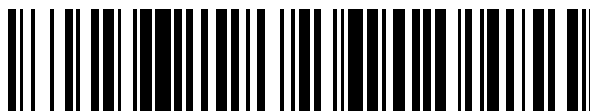


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 581**

51 Int. Cl.:

C07H 19/167 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 9/10 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2015 PCT/EP2015/069879**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16030546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2015 E 15759723 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3186266**

54 Título: **Análogos de S-adenosil-L-cisteína como cofactores para metiltransferasas**

30 Prioridad:

29.08.2014 GB 201415349

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

27.07.2020

73 Titular/es:

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (100.0%)
K.U. Leuven R&D, Waaistraat 6, Box 5105
3000 Leuven, BE**

72 Inventor/es:

**NEELY, ROBERT;
LEEN, VOLKER y
HOFKENS, JOHAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 775 581 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

Análogos de S-adenosil-L-cisteína como cofactores para metiltransferasas

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere a análogos de cofactores para reacciones de catálisis que implican metiltransferasas, así como a la modificación dirigida de proteínas y polinucleótidos (ADN y ARN) utilizando una transferencia catalizada por metiltransferasa de un grupo químico, una etiqueta o un marcador a partir de un análogo de cofactor preparado sintéticamente a la biomolécula de interés.

Antecedentes de la invención

- 10 Las enzimas son los caballos de batalla de nuestras células. Parte de la clave de su éxito es que son capaces de proporcionar una especificidad de sustrato suprema en un entorno químicamente complejo. Tal especificidad ha evolucionado a lo largo de milenios y, como tal, estas enzimas proporcionan una herramienta notable para realizar todo tipo de tareas químicas.

- 15 Un grupo de enzimas, las metiltransferasas, han evolucionado para catalizar la transferencia de un grupo metilo desde un cofactor de molécula pequeña, s-adenosil-L-metionina (también llamado "SAM" o "AdoMet"), a un rango de dianas biomoleculares que incluyen ADN, ARN y otras proteínas y enzimas. En la célula, la modificación catalizada por metiltransferasa desempeña una serie de funciones importantes, tal como la regulación génica, y la comprensión del estado de metilación del ADN es ahora un campo científico creciente (epigenética).

- 20 Con el fin de desarrollar tecnologías novedosas basadas en la modificación específica y covalente de sustratos biomoleculares por las enzimas metiltransferasas, varios grupos de investigación han desarrollado recientemente análogos sintéticos del cofactor AdoMet. Los cofactores se han utilizado principalmente con ADN metiltransferasas.

- 25 En términos generales, existen dos clases de AdoMet: (1) cofactores derivados de aziridina y (2) los denominados cofactores 'mTAG' que llevan cadenas químicas extendidas en lugar de un grupo metilo. Desafortunadamente, ambas clases tienen limitaciones. Por ejemplo, las ADN metiltransferasas no son capaces de regenerar los cofactores derivados de aziridina, lo que significa que se requieren cantidades estequiométricas de cofactor y enzima para la modificación completa del sustrato. Además, se han seleccionado múltiples enzimas para la actividad con estos cofactores, pero solo unas pocas muestran actividad significativa, tal vez debido a la estructura química relativamente voluminosa de los análogos de aziridina.

- 30 Se han dado a conocer muchas variantes de los cofactores mTAG. En el documento EP1874790B1 se describen ejemplos de variantes de cofactores mTAG. Sin embargo, su síntesis está provocando y, de forma crítica, que el rendimiento de la etapa final de la síntesis (acoplamiento del grupo transferible al cofactor) sea bajo y requiera la presencia de un exceso de varias decenas a cientos de veces de la parte transferible. Esto significa que, por ejemplo, el acoplamiento de un fluoróforo directamente al cofactor mTAG es prohibitivamente costoso y está provocando la ampliación a cantidades de relevancia comercial. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de nuevos
35 cofactores que se puedan utilizar fácilmente con una variedad de ADN metiltransferasas, y para los cuales la síntesis sea sencilla y escalable.

En Actas de la academia nacional de ciencias vol. 110, 42 (2013) p 16778 - 16783, K. Islam et al. definen pares enzima-cofactor eficientes para el perfil biortogonal de la metilación de proteínas.

- 40 En Nucleic acid research vol. 40, 22 (2012) p 11594-11602 describe la ingeniería de reacciones de ADN citosina-5 metiltransferasa para el marcaje específico de secuencia de ADN.

En Biochimica et biophysica acta, vol. 385, (1975) p 312 - 323, Schlenk et al. describen un análogo de S-n-propilo de s-adenosilmetionina.

En Methods in molecular biology, vol. 283 (2004) p 145 - 161, Pljevaljic et al. describen el marcaje de ADN específico de secuencia utilizando metiltransferasas.

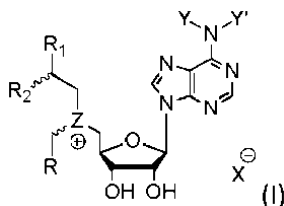
45 Compendio de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar buenos cofactores para utilizar con enzimas metiltransferasas.

- Una ventaja de las realizaciones de la presente invención es que los cofactores se asemejan a los cofactores mTAG estructural y funcionalmente, pero muestran propiedades más favorables, tales como, por ejemplo, escalabilidad total de la síntesis con rendimientos mejorados y un número mínimo de etapas intermedias. Una ventaja de las realizaciones
50 de la presente invención es que se obtiene un enfoque sintético flexible para un análogo de cofactor que abre un rango de nuevos enfoques para la modificación de biomoléculas dirigida por metiltransferasas. Una ventaja de las realizaciones de la presente invención es que se obtiene un comportamiento mejorado de esta nueva generación de cofactores en comparación con los cofactores mTag, tanto en especificidad como en eficiencia enzimática, eficiencia de purificación de diastereómeros y reactividad de los diastereoisómeros.

En esta nueva generación de cofactores, el grupo de homocisteína natural que se encuentra en la porción de aminoácidos del cofactor Adomet ha sido reemplazado por una cisteína. Según la literatura científica, dicha molécula no debería ser funcional (Borchardt et al., J. Med. Chem., 1976, 1104). En un ensayo para la unión competitiva a varias metiltransferasas, Borchardt et al. concluyeron que "una distancia de tres carbonos entre los grupos terminales y el centro sulfonio [como se ve en el grupo de homocisteína natural] son requisitos absolutos para la unión adecuada de la molécula" (página 1107, columna 1, segundo párrafo), porque un análogo con un grupo cisteína no inhibió la unión de un sustrato de ensayo a metiltransferasas, en contraste con la inhibición por análogos con grupos homocisteína. Por lo tanto, un efecto sorprendente de los cofactores descritos es que no solo se unen a las metiltransferasas, sino que también participan en la transferencia de grupos más grandes y en el marcaje de biomoléculas.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a un compuesto representado por la fórmula (I):



en donde

R1 es COOH o COO-;

X es un anión orgánico o inorgánico que lleva una o más cargas negativas;

Y e Y' son H, o un alquilo;

Z es S o Se

R2 es NH₂, NHBoc o H; y

R comprende

un grupo que comprende un enlace insaturado en posición β al centro de sulfonio, que es un doble enlace carbono-carbono, doble enlace carbono-oxígeno, doble enlace carbono-azufre, doble enlace carbono-nitrógeno, un triple enlace carbono-carbono, triple enlace carbono-nitrógeno, un sistema aromático carbocíclico o heterocíclico, unido a un grupo que comprende al menos un miembro seleccionado de fluoróforos, extintores de fluorescencia, etiquetas de afinidad, agentes de reticulación, reactivos de escisión de ácido nucleico, marcadores de espín, átomos pesados o agrupaciones de átomos pesados adecuados para el análisis de las fases de los datos de difracción de rayos X, isótopos raros radioactivos o estables, cromóforos, proteínas, péptidos o aminoácidos que se pueden modificar opcionalmente, nucleótidos, nucleósidos, ácidos nucleicos que se pueden modificar opcionalmente, carbohidratos, lípidos, reactivos de transfección, agentes intercalantes, nanopartículas, perlas y un grupo funcional que se selecciona de un grupo amino, un grupo tiol, un grupo 1,2-diol, un grupo hidrazino, un grupo hidroxiamino, un grupo haloacetamida, un grupo maleimida, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo 1,2-aminotiol, un grupo azido, un grupo alquino, una función 1,3-dieno, una función dienofílica (p. ej. doble enlace carbono-carbono activado), un grupo arilhaluro, un grupo alquino terminal, un grupo ácido arilborónico, un grupo haloalquino terminal, un grupo sililalquino terminal y un grupo amino, tiol, 1,2-diol, hidrazino, hidroxiamino, aldehído, cetona y 1,2-aminotiol protegido.

Se descubrió sorprendentemente que en las realizaciones según la presente invención se proporcionan compuestos que comprenden cisteína, y p. ej., no homocisteína, por lo que los compuestos obtenidos todavía proporcionan funcionalidad para metil transferasas. Es una ventaja de las realizaciones de la presente invención que tales compuestos se puedan producir con alta eficiencia. Es una ventaja de las realizaciones de la presente invención que se obtengan productos que se pueden utilizar como cofactores, por lo que la síntesis es más fácil de realizar, p. ej., tiene un mayor rendimiento. Una ventaja de las realizaciones según la presente invención es que los productos obtenidos son más fáciles de separar en sus enantiómeros. Una ventaja de las realizaciones de la presente invención es que ambos enantiómeros pueden ser activos.


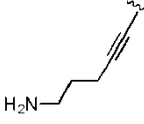

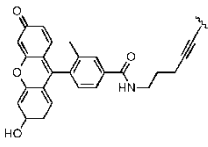
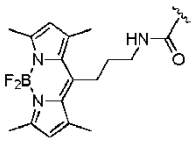
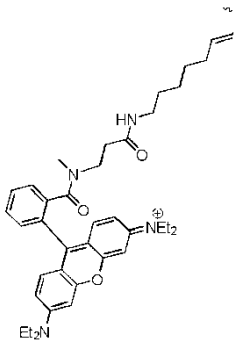

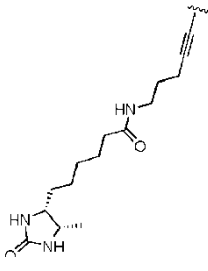
Una ventaja de las realizaciones de la presente invención es que los productos obtenidos se pueden utilizar especialmente ventajosamente para ciertas enzimas, para las cuales, los cofactores, p. ej., basados en homocisteínas, están operando con menos precisión.

En el compuesto, R, R2, Y e Y' se pueden seleccionar entre los siguientes:

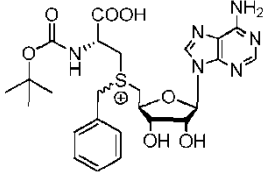
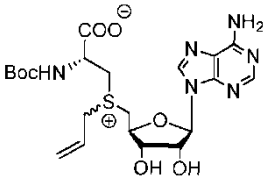
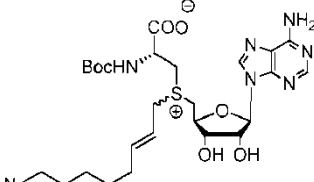
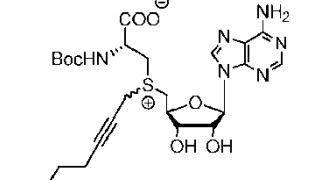
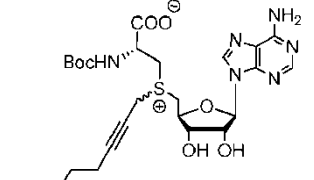
ES 2 775 581 T3

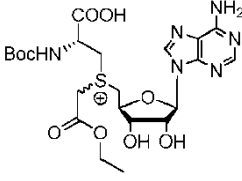
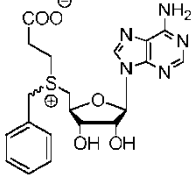
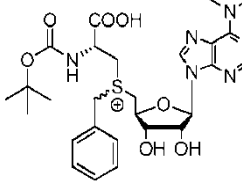
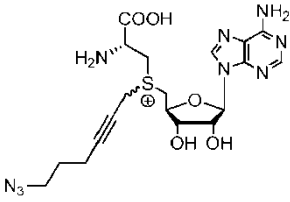
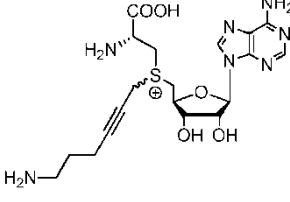
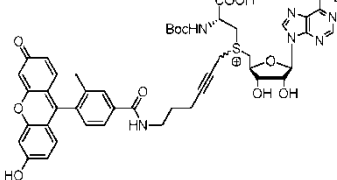
Y	Y'	R2	R
H	H		
H	H	BocHN	
H	H	BocHN	
H	H	BocHN	
H	H	BocHN	
H	H	BocHN	
H	H	H	
CH3	CH3		
H	H	H ₂ N	

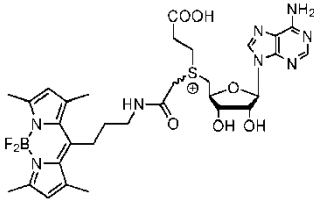
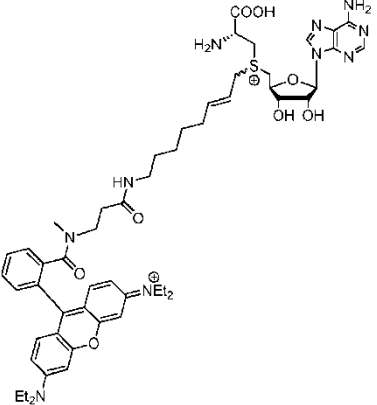
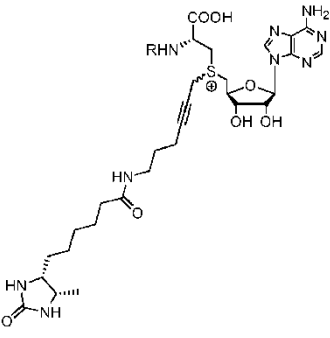
ES 2 775 581 T3

Y	Y'	R2	R
H	H	H_2N 	
H	H	BocHN 	
H	H	H	
H	H	NH2	
H	H	BocHN  or H	

En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona del grupo que comprende:

Compuesto	Nombre
	Sal de (Bencil)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio
	Sal de (Alil)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio
	Sal de (8-Azido-oct-2-eno)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio
	Sal de (6-Azido-hex-2-ino)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio
	Sal de (6-Amino-hex-2-eno)(5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio

 <p>Chemical structure of (Etil carboximetil)(5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio. It features a 5'-desoxyadenosine moiety linked to a sulfonium cation. The sulfonium cation is further substituted with an ethyl carboxymethyl group and an N-Boc-L-cysteine moiety.</p>	<p>Sal de (Etil carboximetil)(5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio</p>
 <p>Chemical structure of (Bencil)(5'-desoxiadenosil)-(3-propionato)sulfonio. It features a 5'-desoxyadenosine moiety linked to a sulfonium cation. The sulfonium cation is further substituted with a benzyl group and a propionate group.</p>	<p>Sal de (Bencil)(5'-desoxiadenosil)-(3-propionato)sulfonio</p>
 <p>Chemical structure of (Bencil)(5'-desoxi-N⁶,N⁶-dimetiladenosina)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio. It features a 5'-desoxy-N⁶,N⁶-dimethyladenosine moiety linked to a sulfonium cation. The sulfonium cation is further substituted with a benzyl group and an N-Boc-L-cysteine moiety.</p>	<p>Sal de (Bencil)(5'-desoxi-N⁶,N⁶-dimetiladenosina)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio</p>
 <p>Chemical structure of (6-azido-hex-2-eno)(5'-desoxiadenosil)-(L-cisteína)sulfonio. It features a 5'-desoxyadenosine moiety linked to a sulfonium cation. The sulfonium cation is further substituted with a 6-azido-hex-2-enyl group and an L-cysteine moiety.</p>	<p>Sal de (6-azido-hex-2-eno)(5'-desoxiadenosil)-(L-cisteína)sulfonio</p>
 <p>Chemical structure of (6-Amino-hex-2-eno)(5'-desoxiadenosil)-(L-cisteína)sulfonio. It features a 5'-desoxyadenosine moiety linked to a sulfonium cation. The sulfonium cation is further substituted with a 6-amino-hex-2-enyl group and an L-cysteine moiety.</p>	<p>Sal de (6-Amino-hex-2-eno)(5'-desoxiadenosil)-(L-cisteína)sulfonio</p>
 <p>Chemical structure of sulfonio fluorescente. It features a 5'-desoxyadenosine moiety linked to a sulfonium cation. The sulfonium cation is further substituted with a fluorescent dye moiety and an N-Boc-L-cysteine moiety.</p>	<p>Sal de sulfonio fluorescente</p>

	Sal de sulfonio fluorescente II
	Sal de sulfonio fluorescente III
	Cofactor de destiobiotin sulfonio

5 En un aspecto, la presente invención también se refiere a un complejo de un compuesto como se describe anteriormente y una metiltransferasa capaz de utilizar S-adenosil-L-metionina (SAM o AdoMet) como cofactor. La presente invención se refiere además a un kit que comprende un compuesto (I) como se describe anteriormente, o un complejo como se describe anteriormente, empaquetado en un recipiente.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un compuesto como se describe anteriormente o un complejo como se describe anteriormente.

10 La presente invención también se refiere a un método para la preparación de una molécula diana modificada; comprendiendo el método la incubación de la molécula diana con un compuesto (I) como se describe anteriormente en presencia de una metiltransferasa que es capaz de utilizar el compuesto (I) como cofactor y en condiciones que permitan la transferencia de parte de los compuestos a la molécula diana. Esto puede requerir, por ejemplo, incubar la enzima metiltransferasa con un compuesto como se describe anteriormente en una solución tamponada acuosa adecuada durante el tiempo apropiado, seguido de una purificación del sustrato, que generalmente comprende el
15 tratamiento con proteinasa de la muestra seguido de purificación por cromatografía o precipitación.

La presente invención también se refiere a un método para detectar metilación específica de secuencia en una biomolécula, que comprende:

(a) poner en contacto una biomolécula con una metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina en presencia de un cofactor detectable de dicha metiltransferasa; y

(b) detectar si el sitio de reconocimiento de dicha metiltransferasa se ha modificado con el cofactor o un derivado del mismo, en donde la modificación del sitio de reconocimiento de dicha metiltransferasa es indicativa de una ausencia de metilación en dicho sitio de reconocimiento,

5 en donde dicho cofactor es un compuesto de fórmula (I) como se describió anteriormente.

La presente invención se refiere además a un método para sintetizar un compuesto como se describe anteriormente, comprendiendo el método el acoplamiento de un tioéter con una lactona. Una ventaja de las realizaciones de la presente invención es que los cofactores se pueden hacer con alta eficiencia, en comparación con al menos algunos cofactores conocidos de la técnica anterior.

10 Los aspectos particulares y preferidos de la invención se exponen en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Las características de las reivindicaciones dependientes se pueden combinar con las características de las reivindicaciones independientes y con las características de otras reivindicaciones dependientes según corresponda y no simplemente como se expone explícitamente en las reivindicaciones.

15 Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de y se dilucidarán con referencia a las realizaciones descritas a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la imagen del gel de agarosa, que ilustra cómo la incubación del ADN con la enzima adenosina metiltransferasa (M. TaqI) y un cofactor sintético da como resultado la misma protección que con el cofactor natural, en contraste con el corte por una enzima de restricción.

20 La Figura 2 muestra la imagen del gel de agarosa, que ilustra cómo la incubación del ADN con la enzima adenosina metiltransferasa (M. TaqI) y ambos diastereoisómeros de un cofactor sintético dan como resultado la misma protección que con el cofactor natural, en contraste con el corte por una enzima de restricción, y sin diferencia entre los diastereoisómeros.

25 La Figura 3 muestra la imagen del gel de agarosa, que ilustra cómo la incubación de ADN con la enzima citosina metiltransferasa (M. MpeI) y un cofactor sintético da como resultado la misma protección que con el cofactor natural, en contraste con el corte por una enzima de restricción.

La Figura 4 muestra la imagen de un gel de agarosa, que ilustra cómo la incubación de ADN con enzima adenosina metiltransferasa (M. TaqI) y un cofactor sintético fluorescente da como resultado la misma protección que con el cofactor natural, en contraste con el corte por una enzima de restricción.

