



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 337**

51 Int. Cl.:  
**C07D 487/04** (2006.01)  
**C07K 5/06** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C07H 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00980769 .4**  
96 Fecha de presentación : **21.11.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1232157**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.08.2002**

54 Título: **Oligómeros no agregantes y sin bloqueo de la fluorescencia que comprenden análogos de nucleótidos; métodos de síntesis y uso de los mismos.**

30 Prioridad: **23.11.1999 US 447936**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.08.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.08.2010**

73 Titular/es: **Epoch Biosciences, Inc.**  
**21720 23rd Drive SE, Suite 150**  
**Bothell, Washington 98021, US**

72 Inventor/es: **Gall, Alexander, A;**  
**Kutyavin, Igor, V.;**  
**Vermeulen, Nicolaas, M., J. y**  
**Dempcy, Robert, O.**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 344 337 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Oligómeros no agregantes y sin bloqueo de la fluorescencia que comprenden análogos de nucleótidos; métodos de síntesis y uso de los mismos.

5 **Campo técnico**

La descripción se refiere al uso de análogos de nucleótidos para proporcionar propiedades mejoradas a las sondas de hibridación, que incluye sondas de DNA y RNA y sondas de ácidos nucleicos modificados, como péptidos de ácidos nucleicos (PNA), y sondas quiméricas que contienen dos o más tipos de ácidos nucleicos y/o ácidos nucleicos modificados.

**Antecedentes**

15 El análisis de hibridación es central para una serie de técnicas en biología molecular y diagnóstico, incluyendo el clonaje de genes, identificación de genes, análisis forense, farmacogenómica e identificación de polimorfismos genéticos. Puede utilizarse la hibridación como objetivo de un ensayo, en el que la presencia de sondas hibridadas constituye la lectura para el ensayo; o la hibridación puede utilizarse como el paso inicial en un ensayo, en el que un evento posterior a la hibridación (como, por ejemplo, extensión de un cebador hibridado o hidrólisis de una sonda hibridada) se utiliza como lectura.

Tradicionalmente, las sondas de hibridación y los cebadores han sido moléculas de DNA; no obstante, existen ciertas desventajas en el uso de DNA como sonda o cebador. Por ejemplo, la composición de bases de una molécula de DNA puede afectar a su efectividad como sonda o cebador de varias maneras. Una molécula de DNA con una alta concentración de residuos G es a menudo difícil de manejar (por ejemplo, problemas con la agregación y pobre solubilidad) y puede proporcionar un gran ruido de fondo en las reacciones de hibridación. También se sabe que las moléculas de DNA ricas en G son propensas a la producción de artefactos en el análisis de las secuencias de DNA mediante electroforesis en gel, presumiblemente debido a la adopción de estructuras secundarias mediante estas moléculas, a pesar de las condiciones desnaturalizantes bajo las que se realizan dichos análisis.

30 Se han utilizado varias formas modificadas de DNA y análogos de DNA para intentar de superar algunas de las desventajas de la utilización de moléculas de DNA como sondas y cebadores. Entre estas están los péptidos de ácidos nucleicos (PNA, también conocidos como poliamidas de ácidos nucleicos). Nielsen *et al.* (1991) *Science* 254:1497-1500. Los PNA contienen unidades de bases heterocíclicas, como se encuentran en el DNA y RNA, que están unidos mediante un esqueleto de poliamida, en lugar del esqueleto característico de azúcar-fosfato del DNA y RNA. Los PNA son capaces de hibridar con secuencias diana complementarias de DNA y RNA y, de hecho, hibridan más fuertemente que la correspondiente sonda de ácido nucleico. Además, los PNA son resistentes a muchos tipos de nucleasas que atacan los esqueletos de azúcar-fosfato del DNA y RNA. Otras ventajas de los PNA incluye la capacidad de los PNA modificados específicamente para cruzar la barrera hematoencefálica y la observación que los PNA inyectados por vía intratecal pueden mediar efectos antisentido *in vivo*. Daring *et al.* (1999) *Nature Biotechnol.* 17:753-754.

La síntesis de oligómeros de PNA y monómeros reactivos utilizados en la síntesis de oligómeros de PNA se ha descrito en las Patentes Estadounidenses N° 5.539.082; 5.714.331; 5.773.571; 5.736.336 y 5.766.855. Las aproximaciones alternativas a la síntesis de PNA y, los monómeros para la síntesis de PNA se resumen en Uhlmann *et al.* (1998) *Angew. Chem. Int. Ed* 37: 2796-2823.

No obstante, como se han empezado a utilizar ampliamente, también se han visto las desventajas de los PNA. Por ejemplo, los oligómeros de PNA largos, dependiendo de su secuencia, son propensos a agregarse, difíciles de purificar y difíciles de caracterizar. Además, los oligómeros de PNA ricos en purinas tienden a agregar y son poco solubles en medio acuoso. Gangamani *et al.* (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 240:778-782; Egholm, Cambridge Healthtech Institute's Seventh Annual nucleic acid-Based Technologies, 21-23 de Junio de 1999, Washington, D.C.; Uhlmann, Cambridge Healthtech Institute's Seventh Annual nucleic acid -Based Technologies, 21-23 Junio de 1999, Washington, D.C. Como consecuencia, el uso efectivo de los PNA en la hibridación está limitado a las secuencias en las que no hay más de 4-5 purinas consecutivas, no más de 6 purinas en cualquier porción de 10 bases de la secuencia, y/o no más de 3 residuos G consecutivos. Véase, por ejemplo, <http://www.resgen.com/perseptivedesign.html>. Además, ya que las interacciones PNA-PNA son aún más fuertes que las interacciones PNA-DNA, las sondas que contienen PNA y los cebadores que contienen secuencias autocomplementarias no pueden utilizarse generalmente para la hibridación de una secuencia diana. Otra consecuencia de la fuerte interacción entre PNA y las moléculas de DNA y/o RNA complementarias es que es difícil obtener una discriminación de desemparejamiento sencillo de nucleótido utilizando sondas de PNA. Demidov *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2637-2641.

Uhlmann *et al.*, *supra* revisan las aproximaciones para aumentar la solubilidad de los PNA, que incluye la síntesis de quimeras de PNA/DNA y la adición de residuos terminales de lisina a un oligómero de PNA. No describen el uso de análogos de nucleótidos para aumentar la solubilidad y mejorar las propiedades de hibridación de los oligómeros de PNA.

Restricciones similares de diseño se requieren en la síntesis de sondas y cebadores de oligonucleótidos que no contienen PNA. Véase, por ejemplo, la publicación titulada "Diseño de Ensayo Cuantitativo y Optimización de los

Sistemas de Detección de Secuencias”, PE Biosystems, N° de reserva. 117MI02-01. En estos casos, el contenido de G/C de un oligómero debe mantenerse dentro del rango de 20-80% y debe evitarse la utilización de un nucleótido idéntico, particularmente guanina (G). En particular, la publicación mencionada advierte sobre los tramos de cuatro o más residuos G y frente a la presencia de un residuo G en el extremo 5' terminal de una sonda marcada con fluorescencia en 5'. En el caso de los cebadores, los cinco nucleótidos en el extremo 3' no pueden comprender más de dos residuos G y/o C.

Se ha descrito la síntesis de nucleósidos pirazolo[3,4-d]pirimidina y 7-deazapurina, así como sus monómeros de fosforamidita para su uso en la síntesis de oligómeros. Seela *et al.* (1985) Nucl. Acids Res. 13:911-926; Seela *et al.* (1986a) Helv Chim. Acta 69:1191-1198; Seela *et al.* (1986b) Helv. Chim. Acta 69:1813-1823; y Seela *et al.* (1987) Biochem. 26:2232-2238. Se describen los nucleósidos de pirazolo[3,4-d]pirimidina y 7-deazapurina para su uso en la secuenciación de DNA y como agentes antivirales en la PE 286 028. La publicación compartida PCT WO 99/51775 describe el uso de oligonucleótidos que contienen pirazolo[3,4-d]pirimidina para hibridación y discriminación de desemparejamiento. Se ha descrito que la incorporación de 2'-deoxi-7-deazaguanosina en el DNA elimina la compresión de bandas en los tramos ricos en GC durante el análisis de la secuencia de DNA mediante electroforesis en gel (Patente Estadounidense N° 5.844.106), disminuye la formación de tetraplex por secuencias ricas en G (Murchie *et al.* (1994) EMBO J. 13:993-1001) y reduce la formación de agregados característicos de moléculas de DNA que contienen 2'-deoxiguanosina (Patente Estadounidense N° 5.480.980). No obstante, la sustitución de oligonucleótidos con 7-deazaadenosina (en lugar de A) o 7-deazaguanosina (en lugar de G) disminuye la Tm de los híbridos formados por dichos oligonucleótidos sustituidos, con más de un grado de reducción en la Tm por base sustituida. Seela *et al.* (1987) *supra*; y Seela *et al.* (1986) Nucl. Acids Res. 14:2319-2332.

Por otro lado, se ha descrito la estabilización de los duplex mediante análogos de la base pirazolopirimidina. Seela *et al.* (1988) Helv. Chim. Acta. 71:1191-1198; Seela *et al.* (1988) Helv. Chim. Acta. 71:1813-1823; y Seela *et al.* (1989) nucleic acid Res. 17:901-910. Los oligonucleótidos en los que uno o más residuos de purina se han sustituido por pirazolo[3,4-d]pirimidinas muestran la capacidad mejorada de formación de duplex y triplex, como se describe, por ejemplo, en Belousov *et al.* (1998) nucleic acid Res. 26:1324-1328; Patente Estadounidense N° 5.594.121 y publicación PCT compartida WO 98/49180. Los residuos pirazolo[3,4-d]pirimidina en los oligonucleótidos son también útiles como sitios de unión de varios grupos colgantes a oligonucleótidos. Véase publicación compartida PCT WO 90/14353, 29 Noviembre, 1990 y Patente Estadounidense N° 5.824.796. Ninguna de estas referencias describe el uso de pirazolopirimidinas o cualquier otro tipo de análogo de base para reducir la agregación y/o aumentar la solubilidad de un oligómero, o para disminuir el bloqueo de la fluorescencia de un fluoróforo conjugado a un oligómero.

Los conjugados que comprenden un ligando de unión al surco menor (MGB), un oligonucleótido en el que uno o más residuos de purina se sustituyen por un residuo de pirazolo[3,4-d]pirimidina (PZP), un fluoróforo y un bloqueador de la fluorescencia se describen en las publicaciones compartidas PCT WO 99/51621 y WO 99/51775. Dichos conjugados se utilizan, entre otras cosas, como sondas de hibridación, cebadores y sondas hidrolizables en los ensayos de amplificación basados en 5'-nucleasa. La inclusión de un MGB en estos conjugados aumenta la estabilidad de los híbridos formados por la porción de oligonucleótido del conjugado, permitiendo el diseño de sondas más cortas. Además, ambos MGB y la PZP contribuyen a la capacidad de dichos conjugados de presentar una discriminación mejorada del desemparejamiento. Ninguna de las publicaciones mencionadas antes describe el uso de PZP o cualquier otro tipo de análogo de base para reducir la agregación y/o aumento de la solubilidad de un oligómero, o para disminuir el bloqueo de la fluorescencia de un fluoróforo conjugado a un oligómero.

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un conjugado que comprende:

- (a) un polímero que comprende una serie de unidades de monómero; y
- (b) un fluoróforo unido covalentemente a ellos,

en el que uno o más de las unidades de monómero comprende un análogo de base, en el que el análogo de base se selecciona de entre el grupo que consiste de pirazolopirimidinas, como el análogo de bases retiene la especificidad de emparejamiento de bases de las bases para las que se sustituyen, y conduce a una reducción en el bloqueo de la fluorescencia del fluoróforo y/o auto-asociación del polímero reducida.

Se proporcionan los oligómeros en los que al menos una de las subunidades comprende un análogo de base pirazolopirimidina. Los oligómeros pueden comprender DNA, RNA, PNA, o cualquier combinación o quimera de los mismos. Cualquier número de residuos de purina en el oligómero puede sustituirse mediante un análogo de base. Cualquiera de estos oligómeros anteriormente mencionados puede comprender porciones adicionales como fluoróforos, bloqueadores de fluorescencia y/o ligandos de unión al surco menor.

Los oligómeros en los que al menos una de las subunidades comprende un análogo de base de pirazolopirimidina, cuando se utiliza para hibridación, tienen menos tendencia a la agregación y autoasociación, son más solubles, tienen capacidad aumentada de discriminación del desemparejamiento, y no bloquean la emisión de marcajes fluorescentes conjugados.

## ES 2 344 337 T3

También se proporcionan los oligómeros que comprenden uno o más residuos de PNA en los que al menos uno de los residuos de PNA comprende un análogo de base pirazolopirimidina. Los oligómeros pueden comprender exclusivamente residuos de PNA, o los oligómeros pueden comprender ambos residuos de nucleótido de PNA y/o DNA y/o RNA para constituir una quimera de PNA/DNA, PNA/RNA o PNA/DNA/RNA. Cualquier número de residuos de purina en el oligómero puede sustituirse mediante un análogo de base. Cualquiera de los oligómeros anteriormente mencionados puede comprender porciones adicionales como fluoróforos, bloqueadores de fluorescencia y/o ligandos de unión al surco menor.

Se proporcionan las composiciones que comprenden un polímero y un fluoróforo, en los que uno o más residuos que contienen purina del polímero están sustituidos con un residuo que comprende un análogo de base de pirazolopirimidina. Los polímeros pueden comprender PNA, DNA, RNA o cualquier combinación o quimera de los mismos; y el análogo de base puede estar presente en cualquiera de las porciones de PNA, DNA o RNA de polímero quimérico. Cualquier número de residuos de purina en el polímero puede sustituirse mediante un análogo de base, en cualquiera de las porciones de PNA, DNA y/o RNA. Las composiciones anteriormente mencionadas pueden comprender opcionalmente un bloqueador de la fluorescencia y/o ligandos de unión al surco menor.

