. Lett.* 24:245-248, 1983; para más información ver *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Gait, ed., IRL Press, Oxford, 1984; Kuijpers W.H.A. *et al.*, *Nucleic Acids Research* 18:5197-5205, 1990; Dueholm K.L., *J. Org. Chem.* 59:5767-5773, 1994; Agrawal S. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, volumen 20). En la primera etapa se elimina el grupo protector DMTr con una solución ligeramente ácida de, por ejemplo, ácido dicloroacético o ácido tricloroacético en diclorometano. Para el acoplamiento, el nucleótido que debe acoplarse con el grupo hidroxilo desprotegido se activa con tetrazol. Posteriormente el producto de reacción se oxida, por ejemplo con una mezcla de yodo/agua/base. El ciclo se completa añadiendo una caperuza a los grupos hidroxilo que no se acoplaron durante la reacción de acoplamiento.

25 Se proporciona en el Ejemplo 2 un ejemplo de síntesis de un oligonucleótido.

30 Los oligonucleótidos sintetizados con la base marcada según la presente invención incorporados en cualquier posición en el oligonucleótido resultan útiles para muchas aplicaciones de PCR. Allanan el camino para nuevas aplicaciones mejoradas en la química de los ácidos nucleicos.

35 En una realización, se utilizan como sondas de hibridación oligonucleótidos que contienen un marcaje interno según la invención. El marcaje interno puede ser una parte integral de cualquier tipo de sonda de hibridación, tal como las sondas Taqman y las balizas moleculares, o puede ser una parte integral de uno o ambos elementos de una pareja de sondas de hibridación de FRET. Dichas sondas de hibridación según la invención pueden utilizarse para la hibridación con filtros, placas de microtitulación, micromatrices y, en particular, para la PCR en tiempo real.

40 En una realización de la presente invención, el nucleótido marcado se utiliza en una sonda de hibridación como elemento de una pareja de sondas de hibridación de FRET. Dicha utilización no se limita a una única pareja sino que puede expandirse a la aplicación en un ensayo de hibridación multiplex de FRET.

45 En una realización, la sonda de hibridación que contiene uno o más nucleótidos marcados según la invención se utiliza como sonda Taqman o sonda de baliza molecular.

50 En una realización, dos compuestos de fórmula I, que portan entidades de señal, se encuentran presentes en un oligonucleótido, preferentemente las entidades de señal son pigmentos fluorescentes.

55 En los tres formatos de sonda de hibridación anteriormente indicados resulta necesaria la interacción de por lo menos dos entidades de señal. Estas parejas preferentemente son un pigmento fluorescente y un inhibidor, o dos pigmentos fluorescentes.

60 En una realización de la invención, utilizando una pareja de sondas de hibridación de FRET según la invención se realiza un seguimiento de la dependencia de la temperatura, por ejemplo llevando a cabo un análisis de curvas de fusión. En una realización alternativa se utiliza una sonda de hibridación según la invención para el seguimiento de la dependencia de la temperatura de la hibridación.

El análisis de curvas de fusión de la PCR en tiempo real habitualmente se lleva a cabo tras completar la reacción de PCR. Tras una etapa inicial de desnaturalización y enfriamiento, se incrementa continuamente la temperatura del amplicón y se detecta la fluorescencia con la condición de que se haya unido la sonda de hibridación al ADN diana. En el caso del formato de sonda de hibridación de FRET, ambas sondas deben seguir hibridadas al ácido nucleico diana para generar una señal fluorescente. A la temperatura de fusión, se liberan las sondas de hibridación (en el caso del formato FRET: por lo menos un elemento de dicha pareja de sondas de hibridación) de su diana y la señal fluorescente se reduce inmediatamente hasta el nivel de fondo.

Se realiza un seguimiento de esta reducción con un gráfico apropiado de fluorescencia frente a la temperatura-tiempo de manera que puede determinarse un primer valor de derivada y de acuerdo con ello se determina a qué temperatura se observa el máximo de reducción de la fluorescencia.

5 Un aspecto de la presente invención se basa en la utilización de reactivos de hibridación marcados de manera diferente, comprendiendo cada reactivo una pareja de sondas de hibridación de FRET, que comprende una pareja de dos pigmentos fluorescentes que interactúan entre sí basándose en el principio de transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET).

10 Más exactamente, dicho reactivo de hibridación está compuesto de dos oligonucleótidos contiguamente hibridantes, marcados apropiadamente de manera que conjuntamente pueden actuar según el formato de sonda de hibridación de FRET tal como se informa en los documentos nº WO 97/46707, nº WO 97/46712 y nº WO 97/46714.

15 En el caso del formato de sonda de hibridación de FRET, una pareja de oligonucleótidos actúa conjuntamente como sonda donante y como sonda aceptora. Sin embargo, en otros casos pueden existir muchas otras variantes de secuencia en las secuencias diana que necesitan detectarse. De esta manera, puede resultar imposible detectar las secuencias de todos los elementos simplemente utilizando una pareja de sondas de hibridación oligonucleótidas de FRET.

20 Un método importante y significativo para la detección y mapeado de, por ejemplo, polimorfismos de nucleótido único (SNP), es decir, la variación de una única base en una secuencia polinucleótida, es el análisis de las curvas de fusión. Mediante el calentamiento de moléculas polinucleótidas de doble cadena se reducen las interacciones basadas en enlaces de hidrógeno que mantienen unidas las cadenas. A una temperatura específica se disocian las dos cadenas. Esta temperatura depende de la longitud del polinucleótido de doble cadena, del nivel de contenido de GC y del grado de complementariedad entre las cadenas. La temperatura a la que el 50% del polinucleótido de
25 doble cadena se convierte a cadena sencilla se denomina temperatura de fusión, T_m .

Esta técnica resulta especialmente importante para el análisis de los heterodúplex formados entre moléculas polinucleótidas de cadena sencilla y las sondas oligonucleótidas específicas de secuencia. Tal como se ha indicado
30 anteriormente, la temperatura de fusión depende de la complementariedad de las dos cadenas individuales. Este parámetro es muy sensible, por lo que realmente es detectable una no correspondencia de una sola base como reducción de la temperatura de fusión. Lo anterior implica que los heterodúplex de sonda/polinucleótido que contienen únicamente una sola no correspondencia se funden a una temperatura más baja que los heterodúplex perfectamente apareados. Lo anterior demuestra que pueden detectarse y cuantificarse los efectos de
35 desestabilización incluso muy pequeños.

Un análisis de curvas de fusión comprende en general tres etapas:

- (i) en la primera etapa se añaden sondas oligonucleótidas marcadas de fluorescencia específicas de secuencia a la mezcla de PCR,
- 40 (ii) la segunda etapa comprende la amplificación del polinucleótido mediante PCR, y
- (iii) en la tercera etapa los heterodúplex formados entre el polinucleótido diana de cadena sencilla y las sondas se calientan lentamente y se registran los cambios de fluorescencia en dependencia de la temperatura, lo que resulta en el registro de una curva de fusión.

45 La intensificación de la señal también resulta importante para las aplicaciones de PCR en tiempo real. En estas aplicaciones, la señal de fluorescencia emitida a partir de los heterodúplex de polinucleótido amplificado y sonda oligonucleótida marcada se utiliza para la cuantificación relativa y absoluta del número y concentración de los polinucleótidos. Entre otros, la determinación de las cargas víricas o el diagnóstico de tumores, así como la determinación de la expresión génica, son áreas de aplicación de la PCR en tiempo real cuantitativa.

50 En los formatos de sonda de hidrólisis, por ejemplo TaqMan, la señal se incrementa durante la hidrólisis debido a que la cumarina resulta cortada durante la PCR por la polimerasa Taq. Tal como puede observarse a partir de la figura 2, el conector presenta una influencia sobre el incremento de la señal, es decir, el incremento de la señal se incrementa con la longitud del conector y, por lo tanto, las propiedades de la fluorescencia pueden ajustarse a
55 diferentes aplicaciones. Para el formato de la sonda de hidrólisis resulta deseable disponer de un informador altamente fluorescente, mientras que para el multiplexado con el formato de sonda de hibridación podría resultar ventajoso que la señal del donante de FRET fuese débil.