30 La Figura 5 muestra ADN fluorescente en microscopía de superresolución, mostrando con el panel A la imagen de la microscopía, con el panel B una imagen invertida del ADN de plásmido y con el panel C muestran la localización conjunta de la sal de sulfonio III fluorescente con colorante de rodamina con un colorante intercalante de ADN, que indica que el marcaje de ADN fluorescente fue exitoso.

35 La Figura 6 muestra una comparación de la síntesis de compuestos de la técnica anterior y compuestos (parte superior) y una comparación de los rendimientos que se pueden obtener (parte inferior) de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. También se muestra el rendimiento de los compuestos obtenidos.

Los dibujos son solo esquemáticos y no son limitantes. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede ser exagerado y no dibujado en escala con fines ilustrativos.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a ciertos dibujos, pero la invención no se limita a ella, sino únicamente por las reivindicaciones. Además, los términos primero, segundo y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se utilizan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir una secuencia, ya sea temporalmente, espacialmente, en clasificación o de cualquier otra manera. Se debe entender que los términos así utilizados son intercambiables en circunstancias apropiadas y
45 que las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria son capaces de funcionar en otras secuencias que se describen o ilustran en la presente memoria.

50 Cabe señalar que el término "que comprende", utilizado en las reivindicaciones, no se debe interpretar como que se limita a los medios enumerados a partir de entonces; no excluye otros elementos o etapas. Por lo tanto, se interpreta como que especifica la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes indicados, pero no impide la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas o componentes, o grupos de los mismos. Por lo tanto, el alcance de la expresión "un dispositivo que comprende los medios A y B" no se debería limitar a los dispositivos que constan únicamente de los componentes A y B. Esto significa que, con respecto a la presente invención, los únicos componentes relevantes del dispositivo son A y B.

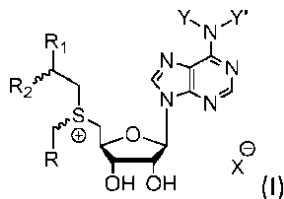
La referencia a lo largo de esta especificación a "una realización" significa que un distintivo, estructura o característica particular descrita en relación con la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de la frase "en una realización" en varios lugares a lo largo de esta especificación no necesariamente se refieren a la misma realización, pero podría ser. Además, los distintivos, las estructuras o las características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada, como sería evidente para un experto en la materia de esta descripción, en una o más realizaciones.

Del mismo modo, se debe apreciar que en la descripción de las realizaciones ejemplares de la invención, varias características de la invención a veces se agrupan en una sola realización, figura o descripción de la misma con el fin de mejorar la descripción y ayudar en la comprensión de uno o más de los diversos aspectos inventivos. Sin embargo, este método de descripción no se debe interpretar como que refleja una intención de que la invención reivindicada requiere más características de las que se enumeran expresamente en cada reivindicación. Más bien, como reflejan las siguientes reivindicaciones, los aspectos inventivos consisten en menos de todas las características de una sola realización descrita anteriormente. Por lo tanto, las reivindicaciones siguientes a la descripción detallada se incorporan expresamente a esta descripción detallada, con cada reivindicación por su cuenta como una realización separada de esta invención.

Además, mientras algunas realizaciones descritas en la presente memoria incluyen algunas, pero no otras características incluidas en otras realizaciones, las combinaciones de características de diferentes realizaciones están destinadas a estar dentro del alcance de la invención, y formar diferentes realizaciones, como entenderían los expertos en la materia. Por ejemplo, en las siguientes reivindicaciones, cualquiera de las realizaciones reivindicadas se puede utilizar en cualquier combinación.

En la descripción que se proporciona en la presente memoria, se establecen numerosos detalles específicos. Sin embargo, se entiende que las realizaciones de la invención se pueden practicar sin estos detalles específicos. En otros casos, los métodos, estructuras y técnicas bien conocidos no se han mostrado en detalle para no ocultar la comprensión de esta descripción.

Un aspecto de la presente descripción es un compuesto de fórmula (I):



en donde

R1 es COOH o COO-

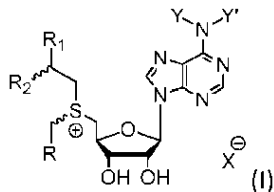
X es un anión orgánico o inorgánico que lleva una o más cargas negativas; y

Y e Y' son H, o un alquilo;

R2 es NH₂, NHBoc o H;

R comprende un doble enlace de carbono-carbono, doble enlace de carbono-oxígeno, doble enlace de carbono-azufre, doble enlace de carbono-nitrógeno, un triple enlace de carbono-carbono, triple enlace de carbono-nitrógeno, un sistema carbocíclico o heterocíclico aromático en posición β al centro de sulfonio, enlace c-c insaturado o enlace c-heteroátomo donde el heteroátomo es O, N, S.

En realizaciones particulares, se describe un compuesto representado por la fórmula (I):



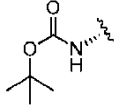




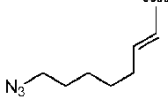

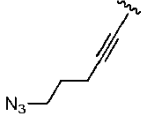

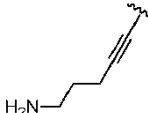



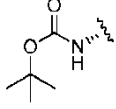


en donde

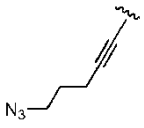

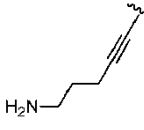

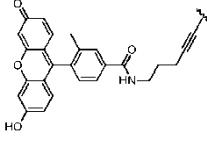
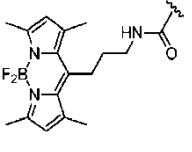
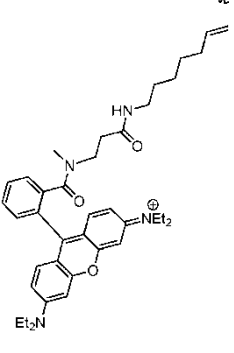

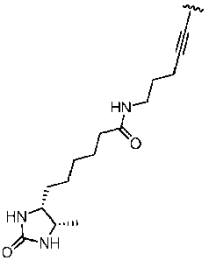
R1 es COOH o COO-

X es un anión orgánico o inorgánico que lleva una o más cargas negativas; y

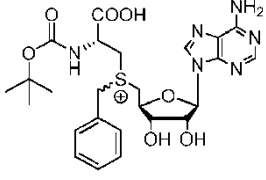
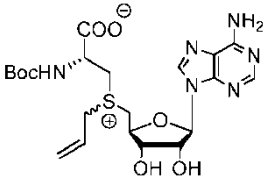
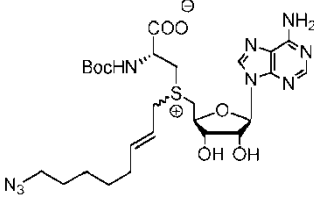
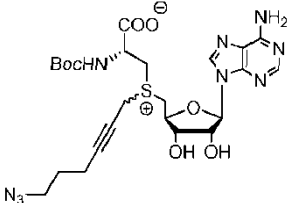
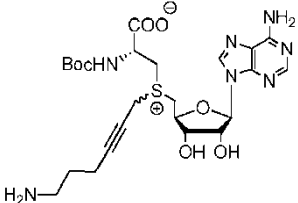
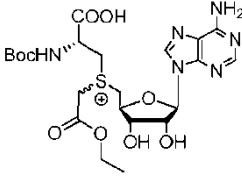
ES 2 775 581 T3

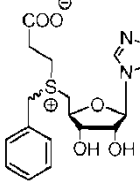
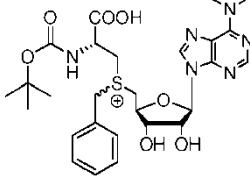
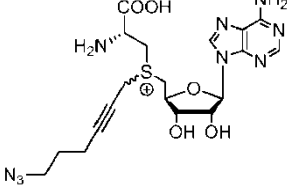
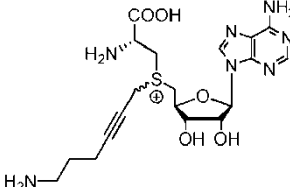
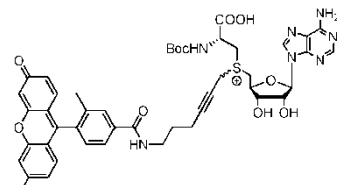
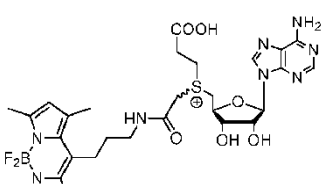
R, R2, Y e Y' se seleccionan de entre los siguientes:

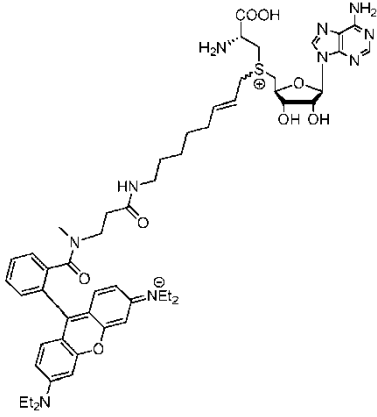
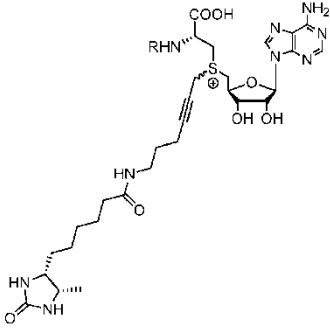
Y	Y'	R2	R
H	H		
H	H	BocHN 	
H	H	BocHN 	
H	H	BocHN 	
H	H	BocHN 	
H	H	BocHN 	
H	H	H	
CH ₃	CH ₃		
H	H	H ₂ N 	

Y	Y'	R2	R
			
H	H	H_2N 	
H	H	BocHN 	
H	H	H	
H	H	NH2	
H	H	BocHN  or H	

En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona del grupo que comprende:

Compuesto	Nombre
 <p>The structure shows a sulfonium ylide where the sulfur atom is bonded to a benzyl group, a 5'-desoxyadenosine moiety, and an N-Boc-L-cysteine moiety. The sulfur atom carries a positive charge, and the cysteine moiety has a carboxylic acid group.</p>	<p>Sal de (Bencil)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>
 <p>The structure shows a sulfonium ylide where the sulfur atom is bonded to an allyl group, a 5'-desoxyadenosine moiety, and an N-Boc-L-cysteine moiety. The sulfur atom carries a positive charge, and the cysteine moiety has a carboxylate group.</p>	<p>Sal de (Alilo)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>
 <p>The structure shows a sulfonium ylide where the sulfur atom is bonded to an 8-azido-oct-2-enyl group, a 5'-desoxyadenosine moiety, and an N-Boc-L-cysteine moiety. The sulfur atom carries a positive charge, and the cysteine moiety has a carboxylate group.</p>	<p>Sal de (8-Azido-oct-2-eno)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>
 <p>The structure shows a sulfonium ylide where the sulfur atom is bonded to a 6-azido-hex-2-ynyl group, a 5'-desoxyadenosine moiety, and an N-Boc-L-cysteine moiety. The sulfur atom carries a positive charge, and the cysteine moiety has a carboxylate group.</p>	<p>Sal de (6-Azido-hex-2-ino)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>
 <p>The structure shows a sulfonium ylide where the sulfur atom is bonded to a 6-amino-hex-2-ynyl group, a 5'-desoxyadenosine moiety, and an N-Boc-L-cysteine moiety. The sulfur atom carries a positive charge, and the cysteine moiety has a carboxylate group.</p>	<p>Sal de (6-Amino-hex-2-ino)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>
 <p>The structure shows a sulfonium ylide where the sulfur atom is bonded to an ethyl carboxymethyl group, a 5'-desoxyadenosine moiety, and an N-Boc-L-cysteine moiety. The sulfur atom carries a positive charge, and the cysteine moiety has a carboxylic acid group.</p>	<p>Sal de (Etil Carboximetil)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>

 <p>The structure shows a benzyl group attached to a sulfur atom that is also bonded to a 5'-desoxyadenosine moiety and a propionate group. The sulfur atom carries a positive charge, and the propionate group is shown as a carboxylate anion (COO⁻).</p>	<p>Sal de (Bencil)(5'-Desoxiadenosil)-(3-Propionato)sulfonio</p>
 <p>The structure features a benzyl group on a sulfur atom, which is also bonded to a 5'-desoxy-N⁶,N⁶-dimethyladenosine moiety and an N-Boc-L-cysteine moiety. The sulfur atom is positively charged.</p>	<p>Sal de (Bencil)(5'-Desoxi-N⁶,N⁶-dimetiladenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>
 <p>The structure shows a 6-azido-hex-2-ynyl group attached to a sulfur atom, which is also bonded to a 5'-desoxyadenosine moiety and an L-cysteine moiety. The sulfur atom is positively charged.</p>	<p>Sal de (6-Azido-hex-2-ino)(5'-Desoxiadenosil)-(L-cisteína)sulfonio</p>
 <p>The structure shows a 6-amino-hex-2-ynyl group attached to a sulfur atom, which is also bonded to a 5'-desoxyadenosine moiety and an L-cysteine moiety. The sulfur atom is positively charged.</p>	<p>Sal de (6-Amino-hex-2-ino)(5'-Desoxiadenosil)-(L-cisteína)sulfonio</p>
 <p>The structure shows a complex fluorescent sulfonio group attached to a sulfur atom, which is also bonded to a 5'-desoxyadenosine moiety and an L-cysteine moiety. The fluorescent group includes a boron atom coordinated to a phenanthroline-like ligand.</p>	<p>Sal de sulfonio fluorescente</p>
 <p>The structure shows another complex fluorescent sulfonio group attached to a sulfur atom, which is also bonded to a 5'-desoxyadenosine moiety and an L-cysteine moiety. The fluorescent group includes a boron atom coordinated to a phenanthroline-like ligand with a different substitution pattern than the first structure.</p>	<p>Sal de sulfonio fluorescente II</p>

	Sal de sulfonio fluorescente III
	Cofactor de desthiobiotin sulfonio

En una realización de la presente invención dicho anión orgánico o inorgánico se selecciona de trifluoroacetato, formiato, halogenuro y sulfonato.

- 5 En otra realización preferida de la presente invención, R comprende además al menos un miembro seleccionado de grupos funcionales, átomos pesados o agrupaciones de átomos pesados adecuados para el análisis de las fases de los datos de difracción de rayos X, isótopos raros radiactivos o estables, y un resto de un miembro seleccionado de fluoróforos, extintores de fluorescencia, etiquetas de afinidad, agentes reticulantes, reactivos de escisión de ácidos nucleicos, marcadores de espín, cromóforos, proteínas, péptidos o aminoácidos que, opcionalmente, se pueden
- 10 modificar, nucleótidos, nucleósidos, ácidos nucleicos que se pueden modificar opcionalmente, carbohidratos, lípidos, reactivos de transfección, agentes intercalantes, nanopartículas y perlas. Los isótopos raros radiactivos o estables preferidos se seleccionan del grupo que consiste en ^3H (T), ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I , ^2H (D), ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O y ^{18}O . Además, los isótopos estables preferidos se seleccionan del grupo formado por ^{19}F y ^{127}I .

- 15 Los marcadores de espín preferidos que son grupos paramagnéticos estables (normalmente un radical nitrilo) se seleccionan del grupo que consiste en 2,2,6,6,-tetrametil-piperidin-1-oxil y 2,2,5,5,-tetrametil-pirrolidin-1-oxil.

- Las modificaciones de aminoácidos preferidas se seleccionan del grupo que consiste en β - y γ -aminoácidos y las modificaciones de péptidos preferidas se seleccionan del grupo que consiste en depsipéptidos, péptidos vinílogos, péptidos permetilados, peptoides, azapéptidos (azatidas), oligocarbamatos, oligoureas, oligosulfonas, oligosulfonamidas, oligosulfonamidas, pirrol-imidazol-hidroxi-pirrol poliamidas y ácidos nucleicos peptídicos (PNA, por sus siglas en inglés), más preferiblemente dichas modificaciones de péptidos son pirrol-imidazol-hidroxi-pirrol poliamidas y ácidos nucleicos peptídicos (PNA).
- 20

Las modificaciones preferidas del ácido nucleico se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y ácidos nucleicos modificados de fosforotioato.

- 25 Los reactivos de transfección preferidos se seleccionan del grupo que consiste en lípidos catiónicos (p. ej., lipofectamina y derivados disponibles comercialmente en Invitrogen, CA, EE.UU.), polímeros catiónicos (p. ej., polietilenoimina (PEI) disponibles comercialmente en Sigma) y dendrímeros policatiónicos.

Los agentes intercalantes preferidos que suelen ser sistemas de anillos aromáticos planos o casi planos que se unen entre los pares de base vecinos en ácidos nucleicos de doble cadena se seleccionan del grupo que consiste en etidio, naranja de tiazol, acridina o un derivado de la misma, y el pireno.

5 Las nanopartículas preferidas se seleccionan del grupo que consiste en agrupaciones de oro y plata.

Las perlas preferidas se seleccionan del grupo que consiste en perlas de sílice, perlas magnéticas y microesferas de poliestireno (p. ej., disponibles comercialmente en Molecular Probes, OR, EE.UU.)

10 En una realización de la presente invención, dicho grupo funcional se selecciona de un grupo amino, un grupo tiol, un grupo 1,2 diol, un grupo hidrazino, un grupo hidroxiamino, un grupo haloacetamida, un grupo maleimida, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo 1,2-aminotiol, un grupo azido, un grupo alquino, una función 1,3-dieno, una función dienofílica (p. ej., doble enlace de carbono-carbono activado), un grupo haluro de arilo, un grupo de alquino terminal, un grupo ácido arilborónico, un grupo haloalquino terminal, un grupo sililalquino terminal y un grupo amino, tiol, 1,2-diol, hidrazino, hidroxiamino, aldehído, cetona y 1,2-aminotiol protegido.

15 En otra realización de la presente invención, dicho fluoróforo se selecciona de Alexa, BODIPY, bimano, cumarina, Cascade blue, dansilo, dapoxilo, fluoresceína, mansilo, MANT, verde Oregon, pireno, rodamina, rojo Texas, TNS, nanocristales fluorescentes (puntos cuánticos), un fluoróforo de cianina y derivados de los mismos.

En otra realización preferida de la presente invención, dicho extintor de fluorescencia se selecciona de dabcyI, QSY y BHQ.

20 En otra realización de la presente invención, dicha etiqueta de afinidad se selecciona de etiquetas peptídicas, grupos quelantes metálicos, etiquetas de afinidad codificadas por isótopos, biotina, maltosa, manosa, glucosa, acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico, galactosa, acetilgalactosamina, digoxigenina y dinitrofenol.

En otra realización de la presente invención, dicha etiqueta peptídica se selecciona de etiquetas his, etiquetas con propiedades quelantes de metales, etiquetas strep, etiquetas flag, etiquetas c-myc, etiquetas HA, epítomos y glutatión.

25 El término "etiqueta de afinidad", como se utiliza en la presente memoria, se refiere, entre otras cosas, a un marcador que, por ejemplo, se puede utilizar para la purificación por afinidad. Una serie de etiquetas de afinidad que están de acuerdo con la presente invención son bien conocidas en la técnica. Tales etiquetas pueden tener, por ejemplo, propiedades quelantes de metales y pueden permitir unir la cadena lateral -Z-R del cofactor (I) de la presente invención, antes o después de la transferencia catalizada por metiltransferasa a una biomolécula, a una matriz utilizada en la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). La técnica IMAC desarrollada por Porath et al. (Porath et al., (1975) Nature 258, 598-599) se basa en la interacción entre ciertos restos superficiales de proteínas (histidinas, cisteínas y, en menor grado, triptófanos) y cationes de metales de transición que forman quelatos con ligandos policarboxílicos. Las condiciones típicas se describen en la técnica y son conocidas por la persona experta (Porath, (1992) Protein Expression and Purification 3, 263-281; Hemdan y Porath, (1985) Journal of Chromatography 323, 255-264; Porath y Hansen, (1991) Journal of Chromatography 550, 751-764).

35 Otras etiquetas preferidas incluyen "etiqueta strep" que se refiere a una secuencia de unión a estreptavidina de 8 aminoácidos. Esta secuencia se encontró a través de la selección sistemática de bibliotecas de péptidos aleatorias para identificar una secuencia de unión a péptidos con propiedades de etiqueta de afinidad óptimas (Schmidt y Skerra, (1993) Prot.Engineering 6, 109-122). Cuando se unen a la cadena lateral -Z-R del cofactor (I) de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico o (poli)péptidos modificados se pueden purificar por afinidad, p. ej., utilizando una columna de flujo por gravedad con una matriz que contiene StrepTactin, Streptavidina, Avidina o similares. Tales matrices están disponibles comercialmente en, p. ej., Sigma-Genosys/The Woodlands (Tx, EE.UU.) o IBA/Goettingen (Alemania).

