

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 726**

51 Int. Cl.:

**C07D 417/04** (2006.01)

**C07D 491/04** (2006.01)

**A61K 49/10** (2006.01)

**C09K 11/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2017** **E 21195809 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2024** **EP 3974425**

54 Título: **Nuevos colorantes fluorescentes y sus usos como biomarcadores**

30 Prioridad:

**30.09.2016 US 201662402635 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**21.11.2024**

73 Titular/es:

**ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED (100.0%)**  
**19 Granta Park, Great Abington**  
**Cambridge CB21 6DF, GB**

72 Inventor/es:

**ROMANOV, NIKOLAI**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 988 726 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

Nuevos colorantes fluorescentes y sus usos como biomarcadores

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a nuevos derivados de benzopirano para su uso como colorantes fluorescentes. Los compuestos pueden utilizarse como etiquetas fluorescentes, particularmente para el etiquetado de nucleótidos en aplicaciones de secuenciación de los ácidos nucleicos.

10

**Antecedentes**

La detección no radiactiva de ácidos nucleicos que utilizan etiquetas fluorescentes es una tecnología importante en la biología molecular. Numerosos procedimientos empleados en la tecnología de ADN recombinante se basaron en gran medida previamente en el uso de nucleótidos o polinucleótidos etiquetados radioactivamente con, por ejemplo, <sup>32</sup>P. Los compuestos radiactivos permiten la detección sensible de ácidos nucleicos y otras moléculas de interés. Sin embargo, existen graves limitaciones en el uso de isótopos radiactivos, como su gasto, su vida útil limitada y, más importante, las razones de seguridad. La eliminación de la necesidad de etiquetas radiactivas mejora la seguridad, al tiempo que reduce el impacto medioambiental y los costes asociados, por ejemplo, con la eliminación de los reactivos. Los métodos susceptibles de detección fluorescente no radiactiva incluyen, a modo de ejemplo no limitante, la secuenciación automatizada del ADN, los métodos de hibridación, la detección en tiempo real de productos de reacción de la cadena de la polimerasa, e inmunoensayos.

15

20

25

30

Para muchas aplicaciones es deseable emplear varias etiquetas fluorescentes espectralmente distinguibles para lograr la detección independiente de una pluralidad de analitos superpuestos espacialmente. En tales métodos multiplexados, la cantidad de recipientes puede reducirse para simplificar los protocolos experimentales y facilitar la producción de kits de reactivos específicos de la aplicación. En la secuenciación de ADN automatizada multicolor, por ejemplo, la detección fluorescente multiplexada permite el análisis de múltiples bases de nucleótidos en una única línea de electroforesis, aumentando de este modo el rendimiento en comparación con los métodos de un solo color y reduciendo las incertidumbres asociadas con las variaciones de movilidad electroforética entre líneas.

35

40

Sin embargo, la detección fluorescente multiplexada puede ser problemática y hay una serie de factores importantes que restringen la selección de las etiquetas fluorescentes. En primer lugar, es difícil encontrar compuestos de colorante cuyos espectros de absorción y emisión se resuelvan espectralmente. Además, cuando se emplean varios colorantes fluorescentes juntos, la excitación simultánea puede ser difícil porque las bandas de absorción de los colorantes en las diferentes regiones espectrales se separan ampliamente. Muchos métodos de excitación utilizan láseres de alta potencia y, por lo tanto, el colorante debe tener una fotoestabilidad suficiente para resistir tal excitación láser. Una consideración final de particular importancia en los métodos de biología molecular es que los colorantes fluorescentes deben ser compatibles con los químicos de los reactivos utilizados, tales como por ejemplo, disolventes y reactivos de síntesis de ADN, reguladores, enzimas polimerasas y enzimas ligasas.

45

A medida que avanza la tecnología de secuenciación, se ha desarrollado la necesidad de compuestos colorantes fluorescentes adicionales, sus conjugados de ácidos nucleicos y conjuntos de colorantes que satisfagan todas las restricciones anteriores y que sean particularmente adecuados para métodos moleculares de alto rendimiento tales como la secuenciación en fase sólida y similares.

50

La publicación de PCT n.º WO 2007/135368 describe una clase de compuestos de rodamina adecuados para su uso como etiquetas fluorescentes. Los compuestos descritos en la presente memoria son adecuados para su uso en protocolos de secuenciación de los ácidos nucleicos en fase sólida. Los avances en la tecnología y el rendimiento de la secuenciación de los ácidos nucleicos en fase sólida han llevado a desarrollos y mejoras adicionales en el diseño molecular de etiquetas fluorescentes, particularmente en el contexto de la interacción entre los reactivos fluorescentes y las secuencias de ácidos nucleicos particulares.

55

La publicación de PCT n.º WO 2014/135223 describe una clase de compuestos de rodamina adecuados para su uso como etiquetas fluorescentes.

60

65

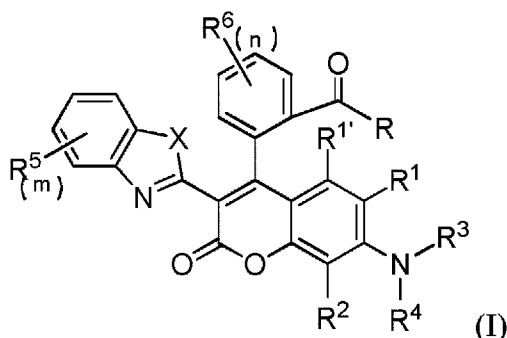
Las moléculas de colorante fluorescente con propiedades de fluorescencia mejoradas (tales como el desplazamiento de Stokes, la intensidad de la fluorescencia, la posición del máximo de fluorescencia y la forma de la banda de fluorescencia) pueden mejorar la velocidad y la precisión de la secuenciación del ácido nucleico. El desplazamiento de Stokes es un aspecto esencial en la identificación de las señales fluorescentes en las aplicaciones biológicas. Por ejemplo, la detección de la luz emitida puede ser difícil de distinguir de la luz de excitación cuando se utilizan fluoróforos con absorción y el máximo de fluorescencia muy cerca entre sí (es decir, pequeño desplazamiento de Stokes) porque las bandas de excitación y emisión se solapan en gran medida. Por el contrario, los fluoróforos con grandes desplazamientos de Stokes son fáciles de distinguir, debido a la mayor separación entre las longitudes de onda de excitación y emisión. El desplazamiento de Stokes es especialmente crítico en aplicaciones de fluorescencia multiplexada, porque la longitud de onda de emisión de un fluoróforo puede solaparse y, por lo tanto, excitar a otro

fluoróforo en la misma muestra. Además, la intensidad de la señal de fluorescencia es especialmente importante cuando se realizan mediciones en búferes biológicos que contienen agua y/o a una temperatura más alta, ya que la fluorescencia de la mayoría de los colorantes es significativamente menor en dichas condiciones. Además, la naturaleza de la base a la que se une un colorante también afecta el máximo de la fluorescencia, la intensidad de la fluorescencia y a otras propiedades espectrales del colorante. Las interacciones específicas de la secuencia entre el colorante fluorescente y la nucleobase pueden adaptarse mediante un diseño específico de los colorantes fluorescentes. La optimización de la estructura de los colorantes fluorescentes puede mejorar sus propiedades fluorescentes y también mejorar la eficiencia de la incorporación de nucleótidos, reducir el nivel de errores de secuenciación y disminuir el uso de reactivos en la secuenciación de los ácidos nucleicos y, por lo tanto, de sus costes.

En la presente memoria se describen nuevos derivados de benzopirano y su uso como etiquetas de biomoléculas, particularmente como etiquetas de los nucleótidos utilizados en la secuenciación de los ácidos nucleicos. Las mejoras se pueden ver en los desplazamientos de Stokes mayores de tales colorantes cuando se preparan como conjugados de biomoléculas y en la longitud, intensidad y calidad de la lectura de secuenciación que se puede obtener utilizando los nuevos compuestos fluorescentes.

### Resumen

La invención proporciona un nucleótido u oligonucleótido etiquetado con un compuesto fluorescente como se define en las reivindicaciones 1 a 9; un kit que comprende dicho nucleótido u oligonucleótido etiquetado y según las reivindicaciones 10 a 12; y un método de secuenciación según la reivindicación 13 y 14. Algunas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a nuevos derivados de benzopirano de la fórmula (I) o formas mesoméricas de los mismos:



en donde cada  $R^1$ ,  $R^2$ , y  $R^{1'}$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquenoilo, alquinoilo, haloalquilo, haloalcoxi, alcoxi alquilo, amino, aminoalquilo, aminosulfonilo, halo, ciano, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroalquilo, C-carboxi, O-carboxi, C-amido, N-amido, nitro, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, haluro de sulfonilo, S-sulfonamido, N-sulfonamido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^1$  y  $R^{1'}$  juntos y con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada  $R^3$  y  $R^4$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquinoilo, aminoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxi alquilo, hidróxido de sulfonilo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^1$  y  $R^3$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido o heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^2$  y  $R^4$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido y heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido;

$R^5$  y  $R^6$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquenoilo, alquinoilo, haloalquilo, haloalcoxi, alcoxi alquilo, amino, aminoalquilo, aminosulfonilo, halo, ciano, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroalquilo, C-carboxi, O-carboxi, C-amido, N-amido, nitro, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, haluro de sulfonilo, S-sulfonamido, N-sulfonamido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido;

R se selecciona de  $-OR^7$  o  $-NR^8R^9$ ;

$R^7$  se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada  $R^8$  y  $R^9$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alquino, aminoalquilo, carboxialquilo, sulfonatoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxialquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

X se selecciona del grupo que consiste en O, S,  $NR^{10}$  y Se;

$R^{10}$  se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

m es un número entero seleccionado de 0 a 4; y

n es un número entero seleccionado de 0 a 4; siempre que

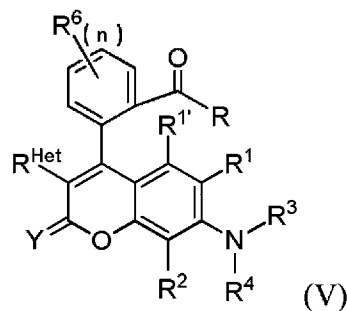
cuando cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  sea H; cada  $R^3$  y  $R^4$  sea etilo; cada m y n sea 0; R sea  $-NHCH(CH_3)CH_2OH$ ; después X se selecciona de O, S o Se;

cuando cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  sea H; cada  $R^3$  y  $R^4$  sea etilo; cada m y n sea 0; R sea  $-OH$ ; después X se selecciona de S o Se;

cuando cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  sea H; cada  $R^3$  y  $R^4$  sea etilo; m es 1 y  $R^5$  sea metilo; n sea 0; R sea  $-OH$  o  $-OEt$ ; entonces se selecciona X entre S,  $NR^{10}$  o Se; y

cuando cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  sea H; cada  $R^3$  y  $R^4$  sea etilo; m es 1 y  $R^5$  sea  $-S(Oz)Et$ ; n sea 0; R sea  $-OH$  o  $-OEt$ ; entonces se selecciona X entre S,  $NR^{10}$  o Se.

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a un compuesto fluorescente de la fórmula (V) con un desplazamiento de Stokes que varía de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 100 nm:



en donde cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alqueno, alquino, haloalquilo, haloalcoxi, alcoxialquilo, amino, aminoalquilo, aminosulfonilo, halo, ciano, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroalquilo, C-carboxi, O-carboxi, C-amido, N-amido, nitro, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, haluro de sulfonilo, S-sulfonamido, N-sulfonamido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^1$  y  $R^{1'}$  juntos y con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada  $R^3$  y  $R^4$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alquino, aminoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxialquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^1$  y  $R^3$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido o heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^2$  y  $R^4$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido y heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido;

5  $R^{\text{Het}}$  es un heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más  $R^5$ ;

10 cada  $R^5$  y  $R^6$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alqueno, alquino, haloalquilo, haloalcoxi, alcoxialquilo, amino, aminoalquilo, aminosulfonilo, halo, ciano, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroalquilo, C-carboxi, O-carboxi, C-amido, N-amido, nitro, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, haluro de sulfonilo, S-sulfonamido, N-sulfonamido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido;

R se selecciona de  $-OR^7$  o  $-NR^8R^9$ ;

15 Y se selecciona de O o NH;

$R^7$  se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

20 cada  $R^8$  y  $R^9$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alquino, aminoalquilo, carboxialquilo, sulfonatoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxialquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido; y

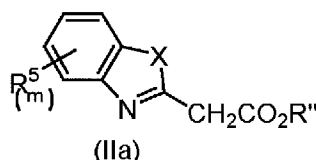
25 n es un número entero de 0 a 4.

Algunas descripciones descritas en la presente memoria se refieren a un nucleótido u oligonucleótido etiquetado con un compuesto de la fórmula (I) o (V).

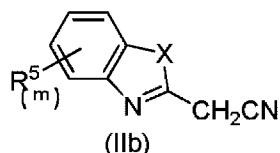
30 Algunas descripciones descritas en la presente memoria se refieren a kits que contienen uno o más nucleótidos donde al menos un nucleótido es un nucleótido etiquetado con un colorante fluorescente descrito en la presente memoria.

35 Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a los métodos de secuenciación que incluyen incorporar un nucleótido etiquetado descrito en la presente memoria a un ensayo de secuenciación y detectar el nucleótido etiquetado.

Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a un método para preparar un compuesto de la fórmula (Ia), los métodos incluyen hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (IIa)



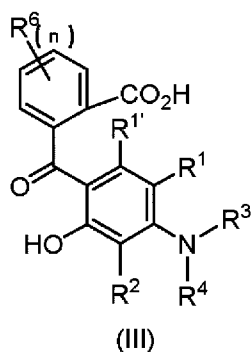
o la fórmula (IIb)



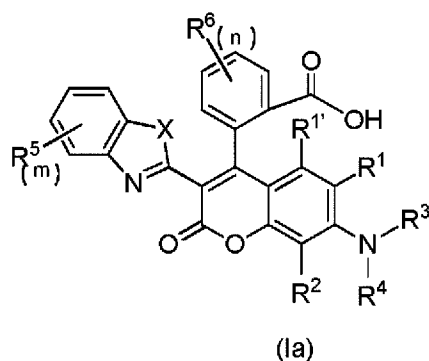
con un compuesto de la fórmula (III)

60

65

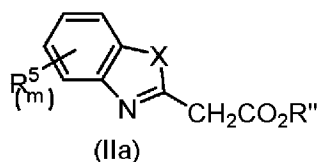


para formar

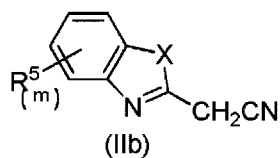


donde las variables  $R^1$ ,  $R^{1'}$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $X$ ,  $m$  y  $n$  se definen anteriormente en la descripción de compuestos de la fórmula (I), y  $R''$  se selecciona de grupo que consiste en H, alquilo opcionalmente sustituido, alquénilo, alquinilo, aminoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxialquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido; heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido.

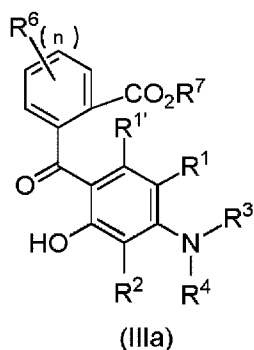
Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a un método para preparar un compuesto de la fórmula (Ia), los métodos incluyen hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (IIa)



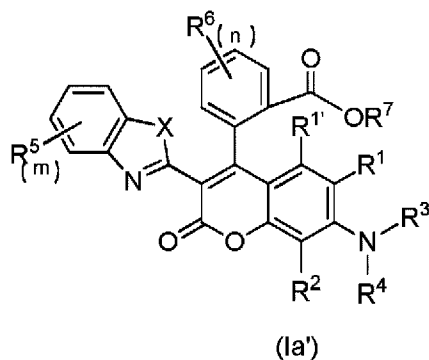
o la fórmula (IIb)



con un compuesto de la fórmula (IIIa)

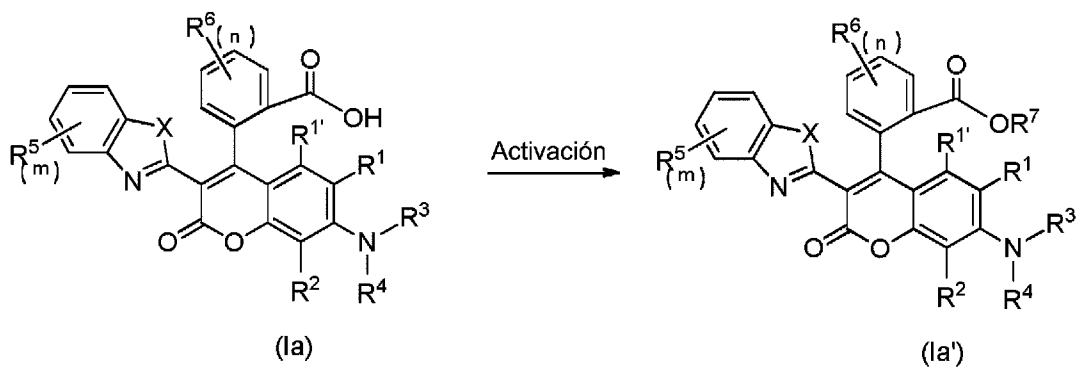


para formar



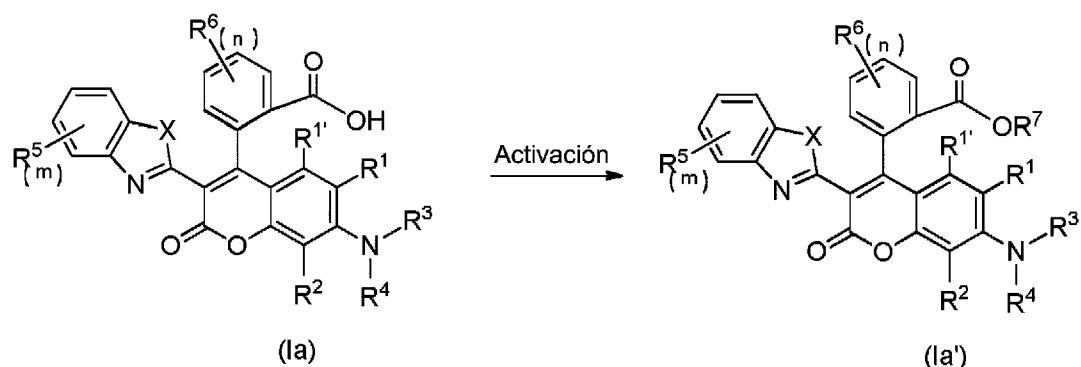
donde las variables  $R^1$ ,  $R^{1'}$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^n$ ,  $X$ ,  $m$  y  $n$  se definen anteriormente.

Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a un método para preparar un compuesto de la fórmula (Ia'), el método incluye convertir un compuesto de la fórmula (Ia) en un compuesto de la fórmula (Ia') a través de la activación con ácido carboxílico:

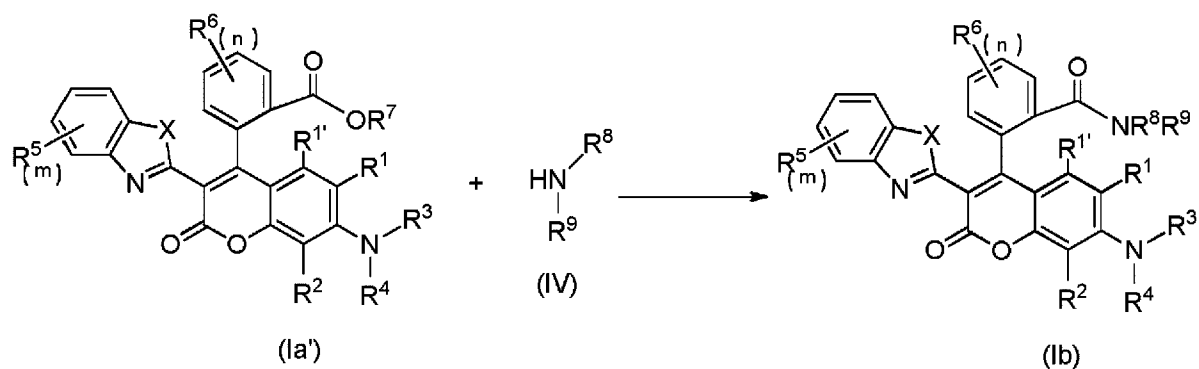


donde las variables  $R^1$ ,  $R^{1'}$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $X$ ,  $m$  y  $n$  se definen anteriormente en la descripción de compuestos de la fórmula (I).

Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a un método para preparar un compuesto de la fórmula (Ib), el método incluye convertir un compuesto de la fórmula (Ia) en un compuesto de la fórmula (Ia') a través de la activación con ácido carboxílico:

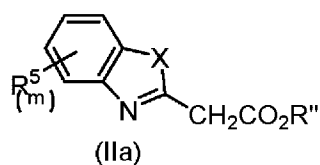


y hacer reaccionar el compuesto de la fórmula (Ia') con una amina primaria o secundaria de la fórmula (IV),

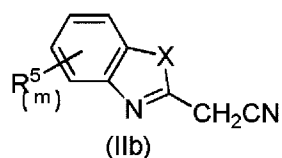


donde las variables  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^{1'}$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^6$ ,  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^8$ ,  $\text{R}^9$ , X, m y n se definen anteriormente en la descripción de compuestos de la fórmula (I).

Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a un método para preparar un compuesto de la fórmula (Ib), los métodos incluyen hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (IIa)

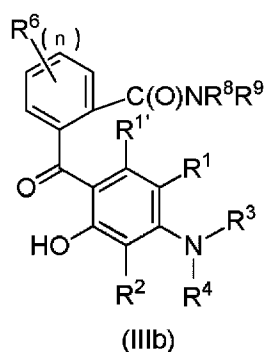


o la fórmula (IIb)

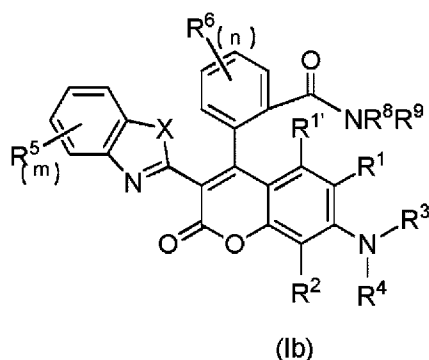


con un compuesto de la fórmula (IIIb)





para formar



donde las variables  $R^1$ ,  $R^{1'}$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R''$ ,  $X$ ,  $m$  y  $n$  se definen anteriormente.

#### Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** es un gráfico lineal que ilustra los espectros fluorescentes de los colorantes fluorescentes de benzopirano descritos en la presente memoria en comparación con colorantes comerciales con absorción en la misma región espectral.

Las **figuras 2A** y **2B** son gráficos que ilustran la utilidad del nucleótido C etiquetado con los nuevos colorantes fluorescentes como se describe en la presente memoria (como se muestra en negro) para el análisis de secuenciación.

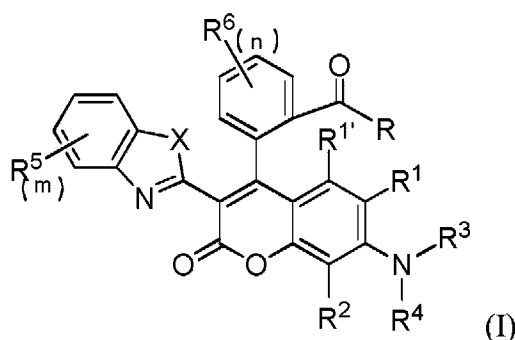
La **figura 3** es un gráfico de barras que ilustra la intensidad fluorescente del nucleótido C etiquetado con los nuevos colorantes fluorescentes como se describe en la presente memoria cuando estos colorantes se excitaron con luz azul (460 nm) o verde (530 nm).

La **figura 4** es un gráfico de barras que ilustra la intensidad fluorescente del nucleótido C etiquetado con un nuevo colorante fluorescente como se describe en la presente memoria en comparación con un colorante comercial a dos temperaturas diferentes.

#### Descripción detallada

Las descripciones descritas en la presente memoria se refieren a nuevos derivados de benzopirano de la estructura de la fórmula (I) o (V) para su uso como colorantes fluorescentes. Estos nuevos colorantes fluorescentes tienen mayores desplazamientos de Stokes y pueden utilizarse como etiquetas fluorescentes, particularmente para el etiquetado de nucleótidos en aplicaciones de secuenciación de los ácidos nucleicos. También se ejemplifican métodos para preparar estos colorantes fluorescentes y aplicaciones de secuenciación posteriores que utilizan estos colorantes.

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a nuevos derivados de benzopirano de la fórmula (I) o formas mesoméricas de los mismos:



en donde cada  $R^1$ ,  $R^2$ , y  $R^{1'}$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, haloalcoxi, alcoxialquilo, amino, aminoalquilo, aminosulfonilo, halo, ciano, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroalquilo, C-carboxi, O-carboxi, C-amido, N-amido, nitro, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, haluro de sulfonilo, S-sulfonamido, N-sulfonamido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^1$  y  $R^{1'}$  juntos y con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada  $R^3$  y  $R^4$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquinilo, aminoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxialquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^1$  y  $R^3$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido o heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^2$  y  $R^4$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido y heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido;

$R^5$  y  $R^6$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, haloalcoxi, alcoxialquilo, amino, aminoalquilo, aminosulfonilo, halo, ciano, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroalquilo, C-carboxi, O-carboxi, C-amido, N-amido, nitro, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, haluro de sulfonilo, S-sulfonamido, N-sulfonamido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido;

R se selecciona de  $-OR^7$  o  $-NR^8R^9$ ;

$R^7$  se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada  $R^8$  y  $R^9$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquinilo, aminoalquilo, carboxialquilo, sulfonatoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxialquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

X se selecciona del grupo que consiste en O, S,  $NR^{10}$  y Se;

$R^{10}$  se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

m es un número entero seleccionado de 0 a 4; y

n es un número entero seleccionado de 0 a 4; siempre que

cuando cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  sea H; cada  $R^3$  y  $R^4$  sea etilo; cada m y n sea 0; R sea  $-NHCH(CH_3)CH_2OH$ ; después X se selecciona de O, S o Se;

cuando cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  sea H; cada  $R^3$  y  $R^4$  sea etilo; cada m y n sea 0; R sea  $-OH$ ; después X se selecciona de S o Se;

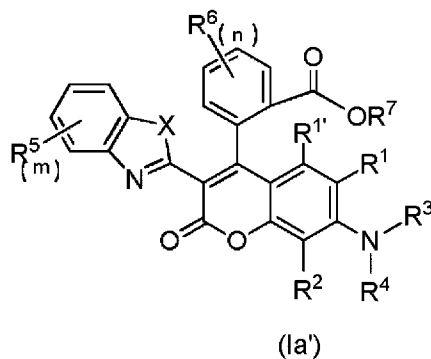
cuando cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  sea H; cada  $R^3$  y  $R^4$  sea etilo; m es 1 y  $R^5$  sea metilo; n sea 0; R sea -OH o -OEt; entonces se selecciona X entre S,  $NR^{10}$  o Se; y

cuando cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  sea H; cada  $R^3$  y  $R^4$  sea etilo; m es 1 y  $R^5$  sea -S(O<sub>2</sub>)Et; n sea 0; R sea -OH o -OEt; entonces se selecciona X entre S,  $NR^{10}$  o Se.

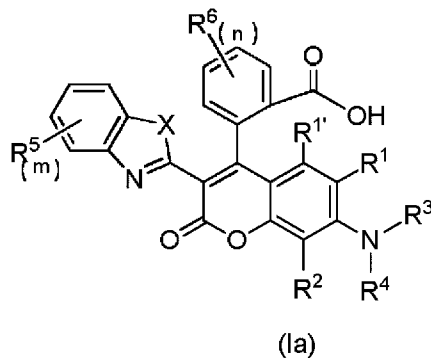
En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (I), cuando cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  sea H; cada  $R^3$  y  $R^4$  sea etilo; m sea 1;  $R^5$  sea Cl; entonces X se selecciona de S, O o Se, preferentemente O.

