



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 275 677**

(51) Int. Cl.:  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C07F 9/40** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01927897 .7**  
(86) Fecha de presentación : **07.04.2001**  
(87) Número de publicación de la solicitud: **1276760**  
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **22.01.2003**

(54) Título: **Derivados de ácido poliamidonucleico, agentes y procedimiento para su preparación.**

(30) Prioridad: **18.04.2000 DE 100 19 135**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2007**

(73) Titular/es: **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH**  
**Brüningstrasse 50**  
**65929 Frankfurt am Main, DE**

(72) Inventor/es: **Uhlmann, Eugen;**  
**Breipohl, Gerhard y**  
**Will, David, William**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

**Aviso:** En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Derivados de ácido poliamidonucleico, agente y procedimiento para su preparación.

La presente invención se refiere a derivados de ácido poliamidonucleicos fosforilados carboxiterminales y carboxi-/aminoterminal (PNA) con propiedades mejoradas, a su uso, así como a agentes y procedimientos para su preparación.

Los ácidos poliamidonucleicos, también llamados ácidos peptidonucleicos (PNA), se unen con gran afinidad como oligonucleótidos naturales a secuencias blanco complementarias (ADN o ARN) y tienen, frente al ADN natural, la ventaja de que son muy estables en suero. Los PNA se describieron originariamente como análogos no naturales de ácido nucleico, en los que todo el esqueleto del fosfato de azúcar está reemplazado por unidades de N-(2-aminoetil)-glicina (M. Egholm *et al.* (1991) *Science* 254, 1497-1500; documento WO 92/20702; M. Egholm *et al.* *Nature* (1993) 365, 566-568; P. Nielsen, (1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 3-7; E. Uhlmann *et al.* (1998) *Angewandte Chemie Int. Ed. Engl.* 37, 2796-2823). Como bases se utilizan las nucleobases naturales o también no naturales usuales en la química de los nucleótidos o sus formas profarmacológicas, es decir, precursores que recién se convierten en el organismo por biotransformación en la base libre. Más allá de ello, se describieron PNA en los que no todas las posiciones del esqueleto llevan radicales de bases (Greiner *et al.* (1999) *Helv. Chim. Acta* 82, 2151), y en los que la aminoetilglicina está reemplazada por unidades más complejas (Uhlmann *et al.* (1998) *Angewandte Chem. Int. Ed.* 37, 2796; Falkiewicz (1999) *Biochim. Pol.*, 46, 509-529).

El carácter de carga neutra del esqueleto del PNA es una característica importante de esta clase de sustancias con amplias consecuencias. Se atribuye al carácter neutro del PNA y el reducido rechazo de carga asociado con ello que el PNA en sí mismo se une con una baja concentración salina al ADN y ARN complementarios (por ejemplo, *Peptide Nucleic acids: protocols and Applications*; Peter E. Nielsen y Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999, 3), en donde se siguen las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Por ello, se puede recurrir al PNA en principio para numerosas aplicaciones en las que, caso contrario, se utilizan oligonucleótidos naturales o derivados de oligonucleótidos. Más allá de ello, resultan en virtud de las propiedades de unión únicas numerosas aplicaciones que no son posibles con oligonucleótidos naturales (ver, por ejemplo: *Peptide Nucleic acids: protocols and Applications*; Peter E. Nielsen y Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999). A modo de ejemplo, con PNA se observó una invasión de cadenas en ADN bicatenario.

Ejemplos típicos para utilizar PNA contienen su uso para la inhibición de la expresión génica por unión específica de secuencias al ADN o ARN celular. "Agentes antisentido" son derivados de ácido nucleico monocatenarios cortos que se unen con un ARNm complementario a través de un apareamiento de bases de Watson-Crick, cuya traducción debe ser inhibida en la correspondiente proteína (Uhlmann y Peyman (1990) *Chem. Rev.* 90, 543; Larsen *et al.* (1999) *Biochem. Biophys. Acta* 1489, 159). "Agentes antígenos" se unen a través del apareamiento de bases de Hoogsteen en la gran hendidura de la doble hélice del ADN formando una triple hélice, con lo cual se inhibe la transcripción de los genes específicos de la secuencia (Praseut *et al.* (1999) *Biochem. Biophys. Acta* 1489, 181). La expresión génica también se puede inhibir específicamente a través de los llamados oligómeros "Decoy" que simulan las regiones de unión para los factores de transcripción. Por medio del tratamiento con agentes Decoy, se pueden captar determinados factores de transcripción específicos de la secuencia, evitando así una activación de la transcripción (Mischiati *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 33114). Se recurre a otro grupo de derivados de oligonucleótidos de acción intracelular, los quimeraplastos, para la corrección genética dirigida (Cole-Strauss *et al.* (1996) *Science* 273, 1386-1389).

Por ello, los PNA se pueden usar como medicamento y/o agente de diagnóstico o para preparar medicamentos y/o agentes de diagnóstico.

De esta manera, el documento WO 00/33867A2 revela derivados de PNA para usar como sondas de detección de ácido nucleico que se modifican de modo tal para reducir las interacciones inespecíficas con ácidos nucleicos que en el interior llevan al menos una unidad no nucleosídica con un PKa inferior a 3,0. La desventaja de estos derivados de PNA consiste en que por una modificación interna se introduce una unidad de carga negativa en el interior de la molécula que provoca un rechazo de carga con los ácidos nucleicos blanco; además, la modificación en el interior del derivado de PNA puede llevar a alteraciones de la estructura de los dúplex de ácido nucleico-PNA.

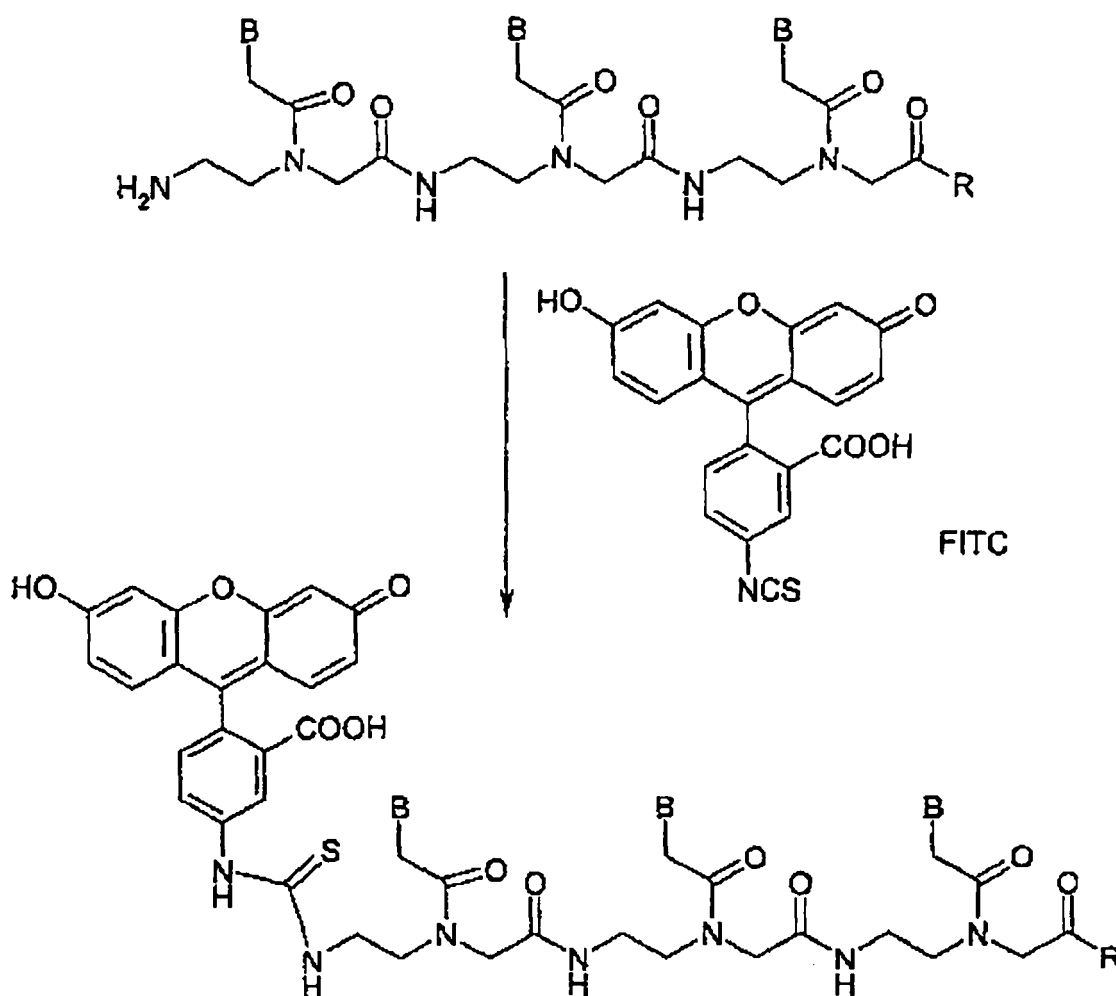
El documento EP 062 677 A2 revela oligómeros de PNA-ADN para usar como medicamentos, como iniciadores o cebadores, en donde la unión de PNA y ADN es covalente y al menos contiene un radical orgánico o una unión con al menos un átomo de la serie de C, N, O o S.

De la patente US 5.874.553 se conocen monoésteres oligoméricos de ácido fosfónico (PMENA), así como derivados de ácido fosfónico, que se basan en la unión de PMENA con PNA y sirven como inhibidores de la expresión génica, sondas de detección y similares. El radical fosfonato se halla en las moléculas aquí reveladas asimismo exclusivamente en el interior de las moléculas y sirven como puentes para la unión covalente de las unidades monoméricas dentro de los PMENA o entre PMENA y PNA.

Para fines diagnósticos y en la biología molecular, el PNA puede utilizarse, por ejemplo, después de la marcación con biotina, fluoresceína u otros rotuladores como sonda específica de hibridación. Para la introducción de grupos marcadores, se describieron en la literatura hasta ahora cuatro métodos (Oerum *et al.* (1999), en *Peptide Nucleic acids: Protocols and Applications*, páginas 81-86; Lohse *et al.* (1997) *Bioconjugate Chem.* 8, 503). El primer método

se basa en la marcación del PNA libre (desprotegido) después de su síntesis en solución. En este caso, el término amino del PNA se hace reaccionar con un ácido carboxílico activado o un isotiocianato. A menudo se introducen, sin embargo, radicales de lisina adicionales en el PNA que luego se hacen reaccionar con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

En el segundo método, el PNA protegido se modifica aún en la fase sólido en el término amino con derivados activados de ácido carboxílico o isotiocianatos. Este método es apropiado únicamente para grupos marcadores que son estables en las condiciones de la desprotección del PNA y durante la separación del portador. Como reactivos en ambos casos se prefiere usar isotiocianatos (P. Wittung *et al.*, (1995) FEBS Lett. 375, 27) o ácidos carboxílicos activados tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) (Oerum *et al.*, 1999). Una desventaja de la reacción con los derivados de NHS consiste en que sólo se produce con bajo rendimiento. Por ello, a menudo se condensa ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico como ligador o espaciador entre PNA y grupo marcador (Oerum *et al.*, 1999). Ambas uniones se realizan a través de uniones amida o uniones tiourea, que como tales llevan más bien a una insolubilidad. De modo alternativo, se hacen reaccionar los ácidos carboxílicos con ayuda de activadores usuales en la química de los péptidos tales como, por ejemplo, HBTU, TBTU o HATU.



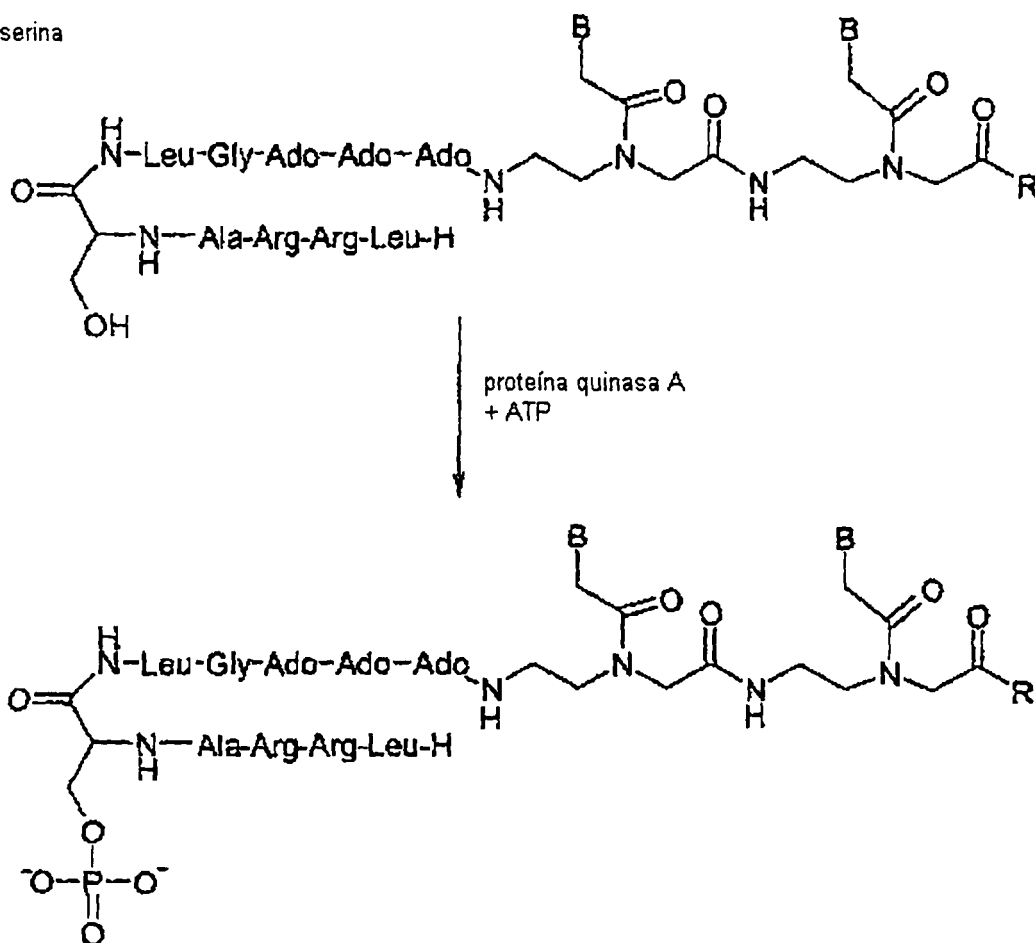
En un tercer método, se usan monómeros conjugados con fluoresceína en la síntesis en fase sólida de PNA, en donde la marcación de fluorescencia se realiza a través de un enlace amida (Lohse *et al.* (1997) Bioconjugate Chem. 8, 503) que, a su vez, lleva a conjugados de disolución relativamente difícil.

Un cuarto método usa conjugados de PNA-péptido, en los que una parte del péptido forma un sustrato para una proteína quinasa (Koch *et al.* (1995) Tetrahedron Lett. 36, 6933). De esta manera, no se modifica la parte del PNA, sino que se fosforila enzimáticamente el radical serina del segmento peptídico. Con este método, sólo se puede introducir fosfato radiactivo, pero, por ejemplo, ninguna fluoresceína o biotina en el segmento peptídico del conjugado de PNA-péptido.

parte peptídica

parte de PNA

serina

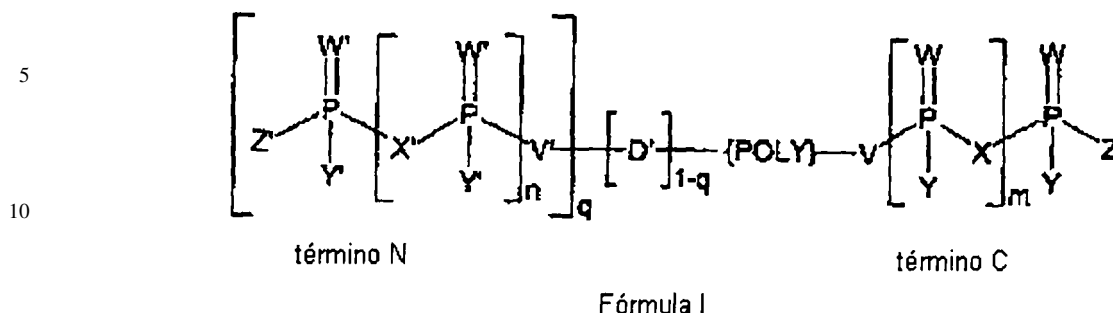


Se sabe que el PNA tiende a la agregación en solución acuosa, es decir, también en condiciones fisiológicas. Por ello, el PNA es difícilmente soluble en tampón acuoso y no está a disposición luego para la hibridación a secuencias complementarias. El PNA muestra además una gran afinidad por distintos materiales como Sephadex® (empresa Pharmacia), Bond Elut® (empresa Varian) o distintos materiales para HPLC-cromatografía que se usan en la purificación de los oligómeros, de modo que el PNA sólo se ha de aislar con bajos rendimientos. Por eso es necesario conjugar el PNA con lisina o con otros aminoácidos con carga positiva (a través del término C) (Egholm *et al* (1992) J. Am. Chem. Soc. 114, 1895). Las secuencias de PNA ricas en guanina tienden muy particularmente a la agregación, por lo cual se desaconseja el uso de esos PNA (ver "Guidelines for sequence design of PNA oligomers" en Peptide Nucleic acids: Protocols and Applications (1999), páginas 253-255). Son difícilmente solubles, por ejemplo, oligómeros largos de PNA marcados con fluoresceína, en donde se recomienda la adición de un disolvente orgánico y el calentamiento hasta 50°C.

La purificación de los derivados de PNA lipofílicos difícilmente solubles es particularmente complicada. En el caso de la HPLC se detectan a veces varios picos que se remiten a los agregados de PNA. La técnica de electroforesis de gel de poliacrilamida aplicada con frecuencia para la purificación y la separación de ácidos nucleicos (PAA) no es posible para estos derivados de PNA.

En el caso de los métodos de los derivados de PNA antes descritos, el grupo marcador siempre se introduce por unión con un enlace de amida o tioamida, en donde se forman derivados de PNA de disolución relativamente difícil. En especial en la introducción de radicales lipofílicos como, por ejemplo, de la fluoresceína, se producen derivados de PNA de difícil disolución. La introducción de marcadores en ambos extremos del PNA es técnicamente más difícil y lleva en general a una solubilidad aún peor. Además, no se describen métodos eficaces para la derivación de PNA amino- y carboxiterminal simultánea, en especial por síntesis en fase sólida. Como las reacciones de marcación además se producen sólo con bajos rendimientos, una misión por resolver consiste en poner a disposición nuevos derivados de PNA que se puedan producir con altos rendimientos y que presenten ventajosas propiedades como mejor solubilidad, mejor comportamiento de unión, mejor captación celular y, además, que permita el uso de métodos eficaces de purificación para los oligómeros de PNA.