45 Otras etiquetas preferidas incluyen la "etiqueta flag" que se refiere a un péptido de 8 aminoácidos que se une a un anticuerpo anti-flag. Cuando se unen a la cadena lateral -Z-R del cofactor (I) de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico o (poli)péptidos modificados se pueden purificar por afinidad, p. ej., utilizando una columna de flujo por gravedad con una matriz que contiene un anticuerpo anti-flag inmovilizado. Dicha matriz está disponible comercialmente en, p. ej., Sigma-Aldrich.

50 Otras etiquetas preferidas incluyen "etiqueta c-myc" que se refiere a un péptido de 10 aminoácidos que se une a un anticuerpo anti-c-myc. Cuando se unen a la cadena lateral -Z-R del cofactor (I) de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico o (poli)péptidos modificados se pueden purificar por afinidad, p. ej., utilizando una columna de flujo por gravedad con una matriz que contiene un anticuerpo anti-c-myc inmovilizado. Tal matriz está disponible comercialmente en, p. ej., Pierce Biotechnology (IL, EE.UU.).

55 Otras etiquetas preferidas incluyen "etiqueta HA" que se refiere al péptido de 9 aminoácidos que se obtiene a partir de la hemaglutinina superficial del virus influenza y se une a un anticuerpo anti-HA. Cuando se unen a la cadena lateral -Z-R del cofactor (I) de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico o (poli)péptidos modificados se pueden purificar por afinidad, p. ej., utilizando una columna de flujo por gravedad con una matriz que contiene anticuerpo anti-HA inmovilizado.

M.Eco72I, M.Eco88I, M.Eco98I, M.Eco105I, M.Eco147I, M.Eco231 I, M.Eco255I, M.Eco536P, M.Eco1639P,
 M.EcoI831 I, M.Eco248534P, M.EcoAI, M.EcoBI, M.EcoCFTDamP, M.EcoCFTDam2P, M.EcoCFTDam3P,
 M.EcoCFTDcmP, M.EcoDI, M.EcoDR2, M.EcoDR3, M.EcoDXXI, M.Eco67Dam, M.EcoEI, M.EcoHI, M.EcoHK31I,
 5 M.EcoKI, M.EcoKII, M.EcoKDam, M.EcoKDcm, M.EcoKO157DamP, M.EcoKO157Dam2P, M.EcoKO157Dam3P,
 M.EcoKO157DcmP, M.EcoKO157ORF1953P, M.EcoLahni P, M.EcoLahn3P, M.EcoNI, M.EcoNM2P, M.EcoO109I,
 M.EcoO157DamP, M.EcoO157DcmP, M.EcoO157ORF1454P, M.EcoO157ORF2389P, M.EcoO157ORF3349P,
 M.Eco536ORF3P, M.EcoPI, M.EcoP15I, M.EcoPI Dam, M.EcoPhi4795DamP, M.EcoRI, M.EcoRII, M.EcoRV,
 M.EcoR124I, M.EcoR124II, M.EcoRD2, M.EcoRD3, M.EcoStxi DamP, M.EcoStx2DamP, M.EcoT2I, M.EcoT38I,
 10 M.EcoTI Dam, M.EcoT2Dam, M.EcoT4Dam, M.EcoVIII, M.EcoVT2Dam, M.EcoWphiP, M.Eco29kI, M.EcopHSHP,
 M.EcopHSH2P, M.Ecoprrl, M.EfaHGSORFHP, M.EphP1ORF1 P, M.EsaBCI I, M.EsaBC3I, M.EsaBC4I, M.EsaBSI I,
 M.EsaBS9I, M.EsaDixI I, M.EsaDix2I, M.EsaDix3I, M.EsaDix4I, M.EsaDixδI, M.EsaDixθI, M.EsaDix7I, M.EsaLHCI,
 M.EsaLHCIII, M.EsaRMI P, M.EsaRM13P, M.EsaRM16P, M.EsaRM17P, M.EsaRM21 P, M.EsaRM38P, M.EsaRM61
 P, M.EsaRM63P, M.EsaRM65P, M.EsaRM67P, M.EsaRM69P, MIEsaSI I, M2.EsaS1 I, M.EsaS3I, M.EsaS4I,
 15 M.EsaS6I, M.EsaS7I, M.EsaSδI, M.EsaSS2P, M.EsaSSδP, M.EsaSS12P, M.EsaSS13P, M.EsaSS15P, M.EsaSS16P, M.EsaSS14P,
 M.EsaSS18P, M.EsaSS19P, M.EsaSS22P, M.EsaSS30P, M.EsaSS31 P, M.EsaSS35P, M.EsaSS36P, M.EsaSS40P,
 M.EsaSS43P, M.EsaSS47P, M.EsaSS48P, M.EsaSS49P, M.EsaSS52P, M.EsaSS55P, M.EsaSS57P, M.EsaSS67P,
 M.EsaSS69P, M.EsaSS70P, M.EsaSS71 P, M.EsaSS72P, M.EsaSS73P, M.EsaSS74P, M.EsaSS75P, M.EsaSS76P,
 M.EsaSS79P, M.EsaSS81 P, M.EsaSS83P, M.EsaSS87P, M.EsaSS88P, M.EsaSS90P, M.EsaSS96P, M.EsaSS97P,
 20 M.EsaSS103P, M.EsaSS104P, M.EsaSS105P, M.EsaSS106P, M.EsaSS107P, M.EsaSS108P, M.EsaSS109P,
 M.EsaSSUOP, M.EsaSS111 P, M.EsaSS113P, M.EsaSS117P, M.EsaSS120P, M.EsaSS123P, M.EsaSS126P,
 M.EsaSS130P, M.EsaSS131 P, M.EsaSS134P, M.EsaSS136P, M.EsaSS137P, M.EsaSS144P, M.EsaSS145P,
 M.EsaSS150P, M.EsaSS153P, M.EsaSS154P, M.EsaSS155P, M.EsaSS156P, M.EsaSS160P, M.EsaSS163P,
 M.EsaSS165P, M.EsaSS167P, M.EsaSS169P, M.EsaSS170P, M.EsaSS172P, M.EsaSS174P, M.EsaSS177P,
 25 M.EsaSS181 P, M.EsaSS182P, M.EsaSS186P, M.EsaSS187P, M.EsaSS192P, M.EsaSS195P, M.EsaSS200P,
 M.EsaSS214P, M.EsaSS215P, M.EsaSS216P, M.EsaSS218P, M.EsaSS221 P, M.EsaSS222P, M.EsaSS223P,
 M.EsaSS225P, M.EsaSS228P, M.EsaSS237P, M.EsaSS238P, M.EsaSS241 P, M.EsaSS244P, M.EsaSS245P,
 M.EsaSS246P, M.EsaSS247P, M.EsaSS254P, M.EsaSS259P, M.EsaSS264P, M.EsaSS266P, M.EsaSS268P,
 M.EsaSS269P, M.EsaSS270P, M.EsaSS275P, M.EsaSS278P, M.EsaSS281 P, M.EsaSS282P, M.EsaSS283P,
 30 M.EsaSS289P, M.EsaSS297P, M.EsaSS302P, M.EsaSS303P, M.EsaSS305P, M.EsaSS315P, M.EsaSS317P,
 M.EsaSS318P, M.EsaSS319P, M.EsaSS323P, M.EsaSS326P, M.EsaSS328P, M.EsaSS329P, M.EsaSS334P,
 M.EsaSS335P, M.EsaSS336P, M.EsaSS51 DamP, M.EsaSS65DamP, M.EsaSS138DamP, M.EsaSS198DamP,
 M.Esp3I, M.Esp1396I, M.EspRB49DamP, M.Faul, M.FnuDI, M.FnuDII, M.FnuDIII, M.Fnu4HI, M.FnuVDamP, M.FokI,
 M.Fsel, M.Fspl, M.Fssl, M.GmeORFCOP, M.GmeORFC16P, M.Gsul, M.GviDamP, M.H2I, M.HaeII, M.HaeIII, M.HapII,
 35 M.HduDamP, MLHgal, M2.Hgal, M.HgiAI, M.HgiBI, M.HgiCI, M.HgiCII, M.HgiDI, M.HgiDII, M.HgiEI, M.HgiGI, M.Hhal,
 M.Hhall, M.HheORF238P, M.HheORF1050P, M.HheORF1244P, M.HheORF1445P, M.Hini II, M.HinB231ORFDP,
 M.HinHPI Dam, M.HinHP2Dam, M.HinPI I, M.HinclI, M.Hindi, M.HindII, M.HindIII, M.HindDam, M.Hinfl,
 M.HinflII, M.Hjal, M.Hpal, M.Hpall, MLHphI, M2.HphI, M.HpyI, M.HpyδI, M.Hpy87AP, M.Hpy99I, M.Hpy99II,
 M.Hpy99III, M.Hpy99IV, M1.Hpy99V, M2.Hpy99VP, M.Hpy99VI, M.Hpy99VIII, M.Hpy99IX, M.Hpy99X, M.Hpy99XI,
 40 M.Hpy166IV, M.HpyI 78IP1 M.Hpy188I, M.Hpy188II, M.Hpy188III, M.Hpy788606P, M.Hpy788845P, M.Hpy788849P,
 M.Hpy789115P, M.Hpy789117P, M.Hpy789137P, M.Hpy789145P, M.Hpy790101P, M.Hpy959772P, M.HpyAI,
 MLHpyAll, M2.HpyAll, M.HpyAIII, M.HpyAIV, M.HpyAV, MLHpyAVI, M2.HpyAVI, M.HpyAVII, M.HpyAVIII, M.HpyAIX,
 M.HpyAX, M.Hpy87AI, M.HpyAORF263P, M.HpyAORF369P, M.HpyAORF481 P, M.HpyAORF483P, M1.HpyC1 I,
 M2.HpyC1 I, M.HpyCH4IV, M.HpyCH4V, M.HpyCR2ORF1P, M.HpyCR2ORF3P, M1.HpyCR4RM1 P, M2.HpyCR4RM1
 45 P, M.HpyCR9RM1 P, M.HpyCR9RM2P, M.HpyCR14RM1 P, M.HpyCR14RM2P, M.HpyCR15RM2P,
 M.HpyCR16RM1P, M.HpyCR29RM1 P, M.HpyCR29RM2P, M.HpyCR35RM1 P, M.HpyCR35RM2P,
 M1.HpyCR38RM1 P, M2.HpyCR38RM1 P, M.HpyCR38RM2P, M.HpyF17I, M.Hpy99ORF430P, M.Hpy99ORF433P,
 M.Hpy99ORF846P, M.Hpy99ORF1012P, M.HspNORF1543P, M.Kasl, M.Kpnl, M.Kpn2I, M.KpnAI, M.KpnBI,
 M.Kpn19097DamP, M.Kpn19097Dam2P, M.Kpn19097ORFFP, M.Kpn2kl, M.Lci22RP, M.LinFORF11323P,
 50 M.LinFORF12222P, M.LinFORF12737P, M.Lin_ ORF903P, M.LinLORF1547P, M.LinLORF2668P, MLLIaAI, M2.LIaAI,
 M. LlaBI, M. LlaCI, M. LlaDI, M. LlaDII, M.LLLIaDCHI, M2. LlaDCHI, M.LIaKR2I, M.LmoAP, M.LmoEORF470P,
 M.LmoFORF327P, M.Lmo19115ORF1 P, M.Lsp1109I, M.Maml, MLMbol, M2.Mbol, MLMbolI, M2.MbolI,
 M.Mca43617ORFAP, M.Mca43617ORFBP, M1.Mca43617ORFDP, M2.Mca43617ORFDP, M.Mca43617ORFJP,
 M.Mfel, M.Mjal, M.Mjall, M.MjalII, M.MjalVP, M.MjaV, M.MjaVI, M.MloORFmir7520P, M.Mlul, M.MlyI,
 55 M.MmaMORFC174P, M.MmaSORF735P, M.Mmel, M.MmelI, M.MmoORF950P, M.MmoORF3450P, M.MmyIP,
 M.MmySCORF186P, M.MmySCORF216P, M.MmySCORF950P, MLMnII, M2.MnII, M.MpeORF1230P,
 M1.MpeORF1780P, M2.MpeORF1780P, M.MpeORF4940P, M.MpeORF9800P, M.MpuCORF430P, M.Mscl, M.Msel,
 M.MsmChe9cORF76P, M.MsmChe9cORF77P, M.MsmChe9cORF80P, M.MsmcdP, M.MsmomegaORF127P, M.Mspl,
 M.MspAI I, M.MspSDIOI, M.MthFI, M.MthTI, M.MthZI, M. Muni, M.Mval, M.Mva1269I, M.Mwol, M.Nael,
 60 M.NarAORFC306P, M.Ncol, M.Ndel, M.NdelI, M.Ngo18785P, M.Ngo185840P, M.Ngo185841 P, M.NgoAI, M.NgoAll,
 M.NgoAIII, M.NgoAIV, M.NgoAV, M.NgoAVIIP, M.NgoAXIP, M.NgoAORFC708P, M1.NgoAORFC717P,
 M2.NgoAORFC717P, M.NgoBI, M.NgoBII, M.NgoBIIIP, M.NgoBIVP, M.NgoBV, MLNgoBVIII, M2.NgoBVIII, M.NgoBIX,
 M.NgoBXII, M.NgoDIII, M.NgoEI, M.NgoFVII, M.NgoGI, M.NgoGII, M.NgoGIII, M.NgoGIVP, M.NgoGV, M.NgoHIP,
 M.NgoHIIP, M.NgoHIIP, M.NgoHIVP, M.NgoHVP, M.NgoHVIP; M.NgoHVIIIP, M.NgoHVIII, M.NgoKVIP, M.NgoLIP,
 65 M.NgoLII, M.NgoLIIIP, M.NgoLIVP, M.NgoLVP, M.NgoMI, M.NgoMII, M.NgoMIII, M.NgoMIV, M.NgoMV, M.NgoMVIII,
 M.NgoMXV, M.NgoNIP, M.NgoNII, M.NgoNIII, M.NgoNIVP, M.NgoNVP, M.NgoPIP, M.NgoPII, M.NgoPIII,
 M.NgoPIVP, M.NgoPVP, M.NgoQIP, M.NgoQIIP, M.NgoQIIIP, M.NgoQIVP, M.NgoQVP, M.NgoSIP, M.NgoSII,

5 M.NgoSIIP, M.NgoSIVP, M.NgoSVP, M.NgoTIP, M.NgoTII, M.NgoTIIIP, M.NgoTIVP, M.NgoTVP, M.Ngo125VIP, M.NIaI, M.NIaII, M.NIaIII, M.NIaIV, M.NIaX, M.NIaL17ORFAP, M.NmaPhiChi I, M.NmeAORF1453P, M.NmeAORF1500P, MLNmeBI, M2.NmeBI, M.NmeBF13P, M.NmeBORF1033P, M.NmeBORF1290P, M.NmeSI, M.NmeST1117ORF1 P, M.NmepNLEI P, M.NpuORFC221 P, M.NpuORFC222P, M.NpuORFC224P, M.NpuORFC226P, M.NpuORFC228P, M.NpuORFC230P, M.NpuORFC231 P, M.NpuORFC234P, M.Nsil, M.Nspl, M.NspIII, M.NspV, M.NspHI, M.OihORF3333P, M.OihORF3336P, M.OkrAI, M.Pac25I, M.Pael, M.PaelMORF3201 P, M.PaeMSHORFI P, M.Pae2164ORF7P, M.PaeR7I, M.PfilMI, M.Pgil, M.Phal, M.PhiBssHII, M.PhiMxδI, M.Phi3TI, M.Phi3TII, M.Phol, M.PholI, M.PhoWORFBP, M.PhsOYDami P, M.PhsOYDam2P, M.PhsOYDam3P, M.PhsOYDam4P, M.PhsOYDamδP, M.PleI, M.PleLFBORFδP, M.PluTDamP, M.PluTDcmP, M.PluTORF600P, M.PluTORF2710P, M.PluTORF2942P, M.Pmi16525DamP, M.Pmi16525Dam2P, M.Pmi16525ORFDP, M.PmuADam, M.PmuDam, M.Ppu21 I, M.PpuH H, M.Ppu1253I, M.PpuMI, M.PshAI, M.PspGI, M.PspPI, M.PstI, M.Pvul, M.Pvull, M.PvuRtsi DamP, M.PvuRts1 Dam2P, M.RcoORF690P, M.ReuORF325P, M.Rho11si, M.RhoUsII, M.Rle39BI, M.RmeADam, M.RpaORF1026P, M.RpapRPA4P, M.Rrh4273I, M.RruMORFS5P, M.RruMORFS15P, M.Rsal, M.RshI, M.RshIII, M.RsrI, M.RsrII, M.SPBeI, M.SPRI, M.SPRi, M.Sacl, M.SacII, M.Sall, M2.Sapl, M.Sau96I, M.Sau3239I, M.Sau6782I, M.Sau3AI, M.SauLPI, M.Sbal, M.Sbfl, M.Sbo13I, M.Scal, M.LScrFl, M2.ScrFl, M.Sdul, M.SenPI, M.SenPhiE15P, M.SenPhiE15DamP, M.SenpCI, M.SeqORFC57P, M.SeqORFC272P, M.SeqORFC448P, M.SfaNI, M.Sfel, M.Sfil, M.Sfl2DamP, M.Sfl2DcmP, M.Sfl2ORF3300P, M.SflSf6DamP, M.SflTDamP, M. Sf IT Dem P, M.SflTORF3517P, M.Sfl2aI, M.Sfol, M.Sho27844P, M.SinI, M.Smal, M.Small, M.SmapR478DcmP, M.SmapR478ORF272P, M.SmelP, M1.SmuUORF504P, M2.SmuUORF504P, M.SnaBI, M.SonDamP, M.SonORF4P, M.Spel, M.SphI, M.Spn526P, M.SpnθBI, M1.Spn19FORF24P, M2.Spn19FORF24P, M.Spn19FORF927P, M.SpnHGORF4P, M.SpnORF1431 P, M.SpnORF1849P, M.SpnRORF1287P, M.SpomI, M.SptAI, M.SscLH, M.Sse9I, M.SsMI, M.Ssol, M.SsolI, M.Ssp6803I, M.Ssp6803ORF729P, M.Ssp6803ORF1803P, M.SspPhiBti P, M.Sssl, M.SstI, M.Ssu211 I, M.Ssu212I, M1.Ssu2479I, M2.Ssu2479I, M1.Ssu4109I, M2.Ssu4109I, M1.Ssu4961 I, M2.Ssu4961 I,, M1.Ssu8074I, M2.Ssu8074I, M1.Ssu11318I, M2.Ssu11318I, M1.SsuDAT1 I, M2.SsuDAT1 I, M.Sth368I, M.SthStβIP, M.StsI, M.Styl, M.StyCDamP, M.StyCDam2P, M.StyCDam3P, M.StyCDam4P, M.StyCDcmP, M.StyD4I, M.StyDam, M.StyDam2P, M.StyDam3P, M.Styl 344Dam, M.Sty14028Dam, M.StyHCM1ORF187P, M.StyLTI, M.StyLTIII, M.Styl_T2Dam, M.StyLT2DcmP, M.StyLT2FelsDamP, M.StyR27ORF154P, M.StySJI, M.StySKI, M.StySPI, M.StySQI, M.StySopEDamP, M.StyTDamP, M.StyTDam2P, M.StyTDam3P, M.StyTDam4P, M.StyTDcmP, M.Sual, M.TaeII, M.TaqI, M.TdelI, M.TdelII, M.TdeORF706P, M.TelBORFI 578P, M.TelBORFI1640P, M.TelBORFI 878P, M1 TerORFS1 P, M2TerORFS1 P, MTerORFS14P, MTerORFS18P, M.TerORFS62P, MTerORFS122P, MTfiTok6A1 I, M.Thai, MThall, MThallI, MTiII, M.Tmal, M.Tpal, MTrsKI, MTrsSI, M.TrsTI, MTsel, MTsp32I, MTsp45I, M.Tsp509I, M.TspRI, MTiM 111, TthU HI, M.TthHBβI, M.TthHB27P, M.TthHB27ORF41 P, M.TvoORF849P, M.TvoORF1192P, M.TvoORF1400P, M.TvoORF1413P, M.TvoORF1416P, M.TwhORF771 P, M.TwhTORF783P, M.Uba580P, M.Ucri P, M.Van91 II, M.VchADamP, M.Vch569BdamP, M.VchO395Dam, M.VchK139I, M.VpaRDamP, M.Vspl, M.VvuDamP, M.VvuYDamP, M.WsuORF1405P, M.WsuORF1930P, M.XamI, M.XaxCORF2436P, M.Xbal, M.Xcml, M.Xcyl, M.XfaAORF345P, M.XfaAORFC348P, M.XfaOORFC725P, M.XfaORF1804P, M.XfaTORF577P, M.XfaTORF1062P, M.XfaTORF1607P, M.Xhol, M.Xhol, M.Xmal, M.XmalII, M.Xmnl, M.XorII, M.Xphi, M.YenI, M.YenSDamP, M.YenSORFC666P, M.YenWI, M.YpeDamP, M.YpeKDamP, M.YpeKORF2224P, M.YpeKORF3792P, M.YpeMDamP, M.YpeMORF1932P, M.YpeMORF3790P, M.YpeORF391 P, M.YpeORF2088P, M.YpsDam.