En algunas realizaciones de los compuestos de la fórmula (I), el arilo opcionalmente sustituido descrito en la presente memoria es arilo C<sub>6-10</sub> opcionalmente sustituido, por ejemplo, fenilo. En algunas realizaciones, el heteroarilo opcionalmente sustituido descrito en la presente memoria es heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido; con mayor preferencia, heteroarilo de 5-6 miembros opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el carbociclilo opcionalmente sustituido descrito en la presente memoria es carbociclilo de 3-7 miembros opcionalmente sustituido, en particular, cicloalquilo de 3-7 miembros. En algunas realizaciones, el heterociclilo opcionalmente sustituido descrito en la presente memoria es heterociclilo de 3-7 miembros opcionalmente sustituido, más preferiblemente heterociclilo de 5-6 miembros.

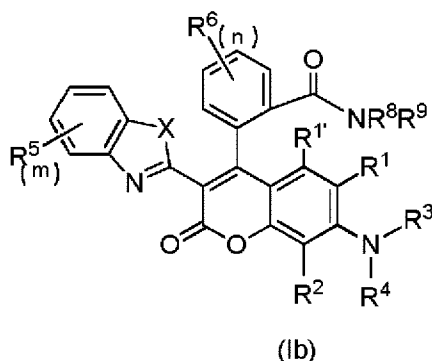
En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (I), R es -OR<sup>7</sup> y el compuesto de la fórmula (I) también está representado por la fórmula (Ia'):



En una descripción, R<sup>7</sup> es H y el compuesto de la fórmula (I) también está representado por la fórmula (Ia):



En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (I), R es -NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup> y el compuesto de la fórmula (I) también está representado por la fórmula (Ib):

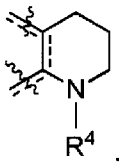


En una descripción, cada  $R^8$  y  $R^9$  es H. En algunas otras descripciones,  $R^8$  es H y  $R^9$  es alquilo sustituido. En algunas realizaciones adicionales, tanto  $R^8$  como  $R^9$  son alquilo sustituido. En algunas de estas descripciones, el alquilo sustituido se selecciona de alquilo sustituido con carboxilo ( $-C(=O)OH$ ), sulfo ( $-SO_3H$ ) o sulfonato ( $-SO_3^-$ ). En algunas otras descripciones, el alquilo sustituido se selecciona de alquilo sustituido con un grupo C-amido.

En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (I), (Ia), (Ia'), o (Ib), cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  es H. En algunas otras descripciones, al menos uno de  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  es un alquilo.

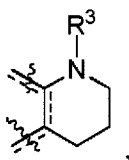
En algunas realizaciones de los compuestos de la fórmula (I), (Ia), (Ia'), o (Ib), cada  $R^3$  y  $R^4$  es un alquilo. En algunas de tales descripciones,  $R^3$  y/o  $R^4$  puede seleccionarse entre metilo o etilo. En algunas otras descripciones,  $R^3$  es H y  $R^4$  es un alquilo. En algunas descripciones,  $R^3$  y  $R^4$  son metilo.

En algunas otras descripciones de los compuestos de la fórmula (I), (Ia), (Ia'), o (Ib),  $R^1$  y  $R^3$  junto con los átomos a los que están unidos para formar un heterociclilo de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido, por ejemplo, un heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. En algunas descripciones, el anillo heterociclilo tiene un heteroátomo (es decir, nitrógeno). En algunas otras descripciones, el anillo heterociclilo puede tener dos o más heteroátomos. En una descripción, el heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido tiene la estructura



donde el ——— representa un enlace simple o un enlace doble, de modo que cada uno de los átomos de carbono en el anillo es neutro y no tiene carga. En algunas de tales descripciones,  $R^4$  se selecciona de H o alquilo. En una descripción,  $R^4$  es etilo. En algunas de tales realizaciones, al menos uno de  $R^1$  y  $R^2$  es H. En una realización, tanto  $R^1$  como  $R^2$  son H.

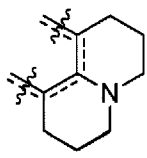
En algunas otras descripciones de los compuestos de la fórmula (I), (Ia), (Ia'), o (Ib),  $R^2$  y  $R^4$  junto con los átomos a los que están unidos para formar un heterociclilo de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido, por ejemplo, un heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. En algunas descripciones, el anillo heterociclilo tiene un heteroátomo (es decir, nitrógeno). En algunas otras descripciones, el anillo heterociclilo puede tener dos o más heteroátomos. En una descripción, el heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido tiene la estructura



donde el ——— representa un enlace simple o un enlace doble, de modo que cada uno de los átomos de carbono en el anillo es neutro y no tiene carga. En algunas de tales descripciones,  $R^3$  se selecciona de H o alquilo. En una descripción,  $R^3$  es etilo. En algunas de tales descripciones, al menos uno de  $R^1$  y  $R^2$  es H. En una descripción, tanto  $R^1$  como  $R^2$  son H.

En algunas descripciones alternativas de los compuestos de la fórmula (I), (Ia), (Ia'), o (Ib),  $R^1$  y  $R^3$  junto con los átomos a los que están unidos para formar un heterociclilo de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido, por ejemplo, un heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; y  $R^2$  y  $R^4$  junto con los átomos a los que están unidos para

formar un heterociclilo de 3-7 miembros opcionalmente sustituido, por ejemplo, un heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. En algunas descripciones, el sistema de anillo heterociclilo fundido resultante tiene un heteroátomo (es decir, nitrógeno). En algunas otras descripciones, el sistema de anillo heterociclilo fundido resultante puede tener dos o más heteroátomos. En una descripción, el sistema de anillo heterociclilo fundido resultante tiene la estructura



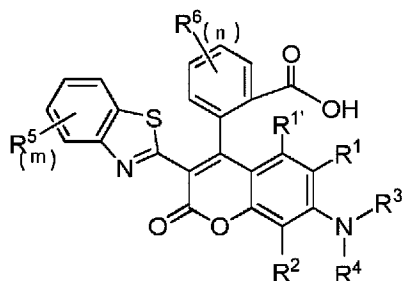
donde el — representa un enlace simple o un enlace doble, de modo que cada uno de los átomos de carbono en el anillo es neutro y no tiene carga. En una descripción,  $R^1$  es H.

En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (I), (Ia), (Ia') o (Ib), el anillo heterociclilo de 3-7 miembros formado por  $R^1 / R^3$  y/o  $R^2 / R^4$  no están sustituidos. En algunas otras descripciones, tal heterociclilo de 3-7 miembros se sustituye con uno o más alquilo, por ejemplo, metilo.

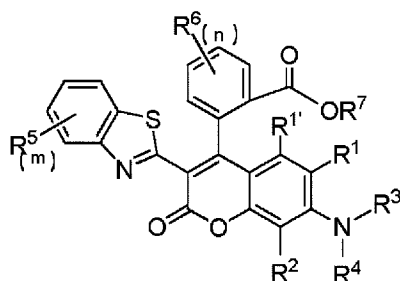
En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (I), (Ia), (Ia'), o (Ib),  $m$  es 0. En algunas otras descripciones,  $m$  es 1. En algunas de tales descripciones,  $R^5$  se selecciona de sulfo, haluro de sulfonilo, por ejemplo, cloruro de sulfonilo, o aminosulfonilo. En algunas descripciones,  $R^5$  es halógeno. En algunas descripciones,  $R^5$  es cloro.

En algunas descripciones de la fórmula (I), (Ia), (Ia'), o (Ib),  $n$  es 0.

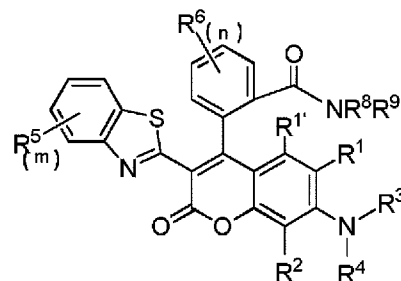
En una cualquiera de las descripciones de los compuestos de la fórmula (I), (Ia), (Ia') o (Ib) descritos en la presente memoria, X puede ser S (azufre). En una cualquiera de las descripciones de los compuestos de la fórmula (I), (Ia), (Ia') o (Ib) descritos en la presente memoria, X puede ser O (oxígeno). En algunas de tales descripciones, los compuestos de la fórmula (Ia), (Ia') e (Ib) también pueden representarse mediante las Fórmulas (Ic), (Ic') e (Id), respectivamente:



(Ic)

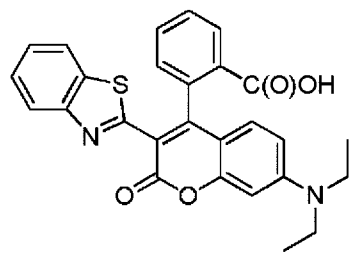


(Ic')

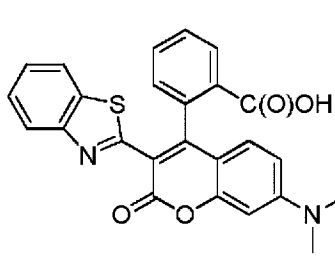


(Id)

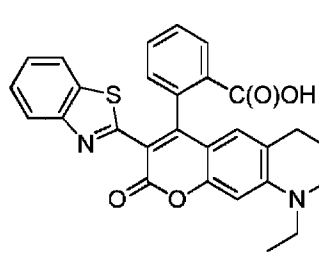
En algunas descripciones específicas, los compuestos ejemplares de la fórmula (I) incluyen:



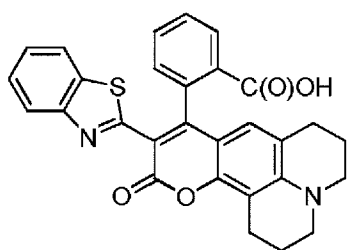
(I-1),



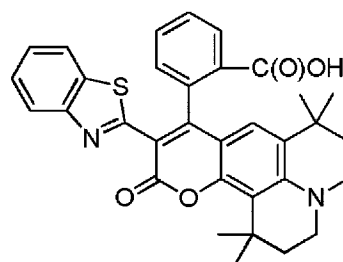
(I-2),



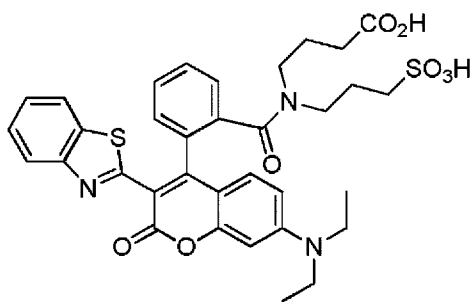
(I-3),



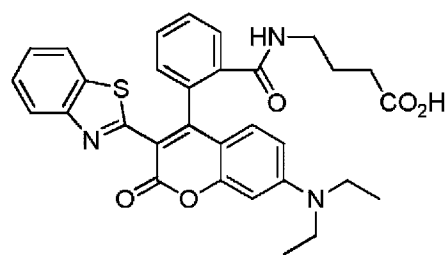
(I-4),



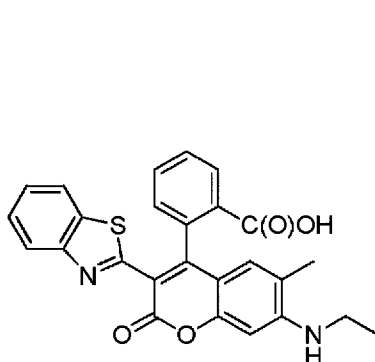
(I-5),



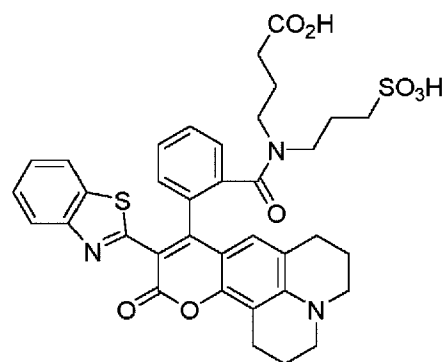
(I-6),



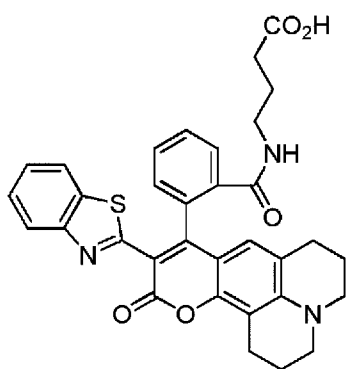
(I-7),



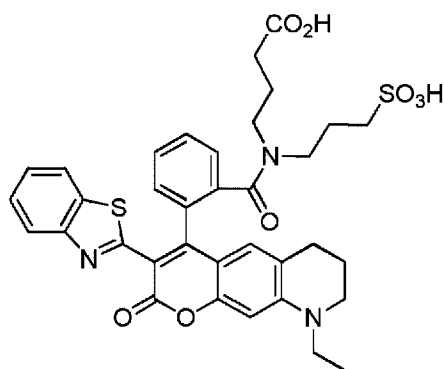
(I-8),



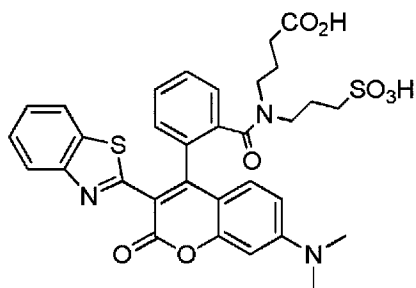
(I-9),



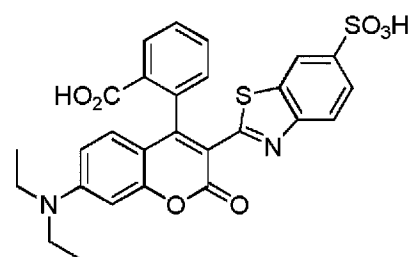
(I-10),



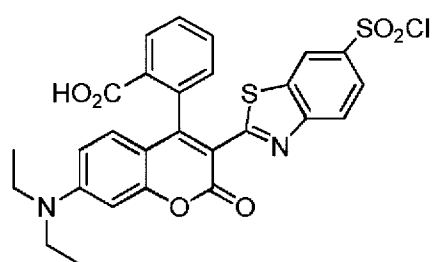
(I-11),



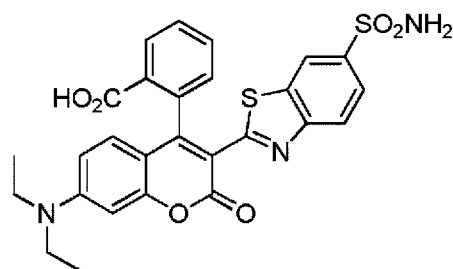
(I-12),



(I-13),

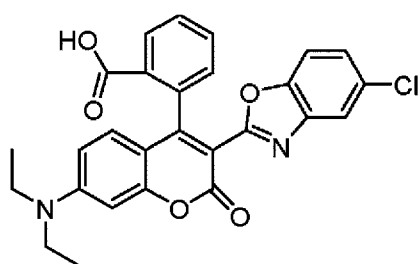


(I-14),



(I-15),

y



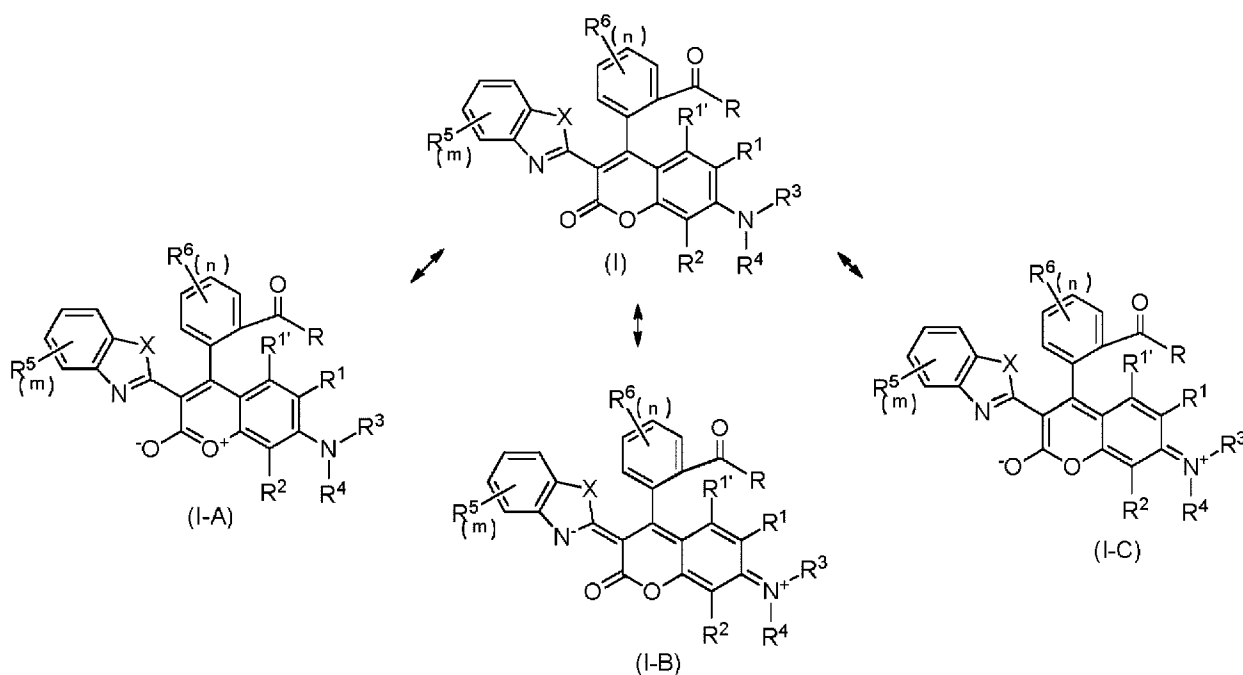
(I-16),

o formas mesoméricas de los mismos.

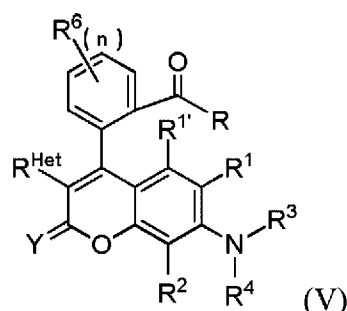
En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (I), el compuesto está unido covalentemente a un nucleótido u oligonucleótido a través de  $C(=O)R$ , en donde  $R$  es  $-OR^7$ , y donde  $R^7$  es un alquilo sustituido.

En algunas descripciones alternativas, el compuesto está unido covalentemente a un nucleótido u oligonucleótido a través de  $C(=O)R$ , en donde  $R$  es  $-NR^8R^9$ , y en donde al menos uno de  $R^8$  o  $R^9$  comprende al menos un grupo funcional que puede utilizarse para el acoplamiento a las biomoléculas, por ejemplo, uno de  $R^8$  o  $R^9$  es un alquilo sustituido que comprende al menos un grupo carboxilo.

En algunas descripciones, el compuesto de la fórmula (I) está presente en una o más formas mesoméricas (I-A), (I-B) o (I-C):



Algunas descripciones descritas en la presente memoria se refieren a un compuesto fluorescente de la fórmula (V) con un desplazamiento de Stokes que varía de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 100 nm:



en donde cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, haloalcoxi, alcoxialquilo, amino, aminoalquilo, aminosulfonilo, halo, ciano, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroalquilo, C-carboxi, O-carboxi, C-amido, N-amido, nitro, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, haluro de sulfonilo, S-sulfonamido, N-sulfonamido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^1$  y  $R^{1'}$  juntos y con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada  $R^3$  y  $R^4$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquinilo, aminoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxialquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^1$  y  $R^3$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido o heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^2$  y  $R^4$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido y heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido;

$R^{Het}$  es un heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más  $R^5$ ;

cada  $R^5$  y  $R^6$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, haloalcoxi, alcoxialquilo, amino, aminoalquilo, aminosulfonilo, halo, ciano, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroalquilo, C-carboxi, O-carboxi, C-amido, N-amido, nitro, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, haluro de sulfonilo, S-sulfonamido, N-sulfonamido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido;

R se selecciona de  $-OR^7$  o  $-NR^8R^9$ ;

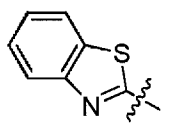
Y se selecciona de O o NH;

$R^7$  se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada  $R^8$  y  $R^9$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquinilo, aminoalquilo, carboxialquilo, sulfonatoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxialquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido; y

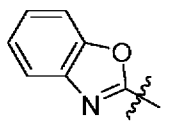
n es un número entero de 0 a 4.

En algunas descripciones de la fórmula (V),  $R^{Het}$  se selecciona de heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido. En algunas de estas descripciones,  $R^{Het}$  se selecciona de heteroarilo de 9 miembros opcionalmente sustituido, por ejemplo, benzotiazol opcionalmente sustituido. En una descripción,  $R^{Het}$  es 2-benzotiazolilo opcionalmente sustituido:



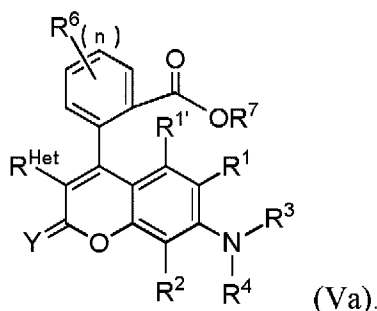


En una descripción,  $R^{\text{Het}}$  es 2-benzoxazolilo opcionalmente sustituido con la estructura



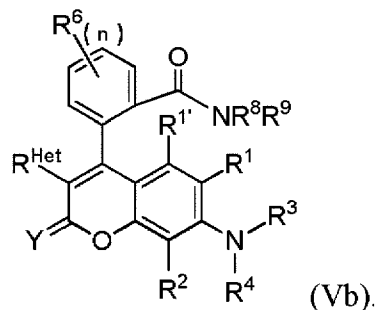
En algunas de tales descripciones,  $R^{\text{Het}}$  está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre sulfo, haluro de sulfonilo o aminosulfonilo. En algunas de tales descripciones,  $R^{\text{Het}}$  está sustituido con uno o más halógenos. En algunas de tales descripciones,  $R^{\text{Het}}$  está sustituido con un cloro.

En algunas descripciones,  $R$  es  $-OR^7$  y los compuestos de la fórmula (V) también están representados por la fórmula (Va):



En una descripción,  $R^7$  es H. En otra descripción,  $R^7$  es alquilo sustituido.

En algunas descripciones,  $R$  es  $-NR^8R^9$  y los compuestos de la fórmula (V) también están representados por la fórmula (Vb):



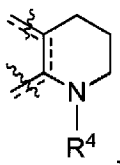
En una descripción, cada  $R^8$  y  $R^9$  es H. En algunas otras descripciones,  $R^8$  es H y  $R^9$  es alquilo sustituido. En algunas realizaciones adicionales, tanto  $R^8$  como  $R^9$  son alquilo sustituido. En algunas de tales descripciones, el alquilo sustituido se selecciona de alquilo sustituido con carboxilo ( $-C(=O)OH$ ) o sulfo ( $-SO_3H$ ) o sulfonato ( $-SO_3^-$ ). En algunas otras descripciones, el alquilo sustituido se selecciona de alquilo sustituido con un grupo C-amido.

En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (V), (Va) o (Vb),  $Y$  es O.

En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (V), (Va) o (Vb), cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  es H. En algunas otras descripciones, al menos uno de  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  es un alquilo.

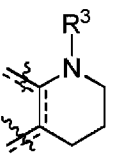
En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (V), (Va) o (Vb), cada  $R^3$  y  $R^4$  es un alquilo. En algunas de tales descripciones,  $R^3$  y/o  $R^4$  puede seleccionarse entre metilo o etilo. En algunas otras descripciones,  $R^3$  es H y  $R^4$  es un alquilo.

En algunas otras descripciones de los compuestos de la fórmula (V), (Va) o (Vb),  $R^1$  y  $R^3$  junto con los átomos a los que están unidos para formar un heterociclilo de 3-7 miembros opcionalmente sustituido, por ejemplo, un heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. En algunas descripciones, el anillo heterociclilo tiene un heteroátomo (es decir, nitrógeno). En algunas otras descripciones, el anillo heterociclilo puede tener dos o más heteroátomos. En una descripción, el heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido tiene la estructura



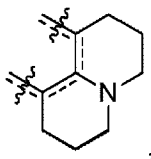
donde el ——— representa un enlace simple o un enlace doble, de modo que cada uno de los átomos de carbono en el anillo es neutro y no tiene carga. En algunas de tales descripciones,  $R^4$  se selecciona de H o alquilo. En una descripción,  $R^4$  es etilo. En algunas realizaciones adicionales, al menos uno de  $R^1$  y  $R^2$  es H. En una descripción, tanto  $R^1$  como  $R^2$  son H.

En algunas otras descripciones de los compuestos de la fórmula (V), (Va) o (Vb),  $R^2$  y  $R^4$  junto con los átomos a los que están unidos para formar un heterociclilo de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido, por ejemplo, un heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. En algunas descripciones, el anillo heterociclilo tiene un heteroátomo (es decir, nitrógeno). En algunas otras descripciones, el anillo heterociclilo puede tener dos o más heteroátomos. En una descripción, el heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido tiene la estructura



donde el ——— representa un enlace simple o un enlace doble, de modo que cada uno de los átomos de carbono en el anillo es neutro y no tiene carga. En algunas de tales descripciones,  $R^3$  se selecciona de H o alquilo. En una descripción,  $R^3$  es etilo. En algunas descripciones adicionales, al menos uno de  $R^1$  y  $R^2$  es H. En una descripción, tanto  $R^1$  como  $R^2$  son H.

En algunas descripciones alternativas de los compuestos de la fórmula (V), (Va) o (Vb),  $R^1$  y  $R^3$  junto con los átomos a los que están unidos para formar un heterociclilo de 3-7 miembros opcionalmente sustituido, por ejemplo, un heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; y  $R^2$  y  $R^4$  junto con los átomos a los que están unidos para formar un heterociclilo de 3-7 miembros opcionalmente sustituido, por ejemplo, un heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. En algunas descripciones, el sistema de anillo heterociclilo fundido resultante tiene un heteroátomo (es decir, nitrógeno). En algunas otras descripciones, el sistema de anillo heterociclilo fundido resultante puede tener dos o más heteroátomos. En una descripción, el sistema de anillo heterociclilo fundido resultante tiene la estructura



donde el ——— representa un enlace simple o un enlace doble, de modo que cada uno de los átomos de carbono en el anillo es neutro y no tiene carga. En una descripción,  $R^1$  es H.

En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (V), (Va) o (Vb), el anillo heterociclilo de 3-7 miembros formado por  $R^1 / R^3$  y/o  $R^2 / R^4$  no están sustituidos. En algunas otras descripciones, tal heterociclilo de 3-7 miembros se sustituye con uno o más alquilos, por ejemplo, metilo.

En algunas descripciones de los compuestos de la fórmula (V), (Va) o (Vb),  $n$  es 0.

En algunas descripciones específicas de la fórmula (V), (Va) o (Vb), los compuestos ejemplares de la fórmula (V) incluyen los compuestos I-1 a través de I-15 como se describe en la presente memoria.

En algunas descripciones, el compuesto fluorescente de la fórmula (V) está unido covalentemente a un nucleótido u oligonucleótido a través de  $C(=O)R$ , donde  $R$  es  $-OR^7$ , y donde  $R^7$  es un alquilo sustituido.

En algunas descripciones alternativas, el compuesto fluorescente de la fórmula (V) está unido covalentemente a un nucleótido u oligonucleótido a través de  $C(=O)R$ , donde  $R$  es  $-NR^8R^9$ , y en donde al menos uno de  $R^8$  o  $R^9$  es un alquilo sustituido.

## Definiciones

Los encabezados de secciones que se utilizan en la presente memoria tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como una limitación de la materia descrita.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el significado que entiende comúnmente un experto en la técnica. Además, el uso del término “incluyendo”, así como otras formas, como “incluyen”, “incluye” e “incluido”, no es limitativo. Además, el uso del término “que tiene”, así como otras formas, como “tienen”, “tiene” y “tenido”, no es limitativo. Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, ya sea en una expresión de transición o en el cuerpo de la reivindicación, se ha de interpretar que las expresiones “que consta de” y “que constan de” tienen un significado abierto. Es decir, las expresiones se han de interpretar como sinónimos de las expresiones “que tiene(n) al menos” o “que incluye(n) al menos”. Cuando se utiliza en el contexto de un proceso, la expresión “que consta de” significa que el proceso incluye al menos las etapas citadas, pero puede incluir etapas adicionales. Cuando se utiliza en el contexto de un compuesto, composición o dispositivo, la expresión “que consta de” significa que el compuesto, la composición o el dispositivo incluye al menos las características o los componentes citados, pero que también puede incluir características o componentes adicionales.

