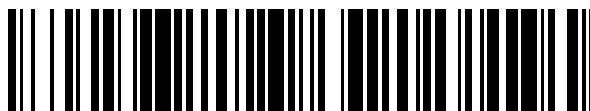


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 652**

51 Int. Cl.:

**C07D 213/24** (2006.01)

**C07D 233/32** (2006.01)

**C07D 333/24** (2006.01)

**C07D 495/04** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2009 PCT/FR2009/051511**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2010 WO10012949**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2009 E 09740395 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2307369**

54 Título: **Reactivos de marcaje que tienen un núcleo piridina que tiene una función diazometilo, procedimientos de síntesis de tales reactivos y procedimientos de detección de moléculas biológicas**

30 Prioridad:  
**29.07.2008 FR 0855190**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.11.2018**

73 Titular/es:  
**BIOMÉRIEUX (33.3%)  
Chemin de l'Orme  
69280 Marcy L'etoile, FR;  
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%) y  
CNRS (33.3%)**

72 Inventor/es:  
**LAURENT, ALAIN;  
LAAYOUN, ALI y  
KOTERA, MITSUHARA**

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 690 652 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

Reactivos de marcaje que tienen un núcleo piridina que tiene una función diazometilo, procedimientos de síntesis de tales reactivos y procedimientos de detección de moléculas biológicas

5 La presente invención se refiere a nuevos reactivos de marcaje de moléculas biológicas, a un procedimiento de síntesis de dichos marcadores, así como a aplicaciones para el marcaje de moléculas biológicas, en particular en el campo del diagnóstico molecular que utiliza la detección y el análisis de los ácidos nucleicos.

10 El estado de la técnica muestra que existen numerosos métodos para marcar los nucleótidos, los oligonucleótidos o los ácidos nucleicos naturales o amplificados.

15 Un primer método consiste en fijar el marcador sobre la base, ya sea natural o modificada. Un segundo método propone fijar el marcador sobre el azúcar, ya sea también natural o modificado. Un tercer método tiene como objetivo la fijación del marcador sobre el fosfato.

El marcaje sobre la base se ha utilizado en particular en el enfoque de marcaje de los ácidos nucleicos por incorporación de nucleótidos directamente marcados.

20 El marcaje sobre el azúcar se utiliza frecuentemente en el caso de sondas nucleicas preparadas por síntesis química.

El marcaje sobre fosfato se ha utilizado también para introducir brazos funcionalizados y marcadores durante la síntesis química de los oligonucleótidos.

25 En realidad, el experto en la materia, que debe efectuar un marcaje de un nucleótido o de un análogo de nucleótido o de un ácido nucleico, es propenso a efectuar esta fijación sobre la base o sobre el azúcar que le ofrecen más comodidad y alternativas. Es de hecho lo que destaca del estudio de numerosos documentos, tales como EP-A-0.329.198, EP-A-0.302.175, EP-A-0.097.373, EP-A-0.063.879, US-A-5,449,767, US-A-5,328,824, WO-A-93/16094, DE-A-3.910.151, EP-A-0.567.841 para la base o EP-A-0.286.898 para el azúcar.

30 La fijación del marcador sobre el fosfato es una técnica más compleja que la técnica que consiste en funcionalizar la base o el azúcar y se ha utilizado mucho menos, en particular debido a la baja reactividad del fosfato (véase por ejemplo Jencks W.P. *et al.* J. Amer. Chem. Soc., 82, 1778-1785, 1960). También en la revista de O' Donnel y Mc Laughlin ("Reporter groups for the analysis of nucleic acid structure", p. 216-243, en "Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids", Ed. Hecht S.M., Oxford University Press, 1996), que se refiere a los métodos de introducción de sondas en los fragmentos de oligonucleótidos, la alquilación eficaz del fosfodiéster internucleotídico se considera como imposible.

40 La solicitud de patente WO-A-99/65926 describe un procedimiento de marcaje de un ácido ribonucleico (ARN) de síntesis o natural que consiste en fragmentar el ARN y en marcar a nivel del fosfato terminal. Este documento describe un cierto número de funciones que se pueden utilizar para el marcaje en relación con la fragmentación, como las funciones hidroxilo, amina, hidrazina, alcoxiamina, halogenuro de alquilo, halogenuro de alquilo de tipo bencílico y en particular el derivado 5-(bromoetil)fluoresceína. Estas funciones permiten marcar los ácidos nucleicos, pero se necesita la asociación de una etapa de fragmentación para obtener un marcaje eficaz, ya que este marcaje se produce sobre el fosfato liberado durante la fragmentación. Además, se necesita añadir un exceso importante de reactivo de marcaje con respecto al ARN para obtener un marcaje eficaz, lo que induce a problemas de ruido de fondo, durante la detección, generados por el marcador en exceso. Finalmente, este método no funciona eficazmente sobre ADN bicatenario.

50 Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos reactivos que sean eficaces desde el punto de vista del rendimiento de marcaje, que sean específicos a nivel de la posición de marcaje y en particular que no afecten a las propiedades de hibridación de las bases implicadas en la formación de la doble hélice, por medio de uniones hidrogénicas, que sean utilizables al mismo tiempo para el ADN y el ARN, y finalmente que permitan marcar indiferentemente nucleótidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos naturales o preparados por transcripción, por transcripción inversa o por amplificación enzimática.

60 La solicitante ha propuesto ya tales nuevos marcadores que responden a las condiciones antes citadas y que utilizan la función diazometilo como función reactiva para el marcaje. Este es por ejemplo el caso en las solicitudes de patente WO-A-02/090319, WO-A-02/090584 y WO-A-2005/092910.

65 Así, la función diazometilo (de fórmula  $-C(N_2)-$ ) ya se ha utilizado para la alquilación de grupos fosfatos, pero se plantea un cierto número de problemas. Por un lado, los reactivos que incorporan al menos una función diazo en general son inestables por sí mismos, lo que plantea problemas para la utilización de estos reactivos en un kit de marcaje, lo que es inaceptable si el producto marcado tiene como función la demostración de la presencia de una molécula diana biológica en una muestra cualquiera.

Finalmente, los reactivos que tienen la función diazometilo, llevada por un núcleo aromático de tipo fenilo, para asegurar su estabilidad, se asocian a ciertos marcadores, tales como biotina. La presencia del núcleo aromático y la naturaleza del marcador hacen estos reactivos poco solubles en agua, lo que lleva a utilizar unos disolventes orgánicos que son miscibles en agua para el acoplamiento con unas moléculas biológicas, que son solubles solamente en agua o en tampones acuosos. Pero estos disolventes, si se utilizan en una concentración demasiado elevada en la reacción de marcaje, tienen el riesgo de provocar la precipitación de las biomoléculas. Además, para la automatización de los protocolos de marcaje en dispositivos integrados, es indispensable liofilizar los reactivos de marcaje en los tampones que no contienen disolventes orgánicos. Estos últimos no son compatibles con la liofilización. Conviene por lo tanto poder disponer de reactivos de marcaje suficientemente solubles y estables en los medios acuosos.

Los reactivos de marcaje recomendados por los documentos WO-A-02/090319, WO-A-02/090584 (moléculas de primera generación) y WO-A-2005/092910 (moléculas de segunda generación) antes mencionados resuelven también estos problemas técnicos.

Estas moléculas tienen por lo tanto los inconvenientes siguientes:

- inestables químicamente, ya que debe estar en seco o solución a 4°C,
- síntesis relativamente compleja, y
- poco solubles en una solución acuosa.

A pesar de estos inconvenientes, estas moléculas son particularmente interesantes y atractivas para el experto en la materia. No obstante, es posible mejorar sus características químicas o físicas, es lo que ha prevalecido durante la elaboración de las moléculas de tercera generación expuestas en el documento WO-A-2009/001017, en el que las moléculas son al mismo tiempo más estables y más fáciles de sintetizar.

Este comienzo de solución ha permitido hacer frente al problema de la estabilidad de las moléculas de primera y de segunda generación, sin embargo, su solubilidad es un poco peor que la de las moléculas de segunda generación (0,3 mM en un 100% de agua). Sin embargo, la solicitante sigue hoy en día en esta vía con la descripción de un nuevo tipo de moléculas mucho más solubles que las moléculas de tercera generación (solubilidad comprendida entre 2 y 28 mM en un 100% de agua) y de una estabilidad igual o superior a las moléculas ya descritas en nuestras anteriores invenciones.

Estos cuatro documentos, antes expuestos, presentan las tres generaciones de moléculas anteriores, que tienen todas por base la presencia de una función diazometilo en las proximidades de un anillo. Se invita el lector a consultar estos cuatro documentos para cualquier explicación complementaria que podría, por omisión involuntaria, faltar en el texto que expone la presente invención.

Para ello, la nueva invención propone introducir un núcleo piridina en *alfa* de la función diazometilo, estando el grupo de reconocimiento o bien en *alfa'*, o bien sobre el ciclo piridinilo (véase la figura 2, molécula 10 o molécula 19). Las moléculas de cuarta generación proponen el mejor perfil que combina estabilidad y solubilidad.

Esto aporta a la molécula:

1) una estabilidad química superior o igual a los Nitro DCB, en forma seca a 4°C o en solución a temperatura ambiente. Esta característica proviene del efecto atrayente de electrones del núcleo piridina que estabiliza la función diazo de manera significativa, como lo hacía el grupo nitro arilo de las moléculas de tercera generación.

2) una solubilidad mucho mayor gracias a la presencia de un átomo de nitrógeno sobre el núcleo piridina.

3) una reactividad sobre los ácidos nucleicos superior a los métodos de marcaje comerciales de los ácidos nucleicos.

La presente invención es una mejora consecuente de las moléculas existentes. En efecto, las moléculas de primera y de segunda generación tienen los inconvenientes de ser inestables químicamente, incluso si este punto ya se ha mejorado con respecto a lo que existía antes. Así, el marcaje sigue siendo eficaz ya que los resultados obtenidos son muy buenos después de un almacenamiento a +4°C durante un año. Además, su síntesis sigue siendo relativamente compleja. Las moléculas de tercera generación son mucho más estables y más eficaces de sintetizar, lo que presenta unas ventajas considerables en términos de fecha de caducidad de los kits que contienen estas moléculas y de industrialización de las síntesis.

Las moléculas de primera y de segunda generación son estables funcionalmente en un año si se conservan a baja temperatura en disolvente orgánico anhidro. Las moléculas de tercera generación son mucho más estables funcional

y químicamente, ya sea en medio líquido o en forma seca. Son por lo tanto manipulables en medio acuoso después de ser conservadas en seco, por secado o liofilización por ejemplo, sobre un tiempo mucho más largo (entre 10 y 100 veces más largo), lo que no es el caso de las moléculas de primera o de segunda generación que son inestables durante la etapa de liofilización.

5 Esta valorización industrial de las moléculas de tercera generación es particularmente importante en dispositivos integrados o microsistemas, en los que la química integrada debe ser eficaz y sólida sin tener que incriminar en caso de problema la estabilidad de algunos reactivos.

10 Finalmente, dichas moléculas de primera y segunda generación son poco solubles en una solución acuosa, lo que es molesto para el usuario que debe, antes de iniciar una reacción, solubilizar bien estas moléculas.

15 Sin embargo, incluso aunque estas moléculas y procedimientos de marcaje son eficaces, la solicitante ha conseguido encontrar con su tercera generación, nuevas moléculas, y numerosos procedimientos de marcaje de tales moléculas que mejoran todavía más la eficacia del marcaje, que aporta una solución al problema de la estabilidad de las moléculas de primera y segunda generación.

20 Sin embargo, sea cual sea la generación, de la una a la tres, de estas moléculas, otro problema reside en la falta de solubilidad de estas. Así, se han asociado dos nuevas funcionalidades moleculares para crear estos nuevos reactivos. Se definen de la siguiente manera:

\* la función diazometilo posee en *alfa* un anillo piridina, que puede sustituirse el mismo una o más veces con uno o más grupos en la posición *meta*, *para* u *orto*.

25 \* la función diazo puede:

- al igual que las moléculas de tercera generación, poseer en *alfa'* el grupo que permite la detección; este grupo puede ser la biotina o cualquier otro grupo detectable.

30 - no ser portadora del grupo detectable que, como las moléculas de primera y de segunda generación, es llevado por el anillo, es decir el anillo piridina, en el presente caso.

35 Cabe señalar que las moléculas de cuarta generación son tan estables y reactivas como las moléculas de tercera generación, pero que su solubilidad se mejora debido a la presencia de un núcleo piridina que estabiliza también la función diazometilo debido a su efecto atrayente.

40 Las definiciones de "estructura mutlimérica", "marcador detectable", sistemas indirectos", "fluoróforos" y otros marcadores de interés, "conjugación", "molécula biológica", "ácido nucleico", "técnica de amplificación enzimática", "solución sustancialmente acuosa", "solución homogénea", "soporte sólido", "etapa de purificación", se dan en la solicitud de patente WO-A-2005/092910, se invita el lector a consultarlo en caso de necesidad.

Asimismo, las técnicas de:

45 \* la química de injerto, y

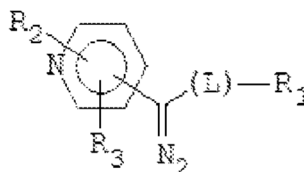
\* la introducción de fosfato en el extremo 3' o 5' de los ácidos nucleicos,

50 se describen también en esta solicitud de patente anterior, y el lector puede encontrar en este documento todas las informaciones necesarias para la completa comprensión de la presente invención.

55 Además, la función diazometilo llevada por estas moléculas de tercera generación, al igual que las moléculas de primera y segunda generación, permite injertar de manera covalente los ácidos nucleicos sobre el soporte. El injerto es simple, el enlace es estable, con respecto a la adsorción en particular, y permite realizar un acoplamiento del ácido nucleico sobre el soporte sólido, lo que facilitan aún más las etapas de hibridación posteriores disminuyendo el volumen estérico.

60 Esta nueva familia de moléculas, denominada cuarta generación, se denomina Piridina Diazo Cetona Biotina (PyDCB) o Piridina Diazo Biotina (PyDB) y está representada por el reactivo de marcaje relativamente estable a la temperatura respectivamente de fórmula (C) para la PyDCB y de fórmula (D) para la PyBD (véase a continuación).

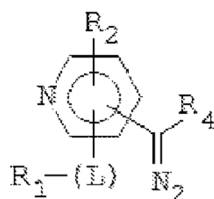
Según un primer modo de realización, la presente invención propone un reactivo de marcaje de fórmula (C):



en la que:

- 5 \* R1 representa un marcador detectable capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable y seleccionado entre:
- las enzimas que producen una señal por colorimetría, fluorescencia o luminiscencia,
  - 10 - los cromóforos,
  - los grupos de densidad electrónica detectable por microscopia electrónica o por sus propiedad eléctrica,
  - los grupos detectables electro-químicamente,
  - 15 - los derivados de un complejo de hierro,
  - las moléculas radioactivas,
  - 20 - las parejas ligando/anti-ligandos seleccionadas entre las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del nucleótido,
  - los compuestos fluorescentes de peso molecular inferior a 1000 g/mol,
  - 25 - los haptenos de peso molecular inferior a 1000 g/mol,
  - los fluoróforos,
  - 30 \* R2 y R3 representan, independientemente el uno del otro: H, CONHR, COOR con R que corresponde a un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o a un grupo aromático monocíclico, y
  - 35 \* L es un brazo de enlace que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes que comprende una unidad  $-(O-CH_2-CH_2)-$ , repetida de 1 a 20 veces.