En una realización más preferida de la presente invención, la metiltransferasa se selecciona del grupo que consiste en las ADN metiltransferasas M.TaqI, M.Hhal, M.Xbahl, M.Pvull, M.Bsahl, M.FokI, M.BcnIB (M2.BcnI), M.Sssl, M.Mpel, M.PstI, M.Xhol, M.BseCI, MMRsrI, M.EcoRI, o un derivado de las mismas.

45 La presente invención también se refiere a un kit que comprende un compuesto (I) de la presente invención. Los diversos componentes del kit se pueden empaquetar en uno o más recipientes, opcionalmente disueltos en un tampón adecuado para el almacenamiento. Se puede añadir un folleto con instrucciones de uso.

En una realización preferida de la presente invención, el kit de la presente invención comprende además una metiltransferasa como se define en la presente invención.

La presente invención también se refiere a un kit que comprende un complejo de la presente invención.

50 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto (I) de la presente invención o un complejo de la presente invención y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 La presente invención también se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un compuesto (I) de la presente invención o un complejo de la presente invención. Según una realización, la composición de diagnóstico es una composición líquida. El disolvente preferido de la composición de diagnóstico es de naturaleza acuosa. Además, la composición puede contener otros ingredientes o vehículos para modificar o mantener el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución u olor de la formulación. De manera similar, la composición puede contener otros ingredientes farmacológicamente aceptables para modificar o mantener la estabilidad, la velocidad de disolución, la liberación o la absorción de la composición de diagnóstico. Una vez que se ha formulado la composición de diagnóstico, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, 60 gel, emulsión, sólido, o polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones se pueden almacenar en forma lista para utilizar o requieren reconstitución inmediatamente antes de su uso.

La presente invención también se refiere al uso de un compuesto (I) de la presente invención o una mezcla de los mismos para modificar una molécula diana. Los usos típicos son métodos según la demostración de la presente invención, tales como los métodos descritos en la presente invención.

5 En una realización preferida de la presente invención, la modificación de la molécula diana se logra utilizando un compuesto (I) de la presente invención o mezclas de los mismos como cofactor de una metiltransferasa que transfiere parte de los compuestos a la molécula diana.

En una realización preferida de la presente invención, la molécula diana es una molécula de ácido nucleico, un polipéptido opcionalmente modificado de una forma específica de secuencia, un carbohidrato o una molécula pequeña.

10 En una realización preferida de la presente invención, la molécula de ácido nucleico es ADN, ARN o un híbrido de los mismos, más preferiblemente la molécula de ADN o ARN se modifica de una forma específica de secuencia.

En otra realización más preferida de la presente invención, la molécula pequeña se selecciona de fosfolípidos, aminoácidos, hormonas, nucleótidos, nucleósidos y derivados de los mismos.

15 En otra realización más preferida de la presente invención, la metiltransferasa es una ADN metiltransferasa como se define anteriormente.

La presente invención también se refiere a un método para la preparación de una molécula diana modificada que comprende la incubación de la molécula diana con un compuesto (I) de la presente invención en presencia de una metiltransferasa que es capaz de utilizar el compuesto como cofactor y bajo condiciones que permiten la transferencia de parte de los compuestos a la molécula diana. En una realización preferida de la presente invención, la molécula diana es una molécula de ácido nucleico, un polipéptido, un carbohidrato, o una molécula pequeña o un complejo entre ellos.

20

En una realización más preferida de la presente invención, la molécula pequeña es un fosfolípido, un aminoácido, una hormona, un nucleótido, un nucleósido o un derivado del mismo.

25 En una realización más preferida de la presente invención, el polipéptido se modifica de una forma específica de secuencia.

En una realización más preferida de la presente invención, la molécula de ADN o ARN se modifica de una forma específica de secuencia.

30 En otra realización más preferida de la presente invención, la modificación resulta de la transferencia de un grupo a la molécula diana que es adecuada como marcador y que permite la identificación de la molécula marcada entre otras moléculas no marcadas. Finalmente, en una realización más preferida de la presente invención, el marcador se selecciona de fluoróforos, extintores de fluorescencia, etiquetas de afinidad, etiquetas espín, etiquetas de masa, isótopos raros radiactivos o estables, cromóforos y una nanopartícula detectable.

35 La presente invención también se refiere a un método para detectar la metilación específica de secuencia en una biomolécula, que comprende: (a) poner en contacto una biomolécula con una metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina en presencia de un cofactor detectable de dicha metiltransferasa; y (b) detectar si el sitio de reconocimiento de dicha metiltransferasa se ha modificado con el cofactor o un derivado del mismo, en donde la modificación del sitio de reconocimiento de dicha metiltransferasa es indicativo de una ausencia de metilación en dicho sitio de reconocimiento, en donde dicho cofactor es el compuesto de fórmula (I) de la presente invención o un derivado de la misma, que se describe en la presente memoria anteriormente en detalle.

40 El término "biomolécula" significa ADN, ARN o (poli)péptido. El término "(poli)péptido" se refiere de forma alternativa a péptido o polipéptido. Los péptidos convencionalmente son aminoácidos unidos covalentemente de hasta 30 restos, mientras que los polipéptidos (también denominados "proteínas") comprenden 31 y más restos de aminoácidos. Preferiblemente, la biomolécula es ADN cromosómico o genómico.

45 El término "poner en contacto una biomolécula con una metiltransferasa" significa poner en contacto la biomolécula con la metiltransferasa. Generalmente, esto se puede hacer añadiendo la metiltransferasa a una muestra que contiene la biomolécula. Alternativamente, la muestra que contiene la biomolécula se puede añadir a una solución que contiene la metiltransferasa. El experto en la materia sabe que se podrían requerir condiciones de tampón particulares para una actividad enzimática óptima. Estas condiciones son conocidas por la persona experta o se pueden obtener estudiando la actividad enzimática bajo diversas condiciones de ensayo.

50 Normalmente, la biomolécula se pone en contacto con la metiltransferasa en presencia de un cofactor de la metiltransferasa. Preferiblemente, dicho cofactor es el compuesto de fórmula (I) o un derivado del mismo, que se describe anteriormente en detalle en la presente memoria.

55 El término "metiltransferasa" se refiere a enzimas que normalmente transfieren el metilo activado de S-adenosil-L-metionina (AdoMet) a su sustrato. Preferiblemente, la metiltransferasa es una enzima capaz de metilar ADN, ARN o (poli)péptidos. Más preferiblemente, la metiltransferasa es una ADN metiltransferasa seleccionada de M.TaqI, M.HhaI,

M.XbaI, M.PvuII, M.BsaI, M.FokI, M.BcnIB (M2.BcnI), M.SssI, M. Mpel, M.PstI, M.XhoI, M.BseCI, MMRsrI, M.EcoRI o un derivado de las mismas.

5 El término "detectar si la secuencia de reconocimiento de dicha metiltransferasa se ha modificado con el cofactor o un derivado del mismo significa evaluar si el cofactor de fórmula (I) o un derivado del mismo está unido a la biomolécula. Preferiblemente, los métodos de detección implican identificar el resto particular, dentro de la secuencia de reconocimiento de la metiltransferasa, modificada por el cofactor o el derivado de la misma. Dicho derivado puede ser cualquier compuesto resultante de la reacción entre el compuesto de fórmula (I) o un derivado del mismo y la biomolécula.

10 El término "secuencia de reconocimiento" se refiere a la secuencia particular dentro de la biomolécula reconocida por la metiltransferasa. En caso de que la metiltransferasa sea una ADN metiltransferasa, la secuencia de reconocimiento puede comprender 2, 3, 4, 5, 6 u 8 nucleótidos o pares de nucleótidos. Como se utiliza en la presente memoria, la secuencia de reconocimiento normalmente comprende el sitio aceptor para el compuesto de fórmula (I) de la presente invención o el derivado del mismo. La enseñanza de la presente invención permite el marcaje específico de secuencia de una manera dependiente de la metilación. El marcaje de ADN de los restos de citosina localizados en las llamadas islas CpG es un aspecto particular de la presente invención, ya que esto permite evaluar el estado de metilación del ADN cromosómico humano. Por lo tanto, los métodos de la presente invención son particularmente útiles para, pero no se limitan a, diagnosticar enfermedades asociadas con un estado de metilación alterado del ADN cromosómico. También debería ser útil para acceder al estado de metilación del ADN de otras fuentes, así como al estado de metilación del ARN o (poli)péptidos. Además, el cofactor de fórmula (I) o un derivado del mismo en complejo con una metiltransferasa se podría utilizar para marcar de forma específica el ADN, el ARN o los (poli)péptidos que deberían ser útiles para diversas aplicaciones en bioquímica, biología molecular, terapia génica y nanobiotecnología. Además, el cofactor de fórmula (I) o un derivado del mismo se podría utilizar para encontrar nuevas dianas de metilación para metiltransferasas.

25 En una realización preferida de la presente invención, dicha biomolécula es una molécula de ácido nucleico o un (poli)péptido. Se entenderá que las moléculas de ácido nucleico abarcan ADN y ARN. Preferiblemente, el ADN es ADN cromosómico o genómico. La biomolécula puede ser de cualquier longitud. El término "ADN cromosómico" también abarca fragmentos de un cromosoma. Preferiblemente, dicho fragmento tiene una longitud de hasta 500 nucleótidos (nt), 1 kilobase (kb), 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb o incluso más. Sin embargo, el término ADN cromosómico también abarca fragmentos cortos con una longitud de hasta 5 nt, 10 nt, 15 nt, 20 nt, 25 nt, 30 nt, 35 nt, 40 nt, 45 nt, 50 nt, 100 nt, 200 nt, 300 nt, 400 nt, 500 nt.

35 Y en otra realización preferida de la presente invención, dicha etapa (a) se realiza in vitro, con extractos celulares o in vivo. En general, las condiciones de reacción adecuadas para el tratamiento con enzimas de restricción y ADN metiltransferasas son conocidas por la persona experta y están documentadas, por ejemplo, en libros de texto estándar de biología molecular (véase, p. ej., Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual"; ISBN: 0879695765, CSH Press, Cold Spring Harbor, 2001). Las condiciones adecuadas para el marcaje del cofactor mediado por la variante M.SssI Q142A son, p.ej., 300 µM del compuesto de fórmula (I) o un derivado del mismo, 31.3 fmol de ADN bicatenario, 73 pmol de la variante M.SssI Q142A en tampón (Tris clorhidrato 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, ditiotreitól 1 mM, pH 7.9). La incubación se puede realizar a una temperatura de 37°C durante 4h. Cuando los métodos de la presente invención se llevan a cabo in vitro, se aísla una muestra biológica de un individuo antes del análisis. El término "muestra biológica" se refiere a la muestra tomada del individuo. Preferiblemente, dicha muestra se toma de cabello, piel, superficies mucosas, fluidos corporales, que incluyen sangre, plasma, suero, orina, saliva, esputo, lágrimas, líquido cerebrospinal, semen, líquido sinovial, líquido amniótico, leche materna, linfa, esputo pulmonar, secreción bronquial o heces.

45 El individuo puede ser humano o animal. Preferiblemente, el individuo es aviar, que incluye el pavo o la gallina, o el individuo es un mamífero que incluye humanos, primates, ratas, ratones, cobayas, cerdos, vacas, gatos o conejos.

En una realización más preferida de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico es ADN. Preferiblemente, dicho ADN es ADN cromosómico.

50 En otra realización más preferida de la presente invención, el método comprende además antes de la etapa (a) una etapa de tratar el ADN con una enzima de restricción. Las enzimas de restricción se pueden seleccionar del grupo que consiste en R.AatII, R.Accl, R.Acc65I, R.Acil, R.AclI, R.Afel, R.AfIII, R.AfIII, R.Agel, R.AhdI, R.Alul, R.AlwI, R.AlwNI, R.ApaI, R.ApaLI, R.Apol, R.Ascl, R.Asel, R.AsiSI, R.Aval, R.Avall, R.AvrII, R.Bael, R.BamHI, R.BanI, R.BanII, R.BbsI, R.BbvI, R.BbvCI, R.BceAI, R.Bcgl, R.BciVI, R.BcII, R.Bfal, R.BfrBI, R.BfuAI, R.BgII, R.BgIII, R.Blpl, R.Bme1580I, R.BmgBI, R.Bmrl, R.Bpml, R.Bsal, R.BsaAI, R.BsaBI, R.BsaHI, R.BsaJI, R.BsaWI, R.BsaXI, R.BseRI, R.Bsgl, R.BsiEI, R.BsiHKAI, R.BsiWI, R.BsII, R.BsmI, R.BsmAI, R.BsmBI, R.BsmFI, R.BsoBI, R.Bsp1286I, R.BspCNI, R.BspDI, R.BspEI, R.BspHI, R.BspMI, R.BsrI, R.BsrBI, R.BsrDI, R.BsrFI, R.BsrGI, R.BssHII, R.BssKI, R.BssSI, R.BstAPI, R.BstBI, R.BstEII, R.BstFöI, R.BstNI, R.BstUI, R.BstXI, R.BstYI, R.BstZ17I, R.Bsu36I, R.Btgl, R.BtrI, R.BtsI, R.CacöI, R.Clal, R.Ddel, R.Dpnl, R.DpnII, R.Dral, R.DraIII, R.DrdI, R.Eael, R.Eagl, R.Earl, R.Ecil, R.EcoNI, R.EcoO109I, R.EcoRI, R.EcoRV, R.Faul, R.Fnu4HI, R.FokI, R.Fsel, R.Fspl, R.HaeII, R.HaeIII, R.Hgal, R.Hhal, R.HinPI I, R.HincII, R.HindIII, R.Hinfl, R.Hpal, R.Hpall, R.HphI, R.Hpy99I, R.Hpy188I, R.Hpy188III, R.HpyCH4III, R.HpyCH4IV, R.HpyCH4V, R.KasI, R.KpnI, R.MboI, R.MbolI, R.Mfel, R.Mlul, R.MlyI, R.MnII, R.Mscl, R.Msel, R.MsII, R.Mspl,

R.MspAI I, R.Mwol, R.Nael, R.Narl, R.Ncil, R.Ncol, R.Ndel, R.NgoMIV, R.Nhel, R.Nlall, R.NlaIV, R.NotI, R.Nrul, R.Nsil, R.Nspl, R.Pacl, R.PaeR7I, R.Pcil, R.PfifI, R.PfIMI, R.PleI, R.Pmel, R.PmII, R.PpuMI, R.PshAI, R.Psil, R.PspGI, R.PspOMI, R.PstI, R.Pvul, R.Pvull, R.Rsal, R.RsrII, R.Sacl, R.SacII, R.Sall, R.Sapl, R.Sau96I, R.Sau3AI, R.Sbfl, R.Scal, R.ScrFI, R.SexAI, R.SfaNI, R.Sfcl, R.Sfil, R.Sfol, R.SgrAI, R.Smal, R.SmII, R.SnaBI, R.Spel, R.SphI, R.Sspl, R.Stul, R.Styl, R.Swal, R.TaqI, R.Tfil, R.TiII, R.Tsel, R.Tsp45I, R.Tsp509I, R.TspRI, R.TthH H, R.Xbal, R.XcmI, R.XhoI, R.Xmal y R.Xmnl.

En otra realización más preferida de la presente invención, dicha molécula de ADN está inmovilizada sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos que se pueden emplear de acuerdo con la invención incluyen material de filtro, chips, láminas, placas de microtitulación. La inmovilización en el soporte sólido se puede lograr por diferentes medios, que incluye el acoplamiento covalente a una superficie activada o por hibridación con moléculas de ácido nucleico.

En otra realización más preferida de la presente invención, dicha molécula de ADN está acoplada al soporte sólido hibridando la molécula de ADN a un oligonucleótido que está unido a dicho soporte sólido. Las condiciones de hibridación pueden ser de baja, intermedia o alta rigurosidad. El término "condiciones rigurosas", como se utiliza en la presente memoria, es bien conocido por el experto en la materia y corresponde a condiciones de alta rigurosidad. Un experto en la materia puede establecer condiciones de hibridación rigurosas apropiadas para cada secuencia modificando parámetros tales como temperatura, composición de las moléculas de ácido nucleico, condiciones de sal, etc; véase, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual"; ISBN: 0879695765, CSH Press, Cold Spring Harbor, 2001 o Higgins y Hames (eds.), "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford 1985, véase en particular el capítulo "Hybridization Strategy" de Britten & Davidson, 3 a 15. Las condiciones de hibridación estrictas son, por ejemplo, condiciones que comprenden incubación durante la noche a una temperatura de 42°C en una solución que comprende: 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7.6), 5 x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 µg/ml de ADN desnudo desnaturalizado de esperma de salmón, seguido de lavado de los filtros en 0.1 x SSC a aproximadamente a una temperatura de 65 °C. Otras condiciones de hibridación rigurosas son, por ejemplo, 0.2 x SSC (NaCl 30 mM, citrato de sodio 3 mM, pH 7) a una temperatura de 65°C. Además, para lograr una rigurosidad aún más baja, los lavados realizados después de una hibridación rigurosa se pueden realizar a concentraciones de sal más altas (p. ej., 5 x SSC). Tenga en cuenta que las variaciones en las condiciones anteriores se pueden lograr mediante la inclusión y/o sustitución de reactivos de bloqueo alternativos utilizados para suprimir el fondo en los experimentos de hibridación. Los reactivos de bloqueo típicos incluyen, pero no se limitan a, el reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y formulaciones patentadas disponibles comercialmente. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente, debido a problemas de compatibilidad. También se contemplan condiciones de hibridación de menor rigurosidad.

Los cambios en la rigurosidad de la hibridación y la detección de señales se logran, por ejemplo, mediante la manipulación de la concentración de formamida (los porcentajes más bajos de formamida dan como resultado una rigurosidad reducida), las condiciones de sal o la temperatura. Por ejemplo, las condiciones de menor rigurosidad incluyen una incubación durante la noche a una temperatura de 37 °C en una solución que comprende 6 x SSPE (20 x SSPE = NaCl 3 M, NaH₂PO₄ 0.2 M, EDTA 0.02 M, pH 7.4), 0.5% de SDS 30% de formamida, 100 µg/ml de esperma de salmón que bloquea el ADN; seguido de lavados a una temperatura de 50 °C con 1 x SSPE, 0.1% de SDS. Además, para lograr una rigurosidad aún más baja, los lavados realizados después de una hibridación rigurosa se pueden realizar a concentraciones de sal más altas (p. ej., 5 x SSC).

En otra realización más preferida de la presente invención, la metiltransferasa es una ADN metiltransferasa huérfana o parte de un sistema de modificación de restricción bacteriana.

En otra realización más preferida de la presente invención, dicha metiltransferasa se selecciona de M.TaqI, M.HhaI, M.XbaI, M.PvuII, M.BsaI, M.FokI, M.BcnIB (M2.BcnI), M.SssI, M.MpeI, M.PstI, M.XhoI, M.BseCI, MMRsrI, M.EcoRI o un derivado de la misma. Sin embargo, cualquier otra metiltransferasa con la misma especificidad de secuencia, es decir, con la misma secuencia de reconocimiento, o una especificidad de secuencia reducida que comprende solo una parte de la secuencia de reconocimiento de M.TaqI, M.HhaI, M.BcnIB (M2.BcnI), M.SssI, M.BseCI, M.RsrI, M2.BfiI (M.BfiC2) y M2.Eco31 I podrían ser útiles para los métodos de la presente invención.

