



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 357**

51 Int. Cl.:
C09B 23/04 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07819447 .9**
96 Fecha de presentación : **30.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2087043**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.2009**

54 Título: **Nuevos colorantes fluorescentes que se unen al ADN de doble cadena.**

30 Prioridad: **02.11.2006 EP 06022800**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.12.2010

73 Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE
F. Hoffmann-La Roche AG.

72 Inventor/es: **Heindl, Dieter;**
Josel, Hans-Peter;
Irlinger, Bernhard y
Weilke, Christian

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 348 357 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).

Nuevos colorantes fluorescentes que se unen al ADN de
doble cadena

5 Descripción

La presente invención se refiere a una nueva clase de colorantes fluorescentes que son capaces de emitir fluorescencia en el caso de que sean debidamente excitados en la situación de encontrarse específicamente unidos a un
10 ácido nucleico de doble cadena o dsADN. Estos colorantes que se unen a dsADN son utilizados frecuentemente para controlar la amplificación del ácido nucleico en tiempo real o para llevar a cabo análisis de curvas de fusión de ADN con dependencia de la temperatura.

15 Técnicas anteriores

~~Los colorantes fluorescentes~~ que se unen a ADN de doble cadena, tal como bromuro de etidiuino, han sido utilizados durante largo tiempo para el marcado de ácidos nucleicos con matrices de gel que han sido sometidas a
20 electroforesis.

De modo igualmente importante, los colorantes fluorescentes que se unen a ADN de doble cadena han sido utilizados en la técnica para control en tiempo real de la amplificación de ácidos nucleicos, tales como PCR, o
25 análisis de curva de fusión. El correspondiente producto de amplificación es detectado por un colorante fluorescente que se une a ADN, que emite una correspondiente señal de fluorescencia cuando tiene lugar la interacción con el ácido nucleico de doble cadena después de excitación con

una luz que tiene la longitud de onda apropiada. Se ha demostrado que es adecuado para esta aplicación el colorante que se intercala por lo menos parcialmente SybrGreenI (sondas moleculares).

5 Debido al hecho de que la detección de amplificación en tiempo real con este formato no puede discriminar entre productos específicos y artefactos de amplificación, tales como cebador/dímeros, se lleva a cabo habitualmente un análisis subsiguiente de curva de fusión. Después de
10 completar la reacción PCR, se incrementa la temperatura de la muestra y se detecta la fluorescencia siempre que el SybrGreen se haya unido al ADN de doble cadena presente en las muestras. Después de la disociación del ADN de doble cadena la señal disminuye inmediatamente. Esta disminución
15 es controlada con un fluorescente apropiado con respecto a un gráfico tiempo-temperatura, de manera tal que se puede determinar un primer valor derivado para el que se observa la máxima disminución de fluorescencia. Dado que los ADN de doble cadena cebador/dímero son habitualmente cortos, la
20 disociación en ADN de cadena única tiene lugar a temperaturas más bajas con respecto al producto de amplificación específico de doble cadena.

Se conocen en la técnica varios colorantes fluorescentes que se unen a ADN de doble cadena, que pueden
25 ser utilizados como agente de detección para PCR en tiempo real y análisis de curvas de fusión. El ejemplo más notable y utilizado más frecuentemente es SybrGreen I, que es un colorante de cianina monómero asimétrico que comprende un sistema de anillo de benzotiazolio N-alquilado que está

enlazado con intermedio de un puente de monometina a un anillo de piridinio o de quinolinio (US 5.658.751). De manera más precisa, SybrGreen tiene la fórmula química [2-[N-(-3-dimetilaminopropil)-N-propilamino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metilideno]-1-fenil-quinolinio]⁺ (Zipper, H., y otros, Nucl. Acids Res. 32 (2004) e103). En el colorante relacionado PicoGreen, la fórmula química es [2-[N-bis-(-3-dimetilaminopropil)-amino]-4-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metilideno]-1-fenil-quinolinio]⁺.

El documento 4.937.198 da a conocer un colorante relacionado fluorescente que se une a ADN, que tiene la fórmula química 3-metil-2-[[[(3,7-dimetil-6-purinilideno)-metil]-benzotiazolio], que ha sido utilizado satisfactoriamente para el marcado de ácido nucleico en ensayos basados en células. Otros colorantes y respectivos medios analíticos se dan a conocer en el documento de Moreda, W. y Forrester, A.R., Tetrahedron 53 (1997) 12595-12604.

El documento WO 04/38038 da a conocer ejemplos de colorantes fluorescentes que se unen a dsADN que se basan en un sistema de anillo de pirimidinio y benzotiazolio que están conectados a un puente de metina. En contraste con SybrGreen, es posible utilizar estos colorantes para detectar productos de amplificación PCR en condiciones de saturación, es decir, elevadas concentraciones en las que cada molécula de ADN se une ya con un número máximo de moléculas de fluorescente. Dentro del documento US 2005/233335, el mismo grupo de inventores da a conocer

otros ejemplos específicos de moléculas fluorescentes que comprenden una fracción de pirimidina y una fracción de benzotiazolio.

Muchos de los colorantes que se han dado a conocer han sido utilizados satisfactoriamente para PCR en tiempo real y análisis de amplificación de curvas de fusión. No obstante, todos los colorantes fluorescentes que se unen a ADN de doble cadena descritos en la técnica tienen o bien una estabilidad limitada y/o tienen utilidades solamente limitadas para métodos mejorados de análisis de curva de fusión. Para estos métodos mejorados de análisis de curva de fusión, que se pueden aplicar para escaneado de mutación (WO 04/38038), los efectos de cambios menores de temperatura con respecto al estado de conformación del ácido nucleico objetivo son objeto de análisis.

De este modo ha sido un objeto de la presente invención dar a conocer un colorante fluorescente que se une a ADN de doble cadena, mejorado, que aumenta la estabilidad y mejora el rendimiento durante el análisis de la curva de fusión de ADN.

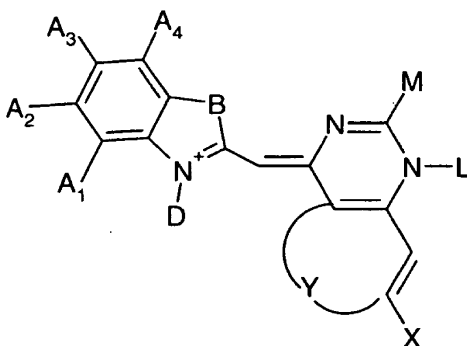
Breve descripción de la invención

En un primer aspecto, la presente invención está dirigida a un colorante fluorescente que comprende una fracción de benzotiazolio y una fracción de pirimidinio conectadas por un puente mono-metina, caracterizado porque:

(i) la posición 2 de la pirimidina lleva un sustituyente que empieza con un átomo de C; y

(ii) las posiciones 5 y 6 del anillo de pirimidina son parte integral de otra estructura de anillo aromático.

De manera más precisa, en un primer aspecto la presente invención está dirigida a un colorante fluorescente que tiene la fórmula:



5 caracterizado porque:

- cualquiera de A₁, A₂, A₃ y A₄ son H o uno de A₁, A₂, A₃ y A₄ es un sustituyente que es preferentemente un halogenilo, y los otros son H

10 - B se selecciona del grupo que consiste en S, O, N-R, y C-(R)₂ en el que R es C₁-C₆-Alquilo

- D es un C₁-C₆ alquilo sustituido o no sustituido

- X es H o un grupo metoxi

15 - Y se selecciona del grupo que consiste en S, O, N-R en el que R es C₁-C₆-Alquilo, y Z₁-C=C-Z₂, en el que Z₁ y Z₂ independientemente uno de otro son H o un grupo metoxi

- L es CH₃ o fenilo

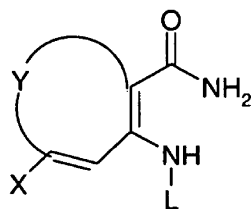
- M es fenilo o un C₁-C₁₈ amino-alquilo sustituido o no sustituido.

20 En una realización, D es -(CH₂)_n-COOH ó -(CH₂)_n-CO-Osuccininimidaa, caracterizado porque n es un número entero comprendido entre 1 y 6.

De manera ventajosa, M es -(CH₂)_n - N⁺-(CH₃)₃, en el que n es un número entero comprendido entre 1 y 18.

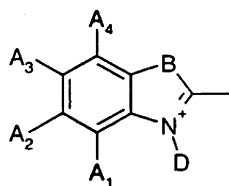
En un segundo aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento para la preparación de un colorante fluorescente de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) disponer una sustancia química que tiene la fórmula:



caracterizada porque

- X es H o un grupo metoxi
 - 10 - Y es seleccionado entre el grupo que consiste en S, O, N-R, en el que R es C₁-C₆-Alquilo, y Z₁-C=C-Z₂, en el que Z₁ y Z₂ son independientemente uno de otro H o un grupo metoxi
 - L es CH₃ o fenilo
- 15 b) hacer reaccionar dicha sustancia con un cloruro ácido sustituido a efectos de generar un derivado de 1,4-dihidropirimidin-4-ona
- c) hacer reacción dicho derivado de 1,4-dihidropirimidin-4-ona con un reactivo de tionación para
- 20 generar un derivado de 1,4-dihidropirimidin-tiona
- d) hacer reacción dicho derivado de 1,4-dihidropirimidin-tiona con yodometano para generar un derivado de 4-metiltio-pirimidina
- e) hacer reaccionar dicha 4-metiltio-pirimidina con un
- 25 compuesto de fórmula:



caracterizado porque:

- cualquiera de A₁, A₂, A₃ y A₄ son H o uno de A₁, A₂, A₃ y A₄ es un sustituyente que es preferentemente un halogenilo, y los otros son H

- B es seleccionado de un grupo que consiste en S, O, N-R, y C-(R)₂ en el que R es C₁-C₆-alquilo

- D es un C₁-C₆ alquil sustituido o no sustituido.

Los compuestos de la presente invención pueden ser utilizados para una serie de aplicaciones distintas.

En particular, los compuestos de acuerdo con la presente invención son utilizados para la detección de ácidos nucleicos de doble cadena.

En una realización, los compuestos según la presente invención son utilizados para la detección de ácidos nucleicos de doble cadena durante una reacción de amplificación de ácido nucleico en tiempo real.

En una segunda realización, los compuestos según la presente invención son utilizados para la detección de ácidos nucleicos de doble cadena durante un análisis de curva de fusión.

En otra realización, los compuestos según la presente invención son utilizados para la detección de ácidos nucleicos de doble cadena en la matriz de gel, de manera que los ácidos nucleicos de doble cadena han sido sometidos a electroforesis de gel.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Esquema de síntesis para RO3.

Figura 2. Esquema de síntesis para RO4.

Figura 3. Esquema de síntesis para R11.

5 Figura 4. Esquema de síntesis para R12.

Figura 5. Esquema de síntesis para R13 y R14.

Figura 6. Esquema de síntesis para R26.

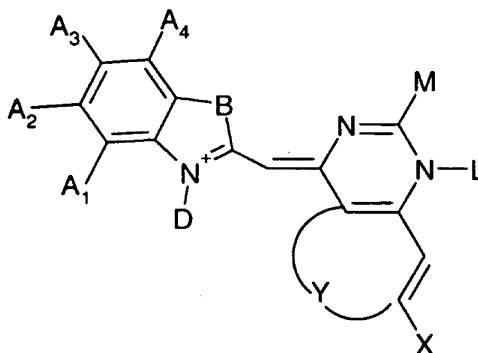
Figura 7. Esquema de síntesis para R27.

Figura 8. Esquema de síntesis para R28.

10 Descripción detallada de la invención

Compuesto según la presente invención

La presente invención está dirigida a un colorante fluorescente que tiene la fórmula:



15 caracterizada porque:

- cualquiera de A1, A2, A3 y A4 son H o uno de A1, A2, A3 y A4 es un sustituyente que es preferentemente un halogenilo y los otros son H

20 - B es seleccionado del grupo que consiste en S, O, N-R, y C-(R)₂ en el que R es C₁-C₆-alquilo

- D es un C₁-C₆ alquilo sustituido o no sustituido

- X es H o un grupo metoxi

- Y es seleccionado del grupo que consiste en S, O, N-R en el que R es C₁-C₆-alquilo, y Z1-C=C-Z2, en el que Z1 y Z2 independientemente entre sí son H o un grupo metoxi

- L es CH₃ o fenilo

5 - M es fenilo o un C₁-C₁₈ amino-alquilo sustituido o no sustituido.

