

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 304**

51 Int. Cl.:

C07D 279/18 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C09B 49/06 (2006.01)

C09B 21/00 (2006.01)

C07F 9/6547 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013 PCT/FR2013/050356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13128099**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013 E 13710497 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2820003**

54 Título: **Derivados del diaminofenotiazinio para el mercado de biomoléculas, procedimiento y soporte de marcado de oligonucleótidos y oligonucleótidos obtenidos**

30 Prioridad:

27.02.2012 FR 1251739

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

20.02.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I (50.0%)
43 boulevard du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHAIX, CAROLE y
DE CROZALS, GABRIEL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 602 304 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 del diaminofenotiazinio para el marcado de biomoléculas, procedimiento y soporte de marcado de oligonucleótidos y oligonucleótidos obtenidos.

La presente invención se refiere al campo técnico de los marcadores de biomoléculas. Más precisamente, la presente invención se refiere a nuevos derivados de diaminofenotiazinio de la misma familia que el azul de metileno, y de estructura adaptada para poder ser incorporados en oligonucleótidos, directamente cuando tiene lugar su síntesis. La invención tiene también por objeto los procedimientos de crecimiento de los oligonucleótidos que utilizan unos derivados de este tipo, los oligonucleótidos así obtenidos y unos soportes de síntesis para oligonucleótidos sobre los cuales se injertan unos derivados de diaminofenotiazinio.

El azul de metileno es una molécula con múltiples propiedades. Es, entre otros, una molécula electroactiva que tiene la propiedad de pasar de un estado reducido a un estado oxidado bajo la acción de un potencial de oxidación, liberando 2 electrones (Farjami, E.; Clima, L.; Gothelf, K. V.; Ferapontova, E. E. *Analyst* 2010, 135, 1443-1448). El azul de metileno es también una molécula coloreada, que absorbe a la longitud de onda de 665 nm en medio acuoso y una molécula fluorescente, cuya longitud de onda de excitación es de 665 nm y la de emisión es de 682 nm.

Por todas estas razones, el azul de metileno es un marcador biológico muy eficaz, ya sea para realizar una detección óptica o una detección electroquímica de la entidad biológica marcada.

En los años 80, se desarrollaron unas síntesis en fase sólida de las biomoléculas y en particular de los péptidos y de los oligonucleótidos. El procedimiento químico más utilizado actualmente para la síntesis de los oligonucleótidos se conoce bajo el nombre de "método de las fosforamiditas". Este método consiste en añadir, de manera secuencial, un único nucleótido a la vez, con una cadena creciente de oligonucleótidos. Un grupo protector de las funciones hidroxilo en condiciones de síntesis de los oligonucleótidos tales como, por ejemplo, un grupo dimetoxitritilo, se coloca en el extremo 5' de una cadena creciente de oligonucleótido que está enganchada a su vez por su extremo 3' a un soporte sólido. Este grupo protector se elimina gracias a un tratamiento ácido, por ejemplo con ácido tricloroacético, y el extremo 5' del oligonucleótido así liberado se acopla a continuación con un sintón nucleotídico sustituido en su extremo 3' con un derivado fosforamidita, lo cual permite incrementar la cadena nucleotídica. El agente de activación de la reacción de acoplamiento es, por ejemplo, el tetrazol que reacciona con la función fosforamidita del sintón, formando *in situ* un intermedio muy reactivo frente a la función alcohol desprotegida presente en el extremo 5' del oligonucleótido fijado al soporte. Es posible asimismo utilizar en lugar de un grupo fosforamidita, un grupo fosfodiéster (Reese C.B., Titmas R.C., Yau L., *Tetrahedron Let* 1978, 30, 2727-2730; Efimov, V.A., Burgakova, A.A., Dubey, I.Y., Polushin, N.N., Chakhmakhcheva, O.G., Orchinnikov, Y.A., *Nucl Acids, Res.*, 1986, 14, 6525-6540) o hidrogenofosfonato (Froehler, B.C., Matteucci, M.D. *Tetrahedron Let.* 1986, 27, 469-472). Para más detalles sobre estas técnicas, se podrá hacer referencia a "Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry", volumen 1, editores: S. L. Beaucage, D. E. Bergstrom, G. D. Glick, R. A. Jones, John Wiley & Sons, Inc., 2004; "Protocols for oligonucleotides and analogs", volumen 20, editor: S. Agrawal, *Methods in molecular biology*, Humana Press, 1993. Es interesante introducir en esta fase unos sintones nucleotídicos modificados que contienen, por ejemplo, un marcador de tipo fluorescente o electroquímico.

En los sintetizadores automáticos, la secuencia de una reacción puede ser repetida un gran número de veces, por ejemplo hasta 150 veces. En cuanto se sintetiza un oligonucleótido de secuencia deseada, éste se libera del soporte por un tratamiento básico que permite también eliminar los diferentes grupos protectores. El oligonucleótido obtenido puede entonces ser purificado por HPLC o por electroforesis sobre gel.

La química de síntesis de los oligonucleótidos en fase sólida necesita por lo tanto una etapa final de desprotección de los nucleótidos que forman el oligonucleótido y de desenganche del soporte, en medio básico, típicamente en una solución acuosa de NH₄OH al 30% en volumen o de K₂CO₃ a 0,05M. Estos tratamientos no son compatibles con un injerto previo del azul de metileno sobre el oligonucleótido cuando tiene lugar su síntesis, ya que el azul de metileno es una fenotiazina sustituida por dos dimetilaminas que no es estable en medio básico. En efecto, los grupos dimetilamina se escinden rápidamente en medio básico conllevando la pérdida de las propiedades electroquímicas y colorantes (Mills A., Hazafy D., Parkinson J., Tuttle T., Hutchings M. G., *Effect of alkali on methylene blue (Cl. Basic Blue 9) and other thiazine dyes*, *Dyes and Pigments* 2011, 88, (2), 149-155).

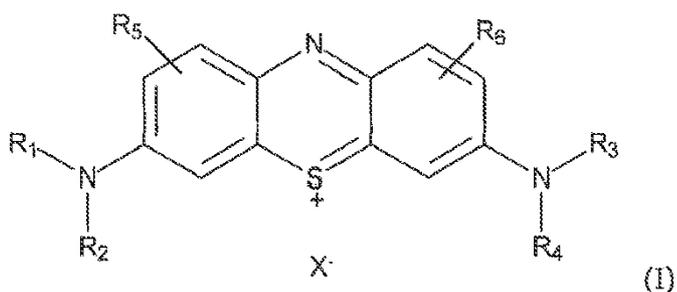
En la actualidad, las estrategias propuestas para injertar un derivado de azul de metileno sobre una biomolécula del tipo oligonucleótido hacen intervenir un acoplamiento pos-síntesis sobre la biomolécula, es decir un acoplamiento en una etapa final sobre la biomolécula ya formada. Se ha sintetizado un derivado éster activado del azul de metileno para ser acoplado sobre una biomolécula portadora de funciones amina primaria (Jähnchen J., Purwanto M. G. M., Weisz K., *NMR studies on self-complementary oligonucleotides conjugated with methylene blue*, *Biopolymers* 2005, 79, (6), 335-343; Farami, *Anal. Chem.* 2011; Hansen, *JOC*, 2010). Los trabajos de Rowe *et al.* (Aaron Rowe, Kelly N Chuh, Arica A Lubin, Erin A Miller, Brett M Cook, Daniel N Hollis, y Kevin W. Plaxco, *Anal. Chem.*, 2011, 83 (24), 9462-9466) prevén por su parte injertar sobre un oligonucleótido ya formado azul de metileno gracias a un enlace peptídico o un enlace hidrazona. También se ha descrito un derivado 8-amino azul de metileno para efectuar un acoplamiento sobre un polímero portador de funciones ácido (Uwe Moller, Frank Schubert, y Dieter Cech,

Bioconjugate, 1995, 6, 174-178).

De manera general, se ha considerado en la técnica anterior que el azul de metileno tenía que ser acoplado en la última etapa de la síntesis, para limitar los riesgos de degradación encontrados en unos medios demasiado agresivos que utilizan una base o un agente reductor utilizado en las síntesis de biomoléculas, y en particular en el caso de la síntesis de los oligonucleótidos.

En el marco de la invención, los inventores proponen unos nuevos derivados de diaminofenotiazinio que pueden ser directamente integrados en unas biomoléculas, y en particular en unos oligonucleótidos cuando tiene lugar su síntesis.