Según un segundo modo de realización, la presente invención propone un reactivo de marcaje de fórmula (D):



40 en la que:

- \* R1 representa un marcador detectable capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable y seleccionado entre:
- 45 - las enzimas que producen una señal por colorimetría, fluorescencia o luminiscencia,
  - los cromóforos,
  - los grupos de densidad electrónica detectable por microscopia electrónica o por su propiedad eléctrica,
  - 50 - los grupos detectables electro-químicamente,
  - los derivados de un complejo de hierro,

- las moléculas radioactivas,

- las parejas ligando/anti-ligandos seleccionadas entre las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del nucleótido,

- los compuestos fluorescentes de peso molecular inferior a 1000 g/mol,

- los haptenos de peso molecular inferior a 1000 g/mol,

- los fluoróforos,

\* R2 representa: H, CONHR, COOR con R que corresponde a un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o a un grupo aromático monocíclico,

\* R4 representa: H, un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o un grupo aromático monocíclico, y

\* L es un brazo de enlace que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes que comprende una unidad  $-(O-CH_2-CH_2)-$ , repetida de 1 a 20 veces.

La implantación del brazo que lleva al mismo tiempo el marcador  $R_1$  y la función diazometilo (fórmula C) está en posición *para*, *meta* u *orto* con respecto a la posición de implantación del átomo de nitrógeno del núcleo piridina. Preferiblemente, este brazo está en posición *para* con respecto a la posición de implantación del nitrógeno del núcleo piridina.

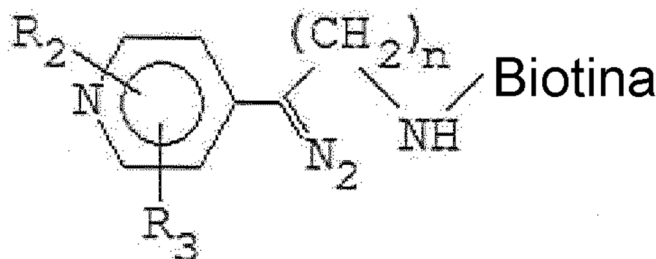
La implantación del brazo que lleva el marcador  $R_1$  o la implantación del brazo que lleva la función diazometilo (fórmula D) están, independientemente la una de la otra, en la posición *para*, *meta* u *orto* con respecto a la posición de implantación del átomo de nitrógeno del núcleo piridina. Preferiblemente el brazo que lleva la función diazometilo está en la posición *para* con respecto a la posición del átomo de nitrógeno del núcleo piridina, mientras que dicho brazo que lleva el marcador  $R_1$  está en la posición *orto* con respecto a la posición de dicho átomo de nitrógeno del núcleo piridina.

De manera preferida,  $R_2$  y/o  $R_3$  están en la posición *meta* con respecto a la función diazo. Esta posición permite la conjugación de la función diazometilo con un sustituyente  $R_2$  y/o  $R_3$ .

Por grupo alquilo, se entiende, en el sentido de la presente invención: un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono (ventajosamente uno a dos, uno a tres, uno a cuatro átomos de carbono) lineal o, cuando la cadena alquilo comprende al menos tres átomos de carbono, ramificado o cíclico. A título de ejemplos, se pueden citar los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, tertio-butilo, metilciclopropilo, pentilo, 2'-dimetilopropilo, hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

En el sentido de la presente invención, se entiende por grupo arilo un grupo aromático monocíclico, por ejemplo un grupo fenilo.

Según una tercera variante de realización, la presente invención propone un reactivo de marcaje de fórmula (E):

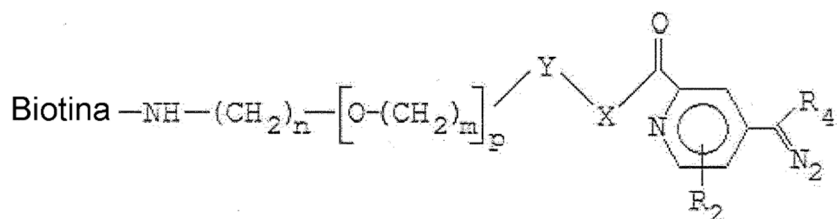


en la que:

\* R2 y R3 representan independientemente el uno del otro: H, CONHR, COOR con R que corresponde a un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o a un grupo aromático monocíclico, y

\* n es un número entero comprendido entre 1 y 12, preferiblemente entre 1 y 6.

Según una cuarta variante de realización, la presente invención propone un reactivo de marcaje de fórmula (F):



5 en la que:

\* R2 representa: H, CONHR, COOR con R que corresponde a un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o a un grupo aromático monocíclico,

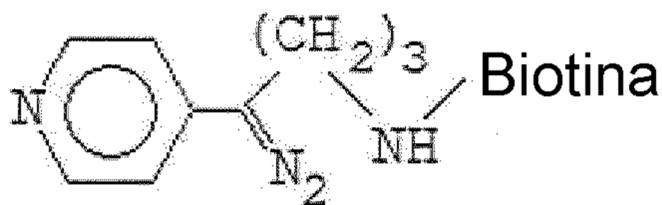
10 \* R4 representa: H, un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o un grupo aromático monocíclico,

\* -Y-X- representa -CH<sub>2</sub>NH-, -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O- o -CH<sub>2</sub>-S-, y

15 \* m, n y p son cada uno, independientemente los unos de los otros, un número entero comprendido entre 1 y 12, preferiblemente entre 1 y 6.

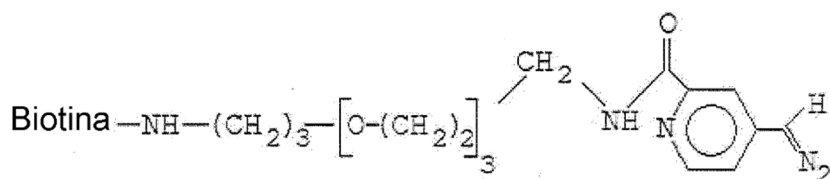
Según una variante de la tercera variante de realización, la presente invención propone un reactivo de marcaje de fórmula (G):

20



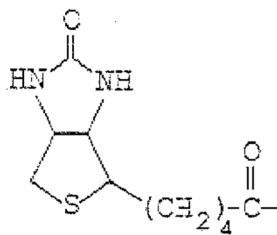
Según una variante de la cuarta variante de realización, la presente invención propone un reactivo de marcaje de fórmula (H):

25



Sea cual sea el modo de realización, el reactivo según la invención, expuesto antes, comprende preferiblemente un radical R<sub>1</sub>, que está constituido por un resto D-Biotina de fórmula (I):

30



La presente invención se refiere también a un procedimiento de síntesis de un reactivo de marcaje, tal como se ha expuesto anteriormente, que comprende las etapas siguientes (molécula de tipo PyDCB):

35

a) se pone un derivado de ácido carboxílico aromático en reacción con el enolato de una lactona (reacción de tipo Claisen) para formar un precursor cíclico, precursor cíclico el cual se abre después con un ácido halogenado para formar una cetina aromática halogenada,

5 c) la función carbonilo de la cetona aromática halogenada se protege mediante un grupo protector para formar un precursor protegido,

d) dicho precursor protegido se somete a una reacción de aminación (de tipo Gabriel) para formar un precursor aminado,

10 e) dicho precursor aminado se desprotege para liberar la función amina, poniéndose dicha función amina en reacción con un marcador detectable cuya función carboxílica se activa para formar un precursor que comprende un marcador detectable,

15 f) el precursor marcado se somete a una reacción de desprotección de la función carbonilo para formar un precursor marcado y carbonilado, finalmente

g) el precursor marcado y carbonilado se transforma en un reactivo de marcaje, tal como se ha descrito anteriormente, por una transformación de la función carbonilo en una función diazo.

20 En lo que se refiere a la síntesis de moléculas de tipo PyDB, las etapas son las siguientes:

a) se esterifica un ácido aromático di-carboxílico para formar un diéster,

25 b) se sustituye este diéster regio-selectivamente con un compuesto derivado del etilenglicol aminado mono protegido para formar un precursor protegido sobre la función carboxílica y sobre la función amina,

c) dicho precursor se reduce después en alcohol y se oxida en aldehído,

30 d) el aldehído, sintetizado en la etapa c), se somete a un tratamiento ácido a fin de, al mismo tiempo, proteger esta función desprotegiendo al mismo tiempo la función amina, para llevar a un acetal aminado,

e) dicho acetal aminado se pone en reacción con un marcador detectable cuya función carboxílica se activa para formar un precursor que comprende un marcador detectable,

35 f) el precursor marcado se somete a una reacción de desprotección de la función carbonilo para formar un precursor marcado y carbonilado, finalmente,

40 g) el precursor marcado y carbonilado se transforma en un reactivo de marcaje, tal como se ha descrito anteriormente, por una transformación de la función carbonilo en una función diazo según una reacción del tipo de Bamford Stevens.

45 La presente invención se refiere también a un procedimiento para el marcaje de una molécula biológica, en particular un ácido nucleico, que comprende poner en contacto en solución homogénea, en un tampón sustancialmente acuoso, de una molécula biológica y de un reactivo.

La invención propone también una molécula marcada susceptible de obtenerse mediante el procedimiento de marcaje de una molécula biológica expuesta anteriormente.

50 La presente invención se refiere también a un procedimiento de marcaje y de fragmentación de un ácido nucleico mono o bicatenario que comprende las etapas siguientes:

\* fragmentar el ácido nucleico,

55 \* fijar un marcador en al menos uno de los fragmentos por medio de un reactivo de marcaje seleccionado entre los reactivos,

acoplándose dicho reactivo de manera covalente y mayoritaria sobre al menos un fosfato de dicho fragmento. Tal técnica de fijación sobre el fosfato se representa, por ejemplo, en la figura 1.

60 Según una primera variante de realización, el procedimiento se caracteriza por que la fragmentación y el marcado se efectúan en dos etapas.

65 Según una segunda variante de realización, el procedimiento se caracteriza por que la fragmentación y el marcaje se efectúan en una etapa.



Sea cual sea la variante de realización, el procedimiento se caracteriza por el hecho de que el marcaje se efectúa en solución homogénea sustancialmente acuosa.

5 Sea cual sea la variante de realización, el procedimiento se caracteriza por que la fragmentación se efectúa por vía enzimática, física o química.

Los procedimientos descritos anteriormente permiten a la invención reivindicar también un ácido nucleico marcado susceptible de obtenerse por estos procedimientos.

10 La presente invención se refiere también a un kit de detección de un ácido nucleico diana que comprende un ácido nucleico marcado, tal como se ha descrito anteriormente.

La presente invención se refiere también a un soporte sólido sobre el cual se fija un reactivo, tal como se ha descrito anteriormente.

15 La presente invención se refiere finalmente a un procedimiento de captura de ácidos nucleicos que comprende las etapas siguientes:

20 \* se dispone de un soporte sólido sobre el cual se fija directa o indirectamente al menos una molécula biológica, tal como se ha descrito anteriormente, o un ácido nucleico, tal como se ha descrito anteriormente, comprendiendo la molécula biológica o el ácido nucleico una función diazometilo,

\* se pone en contacto una muestra biológica susceptible de contener unos ácidos nucleicos libres, y

25 \* se lava el sólido en el que la o las moléculas se fijan de manera covalente al menos a un ácido nucleico.

Estas moléculas de cuarta generación DCB comprenden un brazo espaciador L, denominado enlazador, y un marcador R<sub>1</sub> que podría estar constituido por un grupo detectable, tal como la biotina, un hapteno, un fluoróforo, un grupo fluorescente, un grupo luminiscente, etc.

30 L es un brazo de enlace que comprende una unidad  $-(O-CH_2-CH_2)-$ , repetida de 1 a 20 veces, preferiblemente de 1 a 12 veces, y aún más preferiblemente de 2 a 6 veces.

35 Los ejemplos y figuras anexas representan unos modos particulares de realización y no pueden considerarse como limitante el alcance de la presente invención.

La Figura 1 representa un esquema de reacción que muestra el marcaje de un ácido nucleico monocatenario, ya sea en forma de ARN o de ADN por una molécula según la invención.

40 La Figura 2 es un recapitulativo de las moléculas utilizadas en la presente solicitud de invención.

La Figura 3 representa un esquema de reacción del procedimiento de síntesis de una molécula de PyDB (molécula 10)

45 La Figura 4 representa un esquema de reacción del procedimiento de síntesis de una molécula de PyDCB (molécula 19)

50 La Figura 5 representa la estabilidad comparada en medio líquido de las moléculas PyDB y PyDCB con respecto a una molécula de [Bio-EG3]2-PDAM de segunda generación (denominada en lo sucesivo BBP) y descrita en la solicitud WO-A-02/090319.

La Figura 6 representa estabilidad comparada en forma seca de las dos moléculas de cuarta generación PyDB y PyDCB con respecto a una molécula de segunda generación BBP.

55 La Figura 7 representa los resultados de marcaje de un amplicón de ARN después de la purificación con la ayuda de los marcadores BBP y PyDB, estando cada uno de los marcadores a una concentración de 45 mM.

60 La Figura 8 representa los resultados de marcaje de un amplicón de ARN sin purificación con la ayuda de los marcadores BBP y PyDB, estando cada uno de los marcadores a una concentración de 2 mM y en presencia de 3 mM HCL.

La Figura 9 representa la estabilidad del marcaje de un amplicón de ARN marcado por los marcadores PyDB o BBP, a una concentración de 2,5 mM, sobre 24 horas de hibridación.

La Figura 10 representa la comparación de la eficacia de marcaje de un amplicón de ARN en función de la técnica de marcaje empleada, o bien ULS (Universal Labelling System) de Kreatech (Ámsterdam, países bajos), bien según la presente invención.

5 La Figura 11 representa la solubilidad comparativa en medio acuoso de dos moléculas de tercera generación (*meta* Nitro DCB y *para* Nitro DCB) con respecto a dos moléculas de cuarta generación (PyDB y PyDCB), establecida por HPLC.

En las figuras y en la descripción, los términos “Fluorescencia relativa” y “RFU” son idénticos.

10

En los ejemplos descritos a continuación, se utilizarán las abreviaturas siguientes:

- Ar: aromático,
- s: singulete,
- 15 • se: singulete ensanchado,
- d: doblete,
- dd: doblete desdoblado,
- t: triplete,
- q: cuadruplete
- 20 • qu: quintuplete,
- m: masivo,
- M: multiplete,
- HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento
- CCM: cromatografía sobre capa delgada,
- 25 • RMN: resonancia magnética nuclear,
- Rdt: rendimiento,
- Eq: equivalentes
- Rf o TR: tiempo de retención,
- DMSO-d<sub>6</sub>: dimetilsulfóxido deuterado,
- 30 • DMCF: formiato de dimetilciclohexilamonio,
- CDCl<sub>3</sub>: cloroformo deuterado, y
- DMF: dimetilformamida,
- DCM: Diclorometano,
- MeOH: Metanol,
- 35 • ACN: Acetonitrilo,
- AcOET: Acetato de etilo,
- Agua MilliQ: Agua ultrapura (Millipore, Molsheim, Francia),
- DMAC: Dimetilamino cinamaldehído,
- Si60: Silica gel 60 FLUKA (40-63 μm),
- 40 • UV: ultravioleta.

**Las condiciones generales para el análisis y la síntesis de los compuestos químicos descritos (ejemplos 1, 2, 3, 4 y 9) son:**

45 Material:

Condiciones HPLC (cadena HPLC WATERS Alliance 2795, Detector de barra de diodos PDA 996, programa Empower versión 2 y columna WATERS XTerra MS C18 4,6 x 30 2,5 μM) con un caudal de 1 ml/minuto a 30°C (detección a 260 nm).

50

Método HPLC básico:

Eluyente A:	agua milliQ
Eluyente B:	ACN
Eluyente C:	Amoniaco a 500 mM pH 12

Es decir un gradiente lineal del 1 al 64% de acetonitrilo (5 mM constantes de amoniaco a pH=9) en 20 minutos.

55

Método HPLC Neutro:

eluyente A:	agua milliQ
eluyente C:	ACN
eluyente D:	Solución a 500mM de formiato de amonio pH 7

Es decir un gradiente lineal del 1 al 64% de C en una solución a 10mM en formiato de amonio en 20 minutos.