60 Los ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción de las secuencias

65

SEC ID nº 01 Sonda marcada terminalmente
 SEC ID nº 02 Sonda de doble marcaje
 SEC ID nº 03 Cebador directo del Ejemplo 3
 SEC ID nº 04 Cebador inverso del Ejemplo 3

5

Descripción de las figuras

10 Figura 1a: ruta sintética a un nucleósido con grupo reactivo (1=5-nitro-1H-indol; 2=3-yodo-5-nitro-1H-indol; 3=5-cloro-2-(4-metil-benzoiloximetil)-3-(4-metil-benzoiloxi)-tetrahydrofurano; 4=5-(3-Iodo-5-nitro-indol-1-il)-2-(4-metil-benzoiloximetil)-3-(4-metil-benzoiloxi)-tetrahydrofurano; 5=2-hidroximetil-5-(3-yodo-5-nitro-indol-1-il)-tetrahydro-furán-3-ol; 6= 2,2,2-trifluoro-N-prop-2-inil-acetamida; 7= 2,2,2-trifluoro-N-{3-[1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydro-furán-2-il)-5-nitro-1H-indol-3-il]-prop-2-inil}-acetamida

15 Figura 1b: ruta sintética a un nucleósido con grupo reactivo (7=2,2,2-trifluoro-N-{3-[1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydro-furán-2-il)-5-nitro-1H-indol-3-il]-prop-2-inil}-acetamida; 8=N-{3-[5-amino-1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydrofurán-2-il)-1H-indol-3-il]-propil}-2,2,2-trifluoro-acetamida; 9=2,2,2-trifluoro-N-{3-[1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydro-furán-2-il)-5-metanosulfonilamino-1H-indol-3-il]-propil}-acetamida; 10=N-[3-(1-{5-[Bis-(4-metoxi-phenil)-fenil-metoximetoximetil]-4-hidroxi-tetrahydro-furán-2-il)-5-metanosulfonilamino-1H-indol-3-il]-propil]-2,2,2-trifluoro-acetamida, DMTr=bis-(4-metoxi-fenil)-fenilo-; 11=2-[bis-(4-metoxiphenil)-fenil-metoximetil]-5-(5-metanosulfonilamino-3-[3-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-propil]-indol-1-il)-tetrahydrofuran-3-il éster de ácido diisopropil-fosforamidoso 2-ciano-etilo)

25 Figura 1c: síntesis de una fosforamidita de cumarina (10=N-[3-(1-{5-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetoximetil]-4-hidroxi-tetrahydro-furán-2-il)-5-metanosulfonilamino-1H-indol-3-il]-propil]-2,2,2-trifluoro-acetamida, DMTr= bis-(4-metoxi-fenil)-fenilo-; 12=5-[3-(3-amino-propil)-5-metilamino-indol-1-il]-2-metoximetil-tetrahydro-furán-3-ol); 13=-[1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydro-furan-2-il)-5-metanosulfonilamino-1H-indol-3-il]-propil]-amida de ácido octanodioico 13{2-[(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H,10H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]antraceno-9-carbonil)-amino]-etil}-amida; 14=fosforamidita marcada)

30

Figura 2: cambio de la fluorescencia durante la amplificación de ácidos nucleicos.

35 Descripción de los Ejemplos

Ejemplo 1: a) Síntesis de una fosforamidita para la síntesis de oligonucleótidos que portan un grupo reactivo
 b) Síntesis de un marcaje reactivo
 c) Síntesis de una fosforamidita marcada para la síntesis de oligonucleótidos.

40

Ejemplo 2: síntesis de oligonucleótidos.

Ejemplo 3: detección de ADN vírico diana mediante RT-PCR.

45 Ejemplos

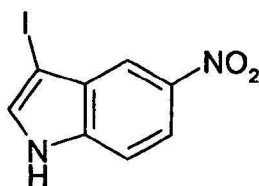
A menos que se indique lo contrario, todos los compuestos químicos eran de grado reactivo y se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Los compuestos químicos se utilizaron sin modificación, tal como se recibieron del fabricante o proveedor.

50

Ejemplo 1a

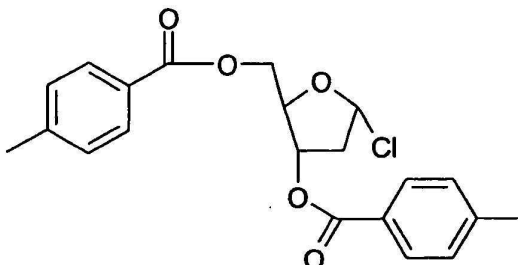
Preparación de nucleósido de indol

55 a) 3-Yodo-5-nitroindol



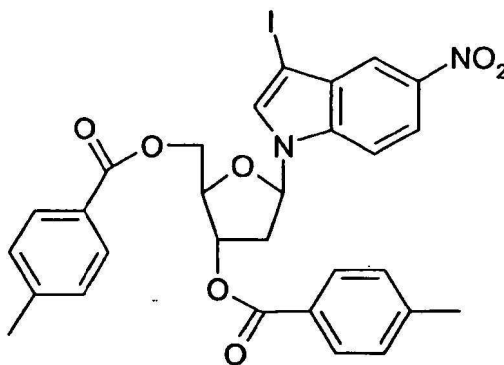
Se disolvieron en 270 ml de DMF 25,0 g (154,2 mmoles) de 5-nitroindol (Aldrich N1,760-2) y 21,7 g (386,7 mmoles) de hidróxido de potasio. A esta solución se añadieron gota a gota durante una hora 39,5 g (155,6 mmoles) de yodo disueltos en 250 ml de DMF. La mezcla resultante posteriormente se agitó durante 1,0 h a temperatura ambiente. A continuación la mezcla de reacción se vertió en 2,5 l de suspensión. El precipitado formado se recogió mediante filtración y se lavó dos veces con agua. El residuo obtenido se secó al vacío (rendimiento: 43,0 g).

b) 5-Cloro-2-(4-metil-benzoiloximetil)-3-(4-metil-benzoiloxi)-tetrahidrofurano



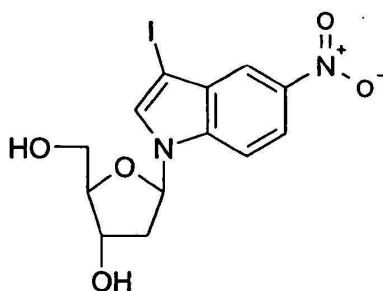
Se disolvieron 45,0 g (335,5 mmoles) de 2-desoxi-D-ribose (Fluka 31170) en 540 ml de metanol anhidro. A esta solución se añadió gota a gota a temperatura ambiente una mezcla de 90 ml de metanol y 1,53 ml (21,5 mmoles) de cloruro de acetilo (Aldrich 40,279-6). La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos adicionales a temperatura ambiente. Tras la adición de 18,0 g (214,3 mmoles) de bicarbonato sódico, la suspensión resultante se agitó durante 15 min. Tras la filtración de la suspensión, se eliminó el solvente mediante destilación. Al residuo aceitoso marrón, se añadieron 75 ml de piridina anhidra y posteriormente se eliminó el solvente al vacío en un evaporador giratorio. Este procedimiento se repitió tres veces. El residuo restante se disolvió en 270 ml de piridina anhidra y se enfrió a 0°C. A esta temperatura se añadieron gota a gota durante un periodo de 90 minutos 99 ml (748,6 mmoles) de cloruro de p-toluilo (Alrich 10,663-1). A continuación, la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas adicionales a temperatura ambiente. La suspensión se vertió en 1,5 l de suspensión y la fase acuosa se extrajo tres veces cada vez con 600 ml de diclorometano. Las fases orgánicas agrupadas se lavaron dos veces, cada vez con 600 ml de agua, tres veces cada vez con 600 ml de ácido clorhídrico 2 M, dos veces cada vez con 600 ml de solución saturada de bicarbonato sódico y dos veces cada vez con 600 ml de agua. A continuación, la fase orgánica separada se secó sobre sulfato sódico y se evaporó a sequedad al vacío en un evaporador giratorio. El residuo aceitoso se disolvió en 180 ml de ácido acético glacial y se añadieron 280 ml de una mezcla de 228 ml de ácido acético glacial, 45,9 ml (646 mmoles) de cloruro de acetilo y 11,3 ml de agua, bajo agitación y con enfriamiento sobre hielo. Se separó la pulpa mediante filtración y se lavó dos veces, cada vez con 200 ml de éter dietílico helado. El residuo se secó sobre hidróxido de potasio al vacío (rendimiento: 96,3 g).

c) 5-(3-Yodo-5-nitro-indol-1-il)-2-(4-metil-benzoiloximetil)-3-(4-metil-benzoiloxi)-tetrahidrofurano