En este contexto, la presente invención se refiere a unos derivados de diaminofenotiazinio de fórmula (I):



en la que:

- uno de los grupos R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , representa $-A_1-OR_7$, representando A_1 una cadena alqueno lineal o ramificada que comprende de 2 a 12 carbonos, estando los átomos de oxígeno y de nitrógeno separados por lo menos por dos átomos de carbono consecutivos, y representando R_7 un grupo fosforado capaz de reaccionar con un hidroxilo libre en unas condiciones de síntesis de los oligonucleótidos, formando dicho grupo con OA_1 al que está unido, un grupo fosforamidita, fosfodiéster o hidrogenofosfonato,
- los otros grupos R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro:
 - * un grupo $-A_2OR_8$, representando A_2 una cadena alqueno lineal o ramificada que comprende de 2 a 12 carbonos, estando los átomos de oxígeno y de nitrógeno separados por lo menos por dos átomos de carbono consecutivos, y representando R_8 un grupo protector de las funciones hidroxilo en unas condiciones de síntesis de los oligonucleótidos seleccionado de entre los grupos tritilo, 4-O-monometoxitritilo, 4,4'-O-dimetoxitritilo, terc-butildimetilsililo, acetilo, trifluoroacetilo, 9-fenilxanten-9-ilo y fluorenilmetiloxicarbonilo,
 - * un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono,
 - * o bien R_1 y R_2 o R_3 y R_4 están unidos entre sí para formar con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo piperidinilo o pirrolidinilo,
- R_5 y R_6 , idénticos o diferentes, representan, independientemente uno del otro, un átomo de hidrógeno, de cloro, de bromo, de yodo o de flúor, o un grupo alquilo de 1 a 12 átomos de carbono, un grupo alqueno de 2 a 12 átomos de carbono, un grupo alquino de 2 a 12 átomos de carbono, un grupo acilo o un grupo fenilo,
- X^- representa un anión, seleccionado preferentemente de entre Cl^- , I^- , ClO_4^- , NO_3^- .

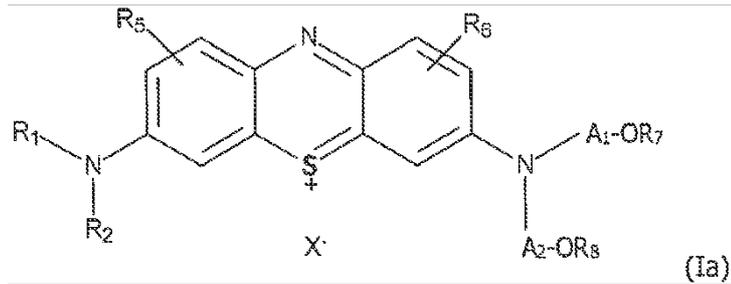
En el marco de la invención, los grupos dimetilamina del azul de metileno han sido sustituidos por unas cadenas más largas y más voluminosas, con el fin de obtener un derivado de azul de metileno que, una vez integrado en un oligonucleótido, es más estable, en particular en condiciones básicas. Un derivado de este tipo es por lo tanto compatible con una utilización en la síntesis de los oligonucleótidos soportados que necesitan como etapa final un tratamiento básico para liberar el oligonucleótido formado del soporte de síntesis y/o desproteger los nucleótidos.

Además, se ha constatado asimismo que estas modificaciones químicas no afectaban, de manera problemática, a las propiedades oxidorreductoras de los derivados de diaminofenotiazinio así obtenidos, lo cual confirma así su interés para el marcado de los oligonucleótidos, incluso de otras biomoléculas tales como los péptidos.

Según unos modos de realización preferidos, en particular en términos de estabilidad, A_1 y A_2 (cuando está presente) son unas cadenas alqueno lineales o ramificadas, en las que de 2 a 6 átomos de carbono consecutivos separan los átomos de oxígeno y de nitrógeno.

En el marco de la invención, es posible que tres de los grupos R_1 , R_2 , R_3 y R_4 representen un grupo $-A_2OR_8$ tal como se define en la invención. En este caso, es posible injertar varios nucleótidos en un mismo derivado de diaminofenotiazinio, lo cual permite sintetizar unos oligonucleótidos ramificados. Según otros modos de realización, por lo menos uno de los grupos R_1 , R_2 , R_3 y R_4 no representa un grupo $-A_2OR_8$ y el o dichos grupos R_1 , R_2 , R_3 y R_4 diferente(s) de $-A_1OR_7$ y de $-A_2OR_8$ representa(n) un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono. En este caso, los derivados de diaminofenotiazinio pueden responder a una de las formulas dadas a continuación:

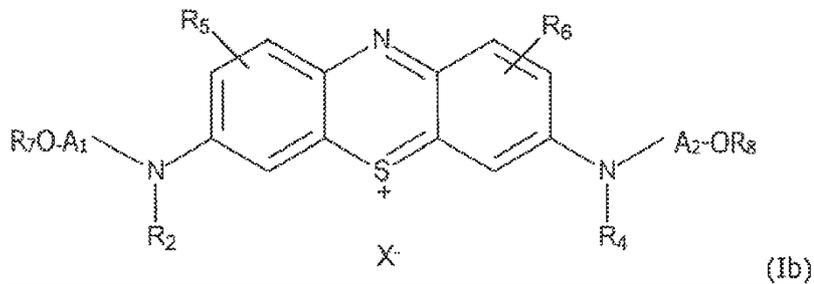
10 - fórmula (Ia):



en la que:

- 15
- A_1 , A_2 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 y X' son tales como se definen para los compuestos de fórmula (I),
 - R_1 y R_2 , idénticos o diferentes, representan independientemente entre sí un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono, o R_1 y R_2 son enlazados entre sí para formar, con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo piperidinilo o pirrolidinilo;
- 20

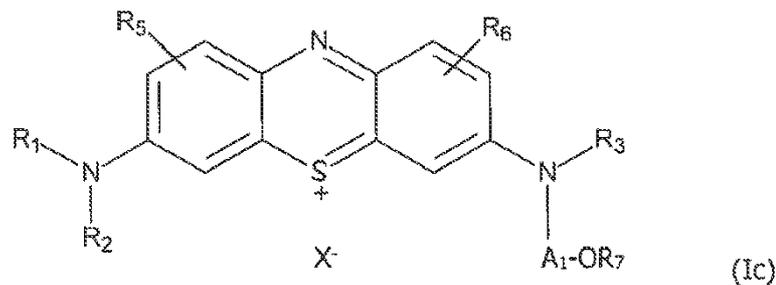
- fórmula (Ib):



en la que:

- 25
- A_1 , A_2 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 y X' son tales como los definidos para los compuestos de fórmula (I),
 - R_2 y R_4 , idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono; y
- 30

35 - fórmula (Ic):



en la que:

- A₁, R₅, R₆, R₇, y X⁻ son tales como los definidos para los compuestos (I),
- R₁ y R₂, idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono, o R₁ y R₂ están enlazados entre sí para formar con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo piperidinilo o pirrolidinilo;
- R₃ representa un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono.

Cualquiera que sea el compuesto de fórmula (I), (Ia), (Ib) o (Ic) descrito anteriormente, R₅ y R₆ representan, por ejemplo, un átomo de hidrógeno, como en el caso del azul de metileno.

El grupo R₇ puede ser del tipo -P(NR'aR'b)R'c (y forma por lo tanto una fosforamidita con -OA₁-), -P(O)(OH)(OR'd) (y forma por lo tanto un fosfodiéster con -OA₁-) o -P(O)(OH)H (y forma por lo tanto un hidrogenofosfonato con -OA₁-), en los que R'a, R'b, R'c y R'd son, por ejemplo, unos grupos alquilo o fenilo eventualmente sustituidos. De manera ventajosa, en los compuestos de fórmula (I), (Ia), (Ib) y (Ic) descritos anteriormente, uno de los grupos R₁, R₂, R₃ y R₄ representa un grupo -A₁-OR₇ en el que R₇ representa un grupo -P[N(iPr)₂](OCH₂CH₂C≡N) (siendo 'Pr = isopropilo) y forma por lo tanto una fosforamidita con OA₁ y A₁ es tal como se ha definido anteriormente, R₇ puede representar más generalmente un grupo -P{N[alquilo(C₂-C₁₂)]₂}(OCH₂CH₂C≡N), R₇ también puede representar un grupo tal como el O-(2-clorofenilfosfato) o el O-2-(1-metilimidazol-2-il)fenilfosfato, de manera que forme un fosfodiéster con OA₁, R₇ puede representar asimismo un grupo -P(O)(OH)H.

Unos derivados de diaminofenotiazinio de este tipo podrán ser preparados según unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia, en particular por analogía con las técnicas descritas en los ejemplos. En lo esencial, es posible formar unos derivados aminados de fenotiazinio por reacción, en particular a temperatura ambiente, de una sal de fenotiazinio, tal como el tetrayoduro de fenotiazinio, con una dialquilamina, una dihidroxialquilamina o una alquil(hidroxialquil)amina en un alcohol tal como el metanol o un disolvente clorado tal como el diclorometano.

La relación molar amina/sal de fenotiazinio será aproximadamente igual a 2 cuando se desea injertar una sola amina sobre el ciclo y será superior a 2 cuando se desea injertar dos aminas idénticas a uno y otro lado del ciclo fenotiazinio (caso de los compuestos de fórmula (Ib) en los que A₁=A₂ y R₂=R₄). Para los compuestos en los que es necesario injertar dos aminas diferentes a uno y otro lado del ciclo fenotiazinio (caso de los compuestos (Ia) y de los compuestos (Ib) en los que A₁ es diferente de A₂ y/o R₂ es diferente de R₄), se realizará una nueva reacción con otra amina en unas condiciones análogas. Por lo menos una de las aminas utilizadas está sustituida por un grupo hidroxialquilo. Se realiza después un acoplamiento sobre la función hidroxilo con por lo menos un derivado halogenado, y en particular un derivado clorado Cl-R₇ o Cl-R₈, para obtener la función -O-R₇ u -O-R₈ deseada. Un acoplamiento de este tipo se realiza en condiciones bien conocidas por el experto en la materia, en particular en presencia de diisopropiletilamina en acetonitrilo. Se podrán realizar dos acoplamientos sucesivos para obtener dos funcionalizaciones diferentes, en el caso en el que están presentes por lo menos dos funciones hidroxilo.

