

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 732**

51 Int. Cl.:

A61B 10/00	(2006.01)
A61B 5/00	(2006.01)
A61B 8/00	(2006.01)
C09B 11/08	(2006.01)
C09B 11/24	(2006.01)
G01N 33/58	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2005 PCT/US2005/003627**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2005 WO05102176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2005 E 05712902 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 1740100**

54 Título: **Colorantes de xanteno**

30 Prioridad:

13.04.2004 US 824175

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

22.02.2017

73 Titular/es:

**BIOSEARCH TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
2199 South McDowell Blvd.
Petaluma, CA 94954, US**

72 Inventor/es:

**REDDINGTON, MARK y
LYTTLE, MATT**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 602 732 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

Colorantes de xanteno

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de Patente Provisional U.S. No. 60/541,686 presentada el 3 de febrero de 2004, y la Solicitud de Patente U.S. No. 10/824,175, presentada el 13 de abril de 2004.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se relaciona en general con los compuestos fluorescentes que son análogos de colorantes de xanteno. Los compuestos de la invención son fluoróforos que se derivan para permitir su unión fácil a una molécula portadora.

Antecedentes

15 Existe una necesidad continua y en expansión para métodos rápidos, altamente específicos para detectar y cuantificar sustancias químicas, bioquímicas y biológicas como analitos en la investigación y mezclas de diagnóstico. Son de particular valor métodos para medir pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, péptidos, sacáridos, productos farmacéuticos, metabolitos, microorganismos y otros materiales de valor diagnóstico. Ejemplos de tales materiales incluyen los narcóticos y venenos, fármacos administrados para propósitos terapéuticos, hormonas, microorganismos patógenos y virus, péptidos, por ejemplo, anticuerpos y enzimas, y ácidos nucleicos, particularmente aquellos implicados en estados de enfermedad.

20 La presencia de un analito particular, frecuentemente se puede determinar por métodos de enlazamiento que explotan el alto grado de especificidad que caracteriza a muchos sistemas bioquímicos y biológicos. Frecuentemente los métodos usados se basan en, por ejemplo, sistemas de antígeno-anticuerpo, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y sistemas de proteína-ligando. En estos métodos, la existencia de un complejo de valor diagnóstico se indica típicamente por la presencia o ausencia de un "marcador" observable que está unido a uno o más de los materiales que interactúan. El método de marcación específica elegido dicta frecuentemente la utilidad y la versatilidad de un sistema en particular para la detección de un analito de interés. Los marcadores preferidos son de 25 bajo coste, seguros y capaces de ser unidos eficientemente a una amplia variedad de materiales químicos, bioquímicos, y biológicos sin alterar significativamente las importantes características de enlazamiento de esos materiales. El marcador debe dar una señal altamente característica, y debe ser raro, y preferiblemente nunca, encontrado en la naturaleza. El marcador debe ser estable y detectable en sistemas acuosos durante períodos de 30 tiempo que van hasta meses. La detección del marcador etiqueta es preferiblemente rápida, sensible y reproducible, sin la necesidad de costosas instalaciones, especializados o la necesidad de precauciones especiales para proteger al personal. La cuantificación del marcador es preferiblemente relativamente independiente de variables tales como la temperatura y la composición de la mezcla que se va a ensayar.

35 Se ha desarrollado una amplia variedad de marcadores, cada una con ventajas y desventajas particulares. Por ejemplo, los marcadores radiactivos son bastante versátiles y pueden detectarse a concentraciones muy bajas, sin embargo, tales marcadores son costosos, peligrosos y su uso requiere de equipo sofisticado y personal entrenado. Por lo tanto, existe un amplio interés en los marcadores no radioactivos, particularmente en marcadores que sean observables por espectrofotometría, resonancia por rotación y técnicas de luminiscencia, y materiales reactivos, tales como enzimas que produzcan tales moléculas.

40 Los marcadores que son detectables usando espectroscopia de fluorescencia son de particular interés, debido a la gran cantidad de tales marcadores que son conocidas en la técnica. Por otra parte, como se discute más adelante, la literatura está repleta de síntesis de marcadores fluorescentes que se derivan para permitir su unión a otras moléculas y muchos de tales marcadores fluorescentes están disponibles comercialmente.

45 Además de ser detectados directamente, muchos marcadores fluorescentes operan para detener la fluorescencia de un segundo marcador fluorescente adyacente. Debido a su dependencia de la distancia y de la magnitud de la interacción entre el detenedor y el fluoróforo, la detención de una especie fluorescente provee una sonda sensible de

conformación molecular y de enlazamiento, así como otras interacciones. Un excelente ejemplo del uso de pares de detectores fluorescentes se encuentra en la detección y el análisis de ácidos nucleicos.

5 Las sondas de ácidos nucleicos fluorescentes son herramientas importantes para el análisis genético, tanto en la investigación genómica como en el desarrollo, y en la medicina clínica. Como información a partir de los acumulados del Proyecto del Genoma Humano, el nivel de interrogación genética mediada por las sondas fluorescentes se ampliará enormemente. Una clase particularmente útil de sondas fluorescentes incluye sondas de autodetección, también conocidas como sondas de transferencia de energía de fluorescencia, o sondas FET. El diseño de sondas diferentes que utilizan este motivo puede variar en detalle. En una sonda FET de ejemplo, tanto un fluoróforo como un detector son enlazados a un ácido nucleico. La sonda está configurada de tal manera que el fluoróforo está
10 próximo al detector y la sonda produce una señal solamente como un resultado de su hibridación a un objetivo previsto. A pesar de la limitada disponibilidad de sondas FET, técnicas que incorporan su uso están desplazando rápidamente métodos alternativos.

15 Las sondas que contienen un par fluoróforo-detector se han desarrollado para ensayos de hibridación de ácido nucleico donde la sonda forma una estructura de horquilla, esto es, donde la sonda se hibrida a sí misma para formar un bucle de tal manera que la molécula detectora se pone en proximidad con la molécula informadora en el ausencia de una secuencia de ácido nucleico complementaria para prevenir la formación de la estructura de horquilla (véase, por ejemplo, WO 90/03446; Solicitud de Patente Europea No. 0 601 889 A²). Cuando una secuencia objetivo complementaria está presente, la hibridación de la sonda a la secuencia objetivo complementaria altera la estructura de horquilla y hace que la sonda adopte una conformación donde la molécula detectora ya no esté lo
20 suficientemente cerca de la molécula informadora para detectar la molécula informadora. Como resultado, las sondas proveen una señal incrementada de fluorescencia cuando se hibridan a una secuencia objetivo que cuando están sin hibridar.

25 Los ensayos también se han desarrollado para la detección de una secuencia de ácido nucleico seleccionada y para la identificación de la presencia de una estructura de horquilla usando dos sondas separadas, una que contiene una molécula informadora y la otra una molécula detectora (véase, Meringue, et al., *Nucleic Acids Research*, 22: 920-928 (1994)). En estos ensayos, la señal de fluorescencia de la molécula informadora disminuye cuando se hibrida a la secuencia objetivo debido a que la molécula de detección entra en proximidad con la molécula informadora.

30 Una aplicación particularmente importante para las sondas, que incluyen un par de moléculas informadora – detectora es su uso en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, tales como las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), para detectar la presencia y la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo. En general, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos han abierto amplias nuevas metodologías para pruebas genéticas y análisis de ADN (véase, por ejemplo, Arnheim et al. *Ann. Rev. Biochem.*, 61: 131-156 (1992)). La PCR, en particular, se ha convertido en una herramienta de investigación de gran importancia con aplicaciones en, por ejemplo, clonación, análisis de expresión genética, secuenciación de ADN, mapeo genético y descubrimiento de
35 fármacos (véase, Arnheim *et al.*, *supra*; Gilliland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2725-2729 (1990); Bevan et al., *PCR Methods and Applications*, 1: 222-228 (1992); Green et al., *PCR Methods and Applications*, 1: 77-90 (1991); Blackwell et al., *Science*, 250: 1104-1110 (1990)).

40 Los métodos utilizados comúnmente para la detección de productos de amplificación de ácidos nucleicos requieren que el producto amplificado sea separado de los cebadores sin reaccionar. Esto se logra típicamente bien sea a través del uso de electroforesis en gel, que separa el producto de amplificación de los cebadores sobre la base de un tamaño diferencial, o a través de la inmovilización del producto, permitiendo que el cebador libre sea limpiado. Sin embargo, se ha descrito un número de métodos para la monitorización del proceso de amplificación sin la separación previa del cebador; todos ellos se basan en FET, y ninguno de ellos detecta el producto amplificado directamente. En su lugar, los métodos detectan algún evento relacionado con la amplificación. Por esa razón, están
45 acompañados de problemas de alto fondo, y no son cuantitativos, como se discute más adelante.

Un método, descrito en Wang et al. (Pat. U.S. No. 5,348,853; y *Anal. Chem.*, 67: 1197-1203 (1995)), utiliza un sistema de transferencia de energía en donde la transferencia de energía se produce entre dos fluoróforos en la sonda. En este método, la detección de la molécula amplificada se lleva a cabo en el recipiente de reacción de amplificación, sin la necesidad de una etapa de separación.

50 Un segundo método para detectar un producto de amplificación sin la separación previa de cebador y producto es el ensayo de PCR de nucleasa 5' (también conocido como el ensayo TaqMan™) (Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*

EE.UU., 88: 7276-7280 (1991); Lee et al, Nucleic Acids Res, 21: 3761-3766 (1993)). Este ensayo detecta la acumulación de un producto de PCR específico mediante hibridación y escisión de una sonda fluorogénica doblemente marcada (la sonda "TaqMan") durante la reacción de amplificación. La sonda fluorogénica consiste en un ácido nucleico marcado tanto con un colorante informador fluorescente como un colorante detenedor. Durante la PCR, esta sonda es escindida por la actividad 5'-exonucleasa del ADN polimerasa si, y sólo si, se hibrida con el segmento que se amplifica. La escisión de la sonda genera un incremento en la intensidad de fluorescencia del colorante informador.

Aún así, otro método de detección de productos de amplificación que se basa en el uso de transferencia de energía es el método de "sonda de baliza" descrito por Tyagi et al. (Nature Biotech., 14: 303-309 (1996)), el cual también es el objeto de la patente de U.S. No. 5,312,728 a Lizardi et al. Este método emplea sondas de hibridación de ácidos nucleicos que pueden formar estructuras de horquilla. En un extremo de la sonda de hibridación (ya sea el extremo 3' o 5'-) hay un fluoróforo donante, y en el otro extremo, una unidad estructural aceptora. En este método, la unidad estructural aceptora es un detenedor, que absorbe energía del donante. Así, cuando la baliza se encuentra en la conformación abierta, la fluorescencia del fluoróforo donante es detectable, mientras que cuando la baliza está en conformación de horquilla (cerrada), la fluorescencia del fluoróforo donante se detiene. Cuando se emplea en PCR, la sonda de baliza molecular, que se hibrida a una de las cadenas del producto de PCR, se encuentra en "conformación abierta", y se detecta la fluorescencia, mientras que aquellas que permanecen sin hibridar no serán fluorescentes. Como resultado, la cantidad de fluorescencia se incrementará a medida que se incrementa la cantidad de productos de PCR, y por lo tanto puede ser utilizada como una medida del progreso de la PCR.

Las sondas discutidas más arriba están configuradas más generalmente de tal manera que el detenedor y el fluoróforo están en los extremos 3'- 5'- de la sonda (Lyamichev et al., Science, 260:778-783 (1993)). Este espaciado del fluoróforo y el detenedor puede impedir la transferencia de energía fluorescente: la transferencia de energía de fluorescencia disminuye como la sexta potencia inversa de la distancia entre el fluoróforo y el detenedor. Por lo tanto, si el detenedor no está lo suficientemente cerca del informador para lograr detención eficiente las emisiones de fondo de la sonda pueden ser muy altas.

Para que el colorante de xanteno sea útil como un marcador debe poseer un grupo funcional químico que permitirá que se una a, o reaccionar con un sustrato de interés. La incorporación de tal funcionalidad química reactiva en colorantes de xanteno usualmente requiere etapas sintéticas adicionales y/o difíciles de aplicar métodos de purificación. En particular, la separación de isómeros estructurales de fluoresceínas y rodamina, que son los reactivos de marcación de xanteno más comúnmente utilizados para aplicaciones biológicas y médicas, es tediosa y se debe evitar si es posible.

La estructura química de núcleo de muchos colorantes de fluoresceína y rodamina incluye un grupo de ácido carboxílico en la posición orto del anillo de benceno unido al residuo de xanteno; algunos otros poseen un grupo ácido sulfónico en este sitio. El grupo de ácido carboxílico no ha sido ampliamente utilizado como un sitio para la conjugación del colorante a sustratos debido a su baja reactividad y debido a reacciones secundarias que hacen al colorante no fluorescente. Aunque el ácido carboxílico puede ser activado y hacerse reaccionar con alcoholes para formar ésteres o con aminas para formar amidas, el enlace éster es de una estabilidad insuficiente para ser útil cuando se preparan compuestos que son marcados de forma estable con un fluoróforo.

El enlace amida es estable a la hidrólisis, pero mientras que se informa de algunas amidas preparadas a partir del ácido carboxílico activado y aminas primarias que se van a colorear (Mayer et al., Patente U.S. No. 4,647,675) se informa de otras que experimentan una reacción de espirolactamización en la que el colorante pierde su color y se hace no fluorescente (Adamczyk et al., Synthetic Commun. 31: 2681-2690 (2001); y Cincotta et al., U.S. Patent No. 4,290,955)). Por el contrario, las aminas secundarias reaccionan con el ácido carboxílico activado para crear un enlace de amida que no pueden someterse a espirolactamización, proveyendo un colorante de xanteno que conserva su color y fluorescencia (Gao et al., WO 02/055512). Menchen et al. divulgan colorantes de xanteno en donde la unidad estructural orto carboxilo es activada y acoplada a otra especie. Otros colorantes de xanteno derivados de amida se divulgan en Haugland et al, patente U.S. No. 6,399,392; y Mayer et al., patente U.S. No. 4,935,059.

Los colorantes de xanteno que poseen un grupo ácido sulfónico en la posición orto se pueden activar y hacer reaccionar con alcoholes y con aminas de una manera similar a los colorantes de xanteno con grupos de ácido orto carboxílico para producir ésteres de sulfonato y sulfonamidas, respectivamente. Los ésteres de sulfonato no son estables bajo condiciones acuosas y son de poca utilidad como funcionalidad enlazante para la preparación de

oligonucleótidos. Las sulfonamidas son estables y se han utilizado para preparar colorantes de xanteno reactivos tales como ésteres de succinimidilo, maleimididas y fosforamiditas.

5 Ninguna de las referencias descritas más arriba divulga o sugiere la modificación del núcleo fluoróforo con una unidad estructural enlazada a amida versátil que permita la variación fácil de la composición, la longitud y grado de ramificación del enlazante. Adicionalmente, ninguna de las referencias sugiere un enlazante que provea un locus para unir el fluoróforo a un soporte sólido, ni las referencias describen una unidad estructural enlazante ramificada que ate tanto una fosforamidita como un éter de dimetoxitritilo a un átomo de nitrógeno endocíclico individual.

10 La unión de detenedores o fluoróforos a sitios deferentes del grupo 5'-OH fácilmente accesibles generalmente requiere la síntesis de marcadores fluorescentes que son de uso para unir el fluoróforo a un residuo reactivo individual de una molécula portadora o un grupo funcional reactivo seleccionado en ese residuo; hacer reaccionar el mismo fluoróforo con un grupo funcional diferente de la portadora generalmente requiere una nueva modificación del núcleo fluorescente. Del mismo modo, la modificación de la estructura o composición de brazo enlazante requiere una modificación en el núcleo fluoróforo. Por lo tanto, un marcador de xanteno que provea un punto de entrada versátil para un arreglo de modificaciones sintéticas representaría un avance significativo en la técnica.

15 La WO0064988 divulga xantenos sustituidos por nitrógeno que son sustituidos con una o más unidades estructurales de detención más aromáticas o heteroaromáticas.

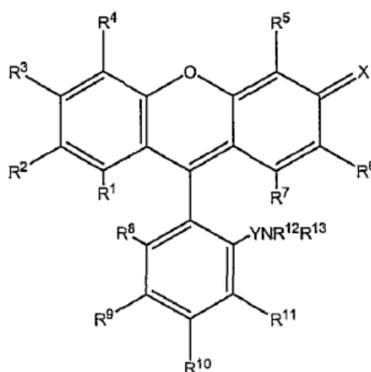
La WO9739064 divulga fluoresceínas y rodoles que son directamente sustituidos en uno o más carbonos aromáticos por flúor.

Breve resumen de la invención

20 La invención provee una clase de fluoróforos basados en xanteno modificados con un brazo enlazante versátil, cuya estructura es fácilmente alterable. La flexibilidad de la estructura del brazo enlazante permite la variación en la naturaleza y posición de los grupos reactivos, que proveen un locus para la unión de la casete de fluoróforo enlazante a una molécula portadora. Los marcadores basados en xanteno se unen fácilmente a una molécula portadora usando técnicas bien conocidas en la técnica, o modificaciones de tales técnicas que están bien dentro de
25 las capacidades de los expertos en la técnica. La versatilidad de los marcadores establecidos aquí provee una marcada ventaja sobre los marcadores de xanteno utilizados actualmente, sondas ensambladas usando estos marcadores y métodos basándose en tales marcadores y sondas. Además, la presente invención provee una clase de marcadores químicamente versátiles en los que el fluoróforo puede ser diseñado para tener un perfil de emisión de luz deseada.

30 En una realización de ejemplo, el núcleo fluorescente se funcionaliza a través del grupo de ácido orto carboxílico de la unidad estructural fenilo del núcleo de xanteno, produciendo acceso a fluoróforos reactivos a través de los procedimientos convenientes, eliminando de la necesidad de separar los isómeros estructurales.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención provee un compuesto fluorescente que tiene la fórmula:



35 en la que R¹, R² y R⁴-R¹¹ se seleccionan cada uno independientemente de grupos tales como alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no

sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, halógeno, H, NO₂, CN y C(Z¹)R¹⁴, NR¹⁵R¹⁶ y Z²R¹⁶. R³ se selecciona del Z²R¹⁶ y NR¹⁵R¹⁶.

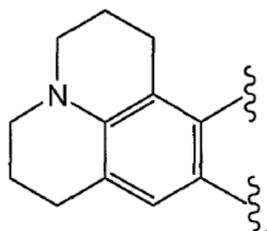
5 Z¹ representa O, S o NH. Z² es bien sea O o S. Los grupos correspondientes a R¹⁵ incluyen H, alquilo sustituido o no sustituido, y heteroalquilo sustituido o no sustituido. R¹⁶ se selecciona de H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido y C(Z³)R¹⁷. R¹⁵ y R¹⁶, junto con el nitrógeno al que están unidos, también pueden ser cualquier grupo reactivo que contenga nitrógeno. Grupos de ejemplo incluyen -NHNH₂, -N=C=S y N=C=O.

10 Z³ representa O, S o NH. El símbolo R¹⁷ representa grupos tales como alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, OR¹⁸, y NR¹⁹R²⁰. R¹⁸ representa H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y C(O)R²¹. R¹⁹ y R²⁰ son símbolos que representan grupos seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. R²¹ es alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido.

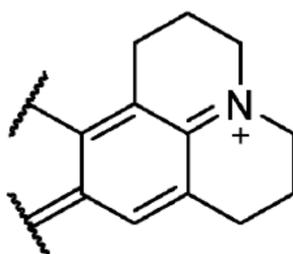
15 El símbolo Y representa o bien C(O) o S(O)₂. X es (NR²²R²³) o (O). R²² y R²³ se seleccionan independientemente y son miembros seleccionados de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

20 R¹² o R¹³ se seleccionan independientemente de alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido, con la condición de que al menos uno de R¹² o R¹³ incluya un grupo reactivo que contenga oxígeno o una molécula portadora a la que el colorante de la invención está conjugado a través de una unidad estructural producido por la reacción del grupo reactivo que contiene oxígeno con un grupo reactivo en la molécula portadora de la reactividad complementaria. R¹² y R¹³, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, se unen opcionalmente para formar un anillo. Los anillos de ejemplo incluyen anillos heterocíclicos y heteroarilo de 4-6 miembros.

25 Los sustituyentes en los núcleos de anillo arilo pueden estar unidos para formar anillos. Por ejemplo, en una realización en la que R³ es NR¹⁵R¹⁶, R², R⁴ y R¹⁵ y R¹⁶, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, se fusionan con la unidad estructural fenilo al que NR¹⁵R¹⁶, R² y R⁴ están unidos, formando un sistema de anillo sustituido o no sustituido que tiene la fórmula general:



30 En aún otra realización en la que X es NR²²R²³, R⁵, R⁶ y R²² y R²³, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, se fusionan con el anillo de 6 miembros insaturado al que NR²²R²³, R⁵ y R⁶ están unidos, formando un sistema de anillo sustituido o no sustituido que tiene la fórmula general:



35 La presente invención también provee un conjugado entre una molécula portadora, por ejemplo, un ácido nucleico, y un compuesto fluorescente de la invención, que está unido covalentemente o iónicamente a una unidad estructural de la molécula portadora. Cuando la molécula portadora es un ácido nucleico, las unidades extruturales representativas a las que se unen los compuestos fluorescentes de la invención incluyen la unidad estyructural de

azúcar, en centros O- y/o C; aminos endo y/o exo-cíclicos, átomos de carbono de unidades estructurales unidades estructurales nucleobases, y puentes internucleotídicos. En todavía una realización de ejemplo adicional, el conjugado entre el compuesto de la invención y la molécula portadora incluye al menos una unidad estructural que detiene la emisión de fluorescencia del compuesto de la invención.

- 5 También se proveen ensayos que utilizan uno o más compuestos de la invención o un conjugado entre un compuesto de la invención y una molécula portadora. En ensayos de ejemplo la molécula portadora incluye tanto un colorante de la invención como una especie que detiene la emisión de fluorescencia del colorante.

Otros aspectos, realizaciones y objetos de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue.

- 10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 despliega compuestos representativos de la invención.

La Figura 2 es una traza representativa de HPLC en fase reversa de 3'-TTCGATAAGTCTAG-5', marcada en 5' con 15.

La Figura 3 es un espectro representativo de masas de 3'-TTCGATAAGTCTAG-5', marcada en 5' con 15.

- 15 La Figura 4 es una traza de HPLC de intercambio de aniones representativo de 3'-TTCGATAAGTCTAG-5', marcada en 5' con 25.

La Figura 5 es un espectro de masas representativo de 3'-TTCGATAAGTCTAG-5', marcado en 5' con compuesto 25.

- 20 La Figura 6 es una traza representativa de HPLC en fase reversa de 3'-TTCGATAAGTCTAG-5', marcada en 5' con compuesto 19.

La Figura 7 es un espectro de masas representativo de 3'-TTCGATAAGTCTAG-5', marcado en 5' con compuesto 19.

La Figura 8 es una traza de HPLC de intercambio de aniones representativo de 3'-TTCGATAAGTCTAG-5', marcada en 3' usando compuesto 29 en CPG que porta colorantes.

- 25 La Figura 9 es un espectro de masas representativo de 3'-TTCGATAAGTCTAG-5', marcado en 3' a mediante el uso del compuesto 29 en CPG que porta colorantes.

La Figura 10 es una superposición de los espectros de absorción y emisión de 5'-TTTTTTTTTT-3' marcados en 5' con 25.

- 30 La Figura 11 es una superposición de los espectros de absorción y emisión de 5'-TTTTTTTTTT-3' marcados en 5' con 15.

La Figura 12 es una superposición de los espectros de absorción y emisión de 5'-TTTTTTTTTT-3' marcados en 5' con 6.

La Figura 13 es una superposición de los espectros de absorción y emisión de 5'-TTTTTTTTTT-3' marcados en 5' con 19.

- 35 La Figura 14 es una comparación de la realización de sondas marcadas con colorante 15 a sondas marcadas con JOE. La gráfica muestra los resultados del análisis de PCR en tiempo real realizado en el Sistema de Detección de Secuencias ABI 7700. Los datos para sondas ApoB marcadas con colorante 15 y JOE están presentes en valores de Ct. Los resultados para las sondas marcadas con colorante 15 muestran que es al menos equivalente a las sondas marcadas con JOE.

- 40 La Figura 15 es una comparación de la realización de sondas marcadas con colorante 15 a sondas marcadas con HEX y JOE. La gráfica muestra los resultados del análisis de PCR en tiempo real realizado en el Sistema de Detección de Secuencias ABI 7700. Los datos para sondas de telomerasa marcadas con colorante 15, HEX y JOE

se presentan en valores de Ct. Los resultados para la sonda marcada con colorante 15 muestran que es al menos equivalente a las sondas marcadas con HEX o JOE.

La Figura 16 es una comparación de la realización de sondas marcadas con colorante 19 a sondas marcadas con ROX y Texas Red. El gráfico muestra los resultados del análisis de PCR en tiempo real realizado en el Sistema de Detección de Secuencias ABI 7700. Los datos para las sondas ApoB marcadas con colorante 19, ROX y Texas Red se presentan en valores de Ct. Los resultados para la sonda marcada con colorante 19 muestran que es al menos equivalente a las sondas marcadas con ROX o Texas Red.

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

10 "FET", como se usa aquí, se refiere a "Transferencia de energía de fluorescencia."

"FRET", como se usa aquí, se refiere a "Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia." Estos términos se utilizan aquí para referirse a ambos procesos de transferencia de energía radiativa y no radiativa. Por ejemplo, procesos en los que un fotón es emitido y las que involucran la transferencia de electrones a larga distancia están incluidos dentro de estos términos. A lo largo de esta especificación, ambos de estos fenómenos están subsumidos bajo el término general de "transferencia de energía donante-aceptora."

Definiciones

20 Cuando se especifican unidades estructurales químicas mediante sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente la unidad estructural que resultaría de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{O}-$ pretende también recitar $-\text{OCH}_2-$; $\text{NHS}(\text{O})_2-$ también está destinado a representar. $-\text{S}(\text{O})_2\text{HN}-$, etc.

Tal como se usa aquí, "ácido nucleico" significa cualquier nucleósido natural o no natural, o nucleótidos y oligómeros y polímeros de los mismos, por ejemplo, ADN, ARN, decadena sencilla, de doble cadena, de cadena triple o motivos de hibridación más altamente agregados, y cualesquier modificaciones químicas de los mismos. Las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la conjugación con un compuesto de la invención o un constructo que incluye un compuesto de la invención unido de forma covalente a un enlazante que ata el compuesto con el ácido nucleico, y los que proveen el ácido nucleico con un grupo que incorpora carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática, fluxionalidad o funcionalidad en el ácido nucleico. Modificaciones de ejemplo incluyen la unión al ácido nucleico, en cualquier posición, de uno o más unidades estructurales hidrófobas o hidrofílicas, aglomerante de surco menor, agentes intercalantes, detenedores, agentes quelantes, quelatos de metales, soportes sólidos, y otros grupos que están unidos de manera útil a ácidos nucleicos.

35 Ácidos nucleicos modificados de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), aquellos con modificaciones del grupo fosfodiéster (por ejemplo, sustitución de O- con O, NR, o SR), modificaciones de azúcares en las posiciones 2', 3' y 5', modificaciones en la unidad estructural de base, por ejemplo, modificaciones de pirimidina en la posición 5, modificaciones de purina en la posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo; modificaciones del esqueleto, esto es, sustitución de un puente de fosfodiéster $\text{P}(\text{O})\text{O}_3$ con otra unidad estructural, metilaciones, combinaciones de emparejamiento de bases inusuales, tales como la isobases, isocitidina e isoguanidina y similares. Los ácidos nucleicos también pueden incluir bases no naturales, por ejemplo, nitroindol. Las bases no naturales incluyen las bases que están modificadas con un compuesto de la invención o un compuesto enlazantes del constructo de la invención, un aglomerante de surco menor, un agente intercalante, un potenciador de la hibridación, un agente quelante, un quelato de metal, un detenedor, un fluoróforo, un compuesto fluorogénico, etc. Modificaciones dentro del alcance de "ácido nucleico" también incluye modificaciones en 3' y 5' con una o más de las especies descritas

45 "Ácido nucleico" también incluye especies que están modificados en uno o más puentes internucleotídicos (por ejemplo, $\text{P}(\text{O})\text{O}_3$) mediante el reemplazo derivando un oxígeno del átomo puente con un compuesto de la invención o una especie que incluye un compuesto de la invención unido a un enlazante. Por ejemplo, "ácido nucleico" también se refiere a especies en las que la unidad estructural $\text{P}(\text{O})\text{O}_3$ de un ácido nucleico natural se sustituye con una especie de puente internucleotídico no natural, por ejemplo, $\text{ORP}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{ROP}(\text{O})\text{R}-$, $-\text{ORP}(\text{O})\text{OR}-$ $-\text{ROP}(\text{O})\text{OR}-$ o $-\text{RP}(\text{O})\text{R}-$ en la que el símbolo "-" indica la posición de unión del puente del carbono en 2', 3' o 5' (o el colgante de oxígeno de este carbono) de una unidad estructural de azúcar de nucleótidos, permitiendo así la colocación de los

ejemplificados, y otros enlazantes, no naturales entre unidades estructurales de azúcar de nucleósidos adyacentes. Las subunidades enlazantes de ejemplo ("R") incluyen alquilo sustituido o no sustituido y unidades estructurales sustituidas o no sustituidas. "R" puede incluir un compuesto de la invención o un constructo de un enlazante y un compuesto de la invención.

- 5 Adicionalmente, "ácido nucleico" incluye aquellas especies en las que uno o más puentes internucleótidos no incluye fósforo: siendo el puente opcionalmente modificado con un compuesto de la invención o un constructo de colorante de xanteno de brazo enlazante. Un puente a modo de ejemplo incluye una unidad estructural alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido en donde un átomo de carbono es el locus para la interconexión de dos residuos de nucleósidos de azúcar (o unidades estructurales enlazantes del mismo) y un compuesto de la
10 invención o un constructo enlazante que incluye un compuesto de la invención. La discusión anterior no se limita a unidades estructurales que incluyen un átomo de carbono como el punto de unión; el locus también puede ser otro átomo enlazante apropiado, tal como nitrógeno u otro átomo.

Los expertos en la técnica entenderán que en cada uno de los compuestos "ácido nucleico" descritos anteriormente, la estructura correspondiente a la expresión "compuesto de la invención" se pueden intercambiar con un detenedor,
15 un potenciador de la hibridación, e intercalador, un aglomerante de surco menor, un agente quelante, un quelato metálico u otra unidad estructural que se conjuga de manera útil a un ácido nucleico, estando opcionalmente presentes en tándem con especies que incluyen un compuesto de la invención o un derivado del mismo.

Como se usa aquí, "grupo de detención" se refiere a cualquier grupo que modifica la fluorescencia de la invención que puede atenuar al menos parcialmente la luz emitida por un grupo fluorescente. Esta atenuación se denomina
20 aquí como "detención". Por lo tanto, la iluminación del grupo fluorescente en presencia del grupo de detención conduce a una señal de emisión que es menos intensa de lo esperado, o incluso completamente ausente. La detención se produce típicamente a través de la transferencia de energía entre el grupo fluorescente y el grupo de detención.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos sintético. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético,
25 así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, esto es, un α carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales
30 análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. "Miméticos de aminoácidos" se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

"Péptido" se refiere a un polímero en donde los monómeros son aminoácidos y están unidos entre sí a través de
35 enlaces amida, alternativamente denominados como un polipéptido. Cuando los aminoácidos son α -aminoácidos, se pueden utilizar ya sea el isómero L-óptico o el isómero D-óptico. Adicionalmente, también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina. Aminoácidos comúnmente encontrados que no están codificados por genes también se pueden usar en la presente invención. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser o bien el isómero D- o L-. Los isómeros L- son generalmente preferidos. Además,
40 otros peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Para una revisión general, véase, CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983).

"Especies bioactivas," se refiere a moléculas que, cuando se administran a un organismo, afectan a ese organismo. Especies bioactivas de ejemplo incluyen productos farmacéuticos, pesticidas, herbicidas, reguladores del
45 crecimiento y similares. Especies bioactivas abarcan moléculas pequeñas (esto es, de aproximadamente <1000 daltons), oligómeros, polímeros y similares. También se incluyen ácidos nucleicos y sus análogos, péptidos y sus análogos y similares.

"Molécula portadora," como se usa aquí se refiere a cualquier molécula a la que está unido un compuesto de la invención. Moléculas portadoras representativas incluyen una proteína (por ejemplo, enzima, anticuerpo),
50 glicoproteína, péptido, sacárido (por ejemplo, mono- oligo- y poli-sacáridos), hormona, receptor, antígeno, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento,

etc., sin limitación. "Molécula portadora" también se refiere a las especies que podrían no estar consideradas para caer dentro de la definición clásica de "una molécula", por ejemplo, soporte sólido (por ejemplo, soporte de síntesis, soporte cromatográfico, membrana), virus y microorganismos.

5 "Derivados activados de unidades estructurales hidroxilo", y especies equivalentes, se refieren a compuestos en los que un grupo saliente que contiene oxígeno se deriva formalmente de una unidad estructural hidroxilo.

"Derivados activados de unidades estructurales carbonilo", y especies equivalentes, se refieren a compuestos en los que un grupo saliente que contiene oxígeno se deriva formalmente de una unidad estructural carboxilo.

10 El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique otra cosa, una cadena recta o ramificada, o radical de hidrocarburo cíclico, o combinación de los mismos, que puede estar totalmente saturado, mono- o poliinsaturado y puede incluir radicales mono-, di- y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designados (es decir, C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales alquilo saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, metileno, etilo, etileno, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que 15 tenga uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique otra cosa, incluye "alquilenos" y aquellos derivados de alquilo definidos con más detalle más adelante, tal como "heteroalquilo". Grupos alquilo, que están limitados a grupos hidrocarburo, se denominan "homoalquilo".

20 El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique otra cosa una cadena recta estable o ramificada, o radical de hidrocarburo cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los heteroátomos O, N y S y Si pueden 25 colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NHCH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂CH₃, -CH=CH-OCH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃, y -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tal como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-OSi(CH₃)₃. Del mismo modo, el término "heteroalquilenos" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero no limitado por, - 30 CH₂CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Para los grupos heteroalquilenos, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino, y similares). Aún más, para grupos enlazantes alquilenos y heteroalquilenos, ninguna orientación del grupo enlazante está implicada por la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo enlazante. Por ejemplo, la 35 fórmula -C(O)₂R' representa tanto -C(O)₂R' y -R'C(O)₂.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique otra cosa, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. También se incluyen las especies di- y multivalentes tales como "cicloalquilenos". Adicionalmente, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de 40 cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares.