Como se utilizan en la presente memoria, las abreviaturas orgánicas comunes se definen de la siguiente manera:

Ac Acetil

Ac<sub>2</sub>O Anhídrido acético

ac. Acuoso

BOC o Boc tert-butiloxycarbonilo

BOP (Benzotriazol-1-iloxi) tris (dimetilamino) fosfonio hexafluorofosfato

cat. Catalizador

°C temperatura en grados centígrados

dATP trifosfato de desoxiadenosina

dCTP trifosfato de desoxicitidina

dGTP trifosfato de desoxiguanosina

dTTP trifosfato de desoxitimidina

ddNTP(s) didesoxinucleótido(s)

DCM cloruro de metileno

DMA dimetilacetamida

DMF dimetilformamida

Et etilo

EtOAc acetato de etilo

ffN Conjugado de nucleótido completamente funcional

ffC Conjugado de citidina completamente funcional

g gramo(s)

h o hr hora u horas

IPA alcohol isopropílico

LCMS cromatografía líquida-espectrometría de masas

	MeCN	acetonitrilo
	mL	mililitro(s)
5	PG	grupo protector
	Ph	fenilo
	ppt	precipitado
10	PyBOP	(benzotriazol-1-iloxi) hexafluorofosfato de tripirrolidinomio
	ta	temperatura ambiente
15	SBS	secuenciación por síntesis
	TEA	triethylamina
	TEAB	bicarbonato de tetraetilamonio
20	TFA	ácido trifluoroacético
	Tert, t	terciario
25	THF	tetrahidrofurano
	TLC	cromatografía en capa fina
	TSTU	tetrafluoroborato de O-(N-succinimidilo) N,N,N',N'-tetrametiluronio
30	μL	microlitro(s)

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “unido covalentemente” o “enlazado covalentemente” se refiere a la conformación de un enlace químico que se caracteriza por compartir pares de electrones entre átomos. Por ejemplo, una “lámina de polímero unida covalentemente”, cuando se utiliza en referencia a la superficie de un sustrato, se refiere a una lámina de polímero que forma enlaces químicos con la superficie funcionalizada de un sustrato, en comparación con la unión a la superficie a través de otros medios, por ejemplo, la adhesión o la interacción electrostática. Se apreciará que los polímeros que se unen covalentemente a una superficie también se pueden unir a través de distintos medios, además de la unión covalente.

El término “halógeno” o “halo”, como se utiliza en la presente memoria, significa uno cualquiera de los átomos radioestables de la columna 7 de la Tabla periódica de los elementos, *p. ej.*, flúor, cloro, bromo o yodo, prefiriéndose el flúor y el cloro.

Como se utiliza en la presente memoria, “alquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburos recta o ramificada que está completamente saturada (es decir, que no contiene enlaces dobles ni triples). El grupo alquilo puede tener de 1 a 20 átomos de carbono (siempre que aparezca en la presente memoria, un intervalo numérico tal como “de 1 a 20” se refiere a cada número entero en el intervalo dado; *p. ej.*, “de 1 a 20 átomos de carbono” significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, *etc.*, hasta e inclusive 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también abarca la aparición del término “alquilo” donde no se designa ningún rango numérico). El grupo alquilo también puede ser un alquilo de tamaño medio que tenga de 1 a 9 átomos de carbono. El grupo alquilo podría ser un alquilo inferior que tenga de 1 a 6 átomos de carbono. El grupo alquilo puede designarse como “alquilo C<sub>1-4</sub>” o designaciones similares. Únicamente como ejemplo, “alquilo C<sub>1-6</sub>” indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena alquilo, es decir, la cadena alquilo se selecciona en el grupo que consta de metilo, etilo, propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo y t-butilo. Los grupos alquilo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa de ninguna manera, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo y similares.

Como se emplea en la presente memoria, “alcoxi” se refiere a la fórmula -OR en la que R es un alquilo como se definió anteriormente, tal como “alcoxi C<sub>1-9</sub>”, que incluye, entre otros, metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-metiletoxí (isopropoxi), n-butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi y tert-butoxi, y similares.

Como se utiliza en la presente memoria, “alquenilo” se refiere a una cadena de hidrocarburos recta o ramificada que contiene uno o más enlaces dobles. El grupo alquenilo puede tener de 2 a 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también abarca la aparición del término “alquenilo” cuando no se designa ningún intervalo numérico. El grupo alquenilo también puede ser un alquenilo de tamaño medio que tenga de 2 a 9 átomos de carbono. El grupo

alquenilo podría ser un alquenilo inferior que tenga de 2 a 6 átomos de carbono. El grupo alquenilo puede designarse como “alquenilo C<sub>2-6</sub>” o designaciones similares. Únicamente como ejemplo, “alquenilo C<sub>2-6</sub>” indica que hay de dos a seis átomos de carbono en la cadena de alquenilo, es decir, la cadena de alquenilo se selecciona en el grupo que consta de etenilo, propen-1-ilo, propen-2-ilo, propen-3-ilo, buten-1-ilo, buten-2-ilo, buten-3-ilo, buten-4-ilo, 1-metil-propen-1-ilo, 2-metil-propen-1-ilo, 1-etil-eten-1-ilo, 2-metil-propen-3-ilo, buta-1,3-dienilo, buta-1,2-dienilo y buta-1,2-dien-4-ilo. Los grupos alquenilo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa de ninguna manera, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo y hexenilo, y similares.

Como se utiliza en la presente memoria, “alquinilo” se refiere a una cadena de hidrocarburos recta o ramificada que contiene uno o más enlaces triples. El grupo alquinilo puede tener de 2 a 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también abarca la aparición del término “alquinilo” cuando no se designa ningún intervalo numérico. El grupo alquinilo también puede ser un alquinilo de tamaño medio que tenga de 2 a 9 átomos de carbono. El grupo alquinilo podría ser un alquinilo inferior que tenga de 2 a 6 átomos de carbono. El grupo alquinilo puede designarse como “alquinilo C<sub>2-6</sub>” o designaciones similares. Únicamente como ejemplo, “alquinilo C<sub>2-6</sub>” indica que hay de dos a seis átomos de carbono en la cadena de alquinilo, es decir, la cadena de alquinilo se selecciona en el grupo que consta de etinilo, propin-1-ilo, propin-2-ilo, butin-1-ilo, butin-3-ilo, butin-4-ilo y 2-butinilo. Los grupos alquinilo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa de ninguna manera, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo, y similares.

Como se emplea en la presente memoria, “heteroalquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburo recta o ramificada que contiene uno o más heteroátomos, es decir, un elemento distinto del carbono, que incluye, entre otros, nitrógeno, oxígeno y azufre, en la estructura molecular básica de la cadena. El grupo heteroalquilo puede tener de 1 a 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también abarca la aparición del término “heteroalquilo” cuando no se designa ningún intervalo numérico. El grupo heteroalquilo también puede ser un heteroalquilo de tamaño medio que tenga de 1 a 9 átomos de carbono. El grupo heteroalquilo podría ser un heteroalquilo inferior que tenga de 1 a 6 átomos de carbono. El grupo heteroalquilo puede designarse como “heteroalquilo C<sub>1-6</sub>” o designaciones similares. El grupo heteroalquilo puede contener uno o más heteroátomos. Solo a modo de ejemplo, “heteroalquilo C<sub>1-6</sub>” indica que hay de uno a seis átomos de carbono en la cadena de heteroalquilo y adicionalmente uno o más heteroátomos en la estructura molecular básica de la cadena.

El término “aromático” se refiere a un anillo o sistema de anillos que tiene un sistema de electrones pi conjugado e incluye grupos aromáticos carbocíclicos (por ejemplo, fenilo) y heterocíclicos (por ejemplo, piridina). El término incluye grupos monocíclicos o policíclicos de anillos condensados (es decir, anillos que comparten pares de átomos adyacentes), siempre que todo el sistema de anillos sea aromático.

Como se utiliza en la presente memoria, “arilo” se refiere a un anillo o sistema de anillos aromáticos (es decir, dos o más anillos fusionados que comparten dos átomos de carbono adyacentes) que solo contienen carbono en la estructura molecular básica del anillo. Cuando el arilo es un sistema de anillos, cada anillo del sistema es aromático. El grupo arilo puede tener de 6 a 18 átomos de carbono, aunque la presente definición también abarca la aparición del término “arilo” cuando no se designa ningún intervalo numérico. En algunas realizaciones, el grupo arilo tiene de 6 a 10 átomos de carbono. El grupo arilo puede designarse como “arilo C<sub>6-10</sub>”, “arilo C<sub>6</sub>” o “arilo C<sub>10</sub>” o designaciones similares. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, entre otros, fenilo, naftilo, fluorenilo, azulenilo, antrilo, fenantrilo, pirenilo, bifenilo y terfenilo.

Un “aralquilo” o “arilalquilo” es un grupo arilo conectado, como sustituyente, a través de un grupo alquileo, tal como “aralquilo C<sub>7-14</sub>” y similares, que incluyen, entre otros, bencilo, 2-feniletilo, 3-fenilpropilo y naftilalquilo. En algunos casos, el grupo alquileo es un grupo alquileo inferior (es decir, un grupo alquileo C<sub>1-6</sub>).

Como se utiliza en la presente memoria, “heteroarilo” se refiere a un anillo o sistema de anillos aromáticos (es decir, dos o más anillos fusionados que comparten dos átomos adyacentes) que contiene/n uno o más heteroátomos, es decir, un elemento que no es carbono, incluidos, entre otros, nitrógeno, oxígeno y azufre, en la estructura molecular básica del anillo. Cuando el heteroarilo es un sistema de anillos, cada anillo en el sistema es aromático. El grupo heteroarilo puede tener 5-18 miembros de anillo (es decir, el número de átomos que forman la estructura molecular básica del anillo, que incluye átomos de carbono y heteroátomos), aunque la presente definición también abarca la aparición del término “heteroarilo” cuando no se designa ningún rango numérico. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo tiene 5 a 10 miembros del anillo o 5 a 7 miembros del anillo. El grupo heteroarilo puede designarse como “heteroarilo de 5-7 miembros”, “heteroarilo de 5-10 miembros” o designaciones similares. Los ejemplos de anillos de heteroarilo incluyen, entre otros, furilo, tienilo, ftalazinilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, indolilo, isoindolilo y benzotienilo.

Un “heteroaralquilo” o “heteroarilalquilo” es un grupo heteroarilo conectado, como un sustituyente, mediante un grupo alquileo. Los ejemplos incluyen, entre otros, 2-tienilmetilo, 3-tienilmetilo, furilmetilo, tieniletilo, pirrolilalquilo, piridilalquilo, isoxazolilalquilo e imidazolilalquilo. En algunos casos, el grupo alquileo es un grupo alquileo inferior (es decir, un grupo alquileo C<sub>1-6</sub>).

Como se utiliza en la presente memoria, “carbociclilo” hace referencia un anillo o sistema de anillos cíclicos no aromático/s que solo contiene átomos de carbono en la estructura molecular básica del sistema de anillo. Cuando el carbociclilo es un sistema de anillo, se pueden unir dos o más anillos de forma fusionada, por puentes o conectada en espiral. Los carbociclicos pueden tener cualquier grado de saturación, siempre que al menos un anillo de un sistema de anillos no sea aromático. Por lo tanto, los carbociclicos incluyen cicloalquilos, cicloalquenos y cicloalquinos. El grupo carbociclilo puede tener de 3 a 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también abarca la aparición del término “carbociclilo” cuando no se designa ningún intervalo numérico. El grupo carbociclilo también puede ser un carbociclilo de tamaño medio que tenga de 3 a 10 átomos de carbono. El grupo carbociclilo podría ser un carbociclilo que tenga de 3 a 6 átomos de carbono. El grupo carbociclilo puede designarse como “carbociclilo C<sub>3-6</sub>” o designaciones similares. Los ejemplos de anillos de carbociclilo incluyen, entre otros, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 2,3-dihidro-indeno, biciclo[2.2.2]octanilo, adamantilo y espiro[4.4]nonanilo.

Como se utiliza en la presente memoria, “cicloalquilo” significa un anillo o sistema de anillos carbociclilo completamente saturado. Los ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

Como se utiliza en la presente memoria, “heterociclilo” hace referencia a un anillo o sistema de anillos cíclico no aromático que contiene al menos un heteroátomo en la estructura molecular básica del anillo. Los heterociclicos pueden unirse entre sí de forma fusionada, por puentes o conectada a espiro. Los heterociclicos pueden tener cualquier grado de saturación siempre que al menos un anillo en el sistema de anillos no sea aromático. El/los heteroátomo/s puede/n estar presente/s en un anillo aromático o no aromático dentro del sistema de anillos. El grupo heterociclilo puede tener 3 a 20 miembros del anillo (es decir, el número de átomos que forman la estructura molecular básica del anillo, que incluye átomos de carbono y heteroátomos), aunque la presente definición también abarca la aparición del término “heterociclilo” cuando no se designa ningún rango numérico. El grupo heterociclilo también puede ser un heterociclilo de tamaño medio que tenga de 3 a 10 miembros del anillo. El grupo heterociclilo también podría ser un heterociclilo que tenga de 3 a 6 miembros del anillo. El grupo heterociclilo puede designarse como “heterociclilo de 3-6 miembros” o designaciones similares. En los heterociclicos monocíclicos preferidos de seis miembros, el(los) heteroátomo(s) se selecciona(n) en uno hasta tres de O, N o S, y entre los heterociclicos monocíclicos preferidos de cinco miembros, el(los) heteroátomo(s) se selecciona(n) entre uno o dos heteroátomos seleccionados de O, N o S. Los ejemplos de anillos heterociclicos incluyen, pero no se limitan a, azepinilo, acridinilo, carbazolilo, cinnolinilo, dioxolanilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, morfolinilo, oxiranilo, oxeanilo, tiepanilo, piperidinilo, piperazinilo, dioxoperazinilo, pirrolidinilo, pirrolidonilo, pirrolidionilo, 4-piperidonilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, 1,3-dioxinilo, 1,3-dioxanilo, 1,4-dioxinilo, 1,4-dioxanilo, 1,3-oxatianilo, 1,4-oxatiinilo, 1,4-oxatianilo, 2H-1,2-oxazinilo, trioxanilo, hexahidro-1,3,5-triazinilo, 1,3-dioxolilo, 1,3-dioxolanilo, 1,3-ditiolilo, 1,3-ditiolanilo, isoxazolinilo, isoxazolidinilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, oxazolidinonilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, 1,3-oxatiolanilo, indolinilo, isoindolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidro-1,4-tiazinilo, tiamorfolinilo, dihidrobenzofuranilo, bencimidazolidinilo, y tetrahidroquinolina.

Un grupo “O-carboxi” se refiere a un grupo “-OC(=O)R” en el que R se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 3-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo “C-carboxi” se refiere a un grupo “-C(=O)OR” en el que R se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 3-10 miembros, como se define en la presente memoria. Un ejemplo no limitante incluye el carboxilo (es decir, -C(=O)OH).

Un grupo “ciano” se refiere a un grupo “-CN”.

Un grupo “sulfonilo” se refiere a un grupo “-SO<sub>2</sub>R” en el que R se selecciona entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 3-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo “sulfo” o “hidróxido de sulfonilo” se refiere a un grupo “-S(=O)<sub>2</sub>-OH”.

Un grupo “sulfinio” se refiere a un grupo “-S(=O)OH”.

Un grupo “sulfonato” se refiere a -SO<sub>3</sub>.

Un grupo “haluro de sulfonilo” se refiere a un grupo “-S(=O)<sub>2</sub>-X”, en donde X es un haluro.

Un grupo “S-sulfonamido” se refiere a un grupo “-SO<sub>2</sub>NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>” en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 3-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo “N-sulfonamido” se refiere a un grupo “-N(R<sub>A</sub>)SO<sub>2</sub>R<sub>B</sub>” en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 3-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo “C-amido” se refiere a un grupo “-C(=O)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>” en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 3-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo “N-amido” se refiere a un grupo “-N(R<sub>A</sub>)C(=O)R<sub>B</sub>” en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 3-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo “amino” se refiere a un grupo “-NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>” en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 3-10 miembros, como se define en la presente memoria. Un ejemplo no limitativo incluye amino libre (es decir, -NH<sub>2</sub>).

Un grupo “aminoalquilo” se refiere a un grupo amino conectado mediante un grupo alquileo.

Un grupo “aminosulfonilo” se refiere a un grupo “-S(=O)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>”.

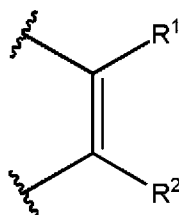
Un grupo “alcoxialquilo” se refiere a un grupo alcoxi conectado mediante un grupo alquileo, como un “alcoxialquilo C<sub>2-8</sub>” y similares.

Como se utiliza en la presente memoria, un grupo sustituido deriva del grupo original no sustituido en el que ha habido un intercambio de uno o más átomos de hidrógeno por otro átomo o grupo. A menos que se indique lo contrario, cuando se considera que un grupo es “sustituido”, se entiende que el grupo es sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>1-6</sub>, alquinilo C<sub>1-6</sub>, heteroalquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub> (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquilo C<sub>1-6</sub> y haloalcoxi C<sub>1-6</sub>), carbociclil-C<sub>3-7</sub>-alquilo-C<sub>1-6</sub> (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquilo C<sub>1-6</sub> y haloalcoxi C<sub>1-6</sub>), heterociclilo de 3-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquilo C<sub>1-6</sub> y haloalcoxi C<sub>1-6</sub>), heterociclil-alquilo-C<sub>1-6</sub> de 3-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquilo C<sub>1-6</sub> y haloalcoxi C<sub>1-6</sub>), arilo (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquilo C<sub>1-6</sub> y haloalcoxi C<sub>1-6</sub>), aril-alquilo (C<sub>1-6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquilo C<sub>1-6</sub> y haloalcoxi C<sub>1-6</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquilo C<sub>1-6</sub> y haloalcoxi C<sub>1-6</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros alquilo (C<sub>1-6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquilo C<sub>1-6</sub> y haloalcoxi C<sub>1-6</sub>), halo, ciano, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub>-alquilo (C<sub>1-6</sub>) (es decir, éter), ariloxi, sulfhidrido (mercapto), halo-alquilo (C<sub>1-6</sub>) (p. ej., -CF<sub>3</sub>), halo-alcoxi (C<sub>1-6</sub>) (p. ej., -OCF<sub>3</sub>), alquilio C<sub>1-6</sub>, ariltio, amino, amino-alquilo (C<sub>1-6</sub>), nitro, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfonamido, N-sulfonamido, C-carboxi, O-carboxi, acilo, cianato, isocianato, tiocianato, isotiocianato, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato y oxo (=O). Siempre que un grupo se describa como “opcionalmente sustituido”, ese grupo puede estar sustituido con los sustituyentes anteriores.

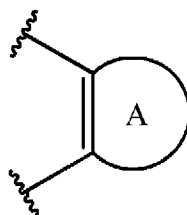
Como entenderá un experto en la técnica, si un compuesto contiene grupos sustituyentes cargados positiva o negativamente, por ejemplo, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, también puede contener un contraión cargado negativamente o positivamente, de manera que el compuesto en su conjunto sea neutro.

Debe entenderse que ciertas convenciones de denominación de los radicales pueden incluir un monorradical o un dirradical, dependiendo del contexto. Por ejemplo, cuando un sustituyente requiere dos puntos de unión al resto de la molécula, se entiende que el sustituyente es un dirradical. Por ejemplo, un sustituyente identificado como el alquilo que requiere dos puntos de unión incluye dirradicales como -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>- y similares. Otras convenciones de denominación de los radicales indican claramente que el radical es un dirradical, como “alquileo” o “alquenileo”.

Cuando se dice que dos grupos R “adyacentes” forman un anillo “junto con el átomo al que están unidos”, significa que la unidad colectiva de los átomos, enlaces intermedios y los dos grupos R son el anillo mencionado. Por ejemplo, cuando está presente la siguiente subestructura:



y  $R^1$  y  $R^2$  se definen como seleccionados en el grupo que consta de hidrógeno y alquilo, o  $R^1$  y  $R^2$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un arilo o carbociclilo, se entiende que  $R^1$  y  $R^2$  pueden seleccionarse entre hidrógeno o alquilo o, alternativamente, la subestructura tiene estructura:



Donde A es un anillo arilo o un carbociclilo que contiene el enlace doble representado.

#### Nucleótidos etiquetados

Los compuestos de colorante descritos en la presente memoria son adecuados para unirse a restos de sustrato. Los restos de sustrato pueden ser virtualmente cualquier molécula o sustancia con la que los colorantes fluorescentes descritos en el presente documento pueden conjugarse y, a modo de ejemplo no limitante, pueden incluir nucleósidos, nucleótidos, polinucleótidos, carbohidratos, ligandos, partículas, superficies sólidas, polímeros orgánicos e inorgánicos y combinaciones o conjuntos de los mismos, como cromosomas, núcleos, células vivas y similares. Los colorantes pueden conjugarse con un conector opcional mediante una serie de medios que incluyen la atracción hidrófoba, la atracción iónica y la unión covalente. Particularmente, los colorantes se conjugan con el sustrato mediante la unión covalente. Más particularmente, la unión covalente se realiza por medio de un grupo enlazador. En algunos casos, dichos nucleótidos etiquetados también se denominan “nucleótidos modificados”.

Una aplicación particularmente útil de los nuevos colorantes fluorescentes con desplazamiento de Stokes largo, como se describe en la presente memoria, es para etiquetar las biomoléculas, por ejemplo, los nucleótidos o los oligonucleótidos. Algunas realizaciones de la presente solicitud están dirigidas a un nucleótido u oligonucleótido etiquetado con los nuevos compuestos fluorescentes, como se describe en la presente memoria.

El acoplamiento a las biomoléculas puede ser a través del resto  $-C(=O)R$  del compuesto de la fórmula (I) o (V). En algunas descripciones, R es  $-OR^7$  y  $R^7$  es un alquilo sustituido, que puede utilizarse para acoplarse al grupo amino de las biomoléculas. En una descripción, el resto  $-C(=O)R$  puede ser un residuo de éster activado más adecuado para una mayor formación de enlaces amida/péptido. El término “éster activado”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un derivado del grupo carboxi que es capaz de reaccionar en condiciones suaves, por ejemplo, con un compuesto que contiene un grupo amino. Los ejemplos no limitantes de ésteres activados incluyen, entre otros, ésteres de p-nitrofenilo, pentafluorofenilo y succinimido. En algunas otras descripciones, R es  $-NR^8R^9$  y al menos uno de  $R^8$  o  $R^9$  contiene al menos un grupo funcional que puede utilizarse para el acoplamiento a las biomoléculas, por ejemplo, uno de  $R^8$  o  $R^9$  es un alquilo sustituido que comprende al menos un carboxilo.

En algunas realizaciones, los compuestos del colorante pueden unirse covalentemente a oligonucleótidos o nucleótidos a través de la base de nucleótidos. Por ejemplo, el nucleótido u oligonucleótido etiquetado puede tener la etiqueta unida a la posición C5 de una base de pirimidina o la posición C7 de una base de 7-deaza purina a través de un resto enlazador. El nucleótido u oligonucleótido etiquetado también puede tener un grupo bloqueante 3'-OH unido covalentemente al azúcar ribosa o desoxirribosa del nucleótido.

#### Enlazadores

Los compuestos del colorante, como se describe en la presente memoria, pueden incluir un grupo enlazador reactivo en una de las posiciones de los sustituyentes de la unión covalente del compuesto a otra molécula. Los grupos enlazadores reactivos son restos capaces de formar un enlace covalente. En una realización particular, el enlazador puede ser un enlazador escindible. El uso del término “enlazador escindible” no pretende implicar que se requiera eliminar el enlazador completo. La zona de escisión puede ubicarse en una posición del conector que asegure que parte del enlazador permanezca unida al colorante y/o al resto del sustrato después de la escisión. Los enlazadores escindibles pueden ser, a modo de ejemplo no limitante, enlazadores escindibles electrófilos, conectores escindibles nucleófilos, enlazadores fotoescindibles, escindibles en condiciones reductoras (por ejemplo, enlazadores que contienen disulfuro o azida), condiciones oxidativas, escindibles mediante el uso de enlazadores de captura de seguridad y pueden escindirse mediante mecanismos de eliminación. El uso de un enlazador escindible para unir el compuesto de colorante a un resto de sustrato asegura que la etiqueta pueda, si es necesario, eliminarse después de la detección, por lo que se evitará cualquier señal interferente en etapas posteriores.

Los ejemplos no limitantes de grupos enlazadores incluyen los descritos en la publicación de PCT n.º WO2004/018493, que conectan las bases de los nucleótidos a etiquetas tales como, por ejemplo, los nuevos compuestos fluorescentes descritos en la presente memoria. Estos enlazadores pueden escindirse utilizando fosfinas solubles en agua o



catalizadores de metales de transición solubles en agua formados a partir de un metal de transición y al menos parcialmente ligandos solubles en agua. En solución acuosa, este último forma, al menos parcialmente, complejos de metales de transición solubles en agua. Los enlazadores adecuados adicionales que pueden utilizarse incluyen los descritos en la publicación de PCT n.º WO2004/018493 y WO 2007/020457. Se descubrió que, al alterar, y en particular aumentar, la longitud del enlazador entre un colorante fluorescente (fluoróforo) y la base de guanina, mediante la introducción de un grupo espaciador de polietilenglicol, es posible aumentar la intensidad de la fluorescencia, en comparación con el mismo fluoróforo unido a la base de guanina a través de otros enlaces conocidos en la técnica. El diseño de los conectores, y especialmente su longitud aumentada, también permite mejorar el brillo de los fluoróforos unidos a las bases de guanina de los nucleótidos guanosina cuando se incorporan a polinucleótidos como ADN. Por lo tanto, cuando el colorante se utiliza en cualquier método de análisis que requiere la detección de una etiqueta de colorante fluorescente acoplada a un nucleótido que contiene guanina, es ventajoso si el enlazador comprende un grupo espaciador de la fórmula  $-(CH_2)_nO-$ , en donde n es un número entero entre 2 y 50, como se describe en el documento WO 2007/020457.

Los nucleósidos y nucleótidos pueden etiquetarse en zonas del azúcar o la nucleobase. Como entenderá un experto en la técnica, un “nucleótido” consta de una base nitrogenada, un azúcar y uno o más grupos fosfato. En el ARN, el azúcar es una ribosa, y en el ADN es una desoxirribosa, es decir, un azúcar que carece de un grupo hidroxilo que está presente en la ribosa. La base nitrogenada es un derivado de la purina o la pirimidina. Las purinas son adenina (A) y guanina (G), y las pirimidinas son citosina (C) y timina (T) o en el contexto de ARN, uracilo (U). El átomo C-1 de la desoxirribosa se une al N-1 de una pirimidina o al N-9 de una purina. Un nucleótido también es un éster de fosfato de un nucleósido, teniendo la esterificación en el grupo hidroxilo unido a la C-3 o C-5 del azúcar. Los nucleótidos generalmente son mono-, di- o trifosfatos.

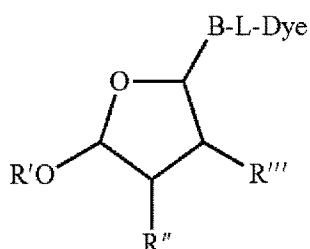
Un “nucleósido” es estructuralmente similar a un nucleótido, pero le faltan los restos de fosfato. Un ejemplo de un análogo de nucleósido sería uno en el que la etiqueta está unida a la base y no hay un grupo fosfato unido a la molécula de azúcar.

Aunque la base generalmente se denomina “purina” o “pirimidina”, el experto apreciará que los derivados y análogos disponibles no alteran la capacidad del nucleótido o nucleósido de someterse al emparejamiento de las bases de Watson-Crick. “Derivado” o “análogo” significa que hace referencia a un compuesto o una molécula cuya estructura central es la misma que la de un compuesto original, o se asemeja mucho a ella, pero que tiene una modificación química o física, como, por ejemplo, un grupo lateral diferente o adicional, que permite que el nucleótido derivado o el nucleósido se conecte a otra molécula. Por ejemplo, la base puede ser una desazopurina. Los derivados deben ser capaces de experimentar el emparejamiento de Watson-Crick. “Derivado” y “análogo” también hacen referencia a un nucleótido sintético o al derivado de un nucleósido que tiene restos de base modificados y/o restos de azúcar modificados. De tales derivados y análogos se habla, por ejemplo, en Scheit, Nucleotide analogs (John Wiley & Son, 1980) y Uhlman y col., Chemical Reviews 90:543-584, 1990. Los análogos de nucleótidos también pueden constar de enlaces fosfodiéster modificados que incluyen enlaces de fosforotioato, fosforoditioato, alquilo-fosfonato, fosforanilida, fosforamidato y similares.