Los derivados según la invención podrán ser integrados en un oligonucleótido, en un procedimiento de síntesis soportado clásico, en lugar de un nucleótido.

El término "oligonucleótido" designa una cadena de por lo menos 2 nucleótidos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o los dos), naturales o modificados, susceptibles de hibridarse, en unas condiciones apropiadas de hibridación, con un oligonucleótido por lo menos parcialmente complementario. Por "nucleótido" se entiende un compuesto orgánico que consiste en una base purina o pirimidina enlazada a una osa (ribosa o desoxirribosa) y a un grupo fosfato. Por "nucleótido modificado" se entiende, por ejemplo, un nucleótido que comprende una base modificada y/o que comprende una modificación a nivel del enlace internucleotídico y/o a nivel del esqueleto. A título de base modificada, se puede citar la inosina, la metil-5-desoxicitidina, la dimetilamino-5-desoxiuridina, la diamino-2,6-purina y la bromo-5-desoxiuridina. Para ilustrar un enlace internucleotídico modificado, se pueden mencionar los enlaces fosforotioato, N-alkilfosforamidato, alkilfosfonato y alkilfosfotriéster.

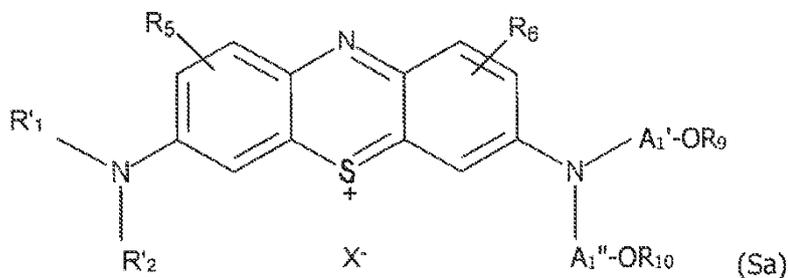
La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de marcado de un oligonucleótido por un derivado de diaminofenotiazinio según la invención, que comprende el crecimiento de un oligonucleótido injertado en un soporte sólido, y la sustitución de uno o varios nucleótidos por uno o varios de dichos derivados de diaminofenotiazinio según la invención, antes de que el oligonucleótido sea desenganchado del soporte sólido. Por lo menos una sustitución por un derivado de diaminofenotiazinio se puede llevar a cabo en posiciones 3' o 5', en el primer o el último nucleótido, respectivamente. Es posible asimismo realizar la inserción de un derivado de diaminofenotiazinio en el interior de la cadena nucleotídica, siendo la sustitución de un sintón nucleotídico fosforamidita, fosfodiéster o hidrogenofosfonato por un derivado de diaminofenotiazinio según la invención, realizada entonces antes del final del crecimiento del oligonucleótido. En el ámbito de la invención, es posible insertar el derivado de diaminofenotiazinio en cualquier sitio en la cadena nucleotídica, dado que este último puede ser introducido directamente cuando tiene lugar el crecimiento de los oligonucleótidos. Es posible incorporar un derivado de diaminofenotiazinio según la invención en cualquiera de las posiciones de una secuencia oligonucleotídica.

Además, es posible incorporar un número importante de derivados de diaminofenotiazinio dentro de una secuencia oligonucleotídica, por síntesis soportada. Según un modo de realización particular, se efectúan por lo menos dos inserciones, por ejemplo consecutivas. Conviene señalar que un proceso de marcado de este tipo ya se había descrito en la solicitud WO 03/068787 en el caso de derivado ferroceno. No obstante, la sustitución de un marcado de tipo ferroceno por un derivado de diaminofenotiazinio podrá aportar una mejora notable, en términos de rendimiento del marcado. En efecto, los marcados según la invención transfieren dos electrones por onda de oxidación, en lugar de un electrón transferido en el caso del ferroceno. Los derivados de diaminofenotiazinio son también más estables frente a las condiciones oxidantes y más sensibles a su entorno estérico e iónico, en el medio.

5 La presente invención tiene asimismo por objeto los oligonucleótidos marcados susceptibles de ser obtenidos mediante el procedimiento de marcado según la invención o a partir de los soportes descritos a continuación.

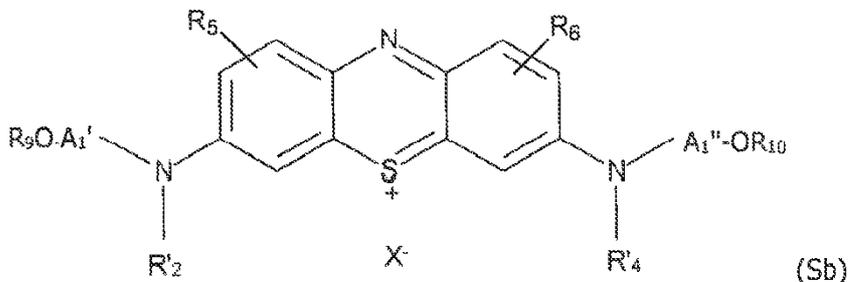
10 Los derivados de diaminofenotiazinio según la invención son muy reactivos y también pueden ser utilizados para reaccionar eficazmente con otro tipo de biomolécula, polímero o un soporte plano o particulado, portador de uniones alcohol o amina en particular.

15 La invención se refiere asimismo a los soportes de síntesis de oligonucleótidos, que comprenden por lo menos un derivado de diaminofenotiazinio injertado de manera covalente en superficie del soporte y que responde a la fórmula:



20 en la que:

- 25 - R₅, R₆ y X⁻ son tales como se definen para los compuestos de fórmula (I),
- R'₁ y R'₂, idénticos o diferentes, representan, independientemente el uno del otro, un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono, o R₁ y R₂ están enlazados entre sí para formar con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo piperidinilo o pirrolidinilo,
- 30 - A₁' y A₁'', idénticos o diferentes, representan, independiente el uno del otro, una cadena A₁ tal como se define para los compuestos de fórmula (I), y
- R₉ representa un grupo protector de las funciones hidroxilo en las condiciones utilizadas habitualmente en la síntesis de los oligonucleótidos seleccionados de entre los grupos tritilo, 4-O-monometoxitritilo, 4,4'-O-dimetoxitritilo, terc-butildimetilsililo, acetilo, trifluoroacetilo, 9-fenilxanten-9-ilo y fluorenilmetiloxicarbonilo; y
- 35 - R₁₀ representa -CO-A₃-CO-NH-soporte, representando A₃ una cadena alquilenos lineal o ramificada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono; o



40 en la que:

- 45 - R₅, R₆ y X⁻ son tales como se definen para los compuestos de fórmula (I),
- R'₂ y R'₄, idénticos o diferentes, representan, independientemente el uno del otro, un grupo alquilo de 2 a 12

átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono,

- A_1' y A_1'' , idénticos o diferentes, representan, independiente el uno del otro, una cadena A_1 tal como se define para los compuestos de fórmula (I), y
- R_9 representa un grupo protector de las funciones hidroxilo en las condiciones utilizadas habitualmente en la síntesis de los oligonucleótidos seleccionados de entre los grupos tritilo, 4-O-monometoxitritilo, 4,4'-O-dimetoxitritilo, terc-butildimetilsililo, acetilo, trifluoroacetilo, 9-fenilxanten-9-ilo y fluorenilmetiloxicarbonilo; y
- R_{10} representa -CO- A_3 -CO-NH-soporte, representando A_3 una cadena alquileo lineal o ramificada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono.

El soporte se puede seleccionar en particular de entre las resinas, en particular de entre las resinas a base de poliestireno, poli(acrilamida), polietilenglicol, celulosa, polipropileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, los polímeros hidrófilos sintéticos o naturales, los vidrios y sílices de porosidad controlada, las bolas de vidrio, los geles de sílice. Este tipo de soporte comprende generalmente unas funciones amina de superficie que serán modificadas para hacer aparecer unas funciones ácido de superficie que podrán entonces ser acopladas a unas funciones hidroxialquilamino portadas por el heterociclo para conducir a los soportes (Sa) y (Sb) anteriores.

Se recuerdan algunas definiciones utilizadas en la descripción de la invención.

Por "alquilo" se entiende un grupo hidrocarbonado monovalente saturado, lineal o ramificado. A título de ejemplos de grupo alquilo, se podrán citar los grupos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, n-hexilo.

Por "alqueno" se entiende un grupo hidrocarbonado monovalente insaturado que comprende por lo menos un doble enlace, lineal o ramificado.