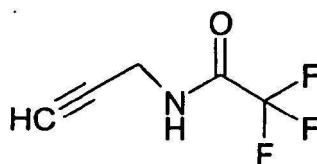
A una suspensión de 1,0 g (3,5 mmoles) de 3-yodo-5-nitroindol en 15 ml de acetonitrilo se añadieron 0,16 g (6,7 mmoles) de hidruro sódico (Aldrich 223441-50G). Se continuó la agitación y la suspensión se tornó roja. Tras 15 min., se añadieron en partes pequeñas 2,02 g (5,2 mmoles) de 5-cloro-2-(4-metil-benzoiloximetil)-3-(4-metil-benzoiloxi)-tetrahidrofurano y se continuó la agitación durante 60 minutos adicionales a temperatura ambiente. Se separó el precipitado mediante filtración y se lavó una vez con acetonitrilo. Los filtrados amarillos agrupados se concentraron hasta la precipitación de un producto. Para una precipitación completa del producto se añadieron 50 ml de etanol. Se separó el precipitado amarillo mediante filtración y se lavó con etanol. El residuo se secó sobre pentóxido de fósforo e hidróxido de potasio al vacío (rendimiento: 1,9 g).

d) 2-Hidroximetil-5-(3-yodo-5-nitroindol-1-il)-tetrahidrofurán-3-ol



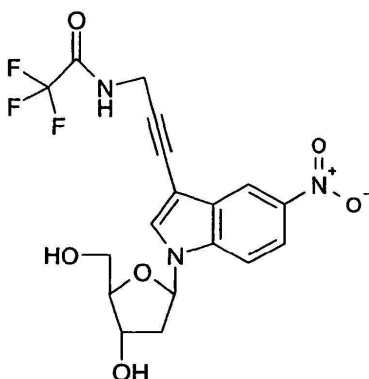
5 A una suspensión de 12 g (18,7 mmoles) del derivado indol 5-(3-yodo-5-nitroindol-1-il)-2-(4-metil-benzoiloximetil)-3-(4-metil-benzoiloxi)-tetrahidrofurano en 600 ml de etanol, se añadieron 4,2 g (37,5 mmoles) de *tert*-butilato de potasio. La suspensión se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La solución amarilla resultante se cromatografió en una columna de gel de sílice (Silica gel 60, Merck, 230x100 mm) con un gradiente, partiendo de 100 diclorometano hasta 85% de diclorometano: 15% de metanol (rendimiento: 6,6 g).

e) 2,2,2-Trifluoro-N-prop-2-inil-acetamida



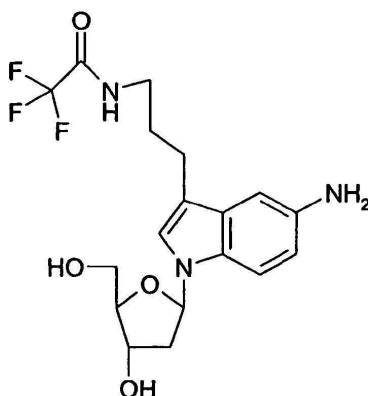
10 A 15 g (272,3 mmoles) de propargilamina en 275 ml de metanol anhidro se añadieron 36,6 g (285,9 mmoles) de trifluoroacetato de metilo. La mezcla de reacción resultante se agitó durante cuatro horas adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el solvente mediante destilación bajo presión reducida. Se disolvió el residuo en 300 ml de triclorometano y se extrajo cuatro veces, dos veces cada vez con 300 ml de una solución saturada de bicarbonato sódico y dos veces cada vez con 300 ml de agua. La fase orgánica separada se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se eliminó el solvente mediante destilación (rendimiento: 23,3 g).

15 f) 2,2,2-Trifluoro-N-{3-[1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydro-furán-2-il)-5-nitro-1H-indol-3-il]-prop-2-inil}-acetamida



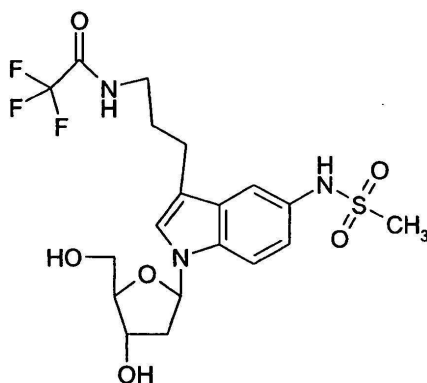
20 Se introdujeron 19,8 g (48,99 mmoles) de 2-hidroximetil-5-(3-yodo-5-nitroindol-1-il)-tetrahidrofurán-3-ol en un matraz precalentado en una atmósfera de argón y se disolvieron en 200 ml de tetrahidrofurano anhidro. Se añadieron 27,2 ml (196,2 mmoles) de trietilamina (Merck, 8.08352.1000), 1,87 g (9,82 mmoles) de yoduro de cobre (I) (Merck, 8.18311.0100) y 5,66 g (4,89 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (Merck, 8.14761.005). Tras 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 19,8 ml de 2,2,2-trifluoro-N-propil-2-inil-acetamida y se agitó durante 45 minutos adicionales. Se eliminó el solvente mediante destilación. El residuo se cromatografió en una columna de gel de sílice (Silica gel 60, Merck, 400x70 mm) con un gradiente, partiendo de 100% de diclorometano hasta 95 % de diclorometano con 5% de metanol (rendimiento: 17,06 g).

25 g) N-{3-[5-Amino-1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydro-furán-2-il)-1H-indol-3-il]-propil}-2,2,2-trifluoro-acetamida



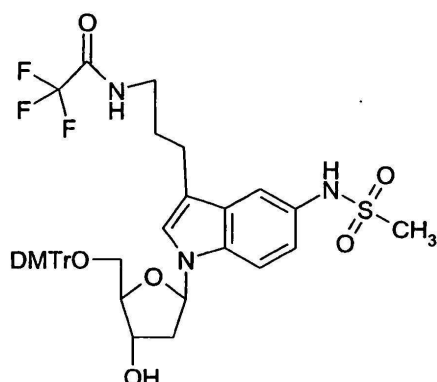
Se suspendieron 4,0 g (9,3 mmoles) de 2,2,2-trifluoro-N-(3-[1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydro-furán-2-il)-5-nitro-1H-indol-3-il]-prop-2-inil)-acetamida y 650 mg de paladio al 5% (p/p) sobre carbono (Fluka nº 75992) en 100 ml de etanol anhidro y se sometieron bajo una atmósfera de argón en un matraz. Se sustituyó el argón por hidrógeno (generador de hidrógeno Whatman). Se realizó un seguimiento de la hidrogenación mediante CCF (Silica Gel Merck F60, solvente de revelado: tolueno/etil-éster de ácido acético/metanol 4:1:1 (v/v/v)) y se detuvo en el momento en que ya no era detectable el material de partida. Se eliminó el catalizador mediante filtración y el solvente se evaporó a sequedad al vacío en un evaporador giratorio. El producto se utilizó sin purificación adicional (rendimiento: 3,7 g).

h) 2,2,2-Trifluoro-N-(3-[1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydro-furán-2-il)-5-metanosulfonilamino-1H-indol-3-il]-propil)-acetamida



Se disolvieron 3,75 g (9,2 mmoles) de N-(3-[5-amino-1-(4-hidroxi-5-hidroximetil-tetrahydrofurán-2-il)-1H-indol-3-il]-propil)-2,2,2-trifluoro-acetamida en 30 ml de piridina anhidra. Se añadieron 0,72 ml (9,2 mmoles) de cloruro de metilsulfonilo. Se realizó un seguimiento de la reacción mediante CCF (Silica Gel Merck F60, tolueno/etil-éster de ácido acético/metanol 3:2:1 (v/v/v)). Tras 20 minutos bajo agitación, se eliminó el solvente al vacío en un evaporador giratorio. Se disolvió el residuo en acetato de etilo y se lavó tres veces con cada vez 100 ml de solución acuosa al 10% (p/v) de ácido cítrico y posteriormente una vez con 100 ml de solución hipersalina (solución saturada de cloruro sódico). La fase orgánica se separó y se secó sobre sulfato sódico. Para la purificación adicional, el residuo se cromatografió en una columna de gel de sílice (Silica gel 60, Merck, 185x85 mm) con tolueno/etil-éster de ácido acético/metanol 3:2:1 (v/v/v) como fase móvil. Se agruparon las fracciones que contenían el producto y se eliminó el solvente al vacío en un evaporador giratorio (rendimiento: 720 mg).