Una importante característica de dicho colorante fluorescente que comprende una fracción de benzotiazolio y una fracción de pirimidinio relacionada a un puente de mono-metina es que la posición 2 de la pirimida lleva un
10 sustituyente que empieza con un átomo de C. Como consecuencia dichos componentes fluorescentes tienen una estabilidad térmica y química incrementada en comparación con otros colorantes fluorescentes conocidos en la técnica.

15 Una segunda característica importante es que las posiciones 5 y 6 del anillo de pirimidina son una parte integral de una estructura de anillo aromático adicional. Conjuntamente estas dos estructuras de anillo forman una quinazolina o en otras realizaciones otras estructuras
20 heterocíclicas. Como consecuencia, los espectros de excitación y emisión del compuesto fluorescente son distintos de los que se dan a conocer en los documentos WO 04/38038 y US 2005/233335, pero similares al de SybrGreen. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención
25 pueden ser detectados por los mismos canales de detección que los explícitamente configurados para la detección SybrGreen. Además, dentro de un armazón determinado dichos espectros de emisión pueden ser modulados escogiendo una u

otra alternativa de los sustituyentes X e Y de dicho compuesto.

Preferentemente, solamente un representante de A1, A2, A3 y A4 es una sustitución. También de forma preferente
5 dicha sustitución es un halogenilo que de manera más preferente es un átomo de fluor. Asimismo es altamente preferente B como átomo de azufre.

En los casos en los que el compuesto fluorescente se utilizará como colorante no conjugado a una segunda
10 fracción química, D es un grupo metilo u otro grupo C₂-C₆ alquilo. No obstante, en casos en los que el compuesto fluorescente de la presente invención estará conectado a una segunda entidad química, D es -(CH₂)_n-COOH ó -(CH₂)_n-COOsuccininimida, caracterizada porque n es un número
15 entero comprendido entre 1 y 6. Preferentemente, para estos casos n es 3 ó 4. El compuesto fluorescente puede estar unido por intermedio de los respectivos grupos a cualquier tipo de otra molécula, y en particular a biomoléculas. Por ejemplo, este compuesto puede estar unido al extremo 5' de
20 un oligonucleótido. El conjugado resultante puede actuar entonces como sonda de hibridación que, después de excitación apropiada, emite fluorescencia solamente cuando dicho oligonucleótido ha sido hibridizado a una secuencia de ácido nucleico objetivo complementaria.

25 En una realización, L es un grupo fenilo y M es un C₁-C₁₈ amino-alquilo sustituido o no sustituido. Alternativamente, M es un fenilo y L un grupo metilo. También de forma alternativa L es un grupo metilo y M es un grupo C₁-C₁₈ amino-alquilo sustituido o no sustituido. Las

realizaciones en las que L y M son grupos fenilo son menos preferentes porque estas moléculas tienden a tener menos propiedades de intercalación con ADN. En particular, M puede ser $-(CH_2)_n - N^+-(CH_3)_3$, en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 18.

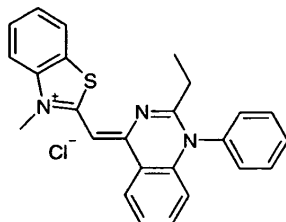
La estructura de anillo aromático adicional conectada a la pirimidina con intermedio de su posición 5- y 6- (tal como se ha definido dentro de la propia pirimidina) en una realización es un anillo de fenilo, tal que se forma una quinazolina. Este anillo de fenileno puede estar sustituido por uno o dos grupos metoxi en las posiciones 6 y/o 7 del sistema del anillo de quinazolina.

En otra realización la estructura de anillo aromático es un penta-heterociclo que tiene un átomo de azufre que forma una tieno[3,2-d]pirimidina.

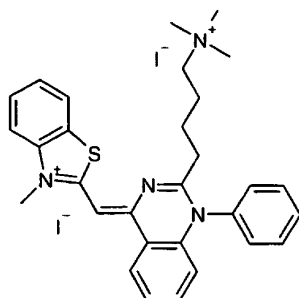
Además, cuando dichos compuestos según la invención se encuentran presentes en estado sólido, el contraión preferente es un halógeno tal como yodo o cloro.

Son compuestos altamente preferentes los de las estructuras siguientes:

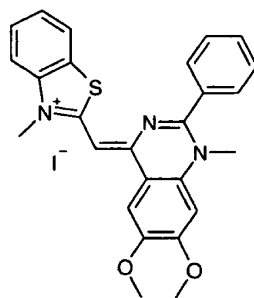
R03:



R04:

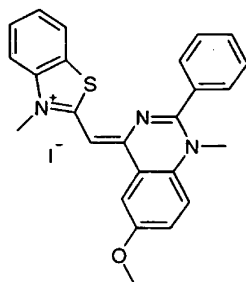


R11:

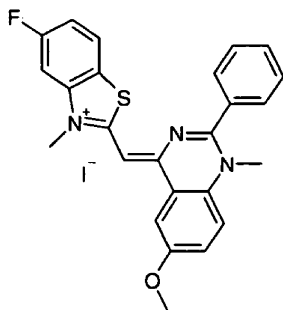


5

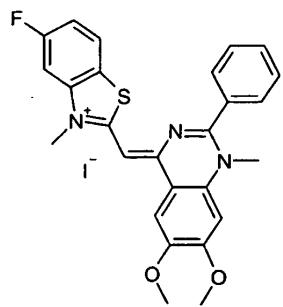
R12:



R13:

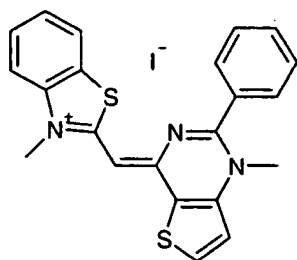


R14:

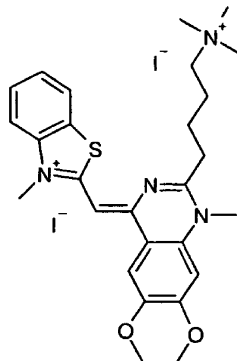


5

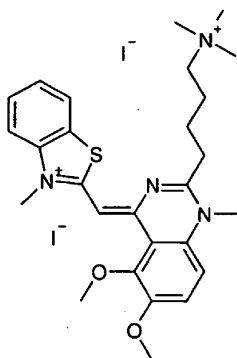
R26:



R27:



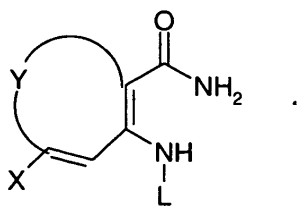
R28:



5 Procedimientos según la presente invención

Todos los compuestos que se han dado a conocer de acuerdo con la invención se pueden sintetizar en un método específico de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, la presente invención está dirigida también a un procedimiento para la preparación de un colorante fluorescente de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las siguientes etapas:

a) disponer una sustancia química que tiene la fórmula



caracterizado porque:

- X es H o un grupo metoxi
- Y se selecciona entre el grupo que consiste en S, O, N-R, en el que R es C₁-C₆-alquilo, y Z1-C=C-Z2, en el que Z1 y Z2 independientemente entre sí son H o un grupo metoxi

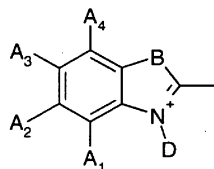
- L es CH₃ o fenilo

b) hacer reaccionar dicha sustancia con un cloruro ácido sustituido para generar un derivado de 1,4-dihidropirimidin-4-ona

c) hacer reaccionar dicho derivado de 1,4-dihidropirimidin-4-ona con un reactivo de tionilación a efectos de generar un derivado de 1,4-dihidropirimidin-tiona

d) hacer reaccionar dicho derivado de 1,4-dihidropirimidin-tiona con yodometano a efectos de generar un derivado de 4-Metiltiopirimidina

e) hacer reaccionar dicho derivado de 4-Metiltiopirimidina con un compuesto que tiene la fórmula



20

caracterizado porque:

- cualquiera de A1, A2, A3 y A4 son H o uno de A1, A2, A3 y A4 es un sustituyente que es preferentemente un halogenilo y los otros son H

- B es seleccionado entre un grupo que consiste en S, O, N-R, y C-(R)₂ en el que R es C₁-C₆-alquilo

- D es un C₁-C₆ alquilo sustituido o no sustituido.

En el contexto de la presente invención un agente de tionación se define como un reactivo que transforma un grupo carbonilo en un grupo tiocarbonilo. Preferentemente este reactivo es un reactivo de Lawesson (catálogo FLUKA).

De manera más precisa, el procedimiento de la invención se puede dar a conocer del modo siguiente:

Los materiales iniciales para la síntesis de los nuevos colorantes que se unen a ds DNA son en general compuestos orto amino-carboxi aromáticos que se encuentran a disposición comercialmente o que se pueden sintetizar de acuerdo con los procedimientos habituales descritos en la literatura. Estos compuestos aromáticos pueden consistir en estructuras de anillos de arilo y heteroarilo que pueden ser sustituidos además en adición a la función amino y carboxi en ciertas posiciones del anillo. Son compuestos preferentes teniendo en cuenta la presente invención el ácido 2-amino benzoico u otros ácidos 2-amino-benzoicos sustituidos y especialmente derivados que llevan uno o dos grupos metoxi. Los ácidos orto amino-carboxílicos heteroaromáticos preferentes tienen una estructura de anillo de cinco miembros, poseyendo un átomo de azufre, oxígeno o nitrógeno tal como en el tiofeno, furano y

pirrol. La posición preferente de los grupos orto amino-carboxílicos es la sustitución 3-amino-2-carboxi.

El grupo amino de los compuestos orto amino-carboxi aromáticos puede poseer o bien un segundo sustituyente o uno de los átomos de hidrógeno es sustituido en una etapa posterior de la síntesis de los nuevos colorantes. Estos sustituyentes pueden comprender cadenas alquilo o son compuestos arilo. Son especialmente preferentes metilo o fenilo.

Si los compuestos aromáticos con grupos orto amino-carboxi poseen ya el sustituyente apropiado en el grupo amino, éstos pueden ser reaccionados directamente con una amina por activación a un cloruro ácido, utilizando, por ejemplo, cloruro de tionilo o dicloruro de oxalilo u otros métodos habituales y haciendo reaccionar habitualmente con amoniaco pasando a la amida. Por ejemplo, el ácido N-fenil-antralínico puede ser transformado en amida N-fenil-antralínica con el método que se da a conocer.

En caso de que los compuestos aromáticos con grupos orto amino-carboxi necesiten ser sustituidos adicionalmente en el grupo amino, el procedimiento es el siguiente: en primer lugar una reacción, por ejemplo, con etil cloroformato, fosgeno, difosgeno o trifosgeno que se lleva a cabo para formar una benz-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona, una benz-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona sustituida o una heterociclo-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona. El nitrógeno de la benz-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona o una benz-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona sustituido o heterociclo-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona se puede sustituir por el siguiente procedimiento de

alquilación. En primer lugar, se lleva a cabo una desprotonación utilizando una base fuerte, tal como por ejemplo hidruro sódico, y el anión formado de esta manera reacciona con un haluro de alquilo o un compuesto de alquilo con otros grupos cedentes, tales como por ejemplo 5 tosilato, para formar una benz-3-alquilo-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona, una benz-3-alquilo-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona sustituida o una heterociclo-3-alquilo-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona. Es especialmente preferente la reacción con 10 yodometano, pasando a benz-3-metil-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona, una benz-3-metil-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona sustituida o una heterociclo-3-metil-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona.

En una tercera etapa la benz-3-alquilo-3H- 15 (1,3)oxacina-2,6-diona, benz-3-alquilo-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona sustituida o heterociclo-3-alquilo-3H-(1,3)oxacina-2,6-diona es obligada a reaccionar con amoniaco para conseguir 2-alquiloamino-benzamida, 2-alquiloaminobenzamida sustituida, o un compuesto heterocíclico de ácido 3- 20 alquilometil-2-carboxílico amida, especialmente un derivado de tiofeno, furano o pirrol.