5

Síntesis:

Los análisis por cromatografía sobre capa delgada se realizaron sobre unas placas de sílice ALUGRAM® MACHEREY-NAGEL SIL G/UV<sub>254</sub> 4 x 8 cm (Duren, Alemania) con una detección UV a 254 nm o con DMAC para los productos biotinilados.

10

La purificación de los productos se ha efectuado por cromatografía sobre gel de sílice Silica gel 60 FLUKA (40-63 µm). Las condiciones de separación por cromatografía "ultrarrápida" (bajo presión de argón) respetan estrictamente las condiciones descritas por Clark Still *et al.* (Clark Still, W.; Kahn, M.; Mitra, A. J. Org. Chem. 1978, 43, 2923-2925) es decir una altura fija de 15 cm desarrollada a una velocidad de 5 cm/minutos, dependiendo el diámetro de la columna de la cantidad de los R<sub>f</sub> de los productos a purificar.

15

Para el ejemplo 1, los espectros RMN se han registrado en un espectrómetro Brüker 200 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm con respecto al pico del disolvente tomado como referencia interna (CDCl<sub>3</sub>: 7,24 ppm; DMSO-d<sub>6</sub>: 2,49 ppm; D<sub>2</sub>O: 4,80 ppm a 25°C). Los espectros se describen con las abreviaturas anteriores: s, d, t, q, qu, m y M. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz)

20

Para el ejemplo 2, los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se han realizado sobre unos espectrómetros Bruker AC 200 o Bruker DPX 300 a temperatura ambiente. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con respecto al tetrametilsilano y calibrados con respecto al CHCl<sub>3</sub> (δ<sub>H</sub> = 7,27, δ<sub>C</sub> = 77,0) o el DMSO (δ<sub>H</sub> = 2,52, δ<sub>C</sub> = 40,0). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz). La forma de las señales se abrevia de la manera siguiente: se y dd.

25

Espectros de masas:

30

Los espectros de masas (SM) se obtuvieron con un aparato LCQ-ion trap (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) mediante unos métodos de ionización electrospray en modo positivo por infusión a través de un tubo de sílice 2 a 10 µl/minuto. Los principales solventes son el DCM y el MeOH.

Ejemplo 1: Síntesis de la piridina Diazo Biotina (PyDB):

35

**Objetivo:**

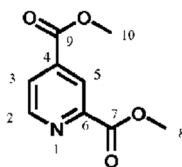
Demostrar la viabilidad de la síntesis de una molécula que contiene un núcleo piridina en *alfa* de una función diazometilo, y un grupo de reconocimiento sobre el anillo aromático, según el esquema de reacción expuesto a continuación:

40

**Modo de realización:**

→ **Piridin-2,4-dicarboxilato de dimetilo (2)**

45



En un matraz de 500 ml se introducen el PCl<sub>5</sub> (39 g; 0,186 mol; 3 eq.) y el ácido piridin-2,4-dicarboxílico (11,5 g; 6,2×10<sup>-2</sup> mol). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 45 minutos: se vuelve líquido verde. Se diluye después con diclorometano (80 ml) y después se añade metanol (20 ml) con precaución. El conjunto se vierte en agua H<sub>2</sub>O (300 ml) con 60 g de NaHCO<sub>3</sub>, la fase acuosa se lava con diclorometano (4 × 50 ml) y la fase orgánica se lava con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (2 × 50ml). El producto bruto se purifica por cromatografía ultrarrápida (eluyente: AcOEt/Ciclohexano 75:25).

50

55

Sólido: m = 11,71 g

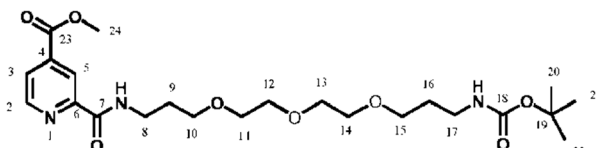
Rendimiento: 96%

Almacenamiento: temperatura ambiente

5 **RMN <sup>1</sup>H (200MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 4,03 (s, 3H, -OMe); 4,09 (s, 3H, - OMe); 8,07 (dd, J=6Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 8,68 (s, 1H, H<sub>5</sub>); 8,91 (d, J=4,6Hz, 1H, H<sub>2</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 53,28 (C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>); 124,49 (C<sub>5</sub>); 126,29 (C<sub>3</sub>); 138,64 (C<sub>4</sub>); 149,06 (C<sub>6</sub>); 150,92 (C<sub>2</sub>); 162,45 (C<sub>7</sub>); 164,96 (C<sub>9</sub>)

10 → **2-{N-[13-(*t*-Butoxicarbonilamino)-4,7,10-trioxatridecil]aminocarbonil}piridin-4-carboxilato de metilo (3)**



15 En un matraz de 25 ml, se introduce el diéster 2 (2,25g;  $1,1 \times 10^{-2}$  mol) en el tolueno (3 ml). Se añade la Boc-diamina (3,7 g;  $1,2 \times 10^{-2}$  mol; 1,1 eq.) y después se agita la mezcla a 90°C durante 20 horas. Se evapora el tolueno y después la mezcla bruta se purifica por cromatografía ultrarrápida (gradiente de eluyente: diclorometano/acetona 10, 20 y 30%).

20 Aceite transparente: m = 2,9 g

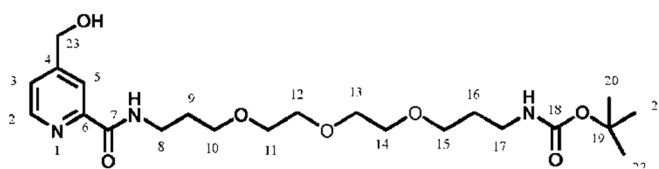
Rendimiento: 55%

Almacenamiento: temperatura ambiente

25 **RMN <sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 1,42 (s, 9H, -Boc); 1,74 (q, 2H, H<sub>9</sub>); 1,92 (q, 2H, H<sub>16</sub>); 3,21 (q, 2H, H<sub>8</sub>); 3,61 (m, 16H, H<sub>10</sub>-H<sub>11</sub>-H<sub>12</sub>-H<sub>13</sub>-H<sub>14</sub>-H<sub>15</sub>-H<sub>17</sub>); 3,97 (s, 3H, -OMe); 5,01 (m, 1H, N-H); 7,96 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 8,35 (s+d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>); 8,69 (m, 1H, N-H)

30 **RMN <sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 28,63 (C<sub>20</sub>-C<sub>21</sub>-C<sub>22</sub>); 29,30 (C<sub>16</sub>); 29,74 (C<sub>9</sub>); 37,55 (C<sub>17</sub>); 38,85 (C<sub>8</sub>); 53,02 (C<sub>24</sub>); 69,69 (C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub>-C<sub>11</sub>-C<sub>14</sub>); 70,78 (C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub>); 79,97 (C<sub>19</sub>); 121,60 (C<sub>5</sub>); 125,52 (C<sub>3</sub>); 139,08 (C<sub>4</sub>); 149,23 (C<sub>2</sub>); 151,76 (C<sub>6</sub>); 156,27 (C<sub>18</sub>); 163,65 (C<sub>7</sub>); 165,60 (C<sub>23</sub>)

→ **4-(Hidroximetil)piridin-2-N-[13-(*t*-butoxicarbonilamino)-4,7,10-trioxatridecil]-carboxamida (4)**



35 En un matraz de 250 ml se disuelve el monoéster (2,73 g;  $5,4 \times 10^{-3}$  mol) en el MeOH (20 ml). La mezcla se enfría con la ayuda de un baño de hielo, se añade poco a poco NaBH<sub>4</sub> (1,32 g;  $3,5 \times 10^{-2}$  mol; 6,5 eq.). La mezcla se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente.

40 La mezcla se diluye en H<sub>2</sub>O (100 ml) y se neutraliza con NH<sub>4</sub>Cl saturado y después se extrae con diclorometano (4 × 100 ml). Las fases orgánicas se unen, se evaporan y se secan al vacío del desecador durante una noche.

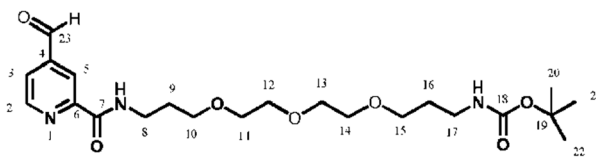
45 Aceite transparente: m = 2,44 g

Rendimiento: 95%

Almacenamiento: temperatura ambiente

50 **RMN <sup>1</sup>H (200MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 1,42 (s, 9H, -Boc); 1,75 (q, 2H, H<sub>9</sub>); 1,91 (q, 2H, H<sub>16</sub>); 3,02 (m, 1H, OH); 3,19 (q, 2H, H<sub>8</sub>); 3,59 (m, 16H, H<sub>10</sub>-H<sub>11</sub>-H<sub>12</sub>-H<sub>13</sub>-H<sub>14</sub>-H<sub>15</sub>-H<sub>17</sub>); 4,79 (d, 2H, H<sub>23</sub>); 5,03 (m, 1H, N-H); 7,47 (d, 1H, H<sub>3</sub>); 8,15 (s, 1H, H<sub>5</sub>); 8,39 (m, 1H, N-H); 8,51 (d, J=5Hz, 1H, H<sub>2</sub>)

55 **RMN <sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 28,77 (C<sub>20</sub>-C<sub>21</sub>-C<sub>22</sub>); 29,26 (C<sub>16</sub>); 30,07 (C<sub>9</sub>); 37,68 (C<sub>17</sub>); 39,01 (C<sub>8</sub>); 63,70 (C<sub>23</sub>); 69,42 (C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub>); 70,39 (C<sub>11</sub>-C<sub>14</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub>); 79,96 (C<sub>19</sub>); 119,95 (C<sub>5</sub>); 123,87 (C<sub>3</sub>); 148,44 (C<sub>2</sub>); 150,03 (C<sub>6</sub>); 143,34 (C<sub>4</sub>); 156,42 (C<sub>18</sub>); 164,96 (C<sub>7</sub>)

→ 4-(Formil)piridin-2-N-[13-(*t*-butoxicarbonilamino)-4,7,10-trioxatridecil]carboxamida (5)

5 A una solución de DMSO (2,0 ml, 28,2 mmoles) en el diclorometano (8 ml), se añade (COCl)<sub>2</sub> (1,2 ml, 13,7 mmoles) en solución en diclorometano (5 ml) a -70°C bajo argón. Se deja la agitación durante 30 minutos a -70°C después se añade gota a gota el alcohol **4** (1,92 g, 4,2 mmoles) en solución en el diclorometano (20 ml). Se deja agitar durante 10 30 minutos a una temperatura de -70°C, se añade NEt<sub>3</sub> (6,5 ml, 47 mmoles). La mezcla de reacción se agita a 0°C durante 3 h, después se vierte en agua (70 ml). La fase acuosa se extrae con dicho diclorometano, se lava (NaHCO<sub>3</sub>), se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se evapora en un aceite viscoso. Aparece entonces una liberación de Me<sub>2</sub>S, para el cual se necesita utilizar lejía para atraparla y lavar las vasijas contaminadas. El producto bruto se purifica por cromatografía ultrarrápida (eluyente: AcOEt/acetona 85:15).

15 Aceite transparente:

m = 1,46 g

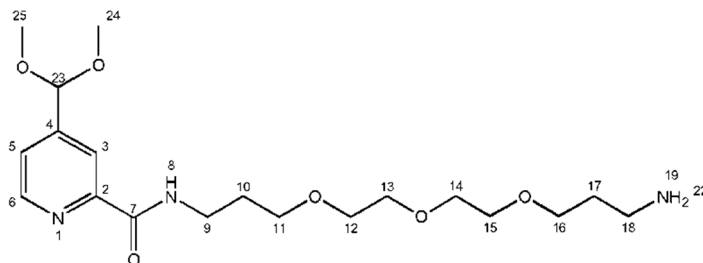
Rendimiento: 75 %

20 **RMN <sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 1,42 (s, 9H, -Boc); 1,76 (q, J=6Hz, 2H, H<sub>9</sub>); 1,95 (q, J=6Hz, 2H, H<sub>16</sub>); 3,22 (q, 2H, H<sub>8</sub>); 3,57 (m, 16H, H<sub>10</sub>-H<sub>11</sub>-H<sub>12</sub>-H<sub>13</sub>-H<sub>14</sub>-H<sub>15</sub>-H<sub>17</sub>); 4,98 (m, 1H, *N-H*); 7,85 (d, 1H, H<sub>3</sub>); 8,59 (s, 1H, H<sub>5</sub>); 8,77 (d, 1H, H<sub>2</sub>); 10,15 (s, 1H, H<sub>al</sub>)

25 **RMN <sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 29,59 (C<sub>20</sub>-C<sub>21</sub>-C<sub>22</sub>); 30,03 (C<sub>9</sub>-C<sub>16</sub>); 38,11 (C<sub>8</sub>-C<sub>17</sub>); 70,11 (C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub>); 70,99 (C<sub>11</sub>-C<sub>14</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub>); 79,50 (C<sub>19</sub>); 122,27 (C<sub>5</sub>); 123,68 (C<sub>3</sub>); 143,22 (C<sub>4</sub>); 149,80 (C<sub>2</sub>); 152,61 (C<sub>6</sub>); 156,35 (C<sub>18</sub>); 163,62 (C<sub>7</sub>); 191,32 (C<sub>23</sub>)

## → 4-(Dimetoximetil)piridin-2-N-(13-amino-4,7,10-trioxatridecil)-carboxamida (6)

30



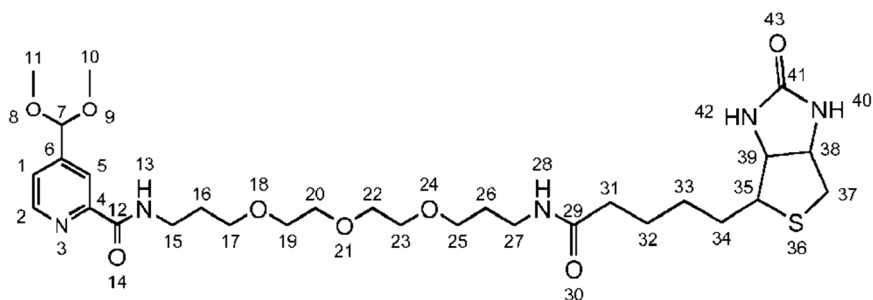
35 Se disuelve el aldehído **5** (1,4 g, 3,1 mmoles, 1 eq.) en 10 ml de metanol. Se añade el TMSCl (1 ml, 7,9 mmoles, 2,5 eq.) y se agita la mezcla toda la noche. Se añade una solución de hidróxido de sodio 1 M (40 ml)) y el producto se extrae con diclorometano, las fases orgánicas se secan en presencia de carbonato de sodio y el disolvente se evapora al vacío.

M = 997 mg

40 Rendimiento: 81%

**RMN <sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 8,54 (d, 1H, H<sub>6</sub>), 8,35 (br s, 1H, H<sub>8</sub>), 8,24 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7,52 (d, 1H, H<sub>5</sub>), 5,42 (s, 1H, H<sub>23</sub>), 3,71-3,53 (m, 15H, H<sub>9</sub>+H<sub>11-16</sub>), 3,33 (s, 6H, H<sub>24</sub>, 25), 2,80 (t, 2H, H<sub>18</sub>), 1,91 (quint, 2H, H<sub>10</sub>), 1,75 (quint, 2H, H<sub>17</sub>).