En las composiciones polímero-fluoróforo recién descritas, el bloqueo del fluoróforo mediante residuos de purina en el polímero se reduce cuando una o más purinas se sustituye con un análogo de base. Dichas composiciones que comprenden de forma adicional un bloqueador de la fluorescencia son útiles, por ejemplo, como sondas en ensayos de sonda hidrolizable, en los que el bloqueo del fluoróforo por el bloqueador de la fluorescencia se reduce mediante la hidrólisis dependiente de la hibridación de la sonda. La reducción en el bloqueo proporcionada por la sustitución de un análogo de base para una purina conduce a una mayor emisión de fluorescencia tras la hidrólisis y, por lo tanto, una mayor sensibilidad en dichos ensayos.

También se describen los nuevos intermediarios para la síntesis de oligómeros que contienen PNA que comprenden análogos de bases. En una realización, se proporcionan los derivados del ácido acético de análogos de bases de pirazolopirimidina y pirrolopirimidina, en el que el N1 de la pirazolopirimidina o pirrolopirimidina está unido al C2 de una porción de ácido acético y los grupos funcionales están bloqueados. Estos derivados son útiles para la preparación de monómeros para la síntesis automatizada de PNA sustituidas y quimeras de PNA/DNA. Las realizaciones preferibles de estos intermediarios incluyen ácido 2-{6-[(1E)-1-aza-2-(dimetilamino)vinil]-4-hidroxipirazolo[5,4-d]pirimidinil}acético; ácido 2-(6-amino-4-hidroxipirazolo[5,4-d]pirimidinil)acético; y ácido 2-(-4-aminopirazolo[5,4-d]pirimidinil)acético.

También se describen derivados de aminoetilglicil de los anteriormente mencionados derivados de ácido acético de análogos de bases de pirazolopirimidina y pirrolopirimidina, en el que el grupo  $\alpha$ -amino de una porción glicilo bloqueada se deriva al C1 del ácido acético del acetato y al C2 de una porción de etilamina. Estos derivados también son conocidos como "monómeros de PNA". Dichos compuestos son útiles para la síntesis automatizada de los oligómeros y polímeros anteriormente mencionados. Las realizaciones preferibles de monómeros de PNA que contienen PPG (también conocido como PPPG) incluye ácido 5-[4-hidroxi-6-(2-metilpropanoilo)amino]pirazolo[5,4-d]pirimidinil-3-(2-[[4-metoxifenil]difenilmetil]amino)etil)-4-oxopentanoico y 1-{6-[(1E)-aza-2-(dimetilamino)vinil]-4-hidroxipirazolo[5,4-d]pirimidinil}-N-(2-[[4-metoxifenil]difenilmetil]amino)etil)-N-(2-oxipropil)acetamida. Una realización preferible de un monómero de PNA que contiene PPA es el ácido 2-[N-(2-[[4-metoxifenil]difenilmetil]amino)etil)-2-{4-[(4-metoxifenil)carbonilamino]pirazolo[5,4-d]pirimidinil}acetil-amino]acético.

También se describen los métodos para la síntesis de oligómeros que comprenden PNA, DNA, RNA y/o quimeras de los mismos, en los que los anteriormente mencionados monómeros de PNA se utilizan en uno o más pasos en la síntesis. Los oligómeros sintetizados por estos métodos también se proporcionan.

En otra realización, se proporcionan los métodos para detectar una secuencia diana en un polinucleótido mediante hibridación a una sonda que comprende un oligómero de DNA, PNA, o PNA/DNA, en el que uno o más residuos en la sonda comprende un análogo de base de pirazolopirimidina. En la práctica de estos métodos, la sonda puede comprender adicionalmente uno o más de un ribonucleósido, un fluoróforo, un bloqueador de la fluorescencia y/o un ligando de unión al surco menor.

En otra realización, se proporcionan los métodos para la detección de una secuencia diana en un polinucleótido que utiliza composiciones que comprenden una porción polimérica (que comprende un polímero) y una porción fluorogénica (que comprende uno o más fluoróforos), en el que uno o más residuos que contienen purina del polímero están sustituidos por un residuo que comprende un análogo de base de pirazolopirimidina. Los polímeros para utilizar en el método pueden comprender PNA, DNA, RNA o quimeras de los mismos; y el análogo de base puede estar presente en cualquiera de las porciones de PNA, DNA o RNA de un polímero quimérico. Cualquier número de residuos de purina en el polímero puede sustituirse mediante un análogo de base. En una realización preferible, el método se practica utilizando una composición en la que un residuo de purina en la porción polimérica que está directamente adyacente a la porción fluorogénica se sustituye con una pirazolopirimidina. En otra realización preferible, los oligómeros que contienen tres o más residuos de G consecutivos tienen sus residuos G consecutivos sustituidos por PPG. Las composiciones para utilizar en este método pueden comprender opcionalmente un bloqueador de la fluorescencia y/o un ligando de unión al surco menor.

En realizaciones adicionales, se proporcionan los métodos para detectar una secuencia diana en una reacción de amplificación, utilizando las composiciones de la invención. En una realización preferible, la reacción de amplificación comprende un ensayo de sonda hidrolizable.

5 También se proporcionan microchips de oligómeros en los que al menos uno de los oligómeros descritos aquí está presente en el chip.

También se proporcionan los métodos para detectar una secuencia diana en un polinucleótido, en el que el polinucleótido está presente en una muestra, mediante hibridación a una composición como se ha descrito aquí. En una  
10 realización preferible, la secuencia diana presenta un desparejamiento de nucleótido único respecto a la secuencia relacionada que también está presente en la muestra, y la composición forma un híbrido con la secuencia diana pero no con la secuencia relacionada.

### Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 muestra el análisis de la fluorescencia a tiempo real de una serie de ensayos de sonda hidrolizable en los que se utilizan las sondas que contienen G entre 2 y 9 nucleótidos (Id. de Sec N° 1-8) como sondas fluorescentes y se compara con sondas en las que los residuos G se sustituyen por PPG (Id. de Sec N° 9-16).

### 20 Descripción detallada

La práctica de la invención empleará, a no ser que se indique de otra manera, técnicas convencionales en química orgánica, bioquímica, síntesis y modificación de oligonucleótidos, química de bioconjugados, hibridación de ácidos nucleicos, biología molecular, microbiología, genética, DNA recombinante, y campos relacionados a los expertos  
25 en la materia. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch & Sambrook, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982); Sambrook, Fritsch & Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel, *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales); Gait (ed.), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESSES: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1984); Eckstein (ed.), OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL  
30 APPROACH, IRL Press (1991).

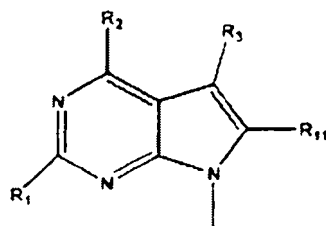
Las descripciones de todas las publicaciones y patentes citadas aquí se incorporan en su totalidad por referencia.

### 35 Definiciones

Los términos deazapurina y pirrolopirimidina se utilizan intercambiably para indicar un núcleo heterocíclico que comprende anillos pirimidina y pirrol fusionados, de acuerdo con la siguiente fórmula general:

40

45

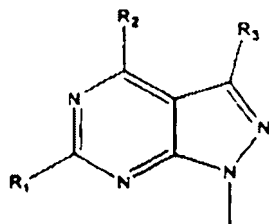


50

El término pirazolopirimidina se refiere a un núcleo heterocíclico que comprende anillos pirimidina y pirazol fusionados, de acuerdo con la siguiente fórmula general:

55

60



65

Un "monómero" se refiere a una composición que comprende una base o un análogo de base unido de forma covalente a una porción reactiva, de forma que el monómero pueda incorporarse, mediante la porción reactiva, como parte de un oligómero o polímero. En ciertos casos, los grupos funcionales en la porción base/análogo de base y/o en

la porción reactiva se bloquean para que no sean reactivas durante la polimerización. En realizaciones preferibles, la porción reactiva es una porción aminoetilglicina, en cuyo caso el monómero puede describirse como “monómero de PNA”.

5 Un “oligómero” es un polímero que comprende unidades de monómero unidas. Los oligómeros pueden sintetizarse mediante unión secuencial de los monómeros, mediante sus porciones reactivas, como se conoce en la técnica. Un oligómero puede comprender un oligómero de DNA, un oligómero de RNA, un oligómero de PNA, o cualquier oligómero quimérico compuesto de monómeros de DNA, RNA, y/o PNA.

10 Un “grupo bloqueador” o “grupo protector” es cualquier porción química capaz de prevenir la reactividad de un átomo de N, S o O al que está unido, bajo condiciones en las que dichos átomos de N, S o O pueden de otra manera ser reactivos. Ejemplos de grupos protectores incluye, pero no se limita a grupos terc-butiloxycarbonilo (tBoc), 4-metoxifenildifenilmetilo (MMTr), isobutirilo (iBu), 9-fluoronilmetiloxycarbonilo (Fmoc), -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (bencilo), difenilcarbamoilo (DPC), 2-N-dimetilvinilo (Dmv), bencilooxicarbonilo (Cbz), benzoilo (bz), isobutanoilo, acetilo, y anisoilo (An). Estos y otros grupos protectores útiles en la síntesis de ácidos nucleicos y oligómeros de PNA son conocidos en la materia. Uhlmann *et al.* (1998) *Angew. Chem. Int. Ed* 37:2796-2823; Green, *et al.* en *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª Edición, John Wiley y Sons, Inc, NY., pp. 441-452. 1991.

### Oligómeros

20 La invención proporciona oligómeros en los que uno o más bases de purina están sustituidos con un análogo de base la misma especificidad de emparejamiento de base que la purina a la que sustituye. Los análogos pueden ser pirazolopirimidinas o pirrolopirimidinas. Los oligómeros pueden comprender oligonucleótidos de DNA, oligonucleótidos de RNA, oligómeros de PNA, o quimeras de los mismos. Una quimera se refiere a un oligómero que comprende más de un tipo de subunidad, por ejemplo, una quimera de RNA/DNA, una quimera de PNA/DNA, una quimera de RNA/PNA o una quimera de PNA/DNA/RNA. Para los oligómeros quiméricos, un análogo de base puede estar presente en cualquier porción de la quimera (es decir, en una porción del DNA, en una porción del RNA y/o a una porción del PNA).

25 Los métodos para la síntesis de oligómeros de DNA, RNA y PNA son conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense N° 5.419.966; Gait, *supra*; Eckstein (ed.) “Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach”, 1991, IRL Press, Oxford; Ogilve *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5746-5748; Nielsen *et al.* (1991) *supra*; Uhlmann *et al.* (1998) *supra*; Patentes Estadounidenses N° 5.539.082; 5.714.331; 5.773.571; 5.736.336 y 5.766.855. Otros oligómeros modificados de DNA y/o RNA también pueden utilizarse. Por ejemplo, se han descrito los métodos para la síntesis de oligoribonucleótidos 2'-O-metilo. Sproat *et al.* (1989) *Nucleic acid Res.* 17:3373-3386.

30 En general, los métodos para la síntesis de oligómeros comprende ciclos secuenciales de adición de monómeros a una cadena creciente de oligómeros que está opcionalmente unida a un soporte sólido, en el que la cadena creciente de oligómero contiene opcionalmente grupos funcionales protegidos y un extremo creciente bloqueado. Normalmente, en cada ciclo de adición de monómero, la cadena creciente unida al soporte se somete primero a condiciones que desbloquean el extremo creciente, se condensa después con un monómero, el cual está opcionalmente activado por condensación. Las condiciones y reactivos de desbloqueo, así como las condiciones y reactivos activadores, son conocidas en la técnica. El paso de adición de monómeros se repite tan a menudo como sea necesario, con la identidad del monómero añadido a cada paso que corresponde con la secuencia deseada del oligómero. Cuando la secuencia deseada se ha obtenido, el oligómero naciente se somete a condiciones que desprotegen los grupos funcionales y/o escinden el oligómero completo del soporte, después se purifica, si es necesario.

35 Los oligómeros de PNA se utilizan a menudo como sustitutos de oligonucleótidos de DNA en técnicas de hibridación y otras. No obstante, los oligómeros de PNA tienden a la agregación y a menudo presentan una solubilidad reducida en solventes acuosos, especialmente PNA ricos en G. En una realización preferible, un oligómero de PNA comprende uno o más residuos en los que una base de purina se sustituye mediante un análogo de base de pirazolopirimidina o pirrolopirimidina; por ejemplo, G se sustituye por PPG o 7-deazaguanina, A se sustituye por PPA o 7-deazaadenina, y G o A se sustituye por PPI o 7-deazahipoxantina. De esta manera el análogo de base retiene la especificidad de emparejamiento de base de la base para la que se sustituye. En una realización más preferible, se proporciona un oligómero de PNA con uno o más residuos G sustituidos por PPG. Dichos PNA sustituidos por PPG presentan autoasociación intermolecular e intramolecular reducida si se compara con los oligómeros que contienen G. Esto facilita la purificación y el manejo de oligómeros y proporciona propiedades de hibridación mejoradas (por ejemplo, aumento de la sensibilidad), especialmente para las secuencias de sonda que contienen tres o más residuos G consecutivos.

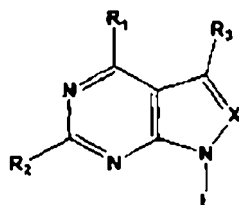
40 Ya que un análogo de base retiene la especificidad de emparejamiento de base de la base a la que sustituye, los oligómeros de la invención son capaces de una unión específica de secuencia a secuencias complementarias y puede presentar un aumento en la formación de duplex y triplex a dianas de cadena sencilla y dobles, respectivamente.