En otra realización más preferida de la presente invención, (a) el compuesto de fórmula (I) de la presente invención o un derivado del mismo bloquea la escisión de la enzima de restricción en o cerca de la secuencia de reconocimiento de la ADN metiltransferasa; y (b) la metilación se detecta probando si la modificación del ADN por dicho compuesto bloquea la escisión mediada por una enzima de restricción en o cerca de dicha secuencia de reconocimiento. Cualquier enzima de restricción y ADN metiltransferasa mencionada en la presente invención se puede utilizar al realizar este método.

El autor de la presente invención ha observado que la presencia del compuesto de fórmula (I) de la presente invención en el sitio aceptor de la secuencia de reconocimiento bloquea la escisión del ADN mediante enzimas de restricción con una superposición o la misma secuencia de reconocimiento. Bloquear la escisión de la enzima de restricción, como se utiliza en la presente memoria, significa evitar que la enzima de restricción corte las cadenas de ADN. Sin limitarse a la teoría, se supone que el impedimento estérico bloquea la accesibilidad de la secuencia de reconocimiento

de modo que la enzima de restricción ya no se puede unir a su secuencia diana de manera productiva. Esta observación se puede explotar mediante ensayos que implican una etapa de marcaje inicial con el compuesto de la presente invención y una etapa de escisión posterior con una enzima de restricción. Naturalmente, la elección de la enzima de restricción depende de la ADN metiltransferasa particular empleada en la etapa de marcaje. Como pauta general, la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción debe estar cerca de la base modificada. Preferiblemente, la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción comprende la base modificada. Más preferiblemente, la secuencia de reconocimiento de la ADN metiltransferasa y la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción son las mismas. La elección de combinaciones particulares de enzima de restricción y la ADN metiltransferasa es obvia para la persona experta y no necesita más explicaciones. Además, la reacción de marcaje realizada por la ADN metiltransferasa y la escisión de la enzima de restricción se pueden realizar en condiciones estándar.

En otra realización más preferida de la presente invención, (a) el compuesto de fórmula (I) de la presente invención o un derivado del mismo interfiere con la amplificación de ácido nucleico en el sitio de reconocimiento de la metiltransferasa; y (b) la metilación se detecta probando si la amplificación de la molécula de ácido nucleico en el sitio de reconocimiento de la metiltransferasa se ha retrasado.

El retraso de la amplificación se puede lograr interfiriendo la unión del cebador o el alargamiento de la cadena durante una reacción de amplificación.

El término "amplificación" o "amplificar" significa aumento en el número de copias. El experto en la materia conoce varios métodos para amplificar moléculas de ácido nucleico, estos métodos también se pueden utilizar en el método de diagnóstico de la presente invención. Los métodos de amplificación incluyen, pero no se limitan a, "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR, por sus siglas en inglés), "reacción en cadena de la ligasa" (LCR, por sus siglas en inglés, EPA320308), "reacción de la sonda cíclica" (CPR, por sus siglas en inglés), "amplificación por desplazamiento de cadena" (SDA, por sus siglas en inglés, Walker et al., (1992) *Nucleic Acid Res.* 7, 1691-1696), "sistemas de amplificación basados en transcripción" (TAS1, por sus siglas en inglés, Kwoh et al., (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86, 1173; Gingeras et al., Solicitud PCT nº WO 88/10315). Preferiblemente, la amplificación de ADN se logra utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Methods in Molecular Biology, vol. 226 (Bartlett y Stirling, eds.): PCR protocols, 2nd edition; PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Erlich, ed.), New York 1992; PCR Protocols: A guide to methods and applications (Innis et al., Eds.), Academic Press, San Diego 1990]. Los métodos de amplificación de ácido nucleico pueden ser particularmente útiles en los casos en que la muestra contiene solo pequeñas cantidades de ácido nucleico. Si dicho ácido nucleico es ARN, se podría realizar una RT-PCR. Posteriormente, se puede realizar otra etapa de amplificación que involucra PCR. Alternativamente, si dicho ácido nucleico contenido en la muestra es ADN, se puede realizar la PCR.

La PCR, en general, consiste en muchas repeticiones de un ciclo que consiste en: (a) una etapa de desnaturalización, que funde ambas cadenas de una molécula de ADN; (b) una etapa de apareamiento, que tiene como objetivo permitir que los cebadores se apareen específicamente a las cadenas fundidas de la molécula de ADN; y (c) una etapa de extensión, que alarga los cebadores apareados utilizando la información proporcionada por la cadena molde. En general, la PCR se puede realizar, por ejemplo, en una mezcla de reacción de 50 µl que contiene 5 µl de 10 x tampón de PCR con MgCl₂ 1.5 mM, 200 µM de cada desoxinucleósido trifosfato, 0.5 µl de cada cebador (10 µM), aproximadamente 10 a 100 ng de ADN molde y de 1 a 2.5 unidades de ADN polimerasa Taq. Los cebadores para la amplificación pueden estar marcados o no marcados. La amplificación de ADN se puede realizar, p. ej., con un termociclador modelo 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA): 2 min a una temperatura de 94 °C1 seguido de 35 ciclos que consisten en apareamiento (30 s a una temperatura de 50°C), extensión (1 min a una temperatura de 72°C), desnaturalización (10 s a una temperatura de 94°C) y una etapa de apareamiento final a una temperatura de 55°C durante 1 min, así como una etapa de extensión final a una temperatura de 72°C durante 5 min. Sin embargo, el experto en la materia sabe cómo optimizar estas condiciones para la amplificación de moléculas de ácido nucleico específicas o para reducir o aumentar el volumen de la mezcla de reacción.

Otro método de amplificación de ácido nucleico es la "reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa" (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Este método se utiliza cuando el ácido nucleico a amplificar consiste en ARN. El término "transcriptasa inversa" se refiere a una enzima que cataliza la polimerización de trifosfatos desoxirribonucleósidos para formar productos de extensión de cebadores que son complementarios a un molde de ácido ribonucleico. La enzima inicia la síntesis en el extremo 3' del cebador y avanza hacia el extremo 5' del molde hasta que termina la síntesis. Ejemplos de agentes de polimerización adecuados que convierten la secuencia diana de ARN en una secuencia de copia de ADN (ADNc), complementaria son la transcriptasa inversa del virus de mieloblastosis aviar y la ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*, una ADN polimerasa termoestable con actividad de transcriptasa inversa comercializada por Perkin Elmer. Típicamente, el molde dúplex de ARN/ADNc genómico se desnaturaliza por calor durante la primera etapa de desnaturalización después de la etapa de transcripción inversa inicial, dejando la cadena de ADN disponible como molde de amplificación. Las polimerasas adecuadas para utilizar con un molde de ADN incluyen, por ejemplo, la ADN polimerasa I de *E. coli* o su fragmento Klenow, la ADN polimerasa T.sub.4, la polimerasa Tth y la polimerasa Taq, una ADN polimerasa termoestable aislada de *Thermus aquaticus* y desarrollada y fabricada por Hoffmann-La Roche y comercialmente disponible en Perkin Elmer. La última enzima se utiliza ampliamente en la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos. Las condiciones de reacción para utilizar la ADN polimerasa Taq se conocen en la técnica y se describen, p. ej., en: PCR Technology, Erlich (1989, Stockton

Press, New York; o en: Innis, Gelfand, Sninsky y White. 1990, PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, New York. La RT a alta temperatura proporciona mayor especificidad del cebador y eficiencia mejorada. La solicitud de patente de EE.UU., en tramitación con la presente, nº de serie 07/746, 121, presentada el 15 de agosto de 1991, describe una "RT-PCR homogénea" en la que los mismos cebadores y polimerasa son suficientes tanto para la transcripción inversa como para las etapas de amplificación de PCR, y las condiciones de reacción se optimizan para que ambas reacciones ocurran sin un cambio de reactivos. La ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*, una ADN polimerasa termoestable que puede funcionar como una transcriptasa inversa, se puede utilizar para todas las etapas de extensión del cebador, independientemente del molde. Ambos métodos se pueden realizar sin tener que abrir el tubo para cambiar o añadir reactivos; solo el perfil de temperatura se ajusta entre el primer ciclo (molde de ARN) y el resto de los ciclos de amplificación (molde de ADN). La reacción de la RT se puede realizar, por ejemplo, en una mezcla de reacción de 20 µl que contiene: 4 µl de 5 x tampón ANV-RT, 2 µl de oligo dT (100 µg/ml), 2 µl de dNTP 10 mM, 1 µl total de ARN, 10 unidades de transcriptasa inversa de AMV y H₂O hasta 20 µl de volumen final. La reacción se puede realizar, por ejemplo, utilizando las siguientes condiciones: La reacción se mantiene a una temperatura de 70°C durante 15 minutos para permitir la transcripción inversa. La temperatura de reacción se eleva después a 95°C durante 1 minuto para desnaturalizar el dúplex de ARN-ADN. A continuación, la temperatura de reacción experimenta dos ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 20 segundos, seguidos de 38 ciclos de 90°C durante 15 segundos y 60°C durante 20 segundos. Finalmente, la temperatura de reacción se mantiene a una temperatura de 60°C durante 4 minutos para la etapa de extensión final, se enfría hasta 15°C y se mantiene a esa temperatura hasta el procesamiento adicional de la muestra amplificada.

El término "cebador" u "oligonucleótido", como se utiliza a lo largo de la invención, se refiere a una molécula de ácido nucleico corta de aproximadamente 8 a aproximadamente 30, eventualmente de aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, ya sea natural o sintética, capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador complementario a una cadena de ácido nucleico molde, es decir, en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes o análogos de los mismos y un agente para la polimerización (es decir, ADN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Preferiblemente, un cebador es un oligodesoxirribonucleótido monocatenario. La longitud apropiada de un cebador depende del uso previsto del cebador, pero generalmente varía para los cebadores de PCR y los cebadores utilizados en reacciones de secuenciación de 10 a 25 nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde, pero debe ser lo suficientemente complementario para hibridarse específicamente con un molde, siempre que su capacidad para mediar la amplificación no se vea comprometida. "Hibridar" se refiere a la unión de dos ácidos nucleicos monocatenarios mediante un apareamiento de bases complementario, es decir, A con T (en ARN: U), G con C. El término "par de cebadores" se refiere a dos cebadores que se hibridan con la cadena positiva y negativa, respectivamente, de una molécula de ácido nucleico bicatenario, y permiten la amplificación de, p. ej., fragmentos de ADN, como por ejemplo en una reacción de PCR. Un cebador se puede marcar, si se desea, incorporando un compuesto detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, las etiquetas útiles incluyen, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, biotina o péptidos pequeños para los cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. También se puede utilizar un marcador para "capturar" el cebador, a fin de facilitar una selección de ácido nucleico amplificado o fragmentos del mismo. Los marcadores preferidos son carboxifluoresceína (FAM) y 6-carboxi-X-rodamina (ROX). Sin embargo, otros marcadores preferidos incluyen fluorocromos, p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), rojo Texas, ficoeritrina, alofocianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4I,5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o N.N.N'.N'-tetraetil-θ-carboxirodamina, marcadores radiactivos, p. ej., 32P, 35S, 3H; etc.

El marcador también puede ser un sistema de dos etapas, donde el cebador se conjuga con biotina, haptenos, etc., que tiene coparticipes de unión de alta afinidad, p. ej., avidina, anticuerpos específicos, etc., donde el copartícipe de unión se conjuga con un marcador detectable. El marcador se puede conjugar con uno o ambos cebadores.

Durante dicho método de diagnóstico, se puede realizar una etapa de secuenciación de ácido nucleico. Cualquier método conocido en la técnica se puede utilizar para la secuenciación.

Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico se determina mediante un método basado en las técnicas de secuenciación de Sanger o Maxam/Gilbert (véase, por ejemplo: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 167 (Graham and Hill, eds.): DNA sequencing protocols. 2nd edition, 2001; Galas and McCormack, *Genomic Technologies: Present and Future*. Caister Academic Press, Wymondham, UK, 2002).

En una realización preferida de la presente invención, la PCR es PCR en tiempo real. En otra realización preferida de la presente invención, la amplificación de ácido nucleico se lleva a cabo mediante PCR en tiempo real.

En otra realización más preferida de la presente invención, (a) el compuesto de fórmula (I) de la presente invención o un derivado del mismo contiene un marcador fluorescente; y (b) la metilación se detecta midiendo la presencia o la cantidad de fluorescencia en dicha molécula de ácido nucleico. Dicho compuesto de fórmula (I) de la presente invención o un derivado del mismo se puede marcar con cualquiera de los marcadores fluorescentes mencionados en la presente invención o conocidos por el experto en la materia. De acuerdo con la presente invención, Alexa, BODIPY, bimano, cumarina, Cascade blue, dansilo, dapoxilo, fluoresceína, mansilo, MANT, verde Oregon, pireno, rodamina,

verde Tokyo, rojo Texas, ATTO, nanocristales fluorescentes (puntos cuánticos), un fluoróforo de cianina y sus derivados son marcadores particularmente preferidos.

5 "Medir la presencia o la cantidad de fluorescencia" significa evaluar si, o no, o cuánta fluorescencia se puede detectar mediante espectroscopía de fluorescencia.

En otra realización más preferida de la presente invención, (a) las moléculas de ácido nucleico modificadas en la secuencia de reconocimiento de metiltransferasa se purifican mediante purificación por afinidad; y (b) el compuesto de fórmula (I) de la presente invención o un derivado del mismo contiene una etiqueta de afinidad.

10 Las moléculas de ácido nucleico se pueden purificar utilizando un compuesto capaz de unirse específicamente al marcador del compuesto de fórmula (I) de la presente invención o un derivado del mismo. En ese caso, el marcador corresponde o comprende una etiqueta de afinidad. Una etiqueta de afinidad se puede combinar con una o más etiquetas fluorescentes. Preferiblemente, el compuesto capaz de unirse al marcador o etiqueta de afinidad es un anticuerpo, una proteína, un péptido o un aptámero, en donde la unión de estos compuestos es específica. La etiqueta de afinidad puede ser un epítipo tal como la etiqueta flag, etiqueta c-myc, etiqueta HA, digoxigenina o dinitrofenol. Alternativamente, la etiqueta de afinidad puede ser un péptido artificial tal como la etiqueta His. Las "etiquetas His" se pueden seleccionar de His4> His5, His6) His7, His8, Hisg, His-io, His-n, Hisi2, Hisi3, His-u, HiSi5. Además, la etiqueta de afinidad puede ser biotina, etiqueta strep, glutatión, ácido níquel-nitrilotriacético (NTA, por sus siglas en inglés) o maltosa. Si la etiqueta de afinidad es una "etiqueta His", se puede utilizar níquel acoplado a un soporte sólido para la purificación. Si la etiqueta de afinidad es un epítipo, se puede utilizar una afinidad de anticuerpos acoplada a un soporte sólido para la purificación. Si la etiqueta de afinidad es biotina o etiqueta strep, se puede utilizar avidina o estreptavidina o similares unidos a un soporte sólido para la purificación. Si la etiqueta de afinidad es glutatión, se puede utilizar glutatión transferasa (GST) unida a un soporte sólido para la purificación. Si la etiqueta de afinidad es maltosa, se puede utilizar proteína de unión a maltosa unida a un soporte sólido para la purificación. Si la etiqueta de afinidad es ácido níquel-nitrilotriacético (NTA), se puede utilizar un péptido que contiene varios restos de histidina unidos a un soporte sólido para la purificación.

30 La purificación por afinidad generalmente implica la separación de moléculas en solución (fase móvil) en función de las diferencias en la interacción de unión con un ligando que se inmoviliza en un material estacionario (fase sólida). Un soporte o matriz en la purificación por afinidad es cualquier material al que se puede unir covalentemente un ligando. Típicamente, el material que se utilizará como matriz de afinidad es insoluble en el sistema en el que se encuentra la molécula diana. Usualmente, pero no siempre, la matriz insoluble es sólida. Cientos de sustancias han sido descritas y empleadas como matrices de afinidad. Los soportes de afinidad útiles son aquellos con una alta relación de área de superficie a volumen, grupos químicos que se modifican fácilmente para la unión covalente de ligandos, propiedades de unión mínimas no específicas, buenas características de flujo y estabilidad mecánica y química. Los soportes sólidos preferidos son perlas de agarosa, sefarosa y poliestireno.

35 Preferiblemente, la purificación por afinidad se realiza utilizando biotina, digoxigenina, glutatión o ácido níquel-nitrilotriacético (NTA) como la etiqueta de afinidad del compuesto de fórmula (I) de la presente invención o un derivado del mismo.

En otra realización más preferida de la presente invención, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención o un derivado del mismo se añade a un resto de citosina y no se puede añadir a un resto de 5-metilcitosina en el ADN.

40 En una realización preferida de la presente invención, el método comprende después de la etapa (a) la etapa adicional de secuenciar la molécula de ADN. Cualquier método conocido en la técnica se puede utilizar para la secuenciación. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico se determina mediante un método basado en las técnicas de secuenciación de Sanger o Maxam/Gilbert (véase, por ejemplo: Methods in Molecular Biology, Vol. 167 (Graham and Hill, eds.): ADN sequencing protocols. 2nd edition, 2001; Galas y McCormack, Genomic Technologies: Present and Future. Caister Academic Press, Wymondham, UK, 2002).

En otra realización preferida de la presente invención, el marcador de dicho cofactor detectable se detecta mediante (a) un anticuerpo que se une específicamente al marcador de dicho cofactor detectable o mediante (b) avidina o estreptavidina que se une específicamente al marcador de dicho cofactor detectable.

50 El término "anticuerpo", como se utiliza a lo largo de la invención, se refiere a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla o un fragmento de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo es específico para su epítipo. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, F(ab2)', Fv o scFv, etc., o un derivado modificado químicamente de cualquiera de estos. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, mediante las técnicas descritas originalmente en Kohler y Milstein, (1975) Nature 256, 495, y Galfre, (1981) Meth. Enzymol 73, 3, que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células de bazo obtenidas a partir de mamíferos inmunizados con modificaciones desarrolladas por la técnica. Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden obtener utilizando métodos que se describen, p. ej., en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1998. Cuando se obtienen derivados de dichos anticuerpos mediante la técnica de visualización de fagos, se puede utilizar la resonancia de plasmón superficial como se utiliza en el sistema BIAcore

para aumentar la eficacia de los anticuerpos de fago que se unen a un epítipo para ser analizados (Schier, (1996) Human Antibodies Hybridomas 7, 97-105; Malmborg, (1995) J. Immunol. Methods 183, 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en el documento WO89/09622.

5 Los anticuerpos pueden estar marcados, en donde el marcador puede ser cualquiera de los marcadores mencionados en la presente invención.

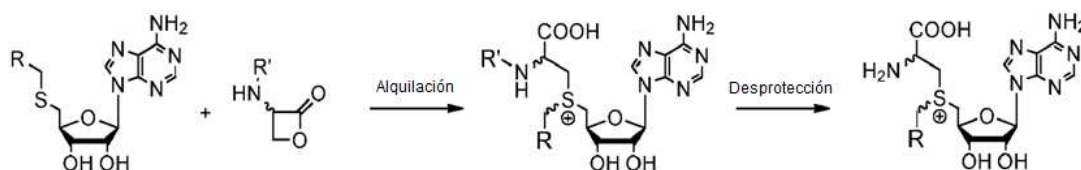
Finalmente, en otra realización preferida de la presente invención, la identidad de dicha molécula de ADN se determina mediante secuenciación de ADN, hibridación, Maldit-Tof o análisis de la composición de nucleósidos mediante fragmentación enzimática y cromatografía.

10 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos sin limitarse a estos ejemplos.