Por "alquino" se entiende un grupo hidrocarbonado monovalente insaturado que comprende por lo menos un triple enlace, lineal o ramificado.

Por "alquileo" se entiende un grupo hidrocarbonado bivalente saturado, lineal o ramificado. A título de ejemplo de grupo alquileo que comprende de 2 a 12 átomos de carbono, se pueden citar $-(CH_2)_2-$, $-CH_2-CH(CH_3)-$, $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_7-$, $-(CH_2)_8-$, $-(CH_2)_9-$, $-(CH_2)_{10}-$, $-(CH_2)_{11}-$, $-(CH_2)_{12}-$, $-CH_2-CH(CH_2CH_3)-$, $-(CH_2)_2-CH(CH_2CH_3)-$, etc.

"Estando los átomos de oxígeno y de nitrógeno separados por lo menos por dos átomos de carbono consecutivos" significa que una cadena alquileo lineal que comprende por lo menos dos átomos de carbono separan el átomo de oxígeno del átomo de nitrógeno (se obtiene por lo tanto por lo menos la cadena -N-C-C-O-), comprendiendo los otros átomos de carbono, en el caso de una cadena alquileo ramificada más de 2 átomos de carbono, que pueden entonces encontrarse en las ramificaciones.

A título de ejemplo de grupo protector de las funciones hidroxilo en unas condiciones de síntesis de los oligonucleótidos, se selecciona por ejemplo de entre los grupos tritilo, 4-O-monometoxitritilo, 4,4'-O-dimetoxitritilo, terc-butildimetilsililo, acetilo, trifluoroacetilo, 9-fenilxanten-9-ilo (pixilo) (el grupo protector pixilo se describe en particular en el documento Chattopadhyaya y Reese, Chem. Soc Chem, Comm., 1978, 639-640) y fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc).

A título de ejemplo de condiciones de síntesis de los oligonucleótidos, se puede hacer referencia en particular a Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, volumen 1, editores: S. L. Beaucage, D. E. Bergstrom, G. D. Glick, R. A. Jones, John Wiley & Sons, Inc., 2004; Protocols for oligonucleotides and analogs.

De manera general, un procedimiento de síntesis de oligonucleótido sobre soporte sólido comprende las etapas siguientes que corresponden al primer ciclo del procedimiento:

- 1) Disponer de un soporte sobre el cual un nucleósido portador de una función -OH protegida, por ejemplo por un grupo tritilo, 4-O-monometoxitritilo, 4,4'-O-dimetoxitritilo, terc-butildimetilsililo, acetilo, trifluoroacetilo, 9-fenilxanten-9-ilo o fluorenilmetiloxicarbonilo,
- 2) Desproteger la función hidroxilo, mediante un tratamiento ácido, por ejemplo gracias a una solución de ácido tricloroacético o ácido dicloroacético, a una concentración del 2 al 3% en masa en un disolvente tal como el diclorometano,
- 3) Añadir una solución de un sintón nucleotídico portador de una función fosforamídica y de una función hidroxilo protegida, por ejemplo a una concentración de 0,05 a 0,2 M (= mol/l), en presencia de un agente de acoplamiento tal como el tetrazol, el etiltiotetrazol, el 4,5-dicianimidazol, el sacarina 1-metilimidazol o el 5-

benciltiotetrazol, por ejemplo a una concentración de 0,2 a 0,5 M, en un disolvente tal como el acetonitrilo,

4) Bloquear las funciones hidroxilo que no han reaccionado con las funciones fosforadas reactivas, por acción de anhídrido acético o de anhídrido fenoxiacético que corresponde a unas condiciones más suaves, eventualmente en presencia de metilimidazol o de dimetilaminopiridina, en un disolvente tal como el tetrahidrofurano o una mezcla tetrahidrofurano/piridina o tetrahidrofurano/lutidina;

5) Oxidación del fósforo por acción de una solución de yodo, por ejemplo a una concentración de 0,02 a 0,1 M, por ejemplo en una mezcla tetrahidrofurano/piridina/agua, o por acción de un peróxido, por ejemplo el terc-butilhidroperóxido, el cumeno hidroperóxido, el peróxido de hidrógeno o el bis-trimetilsilil peróxido, por ejemplo a una concentración de 1 a 2 M en una mezcla decano/diclorometano, o por acción de un oxidante no acuoso como la (10-alcanforsulfonil)-oxaziridina, por ejemplo a una concentración de 0,1 a 0,5 M en acetonitrilo.

De manera clásica, las aminas de los sintones nucleotídicos utilizados están protegidas, con el fin de evitar cualquier reacción parásita con las funciones fosforadas de los sintones nucleotídicos puestos en reacción durante la síntesis del oligonucleótido (etapa 3). Estas técnicas de protección son bien conocidas por el experto en la materia. En particular, en el caso de la adenosina, la función amina exocíclica podrá estar protegida por un grupo fenoxiacetilo, en el caso de la citidina, la función aminada exocíclica podrá estar protegida por un grupo acetilo, en el caso de la guanosina, la función aminada exocíclica podrá estar protegida por un grupo isopropilfenoxiacetilo, etc.

Todas estas etapas pueden ser realizadas a temperatura ambiente (22°C). Los nucleótidos están protegidos a lo largo de la síntesis nucleotídica, según unos métodos bien conocidos por el experto en la materia.

En general, las etapas 2), 3), 4) y 5) están seguidas de un aclarado para eliminar los reactivos que no han reaccionado.

Se repiten las etapas 2) a 5) tantas veces como sea necesario, con los sintones nucleotídicos seleccionados que pueden variar de un ciclo a otro, para obtener la secuencia de oligonucleótido deseada.

En el caso en el que se utiliza un sintón nucleotídico portador de una función fosfodiéster, en la etapa 3), el sintón nucleotídico portador de una función fosfodiéster se acopla en presencia de 1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) y de 1-metilimidazol. No hay etapa de oxidación 5). Además, al final de la síntesis, previamente al tratamiento básico final, se realiza un tratamiento con una solución de sin-2-nitrobenzaldoxima y de 1,1,3,3-tetrametilguanidina en dioxano acuoso, como se describe por ejemplo en el capítulo 4 del libro editado por Gait, M., *Oligonucleotide synthesis. A practical approach* (1984) IRL Press, Oxford.

En el caso en el que se utiliza un sintón nucleotídico portador de una función hidrogenofosfonato, en la etapa 3), el sintón nucleotídico portador de una función hidrogenofosfonato se acopla en presencia de cloruro de pivaloilo en solución en acetonitrilo. Se repiten las etapas 2) a 4) tantas veces como sea necesario para obtener la secuencia de oligonucleótido deseada. La etapa de oxidación 5) se realiza al final de la síntesis.

A continuación, se realiza una etapa final en medio básico, por ejemplo o bien gracias a una solución básica de sosa, de amoníaco, o de carbonato de potasio o de una solución de metilamina y de amoníaco o de una solución de diisopropilamina y de β -mercaptoetanol, o bien gracias a amoníaco o metilamina en fase gaseosa. Este tratamiento básico permite desproteger los nucleótidos presentes en el oligonucleótido formado y, en el caso del método que utiliza unos sintones fosforamiditas o hidrogenofosfonatos, permite también el desenganche del soporte del oligonucleótido formado. En el caso del método que utiliza unos sintones fosfodiésteres, este desenganche se produce cuando tiene lugar el tratamiento con una mezcla de sin-2-nitrobenzaldoxima y de 1,1,3,3-tetrametilguanidina. Más precisamente, se podrá utilizar o bien una solución básica de sosa por ejemplo a una concentración de 0,1 a 0,5 M de los nucleótidos, en un disolvente tal como una mezcla agua/metanol, a una temperatura de 15 a 80°C, o bien gracias a una solución de amoníaco por ejemplo a una concentración de 20 a 40% másico, a una temperatura de 15 a 65°C, o bien una solución de carbonato de potasio por ejemplo a una concentración de 0,02 a 0,1 M, en un disolvente tal como el metanol, a una temperatura de 15 a 30°C, o bien una solución de metilamina y de amoníaco (AMA) por ejemplo a una concentración de 10% a 20% másico cada uno, en un disolvente tal como el agua, a una temperatura de 15 a 65°C, o bien una solución del 10% de diisopropilamina (0,25 M de β -mercaptoetanol en un disolvente tal como el metanol, a una temperatura de 45 a 65°C, o bien amoníaco o metilamina en fase gaseosa, por ejemplo a una temperatura de 15 a 30°C. Preferentemente, se realiza un tratamiento básico con una solución de carbonato de potasio a una concentración de 0,02 a 0,1 M, en el metanol, a una temperatura de 15 a 30°C.

En el marco del procedimiento según la invención, es posible utilizar en la etapa 1) del primer ciclo un soporte (Sa) de acuerdo con la invención, lo cual permitirá introducir en el extremo 3' del oligonucleótido sintetizado un derivado de diaminofenotiazinio.