45 Sin pretender adherirse a ninguna teoría, los solicitantes remarcan que, cuando se compara con bases de purina que aparecen de forma natural, los análogos de bases pirazolopirimidina y pirrolopirimidina tienen menos probabilidad de formar pares de base no canónicas (como los emparejamientos G-T y G-G), reteniendo aún la capacidad de formar los emparejamientos canónicos característicos de las purinas a las que sustituyen (es decir, emparejamientos PPG-C, 7PG-C, PPA-T y 7PA-T).

## ES 2 344 337 T3

### Análogos de bases y su síntesis

Se proporcionan los análogos de bases en los oligómeros y en los intermediarios para la síntesis de oligómero. El análogo de base posee una estructura como la indicada en la Fórmula 1, en el que R1 y R2 son independientemente -H, -OH, -SH, o -NH2; R3 es -H, -CN, halógeno (F, Cl, Br o I), o -R12-Y, en el que R11 es C1-C12 alquilo, alqueno o alquinilo y Y es -H, -OH, -NH2 o -SH; X es =CH- o =N-; y L es el enlace a un esqueleto de oligómero, como DNA, RNA, PNA o cualquier quimera de los mismos.



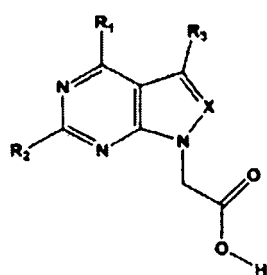
Fórmula 1

Cuando X es =N-, el análogo de base es pirazolopirimidina y cuando X es =CH-, el análogo de base es pirrolopirimidina (también conocido como 7-deazapurina). Por ejemplo, cuando X es =N-, R1 es -OH, R2 es -NH2, y R3 es -H, el análogo de base es pirazolopirimidinilguanina (PPG). Cuando X es =N-, R1 es -NH2, y R2 y R3 son -H, el análogo de base es pirazolopirimidiniladenina (PPA). Cuando X es =N-, R1 es -OH, y R2 y R3 son -H, el análogo de base es pirazolopirimidinilhipoxantina (PPI).

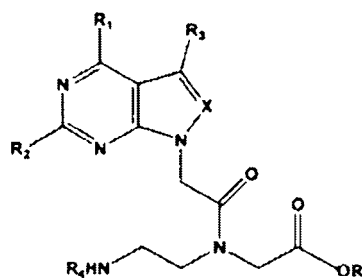
Cuando X es =C-, R1 es -OH, R2 es -NH2, y R3 es -H, el análogo de base es 7-deazaguanina (7PG). Cuando X es =C-, R1 es -NH2, y R2 y R3 son -H, el análogo de base es 7-deazaadenina (7PA). Cuando X es =C-, R1 es -OH, y R2 y R3 son -H, el análogo de base es 7-deazahipoxantina (7PI).

PPG y 7-deazaguanina poseen las mismas propiedades de emparejamiento de bases que la guanina (es decir, se empareja con C), mientras que PPA y 7-deazaadenina poseen las mismas propiedades de emparejamiento de bases que la adenina (es decir, se empareja con T y U). PPI y 7-deazahipoxantina poseen las propiedades de emparejamiento de bases equivalentes a ambos G y A y por lo tanto se empareja con C, T y U.

Los análogos de bases que comprenden los oligonucleótidos se sintetizan mediante métodos automatizados que son bien conocidos en la técnica, que utilizan precursores ("monómeros de PNA") de acuerdo con la Fórmula 3. Los monómeros se producen utilizando intermediarios que poseen la estructura representada en la Fórmula 2.



Fórmula 2



Fórmula 3

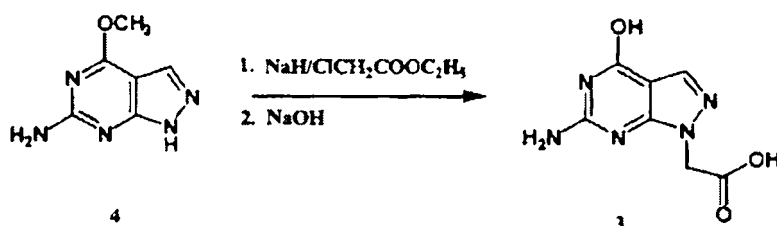
Los grupos funcionales permitidos en las Fórmulas 1 y 2 son los siguientes. R1 y R2 son independientemente -H, -OH, -OR6, -SH, -NH2 o -NHR7; R3 es -H, -CN, halógeno (F, Cl, Br o I), o -R12-Y, en el que R12 es alquilo C1-C12, alqueno o alquinilo y Y es -H, -OH, -NH2 o -SH, R4 es -H o un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en el grupo terc-butiloxicarbonilo (tBoc), 4-metoxifenildifenilmetilo (MMTr), isobutirilo (iBu) y 9-fluoronilmetiloxicarbonilo (Fmoc); R5 es -H o -C6F4H (TFP); R6 es -H, -C6H5 (bencilo) o un grupo difenilcarbamoilo (DPC); R7 es un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en 2-N-dimetilvinilo (Dmv), bencilo oxicarbonilo (Cbz), monometoxitritilo (MMTr), benzoilo (bz), isobutirilo (iBu), isobutanoilo, acetilo, y grupos anisoilo (An); y X es =CH- o =N-.

Estas fórmulas incluyen todos los isómeros y tautómeros de las moléculas que simbolizan. Las realizaciones preferibles de los precursores para la síntesis de PNA y los intermediarios utilizados en la síntesis de estos precursores son los siguientes. Cuando R1 es -OH, R2 es -NH2, R3 es -H y X es =N- en la Fórmula 2, la estructura resultante es ácido 2-(6-amino-4-hidroxipirazolo[5,4-d]pirimidinil)acético (PPGA). Cuando R1 es -NH2, R2 es -H, R3 es -H y X es =N- en la Fórmula 2, la estructura resultante es ácido 2-(4-aminopirazolo[5,4-d]pirimidinil)acético (PPAA). Los correspondientes derivados de Fórmula 3, en los que R4 y R5 son -H, se abrevian MPPGA y MPPAA, respectivamente. Los derivados de bloqueo de estos compuestos también se proporcionan, como se describe más adelante.

La denominación "pirazolo[5,4-d]pirimidina" tal como se utiliza aquí, se refiere a las mismas estructuras que las denominadas pirazolo[3,4-d]pirimidinas en anteriores publicaciones compartidas, patentes y solicitudes de patente. Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense N° 5.824.796; PCT WO 99/51621 y PCT WO 99/51775. La razón para este cambio en la nomenclatura es para que los nombres por los que se identifica las estructuras cumplan con los asignados a las estructuras mediante los programas de nomenclatura NamExpert y Nomenclator, proporcionados por ChemInnovation Software, San Diego, CA.

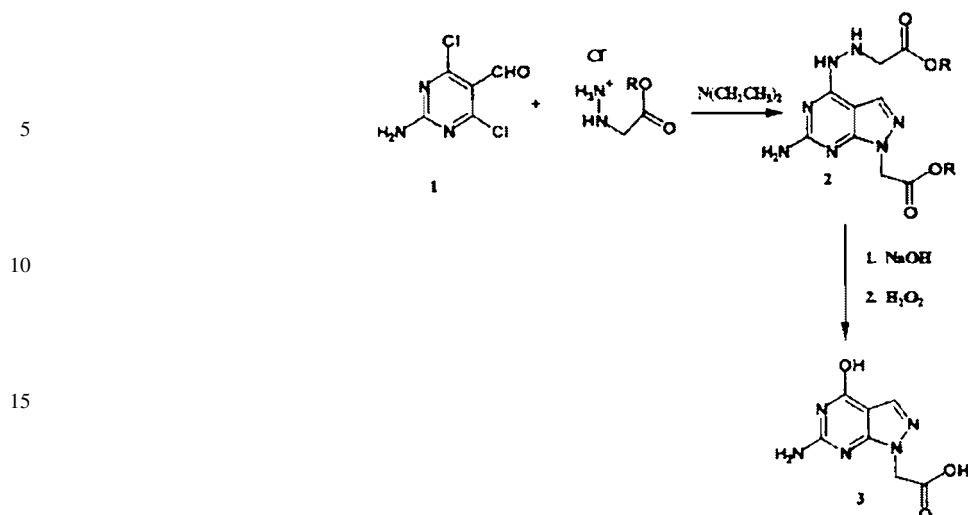
La síntesis de bases de pirazolopirimidina y pirrolopirimidina se logra mediante los métodos conocidos en la técnica. Seela *et al.* (1985) *supra*; Seela *et al.* (1986a), *supra*; Seela *et al.* (1986b), *supra*; y Seela *et al.* (1987) *supra*. Utilizando las reacciones descritas por Uhlmann *et al.* (1998) *supra* para la síntesis de derivados de ácido purina acético 2-sustituida, 4-aminopirazolo[5,4-d]pirimidina apropiadamente protegida (PPA) y 6-amino-4-hidroxipirazolo[5,4-d]pirimidina (PPG) pueden reaccionar con 2-bromoacetato de alquilo para proporcionar productos de Fórmula 2. Ya que la alquilación puede ocurrir en ambos átomos 1 y 2 de nitrógeno de pirazolopirimidinas, es necesaria la separación de isómeros y la purificación del isómero 1-sustituido. En el caso de las 7-deazapurinas y las pirrolopirimidinas relacionadas, la reacción con 2-bromoacetato de alquilo proporciona solo el producto N1-sustituido.

De acuerdo con esto, la PPGA (3) puede sintetizarse a partir de 4-metoxipirazolo [5,4-d]pirimidina-6-ilamina (4) (Seela *et al.* (1985) Heterocycles 23:2521-2524) mediante alquilación con 2-cloroacetato de etilo en presencia de hidruro sódico, seguido de la separación de los isómeros (Esquema de reacción 1).



Esquema de reacción 1

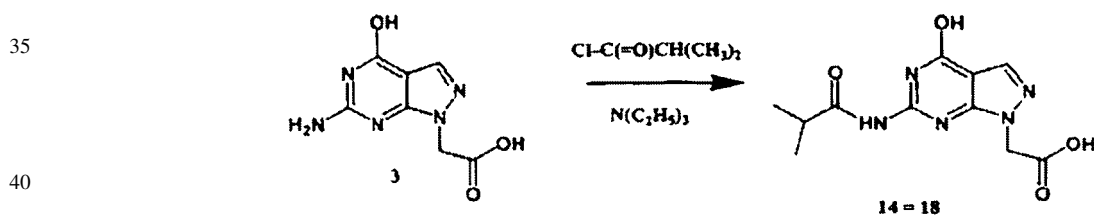
Otra aproximación a la síntesis de PPGA se muestra en el Esquema de reacción 2. En este caso, 2-amino-4,6-dicloropirimidina-5-carboxialdehído (1) reacciona con acetato de etilo 2-(hidrazinol)acético para proporcionar 2-(6-amino-4-{2-[(etoxicarbonil)metil]hidrazino}pirazolo [5,4-d]pirimidinil)acetato de etilo (2). Tratamiento de (2) con hidróxido sódico seguido de peróxido de hidrógeno proporciona al producto PPGA deseado (3). Una ventaja de este procedimiento sintético es que proporciona sólo el isómero N1-sustituido. Véase Ejemplo 1, *infra*.



Esquema de reacción 2

25 Para el uso en la síntesis química automatizada de los oligómeros, los grupos reactivos en los análogos de bases, como los grupos amino, deben protegerse. En una realización, los derivados de PPGA bloqueados se sintetizan como se describe en el Esquema de reacción 3. La PPGA (3) reacciona con cloruro de isobutanoilo en dimetilformamida y trietilamina para generar un derivado de PPGA con un grupo amino bloqueado con isobutirilo (14). Véase Ejemplo 2, *infra*.

30



Esquema de reacción 3

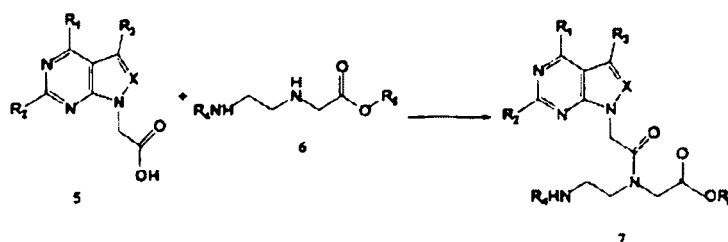
45 Los métodos para la síntesis de derivados aminoetilglicilo de PPGA, PPAA, ácido 2-(2-amino-4-hidroxipirroló [2,3-d]pirimidin-7-il)acético (7PGA) y ácido 2-(4-aminopirroló[2,3-d]pirimidin-7-il)acético (7PAA), para su uso como monómeros en la síntesis automatizada de oligómeros, son conocidos en la técnica. Uhlmann *et al.*, *supra*. Estos métodos implican la condensación de aminoetilglicina apropiadamente protegida, por ejemplo, 2-[(2-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amino)etil]amino]acetato de metilo (MMTrAeg, Will *et al.* (1995) Tetrahedron 51:12069-12082) con cualquiera de PPGA, PPAA, 7PGA o 7PAA (también protegidos, si es necesario) en presencia de un reactivo de condensación como hexafluorofosfato de (O-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), o tetrafluoroborato de O-[(ciano(tetoxicarbonil)metileno)amino]-1,1,3,3-tetrametiluronio (TOTU), como se muestra en el Esquema de reacción 4. El R<sub>5</sub> grupo protector se elige de forma que pueda eliminarse de forma selectiva, (es decir, sin eliminar otros grupos de bloqueo) para proporcionar el compuesto 7 en el que R<sub>5</sub> es -H y, por ejemplo, R<sub>1</sub> es -NHCbz, R<sub>2</sub>, y R<sub>3</sub> son -H y R<sub>4</sub> es -MMTr. Este derivado protegido de MPPAA se utiliza en la síntesis de un oligómero de PNA o una quimera de PNA/DNA.