El objeto se resuelve según la invención por medio de la preparación de derivados de PNA de la fórmula I



15 en donde

q es igual a 0 ó 1,

20 D' es igual a hidroxilo, mercapto, amino, alquilamino o acilamino, con preferencia acetilamino,

V de modo independiente entre sí, es igual a oxígeno, azufre, NR<sub>1</sub>,

V' de modo independiente entre sí, es igual a oxígeno, azufre, NR<sub>1</sub>, un grupo U-(CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>u'</sub>-C(O)-NH o un grupo U-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u'</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH,

25 U de modo independiente entre sí, es igual a oxígeno, azufre o NH,

u' de modo independiente entre sí, es igual a 1 a 10, con preferencia 1 a 4, con preferencia especial 1,

30 W y W' de modo independiente entre sí, son iguales a oxígeno, azufre o NR<sub>1</sub>,

Y e Y' de modo independiente entre sí, son iguales a hidroxilo, mercapto, anión oxi, tioato o NR<sub>1</sub> R<sub>2</sub>,

35 X y X' de modo independiente entre sí, son iguales a un grupo U-(alcandiil C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>)-U o un grupo U-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>u'</sub>, o iguales a un grupo marcador, o un grupo para la reticulación cruzada o un grupo que favorece la captación intracelular, o un grupo que aumenta la afinidad de unión del derivado de PNA a ácidos nucleicos, por ejemplo, un radical bifuncional de fluoresceína, rodamina, TAMRA, biotina, pireno, dinitrofenilo, colesterilo, acridina, adamantilo, vitamina E, colorante de cianina, dabculo, edans, lexitropsina, psoraleno, BODIPY, ROX, R6G o digoxigenina,

40 Z y Z' de modo independiente entre sí, es igual a hidroxilo, mercapto, anión oxi, tioato o NR<sub>1</sub> R<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>, arilalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-U, arilalquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-U, hidroxilo-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-U, aminoalquil-U, mercaptoalquil-U,

45 o un grupo de la fórmula R<sub>7</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>, en donde R<sub>7</sub> es igual a hidroxilo, amino o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub> y m es igual a 1 a 100, con preferencia 2 a 10,

o es igual a un grupo marcador, o un grupo para la reticulación cruzada, o un grupo que favorece la captación intracelular, o un grupo que aumenta la afinidad de unión del derivado de PNA a ácidos nucleicos,

50 por ejemplo, un radical monofuncional o bifuncional de fluoresceína, rodamina, TAMRA, biotina, pireno, dinitrofenilo, colesterilo, acridina, adamantilo, vitamina E, colorante de cianina, dabculo, edans, lexitropsina, psoraleno, BODIPY, ROX, R6G o digoxigenina,

55 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de modo independiente entre sí, son un radical compuesto por hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, con preferencia hidrógeno,

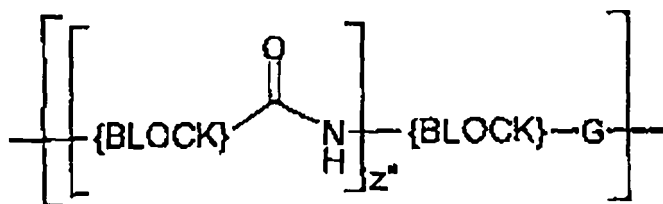
R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> de modo independiente entre sí, son un radical compuesto por hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o el radical de una cadena lateral de aminoácidos, con preferencia hidrógeno, en donde los radicales R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> adyacentes en V' también pueden formar un anillo cicloalquilo C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>,

60 n es igual a 0 a 10, con preferencia 0 a 3,

m es igual a 0 a 10, con preferencia 0 a 3,

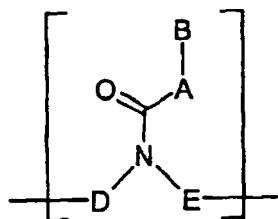
65 con la condición de que al menos un radical Y, Y', Z o Z' sea igual a hidroxilo, mercapto, anión oxi o tioato.

El grupo {POLY} se describe por medio de la fórmula II,



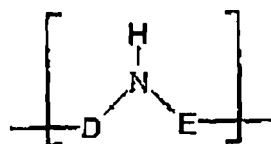
fórmula II

en donde {BLOCK} es, de modo independiente entre sí, un grupo seleccionado de la fórmula IIIA,



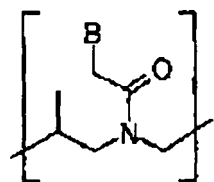
Fórmula IIIA

o de la fórmula IIIB (Greiner *et al.* (1999) Helv. Chim. Acta 82, 2151),

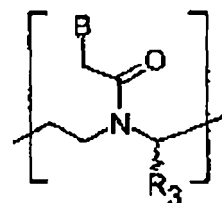


Fórmula III B

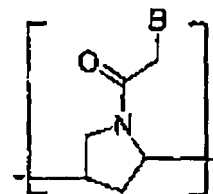
o de las fórmulas IV A a IV G (Uhlmann *et al.* (1998) Angewandte Chem. Int. Ed. 37, 2796; Falkiewicz (1999) Biochim. Pol., 46, 509-529),



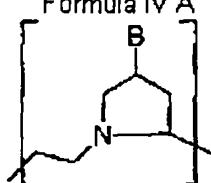
Fórmula IV A



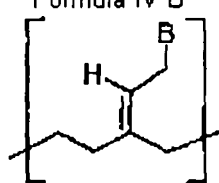
Fórmula IV B



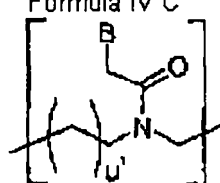
Fórmula IV C



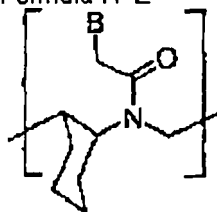
Fórmula IV D



Fórmula IV E



Fórmula IV F



Fórmula IV G

en donde cada unidad {BLOCK} puede ser diferente,

y también rige que

z'' es igual a 0 a 100, con preferencia 1-20, con preferencia especial 4-15,

G está seleccionado de los grupos  $(CR_5R_6)_{u'}$ ,  $C(O)NH-(CR_1R_2)_{t'}$  o  $C(O)NH-(CH_2CH_2O)_{u'}-CH_2CH_2$ , en donde u' tiene el significado anterior y t' es igual a 2 a 10, con preferencia 6,

A es, de modo independiente entre sí, un grupo  $(CR_1R_2)_s$ , en donde s es igual a 1 a 3, con preferencia 1,

B es, de modo independiente entre sí, un radical aromático que también puede poseer carácter heteroaromático o hidrógeno, o es hidroxilo o alquilo  $C_1-C_{18}$ ,

o es una nucleobase natural o no natural usual en la química de los nucleótidos o su forma profarmacológica, con la condición de que al menos un radical B sea una nucleobase,

D es, de modo independiente entre sí, un grupo  $(CR_3R_4)_t$ , en donde t es igual a 2 a 10, con preferencia 2 a 4, con preferencia especial 2,

E es, de modo independiente entre sí, un grupo  $(CR_5R_6)_{u'}$ , en donde los radicales  $R_5$  y  $R_6$  adyacentes también pueden formar un anillo cicloalquilo  $C_5-C_8$  o un compuesto espiral,

$R_5$  y  $R_6$  son, de modo independiente entre sí, un radical compuesto por hidrógeno o alquilo  $C_1-C_6$  o el radical de una cadena lateral de aminoácidos, con preferencia hidrógeno,

y en donde u',  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  tienen el mismo significado que el descrito con anterioridad, así como sales fisiológicamente tolerables de los derivados de PNA de la fórmula I. Las sales fisiológicamente tolerables se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science (1985) Mack Publishing Company, Easton, PA, Estados Unidos, página 1418. Se prefieren sales de amonio, sales de trialkilamonio, sales de metal alcalino (como sales de sodio y de potasio) y sales de metal alcalinotérreo (como sales de magnesio y de calcio). Se prefieren en especial las sales de sodio.

Por grupos marcadores (rotuladores) se entienden, en este caso, grupos que permiten la valoración cualitativa o cuantitativa de la actividad química o biológica de los derivados de PNA, por ejemplo, biotina o fluoresceína. Por reticulación cruzada (crosslinking) se entiende la conformación de uniones intra- o intermoleculares entre funcionalidades espacialmente adyacentes. Un grupo para la reticulación cruzada es, por ejemplo, el grupo psoraleno.

Como efecto sorprendentemente positivo se mostró que la introducción de un radical fosforilado terminal aumenta, por ejemplo, como fosfato o también en forma de una derivación lipofílica (por ejemplo, como hexadecilfosfodiéster) la afinidad del PNA con ADN o ARN complementario. Este efecto no era de esperar, dado que la fuerte unión de PNA con ADN o ARN complementario se atribuyó al carácter neutro del PNA y el rechazo de la carga reducida asociada a ello (por ejemplo, Peptide Nucleic acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen y Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999, 3).

Se produjo de modo particularmente efectivo la introducción de la biotina a través de un radical fosforilado. El PNA biotinilado de la fórmula I ( $X$ ,  $X'$ ,  $Z$  y/o  $Z'$  = radical de biotina) mostró como sondas de hibridación mejores propiedades de unión y menos efectos secundarios inespecíficos como sondas de ADN biotiniladas correspondientes.

Contrariamente al PNA sin carga, los derivados de PNA de la fórmula I según la invención también pueden migrar en el campo eléctrico, con lo cual es posible una microlocalización y una concentración en derivados de ácido nucleico complementario inmovilizado. Para los oligonucleótidos polianiónicos, ya se describió este método para la rápida determinación de apareamientos erróneos de bases con ayuda del campo eléctrico (Sosnowski *et al.* (1997) *proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 94, 1119).

Los sustituyentes de hidroxilo- o mercapto de los radicales fosforilo de los derivados de PNA según la invención pueden desprotonarse en un intervalo de pH de 4,5 a 14, con preferencia 6,5 a 12, con preferencia especial 6,5 a 9. La propiedad de la capacidad de ionización de los radicales fosforilados puede aprovecharse ventajosamente para la purificación de los compuestos de la fórmula I. Por un lado, los compuestos de la fórmula I se pueden purificar por electroforesis, por ejemplo, electroforesis de gel de poliacrilamida. Por otro lado, es posible una purificación con ayuda de intercambiadores de aniones. En este caso, se eluyen los productos deseados preferentemente por aplicación de un gradiente de sal, por ejemplo, de un gradiente de cloruro de sodio o de un gradiente de pH.

Se pueden purificar de forma particularmente sencilla y eficaz los derivados de PNA de la fórmula I según la invención a través de intercambiadores de aniones. Se mostró que los subproductos sin carga no se retardan en el intercambiador de aniones, mientras que el producto cargado se adhería a la columna. Después de lavar con agua, se pudo aislar el producto deseado con ácido acético o una solución de cloruro de sodio en forma pura. Como intercambiador de aniones se usa preferentemente intercambiadores de aniones fuertes o fases de modo mixto tal como, por ejemplo, Oasis MAX (Waters GmbH, Eschbom).

También se mostró que los compuestos de la fórmula I según la invención son en general mejor solubles en medio acuoso que los correspondientes oligómeros de PNA sin el radical fosforilado. Esto se nota muy especialmente en el

caso de los derivados lipofílicos tales como, por ejemplo, los derivados de fluoresceína o los derivados de hexadecilo, en forma de una solubilidad muy mejorada en medio acuoso.

La invención se refiere en especial a derivados de PNA, en los que A y E son iguales a  $\text{CH}_2$ . Además, la invención se refiere en especial a derivados de PNA en los que D es igual a  $(\text{CH}_2)_2$ . También se prefieren los derivados de PNA de la fórmula I, en los que W y W' son iguales a oxo, también aquellos en los que Y e Y' son iguales a hidroxilo o anión oxo, y aquellos en los que V y V' son iguales a oxo.

Ejemplos de bases naturales son adenina, citosina, 5-metilcitosina, guanina, timina y uracilo. Ejemplos de bases no naturales son purina, 2,6-diaminopurina,  $\text{N}^4\text{N}^4$ -etancitosina,  $\text{N}^6\text{N}^6$ -etano-2,6-diaminopurina, 5-alquil (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-uracilo, 5-alquil (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-citosina, 5-(1-propargilamino)-uracilo, 5-(1-propargilamino)-citosina, fenoxazina, 9-aminoetoxifenoxazina, 5-fluoro-uracilo o pseudoisocitosina, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-aminouracilo, pseudouracilo, dihidouracilo, 5-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-uracilo, 5-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-citosina, 5-alquénil (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-citosina, 5-fluorocitosina, 5-clorouracilo, 5-clorocitosina, 5-bromouracilo, 5-bromocitosina, 7-desazaadenina, 7-desazaguanina, 8-azapurina o purinas 7-desaza-7-sustituidas.

Para derivados de PNA, que sólo llevan en posición C-terminal un radical fosforilado (donde q es igual a 0), el término N puede estar unido con una secuencia de péptidos. Como secuencias de péptidos se tienen en cuenta, con preferencia, aquellos que optimizan la distribución orgánica o la localización celular del PNA, como por ejemplo, transportano, factor de crecimiento similar a la insulina, señales de localización nuclear u otras secuencias portadoras (Larsen *et al.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 159-166). El péptido también puede servir como tag de afinidad, como aproximadamente una cadena (His)<sub>6</sub>.

La presente invención permite una amplia variación de los radicales X, X', Z y Z' (se brindan ejemplos en las Figuras 1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 3b) y permite así la introducción de distintas características funcionales específicas en el PNA.

Una realización preferida de Z o Z' es un radical alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>22</sub>. También se prefieren radicales alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>22</sub>, en especial radicales alcoxi C<sub>16</sub>. Otros radicales preferidos son radicales hidroxilo (alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>), en especial HO(CH<sub>2</sub>)<sub>3-12</sub>O. También se prefieren radicales aminoalcoxi, en especial radicales 6-aminohexoxi y 5-aminopentoxi. Además se prefieren radicales de la fórmula R<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>, en donde R<sub>7</sub> es igual a hidroxilo, amino o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>, pero con preferencia es hidroxilo y m es igual a 0 a 100, con preferencia 2 a 10. Se prefieren en especial HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>2</sub>, HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>6</sub> y H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>2</sub>. Otros ejemplos preferidos de Z o Z' comprenden radicales mercaptoalcoxi, en especial 6-mercaptohexiloxi.

En otra realización preferida, Z o Z' es un grupo fluorescente como fluoresceína, rodamina, TAMRA o un colorante de cianina. Los grupos fluorescentes preferidos pueden hallarse en las Figuras 1a-3b. Tiene preferencia muy especial la biotina para Z. Otros grupos preferidos para Z comprenden dabcilo, psoraleno, acridina, DNP y colesterol (Figuras 1b y 2b), radicales BODIPY, ROX o R6G (Su-Chun Hung *et al.* (1998) *Analytical Biochemistry* 255, 32-38) y digoxigenina (Tarrason *et al.*, *Methods in Enzymology* (1999) Vol. 313, 257-268).

Más allá de ello, Z o Z' son iguales a un grupo compuesto por un radical monofuncional o bifuncional de fluoresceína, rodamina, TAMRA, biotina, pireno, dinitrofenilo, colesterilo, acridina, adamantilo, vitamina E, colorante de cianina, dabcilo, edans, lexitropsina o psoraleno. Los grupos terminales monofuncionales se detallan por ejemplo en las Figuras 1a, 1b, 2a y 3a, los grupos bifuncionales de puente se detallan en las Figuras 2b y 3b. En otra realización preferida, n y/o m son, de modo independiente entre sí, 0, es decir, la parte del PNA lleva en el término N y/o C sólo un radical fosforilado.

Una realización preferida de X o X' es U-(alcandiil C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>)-U, en especial O-(alcandiil C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>)-O, con preferencia especial O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-6</sub>-O. Otra realización preferida de X o X' es un grupo de la fórmula U-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>u</sub>, en donde u' es igual a 1 a 10, con preferencia 1 a 6, y en donde U es preferentemente oxo. En otra realización preferida, X o X' comprende un grupo fluorescente como fluoresceína, rodamina, TAMRA o un colorante de cianina, por ejemplo, Cy3® (empresa Amersham Pharmacia Biotech). Los grupos fluorescentes preferidos pueden hallarse en las Figuras 2a-3b. Tiene preferencia muy especial la biotina para X o X'. Otros grupos preferidos son radicales dabcilo, psoraleno, acridina, DNP, colesterol, BODIPY, lexitropsina, digoxigenina, ROX y R6G.

Los distintos radicales para X, X', Z y Z' en la fórmula I puede cumplir diferentes funciones. Los radicales de fluoresceína tienen variadas aplicaciones en la secuenciación de ADN, amplificación de señales o como marcadores para la determinación de la captación celular de PNA. Los radicales de colorante de cianina (Cy3® y Cy5®) dan como resultado una señal de fluorescencia esencialmente más intensa y más duradero que la fluoresceína en sí. El radical psoraleno se utiliza para la reticulación cruzada (crosslinking) con ácidos nucleicos complementarios. El radical acridina es un intercalador efectivo y así puede incrementar la afinidad de unión del PNA. Los derivados de biotina, acridina y psoraleno también se pueden emplear para experimentos antisentido. Además, los derivados de hexadecilo y colesterol se pueden emplear para el paso a través de la membrana del PNA. Los compuestos marcados con DNP de la fórmula I se pueden detectar con anticuerpos anti-DNP. Los radicales aminoalcoxi se pueden utilizar para el acoplamiento de otros grupos tales como, por ejemplo, lexitropsina (comp. ejemplo 17; PNA-16). De forma similar, también se pueden usar grupos mercaptoalcoxi para otra derivación.



La invención también se refiere al uso de derivados de PNA de la fórmula I como medicamentos. Estos medicamentos se pueden emplear para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades que están acompañadas de la expresión o una sobreexpresión de determinados genes. La invención también se refiere al uso de derivados de PNA como agentes de diagnóstico. Estos agentes de diagnóstico pueden emplearse para el reconocimiento precoz de las enfermedades antes mencionadas. Como medicamentos o agentes de diagnóstico, los derivados de PNA de la fórmula se pueden aprovechar en función de su secuencia como agentes antisentido, antígenos, Decoy y de quimeraplastia.

Los derivados de PNA según la invención se utilizan en especial para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades en las que son la causa o participan genes definidos por sobreexpresión.

Estos medicamentos se pueden usar, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades causadas por virus, por ejemplo, por CMV, VIH, HSV-1, HSV-2, gripe, VSV, hepatitis B o papilomavirus, en donde la correspondiente secuencia viral es el objetivo.

Los derivados antisentido de PNA según la invención que son activos contra estos blancos tienen, por ejemplo, la siguiente secuencia de bases.

a) contra CMV, por ejemplo,

SEQ ID NO: 1      5'-GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCG-3'

b) contra VIH, por ejemplo,

SEQ ID NO: 2      5'-ACACCCAATTCTGAAAATGG-3'

SEQ ID NO: 3      5'-AGGTCCCTGTTCTGGGCGCCA-3'

c) contra HSV-1, por ejemplo,

SEQ ID NO: 4      5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCTG-3'

Estos medicamentos también son apropiados, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer. En este caso, se pueden usar preferentemente secuencias que están dirigidas contra blancos responsables del origen del cáncer o del crecimiento del cáncer, en especial por la inhibición de la telomerasa (E. Matthes *et al.* (1999) Nucleic acids Res. 27, 1152). Estos blancos son, además:

1) Oncoproteínas nucleares tales como, por ejemplo, c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120,

2) Oncoproteínas citoplasmáticas/asociadas a membrana tales como, por ejemplo, EJras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl, c-ets,

3) Receptores celulares tales como, por ejemplo, receptor EGF, Her-2, c-erbA, receptor VEGF (KDR-1), receptores de retinoides, subunidad reguladora de la proteína quinasa, c-fms, Tie-2, c-raf-1 quinasa, PKC-alfa, proteína quinasa A (R1 alfa),

4) Citoquinas, factores de crecimiento, matriz extracelular tales como, por ejemplo, CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, bFGF, VEGF, mieloblastina, fibronectina.

Derivados de PNA antisentido que son eficaces contra tales blancos, tienen por ejemplo la siguiente secuencia de bases:

a) contra c-Ha-ras, por ejemplo,

SEQ ID NO: 5      5'-CAGCTGCAACCCAGC-3'

SEQ ID NO: 6      5'-TATTCCGTCAT-3'

SEQ ID NO: 7      5'-TTCCGTCATCGCTCCTCAGGGG-3'

b) bFGF, p. ej.,

SEQ ID NO: 8      5'-GGCTGCCATGGTCCC-3'

c) c-myc, p. ej.