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique otra cosa, un átomo de flúor, cloro, bromo, o yodo. Además, los términos tales como "haloalquilo", pretendenn incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "halo(C₁-C₄) alquilo" es decir para 45 incluir, pero no limitarse a, especies tales como trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y similares.

El término "arilo" significa, a menos que se indique otra cosa, un hidrocarburo poliinsaturado, aromático sustituyente, 50 que puede ser un anillo individual o múltiples anillos (preferiblemente de 1 a 3 anillos), que están fusionados juntos o enlazados covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro

heteroátomos seleccionados de N, O, y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. También se incluyen especies enlazantes di- y multivalentes, tales como "arileno". Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descrito a continuación.

Por razones de brevedad, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye tanto anillos arilo como heteroarilo como se define anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" se entiende que incluye aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno grupo) ha sido reemplazado por, por ejemplo, un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") incluye tanto formas sustituidas como no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proveen más adelante.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos denominados frecuentemente como alquilenilo, alquenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, y heterocicloalquenilo) ("sustituyentes del grupo alquilo") pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de, pero no limitado a: $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=NOR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$ en un número que varía de cero a $(2m'+1)$, donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. R' , R'' , R''' y R'''' se refieren cada uno preferiblemente de forma independiente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, grupos alquilo, alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo sustituidos o no sustituidos. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como son cada uno de grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6, o 7 miembros, por ejemplo, $-NR'R''$ está destinado a incluir, pero no se limitan a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. De la discusión anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" se entiende que incluye grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acilo (por ejemplo, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ y similares).

Similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo ("sustituyentes del grupo arilo") son variados y se seleccionan de, por ejemplo: halógeno, $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, fluoro(C_1-C_4)alcoxi, y fluoro(C_1-C_4)alquilo en un número que va de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillos aromáticos; y donde R' , R'' , R''' y R'''' se seleccionan preferiblemente independientemente de hidrógeno, (C_1-C_{18})alquilo y heteroalquilo, arilo y heteroarilo no sustituido, (arilo no sustituido)-(C_1-C_4)alquilo y (arilo no sustituido)oxi-(C_1-C_4)alquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como son cada uno de los grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente.

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo se pueden reemplazar opcionalmente por un sustituyente de la fórmula $-T-C(O)-(CRR')_q-U-$ en donde T y U son independientemente $-NR-$, $-O-$, $-CRR'-$ o un enlace sencillo, y q es un entero de 0 a 3. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden ser opcionalmente reemplazados con un sustituyente de la fórmula $-A-(CH_2)_r-B-$, en donde A y B son independientemente $-CRR'-$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'-$ o un enlace sencillo, y r es un entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede ser opcionalmente reemplazado por un doble enlace. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de

arilo o heteroarilo puede ser opcionalmente reemplazado con un sustituyente de la formulación $-(CRR')_s-X-(CR''R''')_d-$, donde s y d son independientemente enteros de 0 a 3, y X es $-O-$, $-NR^1-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, o $-S(O)_2NR^1-$. Los sustituyentes R, R', R'' y R''' preferiblemente se seleccionan independientemente de hidrógeno o (C₁-C₆)alquilo no sustituido o sustituido.

5 "Analito", "objetivo", "sustancia que se va a analizar", y "especies objetivo," tal como se utilizan aquí se refieren a la especie de interés en una mezcla de ensayo. Los términos se refieren a una sustancia, que se detecta cualitativa o cuantitativamente utilizando un material, proceso o dispositivo de la presente invención. Ejemplos de tales sustancias incluyen células y porciones de las mismas, enzimas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras biomoléculas, por ejemplo, antígenos, polipéptidos, glicoproteínas, polisacáridos, glicolípidos complejos, ácidos nucleicos, moléculas efectoras, moléculas receptoras, enzimas, inhibidores y similares, y fármacos, pesticidas, herbicidas, agentes de guerra y otros agentes bioactivos.

Más ilustrativamente, tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, marcadores tumorales tales como α -fetoproteína, antígeno carcinoembrionario (CEA), CA 125, CA 19-9 y similares; diversas proteínas, glicoproteínas y glicolípidos complejos tales como β 2- microglobulina (β 2 m), ferritina y similares; diversas hormonas tales como estradiol (E2), estriol (E3), gonadotropina coriónica humana (hCG), hormona luteinizante (LH), lactógeno placentario humano (hPL) y similares; diversos antígenos relacionados con virus y moléculas de anticuerpos relacionados con virus tales como el antígeno HBs, anticuerpo anti-HBs, antígeno HBc, anticuerpo anti-HBc, anticuerpo anti-HCV, anticuerpo anti-VIH y similares; diversos alérgenos y sus correspondientes moléculas de anticuerpos IgE; fármacos narcóticos y fármacos médicos y productos metabólicos de los mismos; y ácidos nucleicos que tienen secuencias de polinucleótidos relacionados con virus y tumores.

El término "mezcla de ensayo," se refiere a una mezcla que incluye el analito y otros componentes. Los otros componentes son, por ejemplo, diluyentes, reguladores, detergentes, y especies contaminantes, desechos y similares que se encuentran mezclados con el objetivo. Ejemplos ilustrativos incluyen orina, suero, plasma sanguíneo, sangre total, saliva, líquido lagrimal, líquido cefalorraquídeo, fluidos de secreción de los pezones y similares. También se incluyen sólidos, sustancias de gel o sol tales como moco, tejidos del cuerpo, células y similares suspendidos o disueltos en materiales líquidos tales como reguladores, agentes de extracción, solventes y similares.

El término "fármaco" o "agente farmacéutico" se refiere a compuestos bioactivos que provocan un efecto en un organismo biológico. Los fármacos utilizados como unidades estructurales de afinidad u objetivos pueden ser neutrales o en sus formas de sal. Además, los compuestos se pueden utilizar en el presente método en una forma de profármaco. Los profármacos son aquellos compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos bajo condiciones fisiológicas para proveer los compuestos de interés en la presente invención.

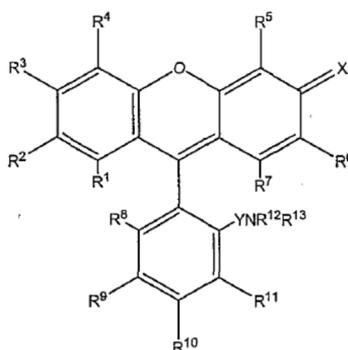
Introducción

La presente invención provee una clase de compuestos fluorescentes reactivos que se basan en el núcleo de xanteno. También se proveen conjugados de los colorantes de xanteno con moléculas portadoras, incluyendo especies biológicas, no biológicas y biológicamente activas. Los marcadores de xanteno seleccionados descritos aquí incluyen un brazo enlazante funcionalizado que es fácilmente funcionalizado con un arreglo de derivados reactivos sin requerir modificación adicional del núcleo xanteno una vez que el brazo enlazante está en su lugar. De acuerdo con ello, los compuestos de la invención proveen una ventaja aún no divulgada, lo que permite el acceso fácil a un arreglo de conjugados entre el núcleo de xanteno derivado del brazo enlazante y las moléculas portadoras. Residiendo en el campo de marcadores fluorescentes, la presente invención provee beneficios de particular interés. Los marcadores fluorescentes tienen la ventaja de requerir algunas precauciones en la manipulación, y siendo susceptibles de técnicas de visualización de alto rendimiento (análisis óptico que incluye la digitalización de la imagen para el análisis en un sistema integrado que comprende un ordenador). Los marcadores de ejemplo presentan una o más de las siguientes características: alta sensibilidad, alta estabilidad, bajo fondo, baja sensibilidad ambiental y alta especificidad en el marcado. Muchos marcadores fluorescentes basados en el núcleo xanteno están disponibles comercialmente por la compañía química SIGMA (Saint Louis, MO), Molecular Probes (Eugene, OR), sistemas R & D (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica- Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas por alguien de experiencia. Adicionalmente, los expertos en la técnica reconocerán cómo seleccionar un fluoróforo basado en

xanteno apropiado para una aplicación particular y, si no está disponible comercialmente, será capaz de sintetizar el fluoróforo necesario *de novo* o modificar sintéticamente los compuestos de xanteno comercialmente disponibles para llegar al marcador fluorescente deseado.

- 5 Los compuestos, sondas y métodos descritos en las siguientes secciones son generalmente representativos de las composiciones de la invención y los métodos en los que tales composiciones se pueden utilizar. La siguiente discusión se destina como ilustrativa de aspectos y realizaciones seleccionados de la presente invención y no debe interpretarse como limitación del alcance de la presente invención.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención provee un compuesto fluorescente que tiene la fórmula:



- 10 en la que R¹, R² y R⁴-R¹¹ se seleccionan cada uno independientemente de grupos tales como alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, halógeno, H, NO₂, CN y C(Z¹)R¹⁴, NR¹⁵R¹⁶ y Z²R¹⁶. R³ se selecciona del Z²R¹⁶ y NR¹⁵R¹⁶.

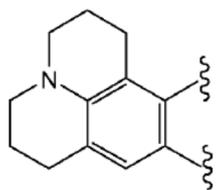
- 15 Z¹ representa O, S o NH. Z² es o bien O o S. Los grupos correspondientes a R¹⁵ incluyen H, alquilo sustituido o no sustituido, y heteroalquilo sustituido o no sustituido. R¹⁶ se selecciona de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido y C(Z³)R¹⁷. R¹⁵ y R¹⁶, junto con el nitrógeno al que están unidos, también pueden ser cualquier grupo reactivo que contiene nitrógeno. Grupos de ejemplo incluyen -NHNH₂, -N=C= S y N=C=O.

- 20 Z³ representa O, S o NH. El símbolo R¹⁷ representa grupos tales como alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, OR¹⁸, y NR¹⁹R²⁰. R¹⁸ representa H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y C(O)R²¹. R¹⁹ y R²⁰ son símbolos que representan grupos seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. R²¹ es alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido.

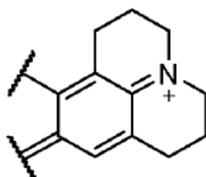
- 25 El símbolo Y representa o bien C(O) o S(O)₂. X es (NR²²R²³) o (O). R²² y R²³ se seleccionan independientemente y son miembros seleccionados de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

- 30 R¹² o R¹³ se seleccionan independientemente de alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, con la condición de que al menos uno de R¹² o R¹³ incluye un grupo reactivo que contiene oxígeno o una molécula portadora a la que el colorante de la invención está conjugado a través de una unidad estructural producida por la reacción del grupo reactivo que contiene oxígeno con un grupo reactivo en la molécula portadora de reactividad complementaria. R¹² y R¹³, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, se unen opcionalmente para formar un anillo. Los anillos de ejemplo incluyen anillos heterocíclicos y heteroarilo de 4-8 miembros.

- 35 Los sustituyentes en los núcleos de anillo arilo pueden estar unidos para formar anillos. Por ejemplo, en una realización en la que R³ es NR¹⁵R¹⁶, R², R⁴ y R¹⁵ y R¹⁶, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, se fusionan con la unidad estructural fenilo a la que NR¹⁵R¹⁶, R² y R⁴ están unidos, formando un sistema de anillo sustituido o no sustituido que tiene la fórmula general:



En aún otra realización en la que X es NR²²R²³, R⁵, R⁶ y R²² y R²³, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, se fusionan con el anillo de 6 miembros insaturado al que NR²²R²³, R⁵ y R⁶ están unidos, formando un sistema de anillo sustituido no sustituido que tiene la fórmula general:



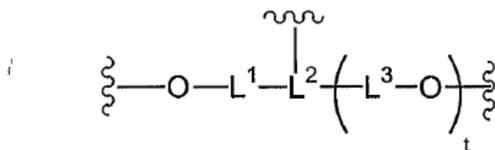
5

La presente invención también provee un conjugado entre una molécula portadora, por ejemplo, un ácido nucleico, y un compuesto fluorescente de la invención, que está unido covalentemente o iónicamente a una unidad estructural de la molécula portadora. Cuando la molécula portadora es un ácido nucleico, las unidades estructurales representativas a los que se unen los compuestos fluorescentes de la invención incluyen la unidad estructural de azúcar, en centros de O- y/o C; aminas endo y/o exo-cíclicas, átomos de carbono de unidades estructurales de nucleobases, y puentes internucleotídicos. En todavía una realización de ejemplo adicional, el conjugado entre el compuesto de la invención y la molécula portadora incluye al menos una unidad estructural que detiene la emisión de fluorescencia del compuesto de la invención.

Los compuestos de la invención incluyen una unidad estructural enlazante como un componente de uno o ambos R¹² y R¹³. Un enlazante de ejemplo es un alquilo sustituido o no sustituido o una unidad estructural heteroalquilo sustituida o no sustituida que incluye un grupo reactivo en el extremo del enlazante. En los conjugados de la invención, el grupo reactivo se convierte en una unidad estructural de enlazamiento por reacción con un grupo de reactividad complementaria en la especie a la que se conjuga el colorante.

En una realización representativa, la invención provee un colorante de xanteno, como se expuso más arriba, en donde R¹² y/o R¹³ incluye una unidad estructural que tiene la fórmula:

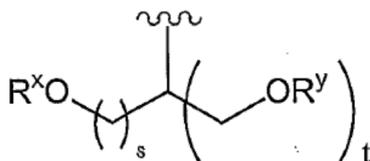
20



en donde L¹, L² y L³ son miembros seleccionados independientemente de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. El índice de "t" es 0 o 1. Los brazos enlazantes de ejemplo de acuerdo con esta fórmula incluyen uno o más de amida, uretano, éter, éster, urea, sulfonamida, sulfóxido, amina, sulfuro, fosfato, o una unidad estructural ceto. En otro enlazante de ejemplo de uso en la invención, uno o más de L¹, L² o L³ incluye de 1 a 6 unidades estructurales de etilenglicol.

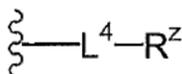
25

Un subconjunto de las unidades estructurales R¹² y R¹³ de acuerdo con el motivo indicado más arriba tiene la fórmula:



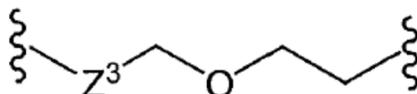
5 en la que los símbolos R^x y R^y representan grupos que se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido, un grupo protector de hidroxilo, una unidad estructural fosfato, una unidad estructural fosfodiéster, un puente internucleotídico que contiene fósforo, un soporte sólido, una molécula portadora y $OP(OR^o)(N(R^pR^q))$. Los grupos representados por los símbolos R^o , R^p y R^q son miembros seleccionados independientemente de H, C_1 - C_6 alquilo sustituido o no sustituido y C_1 - C_6 heteroalquilo sustituido o no sustituido, y el índice de "s" es un entero de 1 a 20. En una realización de ejemplo, R^o es CH_2CH_2CN .

La invención también provee compuestos fluorescentes en los que al menos uno de R^x y R^y comprende una unidad estructural que tiene la fórmula:



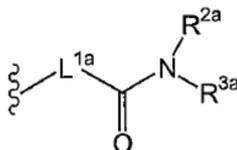
10 L^4 es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido; y R^z es un miembro seleccionado de un grupo funcional reactivo, soporte sólido, o una molécula portadora, por ejemplo, un ácido nucleico, un sacárido y un péptido.

En los compuestos seleccionados de la invención, L^4 comprende una unidad estructural que tiene la fórmula:



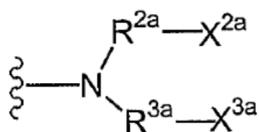
15 en donde el símbolo Z^3 representa o bien CH_2 o $C=O$.

En otra realización, la invención provee colorantes de xanteno en los que uno de los sustituyentes en el núcleo de xanteno, preferiblemente R^{12} , incluye una unidad estructural que tiene la estructura:



20 en donde L^{1a} es un miembro seleccionado de grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, y heteroalquilo sustituidos o no sustituidos. Los símbolos R^{2a} y R^{3a} representan grupos que se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, y heteroalquilo sustituido o no sustituido. Los grupos R^2 y R^3 , junto con el nitrógeno al que están unidos, se unen opcionalmente para formar un anillo. Estructuras de anillo preferidas incluyen C_5 - C_7 cicloalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido de 5-7 miembros.

25 Una especie de enlazante de ejemplo de acuerdo con el motivo presentado más arriba incluye una unidad estructural $NR^{12}R^{13}$ que tiene la fórmula:

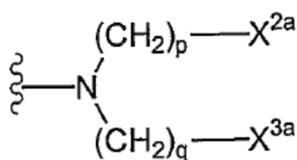


5 en la que R^{2a} y R^{3a} son miembros seleccionados independientemente de alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. Los símbolos X^{2a} y X^{3a} representan grupos que se seleccionan independientemente de H, alquilo inferior sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, grupos funcionales reactivos y un enlace a una molécula portadora. Cuando la molécula portadora es un ácido nucleico, el enlace puede ser a una nucleobase (por ejemplo, a C o N), azúcar (por ejemplo, a C u O) o el puente internucleotídico (por ejemplo, a P, O, S, C o N).

10 Identidades de ejemplo para X^{2a} y X^{3a} incluyen $-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, y $-\text{OP}(\text{OX}')(\text{N}(\text{X}'')_2)_2$ en la que X' y X'' son miembros seleccionados independientemente a partir de alquilo sustituido o no sustituido. En un compuesto de ejemplo de la invención X' es cianoetilo; y ambas unidades estructurales X'' son isopropilo. Cuando X^{2a} y X^{3a} son componentes de los enlaces entre una especie de la invención y una molécula portadora, el grupo se modifica de una manera que satisfaga las reglas de valencia, por ejemplo, $-\text{OH}$ se convierte en $-\text{O}-$; COOH se convierte en COOR , CONRR' , etc.

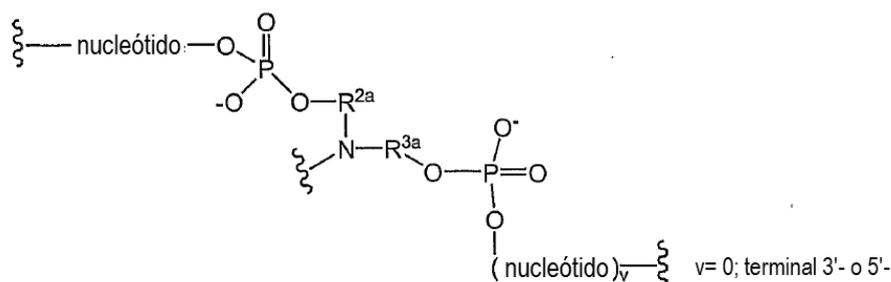
15 En otra realización preferida, un miembro seleccionado del R^{2a} , R^{3a} y combinaciones de los mismos comprende un poliéter. Los poliéteres preferidos incluyen, por ejemplo, poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) y copolímeros de los mismos. El poliéter puede ser interno al grupo R^{2a} o R^{3a} o puede formar el terminal libre del grupo. Cuando el poliéter está en el terminal del grupo, la unidad estructural $-\text{O}-$ terminal está presente como $-\text{OH}$, alcoxi o uno de una variedad de los grupos mencionados aquí como sustituyentes para las unidades estructurales alquilo. Véase, por ejemplo, Shearwater Polymers, Inc. Catalog of Poly(ethylene glycol) Derivatives 2002.

20 En una realización de ejemplo adicional, $\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ tiene la fórmula:



en la que los índices p y q son enteros seleccionados independientemente de 1 a 20, inclusive, preferiblemente de 2 a 16, inclusive.

En aún otra realización de ejemplo, $\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ tiene la fórmula:

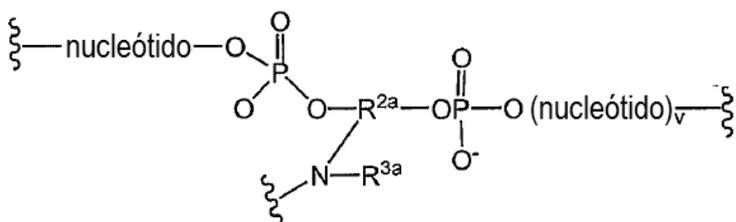


25 en la que el índice "v" es 0 o 1. R^{2a} y R^{3a} se seleccionan independientemente de unidades estructurales alquilo sustituidos o no sustituidos o heteroalquilo sustituido o no sustituido. Cuando "v" es), el fosfato mostrado alternativamente puede ser OH. Aunque representado como interpuesto entre dos nucleótidos, el marcador fluorescente de la invención se puede colocar en cualquier punto entre dos subunidades de nucleósido o nucleótido

30 en un ácido nucleico. Por lo tanto, los compuestos de ejemplo incluyen NR^{2}R^3 en una posición interna del ácido

nucleico, y atado con el ácido nucleico en el enlace entre los residuos 5' y 5'-1 y/o el enlace entre los residuos 3' y 3'-1.

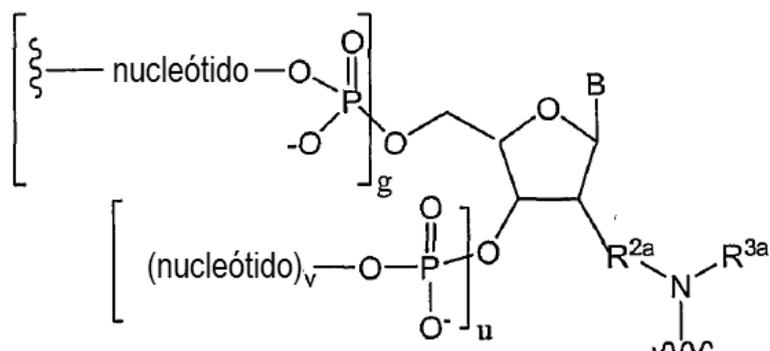
En una realización de ejemplo, NR¹²R¹³ tiene la fórmula:



5 cuando v = 0; terminales en 3' o 5'

Cuando "v" es 0, el grupo fosfato es opcionalmente un grupo OH.

La invención también provee derivados de ácidos nucleicos en los que se conjuga un compuesto de la invención a una unidad estructural de azúcar del ácido nucleico. Una especie de ejemplo de acuerdo con este motivo tiene la fórmula:



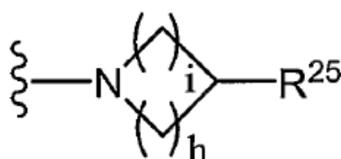
10

en la que el índice u y el índice g representan independientemente 0, 1 o un número mayor que uno, con la condición de que al menos uno de u y g es distinto de cero. Aunque se muestra unido al carbon 2' del terminal en 3' del ácido nucleico, los expertos apreciarán que una estructura similar atada al terminal en 5', o un sitio interno del ácido nucleico está dentro del alcance de la invención. Por otra parte, el grupo puede ser atado a través del átomo de O de un 2'-hidroxilo. Cuando "u" es 0, el grupo fosfato/fosfodiéster es opcionalmente OH.

15

Por otra parte, los agentes de la invención pueden conjugarse a través de la unidad estructural 3' y/o 5'-hidroxilo de un ácido nucleico.

En otra realización de ejemplo, NR¹²R¹³ tiene la fórmula:



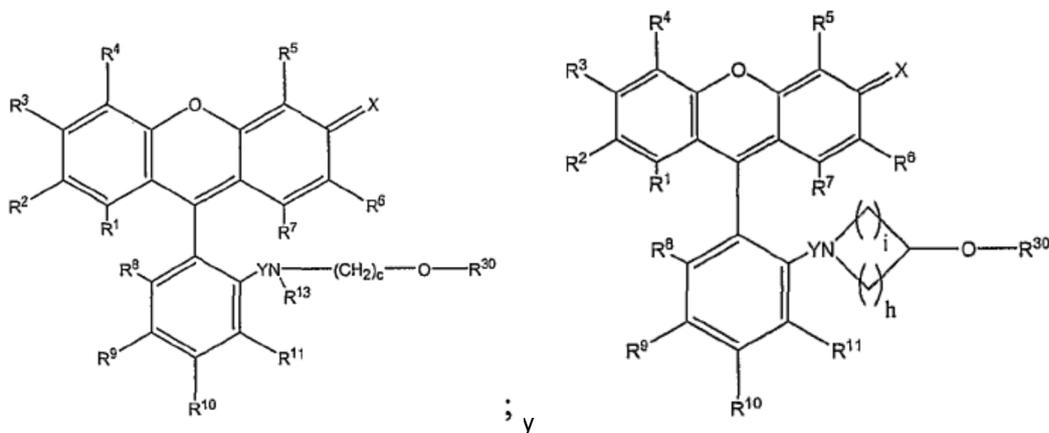
en la que h e i son miembros seleccionados independientemente de nenteros de tal manera que la suma (h + i) es de 4-8. R²⁵ es un grupo funcional reactivo, por ejemplo, y el grupo funcional reactivo que contiene oxígeno. En una realización de ejemplo, R²⁵ es una fosforamidita. En una realización de ejemplo, h e i son ambos 2.

En una realización de ejemplo, R¹² y R¹³ no son ambos -(CH₂)_a-OH en donde a es un entero de 1 a 3.

- 5 En aún otra realización, cuando R¹² es -(CH₂)_bCH₃, en donde b es un entero de 0 a 3, R¹³ es diferente de -CH₂CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH₂OH, y, en todavía una realización adicional, que un miembro seleccionado de R¹² y R¹³ comprende un miembro seleccionado de OH, fosforamidita, un enlazante a una molécula portadora, un enlazante a un soporte sólido y combinaciones de los mismos.

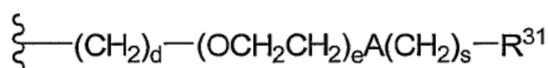
Los compuestos representativos de la invención se exponen en la Figura 1.

- 10 En otra realización de ejemplo, la invención provee compuestos que tienen una fórmula que es un miembro seleccionado de:



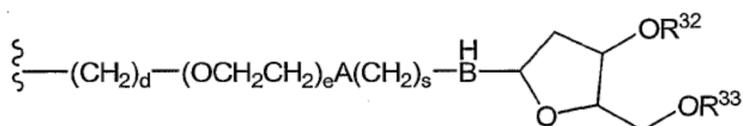
- 15 en las fórmulas anteriores, R¹³ es un miembro seleccionado de H, C₁-C₂₀ alquilo no sustituido, y C₁-C₂₀ alquilo sustituido que no está sustituido con OH. El símbolo R³⁰ representa H, P(OR^q(NR^pR^q))₂ o C(O)NH-L^c-R³¹. L^c es un enlace o enlazante seleccionado de alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido unido a R³¹. R³¹ es OH, OP(OR^q)(N(R^pR^q)), un ácido nucleico, una fosforamidita de un ácido nucleico, un ácido nucleico enlazado a un soporte sólido, y ácido amino, un aminoácido protegido, un aminoácido unido a un soporte sólido o un residuo de aminoácido de un péptido. Los símbolos R^q, R^p y R^q representan independientemente H, C₁-C₆ alquilo o sustituido o C₁-C₆ heteroalquilo sustituido o no sustituido o no sustituido. El índice c es un entero de 1 a 20. R¹-R¹¹ son como se discutió anteriormente.
- 20

Una especie de ejemplo de acuerdo a L^c tiene la fórmula:



- 25 en la que los índices D y s se seleccionan independientemente de los enteros de 0 a 10. El índice e es un entero de 0 a 1,000. Generalmente, al menos uno de d, s y e es al menos 1. A es un enlace, NH, S o O. El símbolo R³¹ es como se discutió anteriormente.

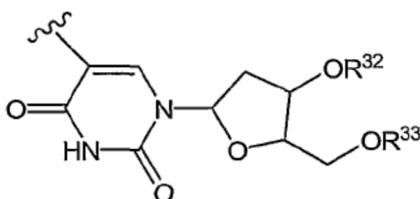
En otra realización de ejemplo, -L^c-R³¹ tiene la fórmula:



en donde el símbolo A representa O, S o NH. B es una base de ácido nucleico. R³² es H, P(OR^o)(N(R^pR^q)) o LG-R³⁴. L^g es un enlace, un puente de fosfodiéster internucleótido, un grupo alquilo sustituido o no sustituido o una unidad estructural heteroalquilo sustituida o no sustituida. El símbolo R³⁴ representa OH, un soporte sólido, P(OR^o)(N(R^pR^q)) o un ácido nucleico.

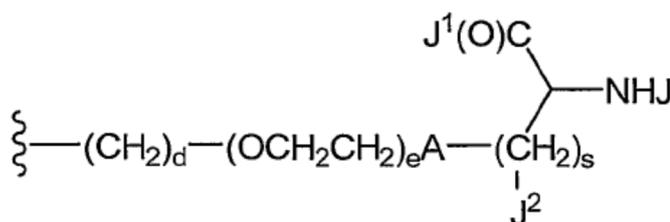
- 5 R³³ es un grupo protector de hidroxilo (por ejemplo, tritilo o un tritilo sustituido, véase, por ejemplo, Jones, AMINO ACID Y PEPTIDE SYNTHESIS, Oxford Science Publications, Oxford, 1992), OH, un soporte sólido, P(OR^o)(N(R^pR^q)), o un ácido nucleico.

Un ácido nucleico de ejemplo de acuerdo con esta realización tiene la fórmula:



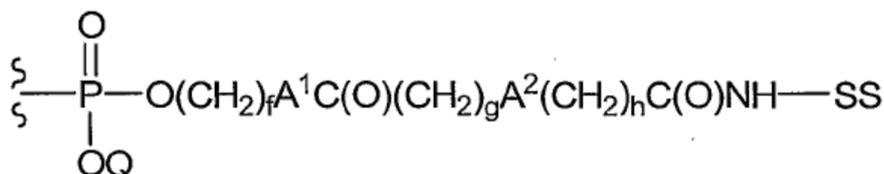
- 10 en la que R³² y R³³ son como se discutió anteriormente.

En otra realización, el fluoróforo xanteno está unido a un aminoácido, preferiblemente a través de un enlazante. Por ejemplo, compuestos dentro del alcance de la presente invención incluyen aquellos en los que R¹² tiene la fórmula:



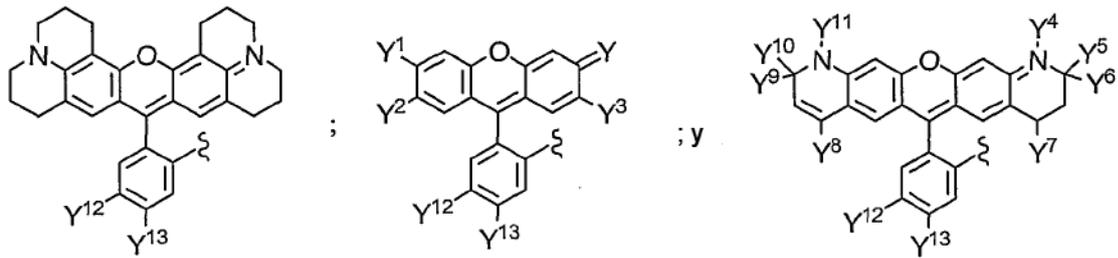
- 15 en la que J es H o un grupo protector de amina, por lo general un grupo protector reconocido en la técnica de síntesis de péptidos (por ejemplo, t-Boc, FMOC, etc.; véase, por ejemplo, Jones, AMINO ACID AND PEPTIDE SYNTHESIS, Oxford Science Publications, Oxford (1992)). J¹ es un miembro seleccionado de H, grupos de activación y aminoácidos. J² es H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido. A y los índices d, s y e son como se discutió anteriormente.

En aún una realización de ejemplo adicional, la invención provee un compuesto en donde R³² tiene la fórmula:



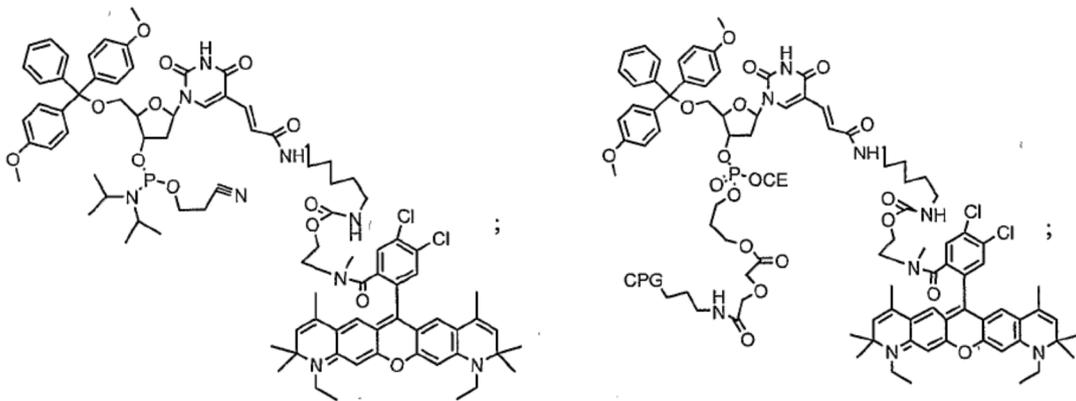
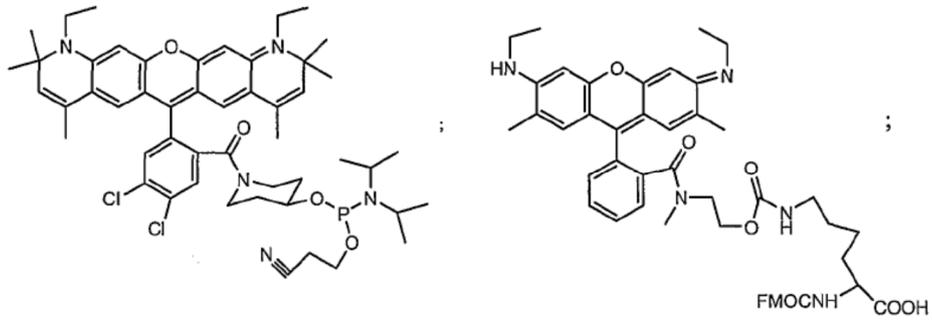
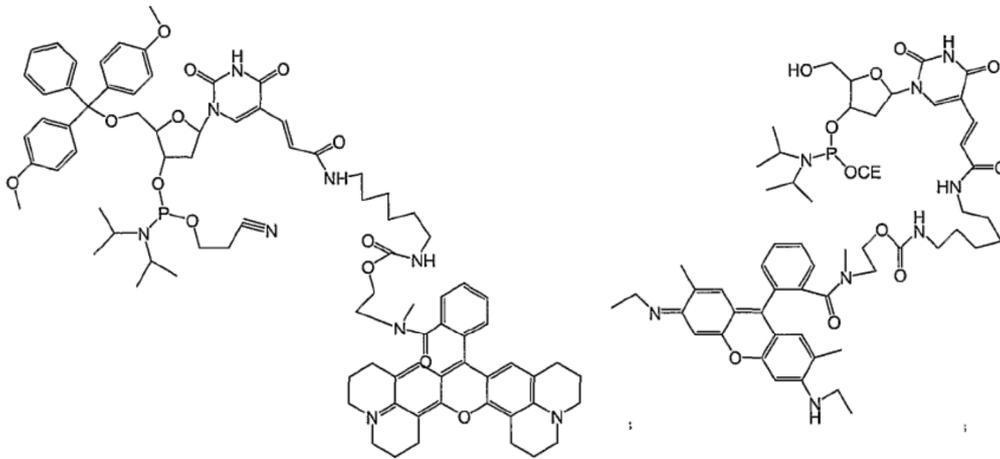
- 20 en donde A¹ y A² se seleccionan independientemente de un enlace, O y NH. El símbolo SS representa un soporte sólido. Q es un miembro seleccionado de O- y alquilo sustituido o no sustituido; y f, g, y h son enteros seleccionados independientemente de 0 a 20. En especies seleccionadas de acuerdo con este motivo A¹ y A² son ambos O.