50

55

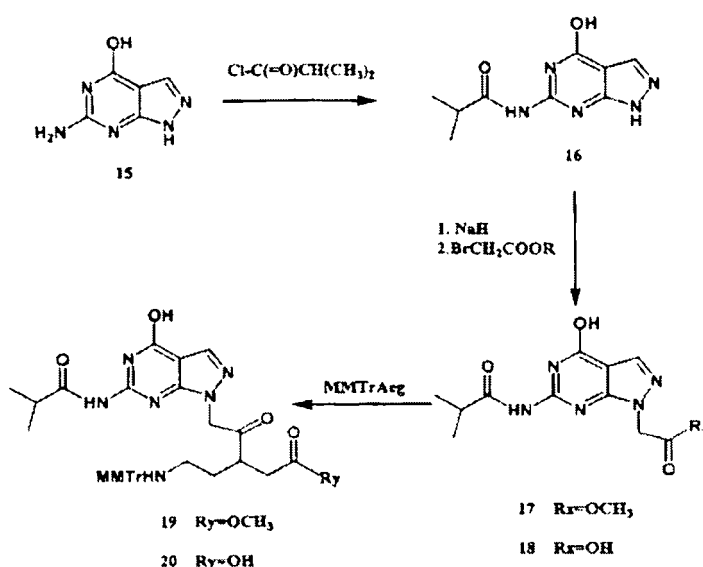
60

65



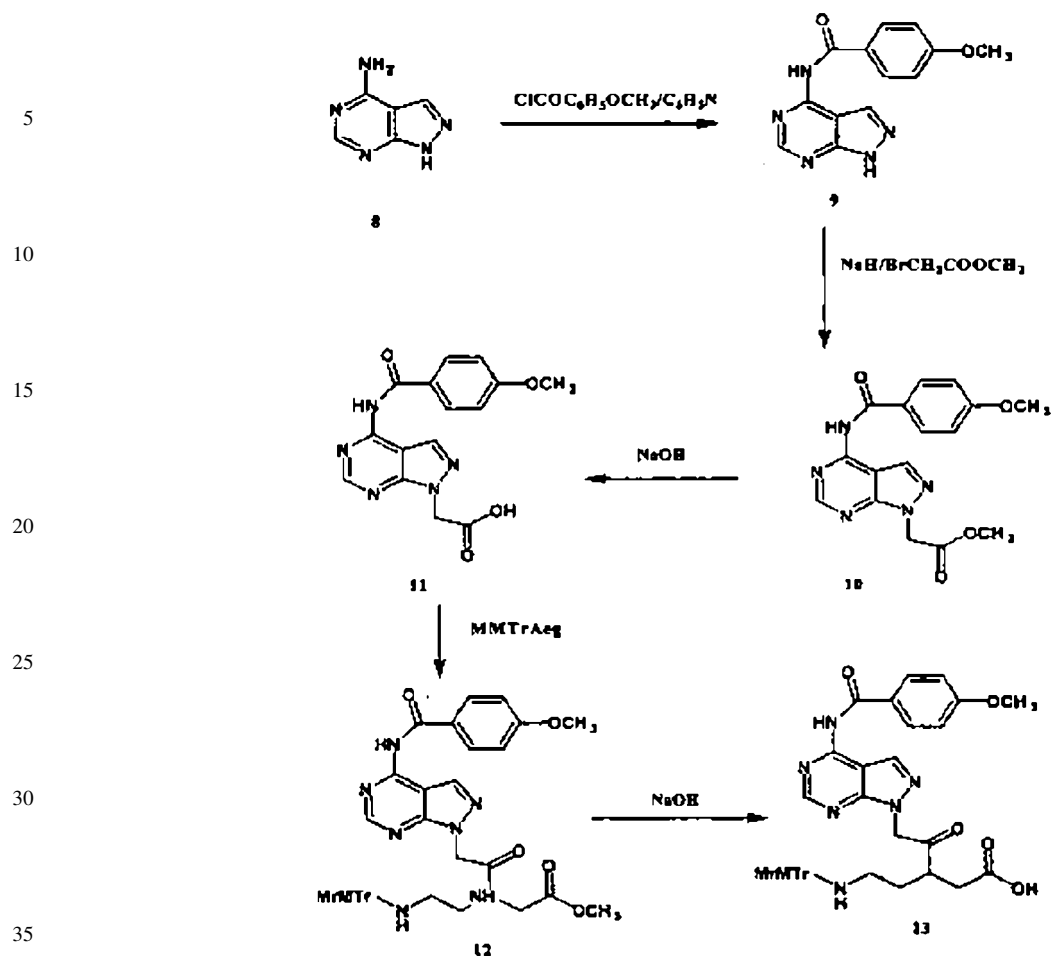
Esquema de reacción 4

15 Ejemplos de síntesis de un monómero de PPG bloqueado para la síntesis de PNA se logra de acuerdo con el Esquema de reacción 5. La PPG (15) reacciona con cloruro de isobutanoilo para generar una PPG bloqueada con amino (16), que se trata con hidruro sódico y después reacciona con bromoacetato de alquilo para generar, por ejemplo, un derivado de acetato de metilo (17). La hidrólisis alcalina de éster de metilo 17 proporciona el derivado de ácido acético 18. Otra reacción de 18 con 2-[(2-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amino)etil]amino]acetato de metilo (MMTrAeg) genera un éster de alquilo (en este ejemplo, el éster de metilo) de un derivado aminoetilglicilo bloqueado con MMTr (19), que, tras la hidrólisis alcalina del éster, proporciona el derivado de aminoetilglicina protegido por MMTr (20). Véase Ejemplo 3, *infra*.



Esquema de reacción 5

50 Un ejemplo de método para la síntesis de un monómero de PNA que comprende el análogo de base PPA se muestra en el Esquema de reacción 6. 4-aminopirazolo[5,4-d]pirimidina (PPA, Compuesto 8) reacciona con cloruro de 4-metoxibenzoilo en piridina para proporcionar el derivado PPA protegido por amino (9). Éste reacciona con hidruro sódico seguido del éster de 2-bromoacetato de metilo, y se aísla el derivado metilacetato N1-sustituido (10). El tratamiento de 10 con hidróxido sódico convierte el éster de metilo en el derivado de acetato protegido por N-Bz de PPAA (Compuesto 11). Véase Ejemplo 4 para más detalles.

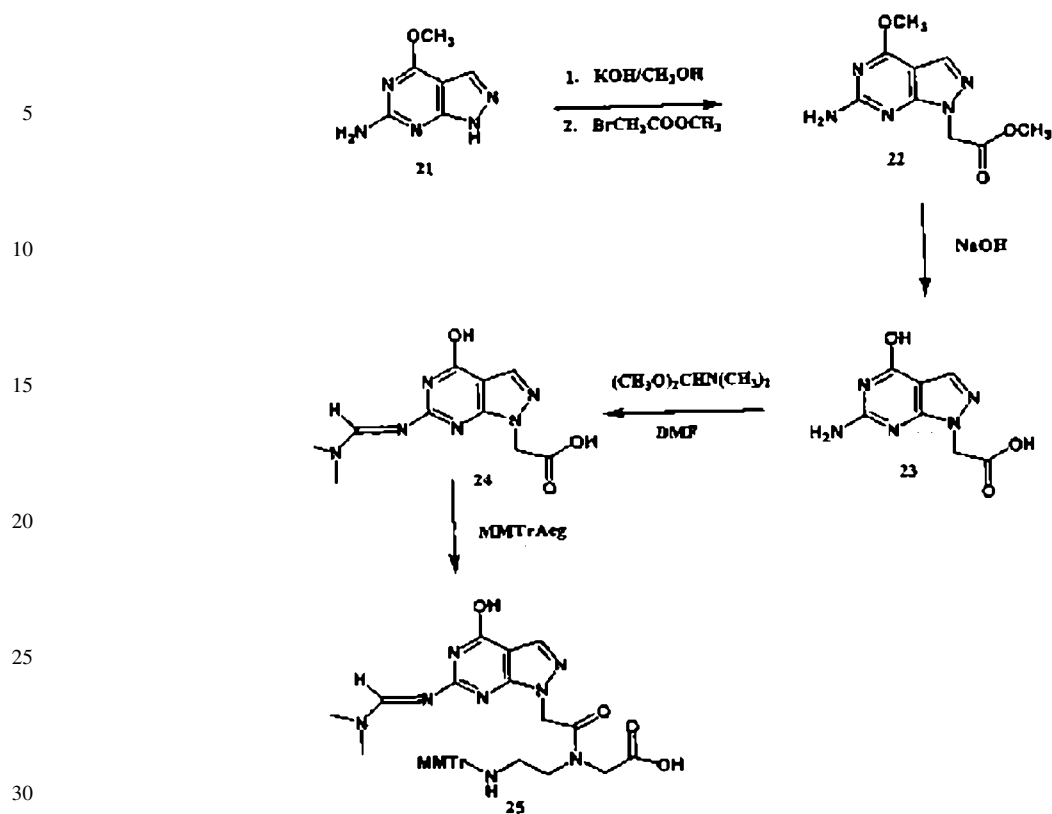


Esquema de reacción 6

Continuando con el Esquema de reacción 6, la conversión de N-Bz PPAA (11) en un monómero reactivo para la síntesis de PNA procede mediante condensación de 11 con monometoxitritilaminoetilaminoacetato (MMTrAeg = monometoxitritilaminoetilglicina) para formar 12, seguido por el tratamiento de 12 con álcali para generar el derivado aminoetilglicina protegido por MMTr 13. Véase Ejemplo 5 para más detalles.

Un monómero de PPG preferible es el derivado de MMTr-aminoetilglicina protegido por 2-N-dimetilvinilo (24), cuya síntesis se muestra en el Esquema de reacción 7. 4-metoxipirazolo[5,4]pirimidina-6-ilamina (21) reaccionó primero con KOH en metanol seco, seguido por la reacción con bromoacetato de metilo para proporcionar el derivado de acetato de metilo (22). La hidrólisis alcalina para proporcionar el derivado de ácido acético 23 fue precedida por la reacción con (dimetoximetil)dimetilamina para proporcionar (24). La reacción de (24) con MMTrAeg proporcionó el monómero PPG protegido 25.

ES 2 344 337 T3



Esquema de reacción 7

35

40

Un monómero PPA preferible es el derivado de MMTr-aminoetilglicina protegido por 2-N-dimetilvinilo (29), cuya síntesis se muestra en el Esquema de reacción 8. Pirazolo[5,4]pirimidin-4-ilamina (8) reaccionó primero con KOH en metanol seco seguido por la reacción con bromoacetato de metilo para proporcionar el derivado acetato de metilo (26). Éste reaccionó con (dimetoximetil)dimetilamina para proporcionar (27), que se trató con NaOH para proporcionar (28). La reacción de (28) con MMTrAeg proporcionó el monómero de PPA (29).

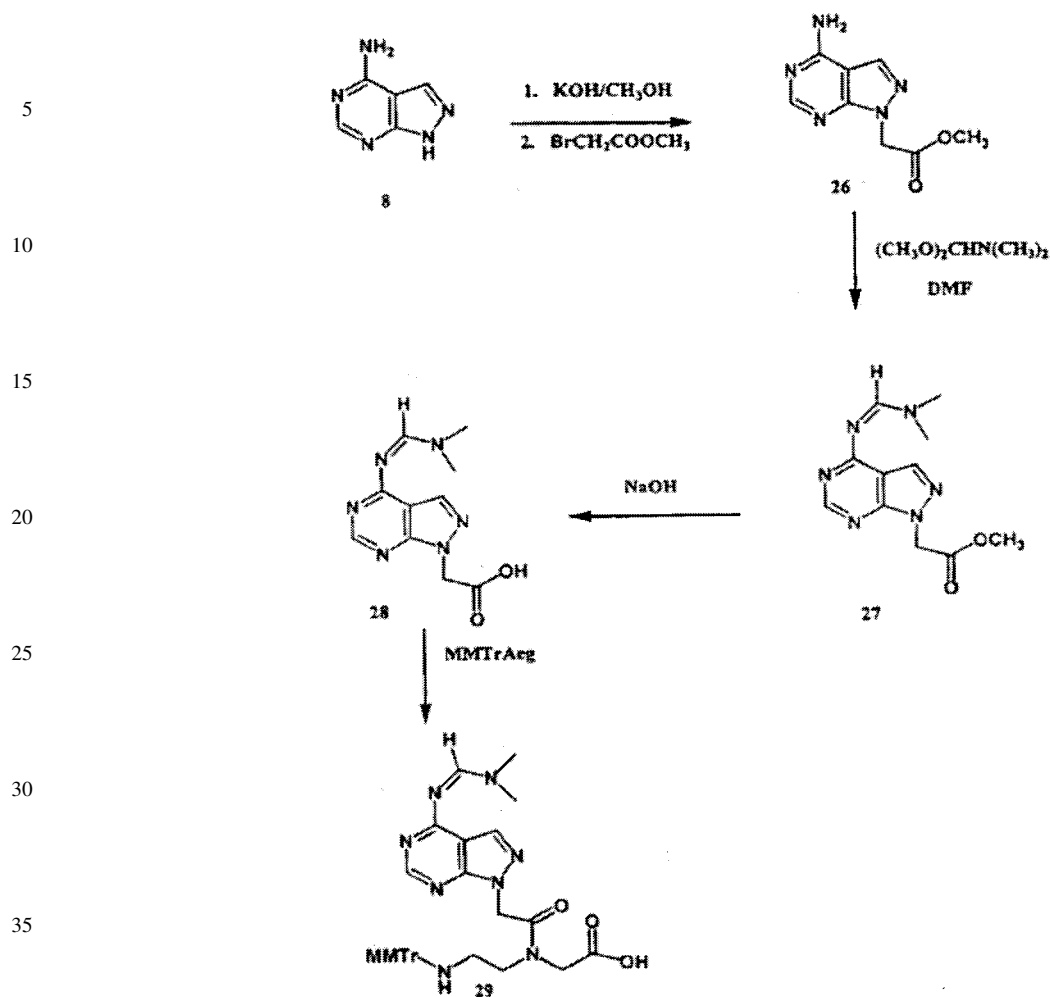
45

50

55

60

65



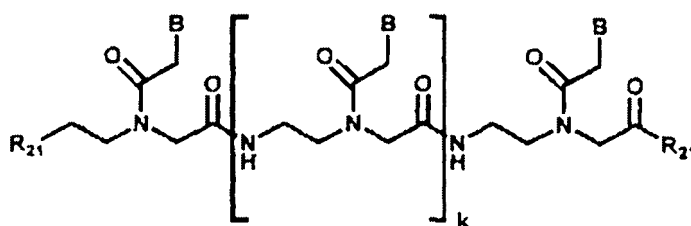
Esquema de reacción 8

La síntesis de los derivados reactivos de PPI sigue procedimientos similares. Pirazolo[5,4-d]pirimidin-4-ol (PPI, Tominaga *et al.* (1990) *J. Heterocycl. Chem.* 27:775-783) puede alquilarse directamente con bromoacetato de metilo, seguido por hidrólisis alcalina, para proporcionar ácido 2-(4-hidroxipirazolo[5,4-d]pirimidinil)acético, que puede convertirse como se ha descrito (Uhlmann *et al.* (1998) *supra*) para el derivado de aminoetilglicina bloqueado por MMTr. Alternativamente, el grupo hidroxilo de PPI puede bloquearse con un grupo difenilcarbamoilo antes de la reacción con acetato bromoacético de metilo.

