



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 346**

51 Int. Cl.:
C07H 19/16 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01956576 .1**
86 Fecha de presentación : **31.07.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1307469**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2003**

54 Título: **Compuestos de enlace de ácidos nucleicos que contienen análogos de pirazolo-3,4-d pirimidina de purina 2,6-diamina y sus usos.**

30 Prioridad: **03.08.2000 EP 00116816**
24.04.2001 EP 01109438

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 24
4070 Basle, CH

72 Inventor/es: **Seela, Frank;**
Bergmann, Frank;
Von der Eltz, Herbert;
Heindl, Dieter;
Seidel, Christoph y
Becher, Georg

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 300 346 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

Compuestos de enlace de ácidos nucleicos que contienen análogos de pirazolo-3,4-d pirimidina de purina 2,6-diamina y sus usos.

La presente invención, se refiere al sector de los compuestos de enlace de ácidos nucleicos, que comprenden bases de 7-desaza-3-aza-2,6-diamino-purina 7-sustituidas (sustituidas en la posición 7), a compuestos de utilidad para la preparación de tales tipos de compuestos, a varios usos de éstos, y a procedimientos para la determinación de ácidos nucleicos, utilizando los citados compuestos, en el sector de diagnósticos.

Antecedentes y trasfondo de la invención

Se ha encontrado que, los ácidos nucleicos, son analitos de utilidad, para la determinación de la presencia o de la ausencia de genes o microorganismos, en fluidos del cuerpo humano, alimentos o entorno medioambiental, en el sector del cuidado de la salud. Los análisis del ácido nucleico, han encontrado un uso extendido, después de la introducción de la amplificación del ácido nucleico, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR - [del inglés, Polymerase Chain Reaction] -), solicitud de patente estadounidense US - A - 4.683.202). Así, de este modo, a partir de cada muestra, son obtenibles suficientes cantidades de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos, pueden determinarse a partir de esta muestra pretratada, utilizando una variedad de técnicas diferentes, en dependencia del propósito particular. La mayoría de los ensayos, requieren el uso de una sonda, la cual, o bien se inmoviliza o bien es inmovilizable o bien se marca, mediante la unión de uno o más grupos reportadores.

Un grupo reportador, tiene las características de ser él mismo capaz de ser determinado, o éste puede hacerse reaccionar con reactivos que convierten a la sonda en determinable, vía el citado grupo reportador. Así, de este modo, por ejemplo, pueden determinarse sondas que se han marcado mediante grupos reportadores, así como también pueden determinarse híbridos que contienen la sonda y un ácido nucleico a ser determinados. En caso de sondas inmovilizadas, el híbrido entre la sonda y el ácido nucleico a ser determinado, se determina en la fase sólida a la cual se encuentra enlazada la sonda. En una forma particular de ensayos, no únicamente se determina uno de los ácidos nucleicos que tiene una secuencia específica, sino que se determinan un amplio número de ácidos nucleicos de diferente secuencia. Para este propósito, las sondas, se inmovilizan en puntos o manchas de reducido valor, en una serie de disposición sobre una superficie plana, como la correspondiente a una pastilla de vidrio (EP - A - 0 476 014 y TIBTECH (1997), Vol. 15, 465 - 469, WO 89/10 977, WO 89/11 548, US 5.202.231, US 5 002 867, WO 93/17 126). Un desarrollo adicional, ha proporcionado procedimientos para realizar series de distribución muy grandes de sondas de oligonucleótidos, en áreas muy pequeñas. (US 5.143.854, WO 90/15 070, WO 92/10 092). Series de distribución de microfabricados de amplios números de sondas de oligonucleótidos, denominados cortes de ADN (DNA chips), ofrecen una gran promesa para una amplia variedad de aplicaciones (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses US 6.156.501 y US 6.022.963).

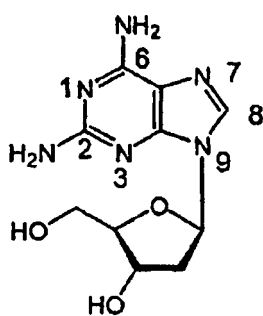
No obstante, las determinaciones de ácido nucleico, sufren a menudo del problema consistente en que, las posibilidades de apareamiento de bases entre las bases naturales A y T y C y G, tienen una estabilidad diferente. Esto puede atribuirse a la diferente capacidad de estas bases, para formar un enlace de hidrógeno. Así, de este modo, el par de bases dA-dT, tiene dos puentes de hidrógeno, mientras que, el par de bases dG-dC, tiene tres puentes de hidrógeno. Esto tiene como resultado diferentes temperaturas de fusión (T_m) de híbridos, en dependencia del contenido de GC [1 - 3]. Cuanto mayor es el contenido de GC, mayor es la T_m . La resistencia de la hibridación o el grado de hibridación, puede investigarse procediendo a medir la T_m del dúplex resultante. Esto puede realizarse mediante la exposición de un dúplex en solución, a una temperatura gradualmente incrementante y controlando la desnaturalización del dúplex, por ejemplo, mediante la absorbancia de luz ultravioleta, la cual se incrementa con el desamontonamiento de los pares de bases que acompaña a la desnaturalización. La T_m , se define, generalmente, como el punto medio de la temperatura, de la transición, desde una estructura dúplex completa, a una desnaturalización completa, es decir, la formación de dos hebras individuales aisladas.