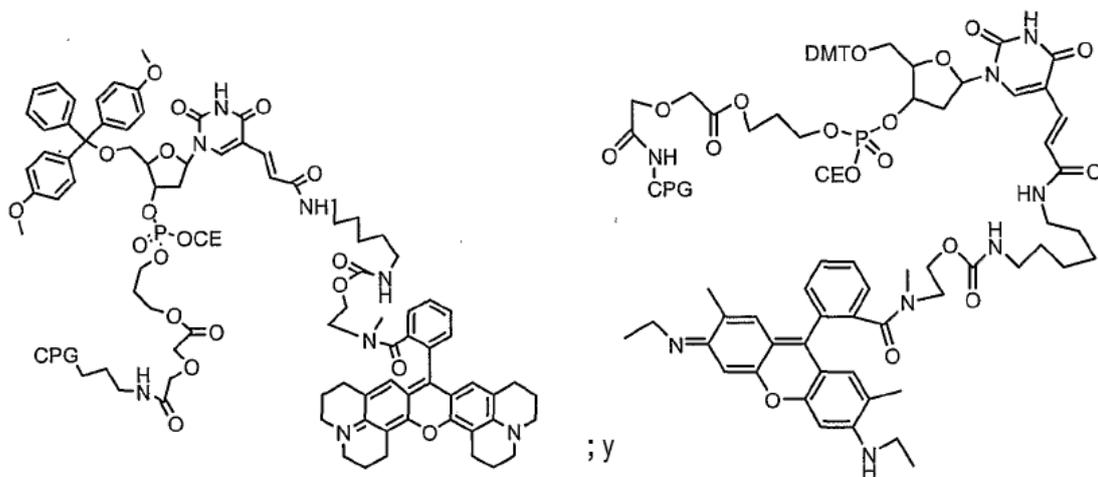
- 25 En realizaciones de ejemplo adicionales, los compuestos de la invención incluyen un componente de xanteno que tiene una fórmula seleccionada de:



5 en la que Y es O o NYⁿ. Los símbolos Y' y Y' son independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido. Y¹, Y², Y³, Y¹² y Y¹³ se seleccionan independientemente de halógeno, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. Los símbolos Y⁴ y Y¹¹ representan independientemente alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido. Y⁵, Y⁶, Y⁹ y Y¹⁰ son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. Y⁷ y Y⁸ son independientemente alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido.

Compuestos de ejemplo de acuerdo con la invención se exponen a continuación:



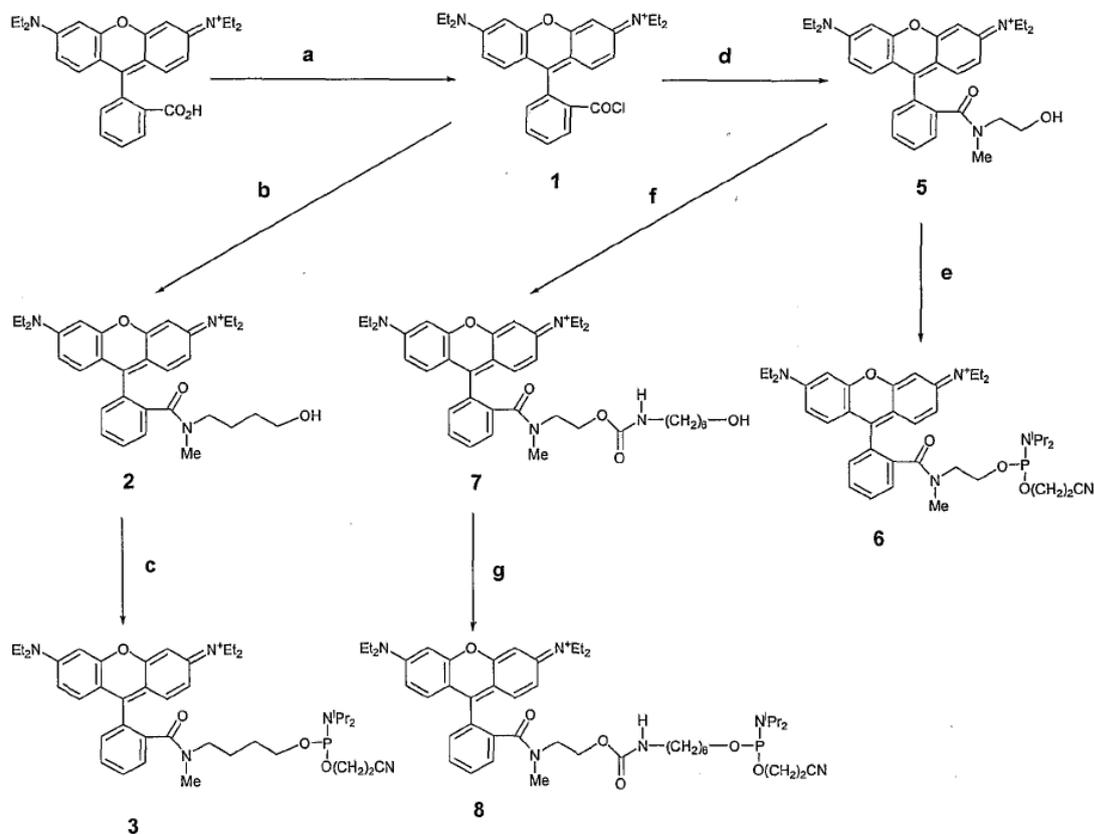


Síntesis

Los compuestos de la invención se sintetizan mediante una combinación apropiada de métodos sintéticos generalmente bien conocidos. Las técnicas útiles en la síntesis de los compuestos de la invención son tanto fácilmente evidentes y accesibles para los expertos en la técnica relevante: La discusión a continuación se ofrece para ilustrar ciertos de los diversos métodos disponibles para su uso en el montaje de los compuestos de la invención, no está destinada a definir el alcance de las reacciones o secuencias de reacción que son útiles en la preparación de los compuestos de la presente invención.

Los compuestos de la invención se pueden preparar como un isómero individual o una mezcla de isómeros, incluyendo, por ejemplo, isómeros cis, isómeros trans, diastereoisómeros y estereoisómeros. En una realización preferida, los compuestos se preparan como sustancialmente un isómero individual. Los compuestos isoméricamente puros se preparan mediante el uso de intermediarios sintéticos que son isoméricamente puros en combinación con reacciones que, o bien dejan la estereoquímica en un centro quiral sin cambios o dan como resultado su inversión completa. Alternativamente, el producto final o intermediarios a lo largo de la ruta sintética se pueden resolver en un isómero individual. Las técnicas para invertir o dejar sin cambios un estereocentro particular, y aquellos para la resolución de mezclas de estereoisómeros son bien conocidos en la técnica y está bien dentro de la capacidad de un experto en la técnica para escoger una resolución apropiada o método sintético para una situación particular. Véase, en general, Furniss et al. (eds.), VOGEL'S ENCYCLOPEDIA OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY 5TH ED., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, pp. 809-816; and Heller, Acc. Chem. Res. 23: 128 (1990).

Esquema 1

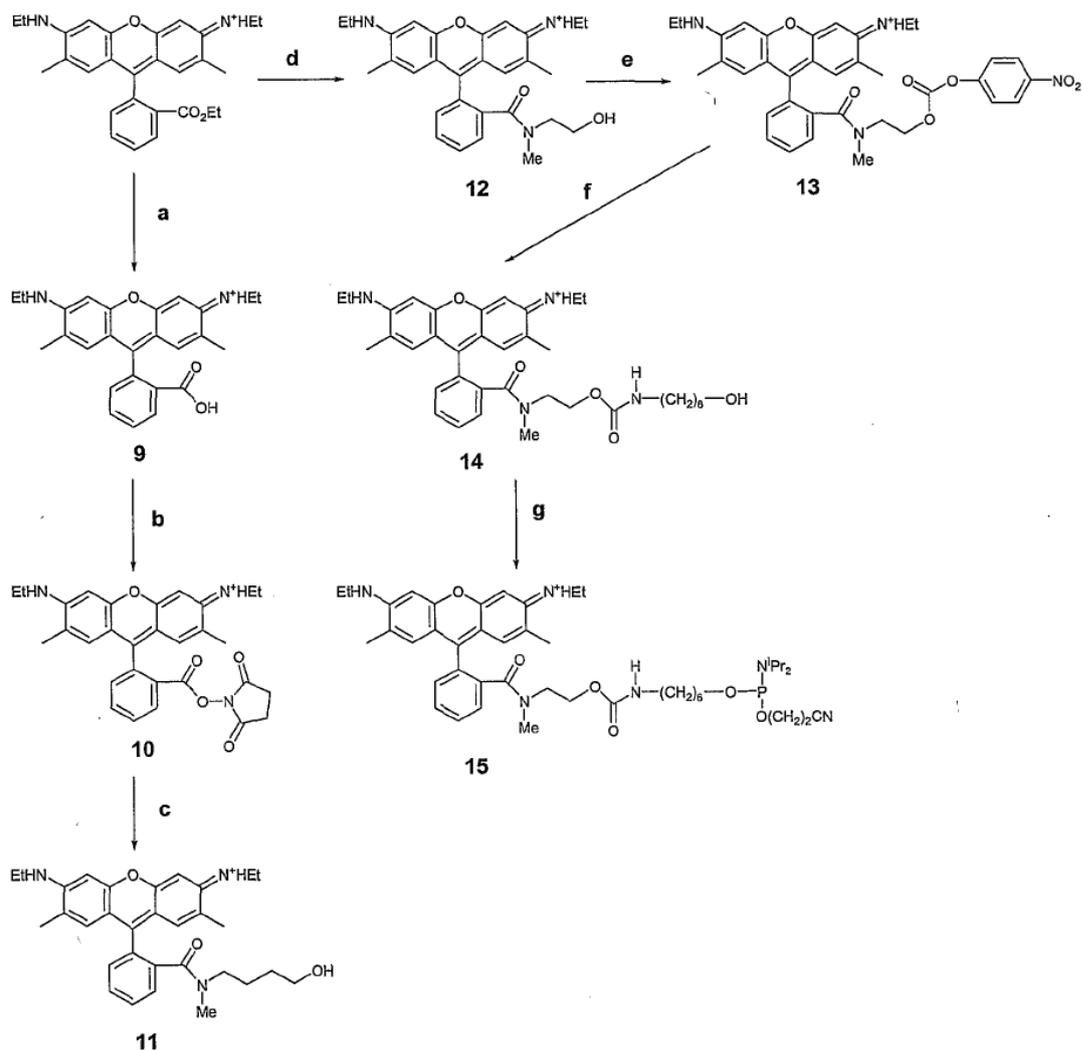


- a. POCl₃, reflujo; b. (1) N-metilaminobutanol, DMF/MeCN; (2) KPF₆; c. N,N,N',N'-tetraisopropil-β-cianoetilfosfano, 1-H tetrazol, DCM; d. (1) N-metilaminoetanol, DMF, DCM; (2) KPF₆; e. N,N,N',N'-tetraisopropil-β-cianoetilfosfano, 1-H tetrazol; f. p- (1) nitrofenil cloroformiato, piridina, dioxano; (2) 6-aminohexanol, DIEA, DCM; g. N, N', N'-tetraisopropil-β-cianoetilfosfano, 1-H tetrazol, DCM.

Una ruta sintética de ejemplo a compuestos de la invención se expone en el Esquema 1. Rodamina B cloruro de ácido 1 se prepara mediante la acción de oxiclورو de fósforo en el precursor colorante de ácido carboxílico. El colorante activado se hace reaccionar con aminoalcoholes seleccionados para formar amidas correspondientes 2 y 5. El brazo enlazante se extiende fácilmente mediante la activación de la unidad estructural hidroxilo de 5 y formación de uretano 7 con un alcohol amino apropiado. Los colorantes que portan los brazos enlazantes terminados en hidroxilo se convierten en las correspondientes fosforamiditas 3, 6 y 8.

10

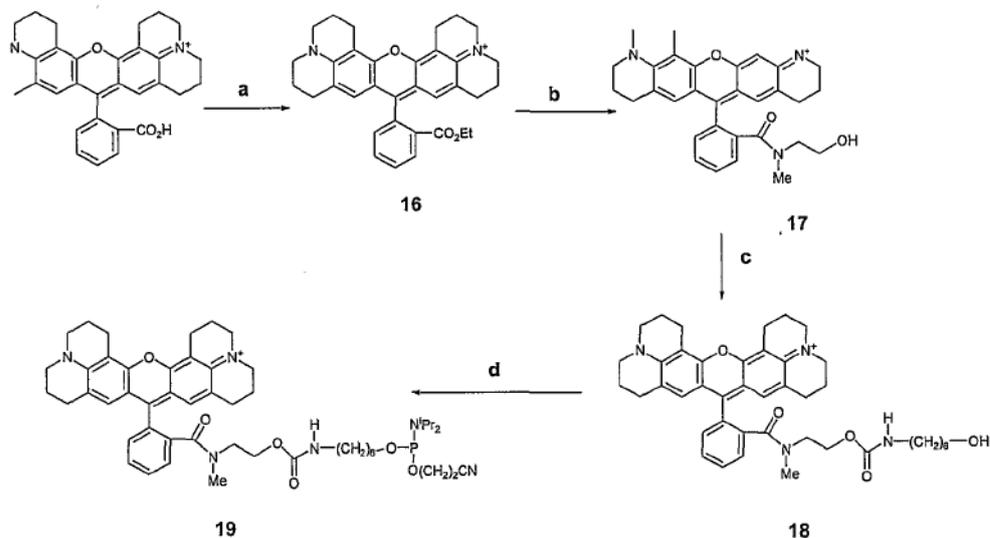
Esquema 2



a. DMSO/NaOH 1N(ac); b. N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil) uronio tetrafluoroborato, diisopropiletilamina, DMF; c. N-metilaminobutanol, DMF; d. N-metiletanolamina, 120°C; e. cloroformiato de p-nitrofenilo, piridina, dioxano; f. 6-amino-1-hexanol, Na₂CO₃ acuoso, THF; g. N,N,N' N'-tetraisopropil-β-cianoetilfosfano, 1-H tetrazol, MeCN, DCM.

- 5 El Esquema 2 delinea la preparación de una serie de colorantes de xanteno derivados de brazos enlazantes la invención. El éster etílico de Rodamina 6G se hidrolizó en base, proporcionando el ácido correspondiente 9, que se activa como el éster de N-hidroxisuccinimida 10 y se convierte en la correspondiente amida de alquilo terminado en hidroxilo 11. Alternativamente, el éster es aminolisado con un aminoalcohol, produciendo amida 12. La amida se activa como el p-nitrofenilcloroformiato 13 y se acopla con 6-amino-1-hexanol, produciendo 14, que se convierte fácilmente en la fosforamidita correspondiente 15.

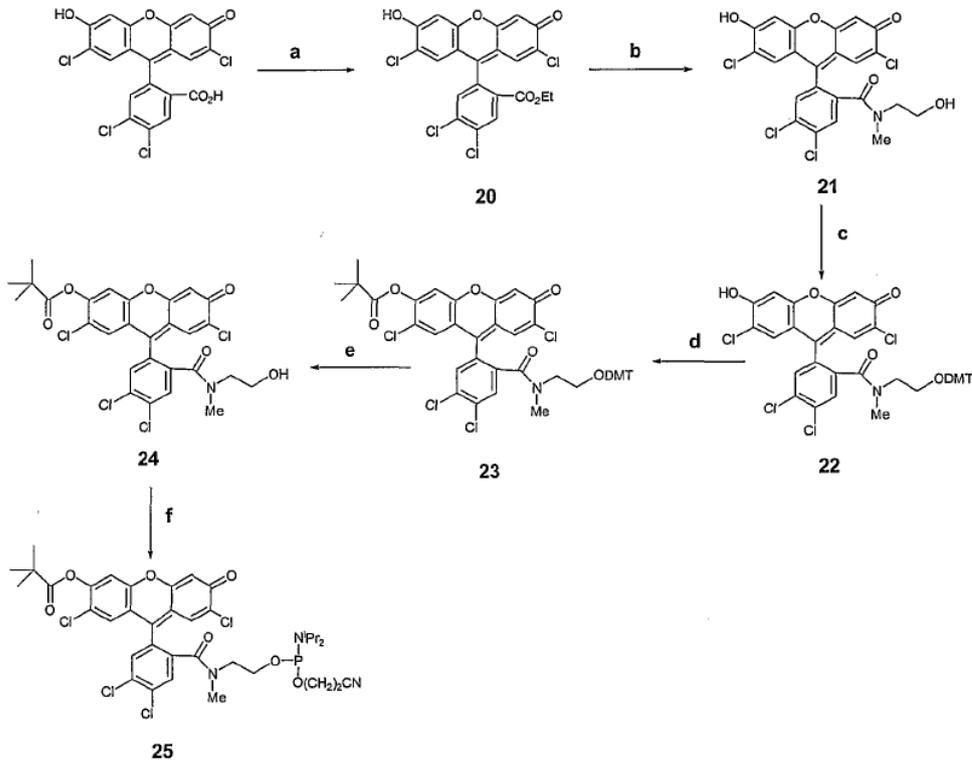
Esquema 3



a. EtOH, CSiMe_3 , reflujo: b. N-metiletanolamina, 120°C : c. cloroformiato de p-nitrofenilo, piridina, dioxano: d. 6-amino-1-hexanol, Na_2CO_3 acuoso, THF: e. N,N,N',N'-tetraisopropil- β -cianoetilfosfano, 1-H tetrazol, MeCN, DCM.

- 5 El Esquema 3 establece una ruta de ejemplo para la preparación de un colorante derivado del brazo enlazante y la fosoramidita correspondiente de rodamina 101. El conjugado 17 de brazo enlazante de colorante está formado por aminólisis del éster 16 con N-metilaminoetanol. El análogo activado de p-nitrofenilo de 17 se hace reaccionar con 6-amino-1-hexanol, proveyendo uretano 18, que se convierte en la fosoramidita 19.

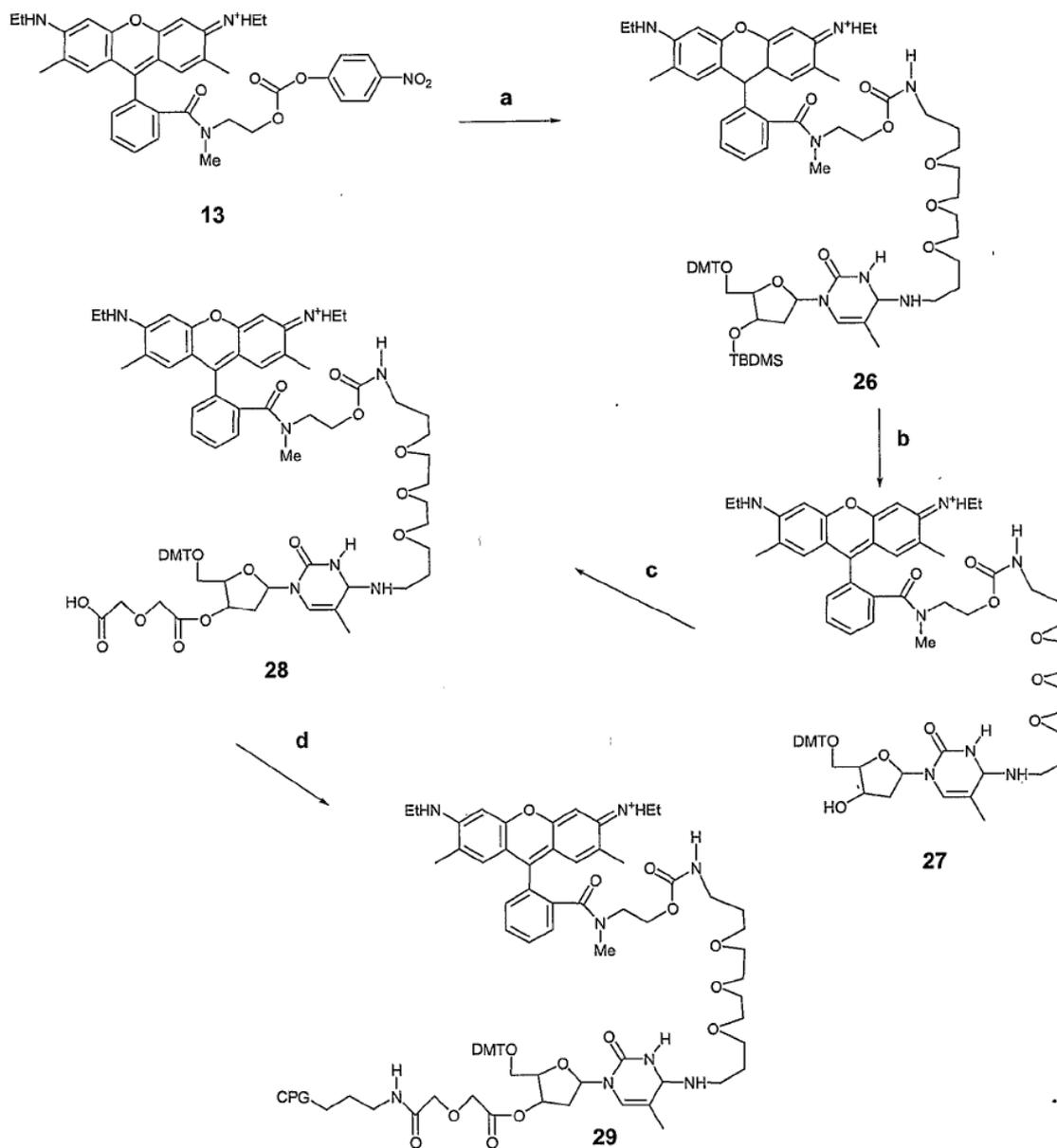
Esquema 4



a. EtOH, ClSiMe₃, reflujo: b. N-metil-etanolamina, 120°C: c. cloruro de dimetoxitritilo, piridina: d. Me₃C(O)Cl, piridina: e. 3% Cl₂CHCOOH: f. N, N,N',N'-tetraisopropil-β-cianoetilfosfano, 1-H tetrazol, MeCN, DCM.

5 En el Esquema 4, el éster etílico 20 se forma por la acción de clorotrimetilsilano y etanol y el compuesto de origen. La aminólisis del éster con N-metilaminoetanol provee amida 21. La protección de la unidad estructural hidroxilo como el éter DMT provee 22, y la protección del hidroxilo similar a fenol como el grupo t-butilacetilo dan como resultado 23. la unidad estructural DMT se elimina con ácido dicloroacético y el alcohol resultante 24 se convierte en la fosforamidita 25.

Esquema 5



- 5 a. N^4 -(2-(4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina)-5-metil-5'-(4,4'-dimetoxi-tritilo)-3'-O-tert-butildimetilsilil-2'-desoxicidina, NaHCO_3 , THF: b. fluoruro de tetrabutilamonio, THF: c. anhídrido diglicólico, N-metilimidazol, piridina: d CPG, Bop, N-metilmorfolina, THF.

Como se muestra en el Esquema 5, p-nitrofenilcarbonato 13 se convierte en uretano 26 con N^4 -(2-(4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina)-5-metil-5'-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-tertbutildimetilsilil-2'-desoxicidina. El grupo TBDMS se elimina del uretano y el producto resultante 27 se hace reaccionar con anhídrido glutárico para producir el ácido 28 que se conjuga con vidrio poroso controlado activado, produciendo 29.

Cada una de las fosforamiditas descritas anteriormente y el conjugado inmovilizado de CPG 29 son de uso en la síntesis de ácidos nucleicos. Las fosforamiditas se acoplan limpiamente a un ácido nucleico como se ha demostrado por análisis cromatográfico de TTCGATAAGTCTAG, marcado en la unidad estructural 5'-G con un compuesto de la invención.

5 Por ejemplo, la Figura 2 es una traza de HPLC en fase reversa de un conjugado entre el ácido nucleico y 15, que muestra la pureza del conjugado. El espectro de masas, que muestra un pico que corresponde al conjugado (M/e 5214), se muestra en la Figura 3. La Figura 4 es un cromatograma de HPLC de intercambio de aniones de un conjugado entre el ácido nucleico y 25. El espectro de masas (Figura 5) del conjugado de ácido nucleico con 25 incluye un pico principal en M/e 5128, que corresponde al conjugado. El cromatograma de HPLC en fase reversa del
10 conjugado entre el ácido nucleico y 19 se muestra en la Figura 6. Un espectro de masas de este conjugado tiene un pico (M/e 5304) que corresponde al peso molecular del conjugado (FIGURA 7). El cromatograma de intercambio aniónico del conjugado entre el ácido nucleico y 28 enlazado a 3'-OH se muestra en la figura 8 y el espectro de masas en la Figura 9.

15 Los perfiles de absorción y emisión de los conjugados de los xantenos de la invención 25,15, 6 y 19 y un ácido nucleico modelo (TTTTTTTTTTT) se muestran en la Figura 10, Figura 11, Figura 12, Figura 13, respectivamente.

La síntesis química del ácido nucleico es generalmente automatizado y se realiza mediante el acoplamiento de los nucleósidos a través de enlaces covalentes que contienen fósforo. El método de síntesis de oligonucleótidos más comúnmente utilizado involucra la reacción de un nucleósido con un monómero cianoetil fosforamidita protegido en presencia de un ácido débil. La etapa de acoplamiento es seguida por oxidación del enlace fosfito resultante.
20 Finalmente, el grupo protector cianoetilo se elimina y el ácido nucleico se escinde del soporte sólido sobre el que se sintetizó. Los marcadores de la presente invención se pueden incorporar durante la síntesis de oligonucleótidos utilizando un derivado de fosforamidita del compuesto fluorescente de la invención. Alternativamente, el marcador se puede introducir mediante la combinación de un compuesto de la invención que incluye un grupo funcional reactivo con el ácido nucleico bajo condiciones apropiadas para acoplar el compuesto con el ácido nucleico. En aún otra
25 realización, el compuesto fluorescente está unido a un soporte sólido a través de un brazo enlazante, tal como un alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido o un residuo de ácido nucleico. La síntesis procede con la unidad estructural fluorescente ya en su lugar en la cadena de ácido nucleico en crecimiento

Los métodos enzimáticos de síntesis implican el uso de ácidos nucleicos marcados con fluorescencia en conjunción con una plantilla de ácido nucleico, un cebador y una enzima. La incorporación enzimática eficaz eficiente de un
30 ácido nucleico marcado fluorescente es facilitada por la selección de asociados de reacción que no afectan negativamente a la capacidad de la enzima para acoplar los asociados.

En aquellas realizaciones de la invención en las que el compuesto fluorescente basado en xanteno de la invención está unido a un ácido nucleico, la molécula portadora es producida por cualquiera de los procesos sintéticos (fase sólida, fase líquida o una combinación) o enzimáticos, o mediante una combinación de estos procesos. Una
35 estrategia sintética para la preparación de oligonucleótidos es el método de H-fosfonato (Froehler, B. and Matteucci, M. (1986) Tetrahedron Lett., (27): 469-472). Este método utiliza monómeros de nucleósido H-fosfonato activado en vez de fosforamiditas para crear el enlace internucleotídico fosfato. En contraste con el método de la fosforamidita, el enlace fosfonato resultante no requiere la oxidación en cada ciclo, sino que solamente una única etapa de oxidación al final del ensamblaje de la cadena. El método H-fosfonato también se puede usar para conjugar los informadores y colorantes a las cadenas de oligonucleótidos sintéticos (Sinha, N. and Cook, R. (1988) Nucleic Acids Research,(16):
40 2659).

Las cuatro bases de los nucleósidos, adenina, timina (uracilo en el ARN), guanina y citosina incluyen unidades estructurales que son reactivas químicamente (por ejemplo, aminas exocíclicas) y deben ser protegidas de participar en reacciones indeseables durante la síntesis del oligonucleótido mediante "bloqueo" de los sitios reactivos con una
45 unidad estructural que se puede eliminar una vez que la síntesis es completa. Los grupos protectores tradicionales incluyen los grupos benzoilo (dA, dC) e isobutirilo (dC, dG). Cada uno de los grupos protectores mencionados anteriormente es lábil en medio básico y típicamente se escinde, con la escisión concomitante del oligonucleótido del soporte de síntesis, usando mezclas de amoníaco/agua. Una revisión completa de los grupos protectores se puede encontrar en "Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach", Tetrahedron Vol 48,
50 p2223-2311, 1992).

En otra realización de ejemplo, la invención provee un método de desprotección de un conjugado formado entre un colorante de xanteno de la invención y un ácido nucleico. El método consiste en poner en contacto un precursor del conjugado en donde los monómeros de ácido nucleico están protegidos con un cóctel de desprotección que incluye una amina y alcohol. Se ha descubierto que el uso del cóctel de desprotección con los conjugados de la invención mejora significativamente el rendimiento del conjugado desprotegido, minimizando la degradación del colorante de xanteno durante la desprotección.

El oligonucleótido puede escindir del soporte sólido antes de la desprotección, después de la desprotección o concomitante con la desprotección. Por lo tanto, en otra realización, el oligonucleótido está atado a un soporte sólido a través de un brazo enlazante que no se escinde por la amina orgánica que elimina el grupo protector lábil en medio básico. En esta realización, el oligonucleótido se puede escindir del soporte usando un reactivo distinto del reactivo de desprotección. Por lo tanto, el método de la invención incluye además la etapa de poner en contacto el oligonucleótido unido al soporte con un reactivo de escisión, formación de esta forma una mezcla de escisión, e incubando la mezcla de escisión durante un período de tiempo suficiente para escindir el oligonucleótido del soporte.

La flexibilidad superior del método de la invención permite virtualmente que cualquier amina orgánica primaria o secundaria sea de uso como el agente de desprotección. Las aminas que se establecen a continuación son meramente de ejemplo, y los expertos apreciarán que la invención no se limita a la utilización de las aminas citadas explícitamente. Las aminas de uso en la práctica de la presente invención incluyen aminas alquilo sustituidas o no sustituidas, aminas arilo sustituidas o no sustituidas, aminas heteroarilo sustituidas o no sustituidas y aminas heterocíclicas sustituidas o no sustituidas.

También son útiles en el método de la invención los alcoholes de alquil amino, por ejemplo, aminoetanol, aminopropanol, 2-amino-2-metil-1-propanol y combinaciones de los mismos. También se pueden utilizar éteres de alquil amino, por ejemplo, 1,4-butanodiol-bis-(3-aminopropil)éter, 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanamina y combinaciones de los mismos. La amina también puede ser una amina polimérica, por ejemplo, poli(etilenimina), poli(etilenglicol)amina y combinaciones de los mismos. Otras aminas y combinaciones de aminas serán evidentes para los expertos en la técnica.

Grupos funcionales reactivos

Los compuestos de la invención portan un grupo funcional reactivo, que puede estar situado en cualquier posición en la molécula. Especies de ejemplo incluyen un grupo funcional reactivo como un constituyente de al menos uno de R^{12} y R^{13} . Grupos reactivos de ejemplo son miembros seleccionados independientemente de alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, con la condición de que al menos uno de R^{12} o R^{13} incluya un grupo reactivo que contenga oxígeno o una molécula portadora. Cuando el grupo reactivo está unido a un grupo alquilo sustituido o no sustituido o una unidad estructural heteroalquilo sustituida o no sustituida, el grupo reactivo está situado preferiblemente en una posición terminal de la cadena alquilo o heteroalquilo. Los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente aquellos que son bien conocidos en la técnica de la química de bioconjugados. Actualmente clases favorecidas de reacciones disponibles con compuestos reactivos a base de xanteno de la invención son aquellos que proceden bajo condiciones relativamente moderadas. Estas incluyen, pero no se limitan a sustitución nucleofílica (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrofílicas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples de carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se discuten en, por ejemplo, March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; and Feeney et al., MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Los grupos funcionales reactivos útiles incluyen, por ejemplo:

(a) grupos carboxilo y derivados de los mismos, que incluyen, pero no se limitan a ésteres activados, por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, imidazoles de acilo, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alqueno, alquino y aromáticos, que activan grupos utilizados en la síntesis de péptidos y haluros de ácido;

(b) grupos hidroxilo, que se pueden convertir en ésteres, sulfonatos, fosforamiditas, éteres, aldehídos, etc.

(c) grupos haloalquilo, en donde el haluro puede ser desplazado con un grupo nucleofílico tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión, o un ión alcóxido, por lo tanto dando como resultado la unión covalente de un nuevo grupo en el sitio del átomo de halógeno;

5 (d) grupos dienófilos, que son capaces de participar en las reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos de maleimida;

(e) grupos aldehído o cetona, que permiten la derivación a través de la formación de derivados de carbonilo, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de mecanismos tales como la adición de Grignard o adición de alquil-litio;

(f) grupos haluro de sulfonilo para la reacción con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas;

10 (g) grupos tiol, que se pueden convertir a disulfuros o reaccionan con haluros de acilo, por ejemplo;

(h) grupos amina o sulfhidrilo, que pueden ser, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados;

(i) alquenos, que pueden ser sometidos, por ejemplo, a cicloadiciones, acilación, adición de Michael, etc;

(j) epóxidos, que pueden hacerse reaccionar con, por ejemplo, aminas y compuestos hidroxilo; y

(k) fosforamiditas y otros grupos funcionales estándar útiles en la síntesis de ácidos nucleicos.