El colorante puede unirse a cualquier posición de la base de nucleótidos, a través de un enlazador, siempre que aún pueda llevarse a cabo el emparejamiento de bases de Watson-Crick. Determinadas zonas de etiquetado de nucleobase incluyen la posición C5 de una base de pirimidina o la posición C7 de una base de 7-deaza purina. Como se describió anteriormente, un grupo enlazador puede utilizarse para unir covalentemente un colorante al nucleósido o nucleótido.

En particular, el nucleósido o nucleótido etiquetado puede incorporarse enzimáticamente y ser enzimáticamente extensible. Por consiguiente, un resto enlazador puede ser de longitud suficiente para conectar el nucleótido al compuesto, de manera que el compuesto no interfiera significativamente en la unión general y el reconocimiento del nucleótido por una enzima de replicación de ácido nucleico. Por lo tanto, el conector también puede constar de una unidad separadora. Las distancias espaciadoras, por ejemplo, la base de los nucleótidos de una zona o una etiqueta de escisión.

Los nucleósidos o nucleótidos etiquetados con los nuevos colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria pueden tener la fórmula:



donde Colorante es un compuesto de colorante, B es una nucleobase, como, por ejemplo, uracilo, timina, citosina, adenina, guanina y similares y L es un grupo enlazador opcional que puede o no estar presente. R' puede ser H, monofosfato, difosfato, trifosfato, tiofosfato, un análogo de éster de fosfato, -O- unido a un grupo que contiene fósforo reactivo u -O- protegido por un grupo bloqueante. R'' puede ser H, OH, una fosforamidita o un grupo bloqueante 3'-OH y R''' es H u OH; donde R'' es fosforamidita, R' es un grupo protector hidroxilo escindible con ácido que permite el acoplamiento de monómero posterior en condiciones de síntesis automatizadas.

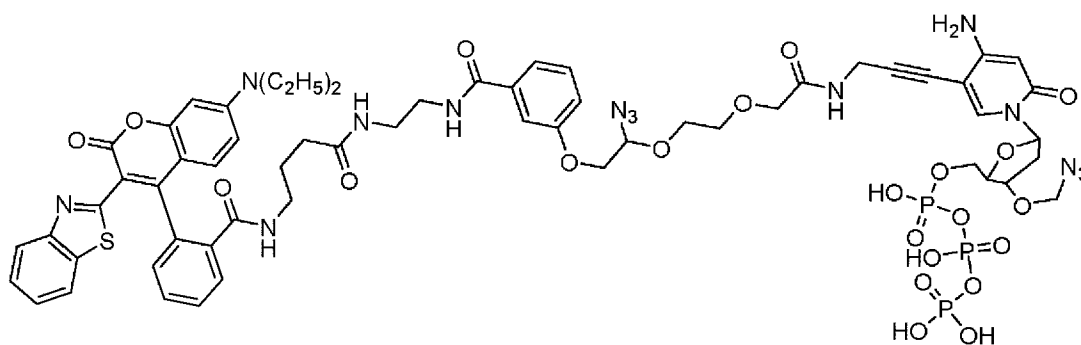
En algunos casos, el grupo bloqueante está separado e independiente del compuesto de colorante, es decir, no unido a él. Por otra parte, el colorante puede constar de todo o parte del grupo bloqueante 3'-OH. Por lo tanto, R'' puede ser un grupo bloqueante 3'-OH que puede constar o no del compuesto colorante. En realizaciones alternativas adicionales, no hay ningún grupo bloqueante en el carbono 3' del azúcar pentosa y el colorante (o el colorante y la estructura enlazadora) unido a la base, por ejemplo, puede ser de un tamaño o estructura suficiente para actuar como un bloque para la incorporación de un nucleótido adicional de un punto distinto del sitio 3'. Por lo tanto, el bloqueo puede deberse a un impedimento estérico o puede deberse a una combinación de tamaño, carga y estructura.

El uso de un grupo bloqueante permite controlar la polimerización, como detener la extensión cuando se incorpora un nucleótido modificado. Si el efecto bloqueante es reversible, por ejemplo, a modo de ejemplo no limitante, cambiando las condiciones químicas o mediante la retirada de un bloqueo químico, la extensión puede detenerse en ciertos puntos y luego dejar que continúe. Los ejemplos no limitantes de grupos bloqueantes 3'-OH incluyen los descritos en los documentos WO 2004/018497 y WO2014/139596. Por ejemplo, el grupo bloqueante puede ser azidometilo (-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>) o azidometilo sustituido (por ejemplo, -CH(CHF<sub>2</sub>)N<sub>3</sub> o CH(CH<sub>2</sub>F)N<sub>3</sub>) o alilo.

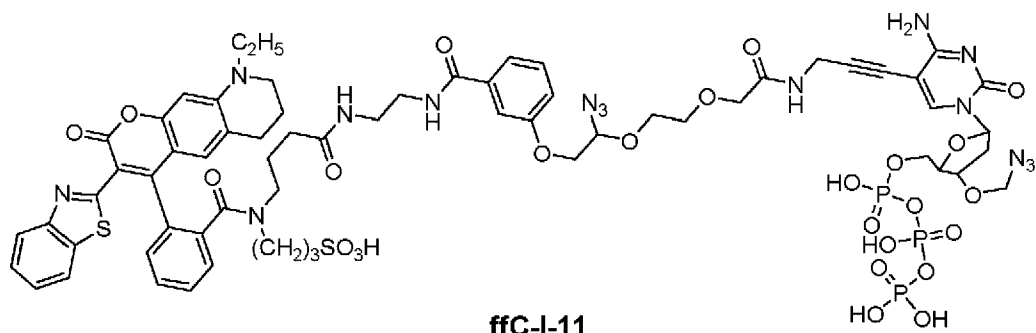
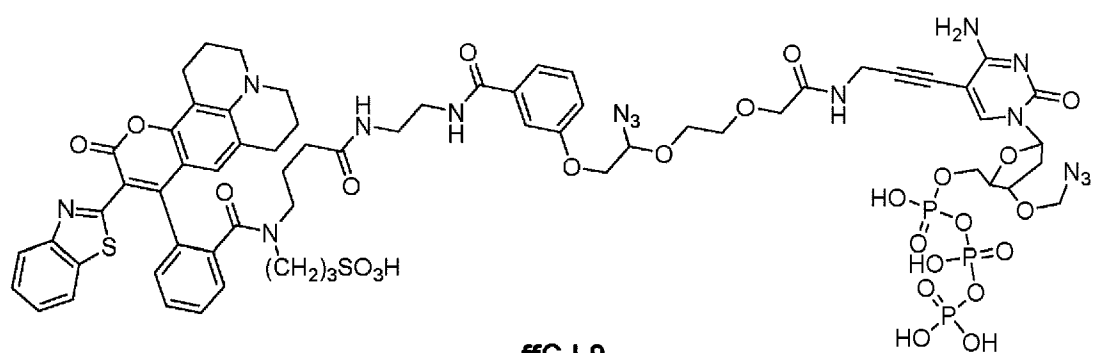
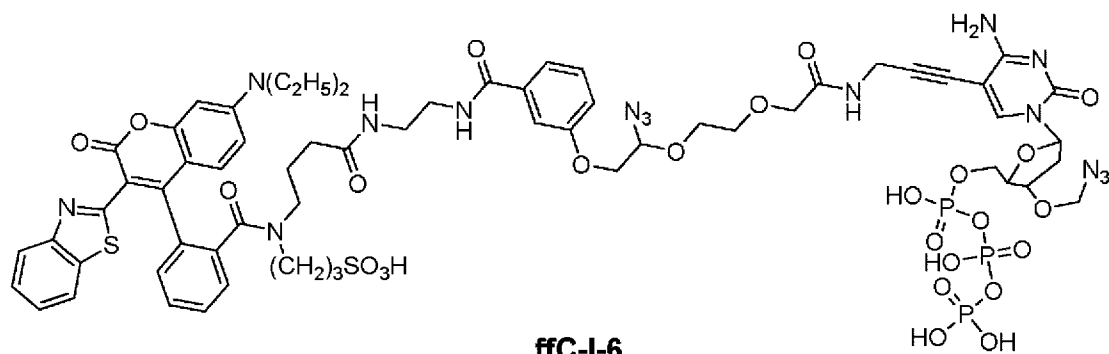
En una realización particular, el enlazador y el grupo bloqueante están presentes y son restos separados que son ambos escindibles en condiciones sustancialmente similares. Por lo tanto, los procesos de desprotección y desbloqueo pueden ser más eficientes, ya que solo se requerirá un único tratamiento para eliminar tanto el compuesto colorante como el grupo bloqueante.

La presente realización también dirige la expresión de polinucleótidos que incorporan compuestos de colorante descritos en la presente memoria. Dichos polinucleótidos pueden ser ADN o ARN que consten de, respectivamente de, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos unidos en un enlace fosfodiéster. Los polinucleótidos pueden constar de nucleótidos naturales, nucleótidos no naturales (o modificados) distintos de los nucleótidos marcados descritos en la presente memoria o cualquier combinación de los mismos, siempre que se presente al menos un nucleótido etiquetado con un compuesto de colorante, según la presente solicitud. Los polinucleótidos también pueden incluir segmentos principales no naturales y/o modificaciones químicas no nucleotídicas. También se contemplan estructuras quiméricas compuestas por mezclas de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos que constan de al menos un nucleótido etiquetado.

Los nucleótidos etiquetados de ejemplo no limitantes, como se describen en la presente memoria incluyen:



**ffC-I-1**



y

Kits

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria son kits que incluyen nucleósidos y/o nucleótidos etiquetados con los nuevos colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria. Dichos kits generalmente incluirán al menos un nucleótido o nucleósido etiquetado con un colorante junto con al menos un componente adicional. Los componentes adicionales pueden ser nucleótidos o nucleósidos modificados o no modificados adicionales. Por ejemplo, los nucleótidos etiquetados con colorantes pueden suministrarse en combinación con nucleótidos no etiquetados o nativos, y/o con nucleótidos etiquetados con fluorescencia o cualquier combinación de los mismos. Pueden proporcionarse combinaciones de nucleótidos como componentes individuales separados o como mezclas de nucleótidos. En algunas realizaciones, los kits comprenden uno o más nucleótidos en los que al menos un nucleótido es un nucleótido etiquetado con un nuevo compuesto fluorescente descrito en la presente memoria. Los kits pueden comprender dos o más nucleótidos etiquetados. Los nucleótidos pueden etiquetarse con dos o más etiquetas fluorescentes. Dos o más de las etiquetas pueden excitarse utilizando una única fuente de excitación, que puede ser un láser.

Los kits pueden contener cuatro nucleótidos etiquetados, de los cuales el primero de los cuatro nucleótidos está etiquetado con un compuesto, como se describe en la presente memoria, y el segundo, tercer y cuarto nucleótidos

cada uno se etiqueta con un compuesto diferente, en donde cada compuesto tiene un máximo de fluorescencia distinto y cada uno de los compuestos es distinguible de los otros tres compuestos. Los kits pueden ser tales que dos o más de los compuestos tienen un máximo de absorbancia similar pero diferentes desplazamientos de Stokes.

Los compuestos de colorante fluorescente, nucleótidos o kits etiquetados descritos en la presente memoria pueden utilizarse en secuenciaciones, análisis de expresión, análisis de hibridación, análisis genético, análisis de ARN o ensayos de unión a proteínas. El uso puede estar en un instrumento de secuenciación automatizado. El instrumento de secuenciación puede contener dos láseres que funcionan a diferentes longitudes de onda.

Cuando los kits comprenden una pluralidad, particularmente dos, más particularmente cuatro, nucleótidos etiquetados con un compuesto de colorante, los diferentes nucleótidos pueden etiquetarse con diferentes compuestos de colorante, o uno puede ser oscuro, sin compuestos de colorante. Cuando los diferentes nucleótidos están etiquetados con diferentes compuestos de colorante, es una característica de los kits que dichos compuestos de colorante sean colorantes fluorescentes espectralmente distinguibles. Como se emplea en el presente documento, el término “colorantes fluorescentes espectralmente distinguibles” se refiere a los colorantes fluorescentes que emiten energía fluorescente a longitudes de onda que pueden distinguirse por el equipo de detección fluorescente (por ejemplo, una plataforma comercial de secuenciación del ADN basada en capilares) cuando dos o más de dichos colorantes están presentes en una muestra. Cuando se suministran dos nucleótidos etiquetados con compuestos de colorante fluorescente en forma de kit, los colorantes fluorescentes espectralmente distinguibles pueden excitarse a la misma longitud de onda, tal como, por ejemplo, por el mismo láser en algunas realizaciones. Cuando se suministran cuatro nucleótidos etiquetados con compuestos de colorante fluorescente en forma de kit, dos de los colorantes fluorescentes espectralmente distinguibles pueden ser excitados a una longitud de onda y los otros dos colorantes espectralmente distinguibles pueden ser excitados en otra longitud de onda en algunas realizaciones. Las longitudes de onda de excitación particulares son de aproximadamente 460 nm.

En una sola realización, un kit consta de un nucleótido etiquetado con un compuesto descrito en la presente memoria y un segundo nucleótido marcado con un segundo colorante en el que los colorantes tienen una diferencia en el máximo de absorbancia de al menos 10 nm, particularmente de 20 nm a 50 nm. Más particularmente, los dos compuestos de colorante tienen desplazamientos de Stokes de entre 15-40 nm o entre 20-40 nm. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “desplazamiento de Stokes” es la diferencia entre las posiciones de los máximos de banda de los espectros de absorción y emisión de la misma transición electrónica.

En una realización adicional, dicho kit comprende además otros dos etiquetados con colorantes fluorescentes en donde dichos colorantes son excitados por los mismos láseres desde aproximadamente 460 nm hasta aproximadamente 540 nm.

En una realización alternativa, los kits pueden contener nucleótidos donde la misma base está etiquetada con dos compuestos diferentes. Un primer nucleótido puede etiquetarse con un compuesto descrito en la presente memoria. Un segundo nucleótido puede etiquetarse con un compuesto espectralmente distinto, por ejemplo, un colorante “rojo” que absorbe más de 600 nm. Un tercer nucleótido puede etiquetarse como una mezcla del compuesto de colorante fluorescente descrito en la presente memoria y el compuesto espectralmente distinto, y el cuarto nucleótido puede ser “oscuro” y no contiene ninguna etiqueta. En términos simples, por lo tanto, los nucleótidos 1-4 pueden etiquetarse como “verde”, “rojizo”, “rojo/verde” y oscuro. Para simplificar el instrumental, se pueden etiquetar cuatro nucleótidos con dos colorantes excitados con un solo láser y, por lo tanto, el etiquetado de los nucleótidos 1-4 puede ser “verde 1”, “verde 2”, “verde 1/verde 2” y oscuro.

En otras realizaciones, los kits pueden incluir una enzima polimerasa capaz de catalizar la incorporación de los nucleótidos a un polinucleótido. Otros componentes que se incluirán en dichos kits pueden incluir búferes y similares. Los nucleótidos etiquetados con los nuevos colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria, y otros componentes de los nucleótidos que incluyen mezclas de diferentes nucleótidos, pueden proporcionarse en el kit en una forma concentrada para diluirse antes de su uso. En dichas realizaciones, también puede incluirse un búfer de dilución adecuado.

#### Métodos de secuenciación

Los nucleótidos (o nucleósidos) que constan de un nuevo colorante fluorescente descrito en la presente memoria pueden utilizarse en cualquier método de análisis que requiera la detección de una etiqueta fluorescente unida a un nucleótido o nucleósido, ya sea por sí misma o incorporada en o asociada a una estructura molecular o conjugada más grande. Algunas realizaciones de la presente solicitud se dirigen a métodos de secuenciación que incluyen: (a) incorporar al menos un nucleótido etiquetado, como se describe en la presente memoria, a un polinucleótido; y (b) detectar el o los nucleótidos etiquetados incorporados al polinucleótido detectando la señal fluorescente del nuevo colorante fluorescente unido a dicho nucleótido o nucleótidos modificados.

En algunas realizaciones, al menos un nucleótido etiquetado se incorpora a un polinucleótido en la fase de síntesis por la acción de una enzima polimerasa. Sin embargo, no se excluyen otros métodos para incorporar nucleótidos marcados a los polinucleótidos, como la síntesis de oligonucleótidos químicos o el ligamiento de oligonucleótidos

marcados a oligonucleótidos no etiquetados. Por lo tanto, el término “incorporar” un nucleótido a un polinucleótido abarca la síntesis de polinucleótidos mediante métodos químicos, así como métodos enzimáticos.

En todas las realizaciones de los métodos, la etapa de detección puede llevarse a cabo mientras la cadena polinucleotídica a la que se incorporan los nucleótidos etiquetados se hibrida con una cadena molde, o después de una etapa de desnaturalización en la que las dos cadenas se separan. Pueden incluirse etapas adicionales, por ejemplo, etapas de reacción química o enzimática o etapas de purificación entre la etapa de síntesis y la etapa de detección. En particular, la cadena diana que incorpora el o los nucleótidos etiquetados puede aislarse o purificarse y luego procesarse adicionalmente o utilizarse en un análisis posterior. A modo de ejemplo, los polinucleótidos diana etiquetados con nucleótidos modificados como se describe en la presente memoria en una etapa sintética pueden utilizarse posteriormente como sondas o cebadores etiquetados. En otras realizaciones, el producto de la fase de síntesis (a) puede someterse a etapas de reacción adicionales y, si se desea, el producto de estas etapas posteriores se purifica o aísla.

Las condiciones adecuadas para la etapa de síntesis serán bien conocidas por quienes estén familiarizados con las técnicas estándar de la biología molecular. En una sola realización, la etapa de síntesis puede ser análoga a una reacción de extensión de cebador estándar utilizando precursores de nucleótidos, incluidos los nucleótidos modificados según la presente realización, para formar una cadena diana extendida complementaria a la cadena molde en presencia de una enzima polimerasa adecuada. En otras realizaciones, la etapa de síntesis puede formar parte de una reacción de amplificación que genera un producto de amplificación bicatenario etiquetado compuesto por cadenas complementarias hibridadas derivadas de la copia de las cadenas de polinucleótidos diana y molde. Otras etapas “sintéticas” de ejemplo incluyen la traslación de cortes, la polimerización por desplazamiento de la cadena, el etiquetado de ADN con cebado aleatorio, etc. La enzima polimerasa utilizada en la etapa de síntesis debe ser capaz de catalizar la incorporación de nucleótidos modificados según la presente descripción. De lo contrario, la naturaleza precisa de la polimerasa no está particularmente limitada, pero puede depender de las condiciones de la reacción sintética. A modo de ejemplo, si la reacción sintética se lleva a cabo mediante termociclado, se requiere una polimerasa termoestable, mientras que esto puede no ser esencial para las reacciones de extensión del cebador estándar. Las polimerasas termoestables adecuadas que son capaces de incorporar a los nucleótidos modificados según la presente descripción incluyen las descritas en WO 2005/024010 o WO 2006/120433. En las reacciones sintéticas que se llevan a cabo a temperaturas más bajas, como 37 °C, las enzimas polimerasa no necesitan necesariamente ser las polimerasas termoestables; por lo tanto, la elección de la polimerasa dependerá de una serie de factores, como la temperatura de reacción, el pH, la actividad de desplazamiento de la cadena y similares.

En las realizaciones específicas no limitantes, los nucleótidos o nucleósidos modificados etiquetados con los nuevos colorantes fluorescentes con desplazamiento de Stokes más largo según la presente solicitud pueden utilizarse en un método de secuenciación de los ácidos nucleicos, resecuenciación, secuenciación del genoma completo, puntuación del polimorfismo de un solo nucleótido, cualquier otra aplicación que implique la detección del nucleótido o nucleósido modificado cuando se incorpore a un polinucleótido, o cualquier otra aplicación que requiera el uso de polinucleótidos etiquetados con los nucleótidos modificados que consten de colorantes fluorescentes según la presente solicitud.

En una realización particular, la presente solicitud proporciona el uso de nucleótidos modificados que constan de compuestos de colorante descritos en la presente descripción en una reacción de “secuenciación por síntesis” de polinucleótidos. La secuenciación por síntesis generalmente implica la adición secuencial de uno o más nucleótidos u oligonucleótidos a una cadena polinucleotídica en crecimiento en la dirección 5' a 3' utilizando una polimerasa o ligasa para formar una cadena polinucleotídica extendida complementaria al ácido nucleico molde que se va a secuenciar. La identidad de la base presente en uno o más de los nucleótidos añadidos se determina en una etapa de detección o “toma de imágenes”. La identidad de la base añadida puede determinarse después de cada etapa de incorporación de los nucleótidos. La secuencia del molde se puede inferir usando reglas convencionales de emparejamiento de bases Watson-Crick. El uso de los nucleótidos modificados marcados con colorantes según la presente realización para la determinación de la identidad de una sola base puede ser útil, por ejemplo, en la puntuación de los polimorfismos de un solo nucleótido, y dichas reacciones de extensión de una sola base están dentro del ámbito de esta solicitud.

En una realización, la secuencia de un polinucleótido molde se determina detectando la incorporación de uno o más nucleótidos a una cadena naciente complementaria al polinucleótido molde que se va a secuenciar a través de la detección de etiquetas fluorescentes unidas al nucleótido o nucleótidos incorporados. La secuenciación del polinucleótido molde se ceba con un cebador adecuado (o preparado como un constructo de horquilla que contendrá el cebador como parte de la horquilla), y la cadena naciente se extiende de manera escalonada mediante la adición de nucleótidos al extremo 3' del cebador en una reacción catalizada por polimerasa.

En particular, cada uno de los diferentes trifosfatos de los nucleótidos (A, T, G y C) puede etiquetarse con un fluoróforo único y también consta de un grupo bloqueante en la posición 3' para prevenir la polimerización descontrolada. Alternativamente, uno de los cuatro nucleótidos puede no estar etiquetado (oscuro). La enzima polimerasa incorpora un nucleótido en la cadena naciente complementaria al polinucleótido molde, y el grupo bloqueante impide la incorporación adicional de nucleótidos. Cualquier nucleótido no incorporado se elimina y la señal fluorescente de cada nucleótido incorporado se “lee” ópticamente con los medios adecuados, como un dispositivo de carga acoplada que

emplea excitación láser y filtros de emisión adecuados. El grupo bloqueante 3' y los compuestos de colorante fluorescente se eliminan (desprotegen), particularmente por el mismo método químico o enzimático, para exponer la cadena naciente de una posterior incorporación de los nucleótidos. Típicamente, la identidad del nucleótido incorporado se determinará después de cada etapa de incorporación, pero esto no es estrictamente esencial. De forma similar, la patente US- 5.302.509 describe un método para secuenciar polinucleótidos inmovilizados sobre un soporte sólido. El método se basa en la incorporación de nucleótidos A, G, C y T bloqueados en 3' etiquetados con fluorescencia en una cadena de crecimiento complementaria al polinucleótido inmovilizado, en presencia de ADN polimerasa. La polimerasa incorpora una base complementaria al polinucleótido diana, pero se evitan más adiciones por el grupo bloqueante 3'. La etiqueta del nucleótido incorporado puede, luego, determinarse y el grupo bloqueante eliminarse por escisión química para permitir que se produzca la polimerización adicional. El molde de ácido nucleico que se va a secuenciar en una reacción de secuenciación por síntesis puede ser cualquier polinucleótido que se desee secuenciar. El molde de ácido nucleico para una reacción de secuenciación constará típicamente de una región bicatenaria que tiene un grupo hidroxilo 3' libre que sirve como cebador o punto de iniciación para la adición de más nucleótidos en la reacción de secuenciación. La región del molde que se va a secuenciar colgará este grupo hidroxilo 3' libre en la cadena complementaria. La región sobresaliente del molde que secuenciar puede ser monocatenaria, pero puede ser bicatenaria, siempre que un "corte esté presente" en la cadena complementaria a la cadena molde que se vaya a secuenciar para proporcionar un grupo 3' OH libre al inicio de la reacción de secuenciación. En dichas realizaciones, la secuenciación puede continuar mediante el desplazamiento de cadenas. En ciertas realizaciones, un cebador que porta el grupo hidroxilo 3' libre puede añadirse como un componente aparte (por ejemplo, un oligonucleótido corto) que se hibrida con una región monocatenaria del molde que se va a secuenciar. Por otra parte, el cebador y la cadena molde que se va a secuenciar pueden formar parte de una cadena de ácido nucleico parcialmente autocomplementaria capaz de formar un dúplex intramolecular, como por ejemplo, una estructura en bucle de horquilla. Los polinucleótidos de horquilla y los métodos por los que pueden acoplarse a soportes sólidos se describen en las publicaciones de PCT n.º WO 2001/057248 y WO 2005/047301. Los nucleótidos se añaden sucesivamente al grupo 3'-hidroxilo libre, lo que da como resultado la síntesis de una cadena de polinucleótidos en la dirección 5' a 3'. La naturaleza de la base que se ha añadido puede determinarse, particularmente pero no necesariamente, después de cada adición de nucleótidos, lo que así proporciona información de la secuencia del molde de ácido nucleico. El término "incorporación" de un nucleótido a una cadena de ácido nucleico (o polinucleótido) en este contexto se refiere a la unión del nucleótido al grupo hidroxilo 3' libre de la cadena de ácido nucleico a través de la formación de un enlace fosfodiéster con el grupo fosfato 5' del nucleótido.

El molde de ácido nucleico que se va a secuenciar puede ser ADN o ARN, o incluso una molécula híbrida compuesta de desoxinucleótidos y ribonucleótidos. El molde de ácido nucleico puede constar de nucleótidos de origen natural y/o no natural y enlaces del segmento principal naturales o no naturales, siempre que estos no impidan copiar el molde en la reacción de secuenciación.

En ciertas realizaciones, el molde de ácido nucleico que se va a secuenciar puede unirse a un soporte sólido a través de cualquier método de enlace adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, mediante unión covalente. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos molde pueden unirse directamente a un soporte sólido (por ejemplo, un soporte a base de sílice). Sin embargo, en otras realizaciones, la superficie del soporte sólido puede modificarse de alguna manera para permitir una unión covalente directa de los polinucleótidos del molde, o inmovilizar los polinucleótidos molde a través de un hidrogel o una multicapa polielectrolítica, que puede estar unido de forma no covalente al soporte sólido.

Las matrices en las que los polinucleótidos se han unido directamente a los soportes a base de sílice son las que se describen por ejemplo en la publicación de PCT n.º WO 2000/006770, en donde los polinucleótidos se inmovilizan sobre un soporte de vidrio mediante reacción entre un grupo epóxido colgante en el vidrio con un grupo amino interno en el polinucleótido. Además, la publicación de PCT n.º WO2005/047301 describe matrices de polinucleótidos unidos a un soporte sólido, por ejemplo, para su uso en la preparación de matrices de moléculas individuales mediante la reacción de un nucleófilo basado en azufre con el soporte sólido. Otro ejemplo adicional de polinucleótidos molde admitidos en sólidos es cuando los polinucleótidos molde se unen al hidrogel admitido sobre soportes sólidos basados en sílice u otros. Los soportes a base de sílice se utilizan típicamente para admitir hidrogeles y matrices de hidrogel como se describe en las publicaciones de PCT n.º WO 00/31148, WO 01/01143, WO02/12566, WO 03/014392, WO 00/53812 y la patente US- 6.465.178.

Una superficie particular a la que se pueden inmovilizar polinucleótidos molde es un hidrogel de poli(acrilamida). Los hidrogeles de poli(acrilamida) se describen en la técnica anterior, de algunos de los cuales se ha hablado anteriormente. Los hidrogeles específicos que pueden utilizarse en la presente solicitud incluyen los descritos en el documento WO 2005/065814 y la publicación US- 2014/0079923. En una sola realización, el hidrogel es PAZAM (poli (N-(5-azidoacetamidil) acrilamida-co-acrilamida).