Las amidas preparadas de este modo fenilen-, fenilen sustituido, o amidas heterocíclicas - ácido orto arilo- o alquilamino carboxílico se pueden transformar en los 25 derivados apropiados de 1H-quinazolin-4-ona o los derivados de 1H-pirimidin-4-ona con una estructura de anillo heterocíclico de 5 miembros condensada por una reacción con cloruros ácidos de alquilo o arilo o cloruros de ácido alquil-aril carboxílico sustituidos. En vez de cloruros de

ácido carboxílico se pueden aplicar otros aditivos tales como anhídridos, anhídridos mixtos o aldehidos con oxidación subsiguiente con permanganato potásico. En el caso de, por ejemplo, cloruros de ácido alquil carboxílico sustituido el sustituyente puede consistir en grupos amino 5 o grupos amino alquilados o un precursor que puede ser transformado en un grupo amino, tal como por ejemplo un haluro, que puede reaccionar con amoniaco o aminas sustituidas para formar una amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria en la cadena lateral en la posición 10 2.

En la siguiente etapa la función carbonilo del derivado de 1H-quinazolin-4-ona o el derivado 1H-pirimidin-4-ona con una estructura de anillo heterocíclico condensado 15 de 5 miembros se hace reaccionar adicionalmente, por ejemplo, con pentasulfuro fosforoso o reactivo de Lawesson para conseguir los derivados de 1H-quinazolin-4-tion o derivados 1H-pirimidin-4-tion con una estructura de anillo heterocíclico condensada de 5 miembros.

En la siguiente etapa los derivados de 1H-quinazolin-4-tion o bien los derivados de 1H-pirimidin-4-ona con una estructura de anillo heterocíclico condensada de 5 miembros, tales como tieno, furo o pirrol, son metilados con yodometano u otros reactivos tales como, por ejemplo, 25 dimetilsufato para proporcionar una sal 2-alkuil/alkuilo sustituido/o aril-4-metilsulfanil-1-alkuil/o aril-quinazolin-1-io o el 2-alkuil/alkuilo sustituido/o aril-4-metilsulfanil-1-alkuilo/o aril-tieno(3,2-d)pirimidin-1-io o los derivados análogos furo o pirrolo.

Finalmente estos compuestos se hacen reaccionar con 3-
alquil-2-metil-benzotiazol-3-io yodo o con 3-alquil-2-
metil-benzotiazol-3-io yodo sustituido adicionalmente, en
condiciones básicas, que se encuentran a disposición
5 comercialmente o que se pueden sintetizar de acuerdo con
procedimientos publicados para conseguir los nuevos
colorantes que se unen a ds ADN. El contraíón se puede
variar de acuerdo con los reactivos aplicados para la
alquilación en la posición 3 del 2-metil-benzatiazol o
10 intercambiado en el producto final.

Aplicación de los compuestos fluorescentes según la
presente invención

Los compuestos de la presente invención pueden ser
utilizados para una serie de distintas aplicaciones. Del
15 modo más importante, los compuestos pueden ser utilizados
para detectar ácidos nucleicos de doble cadena. Dado que se
sabe que algunos colorantes asimétricos de carbocianina se
intercalan en ácidos nucleicos de doble cadena, tales como
ADN de doble cadena, y/o se unen en la ranura menor de la
20 hélice doble de ADN, existe la evidencia de que la forma de
unir ADN de doble cadena por compuestos de la presente
invención es similar sino idéntico.

En una realización los compuestos según la invención
son utilizados para la detección de ácidos nucleicos de
25 doble cadena en la matriz de un gel en el que se han
sometidos ácidos nucleicos de doble cadena a electroforesis
de gel. En primer lugar se lleva a cabo una electroforesis
en gel de ácido nucleico en gel de agarosa o en un gel de
acril amida de acuerdo con métodos estándar conocidos en

esta técnica. A continuación, dicho gel es incubado preferentemente con agitación suave continua en una solución acuosa que contiene 0,2 a 1,5 µg/ml de un compuesto del tipo que se ha indicado en lo anterior.

5 Preferentemente, se utiliza una concentración de 0,7 µg/ml.

En otra realización, los compuestos según la presente invención son utilizados para la detección de ácidos nucleicos de doble cadena durante una reacción de amplificación de ácido nucleico en tiempo real. En este
10 contexto, el compuesto de la invención es una parte de una mezcla de reacción PCR y se encuentra presente ya al inicio de la reacción de amplificación. Tal como se ha mostrado por los inventores, los compuestos de la invención no interfieren con la eficacia de dicha reacción de
15 amplificación PCR.

Por lo tanto, una mezcla de acuerdo con la presente invención comprende, como mínimo:

- un compuesto de acuerdo con la presente invención,
TAL COMO SE HA INDICADO EN LO ANTERIOR
- 20 - una ADN polimerasa termoestable
- una mezcla de trifosfatos desoxinucleósidos que es habitualmente dA, dG, dC y dT, o dA, dG, dC y dU y
- un tampón.

Cuando son adecuados para amplificación de una o
25 varias secuencias objetivo de ácido nucleico específicas, esta mezcla de reacción PCR puede comprender:

- un compuesto de acuerdo con la presente invención
- una ADN polimerasa termoestable

- una mezcla de trifosfatos desoxinucleósidos que es habitualmente dA, dG, dC y dT o dA, dG, dC y dU,

- un tampón, y

- como mínimo un par de cebadores de amplificación.

5 Dicho par de cebadores de amplificación está diseñado para amplificar una secuencia específica de interés de acuerdo con métodos estándar conocidos en la técnica de biología molecular.

Además, cuando se lleva a establecer contacto con una muestra que se debe analizar, dicha mezcla de reacción PCR comprende

- un compuesto, según la presente invención

- una ADN polimerasa termoestable,

- una mezcla de trifosfatos desoxinucleósidos que es habitualmente dA, dG, dC y dT o dA, dG, dC y dU,

- un tampón,

- como mínimo un par de cebadores de amplificación

- un ácido nucleico, como mínimo parcialmente purificado, que putativamente comprende una secuencia específica de interés.

Dicho ácido nucleico parcialmente purificado es preferentemente ADN genómico total o alternativamente ARN celular total o mRNA celular total. En el caso de ARN, la ADN polimerasa termoestable es una ADN polimerasa o una mezcla de ADN polimerasas comprendiendo actividad de transcriptasa inversa.

Las concentraciones de todos los reactivos incluidos son conocidas aproximadamente por los técnicos en la materia y se pueden optimizar para adaptaciones específicas

de acuerdo con protocolos estándar. La concentración del compuesto fluorescente, de acuerdo con la presente invención, es de 0,1 a 10,0 µg/ml preferentemente de 0,6 µg/ml.

5 En otra realización, los compuestos, según la invención, son utilizados para la detección de ácidos nucleicos de doble cadena durante un análisis de curva de fusión, tal como se ha dado a conocer para otros compuestos conocidos en esta técnica. De manera más precisa, un
10 fragmento de ADN de doble cadena es sometido a un gradiente térmico en presencia de un compuesto de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, el gradiente es un gradiente continuo, pero también son posibles gradientes escalonados. Más preferentemente, el gradiente es un
15 gradiente lineal. En una realización específica, la muestra es sometida a un incremento de temperatura que tiene como resultado la generación de una curva de disociación. En otra realización, la molécula objetivo de doble cadena es desnaturalizada térmicamente en primer lugar en cadenas
20 simples y se controla la dependencia de la fluorescencia en cuanto a la temperatura durante la renaturalización subsiguiente.

La concentración del compuesto fluorescente, de acuerdo con la invención para un análisis de curva de
25 fusión, está comprendida entre 0,1 a 10,0 µg/ml y preferentemente es de 0,6 µg/ml.

Preferentemente, el fragmento de ADN de doble cadena que será analizado se deriva de una reacción de amplificación PCR. Además, el control de amplificación en

tiempo real se puede monitorizar utilizando un compuesto de acuerdo con la invención y se puede seguir por cualquier análisis de curva de fusión subsiguiente utilizando dicho compuesto. Preferentemente, ese procedimiento es realizado de forma homogénea sin apertura intermedia del recipiente de reacción.

De forma alternativa, es posible mezclar los complementos de dos variantes distintas de una secuencia que se origina de dos muestras diferentes antes del propio experimento de la curva de fusión. En una primera etapa, los dos ADN de doble cadena son mezclados y térmicamente desnaturalizados en cadenas únicas. La disminución subsiguiente de la temperatura tiene como resultado la formación de híbridos mixtos de doble cadena. Las variaciones en las secuencias de los dos ADN originales resultan en faltas de correspondencia que resultan adicionalmente en una temperatura de fusión más baja de los híbridos mixtos que se han generado. Estas faltas de correspondencia son detectadas por medio del control de la dependencia de temperatura de la señalización fluorescente durante el subsiguiente incremento de temperatura.

También de forma alternativa es posible añadir una sonda de ácido nucleico de cadena única con una concentración molar en exceso a una muestra de ácido nucleico de doble cadena tal como amplicon PCR. En este caso, la curva de fusión mide el comportamiento de fusión del complejo sonda/amplicon. En el caso de faltas de correspondencia entre la sonda y el objetivo se observan temperaturas de fusión más bajas.

Además, es posible utilizar una sonda de hibridación de oligonucleótidos para análisis de la curva de fusión caracterizada porque un compuesto fluorescente de acuerdo con la invención es enlazado de forma covalente a dicha sonda de hibridación. Después de la hibridación de dicha sonda, se genera una estructura por lo menos parcialmente de doble cadena y se controla la señalización fluorescente del compuesto fluorescente.

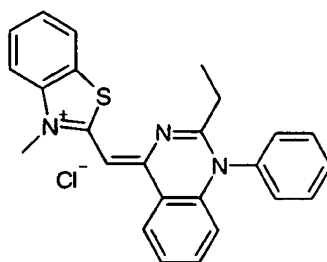
Los siguientes ejemplos y figuras se facilitan para la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero ámbito es el indicado por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1:

15 **Síntesis de R03**

R03:



1) 2-Fenilamino-benzamida

10 g (46,9 mmol) de ácido N-fenilantranílico fueron disueltos en 100 ml de tolueno y se añadieron 8,37 g (5,10 ml, 70,3 mmol) de cloruro de tionilo. La mezcla fue sometida a ebullición durante 30 minutos, se evaporó y el residuo de color rojo se añadió a 30 ml de amoniaco concentrado. La suspensión fue agitada durante una noche,

filtrada y cristalizada a partir de una mezcla de acetato de etilo/metanol.

Rendimiento: 6,0g= 60% de material en polvo amarillo-naranja

5 **2) 2-Etil-1-fenil-1H-quinazolin-4-ona**

Se disolvieron 2,0 g (9,42 mmol) de 2-fenilamino-benzamida en 30 ml de triclorometano, la solución fue enfriada a 0°C y se añadieron lentamente 2,61 g (2,44 ml, 28,2 mmol) de cloruro de propionilo. La mezcla fue sometida a ebullición durante 90 minutos y después de ello fue neutralizada con solución de bicarbonato sódica saturada. Después de la evaporación, la sustancia fue cristalizada a partir de isopropanol.

10 Rendimiento: 1,85g = 78% de material en polvo de color amarillo.

3) 2-Etil-1-fenil-1H-quinazolin-4-tiona

1,50 g (5,99 mmol) de 2-etil-1-fenil-1H-quinazolin-4-ona y 2,42 g (5,99 mmol) de reactivo de Lawesson (C₁₄H₁₄O₂P₂S₄, Fluka) fueron suspendidos en 40 ml de tolueno y sometidos a ebullición durante 1 hora. Después de evaporación, la mezcla en bruto fue purificada por cromatografía de columna sobre gel de sílice con eluyente de diclorometano/acetona 95/5.

20 Rendimiento 1,36g = 85% de material en polvo de color naranja.

4) 2-Etil-4-metilsulfanil-1-fenil-quinazolin-1-io

1,0 g (3,72) de 2-etil-1-fenil-1H-quinazolin-4-tiona fueron añadidos a 15 ml de yodometano y se agitó durante 1 hora. La mezcla fue filtrada y lavada con etil éter.

Rendimiento: 1,0 g = 65%

5) Yoduro de 2,3-Dimetil-benzotiazol-3-io

14,9 g (12,7 ml, 0,10 mol) de 2-metil-benzotiazol y 28,4 g (12,5 ml, 0,20 mol) de yodometano fueron sometidos a ebullición durante 7 horas en 20 ml de etanol. El residuo fue filtrado y lavado con etanol.