15 Los grupos funcionales reactivos pueden escogerse de tal manera que no participan en, o interfieren con las reacciones necesarias para montar o utilizar el análogo de xanteno reactivo. Alternativamente, un grupo funcional reactivo se puede proteger de participar en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica entienden cómo proteger un grupo funcional particular de tal manera que no interfiera con un conjunto seleccionado de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo, Greene et al., PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

20 Además de esas realizaciones en las que un compuesto de la invención está unido directamente a una molécula portadora, los fluoróforos también se pueden unir por medios indirectos. En esta realización, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une generalmente de forma covalente a la especie de sonda. El ligando se une entonces a otras moléculas (por ejemplo, estreptavidina), lo que o bien es inherentemente detectable o se une

25 covalentemente a un sistema de señal, tal como un compuesto fluorescente, o una enzima que produce un compuesto fluorescente por conversión de un compuesto no fluorescente. Enzimas útiles de interés como marcadores incluyen, por ejemplo, hidrolasas, particularmente fosfatasas, esteratasas y glicosidasas, hidrolasas, peptidasas u oxidasas y peroxidasas.

Sondas

30 La invención provee sondas que tienen un colorante de xanteno de la invención conjugado a una molécula portadora, por ejemplo, una especie objetivo (por ejemplo, un receptor, una enzima, etc.) un ligando para una especie objetivo (por ejemplo, un ácido nucleico, un péptido, etc.), una molécula pequeña (por ejemplo, fármaco, pesticida, etc.), un soporte sólido y similares. Las sondas pueden usarse para aplicaciones in vitro e in vivo.

35 Una propiedad inesperada de los colorantes de xanteno de la invención es su robustez bajo una variedad de condiciones sintéticas utilizadas para unir el colorante de xanteno de la invención a una molécula portadora. Por ejemplo, muchos de los colorantes de xanteno de la invención sobreviven a las condiciones necesarias para la síntesis automatizada de ácidos nucleicos sin sufrir ningún grado sustancial de degradación o de alteración. Por el contrario, muchos de los fluoróforos reconocidos en la técnica actualmente en uso requieren el uso de condiciones especiales para ensamblar la molécula portadora a la que están unidos, o tienen que ser unidos después de la

40 finalización de la síntesis de molécula portadora. La complejidad adicional de la síntesis de una sonda incrementa tanto la duración de la síntesis como su coste.

Sondas de moléculas pequeñas

Los colorantes de xanteno de la invención se pueden utilizar como componentes de sondas de moléculas pequeñas. En un diseño preferido, una sonda de molécula pequeña incluye un colorante de xanteno de la invención y una

45 segunda especie que altera las propiedades luminiscentes de los colorantes, por ejemplo, un detenedor de

fluorescencia. En una realización de ejemplo, un agente tal como un enzima escinde el colorante de xanteno de la invención, el detenedor o ambos de la pequeña molécula que genera fluorescencia en el sistema bajo investigación (véase, por ejemplo, Zlokarnik et al., Science 279: 84-88 (1998)).

Sondas de captura de ácido nucleico

5 En una realización, un ácido nucleico inmovilizado que comprende un colorante de xanteno de la invención se utiliza como una sonda de captura. La sonda de ácido nucleico se puede utilizar en fase de solución o puede estar directamente unida a un soporte sólido. Las sondas inmovilizadas se pueden unir directamente al soporte sólido o a través de un brazo enlazante entre el soporte y el colorante de xanteno o entre el soporte y un residuo de ácido nucleico. Preferiblemente, la sonda se une al soporte sólido mediante un enlazante (es decir, brazo espaciador, supra). El enlazante sirve para distanciar la sonda del soporte sólido. El enlazante es más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 átomos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 átomos de longitud. Los puntos de unión de ejemplo incluyen el nucleótido de terminales en 3' o 5' de la sonda, así como otros sitios accesibles discutidos aquí.

15 En aún otra realización preferida, el soporte sólido se utiliza también como el soporte de síntesis en la preparación de la sonda. La longitud y la estabilidad química del enlazante entre el soporte sólido y la primera unidad 3' de ácido nucleico (o el colorante de xanteno) juegan un papel importante en la síntesis eficiente y la hibridación de ácidos nucleicos unido al soporte. El brazo enlazante debe ser lo suficientemente largo para que se pueda conseguir un alto rendimiento (> 97%) durante la síntesis automatizada. La longitud requerida del enlazante dependerá del soporte sólido particular utilizado. Los enlazantes de ejemplo son de aproximadamente 6 a aproximadamente 30 átomos de longitud. Para la síntesis de ácido nucleico, el brazo enlazante se une usualmente al 3'-OH del terminales en 3' mediante un enlace escindible, por ejemplo, un enlace éster, que se puede escindir con reactivos apropiados para liberar el ácido nucleico del soporte sólido.

20 La hibridación de una sonda inmovilizada en un soporte sólido requiere generalmente que la sonda sea separada del soporte sólido. Un enlazante preferido para esta realización incluye al menos aproximadamente 20 átomos, más preferiblemente al menos aproximadamente de 50 átomos.

Una amplia variedad de enlazantes son conocidos en la técnica, que pueden utilizarse para unir la sonda de ácido nucleico al soporte sólido. El enlazante puede incluir un oligómero o polímero de cualquier unidad estructural o combinación de unidades estructurales, que no interfieran significativamente con la hibridación de la secuencia objetivo a la sonda unida al soporte sólido. El enlazante puede incluir un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico homopolimérico, que se pueden añadir fácilmente en el enlazante mediante síntesis automatizada. Alternativamente, polímeros tales como polietilenglicol se pueden usar como el enlazante. Tales polímeros se prefieren actualmente más de los ácidos nucleicos homopoliméricos porque no interfieren significativamente con la hibridación de la sonda al ácido nucleico objetivo. El polietilenglicol es particularmente preferido ya que está disponible comercialmente, soluble tanto en medios orgánicos y acuosos, fácil de funcionalizar, y completamente estable bajo condiciones de síntesis y de post-síntesis de ácido nucleico.

Los enlaces entre el soporte sólido, el enlazante y la sonda preferiblemente no se escinden durante la síntesis o la eliminación de los grupos protectores de base bajo condiciones básicas a alta temperatura. Estos enlaces pueden, sin embargo, ser seleccionados de grupos que son escindibles bajo una variedad de condiciones. Ejemplos de enlaces actualmente preferidos incluyen enlaces de carbamato, éster y amida.

40 Sondas de marcación doble

La presente invención también provee sondas de marcación doble que incluyen tanto un colorante de xanteno de la invención como otro marcador. Ejemplos de sondas de marcación doble incluyen sondas de ácido nucleico que incluyen un ácido nucleico con un colorante de xanteno de la invención unido al mismo. Sondas de ejemplo incluyen tanto un colorante de xanteno de la invención como un detenedor. Las sondas son de uso en una variedad de formatos de ensayo. Por ejemplo, cuando un ácido nucleico marcado individualmente con un colorante de xanteno de la invención es la sonda, la interacción entre el primero y segundo ácidos nucleicos se puede detectar mediante la observación de la interacción entre el colorante de xanteno de la invención y el ácido nucleico. Alternativamente, la interacción es la detención mediante un detenedor unido al segundo ácido nucleico de la fluorescencia desde un colorante de xanteno de la invención.

Los colorantes de xanteno de la invención son útiles en conjunción con sondas de ácidos nucleicos en una variedad de estrategias de amplificación/cuantificación de ácido nucleico incluyendo, por ejemplo, el ensayo de 5'-nucleasa, ensayos de Amplificación por Desplazamiento de Cadena (SDA), Amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), Amplificación en Círculos Rodantes (RCA), así como para la detección directa de objetivos en fase de solución o en fase sólida (por ejemplo, arreglo). Adicionalmente, el colorante de xanteno de los ácidos nucleicos derivados de la invención puede ser utilizado en las sondas de sustancialmente cualquier formato, incluyendo, por ejemplo, el formato seleccionado de balizas moleculares, Scorpion probes™, Sunrise probes™, sondas conformacionalmente asistidas, sondas de encendido, sondas de detección de Invasión y sondas TaqMan™. Véase, por ejemplo, Cardullo, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU, 85:8790-8794 (1988); Dexter, D.L., J. Chem. Physics, 21:836-850 (1953); Hochstrasser, R.A., et al., Biophysical Chemistry, 45:133-141 (1992); Selvin, P., Methods in Enzymology, 246:300-334 (1995); Steinberg, I., Ann. Rev. Biochem., 40:83-114 (1971); Stryer, L., Ann. Rev. Biochem., 47:819-846 (1978); Wang, G., et al., Tetrahedron Letters, 31:6493-6496 (1990); Wang, Y., et al., Anal. Chem., 67:1197-1203 (1995); Debouck, C., et al., in supplement to nature genetics, 21:48-50 (1999); Rehman, F.N., et al., Nucleic Acids Research, 27:649-655 (1999); Cooper, J.P., et al., Biochemistry, 29:9261-9268 (1990); Gibson, E.M., et al., Genome Methods, 6:995-1001 (1996); Hochstrasser, R.A., et al., Biophysical Chemistry, 45:133-141 (1992); Holland, P.M., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA, 88:7276-7289 (1991); Lee, L.G., et al., Nucleic Acids Resch., 21:3761-3766 (1993); Livak, K.J., et al., PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Press (1995); Vamosi, G., et al., Biophysical Journal, 71:972-994 (1996); Wittwer, C.T., et al., Biotechniques, 22:176-181 (1997); Wittwer, C.T., et al., Biotechniques, 22:130-38 (1997); Giesendorf, B.A.J., et al., Clinical Chemistry, 44:482-486 (1998); Kostrikis, L.G., et al., Science, 279:1228-1229 (1998); Matsuo, T., Biochemica et Biophysica Acta, 1379:178-184 (1998); Piatek, A.S., et al., Nature Biotechnology, 16:359-363 (1998); Schofield, P., et al., Appl. Environ. Microbiology, 63:1143-1147 (1997); Tyagi S., et al., Nature Biotechnology, 16:49-53 (1998); Tyagi, S., et al., Nature Biotechnology, 14:303-308 (1996); Nazarenko, I.A., et al., Nucleic Acids Research, 25:2516-2521 (1997); Uehara, H., et al., Biotechniques, 26:552-558 (1999); D. Whitcombe, et al., Nature Biotechnology, 17:804-807 (1999); Lyamichev, V., et al., Nature Biotechnology, 17:292 (1999); Daubendiek, et al., Nature Biotechnology, 15:273-277 (1997); Lizardi, P.M., et al., Nature Genetics, 19:225-232 (1998); Walker, G., et al., Nucleic Acids Res., 20:1691-1696 (1992); Walker, G.T., et al., Clinical Chemistry, 42:9-13 (1996); y Compton, J., Nature, 350:91-92 (1991).

En vista del cuerpo bien desarrollado de literatura concerniente a la conjugación de moléculas pequeñas a ácidos nucleicos, muchos otros métodos de fijación de pares donante/aceptor a ácidos nucleicos serán evidentes para los expertos en la técnica.

Más específicamente, hay muchas unidades estructurales de enlace y metodologías para la unión de grupos a los terminales en 5' o 3' de los ácidos nucleicos, como se ejemplifica por las siguientes referencias: Eckstein, editor, Nucleic acids and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman et al., Nucleic Acids Research, 15: 5305-5321 (1987) (3'-thiol group on nucleic acid); Sharma et al., Nucleic Acids Research, 19: 3019 (1991) (3'-sulfhydryl); Giusti et al., PCR Methods and Applications, 2: 223-227 (1993) y Fung et al., Patente U.S. No. 4,757,141 (5'-phosphoamino group via Aminolink™ II disponible de P.E. Biosystems, CA.) Stabinsky, Patente U.S. No. 4,739,044 (3-aminoalkylphosphoryl group); Agrawal et al., Tetrahedron Letters, 31: 1543-1546 (1990) (unión a través de enlaces fosforamidato); Sproat et al., Nucleic Acids Research, 15: 4837 (1987) (5-mercapto group); Nelson et al., Nucleic Acids Research, 17: 7187-7194 (1989) (3'-amino group), y similares. Los métodos para unir los colorantes a otras unidades estructurales de ácido nucleico, por ejemplo, puentes internucleotídicos, átomos C de azúcar, átomos de nucleobases, etc., son conocidos por los expertos en la técnica.

Fluoróforos de ejemplo que se pueden combinar en una sonda con un colorante de xanteno de la invención incluyen los expuestos en la Tabla 1.

TABLA 1

Unidades estructurales adecuadas que se pueden seleccionar como donantes o aceptores en pares de transferencia de energía donante-aceptor

ácido 4-acetamido-4'isotiocianatoestilbeno-2,2'disulfónico

acridina y derivados:

acridina

isotiocianato de acridina

- ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS)
- 4-amino-N- [3-vinilsulfonil) fenil]naftalimida-3,5 disulfonato
- N-(4-anilino-1-naftil) maleimida
- Antranilamida
- 5 BODIPY
- amarillo brillante
- cumarina y derivados:
- cumarina
- 7-amino-4-metil-cumarina (AMC, cumarina 120)
- 10 7-amino-4-trifluorometilcoularina (Coumaran 151)
- Colorantes de xanteno
- cianosina
- 4',6 - diaminidino -2- fenilindol (DAPI)
- 5', 5"- dibromopirogalol-sulfonaftaleína (Rojo de Bromopirogalol)
- 15 7-dietilamino-3-(4'- isotiocianatofenil)- 4 - metilcumarina
- pentaacetato de dietilentriamina
- ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbena - 2,2' - disulfónico
- ácido 4,4'-diisotiocianatostilbenceno-2,2'-disulfónico
- Cloruro de 5- [di-N-metilamino]naftaleno - 1 - sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo)
- 20 Ácido 4 (4 '- di - N - metilaminofenilazo) benzoico (DABCYL)
- 4-di-N-metilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC)
- Eosina y derivados:
- Eosina
- isotiocianato de eosina
- 25 eritrosina y derivados:
- eritrosina B
- isotiocianato de eritrosina
- etidio
- fluoresceína y derivados:
- 30 5-carboxifluoresceína (FAM)
- 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF)

- 2',7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE)
- fluoresceína
- isotiocianato de fluoresceína
- QFITC (XRITC)
- 5 fluorescamina
- IR144
- IR1446
- Isotiocianato verde de malaquita
- 4-metilumbeliferona
- 10 orto cresoltaleína
- nitrotirosin
- pararosanilin
- Fenol Rojo
- B-ficoeritrina
- 15 o-ftaldialdehído
- pireno y derivados:
- pireno
- butirato de pireno
- butirato de succinimidil 1 - pireno
- 20 puntos cuánticos
- Rojo reactivo 4 (Cibacron TM Brilliant Red 3B-A)
- Rodamina y derivados:
- 6-carboxi-X -rodamina (ROX)
- 6 - carboxirodamina (R6G)
- 25 Lissamina rodamina B cloruro de sulfonilo rodamina (Rhod)
- rodamina B
- rodamina 123
- isotiocianato de rodamina X
- sulforodamina B
- 30 sulforodamina 101
- Cloruro de sulfonilo derivado de sulforodamina 101 (Texas Red)

N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA)

tetrametil rodamina

isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC)

riboflavina

5 ácido rosólico

derivados del quelato de terbio

Hay una gran cantidad de orientación práctica disponible en la literatura para la selección de pares donante-aceptor adecuados para sondas particulares, como se ejemplifica por las siguientes referencias: Pesce et al., Eds.,
 10 FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., FLUORESCENCE ANALYSIS:
 A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, New York, 1970); y similares. La literatura también incluye referencias
 que proveen una lista exhaustiva de moléculas fluorescentes y cromogénicos y sus propiedades ópticas relevantes
 para la selección de pares informador-detenedor (véase, por ejemplo, Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE
 15 SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, COLOUR AND
 CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, New York, 1976); Bishop, Ed., INDICATORS
 (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH
 CHEMICALS (Molecular Probes, Eugene, 1992) Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE
 (Interscience Publishers, New York, 1949); y similares. Además, existe una amplia orientación en la literatura para
 derivar moléculas informadoras y detenedoras para unión covalente a través de grupos reactivos comunes que se
 20 pueden añadir a un ácido nucleico, como se ejemplifica por las siguientes referencias: Haugland (*supra*); Ullman et
 al., U.S. Pat. No. 3,996,345; Khanna et al., Patente U.S. Pat. No. 4,351,760. Por lo tanto, está bien dentro de las
 capacidades de los expertos en la técnica escoger un par de intercambio de energía para una aplicación particular y
 para conjugar los miembros de este par a una molécula de sonda, tales como, por ejemplo, un ácido nucleico,
 péptido u otro polímero.

25 Como será evidente para los expertos en la técnica los métodos expuestos anteriormente son igualmente aplicables
 para el acoplamiento a un ácido nucleico de grupos diferentes de los compuestos fluorescentes de la invención, por
 ejemplo, detenedores, agentes intercalantes, unidades estructurales que potencian la hibridación, aglomerantes de
 surco menor, agentes alquilantes, agentes de escisión, etc.

Por ejemplo, en realizaciones seleccionadas, la sonda incluye un quelato metálico o un agente quelante unido a la
 30 molécula portadora. El uso de estos compuestos para unir a los compuestos específicos es bien conocida por los
 expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pitt et al. "The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron
 Overload," In, INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE; Martell, A.E., Ed.; American Chemical
 Society, Washington, D.C., 1980, pp. 279-312; Lindoy, L.F., THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND
 COMPLEXES; Cambridge University Press, Cambridge, 1989; Dugas, H., BIOORGANIC CHEMISTRY; Springer-
 35 Verlag, Nueva York, 1989, y referencias contenidas en las mismas.

Adicionalmente, un colector de rutas que permiten la unión de agentes quelantes, éteres de corona y ciclodextrinas a
 otras moléculas está disponible para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Meares et al., "Properties of In
 Vivo Chelate- Tagged Proteins and Polypeptides." In, MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND
 40 PHARMACOLOGICAL ASPECTS;" Feeney, R.E., Whitaker, J.R., Eds., American Chemical Society, Washington,
 D.C., 1982, pp.370-387; Kasina et al. Bioconjugate Chem. 9:108-117 (1998); Song et al., Bioconjugate. Chem.
 8:249-255 (1997).

En una realización actualmente preferida, el agente quelante es un agente quelante poliaminocarboxilato tal como
 ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Estos agentes quelantes se
 pueden unir a cualquier componente terminado en amina de una molécula portadora o un brazo espaciador, por
 45 ejemplo, mediante la utilización de dianhídrido disponible comercialmente (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI).

Los ácidos nucleicos para uso en las sondas de la invención pueden ser de cualquier tamaño adecuado, y están
 preferiblemente en el rango de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, más preferiblemente de

aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nucleótidos y más preferiblemente todavía, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos. La secuencia precisa y la longitud de una sonda de ácido nucleico de la invención depende en parte de la naturaleza del polinucleótido objetivo al que se une. La ubicación de enlazamiento y la longitud pueden variarse para lograr apropiadas propiedades de recocido y fusión para una realización particular. La guía para hacer tales elecciones de diseño se puede encontrar en muchas referencias reconocidas en la técnica.

Preferiblemente, el nucleótido de terminales en 3' de la sonda de ácido nucleico se bloquea o se vuelve incapaz de extensión por una polimerasa de ácido nucleico. Tal bloqueo se lleva a cabo convenientemente mediante la unión de una unidad estructural donante o aceptora a la posición 3' terminal de la sonda de ácido nucleico, ya sea directamente o por una unidad estructural de enlazamiento.

El ácido nucleico puede comprender ADN, ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos. Tanto la sonda como el ácido nucleico objetivo pueden estar presentes como una cadena individual, dúplex, triplex, etc. Además, como se discutió anteriormente, el ácido nucleico puede modificarse en la unidad estructural base, la unidad estructural de azúcar, o esqueleto de fosfato con otros grupos tales como marcadores radiactivos, aglomerantes de surco menor, agentes intercalantes, unidades estructurales donantes y/oceptoras y similares.

Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender al menos una unidad estructural de base modificada que se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)uracilo, 5-carboxi-N-metilaminometil-2-tiouridina, 5-carboxi-N-metilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7 metilguanina, 5-N-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-methoxyuracil, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metil éster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, nitroindol, y 2,6-diaminopurina. El colorante de xanteno de la invención u otro componente de la sonda se puede unir a la base modificada.

En otra realización, el ácido nucleico comprende al menos una unidad estructural de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa. El colorante de xanteno u otro componente de la sonda pueden estar unidos a la unidad estructural de azúcar modificado.

En aún otra realización, el ácido nucleico comprende al menos un esqueleto de fosfato modificado seleccionado del grupo que incluye, pero no limitado a, un híbrido de ácido nucleico peptídico, un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosforodiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo y un formacetal o análogo del mismo. El colorante de xanteno u otro componente de la sonda se puede unir al esqueleto de fosfato modificado.

Ácidos nucleicos enlazados a fosfodiéster de la invención se pueden sintetizar por métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado usando químicas amidita disponibles en el mercado (Ozaki et al., *Nucleic Acids Research*, 20: 5205-5214 (1992); Agrawal et al., *Nucleic Acids Research*, 18: 5419-5423 (1990); Beaucage et al., *Tetrahedron*, 48: 2223-2311 (1992); Molko et al., Patente U.S. No. 4,980,460; Koster et al., Patente U.S. No. 4,725,677; Caruthers et al., Patente U.S. Nos. 4,415,732; 4,458,066; y 4,973,679). Los ácidos nucleicos que portan grupos enlazantes de fosfodiéster modificado pueden ser sintetizados por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de fosforotioato se pueden sintetizar por el método de Stein et al. (*Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988)), los ácidos nucleicos de metilfosfonato se pueden preparar mediante el uso de soportes de polímero de vidrio poroso controlado (Sarin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7448-7451 (1988)). Otros métodos de síntesis de ambos ácidos nucleicos enlazados a fosfodiéster y fosfodiéster modificados serán evidentes para los expertos en la técnica.

Cuando los ácidos nucleicos se sintetizan utilizando un sintetizador de ácidos nucleicos automatizado, las unidades estructurales donantes yceptoras se introducen preferiblemente durante la síntesis automatizada. Alternativamente, una o más de estas unidades estructurales se puede introducir ya sea antes o después de que el procedimiento de síntesis automatizada ha comenzado. Por ejemplo, los grupos donantes y/o aceptores puede ser introducido en el terminal en 3' usando un soporte sólido modificado con el o los grupos deseados. Adicionalmente, los grupos donantes y/o aceptores se pueden introducir en el terminal en 5', mediante por ejemplo un derivado del

grupo que incluya una fosforamidita. En otra realización de ejemplo, uno o más de los grupos donantes y/o aceptores se introduce después de que la síntesis automática está completa.

En las sondas de doble marcación, la unidad estructural de detención se separa preferiblemente del colorante de xanteno de la invención por al menos aproximadamente 6 nucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 10 nucleótidos, y más preferiblemente por al menos aproximadamente 15 nucleótidos. la unidad estructural de detención está preferiblemente unida a cualquiera de los nucleótidos terminales en 3' o 5' de la sonda. El colorante de xanteno de la unidad estructural de la invención también se une preferiblemente a cualquiera de los nucleótidos terminales en 3' o 5' de la sonda. Más preferiblemente, las unidades estructurales donantes yceptoras se unen a los nucleótidos terminales en 3' y 5' o 5' y 3' de la sonda, respectivamente, aunque la colocación interna también es útil.

Una vez que se sintetiza el ácido nucleico deseado, se escinde preferiblemente del soporte sólido sobre el que se sintetizó y se trató, por métodos conocidos en la técnica, para eliminar cualesquiera grupos protectores presentes (por ejemplo, 60°C, 5 h, amoníaco concentrado). En aquellas realizaciones en las que un grupo sensible a la base se une a los ácidos nucleicos (por ejemplo, TAMRA), la desprotección utilizará preferiblemente condiciones más suaves (por ejemplo, butilamina: agua 1:3, 8 horas, 70°C). La desprotección bajo estas condiciones es facilitada por el uso de amiditas de desprotección rápida (por ejemplo, dC-acetilo, dG-DMF). Una manipulación alternativa utiliza 2-metoxietilamina y metanol.

Después de la escisión del soporte y la desprotección, el ácido nucleico se purifica por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la cromatografía, extracción y purificación en gel. En una realización preferida, el ácido nucleico se purifica utilizando HPLC. La concentración y la pureza del ácido nucleico aislado se determina preferiblemente mediante la medición de la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro.

Las sondas de marcación doble de ejemplo de la invención se prepararon como se describe en la sección de Ejemplos.

Sondas de péptidos

Los péptidos, proteínas y ácidos nucleicos peptídicos que están marcados con un detenedor y un colorante de xanteno de la invención se pueden utilizar tanto en ensayos enzimáticos in vivo como en in vitro.

Los constructos peptídicos útiles en la práctica de la invención incluyen aquellos que tienen las siguientes características: i) un detenedor; ii) un colorante de xanteno de la invención; y iii) un sitio de reconocimiento de escisión o de ensamblaje para la enzima. Además, el constructo peptídico existe preferiblemente en al menos una conformación que permite la transferencia de energía donante-aceptor entre el colorante de xanteno de la invención y el detenedor cuando el fluoróforo es excitado.

En las sondas de marcación doble de la invención, las unidades estructurales donantes yceptoras están conectadas a través de una unidad estructural enlazante que interviene. La unidad estructural enlazante, preferiblemente, incluye una unidad estructural peptídica, pero puede ser o puede incluir otra unidad estructural molecular orgánica, también. En una realización preferida, la unidad estructural enlazante incluye un sitio de reconocimiento de escisión específico para una enzima u otro agente de escisión de interés. Un sitio de escisión en la unidad estructural enlazante es útil porque cuando un constructo tándem se mezcla con el agente de escisión, el enlazante es un sustrato para la escisión mediante el agente de escisión. La rotura de la unidad estructural enlazante da como resultado la separación del colorante de xanteno y el detenedor. La separación se puede medir como un cambio en la transferencia de energía donante-aceptor. Alternativamente, el ensamble peptídico se puede detectar por un incremento en la transferencia de energía donante-aceptor entre un fragmento de péptido que porta un colorante de xanteno de la invención y un fragmento de péptido que porta una unidad estructural donante.

Cuando el agente de escisión de interés es una proteasa, el enlazante generalmente incluye un péptido que contiene una secuencia de reconocimiento de escisión para la proteasa. Una secuencia de reconocimiento de escisión para una proteasa es una secuencia de aminoácidos específica reconocida por la proteasa durante la escisión proteolítica. Muchos sitios de escisión de la proteasa son conocidos en la técnica, y estos y otros sitios de escisión se pueden incluir en la unidad estructural enlazante. Véase, por ejemplo, Matayoshi et al. Science 247: 954 (1990); Dunn et al. Meth. Enzymol. 241: 254 (1994); Seidah et al. Meth. Enzymol. 244: 175 (1994); Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 615 (1994); Weber et al. Meth. Enzymol. 244: 595 (1994); Smith et al. Meth. Enzymol. 244: 412

(1994); Bouvier et al. Meth. Enzymol. 248: 614 (1995), Hardy et al., in AMYLOID PROTEIN PRECURSOR IN DEVELOPMENT, AGING, AND ALZHEIMER'S DISEASE, ed. Masters et al. pp. 190-198 (1994).

Análogos de colorante de xanteno inmovilizados de soporte sólido

5 Los colorantes de xanteno de la invención se pueden inmovilizar en sustancialmente cualquier polímero, biomolécula, o material sólido o semisólido que tenga cualquier configuración útil. Por otra parte, cualquier conjugado que comprenda uno o más colorantes de xanteno de la invención se puede inmovilizar de manera similar. Cuando el soporte es un sólido o semisólido, ejemplos de tipos preferidos de soportes para la inmovilización de la sonda de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, vidrio poroso controlado, placas de vidrio, poliestireno, perlas de poliestireno recubiertas con avidina, celulosa, nailon, gel de acrilamida y dextrano activado. Estos soportes
10 sólidos se prefieren debido a su estabilidad química, facilidad de funcionalización y área de superficie bien definida. Se prefieren particularmente los soportes sólidos tales como, vidrio poroso controlado (CPG, 500 Å, 1000 Å) y poliestireno no hinchable altamente entrecruzado (1000 Å).

De acuerdo con la presente invención, la superficie de un soporte sólido se funcionaliza con un colorante de xanteno de la invención o una especie a la que se conjuga un colorante de xanteno de la invención. Para claridad de la ilustración, la siguiente discusión se enfoca en la unión de un colorante de xanteno reactivo de la invención a un soporte sólido. La siguiente discusión también es muy relevante para unir a un soporte sólido una especie que incluya dentro de su estructura un colorante de xanteno de la invención.
15

Los colorantes de xanteno de la invención se unen preferiblemente a un soporte sólido mediante la formación de un enlace entre un grupo reactivo en el colorante de xanteno de la invención y un grupo reactivo sobre la superficie del soporte sólido, derivando de este modo el soporte sólido con uno o más colorantes de xanteno de la invención. Alternativamente, el grupo reactivo en el colorante de xanteno de la invención se acopla con un grupo reactivo en un brazo enlazante unido al soporte sólido. El enlace entre el soporte sólido y el colorante de xanteno de la invención es preferiblemente un enlace covalente, aunque iónicos, dativos y otros tales enlaces son útiles también. Los grupos reactivos que se pueden utilizar en la práctica de la presente invención son discutidos en detalle más arriba e incluyen, por ejemplo, aminas, grupos hidroxilo, ácidos carboxílicos, derivados de ácidos carboxílicos, alquenos, sulfhidrilos, siloxanos, etc.
20

Un gran número de soportes sólidos adecuados para la práctica de la presente invención están disponibles comercialmente e incluyen, por ejemplo, resinas de síntesis de péptidos, con y sin aminoácidos unidos y/o péptidos (por ejemplo, alcoxibencilo resina de alcohol, resina de aminometilo, resina aminopoliestireno, resina de benzhidrilamina, etc. (Bachem)), vidrio poroso controlado funcionalizado (Biosearch Technologies, Inc.), medios de intercambio iónico (Aldrich), membranas funcionalizadas (por ejemplo, membranas -COOH; Asahi Chemical Co., Asahi Glass Co., y Tokuyama Soda Co.), y similares.
30

Además, para aplicaciones en las que un soporte sólido apropiado no está disponible comercialmente, una amplia variedad de tipos de reacción está disponible para la funcionalización de una superficie de soporte sólido. Por ejemplo, soportes construidos de un plástico tal como polipropileno, puede ser superficie derivada por oxidación con ácido crómico, y subsecuentemente convertida a superficies hidroxiladas o aminometiladas. El soporte funcionalizado se hace reaccionar entonces con un colorante de xanteno de la invención de reactividad complementaria, tal como un colorante de xanteno del éster activo de la invención, cloruro de ácido o éster sulfonato, por ejemplo. Soportes hechos de divinilbenceno altamente entrecruzado puede ser la superficie derivada por clorometilación y la manipulación del grupo funcional subsiguiente. Adicionalmente, los sustratos funcionalizados se pueden hacer de politetrafluoroetileno grabado, reducido.
35

Cuando el soporte está construido de un material silíceo, tal como el vidrio, la superficie puede ser derivada por reacción de la superficie de grupos Si-OH, SiO-H, y/o Si-Si con un reactivo de funcionalización.
40

En una realización preferida, en donde los sustratos están hechos de vidrio, la unión covalente del grupo reactivo a la superficie de vidrio se logra mediante la conversión de los grupos en la superficie del sustrato mediante un reactivo que modifica el silicio tales como:
45



donde Ra es un grupo alquilo, tal como metilo o etilo, R^b es un grupo enlazante entre el silicio y X^a, y X^a es un grupo reactivo o un grupo reactivo protegido. Derivados de silano que tiene halógenos u otros grupos salientes junto a los

grupos alcoxi mostrados son también útiles en la presente invención. Grupos de enlace de ejemplo incluyen aquellos que incluyen grupos alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

5 En otra realización preferida, el reactivo utilizado para funcionalizar el soporte sólido provee más de un grupo reactivo por cada molécula de reactivo. El uso de reactivos, tales como el compuesto a continuación, cada sitio reactivo en la superficie del sustrato es, en esencia, "amplificado" a dos o más grupos funcionales:



10 donde R^a es un grupo alquilo (por ejemplo, metilo, etilo), R^b es un grupo de enlace entre el silicio y X^a , X^a es un grupo reactivo o un grupo reactivo protegido y n es un entero entre 2 y 50, y más preferiblemente entre 2 y 20. La amplificación de un colorante de xanteno de la invención por su unión a un sustrato que contiene silicio se entiende que es de ejemplo del concepto general de la amplificación. Esta estrategia de amplificación es igualmente aplicable a otros aspectos de la invención en los que un colorante de xanteno de la invención está unido a otra molécula o soporte sólido.

Se puede utilizar un número de reactivos de funcionalización de silano, por ejemplo:

1. Hidroxialquil siloxanos (superficie de sililato, funcionalizar con diborano y H_2O_2 para oxidar al alcohol)
 - 15 a. Alil triclorosilano \rightarrow \rightarrow 3-hidroxipropilo
 - b. 7-oct-1-enil triclorosilano \rightarrow \rightarrow 8-hidroxiocilo;
2. Diol (dihidroxialquil)siloxanos (superficie de sililato e hidrolizar a diol)
 - a. (glicidil trimetoxisilano \rightarrow (2,3-dihidroxipropiloxi)propilo;
3. Aminoalquil siloxanos (Aminas que no requieren paso intermedio de funcionalización);
 - 20 a. 3-aminopropil trimetoxisilano \rightarrow aminopropilo
4. Aminosiloxanos secundarios diméricos
 - a. bis (3-trimetoxisililpropil) amina \rightarrow bis(sililoxilpropil)amina.

25 Será evidente para los expertos en la técnica que está disponible un arreglo de químicas de funcionalización igualmente útil cuando se utilizan componentes de soporte distintos de los siloxanos. Así, por ejemplo alquil tioles (por ejemplo, monocapas autoensambladas), funcionalizados como se discutió anteriormente en el contexto de los reactivos que modifican el siloxano, se puede unir a películas de metal y subsecuentemente se hace reaccionar con un colorante de xanteno de la invención para producir el compuesto inmovilizado de la invención.

30 Grupos de ejemplo de uso para R^b en las realizaciones descritas anteriormente de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, alquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, arilalilo, alquilamino, alcoxi sustituido o no sustituido), arilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, arilalquilo, ariloxi y ariloxialquilo sustituido o no sustituido), acilo (por ejemplo, acilamino, aciloxi), mercapto, saturado o hidrocarbilo cíclico insaturado, heteroarilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido), heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, y combinaciones de los mismos.