Las moléculas molde de ADN se pueden unir a microesferas o micropartículas para efectuar la secuenciación; por ejemplo, como se describe en la patente US- 6.172.218. Otros ejemplos de la preparación de genotecas de microesferas donde cada microesfera contiene diferentes secuencias de ADN pueden encontrarse en Margulies y col., Nature 437, 376-380 (2005); Shendure y col., Science. 309(5741): 1728-1732 (2005). La secuenciación de las matrices de dichas microesferas utilizando nucleótidos, como se describe, está dentro del ámbito de la presente solicitud.

El molde o los moldes que se van a secuenciar pueden formar parte de una “matriz” sobre un soporte sólido, en cuyo caso la matriz puede tomar cualquier forma conveniente. Por lo tanto, el método de la presente realización es aplicable a todos los tipos de matrices de “alta densidad”, que incluyen matrices de moléculas individuales, matrices agrupadas y matrices de microesferas. Los nucleótidos modificados etiquetados con compuestos de colorante de la presente solicitud pueden utilizarse en moldes de secuenciación sobre esencialmente cualquier tipo de matriz que consta de la inmovilización de moléculas de ácido nucleico sobre un soporte sólido y, más particularmente, cualquier tipo de matriz de alta densidad. Sin embargo, los nucleótidos modificados etiquetados con los nuevos colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria son particularmente ventajosos en el contexto de la secuenciación de las matrices agrupadas.

En matrices múltiples o agrupadas, las regiones distintivas de la matriz constan de varias moléculas molde de polinucleótidos. El término “matriz agrupada” se refiere a una matriz en la cual distintas regiones o zonas de la matriz constan de varias moléculas de polinucleótidos que no pueden resolverse individualmente por medios ópticos. Dependiendo de cómo se forme la matriz, cada zona en la matriz puede constar de varias copias de una sola molécula polinucleotídica individual o incluso de varias copias de un pequeño número de moléculas de polinucleótidos diferentes (por ejemplo, varias copias de dos cadenas de ácido nucleico complementarias). Las matrices múltiples de polinucleótidos o agrupadas de moléculas de ácido nucleico pueden producirse mediante el uso de técnicas generalmente conocidas en la técnica. A modo de ejemplo, los documentos WO 98/44151 y WO 00/18957 describen métodos de amplificación de ácidos nucleicos en donde tanto los productos molde como los de amplificación permanecen inmovilizados sobre un soporte sólido para formar matrices compuestas por agrupaciones o “colonias” de moléculas de ácido nucleico inmovilizadas. Las moléculas de ácido nucleico presentes en las matrices agrupadas preparadas según estos métodos son moldes adecuados para la secuenciación utilizando los nucleótidos modificados etiquetados con los nuevos colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria.

Los nucleótidos modificados etiquetados con compuestos de colorante de la presente solicitud también son útiles en la secuenciación de moldes en las matrices de moléculas individuales. El término “matriz de moléculas individuales” o “SMA”, como se emplea en la presente rea, se refiere a una población de moléculas de polinucleótidos, distribuidas (o dispuestas) sobre un soporte sólido, en donde la separación de cualquier polinucleótido individual de todos los demás de la población es tal que es posible efectuar una resolución individual de los polinucleótidos. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico diana inmovilizadas sobre la superficie del soporte sólido deben ser capaces de resolverse por medios ópticos. Esto significa que, dentro del área resoluble del dispositivo de formación de imágenes particular utilizado, debe haber una o más señales distintas, cada una de las cuales representa un polinucleótido.

Esto puede lograrse allí donde la separación entre moléculas de polinucleótidos adyacentes en la matriz es de al menos 100 nm, más particularmente de al menos 250 nm, aún más particularmente de al menos 300 nm, incluso más particularmente de al menos 350 nm. Por lo tanto, cada molécula puede resolverse individualmente y detectarse como un punto fluorescente de una sola molécula, y la fluorescencia de dicho punto fluorescente de molécula única también exhibe un fotoblanqueamiento de una sola etapa.

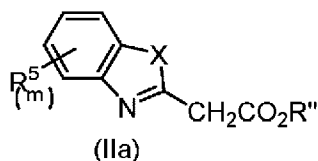
Los términos “resueltas individualmente” y “resolución individual” se utilizan en la presente memoria para especificar que, cuando se visualiza, es posible distinguir una molécula en la matriz de sus moléculas vecinas. La separación entre moléculas individuales en la matriz se determinará, en parte, por la técnica particular utilizada para resolver las moléculas individuales. Las características generales de las matrices de moléculas individuales se entenderán con referencia a las publicaciones de PCT n.º WO 2000/006770 y WO 2001/057248. Aunque una aplicación de los nucleótidos modificados de la presente memoria está en las reacciones de secuenciación por síntesis, la utilidad de dichos nucleótidos etiquetados no se limita a dichos métodos. De hecho, los nucleótidos pueden utilizarse ventajosamente en cualquier metodología de secuenciación que requiera la detección de etiquetas fluorescentes unidas a nucleótidos incorporados a un polinucleótido.

En particular, los nucleótidos modificados etiquetados con los compuestos de colorante de la presente solicitud pueden utilizarse en protocolos automatizados de secuenciación fluorescente, particularmente, en la secuenciación del ciclo terminador del colorante fluorescente en función del método de secuenciación de la terminación de la cadena de Sanger y colegas. Dichos métodos emplean generalmente enzimas y la secuenciación del ciclo para incorporar didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia en una reacción de secuenciación de extensión del cebador. Los denominados “métodos de secuenciación de Sanger” y los protocolos relacionados (tipo de Sanger), dependen de la terminación de la cadena aleatoria con didesoxinucleótidos etiquetados.

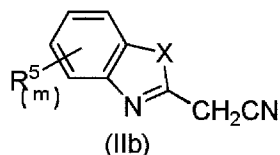
Por lo tanto, la presente realización también abarca nucleótidos modificados etiquetados con compuestos de colorante como se describe en la presente memoria que son didesoxinucleótidos que carecen de grupos hidroxilo en ambas posiciones 3' y 2', dichos didesoxinucleótidos modificados son adecuados para su uso en métodos de secuenciación de tipo Sanger y similares.

Métodos de preparación

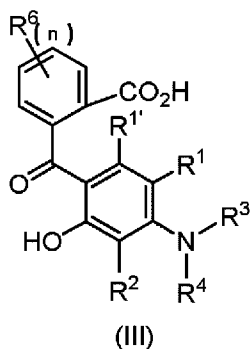
Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a un método para preparar un compuesto de la fórmula (Ia), los métodos incluyen hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (IIa)



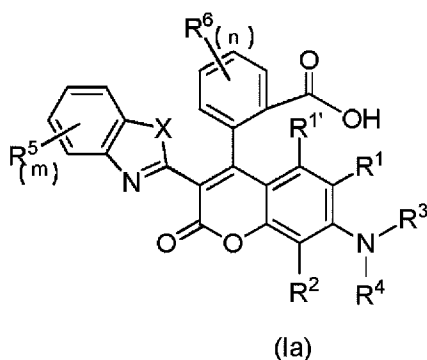
o la fórmula (IIb)



con un compuesto de la fórmula (III)

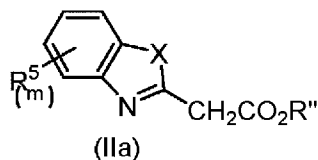


para formar



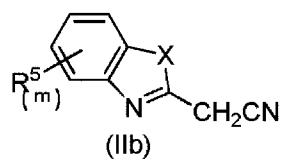
donde las variables  $R^1$ ,  $R^{1'}$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $X$ ,  $m$  y  $n$  se definen anteriormente en la descripción de compuestos de la fórmula (I), y  $R''$  se selecciona de grupo que consiste en H, alquilo opcionalmente sustituido, alquénilo, alquínilo, aminoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxilalquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido; heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido.

Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a un método para preparar un compuesto de la fórmula (Ia), los métodos incluyen hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (IIa)

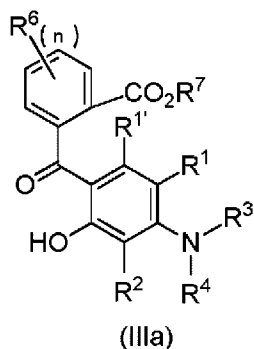




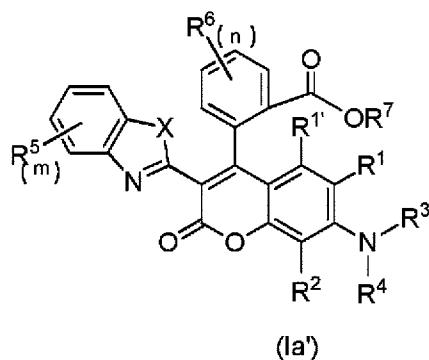
o la fórmula (IIb)



con un compuesto de la fórmula (IIIa)

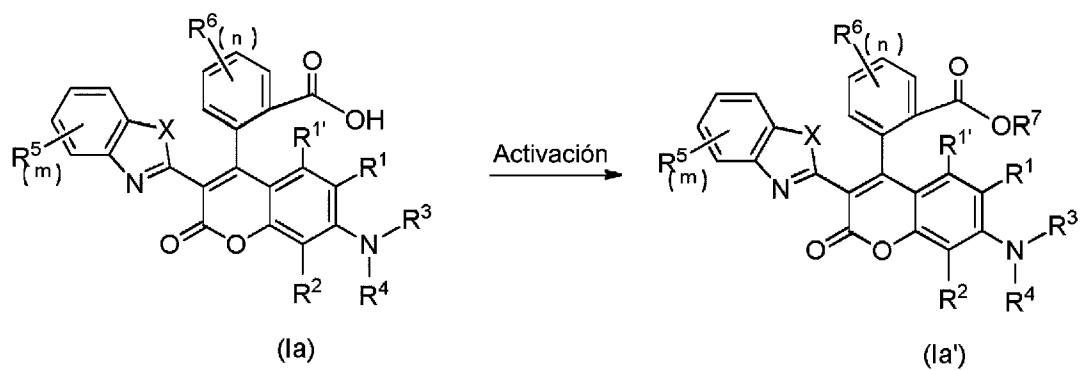


para formar



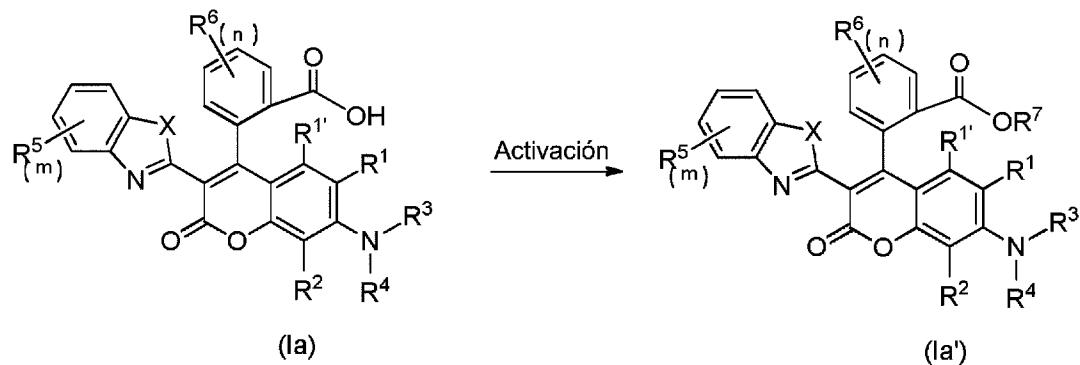
donde las variables  $R^1$ ,  $R^{1'}$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^n$ ,  $X$ ,  $m$  y  $n$  se definen anteriormente.

Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a un método para preparar un compuesto de la fórmula (Ia'), el método incluye convertir un compuesto de la fórmula (Ia) en un compuesto de la fórmula (Ia') a través de la activación con ácido carboxílico:

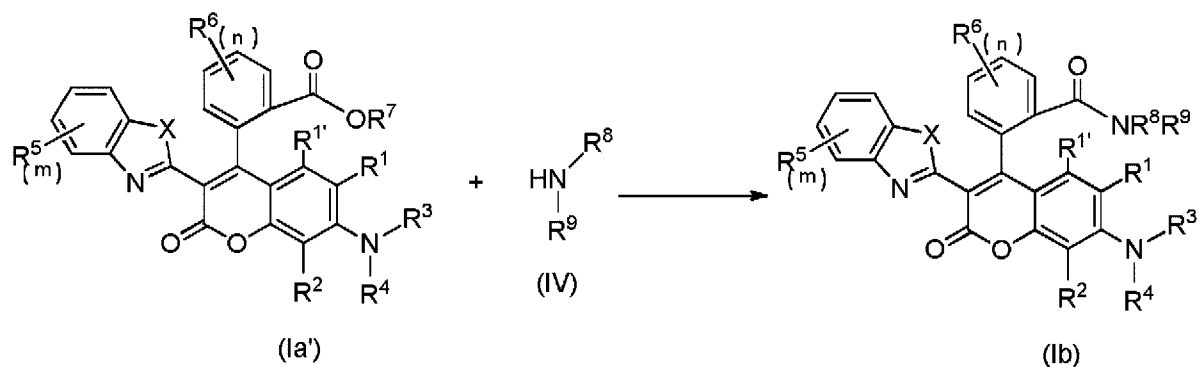


donde las variables  $R^1$ ,  $R^{1'}$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $X$ ,  $m$  y  $n$  se definen anteriormente en la descripción de compuestos de la fórmula (I).

Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a un método para preparar un compuesto de la fórmula (Ib), el método incluye convertir un compuesto de la fórmula (Ia) en un compuesto de la fórmula (Ia') a través de la activación con ácido carboxílico:

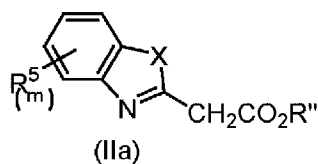


y hacer reaccionar el compuesto de la fórmula (Ia') con una amina primaria o secundaria de la fórmula (IV),

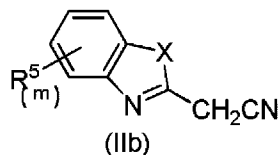


donde las variables R<sup>1</sup>, R<sup>1'</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, X, m y n se definen anteriormente en la descripción de compuestos de la fórmula (I).

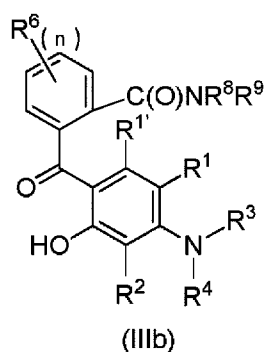
Algunas descripciones adicionales descritas en la presente memoria se refieren a un método para preparar un compuesto de la fórmula (Ib), los métodos incluyen hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (IIa)



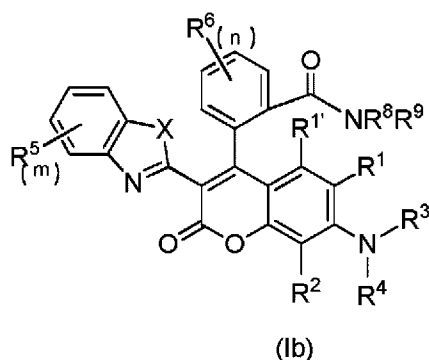
o la fórmula (IIb)



con un compuesto de la fórmula (IIIb)



para formar



donde las variables  $R^1$ ,  $R^{1'}$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R''$ ,  $X$ ,  $m$  y  $n$  se definen anteriormente.

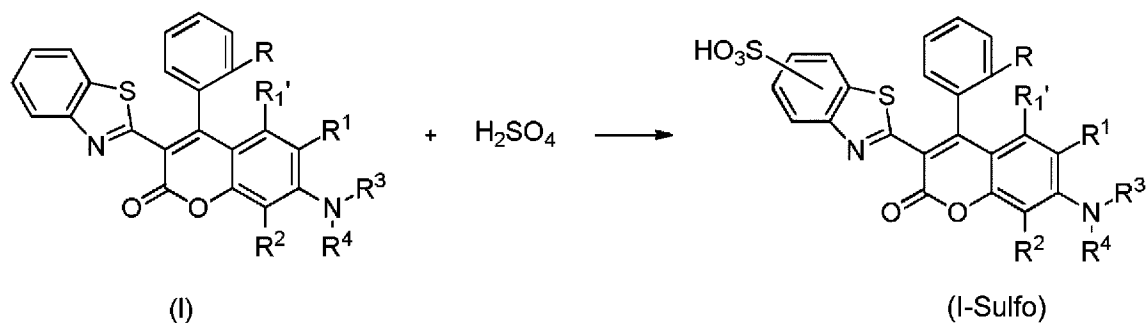
La preparación de compuestos de la fórmula (Ia) se puede lograr haciendo reaccionar materiales de partida de la fórmula (IIa) o (IIb) con el compuesto intermedio de la fórmula (III) preferiblemente en una relación molar de uno a uno en un disolvente orgánico con o sin un catalizador. Se pueden utilizar tanto catalizadores orgánicos (por ejemplo, ácido trifluoroacético o ácido metanosulfónico) como catalizadores inorgánicos (por ejemplo, ácido fosfórico o sulfúrico). En algunas descripciones, la preparación puede realizarse sin un disolvente o utilizando un catalizador como disolvente.

La preparación de compuestos de la fórmula (Ia') o (Ib) se puede lograr mediante la primera activación ácida de los materiales de partida de la fórmula (Ia) en un disolvente orgánico a temperatura ambiente utilizando, por ejemplo, carbodiimida, sales de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, BOP o PyBOP como un reactivo de activación seguido de la reacción con derivados hidroxilados apropiados  $HOR^7$  o amina de la fórmula (IV) para la etapa de acoplamiento.

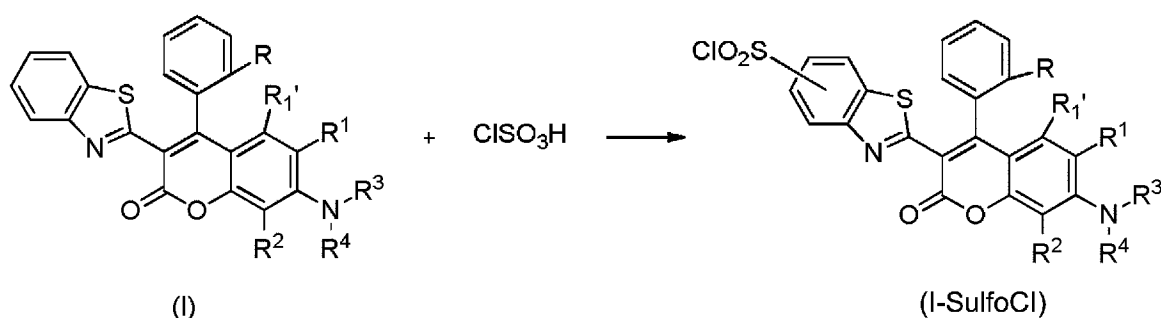
Los compuestos de la fórmula (V), (Va) o (Vb) pueden prepararse siguiendo esquemas sintéticos similares a los descritos anteriormente en la preparación de compuestos de la fórmula (Ia), (Ia') o (Ib).

Los compuestos de la fórmula (I) pueden utilizarse en algunas reacciones orgánicas, por ejemplo, en reacciones de sustitución aromática electrofílica como materiales de partida para la síntesis de nuevos colorantes. Por ejemplo, esto fue demostrado anteriormente por Alan S. Waggoner (Bioconjugate Chemistry, 1993, 4(2):105-111; ver también las publicaciones de patentes US- 2015/0274976) que algunas modificaciones de las moléculas de colorantes de cianina mediante la reacción de sulfonación pueden mejorar las propiedades fluorescentes de tales derivados.

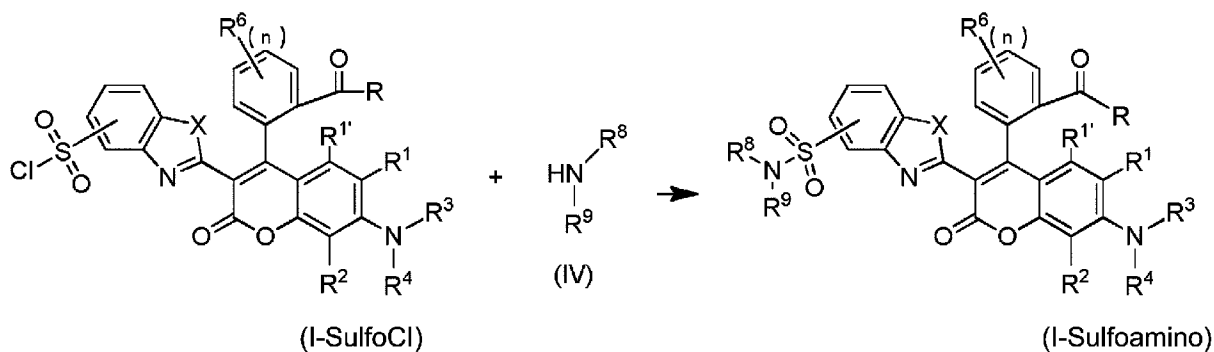
La sulfonación de los compuestos (I) se puede realizar mediante reacción con trióxido de azufre con derivados de trióxido de azufre o soluciones, por ejemplo, en ácido sulfúrico



La sulfocloración de los compuestos (I) puede realizarse mediante reacción con ácido clorosulfónico.



Los compuestos de la fórmula (I) que contienen grupos sulfónicos o clorosulfónicos se pueden modificar además, por ejemplo, haciéndolos reaccionar con amoníaco, aminas primarias o secundarias de la fórmula (IV):

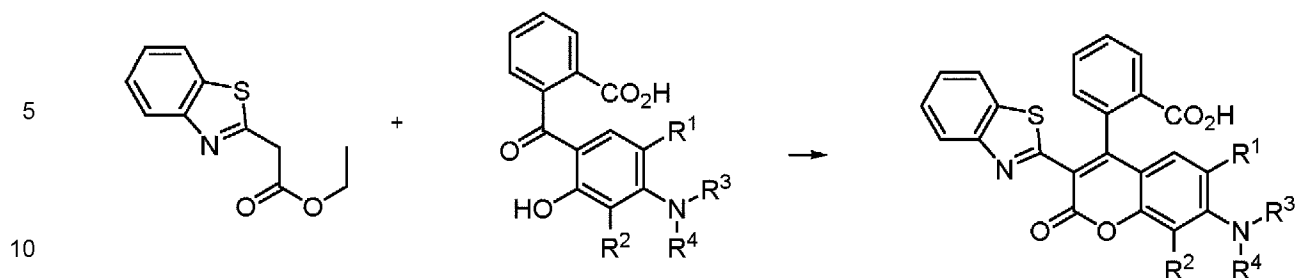


donde las variables R<sup>1</sup>, R<sup>1'</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, X, n se definen anteriormente en la descripción de compuestos de la fórmula (I).

### Ejemplos

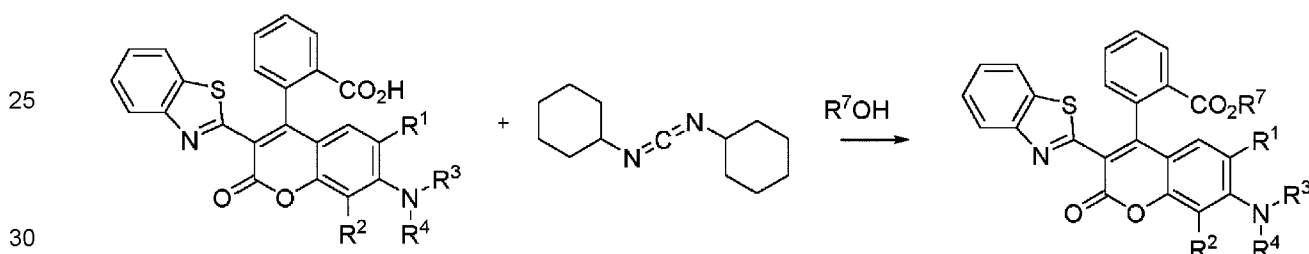
Se describen otras realizaciones con más detalle en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

Procedimiento general para la síntesis de compuestos de la fórmula (Ia)



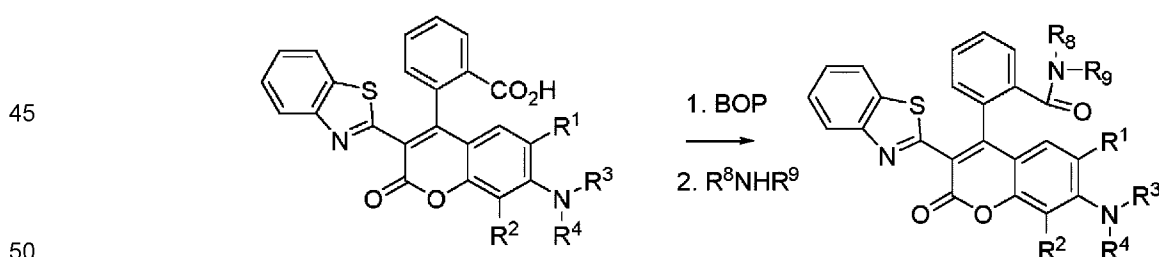
15 Se disolvió una mezcla de ácido benzotiazolil-2 acético de etilo (2,2 g, 0,01 mol) y un derivado apropiado del ácido hidroxibenzoilbenzoico (0,011 mol) en ácido sulfúrico concentrado (5 ml). Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se calentó, por ejemplo, a 80-120 °C durante 1-2 horas hasta que se completó la reacción. La mezcla de reacción se vertió en hielo (aproximadamente 50 g) y el producto se filtró, se lavó con agua. En muchos casos, los productos finales no necesitan ninguna purificación adicional.

20 Procedimiento general para la síntesis de compuestos de la fórmula (Ia')



35 Se disolvió un compuesto de la fórmula (Ia) (0,001 mol) en DMF anhidro (1,5 ml). A esta solución se añadió carbodiimida (0,0012 mol) u otro reactivo de activación. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se añadieron derivados hidroxil apropiados R<sup>7</sup>OH. La mezcla de reacción se agitó durante la noche, después se filtró y se vertió en hielo (aproximadamente 50 g). El producto se filtró, se lavó con agua. Rendimiento: 55-75 %. En muchos casos, los productos finales no necesitan ninguna purificación adicional.

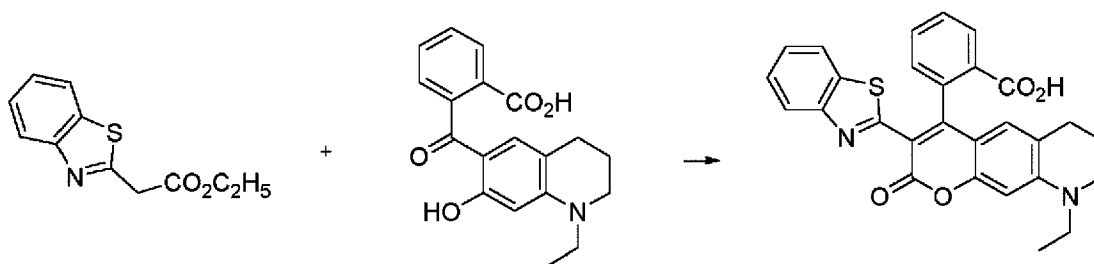
40 Procedimiento general para la síntesis de compuestos de la fórmula (Ib)



55 Se disolvió un compuesto de la fórmula (Ia) (0,001 mol) en un disolvente orgánico anhidro adecuado (DMF, 1,5 ml). A esta solución, se añadió TSTU, BOP o PyBOP como reactivo de activación. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos y después se añadió la amina apropiada NHR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>. La mezcla de reacción se agitó durante la noche, se filtró y el exceso de reactivo de activación se inactivó con una 0,1M solución de TEAB en agua. Los disolventes se evaporaron al vacío y el residuo se purificó por HPLC. Rendimiento: 65-75 %.