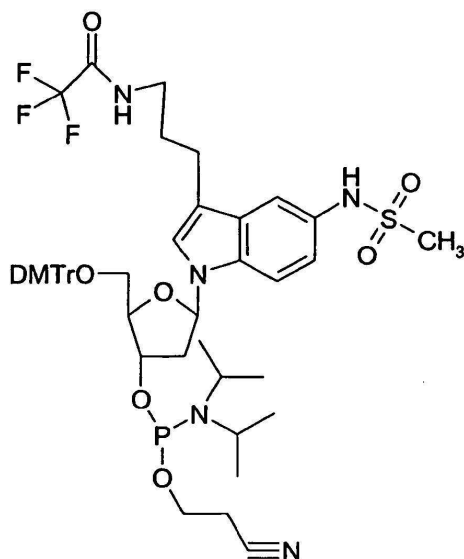
i) N-[3-(1-(5-[Bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetoximetil]-4-hidroxi-tetrahydro-furán-2-il)-5-metanosulfonilamino-1H-indol-3-il)-propil]-2,2,2-trifluoro-acetamida



5 Se suspendieron 0,7 g (1,45 mmoles) de 2,2,2-trifluoro-N-{3-[1-(4-hidroxi-5-hidroxiometil-tetrahydro-furán-2-il)-5-metanosulfonilamino-1H-indol-3-il]-propil}-acetamida y se introdujeron 540 mg (1,5 mmoles) de cloruro de 4,4'-dimetoxitriifenilmetilo (Aldrich nº 10.001-3) en un matraz de 50 ml seco a la llama bajo una atmósfera de argón. Las sustancias se disolvieron en 15 ml de piridina anhidra y se agitaron durante tres horas con exclusión de humedad. Se añadieron 0,5 ml de metanol y se eliminó el solvente al vacío en un evaporador giratorio. El residuo se

10 cromatografió en una columna de gel de sílice (Silica gel 60, Merck, 280x50 mm) con tolueno/acetato de etilo/metanol 4:1:1 (v/v/v) suplementado con trietilamina al 0,1% (v/v). Se realizó un seguimiento de las fracciones mediante CCF (gel de sílice, tolueno/acetato de etilo/metanol 4:1:1 (v/v/v)). Se agruparon las fracciones deseadas y se eliminaron los solventes al vacío en un evaporador giratorio con una temperatura del baño de agua de 38°C (rendimiento: 660 mg).

15 j) 2-[Bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-5-{5-metanosulfonilamino-3-[3-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-propil]-indol-1-il}-tetrahydro-furán-3-il-éster de ácido diisopropil-fosforamidoso 2-ciano-etilo



20 Se disolvieron secuencialmente 610 mg (0,77 mmoles) de N-3-(1-{5-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetoximetil]-4-hidroxi-tetrahydro-furán-2-il}-5-metanosulfonilamino-1H-indol-3-il)-propil]-2,2,2-trifluoro-acetamida, 0,44 ml (2,55 mmoles) de N-etil-diisopropilamina (Fluka nº 03440) y 0,19 ml (0,85 mmoles) de monocloruro de cloro-2-cianoetoxidiisopropilamonofosfano disueltos en 15 ml de diclorometano anhidro en un matraz de reacción seco bajo una atmósfera de argón. El recipiente de reacción sellado se agitó durante 50 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 0,1 ml de metanol y después la mezcla se cromatografió directamente en una columna de gel

25 de sílice (gel de sílice 60, Merck, 120x30 mm) con un gradiente de diclorometano con trietilamina al 0,1% (v/v) hasta diclorometano:acetona 95:5 (v/v) con trietilamina al 0,1% (v/v). Se agruparon las fracciones que contenían el producto y se eliminó el solvente al vacío en un evaporador giratorio (temperatura del baño: 28°C a 30°C). El aceite resultante se disolvió en 15 ml de diclorometano y se evaporó el solvente. El residuo remanente se disolvió en 20 ml de diclorometano y se añadió a una botella de vidrio compatible con un sintetizador de ADN ABI. Se eliminó el

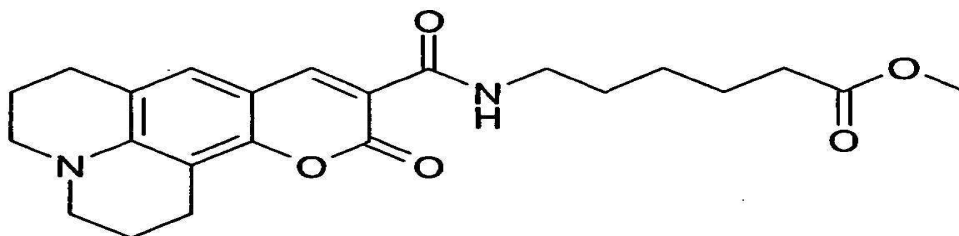
30 solvente en un flujo de nitrógeno (rendimiento: 410 mg). RMN, solvente: d₆-DMSO, modelo: Bruker DPX 300, 300 MHz, RMN-³¹P: 148,79 (d), 1H: 9,45(t) [1H], 9,33(s) [1H], 7,58(d) [1H], 7,17-7,56 (m) [11H], 7,02 (d)[1H], 6,80 (m) [4H] 6,36 (dd) [1H], 4,75 (m) [1H], 4,05 (d)[1H], 3,54-3,73 (m)[5H], 3,71(s) [6H], 3,16 (s,br) [4H] 2,86(s) [3H], 2,49-2,79 (m,s,DMSO), 1,74 (m) [2H], 1,15 -0,99 (m) [12 H].

Ejemplo 1b

I) Síntesis de marcaje reactivo - Síntesis de cumarina 343-éster de NHS de ácido aminohexanoico

5

a) Cumarina 343-ácido aminohexanoico

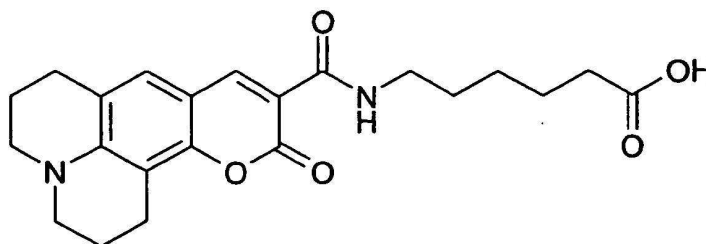


10 Se disolvió en 100 ml de DMF, cumarina 343 (5 mmoles, Aldrich nº 393029) y 5,5 mmoles de cada uno de metil-éster de ácido 4-aminohexanoico y HBTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio), así como 11 mmoles de trietilamina, y se agitaron durante 1,5 h a temperatura ambiente. Se eliminó el solvente mediante evaporación en un evaporador giratorio y el residuo se disolvió en triclorometano. Se eliminó el HBTU residual mediante extracción con agua con ácido clorhídrico 0,5 moles/l. Se separó el solvente orgánico y se evaporó a sequedad en un evaporador giratorio. El producto en bruto (2,37 g) se purificó mediante cromatografía flash (gel de sílice 60, Merck, nº 11452134001) con una fase móvil que consistía de triclorometano:acetato de etilo 2:1 (v/v) (rendimiento: 1,03 g).

15

b) Cumarina 343-ácido aminohexanoico

20

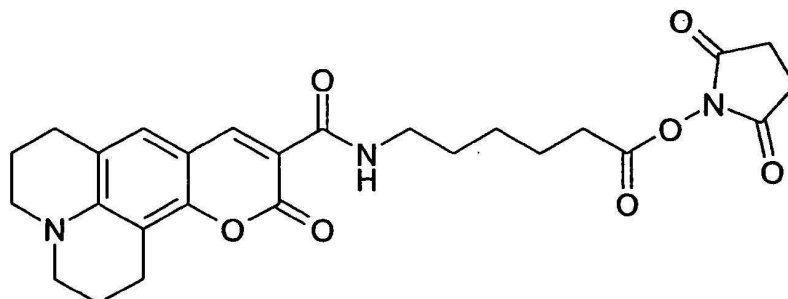


25

Se disolvió cumarina 343-metil-éster de ácido aminohexanoico (0,1 mmoles) en 200 ml de tampón fosfato (10 mM, pH 7,0) y se añadieron 20 mg de esterasa (EC 3.1.1.1, Sigma nº E-3019). Tras agitar durante tres días bajo condiciones ambientales (temperatura ambiente), el éster de metilo se había escindido cuantitativamente. Se aisló el producto mediante extracción de la fase acuosa con triclorometano. La fase orgánica separada se lavó con H₂O y solución hipersalina (H₂O saturado con NaCl). Tras secar sobre sulfato de magnesio y eliminar el solvente al vacío en un evaporador giratorio, se disolvió el residuo en dioxano y se liofilizó.