Sondas inmovilizadas con acrilamida

35 En otra realización de ejemplo, una especie conjugada con un colorante de xanteno de la invención se inmoviliza dentro de una matriz, tal como una matriz de acrilamida. En una realización preferida, la inmovilización se lleva a cabo en conjunción con el proceso de "Acrydite" (véase, Rehman et al., Nucleic Acids Research, 27: 649-655 (1999)). El método de Acrydite permite la inmovilización de sondas marcadas con alqueno dentro de una red de poli(acrilamida) polimerizada. Cuando mezclas objetivo se ejecutan más allá de la banda de sonda inmovilizada bajo condiciones de electroforesis, el ácido nucleico objetivo es capturado sustancialmente de manera cuantitativa. Sin embargo, la detección de este evento requiere actualmente una segunda sonda. En una realización, las sondas que portan un colorante de xanteno de la invención, y/o un fluoróforo, se inmovilizan en una matriz de acrilamida y

40

subsecuentemente entran en contacto con la mezcla objetivo. Mediante el uso de sondas fluorescentes como sondas de captura, las señales de mezclas objetivo pueden ser detectadas directamente en tiempo real.

Microarreglos

- 5 La presente invención también provee microarreglos incluyendo colorante de xanteno inmovilizado de la invención y compuestos funcionalizados (por ejemplo, péptidos, ácidos nucleicos, agentes bioactivos, etc.) con colorante de xanteno de la invención. Además, la invención provee métodos para interrogar microarreglos utilizando sondas que están funcionalizadas con colorante de xanteno de la invención. Las especies inmovilizadas y las sondas se seleccionan de sustancialmente cualquier tipo de molécula, incluyendo, pero no limitado a, moléculas pequeñas, péptidos, enzimas, ácidos nucleicos y similares.
- 10 Los microarreglos de ácidos nucleicos que consisten en una multitud de ácidos nucleicos inmovilizados son herramientas revolucionarias para la generación de la información genómica, véase, Debouck et al, en el suplemento de Nature Genetics., 21: 48-50 (1999). La discusión que sigue se centra en el uso de un colorante de xanteno de la invención en conjunción con microarreglos de ácidos nucleicos. Este enfoque está destinado a ser ilustrativo y no limita el alcance de materiales con los que se puede practicar este aspecto de la presente invención.
- 15 En otra realización preferida, los compuestos de la presente invención se utilizan en un formato de microarreglo. El colorante de xanteno de la invención, o de una especie que porta colorante de xanteno de la invención pueden ser en sí mismos componentes de un microarreglo, alternativamente, se pueden utilizar como una herramienta para detectar los componentes de un microarreglo.
- 20 Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención provee un método de selección de un microarreglo. El método incluye poner en contacto los miembros del microarreglo con, por ejemplo, una sonda que porta colorante de xanteno de la invención y que interroga el microarreglo para las regiones de fluorescencia. En una realización de ejemplo, las regiones fluorescentes son indicativos de la presencia de una interacción entre la sonda que porta el colorante de xanteno de la invención y un componente de microarreglo.
- 25 En otra realización de ejemplo, el arreglo comprende una sonda inmovilizada de transferencia de energía donante-aceptora que porta xanteno. En esta realización, cuando la sonda interactúa (por ejemplo, se hibrida) con su objetivo, la transferencia de energía entre el xanteno y una unidad estructural de detención se interrumpe y el colorante de xanteno es fluorescente. Tales arreglos se preparan y se leen fácilmente, y pueden ser diseñados para dar datos cuantitativos. Las matrices que comprenden una sonda que porta xanteno son herramientas valiosas para el análisis de expresión y la selección del genoma clínica.
- 30 En otra realización, la sonda inmovilizada que porta xanteno no es una sonda de transferencia de energía donante-aceptor. Un microarreglo basado en como el formato se puede usar para sondear la presencia de interacciones entre un analito y la sonda inmovilizada mediante, por ejemplo, la observación de la alteración de la fluorescencia analito tras la interacción entre la sonda y el analito.
- 35 Los microarreglos de ejemplo comprenden n regiones de especies idénticas o diferentes (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos, agentes bioactivos). En una realización preferida, n es un número de 2 a 100, más preferiblemente, de 10 a 1.000, y más preferiblemente de 100 a 10,000. En una realización además todavía preferida, las n regiones son modeladas sobre un sustrato como n ubicaciones distintas en una manera que permite la identidad de cada uno de los n lugares que se van a establecer.
- 40 En aún otra realización preferida, la invención también provee un método para preparar un microarreglo de n sondas que portan xanteno. El método incluye unir sondas que portan colorantes de xanteno a regiones seleccionadas de un sustrato. Una variedad de métodos está disponible actualmente para la fabricación de arreglos de macromoléculas biológicas, tales como arreglos de moléculas de ácidos nucleicos. La siguiente discusión se centra en el ensamblaje de un microarreglo de sondas que portan xanteno, este enfoque es por razones de brevedad y está destinado a ser ilustrativo y no limitante.
- 45 Un método para la fabricación de arreglos ordenados de sondas que portan xanteno, sobre un sustrato es un enfoque de "inmunoprecipitación de mancha". En este método, un colector de vacío transfiere una pluralidad de muestras acuosas de sondas, por ejemplo, 96, de los pozos a un sustrato. La sonda se inmoviliza sobre la membrana porosa por la coacción de la membrana o para exponerla a la radiación UV. Una variante común de este

procedimiento es un método de " inmunoprecipitación en ranura" en donde los pozos tienen formas altamente alargadas ovaladas.

Otra técnica empleada para la fabricación de arreglos ordenados de sondas utiliza un arreglo de pasadores sumergido en los pozos, por ejemplo, los 96 pozos de una placa de microtitulación, para la transferencia de un arreglo de muestras a un sustrato, tal como una membrana porosa. Un arreglo incluye pasadores que están diseñados para manchar una membrana de una forma escalonada, para la creación de un arreglo de 9216 manchas en un área de 22 x 22 cm. Véase, Lehrach, et al., Lehrach, et al., HYBRIDIZATION FINGERPRINTING IN GENOME MAPPING AND SEQUENCING, GENOME ANALYSIS, Vol. 1, Davies et al, Eds., Cold Springs Harbor Press, pp. 39-81 (1990).

Un método alternativo de creación de arreglos ordenados de sondas es análogo al descrito por Pirrung et al. (Patente U.S. No. 5,143,854, otorgada en 1992), y también por Fodor et al., (Science, 251: 767-773 (1991)). Este método involucra la síntesis de diferentes sondas en diferentes regiones discretas de una partícula o de otro sustrato. Este método se utiliza preferiblemente con las moléculas de sonda relativamente cortas, por ejemplo, menos de 20 bases. Un método relacionado fue descrito por Southern et al. (Genomics, 13: 1008-1017 (1992)).

Khrapko, et al, DNA Sequence, 1: 375-388 (1991) describe un método de fabricación de una matriz de ácidos nucleicos mediante el manchado de ADN en una capa delgada de poliacrilamida. El manchado se realiza manualmente con una micropipeta.

El sustrato también puede ser modelado usando técnicas tales como la fotolitografía (Kleinfeld et al, J. Neurosci 8: 4098-120 (1998)), fotograbado, grabado químico e impresión por microcontacto (Kumar et al, Langmuir 10: 1498-511 (1994)). Otras técnicas para la formación de patrones en un sustrato serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

El tamaño y la complejidad del patrón sobre el sustrato está limitado solamente por la resolución de la técnica utilizada y el propósito para el que está destinado el patrón. Por ejemplo, el uso de la impresión por microcontacto, características tan pequeñas como 200 nm se colocan en capas sobre un sustrato. Véase, Xia, Y., J. Am. Chem. Soc. 117: 3274-75 (1995). Del mismo modo, usando la fotolitografía, se producen patrones con características tan pequeñas como de 1 µm. Véase, Hickman et al., J. Vac. Sci. Technol. 12: 607-16 (1994). Los patrones que son útiles en la presente invención incluyen aquellos que incluyen características tales como pozos, cerramientos, particiones, cavidades, entradas, salidas, canales, depresiones, redes de difracción y similares.

En una realización actualmente preferida, el patrón se usa para producir un sustrato que tenga una pluralidad de pozos adyacentes, muescas o agujeros para contener las sondas. En general, cada una de estas características de sustrato está aislada de los otros pozos por una pared o partición en relieve y los pozos no se comunican fácilmente de forma fluida. Por lo tanto, una partícula, reactivo u otra sustancia, colocada en un pozo particular permanece sustancialmente confinado a ese pozo. En otra realización preferida, el patrón permite la creación de canales a través del dispositivo mediante el cual un analito u otra sustancia pueda entrar y/o salir del dispositivo.

En otra realización, las sondas se inmovilizan "imprimiéndolas" directamente sobre un sustrato o, alternativamente, se puede utilizar una técnica de "despegue". En la técnica de despegue, una resistencia estampada se tiende sobre el sustrato, y una sonda se tiende en dichas áreas no cubiertas por la resistencia y la resistencia se retira subsecuentemente. La resistencia apropiada para uso con los sustratos de la presente invención es conocida por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kleinfeld et al., J. Neurosci. 8: 4098-120 (1998). Después de la eliminación de la fotorresistencia, una segunda sonda, que tiene una estructura diferente de la primera sonda puede ser unida al sustrato en aquellas áreas inicialmente cubiertas por la resistencia. Usando esta técnica, se pueden producir sustratos con patrones de sondas que tienen diferentes características. Configuraciones de sustrato similares son accesibles a través de microimpresión de una capa con las características deseadas directamente sobre el sustrato. Véase, Mrkish et al. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 25: 55-78 (1996).

Enlazantes

Tal como se utiliza aquí, el término "enlazante" hace referencia a un componente de un conjugado entre un colorante de xanteno y una molécula portadora. El enlazante es un componente del colorante de xanteno, la molécula portadora o es una especie de entrecruzamiento reactivo que reacciona tanto con la molécula portadora como con el colorante de xanteno. Los grupos enlazantes pueden ser hidrofílicos (por ejemplo, tetraetilenglicol, hexaetilenglicol, polietilenglicol) o pueden ser hidrófobos (por ejemplo, hexano, decano, etc.). Enlazantes de ejemplo incluyen grupos alquilo C₆-C₃₀ sustituidos o no sustituidos, polioles (por ejemplo, glicerol), poliéteres (por ejemplo, poli(etilenglicol)),

5 poliaminas, aminoácidos (por ejemplo, poliaminoácidos), sacáridos (por ejemplo, polisacáridos) y combinaciones de los mismos. En una realización de ejemplo, el enlazante se une a unidades estructurales donantes y/oceptoras y otros grupos a un ácido nucleico, péptido u otro componente de una sonda. En una realización adicional de ejemplo, uando un soporte sólido, el constructo inmovilizado incluye un enlazante unido a través del soporte sólido y también al colorante de xanteno.

10 En ciertas realizaciones, es ventajoso tener las unidades estructurales donantes y/oceptoras de la sonda unida a una molécula portadora por un grupo que provea flexibilidad y distancia de la especie enlazada de la molécula portadora. Usando grupos enlazantes, las propiedades de la unidad estructural del donante y/oceptor es modulada. Las propiedades que son controlados de manera útil incluyen, por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliidad, actividad de superficie, la distancia del detenedor y/o colorante de xanteno de la unidad estructural de la invención a partir de los otros componentes de la sonda (por ejemplo, molécula portadora) y la distancia del detenedor del colorante de xanteno de la invención.

15 En una realización de ejemplo, el enlazante sirve para distanciar al colorante de xanteno de la invención de un ácido nucleico al que está unido. Enlazantes con esta característica tienen varios usos. Por ejemplo, un colorante de xanteno de la invención mantenido muy cerca al ácido nucleico no puede interactuar con el grupo de detención, o puede interactuar con afinidad demasiado baja. Cuando un colorante de xanteno de la invención es en sí mismo estéricamente exigente, la interacción que conduce a la detención se puede debilitar indeseablemente, o no se puede producir en absoluto, debido a un impedimento estéricamente inducido de la aproximación de los dos componentes.

20 Cuando el constructo que comprende el colorante de xanteno es inmovilizado por unión a, por ejemplo, un soporte sólido, el constructo también puede incluir una unidad estructural enlazante colocada entre el grupo reactivo del soporte sólido y el análogo de xanteno, u otro componente de sonda unido al soporte sólido.

25 En aún una realización adicional, un grupo enlazante utilizado en las sondas de la invención se provee con un grupo que puede ser escindido para liberar una unidad estructural unida, por ejemplo, un colorante de xanteno de la invención, detenedor, aglomerante de surco menor, unidad estructural de intercalación, y similares a partir del componente polimérico. Muchos grupos escindible son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Jung et al., Biochem. Biophys. Acta, 761: 152-162 (1983); Joshi et al., J. Biol. Ckem., 265: 14518-14525 (1990); Zarlring et al., J. Immunol., 124: 913-920 (1980); Bouizar et al., Eur. J. Biochem., 155: 141-147 (1986); Park et al., J. Biol. Chem., 261: 205-210 (1986); Browning et al., J. Immunol., 143: 1859-1867 (1989). Además, un amplio rango de brazos enlazantes escindibles, bifuncionales (tanto homo como hetero-bifuncional) está disponible comercialmente de proveedores tales como Pierce. Grupos escindibles de ejemplo son los escindidos por la luz, por ejemplo, derivados nitrobenzilo, grupos fenacilo, ésteres de benzoína; hidrólisis, por ejemplo, ésteres, carbonatos; cambios en el pH, etc.

Los métodos

35 En otro aspecto de la realización, la presente invención provee un método para la detección de una especie objetivo en una mezcla de ensayo u otra muestra. La siguiente discusión es generalmente relevante para los ensayos descritos aquí. Esta discusión se destina a ilustrar la invención por referencia a ciertas realizaciones preferidas y no debe interpretarse como limitante del alcance de las sondas y los tipos de ensayo en donde los compuestos de la invención encuentran uso. Otros formatos de ensayo que utilizan los compuestos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

40 Un método de ejemplo utiliza un colorante de xanteno de la invención o un conjugado del mismo para detectar una secuencia objetivo de ácido nucleico. El método incluye: (a) poner en contacto la secuencia objetivo con un ácido nucleico detector que incluye un colorante de xanteno de la invención y un detenedor; (b) hibridar el ácido nucleico detector a la secuencia objetivo, alterando así la conformación del ácido nucleico detector, provocando un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (c) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, detectando de este modo la secuencia objetivo de ácidos nucleicos.

50 En los métodos descritos aquí, a menos que se indique otra cosa, un ácido nucleico detector preferido incluye una secuencia de enlazamiento al objetivo de cadena sencilla. La secuencia de enlazamiento tiene enlazada a la misma: i) un detenedor; y ii) un colorante de xanteno de la invención. Por otra parte, antes de su hibridación con una secuencia complementaria, el ácido nucleico detector está preferiblemente en una conformación que permite la transferencia de energía donante-aceptor entre el detenedor y el colorante de xanteno de la invención cuando el

fluoróforo es excitado. Adicionalmente, en los métodos descritos en esta sección, se detecta un cambio en la fluorescencia como una indicación de la presencia de la secuencia objetivo. El cambio en la fluorescencia se detecta preferiblemente en tiempo real.

5 Sondas de ácido nucleico actualmente preferidas no requieren que la molécula portadora adopte una estructura secundaria para que la sonda funcione. Sondas de ejemplo de acuerdo con este motivo incluyen una unidad estructural de detención que incluye detenedores enlazados a diazo descritos en la Solicitud de Patente copendiente, asignada comúnmente U.S. No.09/567,863 o sondas conformacionalmente asistidas divulgadas en la Solicitud de Patente U.S. No. 09/591,185.

10 En otros métodos descritos en esta sección, el ácido nucleico detector puede asumir sustancialmente cualquier estructura secundaria asociada intramolecularmente, por ejemplo, estructuras de horquilla, tallo-bucle, pseudonudos, hélices triples y estructuras conformacionalmente asistidas. Además, la estructura secundaria con bases apareadas intramolecularmente comprende preferiblemente una porción de la secuencia de enlazamiento al objetivo.

15 En otro aspecto, la invención provee un método para detectar la amplificación de una secuencia objetivo. El método incluye el uso de una reacción de amplificación que incluye las siguientes etapas: (a) hibridar la secuencia objetivo y un ácido nucleico detector que incluye un colorante de xanteno de la invención. El ácido nucleico detector incluye preferiblemente una secuencia de enlazamiento al objetivo de cadena sencilla y una estructura en 5' secundaria asociada de manera intramolecular a la secuencia de enlazamiento al objetivo. Al menos una porción de la secuencia detectora forma una cola de cadena sencilla que está disponible para la hibridación a la secuencia objetivo; (b) extender el ácido nucleico detector hibridado en la secuencia objetivo con una polimerasa para producir un producto de extensión de ácido nucleico detector y separar el producto de extensión de ácido nucleico detector a partir de la secuencia objetivo; (c) hibridar un cebador al producto de extensión de ácido nucleico detector y extender el cebador con la polimerasa, linealizando de este modo la estructura secundaria asociada de manera intramolecular y produciendo un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (d) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, detectando de este modo la secuencia objetivo.

25 En aún un aspecto adicional, la invención provee un método para determinar si un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico se hibridan. En este método, el primer ácido nucleico incluye un colorante de xanteno de la invención. El método incluye: (a) poner en contacto el primer ácido nucleico con el segundo ácido nucleico; (b) detectar una alteración en una propiedad fluorescente de un miembro seleccionado de entre el primer ácido nucleico, el segundo ácido nucleico y una combinación de los mismos, determinando de este modo si se produce la hibridación.

30 En general, para determinar la concentración de una molécula objetivo, por ejemplo, un ácido nucleico, es preferible obtener primero los datos de referencia en donde se ponen en contacto las cantidades constantes de sonda con cantidades variables de destino. La emisión de fluorescencia de cada una de las mezclas de referencia se utiliza para derivar un gráfico o tabla en la que la concentración objetivo se compara con la fluorescencia de emisión. Por ejemplo, una sonda que hibrida con un ligando de ácido nucleico y tiene una arquitectura de tallo-bucle con los terminales 5' y 3' siendo los sitios de detención y el marcado de xanteno, que se puede utilizar para obtener tales datos de referencia. El valor de la emisión de fluorescencia se compara entonces con los datos de referencia para obtener la concentración del objetivo en la mezcla de prueba.

40 Los colorantes de xanteno y sus conjugados descritos aquí pueden ser utilizados sustancialmente en cualquier formato de sonda de ácido nucleico conocido ahora o descubierto más tarde. Por ejemplo, los colorantes de xanteno de la invención se pueden incorporar en motivos de sondas, tales como sondas Taqman™ (Held et al., Genome Res. 6: 986-994 (1996), Holland et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280 (1991), Lee et al., Nucleic Acids Res. 21: 3761-3766 (1993)), balizas moleculares, (Tyagi et al., Nature Biotechnology 14:303-308 (1996), Jayasena et al., Patente U.S. No. 5,989,823, otorgada el 23 de Noviembre de 1999)) sondas scorpion (Whitcomb et al., Nature Biotechnology 17: 804-807 (1999)), sondas sunrise (Nazarenko et al., Nucleic Acids Res. 25: 2516-2521 (1997)), sondas conformacionalmente asistidas (Cook, R., Solicitud de Patente copendiente y de propiedad común U.S. No. 09/591,185), sondas de encendido basadas en ácido nucleico peptídico (PNA) (Kubista et al., WO 97/45539, Diciembre de 1997), colorantes de AND específicos de doble cadena (Higuchi et al, Bio/Technology 10: 413-417 (1992), Wittwer et al, BioTechniques 22: 130-138 (1997)) y similares. Estos y otros motivos de sonda con la que se pueden utilizar los presentes colorantes de xanteno son revisados en NONISOTOPIC DNA PROBE TECHNIQUES, Academic Press, Inc. 1992.

Los péptidos, proteínas y ácidos nucleicos peptídicos que están marcados con un detenedor y un colorante de xanteno de la invención se pueden utilizar tanto en ensayos enzimáticos in vivo como in vitro.

5 Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención provee un método para determinar si una muestra contiene una enzima. El método comprende: (a) poner en contacto la muestra con un constructo peptídico que incluye un tinte de xanteno de la invención; (b) excitar el fluoróforo; y (c) determinar una propiedad de fluorescencia de la muestra, en donde la presencia de la enzima en la muestra da como resultado un cambio en la propiedad de fluorescencia. En realizaciones seleccionadas, una propiedad de fluorescencia de la sonda se mide antes de incubar la sonda con la enzima.

10 Constructos peptídicos útiles en la práctica de la invención incluyen los que tienen las siguientes características: i) un detenedor; ii) un colorante de xanteno de la invención; y iii) un sitio de reconocimiento de escisión o de ensamblaje para la enzima. Además, el constructo peptídico existe preferiblemente en al menos una conformación que permite la transferencia de energía donante-aceptor entre el colorante de xanteno de la invención y el detenedor cuando el fluoróforo es excitado.

15 Cuando se utiliza la sonda para detectar una enzima, tal como una enzima de degradación (por ejemplo, proteasa), y se observa un grado de transferencia de energía donante-aceptor que es más baja que una cantidad esperada, esto es en general indicativo de la presencia de una enzima. El grado de transferencia de energía donante-aceptor en la muestra se puede determinar, por ejemplo, como una función de la cantidad de fluorescencia de la unidad estructural donante, la cantidad de fluorescencia de la unidad estructural aceptora, la relación de la cantidad de fluorescencia de la unidad estructural donante a la cantidad de fluorescencia de la unidad estructural aceptora o el tiempo de vida del estado de excitación de la unidad estructural donante.

20 El ensayo también es útil para determinar la cantidad de enzima en una muestra. Por ejemplo, mediante la determinación del grado de transferencia de energía donante-aceptor en una primera y segunda vez después del contacto entre la enzima y el constructo en tándem, y la determinación de la diferencia en el grado de transferencia de energía donante-aceptor. La diferencia en el grado de transferencia de energía donante-aceptor está relacionada con la cantidad de enzima en la muestra, la actividad de la enzima hacia el constructo, o ambos.

30 Los métodos de ensayo también se pueden utilizar para determinar si un compuesto altera la actividad de una enzima, es decir, ensayos de cribado. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención provee métodos para determinar la cantidad de actividad de una enzima en una muestra de un organismo. El método incluye: (a) poner en contacto una muestra que comprende la enzima y el compuesto con un constructo peptídico que incluye un colorante de xanteno de la invención; (b) excitar el fluoróforo; y (c) determinar una propiedad de fluorescencia de la muestra, en donde la actividad de la enzima en la muestra da como resultado un cambio en la propiedad de fluorescencia. Los constructos peptídicos útiles en este aspecto de la invención son sustancialmente similares a los descritos inmediatamente más arriba.

35 En una realización preferida, la cantidad de actividad de la enzima en la muestra se determina como una función del grado de transferencia de energía donante-aceptor en la muestra y la cantidad de actividad en la muestra se compara con una actividad estándar para la misma cantidad de la enzima. Una diferencia entre la cantidad de actividad de la enzima en la muestra y la actividad estándar indica que el compuesto altera la actividad de la enzima.

40 Enzimas representativas con las que se puede practicar la presente invención incluyen, por ejemplo, tripsina, enteroquinasa, VIH-1 proteasa, prohormona convertasa, enzima convertidora de interleucina-1b, adenovirus endopeptidasa, assemblin citomegalovirus, leishmanolisina, β -secretasa para la proteína precursora de amiloide, trombina, renina, enzima convertidora de angiotensina, catepsina-D y una quininogenasa, y proteasas en general.

45 Las proteasas desempeñan un papel esencial en muchos procesos de enfermedad, tales como la enfermedad de Alzheimer, hipertensión, inflamación, apoptosis, y el SIDA. Los compuestos que bloquean o potencian su actividad tienen potencial como agentes terapéuticos. Debido a que los sustratos normales de peptidasas son péptidos lineales y porque existen procedimientos establecidos para la fabricación de análogos no peptídicos, compuestos que afectan a la actividad de proteasas son sujetos naturales de la química combinatoria. Compuestos de tamizaje producidos por la química combinatoria requiere ensayos enzimáticos convenientes.

50 Los ensayos convenientes para proteasas se basan en la transferencia de energía donante-aceptor de un fluoróforo donante a un detenedor colocado en los extremos opuestos de una cadena peptídica corta que contiene el sitio de escisión potencial (véase, Knight CG, Methods in Enzymol 248: 18-34 (1995)). La proteólisis separa el fluoróforo y el

detenedor, lo que resulta en un aumento de intensidad en la emisión del fluoróforo donante. Ensayos de proteasa existentes utilizan sustratos peptídicos cortos que incorporan aminoácidos no naturales cromóforos, ensamblados mediante síntesis de péptidos en fase sólida.

5 Los ensayos de la invención también son útiles para determinar y caracterizar secuencias de escisión de sustrato de proteasas o para la identificación de proteasas, tales como proteasas huérfanas. En una realización, el método implica la sustitución de una secuencia de aminoácidos de unidad estructural enlazante definida con una que contiene una selección aleatoria de aminoácidos. Una biblioteca de sondas de colorantes de xanteno fluorescente, en donde los colorantes de xanteno de la invención están enlazados por una unidad estructural enlazante de péptido aleatorizado, que puede ser generado usando técnicas de ingeniería recombinante o técnicas de química sintética.

10 La selección de los miembros de la biblioteca se puede lograr mediante la medición de una señal relacionada con la escisión, tales como la transferencia de energía donante-aceptor, después de poner en contacto la enzima de escisión con cada uno de los miembros de la biblioteca del constructo peptídico fluorescente del tándem. Un grado de transferencia de energía donante-aceptor que es menor que una cantidad esperada indica la presencia de una secuencia enlazante que se escinde por la enzima. El grado de transferencia de energía donante-aceptor en la

15 muestra se puede determinar, por ejemplo, como una función de la cantidad de fluorescencia de la unidad estructural donante, la cantidad de fluorescencia de la unidad estructural donante-aceptor, o la relación de la cantidad de fluorescencia de la unidad estructural donante a la cantidad de fluorescencia de la unidad estructural aceptora o el tiempo de vida del estado de excitación de la unidad estructural donante.

Análisis Multiplex

20 En otra realización de ejemplo, los colorantes de xanteno de la invención se utilizan como un componente de una o más sondas utilizadas en un ensayo multiplex para la detección de una o más especies en una mezcla.

Las sondas que incluyen un colorante de xanteno son particularmente útiles en la realización de análisis y ensayos de tipo multiplex. En un análisis típico multiplex, dos o más especies distintas (o regiones de una o más especies) se detectan usando dos o más sondas, en donde cada una de las sondas está marcada con un fluoróforo diferente, detenedor o un par fluoróforo/detenedor. Las especies preferidas utilizadas en los análisis múltiplex que dependen de transferencia de energía donante-aceptor encuentran al menos dos criterios: la especie fluorescente es luminosa y bien resuelta espectralmente; y la transferencia de energía entre las especies fluorescentes y el detenedor es eficiente.

25

Por lo tanto, en una realización adicional, la invención provee una mezcla que comprende al menos una primera molécula portadora y una segunda molécula portadora. La primera molécula portadora tiene unida covalentemente a la misma un primer detenedor y un primer colorante de xanteno de la invención. Un detenedor de ejemplo tiene una estructura que incluye al menos tres radicales seleccionados de arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido y combinaciones de los mismos. Al menos dos de los radicales están enlazados covalentemente mediante un enlace diazo exocíclico. La mezcla también incluye una segunda molécula portadora. El fluoróforo, detenedor o tanto el fluoróforo como el detenedor unido a la segunda molécula portadora es diferente al unido al primer ácido nucleico. Detenedores de ejemplo de uso en conjunción con los compuestos de la invención incluyen los descritos en la WO 01/86001 de propiedad común.

30

35

El colorante de xanteno de la invención permite el diseño de ensayos multiplex en los que se utiliza más de una estructura detenedora en el ensayo. En un ensayo de ejemplo, al menos dos colorantes de xanteno distintos de la invención se utilizan con una estructura detenedora común. Los detenedores se pueden enlazar a la misma molécula como el colorante de xanteno de la invención o a una molécula diferente. Por otra parte, las moléculas portadoras de uso en un sistema de ensayo particular, pueden ser la misma o diferente.

40

Además de la realización descrita anteriormente, la presente invención también provee un método para detectar y/o cuantificar una especie molecular particulares. El método incluye: (a) poner en contacto las especies con una mezcla como la descrita anteriormente; y (b) detectar un cambio en una propiedad fluorescente de uno o más componentes de la mezcla, las especies moleculares o una combinación de los mismos, detectando de ese modo y/o cuantificando las especies moleculares.

45

Puesto que la presente invención provee colorantes de xanteno reactivos fácilmente disponibles, que pueden ser "sintonizados" para emitir fluorescencia de una longitud de onda deseada, los compuestos de la invención son particularmente adecuados para uso en aplicaciones de multiplex. El acceso a los colorantes de xanteno de la invención que tiene un rango de características de emisión permite el diseño de sondas de transferencia de energía

50

donante-aceptor en las que las propiedades de absorbanza del aceptor y las propiedades de emisión del xanteno son coincidentes sustancialmente, proveyendo de este modo un nivel útil de solapamiento espectral. Además, los colorantes de xanteno de la invención proveen el acceso a sondas que emiten luz en diferentes longitudes de onda y permiten que las sondas sean resueltas espectralmente, lo que es deseable para el análisis multiplex.

- 5 El uso simultáneo de dos o más sondas que utilizan transferencia de energía donante-aceptor se conoce en la técnica. Por ejemplo, se han descrito ensayos multiplex utilizando sondas de ácido nucleico con diferentes especificidades de secuencia. Las sondas fluorescentes se han utilizado para determinar si un individuo es homocigoto de tipo silvestre, mutante homocigoto o heterocigoto para una mutación particular. Por ejemplo, utilizando una baliza molecular de fluoresceína detenida que reconoce la secuencia de tipo silvestre y otra baliza molecular detenida con rodamina que reconoce un alelo mutante, es posible determinar el genotipo individual para el receptor de β -quimiocinas (Kostrikis et al. *Science* 279:1228-1229 (1998)). La presencia de solamente una señal de fluoresceína indica que el individuo es de tipo silvestre, y la presencia de la señal de rodamina indica solamente que el individuo es un mutante homocigoto. La presencia tanto de señal de rodamina como de fluoresceína es diagnóstico de un heterocigoto. Tyagi et al. *Nature Biotechnology* 16: 49-53 (1998) han descrito el uso simultáneo de cuatro balizas moleculares marcadas diferencialmente para la discriminación de alelos, y Lee et al, *BioTechniques* 27: 342-349 (1999) han descrito siete colores homogéneos de detección de seis productos PCR. Los compuestos de la invención son de uso en tales métodos.

Los colorantes de la presente invención se pueden utilizar en ensayos multiplex diseñados para detectar y/o cuantificar sustancialmente cualquier especie, incluyendo, por ejemplo, células enteras, virus, proteínas (por ejemplo, enzimas, anticuerpos, receptores), glicoproteínas, lipoproteínas, partículas subcelulares, organismos (por ejemplo, *Salmonella*), ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN y análogos de los mismos), polisacáridos, lipopolisacáridos, lípidos, ácidos grasos, polímeros no biológicos y moléculas pequeñas (por ejemplo, toxinas, fármacos, pesticidas, metabolitos, hormonas, alcaloides, esteroides).

Kits

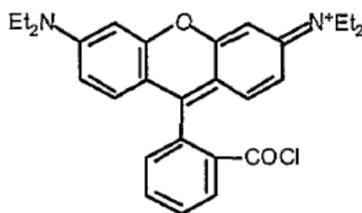
- 25 En otro aspecto, la presente invención provee kits que contienen uno o más de los colorantes de xanteno de la invención o un conjugado del mismo. En una realización, un kit incluye un colorante de xanteno reactivo de la invención y las instrucciones para unir este derivado a otra molécula. En otra realización, el kit incluye un soporte marcado de xanteno, por ejemplo, un ácido nucleico que, opcionalmente, también está marcado con un detenedor y las instrucciones para el uso de este ácido nucleico en una o más formatos de ensayo. Otros formatos para kits serán evidentes para los expertos en la técnica y están dentro del alcance de la presente invención.

Los materiales y métodos de la presente invención se ilustran adicionalmente por los ejemplos que siguen. Estos ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar la invención reivindicada.

- Los siguientes ejemplos se provee a manera de ilustración y no a manera de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Ejemplos

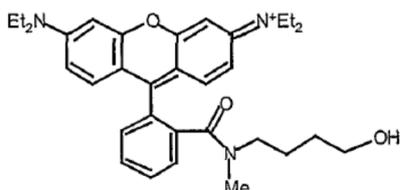
Ejemplo 1 1.1 Preparación cloruro de ácido de Rodamina B 1



- 40 A un matraz de fondo redondo de 500 mL se añadieron 80% de rodamina B (6,0 g, 5,0 mmol) y oxiclorigeno de fósforo (50 mL). El matraz se equipó con un condensador y un tubo de secado de sulfato de calcio. La mezcla de reacción

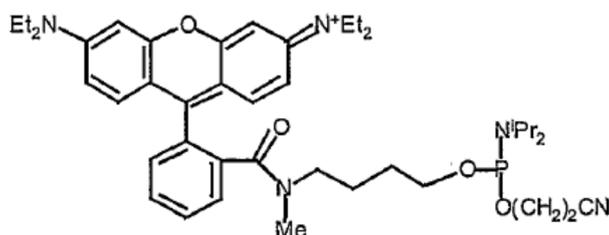
se calentó a reflujo durante 16 h y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Los componentes volátiles se eliminaron bajo alto vacío. Se añadió acetonitrilo (100 mL) para disolver el residuo y se eliminó entonces por evaporación rotatoria y alto vacío. El material sólido se disolvió de nuevo en acetonitrilo (100 mL) y se evaporó hasta sequedad para producir cloruro de ácido rodamina B crudo.

5 1.2 N-metilaminobutanol hexafluorofosfato de rodamina B 2



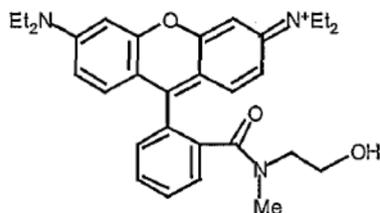
El cloruro de ácido de rodamina B crudo (5,13 g, aprox. 8,2 mmol) se disolvió en una mezcla de DMF (20 mL) y acetonitrilo (70 mL) y a esta solución se añadió una solución de N-metilaminobutanol (3,0 g, 29,1 mmol) y trietilamina (7 mL) en acetonitrilo (10 mL). El matraz se equipó con un séptum y se calentó a 60°C durante la noche. Los componentes volátiles se eliminaron bajo alto vacío y el residuo se sometió a partición entre diclorometano (200 mL) y ácido clorhídrico acuoso 1 N (200 mL). La fase acuosa se lavó con diclorometano (3 x 200 mL). Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con solución de hexafluorofosfato de potasio acuoso (3 x 100 mL de 1g/100 mL), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron in vacuo para dar un sólido de color rojo. El sólido se disolvió en piridina y se separó hasta sequedad bajo alto vacío a 90°C durante la noche para producir la rodamina B cruda, hexafluorofosfato de N-metilaminobutanol como un sólido de color rojo (4,11 g, 74%).