60 Ejemplo 1

Ácido 2-[3-(benzotiazol-2-il)-9-etil-2-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-4-il]benzoico (compuesto 1-3)

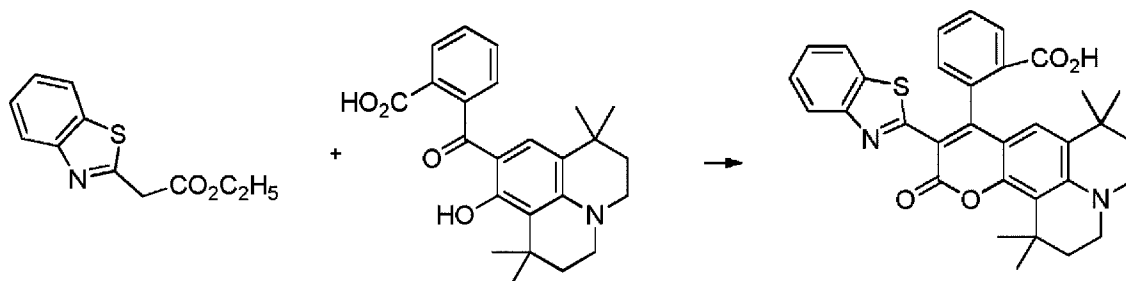


Se colocó ácido sulfúrico (2 ml) en un matraz de fondo redondo, después se enfrió hasta aproximadamente 0-5 °C y se añadieron 0,325 g (1,0 mmol, 1 eq) de ácido 2-(1-etil-7-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-6-carbonil)benzoico con agitación seguido de la adición de 0,3 g (1,4 mmol, 1,4 eq) de 2-(benzotiazol-2-il)acetato de etilo. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 30 minutos, después se calentó durante 1,5 horas mientras se agitaba a 100 °C. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (DCM-MeOH, 10 %) y mediante LCMS.

La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 0,5 horas y después se vertió en una mezcla de hielo picado (aproximadamente 100 g) y acetato de sodio (aproximadamente 5 g). Después de 1 hora, el producto se filtró y se lavó con agua hasta la neutralidad, a continuación, el filtrado se secó al aire. Rendimiento: 0,35 g (0,73 mmol, 73 %). El producto final se utilizó sin purificación adicional. MS (DUIS): PM calculado 482,13. Encontrado: (-) 481 (M-1), (+) 483 (M+1). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,71 (s, 1H), 8,11 - 8,02 (m, 1H), 7,96 (dd, *J* = 7,4, 1,6 Hz, 1H), 7,56 (tt, *J* = 7,5, 5,8 Hz, 2H), 7,40 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,39 - 7,25 (m, 2H), 7,16 (dd, *J* = 6,6, 2,1 Hz, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,35 (s, 1H), 3,48 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,36 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 2,65 - 2,55 (m, 2H), 1,79 (q, *J* = 6,3 Hz, 2H), 1,15 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H).

#### Ejemplo 2

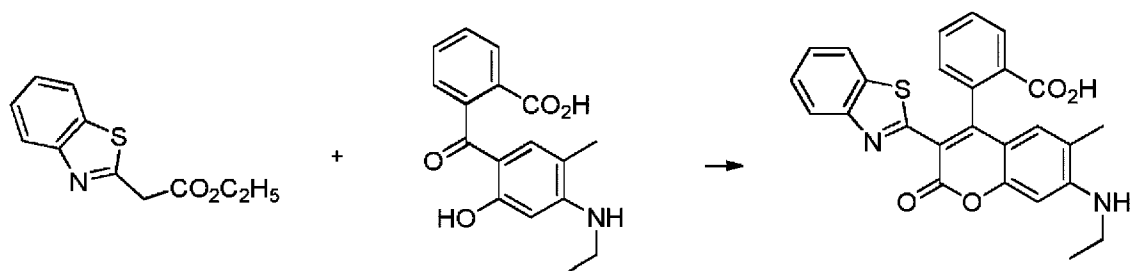
Ácido 2-[10-(benzotiazol-2-il)-1,1,7,7-tetrametil-11-oxo-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H,11H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-il]quinolin-9-il]benzoico (compuesto **I-5**)



Se añadió una mezcla de 0,75 g (1,90 mmol, 1 eq) de ácido 2-(8-hidroxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-pirido[3,2,1-il]quinolina-9-carbonil)benzoico y 0,44 g (1,99 mmol, 1,04 eq) de 2-(benzotiazol-2-il)acetato de etilo con agitación a ácido sulfúrico concentrado (7 ml) a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, después se calentó durante 2,5 horas mientras se agitaba a 120 °C. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (DCM-MeOH, 10 %) y mediante LCMS. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 0,5 horas y después se vertió en una mezcla de hielo picado (aproximadamente 50 g) y acetato de sodio (aproximadamente 5 g). Después de 1 hora, el producto se filtró y se lavó con agua hasta neutralidad y se secó al aire. Rendimiento: 0,58 g (1,05 mmol, 55 %). El producto final se utilizó sin purificación adicional. MS (DUIS): PM calculado 550,19. Encontrado: (-) 549 (M-1).

#### Ejemplo 3

Ácido 2-[3-(benzotiazol-2-il)-7-(etilamino)-6-metil-2-oxo-2H-cromen-4-il]benzoico (compuesto **I-8**)

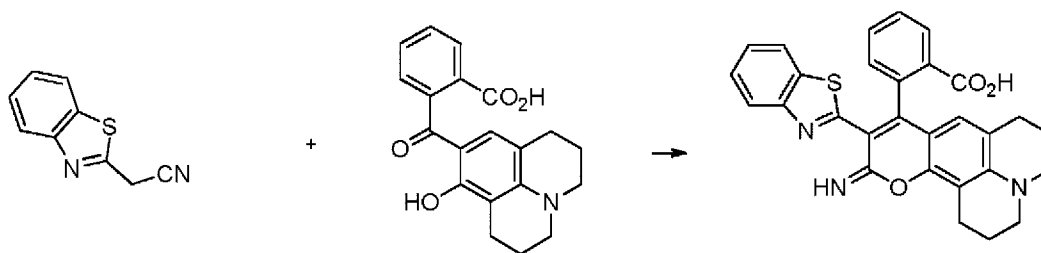


Se colocó ácido sulfúrico (5 ml) en un matraz de fondo redondo, después se enfrió hasta aproximadamente 0-5 °C y se añadieron 0,7 g (2,34 mmol, 1 eq) de ácido 2-(4-(etilamino)-2-hidroxi-5-metilbenzoil)benzoico con agitación seguido de la adición de 0,7 g (3,16 mmol, 1,35 eq) de 2-(benzotiazol-2-il)acetato de etilo. Esta mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y después se calentó durante 1 hora mientras se agitaba a 95 °C. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (DCM-MeOH, 10 %) y mediante LCMS.

La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 0,5 horas y después se vertió en una mezcla de hielo picado (aproximadamente 100 g) y acetato de sodio (aproximadamente 5 g). Después de 1 hora, el producto se filtró y se lavó con agua hasta neutralidad y se secó al aire. Rendimiento: 1,01 g (2,22 mmol, 95 %). El producto final se utilizó sin purificación adicional. MS (DUIS): PM calculado 456,11. Encontrado: (-) 455 (M-1), (+) 457 (M+1). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 8,19 - 8,12 (m, 1H), 7,92 - 7,78 (m, 1H), 7,64 (dd, *J* = 8,3, 1,1 Hz, 1H), 7,61 - 7,48 (m, 2H), 7,43 - 7,36 (m, 1H), 7,36 - 7,26 (m, 1H), 7,21 - 7,14 (m, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,56 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H), 3,41 - 3,34 (m, 2H), 2,03 (s, 3H), 1,38 - 1,27 (m, 3H).

#### Ejemplo 4-1

Ácido 2-[10-(benzotiazol-2-il)-11-imino-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ilquinolin-9-il]benzoico (compuesto **I-4A**)

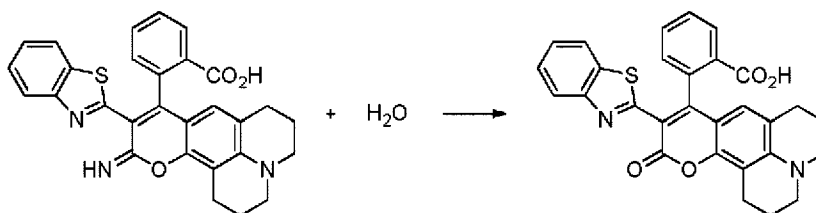


Se colocó ácido sulfúrico (10 ml) en un matraz de fondo redondo, después se añadió 1 g (2,96 mmol, 1 eq) de ácido 2-(8-hidroxi-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pirido[3,2,1-il]quinolina-9-carbonil)benzoico con agitación seguido de la adición de 0,57 g (3,26 mmol, 1,1 eq) de 2-(benzotiazol-2-il)acetonitrilo. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 30 minutos y después se calentó durante 1,5 horas mientras se agitaba a 80 °C y 1 hora a 90 °C. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (DCM-MeOH, 10 %) y mediante LCMS.

La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 0,5 horas y después se vertió en una mezcla de hielo picado (aproximadamente 100 g). Después de 0,5 horas, el producto se filtró y se lavó con agua hasta neutralidad y se secó al aire. Rendimiento: 0,8 g (1,62 mmol, 55 %). El producto final se utilizó sin purificación adicional. MS (DUIS): PM calculado 493,15. Encontrado: (-) 492 (M-1), (+) 494 (M+1).

#### Ejemplo 4-2

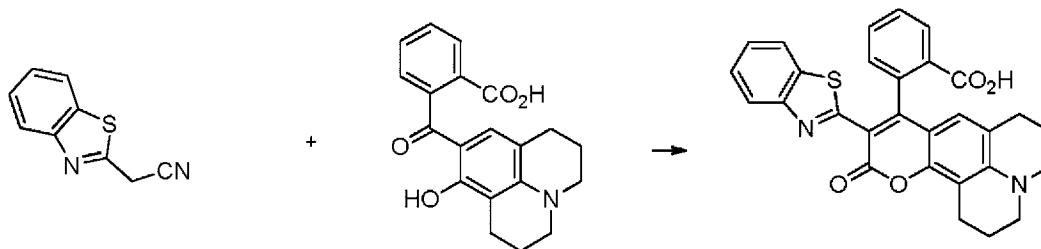
Ácido 2-[10-(benzotiazol-2-il)-11-oxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-il]quinolin-9-il]benzoico (compuesto **I-4**).



La suspensión de la imina (**I-4A**) de la etapa anterior (ejemplo 4-1) y agua (25 ml) se agitó 5 horas a 80 °C. Al final de este tiempo, el color rojo del material inicial casi desapareció y se desarrolló una fluorescencia muy fuerte. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (DCM-MeOH, 10 %) y mediante LCMS. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 0,5 horas y después el producto se filtró y se lavó con agua y se secó al aire. Rendimiento: 0,77 g (1,56 mmol, 96 %). El producto final se utilizó sin purificación adicional. MS (DUIS): PM calculado 494,13. Encontrado: (-) 493 (M-1), (+) 495 (M+1).

## Ejemplo 5

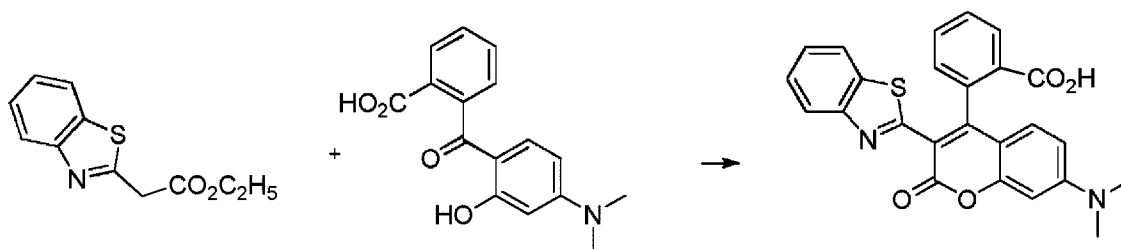
Ácido 2-[10-(benzotiazol-2-il)-11-oxo-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H,11H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ilquinolin-9-ilbenzoico (compuesto **I-4**)



Se colocó ácido sulfúrico (10 ml) en un matraz de fondo redondo y después se añadió 1 g (2,96 mmol, 1 eq) de ácido 2-(8-hidroxi-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H,11H-pirido[3,2,1-il]quinolina-9-carbonil)benzoico con agitación seguido de la adición de 0,57 g (3,26 mmol, 1,1 eq) de 2-cianometilbenzotiazol. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 30 minutos, después se calentó durante 2 horas mientras se agitaba a 95 °C. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y después se vertió en una mezcla de agua y hielo picado (aproximadamente 75 g). Esta mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente y el producto se filtró y se lavó con agua hasta que estuvo neutro y se secó al aire. El producto final se utilizó sin purificación adicional. Rendimiento: 1,09 g (2,21 mmol, 75 %). MS (DUIS): PM calculado 494,13. Encontrado: (-) 493 (M-1), (+) 495 (M+1).

## Ejemplo 6

Ácido 2-[3-(benzotiazol-2-il)-7-(dimetilamino)-2-oxo-2H-cromen-4-il]benzoico (compuesto **I-2**)

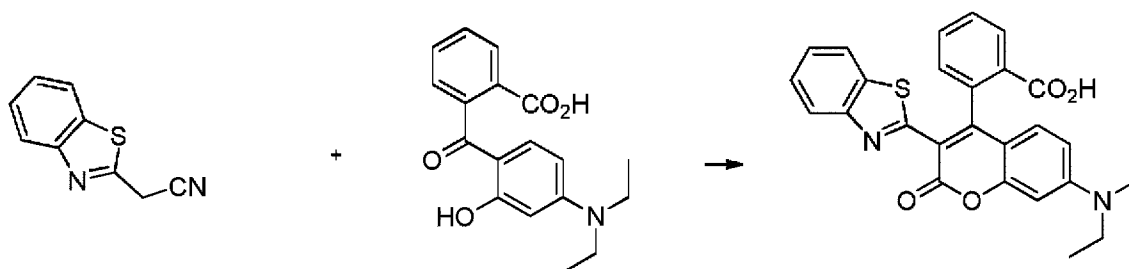


Se añadió una mezcla de 0,285 g (1,0 mmol, 1 eq) de ácido 2-[4-(dimetilamino)-2-hidroxibenzoil]benzoico y 0,243 g (1,1 mmol, 1,1 eq) de 2-(benzotiazol-2-il)acetato de etilo con agitación a ácido sulfúrico (5 ml) a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, después se calentó durante 4 horas mientras se agitaba a 100 °C. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (DCM-MeOH, 10 %) y mediante LCMS. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante la noche y después se vertió en una mezcla de agua con hielo picado (aproximadamente 100 g) y acetato de sodio (aproximadamente 5 g). Después de 1 hora, el producto se filtró y se lavó con agua hasta neutralidad y se secó al aire. Rendimiento: 0,429 g (0,96 mmol, 97 %). El producto final se utilizó sin purificación adicional. MS (DUIS): PM calculado 442,10. Encontrado: (-) 441 (M-1). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,70 (s, 1H), 8,14 - 8,04 (m, 1H), 8,04 - 7,94 (m, 1H), 7,58 (h, *J* = 6,5 Hz, 2H), 7,43 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,40 - 7,29 (m, 2H), 7,19 (dd, *J* = 7,2, 1,7 Hz, 1H), 6,78 - 6,63 (m, 3H), 3,07 (s, 6H).

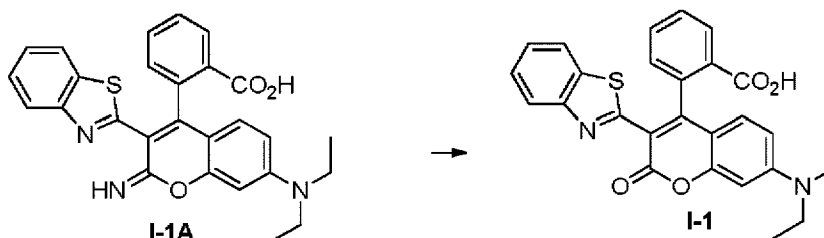
## Ejemplo 7-1

Ácido 2-[3-(benzotiazol-2-il)-7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-4-il]benzoico (compuesto 1-1).





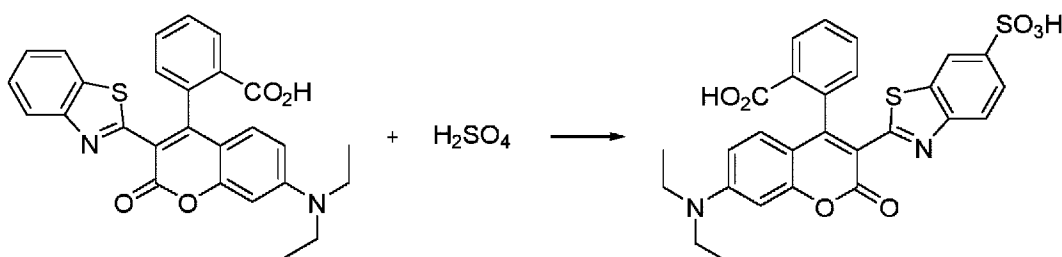
Se colocó ácido sulfúrico (8 ml) en un matraz de fondo redondo, después se añadieron 0,25 g (0,8 mmol, 1 eq) de ácido 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]benzoico con agitación seguido de la adición de 0,14 g (0,8 mmol, 1 eq) de 2-cianometilbenzotiazol. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 30 minutos y después se calentó durante 2 horas mientras se agitaba a 95 °C. Esta mezcla de reacción se vertió en agua helada (aproximadamente 75 g). En esta etapa, el intermedio imina correspondiente (**I-1A**) y se puede aislar por filtración. En agua o en disolventes orgánicos con presencia de agua y particularmente en condiciones ácidas se puede lograr la hidrólisis adicional del intermedio imina.



Esta mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente y el producto se filtró y se lavó con agua hasta que estuvo neutro y se secó al aire. Rendimiento: 0,33 g (0,7 mmol, 88 %). El producto final se utilizó sin purificación adicional. MS (DUIS): PM calculado 470,13. Encontrado: (-) 469 (M-1), (+) 471 (M+1). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,71 (s, 1H), 8,08 (dt,  $J$  = 7,6, 1,7 Hz, 1H), 8,03 - 7,92 (m, 1H), 7,64 - 7,52 (m, 2H), 7,45 - 7,39 (m, 1H), 7,39 - 7,27 (m, 2H), 7,19 (dd,  $J$  = 6,9, 2,3 Hz, 1H), 6,70 (d,  $J$  = 1,9 Hz, 1H), 6,69 - 6,61 (m, 2H), 3,47 (q,  $J$  = 7,2 Hz, 4H), 1,23 - 1,05 (m, 6H).

#### Ejemplo 7-2

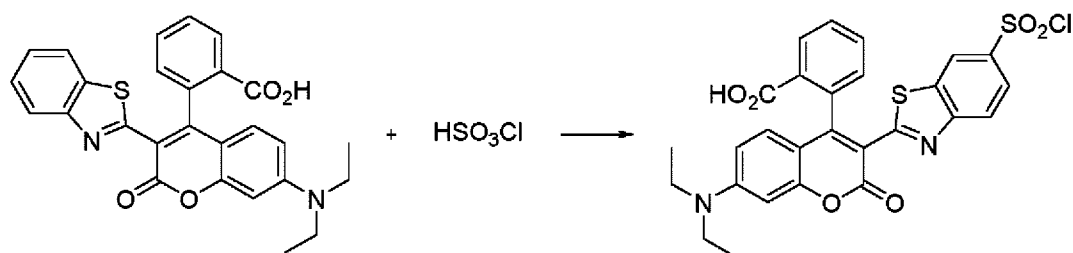
Ácido 2-(7-(dietilamino)-2-oxo-3-(6-sulfobenzotiazol-2-yl)-2H-cromen-4-yl)benzoico (compuesto **I-13**).



Se colocó ácido 2-[3-(benzotiazol-2-yl)-7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-4-yl]benzoico (compuesto **I-1**) (1,3 g, 2,76 mmol) en un matraz de fondo redondo, se secó al vacío, después se enfrió en un baño de acetona y hielo seco. Se añadió ácido sulfúrico fumante (20 %, 5,8 ml, 27 mmol) gota a gota mientras se agitaba. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, después se calentó durante 1 hora a 50 °C y se disolvió el material de partida. La mezcla de reacción se enfrió y se añadió éter anhidro con precaución. El precipitado higroscópico de color blanquecino se filtró y el filtrado se trituro nuevamente con éter y después con EtOH. Se recolectó un precipitado de color rosa. Rendimiento 1,21 g (80 %). El producto final se utilizó sin purificación adicional. MS (DUIS): PM calculado 550,09. Encontrado: (-) 549 (M-1), (+) 551 (M+1). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, TFA)  $\delta$  8,85 - 8,78 (m, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,57 - 8,45 (m, 2H), 8,26 - 8,15 (m, 2H), 7,94 (s, 1H), 7,67 (d,  $J$  = 9,4 Hz, 1H), 7,63 - 7,56 (m, 1H), 7,45 (dd,  $J$  = 8,8, 4,5 Hz, 1H), 3,94 (q,  $J$  = 7,2 Hz, 4H), 1,38 (t,  $J$  = 7,1 Hz, 6H). Según el análisis de espectros de HPLC y RMN, este producto se compone principalmente de un isómero.

#### Ejemplo 7-3

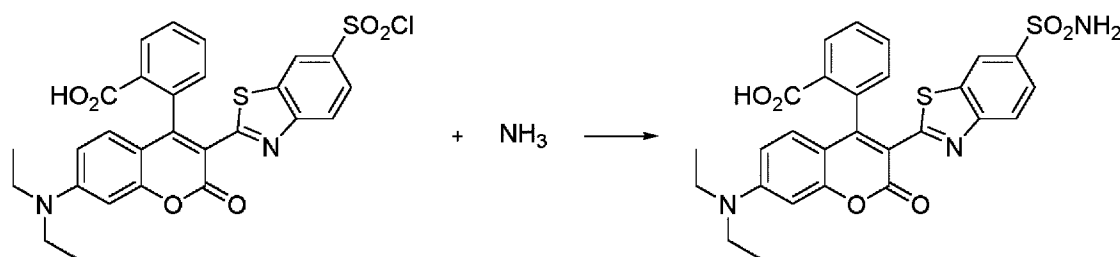
Ácido 2-(7-(dietilamino)-2-oxo-3-(6-clorosulfonilbenzotiazol-2-yl)-2H-cromen-4-yl)benzoico (compuesto **I-14**).



El ácido clorosulfónico (5 ml, 75 mmol) se enfrió en un baño de hielo y el colorante **I-1** (1,2 g, 2,55 mmol) se añadió cuidadosamente mientras se agitaba en porciones durante un período de 5 minutos. La mezcla combinada se agitó a temperatura ambiente ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ) durante 1,5 horas y después se calentó a  $95\text{--}100^\circ\text{C}$  durante 6 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se añadió muy lentamente a aproximadamente 20 ml de mezcla de hielo y agua. Se separó un sólido de color rojo que se filtró rápidamente y se lavó con agua fría ( $2 \times 30\text{ ml}$ ) y se secó al vacío. Rendimiento 1,2 g (83 %, 2,11 mmol). Este compuesto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

#### Ejemplo 7-4

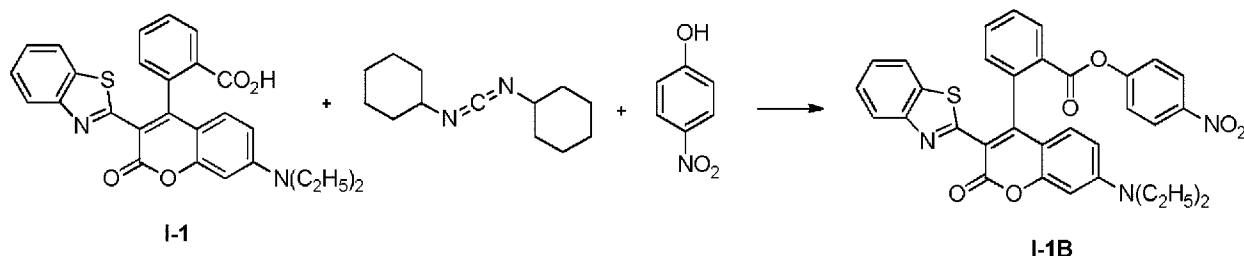
Ácido 2-(7-(dietilamino)-2-oxo-3-(6-aminosulfonilbenzotiazol-2-il)-2H-cromen-4-il)benzoico (compuesto **I-15**).



Se añadió cuidadosamente ácido 2-(7-(dietilamino)-2-oxo-3-(6-clorosulfonilbenzotiazol-2-il)-2H-cromen-4-il) benzoico (**I-14**) (1,2 g, 2,11 mmol) en porciones con agitación a una solución de amoníaco (5 ml, 25 %) enfriada en un baño de hielo durante un período de 5 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ) durante 1 hora y el disolvente se destiló a temperatura ambiente al vacío. El compuesto se purificó mediante columna ultrarrápida (gel de sílice, DCM-MeOH como eluyente). Rendimiento 0,34 g (30 %, 0,62 mmol). Este compuesto contiene una pequeña cantidad de otros isómeros y se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. MS (DUIS): PM calculado 549,10. Encontrado: (-) 548 (M-1), (+) 550 (M+1). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, TFA)  $\delta$  8,83-8,73 (m, 1H), 8,62 (d,  $J = 1,6\text{ Hz}$ , 1H), 8,57 (d,  $J = 8,9\text{ Hz}$ , 1H), 8,42 (dd,  $J = 8,9, 1,8\text{ Hz}$ , 1H), 8,24-8,13 (m, 2H), 7,82 (d,  $J = 2,1\text{ Hz}$ , 1H), 7,64-7,52 (m, 2H), 7,38 (d,  $J = 8,8\text{ Hz}$ , 1H), 3,90 (q,  $J = 7,2\text{ Hz}$ , 4H), 1,37 (t,  $J = 7,2\text{ Hz}$ , 6H).

#### Ejemplo 8

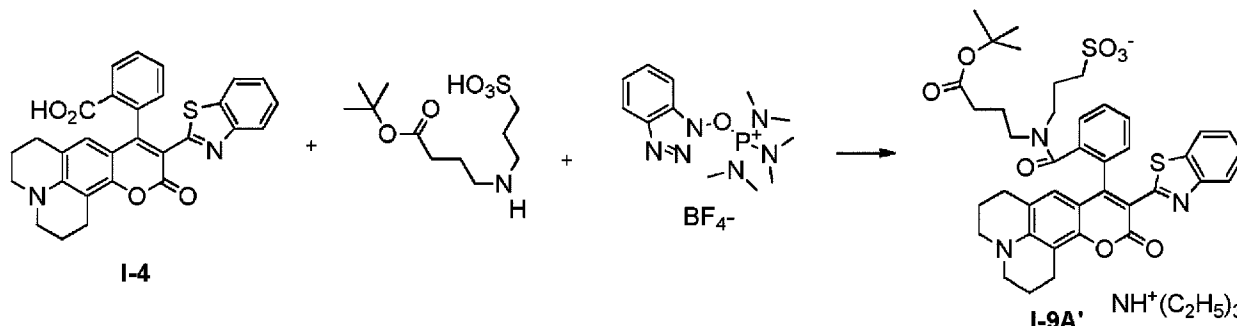
2-[3-(benzotiazol-2-il)-7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-4-il]benzoato de 4-nitrofenilo (compuesto **I-1B**)



En DMF anhidro (1,5 ml) se disolvieron 94 mg (0,2 mmol, 1 eq) de ácido 2-[3-(benzotiazol-2-il)-7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-4-il]benzoico (**I-1**, NR440). A esta solución se añadió dicitlohexilcarbodiimida (62 mg, 0,3 mmol, 1,5 eq.). Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se añadió p-nitrofenol (33 mg, 0,24 mmol, 1,2 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante la noche, después se filtró la dicitlohexilurea. El disolvente se destiló al vacío a temperatura ambiente y el residuo aceitoso se vertió en hielo (aproximadamente 5 g). El producto sólido amarillo se filtró, se lavó con agua. Rendimiento: 79 mg (67 %, 0,134 mmol). MS (DUIS): PM calculado 591,15. Encontrado: (-) 590 (M-1), (+) 592 (M+1).