Así, por lo tanto, en análisis rutinarios de ácidos nucleicos, existe a menudo el deseo de cambiar la T_m de una molécula de ácido nucleico. Así, por ejemplo, para ciertos propósitos, puede ser ventajoso el proceder a igualar o a armonizar la T_m de los ácidos nucleicos de la misma longitud, o de convertirla incluso en independiente de la longitud del ácido nucleico de la región de enlace, con objeto de encontrarse en la posición de aplicar unas condiciones similares de hibridación para todos los ensayos. Esto es particularmente necesario, para ensayos en los que se utilizan series de distribución, tales como aquéllos correspondientes a tales tipos de series de distribución en los que, las condiciones de hibridación para casa sonda, deben ser idénticas. Una solución utilizada, era el uso de bajas temperatura de hibridación. Bajo tales condiciones, muchos ácidos nucleicos que tienen un reducido grado de complementariedad de secuencias de bases, se enlazarán a la sonda. Esto se denomina enlace inespecífico, el cual no permite la discriminación entre secuencias similares. Otra propuesta, iba dirigida al uso de reactivos químicos en la mezcla de hibridación, por ejemplo, la adición de cloruro de tetrametilamonio (TMAC). Este reactivo, reduce la diferencia entre la estabilidad de los bases de pares dG-dC y dA-dT pero, el efecto, es insuficiente para oligonucleótidos cortos. Adicionalmente, además, la adición de sales, tales como el TMAC, puede no ser apreciada, debido al hecho de que, ésta, complica la optimización del ensayo. Otra propuesta, iba dirigida al uso de diferentes concentraciones de cada una de las diferentes sondas (inmovilizadas), en un ensayo. Esto se encontró que era técnicamente complejo, si no imposible, en una superficie de corte o rebanada. Como una opción adicional, se aplicó la sustitución de ribonucleótidos en un oligonucleótido compuesto de desoxirribonucleótidos, y vice-versa, para la adaptación de la estabilidad del DNA, Hoheisel (1996), Nucleic Acids Res. 24, 430 - 432.

No obstante, puede también ser ventajoso el proceder a incrementar la T_m de un ácido nucleico dado. Esto es interesante, en el sector de los ácidos nucleicos utilizados para la terapia antisentido, discriminación de apareamientos fallidos, y para ácidos nucleicos utilizados en diagnósticos. Los ácidos nucleicos, pueden utilizarse como cebadores o sondas. El objetivo, es el de permitir un diseño más sencillo de cebadores y sondas, utilizados en reacciones múltiplex y para sintetizar sondas de captura cortas, utilizadas en los cortes, puesto que, la síntesis química de oligonucleótidos en una superficie de un corte, utilizada para la serie de distribución, no es tan efectiva como en la síntesis de oligonucleótidos de rutina. La contribución relativa de cada par de bases, a la temperatura de fusión de un híbrido, es tanto mayor, cuanto más corto es el oligonucleótido. Por consiguiente, la diferencia de estabilidad, entre un apareamiento fallido y un apareamiento perfecto, es mayor, para los oligonucleótidos más cortos. No obstante, los oligonucleótidos cortos, hibridan débilmente y, por lo tanto, la reacción de hibridación, debe realizarse a una reducida rigurosidad. Por consiguiente, la superior capacidad de discriminación entre las diferentes secuencias, mediante oligonucleótidos más cortos, puede únicamente utilizarse bajo unas condiciones de reducida severidad. Sería de una gran ventaja, el proporcionar bases que permitieran lograr un alto nivel de discriminación de apareamientos fallidos, bajo unas condiciones severas, de una forma particular, para oligonucleótidos cortos, a la temperatura utilizada, por ejemplo, en reacciones de amplificación. Adicionalmente, además, existe un deseo, en el estado actual del arte especializado de la técnica, de utilizar oligonucleótidos con un alto poder discriminatorio, en series de distribución, debido al hecho de que, la síntesis química de los oligonucleótidos sobre soportes sólidos, utilizados para series de distribución, no es tan efectiva que en los análisis de rutina. Así, por lo tanto, la capacidad para utilizar oligonucleótidos más cortos, bajo unas severas condiciones, serían de una ventaja considerable. Si se encuentran bases que conducen a un incremento de la T_m de un oligonucleótido hibridado a su hebra complementaria, pueden entonces utilizarse otras bases en el mismo oligonucleótido, con objeto de ajustar adicionalmente la T_m , en concordancia con la preferencias del sistema de test de ensayo a ser utilizado.

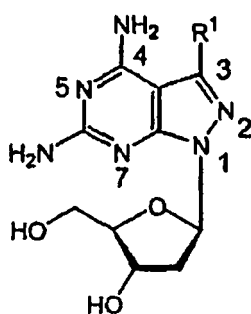
Teóricamente, los dúplex de oligonucleótidos que forman otros pares de bases tridentadas, deberían exhibir una estabilidad similar o superior, por ejemplo, aquéllos con una 2-aminoadenina opuesta a la timina. No obstante, se ha mostrado que, los pares de bases de 2-aminoadenina - timina/uracilo, exhiben únicamente una reducida estabilidad térmica [4 - 10]. A raíz de los datos publicados hasta ahora, puede llegarse a la conclusión en cuanto al hecho de que, el grupo NH_2 adicional de 2'-desoxiadenosina-2-amina (molécula 1 - [véase posteriormente, más abajo]; n^2A_d), contribuye muy poco a la estabilidad de los pares de bases de un dúplex de DNA. El incremento de T_m , se encuentra comprendido dentro de unos márgenes de temperatura situados entre únicamente unos valores de 1 - 2°C . Adicionalmente, además, esta estabilización, no corresponde al número total de residuos de n^2A_d incorporados en el dúplex, en lugar de dA [11]. Una estabilización más fuerte, tal y como se reporta para DNA dúplex, se encuentra para los RNA dúplex o para híbridos de DNA - RNA [9][10][12]. Se observa una estabilidad de pares de bases algo más alta, cuando se introduce 2-aminoadenina en PNA [13] o ácidos nucleicos de hexitol [14]. Estructuras o esqueletos de cadena modificadas, distintas de DNA ó de RNA, parecen mejorar la estabilidad del par de 2-aminoadenina - timina/uracilo.