45 → Acetal-Biotina (7)



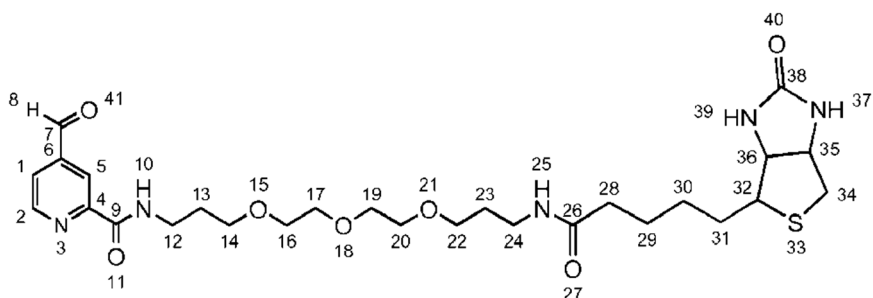
El acetal (6) (1,54 g, 3,9 mmoles) se disuelve en 30 ml de diclorometano. Se añade biotina (1,36 g, 4,2 mmoles, 1,1 eq.) y se agita la mezcla durante dos horas. La solución se extrae tres veces con 50 ml de carbonato de sodio 1 M. Las fases acuosas se lavan con 50 ml de diclorometano. La fase orgánica se seca con sulfato de magnesio y el disolvente se evapora. El bruto se purifica por cromatografía ultrarrápida: SiO<sub>2</sub> Φ= 50 mm, 15 cm. Eluyente: 700 ml 10% metanol/diclorometano y después 1l 15% metanol/diclorometano. Después, el disolvente se evapora, y el resto oleoso se lava con éter. Se obtiene un polvo blanco.

m = 1,78 g

Rendimiento: 74%

**RMN <sup>1</sup>H (300MHz dual, CDCl<sub>3</sub>):** 8,55 (d, 1H, H<sub>2</sub>), 8,35 (t, 1H, H<sub>13</sub>), 8,26 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7,55-7,53 (m, 1H, H<sub>1</sub>), 6,7 (ancho s, 1H, H<sub>42</sub>), 6,2 (ancho s, 1H, H<sub>40</sub>), 5,44 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 4,4- 4,6 (m, 1H, H<sub>38</sub>), 4,2- 4,4 (m, 1H, H<sub>39</sub>), 3,71- 3,54 (m, 16H, H<sub>15</sub>, H<sub>17-25</sub>, H<sub>27</sub>), 3,34 (s, 6H, H<sub>10-11</sub>), 3,2-3,1 (m, 1H, H<sub>35</sub>), 3-2,8 (m, 1H, H<sub>37</sub>), 3,8-3,7 (m, 1H, H<sub>37</sub>), 2,19 (t, 2H, H<sub>31</sub>), 1,92 (quint, 2H, H<sub>16</sub>), 1,8-1,3 (m, 8H, H<sub>26</sub>, H<sub>32-34</sub>).

→ Aldehído (8)



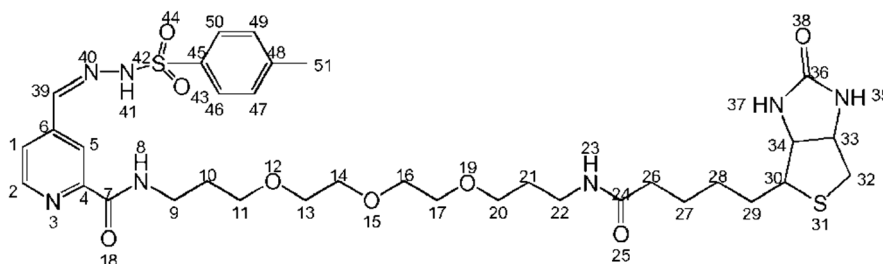
El acetal (7) (1,76 g, 2,8 mmoles) se disuelve en una solución de ácido acético/agua 80:20 (20 ml) y se agita la mezcla a 60°C durante 24 horas bajo argón. La solución se evapora y el resto oleoso se lava con éter hasta obtener un polvo blanco.

M = 1,83 g

Rendimiento: aproximadamente el 100%

**RMN <sup>1</sup>H (300MHz dual, DMSO-d<sub>6</sub>):** 10,17 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 8,92 (s+d, 2H, H<sub>10,2</sub>), 8,42 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7,99 (d, 1H, H<sub>1</sub>), 7,73 (t, 1H, H<sub>25</sub>), 6,4-6,3 (s+ ancho s, 2H, H<sub>39,37</sub>), 4,3-4,1 (m+m, 2H, H<sub>35,36</sub>), 3,53-3,28 (m, 18H, H<sub>12,14-22,24</sub>), 3,07 (m, 1H, H<sub>32</sub>), 2,80 (d, 1H, H<sub>34</sub>), 2,78 (d, 1H, H<sub>34</sub>), 2,2-1,00 (m, 12H, H<sub>13,28-31</sub>).

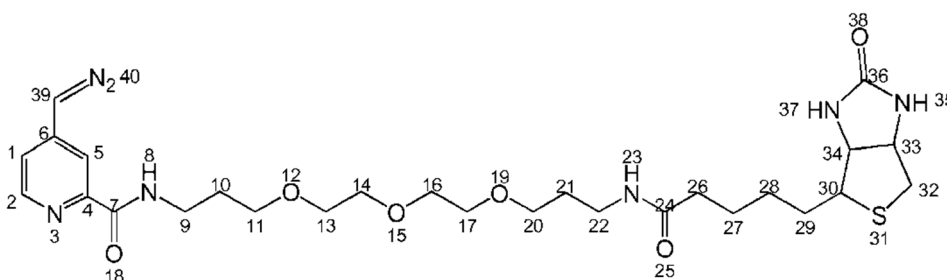
→ Tosilhidrazona (9)



Una solución de aldehído 8 (1,62 g, 2,79 mmoles) en dimetilformamida (20 ml) se agita a 130°C durante 30 minutos bajo argón. Se añade la 4-metilbenceno-sulfonhidrazida y se agita la mezcla durante una hora. Se evapora el disolvente y se purifica el bruto por cromatografía ultrarrápida: SiO<sub>2</sub>, Φ= 30 mm, 15 cm, eluyente: 10% metanol/diclorometano. El resto oleoso se lava con éter hasta obtener un polvo amarillo.

- 5 M = 1,57 g
- Rendimiento: 75%
- 10 **RMN <sup>1</sup>H (300MHz dual, DMSO-d<sub>6</sub>):** 12,0 (ancho s, 1H, H<sub>39</sub>), 8,83 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 8,63 (d, 1H, H<sub>2</sub>), 8,13 (s, 1H, H<sub>41</sub>), 7,99 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7,77 (d, 2H, H<sub>46</sub>, 50), 7,69 (d, 1H, H<sub>1</sub>), 7,42 (d, 2H, H<sub>47</sub>, 49), 6,41 (s, 1H, H<sub>37</sub>), 6,35 (s, 1H, H<sub>35</sub>), 4,4-4,2 (m, 1H, H<sub>34</sub>), 4,0-4,2 (m, 1H, H<sub>33</sub>), 3,51- 3,33 (m, 16H, H<sub>9</sub>, 11-20, 22), 3,1-3,0 (m, 2H, H<sub>32</sub>), 2,8-2,7 (m, 1H, H<sub>30</sub>), 2,36 (s, 3H, H<sub>51</sub>), 2,03 (t, 2H, H<sub>10</sub>), 1,77 (t, 2H, H<sub>21</sub>), 1,6-1,2 (m, 8H, H<sub>26-29</sub>).

15 → **Compuesto Diazo Final (10)**



- 20 En un matraz de 25 ml, se introduce la tosilhidroazona 9 (200 mg, 0,27 mmol). Se añade una solución de hidruro de sodio (60% en aceite) (42,8 mg, 1,07 mmol, 4 eq.) en metanol (10 ml) y se deja la agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto se extrae con 10 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M y 4×10ml de diclorometano. El resto oleoso se lava con éter. Se obtiene un polvo naranja.

- 25 M = 135 g
- Rendimiento: 88%
- 30 **RMN <sup>1</sup>H (200MHz dual, CDCl<sub>3</sub>):** 8,31-8,28 (br s+d, 2H, H<sub>8,2</sub>), 7,73 (d, 1H, H<sub>5</sub>), 6,88 (dd, 1H, H<sub>1</sub>), 6, 62 (t, 1H, H<sub>23</sub>), 6,13 (s, 1H, H<sub>37</sub>), 5,32 (s, 1H, H<sub>35</sub>), 5,10 (s, 1H, H<sub>39</sub>), 4,6- 4,4 (m, 1H, H<sub>34</sub>), 4,4- 4,2 (m, 1H, H<sub>33</sub>), 3,7- 3,5 (m, 18H, H<sub>9</sub>, 11-20, 22), 3,13 (m, 1H, H<sub>30</sub>), 2,88 (dd, 1H, H<sub>32</sub>), 2,72 (d, 1H, H<sub>32</sub>), 2,2- 1,3 (m, 12H, H<sub>10</sub>, 21, 26-29).

**Resultados y conclusiones:**

- 35 **Se ha demostrado que la síntesis de un compuesto que comprende una función diazo metilo conjugado con un núcleo piridina que lleva un grupo de reconocimiento (biotina) se podía realizar con un buen rendimiento.**

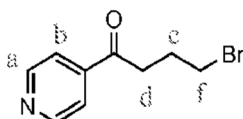
**Ejemplo 2: Síntesis de la Piridina Diazo Cetona Biotina (PyDCB):**

**Objetivo:**

- 40 Demostrar la viabilidad de la síntesis de una molécula que contiene un núcleo piridina en *alfa* de una función diazo y un grupo de reconocimiento (Biotina) en *alfa* prima de la función diazo según el esquema de reacción siguiente.

**Modo de realización:**

- 45 → **Síntesis de la cetona bromada (12)**



- 50 La  $\gamma$ -Butirolactona (5,020 g/4,55 ml; 32,23 mmoles; 1,0 eq.) se diluye en THF (15 ml; 3,3 v) después se enfría a 0°C en un baño de hielo. El hidruro de sodio (a 60%; 3,018 g; 75,42 mmoles; 2,27 eq.) se añade por porción en el espacio de 5 minutos, después se retira el baño de hielo durante 30 minutos. El matraz se vuelve a poner a 0°C y después el isonicotinato de etilo (3,80 ml; 49,84 mmoles; 1,5 eq.) en solución en THF (245 ml; 64,5 v) se vierte gota

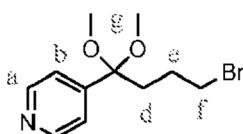
a gota. La reacción se agita 18 horas a temperatura ambiente. El THF se elimina por evaporación al vacío y después se recoge el residuo con 100 ml de éter etílico, el producto esperado precipita, la suspensión se escurre, después se seca en rotor a 1 mbar durante 20 minutos con obtención de un producto. Una parte del producto (4,721 g; 24,7 mmoles) se recoge mediante ácido bromhídrico a 48% (38 ml es decir 650 mM) en agua y después se lleva a 110°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se vuelve básica hasta pH 9 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y después se complementa con 200 ml de agua y se extrae dos veces con 200 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra sobre algodón y se evapora en rotavapor.

m = 3,096g

Rendimiento (sobre las 2 etapas): el 21%

Método HPLC: neutro

→ **Síntesis de la cetona bromada y protegida (13)**



En un matraz de 500 ml, la cetona bromada (3,096 g; 13,57 mmoles; 1,0 eq.) se pone en solución en metanol anhidro (165 ml; 80 mM) al cual se añade cloruro de trimetilsililo (51,5 ml; 407,2 mmoles; 30,0 eq.) después la reacción se pone bajo argón antes de calentar a 53°C (temperatura inferior al punto de ebullición de los reactivos) durante 18 horas. La mezcla de reacción se evapora en seco y después se recoge en 50 ml de agua y se vuelve básica con sosa 35% hasta pH 9-10 y después se complementa a 200 ml y se extrae dos veces con 150 ml de diclorometano (también denominado de manera abreviada, DCM). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora en seco bajo presión reducida. El resto de evaporación se recoge con 1 ml de DCM y se deposita en una columna de gel de sílice en fase normal Si60 (h = 5 cm; diam.= 15 cm; eluyente: DCM/MeOH: 95/5).

m = 1,506g

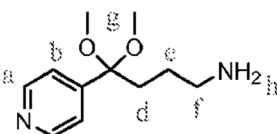
Rendimiento: un 40%

Eluyente CCM: DCM/MeOH: 95/5

Método HPLC: neutro

**RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,4 a 1,7 (M; 2H; e); 3,0 a 3,25 (m; 8H; f,g); 3,30 (t;2H; d); 7,42 (d; 2H; a); 8,65 (d; 2H; b).

→ **Cetona protegida y aminada (reacción de Gabriel) (15)**



En un matraz de 100 ml, la cetona bromada (1,506 g; 5,49 mmoles; 1,0 eq.), la ftalimida de potasio (1,526 g; 8,24 mmoles; 1,5 eq.) y el DMF (55 ml 0,1 M) se cargan y después se recalientan 15 minutos a 155°C. Se evapora el disolvente en seco, después se recoge el residuo de evaporación con 200 ml de una solución de sosa a 100 mM y se extrae con dos veces 200 ml de DCM, se seca la fase diclorometano sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora en seco para dar el compuesto 14. Su totalidad (5,49 mmol; 1,0 eq.) se pone en reacción con hidrazina con el 25% en agua (21,35 ml; 109,8 mmoles; 20 eq.) y metanol (109 ml; 50 mM), se agita la reacción durante 18 horas. Los disolventes se eliminan y después el resto se recoge en 200 ml de una solución de sosa a 10 mM, y después se extrae con tres veces 200 ml de DCM. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora bajo presión reducida, y después el aceite obtenido se recoge por 1 ml de DCM y se deposita sobre una columna de gel de sílice en fase normal Si60 (h = 15 cm; diam. = 3 cm; eluyente: DCM/MeOH/NH<sub>3</sub>: 97,5/2,5/1).

m = 300 mg

Rendimiento: un 26%

Eluyente CCM: DCM/MeOH/NH<sub>3</sub>: 90/10/1

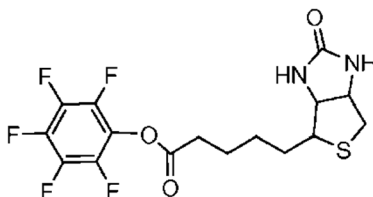


Método HPLC: neutro

5 **RMN <sup>1</sup>H** (ftalimida 14) (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,2 a 1,3 (M; 2H; e); 1,88 (M; 2H; d); 3,03 (t; 6H; g); 3,44 (dd; 2H; f); 7,45 (d; 2H; a); 7,57 a 7,71 (m; 4H; i y j); 8,52 (d; 2H; b).

**RMN <sup>1</sup>H** (amina 15) (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,0 a 1,2 (m; 4H; e y f); 1,88 (M; 2H; d); 2,54 (t; 2H; h); 3,15 (t; 6H; g); 7,35 (d; 2H; a); 8,58 (d; 2H; b).

10 → **Síntesis de la biotina activada (20)**



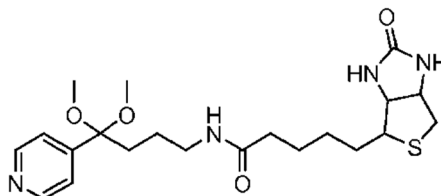
15 La biotina (5 g; 23,1 mmoles; 1,0 eq.) se pone en suspensión en DMF anhidro (50 ml) y la piridina (2,07 ml; 25,4 mmoles; 1,1 eq.). Después de 5 minutos de agitación, se añade el trifluoroacetato de pentafluorofenilo (PFP-TFA: 4,621 ml, es decir 7,50 g; 25,4 mmoles; 1,1 eq.). Al final de una noche de agitación, la reacción finaliza. Los disolventes se evaporan en rotavapor. El resto de evaporación se recoge con 100 ml de éter etílico para ponerse en suspensión, después se escurre sobre sinterizado, la torta se aclara con un mínimo de éter. Nota: en CCM se observa una pequeña traza de biotina, pero no tendrá impacto para el desarrollo.