Las mismas aproximaciones sintéticas utilizadas para sintetizar los derivados reactivos de las pirazolo[5,4-d]pirimidinas pueden utilizarse para sintetizar los derivados reactivos de las 7-deazapurinas para su uso en la síntesis de oligómeros que contienen PNA. La diferencia básica entre la síntesis de estos dos tipos de compuestos es que en el último caso sólo un isómero se genera tras la alquilación con bromoacetato de metilo.

#### Síntesis de oligómeros que contienen PNA

Además de los monómeros y precursores descritos antes, la invención incluye oligómeros de PNA, oligonucleótidos de DNA y/o quimeras de PNA/DNA que comprenden al menos una unidad monomérica de Fórmula 4, opcionalmente unida de forma covalente a uno o más ligandos, porciones de colas o grupos colgantes. Un oligómero de PNA comprende dos o más monómeros de PNA que están covalentemente unidos mediante enlaces peptídicos, como se ilustra en la Fórmula 4, en el que B es una base (es decir, una base heterocíclica A, G, C, T o U como se encuentran normalmente en los ácidos nucleicos o un derivado modificado de las mismas) o análogo de base; k está entre 0 y 50, preferiblemente entre 0 y 40, más preferiblemente entre 0 y 30, y aún más preferiblemente entre 0 y 20; y  $R_{21}$  son independientemente -H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -NHR<sub>22</sub>, -N(R<sub>22</sub>)<sub>2</sub>, un grupo protector, un grupo reactivo o un oligómero, en el que R<sub>22</sub> es -H o C<sub>1-6</sub> alquilo, alquenilo o alquinilo.



Fórmula 4

La síntesis de oligómeros de PNA a partir de precursores monoméricos se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Uhlmann *et al.*, *supra*. La síntesis comienza con una resina de CPG u otro soporte sólido, que contiene un grupo amino conjugado. Un monómero bloqueado de forma apropiada (que corresponde con el monómero terminal del oligómero deseado) está acoplado covalentemente al grupo amino con la ayuda de un reactivo de acoplamiento. Tras la desprotección del extremo creciente bloqueado del primer monómero, se acopla un segundo monómero. El proceso se repite hasta que se obtiene un oligómero de la longitud deseada y secuencia, en dicho momento el oligómero se escinde del soporte sólido y se elimina cualquier grupo protector de base.

En una realización, un oligómero de PNA contienen un grupo  $-NH_2$  en el extremo que se ha escindido del soporte sólido, y un grupo  $-COOH$  o  $-OH$  en el extremo opuesto. Los grupos terminales funcionales proporcionan sitios para la unión de moléculas adicionales y grupos colgantes para los oligómeros que contienen PNA.

Las estrategias para la síntesis de oligómeros quiméricos de PNA/DNA son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Uhlmann *et al.*, *supra*. Las dos estrategias principales para la síntesis de quimeras de PNA/DNA son condensación de bloques de oligómeros de PNA y DNA presintetizados en solución y síntesis secuencial en fase sólida con precursores monoméricos de PNA y DNA protegidos de forma adecuada. Los expertos en la materia apreciarán que, dependiendo del método de síntesis, son posibles diferentes grupos de conexión entre las porciones de PNA y DNA. Ejemplos de enlaces incluye, pero no se limita a, los enlaces N-(2-hidroxietyl)glicina y 5'-amino-2',5'-dideoxynucleósido fosforamídita. Uhlmann *et al.*, *supra*.

Los reactivos de acoplamiento (o agentes activadores) para su uso en la condensación de monómeros de PNA para formar un oligómero de PNA incluye, pero no se limita a, hexafluorofosfato de benzotriazolil-1-oxi-trispirrodinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de O-(7'-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), hexafluorofosfato de O-(7-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), diciclohexilcarbodiimida (DCC)/1-hidroxibenzotriazol (HOBT), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), hexafluorofosfato de bromo tris(pirrolidino) fosfonio (ByBrop), y tetrafluorborato de O-[(ciano (etoxicarbonil)metil)amino] 1,1,3,3-tetrametiluronio (TOTU). Éstos y otros agentes activadores y condensadores son conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Uhlmann *et al.*, *supra*.

Otras moléculas que pueden acoplarse de forma covalente a un oligómero incluye, pero no se limita a, intercalantes, grupos lipofílicos, ligandos de unión al surco menor, ligandos de unión al surco mayor, grupos marcadores (incluyendo marcadores fluorescentes, quimioluminescentes y radioactivos), proteínas, enzimas, anticuerpos, agentes quelantes y/o agentes de entrecruzamiento. Estas moléculas pueden enlazarse internamente y/o a uno o ambos extremos del oligómero. La naturaleza y unión de dichas moléculas a los oligonucleótidos son bien conocidos en la técnica actual, y están descritos, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses N° 5.512.667 y 5.419.966 y en la publicación PCT WO 96/32496, que se incorporan aquí mediante referencia.

Los oligómeros de la invención pueden también tener una porción de cola de peso molecular relativamente bajo unida a uno o ambos extremos. A modo de ejemplo, una molécula de cola puede ser un fosfato, un éster de fosfato, un grupo alquilo, un grupo aminoalquilo, un grupo hidrofílico o un grupo lipofílico. La porción de cola puede también unir un intercalante, grupo lipofílico, ligando de unión al surco menor, grupo marcador, agente quelante y/o funcionalidad de entrecruzamiento a los oligómeros de la invención. La naturaleza de las porciones de cola y los métodos para obtener oligonucleótidos con varias porciones de cola también se describen en las Patentes Estadounidenses N° 5.512.667 y 5.419.966, anteriormente mencionadas.

Las moléculas pueden unirse a un oligómero de la invención para modificar su solubilidad en solventes acuosos. Dichas moléculas incluyen, pero no se limitan a, sacáridos y moléculas cargadas como aminoácidos, ligandos de unión al surco menor cargados, y similares.

En una realización preferible, los oligómeros de la invención que contienen PPG sustituido por guanina y/o PPA sustituido por adenina también comprenden un ligando de unión al surco menor conjugado (MGB). La discriminación de desemparejamiento de nucleótido simple óptima se obtiene utilizando oligonucleótidos conjugados a MGB que contiene PPG en lugar de guanina, como se describe en la publicación compartida PCT WO 99/51775. Son preferibles los MGB polares; las porciones MGB más preferibles incluyen el trímero de 3-carbamoyl-1,2-dihidro-(3H)-pirrolo [3,2-e]indol-7-carboxilato (CDPI3) y el pentámero de N-metilpirrol-4-carbox-2-amida (MFC). Otras porciones MGB

que podemos darle uso en la práctica de la presente invención se describen en la Patente Estadounidense N° 5.801.155 y la publicación compartida PCT WO 99/51621, cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia.

5 Los oligómeros pueden comprender análogos de bases además de los análogos de purina descritos aquí como, por ejemplo, pirimidinas modificadas y análogos de pirimidina.

Además, los oligómeros de la invención pueden comprender esqueletos diferentes de los esqueletos de péptidos, o pueden comprender esqueletos heterogéneos hechos de péptidos mezclados y enlaces no peptídicos. Por ejemplo, pueden utilizarse oligómeros con esqueletos basados en ésteres de metil glicina, ornitina, prolina, diaminociclohexano y la fosforamidita de 2-aminopropanodiol. Uhlmann *et al.*, *supra*. Además, pueden utilizarse los PNA en los que el enlace peptídico está sustituido por un puente de ácido fosfónico, como N-(2-aminoetil)fosfonoglicina y N-(2-hidroxietil) fosfonoglicina. Peyman *et al.* (1997) *Angew. Chem. Intl. Ed Engl.* 36:2809-2812; Efimov *et al.* (1998) *Nucl. Acids. Res.* 26:566-577. Otros enlaces de oligómero serán evidentes para los expertos en la materia.

#### 15 *Oligómeros formadores de triplex*

Los oligómeros que contienen PNA son útiles para la detección de ambas dianas de ácido nucleico de cadena única y de cadena doble. Para la detección de los ácido nucleicos de cadena doble, un oligómero se une al surco mayor de una diana de cadena doble mediante un emparejamiento de bases de tipo Hoogsteen, Hoogsteen reverso o emparejamiento de bases equivalente, como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Fresco, Patente Estadounidense N° 5.422.251; Hogan, Patente Estadounidense N° 5,176,996; y Lampe (1997) *Nucleic acid Res.* 25:4123-4131. La sustitución de purinas mediante análogos de bases en un oligómero que contiene PNA, como se ha descrito aquí, facilita la formación de triplex. Los oligonucleótidos formadores de triplex opcionalmente contienen grupos conjugados, como fluoróforos, bloqueadores de la fluorescencia y cualquiera de las moléculas adicionales descritas más arriba. En una realización preferible, un oligómero que contiene PNA formador de triplex con una o más purinas sustituido por un análogo de base comprende un ligando de unión al surco menor conjugado. Véase más arriba para la descripción de ligandos de unión al surco menor útiles en los oligómeros de la invención.

#### 30 *Fluoróforos y bloqueadores de la fluorescencia*

En una realización, un grupo marcador unido es un marcaje fluorescente o un par fluoróforo/bloqueador de la fluorescencia. En una realización preferible, la sustitución se uno o más residuos de purina por análogos de bases de pirazolopirimidina y/o pirrolpirimidina, en una sonda que contiene un marcaje fluorescente, resulta en un bloqueo reducido del marcaje. De acuerdo con esto, se proporcionan las sondas marcadas con fluorescencia que comprenden uno o más análogos de purina, opcionalmente que comprende un bloqueador de la fluorescencia.

Los marcajes fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, colorantes como fluoresceínas, rodaminas, naftilaminas, coumarinas, xantenos, acridinas, benzoxadiazoles, estilbenos, pirenos, cianinas, ficoeritrinas, proteínas verdes fluorescentes, y similares. Otros marcajes fluorescentes, y métodos para su conjugación a ácidos nucleicos y sondas de PNA, se conocen por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Haugland (1996) *Handbook of Fluorescent probes and Research Chemicals*, Sexta edición, Molecular Probes, Inc., Eugene, o y publicación PCT WO 99/40226. En general, los métodos para la unión de un marcaje fluorescente y/o un bloqueador de la fluorescencia a un oligómero de PNA o una porción de PNA de un oligómero quimérico son similares a los utilizados para la conjugación de un fluoróforo y/o bloqueador de la fluorescencia a un oligonucleótido de DNA. El fluoróforo o bloqueador de la fluorescencia también está unido a una porción de cola que comprende un grupo reactivo como, por ejemplo, -OH o -NH<sub>2</sub>; o está unido a una base, por ejemplo, en la posición 5 de una pirimidina, la posición 7 de una purina, o la posición 3 de una pirazolopirimidina o pirrolpirimidina.

En ciertas realizaciones de la presente invención, se utilizan los oligómeros que comprenden ambos un marcaje fluorescente (fluoróforo) y un bloqueador de la fluorescencia. Un bloqueador de la fluorescencia también se refiere como una porción bloqueadora de la fluorescencia de una sonda o polímero. Los bloqueadores de la fluorescencia incluyen aquellas moléculas cuyo espectro de absorción se solapa con el espectro de emisión fluorescente de un fluoróforo particular, de forma que son capaces de absorber la energía emitida por un fluoróforo para reducir la cantidad de fluorescencia emitida (es decir, bloquear la emisión del marcaje fluorescente). Los diferentes fluoróforos se bloquean mediante diferentes agentes bloqueadores. En general, las propiedades espectrales de una pareja en concreto de fluoróforo/bloqueador de la fluorescencia son aquellos en que una o más de las longitudes de onda de absorción del bloqueador de la fluorescencia se solapa con una o más de las longitudes de onda de emisión del fluoróforo.