30

c) Cumarina 343-éster de NHS de ácido aminohexanoico



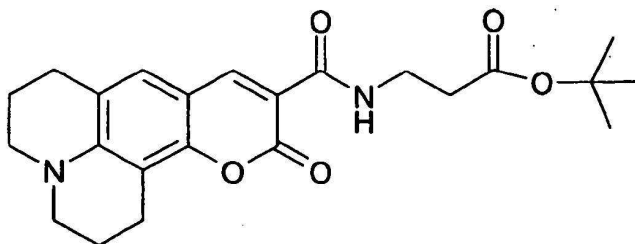
35

Se disolvió 0,1 mmoles de cumarina 343-ácido aminohexanoico en 20 ml de DMF y se añadió un exceso molar de 20% de N-hidroxisuccinimida y isocianuro de morfolinoetilo (0,12 mmoles). El éster de NHS se formó directamente y cuantitativamente. Se consiguió el aislamiento mediante la adición de triclorometano y el lavado de la fase orgánica dos veces con 50 ml de solución saturada de NaHCO₃ y una vez con H₂O saturada con NaCl. Se eliminó el solvente de las fases agrupadas al vacío en un evaporador giratorio y el residuo se liofilizó tras la disolución en dioxano.

40

II) Síntesis de marcaje reactivo - Síntesis de cumarina 343-éster de NHS de ácido aminopropiónico

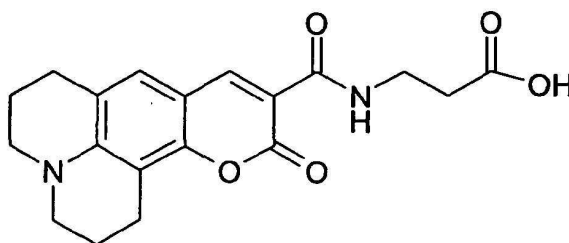
a) Cumarina 343-*tert*-butil-éster de ácido aminopropiónico



5 Se disolvieron en 5 ml de DMF seco 285 mg de cumarina 343 (1 mmol), 262 mg de *tert*-butil-éster de ácido aminopropiónico (1,2 mmoles) y 343 mg de HBTU (1,2 mmoles). Se añadieron 280 ml de trietilamina y la solución se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se evaporó el solvente al vacío en un evaporador giratorio y el producto se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice 60, Merck, fase móvil: acetato de etilo/metanol 2:1 (v/v)).

10

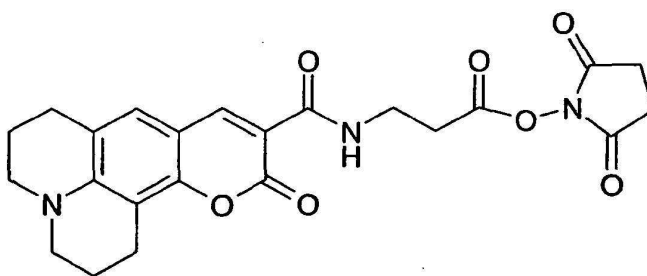
b) Cumarina 343-ácido aminopropiónico



15 El producto cromatografiado de la etapa a) se disolvió en 20 ml de ácido trifluoroacético y se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se evaporaron los componentes líquidos al vacío en un evaporador giratorio. Se añadió acetona y se obtuvo el producto puro en forma de precipitado (rendimiento: 138 mg (2 etapas)).

15

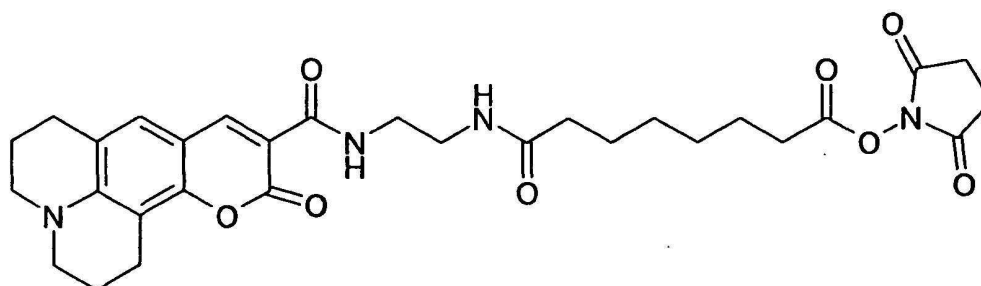
20 c) Cumarina 343-éster de NHS de ácido aminopropiónico



25 Se disolvieron 58,8 mg (0,165 mmoles) de cumarina 343-ácido aminopropiónico en 50 ml de triclorometano. A continuación, se añadieron 0,165 mmoles de isocianuro de morfolinoetilo y 0,165 mmoles de N-hidroxisuccinimida. Se agitó la solución durante dos horas a temperatura ambiente y después se añadieron 150 ml de triclorometano. La fase orgánica se lavó consecutivamente con 80 ml de solución al 5% (p/v) de NaHCO₃, 80 ml de HCl 1 M y 80 ml de H₂O. Tras secar la fase orgánica con Na₂SO₄, se eliminó el solvente al vacío en un evaporador giratorio (rendimiento: 35 mg).

30

III) Síntesis de marcaje - Cumarina 343-EDA-DSS

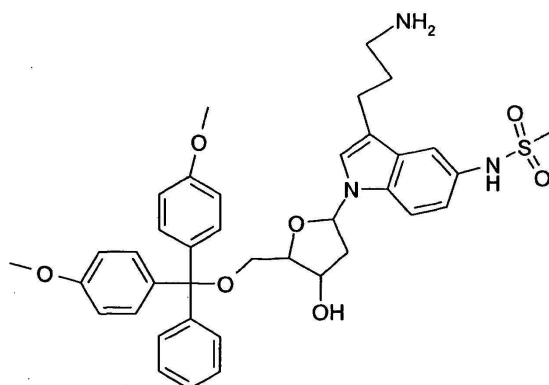


5 Para la síntesis de cumarina 343-EDA-DSS, se disolvió 1 mmol del material de partida cumarina 343-EDA (ver, por ejemplo, Webb R. y Corrie J.E.T., *Biophysical Journal* 81:1562-1569, 2001) en 5 ml de DMF seco y se añadió lentamente a una solución en DMF de 4 mmoles de DSS (suberato de disuccinimido) y 2 mmoles de trietilamina en 10 ml de DMF seco. La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se eliminó el solvente al vacío. El producto se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente: triclorometano:etil-éster de ácido acético 1:1 (v/v) con ácido acético al 1% (v/v)). (Rendimiento: 230 mg).

10 Ejemplo 1c

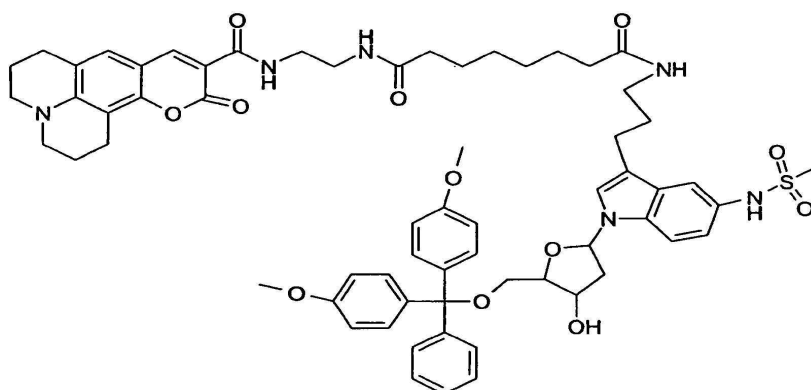
Síntesis de una fosoramidita marcada para la síntesis de oligonucleótidos

15 a) N-(3-(3-Amino-propil)-1-(5-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-etoximetil]-4-hidroxi-tetrahidro-furán-2-il)-1H-indol-5-il)-metanosulfonamida



20 Se disolvieron 490 mg (0,64 mmoles) de N-[3-(1-(5-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetoximetil]-4-hidroxi-tetrahydro-furán-2-il)-5-metanosulfonilamino-1H-indol-3-il)-propil]-2,2,2-trifluoro-acetamida en 20 ml de una solución de amonio 7 N en metanol. Se eliminó el solvente al vacío en un evaporador giratorio. El residuo (420 mg) se utilizó sin purificación adicional.