20 m = 7,106g

Rendimiento: un 81%

25 Eluyente CCM: DCM/MeOH: 90/10

→ **Acoplamiento entre la biotina y la amina aromática (compuesto 16)**



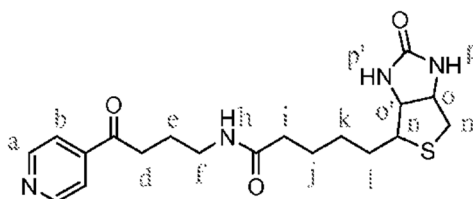
30 El compuesto 15 (808 mg; 2,0 mmoles; 1,4 eq.) se solubiliza en DMF (4,28 ml) a 60°C, antes de añadir trietilamina (1,60 ml; 11,4 mmoles; 8,0 eq.), después de 5 minutos de agitación. El compuesto 20 en solución en el DMF (2,85 ml a 500 mM, es decir 300 mg; 1,4 mmoles; 1,0 eq.) se incorpora de una sola vez. Después de 60 minutos, el disolvente se evapora bajo presión reducida. No se trata más, el bruto de reacción se introduce directamente en desprotección.

35 desprotección.

La masa y el rendimiento se calcularán en la etapa siguiente.

Método HPLC: neutro

40 → **Cetona biotinilada (compuesto 17)**



45 El compuesto 16 se recoge en 50 ml de una solución 6 M de ácido clorhídrico agitado durante 2 horas a temperatura ambiente. La solución se evapora en seco, el resto es un aceite rojo en forma de clorhidrato. Se recoge en una mezcla DCM/MeOH/TEA: 90/8/2, el aceite se decolora y se libera un gas, se añaden 2 ml de trietilamina y después

se evapora la mezcla en seco para dar un precipitado que se recoge en 100 ml de éter etílico y 10 ml de DCM, se escurre la suspensión y se tritura la torta con 50 ml de éter antes de ponerse al vacío 2 horas a 28°C. Se recoge el polvo en 5 ml de mezcla DCM/MeOH: 88/12 a los cuales se añaden 250 µl de sosa 2 M a fin de solubilizar el conjunto. Esta solución se deposita sobre una columna de gel de sílice Si60 de diámetro = 3 cm, h = 16 cm v = 5 cm/minuto y que se eluye con una mezcla DCM/MeOH: 88/12.

m = 940 mg

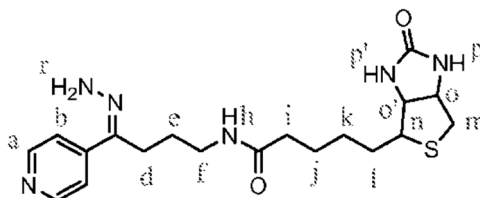
Rendimiento: un 83% sobre dos etapas, y si no se toman en cuenta los 2,9 eq. de clorhidrato de trietilamina.

Eluyente CCM: DCM/MeOH: 85/15.

Método HPLC: neutro

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): δ = 1,28 (t; TEA); 1,49 (M; 2H; k); 1,30 a 1,50 (m; 4H; j y l); 1,73 (quint; 2H; e); 2,05 (t; 2H; i); 2,6 a 2,8 (M; 2H; m); 2,9 a 3,2 (m; 5H + H du TEA; d, f, n y TEA); 4,0 a 4,3 (m; 2H; o y o'); 6,38 (s; 1H; p'); 6,43 (s; 1H; p); 7,78 (d; 2H; b); 7,95 (t; 1H; h); 8,08 (d; 2H; a); 10,3 (M; el clorhidrato de TEA).

→ Hidrazonación de la cetona (18)



La cetona 17 (400 mg; 506,5 µmol) se disuelve en DMF (2,25 ml; 224 mM), MeOH (11,3 ml; 44,8 mM) y ácido acético (580 µl; 10,13 mmoles; 20 eq.) antes de añadir 247 µl de monohidrato de hidrazina (246 µl; 5,065 mmoles; 10 eq.). La solución se agita durante dos horas y después se evapora en seco.

El resto de evaporación se recoge en 5 ml de agua y después se transvasa en un frasco de 15 ml para después volverse básico con sosa 2 M hasta alcanzar un pH de 10, el producto precipita, el tubo se agita por vórtice, a fin de mezclar bien y después se centrifuga a 8000 rpm. El sobrenadante se tira y después la operación se repite otra vez dos veces tomando 5 ml de una solución de sosa a pH 10. El precipitado (polvo amarillo) se seca en una estufa al vacío a temperatura ambiente antes de introducirse en la etapa de oxidación.

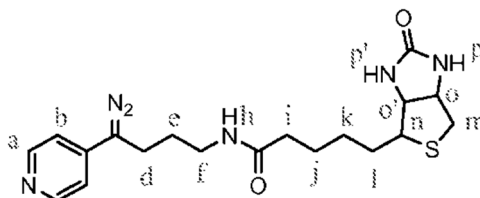
m = 190 mg

Rendimiento: un 93%

Método HPLC: neutro y después básico.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO): δ = 1,2 a 1,7 (m; 8H; e, j, k y l); 1,73 (quint; 2H; e); 2,06 (t; 2H; i); 2,6 a 2,9 (M; 2H; m); 3,0 a 3,2 (m; 3H; f y n); 4,10 a 4,35 (m; 2H; o y o'); 6,39 (s; 1H; p'); 6,47 (s; 1H; p); 7,11 (s; 2H; r); 7,55 (d; 2H; b); 7,87 (t; 1H; h); 8,47 (d; 2H; a).

→ Piridina Diazo Cetona Biotinilada (PyDCB) (19)



La hidrazona 18 (177,2 mg; 438 µmoles; 1,0 eq.) se disuelve parcialmente en DMF (22 ml; 20 mM) antes de enfriarse a 0°C para que se añadan la tetrametilguanidina (448 µl; 3,56 mmoles; 8,14 eq.), el tamiz molecular 3Å (722 mg; 3,8 veces la masa del reactivo utilizado) y el óxido de manganeso (2,387 g; 35,6 mmoles; 81,4 eq.). La suspensión se agita 20 minutos, después se filtra sobre un tapón de celita de 1 cm de alto, el tapón se aclara con metanol hasta que el filtrado fluya incoloro. La solución se evapora en seco y después se recoge con 20 ml de DCM/MeOH: 90/10 y se lava con una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 0,25 M. Se forma un precipitado. Después del análisis, el precipitado y la fase orgánica se ensamblan y se evaporan en seco. Con el fin de disolverse en 100 ml de mezcla

de DCM/MeOH: 90/10 y lavado con 100 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 0,05 M. La fase orgánica se recupera, se seca con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidra, se filtra y se evapora en seco.

m = 42,8 mg

5

Rendimiento: un 24,3%

Método HPLC: básico.

10 **RMN <sup>1</sup>H** (200 MHz, DMSO): δ = 1,20 a 1,74 (m; 8H; e, j, k y l); 1,73 (quint; 2H; e); 2,07 (t; 2H; i); 2,6 a 2,9 (M; 2H; m); 3,00 a 3,25 (m; 3H; f y n); 4,10 a 4,35 (m; 2H; o y o'); 6,37 (s; 1H; p'); 6,44 (s; 1H; p); 6,94 (d; 2H; b); 7,90 (t; 1H; h); 8,35 (d; 2H; b).

15 **Resultados y conclusiones:**

**Se ha demostrado que la síntesis de un compuesto que comprende una función diazo metilo conjugada con un núcleo piridina en *alfa* y unida a un grupo de reconocimiento (biotina) en *alfa'* se puede realizar con un buen rendimiento.**

20 **Ejemplo 3: Demostración de la estabilidad del PyDB o del PyDCB con respecto a una molécula de BBP (bis-bio-PDAM) en medio líquido a temperatura ambiente:**

**Objetivo:**

25 El objetivo es demostrar la estabilidad en medio líquido de las moléculas PyDB o PyDCB en comparación con una molécula de segunda generación. Para ello, se efectúa un estudio de estabilidad en condiciones extremas en las que los compuestos se conservan a 125 mM en una mezcla DMSO/metanol 96/4 a temperatura ambiente (22°C +/- 1°C). Cabe señalar que son unas condiciones extremas de conservación.

30 **Modo de realización:**

35 Los tres compuestos PyDB, PyDCB y BBP, representados en la Figura 2, se solubilizan a 125 mM en una mezcla DMSO/metanol 96/4 y se conservan a temperatura ambiente (22°C a más o menos 1°C). Se inyecta entonces regularmente en HPLC (método básico, cadena HPLC Waters) 2 µl de estas soluciones, a fin de medir la degradación del producto principal por integración del conjunto de los picos del cromatograma (PDA Max Plot sobre el programa Empower 2). Se detalla entonces la evolución de la pureza del compuesto inicial en función del tiempo, como se representa bien en la Figura 5.

40 **Resultados y conclusiones:**

40 **Se demuestra sin ambigüedad que el BBP se degrada en algunos días (< 10% de pureza a 10 días) mientras que las dos moléculas de cuarta generación PyDB y PyDCB son todavía estables en más del 80% al final de este intervalo de tiempo.**

45 **La presencia de la unidad piridinilo en *alfa* de la función diazo estabiliza esta última, por una deslocalización electrónica que hace la función diazo menos sensible a la hidrólisis. La presencia del marcador en *alfa'* estabiliza también considerablemente esta función haciéndola menos susceptible a la hidrólisis en medio acuoso.**

50 **Ejemplo 4: Demostración de la estabilidad de PyDB con respecto a una molécula de BBP, en forma seca a +4°C:**

**Objetivo:**

55 Demostrar la estabilidad en seco de las moléculas PyDB o PyDCB en comparación a una molécula BBP de segunda generación.

**Modo de realización:**

60 Los dos compuestos PyDB y BBP se solubilizan a 250 mM en una solución de Tris HCl 10 mM pH 7,5 y Trehalosa a 10%. Las soluciones se liofilizan durante una noche por alícuotas de 50 nmoles. Los productos secos se conservan después a +4°C. Regularmente, se solubilizan estas alícuotas en metanol y se inyecta en HPLC (Waters) 15 µl de estas soluciones, a fin de medir la degradación del producto principal por integración del conjunto de los picos del cromatograma (PDA Max Plot sobre el programa Empower). Se detalla entonces la evolución de la pureza del compuesto inicial en función del tiempo, como se representa bien en la Figura 6.

65

**Resultados y conclusiones:**

De la misma manera que en el ejemplo 3, pero de manera aún más notable, se demuestra que el BBP no soporta la liofilización (> 60% de degradación durante esta etapa) mientras que el PyDB y el PyDCB se quedan perfectamente estables durante esta operación. Además, una estancia de más de un mes en estado seco y a 4°C muestra muy poca degradación (superior al 80% de pureza para los dos marcadores de cuarta generación).

Otra vez, se demuestra que la presencia de la unidad piridinilo en *alfa* de la función diazo estabiliza esta última, por una deslocalización electrónica que hace la función diazo menos sensible a la hidrólisis.

**Ejemplo 5: Marcaje de ácidos nucleicos del PyDB con respecto a una molécula de BBP con purificación intermedia:****Objetivo:**

Demostrar la eficacia del marcaje de los ácidos nucleicos por una molécula PyDB en comparación a una molécula de segunda generación (BBP).

Para ello, se marcan unos amplicones de ARN, fragmentos de la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis* de 174 bases, procedentes de una reacción de amplificación (NASBA, kit NucliSens Basic Kit de bioMérieux B.V.- Boxtel – Países bajos) se marcan a la biotina por reacción con unos marcadores diazo. Los productos de la reacción de marcaje se detectan por hibridación sobre un chip de ADN de Affymetrix (Custom DNA Chip Combo Myco descrito en J. Clin. Microbiol., 37(1), p. 49-55, A. Troesch *et al.*, 1999).

**Modo de realización:**

En un tubo, se mezclan:

- 18 µl de solución de marcador a 250 mM (DMSO/metanol 96/4), se trata o bien del PyDB o bien del BBP,
- 12 µl de DMSO,
- 15 µl de tampón NASBA 0,5X (Kit "NucliSens Basic Kit Easy Q bioMérieux"),
- 35 µl de tris HCL 1 M,
- 5 µl de NASBA 0,1 X (reacción de amplificación NASBA diluida diez veces, amplicón de 174 bases), y
- 15 µl de HCl 20 mM.

La solución se mezcla por vórtice y después se incuba 10 minutos a 65°C.

**Purificación de los ácidos nucleicos:**

Los ácidos nucleicos marcados se purificaron sobre columna QiaQuick (PCR purification kit, QiaQuick, Qiagen, Hilden, Alemania) utilizando el protocolo de purificación recomendado por el fabricante. El volumen de elución es de 100 µl.

**Hibridación sobre chip de ADN:**

Después de la purificación, los ácidos nucleicos marcados se transfieren en 400 µl de tampón de hibridación. Las muestras se hibridan sobre los chips de ADN diseñados para el análisis de la secuencia M20940 "GenBank" del ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Este chip de ADN se ha descrito por A. Troesch *et al.* en un artículo publicado en J. Clin. Microbiol., 37(1), p. 49-55, 1999.

Las etapas de hibridación se han realizado sobre estaciones fluidicas FS 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA) utilizando el protocolo de hibridación y los tampones descritos en la publicación anterior de A. Troesch *et al.*

La hibridación se revela por el acoplamiento de la estreptavidina (SA) marcado con ficoeritrina (PE), que interactúa con la biotina de los marcadores utilizados en las condiciones siguientes: 300 µl de agua pura; 300 µl de tampón tris 100 mM pH 7/NaCl 1 M/tween 20 0,05%/antiespumante al 0,005%; 6 µl de BSA (50 mg/ml); 6 µl de SA-PE (300 µg/ml).

**Lectura del chip de ADN:**

La lectura de la fluorescencia emitida a la superficie del chip de ADN después del marcaje y de la hibridación así como la generación de los datos en términos de intensidad de la señal y de porcentaje de homología, se realizan por los sistemas de lectura y el programa proporcionado por Affymetrix (Scanner Gene Chip Array y el programa GCOS). El sistema de lectura proporciona unas intensidades en señal y ruido de fondo expresadas en rfu ("relative

fluorescence unit”, o “unidad de fluorescencia relativa”). El porcentaje de homología (%BC o %Right en la Figura 7 pero también posteriormente en las Figuras 8 y 10) se da con respecto a una secuencia de referencia que es, en este caso, la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

5 Los resultados en términos de intensidad media de la señal (Med), del ruido de fondo (Med Bckgd) y del porcentaje de homología (%Right) se dan en el gráfico de la Figura 7 para los marcadores BBP y PyDB.

De manera general, el que se busca prioritariamente es un porcentaje de homología superior al 90%. En segundo lugar, lo que se desea es una señal específica elevada y un ruido de fondo débil.

10

**Resultados y conclusiones:**

**Este ejemplo muestra que el marcador PyDB da una señal fluorescente tres veces superior a la señal dada por la molécula BBP de referencia.**

15

**Teniendo en cuenta la gran estabilidad del PyDB, este marcador demuestra su superioridad con respecto a las moléculas de las anteriores generaciones.**

20

**Ejemplo 6: Marcaje de los ácidos nucleicos por el PyDB con respecto a una molécula de BBP, sin purificación intermedia:**

**Objetivo:**

25

Se busca demostrar lo mismo que en el ejemplo 5, pero colocándose en unas condiciones desfavorables, en las que un exceso de marcador no se elimina por purificación.

**Modo de realización:**

30

En un tubo de 1 ml, se mezclan:

- 5 µl de solución de marcador a 8 mM (DMSO/Metanol 96/4). Se trata o bien del PyDB, o bien del BBP,
- 5 µl de NASBA 0,1 X (Kit NucliSens Basic Kit de bioMérieux),
- 5 µl de tris HCL 1M, y
- 5 µl de HCl 20 mM.