Rendimiento: 17,0 g = 58% de material en polvo incoloro

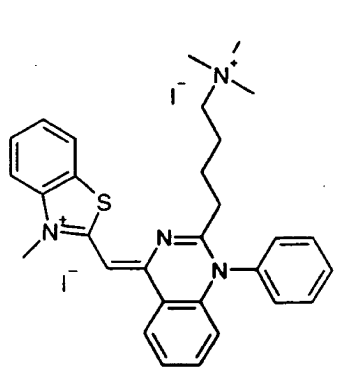
6) Cloruro de 2-(2-Etil-1-fenil-1H-quinazolin-4-ilidenmetil)-3-metil-benzotiazol-3-io

400 mg (1,37 mmol) de yoduro de 2,3-dimetil-benzotiazol-3-io y 559 mg (1,37 mmol) de 2-etil-4-metilsulfanil-1-fenil-quinazolin-1-io fueron disueltos en 10 ml de dimetilformamida y se añadieron 554 mg (0,76 ml, 5,47 mmol) de trietilamina. La mezcla fue agitada durante 1 hora a 80°C. El residuo fue filtrado y lavado con ácido clorhídrico (10%).

Rendimiento: 250 mg= 42%

Ejemplo 2:

20 Síntesis de R04



1) 2-(3-Dimetilamino-butil)-1-fenil-1H-quinazolin-4-ona

3,80 g (20,9 mmol) de ácido dimetilamino-pentanoico fueron añadidos a 25 ml de cloruro de tionilo y se agitó

durante 90 minutos a 55-60°C. El cloruro tionilo restante fue destilado en vacío y el residuo fue añadido a una solución de 2,00g (9,42 mmol) de 2-fenilamino-benzamida (ver anterior) en 30 ml de triclorometano a 0°C. La mezcla
5 de reacción fue sometida a ebullición durante 4 horas y agitada durante una noche a temperatura ambiente. El residuo fue filtrado y disuelto en diclorometano y saturado en una solución de bicarbonato sódico. El disolvente orgánico fue secado sobre sulfato magnésico y evaporado. El
10 aceite de color amarillo cristalizó lentamente.

Rendimiento: 1,90g = 63% cristales de color amarillo

2) 2-(3-Dimetilamino-butil)-1-fenil-1H-quinazolin-4-tiona

550 mg (1,71 mmol) de 2-(3-Dimetilamino-butil)-1-fenil-1H-quinazolin-4-ona se disolvieron en 10 ml de
15 piridina y se añadieron 445 mg (2,00 mmol) de pentosulfuro de fósforo. La mezcla de reacción fue sometida a ebullición durante 90 minutos. Después de evaporación del disolvente, el residuo fue disuelto en diclorometano y lavado con solución de hidróxido sódico 2N. La solución orgánica fue
20 secada con sulfato magnésico y evaporada. El producto en bruto fue purificado adicionalmente por cromatografía de columna sobre sílice con eluyente diclorometano/metanol/trietilamina 9/1/0,1

Rendimiento: 375 mg= 65% de material en polvo de color
25 amarillo-naranja.

3) Diyoduro de 2-(4-Trimetilamonio-butil)-4-metilsulfanil-1-fenil-quinazolin-1-io

300 mg (0,89 mmol) de 2-(3-Dimetilamino-butil)-1-fenil-1H-quinazolin-4-tiona fueron disueltos en 5 ml de

yodometano y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla fue filtrada y el residuo lavado con etil éter y diclorometano.

Rendimiento: 370 mg = 845 dematerial en polvo de color
5 amarillo.

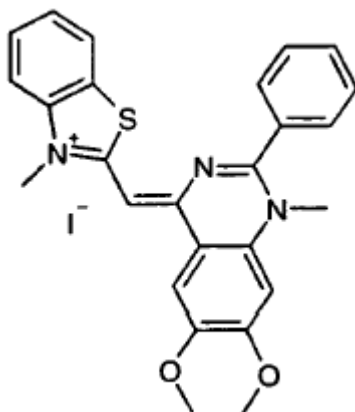
4) Yoduro de 2-(2-(4-Trimetilamonio-butil)-1-fenil-1H-quinazolin-4-ilidenmetil)-3-benzotiazol-3-io

300 mg (0,48 mmol) de dyoduro de 2-(4-Trimetilamonio-butyl)-4-metilsulfanil-1-fenil-quinazolin-1-io y 177 mg
10 (0,61 mmol) de yoduro de 2,3-Dimetilbenzotiazol-3-io se disolvieron en 2 ml de dimetilformamida y se añadieron 247 mg (0,34 ml, 2,44 mmol) de trietilamina. La suspensión fue agitada durante 1 h a 80°C, filtrada y lavada con agua, diclorometano y metanol.

15 Rendimiento: 350 mg = 100% de material en polvo de color rojo.

Ejemplo 3

Síntesis de R11



20

1) 6,7-Dimetoxi-1H-benzo(d)(1,3)oxazina-2,4-diona

10,0 g (50,7 mmol) de ácido 2-Amino-4,5-dimetoxi-benzoico fueron disueltos en 150 ml de tetrahidrofurano. Se

añadieron 6,52 g (22,0 mmol) de trifosgeno y la solución fue sometida a ebullición durante 3 h. Después de equilibrar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción fue vertida sobre una mezcla de agua/hielo. El residuo fue
5 filtrado y lavado con metanol. Rendimiento: 8,7 g = 86% de material en polvo de color gris.

2) 6,7-Dimetoxi-1-metil-1H-benz(d)(1,3)oxazina-2,4-diona

9,00 g (40,3 mmol) de 6,7-Dimetoxi-1H-benzo(d)(1,3)oxazina-2,4-diona se disolvieron en 60 ml de
10 dimetil-formamida seca y se enfrió a 0°C. Se añadieron 1,32 g (52,3 mmol) de hidruro sódico y la solución fue agitada durante 30 min a temperatura ambiente (Argon). Después de enfriar a 0°C se añadieron nuevamente 7,42 g (3,27 ml, 52,3 mmol) de yodometano y se agitó a temperatura ambiente
15 durante una hora. Se añadieron 300 ml de agua y el residuo fue filtrado, lavado con agua y etil éter.

Rendimiento: 8,5 g = 89% de material en polvo de color gris.

3)4,5-Dimetoxi-2-metilamino-benzamida

20 2,40 g (10,1 mmol) de 6,7-Dimetoxi-1-metil-1H-benz(d)(1,3)oxazina-2,4-diona fueron disueltos en 30 ml de tetrahidrofurano y se añadieron 15 ml de amoniaco (25%) a 0°C. La solución fue agitada durante 30 min a 0°C y durante 30 min a temperatura ambiente. Se destiló THF en vacío y la
25 suspensión restante fue neutralizada con ácido clorhídrico diluido. El producto fue aislado por filtrado.

Rendimiento: 2,00 g = 94% de material en polvo de color gris.

4) 6,7-Dimetoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-ona

2,00 g (9,51 mmol) de 4,5-Dimetoxi-2-metilamino-benzamida fueron disueltos en 20 ml de diclorometano y se añadieron 4,01 g (3,31 ml, 28,55 mmol) de cloruro de benzoilo. La mezcla fue sometida a ebullición durante 90 min. Después del filtrado, el residuo fue disuelto en triclorometano y solución de bicarbonato sódico saturada. La solución orgánica fue secada sobre sulfato magnésico y evaporada en vacío.

10 Rendimiento: 2,30 g = 82% de material en polvo de color amarillo.

5) 6,7-Dimetoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-tiona

1,50 g (5,06 mmol) de 6,7-Dimetoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-ona) y 2,00 g (4,94 mmol) del reactivo de Lawesson ($C_{14}H_{14}O_2P_2S_4$, Fluka) se disolvieron en 20 ml de tolueno. La mezcla de reacción fue sometida a ebullición durante 2 h. Después de la evaporación, el residuo fue purificado adicionalmente por columna de cromatografía con sílice, eluyente diclorometano/acetona 95/5.

20 Rendimiento: 1,25 g = 79% de material en polvo de color naranja.

6) Yoduro de 6,7-Dimetoxi-1-metil-4-metilsulfanil-2-fenil-quinazolin-1-io

1,00 g (3,20 mmol) de 6,7-Dimetoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-tiona se añadió lentamente a 5 ml (80 mmol) de yodometano a 0°C y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La solución fue filtrada y el residuo fue lavado con etil éter y diclorometano.

Rendimiento: 1,20 g = 82% de material en polvo de color amarillo.

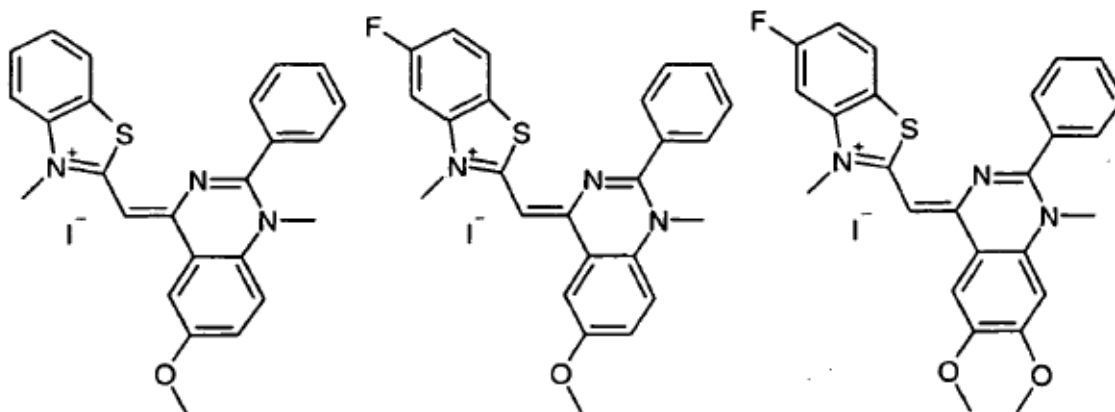
7) Yoduro de 2-(6,7-Dimetoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-ilidenmetil)-3-metil-benzotiazol-3-io

5 500 mg (1,10 mmol) de yoduro de 6,7-Dimetoxi-1-metil-4-metilsulfanil-2-fenil-quinazolin-1-io y 320 mg (1,10 mmol) de yoduro de 2,3-Dimetil-benzotiazol-3-io fueron disueltos en 200 ml dimetilformamida y se añadieron 445 mg (0,61 ml, 4,40 mmol) de trietilamina. La solución fue
10 agitada durante 1h a 80°C, filtrada y el residuo fue lavado con agua y metanol.

Rendimiento: 450 mg = 72% de material en polvo de color rojo naranja.

Ejemplo 4

15 **Síntesis de R12, R13 y R14**



R12

1) 6-Metoxi-1H-benzo(d)(1,3)oxazina-2,4-diona

5,00 g (21,6 mmol) de ácido 2-Bromo-5-metoxi-benzoico,
20 620 mg (4,32mmol) de bromuro de cobre (I) y 2,63 g (32,4 mmol) de cianato potásico fueron disueltos en piridina y sometidos a ebullición durante 30 min. El disolvente fue eliminado y el residuo disuelto en 150 ml de

ácido clorhídrico 2N y 150 ml acetato de etilo. El disolvente orgánico fue tratado con agua y salmuera, secado sobre sulfato magnésico y eliminado. El residuo fue sometido a digestión con metanol.

5 Rendimiento: 2,50 g = 61 % de material en polvo de color gris.

2) 6-Metoxi-1-metil-1H-benz(d)(1,3)oxazina-2,4-diona

2,00 g (10,4 mmol) de 6-Metoxi-1H-benzo(d)(1,3)oxazina-2,4-diona se disolvieron en
10 dimetilformamida seca y se enfrió a 0°C. Se añadieron lentamente 324 mg (13,5 mmol) de hidruro sódico (Argón) y la mezcla fue agitada durante 30 min a temperatura ambiente. Después de enfriar nuevamente a 0°C se añadieron
15 a temperatura ambiente, el residuo fue filtrado y lavado con agua y etil éter.

Rendimiento: 1,62 g = 75% de material en polvo de color gris.

3) 5-Metoxi-2-metilamino-benzamida

20 1,50 g (7,24 mmol) de 6-Metoxi-1-metil-1H-benz(d)(1,3)oxazina-2,4-diona se disolvieron en 20 ml de tetrahidrofurano y se añadieron 10,0 ml de amoniaco (25%) a 0°C. La solución fue agitada durante 30 min a 0°C y durante 30 min a temperatura ambiente. Se separó THF por
25 destilación en vacío y la suspensión restante fue neutralizada con ácido clorhídrico diluido. El producto fue aislado por filtrado.

Rendimiento: 1,00 g = 77% de material en polvo de color marrón.