Las parejas adecuadas de fluoróforo/bloqueador de fluorescencia, cuya emisión por el fluoróforo se absorbe por el extintor, son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Haugland, *supra*. Ejemplos de parejas de bloqueador de fluorescencia/fluoróforo que pueden utilizarse en la práctica de la invención son los siguientes. Una pareja preferible de fluoróforo/bloqueador de fluorescencia es la fluoresceína y la tetrametilrodamina. El azul de nitrotiazol bloquea la emisión de fluorescencia de seis tipos diferentes de colorantes, que son 6-FAM, dR110, dR6G, dTMR, dROX y JAZ. Lee *et al.* (1999) *Biotechniques* 27:342-349. La 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) bloquea la emisión de la 6-carboxifluoresceína (FAM) y de la 6-carboxi-4,7,2',7'-fluoresceína (TET). Lee *et al.* (1993) *Nucl. Acid Res.* 21:3671-3766. El ácido 6-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il]amino)hexanoico bloquea la fluorescencia del 7-dimetilamino-coumarin-4-acetato. Bicket *et al.* (1994) *Ann. NY. Acad. Sci.* (Sep. 6)732:3 51-355. La 6-carboxi-X-rodamina (ROX) y la eritromicina B bloquean la emisión de FAM. Li *et al.* (1999) *Bioconj. Chem.* 10:241-245. El grupo 2,4-dinitrofeni-

lo bloquea el ácido (R,S)-2-amino-3-(7-metoxi-4-coumaril)propanoico. Hawthorne *et al.* (1997) Anal. Chem. 253:13-17. Se utiliza dabculo como bloqueador de fluorescencia de sulfonamida de dansilo en quimiosensores y en péptidos fluorogénicos como un bloqueador de fluorescencia para el fluoróforo EDANS. Rothman *et al.* (1999) Bioorg. Med Chem. Left. 22:509-512 y Matayoshi *et al.* (1990) Science 247:954-958. QSY-7 es un bloqueador de la fluorescencia de tetrametilrodamina. Haugland *supra*. Pueden seleccionarse parejas adicionales de fluoróforo/bloqueador de la fluorescencia por los expertos en la materia si se compara las longitudes de onda de emisión y absorción de acuerdo con las propiedades establecidas anteriormente.

Aunque cualquier marcaje fluorescente es útil en la práctica de la invención, los fluoróforos preferibles presentan una emisión máxima entre 400 y 800 nm. De forma similar, aunque cualquier bloqueador de la fluorescencia es útil, los bloqueadores preferibles de la fluorescencia poseen una absorción máxima entre 400 y 800 nm.

En otra realización, un oligómero comprende una pareja de fluoróforos capaz de realizar transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET). En este caso, se utilizan dos fluoróforos en una serie de FRET. El primer fluoróforo (donante de fluorescencia) presenta un espectro de emisión que se solapa con el espectro de excitación del segundo fluoróforo (aceptor de fluorescencia). De acuerdo con esto, la irradiación en las longitudes de onda de excitación del donante de fluorescencia resulta en una fluorescencia en la longitud de onda de emisión del aceptor. Está claro que cualquier número de fluoróforos, que posee un solapamiento adecuado de sus longitudes de onda de emisión y excitación, puede formar una serie de FRET de tres, cuatro o más fluoróforos.

En una realización, un fluoróforo es un fluoróforo latente, tal como se describe en la Solicitud de Patente Estadounidense compartida N° 09/\_,\_, titulada "Hybridation triggered fluorescent detection of nucleic acids" (Procurador de expediente N° 34469-20006.00), depositada el 26 de octubre de 1999.

#### 25 Ejemplos de ventajas

Cuando un oligómero se utiliza como una sonda o cebador, la sustitución de los análogo de bases para purines reduce la agregación del oligómero sustituido, con sigo mismo y con otras moléculas de oligómeros. La reducción de la agregación se demuestra mediante las sondas ricas en G como se describe en el Ejemplo 6, *infra*. Como consecuencia, los métodos mejorados para la detección de secuencias diana mediante hibridación, se obtienen al utilizar oligómeros como sondas, utilizando los oligómeros descritos aquí. Las secuencias diana pueden comprender DNA, RNA, o cualquier oligonucleótido o polinucleótido.

La sustitución de purines mediante análogos de bases en sondas marcadas con fluorescencia reduce el bloqueo del marcaje que ocurre en las sondas no sustituidas. Véanse los Ejemplos 7 y 8, *infra*. En particular, los inventores han determinado que la detección del producto de amplificación utilizando sondas que contienen más de tres residuos G consecutivos adyacentes a un marcaje fluorescente es ineficiente y, para las sondas que contienen 5 o más residuos G consecutivos adyacentes a un marcaje fluorescente, no se observa detección del producto. Los inventores también han determinado que, cuando se sustituye la PPG por G, las sondas fluorescentes que contienen hasta 9 residuos PPG consecutivos adyacentes a un marcaje fluorescente proporcionan una detección altamente eficiente de los productos de amplificación. De acuerdo con esto, se obtienen métodos mejorados para detectar una secuencia diana que utiliza sondas que comprenden una porción polimérica (normalmente un oligómero, preferiblemente un oligómero de PNA o una quimera PNA/DNA, más preferiblemente un oligómero de DNA) y una porción fluorescente utilizando las composiciones descritas aquí.

Así, los oligómeros de DNA, RNA, PNA y quiméricos, que comprenden análogos de bases de pirazolopirimidina y pirrolopirimidina como se ha descrito aquí, son útiles en las técnicas que incluyen, pero no se limitan a, hibridación, extensión del cebador, ensayos de sonda hidrolizable, métodos de amplificación (por ejemplo, PCR, SSSR, NASBA), discriminación del desemparejamiento de nucleótidos únicos, hibridación de oligonucleótido específicos de alelo, análisis de la secuencia de nucleótidos, hibridación a chips de oligonucleótidos, hibridación *in situ* y técnicas relacionadas. Los oligómeros descritos aquí pueden utilizarse como oligómeros inmovilizados en chips de oligómeros como los descritos en, por ejemplo, las patentes Estadounidenses N° 5.492.806; 5.525.464; 5.556.752 y las publicaciones PCT WO 92/10588 y WO 96/17957. La especificidad y sensibilidad mejoradas probablemente resultan del aumento de la solubilidad, disminución de la tendencia a la agregación, bloqueo reducido de la fluorescencia por parte de los marcajes fluorogénicos conjugados, y/o alguna combinación de estos y otros factores.

El rendimiento mejorado de las sondas sustituidas con PPG en un ensayo de sonda hidrolizable a tiempo real se demuestra en el Ejemplo 9, *infra*.

En otra realización de la invención, se utiliza un oligómero que contiene PNA con uno o más residuos de purina sustituidos por un análogo de base como un fármaco, por ejemplo como un reactivo anti-gen o antisentido, como componente de una ribozima, o para la terapia génica. Los usos terapéuticos incluye formación de bucles D *in vivo* o *ex vivo*.

65 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no para limitar la invención.

## Ejemplos

## Ejemplo 1

5 *Síntesis de ácido 2-(6-amino-4-hidroxipirazolo[5,4-d]pirimidinil)acético (PPGA, Compuesto 3)*

*Etil-2-(6-amino-4-{2-[etoxicarbonil]metil}hidrazino}pirazolo[5,4-d]pirimidinil)acetato (Compuesto 2)*

10 El 2-amino-4-6-dicloropirimidina-5-carboxialdehído (Compuesto 1) (10 g; 52 mmol) se trató con una solución de 10,1 g (64,8 mmol) de clorhidrato de acetato de etilo 2-(hidrazinol)acético en 100 ml de agua. Se añadió trietilamina (15 ml; 107 mmol) y la mezcla se calentó a 60°C durante 10 min., después se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. Aunque el clorhidrato de acetato de etilo 2-(hidrazinol)acético no se disolvió completamente, la TLC sobre SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH 10:1) mostró la formación de un nuevo producto. La mezcla se evaporó hasta secarse, se recogió en tolueno (100 ml) y se evaporó hasta secarse. El sólido se suspendió en alrededor de 300 ml de CH<sub>3</sub>CN y se filtró a través de una columna de SiO<sub>2</sub> (49x6 cm), se lavó con 0,71 de CH<sub>3</sub>CN y alrededor de 300 ml de CHCl<sub>3</sub>. El filtrado se evaporó hasta secarse, se disolvió en 120 ml de CH<sub>3</sub>OH caliente y cristalizó durante la noche a 4°C. El producto, un sólido incoloro (3,2 g) se recogió y se secó. La TLC y la HPLC de fase reversa indicó un compuesto puro y el análisis por RMN certificó la estructura.

20 *2. Ácido 2-(6-amino-4-hidroxipirazolo[5,4-d]pirimidinil)acético (Compuesto 2)*

25 El compuesto 2 (3,16 g; 9,4 mmol) se disolvió en 100 ml de metanol caliente, después se añadió 100 ml de un solución 2N de NaOH, y la mezcla se sometió a reflujo durante 6 horas, transcurrido el cual, el análisis por TLC indicó la hidrólisis del éster. El producto 3 (PPGA) se formó por la adición de 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (en porciones de 0,5 ml) a la mezcla de reacción, seguido de un calentamiento hasta 80°C, hasta que se completó la generación de O<sub>2</sub> por la degradación del exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El metanol se eliminó al calentar a 100-120°C, seguido por un enfriamiento a temperatura ambiente y la adición de 17 ml de HCl concentrado para proporcionar un pH de alrededor de 4. La precipitación del producto se inició en este momento, y se facilitó mediante la adición de hielo. El producto se filtró, se lavó con agua fría y se secó sobre NaOH y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (rendimiento 3,9 g). La RMN confirmó la estructura e indicó la presencia de alrededor de 4-8 moléculas de H<sub>2</sub>O por molécula de producto.

## Ejemplo 2

35 *Síntesis de ácido 2-[4-hidroxi-6-(2-metil-propanoilamino)pirazolo[5,4-d]pirimidinil]acético (14)*

40 El PPGA (Compuesto 3, 5,58 g; 20 mmol) se suspendió en DMF anhidro (40 ml) y trietilamina (4,29 ml; 30,8 mmol). Se añadió por goteo con una jeringa cloruro de isobutanoilo (2,12 g; 19,9 mmol). La mezcla se agitó a 100°C durante 3 horas, después se trató con metanol y se evaporó hasta secarse. El residuo se trató con 20 ml de HCl 1N y después con metanol y se evaporó hasta secarse. El residuo se trató con isopropanol caliente y el producto precipitado se eliminó por filtración y se secó al vacío. El producto (14) se analizó mediante TLC y HPLC y, si fue necesario, se purificó mediante cromatografía.

## Ejemplo 3

*Ácido 5-[4-hidroxi-6-(2-me-tilpropanoil-amino)pirazolo[5,4-d]pirimidinil]-3-(2-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amino)etil)-4-oxopentanoico (20)*

50 *N-(4-isidroxipirazolo[5,4-d]pirimidin-6-il)-2-metilpropanamida (16)*

55 El compuesto 15 (PPG, 3,02 g; 20 mmol) se resuspendió en DMF anhidro (40 ml) y trietilamina (1,45 ml, 10,4 mmol), y se añadió cloruro de isobutanoilo (2,12 g, 19,9 mmol) gota a gota utilizando una jeringa. La mezcla se agitó a 100°C durante 3 horas. La mezcla de reacción se trató luego con metanol y se evaporó hasta la sequedad. El residuo se trató con metanol y se evaporó hasta la sequedad. El residuo se trató luego con isopropanol caliente y el producto precipitado (16) se eliminó por filtración y se secó al vacío. El producto se analizó mediante TLC y HPLC y, en caso de ser necesario, se purificó posteriormente mediante cromatografía.

60 *2-[4-hidroxi-6-(2-metilpropanoilamino)pirazolo[5,4-d]pirimidinil]acetato de metilo (17)*

65 El compuesto 16 (4,42 g; 20 mmol) se resuspendió en DMF seco (40 ml), se añadió hidruro sódico (0,5 g; 20,8 mmol) en porciones, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 min. Luego se añadió bromoacetato de metilo (1,9 ml; 20,6 mmol) a temperatura ambiente, mediante una jeringa, y se continuó la agitación a temperatura ambiente. Tras completarse la reacción (monitorizada mediante TLC), la mezcla de reacción se trató con una pequeña cantidad de dióxido de carbono en metanol. Luego se evaporó el solvente y el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó una vez con agua y luego se evaporó hasta la sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía para proporcionar el isómero deseado (17).

## ES 2 344 337 T3

### *Ácido 2-[4-hidroxi-6-(2-metilpropanoilamino)pirazolo[5,4-d]pirimidinil]acético (18)*

El compuesto 17 (4,41 g; 15 mmol) se resuspendió en 25 ml de agua, y se añadió gota a gota una solución acuosa 2N de hidróxido sódico a 0°C, mientras se mantiene el pH a 11, hasta que el éster de metilo está completamente hidrolizado. Luego se filtró la solución de reacción, y el filtrado se llevó hasta pH 3 utilizando una solución de KHSO<sub>4</sub> 2M, después se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa se evaporó y el producto (18) se purificó mediante cromatografía.

### *5-[4-hidroxi-6-(2-metilpropanoilamino)pirazolo[5,4-d]pirimidinil]-3-(2-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amino)etil)-4-oxopentanoato de metilo (19)*

El 2-[(2-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amino)etil]amino]acetato de metilo (MMTrAeg, 1,26 g; 3,1 mmol) se disolvió en DMF (8 ml). A esta solución se añadieron N-etilmorfolina (1,07 g; 6,28 mmol), 3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3-benzotrazina (HOOBt) (0,505 g; 3,1 mmol), el compuesto 18 (0,91 g; 3,1 mmol) y diisopropilcarbodiimida (DIPC) (0,59 g; 3,72 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 48 horas a 4°C, en cuyo momento el solvente se evaporó y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La solución de acetato de etilo se lavó con agua y se lavó una vez más con una solución saturada de KCl. Luego se secó la fase orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo se disolvió en un pequeño volumen de acetato de etilo y se enfrió sobre hielo para inducir la cristalización de diisopropilurea, dejando el producto 19 en la fase acuosa. Alternativamente, la diisopropilurea se separó del compuesto 19 mediante cromatografía en gel de sílice.