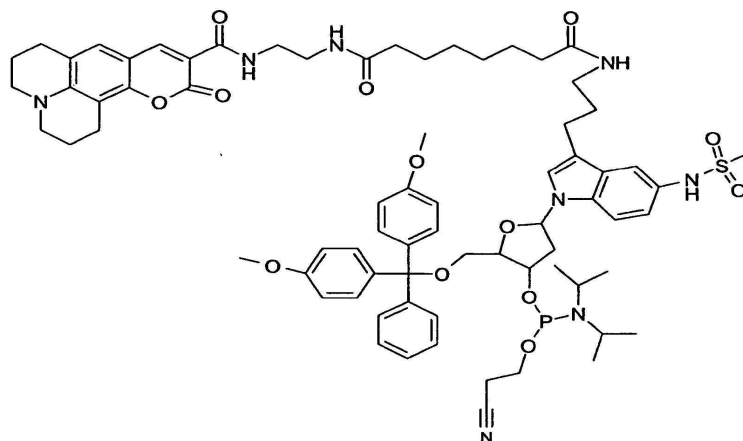
25 b) Acoplamiento de pigmento cumarina a base indol



30 Se añadieron 350 mg de éster de NHS de cumarina 343-EDA-DSS del Ejemplo 1b, parte III (0,60 mmoles) y se añadieron 0,67 ml (5 mmoles) de trietilamina a una solución de 420 mg (0,61 mmoles) de N-(3-(3-amino-propil)-1-(5-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-etoximetil]-4-hidroxi-tetrahidro-furán-2-il)-1H-indol-5-il)-metanosulfonamida en 20 ml de

diclorometano. Tras agitar durante 15 h a temperatura ambiente, se eliminó el solvente al vacío en un evaporador giratorio. El producto se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice 60, Merck, fase móvil: tolueno:acetato de etilo:metanol 4:5:1 (v/v/v) que contenía trietilamina al 0,2% (v/v) (rendimiento: 290 mg).

5 c) Síntesis de una fosforamidita de cumarina sulfometilamino-indol



10 Bajo una atmósfera de argón se añadieron 65,8 mg (62 ml, 0,27 mmoles) de aminofosfano de cloro-2-cianoetoxi-diisopropilo bajo agitación a una mezcla de 290 mg (0,25 mmoles) del producto de la etapa b) y 98 mg (130 ml, 0,76 mmoles) de N-etil-diisopropilamina en 20 ml de diclorometano a temperatura ambiente. Tras 60 minutos se eliminó el solvente al vacío en un evaporador giratorio y el producto se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice 60, Merck, fase móvil: diclorometano:acetona 1:1 (v/v) que contenía trietilamina al 0,2% (v/v) (rendimiento: 205 mg).

15 Ejemplo 2

Síntesis de oligonucleótidos

20 a) Método general de síntesis de sondas de hidrólisis doblemente marcadas

Se llevó a cabo la síntesis de oligonucleótidos en el rango del μmol en un sintetizador ABI 394. Se utilizaron fosforamiditas estándares tac-protégidas disponibles comercialmente de Proligo y se obtuvieron compuestos químicos para la síntesis estándar de Glen Research.

25 Como fase sólida se utilizó BHQ2 CPG (Biosearch) con el fin de obtener oligonucleótidos marcados con 3' BHQ2. Las fosforamiditas del Ejemplos 1a) y 1c) se llenaron en una botella apropiada, se diluyeron con acetonitrilo anhidro hasta una concentración de 100 $\mu\text{moles/l}$ se unieron a la posición extra del sintetizador. Se utilizó el ciclo de síntesis de 1 μmol por defecto del fabricante. Se extendió el tiempo de acoplamiento para las fosforamiditas 1a y 1c a 5 min.

30 b) Síntesis de sondas de hidrólisis marcadas doblemente utilizando 1c

35 La separación de los oligonucleótidos sintetizados según el método de a) del soporte sólido y la desprotección se llevaron a cabo con una solución acuosa de amonio al 33% (p/v) durante dos horas a temperatura ambiente. El solvente se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en tampón A (acuoso, solución de acetato de trietilamonio 0,1 M ajustada a pH 7,0). El oligonucleótido (marcado) se purificó mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna Oligo R3 (4,6x50 mm) mediante la utilización del tampón A: solución acuosa de acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,0, y tampón B: solución acuosa de acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,0: acetonitrilo 1:1 (v/v). El gradiente comprendía, con un caudal lineal de 1 ml/min, 2 minutos con 0% de B, llegando hasta 100% de B en 45 minutos. Las fracciones obtenidas de cada 2 minutos se analizaron mediante HPLC con un detector de matriz de diodos. Se agruparon las fracciones con una pureza de 90% o más y con bandas de absorción en 260, 450 y 579 nm. El solvente se eliminó al vacío mediante la utilización de una centrifuga de vacío. Se disolvió el residuo en agua doblemente destilada y después se eliminó nuevamente el solvente en una centrifuga de vacío. Este procedimiento se repitió tres veces. Se disolvió el pellet final en agua y se liofilizó.

45 c) Síntesis de un oligonucleótido modificado mediante la utilización del aminomodificador del Ejemplo 1 a (2-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-5-(5-metanosulfonilamino-3-[3-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-propil]-indol-1-il)-tetrahydrofurán-3-il-éster de ácido diisopropil-fosforamidoso 2-ciano-etilo y post-marcaje.

La separación de los oligonucleótidos sintetizados según el método de a) del soporte sólido y la desprotección se llevaron a cabo con una solución acuosa de amonio al 33% (p/v) durante dos horas a temperatura ambiente. El solvente se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en 600 ml de agua doblemente destilada y se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Se añadieron 60 ml de tampón de acetato sódico (3 M, pH 8,5). Tras la adición de 1,8 ml de etanol frío (4°C), la mezcla se almacenó a -15°C durante 3 h. La solución obtenida se centrifugó a 10.000xg durante 15 min. Se separó el sobrenadante mediante decantación. El pellet se lavó con 200 ml de etanol frío (4°C). Tras la centrifugación, se separó el sobrenadante mediante decantación. El pellet se disolvió en 400 ml de tampón de borato sódico (0,1 M, pH 8,5) y se marcó siguiendo procedimientos conocidos por el experto en la materia. De acuerdo con lo anterior, se añadió una solución de 1 mg de ésteres de NHS de un pigmento cumarina según el Ejemplo 1b en DMF (1 ml) y la mezcla se agitó durante 15 h a temperatura ambiente. Se eliminó el solvente bajo alto vacío (1 mbar) utilizando un evaporador giratorio. Se llevó a cabo la purificación tal como se ha indicado anteriormente. Con este método se sintetizaron los oligonucleótidos siguientes:

Cumarina 343 C3-metanosulfonilamino indol-CACCAGATCCACGCCCT TGATGAGC (SEC ID nº 01)-BHQ2 y
Cumarina 343 C6-metanosulfonilamino indol-CACCAGATCCACGCCCT TGATGAGC (SEC ID nº 01)-BHQ2

d) Síntesis de una sonda doblemente marcada internamente modificada mediante la utilización del aminomodificador del Ejemplo 1a (2-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-5-{5-metanosulfonilamino-3-[3-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)-propil]-indol-1-il]-tetrahydro-furán-3-il-éster de ácido diisopropil-fosforamidoso 2-ciano-etilo y post-marcaje.

A diferencia del procedimiento descrito anteriormente, se utilizó dT-CPG estándar (Glen Research nº 20-2130-41) como fase sólida y 5'-fluoresceína-fosforamidita (6-FAM) de Biosearch (nº de cat. BNS-5025-100) como marcaje 5'. Para la reacción de post-marcaje se disolvió 1 mg de succinimidil-éster de 6-carboxitetrametilrodamina (éster de NHS de 6-TAMRA) (Invitrogen nº C6123) en 0,75 ml de acetonitrilo y se hizo reaccionar durante la noche a temperatura ambiente con el oligonucleótido aminomodificado del Ejemplo 1a) en 0,25 ml de tampón de borato sódico (0,1 M, pH 8,5). El oligonucleótido doblemente marcado se purificó mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna de material PRP1 (d=2 cm) Condiciones cromatográficas: tampón A: solución 0,1 M de acetato de trietilamonio en agua ajustado a pH 7,0 con acetonitrilo al 5% (v/v); tampón B: acetato de trietilamonio 0,1 M en agua: acetonitrilo 1:1 (v/v); gradiente: de 0% a 40% de B en 60 min. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante HPLC con un detector de matriz de diodos. Se agruparon las fracciones con una pureza de 90% o más y con bandas de absorción en 260, 494 y 558 nm. Se recolectaron las fracciones de los picos que comprendían el oligonucleótido marcado y se eliminó el solvente utilizando una centrifuga de vacío. Se disolvió el residuo en agua doblemente destilada y después se eliminó nuevamente el solvente utilizando una centrifuga de vacío. Este procedimiento se repitió tres veces. Se disolvió el pellet resultante en agua y se liofilizó. Con este método se sintetizó el oligonucleótido siguiente:

5'-(6-FAM) CCCGCCGGAGACTCCAACATTG (SEC ID nº 02)(6-TAMRA-C3-metanosulfonilamino indol)TT -3'
EM-MALDI: PM [g/moles] calculado 8670,2; PM, observado: 8669,65.