35

La solución se ha mezcla por vórtice y después se incuba 10 minutos a 65°C. Los ácidos nucleicos así marcados no se purifican, sino que directamente se hibridan.

**Hibridación sobre chip de ADN:**

40

Los ácidos nucleicos marcados se transfieren sin purificación en 480 µl de tampón de hibridación. Las muestras se hibridan sobre los chips de ADN de la misma manera que para el ejemplo anterior.

**Lectura del chip de ADN:**

45

Los resultados en términos de intensidad, de ruido de fondo, y de porcentaje de homología, para los marcadores BBP y PyDB, se presentan en el gráfico de la Figura 8.

**Resultados y conclusiones:**

50

**Este ejemplo muestra que el marcador PyDB presenta, debido a su estructura, un ruido de fondo reducido con respecto a la molécula de referencia BBP. Las señales específicas significativas de una hibridación específica se mejoran también y el porcentaje de homología, relativamente bajo para el BBP, se vuelve más importante para el PyDB (a 2 mM).**

55

**De nuevo, se demuestra la superioridad de las moléculas de cuarta generación con respecto a las de las anteriores generaciones.**

**Ejemplo 7: Evaluación de la estabilidad sobre 24 horas de un amplicón marcado por PyDB:**

60

**Objetivo:**

Se busca demostrar que un amplicón ARN marcado, puede ser hibridado hasta 24 horas sobre un chip de ADN sin perder su intensidad de fluorescencia. Lo que demuestra la estabilidad de la unión ARN-marcador.

65

**Modo de realización:**

En un tubo, se mezclan:

- 5 • 5 µl de solución de marcador (pyDB o BBP) a 10 mM en DMSO/MeOH (96/4),
- 5 µl de producto de amplificación NASBA 0,1 X (Kit NucliSens Basic Kit de bioMérieux),
- 5 µl de Tris HCL 1 M, y
- 5 µl de agua.

10 La solución se mezcla por vórtice y después se incuba 10 minutos a 65°C.

Purificación de los ácidos nucleicos:

15 Los ácidos nucleicos marcados se han purificado sobre columna QiaQuick (PCR purification kit, Qiagen) utilizando el protocolo de purificación recomendado por el fabricante. El volumen de elución es de 100 µl.

Hibridación sobre chip de ADN:

20 Después de la purificación, los ácidos nucleicos marcados se transfieren en 400 µl de tampón de hibridación. Las muestras se hibridan sobre los chips de ADN diseñados para el análisis de la secuencia M20940 "GenBank" del ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Este chip de ADN se describe en la publicación de A. Troesch *et al.*, J. Clin. Microbiol., 37(1), p. 49-55, 1999.

25 Las etapas de hibridación se realizaron inyectando 80 µl de la mezcla de hibridación en el chip y después manteniendo este en un horno de hibridación a 45°C durante 0,5 hora, 2 horas, 6,5 horas o 24 horas.

30 La hibridación se reveló por el acoplamiento de la estreptavidina (SA) marcada con ficoeritrina (PE), que interactúa con la biotina de los marcadores utilizados en las condiciones siguientes: 300 µl de agua pura; 300 µl de tampón tris 100 mM pH 7/NaCl 1 M/tween 20 al 0,05%/antiespumante 0,005%; 6 µl de BSA (50 mg/ml); 6 µl de SA-PE (300 µg/ml).

Lectura del chip de ADN:

35 La lectura de la fluorescencia emitida en la superficie del chip de ADN después del marcaje y de la hibridación, así como la generación de los datos en términos de intensidad de la señal y del porcentaje de homología se realizan mediante el sistema de lectura y el programa proporcionado por Affymetrix. El sistema de lectura proporciona unas intensidades en señal y ruido de fondo expresadas en rfu ("relative fluorescence unit", o "unidad de fluorescencia relativa"). El porcentaje de homología se da con respecto a una secuencia de referencia que es, en este caso, la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

40 Los resultados en términos de intensidad media de la señal (Med), en función de la duración de hibridación se dan en la Figura 9 para el marcador de cuarta generación, PyDB.

45 Muestran que la señal de fluorescencia sigue estable, incluso tiende a subir en función de la duración de la hibridación.

**Resultados y conclusiones:**

50 **Este ejemplo muestra que los amplicones marcados con PyDB siguen siendo perfectamente estables durante la hibridación que puede prolongarse durante 24H (interés particular para las hibridaciones largas y expresión de los genes en cancerología), véase la Figura 9.**

55 **Se observa incluso un aumento de la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo, que se debe a una mejor hibridación de los amplicones (la cinética de hibridación es lenta).**

**Se demuestra así la estabilidad de la unión marcador-ácido nucleico.**

**Ejemplo 8: Comparación de la eficacia de marcaje de las moléculas descritas en la presente invención con respecto a la de una tecnología comercialmente disponible (ULS RNA Labelling Kit):**

60 **Modo de realización:**

65 Los amplicones ARN se preparan por una amplificación NASBA como anteriormente y se marcan con las moléculas BBP y PyDB.

En un tubo, se mezclan:

- 5 µl de NASBA 1X (Kit NucliSens Basic Kit de bioMérieux),
- 5 µl de solución de marcador a 20 mM (BBP, o PyDB en DMSO/Metanol 96/4,
- 5 • 5 µl de Tris HCL 1 M pH 7,4, y
- 5 µl de agua.

La solución se ha mezclado por vórtice y después se ha incubado 10 minutos a 65°C.

10 Para el marcaje con el kit comercial "ULS RNA Labelling Kit" de Kreatech (Ámsterdam, Países bajos), se ha seguido el protocolo recomendado por el proveedor. En resumen, se mezcla:

- 20 µl de NASBA 1X (Kit NucliSens Basic Kit, bioMérieux B.V., Boxtel, Países bajos),
- 1 µl de solución de marcador,
- 15 • 3 µl Tampón 10x, y
- 6 µl de agua.

La solución se ha incubado 30 minutos a 85°C

### 20 **Purificación de los ácidos nucleicos:**

Los ácidos nucleicos marcados con la ayuda de las moléculas BBP o PyDB se han purificado sobre columna QiaQuick (PCR purification kit, Qiagen) utilizando el protocolo de purificación recomendado por el fabricante. El volumen de elución es de 100 µl. Para los ácidos nucleicos marcados con la ayuda del kit comercial, ULS RNA Labelling Kit, se ha utilizado la purificación recomendada y proporcionada por Kreatech (Ámsterdam, Países bajos). El volumen final es de 30 µl, a los que se añaden 100 µl de una solución de boqueo recomendada por esta compañía.

### 30 **Hibridación sobre chip de ADN:**

Después de la purificación, los ácidos nucleicos marcados se transfieren en 400 µl de tampón de hibridación (BBP o PyDB) o 370 µl de tampón de hibridación de Kreatech. Dichos ácidos nucleicos se hibridan sobre los chips de ADN diseñados para el análisis de la secuencia M20940 "GenBank" del ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*.

35 Este chip de ADN se describe en la publicación de A. Troesch *et al.*, J. Clin. Microbiol., 37(1), p. 49-55, 1999. Las etapas de hibridación se han realizado en las estaciones fluídicas (Affymetrix FS 450) utilizando el protocolo de hibridación y los tampones descritos en esta publicación de A. Troesch *et al.* La hibridación se revela mediante el acoplamiento de la estreptavidina (SA) marcada a la ficoeritrina (PE), que interactúa con la biotina de los marcadores utilizados en las condiciones siguientes: 300 µl de agua pura; 300 µl de tampón tris 100 mM pH 7/NaCl

40 1 M/tween 20 al 0,05%/antiespumante al 0,005%; 6 µl de BSA (50 mg/ml); 6 µl de SA-PE (300 µg/ml).

### Lectura del chip de ADN:

45 La lectura de la fluorescencia emitida en la superficie del chip de ADN después del marcaje y la hibridación así como la generación de datos en términos de intensidad de la señal y de porcentaje de homología se realizan mediante los sistemas de lectura y el programa proporcionado por Affymetrix (Gen Chip array y programa GCOS). El sistema de lectura proporciona unos valores medios de las intensidades en señal (Median) y ruido de fondo (MedBgd) expresados en rfu ("relative fluorescence unit", o "unidad de fluorescencia relativa"). El porcentaje de homología (% right), también denominado "base call percentage" (%BC) se da con respecto a una secuencia de referencia que es

50 en este caso la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los resultados en términos de intensidad media de la señal (Med), del ruido de fondo (MedBgd) y del porcentaje de homología (%Right o %BC) se dan en la Figura 10 para los marcadores BBP, PyDB así como para el kit competidor (Concurrent).

### 55 **Resultados y conclusiones:**

60 **Se constata que la tecnología que utiliza los marcadores cisplatina (ULS RNA Labelling Kit), aplicada exactamente en las condiciones descritas por el proveedor, tiene un potencial de marcaje muy inferior a la solución técnica aportada por la presente invención, ya que con este kit comercial, se necesita añadir más de cuatro veces la concentración de ARN para obtener una señal claramente independiente del ruido de fondo (Concurrent 4X, Figura 10), pero que permanece, en todos los casos, más de diez veces más bajo que el marcador realizado con las moléculas BBP y diez y ocho veces más bajo que el marcaje realizado con las moléculas PyDB.**

65

En todos los casos, el porcentaje de identificación (%BC o %Right) sigue siendo el mismo.

El marcaje sobre los enlaces internucleosídicos en comparación con otra técnica de marcaje permite por lo tanto obtener una sensibilidad de detección mucho mejor y eso sea cuales sean las generaciones de moléculas. La cuarta generación muestra, por su parte, de nuevo su superioridad en este nuevo ejemplo.

**Ejemplo 9: Comparación de la solubilidad de dos marcadores diazo de tercera generación (para Nitro DCB y *meta* Nitro DCB) y de dos marcadores de cuarta generación (PyDB y PyDCB):**

**Objetivo:**

Se quiere demostrar que la presencia del núcleo piridina sobre un reactivo de marcaje diazo mejora la solubilidad de la molécula.

**Modo de realización:**

**Determinación de los épsilon ( $\epsilon$ ) molares de los marcadores:**

Se pesa precisamente algunos miligramos de marcador (5-15 mg) que se solubiliza a 100 mM en DMSO (totalmente soluble). Se diluye al 1/10 esta solución en el MeOH y después de nuevo al 1/100 en MeOH (al final dilución al 1/1000). Se mide el espectro UV de esta solución, a fin de determinar el  $\lambda_{\max}$ , al cual se mide la absorbancia. Esta medición permite calcular el  $\epsilon$  molar de cada marcador (ley de Beer Lambert).

**Determinación de la solubilidad en agua de los marcadores:**

Se pesan precisamente algunos mg de marcador (5-15 mg) que se solubilizan a 100 mM en agua (parcialmente soluble). Se agita con la ayuda de un vórtice y se centrifuga. Se extrae el sobrenadante que se diluye al 1/10 o al 1/100 en el MeOH. Se mide el espectro UV de los marcadores asegurándose que no hubo degradación. Se mide la absorbancia de  $\lambda_{\max}$  y se calcula la concentración del marcador en el sobrenadante utilizando el valor de  $\epsilon$  molar determinado anteriormente, es decir la solubilidad del marcador en agua (Figura 11)

**Resultados y conclusiones:**

Se observa en la Figura 11 que el PyDB es seis veces más soluble en agua que las moléculas de tercera generación *para* Nitro DCB y *meta* Nitro DCB. Esta ganancia de solubilidad se debe únicamente a la presencia del núcleo piridinilo. El PyDB es noventa veces más soluble que las moléculas de tercera generación *para* Nitro DCB y *meta* Nitro DCB. Esta ganancia de solubilidad se aporta también en mayor parte por el núcleo piridina bisustituido.

Se ha demostrado también el impacto muy importante del núcleo piridinilo sobre la solubilidad final estas moléculas.

Al resultar que el núcleo piridina es un núcleo conocido por su carácter básico, se podía prever una estabilización de la función diazometilo y no, por el contrario, una falta de reactividad frente a unos ácidos nucleicos. En efecto, el mecanismo de la reacción diazo/fosfato se basa en un intercambio de protón. La presencia de un núcleo que atrapa el protón (piridina) podría haber inhibido la reacción, ahora bien, se ha observado que este fenómeno aparecía sólo con unas bases más fuertes, como la piperidina. La reacción de marcaje se efectúa a pH 7 en medio tamponado.

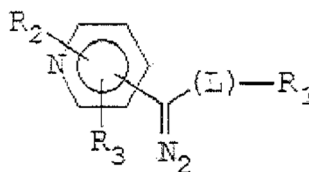
En el ejemplo en el que el marcador está en *alfa'*, se podía esperar unos problemas de reactividad con los fosfatos, debido a problemas de gen estérico incrementado. Otra vez, el efecto de estas moléculas es sorprendente.

Además, la generación de diaestereoisómeros durante la alquilación de los fosfatos tenía el riesgo de perturbar la hibridación y por lo tanto la detección de los ácidos nucleicos. Esto era previsible y dejaba pensar que este tipo de marcador sería menos eficaz. Por lo tanto, no era evidente realizar este tipo de moléculas y obtener tan buenos resultados de marcaje.



REIVINDICACIONES

1. Reactivo de marcaje de fórmula (C):



5

en la que:

10 • R<sub>1</sub> representa un marcador detectable capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable y seleccionado entre:

- las enzimas que producen una señal por colorimetría, fluorescencia o luminiscencia,

15

- los cromóforos,

- los grupos de densidad electrónica detectable por microscopia electrónica o por su propiedad eléctrica,

- los grupos detectables electro-químicamente,

20

- los derivados de un complejo de hierro,

- las moléculas radioactivas,

25

- las parejas ligando/anti-ligandos seleccionadas entre las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del nucleótido,

- los compuestos fluorescentes de peso molecular inferior a 1000 g/mol,

30

- los haptenos de peso molecular inferior a 1000 g/mol,

- los fluoróforos,

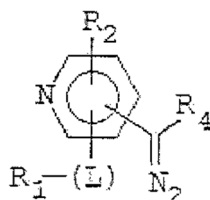
35

• R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan independientemente el uno del otro: H, CONHR, COOR con R que corresponde a un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o a un grupo aromático monocíclico, y

40

• L es un brazo de enlace que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes que comprende una unidad -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)-, repetida de 1 a 20 veces.

2. Reactivo de marcaje de fórmula (D):



45 en la que:

• R<sub>1</sub> representa un marcador detectable capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable y seleccionado entre:

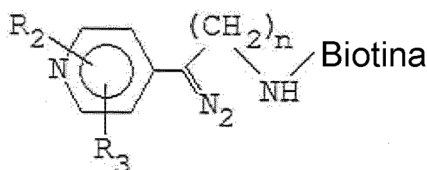
50

- las enzimas que producen una señal por colorimetría, fluorescencia o luminiscencia,

- los cromóforos,

- los grupos de densidad electrónica detectable por microscopia electrónica o por sus propiedad eléctrica,
- los grupos detectables electro-químicamente,
- 5 - los derivados de un complejo de hierro,
- las moléculas radioactivas,
- las parejas ligando/anti-ligandos seleccionadas entre las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del nucleótido,
- 10 - los compuestos fluorescentes de peso molecular inferior a 1000 g/mol,
- 15 - los haptenos de peso molecular inferior a 1000 g/mol,
- los fluoróforos,
- R<sub>2</sub> representa: H, CONHR, COOR con R que corresponde a un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o a un grupo aromático monocíclico,
- 20 • R<sub>4</sub> representa: H, un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o un grupo aromático monocíclico, y
- 25 • L es un brazo de enlace que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes que comprende una unidad -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)-, repetida de 1 a 20 veces.