1.3 Rodamina B N-metilaminoetanol fosforamidita 3



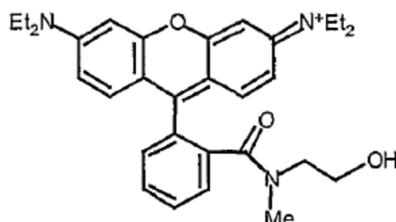
20 N-metilaminobutanol de rodamina B cruda seca (2,24 g, 4,0 mmol) se disolvió en diclorometano seco (50 mL) y luego se añadió 1-H-tetrazol (0,070 g, 1,0 mmol). Se disolvió N,N,N',N'-tetraisopropil β-cianoetil fosfano (1,5 g, 5 mmol) en diclorometano seco (10 mL) y se añadió esta solución a la del colorante. El matraz se equipó con un séptum y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La solución se diluyó con diclorometano (120 mL) y luego se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (2 x 60 mL), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó in vacuo para dejar un aceite. El aceite se lavó con éter dietílico (3 x 50 mL) y el residuo sólido resultante se disolvió en piridina (60 mL). La piridina se eliminó bajo alto vacío y el residuo se disolvió en diclorometano (5 mL). La eliminación del diclorometano in vacuo produjo la fosforamidita como un sólido de color rojo (2,9 g).

1.4 cloruro de N-metilaminoetanol de Rodamina B 4



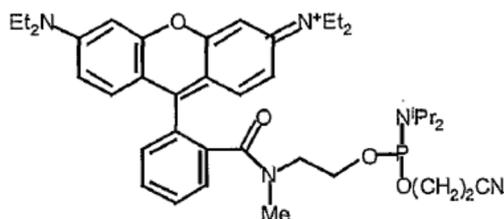
- A un matraz de fondo redondo de 500 mL se añadieron 80% de rodamina B (12,2 g, 20,3 mmol) y oxiclورو de fósforo (120 mL). El matraz se equipó con un condensador y tubo de secado sulfato de calcio. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 16 h y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Los componentes volátiles se eliminaron bajo alto vacío. Se añadió acetonitrilo (100 mL) para disolver el residuo y entonces se separó por evaporación rotatoria y alto vacío. El material sólido se disolvió de nuevo en acetonitrilo (100 mL) y a esta solución se añadió una solución de N-metilaminoetanol (5,0 g, 66,6 mmol) y trietilamina (20 mL) en acetonitrilo (100 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego los componentes volátiles se eliminaron in vacuo. El residuo se sometió a partición entre diclorometano (300 mL) y ácido clorhídrico acuoso 1 N (200 mL). La fase acuosa se lavó con diclorometano (3 x 300 mL). Las soluciones orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtró y se evaporó in vacuo para producir cloruro de N-metilaminoetanol de rodamina B como un sólido rojo (12,9 g).

1.5 Hexafluorofosfato de N-metilaminoetanol de Rodamina B 5



- Se disolvió cloruro de N-metilaminoetanol de rodamina B (4,0 g, aprox. 6 mmol) en diclorometano (500 mL) y la solución se lavó con una solución de hexafluorofosfato de potasio acuoso (3 x 100 mL de 1 g/100 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó in vacuo. El residuo se disolvió en piridina (100 mL) y la solución resultante se evaporó bajo alto vacío para producir rodamina B, hexafluorofosfato de N-metilaminoetanol como un sólido de color púrpura seco.

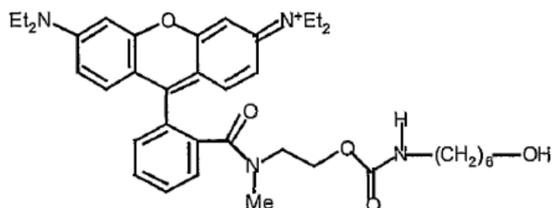
20 1.6 fosforamidita de N-metilaminoetanol de rodamina B 6



- Se disolvió rodamina B, hexafluorofosfato de N-metilaminoetanol (2,45 g, aprox. 3,8 mmol) en diclorometano (50 mL) y luego se añadió 1-H-tetrazol (0,07 g, 1,0 mmol). Se disolvió N,N,N',N'-tetrakisopropil-β-cianoetil fosfano (1,67 g, 5,5 mmol) en diclorometano (10 mL) y la solución se añadió a la del colorante. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La solución se diluyó con diclorometano (120 mL) y luego se lavó con solución saturada de

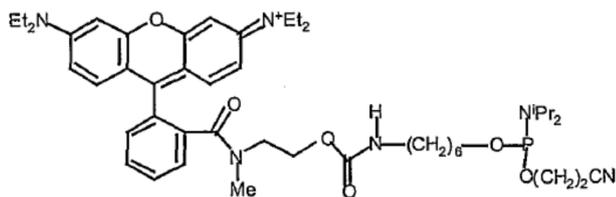
bicarbonato de sodio (2 x 60 mL), se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó in vacuo para dejar un aceite. El aceite se lavó con éter dietílico (3 x 60 mL) y el residuo sólido resultante se disolvió en piridina (60 mL). La piridina se eliminó bajo alto vacío a 45°C y luego el residuo se disolvió en diclorometano (5 mL). La eliminación del diclorometano in vacuo produjo la fosforamidita como una espuma de color rojo.

5 1.7 Rodamina B, N-metilaminoetanoxi hidroxihexil uretiano hexafluorofosfato 7



10 A un matraz de fondo redondo de 250 mL se añadieron rodamina B hexafluorofosfato de etanol (1,75 g, 2,71 mmol) y piridina seca (30 mL). La mezcla se agitó mientras se agregó una solución de p-nitrofenilo (0,73 g, 3,62 mmol) en dioxano (15 mL) durante 5 min. El matraz se equipó con un séptum y se continuó agitando durante otras 2 h. Se
15 añadió una segunda solución de p-nitrofenilo (0,44 g, 2,18 mmol) en dioxano (10 mL) y la mezcla se agitó durante 96 h. Los componentes volátiles se eliminaron in vacuo y el residuo se disolvió en diclorometano (100 mL). La solución se lavó con agua (60 mL), se secó (MgSO_4) y se filtró. Después de concentrar a aprox. 30 mL, la solución se añadió en porciones durante 5 min. a una solución de 6-aminohexanol (3,3 g, 28,2 mmol, exceso) y, diisopropiletilamina (3 mL) en diclorometano (33 mL). La mezcla se agitó durante 90 minutos y luego se diluyó hasta 250 mL con diclorometano. La solución se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1N (2 x 50 mL), se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó in vacuo para dar un sólido rojo que se sometió a cromatografía de columna sobre sílica gel (6 x 20 cm) usando 5% de metanol en diclorometano como eluyente. Las fracciones puras se evaporaron in vacuo y el residuo se disolvió en diclorometano (30 mL) y se filtró a través de una frita de medio. La evaporación del solvente produjo
20 un derivado de uretano como un sólido rojo (1,32 g, 62%).

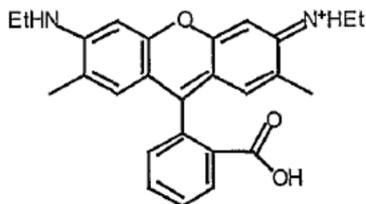
1.8 Rodamina B fosforamidita de N-metilaminoetanoxi hidroxihexil uretano 8



25 Se disolvió rodamina B hexafluorofosfato de N-metilaminoetanoxihidroxihexil uretano (0,825 g, 1,0 mmol) en piridina y luego se evaporó hasta sequedad bajo alto vacío a 80°C durante la noche. Se disolvió en diclorometano seco (30 mL) y luego se añadió 1-H-tetrazol (0,050 g, 0,71 mmol). Se disolvió N,N,N',N'- tetraisopropil-β-cianoetil fosfano (0,50 g, 1,7 mmol) en diclorometano seco (10 mL) y esta solución se añadió a la del colorante. El matraz se equipó con un séptum y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La solución se diluyó con diclorometano (120 mL) y luego se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (2 x 60 mL), se secó (MgSO_4), se filtró y se
30 evaporó in vacuo para dejar un aceite. El aceite se lavó con éter dietílico (3 x 60 mL) y el residuo sólido resultante se disolvió en piridina (60 mL). La piridina se eliminó bajo alto vacío a 45°C y el residuo se disolvió en diclorometano (5 mL). La eliminación del diclorometano in vacuo proporcionó la fosforamidita como una espuma de color rojo (0,91 g, 88%).

Ejemplo 2

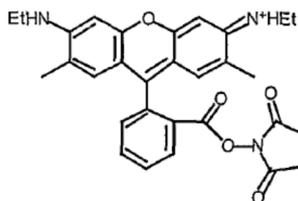
2.1 Preparación de ácido de 6G rodamina 9



5 La rodamina 6G (17,3 g, 36,4 mmol) se disolvió en DMSO (320 mL) y se añadió hidróxido de sodio acuoso 1 N (80 mL). La mezcla se agitó durante 16 h y luego se neutralizó por adición de ácido clorhídrico acuoso 1N. El sólido se separó por filtración y se disolvió en la cantidad mínima de metanol (aprox. 500 mL). La solución se añadió a ácido clorhídrico acuoso 1N (1200 mL) y luego el metanol se eliminó por ebullición. Después de enfriar, el sólido se separó por filtración y se lavó con agua (2 x 30 mL). El sólido se secó para proporcionar el ácido de R6G (16 g, 97%).

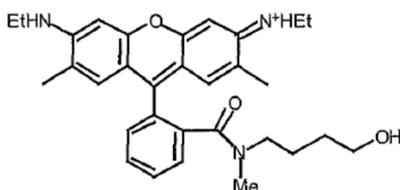
2.2 Preparación de succinimidil éster de rodamina R6G 10

10



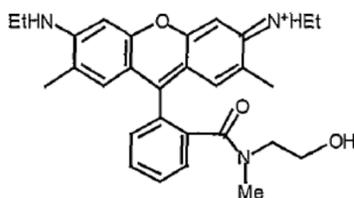
15 A un matraz de fondo redondo de 100 mL se añadió ácido de R6G rodamina (6,63 g, 14,7 mmol), TSTU (5,25 g, 17,4 mmol), DMF (150 mL) y diisopropiletilamina (9 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. El sólido se separó por filtración, se lavó con DMF (2 x 4 mL) y acetonitrilo (2 x 5 mL), y se secó para proporcionar el succinimidil éster de R6G rodamina (2,9 g, 36%).

2.3 N-metilaminobutanol de rodamina R6G 11



20 A un matraz de 50 mL se añadieron éster de succinimidilo de R6G rodamina (1,0 g, 1,83 mmol), N-metilaminobutanol (1,16 g, 11,3 mmol) y DMF (5 mL). La mezcla se calentó a 60°C durante 18 horas y luego se diluyó con agua (150 mL). La solución se aplicó a una columna de C-18 en sílica gel en fase reversa (3 x 13 cm). La columna se eluyó con un fuerte gradiente de 0 a 100% de metanol para eliminar las impurezas y luego con metanol acidificado (5 mL de 1 N ac. HCl en 1 L de metanol) para eluir el producto. La evaporación del eluyente in vacuo proporcionó N-metilaminobutanol de rodamina R6G (0,81 g, 83%).

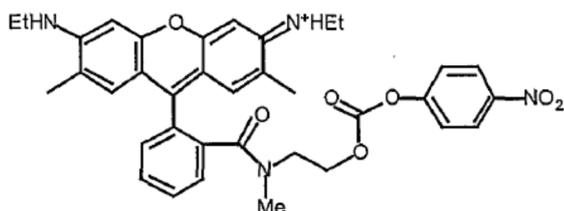
25 2.4 Preparación de N-metilaminoetanol de rodamina 6 G 12



5 La Rodamina 6 G comercialmente disponible (50 g) se calentó hasta 120°C con N-metiletanolamina (150 mL). La mezcla de reacción se comprobó después de 1 h por espectroscopía de masas MALDI que muestra una conversión limpia en un producto, M/e 474. La solución caliente se vertió cuidadosamente en HCl 2 N (1200 mL) y se enfrió durante la noche. Un sólido de color rojo se recogió por filtración y se lavó con HCl 0,5 N (300 mL). El material se secó al aire durante varios días, luego se sometió a alto vacío durante 18 h para dar N-metilaminoetanol de rodamina 6 G (38 g).

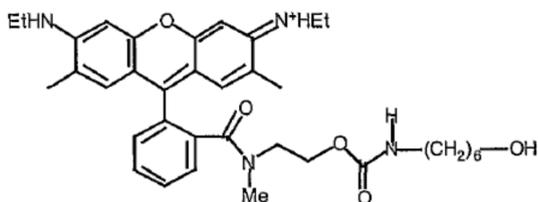
2.5 Preparación de 13, p-nitrofenilcarbonato de 12

10



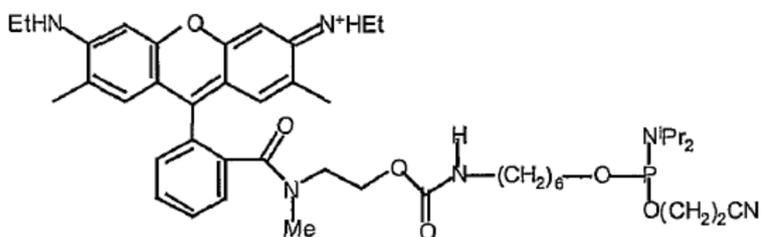
15 Se disolvió N-metilaminoetanol de rodamina 6 G (38 g) en piridina seca (800 mL) y una solución de cloroformiato de p-nitrofenilo (30 g) en dioxano seco (400 mL) se añadió gota a gota durante 30 min. Después de 1 h de agitación adicional, un espectro de masas de una alícuota reveló la conversión a un compuesto de M/e 641, consistente con el éster de p-nitrofenil carbonato.

2.6 Preparación de N-metilaminoetanoxi hidroxihexil uretano de rodamina 6 G 14



20 La solución se separó a un alquitrán por evaporación rotatoria y redisolvió en 1 L de diclorometano. Esta solución se lavó con agua, 800 mL y luego se separó a un aceite por evaporación rotatoria. Una solución de 40 g de 6-amino-1-hexanol en 700 mL de THF y 500 mL de Na₂CO₃ saturado ac. se preparó, y el aceite anterior se disolvió en 500 mL de THF y se añadió durante 20 min. La mezcla de color rojo brillante se agitó durante una hora adicional, después de lo cual un espectro de masas reveló la conversión a un compuesto de M/e 618, consistente con el derivado de uretano.

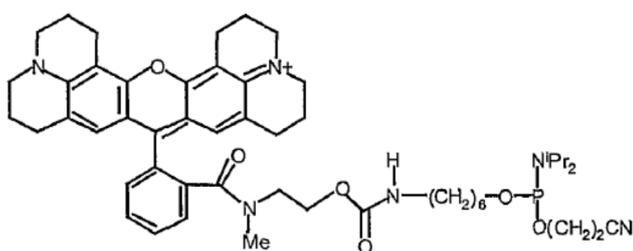
25 2.7 Preparación de fosforamidita de N-metilaminoetanoxi hidroxihexil uretano de rodamina 6 G 15



La mayor parte del THF se eliminó por evaporación rotatoria, y el residuo acuoso se extrajo con diclorometano (800 mL). La capa de diclorometano se lavó con agua (500 mL) seguido de salmuera (500 mL). La fase orgánica se redujo a aproximadamente 300 mL por evaporación rotatoria y se aplicó a una columna rellena con un lecho (10 x 40 cm) de alúmina básica en 2% de metanol en diclorometano. La columna se eluyó a 100 mL/min con la misma fase móvil hasta que eluyeron las bandas coloreadas de ejecución temprana, luego, el metanol se aumentó a 4%. La principal fracción eluyó como una banda de color naranja brillante; las fracciones recogidas de esta banda se comprobaron por TLC (20% de metanol, 2% de piridina en diclorometano). Las fracciones puras ($r_f = 0,6$) se agruparon y se evaporaron para dar 15 (15 g). El material se secó adicionalmente por evaporación rotatoria a partir de piridina seca (400 mL) y alto vacío durante 24 h. El compuesto se disolvió en diclorometano seco (150 mL) y se añadieron una solución premezclada de N,N,N',N'-tetrakisopropil betacianoetil fosfano (7,5 g) y tetrazol (500 mg) en acetonitrilo seco (150 mL). Después de 2 h, la TLC (las mismas condiciones que anteriormente) mostró la conversión a un nuevo compuesto ($r_f = 0,7$), y un espectro de masas de una alícuota mostró M/e 820, consistente con la formación de la fosforamidita. La solución se redujo por evaporación rotatoria a un alquitrán, luego, se redisolvió en diclorometano (600 mL). La solución se lavó con solución de Na_2CO_3 acuoso al 5% (400 mL) y se secó sobre MgSO_4 . La evaporación, seguida de cromatografía y evaporación como anteriormente dio el 15 puro como una espuma de color rojo (19 g).

Ejemplo 3

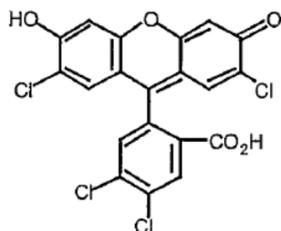
3.1 Preparación de 19 a partir de rodamina 101



El compuesto 19 y sus precursores 16 a 18 se prepararon de una manera análoga a los compuestos correspondientes del Ejemplo 2.

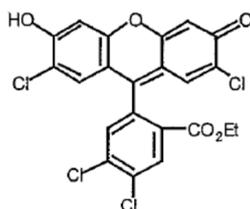
Ejemplo 4

4.1 Preparación de colorante de diclorofenil xanteno



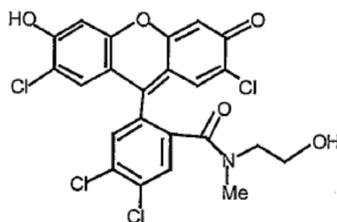
- 5 Se mezcló 4-clororesorcinol (33 g) con anhídrido 4,5-dicloroftálico en ácido metanosulfónico (100 mL) de acuerdo con el procedimiento de Menchen, et. al, (patente U.S. No. 5,654,442). En general, con agitación magnética, la solución se calentó hasta 180°C durante 30 min y se mantuvo durante otros 30 minutos. La mezcla se dejó enfriar hasta ~ 100°C y se vertió cuidadosamente en agua (1 L). El sólido se recogió por filtración y se secó al aire durante varios días, seguido de 24 h de alto vacío y se caracterizó como que tiene la estructura de más arriba.

4.2 Preparación del etil éster de diclorofenilo 20



- 10 El compuesto del Ejemplo 4.1 (50 g) se sometió a reflujo con etanol absoluto (1 L), que contenía clorotrimetilsilano (60 mL). Después de 2 h la solución se enfrió y los componentes volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria. Se aplicó alto vacío al sólido naranja durante 24 h para dar 20, (55 g).

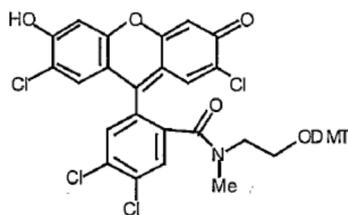
4.3 Preparación de N-metanolaminoetanol amida 21



- 15 Se mezcló etil éster 20 (7 g) con N-metiletanolamina (30 mL) y se calentó hasta 120°C, con agitación magnética. Después de 30 min, la solución se vertió cuidadosamente en HCl 2 N (1 L). El sólido se recogió por filtración y se secó al aire durante varios días, seguido de 24 h de alto vacío para dar 21 como un sólido de color rojo (8 g).

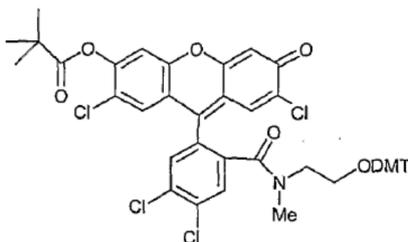
4.4 Preparación de dimetoxitritil éter 22 de N-metanolaminoetanol amida 21

20



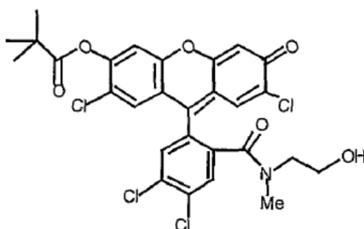
5 Se disolvió alcohol amino 21 (8 g) en piridina seca (200 mL) y se añadió cloruro de DMT (10 g). Después de agitar durante la noche, un espectro de masas de una alícuota mostró un pico a 833 M/e, consistente con la adición del grupo DMT al hidroxilo alifático. El solvente se eliminó por evaporación rotativa, y el residuo se disolvió en diclorometano (300 mL). La solución naranja se lavó con NaHCO_3 saturado (200 mL), seguido de salmuera (200 mL). El material crudo se disolvió entonces en una solución (50 mL) de 1% de metanol, 1% de TEA en diclorometano. Esto se aplicó a una columna de alúmina neutra (5 x 20 cm), 7% en peso de agua, y se eluyó con 1 L de la fase móvil descrita más arriba. Un gradiente de metanol al 4% luego se ejecutó entonces sobre 4 litros de solvente. Las fracciones puras que contienen 22 (TLC r_f 0,6, placas de sílica con 5% de metanol, 1% de TEA en diclorometano) se agruparon y se evaporaron para dar el 22 puro (4 g).

4.5 Preparación de derivado de O-trimetil acetil fenilo 23



15 El producto de la reacción descrito en el Ejemplo 4.4 se disolvió en piridina seca (300 mL) bajo argón. Luego se añadió cloruro de trimetil acetilo (5 mL) gota a gota mediante una jeringa durante 3 min. La solución cambió de color naranja brillante a un color amarillo mate durante la adición. TLC (mismas condiciones que anteriormente) mostró un cambio a un punto amarillo $r_f = 0,8$. Un espectro de masas de una alícuota mostró un pico en m/e 920, acilación consistente del grupo hidroxilo de tipo fenólico. La mezcla se purificó con los mismos métodos como fue el material de partida para dar 23 (2,4 g).

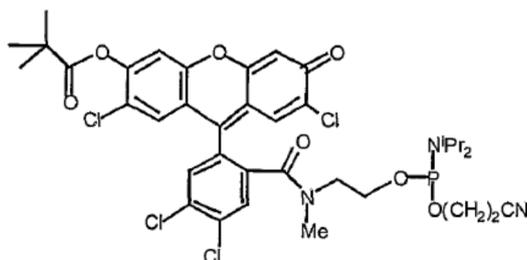
20 4.6 Eliminación del grupo DMT para formar 24



25 El compuesto 23 (2 g) se trató con una solución (300 mL) de ácido dicloroacético al 3% en diclorometano durante 1 h. El ácido se neutralizó mediante la adición de NaHCO_3 saturado con precaución, (300 mL) con agitación durante un adicional de 1 h. Las capas se separaron y la capa de diclorometano se lavó con agua (200 mL) seguido de

salmuera (200 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se redujo por evaporación rotatoria. El producto se purificó por cromatografía de columna como más arriba para dar 24 puro (0,8 g).

4.7 Preparación de fosforamidita 25



5

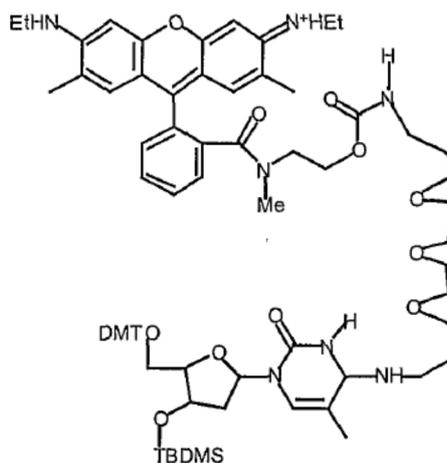
El compuesto 24 se secó por evaporación rotatoria a partir de piridina seca (50 mL) y alto vacío durante la noche y se hizo reaccionar con una solución premezclada de N,N,N',N'-tetra-isopropil-2-cianoetil fosforamidato (500 mg) y tetrazol (20 mg) en acetonitrilo seco (50 mL). Después de 1 h, un espectro de masas de una alícuota mostró un pico correspondiente a la conversión a un nuevo compuesto, M/e 822, consistente con la formación de la fosforamidita. La solución se redujo por evaporación rotatoria y se redisolvió en acetato de etilo (200 mL). La fase orgánica se lavó con NaHCO_3 saturado (100 mL) y se secó sobre MgSO_4 . La filtración seguida por evaporación y alto vacío durante la noche proporcionó la fosforamidita 25 (1 g).

10

Ejemplo 5

5.1 Preparación de nucleósido enlazante de N-metilaminoetanol de rodamina 6G 26

15



20

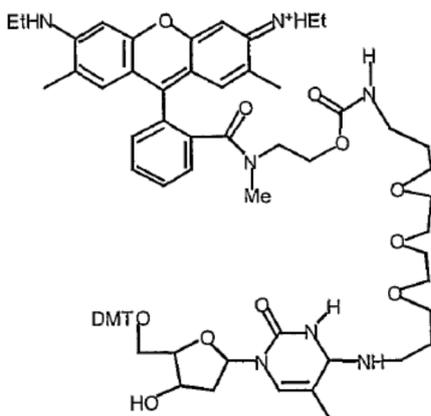
El N-metilaminoetanol de rodamina 6G 13 (10 g) se secó por evaporación rotatoria a partir de piridina seca (200 mL) y alto vacío durante 24 h. El material resultante se disolvió en piridina seca (200 mL) y luego se añadió dioxano seco (75 mL). Se añadió gota a gota clorofornio de p-nitrofenilo (12 g) como una solución en dioxano (100 mL) durante 20 min. La solución se agitó durante varias horas después de lo cual un espectro de masas de una alícuota mostró la conversión completa en el éster de p-nitrofenilo. Los solventes se eliminaron por evaporación rotatoria y el residuo se disolvió en diclorometano (400 mL). La fase orgánica se lavó con KH_2PO_4 0,5 N (2 x 300 mL) y luego se secó sobre MgSO_4 . La solución se redujo a un aceite por evaporación rotatoria y se redisolvió en THF (150 mL). Se disolvió

25

N4-(2-(4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina)-5-metil-5'-(4,4'-dimetoxitritilo)-3'-O-tertbutildimetilsilil-2'-desoxicidina (Lyttle, et al, Bioconjugate Chem. 13: 1146-1154 (2002)) (15 g) en THF (300 mL) y se añadió

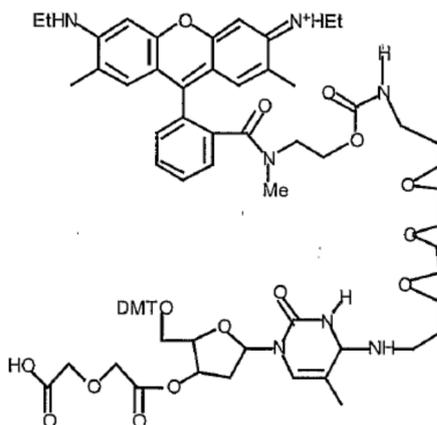
5 NaHCO_3 saturado (200 mL). Con agitación magnética, se añadió la solución en THF de p-nitrofenil éster lentamente durante 5 min. La solución se agitó durante 18 h. Un espectro de masas de una alícuota mostró un pico en m/e 1363, en consonancia con la del producto deseado. La mayor parte del THF se eliminó y el residuo se extrajo con diclorometano (300 mL). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 200 mL) y se secó sobre MgSO_4 . La solución se redujo por evaporación rotatoria y se aplicó a una columna de alúmina básica, 7% en peso de agua (20 x 50 cm), empacada con 2% de metanol, 2% de piridina en diclorometano. La columna se eluyó con 2 L de este solvente, luego, un gradiente de metanol al 10% se ejecutó sobre 20 L de solvente. Las fracciones se comprobaron por TLC (20% de metanol, 2% de piridina en diclorometano) y aquellas fracciones puras que tienen r_f 0,6 se agruparon y se evaporaron para dar 26 (6 g) como un alquitrán rojo.

10 5.2 Desprotección de la unidad estructural 3'-hidroxilo, que forma 27



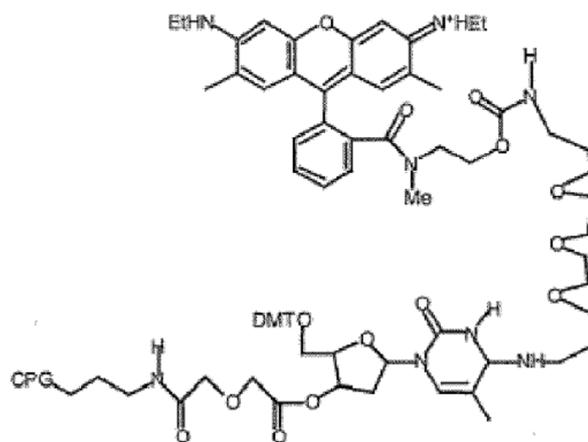
15 El compuesto 26 (6 g) se disolvió en una solución de THF (100 mL), fluoruro de N-tetrabutilamonio (12 mL) en THF (Aldrich # 216143) y ácido acético (2 mL). La solución se dejó reposar durante la noche y una alícuota, comprobada por espectro de masas, mostró un pico en M/e 1252, consistente con la eliminación del grupo TBDMS. La mezcla de reacción se detuvo mediante la adición de NaHCO_3 (20 mL). El THF se eliminó por evaporación rotatoria. El residuo se disolvió en diclorometano (300 mL). La fase orgánica se lavó con agua (200 mL) seguido de NaHCO_3 (200 mL). La capa de diclorometano se secó sobre MgSO_4 y se redujo a un aceite por evaporación rotatoria. TLC (20% de metanol, 2% de piridina en diclorometano) reveló adecuada pureza del producto para proceder sin purificación. El material se secó por evaporación rotatoria con piridina seca (100 mL) seguido de alto vacío durante 18 h para dar 27 (2,5 g).

5.3 Preparación de éster de ácido 3'-glicólico 28



El compuesto 27 (2,5 g) se disolvió en piridina seca (100 mL) y se añadieron N-metilimidazol (0,5 mL) y anhídrido diglicólico (2,5 g). La mezcla se dejó reposar 48 h, después de lo cual un espectro de masas de una alícuota mostró un pico en M/e 1367, consistente con la esterificación del grupo hidroxilo de 27. El solvente se eliminó por evaporación rotatoria, y el residuo se disolvió en diclorometano (300 mL). La fase orgánica se lavó con KH_2PO_4 0,5 M (3 x 200 mL) y se secó sobre MgSO_4 . La solución se filtró y se redujo por evaporación rotatoria para dar 28 (1,5 g) como una espuma.

5.4 Conjugación de 28 a CPG, formando CPG funcionalizado 29



El vidrio de poro controlado (CPG) para la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida se hizo mediante la activación de 28 (300 mg) con BOP (250 mg) y N-metil morfolina (50 μL) en acetonitrilo (50 mL), y luego añadiendo 500 Å de CPG de aminopropilo (Biosearch) (5 g). La suspensión se dejó reposar durante la noche y luego el soporte se lavó a fondo con acetonitrilo. Grupos aminopropilo que no reaccionaron se taparon entonces con una mezcla de N-metilimidazol (5 mL) y anhídrido acético (5 mL) en acetonitrilo (50 mL). Después de 15 min la solución se enjuagó fuera del soporte y el CPG de color naranja oscuro se lavó a fondo con acetonitrilo, seguido de diclorometano y luego se secó mediante alto vacío durante la noche. La carga final, de acuerdo con la eliminación de ácido suave de los grupos DMT, fue de 25 micromoles por gramo.

Ejemplo 6

6.1 Síntesis de 4-hidroxipiperidil N,N,diisopropil betacianoetil fosforamidita de rodamina B

La rodamina B (37 g), se disolvió en DMF (400 mL) y se añadió N-metilmorfolina (20 mL). Se añadió BOP (45 g) como un sólido, y la solución se agitó magnéticamente durante 10 min. Se añadió una solución de 4-hidroxipiperidina (20 g) en DMF (200 mL) gota a gota a la solución de colorante durante 20 min. Después de 30 min adicionales, un espectro de masas de una alícuota mostró la reacción completa (al alcohol de 4-hidroxipiperidinilo, M/e 531). La DMF se eliminó por evaporación rotativa, y el residuo se disolvió en 10% de MeOH en DCM (600 mL). La solución orgánica se lavó con HCl 1 N (800 mL) y se evaporó para dar un alquitrán. La cromatografía DE columna sobre alúmina con un gradiente de 2-4% de MeOH en DCM dio el producto (29 g), rf 0,5 (placa de sílica, 10% MeOH/DCM 2% piridina). Una mitad del producto se secó por tira de piridina y bajo vacío durante la noche. Se agregó una solución de N,N,N,N-tetraisopropil betacianoetil fosfano (6,6 g) y tetrazol (500 mg) en acetonitrilo (200 mL) a una solución del producto en DCM (200 mL). Después de 2 h, un espectro de masas de una alícuota mostró la reacción completa (a la amidita, M/e 730). Los compuestos orgánicos se separaron por evaporación rotatoria, y se disolvieron en DCM (500 mL). La fase orgánica se lavó con NaHCO_3 saturado (300 mL) de evaporado hasta un alquitrán. El producto se purificó por cromatografía sobre alúmina con un gradiente de 2-4% de MeOH en DCM, 1% de piridina 1% de agua. Las fracciones se agruparon y se evaporaron para dar amidita (14,6 g), rf 0,7 (placa de sílica, 10% MeOH/DCM 2% piridina).

6.2 Síntesis de 4-hidroxipiperidinil N,N,diisopropil betacianoetil fosforamidita de rodamina 101:

La rodamina 101 (55 g) se disolvió en DMF (800 mL) y se añadió N-metilmorfolina (25 mL). Se añadió BOP (50 g) como un sólido, y la solución se agitó magnéticamente durante 10 min. Una solución de 4-hidroxipiperidina (30 g) en DMF (200 mL) se preparó y esto se añadió gota a gota a la solución de colorante durante 20 min. Después y 60 minutos adicionales un espectro de masas de una alícuota mostró la reacción completa (al alcohol 4-hidroxipiperidinilo, M/e 577). La DMF se eliminó por evaporación rotatoria, y el residuo se disolvió en 10% de MeOH en DCM (900 mL). La solución orgánica se lavó con HCl 1 N (800 mL) y se evaporó para dar un alquitrán. La cromatografía de columna sobre sílica con un gradiente de 2-6% de MeOH en DCM, 2% de piridina, dio el producto (40,9 g), rf 0,5 (placa de sílica, 20% de MeOH/DCM 2% piridina). Una mitad del producto se secó por tira de piridina y bajo vacío durante la noche. Una solución de N,N,N,N-tetraisopropil betacianoetil fosfano (10 g) y tetrazol (600 mg) se mezcló en acetonitrilo (300 mL) y se añadió a una solución del alcohol anterior disuelto en DCM (300 mL). Después de 4 h, un espectro de masas de una alícuota mostró la reacción completa (a la amidita, M/e 777). La solución se separó por evaporación rotatoria, y redisolvió en DCM (700 mL). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado (500 mL) y se evaporó para dar un alquitrán. El producto se purificó por cromatografía sobre alúmina con un gradiente de 2-4% de MeOH en DCM, 2% piridina 1% de agua. Las fracciones se agruparon y se evaporaron para dar amidita (17,3 g), rf 0,8 (placa de sílica, 20% MeOH/DCM 2% piridina) 0.8.