SEQ ID NO: 9      5'-GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC-3'

SEQ ID NO: 10      5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'

## ES 2 275 677 T3

d) c-myb, por ejemplo,

SEQ ID NO: 11 5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3'

e) c-fos, por ejemplo,

SEQ ID NO: 12 5'-CGAGAACATCATCGTGG-3'  
 SEQ ID NO: 13 5'-GGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'  
 SEQ ID NO: 14 5'-CCCGAGAACATCATGGTCGAAG-3'  
 SEQ ID NO: 15 5'-GGGGAAAGCCCGCAAGGGG-3'

f) p120, por ejemplo,

SEQ ID NO: 16 5'-CACCCGCCTTGGCCTCCAC-3'

g) receptor del EGF, p. ej.,

SEQ ID NO: 17 5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3'  
 SEQ ID NO: 18 5'-GGCAAACCTTTCTTTCTCTCC-3'

h) supresor tumoral p53, p. ej.,

SEQ ID NO: 19 5'-GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3'  
 SEQ ID NO: 20 5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3'

i) bcl-2, por ejemplo,

SEQ ID NO: 21 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'

k) VEGF, por ejemplo,

SEQ ID NO: 22 5'-GCGCTGATAGACATCCATG-3'  
 SEQ ID NO: 23 5'-GGAGGCCCGACC-3'  
 SEQ ID NO: 24 5'-GGTTTCGGAGGC-3'  
 SEQ ID NO: 25 5'-TGGTGGAGGTAG-3'  
 SEQ ID NO: 26 5'-GCATGGTGGAGG-3'  
 SEQ ID NO: 27 5'-TTGGCATGGTGG-3'  
 SEQ ID NO: 28 5'-GCCTGGGACCAC-3'  
 SEQ ID NO: 29 5'-CAGCCTGGGACC-3'  
 SEQ ID NO: 30 5'-TGCAGCCTGGGA-3'  
 SEQ ID NO: 31 5'-GTGCAGCCTGGG-3'  
 SEQ ID NO: 32 5'-GGTGCAGCCTGG-3'  
 SEQ ID NO: 33 5'-ATGGGTGCAGCC-3'  
 SEQ ID NO: 34 5'-GGCTTGAAGATG-3'  
 SEQ ID NO: 35 5'-GCAGCCCCCGCA-3'  
 SEQ ID NO: 36 5'-GCAGCAGCCCCC-3'

l) c-raf quinasa, por ejemplo,

SEQ ID NO: 37 5'-TCCCGCCTGTGACATGCATT-3'

m) PKC-alfa, por ejemplo,

SEQ ID NO: 38 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3'

n) proteína quinasa A, por ejemplo,

SEQ ID NO: 39 5'-GCGTGCCTCCTCACTGGC-3'

Los medicamentos que contienen derivados de PNA de la fórmula I son apropiados, por ejemplo, también para el tratamiento de enfermedades que son influidas por integrinas o receptores de adhesión célula-célula, por ejemplo, por VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM o ELAM.

## ES 2 275 677 T3

Los derivados de PNA antisentido que son eficaces contra estos blancos, tienen, por ejemplo, la siguiente secuencia de bases:

a) VLA-4, p. ej.,

SEQ ID NO: 40 5'-GCAGTAAGCATCCATATC-3'

b) ICAM-1, por ejemplo,

SEQ ID NO: 41 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'

SEQ ID NO: 42 5'-CCCCCACCCTTCCCCTCTC-3'

SEQ ID NO: 43 5'-CTCCCCCACCCTTCCCCTC-3'

SEQ ID NO: 44 5'-GCTGGGAGCCATAGCGAGG-3'

c) ELAM-1, p. ej.,

SEQ ID NO: 45 5'-ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG-3'

SEQ ID NO: 46 5'-CAATCAATGACTTCAAGAGTTC-3'

d) Integrina alfa(V), por ejemplo,

SEQ ID NO: 47 5'-GCGGCGGAAAAGCCATCG-3'

Los medicamentos que contienen derivados de PNA de la fórmula I también son apropiados, por ejemplo, para impedir la reestenosis. En este caso, se pueden usar secuencias de PNA que estén dirigidas contra blancos que son responsables de la proliferación o la migración. Dianas de este tipo son, por ejemplo:

1) Proteínas de transactivadores nucleares y ciclinas tales como, por ejemplo, c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, ciclina y cdc2-quinasa

2) Mitógenos o factores de crecimiento tales como, por ejemplo, PDGF, bFGF, VEGF, EGF, HB-EGF y TGF- $\beta$ .

3) Receptores celulares tales como, por ejemplo, receptor bFGF, receptor EGF y receptor PDGF.

Los derivados de PNA antisentido que son eficaces contra estos blancos, tienen, por ejemplo, la siguiente secuencia de bases:

a) c-myb, por ejemplo,

SEQ ID NO: 48 5'-GTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'

b) c-myc, por ejemplo,

SEQ ID NO: 49 5'-CACGTTGAGGGGCAT-3'

c) cdc2-quinasa, por ejemplo,

SEQ ID NO: 50 5'-GTCTTCCATAGTTACTCA-3'

d) PCNA (proliferating cell nuclear antigen of rat), por ejemplo,

SEQ ID NO: 51 5'-GATCAGGCGTGCCTCAAA-3'

Los derivados de PNA también se pueden usar para el tratamiento de vitiligo y otras enfermedades de despigmentación o alteraciones de la pigmentación (por ejemplo, piel, cabello, ojos) tales como, por ejemplo, albinismo y psoriasis, o para el tratamiento de asma, en donde la expresión del receptor de adenosina-A1, receptor de adenosina-A3, receptor de bradiquinina o de IL-13 se inhiben con ayuda de agentes antisentido apropiados. Una secuencia de bases de este tipo es, por ejemplo:

SEQ ID NO: 52 5'-GATGGAGGGCGGCATGGCGGG-3'

Los medicamentos que contienen un derivado de PNA de la fórmula I se pueden utilizar, por ejemplo, en forma de preparados farmacéuticos que se pueden administrar por vía oral, por ejemplo en forma de comprimidos, grageas, cápsulas de gelatina blanda o dura, soluciones, emulsiones o suspensiones. También se pueden administrar por vía rectal, p. ej. en forma de supositorios, o por vía parenteral, p. ej. en forma de soluciones para inyección. Para la producción de

preparados farmacéuticos, estos compuestos se pueden elaborar en soportes orgánicos e inorgánicos terapéuticamente inertes. Ejemplos de tales portadores para comprimidos, grageas y cápsulas de gelatina dura son lactosa, almidón de maíz o sus derivados, sebo y ácido esteárico o sus sales. Soportes adecuados para la preparación de soluciones son agua, polioles, sacarosa, azúcar invertido y glucosa. Soportes adecuados para soluciones para inyección son agua, alcoholes, polioles, glicerol y aceites vegetales. Soportes adecuados para supositorios son aceites vegetales y endurecidos, ceras, grasas y polioles semilíquidos. Los preparados farmacéuticos pueden contener también conservantes, disolventes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, sales para modificar la presión osmótica, tampones, agentes de revestimiento, antioxidantes, así como, eventualmente, otras sustancias activas terapéuticas.

Las formas de administración preferidas son aplicaciones tópicas, aplicaciones locales tales como, por ejemplo, con ayuda de un catéter o por inhalación, inyecciones o infusiones y la administración por vía oral. Para la inyección se formulan los derivados de PNA de la fórmula I en una solución líquida, con preferencia en un tampón fisiológicamente aceptable como, por ejemplo, solución de Hank o solución de Ringer. Los oligonucleótidos también se pueden formular en forma sólida y disolver o suspender antes de usar. Las dosis preferidas para una administración sistemática son de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal y día.

La invención se refiere además a preparaciones farmacéuticas que contienen derivados de PNA de la fórmula I y/o sus sales fisiológicamente tolerables, además de vehículos y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

Los derivados de PNA de la fórmula y/o sus sales fisiológicamente tolerables se pueden administrar en los animales, con preferencia en los mamíferos, y en especial en los seres humanos como medicamentos en sí, en mezclas entre sí o en forma de preparaciones farmacéuticas que permiten una aplicación tópica, percutánea, parenteral o enteral y que contienen como componente activo una dosis eficaz de al menos un derivado de PNA, además de vehículos y aditivos farmacéuticamente aceptables. Las preparaciones contienen normalmente aprox. 0,1 a 90% en peso del compuesto de eficacia terapéutica. Para el tratamiento de enfermedades cutáneas, se prefiere una aplicación tópica, por ejemplo en forma de ungüentos, lociones o tinturas, emulsiones, suspensiones.

La preparación de productos farmacéuticos se realiza de una forma conocida en sí (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publ. Co., Easton, PA.), en donde se usan vehículos inorgánicos y/u orgánicos farmacéuticamente inertes. Para preparar píldoras, comprimidos, grageas y cápsulas de gelatina dura, se pueden utilizar por ejemplo lactosa, almidón de maíz y/o sus derivados, talco, ácido esteárico y/o sus sales, etc. Los vehículos para cápsulas de gelatina blanda y/o supositorios son, por ejemplo, grasas, ceras, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales y/o endurecidos, etc. Como vehículos para la preparación de soluciones y/o jarabes son apropiados, por ejemplo, agua, sacarosa, azúcar invertido, glucosa, polioles, etc. Como vehículos para la preparación de soluciones para inyección son apropiados agua, alcoholes, glicerina, polioles, aceites vegetales, etc. Como vehículos para microcápsulas, implantes y/o parches, son apropiados polimerizados mixtos de ácido glicólico y ácido láctico. Más allá de ello, son apropiadas formulaciones de liposomas que son conocidas por el especialista (N. Weiner, Drug Develop Ind Pharm 15 (1989) 1523; "Liposome Dermatics, Springer Verlag 1992), por ejemplo, liposomas HVJ (Hayashi, Gene Therapy 3 (1996) 878). La aplicación dérmica se puede realizar, por ejemplo, también con ayuda de métodos iontoforéticos y/o con ayuda de electroporación.

Una preparación farmacéutica puede contener, además de los principios activos y vehículos, aditivos tales como, por ejemplo, rellenos, extensores, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, reticulantes, estabilizantes, emulsionantes, conservantes, endulzantes, colorantes, saborizantes o aromatizantes, espesantes, diluyentes, sustancias tampón, también disolventes y/o solubilizantes y/o agentes para lograr un efecto de depósito, así como sales para alterar la presión osmótica, recubrimientos y/o antioxidantes. También pueden contener dos o más derivados de PNA diferentes de la fórmula I y/o sus sales fisiológicamente tolerables, así como también además de al menos un derivado de PNA de la fórmula I, una o varias otras sustancias terapéuticamente eficaces. La dosis puede variar dentro de amplios límites y se puede adaptar a cada caso individual.

La invención también se refiere al uso de derivados de PNA de la fórmula I como agentes de diagnóstico, en especial como elementos auxiliares en el diagnóstico de ADN y en la biología molecular (ver, por ejemplo: Peptide Nucleic acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen y Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999). En el diagnóstico de ADN, las sondas génicas, también denominadas sondas de ADN o sondas de hibridación, desempeñan un papel muy importante para la detección específica de secuencias de determinados genes. Una sonda génica está compuesta en general de una secuencia de reconocimiento y uno o varios grupos marcadores apropiados (rotuladores). La especificidad de la determinación de una secuencia blanco en una sonda analítica por medio de hibridación con una sonda génica complementaria se determina por medio de la secuencia de reconocimiento y su estructura química. Esta técnica se puede transferir a los PNA. El PNA tiene, frente a los oligonucleótidos de estructura natural, la ventaja de que presenta una gran afinidad por la secuencia blanco y una mayor capacidad para la discriminación de bases.

El uso de compuestos de la fórmula I se refiere, por ello, a la hibridación *in situ* y la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). La hibridación *in situ* puede servir también, por ejemplo, para la detección de microorganismos y virus (Just *et al.* (1998) J. Vir. Method. 73, 163-174). Otra aplicación de los compuestos según la invención se refiere a la detección y cuantificación de ácidos nucleicos. Aquí se hace uso preferentemente también de la tecnología de rayos (Stroter *et al.* J. Am. Chem. Soc. (2000) 122, 1205-1209; Niemeyer *et al.*, Angew. Chem. (1999) 111, 3039-3043; Pirrung (1997) Chem. Rev. 97, 473-488), que presenta una alta producción de sondas y gran sensibilidad. En

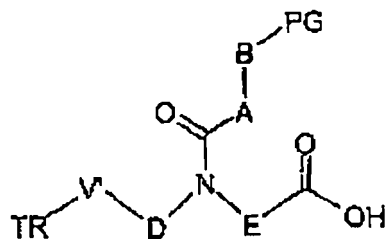
este caso, las sondas de PNA se fijan en un soporte o chip de PNA apropiado. Para ello, se sintetizan PNA como se describió en los ejemplos y luego se fijan sobre el soporte o el chip de PNA. De modo alternativo, el PNA puede prepararse directamente sobre el soporte. Otra aplicación es el uso de compuestos de la fórmula I como biosensores para la detección de ácidos nucleicos (Wang *et al.* (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 7667). La aplicación de PNA de la fórmula I con un rótulo de afinidad, por ejemplo, histidil-PNA, es otra aplicación para la purificación de ácidos nucleicos (Oerum *et al.* (1999), en Peptide Nucleic acids: Protocols and Applications).

Ambos radicales fosforilados en el término amino y carboxi pueden cumplir diferentes funciones. A modo de ejemplo, el término amino puede estar sustituido lipofílicamente para aumentar la captación celular, mientras que en el término carboxi se halla un radical es fluoresceína para la detección de la mejor captación celular (comp. PNA-6 en el Ejemplo 7).

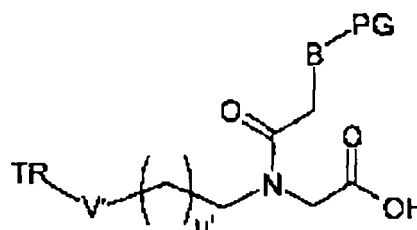
Los derivados de PNA según la invención son apropiados así como agentes antisentido, antígenos, Decoy o de quimeraplastia.

Los compuestos de la fórmula I biderivados son apropiados también como los llamados "Molecular Beacons" (Li *et al.* (2000) Angew. Chemie 112, 1091-1094), que recién en la unión con el ácido nucleico complementario emiten una señal de fluorescencia. En estos Beacons, un extremo del PNA, por ejemplo, el término amino, está provisto de un rótulo de fluorescencia, mientras que el otro extremo, por ejemplo, el término carboxi, está provisto de un atemperador. También es posible el caso inverso, en el que el término N lleva un atemperador y el término C, un rótulo de fluorescencia. Así se produce la supresión de la señal de fluorescencia hasta que el derivado de PNA marcado dos veces no se una a un ácido nucleico complementario. Recién en la unión, se separan espacialmente entre sí el radical de fluorescencia (por ejemplo, edans) y el atemperador (por ejemplo, dabculo), de modo que se emite una señal de fluorescencia (Sokol *et al.* (1998) proc. Natl. Acad. Sci. 95, 11538).

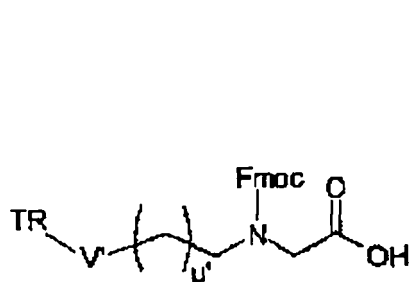
La síntesis del esqueleto de PNA se produce de acuerdo con los métodos descritos en la literatura, por ejemplo, de acuerdo con la estrategia de los grupos protectores de terc-butiloxycarbonilo (BOC), 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) o monometoxitritilo (Mmt) (Peptide Nucleic acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen y Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999). Con preferencia, el grupo protector de Mmt se usa para la protección temporaria de la función amino de la aminoetilglicina y grupos protectores lábiles de bases en las nucleobases heterocíclicas (D. Will *et al.* (1995) Tetrahedron 51, 12069; Breipohl *et al.* (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686). Ejemplos de unidades monoméricas son compuestos de la fórmula V a V D, en donde A, B, D, E, u' y V' tienen el significado anterior, PG es un grupo protector de aminoácido tales como, por ejemplo, benzoílo, anisoílo, isobutiroílo, acetilo, terc-butilbenzoílo (Breipohl *et al.* (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686), TR es un grupo protector lábil de ácidos como dimetoxitritilo (Dmt) (para V' = O y S) o Mmt (para V' = NH).



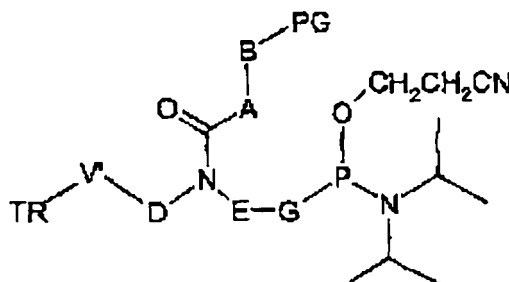
Fórmula V



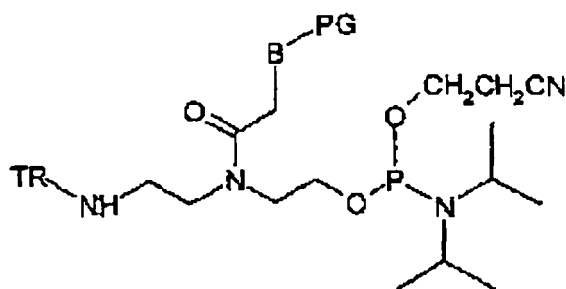
Fórmula V A



Fórmula V B



Fórmula V C



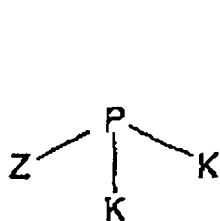
Fórmula V D

Según la estructura del esqueleto del PNA, la función amino libre del término N se puede hacer reaccionar directamente con el correspondiente reactivo de fosforilación, por ejemplo, en un amidato de fósforo ( $V' = NR_1$  en la fórmula I).

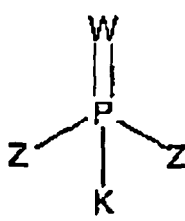
Los radicales fosforilados se pueden introducir con ayuda de reactivos utilizados usualmente en la química de los nucleótidos. Son accesibles numerosos reactivos de fosforilación a los que se puede recurrir para la preparación de los compuestos de la fórmula I. Una selección de los reactivos se muestra en las Figuras 4a a 4d, pero en donde la invención no está limitada a estos derivados especiales. Para la modificación carboxiterminal se utilizan soportes correspondientemente modificados, en especial soportes de CPG para la síntesis en fase sólida. Ejemplos de tales soportes se detallan en la Figura 6.

Como reactivos de fosforilación se pueden utilizar los reactivos usuales en la química de los nucleótidos (Glen Research Corporation, Sterling, VA 20164, Estados Unidos; Figura 4a a 4d), que reaccionan, por ejemplo, de acuerdo con el método de la amidita de fósforo, el método de H-fosfonato o el método de fosfotriéster (E. Sonveaux (1986) Bioorganic Chemistry 14, 274; S. L. Beaucage y R. P. Iyer (1993) Tetrahedron 49, 1925; E. Uhlmann y A. Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 543). El sinnúmero de las posibles modificaciones está determinada por la gran cantidad de los reactivos de fosforilación conocidos y los soportes correspondientemente derivados, en especial de soportes de controlled pore glass (CPG). Como soportes sólidos se utilizan además con preferencia tentagel® (empresa Rapp Polymers GmbH, Tübingen) y aminometilpoliestireno.

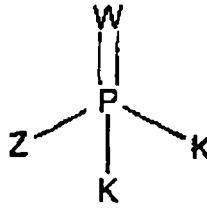
Para introducir la función fosforilo, se tienen en cuenta en principio todos los reactivos conocidos en la química de los nucleótidos, pero en especial los siguientes reactivos de la fórmula VI A, la fórmula VI B, la fórmula VI C y la fórmula VI D,



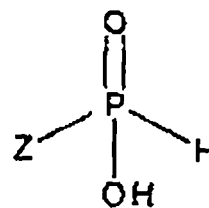
Fórmula VI A



Fórmula VI B



Fórmula VI C



Fórmula VI D

en donde K es igual a halógeno, con preferencia Cl, triazolilo, imidazolilo o dialquilamino, W puede tener el significado antes mencionado o el significado de W' y Z puede tener el significado antes mencionado o el significado de X, X' o Z', en donde los grupos reactivos están correspondientemente protegidos.