El comportamiento inusual de los dúplexes de oligonucleótidos que contienen residuos de n^2A_d -dT, es interesante, para el desarrollo de una formación o motivo de reconocimiento de adenina - timina que muestre la misma estabilidad o incluso una mayor estabilidad que un par de bases de guanina-citosina. En los compuestos que siguen a continuación, la porción de purina del compuesto I, se reemplaza por una 8-aza-7-desazapurina (pirazolo[3,4-d]pirimidina ó una 7-desazapurina(pirrolo[2,3-d]pirimidina) que conduce a nucleósidos (2a[15], 2b, 2c ó 3 [16], [17], véase posteriormente, más abajo).



1

numeración
de purina

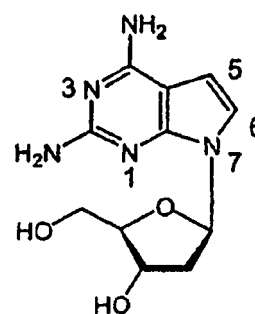


2a: R = H

2b: R = Br

2c: R = I

numeración
sistemática



3

numeración
sistemática

Se procedió a investigar, en el arte anterior de la técnica especializada, compuestos de una arquitectura química similar. La síntesis de los 7-desaza y 8-desaza-7-desazapurina-2'-desoxirribonucleótidos 7-sustituídos (sustituídos en la posición 7, su incorporación en oligonucleótidos, y la estabilidad de los correspondientes dúplexes, ha sido ya investigada (Seela *et al.* (1997) *Nucleosides & Nucleotides* 16, 963 - 966). Este documento, no contiene una revelación
 5 de las 7-desaza-8-aza-diamino-purinas 7-sustituídas. La estabilización de dúplexes mediante análogos de bases de pirazolopirimidina, se ha reportado ya (Seela *et al.* (1998), *Helv. Chim. Acta* 71, 1191 - 1198; Seela *et al.* (1998) *Helv. Chim. Acta* 71, 1813 - 1823; y Seela *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 901 - 910).

Los residuos de pirazolo[3,4-d]pirimidina, en oligonucleótidos, son también de utilidad como sitios de unión de
 10 varios grupos (WO 90/14 353). Los oligonucleótidos que tienen incorporados una o más pirazolo[3,4]-pirimidina, tienen una tendencia intensificada a formar tríplexes (Belousov *et al.* (1998), *Nucleic Acids Res.* 26, 1324 - 1328).

Los compuestos 7-yodo, 7-ciano, y 7-propinil-7-desaza-2-amino-2'-desoxiadenosina, se sintetizaron por parte de
 15 Balow *et al.* (1997, *Nucleosides & Nucleotides* 16, 941, 944) y se incorporaron en secuencias de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos, exhiben unas afinidades de enlace intensificadas a los complementos de RNA, con relación a las secuencias no modificadas. No obstante, no se realizaron ni se investigaron los correspondientes compuestos 8-aza. Seela *et al.* (1999) *Nucleosides & Nucleotides* 18 1399 - 1400), dan a conocer DNA de 8-aza-7-desazapurina disustituída, su síntesis y estabilidad de los dúplex. Los autores, no se refieren a los posibles usos de los compuestos
 20 revelados.

La publicación de patente internacional WO 90/03 370, da a conocer pirazolo-[3,4-d]-pirimidinas 3,4,6-trisustituídas, de una forma más particular, 4,6-diamino-pirazolo[2,4-d]-pirimidinas, con un enlazador en la posición C3, al cual se le une un intercalador, un reticulante electrolítico o un grupo reportador. Estos compuestos, pueden encontrarse
 25 unidos a azúcares o incorporarse a oligonucleótidos y, con ello, utilizarse para la identificación, el aislamiento, la localización y/o la detección de secuencias complementarias de aminoácidos, de interés. La patente estadounidense US 5.594.121, da a conocer oligómeros con capacidades intensificadas para formar dúplexes o tríplexes. Los oligómeros, pueden contener 8-aza-7-desaza-diamino-purinas 7-sustituídas, con propinilo y arilos, como sustituyentes en la posición 7. Las composiciones que contienen estos oligómeros, pueden utilizarse para propósitos de diagnósticos.

Existe todavía una necesidad, en cuanto al hecho de proporcionar sondas con un alto poder discriminatorio, y con una reducida longitud, cuya T_m , sea alta, bajo unas severas condiciones, y las cuales puedan utilizarse en varios procedimientos de utilidad en el sector de diagnósticos como, por ejemplo, en el sistema Lightcycler® (Roche, Mannheim, Alemania), TaqMan® (publicación de patente internacional WO 92/02 638 y las correspondientes patentes estadounidenses US 5.210.015, US 5.804.375, US 5.487.972), u otras aplicaciones que involucren una transferencia de energía
 35 fluorescente.

Términos y definiciones

Las técnicas convencionales de la biología molecular y de la química de los ácidos nucleicos, las cuales forman parte de los conocimientos correspondientes al arte especializado de la técnica, se encuentran plenamente explicadas en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning - A laboratory Manual*, - Clonación molecular; Un manual de Laboratorio -, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization*, - Hibridación de ácidos nucleicos -, (B.D. Hames y S. J. Higgins, Eds. 1984); y una serie *Methods in Enzymology*, - Procedimientos en Enzimología -, (Academia Press, Inc), todas las cuales se incorporadas aquí, a título de referencias. Todas las patentes, solicitudes de patente publicaciones, mencionadas aquí, en este documento, tanto anteriormente, arriba, como posteriormente, abajo, se incorporan aquí, en este documento, a título de referencias.

Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido", se refieren a polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2'-desoxi-D-ribosa), a polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), y cualquier otro tipo de polinucleótido, el cual sea un N-glicósido, de una base de purina o una pirimidina, o una base de purina o pirimidina modificadas. No existe una distinción pretendida en la longitud entre los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" y, estos términos, serán intercambiables. Estos términos, se refieren únicamente a una estructura primaria de la molécula. Así, de este modo, estos términos, incluyen DNA de doble hebra y de hebra individual, así como RNA de doble hebra y de hebra individual. El término "oligonucleótido", se utilizará de una forma intercambiables, para ácido "nucleico".
 55

El término "esqueletos de la cadena" o "esqueleto de la cadena de ácido nucleico", para un compuesto de enlace de ácido nucleico en concordancia con la presente invención, se refiere a la estructura de la porción química que enlaza a nucleasas, en un compuesto de enlace de ácido nucleico. Las bases, se encuentran unidas al esqueleto de la cadena, y forman parte en el apareamiento de bases a un compuesto de enlace de ácido nucleico complementario, vía los enlaces o eslabones de hidrógeno. Esto puede incluir a estructuras formadas a partir de cualquiera de los medios o de la totalidad de los medios de nucleótidos que enlazan químicamente, por ejemplo, esqueletos de cadena de fosforodiestéribosa, de origen natural, o enlaces no naturales, como por ejemplo, fosforotioatos, metilfosfonatos, fosforoaramidatos y fosforotriésteres. Los ácidos nucleicos de péptidos, tiene enlaces no naturales. Así, por lo tanto, un "esqueleto de la cadena modificado", tal y como se utiliza aquí, en este documento, incluye modificaciones en el enlace químico entre nucleótidos, tal y como se ha descrito anteriormente, arriba, así como también otras modificaciones en la estructura del azúcar. Así, por ejemplo, puede utilizarse un α -anómero de desoxirribosa, en donde, la base, se encuentra invertida con respecto al β -anómero natural. En una forma de presentación, el grupo 2'-OH del azúcar, puede modificarse a 2'-
 65

ES 2 300 346 T3

O-alquilo ó 2'-O-alquil-n(O-alquilo), los cuales proporcionan resistencia a la degradación, sin comprender afinidad. Una secuencia nucleótida no modificada que tenga un esqueleto de la cadena de fosfodiéster, es "comparable", a una secuencia que contenga nucleobases que tenga un esqueleto de la cadena modificado, si las dos secuencias, tienen una secuenciación de bases idéntica. Así, de este modo, los esqueletos de la cadena de tales tipos de secuencias, son también comparables.

El término "compuesto de enlace de ácido nucleico", se refiere a sustancias que se asocian con ácidos nucleicos de cualquier secuencia, que son apropiadas para funcionar como compañero de enlace a un ácido nucleico substancialmente complementario. El enlace, de una forma preferible, acontece vía un enlazado de hidrógeno entre pares complementarios, cuando el compuesto de enlace de ácido nucleico, es una forma de hebra complementaria. De una forma preferible, las bases no naturales, el objeto de la invención, unidas a los esqueletos de la cadena del compuesto de enlace de ácido nucleico, pueden también encontrarse involucradas en el enlazado de hidrógeno, aunque, no obstante, éstas pueden también ser capaces de formar enlaces o eslabones de hidrógeno, a únicamente algunas o a la totalidad de bases de origen natural, como por ejemplo, inosina. El experto en el sector, reconoce el hecho de que, los "compuestos de enlace de ácidos nucleicos" mayormente bien conocidos, son ácidos nucleicos tales como el DNA o el RNA.

El término "sonda", se refiere a ácidos nucleicos (DNA o RNA) sintéticamente o biológicamente producidos, los cuales, mediante diseño o selección, contienen secuencias específicas nucleótidas que les permite hibridar bajo unas definidas dificultades predeterminadas, de una forma específica (es decir, de una forma preferente), a ácidos nucleicos diana. Una "sonda", puede identificarse como una "sonda de captura", que significa que "captura" el ácido nucleico diana, de tal forma que, éste, puede separarse de materiales no deseados, que pudieran obscurecer o confundir su detección. Una vez que se ha realizado la separación, puede realizarse la detección del ácido nucleico capturado, utilizando un procedimiento apropiado. Las "sondas de captura", se encuentran a menudo ya unidas a la fase sólida.

El término "hibridación", se refiere a la formación de una estructura dúplex mediante dos ácidos nucleicos de hebra individual, debido al apareamiento de bases complementarias. La hibridación, puede acontecer entre hebras de ácidos nucleicos completamente complementarias, o entre hebras de ácidos nucleicos "substancialmente complementarias" que contienen regiones menores de apareamientos fallidos. A las condiciones bajo las cuales únicamente hibridarán hebras de ácidos nucleicos completamente complementarias, se les hace referencia como "condiciones severas de de hibridación" o "condiciones de hibridación específicas de secuencia". Pueden lograrse dúplex estables de secuencias substancialmente complementarias, bajo unas condiciones menos severas de hibridación; el grado de apareamiento fallido tolerado, puede controlarse mediante un ajuste apropiado de las condiciones de hibridación. Aquéllas personas expertas en el arte especializado de la tecnología de los ácidos nucleicos, pueden determinar la estabilidad de los dúplex, considerando empíricamente un determinado número de variables, incluyendo, por ejemplo, la longitud y la concentración de los pares de bases, siguiendo las guías proporcionadas por la tecnología correspondiente al arte especializado de la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, - Clonación molecular - Un manual de laboratorio -, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. y Wetmur, 1991, Critical Review in Biochem. Y Mol. Biol. 26 (3/4): 227 - 259; ambas incorporados aquí, en este documento, a título de referencia).