Ejemplo 3

Detección de ADN vírico diana mediante PCR en tiempo real utilizando sondas de hidrólisis del Ejemplo 2

Se llevó a cabo una PCR utilizando un instrumento LightCycler® 480 con los equipos habituales. Se preparó la mezcla de PCR siguiendo las recomendaciones del fabricante insertadas en el kit de PCR genérico: LightCycler® 480 Probes Master.

Reactivos:

- LightCycler® 480 Probes Master.
- oligonucleótidos
cebador directo GCTCGAGTGCGAAAAACGTTT (SEC ID nº 03)
cebador inverso CGGGGCGCTCGGCTAAC (SEC ID nº 04)
Sonda Cumarina 343 -X -CACCAGATCCACGCCCTTGATGAGC -BHQ2
- X =conector C3- o C6 (SEC ID nº 01)
concentraciones finales de los cebadores: 0,3 µM, sonda: 0,05 µM
- ADN diana purificado

Protocolo del instrumento:

Configuración			
Formato de detección	Ajustes del filtro	Tipo de bloque	Volumen de reacción
Sonda de hidrólisis	Cyan 500 (450-	384	20 µl

500)				
Programas				
Nombre de programa	Ciclos	Modo de análisis		
Desnaturalización	1	Nada		
Amplificación	45	Cuantificación		
Enfriamiento	1	Nada		
Objetivos de temperatura				
Programa	Temp. objetivo (°C)	Modo de adquis.	Mantenimiento (mm:ss)	Tasa de cambio (°C/s)
Desnaturalización	95	None	05:00	4,8
Amplificación	95	None	00:10	4,8
	55	Single	00:25	2,5
	72	None	00:05	4,8
Objetivos de temperatura				
Programa	Temp. objetivo (°C)	Modo de adquis.	Mantenimiento (mm:ss)	Tasa de cambio (°C/s)
Enfriamiento	40	Nada	00:30	2,5

Resultados:

5 Se llevó a cabo un seguimiento de la amplificación del ADN diana mediante la medición de la fluorescencia de Cyan 500 des-inhibido (excitación a 450 nm, detección de la emisión a 500 nm) (figura 2).

10 La señal a 500 nm se incrementó durante la hidrólisis ya que la cumarina es cortada durante la PCR por la polimerasa Taq. Tal como pudo observarse a partir de la figura 2, el conector presenta una influencia sobre el incremento y la altura de la señal y, por lo tanto, las propiedades de la fluorescencia podrían adaptarse a diferentes aplicaciones. Para el formato de la sonda de hidrólisis resulta deseable disponer de un informador altamente fluorescente, mientras que para el multiplexado con el formato de sonda de hibridación podría resultar ventajoso que la señal del donante de FRET fuese débil.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Reactivo de marcaje mejorado

20 <130> 23615

<150> EP 06003366

<151> 2006-02-20

25 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

30 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

35 <223> Cumarina 343 C3-y C6-metanosulfonilamino indol-CACCAGATCCACGCCCT TGATGAGC-BHQ2

<400> 1

caccagatcc acgccctga tgagc 25

40 <210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 548 752 T3

<220>

<223> 5'-(6-FAM) CCC GCC GGA GAC TCC AAC ATT G (6-TAMRA-C3-metanosulfonilamino indol) TT -3'

<400> 2

5 cccgccggag actccaacat tg 22

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo

<400> 3

gctcgagtgc gaaaaaacgt tc 22

<210> 4

<211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

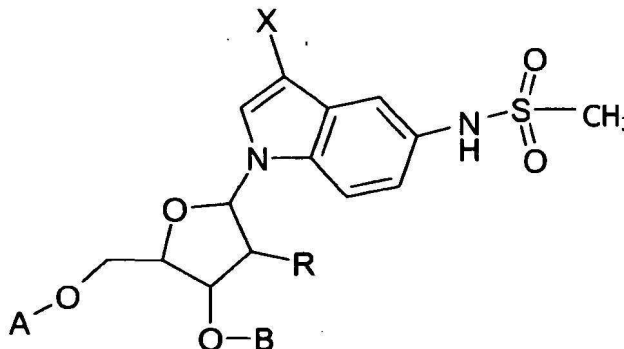
<223> cebador inverso

<400> 4

cggggcgctc ggctaac 17

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que presenta la fórmula:



5

caracterizado por que:

A y B son independientes uno de otro e independientes de R y X, y en la que A y B se seleccionan de entre el grupo que consiste de:

10

- (1) hidrógeno,
- (2) un grupo protector,
- (3) una fase sólida con un conector,
- (4) una fosforamidita,
- (5) un H-fosfonato,
- (6) un trifosfato,
- (7) un fosfato, y
- (8) una cadena de residuos nucleótidos,

15

con la condición de que A pero no B sea un trifosfato,

20

con la condición de que, en el caso de que A o B sea una fosforamidita o un H-fosfonato, el otro de A y B es un grupo protector y R no es OH,

con la condición de que únicamente uno de entre A y B es una fase sólida con un conector, y en la que:

25

R=H, OH, O-alquilo, O-alquenilo, O-alquinilo, O-grupo protector o F,

X es un grupo reactivo o un grupo reactivo protegido o un conector con un grupo reactivo o un conector con un grupo reactivo protegido o una entidad de señal o una entidad de señal protegida o un conector con una entidad de señal o un conector con una entidad de señal protegida.

30

2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que X es un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido, un grupo conector, un grupo conector protegido o una entidad de señal.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que R=H.

35

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que B es un grupo fosforamidato, un H-fosfonato o un VPC y A es un grupo protector.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que A es un grupo fosforamidato, un H-fosfonato o un VPC y B es un grupo protector.

40

6. Oligonucleótido que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

7. Oligonucleótido según la reivindicación 6, caracterizado por que dicho oligonucleótido comprende por lo menos dos compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

45

8. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizado por que dicho oligonucleótido comprende por lo menos dos entidades de señal.

9. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que dicha entidad de señal es una entidad fluorescente.

50

10. Método de síntesis de un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado por que** dicho método comprende la etapa de incorporar un compuesto según la reivindicación 4 o 5 durante la síntesis de oligonucleótidos.
- 5 11. Método de síntesis de un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de:
- 10 a) incorporar un compuesto según la reivindicación 4 o 5 durante la síntesis de oligonucleótidos, en la que X de dicho compuesto según la reivindicación 4 o 5 es un grupo reactivo o un conector con un grupo reactivo, y
- b) acoplar una entidad de señal con dicho grupo reactivo.