Es posible asimismo en cualquier ciclo utilizar un derivado de diaminofenotiazinio (I), y en particular (Ia) o (Ib) en la

etapa 3) en lugar del sintón nucleotídico portador de una función fosforamidita y de una función hidroxilo protegida. Esto permite integrar un derivado de diaminofenotiazinio en el interior del oligonucleótido, en lugar de un nucleótido. La utilización en la etapa 3) del último ciclo de un derivado de diaminofenotiazinio (Ic) permitirá la introducción en el extremo 3' del grupo diaminofenotiazinio.

5 Por supuesto, todas estas posibilidades pueden ser combinadas para incorporar diferentes grupos diaminofenotiazinio dentro del oligonucleótido formado.

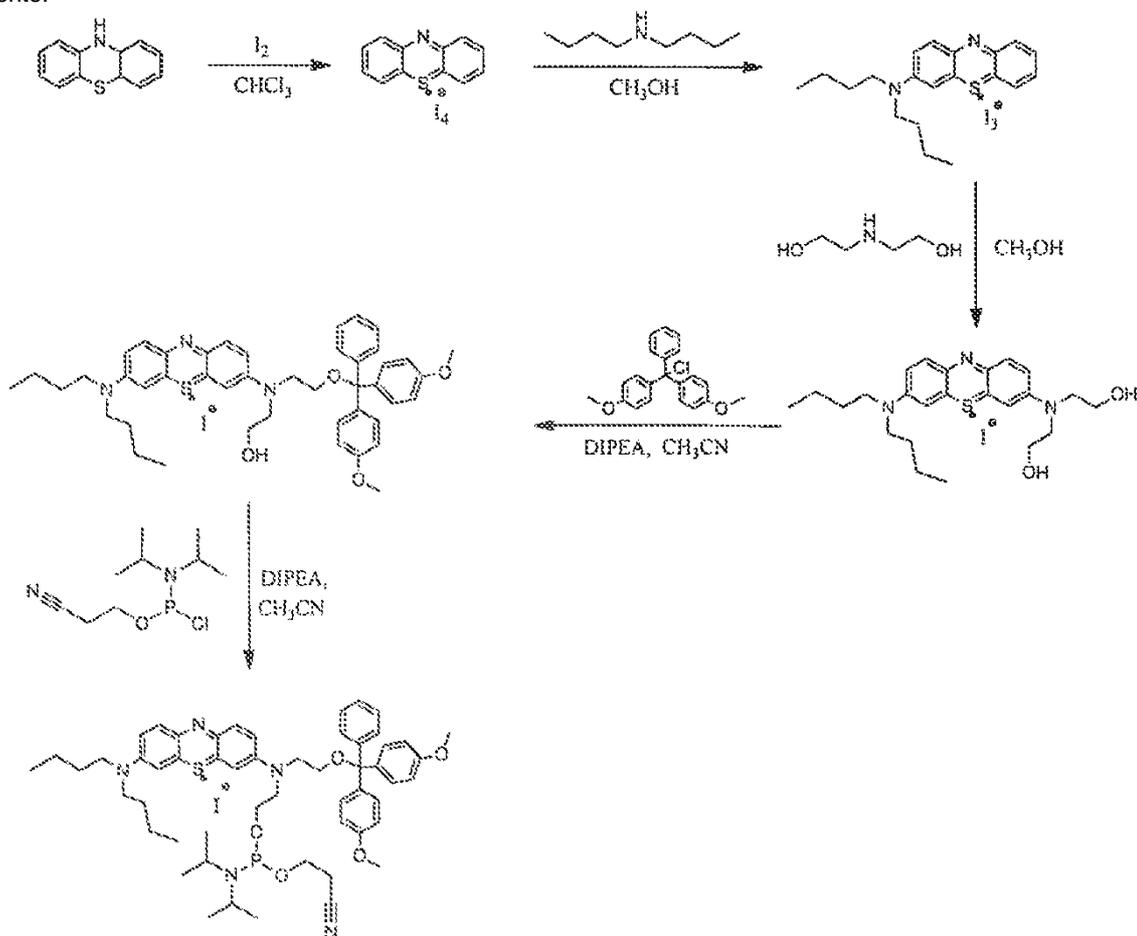
10 Los ejemplos dados a continuación, en referencia a las figuras adjuntas, ilustran la invención, pero no tienen ningún carácter limitativo.

La figura 1 muestra los potenciales de oxidorreducción del azul de metileno y de un compuesto según la invención incorporado a un oligonucleótido de acuerdo con el ejemplo 1.

15 La figura 2 muestra la evolución de los porcentajes de absorbancia en función del tiempo de diferentes derivados de bisaminofeniltiazinio, en medio básico.

Ejemplo 1: Síntesis del dimetoxitritil(dibutil-dietanolamino)fenotiazinio fosforamidita

20 El dimetoxitritil(dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio fosforamidita se prepara de acuerdo con el esquema 1 siguiente.



1) Preparación del tetrayoduro de hidruro de fenotiazin-5-io

25 Se añade gota a gota una solución de yodo (15,2 g, 60 mmoles) en el cloroformo (450 ml) durante 2h30 a una solución de fenotiazina (4,0 g, 20 mmoles) en el cloroformo (120 ml), en un matraz de 1 l bajo agitación magnética en un baño de hielo. Después del final de la adición, la mezcla se agita en un baño de hielo durante toda la noche.

30 La mezcla de reacción se filtra sobre vidrio sinterizado. El sólido se lava con 900 ml de cloroformo para eliminar el excedente de yodo. El sólido se seca bajo presión reducida durante 2h. Se obtiene un polvo gris-púrpura con un rendimiento cuantitativo (14,5 g, 20 mmoles),

RMN ¹H (DMSO-d₆): δ (ppm) = 8,06 (d, 2H); 7,92 (d, 2H); 7,73 (t, 2H); 7,61 (t, 2H)

SM (ESI+): masa calculada = 198,0, masa medida = 198,0

5 2) Preparación del triyoduro de (dibutilamino)fenotiazinio

Se disuelve el tetrayoduro de fenotiazinio (14,5 g, 20 mmoles) en 290 ml de metanol a temperatura ambiente. La dibutilamina (6,7 ml, 40 mmoles, 2 eq.) se añade gota a gota a la solución de fenotiazinio, bajo agitación magnética. La mezcla de reacción está controlada por CCM en un eluyente constituido por una mezcla CH₂Cl₂/CH₃OH 95/5 (v/v).

Después de 2h de reacción, la mezcla se filtra sobre vidrio sinterizado. Se recupera un precipitado sobre el sinterizado, después de 3 veces de lavados con 30 ml de metanol. El sólido se seca bajo presión reducida durante 1h30. Se obtiene un polvo gris-púrpura con un rendimiento del 53% (7,45 g, 10,5 mmoles).

RMN ¹H (CD₃CN): δ (ppm) = 8,25-7,55 (m, 7H, H arom.); 3,85 (m, 4H, 2xN-CH₂); 1,80 (m, 4H, 2xCH₂); 1,50 (m, 4H, 2xCH₂-CH₃); 1,01 (m, 6H, 2xCH₃) SM (ESI+): masa calculada = 325,2, masa medida = 325,2

20 3) Preparación del yoduro de (dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio

Se disuelve el yoduro de (dibutilamino)fenotiazinio (7,45 g, 10,5 mmoles) en 150 ml de metanol a temperatura ambiente (22°C). Se prepara una solución de dietanolamina (2,22 g, 21 mmoles, 2 eq.) diluida en el metanol (35 ml) y después se añade gota a gota por un embudo de adición a la solución de fenotiazinio, bajo agitación magnética a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se controla por CCM en un eluyente constituido por una mezcla CH₂Cl₂/CH₃OH 9/1 (v/v).

Después de 3h de reacción, la mezcla se concentra en evaporador rotativo. El producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente CH₂Cl₂/CH₃OH, 95/5, v/v). Se obtiene un sólido púrpura con un rendimiento del 49% (2,85 g, 5,13 mmoles).

RMN ¹H (CD₃CN): δ (ppm) = 7,90-7,22 (m, 6H, H arom.); 3,87 (m, 8H, 4xN-CH₂); 3,63 (m, 4H, 2xCH₂-OH); 1,71 (m, 4H, 2xN-CH₂-CH₂); 1,45 (m, 4H, 2xCH₂-CH₃); 1,01 (m, 6H, 2xCH₃)

SM (ESI+): masa calculada = 428,2, masa medida = 428,3

35 4) Preparación del yoduro de dimetoxitritil-dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio

Se introduce el yoduro de (dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio (2,85 g, 5,13 mmoles) en un matraz de 500 ml previamente secado en estufa. Se añade el acetonitrilo anhidro (300 ml) bajo atmósfera de argón. Se añade la diisopropiletamina DIPEA (900 μl, 5,13 mmoles, 1 eq.) y después se añade gota a gota con jeringa una solución de clordimetoxitritilo (1,56 g, 4,62 mmoles, 0,9 eq.) en 80 ml de acetonitrilo anhidro. El medio de reacción se agita a temperatura ambiente. La reacción se sigue por CCM en DCM/MeOH/TEA 89/10/1, v/v/v.

Después de 1h30, se detiene la reacción mediante la adición de 1 ml de metanol. La solución se concentra en evaporador rotativo. El producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente CH₂Cl₂/CH₃OH/Et₃N, 94/5/1, v/v/v). Se obtiene un sólido púrpura con un rendimiento del 52% (2,28 g, 2,66 mmoles).