### *Ácido 5-[4-hidroxi-6-(2-metilpropanoilamino)pirazolo[5,4-d]pirimidinil]-3-(2-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amino)etil)-4-oxopentanoico (20)*

El compuesto 19 (1,33 g; 2 mmol) se disolvió en 10 ml de dioxano. Esta solución se enfrió hasta 0°C y se añadió gota a gota NaOH acuoso 1 M (8,66 ml) en 5 alícuotas a lo largo de 2,5 horas. Tras 2 horas adicionales a temperatura ambiente la solución se ajustó a pH 5 mediante la adición gota a gota de KHSO<sub>4</sub> 2M. Las sales precipitadas se eliminaron por filtración y se lavaron con dioxano, y los filtrados combinados se evaporaron. El residuo se co-evaporó con etanol y metanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, luego se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar a (20).

#### Ejemplo 4

### *Síntesis de ácido 2-[4-[4-metoxifenil]carbonilamino]pirazolo[5,4-d]pirimidinil]acético (Compuesto 11, Esquema de reacción 6)*

#### *4-(Metoxifenil)-N-pirazolo[4,5-d]pirimidin-4-ilcarboxamida (9)*

La pirazolo[5,4-d]pirimidin-4-ilamina (8) (13,5 g; 0,10 mol) se resuspendió en piridina seca (250 ml), y se añadió cloruro de 4-metoxibenzolilo (17,1 g; 0,1 mol) gota a gota utilizando una jeringa. La mezcla se calentó hasta 100°C hasta que la TLC mostró que la reacción se había completado (entre 1 y 3 horas). La reacción enfriada se trató luego con metanol y el solvente se evaporó. El residuo se co-evaporó dos veces con tolueno y luego se agitó con isopropanol caliente. Esta mezcla se enfrió lentamente y el producto precipitado (9) se separó por filtración y se evaluó su pureza mediante TLC y HPLC. En caso de ser necesario, el producto se purificó posteriormente mediante cromatografía.

#### *2-[4-[(4-metoxifenil)carbonilamino]pirazolo[5,4-d]pirimidinil]acetato de metilo (10)*

El compuesto (9) (6,7 g; 25 mmol) se resuspendió en 75 ml de DMF seco. Se añadió hidruro sódico (0,65 g; 27 mmol) en porciones, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió bromoacetato de metilo (2,44 ml; 26,5 mmol) a temperatura ambiente utilizando una jeringa. La agitación se mantuvo a temperatura ambiente hasta que el análisis mediante TLC indicó que la reacción se había completado, en cuyo momento se trató la mezcla de reacción con una pequeña cantidad de dióxido de carbono en metanol. El solvente se evaporó y el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó una vez con agua y luego se evaporó hasta la sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía para proporcionar el isómero deseado (10).

#### *Ácido 2-[4-[4-metoxifenil]carbonilamino]pirazolo[5,4-d]pirimidinil]acético (11)*

El compuesto (10) (5,13 g; 15 mmol) se resuspendió en 120 ml de agua, y se añadió gota a gota una solución acuosa de hidróxido sódico 2N a 0°C para mantener el pH a 11, hasta que el éster de metilo se hidrolizó completamente. La solución de reacción se filtró y el pH del filtrado se llevó hasta 3, utilizando una solución de KHSO<sub>4</sub> 2M, lo que llevó a la precipitación del producto (11). El precipitado se lavó con una pequeña cantidad de agua, se secó al vacío, y se analizó su pureza. En caso de ser necesario, el producto (11) se purificó posteriormente mediante cromatografía.

## ES 2 344 337 T3

### Ejemplo 5

*Síntesis de ácido 2-[N-(2-[[4-(4-metoxifenil)difenilmetil]amino]etil)-2-{4-[(4-metoxifenil)carbonilamino]pirazolo[5,4-d]pirimidinil]acetilamino]acético (Compuesto 13, Esquema de reacción 6)*

2-[N-(2-[[4-(4-metoxifenil)difenilmetil]amino]etil)-2-{4-[(4-metoxifenil)carbonilamino]pirazolo[5,4-d]pirimidinil]acetilamino]acetato de metilo (12)

Se disolvió 2-(2-[[4-(4-metoxifenil)difenilmetil]-amino]etil)amino]acetato de metilo (MMTrAeg, 1,26 g; 3,1 mmol) en DMF (8 ml). A esta solución se añadieron N-etilmorfolina (1,07 g; 6,28 mmol), 3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3-benzotrazina (HOObt) (0,505 g; 3,1 mmol), compuesto 11 (1,01 g; 3,1 mmol) y diisopropilcarbodiimida (DIPC) (0,59 g; 3,72 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 48 horas a 4°C, luego se eliminó el solvente al vacío y el residuo se disolvió en acetato de etilo. Esta solución se lavó con agua y se lavó una vez más con una solución de KCl saturado. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo se disolvió en un pequeño volumen de acetato de etilo y se enfrió en hielo hasta inducir la cristalización de la diisopropilurea, dejando el producto (12) en solución. Alternativamente, la diisopropilurea se separó de (12) mediante una cromatografía en gel de sílice.

*Ácido 2-[N-(2-[[4-(4-metoxifenil)difenilmetil]amino]etil)-2-{4-[(4-metoxifenil)carbonilamino]pirazolo[5,4-d]pirimidinil]acetilamino]acético (13)*

El compuesto (12) (1,43 g; 2 mmol) se disolvió en dioxano (10 ml). La solución se enfrió hasta 0°C, y se añadió gota a gota NaOH acuoso 1M (8,66 ml) en 5 alcuotas a lo largo de 2,5 horas. Tras 2 horas adicionales a temperatura ambiente, el pH se ajustó a 5 mediante la adición gota a gota de HKSO<sub>4</sub> 2M. Las sales precipitadas se eliminaron por filtraron, se lavaron con dioxano, luego los filtrados combinados se secaron al vacío. El residuo (13) se co-evaporó con etanol y metanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, luego se purificó mediante cromatografía en gel de sílice.

### Ejemplo 6

*Reducción en la autoasociación de oligonucleótidos que contienen PPG*

En este ejemplo, oligonucleótidos conjugados 13-meros y 14-meros, que contienen entre dos y nueve residuos de G, se analizaron mediante electroforesis en gel no desnaturalizante y se compararon con oligonucleótidos de secuencia idéntica, con la excepción de que todos los residuos de G se reemplazaron por PPG. Las longitudes y secuencias de los oligonucleótidos se proporcionan en la Tabla 1. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 8% que se corrieron en tampón TBE 1X durante 45 min. a 40°C. Los geles se tiñeron con Daiichi 2D Silver Stain II® y los valores de R<sub>f</sub> de las bandas de oligonucleótidos teñidas se determinaron utilizando dos oligonucleótidos control como estándares. El oligonucleótido control A posee la secuencia 5'-ACCTGTATTCCTTGCC-3' (Id. de Sec. N° 22) y el oligonucleótido control B posee la secuencia 5'-ZTACAZCAAATZZAA-3' (Id. de Sec. N° 23), en la que Z representa PPG.

TABLA 1

*Secuencias de los oligonucleótidos*

Secuencia*	Longitud	Id. de Sec. N° (con G)	Id. de Sec. N° (con PPG)
5' - CAAATGGGGGGGGG - 3'	14	1	9
5' - ACAAATGGGGGGGGG - 3'	14	2	10
5' - AACAAATGGGGGGGGG - 3'	14	3	11

## ES 2 344 337 T3

	5' -CAACAAATGGGGGG-3'	14	4	12
5	5' -ACAACAAATGGGGGG-3'	14	5	13
	5' -CACAACAAATGGGGG-3'	14	6	14
10	5' -CACAACAAATGGG-3'	13	7	15
	5' -AGCACAAACAAATGG-3'	14	8	16

\* Todos los oligonucleótidos contenían, en sus extremos 5', una porción fluoresceína conjugada y, en sus extremos 3' conjugado un ligando de unión al surco menor (CDPI<sub>3</sub>) y un bloqueador de la fluorescencia (tetrametilrodamina). La síntesis de este tipo de conjugado se describe en la publicación PCT compartida WO 99/51775, cuya descripción se incorpora como referencia.

Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 2. Los valores R<sub>f</sub> se midieron separadamente para los oligonucleótidos que contenían G y PPG respecto de los oligonucleótidos control A y B, respectivamente. Sin embargo, la distancia a la que migraron los oligonucleótidos control A y B fue esencialmente idéntica. Los oligonucleótidos que contienen tres o más residuos G (oligonucleótidos 1-6) muestran una reducción en un R<sub>f</sub> comparado con oligonucleótidos de tamaño similar que contienen dos residuos G o menos (por ejemplo, los oligonucleótidos 7 y 8 y el oligonucleótido control A), lo que indica la agregación de los oligonucleótidos ricos en G. Por el contrario, los oligonucleótidos que contienen entre dos y nueve residuos PPG poseen R<sub>f</sub> que son similares entre ellos y a los de un oligonucleótido control que contiene dos residuos PPG. También se observó que los oligonucleótidos que contienen G mostraron bandas difusas tras la electroforesis (los valores R<sub>f</sub> de estos oligonucleótidos se determinaron midiendo desde el centro de la banda). Además, la comparación de un oligonucleótido que contiene G con un oligonucleótido del mismo tamaño y secuencia, pero con G sustituida por PPG, muestra que la reducción del R<sub>f</sub> característica de los oligonucleótidos que contienen tres o más residuos G no se observa con oligonucleótidos que contienen PPG, lo que sugiere una agregación baja o inexistente de los oligonucleótidos que contienen hasta nueve residuos de PPG consecutivos.

## ES 2 344 337 T3

TABLA 2

*Valores de  $R_f$  de los oligonucleótidos que contienen G y PPG*

5	<b>Id. de Sec. N°</b>	<b># G</b>	<b># PPG</b>	<b><math>R_f</math></b>
	22	2		1,00
10	1	9		0,58
	2	8		0,42
15	3	7		0,37
	4	6		0,35
20	5	5		0,32
	6	4		0,29
25	7	3		0,96
	8	2		0,96
30	23		4	1,00
	9		9	0,96
35	10		8	0,97
	11		7	0,95
40	12		6	0,95
	13		5	0,98
45	14		4	1,03
	15		3	0,98
50	16		2	0,96

### Ejemplo 7

55 *Bloqueo de la fluorescencia reducido en nucleótidos marcados con fluorescencia cuando se sustituye G con PPG*

60 La fluoresceína se acopló a GMP y a PPGMP (es decir, los derivados monofosfato de G y PPG) y se determinó la fluorescencia de soluciones 200 nM de estos conjugados. La excitación se realizó a 494 nm y la emisión de fluorescencia se midió a 522 nm. La emisión de fluorescencia del conjugado GMP fue de 15.447 unidades; mientras que la emisión de fluorescencia del conjugado PPGMP fue de 32.767 unidades. Así, el bloqueo del fluoróforo por la guanina se reduce cuando se sustituye la guanina por PPG, lo que conduce a un aumento del rendimiento de la fluorescencia del conjugado PPGMP a casi el doble comparado con el conjugado G.

65

## ES 2 344 337 T3

### Ejemplo 8

*Bloqueo de la fluorescencia reducido en sondas de oligonucleótido marcadas con fluorescencia cuando se sustituye G con PPG*

Se analizó el efecto en los conjugados fluoresceína-oligonucleótido, en rendimiento de fluorescencia, de sustituir G con PPG. La porción oligonucleótido de los conjugados contenía una G o un residuo PPG 5'-terminal, al cual se acopló una molécula de fluoresceína. Los conjugados opcionalmente contenían una molécula de CDPI<sub>3</sub> acoplada covalentemente a su extremo 3'. Las secuencias se proporcionan en la Tabla 3. Se midió la fluorescencia de una solución 200 nM de los conjugados, en Tris-HCl 20 mM, pH 7, NaCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, a temperatura ambiente, con una excitación a 494 nm y la emisión se detectó a 522 nm. Los resultados se proporcionan en la Tabla 3.

TABLA 3

*Efecto de la sustitución con PPG en el rendimiento de la fluorescencia de los oligonucleótido conjugados*

Id. de Sec N°	Secuencia*	F†	ΔF‡	% aumento
18	5' - F1 - GTCCTGATTTTAC - MGB - 3'	8.650		
19	5' - F1 - (PPG) TCCTGATTTTAC - MGB - 3'	10.739	2.089	24
20	5' - F1 - GTCCTGATTTTAC - 3'	14.883		
21	5' - F1 - (PPG) TCCTGATTTTAC - 3'	23.835	8.952	38
<p>* - F1 indica fluoresceína; MGB indica un ligando de unión al surco menor conjugado (CDPI<sub>3</sub>) † - indica rendimiento de la fluorescencia, en unidades arbitrarias ‡ - indica el aumento en la fluorescencia de un oligonucleótido que contiene PPG, comparado con un oligonucleótido que contiene G</p>				

Los resultados indicaron que la sustitución de G con PPG aumentan la fluorescencia (es decir, reducen el bloqueo) en un 24% y 38% en los oligonucleótidos conjugados MGB y conjugado no MGB, respectivamente.