Fig. 1a

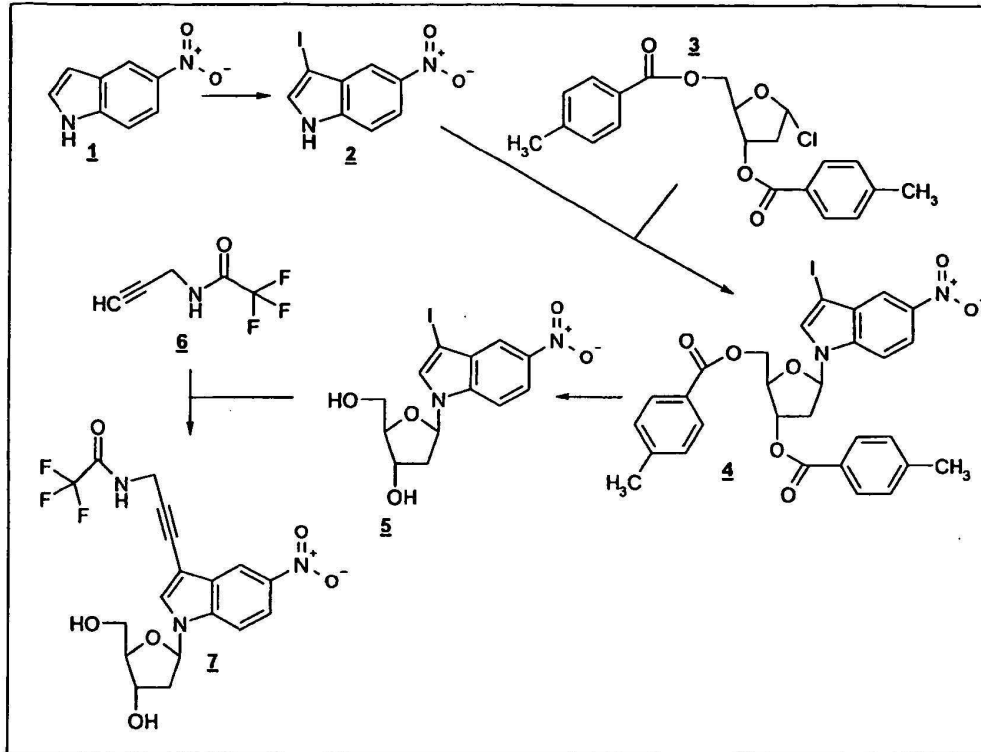


Fig. 1b

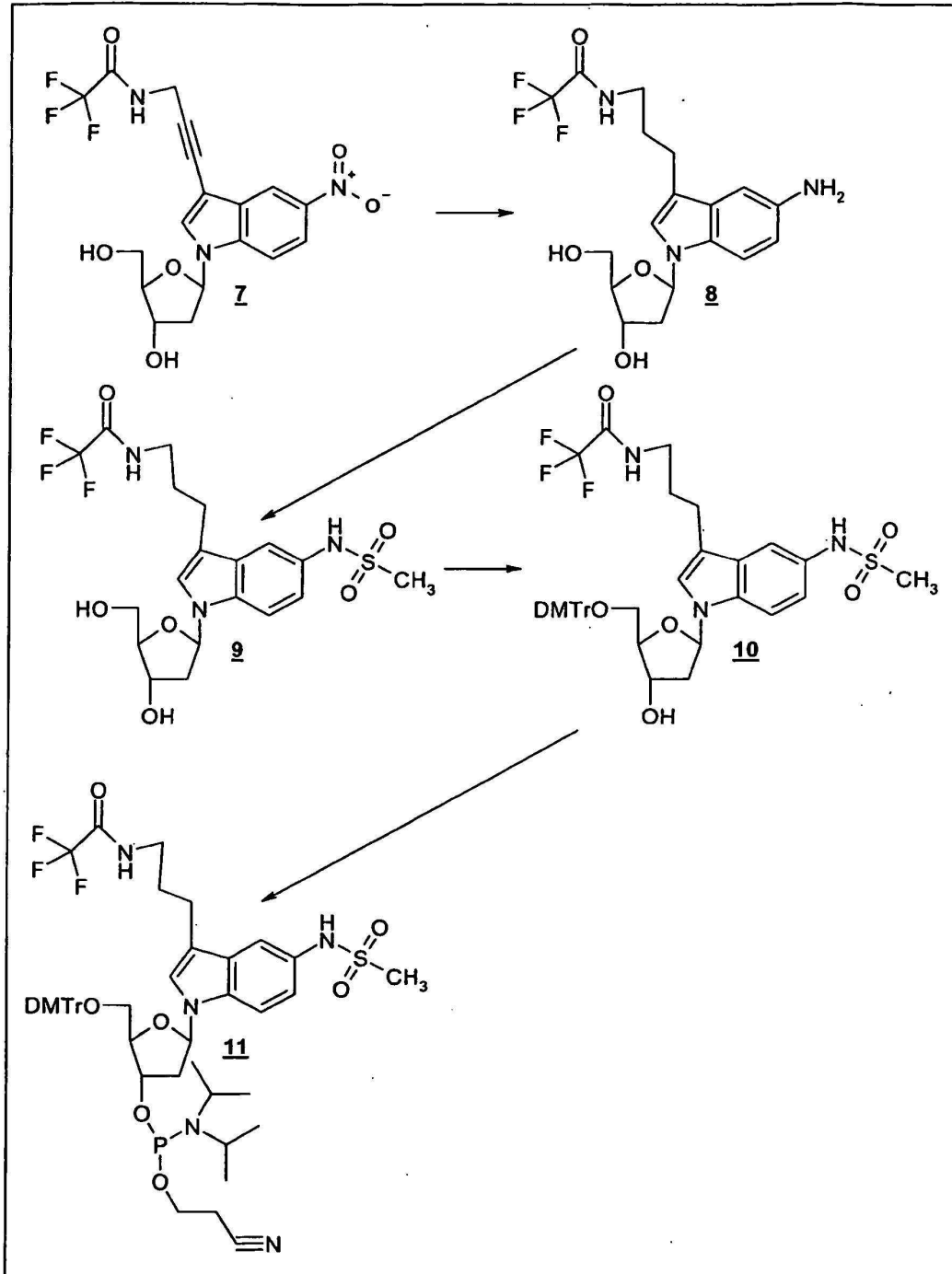


Fig. 1c

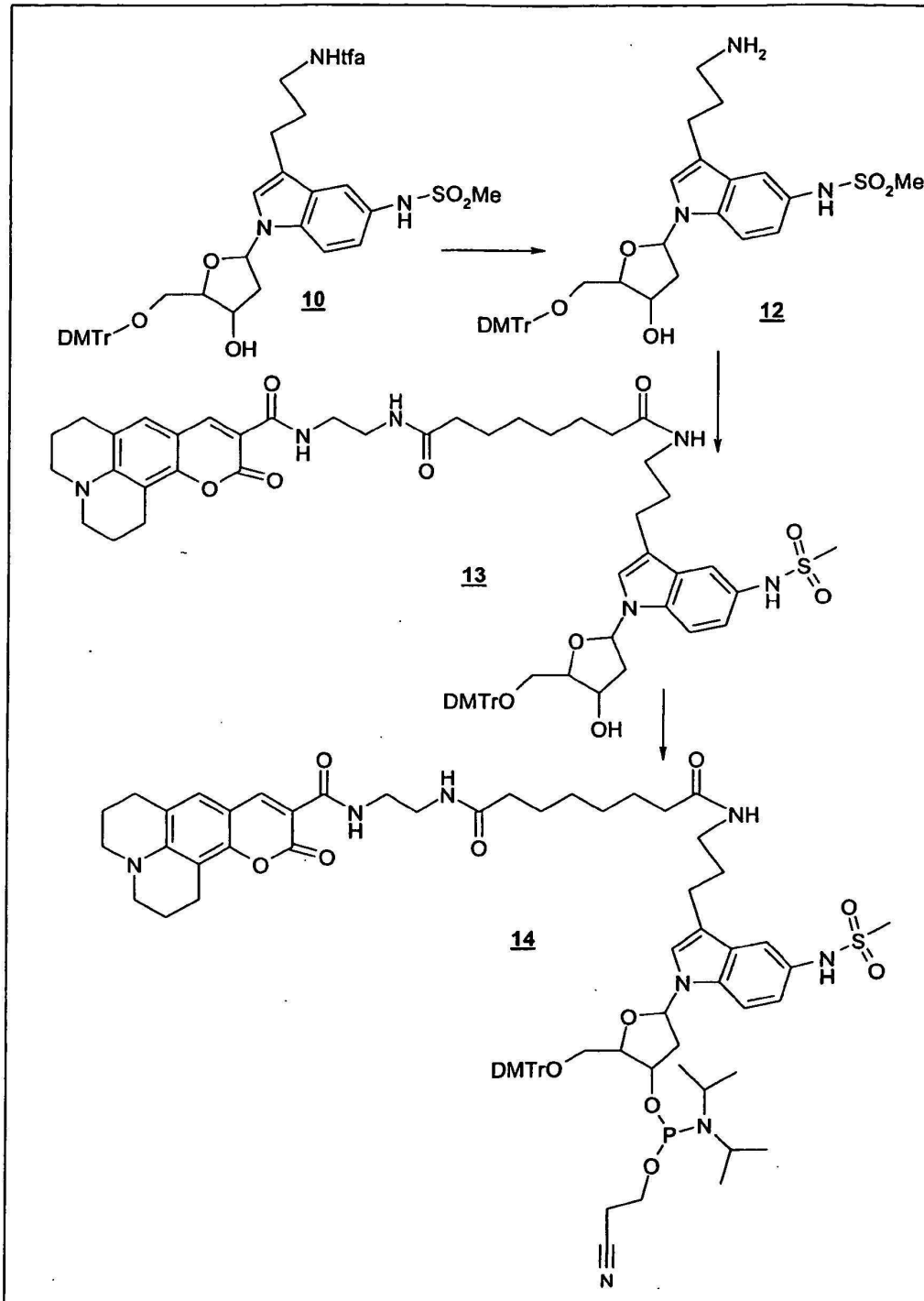


Fig. 2