El término "cebador", se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como un punto de iniciación de las síntesis del DNA, bajo unas condiciones, en las cuales, se induce la síntesis de un producto de extensión de cebadores, complementario a una hebra de ácido nucleico, es decir, en ambas condiciones, la presencia de cuatro diferentes nucleósido-trifosfatos y un agente para la extensión (por ejemplo, una DNA-polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura apropiada. Tal y como se utiliza aquí, en este documento, se pretende que, el término "cebador", abarque a los oligonucleótidos utilizados en los procedimientos de amplificación mediatizados por ligadura, en los cuales, un oligonucleótido, se "extiende" mediante ligadura a un segundo oligonucleótido, el cual hibrida a una posición adyacente. Así, de este modo, el término "extensión de cebadores", tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a un punto de iniciación de la síntesis de DNA, y a la ligadura de dos cebadores, para formar un producto extendido. Un cebador, de una forma preferible, es un DNA de hebra individual. La apropiada longitud de un cebador, depende del uso pretendido del cebador, pero, de una forma típica, ésta es de un valor comprendida dentro de unos márgenes que van de 6 a 50 nucleótidos. Las moléculas de cebadores cortos, requieren generalmente unas temperaturas más frías, para formar complejos híbridos que sean lo suficientemente estables, con la sonda. Un cebador, no necesita reflejar la secuencia exacta del ácido nucleico del molde, sino que, éste, debe ser lo suficientemente complementario, como para hibridar con el molde. El diseño de cebadores apropiados para la amplificación de una secuencia diana, es bien conocida en el arte especializado de la técnica, y se encuentra descrito en la literatura citada aquí, en este documento. Los cebadores, pueden incorporar características o rasgos adicionales, los cuales permiten la detección la inmovilización del cebador, pero que no modifican las propiedades básicas del cebador, la consistente en actuar como un punto de iniciación de la síntesis de DNA. Así, por ejemplo, los cebadores, pueden contener una secuencia de ácido nucleico adicional, en el extremo 5', la cual no hibrida al ácido nucleico diana, pero que facilita la clonación del producto amplificado. A la región del cebador que es suficientemente complementaria al molde para hibridar, se le hace aquí referencia, como la región de hibridación.

Los términos "diana", "secuencia diana", "segmento diana", "región diana" y "ácido nucleico diana", se refieren a una región o subsecuencia de ácido nucleico que debe amplificarse o investigarse.

ES 2 300 346 T3

Tal y como se utiliza aquí, en este documento, un cebador, es “específico” para una secuencia diana, si el número de apareamientos fallidos presentes entre la secuencia del cebador y la secuencia diana, es inferior al número de apareamientos fallidos presentes entre la secuencia del cebador y secuencias no diana, que puedan encontrarse presentes en la muestra. Pueden elegirse unas condiciones de hibridación, bajo las cuales, se formen dúplex estables, únicamente, si el número de apareamientos fallidos presentes, no es mayor que el número de apareamientos fallidos presentes entre la secuencia del cebador y la secuencia diana. Bajo tales condiciones, el cebador, puede formar un dúplex estable, únicamente con la secuencia diana. Así, de este modo, el uso de cebadores específicos de la diana, bajo unas condiciones severas de amplificación apropiadas, capacita la amplificación específica de tales secuencias diana que contienen los sitios diana de enlace de cebadores. El uso de unas condiciones de amplificación específicas de una secuencia, capacita la amplificación específica de tales tipos de secuencias diana, que contienen los sitios exactos de enlace de cebadores complementarios.

Halógeno, significa un grupo fluoro, cloro, bromo o yodo. Los grupos halógenos mayormente preferidos, son -I y -Br.

Los grupos alquilo, se eligen, de una forma preferible, de entre los grupos alquilo que contienen de 1 a 10 átomos de carbono, bien ya sea distribuidos en forma lineal, en forma ramificada, o en forma cíclica. La longitud efectiva del grupo alquilo, dependerá de la situación estérica de la posición específica, en donde, el grupo alquilo, se encuentra localizado. En el caso en el que existan impedimentos estéricos, el grupo alquilo, será generalmente más pequeño, siendo, el grupo metilo y etilo, el mayormente preferido. Todos los grupos alquilo, alqueno y alquino, pueden encontrarse, o bien ya sea insustituídos, o bien ya sea sustituidos. La sustitución por heteroátomos, tal y como se ha explicado en términos generales, anteriormente, arriba, ayudará a incrementar la solubilidad en soluciones acuosas.

Los grupos alqueno, se seleccionan, de una forma preferible, de entre los grupos alquenos que contienen de 2 a 10 átomos de carbono. Para las selecciones, se aplican unas consideraciones similares a las descritas para los grupos alquilo. Éstos pueden ser, también, lineales, ramificados o cíclicos. El grupo alqueno mayormente preferido, es el grupo etileno.

Los grupos alquino, tienen, de una forma preferible, de 2 a 10 átomos de carbono. También aquí, otra vez, tales átomos de carbono, pueden distribuirse de una forma lineal, de una forma ramificada o de una forma cíclica. Adicionalmente, además, puede haber más de un triple enlace o eslabón en el grupo alquino. El grupo alquino mayormente preferido, es el grupo 3-propargilo.

Los grupos alcoxi, contienen, de una forma preferible, de 1 a 6 átomos de carbono, y se encuentran unidos al resto de la porción, vía el átomo de oxígeno. Para el grupo alquilo contenido en los grupos alquilo, se aplican las mismas consideraciones que las que se han descrito para los grupos alquilo. El grupo alquilo mayormente preferido, es el grupo metoxi.