En un aspecto, la presente invención también se refiere a la síntesis de un compuesto como se describe anteriormente. El método de síntesis se basa en el acoplamiento de un tioéter con una lactona. Una ventaja de las realizaciones de la presente invención es que los cofactores se pueden hacer con alta eficiencia, en comparación con al menos algunos cofactores conocidos de la técnica anterior. El método permite, por ejemplo, la síntesis directa de un cofactor fluorescente. A modo de ilustración, la FIG. 6 (porción superior) muestra una comparación entre métodos de síntesis ejemplares de los cofactores descritos en la patente de EE.UU. 8,008,007 B2 y la síntesis utilizada para preparar compuestos según las realizaciones de la presente invención. Ejemplos específicos de rendimientos obtenidos para diferentes métodos de síntesis ejemplares se muestran en la FIG. 6 (porción inferior). Se debe observar que el rendimiento que se puede obtener sin la necesidad de proporcionar un gran exceso (p. ej., con menos de 2 equivalentes moleculares) del grupo funcional, que se transferirá después al utilizar el cofactor, puede ser del 50% o más alto. Incluso si se proporciona un gran exceso de equivalentes en la síntesis de compuestos conocidos de la técnica anterior (p. ej., como se describe en la patente de EE.UU. 8,008,007), el rendimiento aún no alcanza el rendimiento obtenido al sintetizar los compuestos según las realizaciones de la presente invención.

Ejemplos

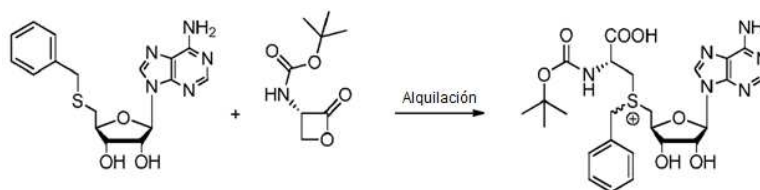
25 Esquema general de reacción para la síntesis de compuestos cofactores:



Condiciones de HPLC: Disolvente A: gradiente de metanol en formiato de amonio 20 mM; 20% a 100% durante 30 minutos; Disolvente B: gradiente de metanol en formiato de amonio 20 mM; 0% a 30% en 20 minutos, aumentó a 60% en 10 minutos y aumentó a 100% en 2 minutos; Disolvente C: gradiente de metanol en formiato de amonio 20 mM; 0% a 20% en 30 minutos, aumentado a 100% en 10 minutos.

30 0% a 20% en 30 minutos, aumentado a 100% en 10 minutos.

Ejemplo 1: Sal de (bencil)(5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio

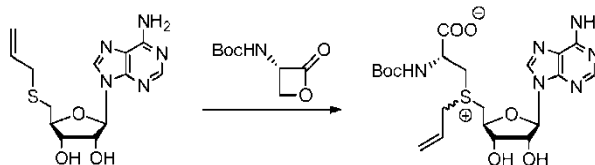


Se cargó cloroadenosina (5.71 g, 20 mmol) en un matraz de fondo redondo y se suspendió en etanol (100 ml). Se añadió carbonato de potasio (5.52 gramos, 40 mmoles, 2 equivalentes, finamente molido). Se eliminó el oxígeno mediante lavado con nitrógeno bajo sonicación. Se añadió bencil tior (2.82 ml, 24 mmol, 1,2 equivalentes) en condiciones libres de oxígeno, y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 3 horas, cuando el análisis por TLC indicó reacción completa. La mezcla de reacción se filtró mientras estaba caliente y el sobrenadante se dejó enfriar a temperatura ambiente. El disolvente se retiró a vacío y el sólido blanco resultante, 5'-desoxi-5'-(benciltio) adenosina, se purificó por cristalización en 2-propanol. Rendimiento del 91%. ¹H-NMR δ 8.34 (s,1H), 8.14 (s,1H), 7.31-7.18 (m,7H), 5.88 (d,1H), 5.51 (d,1H), 5.31 (d,1H), 4.75 (q,1H), 4.17 (m,1H), 4.02 (m,1H), 3.73 (s, 2H), 2.86-2.64 (dq, 2H). ESI-MS: 374.1 (M+H⁺).

La 5'-desoxi-5'-(benciltio)adenosina (37 mg, 0.1 mmol) se suspendió en ácido fórmico (100 μl), seguido de la adición de N-Boc-L-serina β-lactona (28 mg, 1.5 equivs.). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. El disolvente se retiró a vacío a una temperatura de 30 °C y se purificó cromatográficamente (HPLC, disolvente A): diastereómeros del producto a 24.8 min y 25.4 min, material de partida a 29.8 min. ESI-MS 562 (M+H⁺). Rendimiento: 48%

45

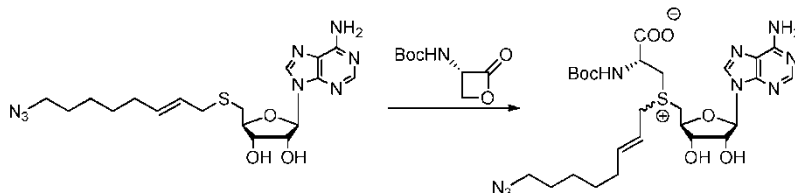
Ejemplo 2: Sal de (alil)(5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio



5 Se cargó cloroadenosina (2.85 g, 10 mmol) en un matraz de fondo redondo y se suspendió en agua (50 ml). Se añadió hidróxido de sodio (1.6 g., 40 mmoles, 2 equivalentes). Se eliminó el oxígeno mediante lavado con nitrógeno bajo sonicación. Se añadió alil tiol (1.41 ml de una pureza del 70%, 12 mmoles, 1.2 equivalentes) en condiciones libres de oxígeno, y la mezcla resultante se calentó a una temperatura de 60 °C durante 90 minutos, cuando el análisis por TLC (CH₂Cl₂: MeOH; 9:1) indicó reacción completa. La mezcla de reacción se enfrió a 0°-4° C utilizando un baño de hielo y se agitó durante 15 minutos. El precipitado resultante se filtra, se lava con agua y se seca al vacío. El compuesto era de pureza suficiente para uso adicional. ¹H-NMR (DMSO) δ 8.35 (s,1H), 8.15 (s,1H), 7.30 (s,2H), 5.88 (d,1H), 5.80-5.68 (m,1H), 5.51(d,1H), 5.32 (d,1H), 5.08-5.05 (m,1H), 5.03 (s,1H), 4.75 (m,1H), 4.17 (m,1H), 4.01 (m,1H), 3.17 (m,2.89 -2.68). ESI-MS 324 (M+H⁺).

15 La 5'-desoxi-5'-(alilitio)adenosina (32 mg, 0.1 mmol) se suspendió en ácido fórmico (100 l), seguido de la adición de N-Boc-L-serina β-lactona (28 mg, 1.5 equivs.). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. El disolvente se eliminó a vacío a una temperatura de 30 °C y se purificó cromatográficamente (HPLC, disolvente A): diastereómeros del producto a 20.2 min. y 20.8 min., material de partida a 25.5 min. ESI-MS 511 (M+H⁺). Rendimiento: 29%

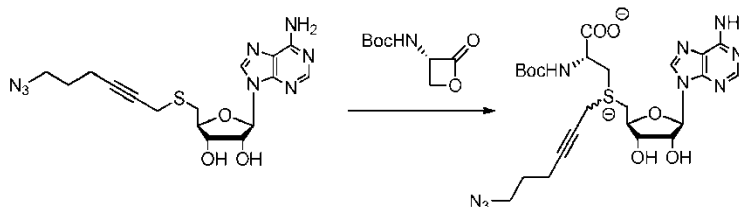
Ejemplo 3: Sal de (8-azido-oct-2-eno)(5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio



20 La S-(E)-8-azido-oct-2-eno-5'-tioadenosina se prepara calentando 5'-tioadenosina (141 mg, 0.5 mmol, véase Pignot et al., Eur. J. Org. Chem, 2000, 549 para síntesis), (E)-8-azido-1-bromooct-2-eno (127 mg, 0.55 mmoles) y NaOCH₃ (30 mg, 0.55 mmoles) en CH₃OH (10 ml) a una temperatura de 70°C durante 3h, seguido de evaporación y purificación cromatográfica (sílice, CH₂Cl₂:MeOH 9:1). El compuesto se obtiene como una espuma incolora con un rendimiento del 58%. ¹H-NMR (CD₃OD) δ8.30 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 5.99 (d, 1H), 5.38 (m, 2H), 4.77 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.16 (m, 1H), 3.23-3.04 (m, 4H), 2.87 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 1.51 (m, 2H), 1.32 (m, 4H), MS (ESI) 434.2 (M+H⁺).

25 La S-(E)-8-azido-oct-2-eno-5'-tioadenosina (88 mg, 0.2 mmol) se suspendió en ácido fórmico (100 l), seguido de la adición de N-Boc-L-serina β-lactona (56 mg, 1.5 equiv.). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. El disolvente se retiró a vacío a una temperatura de 30 °C y se purificó cromatográficamente (HPLC, disolvente A): diastereómeros del producto a 29.8 min. y 30.1 min., material de partida a 34.8 min. ESI-MS 622.2 (M+H⁺). Rendimiento: 64%

Ejemplo 4: Sal de (6-azido-hex-2-ino)(5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio

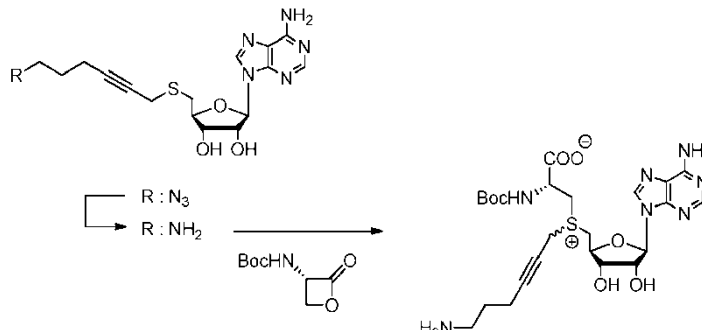


35 La S-6-azido-hex-2-ino-5'-tioadenosina se prepara calentando 5'-tioadenosina (142 mg, 0.5 mmol, véase Pignot et al., Eur. J. Org. Chem, 2000, 549 para síntesis), 6-azido-1-bromohex-2-ino (162 mg, 0.8 mmoles) y NaOCH₃ (43 mg, 0.8 mmoles) en DMF (4 ml) a una temperatura de 70°C durante 3 h, seguido de evaporación y purificación cromatográfica (sílice, CH₂Cl₂: MeOH 9:1). El compuesto se obtiene como espuma incolora. Rendimiento: 74%. ¹H-NMR (CD₃OD)δ8.32 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 6.02 (d, 1H), 5.38 (m, 2H), 4.80 (t, 1H), 4.36 (t, 1H), 4.27 (dd, 1H), 3.40 (t, 2H), 3.15-3.01 (m, 2H), 2.33-2.27 (m, 2H), 1.72 (m, 2H) MS (ESI) 405.5 (M+H⁺).

40 La S-6-azido-hex-2-ino-5'-tioadenosina (40 mg, 0.1 mmol) se suspendió en ácido fórmico (100 μl), seguido de la adición de N-Boc-L-serina β-lactona (28 mg, 1.5 equiv.). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a temperatura

ambiente durante dos horas. El disolvente se retiró a vacío a una temperatura de 30 °C, y se purificó cromatográficamente (HPLC, disolvente A): diastereómeros de producto a 25.8 min. y 26.1 min., material de partida a 29.7 min. ESI-MS 492.2 (M+H⁺). Rendimiento: 56%

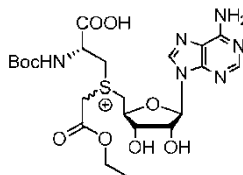
5 Ejemplo 5: Sal de (6-amino-hex-2-ino)(5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio



10 La S-6-amino-hex-2-ino-5'-tioadenosina se prepara calentando S-6-azido-hex-2-ino-5'-tioadenosina (404 mg, 1 mmol, véase ejemplo 4) en un THF: Mezcla de H₂O (10 ml, 5 ml) en presencia de trifetilfosfina (314 mg, 1.2 mmoles) a reflujo durante 3 h, seguido de evaporación y purificación cromatográfica (almohadilla de sílice, CH₂Cl₂: MeOH 7:3). El compuesto se obtiene como espuma incolora. Rendimiento: 74%. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.35 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.31 (s, 2H), 5.89 (d, 1H), 4.75 (t, 1H), 4.15 (t, 1H), 4.06 (dd, 1H), 3.05-2.87 (m, 2H), 2.72 (t, 2H), 2.29-2.23 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), MS (ESI) 379.1 (M+H⁺).

15 La S-6-amino-hex-2-ino-5'-tioadenosina (38 mg, 0.1 mmol) se suspendió en ácido fórmico (100 μl), seguido de la adición de N-Boc-L-serina β-lactona (28 mg, 1.5 equivs.). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. El disolvente se retiró a vacío a una temperatura de 30 °C y se purificó cromatográficamente (HPLC, disolvente A): diastereoisómeros de producto a 17.0 min. y 17.6 min., material de partida a 19.7 min. ESI-MS 566.2 (M+H⁺). Rendimiento: 27%

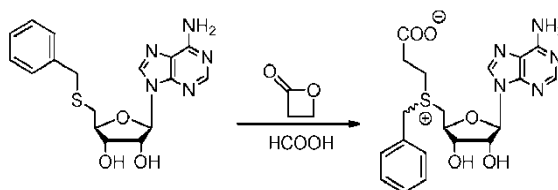
Ejemplo 6: Sal de (etilcarboximetil)(5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio



20 Se cargó cloroadenosina (2.85 g, 10 mmol) en un matraz de fondo redondo y se suspendió en agua (50 ml). Se añadió hidróxido de sodio (1.6 gramos, 40 mmoles, 4 equivalentes). Se retiró el oxígeno mediante lavado con nitrógeno bajo sonicación. Se añadió mercaptoacetato de etilo (1.31 ml, 12 mmol, 1.2 equivalentes) bajo condiciones libres de oxígeno, y la mezcla resultante se calentó a una temperatura de 80°C durante 150 minutos, cuando el análisis por TLC (CH₂Cl₂: MeOH; 9:1) indicó reacción completa. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado se filtró, se lavó con agua (2X), etanol frío (2X) y se secó al vacío. El compuesto era de pureza suficiente para uso adicional. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.33 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.30 (s, 2H), 5.88 (d, 1H), 5.52 (d, 1H), 5.33 (s, 2H), 4.72 (m, 1H), 4.17-4.00 (m, 4H), 3.40 (m, 2H), 3.03-2.88 (m, 2H), 1.14 (t, 3H).

30 La S-etilcarboximetil-5'-tioadenosina (38 mg, 0.1 mmol) se suspendió en ácido fórmico (100 μl), seguido de la adición de N-Boc-L-serina β-lactona (28 mg, 1.5 equivs.). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. El disolvente se retiró a vacío a una temperatura de 30 °C y se purificó cromatográficamente (HPLC, disolvente A): diastereómeros del producto a 22.8 min. y 23.0 min, material de partida a 23.7 min. ESI-MS 557.2 (M+H⁺). Rendimiento: 53%

Ejemplo 7: Sal de (bencil)(5'-desoxiadenosil)-(3-propionato)sulfonio

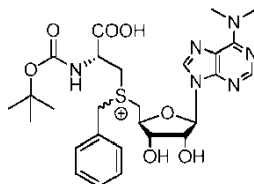


35 La 5'-desoxi-5'-(benciltio)adenosina (véase el Ejemplo 1, 37 mg, 0.1 mmoles) se suspendió en ácido fórmico (100 μl), seguido de la adición de β-propiolactona (9.5 μl, 1.5 equivas). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a

temperatura ambiente durante dos horas. El disolvente se retiró a vacío a una temperatura de 30 °C, dando como resultado el producto como un semisólido incoloro de suficiente pureza para su uso posterior. Tiempo de retención del producto (disolvente A de HPLC): 3.99 min., material de partida 29.22 min. ESI-MS 446.1 (M+H⁺). Rendimiento (racémico): 93%.

5

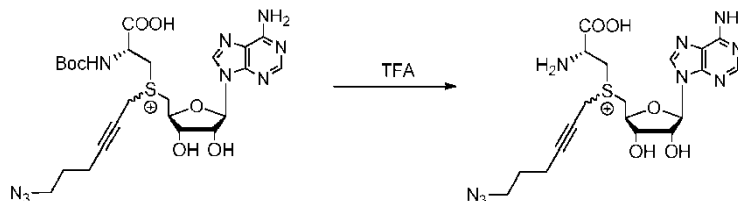
Ejemplo 8: Sal de (bencil)(5'-desoxi-N⁶,N⁶-dimetiladenosina)-(N-Boc-L-cisteína) sulfonio



La 5'-desoxi-5'-(benciltio)-N⁶,N⁶-adenosina (38 mg, 0.1 mmol) se suspendió en ácido fórmico (100 μl), seguido de la adición de N-Boc-L-serina β-lactona (28 mg, 1.5 equiv.). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. El disolvente se retiró a vacío a una temperatura de 30 °C y se purificó cromatográficamente (HPLC, disolvente A): diastereómeros del producto a 28.7 min. y 29.3 min., material de partida 33.3 min. ESI-MS 589.2 (M+H⁺). Rendimiento: 46%

10

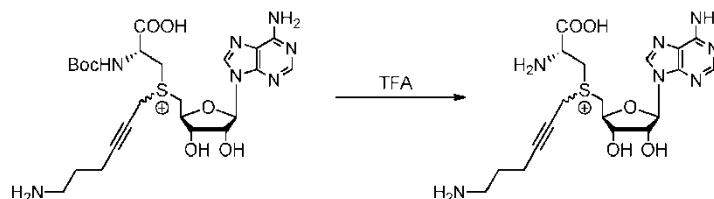
Ejemplo 9: Sal de(6-azido-hex-2-ino)(5'-desoxiadenosil)-(L-cisteína)sulfonio



La sal de (6-azido-hex-2-ino)(5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio (Racémico, escala de 0.1 mmol, véase ejemplo 4 para síntesis) se suspende en TFA (100 μl) y se agita a temperatura ambiente durante 2 h. El ácido trifluoroacético se retira a presión reducida y el producto bruto se purifica cromatográficamente. Tiempo de retención de productos (HPLC, disolvente A): 14.5 min. y 15.9 min. ESI-MS 492.2 (M+H⁺). Rendimiento: cuant.

15

Ejemplo 10: Sal de (6-amino-hex-2-ino)(5'-desoxiadenosil)-(L-cisteína)sulfonio

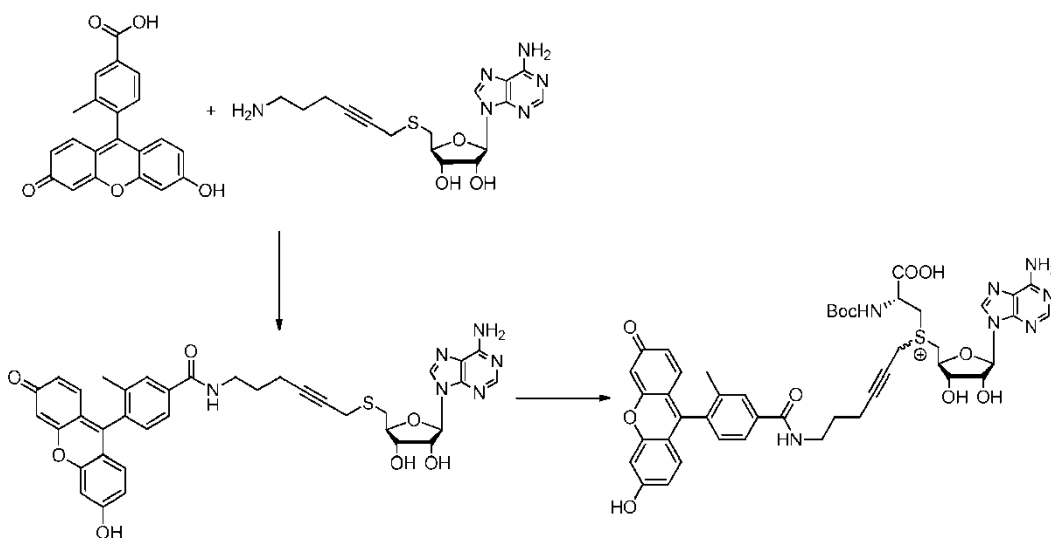


20

La sal (6-amino-hex-2-ino) (5'-desoxiadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio (Racémico, escala de 0.1 mmoles, véase ejemplo 5 para síntesis) se suspende en TFA (100 μl) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El ácido trifluoroacético se retira a presión reducida y el producto bruto se purifica cromatográficamente. Tiempo de retención de productos (HPLC, disolvente B): 8.8 min. y 9.7 min. ESI-MS 466.2 (M+H⁺). Rendimiento: cuant.