A modo de ejemplo, los grupos hidroxilo de la amidita de fósforo de fluoresceína 3 (Figura 4a) están protegidos por esterificación con ácido pivalico.

Los compuestos de la fórmula VI sólo han de verse como ejemplos de tales reactivos que opcionalmente reaccionan con la adición de otros reactivos auxiliares como bases, ácidos o reactivos de condensación. Se prefieren en especial los reactivos de la fórmula VI A, que reaccionan de acuerdo con el método de la amidita de fósforo (Beaucage e Iyer, 1993). Se hacen reaccionar como compuesto de fósforo (III) y luego se oxidan. Si la oxidación se lleva a cabo, por ejemplo, con yodo/agua/piridina o hidroperóxido de terc-butilo, se obtienen los derivados de fosforilo ( $W = O$ ). Si, por el contrario, la oxidación se realiza con azufre elemental o reactivo de Beaucage, se obtiene el correspondiente compuesto de tiofosforilo ( $W = S$ ).

Entre los reactivos (Figuras 4a a 4d) también se hallan los “reactivos bifuncionales”, que se pueden hacer reaccionar varias veces debido a una segunda función que primero está protegida. Ejemplos de tales reactivos bifuncionales son las amiditas de fósforo 4, 6, 8 a 13. En este caso, se puede tratar de la múltiple conjugación de un reactivo o también de la reacción sucesiva con diferentes reactivos. De esta manera, por ejemplo, la amidita de fósforo 3 de fluoresceína se puede hacer reaccionar sólo una vez. Por el contrario, la amidita de fósforo 4 de fluoresceína posee una función hidroxil protegida con el grupo Dmt, que se puede hacer reaccionar después de la separación del grupo Dmt nuevamente con un reactivo de fosforilación. De esta manera, se pueden introducir el mismo grupo o grupos diferentes varias veces. PNA-6 es un ejemplo de una múltiple conjugación en el término carboxi y una modificación adicional en el término amino. En principio, se estructuraron en el término carboxi de forma sucesiva la fluoresceína y el aminoligador. Después de la síntesis de la parte del PNA, se acopló en el último ciclo una unidad de hidroxietilglicinato que reaccionó con el reactivo de fosforilación C16 7. PNA-1 y PNA-2 son compuestos de la fórmula I que sólo se modifican de forma carboxiterminal con un radical fosforilo ( $q = 0$ ). Estas clase de sustancias también es nueva y es objeto de la invención.

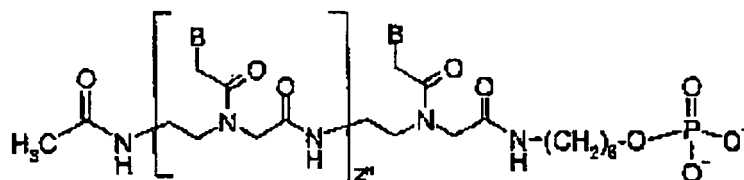
En la Figura 5a y 5b se muestran algunos ejemplos de tipos de compuestos para la modificación N-terminal de los compuestos de la fórmula I. El tipo de compuesto A se obtiene por reacción del grupo hidroxil terminal del PNA con el reactivo de fosforilación 1. El tipo de compuesto B se obtiene por reacción del grupo amino terminal del PNA con la amidita de fósforo 5 de biotina. El tipo de compuesto C se obtiene por reacción sucesiva del PNA con un grupo hidroxil terminal con el espaciador-18 amidita de fósforo 9, modificador de amino-5 amidita de fósforo 12 y lexitropsina. El tipo de compuesto D se obtiene por reacción sucesiva del PNA con un grupo hidroxil terminal con el espaciador-9 amidita de fósforo 8 y la cianina-3 amidita de fósforo 10. El tipo de compuesto E se obtiene por reacción sucesiva del PNA con un grupo hidroxil terminal con la amidita de fósforo 4 bifuncional de fluoresceína, el espaciador-9 amidita de fósforo 8 y el C16-reactivo de fosforilación 7. Los pasos que se han de realizar adicionalmente, como oxidación y separación de grupos protectores, se describen en los ejemplos.

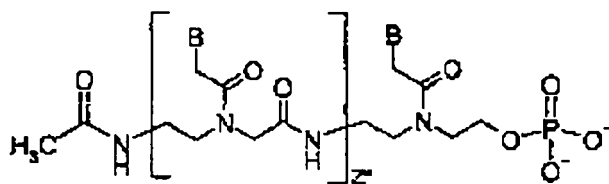
Un ejemplo de una modificación carboxiterminal de PNA con ayuda de una amidita de fósforo de la fórmula V D se representa en la Figura 7. En este caso, se parte de un soporte de bishidroxietilsulfona 1 (Figura 6) que se hace reaccionar después de la separación del grupo Dmt con un 3% de ácido tricloroacético con la amidita de fósforo de la fórmula V D bajo catálisis de tetrazol. Después de la oxidación con agua yodada, se separa el grupo Mmt aminoterminal con 3% de ácido tricloroacético y se sintetiza luego la parte del PNA de acuerdo con los métodos conocidos en la literatura, por ejemplo, según el método Mmt explicado más abajo. Un método alternativo para la modificación carboxiterminal hace uso de soportes CPG®, que están modificados según el resto por introducir, es decir, por ejemplo, contienen el radical de fluoresceína (Figura 8). Este método se debe explicar por medio del ejemplo de un derivado de PNA que se modifica de forma aminoterminal con un radical hexadecilfosfato y carboxiterminal con un fosfato de fluoresceína. Primero se destritila el soporte de fluoresceína 3 (Figura 6) con ácido tricloroacético y luego se condensa con el modificador de amino-C6 amidita de fósforo 13 (Figura 4d) con ayuda de tetrazol. Después de la oxidación con agua yodada y separación del grupo Mmt, se puede sintetizar la parte del PNA de acuerdo con métodos convencionales. En el último ciclo, se acopla una unidad de PNA a base de hidroxietilglicina (fórmula V A,  $u' = 2$ ,  $V' = \text{oxígeno}$ ) que se hace reaccionar después de separar el grupo protector Dmt con ayuda del reactivo de fosforilación C16 7 como se muestra en la Figura 9. Tras separar todos los grupos protectores y separar el soporte de CPG, se obtiene el derivado de PNA doblemente modificado.

## Ejemplos

La preparación de los siguientes compuestos se describe a modo de ejemplo:

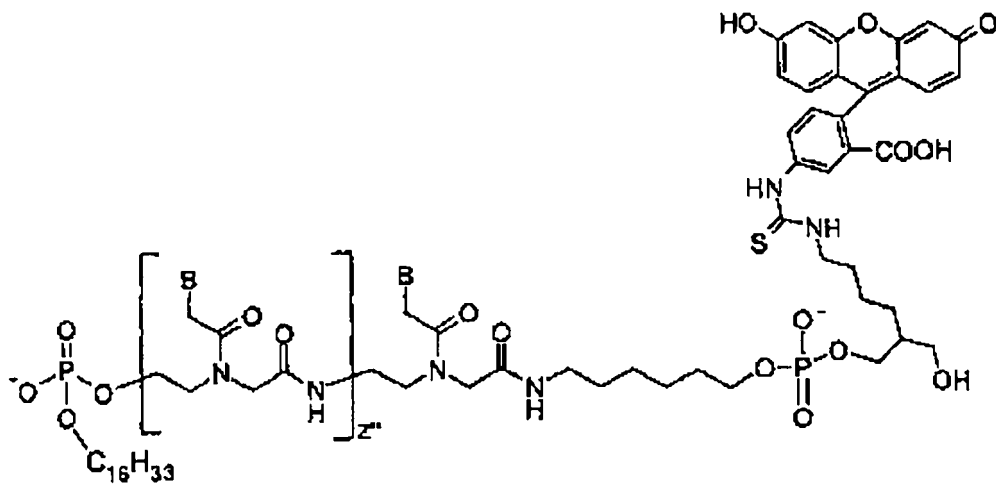
PNA-1:



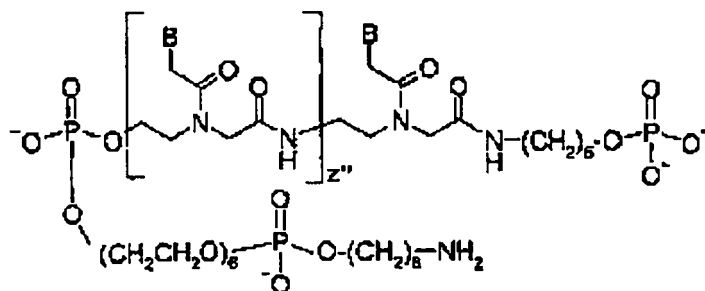

$$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\left[ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}) \right]_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-$$
[illegible][illegible]



PNA-6:



PNA-7:



en donde la secuencia de las bases B se describe en cada caso por SEQ ID NO: 53, y z'' es igual a 10:

SEQ ID NO: 53

5'-TATTCCGTCA T-3'

(PNA-1 a PNA-7)

## Ejemplo 1

*Síntesis de la cadena de PNA*

Para preparar la parte de PNA se usaron los siguientes reactivos:

1. reactivo de amidita de fósforo (0,1 M en acetonitrilo (ACN))
2. monómero de Mmt-PNA o bien monómero de Dmt-oeg-PNA (0,2 M en DMF:ACN (1:1; v:v))
3. ACN anhidro ( $\leq 30$  ppm de agua)
4. ácido tricloroacético (3%) en diclorometano (DCM)
5. acetanhídrido, 2,6-lutidina en THF (1:1:8; v:v:v); (Cap A)
6. N-metilimidazol (16%) en THF; (Cap B)
7. solución yodada (0,05 M) en THF, agua, piridina, (7:2:1; v:v:v)
8. solución de lavado (THF, agua, piridina (7:2:1; v:v:v);
9. tetrazol (0,3 M) en ACN

## ES 2 275 677 T3

10. HBTU; 0,2 M en DMF:ACN (1:1; v:v)

11. DIPEA; 0,2 M en DMF:ACN (1:1; v:v)

12. DMF (> 99,5%)

13. soporte en fase sólida: aminopropil-CPG® (550 Å) cargado con hemisuccinato de Mmt-aminohept-1-ilo (para hexilamidas de PNA).

Los monómeros protegidos con Mmt/acilo o bien los monómeros oeg protegidos con Dmt/acilo se prepararon tal como se acaba de describir (Breipohl *et al.* (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686). la carga de aminopropil-CPG® con el hemisuccinato de Mmt-aminohept-1-ilo también se acaba de describir (Will *et al.* (1995) Tetrahedron 51, 12069-12082). Los soportes de CPG® derivados se pueden adquirir en comercios (Glen Research Corporation, Sterling, VA 20164, Estados Unidos). Las síntesis de PNA se realizaron en general en una escala de 2 a 5 µmol.

El siguiente ciclo se utilizó para la síntesis de PNA:

1. etapa de lavado con ACN

2. desprotección del grupo Mmt o del grupo Dmt por tratamiento con 3% de TCA en DCM; 110 seg.

3. etapa de lavado con DMF/ACN (1:1)

4. neutralización con DIPEA en DMF/ACN (1:1)

5. acoplamiento de la unidad monomérica por preactivación (15 min) con monómero de HBTU/DIPEA/PNA (relación 1:1:1; volumen total 450 µl), carga de la fase sólida y acoplamiento (45 min)

6. etapa de lavado con ACN

7. cubrimiento con acetanhídrido/N-metilimidazol

8. etapa de lavado con ACN

9. nuevo ciclo

### Ejemplo 2

#### Síntesis de acetil-tat tcc gtc at-aminohept-1-p (PNA-1)

Primero se separa del soporte de bishidroxietilsulfonilo 1 (1 µmol, Figura 6) por tratamiento con 3% de ácido tricloroacético el grupo protector Dmt. Luego se hace reaccionar la función hidroxilo libre con el modificador de amino-C6 amida de fósforo 13 (Figura 4d) bajo catálisis de tetrazol. En este caso, se aplican el reactivo de fosforilación 13 en exceso (aprox. 25 veces) como solución 0,3 M en acetonitrilo/tetrahidrofurano (1:1; v:v) y el tetrazol (aprox. 50 veces; 0,5 M en acetonitrilo). Después de realizada la condensación, se oxida con una solución de yodo (0,05 M en tetrahidrofurano/agua, piridina (7:2:1; v:v:v)). A continuación se prepara la parte de PNA como se describe en el Ejemplo 1 por síntesis en fase sólida. En el último ciclo, se acetila la función amino libre por tratamiento con el reactivo de cubrimiento. Esto impide en la desprotección con amoníaco concentrado la desintegración aminoterminal del PNA. Finalmente, el PNA se separa del soporte por tratamiento con amoníaco conc. a 50°C durante la noche y al mismo tiempo se separan los grupos protectores. Se obtiene 103 DO (260) del producto crudo deseado que se purificó por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAA) preparativa. La banda de producto deseada se eluye con 0,2 M de tampón de bicarbonato de trietilamonio y se desaliniza a través de una columna Bond-Elut C18 (1 g). Se obtiene 23,3 DO. El producto se analizó por espectrometría de masa con iones negativos, que confirmó la masa calculada (calc. 3166,2; exp. 3166,8).

### Ejemplo 3

#### Síntesis de acetil-tat tcc gtc at(eo)-p (PNA-2)

La preparación se realiza análogamente a lo descrito en el Ejemplo 2 en una síntesis de 1 µmol. Después de separar el grupo protector Dmt del soporte 1 (Figura 6) se hace reaccionar la función hidroxilo libre con la amida de fósforo de la fórmula V D bajo catálisis con tetrazol. En este caso, se aplican el reactivo de fosforilación en exceso (aprox. 20 veces) como solución 0,1 M en acetonitrilo/tetrahidrofurano (1:1; v:v) y el tetrazol (aprox. 50 veces; 0,5 M en acetonitrilo). Después de realizada la condensación, se oxida con una solución de yodo (0,05 M en tetrahidrofurano/agua, piridina (7:2:1; v:v:v)). Después de la separación con amoníaco, se obtiene 50 DO de producto crudo. De allí se purifica por electroforesis 45 DO a través de un 15% de gel PAA. Se obtiene 13,2 DO de producto con el peso molecular de 3052,9 (calc. 3052,9).

## Ejemplo 4

*Síntesis de aminohexil-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexil-p (PNA-3)*

- 5 La preparación se realiza análogamente a lo descrito en el Ejemplo 2 en una síntesis de 1  $\mu$ mol. Después de estructurar el término carboxi y sintetizar la parte del PNA, se acopla en el último ciclo una unidad a base de hidroxietilglicina con timina como nucleobase (oegT). Después de separar el grupo Dmt se acopla la función hidroxil libre con el modificador de amino-C6 amidita de fósforo 13 (Figura 4d) bajo catálisis con tetrazol y luego se oxida con agua yodada. Por tratamiento con amoníaco conc. a 50°C se separa el oligómero del soporte y al mismo tiempo se separan todos los grupos protectores lábiles de bases. Luego se separa el grupo protector Mmt terminal por tratamiento con 80% de ácido acético. Se obtiene 130 DO del producto crudo que se purificó por electroforesis de gel. Se obtiene 22,5 DO de producto con el peso molecular de 3303,8 (calc. 3305,0)

## Ejemplo 5

- 15 *Síntesis de biotina p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexil-p (PNA-4)*

- 20 La preparación se realiza análogamente a lo descrito en el Ejemplo 2 en una síntesis de 0,5  $\mu$ mol. Después de estructurar el término carboxi y sintetizar la parte del PNA, se acopla en el último ciclo una unidad a base de hidroxietilglicina con timina como nucleobase (oegT). Después de separar el grupo Dmt se acopla la función hidroxil libre con el modificador de amino-C6 amidita de fósforo 5 (Figura 4d) bajo catálisis con tetrazol y luego se oxida con agua yodada y se destritila con ácido trifluoroacético. Por tratamiento con amoníaco conc. a 50°C se separa el oligómero del soporte y al mismo tiempo se separan todos los grupos protectores lábiles de bases. Se obtiene 37 DO del producto crudo que se purificó por electroforesis de gel. Se obtiene 22,5 DO.

## Ejemplo 6

*Síntesis de p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexil-p-fluoresceína (PNA-5)*

- 30 La síntesis se realiza de forma análoga al Ejemplo 2 a partir del soporte de fluoresceína 3 (Figuras 6a y 8). Del soporte de fluoresceína 3 se separa por tratamiento con 3% de ácido tricloroacético el grupo protector Dmt. Luego se hace reaccionar la función hidroxil libre con el modificador de amino-C6 amidita de fósforo 13 (Figura 4d) bajo catálisis de tetrazol. Después de realizada la condensación, se oxida con una solución de yodo (0,05 M en tetrahidrofurano/agua, piridina (7:2:1; v:v:v)). A continuación se prepara la parte de PNA como se describe en el Ejemplo 1 por síntesis en fase sólida. En el último ciclo se acopla una unidad a base de hidroxietilglicina con timina como nucleobase ((t)oeg). Después de separar el grupo Dmt se acopla la función hidroxil libre con el reactivo de fosforilación 1 (Figura 4a) bajo catálisis con tetrazol y luego se oxida con agua yodada. Finalmente, el PNA se separa del soporte por tratamiento con amoníaco conc. a 50°C durante la noche y al mismo tiempo se separan los grupos protectores. Se obtiene 61 DO (260) del producto crudo que se purificó por electroforesis de gel de poliacrilamida (PAA) preparativa. La banda de producto deseada se eluye con 0,2 M de tampón de bicarbonato de trietilamonio y se desaliniza a través de una columna Bond-Elut C18 (1 g). Se obtiene 5,6 DO. El producto se analizó por espectrometría de masa con iones negativos, que confirmó la masa calculada (calc. 3709,5; exp. 3706,3)

## Ejemplo 7

- 45 *Síntesis de C16-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohexil-p-fluoresceína (PNA-6)*

- 50 La síntesis se realiza de forma análoga al Ejemplo 6 1 a partir del soporte de fluoresceína 3 (Figuras 6a y 8). En el último ciclo se acopla una unidad a base de hidroxietilglicina con timina como nucleobase ((t)oeg). Después de separar el grupo Dmt se acopla la función hidroxil libre con el C16-reactivo de fosforilación 7 (Figura 4c) bajo catálisis con tetrazol y luego se oxida con agua yodada. Finalmente, el PNA se separa del soporte por tratamiento con amoníaco conc. a 50°C durante la noche y al mismo tiempo se separan los grupos protectores. Se obtiene 61 DO (260) del producto crudo deseado que se purificó por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAA) preparativa. La banda de producto deseada se eluye con 0,2 M de tampón de bicarbonato de trietilamonio y se desaliniza a través de una columna Bond-Elut C18 (1 g). Se obtiene 4,6 DO. El producto se analizó por espectrometría de masa con iones negativos, que confirmó la masa calculada (calc. 3934, exp. 3931).

## Ejemplo 8

- 60 *Determinación de las temperaturas de fusión*

- La determinación de las temperaturas de fusión se realizó con ayuda de un espectrofotómetro de haz de diodos HP 8452A, un elemento HP 89090A Peltier y el HP Temperature Control Software Rev. B5.1 (empresa Hewlett Packard). Se mide en etapas de 0,5°C/min en 140 mM de KCl, 10 mM de dihidrógeno-fosfato de sodio, 0,1 mM de EDTA (pH 7,4) como tampón. La concentración de los oligómeros asciende a 0,5 hasta 1 DO<sub>260</sub> por cada ml.

Sorprendentemente, los derivados de PNA-5 y PNA-6 modificados dos veces con fosforilo con dos o tres cargas negativas mostraron una unión igual de buena o mejor respecto del ADN y ARN complementario que el PNA sin carga (sustancia de referencia).