RMN ¹H (CD₃CN): δ (ppm) = 7,90-6,75 (m, 19H, H arom.); 3,75 (m, 4H, 2xN-CH₂); 3,66 (s, 6H, 2xO-CH₃); 3,66-3,45 (m, 8H, 2xN-CH₂ y 2xCH₂-OH); 1,70 (m, 4H, 2xN-CH₂-CH₂); 1,45 (m, 4H, 2xCH₂-CH₃); 1,01 (m, 6H, 2xCH₃) SM (ESI+): masa calculada = 730,4, masa medida = 730,7

50 5) Preparación del yoduro de dimetoxitritil-(dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio fosforamidita (I.1)

Se coevapora dos veces el yoduro de dimetoxitritil-(dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio (2,28 g, 2,66 mmoles) en 20 ml de acetonitrilo anhidro, y después se recoge en 50 ml de acetonitrilo anhidro. Se añade la diisopropiletamina (930 μl, 5,32 mmoles, 2 eq.) bajo atmósfera de argón, y después se añade la clorofosfina (710 μl, 3,19 mmoles, 1,2 eq.) gota a gota con jeringa. Se agita el medio de reacción a temperatura ambiente. La reacción se sigue por CCM en CH₂Cl₂/CH₃CN/Et₃N 49/49/2, v/v/v.

Después de 30 min. de reacción, la solución se concentra en evaporador rotativo. El producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente CH₂Cl₂/ Et₃N, 99/1). Se obtiene un aceite púrpura con un rendimiento del 26% (743 mg, 0,70 mmoles).

RMN ³¹P (CD₃CN): δ (ppm) = 149,3

SM (ESI+): masa calculada = 930,5, masa medida 930,5

6) Síntesis de un oligonucleótido marcado por el derivado (dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio

5 Este ejemplo ilustra la incorporación del yoduro de dimetoxitritil-(dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio fosforamidita (compuesto 1.1) en la síntesis de un oligonucleótido de fórmula: 5'-d(XGGGAAAGGGAGAAGACGTCCAAAACTTTCCCYY)-3'

10 En esta secuencia, A representa la adenosina, C la citidina, G la guanosina, T la timidina, X el (dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio e Y el 1,2-ditiano que permitirá el injerto del oligonucleótido sobre una superficie de oro para las caracterizaciones electroquímicas. La síntesis se efectúa utilizando los sintones fosforamiditas correspondientes protegidos en posición 5' por un grupo dimetoxitritilo. Para la adenosina, la función aminada exocíclica está protegida por el grupo fenoxiacetilo. Para la citidina, la función aminada exocíclica está protegida por el grupo acetilo. Para la guanosina, la función aminada exocíclica está protegida por el grupo isopropilfenoxiacetilo.

15 Se ha efectuado la síntesis mediante un sintetizador automático de oligonucleótidos Applied Biosystems DNA/RNA 394 utilizando:

- 20 - 1 μ mol de una molécula de dialcohol ditiano (4-O-dimetoxitritil cicloditioeritritol) injertada en un soporte «Controlled Pore Glass» funcionalizada por unas cadenas aminadas, siendo el enlace entre el 4-O-dimetoxitritil cicloditioeritritol y la amina realizado por un radical succinilo como se describe en el artículo de P. Liepold, T. Kratzmüller, N. Persike, M. Bandilla, M. Hinz, H. Wieder, H. Hillebrandt, E. Ferrer, G. Hartwich, Anal. Bioanal. Chem. (2008) 391:1759-1772.
- 25 - 15 μ moles de (dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio o de sintones de adenosina, citidina, guanosina, timidina o ditiano por ciclo de síntesis según la secuencia previamente programada.

30 En una primera etapa, se escinde el grupo dimetoxitritilo de la molécula ditiano injertada en CPG mediante un tratamiento con ácido tricloroacético al 3% másico en diclorometano, a temperatura ambiente durante 120 s, liberando una función hidroxilo,

35 En una segunda etapa, se acopla un sintón portador de una función fosforamidita y de una función hidroxilo protegida por un grupo dimetoxitritilo, a una concentración de 0,1 M en acetonitrilo, en presencia de tetrazol a una concentración de 0,45 M en acetonitrilo, a temperatura ambiente, durante 30 s para las fosforamiditas A, T, C y G, 360 s para la ditiano fosforamidita y 60 s para la (dibutilamino)-(dietanolamino) fenotiazinio fosforamidita.

40 En una tercera etapa, las funciones hidroxilo que no han reaccionado en la etapa anterior son bloqueadas por una solución de anhídrido fenoxiacético/piridina/tetrahidrofurano (1:1:8), en presencia de metilimidazol al 16% másico en el tetrahidrofurano, a temperatura ambiente durante 20 s.

45 En una cuarta etapa, se oxida el fosfito triéster en fosfato triéster por una solución de yodo a una concentración de 0,02 M en una mezcla agua/piridina/tetrahidrofurano (1:2:7), a temperatura ambiente durante 30 s.

Las cuatro etapas se repiten tantas veces como lo necesite la secuencia programada.

50 Al final de la síntesis, el oligonucleótido se desolidariza del soporte mediante un tratamiento con carbonato de potasio a 0,05 M en el metanol anhidro (1 ml), a temperatura ambiente durante 6h. La solución se neutraliza a continuación por adición de 1,5 ml de acetato de tetraetilamonio 2 M en agua, y después se filtra sobre filtros Amicon 3K (Millipore) para eliminar las sales y los compuestos procedentes de la desprotección del oligonucleótido.

55 El oligonucleótido se purifica por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLHP) sobre una columna en fase inversa Licrospher RP18. La elución del oligonucleótido marcado por el derivado fenotiazinio se sigue por absorción visible a 677 nm. Las fracciones correspondientes son recogidas y concentradas en un evaporador SpeedVac.

El producto se analiza por espectrometría de masa MALDI-ToF por cocrystalización en una matriz de ácido 3-hidroxipicolínico. La masa medida (18813 Da) corresponde a la masa calculada (18814 Da) lo cual demuestra que el derivado fenotiazinio no se ha degradado en las condiciones de síntesis y de desprotección del oligonucleótido.

7) Datos de oxidorreducción

60 Se efectúa una comparación de las propiedades oxidorreductoras del dimetilamino fenotiazinio (azul de metileno) y del sintón (dibutilamino)-(dietanolamino)fenotiazinio incorporado en un oligonucleótido utilizando una célula electroquímica constituida por un electrodo de trabajo de oro, por un contraelectrodo de platino y por un electrodo de referencia con calomelano saturado. La técnica utilizada es la voltametría cíclica. El tampón utilizado es un tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 20 mM KCl 250 mM de pH 6,7.

65 El azul de metileno (curva en línea discontinua) se estudia en solución (concentración 15,6 μ M). El sintón modificado

(curva en línea continua) se estudia después del injerto sobre el electrodo de oro de una solución que contiene 2 nmoles del oligonucleótido marcado. Se observa en la figura 1 que las dos curvas muestran unos potenciales de reducción y de oxidación similares.

5 **Ejemplo 2 - Síntesis de dimetoxitritil bis-(butilbutanolamino)fenotiazinio fosforamidita**

1) Preparación del yoduro de bis-(butilbutanolamino)fenotiazinio

10 Se disuelve el tetrayoduro de fenotiazinio (145 mg, 0,2 mmoles) en 4 ml de metanol a temperatura ambiente. La butilbutanolamina (115 µl, 1 mmol, 5 eq.) se añade gota a gota a la solución de fenotiazinio, bajo agitación magnética. La mezcla de reacción está controlada por CCM en un eluyente constituido por una mezcla CH₂Cl₂/CH₃OH 9/1 (v/v).

15 Después de 2h de reacción, la solución se concentra en evaporador rotativo. El producto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente CH₂Cl₂/CH₃OH, 95/5, v/v). Se obtiene un aceite púrpura con un rendimiento del 41% (50 mg, 0,08 mmol).

20 RMN ¹H (CD₃CN): δ (ppm) = 7,90-7,23 (m, 6H, H arom.); 3,60 (m, 8H, 4xN-CH₂); 3,00 (m, 4H, 2xCH₂-OH); 1,90-1,55 (m, 12H, 6xCH₂); 1,50-1,32 (m, 4H, 2xCH₂-CH₃); 0,99 (m, 6H, 2xCH₃)

SM (ESI+): masa calculada = 484,3, masa medida = 484,3

2) Preparación del yoduro de dimetoxitritil bis-(butilbutanolamino)fenotiazinio fosforamidita (I.1)

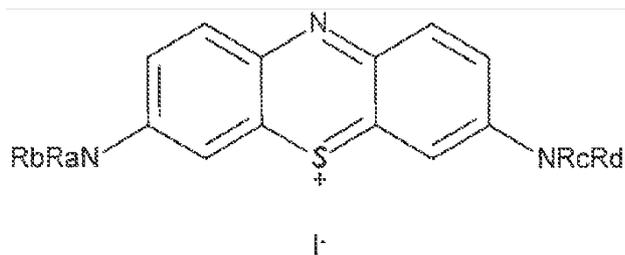
25 Este compuesto se prepara como en el ejemplo 1, 4) y 5).