25

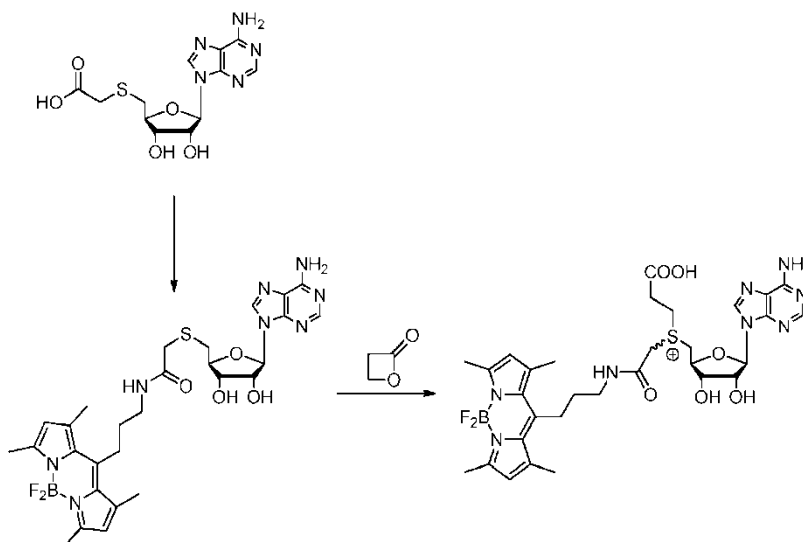
Ejemplo 11: Sal de sulfonio fluorescente



Al ácido carboxílico verde Tokyo (70 mg, 0.2 mmoles, Urano et al. J. Am. Chem. Soc. 2005, 4888) en DMF se añade EDCI (42 mg, 0.22 mmoles, 1.1 equiv.) y NHS (25 mg, 0.22 mmoles, 1.1 equivalentes), y se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente, cuando el análisis por TLC indica la formación completa del éster de NHS. Se añade sal de (6-amino-hex-2-eno)(5'-desoxyadenosil)-(N-Boc-L-cisteína)sulfonio (76 mg, 0.2 mmoles, véase ejemplo 5 para síntesis), y la mezcla de reacción se calentó a una temperatura de 60°C durante 2 horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se retira a presión reducida y el producto se purifica cromatográficamente (sílice, CH₂Cl₂:MeOH 9:1 a 8:2). El producto se aísla como un sólido naranja. Rendimiento del 80%. ESI-MS: 708.1 (M+H⁺).

El verde Tokyo-adenosina sulfuro (70 mg, 0.1 mmol) se suspende en ácido fórmico (200 µl), seguido de la adición de N-Boc-L-serina β-lactona (28 mg, 1.5 equiv). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. El ácido fórmico se elimina; El aceite resultante se vuelve a suspender en ácido trifluoroacético (100 µl), se agita a temperatura ambiente durante 2.5 horas y se elimina nuevamente de los productos volátiles. El producto bruto se purifica cromatográficamente (HPLC, disolvente A). Producto protegido con Boc a 27.9 min. Diastereómeros del producto final a 25.8 y 26.6 min, material de partida a 29.2 min. ESI-MS 894.3 (producto Boc, M+H⁺) 794.2 (M+H⁺).

Ejemplo 12: Sal de sulfonio fluorescente II



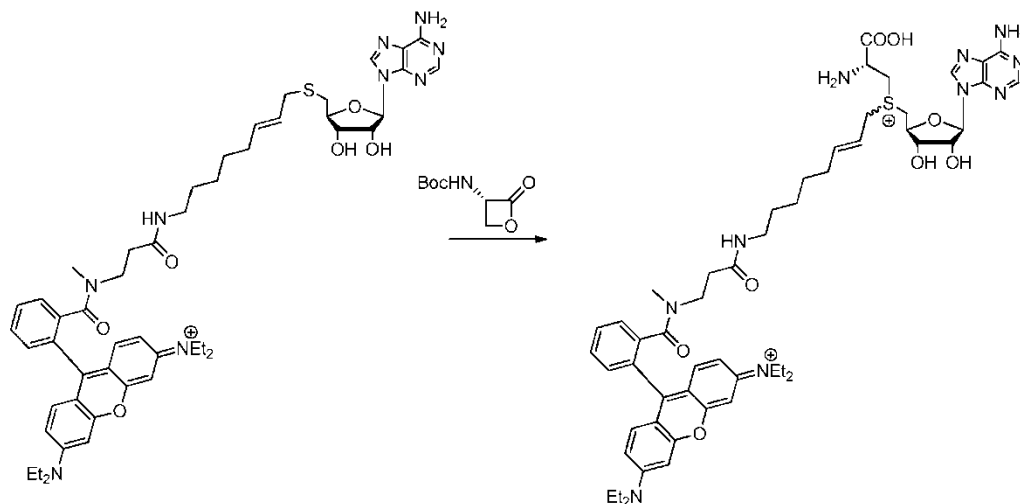
Se cargó cloroadenosina (5.71 g, 20 mmol) en un matraz de fondo redondo y se suspendió en agua (100 ml). Se añadió hidróxido de sodio (1920 gramos, 48 mmoles, 2.2 equivalentes). Se retiró el oxígeno mediante lavado con nitrógeno bajo sonicación. Se añadió ácido mercaptoacético (1.67 ml, 24 mmoles, 1.2 equivalentes) bajo condiciones libres de oxígeno, y la mezcla resultante se calentó a una temperatura de 70 °C durante 3 horas, cuando el análisis por TLC indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se neutralizó cuidadosamente mediante la adición gota a gota de ácido clorhídrico concentrado. El sólido blanco resultante se filtró,

se lavó con etanol frío y se secó al aire. Rendimiento: 86%. ¹H-NMR (DMSO) δ 12.56 (s, br, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.30 (s, 2H), 5.89-5.87 (m, 2H), 4.74 (q, 1H), 4.16 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 3.25 (s, 2H), 3.03-2.87 (m, 2H).

5 A la S-carboximetil-5'-tioadenosina (68 mg, 0.2 mmol) en DMF se añade EDCI (42 mg, 0.22 mmol, 1.1 equiv.) y NHS (25 mg, 0.22 mmol, 1.1 equivalente), y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añade 8-(3-aminopropil)-1,3,5,7-tetrametil BODIPY (61 mg, 0.2 mmol), disuelto en DMF (1 ml) y la mezcla resultante se agita durante la noche. El disolvente se retira mediante evaporación a presión reducida y el residuo se purifica cromatográficamente (sílice, CH₂Cl₂: MeOH 9:1). Rendimiento: 67%. ¹H-NMR (CD₃OD) δ 8.26 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 5.94 (d, 1H), 4.73 (t, 1H), 4.30 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 3.31-3.22 (m, 4H), 3.05-2.84 (m, 4H) 2.41 (s, 6H), 2.35 (s, 6H), 1.74 (m, 2H). ESI-MS: 629.2 (M+H⁺), 652.8 (M + Na).

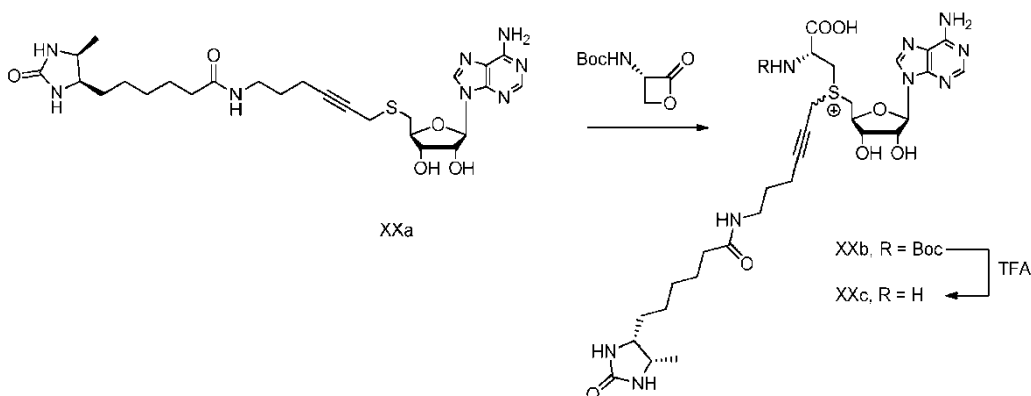
10 BODIPY-tioadenosina (63 mg, 0.1 mmol) se suspende en ácido fórmico (100 l), seguido de la adición de β-propiolactona (9.5 μl, 1.5 equiv.). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante cuatro horas. El disolvente se retiró a vacío a una temperatura de 30 °C, dando como resultado el producto como un sólido rojo que se purificó cromatográficamente. Tiempo de retención del producto (HPLC, disolvente A) 29.99 min., material de partida 32.7 min. ESI-MS 701.2 (M+H⁺). Rendimiento (racémico): 42% (53% de material de partida recuperado).

Ejemplo 12: sal de sulfonio fluorescente III



20 La rodamina B-tioadenosina (90 mg, 0.1 mmol) se suspende en ácido fórmico (100 μ), seguido de la adición de N-Boc-L-serina β-lactona (28 mg, 1.5 equiv.). La reacción se enjuagó con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. El ácido fórmico se retira; El aceite resultante se vuelve a suspender en ácido trifluoroacético (100 μ), se agita a temperatura ambiente durante 2.5 horas y se elimina nuevamente de los productos volátiles. Una vez que se observa la conversión completa utilizando el análisis de TLC, se retiran los productos volátiles y el producto bruto se purifica por filtración sobre una almohadilla de sílice RP. Rendimiento del 83%.

25 Ejemplo 13: Cofactor de detiobiotina sulfonio



30 La D-Detiobiotina (0.15 mmoles) se suspende en DMF (1 ml), seguido de la adición de NHS (0.15 mmoles) y EDCI (0.15 mmoles). La mezcla resultante se agita durante 60 minutos, seguido de la adición de S-6-amino-hex-2-ino-5'-tioadenosina (0.14 mmoles, véase el ejemplo 5 para la preparación). La reacción se deja agitar a temperatura ambiente durante la noche, cuando el disolvente se retira a vacío, y el compuesto bruto se purifica mediante filtración sobre un

tapón de sílice corto (CH₂Cl₂: MeOH 9:1 a 8:2) para obtener el tioéter deseado como un aceite claro. Rendimiento del 83%. ESI-MS: 597.4 (M+Na⁺).

5 El aceite se disuelve en ácido fórmico y se alquila de acuerdo con el procedimiento general (N-Boc oxetanona, 1.5 equivalentes) durante 4 horas a temperatura ambiente. El ácido fórmico se elimina; el aceite turbio se vuelve a suspender en ácido trifluoroacético (100 µl), se agita a temperatura ambiente durante 2.5 horas y se elimina nuevamente de los productos volátiles. El producto bruto se purifica cromatográficamente (HPLC, disolvente A). Los diastereómeros de producto a 20.93 min. y 23.40 min, material de partida a 27.21 min. ESI-MS: 662.3 (M+H⁺). Rendimiento: 30%

10 Ejemplo 14: Alquilación dirigida de ADN.

La modificación de ADN de adenina-N6 mediante ADN metiltransferasa M.TaqI: ADN metiltransferasa M.TaqI se dirige a la secuencia de reconocimiento de cuatro bases 5'-TCGA-3' y modifica el resto de adenina subrayado en la posición N6 y se combinó con sal de (6-azido-hex-2-ino)(5'-desoxiadenosil)-(L-cisteína)sulfonio (véase el ejemplo 9 para la preparación). La enzima metiltransferasa y los cofactores se incubaron con ADN de pUC19 en "tampón Cutsmart" a una temperatura de 60°C durante 1 hora. Para determinar si se produjo protección, el ADN se incubó con la enzima de restricción correspondiente (TaqI) durante 1 hora. Posteriormente, las proteínas restantes se digirieron con Proteinasa K. Las muestras de ADN se colocaron después en un gel de agarosa y se visualizaron con bromuro de etidio (Fig. 1).

20 Los controles protegidos muestran 1 banda correspondiente al ADN sin cortar. Los controles de corte muestran 3 bandas correspondientes a los fragmentos de corte. Todas las muestras que contienen cofactor muestran 1 banda fuerte, que corresponde al ADN sin cortar, lo que demuestra que el cofactor sintético sirve como sustrato para el marcaje enzimático del ADN.

Ejemplo 15: Alquilación dirigida de ADN.

25 La modificación del ADN de la citosina mediante ADN metiltransferasa M.MpeI: ADN metiltransferasa M.TaqI se dirige a la secuencia de reconocimiento de dos bases 5'-CG-3' y modifica el resto de citosina subrayado y se combina con sal de (8-azido-oct-2-eno)(5'-desoxiadenosil)-(L-cisteína)sulfonio (véase el ejemplo 9 para la preparación). La enzima metiltransferasa y los cofactores se incubaron con ADN de pUC19 en "tampón Cutsmart" a una temperatura de 60 °C durante 1 hora. Para determinar si se produjo protección, el ADN se incubó con la enzima de restricción correspondiente (HhaI) durante 1 hora. Posteriormente, las proteínas restantes se digirieron con Proteinasa K. Las muestras de ADN se colocaron después en un gel de agarosa y se visualizaron con bromuro de etidio (Fig. 3).

30 Los controles protegidos muestran 1 banda correspondiente al ADN sin cortar. Los controles de corte muestran 3 bandas correspondientes a los fragmentos de corte. Todas las muestras que contienen cofactor muestran 1 banda fuerte, correspondiente al ADN sin cortar, lo que demuestra que el cofactor sintético sirve como sustrato para el marcaje enzimático del ADN.

35 Ejemplo 18: Marcaje fluorescente de ADN

La modificación de ADN de adenina-N6 mediante ADN metiltransferasa M.TaqI: ADN metiltransferasa M.TaqI se dirige a la secuencia de reconocimiento de cuatro bases 5'-TCGA-3' y modifica el resto de adenina subrayado en la posición N6 y se combinó con sal de sulfonio rodamina (véase ejemplo 12 para la preparación). La enzima metiltransferasa y los cofactores se incubaron con ADN de pUC19 en "tampón Cutsmart" a una temperatura de 60°C durante 1 hora. Para determinar si se produjo protección, el ADN se incubó con la enzima de restricción correspondiente (TaqI) durante 1 hora. Posteriormente, las proteínas restantes se digirieron con Proteinasa K. Después se colocaron muestras de ADN en un gel de agarosa y se visualizaron con bromuro de etidio (Fig. 4).

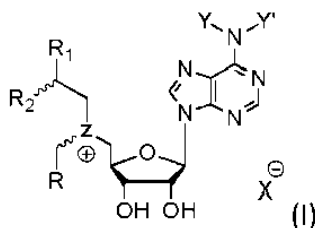
45 Los controles protegidos muestran 1 banda correspondiente al ADN sin cortar. Los controles de corte muestran 3 bandas correspondientes a los fragmentos de corte. Todas las muestras que contienen cofactor muestran 1 banda fuerte, correspondiente al ADN sin cortar, que cambia lentamente al patrón restringido con una concentración decreciente, lo que demuestra que el cofactor sintético sirve como sustrato para el marcaje enzimático del ADN.

El ADN fluorescente se purificó utilizando columnas de ADN Cleaner & Concentrator 5 (Zymo Research), y el ADN se revistió por rotación sobre cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina y se utilizó directamente para estudios de microscopía. (Fig. 5)

50

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula (I)



5 en donde

R1 es COOH o COO-;

X es un anión orgánico o inorgánico que lleva una o más cargas negativas;

Y e Y' son H, o un alquilo;

R2 es NH₂, NHBoc o H; y

10 Z es S o Se

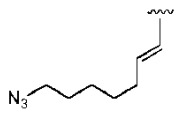
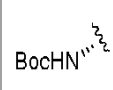

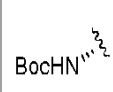
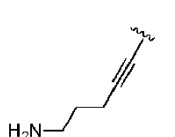
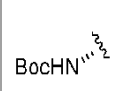
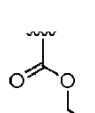

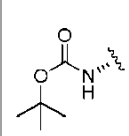




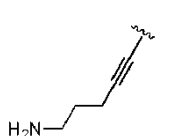
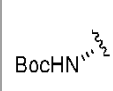
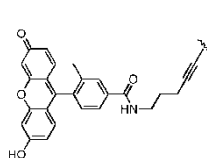
R comprende

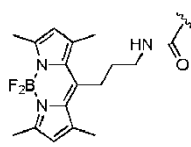
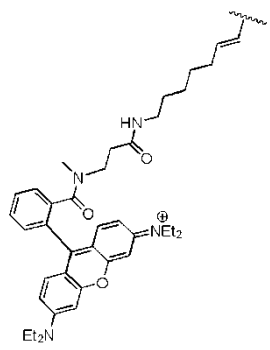
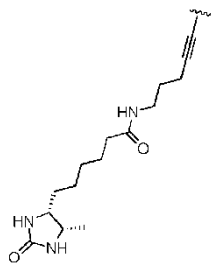
15 un grupo que comprende un enlace insaturado en posición β al centro de sulfonio, que es un doble enlace carbono-carbono, doble enlace carbono-oxígeno, doble enlace carbono-azufre, doble enlace carbono-nitrógeno, triple enlace carbono-carbono, triple enlace carbono-nitrógeno, un sistema carbocíclico o heterocíclico aromático, unido a un grupo que comprende al menos un miembro seleccionado de fluoróforos, extintores de fluorescencia, etiquetas de afinidad, agentes de reticulación, reactivos de escisión de ácido nucleico, marcadores espín, átomos pesados o agrupaciones de átomos pesados adecuados para el análisis de las fases de datos de difracción de rayos X, isótopos raros radioactivos o estables, cromóforos, proteínas, péptidos o aminoácidos que se pueden modificar opcionalmente, nucleótidos, nucleósidos, ácidos nucleicos que se pueden modificar opcionalmente, carbohidratos, lípidos, reactivos de transfección, agentes intercalantes, nanopartículas, perlas y un grupo funcional, seleccionándose el grupo funcional de un grupo amino, un grupo tiol, un grupo 1,2-diol, un grupo hidrazino, un grupo hidroxiamino, un grupo haloacetamida, un grupo maleimida, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo 1,2-aminotiol, un grupo azido, un grupo alquino, una función 1,3-dieno, una función dienofílica tal como doble enlace carbono-carbono activado, un grupo arilhaluro, un grupo alquino terminal, un grupo ácido arilborónico, un grupo haloalquino terminal, un grupo sililalquino terminal y un grupo amino, tiol, 1,2-diol, hidrazino, hidroxiamino, aldehído, cetona y 1,2-aminotiol protegidos.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde

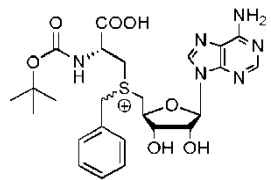
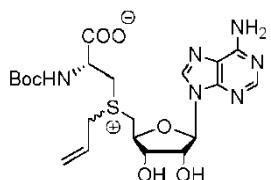
R, R2, Y e Y' se seleccionan entre los siguientes:

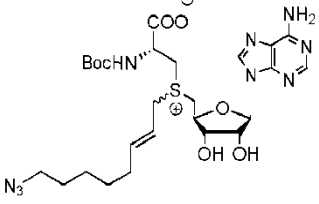
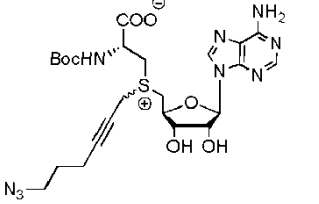
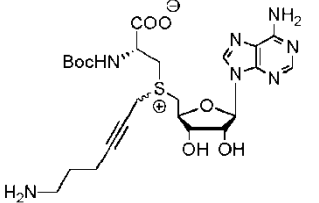
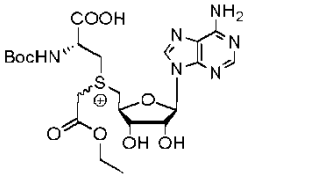
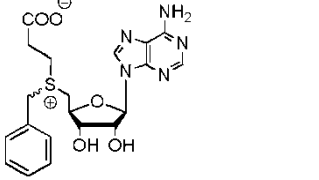
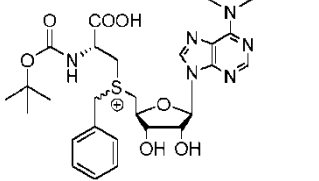
Y	Y'	R2	R
H	H		
H	H		
H	H		