Mediante “arilo” y “heteroarilo” (o “heteroaromático”), se quiere dar a entender un grupo carbocíclico ó heterocíclico, que comprende por lo menos un anillo que tiene unas propiedades físicas y químicas que se parecen a compuestos tales como un grupo aromático que tiene de 5 a 6 átomos de anillo, y que comprende de 4 a 20 átomos de carbono, usualmente, de 4 a 9 átomos ó de 4 a 12 átomos de carbono, en los cuales, de uno a tres átomos del anillo, es N, S, u O, con la condición de que, los átomos del anillo no adyacentes, sean O--O, S--S, O--S, ó S--O. Los grupos arilo y heteroarilo, incluyen a fenilo, 2-, 4- y 5-pirimidilo, 2-, 4-, y 5-tiazol, 2-s-triazinilo, 2-, 4-imidazolilo, 2-, 4- y 5-oxazolilo, 2-, 3- y 4-piridilo, 2- y 3-tienilo, 2- y 3-furanilo, 2- y 3-pirrolilo, opcionalmente sustituidos, en una anillo C, mediante oxígeno, alquilo de 1 - 4 átomos de carbono ó halógeno. Los grupos heteroarilo, incluyen también las sustitución opcional en un anillo N, mediante alquilo de 1 - 4 átomos de carbono o haloalquilo de 1 - 4 átomos de carbono y 1 - 4 átomos de halógeno. Los sustituyentes ejemplares en el grupo arilo ó heteroarilo, incluyen a metilo, etilo, trifluorometilo y bromo. Tales tipos de grupos arilo y heteroarilo sustituidos, incluyen a bencilo y por el estilo. “Heteroarilo”, significa, también, sistemas que tienen uno o más anillos, incluyendo porciones bicíclicas, tales como bencimidazol, benzotriazol, benzoxazol, e indol. Los grupos arilo, son las porciones fenilo o naftilo, bien ya sea sustituidas, o insustituidas, por uno o más amino, -ciano, -aminometilo, -O-alquilo(C₁-C₁₀), -S-alquilo(C₁-C₁₀), -alquilo(C₁-C₁₀), sulfonilo, sulfenilo, sulfinilo, nitro y nitroso. El grupo arilo mayormente preferido, es el grupo fenilo. El grupo arilalquilo preferido, es el grupo bencilo. El grupo alquilamino preferido, es el grupo etilamino. El grupo -COO-alquilo(C₁-C₁₀) preferido, contiene uno o dos átomos de carbono en la porción alquilo (ésteres de metilo ó de etilo). Otros grupos arilo, son grupos heteroarilo como, por ejemplo, pirimidina, purina, pirrolo, o pirazol. Arilo y heteroarilo. En concordancia con la presente invención, el término arilo, incluirá también a todos los heteroarilos.

Los grupos ariloxi, contienen, de una forma preferible, de 6 a 20 átomos de carbono. Tales tipos de átomos de carbono, pueden encontrarse contenidos en uno o más anillos aromáticos y, adicionalmente, en cadenas laterales (por ejemplo, cadenas e alquilo), unidas a la porción aromática. Los grupos ariloxi preferidos, son el grupo fenoxi y el grupo benzoxi.

Un “grupo protector”, es un grupo químico que se encuentra unido a una porción funcional (por ejemplo, al oxígeno o al nitrógeno, en un grupo amino funcional, reemplazando al hidrógeno), para proteger al grupo funcional, para que éste último, no reaccione de una forma no deseada. Un grupo protector, se define, adicionalmente, por el hecho de que, éste, puede retirarse sin destruir la actividad biológica de la molécula formada, aquí, el enlace de los compuestos de enlace de ácido nucleico a un ácido nucleico. Los grupos protectores especialmente preferidos, por ejemplo,

para grupos hidroxilo en el extremo 5', de un nucleótido u oligonucleótido, se seleccionan de entre los grupos tritilo, por ejemplo, dimetoxitritilo. Los grupos protectores preferidos, en los grupos amino exocíclicos, en la fórmula I, son grupos acilo, de una forma mayormente preferida, el grupo bencilo (Bz), fenoxiacetilo, o acetilo, o formilo, y los grupos protectores de amidina como, por ejemplo, el grupo N,N-dialquilformamidina, de una forma preferible, el grupo dimetil-, diisobutil-, disiobutil- y el di-n-butyl-formamidina. Los grupos O-protectores preferidos, son los grupos trialquilsililo, como el trimetilsililo, trietilsililo, y el tert.-butil-dimetil-sililo. Otro grupo sililo preferido, es el grupo trimetilsilil-oxi-metilo (TOM) (solicitud de patente suiza 01 931/97). Adicionalmente, además, los grupos protectores preferidos, son grupos como los grupos orto-nitrobencilo, como el 2-(4-nitrofenil)-etoxicarbonilo (NPEOC) ó compuestos fotoactivables, tal como 2-nitrofenilpropiloxicarbonilo (NPPOC)(Giegrich *et al.*, Nucleosides & Nucleotides 1998, 17, 1987). En concordancia con la presente invención, como grupo protector, puede también utilizarse el grupo ftaloilo.

Cualquier átomo, en las definiciones que se encuentran dentro de las fórmulas presentadas aquí, en este documento, no se limita a un isótopo específico. Así, de este modo, un átomo de fósforo (P), puede significar tanto el ³¹P regular, como el ³²P radioactivo, como una mezcla de éstos. Lo mismo, se aplica para el hidrógeno (H/D/T), carbono, (C), yodo (Cl, Br, I), y nitrógeno (N).

Durante la síntesis química, cualesquiera grupos reactivos, como por ejemplo, -OH, -SH, -NH₂, -NH-alquilo, -NH-alquenileno, -NH-alquinileno, ó -NH-arilo (incluyendo a aquéllos grupos en los grupos reportadores), deben protegerse mediante grupos protectores apropiados, es decir que, la presente invención, contempla compuestos para la síntesis de oligonucleótidos, en donde, las fórmulas o los sustituyentes, se eligen con la condición de que, uno o dos átomos de hidrógeno de cualquier grupo -OH, -SH, -NH₂, -NH-alquilo, -NH-alquenileno, -NH-alquinileno, ó -NH-arilo, se encuentren sustituidos por un grupo protector. Adicionalmente, además, durante la síntesis química, el compuesto, se unirá, a efectos de conveniencia, a una fase sólida. En estos casos, las definiciones de los sustituyentes facilitadas anteriormente, arriba, se seleccionarán correspondientemente en concordancia.