Ejemplo 3 Estudio de estabilidad

30 Se ha demostrado que incorporando una dibutilamina y una dietanolamina o dos butilbutanolamina, se obtiene una importante ganancia de estabilidad en una solución de K₂CO₃ (0,05M) en metanol con respecto al compuesto yoduro de bis(dimetilamino)fenotiazinio (sal de azul de metileno) como se ilustra en la figura 2.

La tabla siguiente pone asimismo en evidencia las ganancias de estabilidad obtenidas con unas aminas diferentes de las dimetilaminas presentes en el azul de metileno.

35 TABLA

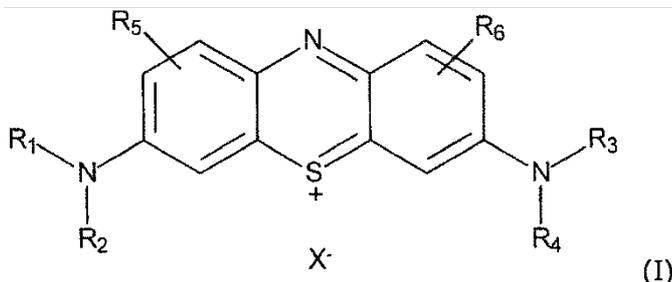


Moléculas	Estabilidad después del tratamiento en K ₂ CO ₃ 0,05 M/MeOH	
	4h	17h
Azul de metileno Ra=Rb=Rc=Rd= metilo	5%	0%
Ra=Rb=Rc=Rd= etilo	84%	67%
Ra=Rb=Rc=Rd= (2-etil)hexilo	92%	74%
Ra=Rb=Rc=Rd= butilo	92%	78%
Ra=Rc=butilo y Rb=Rd=butanol	91%	66%
Ra=Rb=butilo y Rc=Rd=etanol	73%	25%
Ra=Rb=butilo y Rc=Rd=propanol	89%	58%
Ra=Rb=butilo y Rc=Rd=hexanol	92%	76%

40

REIVINDICACIONES

1. Derivados de diaminofenotiazinio de fórmula (I):



5 en la que:

- uno de los grupos R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , representa $-A_1-OR_7$, representando A_1 una cadena alquilo lineal o ramificada que comprende de 2 a 12 carbonos, estando los átomos de oxígeno y de nitrógeno separados por lo menos por dos átomos de carbono consecutivos, y representando R_7 un grupo fosforado capaz de reaccionar con un hidroxilo libre en unas condiciones de síntesis de los oligonucleótidos, formando dicho grupo, con OA_1 al que está unido, un grupo fosforamidita, fosfodíéster o hidrogenofosfonato,
- los otros grupos R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro:
 - * un grupo $-A_2-OR_8$, representando A_2 una cadena alquilo lineal o ramificada que comprende de 2 a 12 carbonos, estando los átomos de oxígeno y de nitrógeno separados por lo menos por dos átomos de carbono consecutivos, y representando R_8 un grupo seleccionado de entre los grupos tritilo, 4-O-monometoxitritilo, 4,4'-O-dimetoxitritilo, terc-butildimetilsililo, acetilo, trifluoroacetilo, 9-fenilxanten-9-ilo y fluorenilmetiloxicarbonilo,
 - * un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono,
 - * o bien R_1 y R_2 o R_3 y R_4 están unidos entre sí para formar con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo piperidinilo o pirrolidinilo,
- R_5 y R_6 , idénticos o diferentes, representan, independientemente uno del otro, un átomo de hidrógeno, de cloro, bromo, yodo o flúor, o un grupo alquilo de 1 a 12 átomos de carbono, un grupo alqueno de 2 a 12 átomos de carbono, un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, un grupo acilo o un grupo fenilo,
- X^- representa un anión, seleccionado preferentemente de entre Cl^- , I^- , ClO_4^- , NO_3^- .

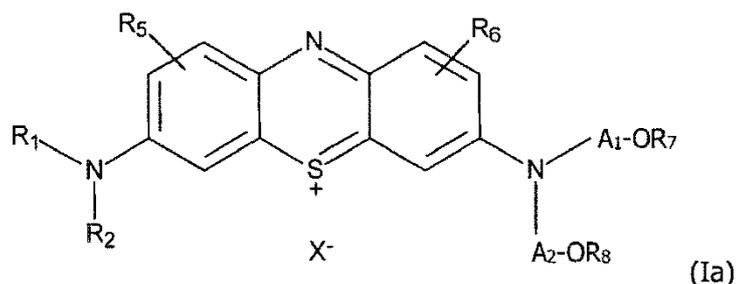
2. Derivados de diaminofenotiazinio según la reivindicación 1, caracterizados por que A_1 y A_2 son unas cadenas alquilo lineales o ramificadas, en las que de 2 a 6 átomos de carbono consecutivos separan los átomos de oxígeno y de nitrógeno.

3. Derivados de diaminofenotiazinio según la reivindicación 1 o 2, caracterizados por que por lo menos uno de los grupos R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , no representa un grupo $-A_2-OR_8$ tal como se define en la reivindicación 1 y el o dichos grupos R_1 , R_2 , R_3 o R_4 diferente(s) de $-A_1-OR_7$ y de $-A_2-OR_8$ representa(n) un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono.

4. Derivados de diaminofenotiazinio según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizados por que $R_5 = R_6 = H$.

5. Derivados de diaminofenotiazinio según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizados por que R_7 representa un grupo $-P\{N[alquil(C_2-C_{12})]_2\}(OCH_2CH_2C\equiv N)$, tal como el grupo $-P\{N(Pr)_2\}(OCH_2CH_2C\equiv N)$.

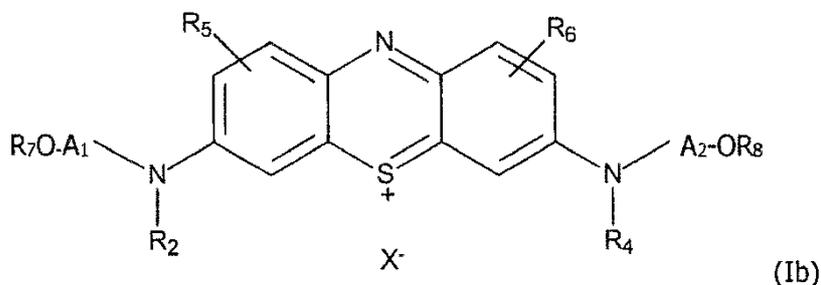
6. Derivados de diaminofenotiazinio según una de las reivindicaciones anteriores de fórmula (Ia):



en la que:

- A₁, A₂, R₅, R₆, R₇, R₈ y X⁻ son tales como los definidos en las reivindicaciones 1, 2, 4 o 5,
- R₁ y R₂, idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono, o R₁ y R₂ están enlazados entre sí para formar, con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo piperidinilo o pirrolidinilo.

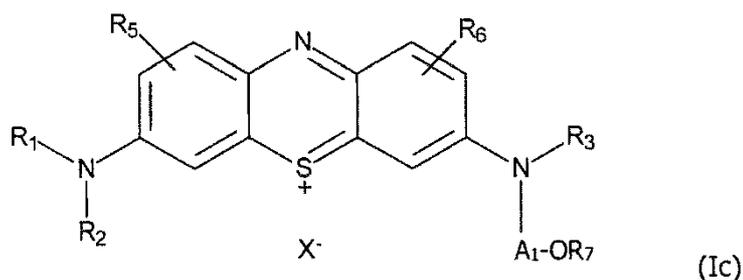
7. Derivados de diaminofenotiazinio según una de las reivindicaciones 1 a 5 de fórmula (Ib):



en la que:

- A₁, A₂, R₅, R₆, R₇, R₈ y X⁻ son tales como los definidos en las reivindicaciones 1, 2, 4 o 5,
- R₂ y R₄, idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono.

8. Derivados de diaminofenotiazinio según una de las reivindicaciones 1 a 5 de fórmula (Ic):



en la que:

- A₁, R₅, R₆, R₇, y X⁻ son tales como los definidos en las reivindicaciones 1, 2, 4 o 5,
- R₁ y R₂, idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono, o R₁ y R₂ están enlazados entre sí para formar, con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo piperidinilo o pirrolidinilo;
- R₃ representa un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono.

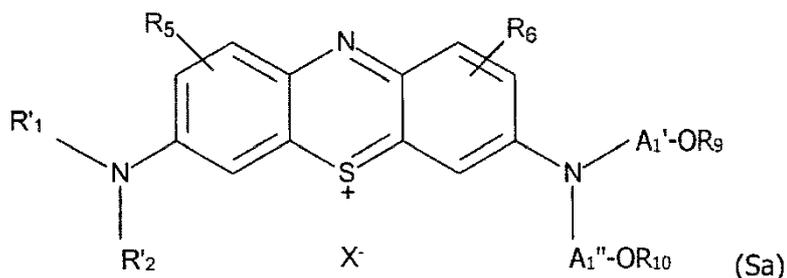
9. Procedimiento de marcado de un oligonucleótido por un derivado de diaminofenotiazinio según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende el crecimiento de un oligonucleótido injertado sobre un soporte sólido, y la sustitución de uno o varios de los nucleótidos que lo constituyen por uno o varios de dichos derivados de diaminofenotiazinio, antes de que el oligonucleótido se desenganche del soporte sólido.