Ejemplo 7

7.1 Síntesis de ácidos nucleicos marcados en 5' con 15, 19 y 25

Fragmentos de ADN 3'-TTTTTTTTT-5' y 3'-TTCGATAAGTCTAG-5' se hicieron en una escala de 200 nm en CPGs de 3'-glicolato (van der Laan, et. al, Tetrahedron Lett. 38: 2252 (1997)) con monómeros de cianoetil fosforamidita en un sintetizador de ADN Biosearch 8750™. Los grupos protectores en los grupos amino exocíclicos de A, C y G eran benzoilo, acetilo y dimetilformamida, respectivamente. Después de que se completó la síntesis, se eliminó el grupo DMT en 5' (con ácido dicloroacético al 3% en diclorometano) y la columna de síntesis con el CPG que contiene el ADN se lavó con acetonitrilo seco.

Para acoplar la unidad estructural de colorante con el ácido nucleico, 35 - 50 mg de 15, 19 y 25 fosforamiditas de colorante se disolvieron en acetonitrilo seco (150 µL) en un vial de centelleo de 20 mL, y se añadieron tamices moleculares activados (20 mg). La solución resultante se aplicó a la columna con una jeringa de 1 mL. Una jeringa complementaria que contiene 100 µL de S-etiltiotetrazol 0,4 M en acetonitrilo se unió en el otro extremo de la columna. Las soluciones se mezclaron sobre el CPG con las jeringas, y se dejó reposar durante 5 min. Las columnas se pusieron de nuevo en el sintetizador de ADN y se lavaron con acetonitrilo seguido de una solución oxidante (yodo 0,02 M en una mezcla de THF (70%): piridina (20%): Agua (10%)). Después de 30 segundos, esta solución se lavó con acetonitrilo y el contenido de cada columna fue expulsado en tubos de 1,5 mL con tapón de rosca Eppendorf™. Una mezcla de 2-metoxietilamina (Aldrich) (100 µL) y metanol (300 µL) se introdujo en cada tubo, y los tubos se taparon y se dejaron reposar durante 6 h a temperatura ambiente. el metanol que contiene el ADN marcado se eliminó y, y el CPG se lavó con metanol fresco (400 mL). El CPG se desechó y se evaporó el metanol que contenía los fragmentos de ADN marcados.

7.2 Síntesis de ácidos nucleicos marcados en 5' con 6

Fragmentos de ADN 3'-TTTTT-5', 3'-TTTTTTTTTT-5', fragmentos de ADN 3'-TTTTTTTTTTTTTTTT-5', marcados con 6 se prepararon como se describe anteriormente, excepto que los fragmentos se escindieron del soporte de CPG usando una solución de de t-butilamina (25%): metanol (25%): agua (50%).

7.3 Síntesis de ácidos nucleicos marcados en 3' con 28

Para la síntesis de ADN marcado con colorante en 3' se utilizó CPG 27 en lugar del soporte de síntesis de ADN estándar. Después de que se terminó la síntesis de ADN automatizado, la muestra se desprotegió y se escindió con la solución de amina/alcohol y se evaporó después de 6 h. Las muestras se disolvieron en agua desionizada (1 mL) para su análisis.

7.4 HPLC y análisis de espectro de masas de ADN marcado con colorante en 3' y 5'

Los análisis de HPLC de intercambio aniónico se realizaron como sigue: 2-20 µL de las muestras acuosas, dependiendo de la concentración, se inyectaron en una columna de intercambio de aniones Dionex (4,6 x 250 mm); las muestras se eluyeron a 2 mL/min con reguladores acuosos de (A) TRIS HCl 0,025 M y TRIS 0,01 M, y (B) TRIS HCl 0,025 M, TRIS 0,01 M, y NaBr 1,0 M utilizando un gradiente lineal de 1:0 a 0:1 durante 14 min, con detección

UV a 260 nm. HPLC en fase reversa como sigue: 20 µL de la muestra acuosa se inyectaron en un HAILSIL HL C18, columna 5 µ (4,6 x 150 mm); las muestras se eluyeron a 1 mL/min con reguladores de (A) TEAA 0,1 M, acetonitrilo al 5%, (B) acetonitrilo, con un gradiente lineal de 1:0 a 0:1 durante 15 min: detección UV a 260 nm. Las muestras para el análisis espectral de masas se prepararon como por Bruker Corp.

5 7.5 Resultados

La Tabla 2 muestra masas calculadas y encontradas de los anteriores Colorantes-ADN de 15 mers por espectroscopía de masas MALDI:

Tabla 2

	M/e calculado	Encontrado
5'- 25 15 mer	5160.2	5129
5'-15 15 mer	5249.2	5214
5'-19 15 mer	5324.2	5304
3'-28 15 mer	5273.2	5241

10

Ejemplo 8

8.1 Preparación de sondas de ácidos nucleicos de marcación doble

El procedimiento de PCR en tiempo real se realiza en un dispositivo de PCR cuantitativo en tiempo real tal como el Sistema de Detección de Secuencias.TM ABI Prizm 7700. (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), o el iCycler (BioRad, Hercules, CA). Estos dos sistemas amplifican muestras en un formato de 96 pozos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por la luz se recolecta en tiempo real para los 96 pozos, y se detecta. Los sistemas incluyen software para el funcionamiento de los instrumentos y para el análisis de los datos.

15

El Sistema de Detección de Secuencias ABI 7700 se calibró con colorante de xanteno 15 y otros colorantes fluorescentes.

20

La cuantificación se obtuvo utilizando cebadores y una sonda de marcación doble derivada de la secuencia que codifica el gen ApoB (apolipoproteína B) y del gen TelomeraseRT (Transcriptasa reversa de telomerasa). Los detenedores BHQ1 y BHQ2, que se describe en la solicitud de patente copendiente U.S. No. 09/567,863, se incorporaron en los cebadores. Los cebadores específicos de genes y sondas fluorogénicas fueron diseñadas basándose en las secuencias de codificación de los ADN. Las secuencias para los cebadores y sondas (cebador de avance, cebador de retroceso y sonda) utilizadas para la ApoB y Telomerasa son las siguientes:

25

TelomerasaRT.f1 CAGGTGGAGACCCTGAGAA

TelomerasaRT.r1 ACACCTTTGGTCACTCCAAAT

TelomerasaRT.p1 TCCCAGAGCTCCCAGGGTCC

ApoB.f1 TGAAGGTGGAGGACATTCCTCTA

30

ApoB.r1 CTGGAATTGCGATTTCTGGTAA

ApoB.p1 CGAGAATCACCTGCCAGACTCCGT

La secuencia de la sonda ApoB y la secuencia de la sonda de la Telomerasa se sintetizaron con diversas combinaciones de colorantes fluorescentes y el detenedor. Estas sondas se utilizaron junto con sus cebadores específicos de genes en los ensayos de PCR en tiempo real. Se detectó ADN humano (Clontech, Palo Alto, CA) en concentraciones de 100 ng por reacción o 1 ng por reacción en un ensayo. Los datos se analizaron a partir de reacciones por triplicado, y se calculó el promedio y la desviación estándar para cada triplicado.

35

Se utilizó PCR cuantitativo en tiempo real (Livak et al, PCR Methods Appl 4 (6): 357-62 (1995)) para determinar si los compuestos anteriores se compararon favorablemente con colorantes existentes utilizados como informadores en un ensayo tal. Los resultados positivos en este ensayo se pueden interpretar para extender a resultados positivos en otros ensayos, incluyendo, pero no limitado a, el Invasor (Hall et al., Natl. Acad. Sci. USA 97: 8272-8277 (2000)), el Amplificador (Uehara, Biotechniques 26(3): 552-8 (1999)), the Scorpion (Thelwell et al., Nucl. Acids. Res. 28: 3752-3761 (2000)), y la baliza molecular (Tyagi & Kramer, Nature Biotechnol. 14: 303-308 (1996)).

8.2 Preparación de sondas de ácidos nucleicos de marcación doble

La reacción del ensayo de PCR en tiempo real es una técnica basada en PCR fluorescente que hace uso de la actividad de exonucleasa en 5' de la enzima Taq ADN polimerasa para controlar la amplificación en tiempo real. Dos cebadores de oligonucleótidos se utilizan para generar un producto de PCR típico de una reacción PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, está diseñado para detectar la secuencia de nucleótidos situada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extensible por la enzima ADN polimerasa Taq, y está marcada con un colorante fluorescente informador y un detenedor de fluorescencia, tradicionalmente TAMRA o DABCYL. Cualquier emisión de luz desde el colorante informador se detiene por el colorante de detención cuando los dos colorantes se encuentran próximos entre sí como están en la sonda intacta. Durante la reacción de amplificación, la enzima ADN polimerasa Taq escinde la sonda de una forma dependiente de la plantilla. Los fragmentos de la sonda resultantes se disocian en solución, y la señal del colorante informador liberada está libre del efecto de detención de la unidad estructural de detención. Una molécula de colorante informador se libera para cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante informador no detenido provee la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

Los datos del ensayo de PCR en tiempo real se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo de umbral. Este se define como el ciclo en donde la señal del informador se acumula por encima del nivel de fondo de fluorescencia. Una unidad corresponde 1 ciclo de PCR o aproximadamente una amplificación de 2 veces en relativa a la normal, dos unidades corresponden a 4 veces, 3 unidades a una amplificación de 8 veces, y así sucesivamente. Los valores de Ct se utilizan como medición cuantitativa del número relativo de copias de partida de una secuencia objetivo particular en una muestra de ácido nucleico.

Los compuestos de la invención son reemplazos útiles para colorantes que se utilizan comúnmente en ensayos de ácidos nucleicos. Por ejemplo, compuestos tales como 15 son un reemplazo útil para los colorantes fluorescentes JOE y HEX. Los colorantes ROX y Texas Red se pueden reemplazar con compuestos tales como 19. Los compuestos tales como 3, 6 y 8 pueden ser sustituidos por TAMRA.

La excitación y emisión de longitudes de onda de los colorantes de la invención y los colorantes reconocidos en la técnica se listan en la Tabla 3. Debido a que el valor de Ct para los colorantes de la invención es equivalente a, o menor que, el valor de Ct de los colorantes reconocidos en la técnica, los colorantes presentes son sustitutos útiles para los colorantes reconocidos en la técnica.

Tabla 3

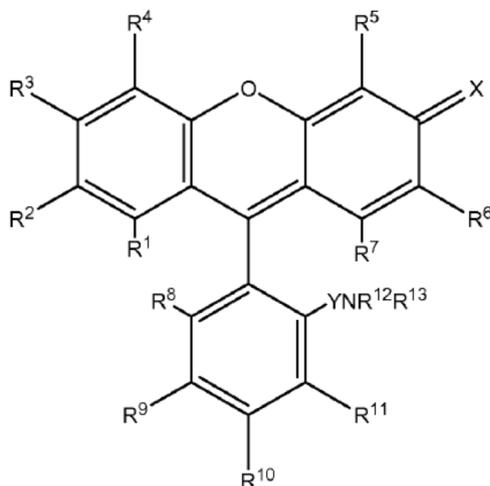
Colorante	Excitación Máxima/nm	Emisión Máxima /nm
FAM	495	520
JOE	520	548
HEX	535	556
VIC	538	554
TAMRA	555	576
ROX	575	602
25	522	544
15	540	561
3, 6, 8	565	588
19	593	613

Los resultados de tres experimentos típicos se graficaron y los datos se presentan en la Figura 14, Figura 15 y Figura 16.

La presente invención provee un nuevo método para desproteger y aislar oligonucleótidos. Aunque se han provisto ejemplos específicos, la descripción anterior es ilustrativa y no restrictiva.

Reivindicaciones

1. Un colorante de xanteno que tiene la fórmula:



en el cual

5 R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰ y R¹¹ se seleccionan independientemente de alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, halógeno, H, NO₂, CN, NR¹⁵R¹⁶ y Z²R¹⁶;

R³ es NR¹⁵R¹⁶;

en donde

10 Z² es O o S;

cada R¹⁵ es un miembro seleccionado independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, y heteroalquilo sustituido o no sustituido

15 cada R¹⁶ es un miembro seleccionado independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, C(Z³)R¹⁷, y R¹⁵ y R¹⁶, junto con el nitrógeno al que están unidos, también pueden ser un grupo reactivo que contiene nitrógeno, en donde dicho grupo reactivo es un miembro seleccionado de -NHNH₂,

-N=C=S y -N=C=O;

en donde

Z³ es un miembro seleccionado de O, S y NH;

20 R¹⁷ es un miembro seleccionado de alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, OR¹⁸ y NR¹⁹R²⁰;

en donde

R¹⁸ es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y C(O)R²¹;

en donde

25 R²¹ es alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido;

R¹⁹ y R²⁰ son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido;

Y es C(O) o S(O)₂; y

X es (NR²²R²³) o (O)

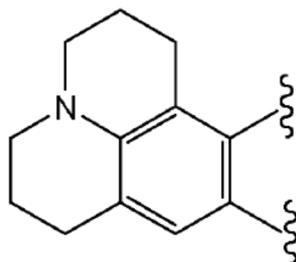
5 en donde

R²² y R²³ son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido;

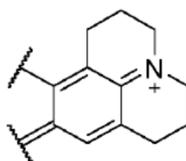
y

10 R¹² y R¹³ junto con el nitrógeno al que están unidos, se unen para formar un anillo, en donde dichos R¹² o R¹³ comprenden un grupo reactivo que contiene oxígeno o una unidad estructural producida por la reacción del grupo reactivo que contiene oxígeno con un grupo reactivo de la reactividad complementaria sobre una molécula portadora.

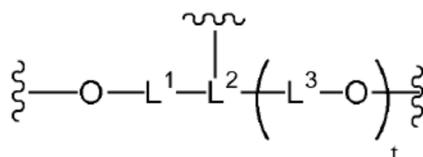
15 2. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R³ es NR¹⁵R¹⁶ y R², R⁴ y R¹⁵ y R¹⁶, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, se fusionan con la unidad estructural fenilo a la que NR¹⁵R¹⁶, R² y R⁴ están unidos, formando un sistema de anillo sustituido o no sustituido que tiene la fórmula:



3. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde X es NR²²R²³ y R⁵, R⁶ y R²² y R²³, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, se fusionan con el anillo de 6 miembros insaturado al que NR²²R²³, R⁵ y R⁶ están unidos, formando un sistema de anillo sustituido o no sustituido que tiene la fórmula:



20 4. El colorante de xanteno de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde R¹² comprende una unidad estructural que tiene la fórmula:

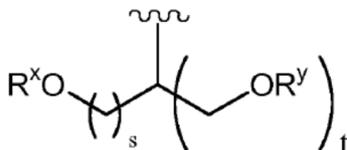


en donde

25 L¹, L² y L³ son miembros seleccionados independientemente de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido;

y t es 0 o 1.

5. El colorante de xanteno acuerdo con la reivindicación 4, teniendo dicha unidad estructural la fórmula:



en donde

- 5 R^x y R^y son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, un grupo protector de hidroxilo, una unidad estructural fosfato, una unidad estructural fosfodiéster, un puente internucleotídico que contiene fósforo de un ácido nucleico, un soporte sólido, una molécula portadora y -P(OR^o)(N(R^pR^q))

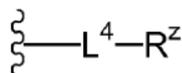
en donde

- 10 R^o, R^p y R^q son miembros seleccionados independientemente de H, C₁-C₆ alquilo sustituido o no sustituido y C₁-C₆ heteroalquilo sustituido o no sustituido; y

s es un entero de 1 a 20.

6. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 5, en donde R^o es CH₂CH₂CN.

- 15 7. El colorante de xanteno acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde al menos uno de R^x y R^y comprende una unidad estructural que tiene la fórmula:

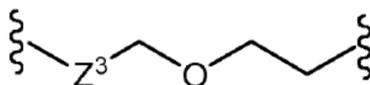


en donde

L⁴ es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido; y

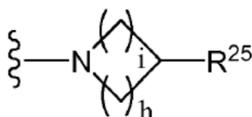
- 20 R^z es un miembro seleccionado de un grupo funcional reactivo, soporte sólido, un ácido nucleico, un sacárido y un péptido.

8. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 7, en donde L⁴ comprende una unidad estructural que tiene la fórmula:



- 25 en donde Z³ es un miembro seleccionado de CH₂ y C=O.

9. El colorante de xantano de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en donde NR¹²R¹³ tiene la fórmula:



en donde

h e i son miembros seleccionados independientemente de enteros de tal manera que la suma (h + i) es 4-8; y

R²⁵ comprende un grupo funcional reactivo que contiene oxígeno.

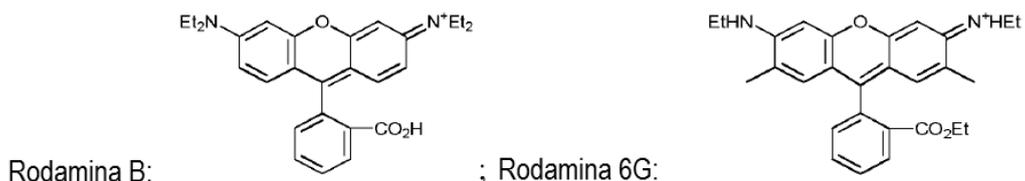
10. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 9, en donde R²⁵ comprende una fosoramidita.

11. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde h es 2 e i es 2.

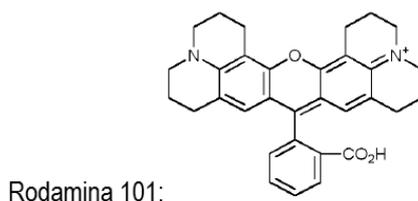
5 12. El colorante de xanteno de cualquier reivindicación precedente en donde dicho R¹² y R¹³ comprenden un grupo reactivo que contiene oxígeno.

13. El colorante de xanteno de la reivindicación 12 en donde dicho R¹² y R¹³ comprenden además una molécula portadora o soporte sólido conjugado a través de una unidad estructural producida por la reacción del grupo reactivo que contiene oxígeno con un grupo reactivo en la molécula portadora o soporte sólido de reactividad complementaria.

10 14. El colorante de xanteno de cualquier reivindicación precedente, en donde el colorante de xanteno se prepara a partir de



o



15 15. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha molécula portadora comprende además una unidad estructural de detención.

16. El colorante de xanteno acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho colorante de xanteno y dicho detenedor comprenden un par de transferencia de energía donante-aceptor.

20 17. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho detenedor sustancialmente no tiene fluorescencia nativa.

18. El colorante de xanteno acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho detenedor comprende al menos tres residuos seleccionados de arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido y combinaciones de los mismos, en donde al menos dos de dichos residuos están enlazados covalentemente a través de un enlace diazo exocíclico.

25 19. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho colorante de xanteno está unido a un ácido nucleico en una posición que es un miembro seleccionado del terminal en 3', el terminal en 5', una nucleobase, y un puente internucleotídico que contiene fósforo de dicho ácido nucleico.

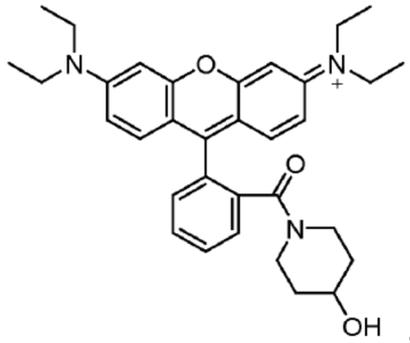
20. El colorante de xanteno acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicho ácido nucleico es una sonda que es un miembro seleccionado de balizas moleculares, sondas scorpion, sondas sunrise, sondas conformacionalmente asistidas y sondas TaqMan™.

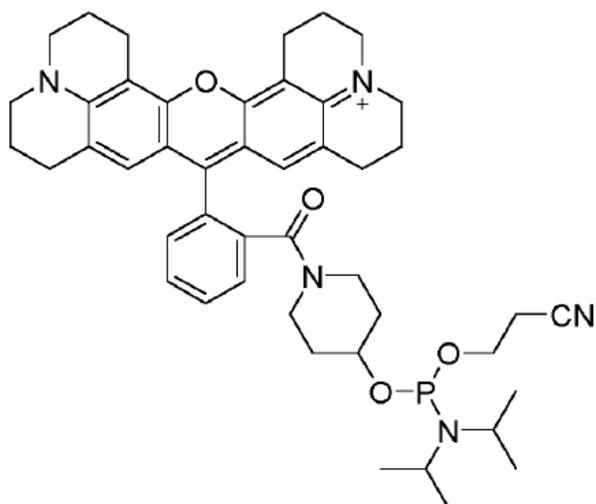
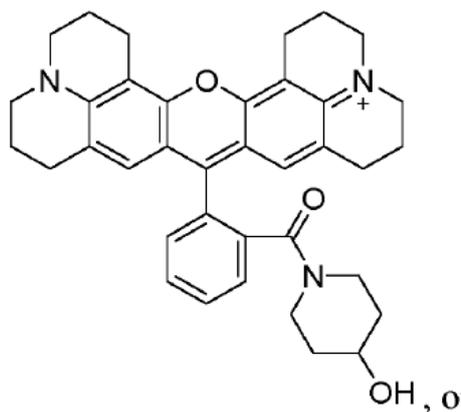
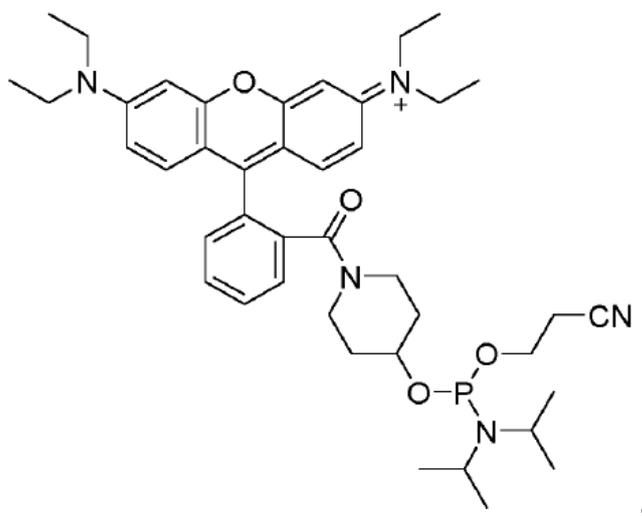
5 21. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha molécula portadora es un péptido que comprende un sitio de reconocimiento de escisión para una enzima.

22. El colorante de xanteno acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho péptido comprende un sitio de reconocimiento de escisión para una proteasa.

10 23. El colorante de xanteno acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho sitio de reconocimiento de escisión es para una enzima seleccionada de tripsina, enteroquinasa, proteasa de VIH-1, prohormona convertasa, enzima convertidora de interleucina-1b, endopeptidasa de adenovirus, assemblina de citomegalovirus, leishmanolisina, β-secretasa para proteína precursora amiloide, trombina, renina, enzima convertidora de la angiotensina, catepsina-D y una quininogenasa.

24. El colorante de xanteno de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:





25. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X es $\text{NR}^{22}\text{R}^{23}$, en donde R^{22} y R^{23} son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

5 26. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos uno de R^8 , R^9 , R^{10} y R^{11} es un halógeno.

27. El colorante de xanteno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R⁹ y R¹⁰ son halógeno.
28. Un método para determinar si una muestra contiene una enzima, comprendiendo dicho método:
- (a) poner en contacto dicha muestra con un constructo peptídico que comprende
- 5 i) un colorante de xanteno, de acuerdo con la reivindicación 1;
- ii) un detenedor; y
- iii) un sitio de reconocimiento de escisión para dicha enzima,
- en donde dicho péptido está en una conformación que permite la transferencia de energía donante-aceptor entre dicho fluoróforo y dicho detenedor cuando dicho fluoróforo es excitado;
- (b) excitar dicho colorante de xanteno; y
- 10 (c) determinar una propiedad de fluorescencia de dicha muestra, en donde la presencia de dicha enzima en dicha muestra da como resultado un cambio en dicha propiedad de fluorescencia.
29. Un método para determinar si un compuesto altera una actividad de una enzima, comprendiendo dicho método:
- (a) poner en contacto una muestra que comprende dicha enzima y dicho compuesto con un constructo peptídico que comprende
- 15 i) un colorante de xanteno, de acuerdo con la reivindicación 1;
- ii) un detenedor; y
- iii) un sitio de reconocimiento de escisión para dicha enzima,
- en donde dicho péptido está en una conformación que permite la transferencia de energía donante-aceptor entre dicho colorante de xanteno y dicho detenedor cuando dicho colorante de xanteno es excitado;
- 20 (b) excitar dicho colorante de xanteno; y
- (c) determinar una propiedad de la fluorescencia de dicha muestra, en donde dicha actividad de dicha enzima en dicha muestra da como resultado un cambio en dicha propiedad de fluorescencia.
30. Un método para detectar una secuencia objetivo de ácido nucleico, comprendiendo dicho método:
- (a) poner en contacto dicha secuencia objetivo con un oligonucleótido detector que comprende una secuencia de
- 25 enlazamiento al objetivo, teniendo dicho oligonucleótido detector enlazado a éste,
- i) un colorante de xanteno, de acuerdo con la reivindicación 1; y
- ii) un detenedor,
- en donde dicho detector de ácido nucleico está en una conformación que permite la transferencia de energía donante-aceptor entre dicho colorante de xanteno y dicho detenedor cuando dicho colorante de xanteno es excitado;
- 30 (b) hibridar dicha secuencia de enlazamiento al objetivo a dicha secuencia objetivo de cadena sencilla, alterando de ese modo dicha conformación de dicho oligonucleótido de detección, provocando un cambio en un parámetro de fluorescencia; y
- (C) detectar dicho cambio en dicho parámetro de fluorescencia, detectando de este modo dicha secuencia objetivo de ácido nucleico.
- 35 31. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde una cadena complementaria se sintetiza en una reacción de amplificación objetivo.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde una cadena complementaria se sintetiza por extensión de la secuencia objetivo usando dicho oligonucleótido de detección como una plantilla.
33. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde dicho parámetro de fluorescencia se detecta en tiempo real.
- 5 34. Un método para detectar la amplificación de una secuencia objetivo que comprende, en una reacción de amplificación:
- (a) hibridar a dicha secuencia objetivo un oligonucleótido detector que comprende una secuencia de enlazamiento al objetivo de cadena sencilla y una estructura secundaria en 5' asociada intramolecularmente a dicha secuencia de enlazamiento al objetivo, en donde al menos una porción de dicha secuencia detectora es una cola de cadena sencilla que está disponible para la hibridación con dicha secuencia objetivo, estando enlazado dicho oligonucleótido detector a éste,
- 10 i) un colorante de xanteno, de acuerdo con la reivindicación 1; y
- ii) un detenedor,
- en donde dicho ácido nucleico detector está en una conformación que permite la transferencia de energía donante-aceptor entre dicho colorante de xanteno y dicho detenedor cuando dicho colorante de xanteno es excitado;
- 15 (b) extender dicho oligonucleótido de detección hibridado en dicha secuencia objetivo con una polimerasa para producir un producto de extensión del oligonucleótido de detección y separar dicho producto de extensión del oligonucleótido de detección de dicha secuencia objetivo;
- (c) hibridar un cebador a dicho producto de extensión del oligonucleótido de detección y extender el cebador con dicha polimerasa, linealizando de ese modo dicha estructura secundaria intramolecularmente asociada y producir un cambio en un parámetro de fluorescencia; y
- 20 (d) detectar dicho cambio en dicho parámetro de fluorescencia, detectando de este modo dicha secuencia objetivo.
35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicha secuencia objetivo se amplifica mediante un método seleccionado de Amplificación por Desplazamiento de Cadena, reacción en Cadena de polimerasa, Replicación de Secuencia Autosostenida, Amplificación mediada por Transcripción, y Amplificación Basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos.
- 25 36. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicha estructura secundaria comprende además un sitio de endonucleasa de restricción de cadena sencilla parcial o totalmente.
37. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde se detecta un cambio en la intensidad de fluorescencia.
- 30 38. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicho cambio en el parámetro de fluorescencia se detecta en tiempo real.
39. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicha estructura secundaria intramolecularmente asociada comprende una porción de dicha secuencia de enlazamiento al objetivo.
40. Un método de preparación de un conjugado entre un ácido nucleico y un colorante de xanteno, de acuerdo con la reivindicación 1
- 35 con la condición de que al menos uno de R¹² o R¹³ comprende dicho ácido nucleico, comprendiendo dicho método:
- (a) poner en contacto un precursor de dicho conjugado que comprende grupos protectores de ácido nucleico con una mezcla de amina y alcohol, eliminando por lo tanto dichos grupos protectores.

FIG. 1A

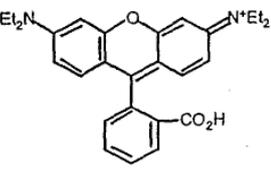
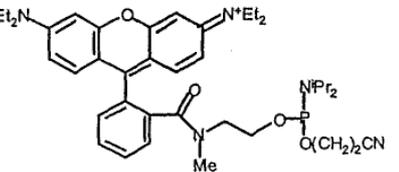
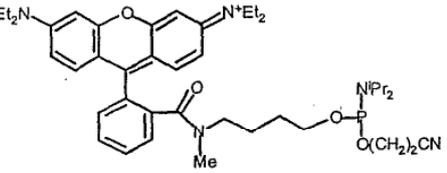
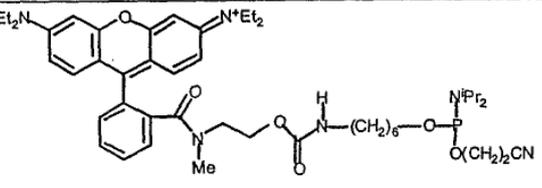
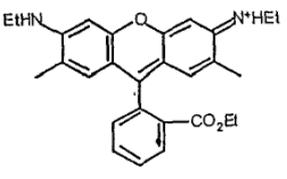
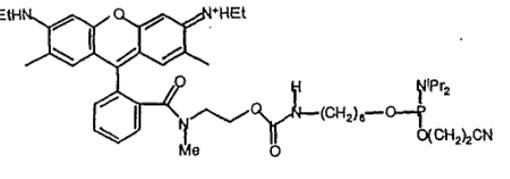
Colorante de Xanteno Original	Reactivo de síntesis de ADN
<p>Rodamina B</p> 	
	