## Ejemplo 9

*Funcionamiento mejorado de las sondas que contienen múltiples residuos G consecutivos en un ensayo de sonda hidrolizable cuando G es sustituido por PPG*

5

Los oligonucleótidos conjugados cuyas secuencias se muestran en la Tabla 1 se utilizaron como sondas fluorescentes en un ensayo de sonda hidrolizable. Patente Estadounidense N° 5.210.015; Livak *et al.* (1995) PCR Meth. App. 4:357-362; Wittwer *et al.* (1997a) Biotechniques 22:130-138; y Wittwer *et al.* (1997b) Biotechniques 22:176-181. El funcionamiento de las sondas que contienen G se comparó con el de las sondas que contienen PPG. Las sondas contenían un fluoróforo conjugado en su extremo 5', junto con un bloqueador de la fluorescencia y un ligando de unión al surco menor conjugado con el extremo 3' de la sonda, como se describe en la publicación PCT compartida WO 99/51775. La secuencia diana era 5'-CACCTCAGCCTCCCAAGTAACTTTTAACCCCCCCCATTGTTGTGCTG TTTTCATACCTGTAATCCTGGCACTTT-3' (Id. de Sec. N° 17). Las porciones subrayadas de la secuencia diana corresponden a las secuencias cebador.

15

La amplificación se realizó en un LC-24 LightCycler® de Idaho Technologies con monitorización a tiempo real de la fluorescencia. Las reacciones de amplificación contenían 10<sup>5</sup> copias/ $\mu$ l del 76-mero diana (como la anterior), 100 nM de cada cebador, 10 nM de sonda fluorescente (como la anterior), Tris-HCl 20 mM, pH 7, NaCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, albúmina sérica bovina al 0,05%, 0,5 mM de cada dNTP, 0,038 Unidades/ $\mu$ l de Taq polimerasa y 0,01 Unidades/ $\mu$ l de uracil-N-glucosilasa. El programa de termociclado fue un ciclo a 50°C durante 3 min., luego 95°C durante 2 min., seguido de 50 ciclos a 95°C durante 2 s., luego 60°C durante 30 s.

20

Los resultados se muestran en la Figura 1. En este método, la producción de producto de amplificación viene indicada por un aumento de la fluorescencia con el tiempo, causada por la hidrólisis de la sonda hibridada con el producto de amplificación. Los resultados obtenidos aquí muestran que la detección de los productos de amplificación utilizando sondas que contienen más de tres residuos de G consecutivos fue ineficiente y, de hecho, para sondas que contienen 5 o más residuos de G consecutivos, no se observó detección del producto. Por el contrario, cuando se sustituyó G con PPG en la sonda fluorescente, las sondas que contienen hasta 9 residuos de PPG consecutivos proporcionaron una detección altamente eficiente a tiempo real del producto de amplificación. Las descripciones y ejemplos precedentes no pretenden ser limitantes del alcance de la invención.

30

35

40

45

50

55

60

65

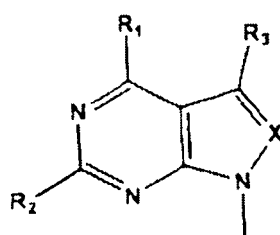
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende:

- (a) un polímero que comprende una serie de unidades de monómero; y
- (b) un fluoróforo unido covalentemente a ellos,

en el que uno o más de las unidades de monómero comprende un análogo de base, en el que el análogo de base se selecciona de entre el grupo que consiste de pirazolopirimidinas, como el análogo de bases retiene la especificidad de emparejamiento de bases de las bases para las que se sustituyen, y conduce a una reducción en el bloqueo de la fluorescencia del fluoróforo y/o auto-asociación del polímero reducida.

2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el análogo de base posee la estructura



en el que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente -H, -OH, -SH, o -NH<sub>2</sub>; R<sub>3</sub> es -H, -CN, halógeno (F, Cl, Br o I), o -R<sub>12</sub>-Y, en el que R<sub>12</sub> es C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo, alquenoilo o alquinilo y Y es -H, -OH, -NH<sub>2</sub> o -SH; y X es N.

3. El conjugado de la reivindicación 1, que comprende además un bloqueador de la fluorescencia.

4. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polímero comprende DNA.

5. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polímero comprende un péptido de ácido nucleico (PNA) o una quimera PNA/DNA.

6. El conjugado de la reivindicación 4 o 5, en el que el análogo de base está presente independientemente en la porción de DNA o PNA del polímero.

7. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que el análogo de base se selecciona de entre el grupo que consiste en pirazolopirimidiniladenina (PPA), pirazolopirimidinilguanina (PPG) y pirazolopirimidinilhipoxantina (PPI).

8. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que posee al menos cuatro residuos consecutivos de purina en el polímero, en el que al menos uno de los cuatro residuos consecutivos de purina en el polímero esté sustituido por un análogo de base.

9. El conjugado de la reivindicación 8, en el que el polímero contiene tres o más guaninas consecutivas que están sustituidas por PPG.

10. El conjugado de la reivindicación 3, en el que el fluoróforo emite entre 400 y 800 nm y en el que el bloqueador de la fluorescencia absorbe entre 400 y 800 nm.

11. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además un ligando de unión al surco menor.

12. El uso del conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 como sonda para detectar una secuencia diana en una reacción de amplificación (ensayo de sonda hidrolizable).

13. Un microchip de oligómeros, que comprende uno o más oligómeros de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

## ES 2 344 337 T3

14. El uso del oligómero de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 como una sonda para detectar una secuencia diana en un polinucleótido mediante hibridación.

5 15. El uso de la reivindicación 12 o 14, en el que la secuencia diana se distingue de una secuencia relacionada que tiene un desemparejamiento de nucleótido sencillo con respecto a la secuencia diana.

10

15

20

25

30

35

40

45

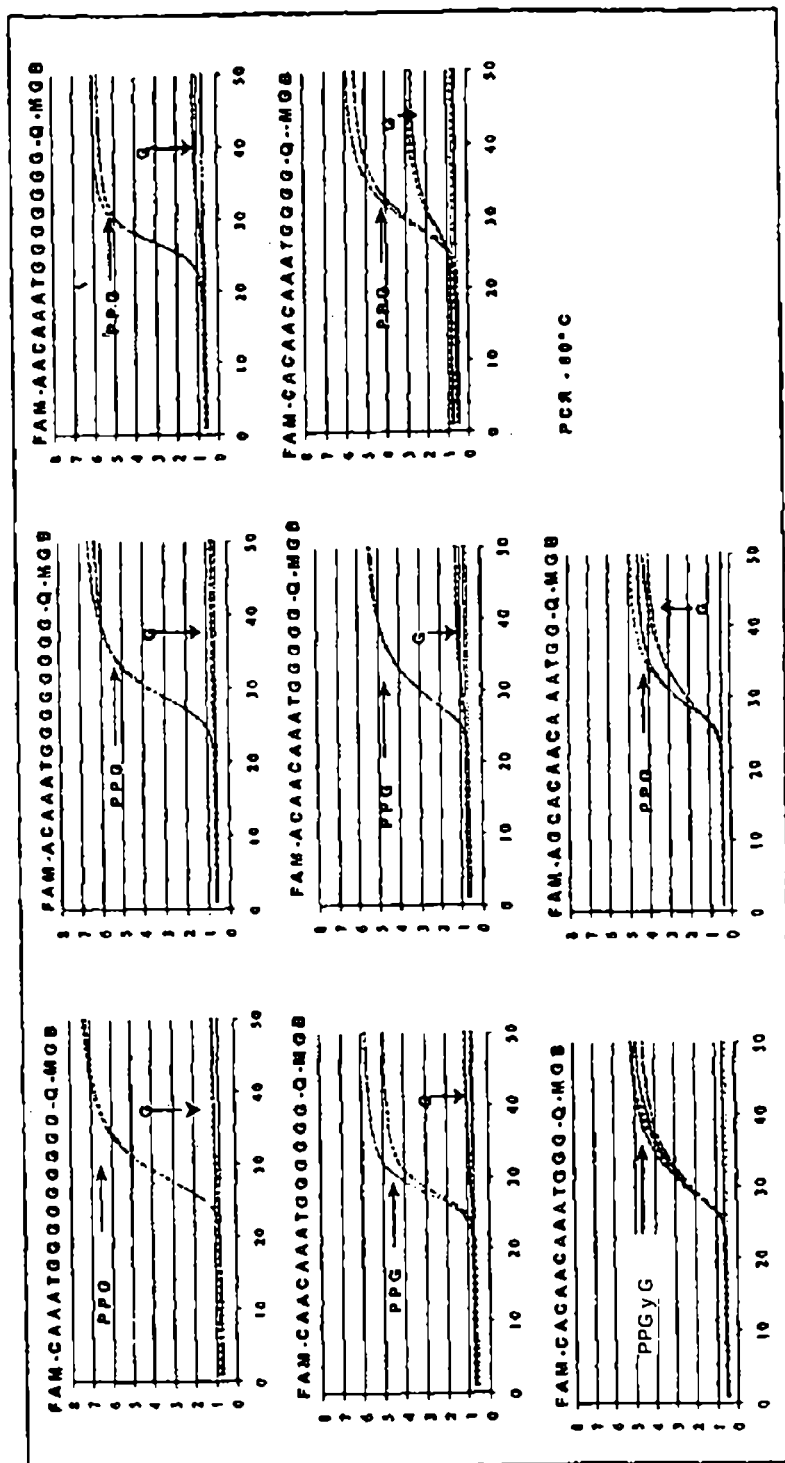
50

55

60

65

FIGURA 1



# ES 2 344 337 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Gall, Alexander Kutuyavin, Igor Vermeulen, Nicholaas Dempcy, Robert
- 5 <120> OLIGÓMEROS NO AGREGANTES Y SIN BLOQUEO DE LA FLUORESCENCIA QUE COMPRENDEN ANÁLOGOS DE NUCLEÓTIDOS; MÉTODOS DE SÍNTESIS Y USO DE LOS MISMOS
- <130> 344692000700
- <140> SIN ASIGNAR
- 10 <141> 1999-11-22
- <160> 23
- <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
- 15 <210> 1
- <211> 14
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Construcción sintética
- <400> 1
- 25 caaatggggg gggg 14
- <210> 2
- 30 <211> 14
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 35 <223> Construcción sintética
- <400> 2
- 40 acaaatgggg gggg 14
- <210> 3
- 45 <211> 14
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 50 <223> Construcción sintética
- <400> 3
- 55 aacaaatggg gggg 14
- <210> 4
- <211> 14
- 60 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Construcción sintética
- 65

## ES 2 344 337 T3

	<400> 4	
	caacaaatgg gggg	14
5	<210> 5	
	<211> 14	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
15	<400> 5	
	acaacaaatg gggg	14
20	<210> 6	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Construcción sintética	
30	<400> 6	
	cacaacaaat gggg	14
	<210> 7	
35	<211> 13	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 7	
45	cacaacaaat ggg	13
	<210> 8	
50	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Construcción sintética	
	<400> 8	
60	agcacaacaa atgg	14
	<210> 9	
	<211> 14	
65	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 344 337 T3

<220>  
<221> Base modificada  
<222> (6)...(14)  
5 <223> n = PPG  
<223> Construcción sintética

<400> 9  
10  
caaatnnnnn nnnn 14

<210> 10  
15 <211> 14  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <221> Base modificada  
<222> (7)...(14)  
<223> n = PPG  
25 <223> Construcción sintética

<400> 10  
30 acaaatnnnn nnnn 14

<210> 11  
<211> 14  
35 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> Base modificada  
40 <222> (8)...(14)  
<223> n = PPG  
<223> Construcción sintética

<400> 11  
45  
aacaatnnn nnnn 14

<210> 12  
50 <211> 14  
<212> DNA

<213> Secuencia artificial  
55 <220>  
<221> Base modificada  
<222> (9)...(14)  
60 <223> n = PPG  
<223> Construcción sintética

<400> 12  
65  
caacaatnn nnnn 14

## ES 2 344 337 T3

	<210> 13	
	<211> 14	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Base modificada	
10	<222> (10)...(14)	
	<223> n = PPG	
	<223> Construcción sintética	
15	<400> 13	
	acaacaaatn nnnn	14
20	<210> 14	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<221> Base modificada	
	<222> (11)...(14)	
	<223> n = PPG	
30	<223> Construcción sintética	
	<400> 14	
35	cacaacaaat nnnn	14
	<210> 15	
40	<211> 13	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<221> Base modificada	
	<222> (11)...(13)	
	<223> n = PPG	
	<223> Construcción sintética	
50	<400> 15	
	cacaacaaat nnn	13
55	<210> 16	
	<211> 14	
	<212> DNA	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Base modificada	
65	<222> (13)...(14)	
	<223> n = PPG	
	<223> Construcción sintética	

## ES 2 344 337 T3

<400> 16  
agcacaacaa atnn 14

5 <210> 17  
<211> 76  
<212> DNA  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Construcción sintética

15 <400> 17

20 **cacctcagcc tcccaagtaa cttttaaccc cccccattt gttgtgctgt tttcatacct 60**  
**gtaatcctgg cacttt 76**

<210> 18  
<211> 13  
25 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Construcción sintética

<400> 18

35 gtcttgattt tac 13

<210> 19  
<211> 13  
40 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<221> Base modificada  
45 <222> (1)...(1)  
<223> n = PPG  
<223> Construcción sintética

50 <400> 19

ntcctgattt tac 13

55 <210> 20  
<211> 13  
<212> DNA  
60 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Construcción sintética

65 <400> 20

gtcctgattt tac 13

## ES 2 344 337 T3

	<210> 21	
	<211> 13	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Base modificada	
10	<222> (1)...(1)	
	<223> n = PPG	
	<223> Construcción sintética	
15	<400> 21	
	ntcctgattt tac	13
20	<210> 22	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Construcción sintética	
30	<400> 22	
	acctgtatc cttgcc	16
35	<210> 23	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<221> Base modificada	
	<222> (1)...(1)	
45	<223> n = PPG	
	<221> Base modificada	
	<222> (6)...(6)	
	<223> n = PPG	
50	<221> Base modificada	
	<222> (12)...(13)	
	<223> n = PPG	
55	<400> 23	
	ntacancaaa tnaa	15
60		
65		