4) 6-Metoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-ona

1,00 g (5,55 mmol) de 5-Metoxi-2-metilamino-benzamida fue disuelto en 25 ml de triclorometano y se añadió 2,34 g (1,93 ml, 16,6 mmol) de cloruro benzoilo. La mezcla fue
5 sometida a ebullición durante 90 min. Después de filtrado, el residuo fue disuelto en triclorometano y solución saturada de bicarbonato sódico. La solución orgánica fue secada sobre sulfato magnésico y evaporada en vacío.
Rendimiento: 1,30 g = 88% de material en polvo de color
10 amarillo

5) 6-Metoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-tiona

1,20 g (4,51 mmol) de 6-Metoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-ona y 1,82 g (4,50 mmol) de reactivo de Lawesson ($C_{14}H_{14}O_2P_2S_4$, Fluka) se disolvieron en 20 ml de
15 tolueno. La mezcla de reacción fue sometida a ebullición durante 3 h. Después de la evaporación, el residuo fue purificado adicionalmente por cromatografía de columna con sílice, eluyente diclorometano/acetato 95/5.
Rendimiento: 1,20 g = 94% de material en polvo de color
20 naranja.

6) Yoduro de 6-Metoxi-1-metil-4-metilsulfanil-2-fenil-quinazolin-1-io

1,00 g (3,54 mmol) de 6-Metoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-tiona se añadieron lentamente a 5 ml (80 mmol)
25 de yoduro de metilo a 0°C y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La solución fue filtrada y el residuo lavado con etil éter y diclorometano.
Rendimiento: 1,25 g = 83% de material en polvo de color amarillo.

7) Yoduro de 2-(6-Metoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-ilidenmetil)-3-metil-benzotiazol-3-io

600 mg (1,41 mmol) de yoduro de 6-Metoxi-1-metil-4-metilsulfanil-2-fenil-quinazolin-1-io y 412 mg (1,41 mmol) de yoduro de 2,3-dimetil-benzotiazol-3-io fueron disueltos en 2,0 ml de dimetilformamida y se añadieron 571 mg (0,79 ml, 5,64 mmol) de trietilamina. La solución fue agitada durante 1 h a 80°C, filtrada y el residuo fue lavado con agua y metanol.

10 Rendimiento: 650 mg = 85% de material en polvo de color rojo.

R13

1) Yoduro de 5-fluoro-2,3-dimetil-benzotiazol-3-io

15 13,0 g (10,4 ml, 77,7 mmol) de 5-fluoro-2-metil-benzotiazol y 22,1 g (9,47 ml, 156 mmol) de yodometano se sometieron a ebullición en etanol durante 7 h. El residuo fue filtrado. 4,00 g = 17% de material en polvo de color blanco.

20 2) Yoduro de 5-fluoro-2-(6-metoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-ilidenmetil)-3-metil-benzotiazol-3-io

600 mg (1,41 mmol) de yoduro de 6-Metoxi-1-metil-4-metilsulfanil-2-fenil-quinazolin-1-io y 436 mg (1,41 mmol) de yoduro de 5-fluoro-2,3-dimetil-benzotiazol-3-io fueron disueltos en 3,0 ml de dimetilformamida y se añadieron 571 mg (0,79 ml, 5,64 mmol) de trietilamina. La solución fue agitada durante 1 h a 80°C, filtrada y el residuo fue lavado con agua y metanol.

Rendimiento: 600 mg = 76% de material en polvo de color rojo naranja.

R14

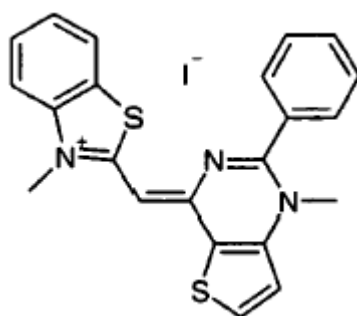
5 1) **Yoduro de 2-(6,7-dimetoxi-1-metil-2-fenil-1H-quinazolin-4-ilidenmetil)-5-fluoro-3-metil-benzotiazol-3-io**

500 mg (1,10 mmol) de yoduro de 6,7-Dimetoxi-1-metil-4-metilsulfanil-2-fenil-quinazolin-1-io (ver anterior) y 340 mg (1,10 mmol) de yoduro de 5-fluoro-2,3-dimetil-benzotiazol-3-io fueron disueltos en 3,0 ml de dimetilformamida y se añadieron 445 mg (0,61 ml, 4,40 mmol) de trietilamina. La solución fue agitada durante 1 h a 80°C, filtrada y el residuo fue lavado con agua y metanol.

15 Rendimiento: 400 mg = 62% de material en polvo de color rojo.

Example 5

Síntesis de R26



20 1) **1H-tieno(3,2-d)(1,3)oxazina-2,4-diona**

40 g (250 mmol) de metil éster del ácido 3-Aminotiofeno-2-carboxílico se suspendieron en 250 ml de agua con 21,0 g (374 mmol) de hidróxido potásico. La mezcla fue sometida a ebullición en una estufa de microondas (500 W)

durante 30 min y después se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota una solución de 37,1 g (125 mmol) de trifosgeno en 200 ml de tolueno y la mezcla de la reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. El residuo fue aislado por filtrado. El producto fue lavado con agua y solución de bicarbonato sódico. Para purificación adicional se puede lavar con etil éter y metanol después de secado.

Rendimiento: 22 g = 52% incoloro.

2) 1-metil-1H-tieno(3,2-d)(1,3)oxazina-2,4-diona

3,60 (21,3 mmol) de 1H-tieno(3,2-d)(1,3)oxazina-2,4-diona se disolvieron en dimetilformamida seca y se enfrió a 0°C. Se añadieron lentamente 664 mg (27,7 mmol) de hidruro sódico (Argón) y la mezcla fue agitada durante 30 min a 0°C y 30 min a temperatura ambiente. Después de enfriar nuevamente a 0°C, se añadieron 3,93 g (1,73 ml, 27,7 mmol) de yodometano. Después de agitación durante 1 h a temperatura ambiente se añadieron 200 ml de agua. El residuo fue filtrado y lavado con agua y etil éter.

Rendimiento: 2,70 g = 69% de material en polvo de color beige.

3) Amida del ácido 3-metilamino-tiofeno-2-carboxílico

2,60 g (14,2 mmol) de 1-metil-1H-tieno(3,2-d)(1,3)oxazina-2,4-diona fueron disueltos en 30 ml de tetrahidrofurano y se añadieron 15,0 ml de amoniaco (25%) a 0°C. La solución fue agitada durante 30 min a 0°C y durante 30 min, a temperatura ambiente. Se separó por destilación en vacío el THF y la suspensión restante fue neutralizada con ácido clorhídrico diluido. El producto fue aislado por filtrado.

Rendimiento: 1,76 g = 79% de material en polvo de color beige.

4) 1-metil-2-fenil-1H-tieno(3,2-d)pirimidina-4-ona

1,70 g (10,9 mmol) de la amida del ácido 3-metilamino-
5 tiofeno-2-carboxílico fueron disueltos en 20 ml de
triclorometano y se añadieron 3,82 g (3,16 ml, 22,2 mmol)
de cloruro de benzoilo. La mezcla fue sometida a ebullición
durante 90 min. Después del filtrado, el residuo fue
disuelto en triclorometano y lavado con solución de
10 bicarbonato sódico saturada. La solución orgánica fue
secada sobre sulfato magnésico y evaporada en vacío. El
producto en bruto fue purificado por cromatografía de
columna sobre sílice, eluyente diclorometano/metanol 95/5.

Rendimiento: 2,10 g = 80% de material en polvo de color
15 blanco.

5) 1-Metil-2-fenil-1H-tieno(3,2-d)pirimidina-4-tiona

2,10 g (8,67 mmol) de 1-Metil-2-fenil-1H-tieno(3,2-
d)pirimidina-4-ona y 3,51 g (8,67 mmol) de reactivo de
Lawesson ($C_{14}H_{14}O_2P_2S_4$, Fluka) se disolvieron en 40 ml de
20 tolueno. La mezcla de reacción fue sometida a ebullición
durante 3 h. Después de evaporación, el residuo fue
purificado adicionalmente por cromatografía de columna con
sílice, eluyente diclorometano/acetona 95/5.

Rendimiento: 500 g = 22% de material en polvo de color
25 amarillo

6) Yoduro de 1-metil-4-metilsulfanil-2-fenil-tieno(3,2-d)pirimidin-1-io

500 mg de 1-metil-2-fenil-1H-tieno(3,2-d)pirimidina-4-
tiona se añadieron lentamente a 5 ml (80 mmol) de yodometano

a 0°C y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La solución fue filtrada y el residuo fue lavado con diclorometano.

Rendimiento: 550 g = 71% de material en polvo de color amarillo.

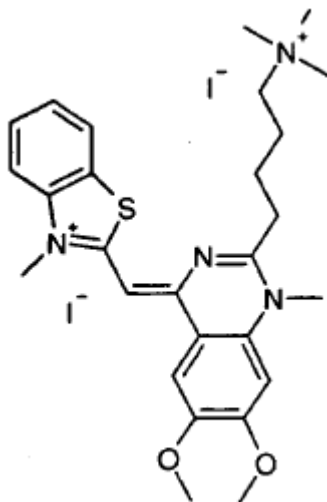
7) Yoduro de 3-Metil-2-(1-metil-2-fenil-1H-tieno(3,2-d)pirimidin-4-ilidenmetil)-benzotiazol-3-io

200 mg (0,50 mmol) de yoduro de 1-Metil-4-metilsulfanil-2-fenil-tieno(3,2-d)pirimidin-1-io y 145 mg (0,50 mmol) de yoduro de 2,3-dimetil-benzotiazol-3-io se disolvieron en 2,0 ml de dimetilformamida y se añadieron 202 mg (0,28 ml, 2,00 mmol) de trietilamina. La solución de color verde fue agitada durante 1 h a 80°C, filtrada y el residuo fue lavado con metanol. El producto en bruto fue purificado adicionalmente por HPLC.

Rendimiento: 40 mg = 15 % de material en polvo de color amarillo.

Ejemplo 6

Síntesis de R27



1) **2-(4-Dimetilamino-butil)-6,7-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolina-4-ona**

3,80 g (20,9 mmol) de ácido dimetilamino-pentanoico fueron añadidos a 25 ml de cloruro de tionilo y agitados durante 90 min a 55-60°C. El cloruro tionilo restante fue destilado en vacío y el residuo fue añadido a una solución de 2,00 g (9,51 mmol) de 4,5-Dimetoxi-2-metilamino-benzamida (ver anterior) disueltos en 30 ml de triclorometano a 0°C. La mezcla fue sometida a ebullición durante 4 h. Después de filtrado el residuo fue disuelto en triclorometano y solución de bicarbonato sódico saturada. La solución orgánica fue secada sobre sulfato magnésico y evaporada en vacío.

Rendimiento: 400 mg = 13 % de material en polvo de color marrón.

2) **2-(4-Dimetilamino-butil)-6,7-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolina-4-tiona**

400 mg (1,25 mmol) de 2-(4-Dimetilamino-butil)-6,7-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolina-4-ona fueron disueltos en 20 ml de piridina y se añadió 418 mg (1,88 mmol) de pentasulfuro fosforoso. La mezcla de reacción fue sometida a ebullición durante 2 h. Después de evaporación del disolvente, el residuo fue disuelto en diclorometano y lavado con una solución de hidróxido sódico 2N. La solución orgánica fue secada con sulfato magnésico y evaporada.

Rendimiento: 310 mg = 74% de material en polvo de color amarillo naranja.

3) Diyoduro de 2-(4-Trimetilamonio-butil)-6,7-dimetoxi-1-metil-4-metilsulfanil-quinazolin-1-io

300 mg (0,89 mmol) de 2-(4-Dimetilamino-butil)-6,7-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolina-4-tiona se disolvieron en 1 ml de yodometano a 0°C y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla fue filtrada y el residuo aclarado con diclorometano.

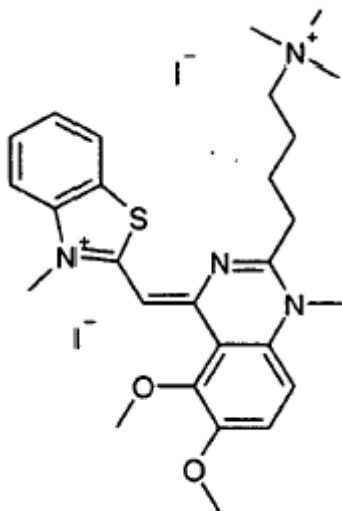
Rendimiento: 310 mg = 75% de material en polvo de color ocre.