Derivado de PNA		T <sub>m</sub> (ADN)	T <sub>m</sub> (ARN)
Referencia	Ac-HN-tat tcc gtc at-hex	41,9 °C	56,6 °C
PNA-5	p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohehexil-p-fluoresceína	41,8 °C	56,9 °C
PNA-6	C16-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohehexil-p-fluoresceína	44,1 °C	56,9 °C

#### Ejemplo 9

##### *Determinación de la captación celular después de la marcación con fluorescencia*

Las células COS se dejan desarrollar hasta confluencia en MEM de Dulbecco, que fue suplementado con FCS al 10%, en placas de Petri de 5 cm. Las células se lavan dos veces con DMEM exento de suero. Con ayuda de una aguja estéril se raspa una superficie de aprox. 1 cm<sup>2</sup> en el centro de la placa de Petri. En esta superficie se coloca la solución de PNA (10 μM) por ensayar. Se incuba a 37°C bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 2, 4 y 16 horas, las células se investigan mediante microscopio de fluorescencia. Para ello, las células se lavan cuatro veces con DMEM exento de suero, se cubren con un soporte de vidrio y se evalúan bajo el microscopio de fluorescencia o mediante contraste de fases. Se ensayaron PNA-5 y PNA-6 microscópicamente con fluorescencia.

En este caso, se mostró que el derivado de hexadecil-PNA (PNA-6) se captó más eficientemente en las células que el PNA sin el radical hexadecilo.

#### Ejemplo 10

##### *Inhibición de la proliferación celular por PNA-6*

La secuencia de PNA-6 se dirige contra el inicio de la traducción de ARNm de Ha-ras. Las células REH (células de leucemia humana pre-B, DSM ACC 22) o células tumorales A549 se cultivaron en OptiMEM (Gibco BRL) con 10% de suero fetal de ternero (FCS, GIBCO-BRL) a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub>. La densidad celular para el ensayo era de aprox. 1 x 10<sup>6</sup>/ml. El PNA-6 (10 μM) se incubó con las células en placas de 24 cavidades. Después de una incubación de 96 h a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub>, se determinó la densidad celular. Los valores medios de la densidad celular se calcularon a partir de 3 cavidades individuales de una concentración de PNA. Se mostró que el PNA-13 inhibe la proliferación de las células REH. Al cabo de > 4 Tagen de tiempo de incubación, la inhibición por PNA-6 es mayor que por un oligonucleótido de fosforotioato correspondiente.

#### Ejemplo 11

##### *Síntesis de aminohehexil-p-espaciador 18-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminohehexil-p (PNA-7)*

La preparación se realiza análogamente a lo descrito en el Ejemplo 2 en una síntesis de 1 μmol. Después de estructurar el término carboxi y sintetizar la parte del PNA, se acopla en el último ciclo una unidad a base de hidroxietilglicina con timina como nucleobase (oegT). Después de separar el grupo Dmt se acopla la función hidroxil libre con el espaciador 18-amidita de fósforo (Figura 4c) y después de una nueva destrilación con el modificador de amino-C6 amidita de fósforo 13 (Figura 4d) bajo catálisis con tetrazol y luego se oxida con agua yodada. Por tratamiento con amoníaco conc. a 50°C se separa el oligómero del soporte y al mismo tiempo se separan todos los grupos protectores lábiles de bases. Luego se separa el grupo protector Mmt terminal por tratamiento con 80% de ácido acético. Se obtiene 57 DO del producto crudo que se purificó por electroforesis de gel. Se obtiene 7,4 DO de producto que muestra en el espectro de masa el peso molecular esperado de 3647,5 (calc. 3648,5).

#### Índice de abreviaturas

ACN	acetonitrilo
BOC.	terc-butiloxycarbonilo
<u>C</u> , <u>c</u>	pseudo-iso-citosina

## ES 2 275 677 T3

	COS	CV1 Origin SV 40
	CPG	controlled pore glass
5	DCM	diclorometano
	DIPEA	diisopropiletilamina
	DMEM	MEM de Dulbecco
10	DMF	dimetilformamida
	Dmt	dimetoxitritilo
15	ADN	ácido desoxirribonucleico
	DNP	dinitroarilo
	FITC	isotiocianato de fluoresceína
20	Fmoc	fluorenilmetoxycarbonilo
	HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
25	HBTU	hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
	hex	-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -OH
	MEM	medio esencial mínimo modificado de Eagle
30	Mmt	monometoxitritilo
	DO	densidad óptica
35	oeg	N-(2-hidroxietil)glicina
	PAA	poliacrilamida
	PG	grupo protector
40	PNA	ácido poliamidonucleico
	ARN	ácido ribonucleico
45	TBTU	tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
	TCA	ácido tricloroacético
	THF	tetrahidrofurano
50	TR	grupo protector lábil a ácido

Figuras 1a, 1 b, 2b y 3b muestran ejemplos de radicales terminales Z y Z'.

Figuras 2a y 3a muestran ejemplos de radicales de puente X y X'.

Figuras 4a, 4b, 4c y 4d muestran ejemplos de reactivos de fosforilación.

Figuras 5a y 5b muestran ejemplos de derivación simple (A, B) y múltiple (C a E) en el término N de PNA.

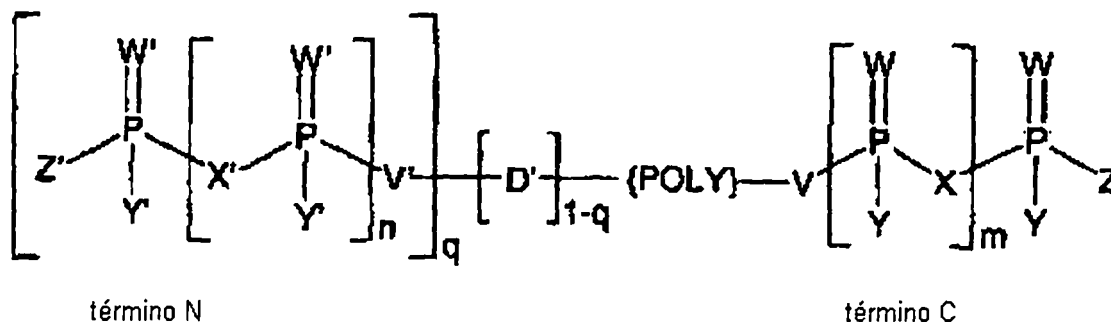
Figura 6 muestra ejemplos de reactivos unidos a portadores para la síntesis de fase sólida.

Figuras 7, 8 y 9 muestran ejemplos de la síntesis de PNA modificado C- y N-terminal.

65

## REIVINDICACIONES

## 1. Derivado de PNA de la fórmula I



Fórmula I

en donde

q es igual a 0 ó 1,

D' es igual a hidroxilo, mercapto, amino, alquilamino o acilamino,

V, de modo independiente entre sí, es igual a oxígeno, azufre, NR<sub>1</sub>,

V', de modo independiente entre sí, es igual a oxígeno, azufre, NR<sub>1</sub>, un grupo U-(CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>u'</sub>-C(O)-NH o un grupo U-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u'</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH,

U de modo independiente entre sí, es igual a oxígeno, azufre o NH,

u' de modo independiente entre sí, es igual a 1 a 10, con preferencia 1 a 4, con preferencia especial 1,

W y W' de modo independiente entre sí, son iguales a oxígeno, azufre o NR<sub>1</sub>,

Y e Y' de modo independiente entre sí, son iguales a hidroxilo, mercapto, anión oxi, tioato o NR<sub>1</sub> R<sub>2</sub>,

X y X' de modo independiente entre sí, son iguales a un grupo U-(alcandiil C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>)-U o un grupo U-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>u'</sub>, o iguales a un grupo marcador, o un grupo para la reticulación cruzada o un grupo que favorece la captación intracelular, o un grupo que aumenta la afinidad de unión del derivado de PNA a ácidos nucleicos, por ejemplo, un radical bifuncional de fluoresceína, rodamina, TAMRA, biotina, pireno, dinitrofenilo, colestero, acridina, adamantilo, vitamina E, colorante de cianina, dabci, edans, lexitropsina, psoraleno, BODIPY, ROX, R6G o digoxigenina,

Z y Z' de modo independiente entre sí, son iguales a hidroxilo, mercapto, anión oxi, tioato o NR<sub>1</sub> R<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>, arilalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-U, arilalquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-U, hidroxilo-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-U, aminoalquil-U, mercaptoalquil-U,

o un grupo de la fórmula R<sub>7</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>, en donde R<sub>7</sub> es igual a hidroxilo, amino o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub> y m es igual a 1 a 100, con preferencia 2 a 10,

o es igual a un grupo marcador, o un grupo para la reticulación cruzada, o un grupo que favorece la captación intracelular, o un grupo que aumenta la afinidad de unión del derivado de PNA con ácidos nucleicos, por ejemplo, un radical monofuncional o bifuncional de fluoresceína, rodamina, TAMRA, biotina, pireno, dinitrofenilo, colestero, acridina, adamantilo, vitamina E, colorante de cianina, dabci, edans, lexitropsina, psoraleno, BODIPY, ROX, R6G o digoxigenina,

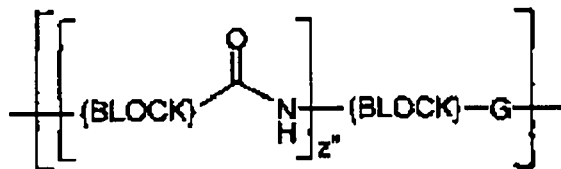
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de modo independiente entre sí, son un radical compuesto por hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, con preferencia hidrógeno,

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> de modo independiente entre sí, son un radical compuesto por hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o el radical de una cadena lateral de aminoácidos, con preferencia hidrógeno, en donde radicales R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> adyacentes en V' también pueden formar un anillo cicloalquilo C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>,

n es igual a 0 a 10, con preferencia 0 a 3,

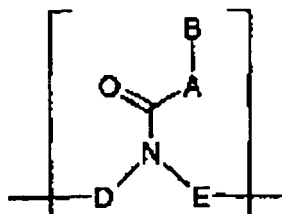
m es igual a 0 a 10, con preferencia 0 a 3,

5 y en donde {POLY} se describe por medio de la fórmula II,



Fórmula II

en donde también {BLOCK} es, de modo independiente entre sí, un grupo seleccionado de la fórmula IIIA,



Fórmula III A

o de la fórmula IIIB,

35 G está seleccionado de los grupos  $(\text{CR}_5\text{R}_6)_{u'}$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CR}_1\text{R}_2)_{t'}$  o  $\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{u'}-\text{CH}_2\text{CH}_2$ , en donde  $t'$  es igual a 2 a 10, con preferencia 6,

A de modo independiente entre sí, es un grupo  $(\text{CR}_1\text{R}_2)_s$ , en donde s es igual a 1 a 3, con preferencia 1,

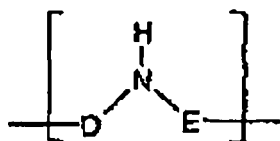
40 B de modo independiente entre sí, es un radical aromático que también puede poseer un carácter heteroaromático, o hidrógeno, o es hidroxilo o alquilo  $\text{C}_1-\text{C}_{18}$ , o una nucleobase natural o no natural usual en la química de los nucleótidos o su forma profarmacológica,

45 D de modo independiente entre sí, es un grupo  $(\text{CR}_3\text{R}_4)_t$ , en donde t es igual a 2 a 10, con preferencia 2 a 4, con preferencia especial 2,

E de modo independiente entre sí, es un grupo  $(\text{CR}_5\text{R}_6)_{u'}$ , en donde los radicales  $\text{R}_5$  y  $\text{R}_6$  adyacentes también pueden formar un anillo cicloalquilo  $\text{C}_5-\text{C}_8$  o un compuesto espiro,

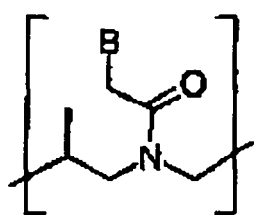
50  $\text{R}_5$  y  $\text{R}_6$  de modo independiente entre sí, son un radical compuesto por hidrógeno o alquilo  $\text{C}_1-\text{C}_6$  o el radical de una cadena lateral de aminoácidos, con preferencia hidrógeno,

55 y en donde  $u'$ ,  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$  y  $\text{R}_4$  tienen el mismo significado que el descrito con anterioridad, así como sales fisiológicamente tolerables del derivado de PNA de la fórmula I,

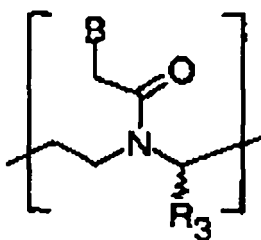


Fórmula III B

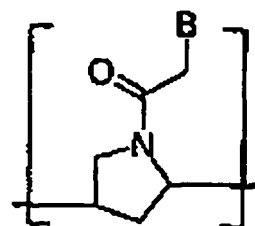
o de las fórmulas IV A a IV G,



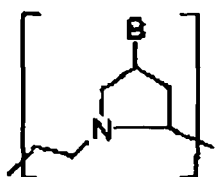
Fórmula IV A



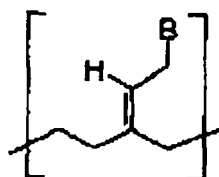
Fórmula IV B



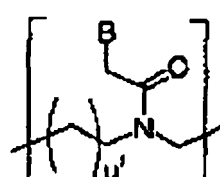
Fórmula IV C



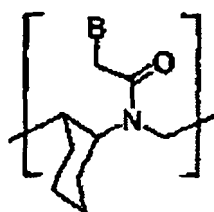
Fórmula IV D



Fórmula IV E



Fórmula IV F



Fórmula IV G

en donde cada unidad {BLOCK} puede ser diferente,

y también rige que

$z'$  es igual a 0 a 100, con preferencia 1-20, con preferencia especial 4-15,

con las condiciones de que al menos un radical Y, Y', Z o Z' sea igual a hidroxilo, mercapto, anión oxi o tioato, y que al menos un radical B sea una nucleobase.

2. Derivado de PNA de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos un radical Y, Y', Z o Z' en la fórmula I en un intervalo de pH de 4,5 a 14, con preferencia 6,5 a 12, con preferencia especial 6,5 a 9 es igual a anión oxi o tioato.

3. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, en donde n y m son, de modo independiente entre sí, 0.

4. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde q es igual a 1.

5. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde W y W' son iguales a oxo.

6. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde Y e Y' son iguales a hidroxilo o anión oxi.

7. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde V y V' son iguales a oxi.

8. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde X y X' son, de modo independiente entre sí, un grupo U-(alcandiil  $C_2-C_{22}$ )-U, con preferencia O-(alcandiil  $C_2-C_{22}$ )-O, con preferencia especial O-( $CH_2$ )<sub>2-6</sub>O, o un grupo U-( $CH_2CH_2$ -O)<sub>u'</sub>, con preferencia O( $CH_2CH_2$ -O)<sub>u'</sub>, en donde u' es 1 a 6.



9. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde X, X', Z y Z' están seleccionados, de modo independiente entre sí, del grupo de fluoresceína, rodamina, TAMRA o colorante de cianina, biotina, dabcilo, psoraleno, acridina, DNP, colesterol, vitamina E, dabcilo, edans, lexitropsina, psoraleno, BODIPY, ROX, R6G o digoxigenina.

10. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde X, X', Z y Z' están seleccionados, de modo independiente entre sí, del grupo monofosfato, derivado de biotina y derivado de fluoresceína.

11 Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde Z es un marcador de fluorescencia y Z' es un atemperador.

12. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde Z es un atemperador y Z' es un marcador de fluorescencia.

13. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde Z y Z' son, de modo independiente entre sí, un radical alquilo  $C_1-C_{22}$ ,

o un radical  $C_1-C_{22}-U$ , con preferencia un radical alcoxi  $C_1-C_{22}$ , con preferencia especial alcoxi  $C_{16}$ ,

o hidroxi- $C_1-C_{18}-U$ , con preferencia hidroxi- $C_1-C_{18}-O$ , con preferencia especial  $HO-(CH_2)_{3-12}O$ ,

o un radical aminoalquil- $U$ , con preferencia un radical aminoalcoxi, con preferencia especial 6-aminohe-xoxi o 5-aminopentoxi,

o un grupo de la fórmula  $R_7-(CH_2CH_2-O)_m$ , en donde  $R_7$  es con preferencia OH o  $NH_2$  y m es igual a 1 a 6, con preferencia especial  $HO(CH_2CH_2-O)_2$ ,  $HO(CH_2CH_2-O)_6$  y  $H_2N-(CH_2CH_2-O)_2$ ,

o un radical mercaptoalquil- $V$ , con preferencia un radical mercaptoalcoxi, con preferencia especial 6-mer-captohexiloxi.

14. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde q es igual a 0.

15. Derivado de PNA de acuerdo con la reivindicación 14, en donde D' es igual a acilamino, con preferencia acetilamino.

16. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 15, en donde D es igual a  $(CH_2)_t$ , con preferencia  $(CH_2)_2$ .

17. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 16, en donde A, E y G es igual a  $CH_2$ .

18. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 17, en donde B es igual a adenina, cito-sina, 5-metilcitosina, guanina, timina y uracilo, o es igual a purina, 2,6-diaminopurina,  $N^4N^4$ -etanocitosina,  $N^6N^6$ -etano-2,6-diaminopurina, 5-alquinil ( $C_3-C_6$ )-uracilo, 5-alquinil ( $C_3-C_6$ )-citosina, 5-(1-propargilamino)-uracilo, 5-(1-propargilamino)-citosina, fenoxazina, 9-aminoetoxifenoxazina, 5-fluoro-uracilo o pseudoisocitosina, 5-(hidroximetil) uracilo, 5-aminouracilo, pseudouracilo, dihidrouracilo, 5-alquil ( $C_1-C_6$ )-uracilo, 5-alquil ( $C_1-C_6$ )-citosina, 5-alquenil ( $C_2-C_6$ )-citosina, 5-fluorocitosina, 5-clorouracilo, 5-clorocitosina, 5-bromouracilo, 5-bromocitosina, 7-desazaadenina, 7-desazaguanina, 8-azapurina, o una purina 7-desaza-7-sustituida.

19. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 18, en donde la secuencia de bases se dirige contra partes de genes supresores de tumores, oncogenes o telomerasas o sus productos de transcripción.

20. Derivado de PNA de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la secuencia de bases de la parte del PNA está dirigida contra el inicio de la traducción de ARNm de HA-ras.

21. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-10 o 13-20 para usar como medicamento.

22. Uso de un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-10 o 15-22 para preparar un medica-mento para la terapia tumoral.

23. Derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20 para usar como agente de diagnóstico.

24. Uso de un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20 para la detección de microorga-nismos y/o virus.

25. Uso de un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20 para la detección y/o la cuanti-ficación de ácidos nucleicos.

## ES 2 275 677 T3

26. Uso de un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20 como reactivo de detección para la hibridación *in situ* o *in situ* de fluorescencia.

27. Uso de un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20 como agente antisentido, antígeno, Decoy o de quimeraplastia.

28. Uso de un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 ó 12 como Molecular Beacon.

29. Reactivo de detección que contiene un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20.

30. Chip de PNA que contiene un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20.

31. Biosensor que contiene un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20.

32. Medicamento que contiene un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-10 o 15-22 y eventualmente otros aditivos y/o vehículos farmacológicamente tolerables.

33. Agente antisentido, antígeno, Decoy o de quimeraplastia, que contiene un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20.

34. Procedimiento para preparar un derivado de PNA de la fórmula I, en donde

a) el término C de un ácido amidonucleico se une con un reactivo de fosforilación unido con fibras sólidas o un ácido amidonucleico fosforilado C-terminal se une con un soporte sólido,

b) el esqueleto del oligómero de PNA se prolonga por acoplamiento con monómeros de ácido amidonucleico,

c) se hace reaccionar opcionalmente en el término N con un reactivo de fosforilación.

35. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el PNA se prepara usando los grupos protectores t-butiloxicarbonilo (BOC), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o monometoxitritilo (Mmt).

36. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 34 ó 35, en donde el PNA se prepara usando portadores sólidos.

37. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 36, en donde como portador sólido se usa CPG®, Tentagel® o aminometilpoliestireno.