	
<p>Rodamina 6G</p> 	

FIG. 1B

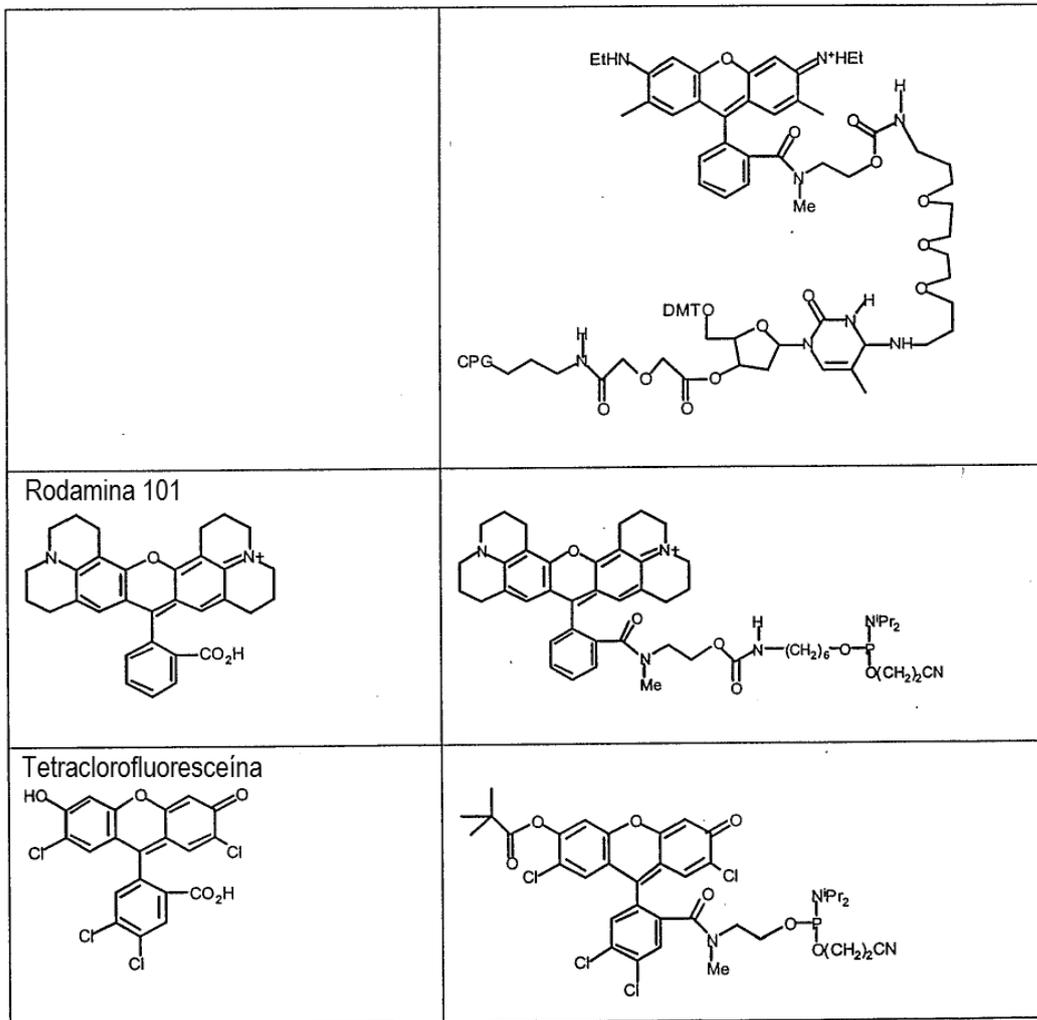


FIG. 2

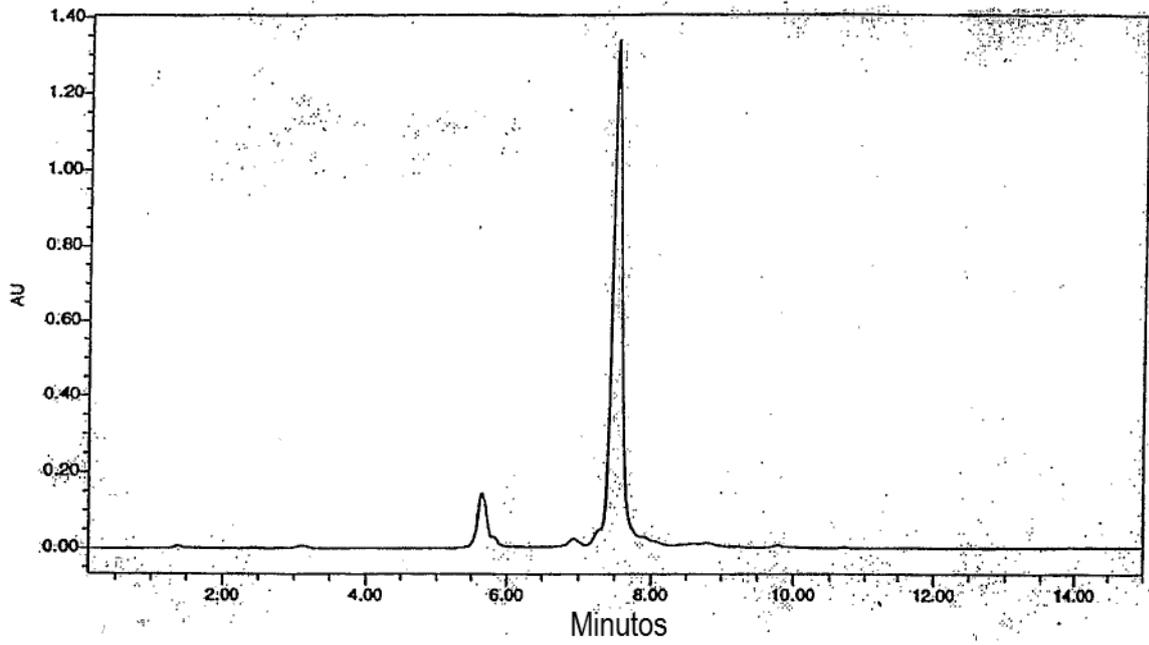


FIG. 3

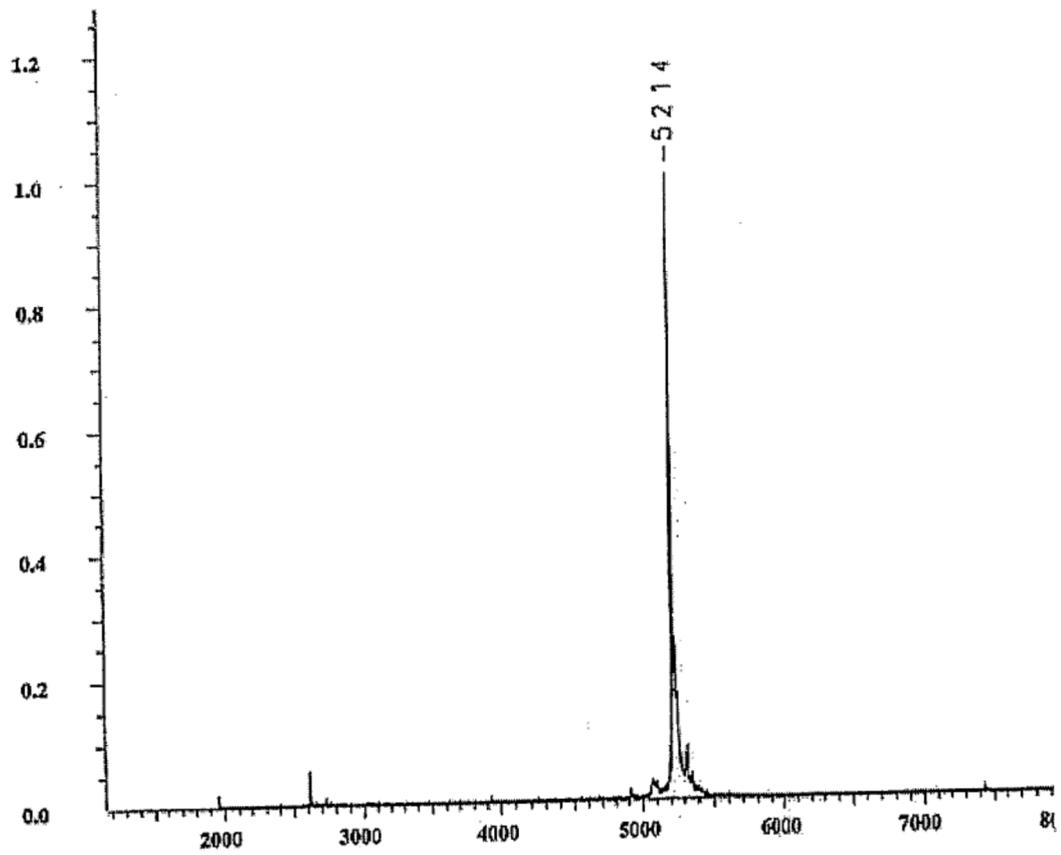


FIG. 4

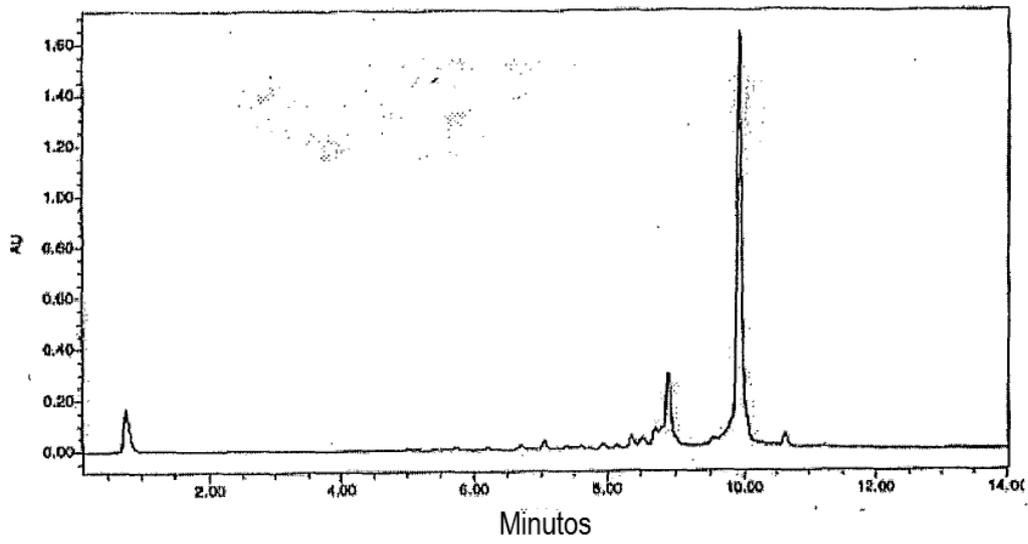


FIG. 5

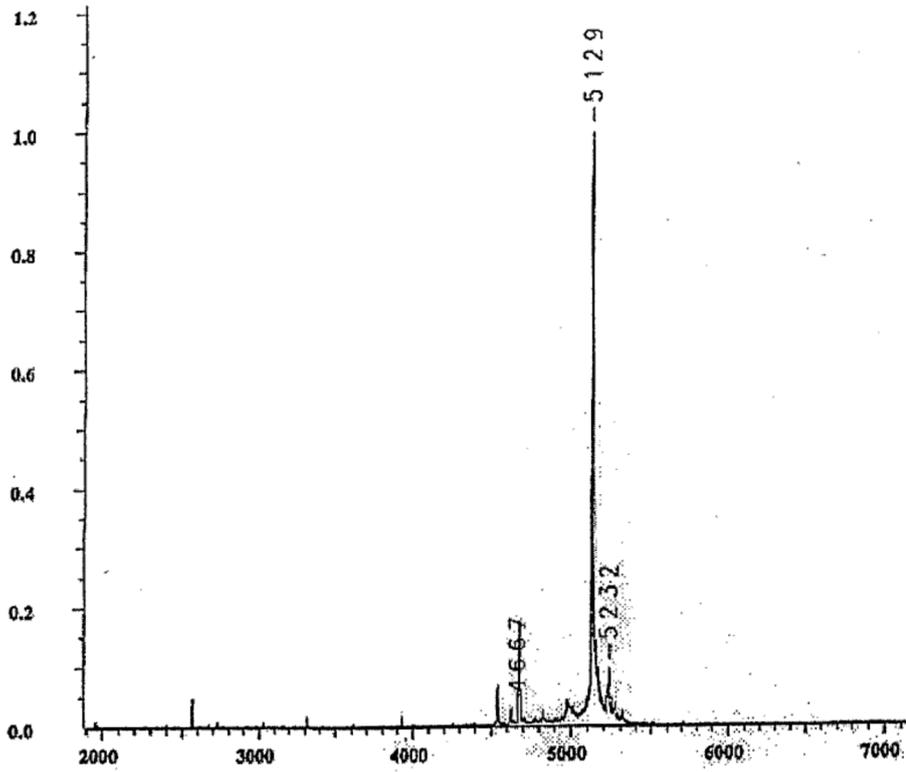


FIG. 6

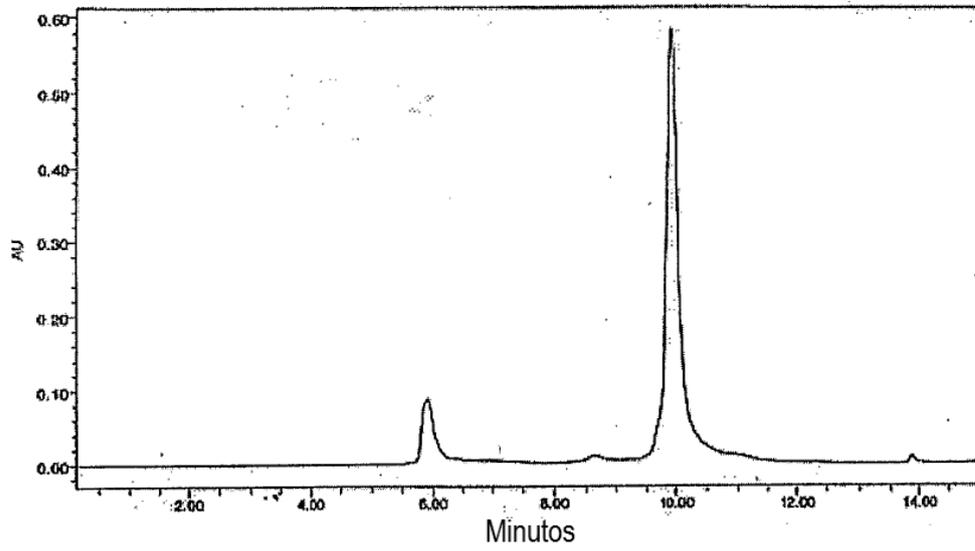


FIG. 7

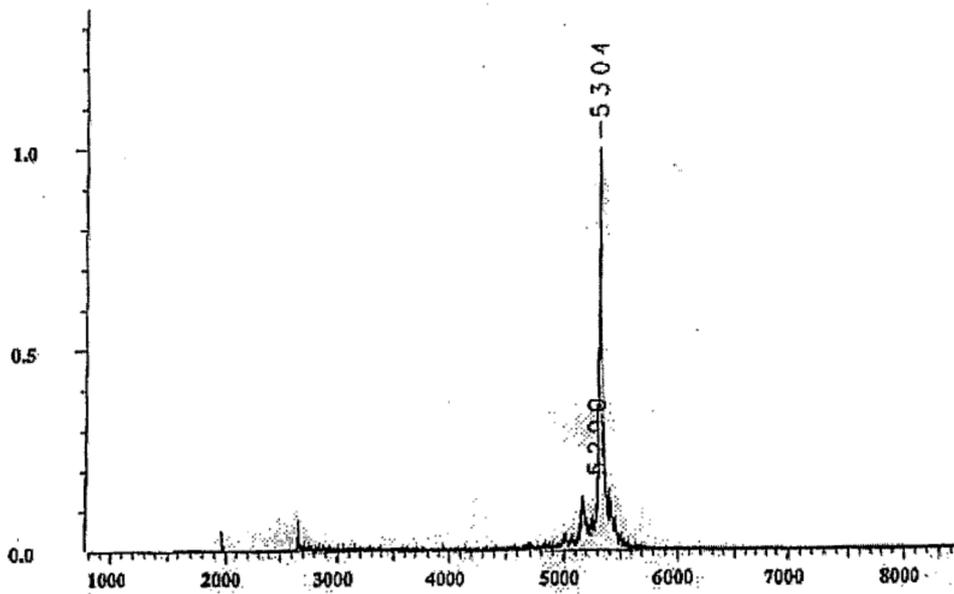


FIG. 8

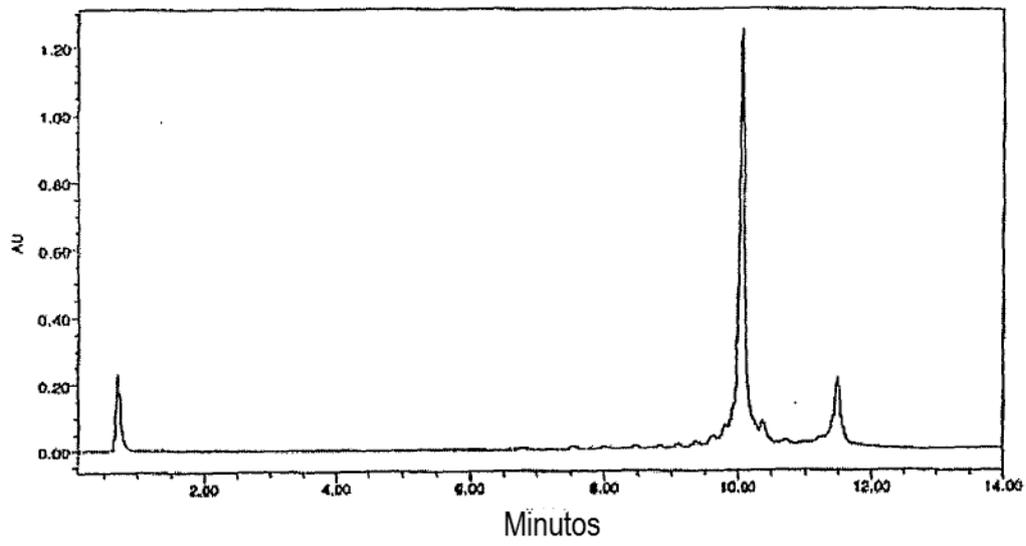


FIG. 9

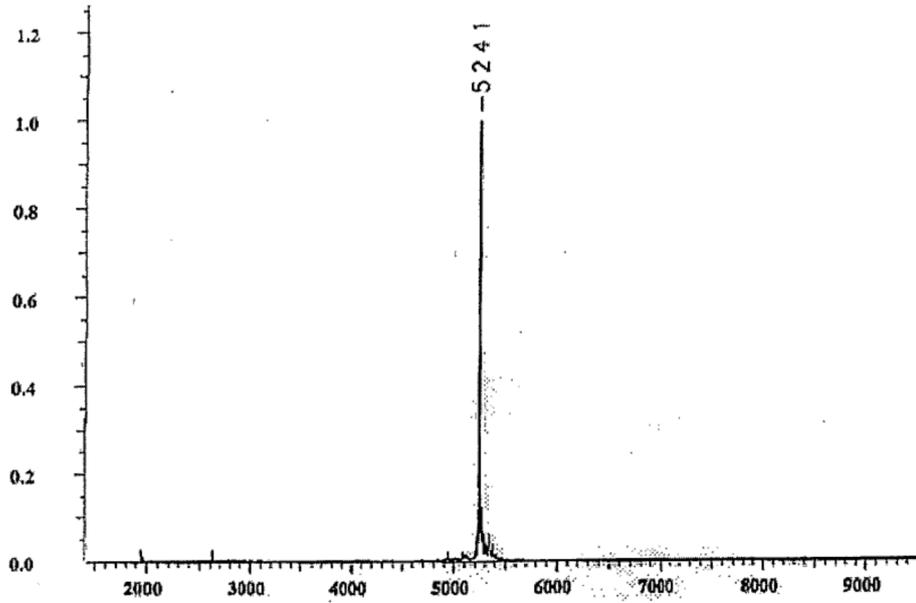


FIG. 10

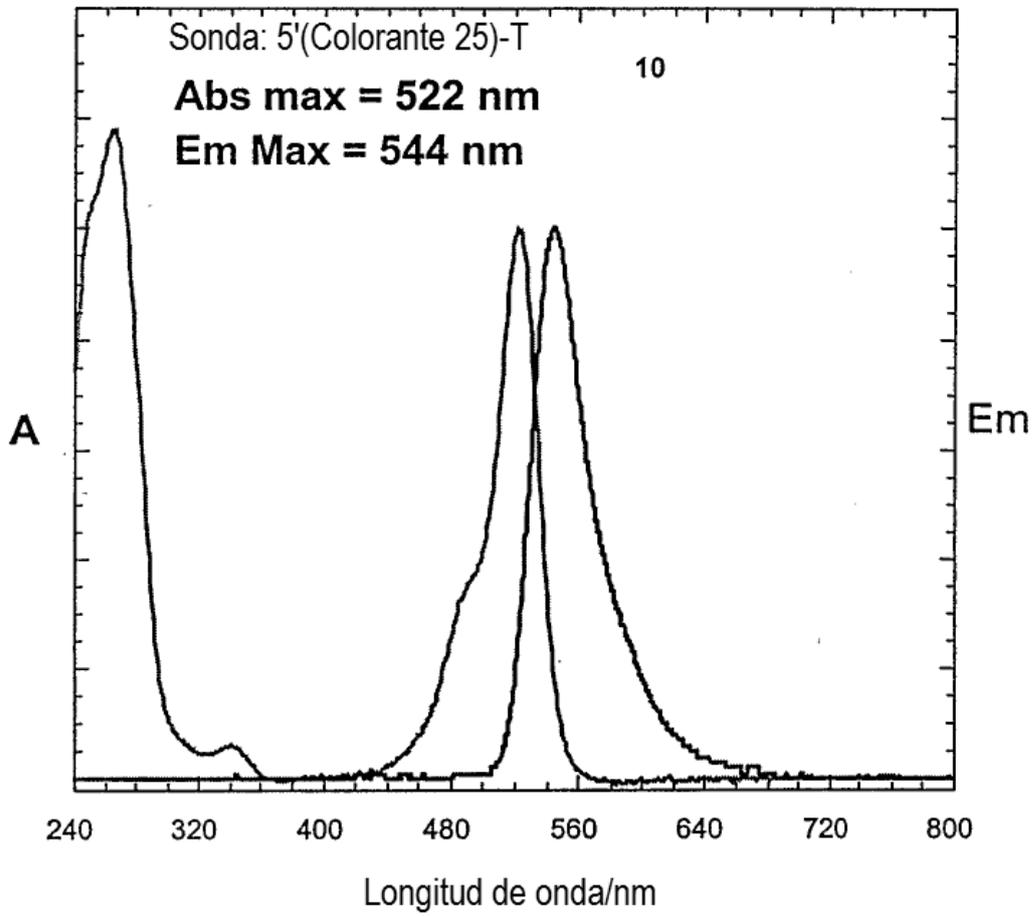


FIG. 11

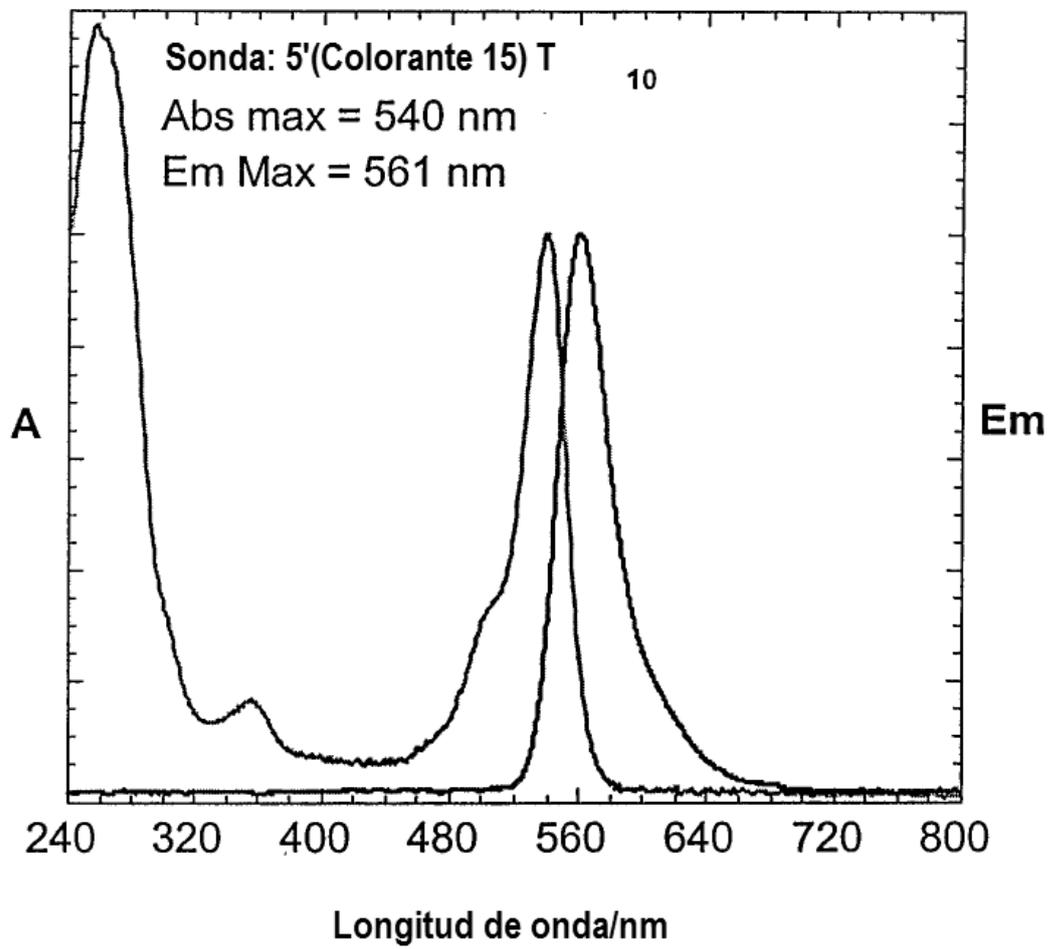


FIG. 12

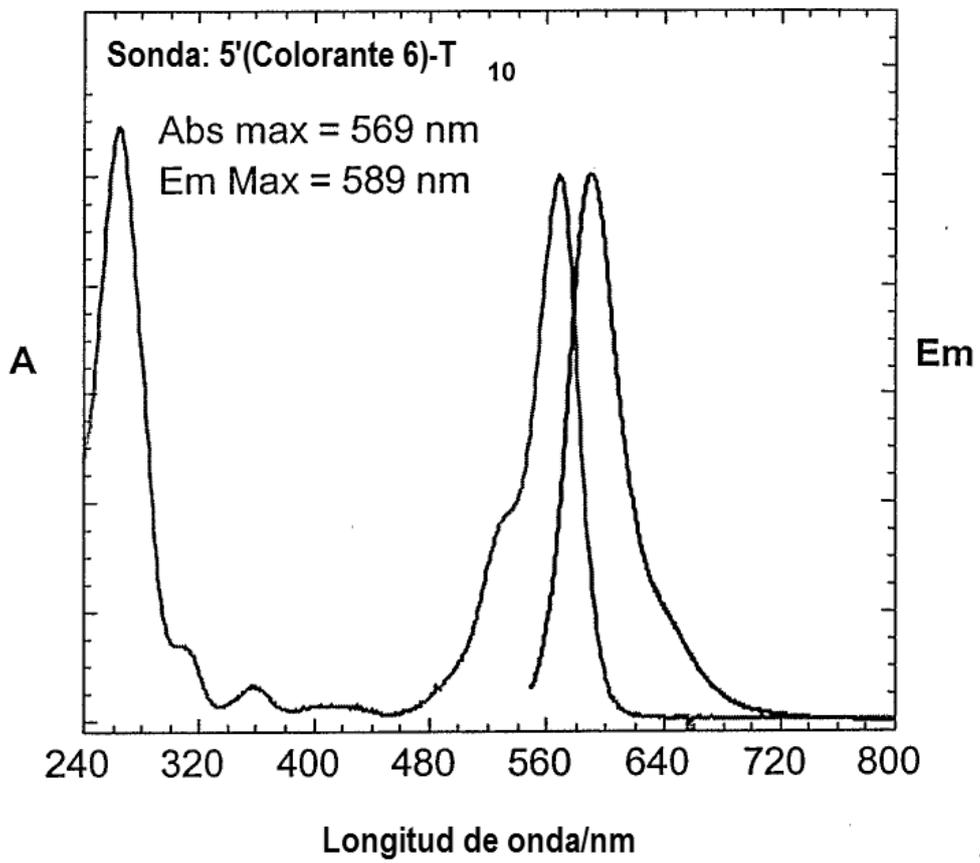


FIG. 13

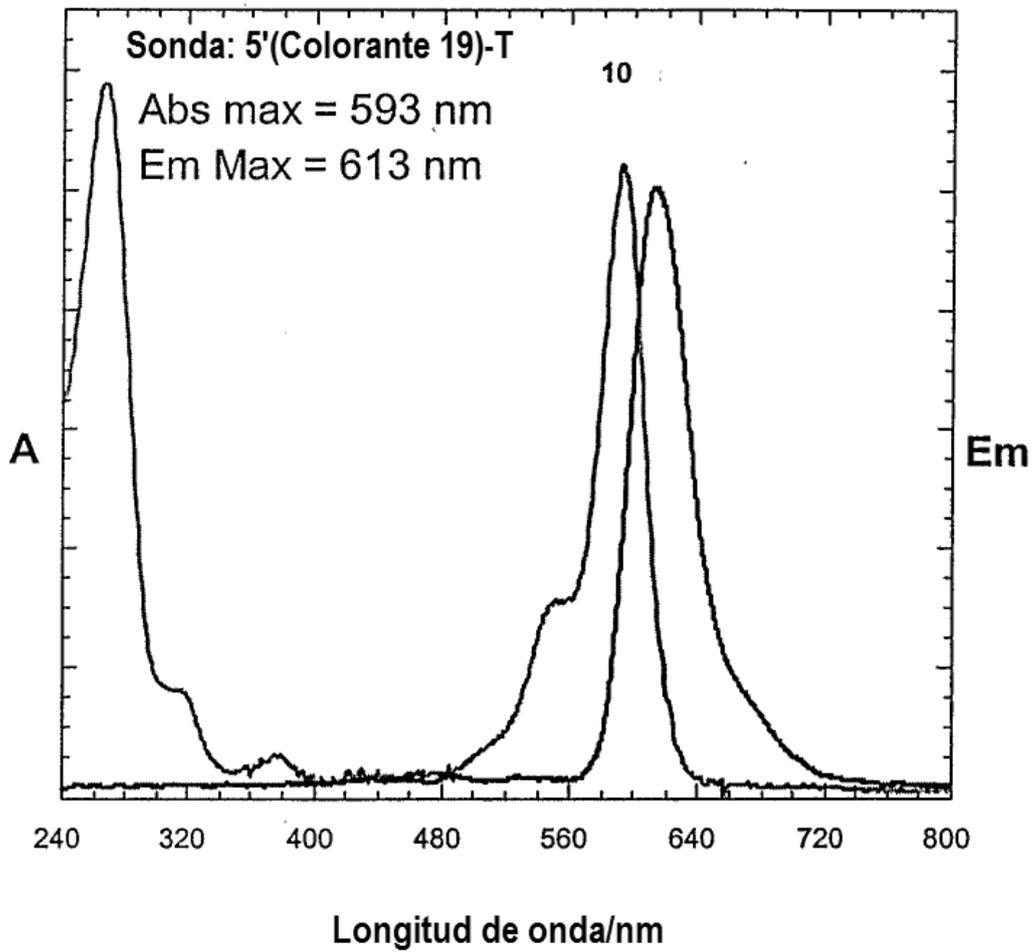


FIG. 14

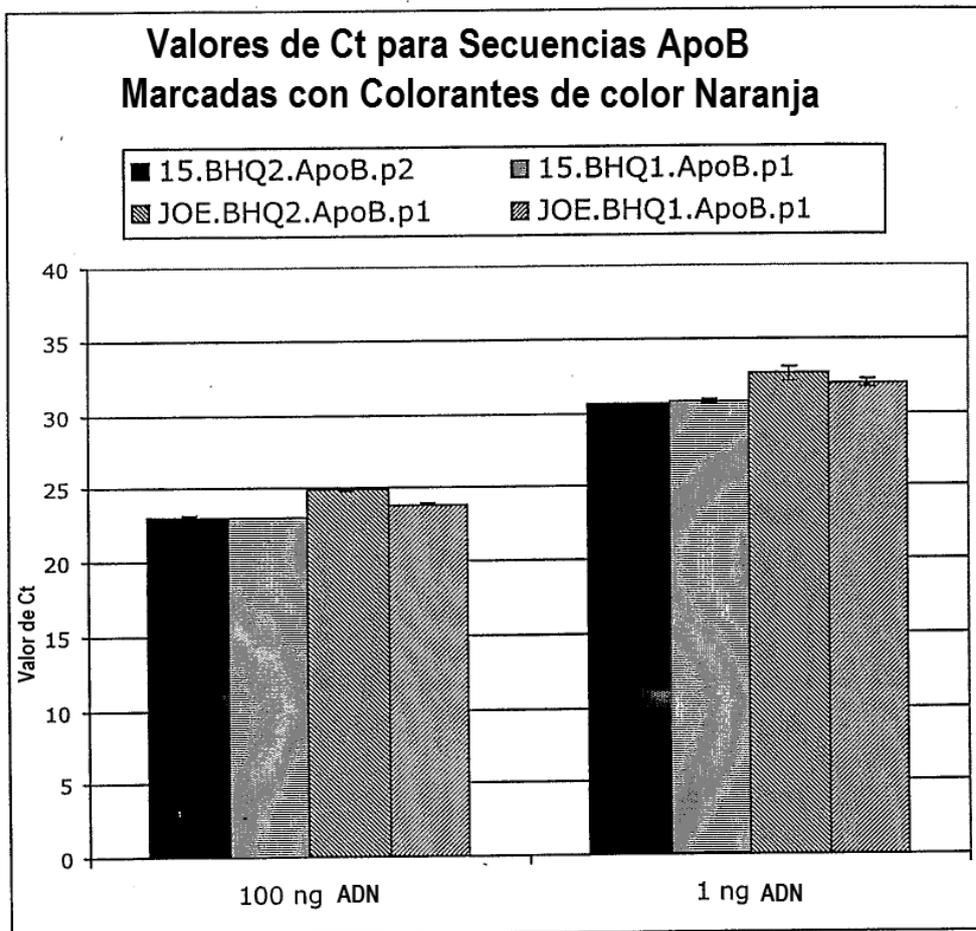


FIG. 15

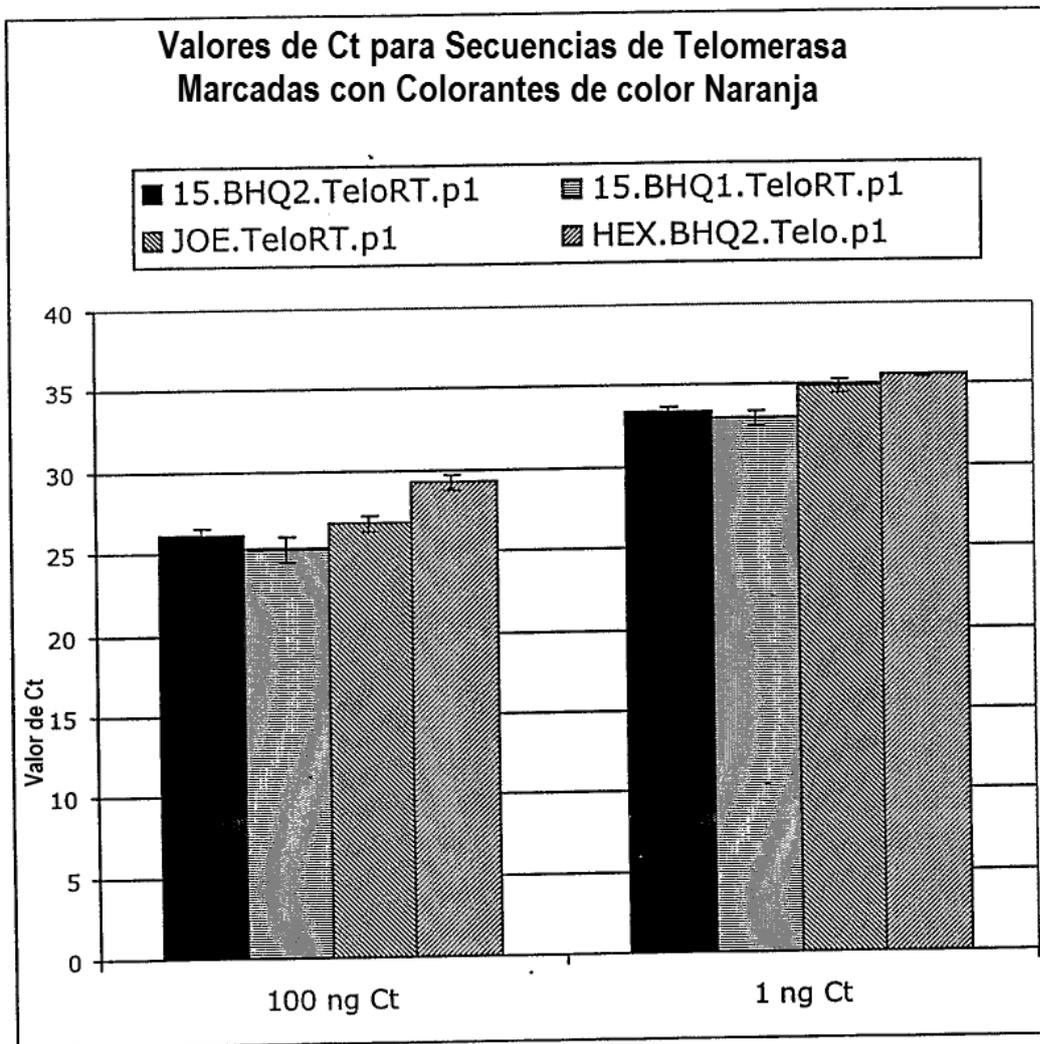


FIG. 16