Los grupos reportadores, son generalmente grupos que convierten al compuesto de enlace de ácido nucleico, así como también cualesquiera ácidos nucleicos unidos a éstos, en distinguibles del resto del líquido, es decir, la muestra (los compuestos de enlace de ácido nucleico que tienen unido un grupo reportador, pueden también denominarse compuestos marcados de enlace de ácido nucleico, sondas marcadas, o solamente, sondas). El término grupo reportador, y las formas específicas de presentación, incluyen, de una forma preferible, un enlazador, el cual se utiliza para conectar la porción que se pretende utilizar (la fase sólida efectiva o real o la porción fluorofórica), a la posición de unión como grupo reportador. El enlazador, proporcionará una flexibilidad de tal forma que, el compuesto de enlace del ácido nucleico, puede enlazar secuencias de ácidos nucleicos a ser determinadas, sin un obstáculo mayor, mediante la fase sólida. Los enlazadores, especialmente, aquéllos que son no hidrofóbicos, por ejemplo, a base de unidades consecutivas de óxido de etileno, por ejemplo, tal y como se dan a conocer en la patente alemana DE 3 943 522, son bien conocidos para una persona experta en el arte especializado de la técnica.

Mediante "serie de distribución", se quiere dar a entender un orden de distribución de localizaciones a las que se puede hacer referencia, en un dispositivo. Las localizaciones, pueden distribuirse en un orden de distribución correspondiente a series de distribución en dos dimensiones, en series de distribución en tres dimensiones, o en otros formatos de matriz. El número de localizaciones, puede ser el correspondiente a unos márgenes comprendidos entre unos valores que van desde algunos a por lo menos cientos de miles. De una forma de la mayor importancia, cada localización, representa un sitio de reacción totalmente independiente. Cada localización, porta un compuesto de enlace de ácido nucleico, el cual puede servir como un compañero de enlace, para un segundo compuesto de enlace de ácido nucleico, un ácido nucleico, de una forma particular, un ácido nucleico diana.

El término "bloque de construcción" o "sub-unidad", se refiere a un compuesto que puede ser utilizado en la síntesis de oligonucleótidos, en donde, subsiguientemente, se enlazan químicamente bloques individuales de construcción, para formar una estructura más compleja, es decir, un precursor oligonucleótido. Los ejemplos para bloques de construcción, son las fosfoamiditas ó fosfonatos.

El término "compuesto sustituido", significará que, un compuestos, porta adicionalmente grupos químicos, porciones químicas o sustituyentes químicos, distintos de los compuestos en sí mismos. Estos sustituyentes, incluirán, en principio, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a halógenos o compuestos alquilo, alquenilo, alquinilo, o arilo, opcionalmente sustituidos con heteroátomos adicionales.

Leyendas de las figuras

Figura 1a

Espectro ultravioleta de desaminación del compuesto 2^a.

Figura 1b

Perfil, según cromatografía líquida a alta presión (HPLC), de los compuestos a, 2a y 2b.

ES 2 300 346 T3

Figura 2a

Perfil, según cromatografía líquida a alta presión (HPLC), de un hidrolizado de diesterasa de veneno de serpiente/fosfatasa alcalina de un oligonucleótido que contiene 2a.

Figura 2b

Perfil, según cromatografía líquida a alta presión (HPLC), de un hidrolizado de diesterasa de veneno de serpiente/fosfatasa alcalina de un oligonucleótido que contiene 2b.

Figura 3

Espectro de dicroísmo circular de dúplex paralelos de DNA/DNA (figura 3a) y dúplex paralelos de DNA/RNA (figura 3b).

Figura 4

Espectro de dicroísmo circular de dúplex paralelos de DNA/DNA (figura 4a) y dúplex paralelos de DNA/RNA (figura 4b).

Figura 5

Perfiles de HPLC de los nucleósidos 1,2a-c (a) y 3a-c y dT (b). Las mezclas, de los nucleósidos, se analizaron en HPLC de fase inversa a 260 nm (RP-18, gradiente: 0-30, mínimo en 0,1M (Et₃NH)OAc (pH 7,0)/MeCN(95:5), 0,7 ml/minuto). Perfil de HPLC de los oligonucleótidos 100 (c) y 304 (d), después de la hidrólisis enzimática con poliesterasa de veneno de serpiente, mediante fosfatasa alcalina en tampón 0,1 M Tris-HCl (pH 8,3) a 37°. La HPLC, se realizó en una columna RP-19 (200 x 10 mm), 0-30 minutos en 0,1 M (Et₃ NH)OAc (pH 7,0)/MeCN (95:5), 0,7 ml/minuto. Detección del pico: 260 nm.

Figura 6

La tendencia del incremento de la T_m, *versus* número de residuos 2b.

Figura 7

(a) dúplex de espectros de CD, 102 · 103, 108 · 109, 110 · 111, 104 · 105 (en 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂ y 60 mM Na-cacodilato (pH 7,0)).(b) Espectros de dúplex de CD, 102 · 403, 108 · 403, 110 · 403, 104 · 403, en 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, y 60 mM Na-cacodilato (pH 7), la concentración de los oligonucleótidos, es 5 μM + 5 μM (concentración de hebra individual).

Descripción de la invención

El problema anteriormente planteado, arriba, pudo resolverse mediante los descubrimientos de la presente invención, la cual da a conocer composiciones que comprenden una serie de disposición de una pluralidad de compuestos de enlace de ácido nucleico, en donde se incorporan 8-aza-7-desaza-2,6-diamino-purinas, 7-halógeno-sustituidas ó 7-ciano-sustituidas (sustituidas en la posición 7, con halógeno o con ciano). Adicionalmente, además, la presente invención, da a conocer procedimientos, en donde pueden utilizarse los compuestos de enlace de ácido nucleico.

De una forma sorprendente, un oligonucleótido que tiene incorporada una 7-yodo ó 7-bromo-8-aza-7-desaza-2,6-diamino-purina, en lugar de un residuo de adenina, muestra un inesperado incremento en la temperatura de fusión. El descubrimiento, contrasta con el comportamiento de las pirimidinas 5-halógeno-sustituidas. Este efecto, puede observarse para dúplex paralelos, así como también para dúplex antiparalelos. Estos descubrimientos, no pudieron preverse en base al estado actual del arte especializado de la técnica. La posición 7, permite el que los sustituyentes se extiendan al interior de la ranura mayor del DNA, en donde, éstos encuentran un espacio suficiente y no perturban a la doble hélice del DNA. Una posible explicación para este efecto, podría ser la retirada del agua de la ranura de mayor y la hidrofobización concomitante de la ranura mayor, incrementando con ello el amontonamiento de las bases de DNA. Los sustituyentes que cumplen con estos requerimientos, pueden también portar otros grupos funcionales, como, por ejemplo, grupos reportadores.