4) Diyoduro de 2-(2-(4-Trimetilamonio-butil-6,7-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolin-4-ilidenmetil)-3-metil-benzotiazol-3-io

220 mg (0,36 mmol) de diyoduro de 2-(4-Trimetilamonio-butil)-6,7-dimetoxi-1-metil-4-metilsulfanil-quinazolin-1-io y 104 mg (0,36 mmol) de yoduro de 2,3-dimetil-benzotiazol-3-io se disolvieron en 2 ml de dimetilformamida y se añadió 146 mg (0,20 ml, 1,44 mmol) de trietilamina. La suspensión fue agitada durante 1 h a 80°C, filtrada y aclarada con diclorometano y metanol.

Rendimiento: 220 mg = 83% de material en polvo de color rojo naranja.

En vez de yoduro de 2,3-dimetil-benzotiazol-3-io se puede utilizar, por ejemplo, benzotiazolio, 3-(3-carboxipropil)-2-metilo bromuro (ver Alfimov M.V. y otros, J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry 7 (1996) 1441-1447) lo cual conduce a diyoduro de 2-(2-(4-Trimetilamonio-butil-6,7-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolin-4-ilidenmetil)-3-carboxipropil-benzotiazol-3-io.

Ejemplo 7:**Síntesis de R28****1) 2,3-Dimetoxi-6-nitro-benzaldehido**

5 50,0 g (301 mmol) de 2,3-Dimetoxi-benzaldehido (Aldrich) fueron añadidos lentamente a ácido nítrico a 0°C. La mezcla de reacción fue agitada durante 5 minutos, diluida con agua hasta que no se obtuvo precipitado adicional. Después de filtrado, el residuo fue lavado con
10 metanol.

Rendimiento: 58,0 g = 91% (nitro isómeros 5 y 6) material en polvo de color amarillo.

2) Ácido 6-Nitro-2,3-dimetoxi-benzoico

15 58,0 g (275 mmol) de 2,3-Dimetoxi-6(5)-nitro-benzaldehido se añadieron a una solución de 45,6 g (289 mmol) de permanganato potásico en 11,2% de hidróxido sódico. La solución fue agitada durante 90 min a 60°C. Se eliminó el dióxido de manganeso por filtrado utilizando Celite. El permanganato potásico restante fue desactivado
20 por la adición de metanol y se elimina nuevamente el dióxido de manganeso por filtrado. La solución fue

acidificada con ácido clorhídrico a pH 2,75. El producto precipitado fue filtrado, lavado con agua y una mezcla de agua/etanol. Por acidificación a pH 0,8 se puede aislar adicionalmente el producto.

5 Rendimiento: 23,8 g = 38% de material en polvo incoloro

3) **Ácido 6-Amino-2,3-dimetoxi-benzoico**

A una solución de 23,4 g (104 mmol) de ácido 6-nitro-2,3-dimetoxi-benzoico en etanol se añadieron 2,5 g Pd/C y se trató con 1 bar H₂ durante 24 h. El catalizador fue
10 eliminado por filtrado sobre Celite y la solución fue evaporada, el residuo fue disuelto en 300 ml de dioxano y liofilizado.

Rendimiento: 20,0 g = 98% de material en polvo de color beige

15 4) **5,6-Dimetoxi-1H-benzo [d][1,3]oxazina-2,4-diona**

10,0 g (50,7 mmol) de ácido 6-Amino-2,3-dimetoxi-benzoico fueron disueltos en 150 ml de tetrahidrofurano, se añadieron 6,52 g (22,0 mmol) de trifosgeno y la solución fue sometida a reflujo durante 3 h. Después de verter sobre
20 400 ml de una mezcla hielo/agua el precipitado fue filtrado y lavado con agua y metanol.

Rendimiento: 8,27 g = 73 % de material en polvo de color amarillo.

5) **5,6-Dimetoxi-1H-benzo[d]-N-metil-[1,3]oxazina-2,4-diona**

25 19,0 g (85,1 mmol) de 5,6-Dimetoxi-1H-benzo [d][1,3]oxazina-2,4-diona se disolvieron en dimetilformamida seca (100 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadieron lentamente 2,8 g (111 mmol) de hidruro sódico (Argón) y la mezcla fue agitada durante 30 min a 0°C y 30

min a temperatura ambiente. Después de enfriar nuevamente a 0°C se añadieron 15,7 g (6,92 ml, 111 mmol) de yodometano. Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente se añadieron 150 ml de agua. El residuo fue filtrado y lavado con agua y etil éter.

Rendimiento: 14,2 g = 67% de material en polvo de color beige.

6) 6-Metilamino-2,3-dimetoxibenzamida

14,0 g (59 mmol) de 5,6-Dimetoxi-1H-benzo[d]-N-metil-[1,3]oxazina-2,4-diona se disolvieron en 180 ml de tetrahidrofurano y se añadieron 90 ml de amoniaco (25%) a 0°C. la solución fue agitada durante 30 min a 0°C y durante 30 min a temperatura ambiente. Se separó THF en vacío y el resto de la suspensión fue neutralizado con ácido clorhídrico diluido. El producto fue aislado por filtrado. Rendimiento: 10,75 g = 87% de material en polvo de color amarillo.

7) 2-(4-Dimetilamino-butil)-5,6-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolina-4-ona

3,80 g (20,9 mmol) de ácido dimetilamino-pentanoico fueron añadidos a 25 ml de cloruro tionilo y se agitó durante 90 min a 55-60°C. El cloruro tionilo restante fue destilado en vacío y el residuo fue añadido a una solución de 2,00 g (11,1 mmol) de 6-metilamino-2,3-dimetoxibenzamida disuelta en 30 ml de triclorometano a 0°C. La mezcla fue sometida a ebullición durante 2 h y agitada durante una noche a temperatura ambiente. Después del filtrado, el residuo fue disuelto en triclorometano y una solución

saturada de bicarbonato sódico. La solución orgánica fue secada sobre sulfato magnésico y evaporada en vacío.

Rendimiento: 500 mg = 14% de aceite.

8) 2-(4-Dimetilamino-butyl)-5,6-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolina-4-tiona

800 mg (2,50 mmol) de 2-(4-Dimetilamino-butyl)-5,6-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolina-4-ona fueron disueltos en 20 ml de piridina y se añadieron 612 mg (2,75 mmol) de pentasulfuro fosforoso. La mezcla de reacción se sometió a ebullición durante 1 h. Después de la evaporación del disolvente, el residuo fue disuelto en diclorometano y lavado con una solución 2N de hidróxido sódico. La solución orgánica fue secada con sulfato magnésico y evaporada. El producto en bruto fue purificado adicionalmente mediante cromatografía de columna de sílice, con eluyente triclorometano, metanol, trietilamina 8:2:0,2.

Rendimiento: 220 mg = 26% de material en polvo de color naranja-rojo.

9) Diyoduro de 2-(4-Trimetilamonio-butyl)-5,6-dimetoxi-1-metil-4-metilsulfanil-quinazolin-1-io

220 mg (0,66 mmol) de 2-(4-Dimetilamino-butyl)-5,6-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolina-4-tiona se disolvieron en 2 ml de yodometano a 0°C y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla fue filtrada y el residuo lavado con diclorometano.

Rendimiento: 340 mg = 83% de material en polvo de color rojo-marrón.

10) Yoduro de 2-(2-(4-Trimetilamonio-butil)-5,6-dimetoxi-1-metil-1H-quinazolin-4-ilidenmetil)-3-metil-benzotiazol-3-io

117 mg (0,27 mmol) de yoduro de 2-(4-Trimetilamonio-butil)-5,6-dimetoxi-1-metil-4-metilsulfanil-quinazolin-1-io y se disolvieron 79 mg (0,27 mmol) de yoduro de 2,3-dimetil-benzotiazol-3-io en 2 ml de dimetilformamida y se añadieron 109 mg (0,15 ml, 1,08 mmol) de trietilamina. La suspensión fue agitada durante 1 h a 80°C, filtrada y lavada con diclorometano y metanol.

Rendimiento: 100 mg = 51% de material en polvo de color rojo-naranja.

Ejemplo 8:

15 Utilización de R03, R04, R11, R12, R13, R14, R26, R27, y R28 en PCR y análisis de la curva de fusión

Utilizando los colorantes que se han dado a conocer en lo anterior, se realizó una PCR utilizando el sistema LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Cat. N° 04640268001, con accesorios) con cebadores para una sección específica del gen *mdr-1* (accesión al Banco de Genes N° M29445). Los cebadores utilizados corresponden a las posiciones N°122 (directa) y 211 (inversa). Se analizaron muestras de ADN genómico que es de tipo natural, heterocigótico o homocigótico para una mutación puntual en esta secuencia.

Mezcla de PCR:

-0,5 µM cebador directo *mdr-1*

-0,5 µM cebador inverso *mdr-1*

-1 ng/µl ADN genómico

- Kit PCR LightTyper 96 (Roche Diagnostics, Cat. N° 03707709001)

-0,8 µM del colorante respectivo

5 Protocolo instrumental:

Disposición				
Formato detección		Tipo bloque	Volumen de reacción	
SYBR Green I (483-533), modalidad dinámica		96	20 µl	
Programas				
Nombre del programa		Ciclos	Modalidad de análisis	
Desnaturalización		1	Ninguna	
Ciclado		45	Cuantificación	
Fusión		1	Curvas de fusión	
Objetivos de temperatura				
Objetivo (°C)	Forma de captación	Retención (hh:mm:ss)	Velocidad subida (°C/s)	Captaciones (por°C)
Desnaturalización				
95	Ninguna	00:10:10	4,4	-
Ciclado				
95	Ninguna	00:00:10	4,4	-
60	Ninguna	00:00:20	2,2	-
72	Única	00:00:20	4,4	-
Fusión				
95	Ninguna	00:00:05	4,4	-
40	Ninguna	00:01:00	1,5	-
95	Continua	-	-	50
40	Ninguna	00:00:30	1,5	-

Con todos los colorantes se controlaron satisfactoriamente las curvas de amplificación por medición de fluorescencia dentro de un canal detectando emisión de fluorescencia a 483-533 nm. A continuación, se pudo controlar el diferente comportamiento de fusión del ADN homocigótico o heterocigótico.

Ejemplo 9:**Estabilidad de R27**

La estabilidad a la luz de R27, que es representativa de los nueve colorantes descritos fue comparada con colorantes establecidos ya utilizados para estas aplicaciones. Se midió la fluorescencia de una mezcla del colorante respectivo y ADN genómico durante la exposición continua a la luz. La estabilidad de R27 se demostró claramente más elevada:

	Exposición a la luz [min]					
	0	10	30	60	180	300
SYBR Green	100%	87%	77%	70%	40%	24%
LC Green Plus	100%	92%	86%	79%	47%	37%
R 27	100%	99%	98%	99%	97%	96%

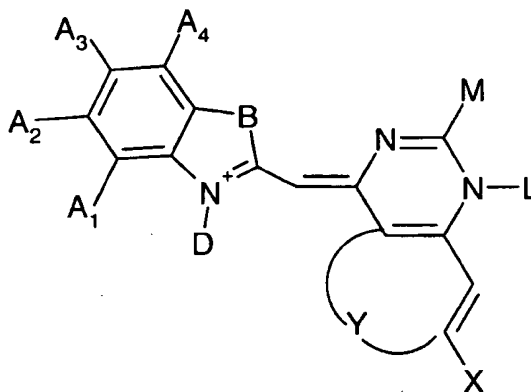
10

La excitación de la solución R27 para medición de fluorescencia y cambios repetidos de temperatura entre 55 y 95°C durante un protocolo típico PCR en un instrumento PCR en tiempo real igual que LightCycler® 480 no provocan blanqueo reconocible del colorante.

15

REIVINDICACIONES

1. Colorante fluorescente que tiene la fórmula



caracterizado porque

5 - cualquiera de A₁, A₂, A₃ y A₄ son H o uno de A₁, A₂, A₃ y A₄ es un sustituyente que es un halogenilo y los otros son H

 - B es seleccionado entre el grupo que consiste en S, O, N-R, y C-(R)₂ en el que R es C₁-C₆-Alquilo

10 - D es C₁-C₆-alquilo sustituido o no sustituido

 - X es H o un grupo metoxi

 - Y es seleccionado entre el grupo que consiste en S, O, N-R en el que R es C₁-C₆-Alquilo, y Z₁-C=C-Z₂, en el que Z₁ y Z₂ independientemente entre si son H o un grupo metoxi

15 - L es CH₃ o fenilo

 - M es fenilo o un C₁-C₁₈ amino-alquilo sustituido o no sustituido.