10. Procedimiento de marcado según la reivindicación 9, caracterizado por que por lo menos se realiza una sustitución por un derivado de diaminofenotiazinio antes del final del crecimiento del oligonucleótido.

5 11. Procedimiento de marcado según la reivindicación 9 o 10, caracterizado por que se efectúa por lo menos una sustitución por un derivado de diaminofenotiazinio en posiciones 3' o 5', en el primer o el último nucleótido, respectivamente.

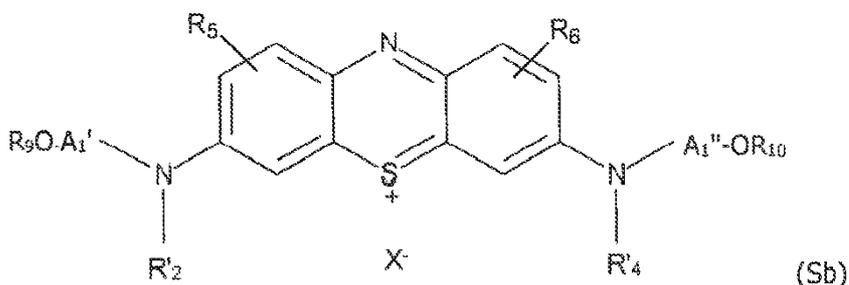
10 12. Procedimiento de marcado según una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que comprende una etapa final de tratamiento en medio básico, o bien gracias a una solución básica de sosa, de amoníaco, o de carbonato de potasio o de una solución de metilamina y de amoníaco o de una solución de diisopropilamina y de β-mercaptoetanol, o bien gracias a amoníaco o metilamina en fase gaseosa.

15 13. Soporte de síntesis de oligonucleótidos, que comprende por lo menos un derivado de diaminofenotiazinio injertado de manera covalente en superficie según la cadena:



en la que:

- 20 - R₅, R₆ y X⁻ son tales como se definen en la reivindicación 1 o 4,
- R'₁ y R'₂, idénticos o diferentes, representan, independientemente el uno del otro, un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono, o R₁ y R₂ están enlazados entre sí para formar con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo piperidinilo o pirrolidinilo,
- 25 - A₁' y A₁'', idénticos o diferentes, representan, independiente el uno del otro, una cadena A₁ tal como se define en la reivindicación 1 o 2, y
- R₉ representa un grupo seleccionado de entre los grupos tritilo, 4-O-monometoxitritilo, 4,4'-O-dimetoxitritilo, terc-butildimetilsililo, acetilo, trifluoroacetilo, 9-fenilxanten-9-ilo y fluorenilmetiloxicarbonilo; y
- 30 - R₁₀ representa -CO-A₃-CO-NH-soporte, representando A₃ una cadena alquileo lineal o ramificada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono; o



35 en la que:

- 40 - R₅, R₆ y X⁻ son tales como se definen en la reivindicación 1 o 4,
- R'₂ y R'₄, idénticos o diferentes, representan, independientemente el uno del otro, un grupo alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 4 a 12 átomos de carbono,
- 45 - A₁' y A₁'', idénticos o diferentes, representan, independiente el uno del otro, una cadena A₁ tal como se define en la reivindicación 1 o 2, y
- R₉ representa un grupo seleccionado de entre los grupos tritilo, 4-O-monometoxitritilo, 4,4'-O-dimetoxitritilo,

terc-butildimetilsililo, acetilo, trifluoroacetilo, 9-fenilxanten-9-ilo y fluorenilmetiloxycarbonilo; y

- R₁₀ representa -CO-A₃-CO-NH-soporte, representando A₃ una cadena alquileo lineal o ramificada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono.

5

14. Soporte de síntesis de oligonucleótidos según la reivindicación 13, caracterizados por que el soporte se selecciona de entre las resinas, en particular de entre las resinas a base de poliestireno, poliácridamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, los polímeros hidrófilos sintéticos o naturales, los vidrios y sílices de porosidad controlada, las bolas de vidrio, los geles de sílice.

10

15. Oligonucleótidos marcados, caracterizados por que se obtienen mediante el procedimiento de marcado según una de las reivindicaciones 9 a 12 o a partir de un soporte sólido tal como se define en la reivindicación 13 o 14.

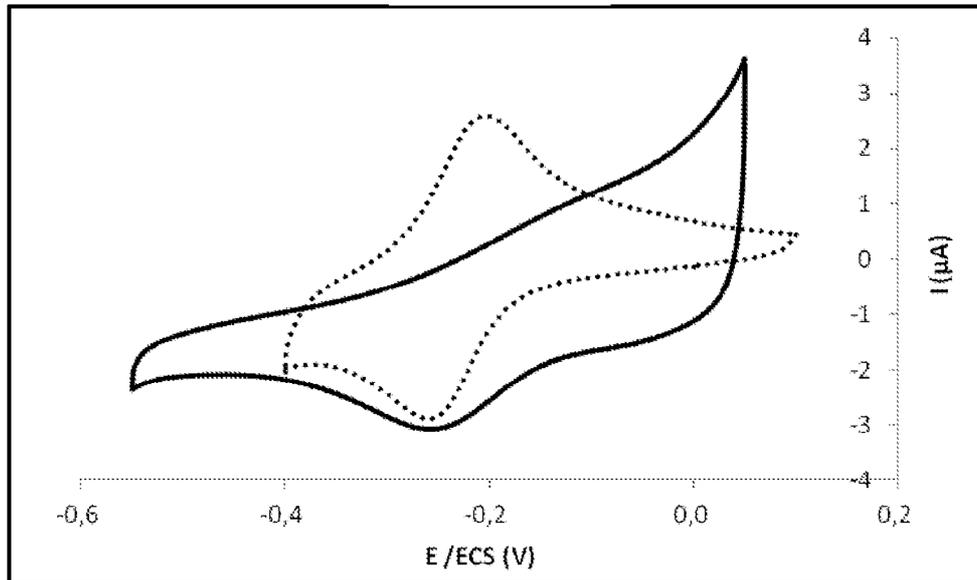


FIG.1

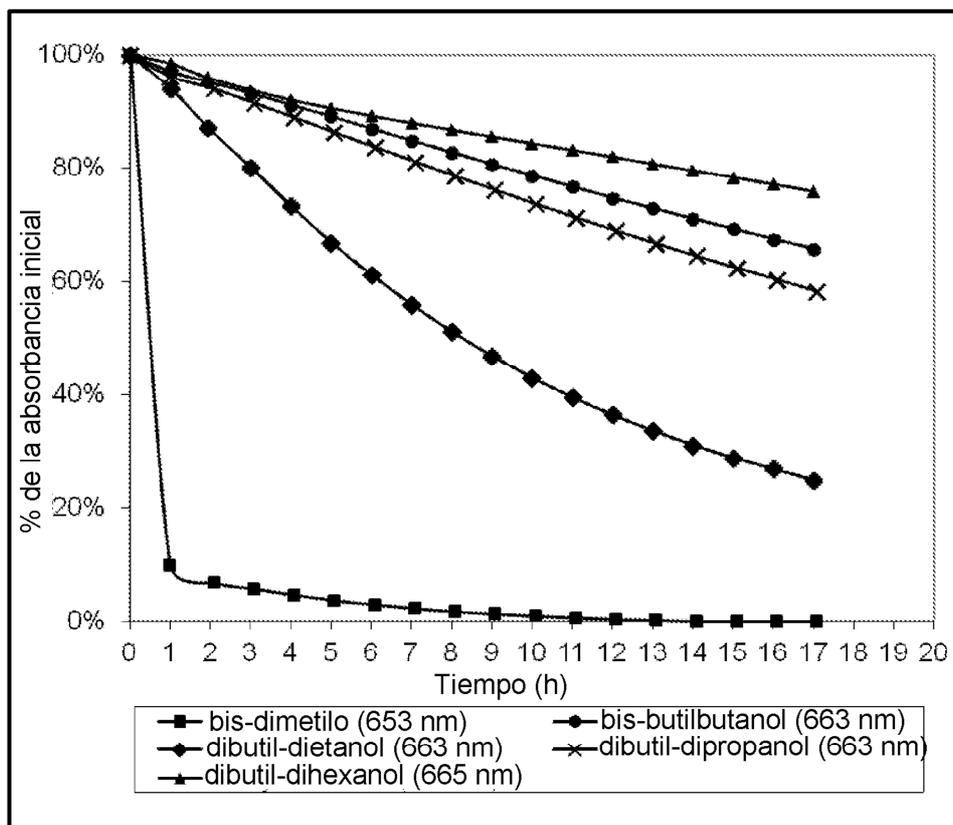


FIG.2