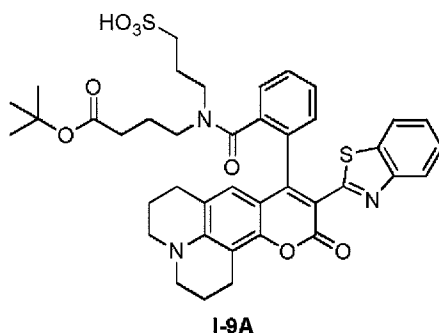
## Ejemplo 9

3-(2-(10-(benzotiazol-2-il)-11-oxo-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H,11H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-il]quinolin-9-il)-N-(4-(terc-butoxi)-4-oxobutil)benzamido)propano-1-sulfonato de trietilamonio (compuesto **1-9A'**)



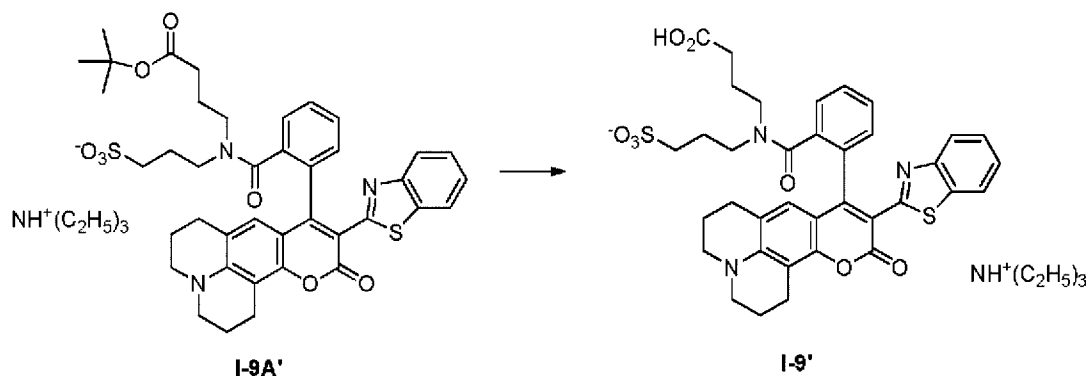
El compuesto **I-4** (150 mg, 0,3 mmol, 1 eq) se disolvió en DMA anhidro (1,5 ml). A esta solución se añadió un exceso de trietilamina (1 ml) y tetrafluoroborato de [(1H-benzotiazol-1-il)oxi]tris(dimetilamino)fosfonio (140 mg, 0,36 mmol, 1,2 eq) como un reactivo de activación. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos y después se añadió ácido 3-((3-(terc-butoxi)carbonil)amino)propano-1-sulfónico (140 mg, 0,5 mmol, 1,6 eq). El progreso de la reacción se controló mediante TLC (acetonitrilo-agua, 10 %) y mediante LCMS.

La mezcla de reacción se agitó durante la noche, se filtró y el exceso de reactivo de activación se inactivó con una 0,1M solución de TEAB en agua. Los disolventes se evaporaron al vacío y el residuo se purificó por HPLC. Rendimiento: 180 mg (0,21 mmol, 69 %). MS (DUIS): PM calculado 757,25. Encontrado: (-) 756 (M-1), (+) 758 (M+1) para el correspondiente anión protonado compuesto **I-9A**.



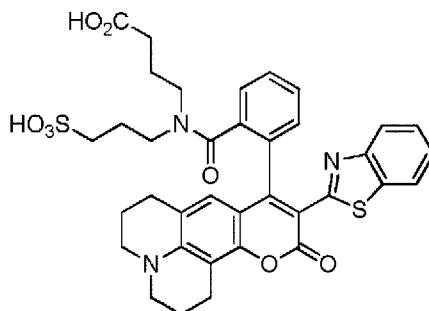
## Ejemplo 10

4-(2-(10-(benzotiazol-2-il)-11-oxo-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H,11H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-il]quinolin-9-il)-N-(3-sulfonatopropil)benzamido)butanoato de trietilamonio (compuesto **I-9'**)



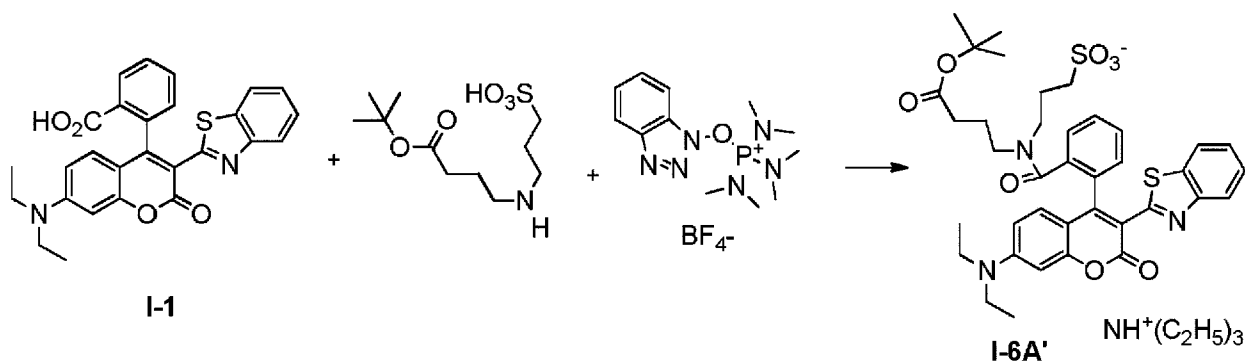
El compuesto **I-9A'** de la etapa anterior después de la evaporación de los disolventes (180 mg, 0,21 mmol) se disolvió en DCM (150 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (5 ml). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante la noche. El progreso de la reacción de desprotección se controló mediante TLC (acetonitrilo-agua, 10 % como

eluyente) y mediante LCMS. Se destiló el DCM. El residuo se disolvió en acetonitrilo y se añadió trietilamina (1 ml). El precipitado amarillo se filtró. MS (DUIS): PM calculado 701,19. Encontrado: (-) 700 (M-1) para el correspondiente anión protonado compuesto **I-9**:



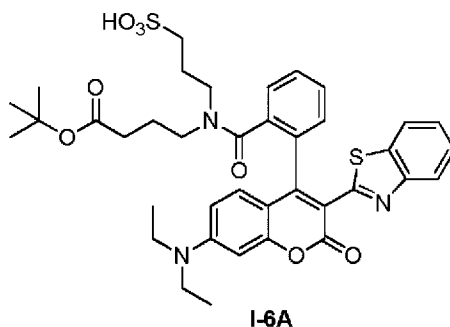
#### Ejemplo 11

3-(2-(3-(benzotiazol-2-yl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-cromen-4-yl)-N-(4-(tert-butoxy)-4-oxobutyl)benzamido)propano-1-sulfonato de trietilamonio (compuesto **I-6A'**)



Se disolvió ácido 2-(3-(benzotiazol-2-yl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-cromen-4-yl)benzoico (compuesto **I-1**) (94 mg, 0,2 mmol, 1 eq) en DMA anhidro (2 ml). A esta solución se añadió un exceso de N-etil-N,N-diisopropilamina (1 ml). A esta solución se añadió tetrafluoroborato de [(1H-benzotiazol-1-yl)oxi]tris(dimetilamino)fosfonio (80 mg, 0,21 mmol, 1,04 eq) como un reactivo de activación. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente.

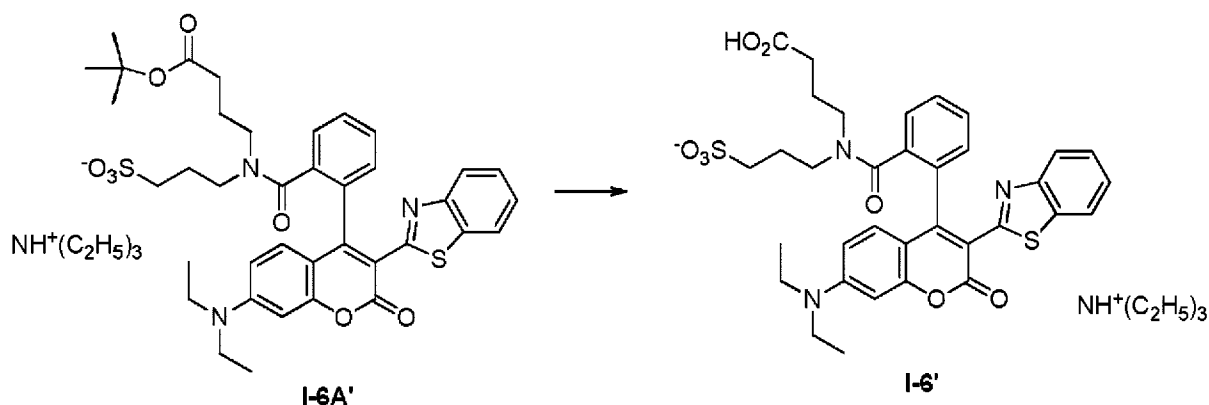
El progreso de la reacción se controló mediante TLC (acetonitrilo-agua, 10 % como eluyente). Después, se añadió ácido 3-((3-(tert-butoxi)carbonil)amino)propano-1-sulfónico (70 mg, 0,25 mmol, 1,25 eq). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente, se filtró y el exceso de reactivo de activación se inactivó con una 0,1M solución de TEAB en agua (3 ml). Los disolventes se evaporaron al vacío y el residuo se purificó por HPLC. Rendimiento: 113 mg (0,136 mmol, 68 %). MS (DUIS): PM calculado 733,25. Encontrado: (-) 732 (M-1) para el correspondiente anión protonado compuesto **I-6A**:



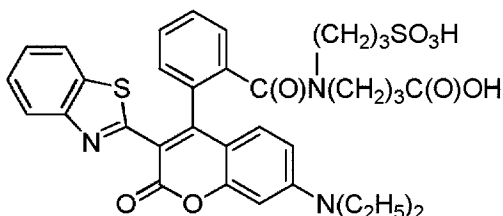
#### Ejemplo 12

4-(2-(3-(benzotiazol-2-yl)-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-cromen-4-yl)-N-(3-sulfonatopropil)benzamido)butanoato de trietilamonio (compuesto **I-6'**)

de

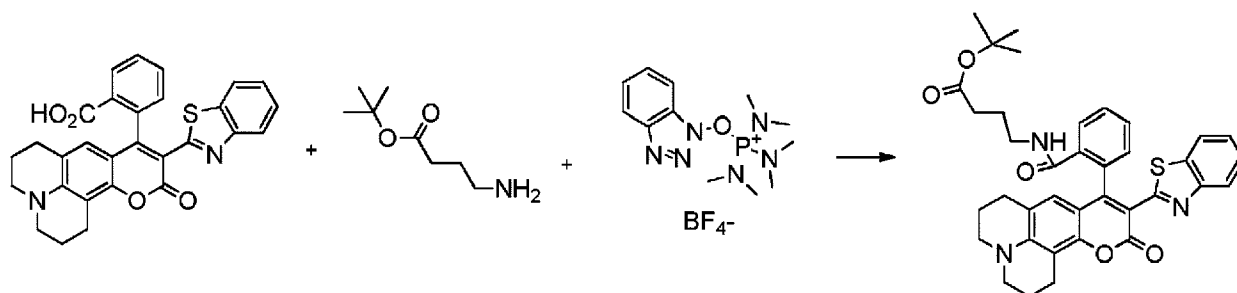


El compuesto **I-6A'** (180 mg, 0,21 mmol) de la etapa anterior después de la evaporación de los disolventes se disolvió en DCM (50 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (2,5 ml). La mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (acetonitrilo-agua, 10 % como eluyente). Se destiló el disolvente y el residuo se disolvió en acetonitrilo y se añadió trietilamina (1,8 ml). Se destiló el acetonitrilo y el exceso de trietilamina. Al residuo en el matraz se añadió dietil éter anhidro y el producto se formó como un precipitado cristalino amarillo y se filtró. MS (DUIS): PM calculado 677,19. Encontrado: (-) 676 (M-1) para el ácido **I-6**:



#### Ejemplo 13

4-(2-(10-(benzotiazol-2-il)-11-oxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-il]quinolin-9-il)benzamido)butanoato de terc-butilo (**I-10A**)

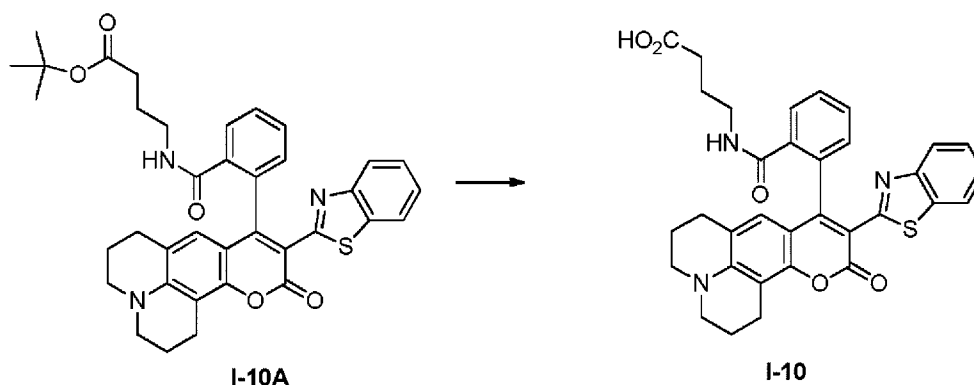


El compuesto **I-4** (97 mg, 0,196 mmol, 1 eq) se disolvió en DMF anhidro recién destilado (2,5 ml). A esta solución se añadió un exceso de N-etil-N,N-diisopropilamina (0,253 mg, 1,961 mmol, 10 eq) y tetrafluoroborato de [(1H-benzotriazol-1-il)oxi]tris(dimetilamino)fosfonio (113 mg, 0,294 mmol, 1,5 eq) como un reactivo de activación. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos y después se añadió clorhidrato de 4-aminobutanoato de terc-butilo (58 mg, 0,294 mmol, 1,5 eq). El progreso de la reacción se controló mediante TLC (acetonitrilo-agua, 10 %) y mediante LCMS.

La mezcla de reacción se agitó durante la noche, se filtró y el exceso de reactivo de activación se inactivó con una 0,1M solución de TEAB en agua. Los disolventes se evaporaron al vacío y el residuo se purificó por HPLC. Rendimiento: 105 mg (0,165 mmol, 84 %). MS (DUIS): PM calculado 635,25. Encontrado: (-) 634 (M-1), (+) 636 (M+1).

#### Ejemplo 14

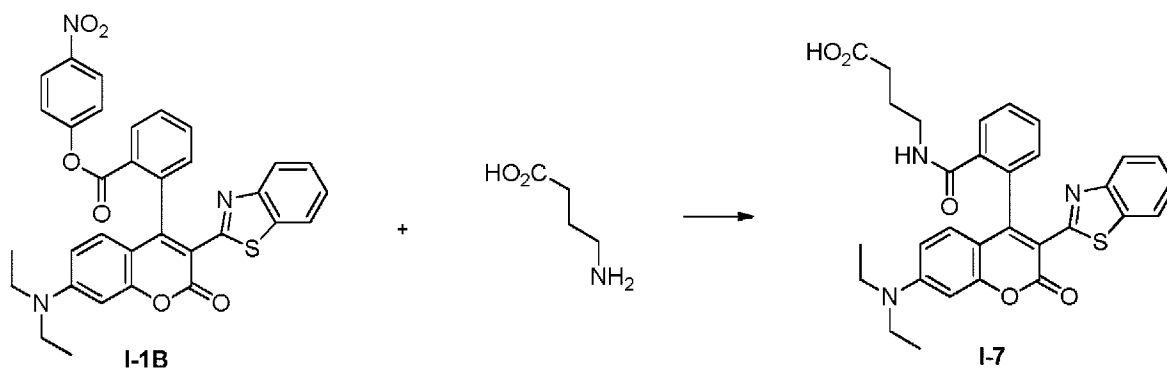
Ácido 4-(2-(10-(benzotiazol-2-il)-11-oxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-il]quinolin-9-il)benzamido)butanoico (compuesto **I-10**)



El compuesto **I-10A'** (64 mg, 0,1 mmol) de la etapa anterior después de la evaporación de los disolventes se disolvió en DCM (25 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (3,5 ml). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante la noche. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (acetonitrilo-agua, 10 % como eluyente) y mediante LCMS. Los disolventes se destilaron. El residuo se disolvió en acetonitrilo y se añadió trietilamina (1 ml). Se destilaron el acetonitrilo y el exceso de trietilamina. El residuo en el matraz se secó durante la noche al vacío, después se sonicó con éster de petróleo (25 ml) durante 1 hora. Se filtró el precipitado amarillo. MS (DUIS): PM calculado 579,18. Encontrado: (-) 578 (M-1), (+) 580 (M+1).

#### Ejemplo 15

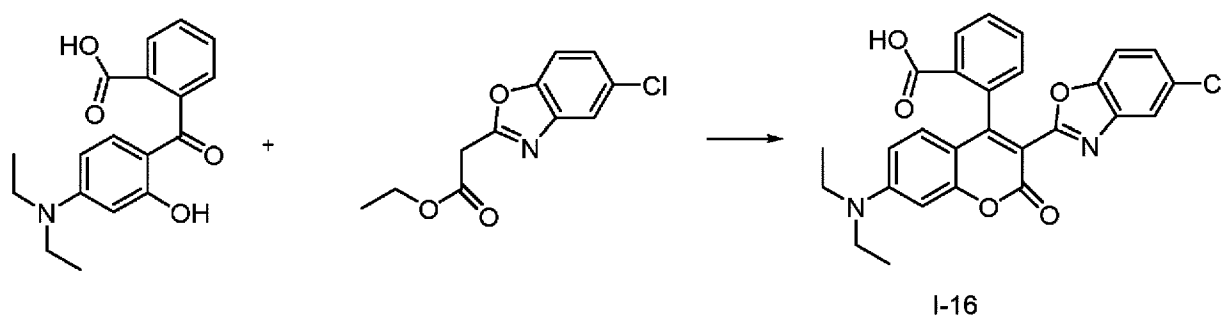
Ácido 4-(2-(10-(benzotiazol-2-il)-11-oxo-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H,11H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-il]quinolin-9-il)benzamido)butanoico (compuesto **I-7**)



El compuesto **1-1B** (180 mg, 0,3 mmol, 1 eq) se disolvió en DMF anhidro (5 ml) y se añadió dimetilaminopiridina (56 mg, 0,45 mmol, 1,5 eq). A esta mezcla de reacción se añadió ácido 4-aminobutanoico (47 mg, 0,45 mmol, 1,5 eq) y esta mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante la noche. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (acetonitrilo-agua, 10 % como eluyente) y mediante LCMS. Los disolventes se destilaron al vacío a temperatura ambiente. El residuo se diluyó con agua (25 ml) y el producto se formó como un precipitado amarillo y se filtró. MS (DUIS): PM calculado 555,18. Encontrado: (-) 554 (M-1), (+) 556 (M+1).

#### Ejemplo 16

Ácido 2-(3-(5-clorobenzoxazol-2-il)-7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-4-il)benzoico (compuesto **I-16**)

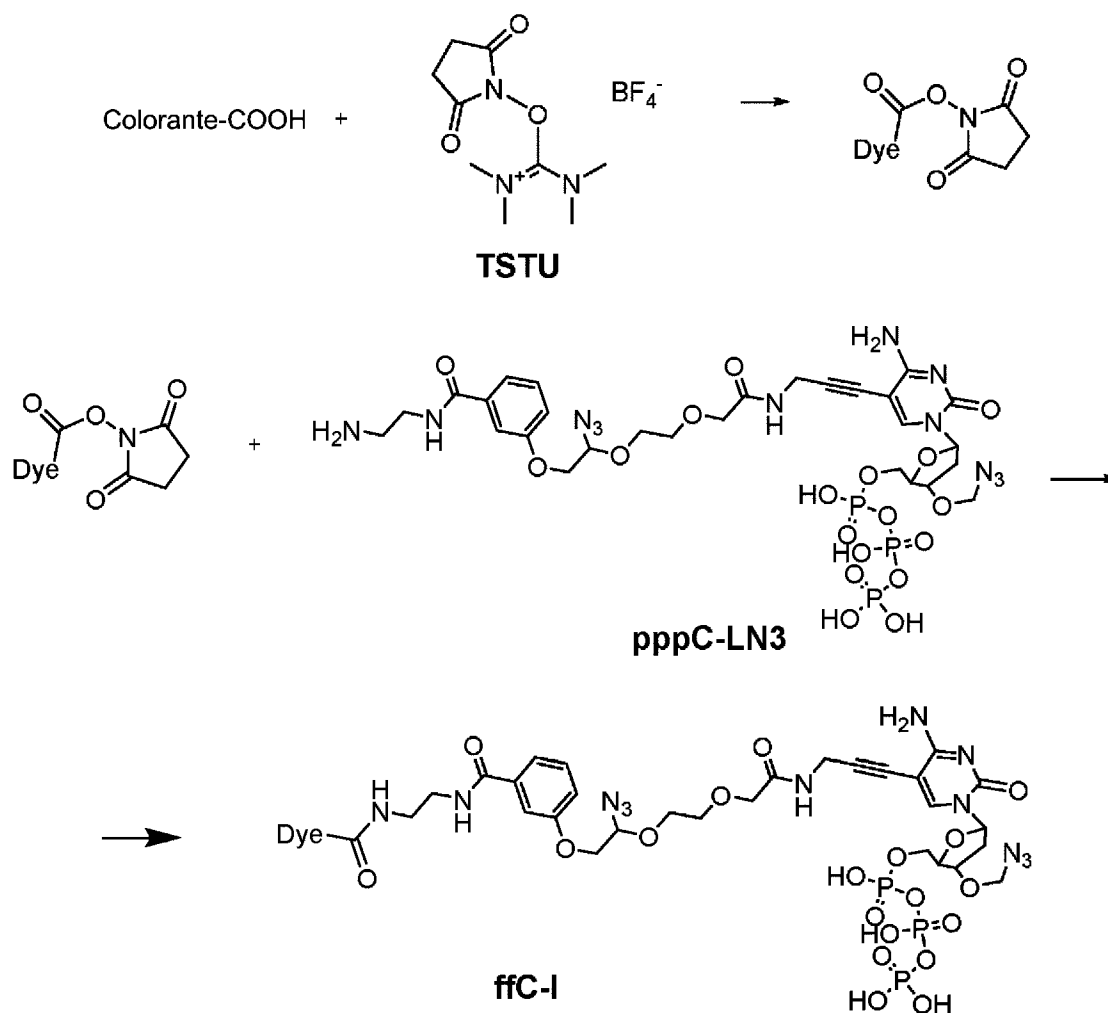


Se añadió una mezcla de 0,313 g (1,0 mmol, 1 eq) de ácido 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]benzoico y 0,263 g (1,1 mmol, 1,1 eq) de 2-(5-clorobenzoxazol-2-il)acetato de etilo con agitación a ácido sulfúrico (5 ml) a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, después se calentó durante 4 horas mientras se agitaba a 100 °C. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (DCM-MeOH, 10 % como eluyente) y mediante LCMS. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante la noche y después se vertió en una mezcla de agua con hielo picado (aproximadamente 100 g) y acetato de sodio (aproximadamente 5 g). Después de 1 hora, el producto se filtró y se lavó con agua hasta una reacción neutra (pH aproximadamente 7) y se secó al aire. Rendimiento: 0,453 g (0,93 mmol, 93 %). El producto final se utilizó sin purificación adicional. MS (DUI): PM calculado 488,11. Encontrado: (-) 487 (M-1).

#### Ejemplo 17

Procedimiento general para la síntesis de conjugados de nucleótidos completamente funcionales

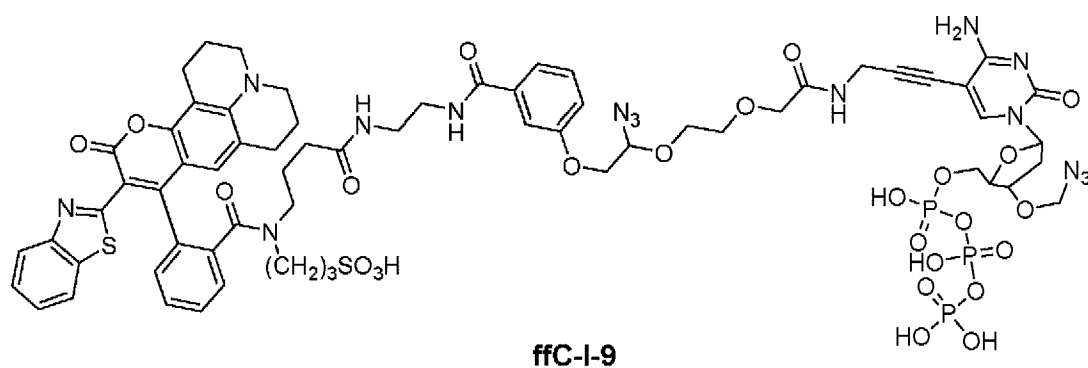
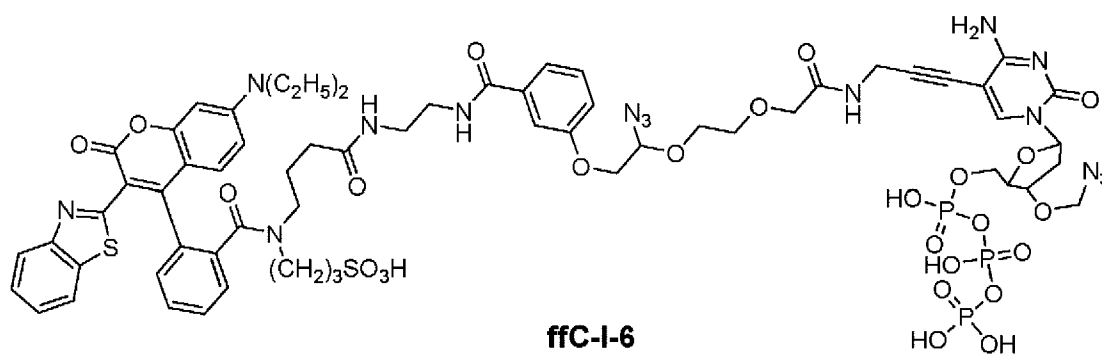
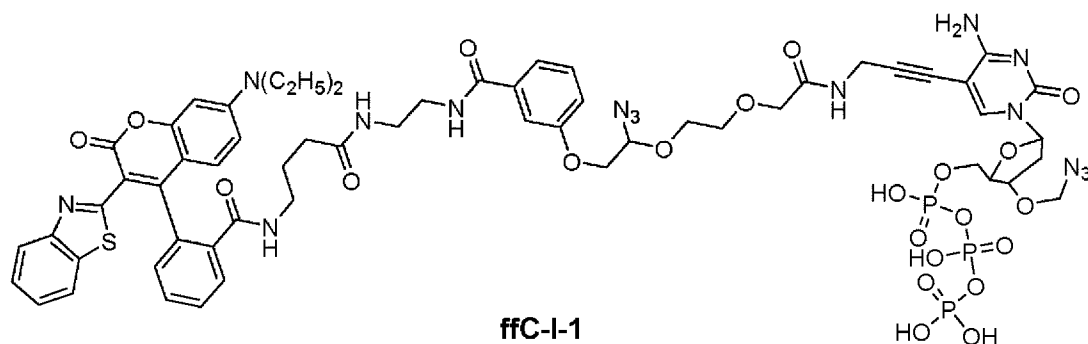
Se sintetizaron nuevos conjugados de colorantes y nucleótidos a partir de los compuestos (I) o compuestos (VO) mediante el acoplamiento con derivados de nucleótidos apropiados.



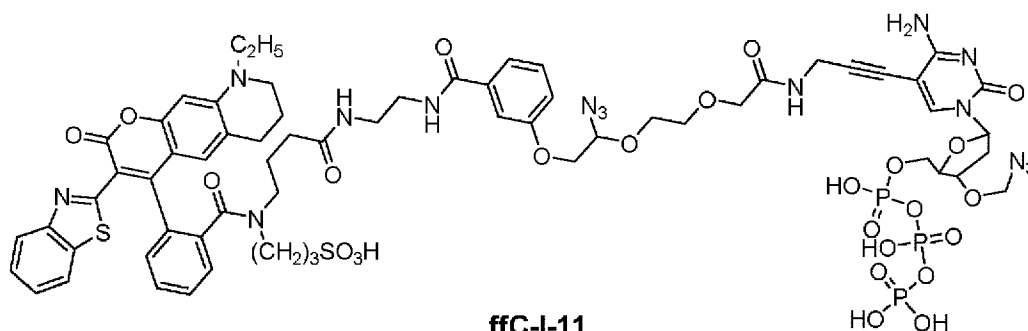
Se añadieron DMA anhidro (2,5 ml), tetrafluoroborato de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(*N*-succinimidil)uronio (20 mg, 60  $\mu\text{mol}$ ) y la base de Hunig (0,05 ml) a la mezcla seca del colorante apropiado (50  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Según el TLC (acetonitrilo-agua, 10 %), la activación usualmente se completó en 20-30 minutos. Una vez completada la activación, se añadió a la mezcla de reacción la solución de pppC-LN3 como una sal de trietilamonio (55  $\mu\text{mol}$ ) en una mezcla de DMA (0,75 ml) y agua (0,30 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió hasta aproximadamente 4 °C con un baño de hielo, después se añadió una solución de 0,1 M TEAB (5 ml) en agua y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla de reacción se aplicó a una columna con aproximadamente 25 g de suspensión de resina DEAE Sephadex en solución de 0,05 M TEAB en agua y se lavó con

TEAB (gradiente de concentración de 0,1 M hasta 1 M). Las fracciones en color se recolectaron y evaporaron, después se coevaporaron nuevamente con agua para eliminar más TEAB y se aspiraron hasta sequedad. Después, el residuo se volvió a disolver en TEAB 0,1 M. Esta solución se filtró a través de un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,2 nm. El producto se purificó por HPLC utilizando una columna de fase inversa C18 con acetonitrilo-0,1 M TEAB. Rendimiento: 60-75 %.