2. Colorante fluorescente, según la reivindicación 1, en el que

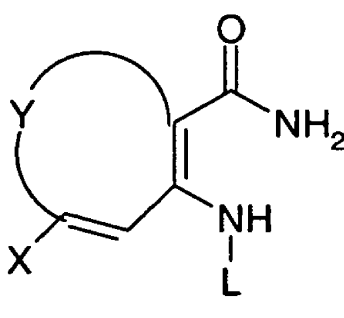
20 - D es -(CH₂)_n-COOH o bien -(CH₂)_n-CO-OSuccininimida, caracterizado porque n es un número entero comprendido entre 1 y 6.

3. Colorante fluorescente, según las reivindicaciones 1-2, en el que

- M es $-(CH_2)_n-N^+(CH_3)_3$, en el que n es un número natural comprendido entre 1 y 18.

5 4. Método para preparar un colorante fluorescente, según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas

a) disponer una sustancia química con la fórmula



10 Caracterizada porque

- X es H o un grupo metoxi

- Y es seleccionado entre el grupo que consiste en S, O, N-R, en el que R es C_1-C_6 -Alquilo, y $Z1-C=C-Z2$, en el que Z1 y Z2 independientemente entre si son H o un grupo metoxi

15 - L es CH_3 o fenilo

b) hacer reaccionar dicha sustancia con un cloruro ácido sustituido a efectos de generar un derivado de 1,4-Dihidropirimidin-4-ona

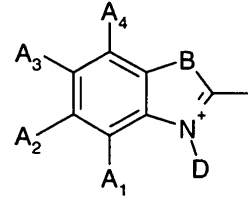
20 c) hacer reaccionar dicho derivado de 1,4-Dihidropirimidin-4-ona con un agente de tionación a efectos de generar un derivado de 1,4-Dihidropirimidin-4-tiona

d) hacer reaccionar dicho derivado de 1,4-Dihidropirimidin-4-tiona con yodometano a efectos de generar un derivado de 4-Metiltio-pirimidina

25

e) hacer reaccionar dicha 4-Metiltio-pirimidina con un compuesto que tiene la fórmula

5



caracterizado porque

- o bien la totalidad de A1, A2, A3 y A4 son H o uno de A1, A2, A3 y A4 es un sustituyente que preferentemente es un Halogenilo y los otros son H

10

- B es seleccionado del grupo que consiste en S, O, N-R, y C-(R)₂ en el que R es C₁-C₆-Alquilo

- D es un C₁-C₆ Alquilo sustituido o no sustituido.

5. Utilización de un compuesto, según las reivindicaciones 1-3, para la detección de ácidos nucleicos de doble cadena.

15

6. Utilización, según la reivindicación 5, en el que la detección es llevada a cabo durante un análisis de curva de fusión.

20

7. Utilización, según la reivindicación 5, en la que la detección es llevada a cabo durante una reacción de amplificación de ácido nucleico en tiempo real.

8. Utilización, según la reivindicación 5, en la que la detección es llevada a cabo con una matriz de gel.

25

9. Mezcla de reacción que comprende, como mínimo

- un compuesto, según las reivindicaciones 1-3
- una ADN polimerasa termoestable
- una mezcla de trifosfatos de desoxinucleósidos, y
- un tampón.