38. Procedimiento para preparar un medicamento, en donde

a) se prepara un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-10 o 15-20 y

b) se mezcla opcionalmente con otros aditivos y/o vehículos farmacológicamente tolerables.

39. Procedimiento para preparar un chip de PNA, en donde primero se prepara un derivado de PNA de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20 y luego se fija sobre un portador sólido, o bien se prepara directamente el derivado de PNA sobre el portador.

40. Procedimiento para preparar un derivado de PNA de la fórmula I de acuerdo con la reivindicación 34 a 37, también **caracterizado** porque el PNA se purifica por aprovechamiento del carácter ácido del radical fosforado por medio de cromatografía o electroforesis.

41. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el derivado de PNA se purifica por cromatografía mediante una fase estacionaria básica y un gradiente de un eluyente ácido o básico.

42. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 41, en donde la fase estacionaria es un intercambiador de aniones o una fase de modo mixto.

Fig. 1a:

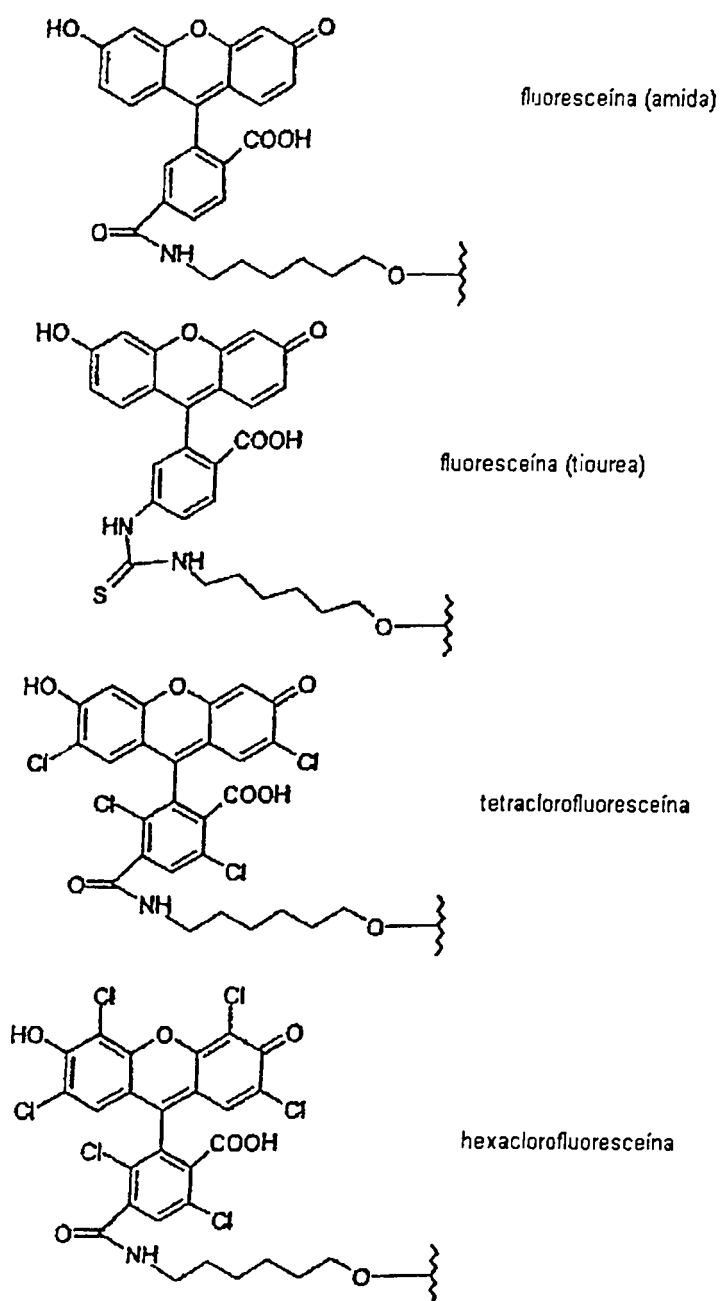


Fig. 1b:

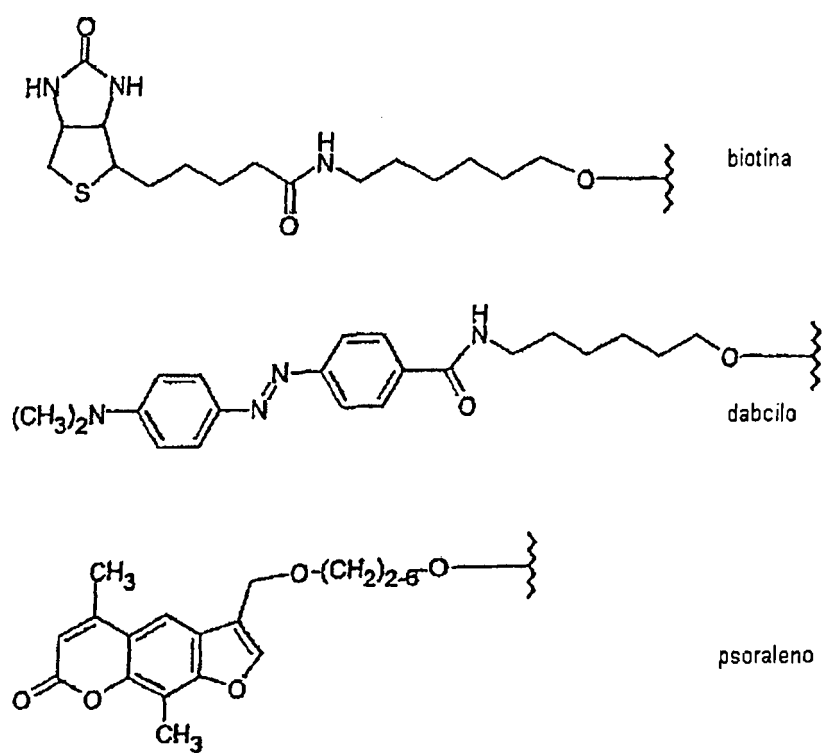


Fig. 2a:

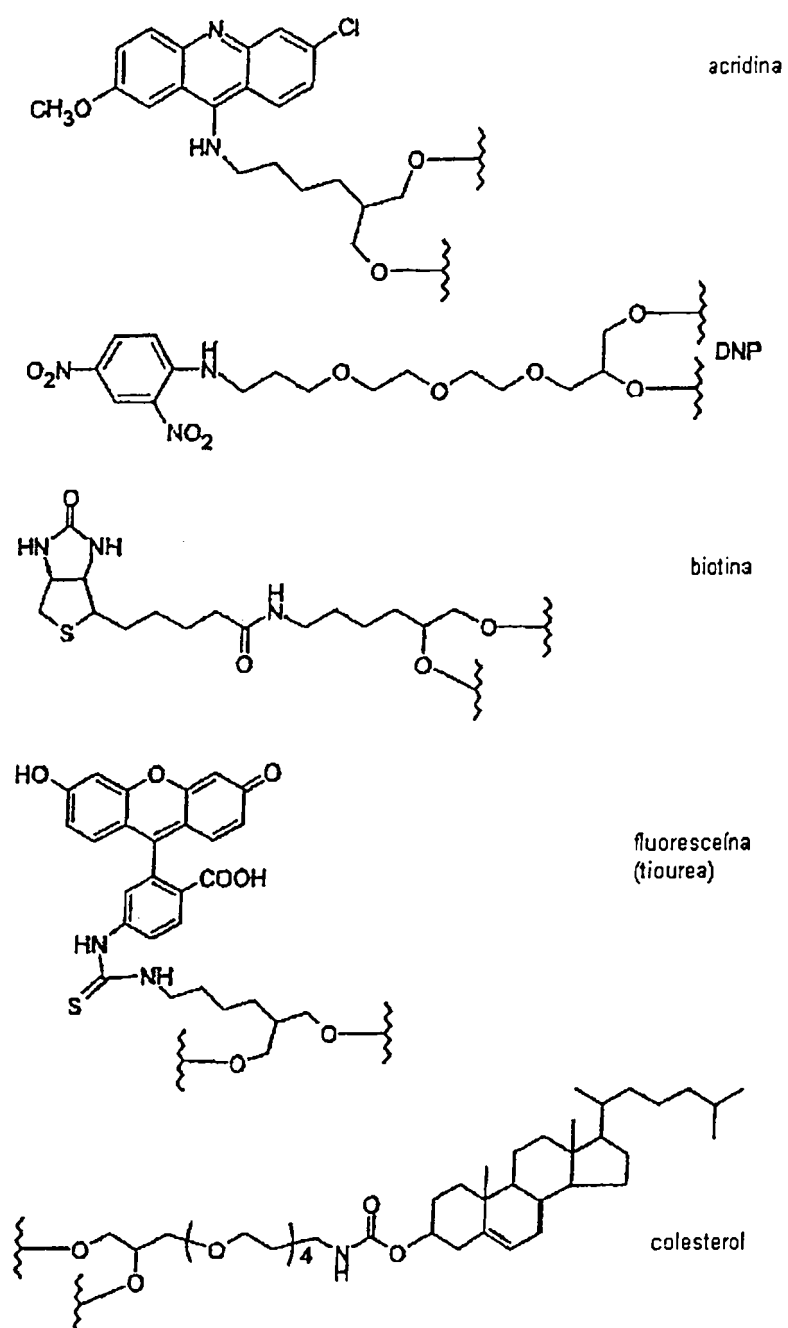
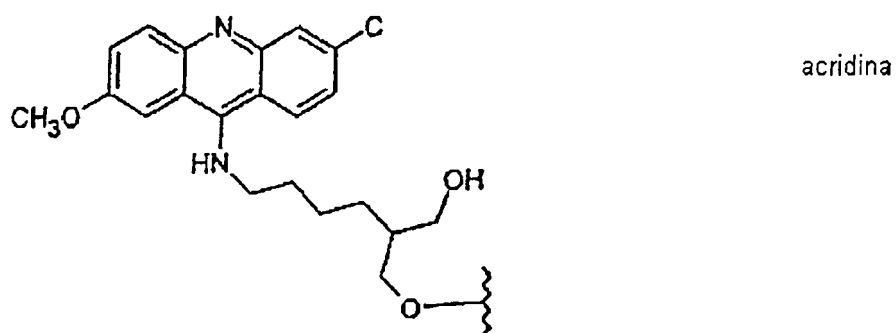
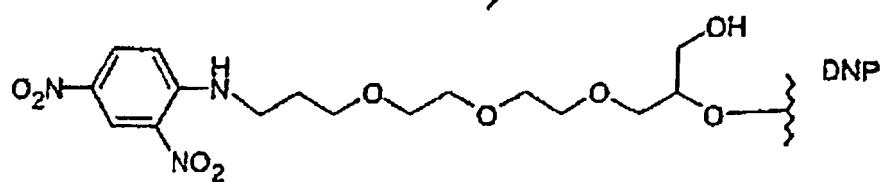


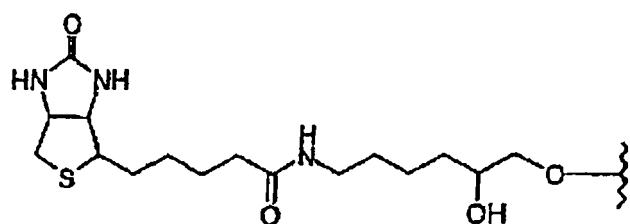
Fig. 2b:



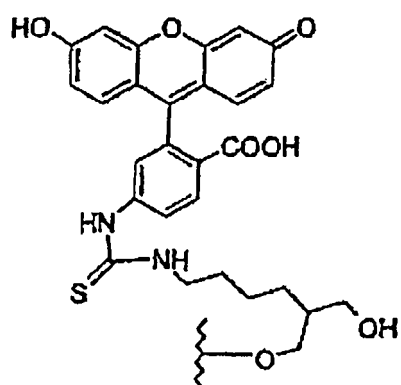
acridina



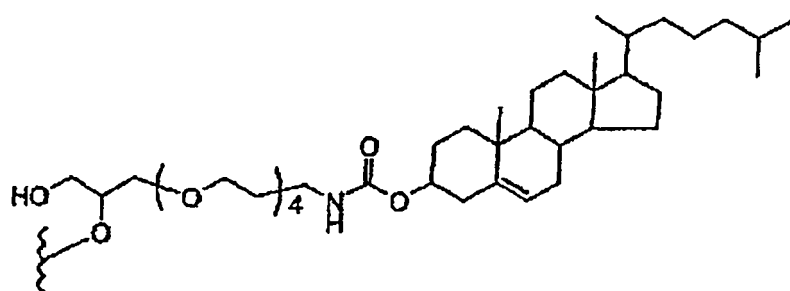
DNP



biotina



fluoresceína  
(tiourea)



colesterol

Fig. 3a:

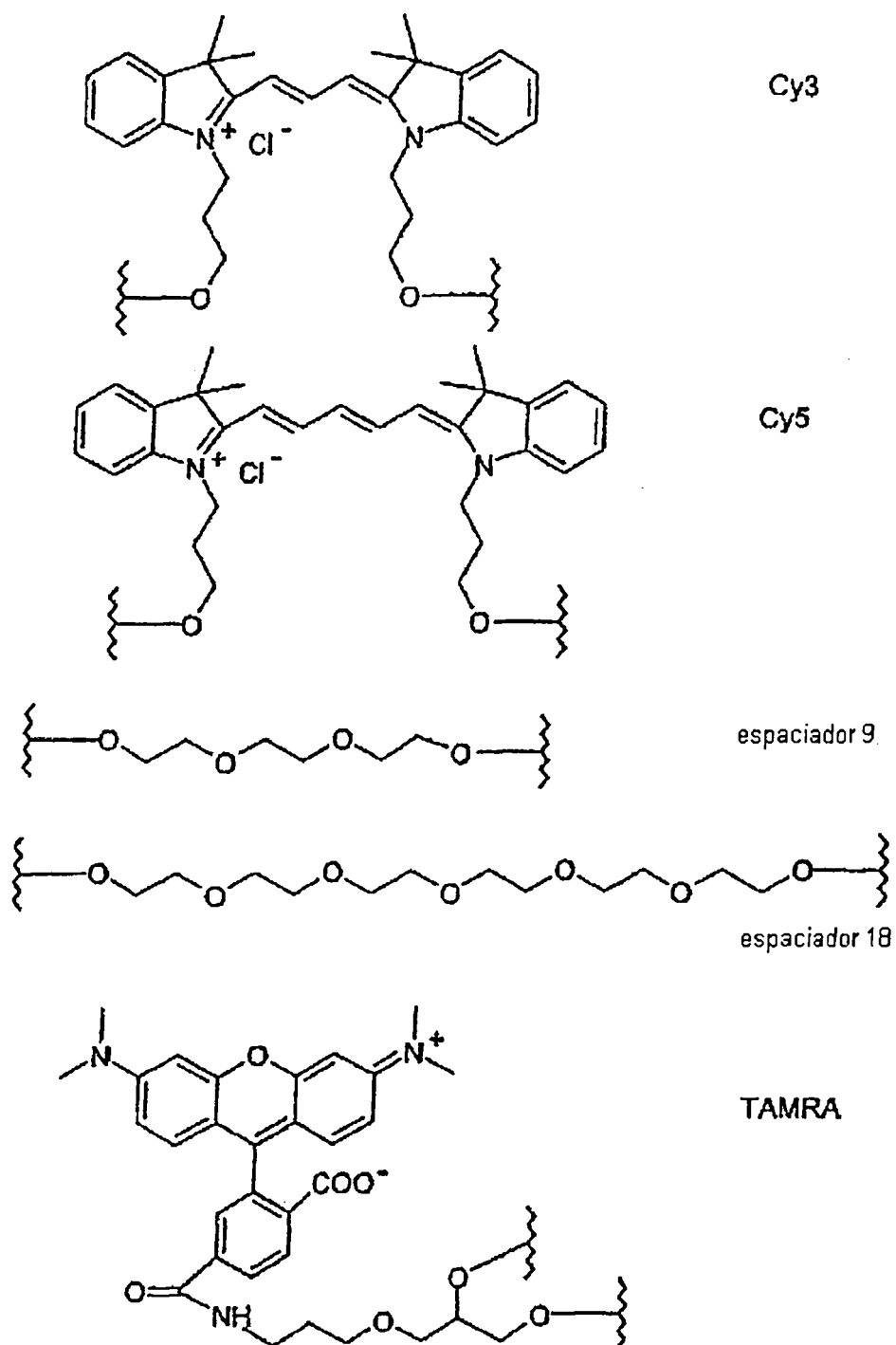


Fig. 3b:

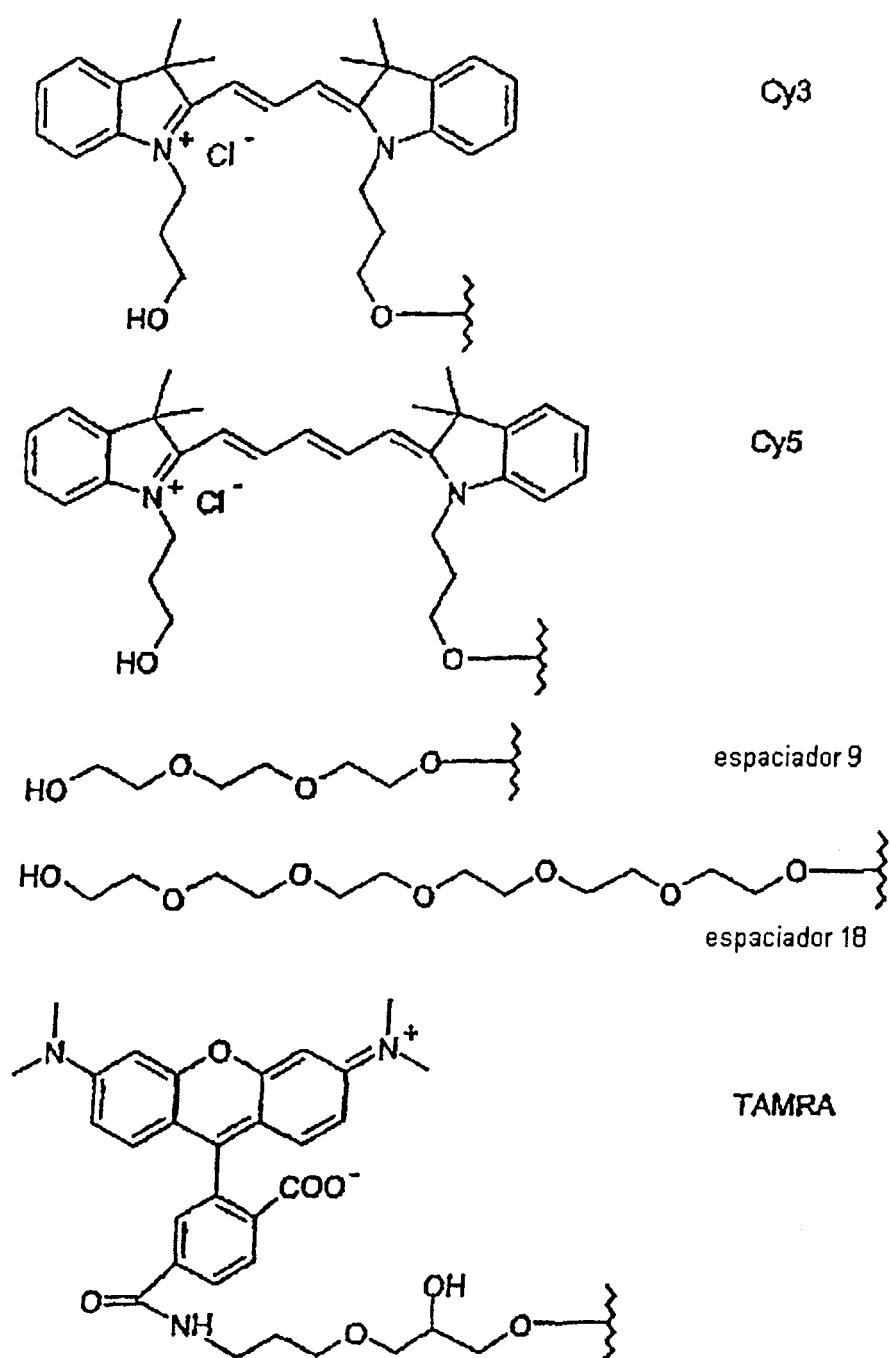
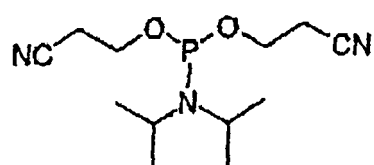
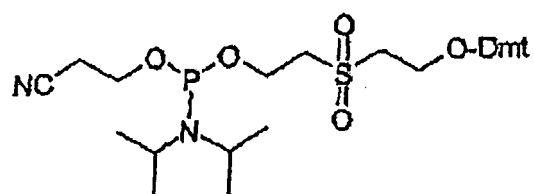