3. Reactivo de marcaje de fórmula (E):

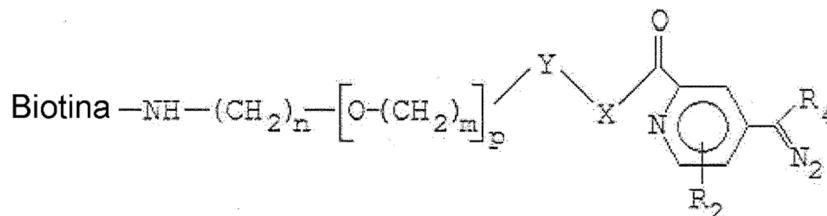


30 en la que:

- R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan independientemente el uno del otro: H, CONHR, COOR con R que corresponde a un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o a un grupo aromático monocíclico, y
- 35 • n es un número entero comprendido entre 1 y 12.

4. Reactivo de marcaje de fórmula (F):

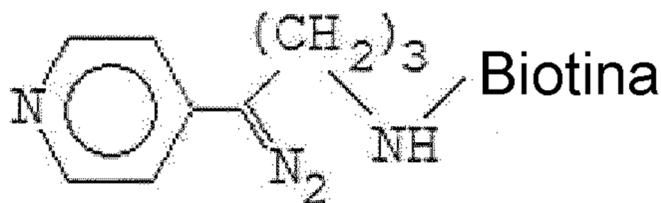
40



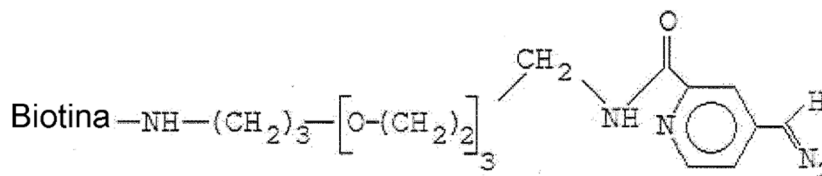
en la que:

- 45 • R<sub>2</sub> representa: H, CONHR, COOR con R que corresponde a un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o a un grupo aromático monocíclico,
- R<sub>4</sub> representa: H, un grupo hidrocarbonado alifático saturado que comprende de uno a seis átomos de carbono o un grupo aromático monocíclico,
- 50 • -Y-X representa -CH<sub>2</sub>NH-, -CONH-, -NHCO-, -CH<sub>2</sub>O- o -CH<sub>2</sub>S-, y
- m, n y p son cada uno, independientemente los unos de los otros, un número entero comprendido entre 1 y 12.

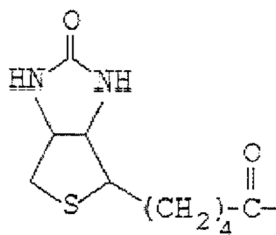
5. Reactivo de marcaje según la reivindicación 3, de fórmula (G):



5 6. Reactivo de marcaje, según la reivindicación 4, de fórmula (H):



10 7. Reactivo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que R<sub>1</sub> está constituido por un resto D-Biotina de fórmula (I):



15 8. Procedimiento de síntesis de un reactivo de marcaje, según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 5, que comprende las etapas siguientes:

- a) se pone un derivado de ácido carboxílico aromático en reacción con el enolato de una lactona (reacción de tipo Claisen) para formar un precursor cíclico,
- 20 b) dicho precursor cíclico se abre después con un ácido halogenado para formar una cetona aromática halogenada,
- c) la función carbonilo de la cetona aromática halogenada se protege mediante un grupo protector para formar un precursor protegido,
- 25 d) dicho precursor protegido se somete a una reacción de aminación (de tipo Gabriel) para formar un precursor aminado,
- e) dicho precursor aminado se desprotege para liberar la función amina, poniéndose en reacción dicha función amina en reacción con un marcador detectable cuya función carboxílica se activa para formar un precursor que
- 30 comprende un marcador detectable,
- f) el precursor marcado se somete a una reacción de desprotección de la función carbonilo para formar un precursor marcado y carbonilado, finalmente
- 35 g) el precursor marcado y carbonilado se transforma en un reactivo de marcaje, tal como se ha descrito anteriormente, por una transformación de la función carbonilo en una función diazo.

9. Procedimiento de síntesis de un reactivo de marcaje, según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 o 6, que comprende las etapas siguientes:

- 40 a) se esterifica un ácido aromático di-carboxílico para formar un diéster,
- b) se sustituye este diéster regio-selectivamente con un compuesto derivado del etilenglicol aminado mono protegido para formar un precursor protegido sobre la función carboxílica y sobre la función amina,

- c) dicho precursor se reduce después en alcohol y se oxida en aldehído,
- 5 d) el aldehído, sintetizado en la etapa c), se somete a un tratamiento ácido a fin de, concomitantemente, proteger esta función desprotegiendo al mismo tiempo la función amina, para llevar a un acetal aminado,
- e) dicho acetal aminado se pone en reacción con un marcador detectable cuya función carboxílica se activa para formar un precursor que comprende un marcador detectable,
- 10 f) el precursor marcado se somete a una reacción de desprotección de la función carbonilo para formar un precursor marcado y carbonilado, finalmente
- 15 g) el precursor marcado y carbonilado se transforma en un reactivo de marcaje, tal como se ha descrito anteriormente, por una transformación de la función carbonilo en una función diazo según una reacción del tipo de Bamford Stevens.
- 20 10. Procedimiento para el marcaje de una molécula biológica, que comprende poner en contacto en solución homogénea, en un tampón acuoso que contiene al menos un 50% de agua, de una molécula biológica y de un reactivo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 25 11. Procedimiento de marcaje y de fragmentación de un ácido nucleico mono o bicatenario comprende las etapas siguientes:
- fragmentar el ácido nucleico,
  - fijar un marcador sobre al menos uno de los fragmentos por medio de un reactivo de marcaje seleccionado entre los reactivos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, acoplándose dicho reactivo de manera covalente y mayoritaria sobre al menos un fosfato de dicho fragmento.
- 30 12. Procedimiento, según la reivindicación 11, caracterizado por que la fragmentación y el marcaje se efectúan en dos etapas.
- 35 13. Procedimiento, según la reivindicación 11, caracterizado por que la fragmentación y el marcaje se efectúan en una etapa.
- 40 14. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado por que el marcaje se efectúa en solución homogénea acuosa que contiene al menos un 50% de agua.
- 45 15. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado por que la fragmentación se efectúa por vía enzimática, física o química.
- 50 16. Kit de detección de un ácido nucleico diana que comprende un ácido nucleico marcado obtenido por el procedimiento tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15.
- 55 17. Soporte sólido sobre el cual se fija un reactivo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
18. Procedimiento de captura de ácidos nucleicos que comprende las etapas siguientes:
- disponer de un soporte sólido sobre el cual se fija directa o indirectamente al menos una molécula biológica obtenida tal como se define en la reivindicación 10, o un ácido nucleico obtenido mediante el procedimiento tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, comprendiendo la molécula biológica o el ácido nucleico una función diazometilo,
  - poner en contacto una muestra biológica susceptible de contener unos ácidos nucleicos libres, y
  - lavar el soporte sólido en el que la o las moléculas están fijadas de manera covalente al menos con un ácido nucleico.