Fig. 1

Síntesis R03

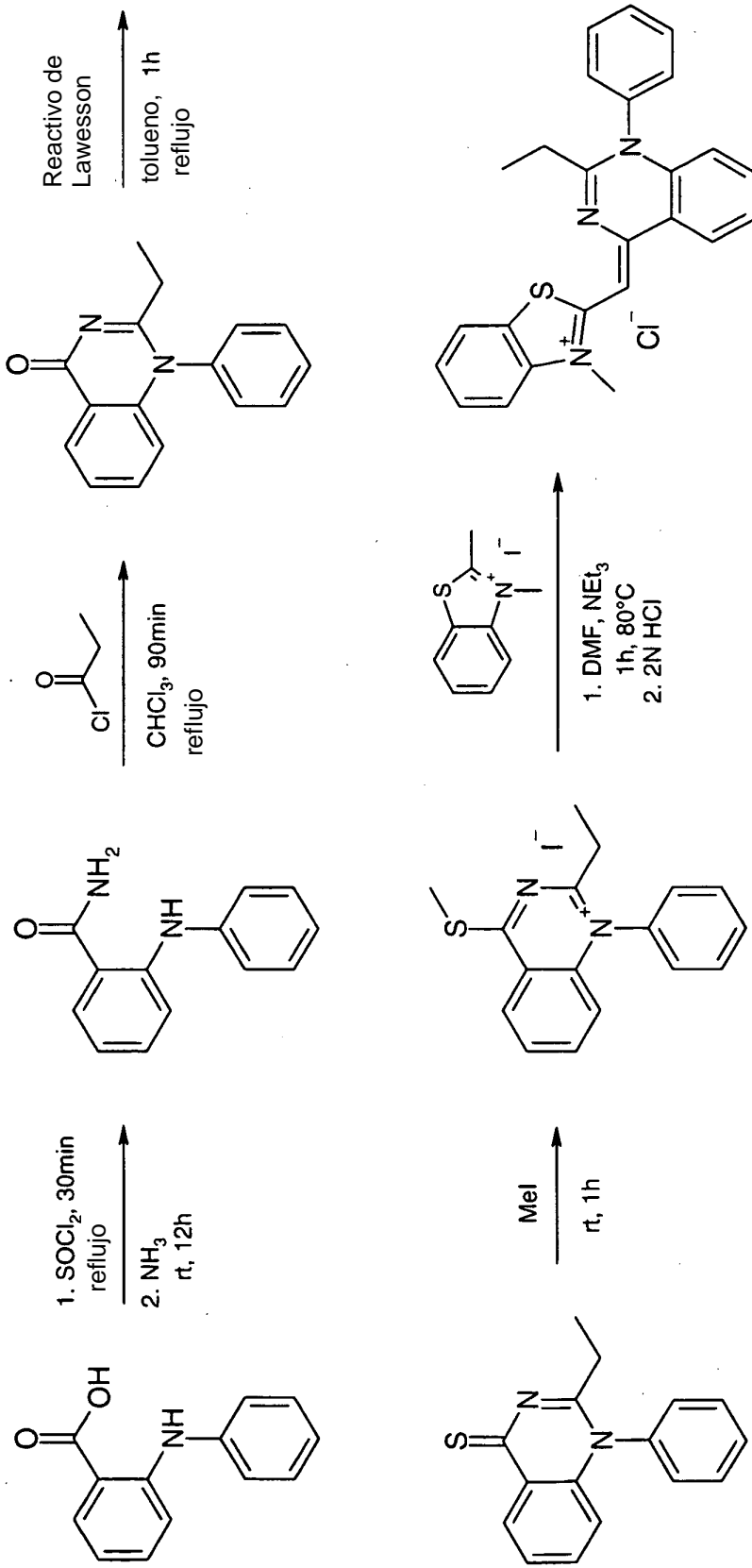


Fig. 2

Síntesis R04

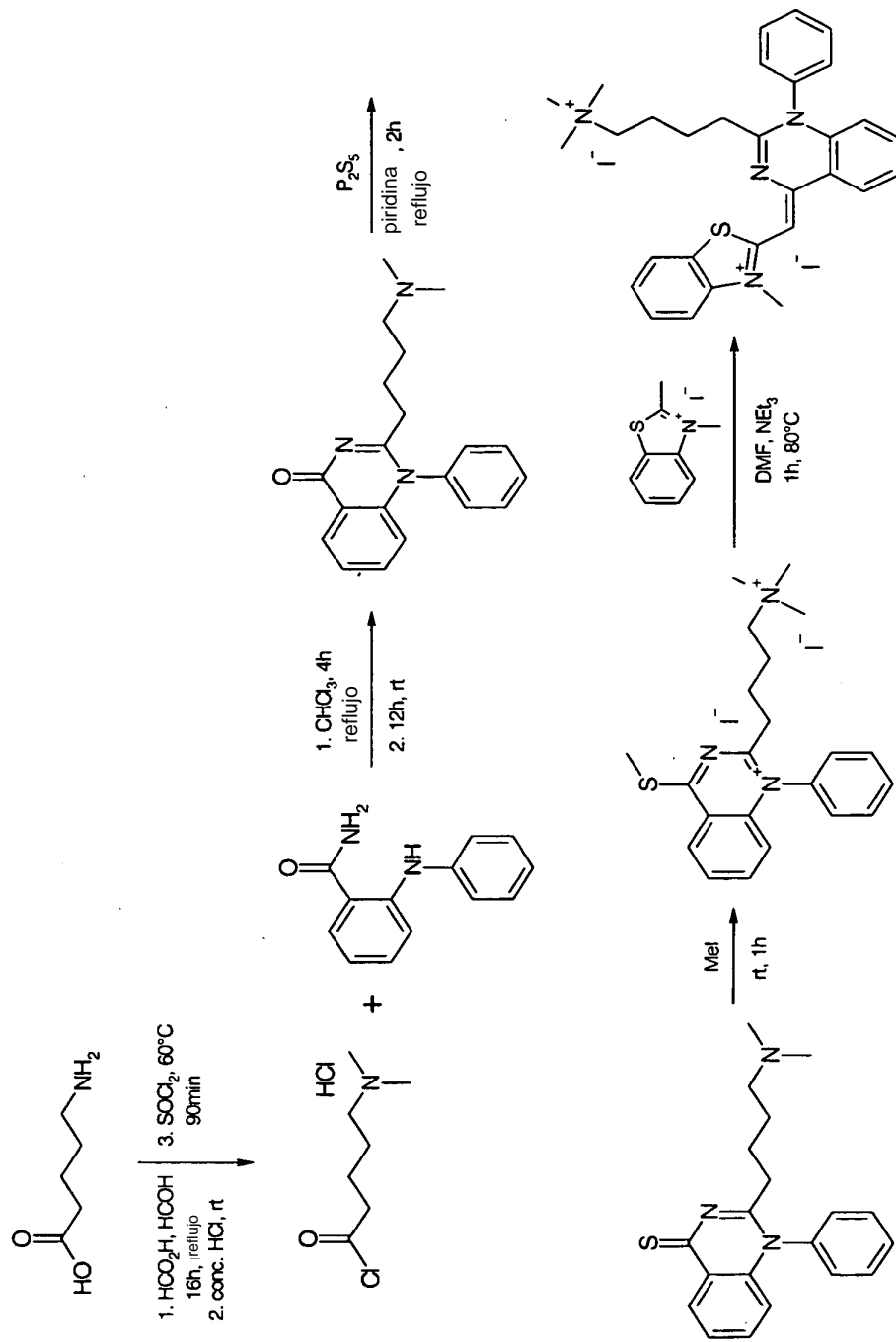


Fig. 3

Síntesis R11

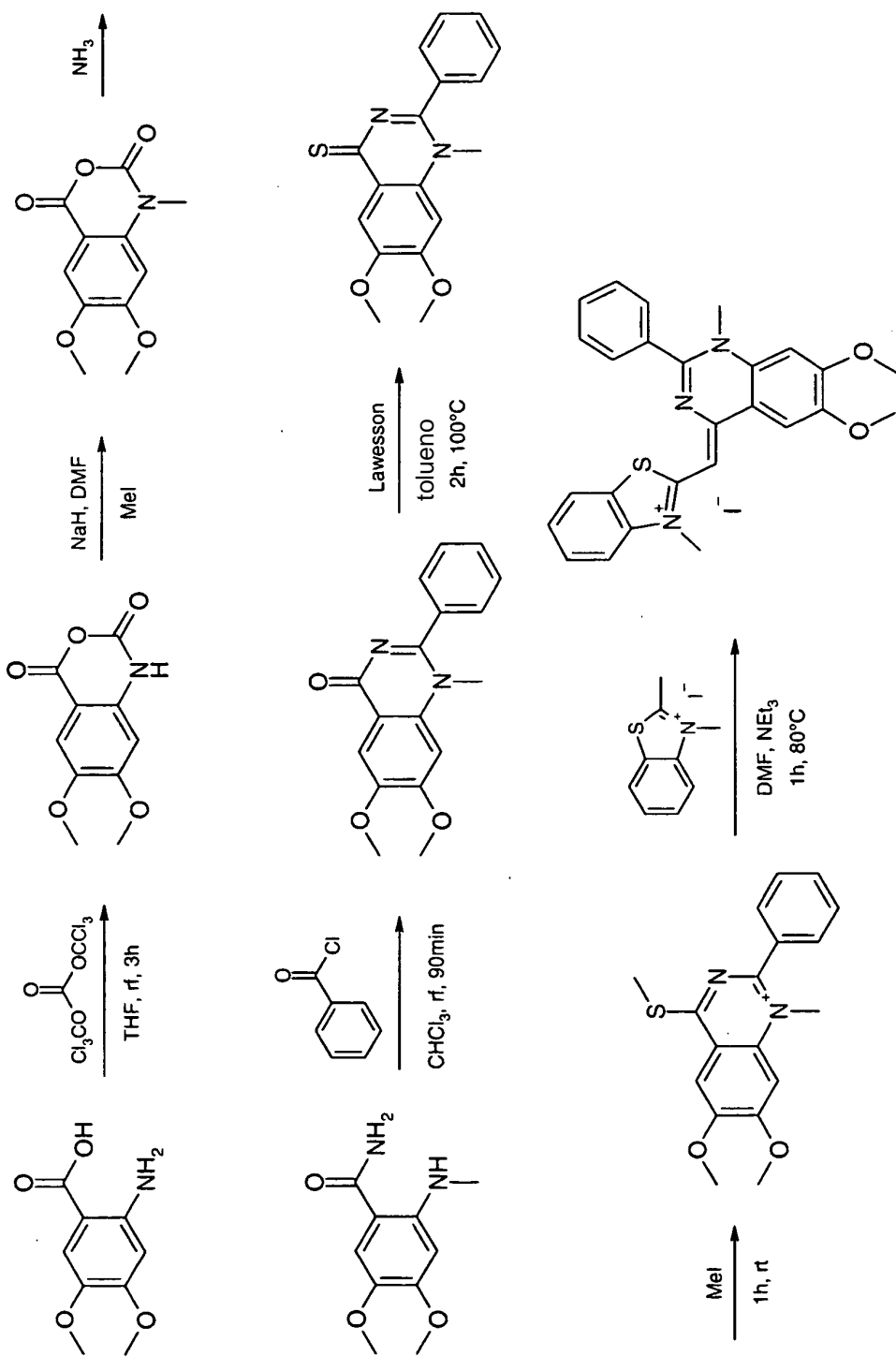


Fig. 4

Síntesis R.12

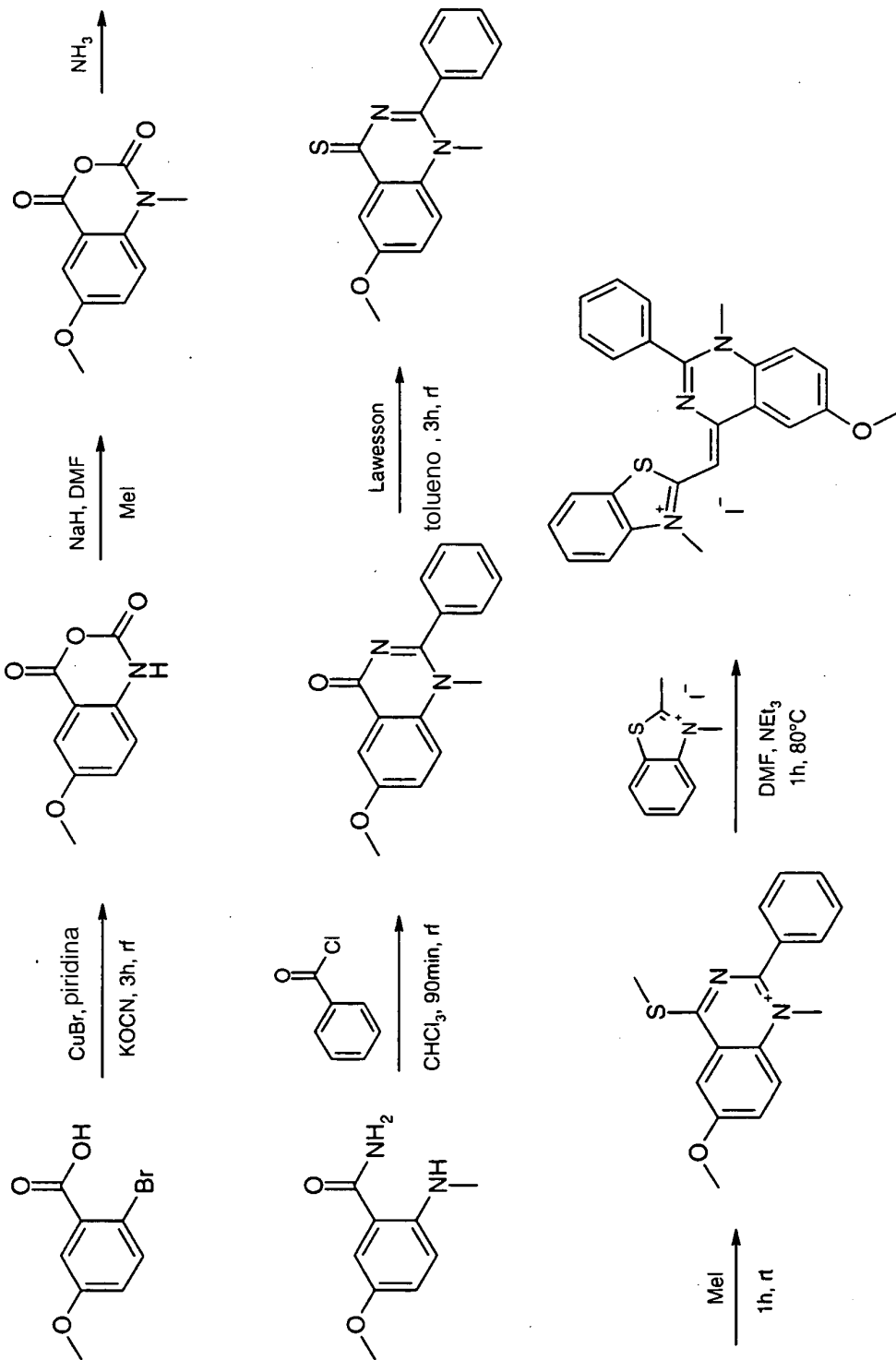
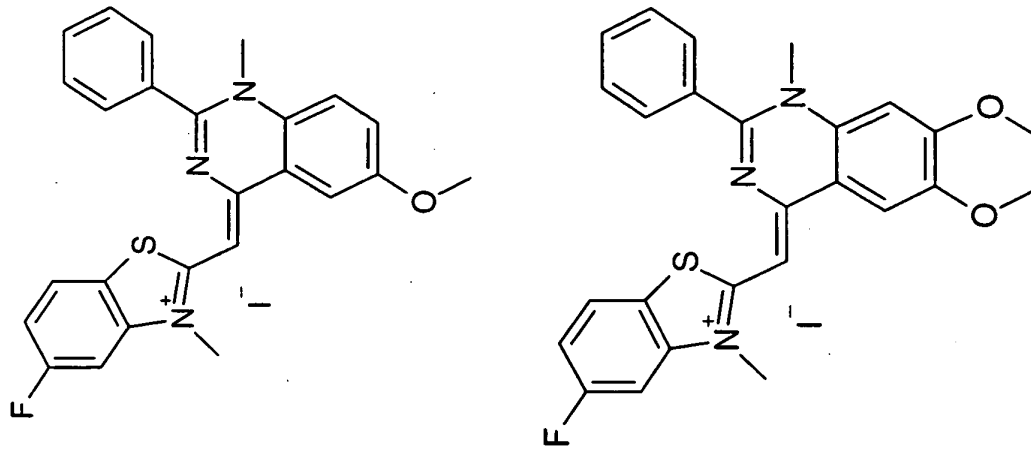
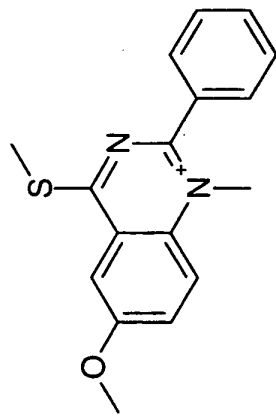


Fig. 5



Síntesis R13



Síntesis R14

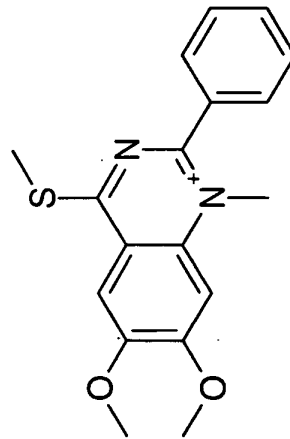


Fig. 6

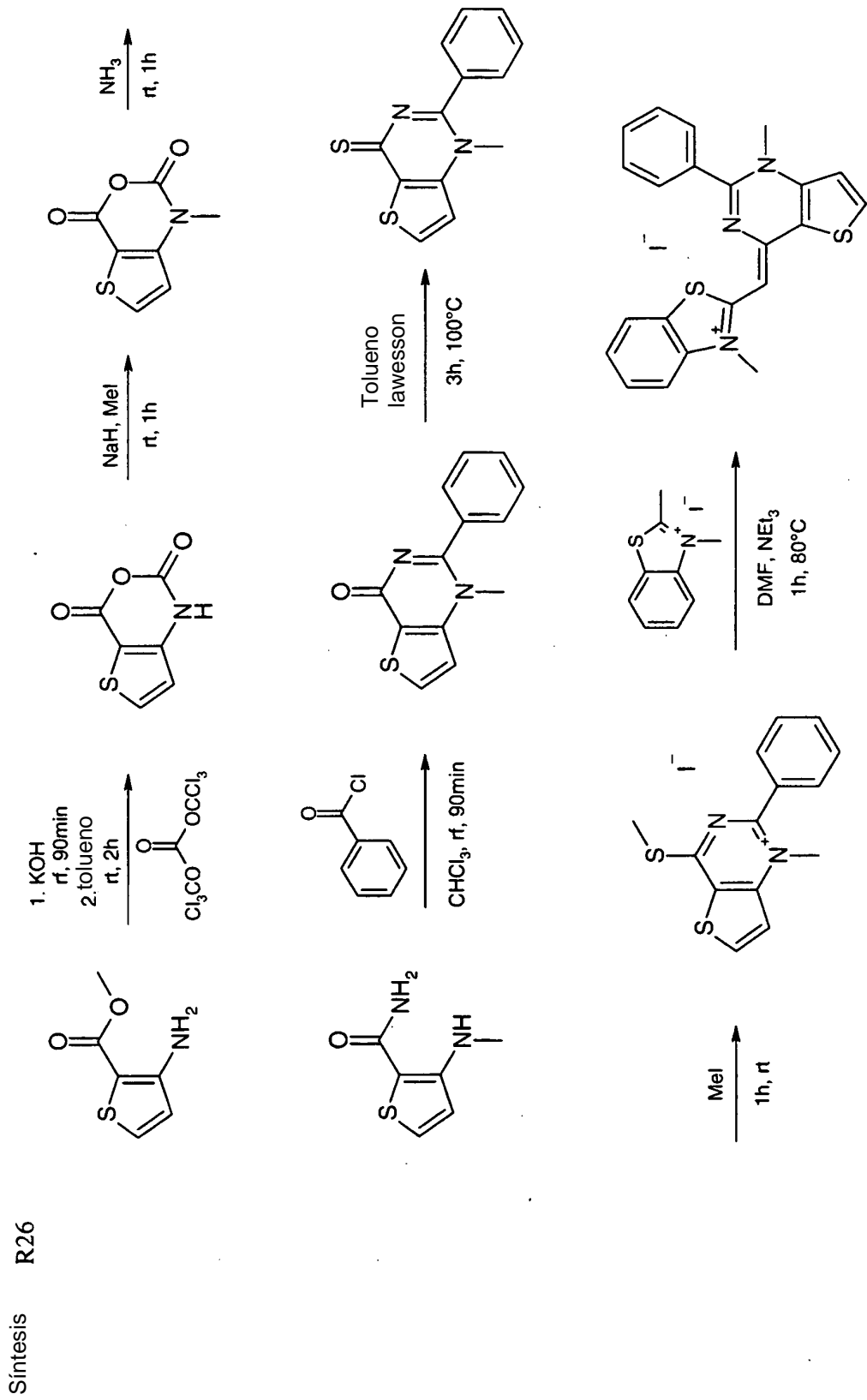


Fig. 7

Síntesis R27