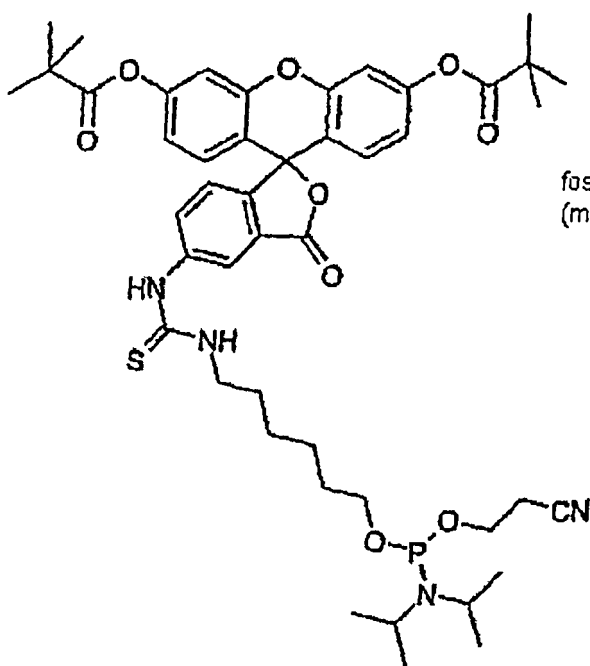
Fig. 4a:



reactivo de fosforilación 1



reactivo de fosforilación 2



fosforoamidita de fluoresceína 3  
(monofuncional)

Fig. 4b:

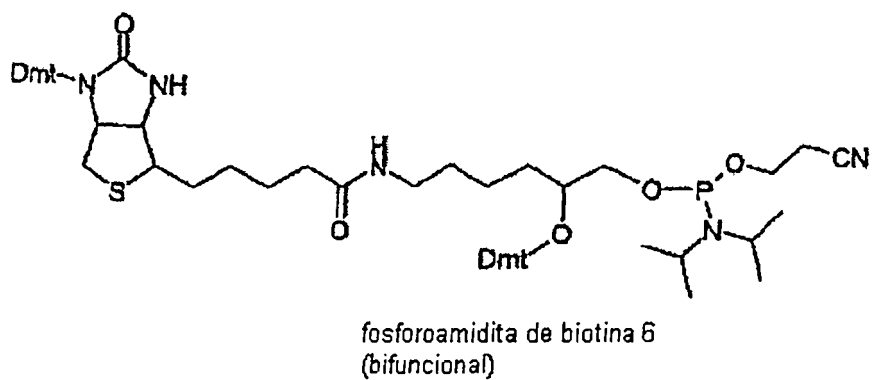
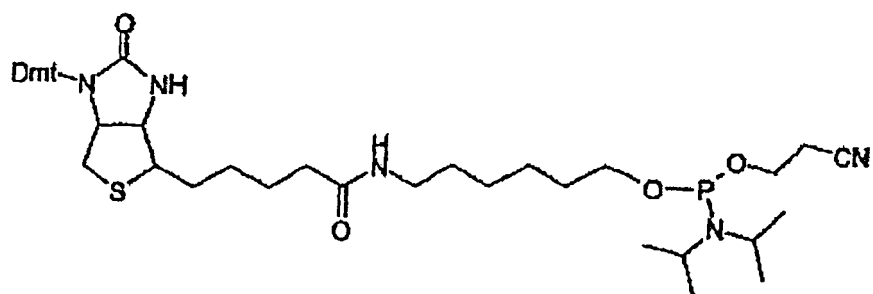
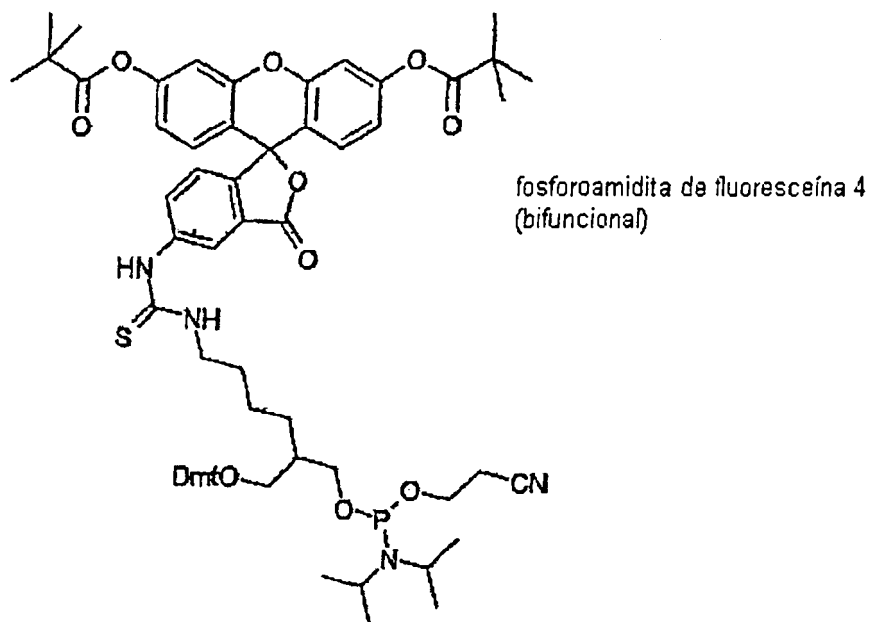
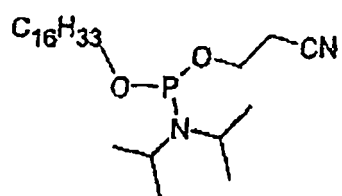
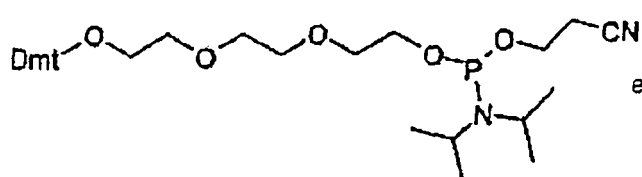


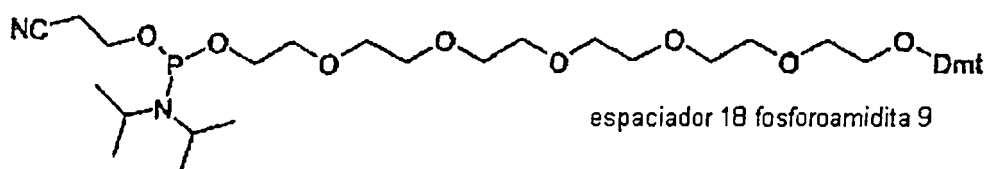
Fig. 4c:



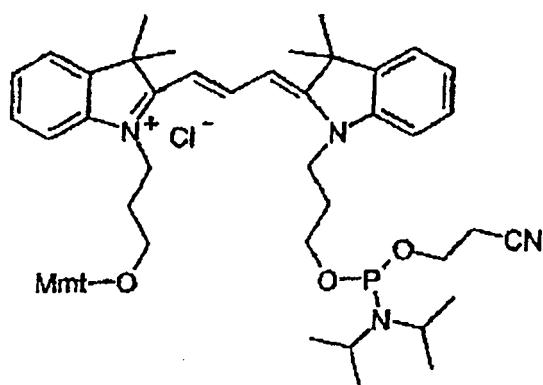
C16-reactivo de fosforilación 7



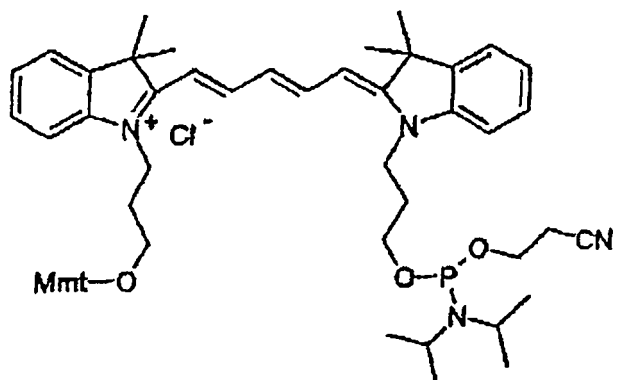
espaciador 9 fosforoamidita 8



espaciador 18 fosforoamidita 9

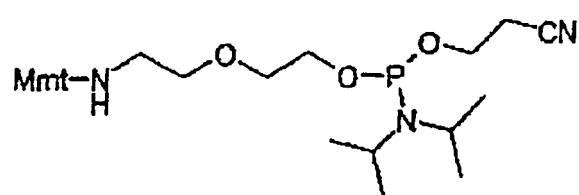


cianina 3 fosforoamidita 10

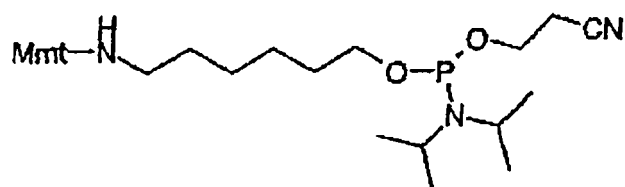


cianina 5 fosforoamidita 11

Fig. 4d:



aminomodificador 5  
fosforoamidita 12



aminomodificador 6  
fosforoamidita 13

Fig. 5a:

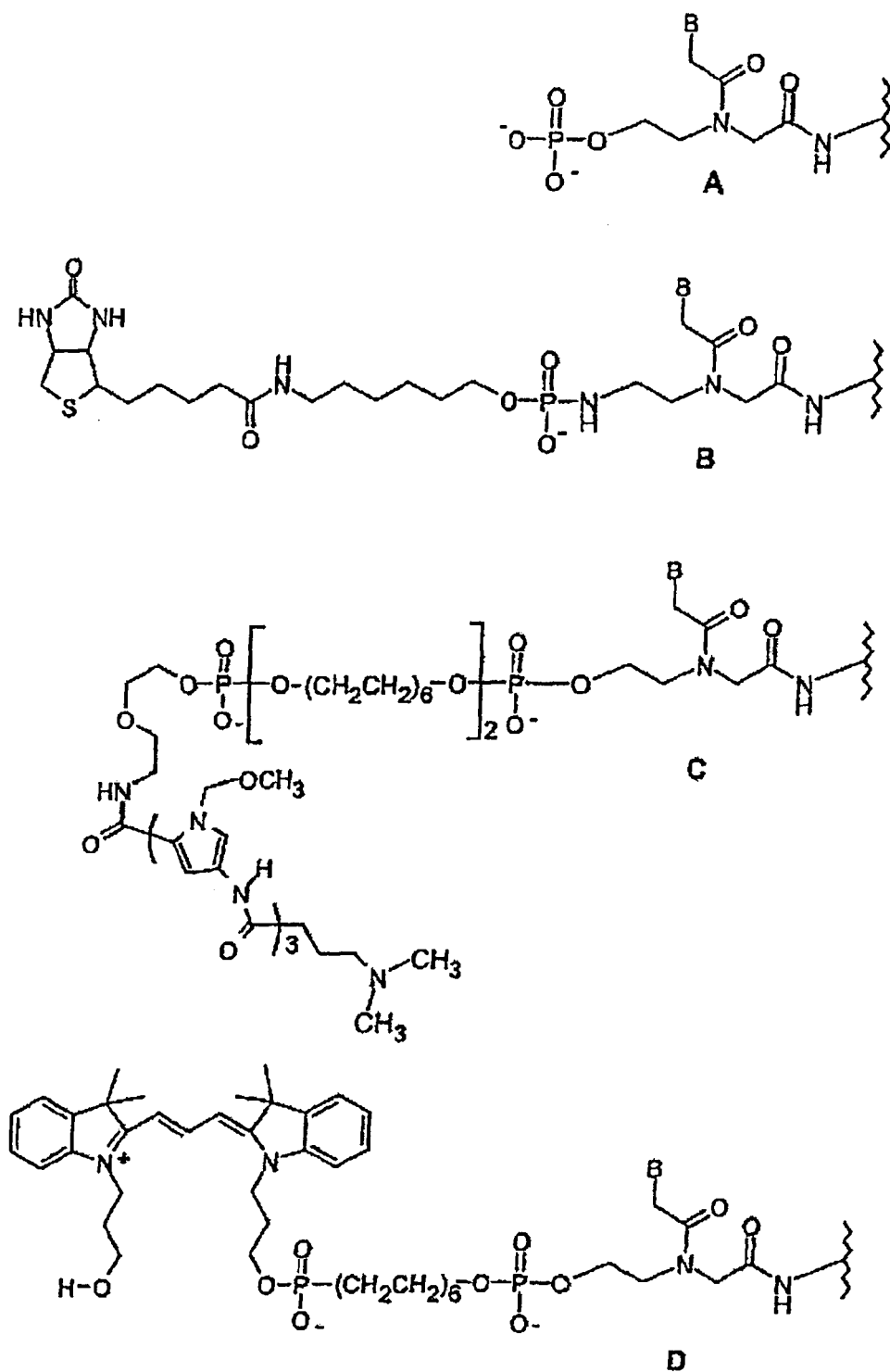


Fig. 5b:

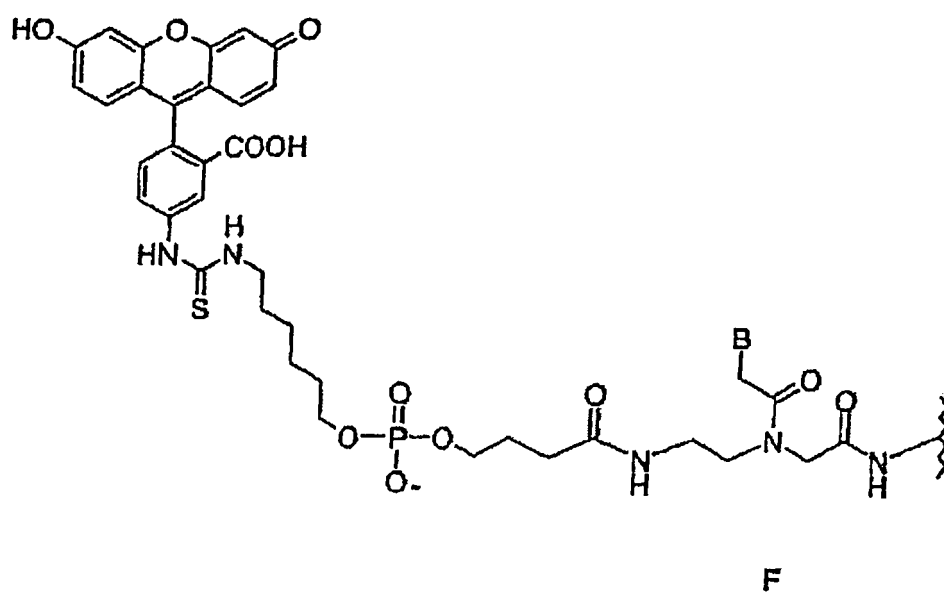
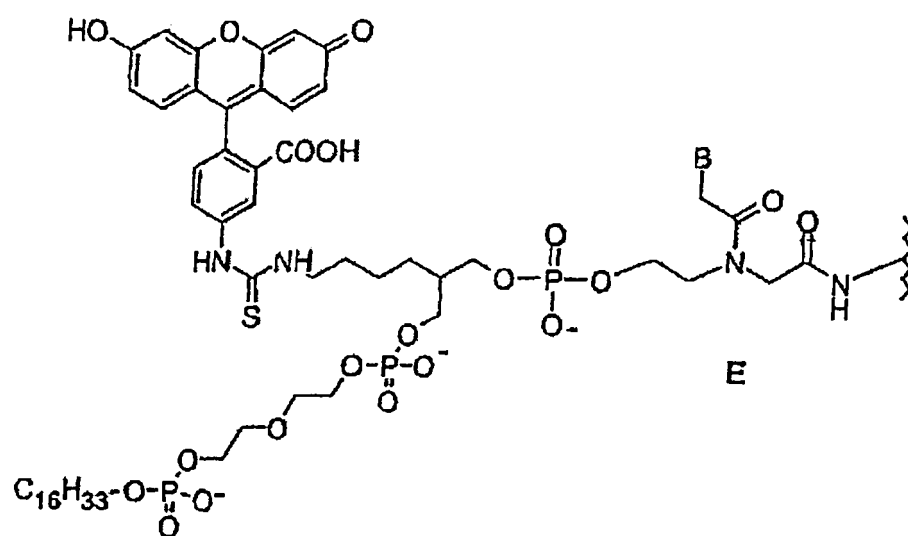


Fig. 6:

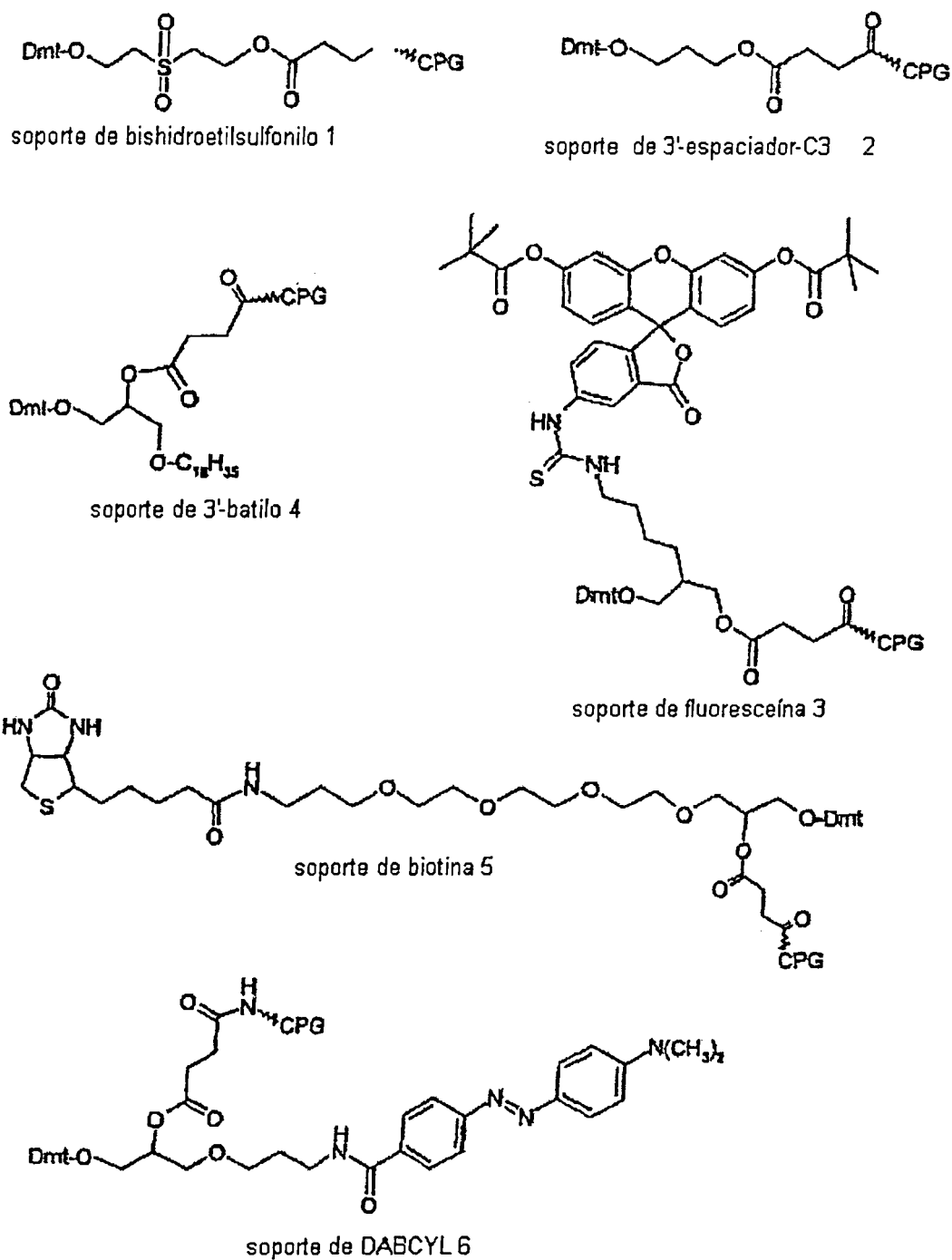


Fig. 7:

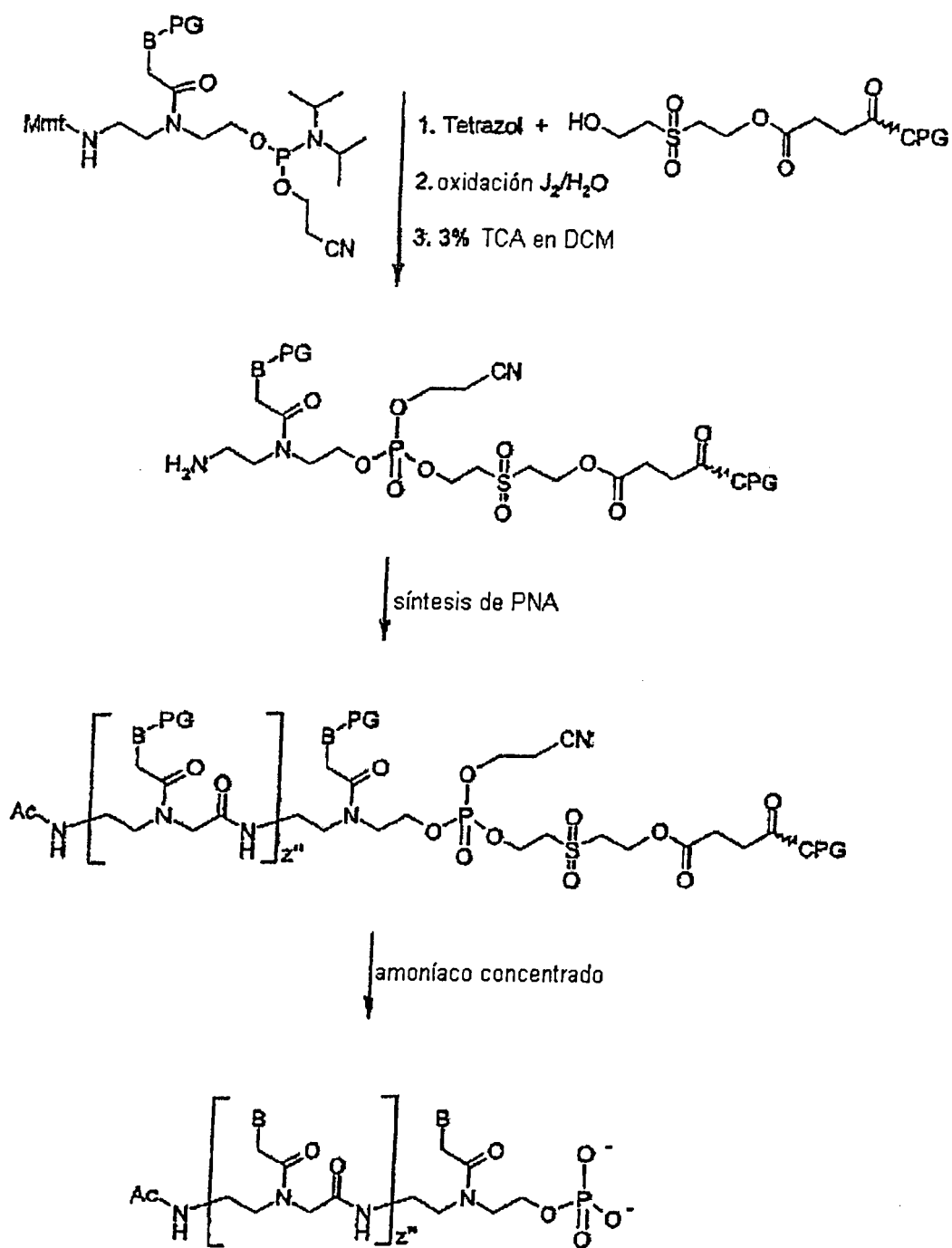




Fig. 8:

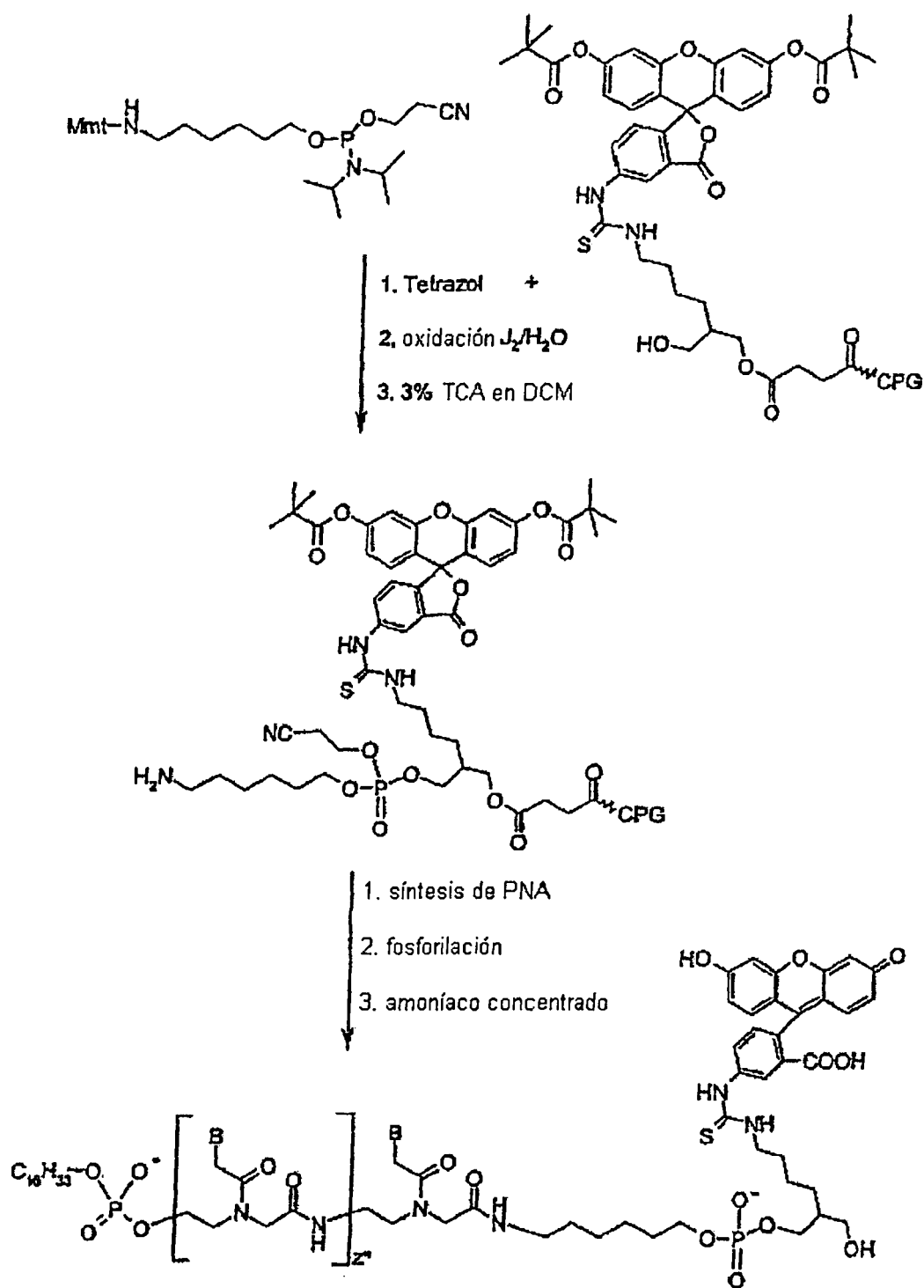
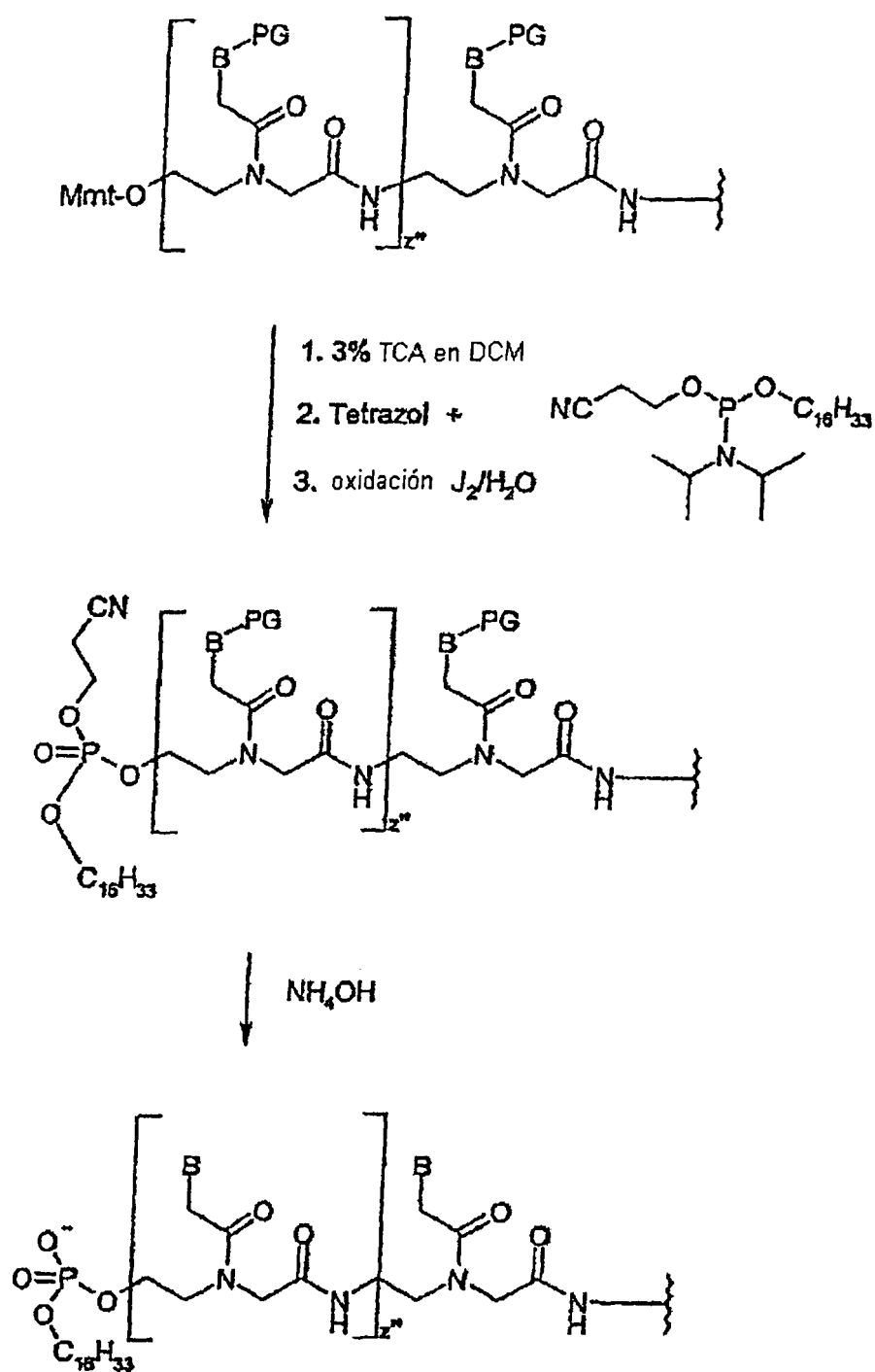


Fig. 9:



# ES 2 275 677 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH	
5	<120> Derivados de ácido poliamidonucleico, agentes y procedimientos para su preparación	
	<130> AVE D-2000/A023	
	<140>	
	<141>	
10	<150> 10019135.5	
	<151> 2000-04-18	
	<160> 53	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
15	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
25	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(21)	
	<400> 1	
30	gcgtttgctc ttcttcttgc g	21
	<210> 2	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(20)	
45	<400> 2	
	acaccaatt ctgaaatgg	20
50	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
60	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(20)	
	<400> 3	
65	aggtccctgt tcggcgcca	20
	<210> 4	

## ES 2 275 677 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
10	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(20)	
	<400> 4	
15	gcggggctcc atgggggtcg	20
	<210> 5	
	<211> 15	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
25	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(15)	
30	<400> 5	
	cagctgcaac ccagc	15
35	<210> 6	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
45	<222> (1)..(11)	
	<400> 6	
50	tattcgtca t	11
	<210> 7	
	<211> 22	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
60	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(22)	
65	<400> 7	
	ttcgtcatc gctctcagg gg	22

## ES 2 275 677 T3

	<210> 8	
	<211> 15	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
10	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(15)	
	<400> 8	
15	cgctaccatg gtccc	15
	<210> 9	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
30	<222> (1)..(21)	
	<400> 9	
	ggctgctgga gcggggcaca c	21
35	<210> 10	
	<211> 15	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
45	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(15)	
	<400> 10	
50	aacgttgagg ggcat	15
	<210> 11	
55	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
65	<222> (1).. 18.	

## ES 2 275 677 T3

	<400> 11	
	gtgccggggt ctcgggc	18
5	<210> 12	
	<211> 17	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
15	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(17)	
	<400> 12	
20	cgagaacatc atcgtgg	17
	<210> 13	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
35	<222> (1)..(21)	
	<400> 13	
	ggagaacatc atggtcgaaa g	21
40	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
50	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(22)	
	<400> 14	
55	cccgagaaca tcatggtcga ag	22
	<210> 15	
60	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	

## ES 2 275 677 T3

<222> (1)..(20)

<400> 15

5 ggggaaagcc cggcaagggg

20

<210> 16

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos

15 <220>

<221> misc\_binding

<222> (1)..(20)

20 <400> 16

cacccgcctt ggcctccac

20

25 <210> 17

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos

<220>

35 <221> misc\_binding

<222> (1)..(18)

<400> 17

40 gggactccgg cgcagcgc

18

<210> 18

<211> 20

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos

50 <220>

<221> misc\_binding

<222> (1)..(20)

55 <400> 18

ggcaaacttt ctttctcc

20

60 <210> 19

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos

<220>

## ES 2 275 677 T3

	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(19)	
	<400> 19	
5	gggaaggagg aggatgagg	19
	<210> 20	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
20	<222> (1).. 21.	
	<400> 20	
	ggcagtcatc cagcttcgga g	21
25	<210> 21	
	<211> 18	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
35	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(18)	
	<400> 21	
40	tctcccagcg tgcgcat	18
	<210> 22	
45	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
55	<222> (1)..(19)	
	<400> 22	
	gcgctgatag acatccatg	19
60	<210> 23	
	<211> 12	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	



## ES 2 275 677 T3

	<220>		
	<221> misc_binding		
	<222> (1)..(12)		
5	<400> 23		
	ggaggcccga cc		12
10	<210> 24		
	<211> 12		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos		
	<220>		
20	<221> misc_binding		
	<222> (1)..(12)		
	<400> 24		
25	ggtttcggag gc		12
	<210> 25		
	<211> 12		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos		
35	<220>		
	<221> misc_binding		
	<222> (1)..(12)		
40	<400> 25		
	tggtggaggt ag		12
45	<210> 26		
	<211> 12		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos		
	<220>		
55	<221> misc_binding		
	<222> (1)..(12)		
	<400> 26		
60	gcatggtgga gg		12
	<210> 27		
	<211> 12		
65	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		

## ES 2 275 677 T3

	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
5	<222> (1)... 12.	
	<400> 27	
	ttggcatggt gg	12
10	<210> 28	
	<211> 12	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
20	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1).. (12)	
	<400> 28	
25	gcctgggacc ac	12
	<210> 29	
30	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
40	<222> (1)..(12)	
	<400> 29	
	cagcctggga cc	12
45	<210> 30	
	<211> 12	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
55	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(12)	
	<400> 30	
60	tgcagcctgg ga	12
	<210> 31	
65	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 275 677 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
5	<221> misc_binding	
	<222> (1).. (12)	
	<400> 31	
10	gtgcagcctg gg	12
	<210> 32	
	<211> 12	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(12)	
25	<400> 32	
	ggtgcagcct gg	12
30	<210> 33	
	<211> 12	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
40	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(12)	
	<400> 33	
45	atgggtgcag cc	12
	<210> 34	
	<211> 12	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(12)	
60	<400> 34	
	ggettgaaga tg	12
65	<210> 35	
	<211> 12	
	<212> ADN	

## ES 2 275 677 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 5 <220>  
 <221> misc\_binding  
 <222> (1)..(12)  
 10 <400> 35  
  
 gcagcccccg ca 12  
  
 <210> 36  
 15 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <220>  
 <221> misc\_binding  
 25 <222> (1)..(12)  
 <400> 36  
  
 gcagcagccc cc 12  
 30  
 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 40 <220>  
 <221> misc\_binding  
 <222> (1)..(20)  
 45 <400> 37  
  
 tccgcctgt gacatgcatt 20  
  
 <210> 38  
 50 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <220>  
 <221> misc\_binding  
 60 <222> (1)..(20)  
 <400> 38  
  
 gttctcgctg gtgagttca 20  
 65  
 <210> 39  
 <211> 18

## ES 2 275 677 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
10	<222> (1)..(18)	
	<400> 39	
	gcgtgcctcc tcaactggc	18
15	<210> 40	
	<211> 18	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
25	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(18)	
	<400> 40	
30	gcagtaagca tccatatt	18
	<210> 41	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
45	<222> (1)..(20)	
	<400> 41	
	gcccgaagctg gcatccgtca	20
50	<210> 42	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
60	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(20)	
	<400> 42	
65	ccccaccac ttcccctctc	20
	<210> 43	

## ES 2 275 677 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
10	<221> misc_binding	
	<222> (1).. (20)	
	<400> 43	
15	ctccccacc acttcccctc	20
	<210> 44	
	<211> 19	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
25	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(19)	
30	<400> 44	
	gctgggagcc atagcgagg	19
35	<210> 45	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
45	<222> (1)..(21)	
	<400> 45	
50	actgctgcct cttgtctcag g	21
	<210> 46	
	<211> 22	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
60	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(22)	
65	<400> 46	
	caatcaatga cttaagagt tc	22

## ES 2 275 677 T3

	<210> 47	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
10	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1)... . (18)	
	<400> 47	
15	gcggcggaag agccatcg	18
	<210> 48	
20	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
30	<222> (1)..(18)	
	<400> 48	
	gtgtcgggggt ctccgggc	18
35	<210> 49	
	<211> 15	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
45	<220>	
	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(15)	
	<400> 49	
50	cacgttgagg ggcac	15
	<210> 50	
55	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
65	<222> (1)..(18)	

## ES 2 275 677 T3

	<400> 50	
	gtctccata gttactca	18
5	<210> 51	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
15	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(18)	
	<400> 51	
20	gatcaggcgt gcctcaaa	18
	<210> 52	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
	<221> misc_binding	
35	<222> (1)..(21)	
	<400> 52	
	gatggagggc ggcattggcgg g	21
40	<210> 53	
	<211> 11	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos	
	<220>	
50	<221> misc_binding	
	<222> (1)..(11)	
	<400> 53	
55	tattccgtca t	11
60		
65		