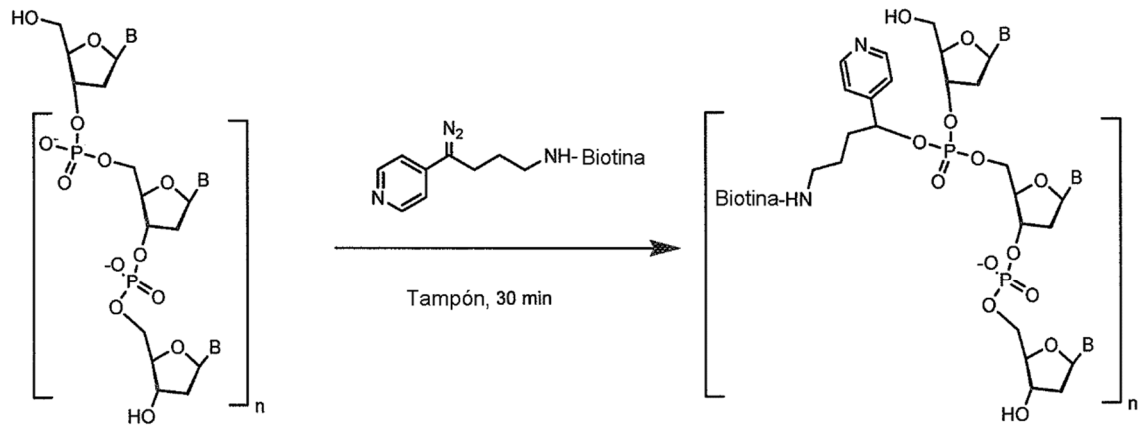


Figura 1

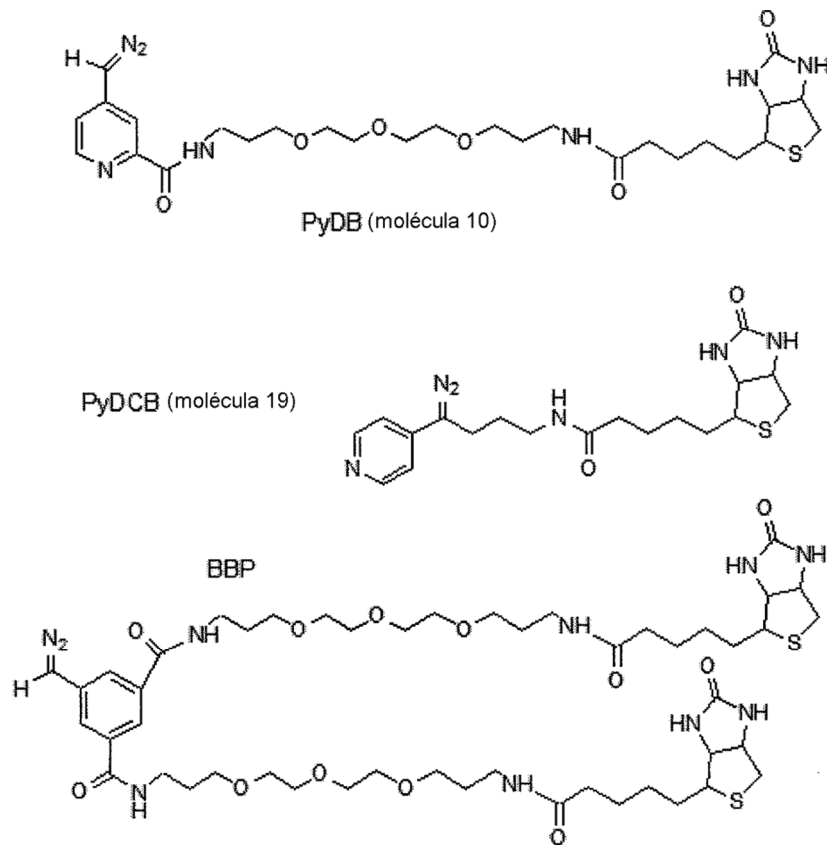


Figura 2

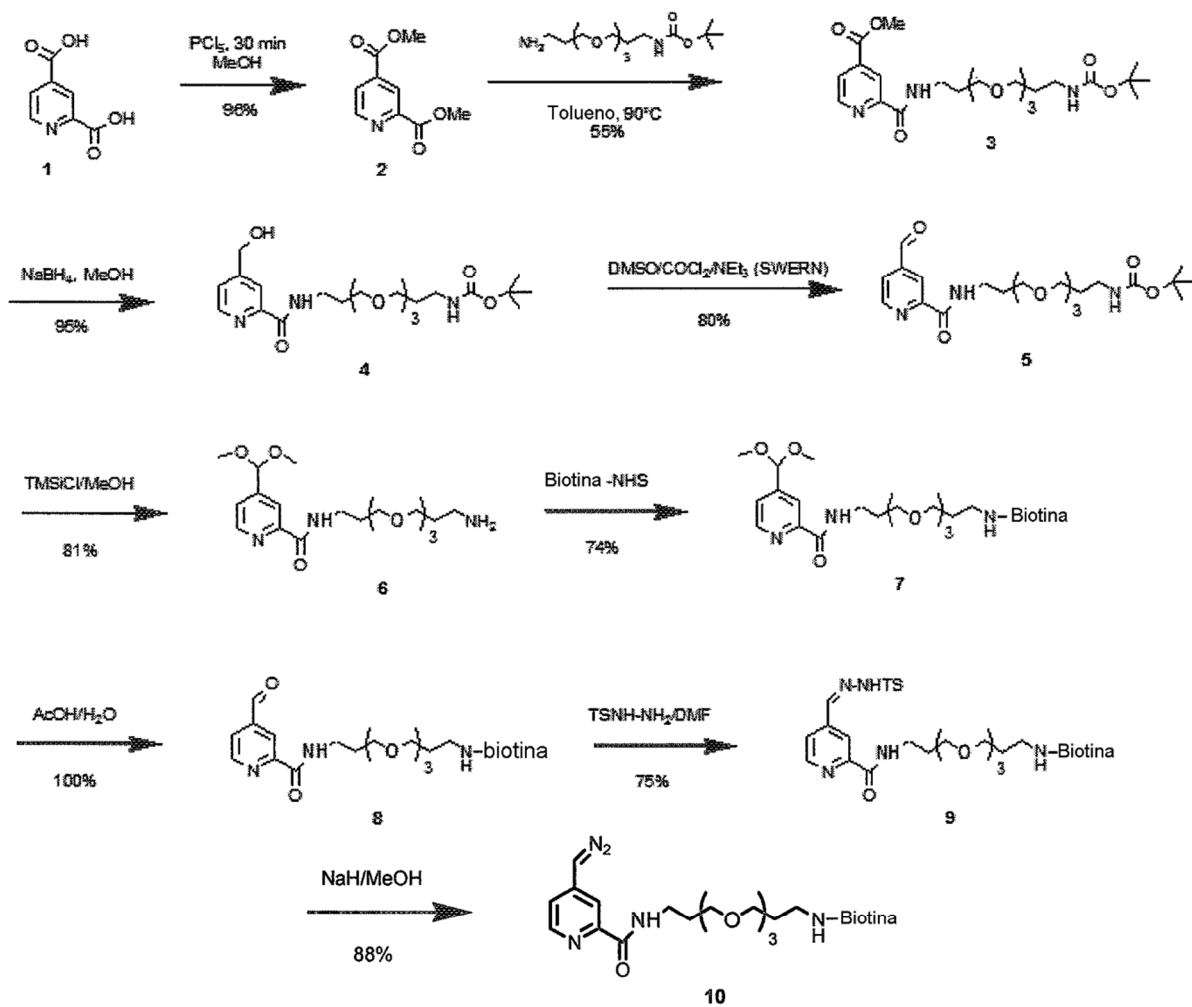


Figura 3

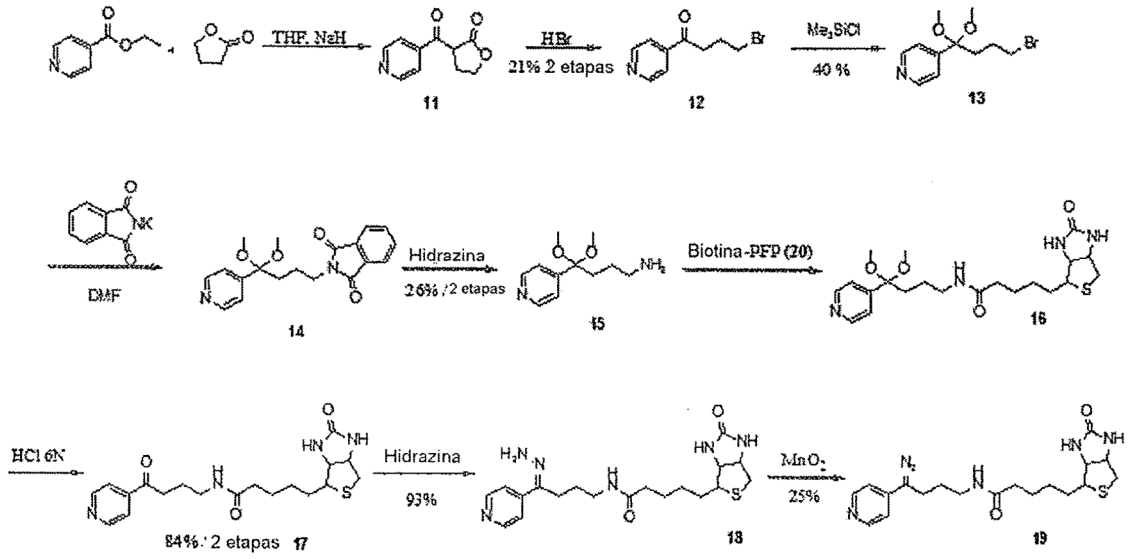


Figura 4

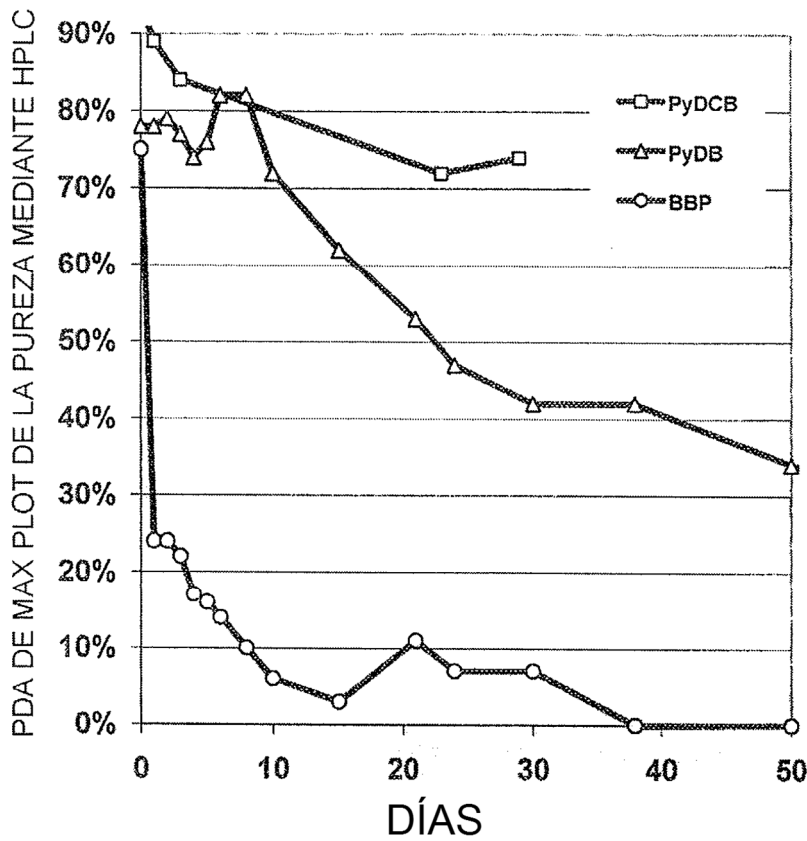


Figura 5

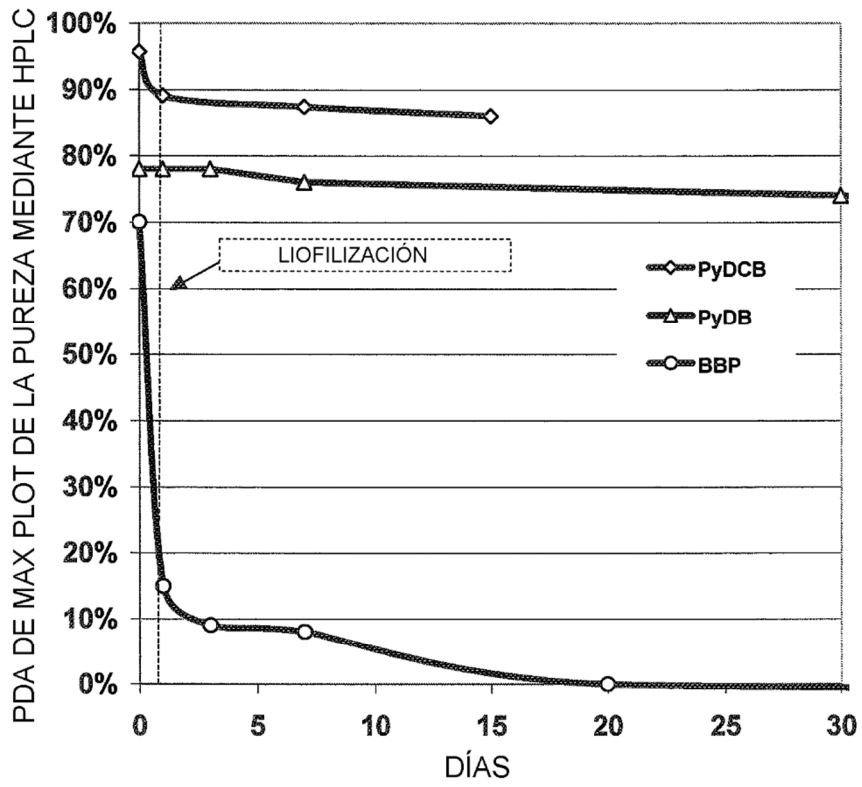


Figura 6

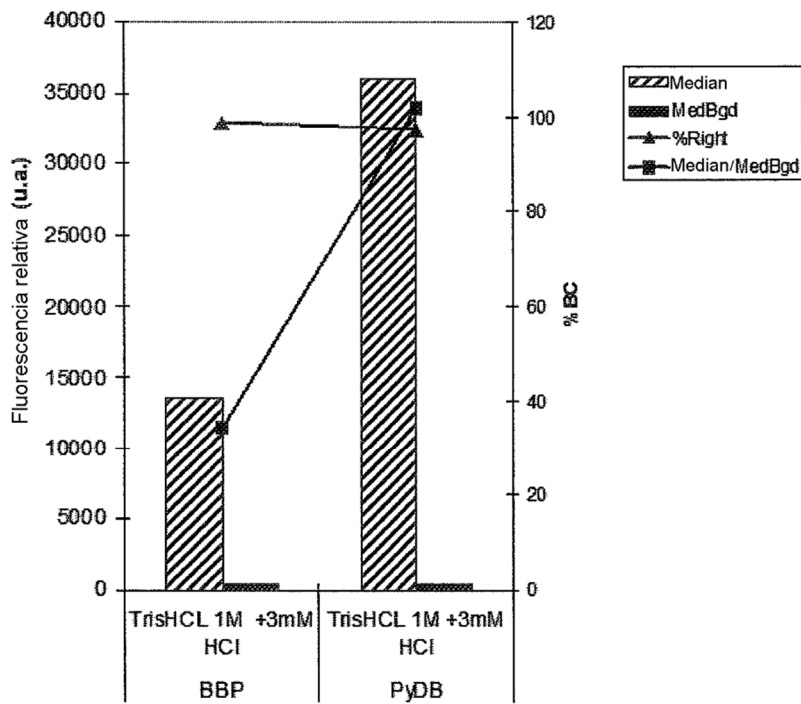


Figura 7



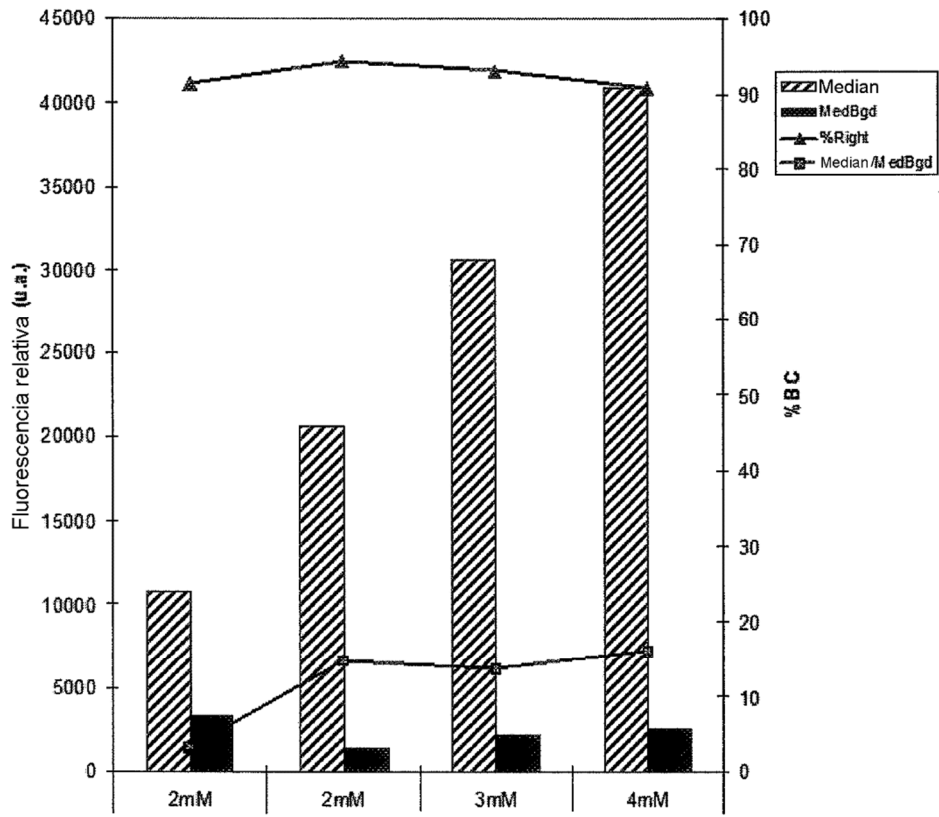


Figura 8

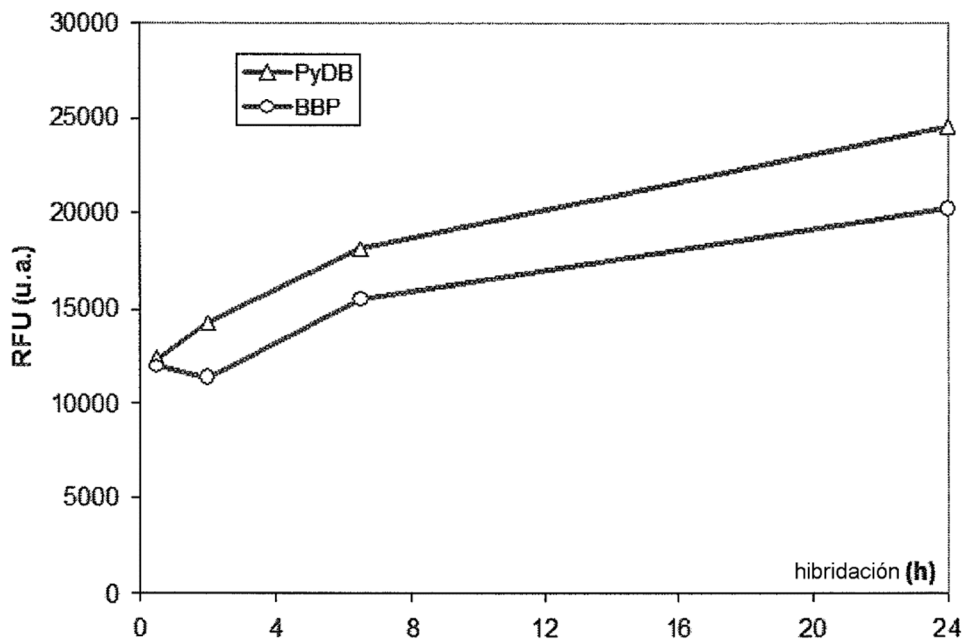


Figura 9

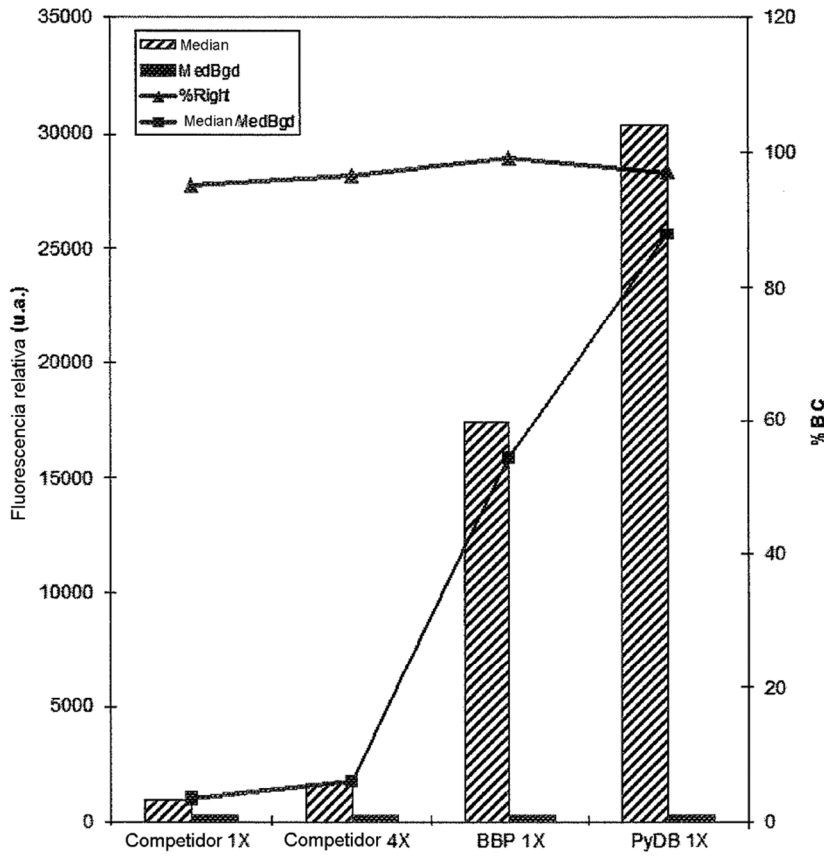


Figura 10

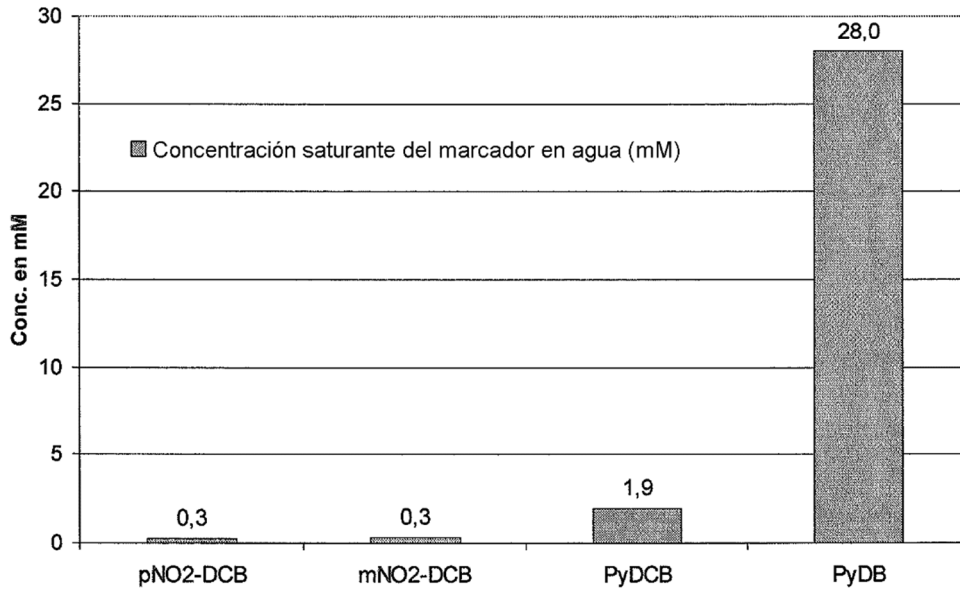


Figura 11