Utilizando el procedimiento general descrito anteriormente, se prepararon los siguientes conjugados de nucleótidos:







#### Ejemplo 18

En este ejemplo, se probaron las propiedades espectrales de varios colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria y los conjugados de nucleótidos correspondientes y se compararon con colorantes disponibles comercialmente.

La Tabla 1A ilustra las propiedades espectrales de los nuevos colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria en comparación con algunos colorantes comerciales ejemplares con absorción en la misma región espectral en solución de etanol. Se puede observar que cada uno de los nuevos colorantes fluorescentes de la presente solicitud tiene un desplazamiento de Stokes más largo en comparación con *Star440sx*.

Tabla 1A. La comparación de propiedades espectrales varía colorantes en solución de EtOH

Colorantes	Absorción máxima (nm)	Emisión máxima (nm)	Desplazamiento de Stokes (nm)
<i>Star440sx</i> *	433	502	69
<b>I-9</b>	460	540	80
<b>I-10</b>	457	543	86
<b>I-6</b>	450	525	75
<b>I-1</b>	445	520	75
<b>I-8</b>	424	510	86
<b>I-3</b>	427	511	84
<b>I-5</b>	465	538	73

\**Star440sx* - Colorante comercial de desplazamiento de Stokes largo

Además, se compararon las propiedades espectrales del colorante **I-1** con los colorantes sulfonados **I-13** y **I-15** en solución de metanol y los resultados se resumieron en la Tabla 1B. Estos datos demuestran que los derivados sulfonados **I-13** y **I-15** tienen una fluorescencia de 2 a 5 veces más fuerte en solución en comparación con el análogo no sustituido correspondiente **I-1**. Estos resultados demuestran el uso potencial de los colorantes sulfonados como biomarcadores.

Tabla 1B. Comparación de las propiedades espectrales de los colorantes sulfonados en solución de metanol

Colorante	Absorción máxima (nm)	Fluorescencia máxima (nm)	Intensidad de fluorescencia (normalizada) %	Desplazamiento de Stokes (nm)
<b>I-1</b>	410	506	100	95
<b>I-13</b>	418	511	235	93
<b>I-15</b>	425	511	496	86

La **figura 1** ilustra los espectros fluorescentes de los nuevos colorantes fluorescentes de la presente solicitud en comparación con un colorante comercial *Star440sx* que tiene absorción en la misma región espectral (solución en mezcla universal de barrido; los colorantes se excitaron a 460 nm). Debido al mayor desplazamiento de Stokes, estos

colorantes recientemente desarrollados pueden proporcionar más señal en la región de detección con una mejor separación de la luz de excitación a 460 nm.

La Tabla 2 ilustra las intensidades fluorescentes relativas del nucleótido C etiquetado con nuevos colorantes en comparación con el nucleótido apropiado etiquetado con colorante comercial que tiene absorción en la misma región espectral. Se demuestra que los nuevos colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria pueden proporcionar entre 60 y 400 % más de señal a 570 nm (región de detección) cuando se excitan con luz a 460 nm debido a su fluorescencia más fuerte y su mayor desplazamiento de Stokes.

Tabla 2. Intensidades de fluorescencia relativas del nucleótido C completamente funcional etiquetado ejemplar

ffC	Intensidad a 570 nm
ffC-star440sx *	1,0
ffC-I-9	3,5
ffC-I-10	4,0
ffC-I-6	1,6
ffC-I-1	2,3
Suponiendo $\epsilon$ para los colorantes I-1, I-6, I-9 y I-10 30.000	
* $\epsilon$ para Star440sx 22.700	

La Tabla 3 ilustra las propiedades espectrales de los nucleótidos C etiquetados con los nuevos colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria en solución, lo que es consistente con la observación de la Tabla 1 de que la mayoría de los nucleótidos etiquetados con los colorantes fluorescentes de la presente solicitud tienen un desplazamiento de Stokes más largo en comparación con el colorante comercial para la misma región espectral.

Tabla 3. Propiedades espectrales de un nucleótido C totalmente funcionalizado y etiquetado ejemplar en solución

ffC	Absorción máxima (nm)	Emisión máxima (nm)	Desplazamiento de Stokes (nm)
ffC-star440sx	447	516	69
ffC-I-9	475	542	67
ffC-I-10	467	545	78
ffC-I-6	453	527	74
ffC-I-1	449	530	81

La **figura 2** ilustra la usabilidad del nucleótido C etiquetado con los nuevos colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria (se muestra en negro) para el análisis de la secuenciación. En este ejemplo de secuenciación, se utilizó el método de detección de dos canales. Con respecto a los métodos de dos canales descritos en la presente memoria, los ácidos nucleicos pueden secuenciarse utilizando métodos y sistemas descritos en la publicación de la solicitud de patente US-2013/0079232. En la detección de dos canales, un ácido nucleico puede secuenciarse proporcionando un primer tipo de nucleótido que se detecta en un primer canal, un segundo tipo de nucleótido que se detecta en un segundo canal, un tercer tipo de nucleótido que se detecta tanto en el primer como en el segundo canal y un cuarto tipo de nucleótido que carece de una etiqueta que no está, o mínimamente, detectada en cualquiera de los canales.

En cada una de las **figuras 2A y 2B**, el nucleótido “G” no está etiquetado y se muestra como la nube izquierda inferior. Hay una mezcla de dos nucleótidos etiquetados “A”, uno etiquetado con un colorante derivado de cumarina a 0,5  $\mu$ M y otro con el derivado de benzopirano I-6 a 1,5  $\mu$ M que se muestra como la nube superior derecha. La señal del nucleótido NR550S0 etiquetada con el colorante “T” se indica mediante la nube superior izquierda, y la señal de nucleótidos “C” etiquetada se indica mediante la nube inferior derecha. El eje X muestra la intensidad de la señal de un canal, y el eje Y muestra la intensidad de la señal del otro canal. En las **figuras 2A y 2B**, el ffC está etiquetado con I-6 y I-1, respectivamente. Configuración del experimento: Instrumento: n.º de ciclo M15: C-I-6 a C5, C-I-1 a C9, secuenciación lib.: PhiX estándar. Se demuestra que los conjugados de nucleótidos C completamente funcionales etiquetados con colorantes I-6 y I-1 proporcionaron intensidades de señal suficientes y una mejor separación de las nubes.

La **figura 3** ilustra las intensidades fluorescentes relativas de los nucleótidos C etiquetados con varios colorantes fluorescentes cuando se excitan con luz azul (460 nm) o verde (530 nm). Este gráfico de barras muestra la intensidad bruta de los grupos que han incorporado el colorante indicado. Cada medición se tomó manualmente a Ex460 nm y

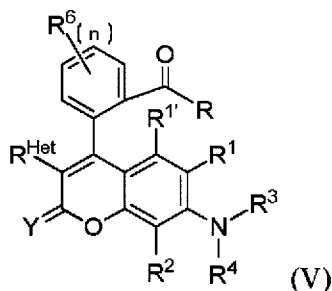
exponiendo durante 1 segundo a 60 °C. Se utilizó MTS [MiSeq R&D (Test) Software] en M15 para tomar las imágenes y se utilizó la herramienta de análisis de imágenes Firecrest para extraer los datos de intensidad.

Los resultados muestran que los ffC etiquetados con los nuevos colorantes fluorescentes descritos en la presente memoria proporcionaron una señal hasta un 300 % más brillante en comparación con el colorante Stokes largo comercial para la misma región espectral.

La **figura 4** ilustra el brillo relativo de los nucleótidos C conjugados etiquetados con un colorante fluorescente comercial y nuevo **I-6** cuando se excitaron con luz azul (460 nm) a dos temperaturas diferentes (temperatura ambiente a 22 °C y temperatura elevada a 60 °C). El ffC etiquetado con el nuevo colorante fluorescente **I-6** proporcionó una señal más brillante en comparación con ffC etiquetado con el colorante Stokes largo comercial Star440ls para cierta región espectral a ambas temperaturas.

## REIVINDICACIONES

1. Un nucleótido u oligonucleótido etiquetado con un compuesto fluorescente de la fórmula (V):



en donde cada  $R^1$ ,  $R^{1'}$  y  $R^2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, haloalcoxi, alcoxialquilo, amino, aminoalquilo, aminosulfonilo, halo, ciano, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroalquilo, C-carboxi, O-carboxi, C-amido, N-amido, nitro, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, haluro de sulfonilo, S-sulfonamido, N-sulfonamido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^1$  y  $R^{1'}$  juntos y con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada  $R^3$  y  $R^4$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquinilo, aminoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxialquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^1$  y  $R^3$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido o heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido;

alternativamente,  $R^2$  y  $R^4$  junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo o sistema de anillos seleccionado del grupo que consiste en heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido y heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido;

$R^{Het}$  es un heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más  $R^5$ ;

cada  $R^5$  y  $R^6$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, haloalcoxi, alcoxialquilo, amino, aminoalquilo, aminosulfonilo, halo, ciano, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroalquilo, C-carboxi, O-carboxi, C-amido, N-amido, nitro, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, haluro de sulfonilo, S-sulfonamido, N-sulfonamido, carbociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido;

R se selecciona de  $-OR^7$  o  $-NR^8R^9$ ;

Y se selecciona de O o NH;

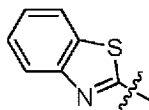
$R^7$  se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada  $R^8$  y  $R^9$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquinilo, aminoalquilo, carboxialquilo, sulfonatoalquilo, haloalquilo, heteroalquilo, alcoxialquilo, sulfo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, y heterociclilo opcionalmente sustituido; y n es un número entero de 0 a 4,

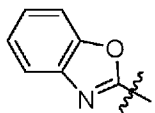
en donde sustituir significa que el grupo se sustituye con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), carbociclilo-C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>-alquilo-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), heterociclilo de 3-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), heterociclil-alquilo-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de 3-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), arilo (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), aril-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), heteroarilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), heteroarilo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), halo, ciano, hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (es decir, éter), ariloxi, sulfhidrilo (mercapto), halo-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (p. ej., -CF<sub>3</sub>), halo-alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (p. ej., -OCF<sub>3</sub>), alquiltio C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ariltio, amino, aminoalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), nitro, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfonamido, N-sulfonamido, C-carboxi, O-carboxi, acilo, cianato, isocianato, tiocianato, isotiocianato, sulfinilo, sulfonilo, sulfo, sulfino, sulfonato, y oxo (=O); y en donde el grupo alquilo tiene 1 a 20 átomos de carbono, el grupo alqueno tiene 2 a 20 átomos de carbono, el grupo alquino tiene 2 a 20 átomos de carbono, el grupo heteroalquilo tiene 1 a 20 átomos de carbono, y el grupo arilo tiene 6 a 18 átomos de carbono

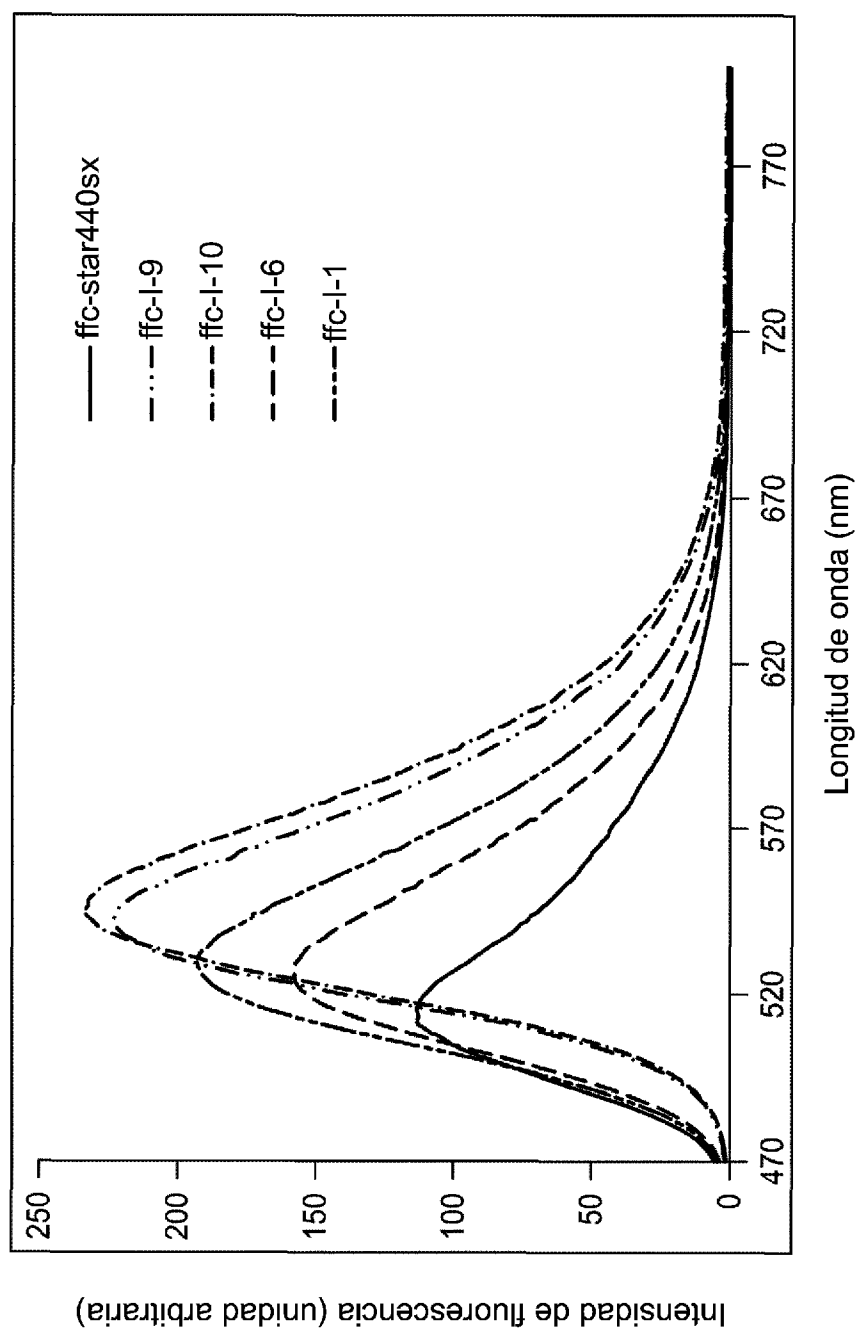
2. El nucleótido u oligonucleótido de la reivindicación 1, en donde R<sup>Het</sup> se selecciona de heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido.
3. El nucleótido u oligonucleótido de la reivindicación 1 o 2, en donde R<sup>Het</sup> se selecciona de heteroarilo de 9 miembros opcionalmente sustituido.
4. El nucleótido u oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R<sup>Het</sup> es 2-benzotiazolilo opcionalmente sustituido con la estructura

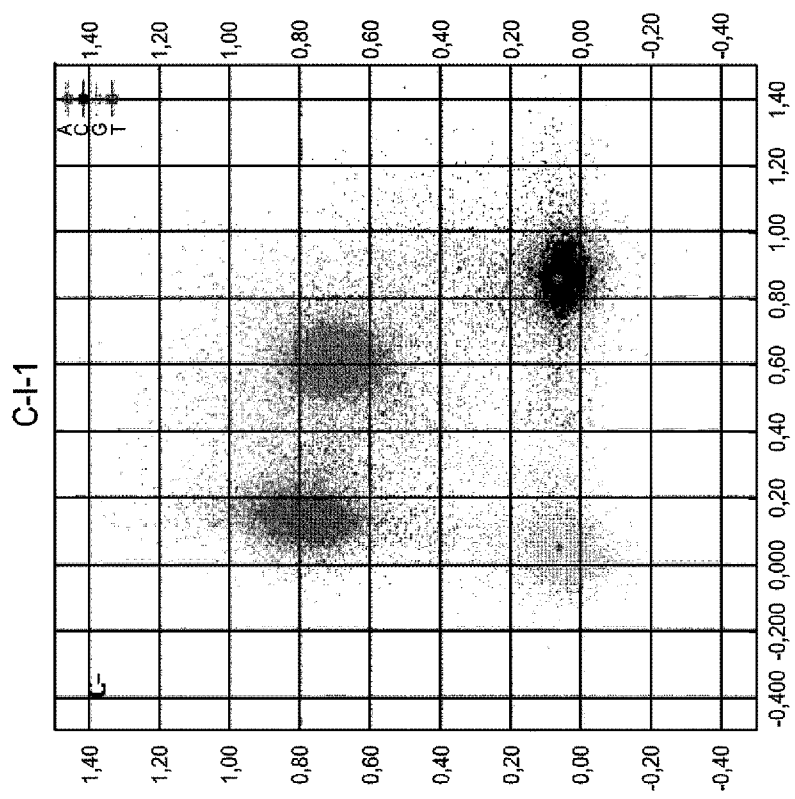


o 2-benzoxazolilo opcionalmente sustituido con la estructura

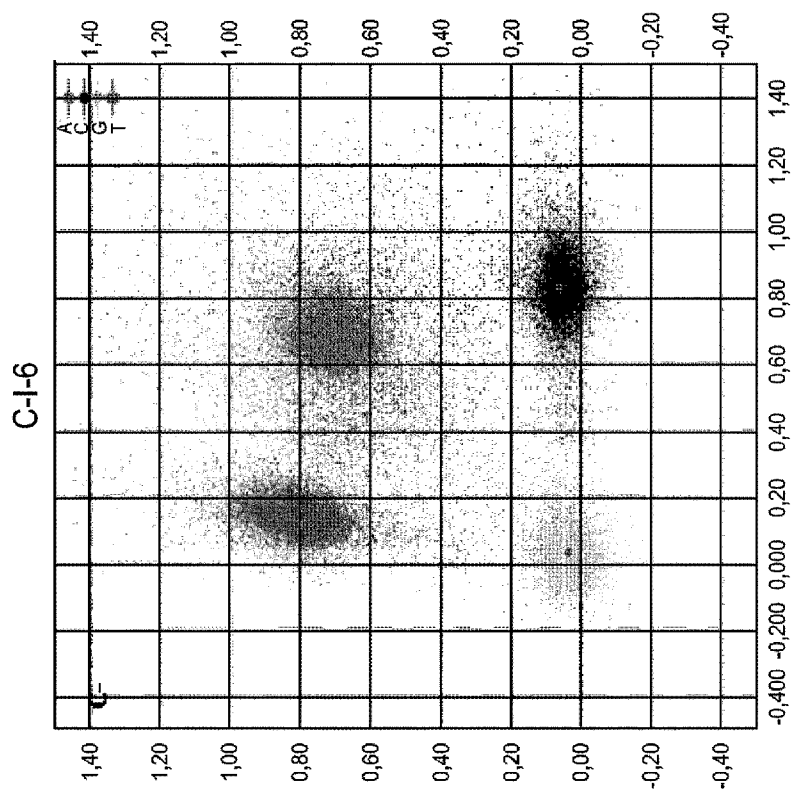


5. El nucleótido u oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde Y es O.
6. El nucleótido u oligonucleótido etiquetado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el compuesto está unido covalentemente al nucleótido u oligonucleótido a través de -C(=O)R, en donde R es -OR<sup>7</sup>, y R<sup>7</sup> es un alquilo sustituido.
7. El nucleótido u oligonucleótido etiquetado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el compuesto está unido covalentemente al nucleótido u oligonucleótido a través de -C(=O)R, en donde R es -NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>, y en donde al menos uno de R<sup>8</sup> o R<sup>9</sup> es un alquilo sustituido.
8. El nucleótido o oligonucleótido etiquetado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto está unido a la posición C5 de una base de pirimidina o la posición C7 de una base de 7-deaza purina del nucleótido u oligonucleótido a través de un resto enlazador.
9. El nucleótido u oligonucleótido etiquetado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un grupo bloqueante 3'-OH unido covalentemente al azúcar ribosa o desoxirribosa del nucleótido u oligonucleótido.
10. Un kit que comprende uno o más nucleótidos, en donde al menos un nucleótido es un nucleótido etiquetado según las reivindicaciones 1 a 9.
11. El kit de la reivindicación 10 que comprende dos o más nucleótidos etiquetados.
12. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, que comprende además un tercer y un cuarto nucleótido, en donde cada uno del segundo, tercer y cuarto nucleótidos está etiquetado con un compuesto diferente, en donde cada compuesto tiene un máximo de absorbancia distinto y cada uno de los compuestos es distinguible de los otros compuestos.
13. Un método de secuenciación que comprende incorporar un nucleótido etiquetado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en un ensayo de secuenciación y detectar el nucleótido.
14. El método de la reivindicación 13, en donde el ensayo de secuenciación se realiza en un instrumento de secuenciación automatizado, y en donde el instrumento de secuenciación automatizado comprende dos fuentes de luz que funcionan en diferentes longitudes de onda.

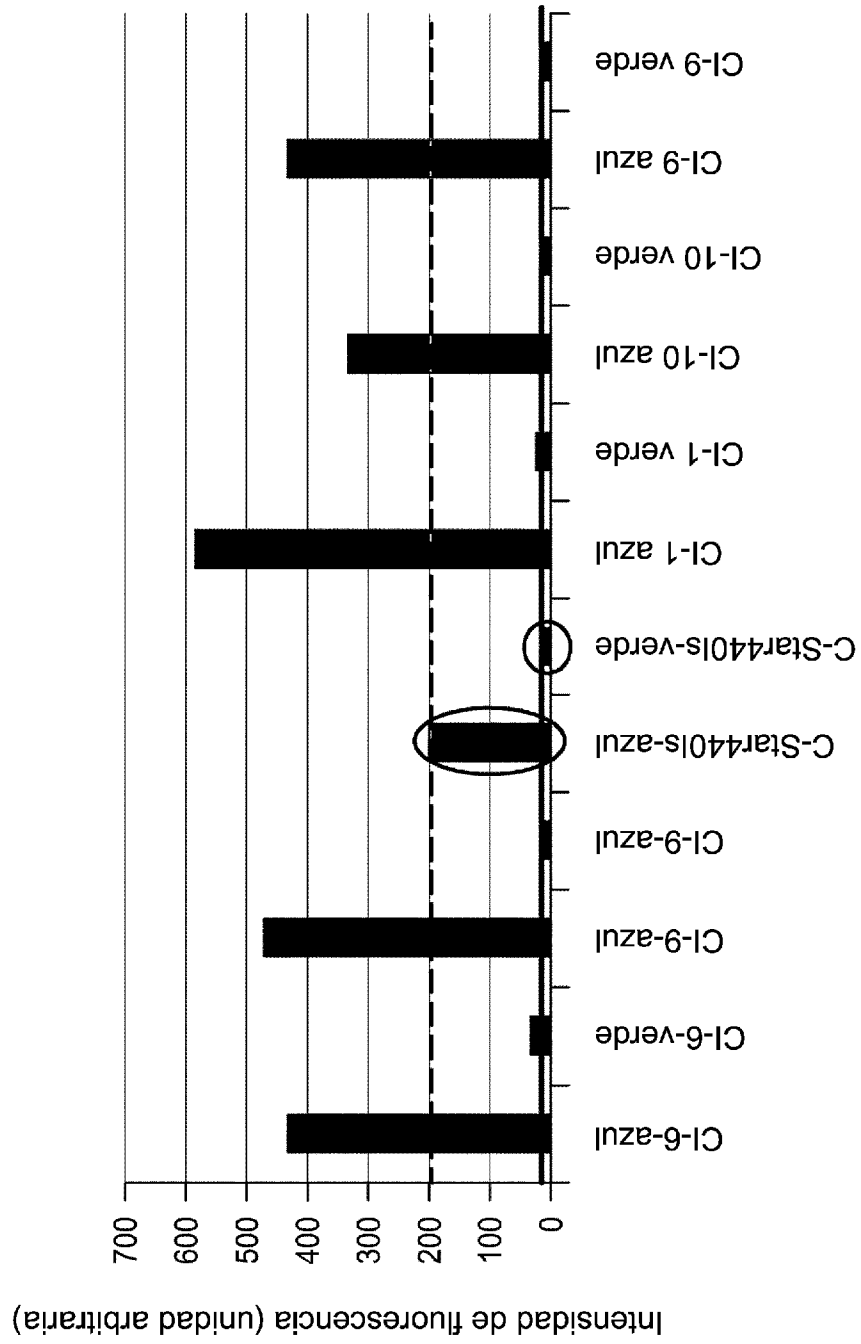
*Figura 1*



*Figura 2B*

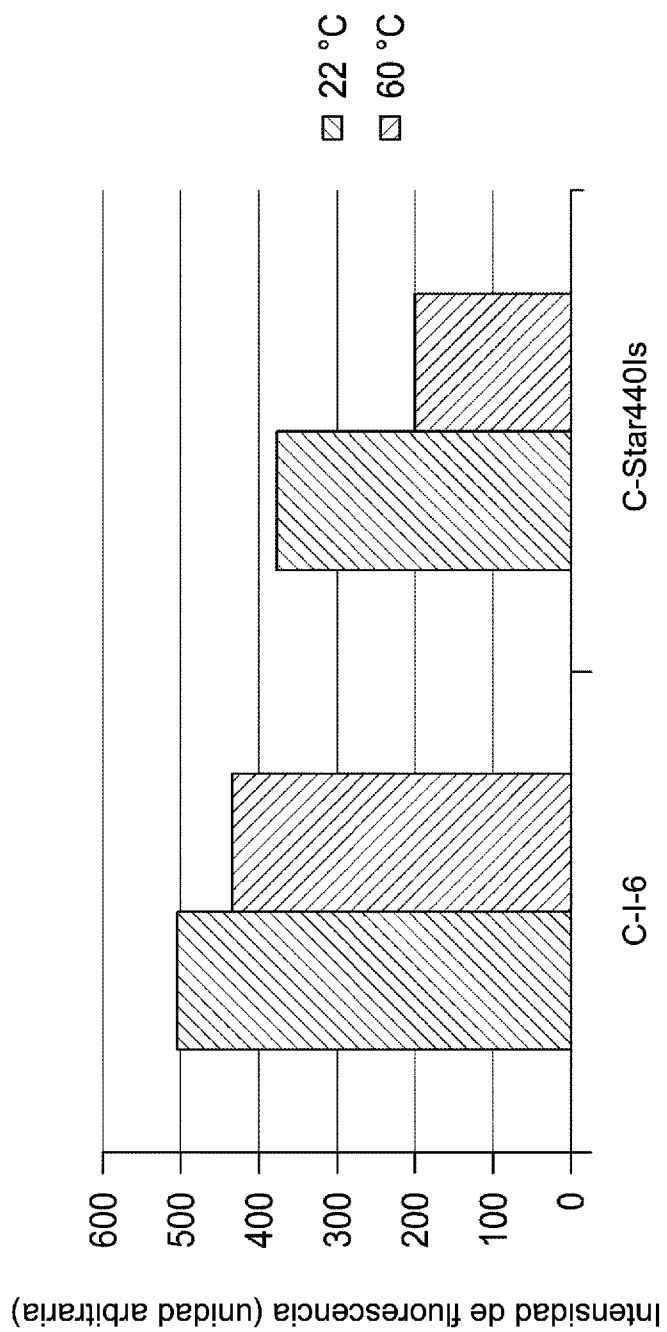


*Figura 2A*



*Figura 3*





*Figura 4*