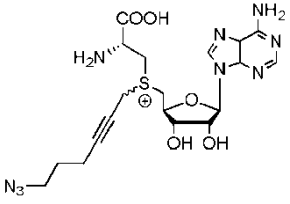
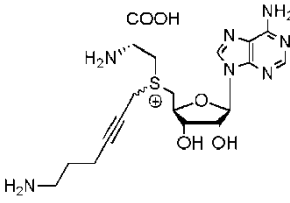
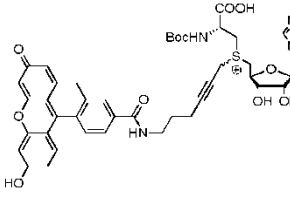
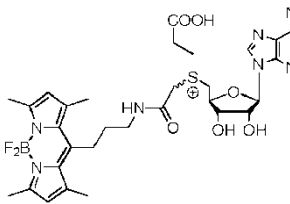
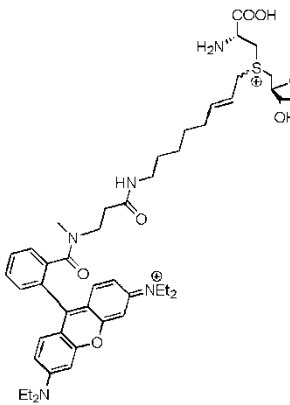
Y	Y'	R2	R
			
H	H		
H	H		
H	H		
H	H	H	
CH ₃	CH ₃		
H	H		
H	H		
H	H		

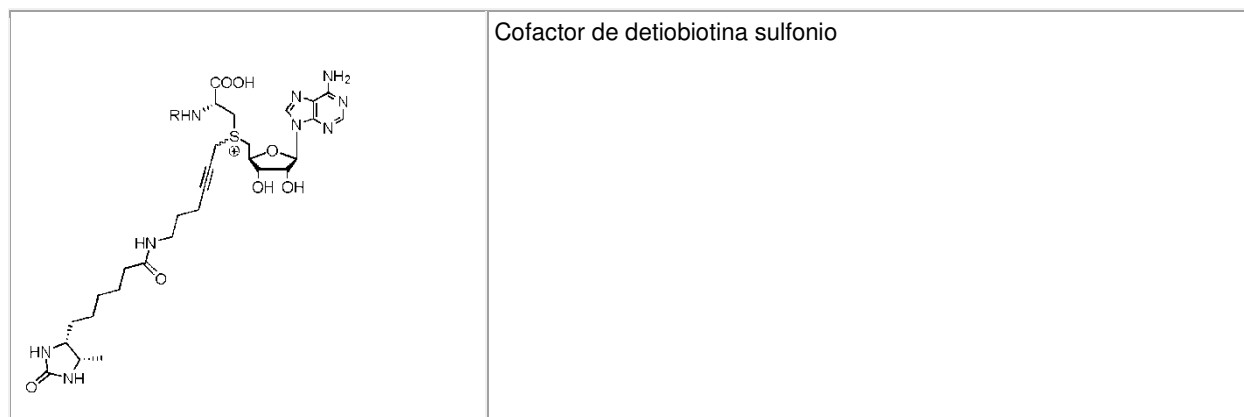
Y	Y'	R2	R
H	H	H	
H	H	NH2	
H	H	BocHN ⁺ or H	

3. Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que comprende:

Compuesto	Nombre
	Sal de (Bencil)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio
	Sal de (Alil)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio

	<p>Sal de (8-Azido-oct-2-eno)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>
	<p>Sal de (6-Azido-hex-2-ino)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>
	<p>Sal de (6-Amino-hex-2-ino)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>
	<p>Sal de (Etil Carboximetil)(5'-Desoxiadenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>
	<p>Sal de (Bencil)(5'-Desoxiadenosil)-(3-Propionato)sulfonio</p>
	<p>Sal de (Bencil)(5'-Desoxi-N⁶,N⁶-dimetiladenosil)-(N-Boc-L-Cisteína)sulfonio</p>

	<p>Sal de (6-Azido-hex-2-ino)(5'-Desoxiadenosil)-(L-Cisteína)sulfonio</p>
	<p>Sal de (6-Amino-hex-2-ino)(5'-Desoxiadenosil)-(L-Cisteína)sulfonio</p>
	<p>Sal de sulfonio fluorescente</p>
	<p>Sal de sulfonio fluorescente II</p>
	<p>Sal de sulfonio fluorescente III</p>



4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anión orgánico o inorgánico se selecciona de trifluoroacetato, formiato, haluro y sulfonato.
5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho fluoróforo se selecciona de Alexa, BODIPY, bimano, cumarina, Cascade blue, dansilo, dapoxilo, fluoresceína, mansilo, MANT, verde Oregon, pireno, rodamina, rojo Texas, TNS, nanocristales fluorescentes (puntos cuánticos), un fluoróforo de cianina y derivados de los mismos y/o en donde dicho extintor de fluorescencia se selecciona de dabcil, QSY y BHQ y/o en donde dicha etiqueta de afinidad se selecciona de etiquetas peptídicas, grupos quelantes de metales, etiqueta de afinidad codificada por isótopos, biotina, maltosa, manosa, glucosa, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico, galactosa, α -acetilgalactosamina, digoxigenina y dinitrofenol.
6. Un compuesto según la reivindicación 5, en donde dicha etiqueta peptídica se selecciona de etiquetas his, etiquetas con propiedades quelantes de metales, etiquetas strep, etiquetas flag, etiquetas c-myc, etiquetas HA, epítomos y glutatión y/o en donde dicho grupo quelante de metales se selecciona de ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1,10-fenantrolina, un éter corona y un péptido HiS4-8.
7. Un compuesto según la reivindicación 4, en donde dicho agente de reticulación se selecciona de complejos de platino (II) mono o bifuncionales, maleimidias, yodacetamidas, aldehídos y agentes de fotoreticulación como arilazida, un compuesto de diazo, un compuesto de 2-nitrofenilo, psoraleno y un compuesto de benzofenona y/o en donde dicho átomo pesado o agrupación de átomos pesados se selecciona de cobre, zinc, selenio, bromo, yodo, rutenio, paladio, cadmio, tungsteno, platino, oro, mercurio, bismuto, samario, europio, terbio, uranio, Ta6Br14, Fe4S4 y P2W-18O62 adecuados para el análisis de datos de difracción de rayos X y/o en donde R comprende reactivos de escisión de ácido nucleico seleccionados del grupo que consiste en hierro-EDTA, cobre-1,10-fenantrolina, acridina o un derivado de los mismos, un compuesto de enediino y un complejo de rodio, más preferiblemente seleccionado de hierro-EDTA, cobre-1,10-fenantrolina y un complejo de rodio.
8. Un complejo de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y una metiltransferasa capaz de utilizar S-adenosil-L-metionina (SAM o AdoMet) como cofactor.
9. Un complejo según la reivindicación 8, en donde dicha metiltransferasa es capaz de transferir el resto metilo de S-adenosil-L-metionina (SAM o AdoMet) sobre una molécula de ácido nucleico, un polipéptido, un carbohidrato o una molécula pequeña y/o en donde dicha metiltransferasa es una ADN metiltransferasa huérfana o parte de un sistema de modificación de restricción bacteriana y/o en donde dicha metiltransferasa se selecciona del grupo que consiste en las ADN metiltransferasas M.TaqI, M.HhaI, M.XbaI, M.PvuII, M.BsaI, M.FokI, M.BcnI (M2.BcnI), M.SssI, M.MpeI, M.PstI, M.XhoI, M.BseCI, MMRsrl, M.EcoRI, o un derivado de las mismas.
10. Un kit que comprende un compuesto (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, empaquetado en un recipiente.
11. Un kit según la reivindicación 10, comprendiendo dicho kit un compuesto (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y que además comprende una metiltransferasa capaz de utilizar S-adenosil-L-metionina (SAM o AdoMet) como cofactor y/o comprendiendo dicho kit un compuesto (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y que además comprende una metiltransferasa capaz de utilizar S-adenosil-L-metionina (SAM o AdoMet) como cofactor en donde dicho compuesto y dicha metiltransferasa se empaquetan en uno o más recipientes y/o en donde dicho compuesto y dicha metiltransferasa se disuelven en un tampón.
12. Una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9.

- 5 13. Un método para la preparación de una molécula diana modificada para una molécula diana siendo cualquiera de una molécula de ácido nucleico, un polipéptido opcionalmente modificado de forma específica de secuencia, un carbohidrato o una molécula pequeña, comprendiendo el método la incubación de la molécula diana con un compuesto (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en presencia de una metiltransferasa que es capaz de utilizar el compuesto (I) como cofactor y en condiciones que permiten la transferencia de parte de los compuestos a la molécula diana.
14. Un método *in vitro* para detectar la metilación específica de secuencia en una biomolécula, que comprende:
- 10 (a) poner en contacto una biomolécula con una metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina en presencia de un cofactor detectable de dicha metiltransferasa; y
- (b) detectar si el sitio de reconocimiento de dicha metiltransferasa se ha modificado con el cofactor o un derivado del mismo, en donde la modificación del sitio de reconocimiento de dicha metiltransferasa es indicativa de una ausencia de metilación en dicho sitio de reconocimiento,
- en donde dicho cofactor es un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 15 15. Un método para sintetizar un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el método acoplar un tioéter con una lactona.

Leyenda

- 1: Cofactor + [enzima] baja
- 2: Cofactor + [enzima] alta
- 3: Cofactor (rac.) + [enzima] baja
- 4: Cofactor (rac.) + [enzima] baja
- 5: Adomet - Restricción
- 6: Adomet + Restricción
- 7: - Cofactor - Restricción
- 8: - Cofactor + Restricción
- 9: - Enzima - Restricción
- 10: -Enzima + Restricción

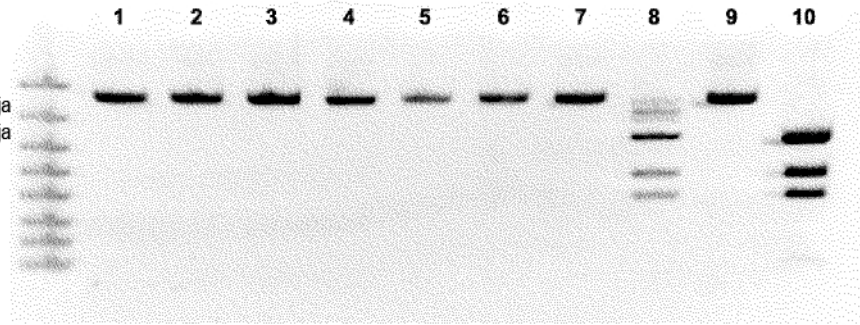


Figura 1

Leyenda

- A: Pico A
- B: Pico B
- AB: Mezcla
- SAM: Control SAM
- C: Control sin cofactor
- E: Control sin enzima
- L Enzima 1uM
- H Enzima 6uM
- : Sin enzima de restricción
- +: Con enzima de restricción

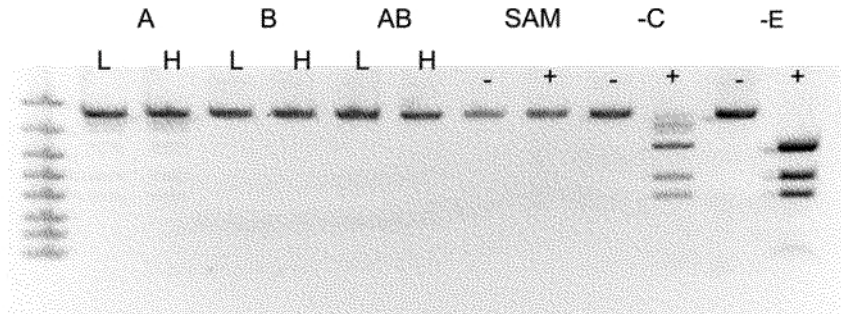


Figura 2

Leyenda

- 1-6: Cofactor + serie de dilución enzimática
- SAM. Control SAM con y sin restricción
- E: Control libre de metilasa con y sin restricción
- C: Control libre de cofactor con y sin restricción

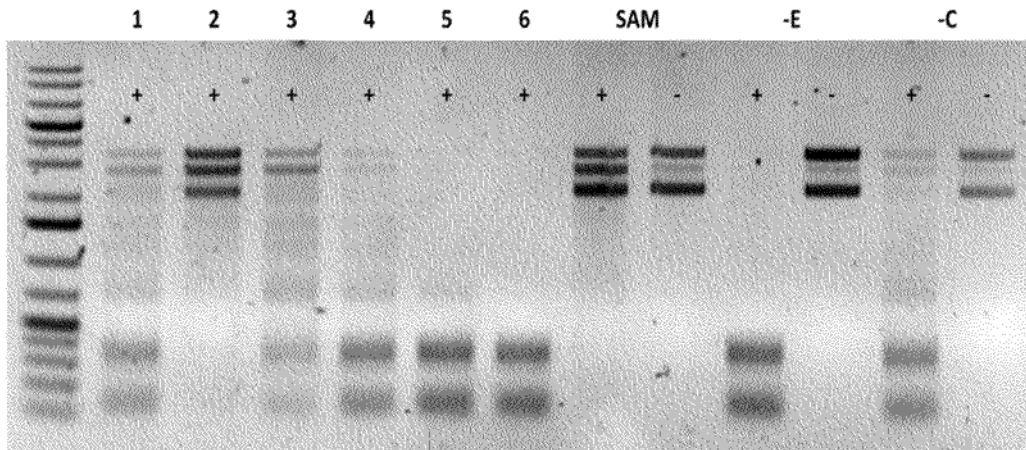


Figura 3

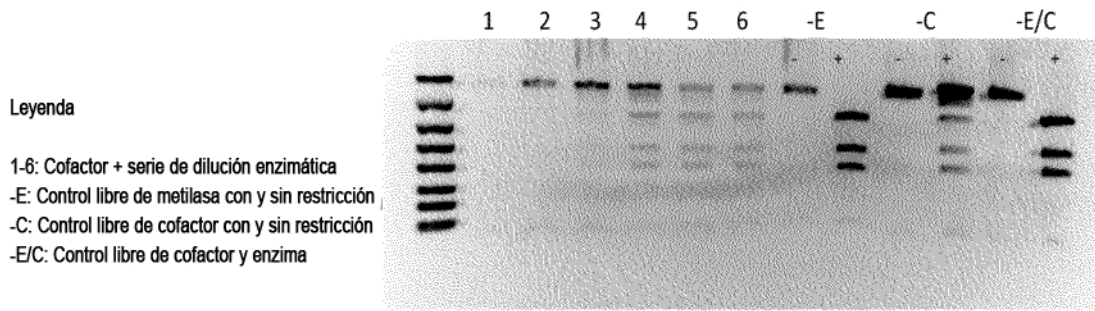
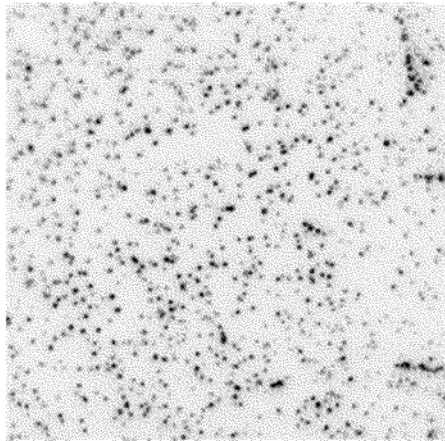
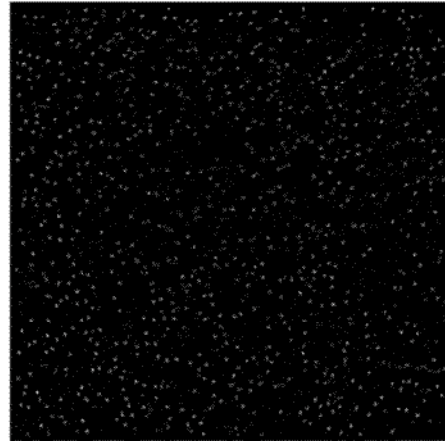


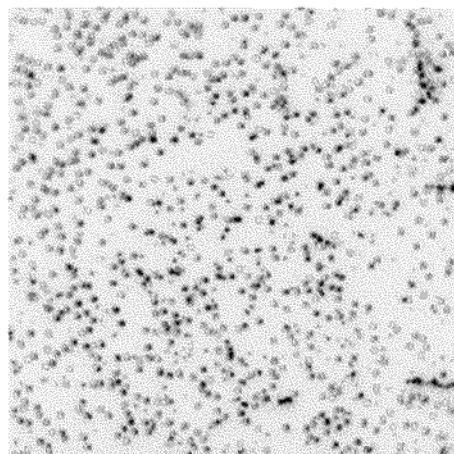
Figura 4



Panel A



Panel B



Panel C

Figura 5

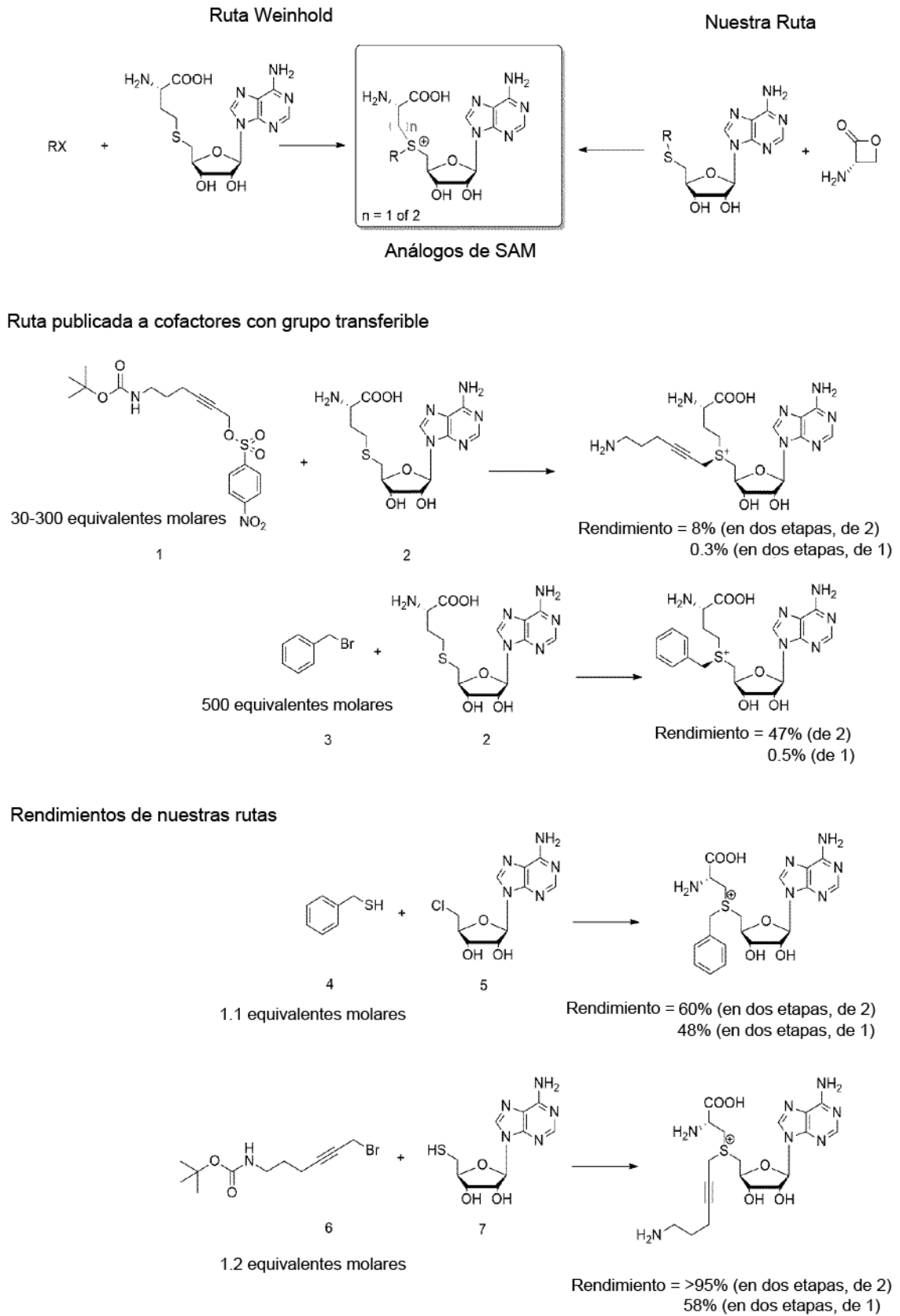


Figura 6