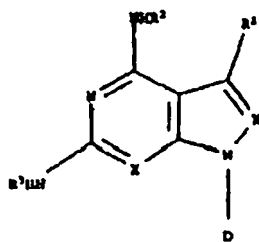
Como resumen, la presente invención, da a conocer composiciones que comprenden una serie de disposición de una pluralidad de compuestos de enlace de ácido nucleico, que comprenden 8-aza-7-desaza-2,6-diamino-purinas, 7-halógeno-sustituidas ó 7-ciano-sustituidas (sustituidas en la posición 7, con halógeno o con ciano), varios usos de éstas, y procedimientos para la determinación de ácidos nucleicos, utilizando los citados compuestos, en el sector de diagnósticos.

La finalidad de la presente invención, es uso de compuestos de enlace de ácido nucleico, en el sector de series de distribución de compuestos de enlace de ácido nucleico, unidos a una superficie sólida (véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente estadounidenses US 5.143.854, US 6.022.963, US 6.156.501, y las publicaciones de patente

ES 2 300 346 T3

internacionales WO 90/15 070, WO 92/10 092), que tiene las propiedades tales como las que se han descrito en estas referencias, y que puede fabricarse tal y como se describe aquí, en este documento, o tal y como se describe por parte de Niemeyer y Blohm (Agew. Chem. Int. Ed. 1999, 38, 2865 - 2869). Así, por lo tanto, en una forma de presentación, la invención, se refiere a una composición para analizar interacciones entre los compuestos de enlace de ácido nucleico, que comprende una serie de distribución de una pluralidad de compuestos de enlace de ácido nucleico, que tienen diferentes secuencias, en donde la citada pluralidad de compuestos de enlace de ácido nucleico, se acoplan a un sustrato sólido, en localizaciones conocidas, y se seleccionan para enlazar los compuestos de enlace de ácido nucleicos complementarios, a cuyo efecto, solamente los compuestos de enlace de ácidos nucleicos, o los compuestos de enlace de ácidos nucleicos y los compuestos de enlace de ácidos nucleicos complementarios (o ácidos nucleicos diana), son compuestos de enlace de ácido nucleico, que comprenden un esqueleto de la cadena, teniendo unidos, el citado esqueleto de la cadena, grupos heterocíclicos capaces de aparear bases a nucleobases, caracterizada por el hecho de que, el grupo heterociclo, es un grupo de la fórmula general I

Fórmula I



en donde,

R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

- (1) -H
- (2) alquilo(C_1-C_{10})
- (3) alquenido(C_2-C_{10})
- (4) alquinilo(C_2-C_{10})
- (5) arilo(C_6-C_{22})
- (6) -Z-alquilo(C_1-C_{10}), -Z-alquenido(C_2-C_{10}), -Z-alquinilo(C_2-C_{10}), -Z-arilo(C_6-C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,
- (7) sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, $-NO_2$, OR^{12} , -CN, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R^{11} , se selecciona de entre el grupo consistente en $-NHR^{12}$ y OR^{12} ,

en donde, R^5 , R^6 y R^{12} , se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C_1-C_{10}), -alquenido(C_2-C_{10}), -alquinilo(C_2-C_{10}), -arilo(C_6-C_{22}), y un grupo reportador,

encontrándose insustituido, el citado alquilo, alquenido, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), -alcoxi(C_1-C_6), -OH, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

ES 2 300 346 T3

X, es independiente de R^1 , R^2 ó R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico;

5 y cualesquiera sales de éstos.

10 Las nucleobases, a la cuales pueden enlazarse los compuestos de enlace de ácido nucleico utilizados en la presente invención, pueden ser nucleobases de origen natural, como, por ejemplo, adenosina, guanosina, uridina, ó citidina, ó los 2'-desoxiderivados de éstas, o pueden ser nucleobases de origen no natural, como, por ejemplo, nucleobases con grupos heterocíclicos de los compuestos de enlace de ácidos nucleicos utilizados en la presente invención, grupos heterocíclicos como la pirrolo-[2,3-d]-pirimidina o la pirazolo[3,4d]-pirimidina, o análogos de éstas, de una forma preferible, los citados análogos de guanina o adenina ó 7-desaza-guanina. Otros grupos heterocíclicos que no sean de origen natural, son conocidos, por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica, y no necesitan ser mencionados de una forma explícita, aquí, en este documento.

15 Los compuestos de enlace de ácido nucleico complementario (ó ácido nucleico diana), pueden contener un grupo heterocíclico en concordancia con la fórmula I, tal y como se describe anteriormente, arriba, cuando estos se amplifican con, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa, en presencia de una trifosfato que contenga un grupo heterocíclico de la fórmula I, tal y como se describe anteriormente, arriba.

20 Son posibles diferentes clases de soportes como, por ejemplo, soportes no porosos u otros soportes sólidos menos porosos que los soportes típicos de la síntesis de péptidos; no obstante, para ciertas aplicaciones de la presente invención, funcionan bien, y son preferibles, a menudo, las perlas bastante porosas, resinas u otros soportes. Un soporte de esta clase, es una resina en forma de perlas. De una forma general, el tamaño de la perla, es el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 1 nm hasta 100 μm , pero, a veces, puede utilizarse un soporte más masivo, de un tamaño de hasta 1 mm. Las resinas particularmente preferidas, incluyen a las resinas de Sasrin (una resina de poliestireno comercialmente obtenible en el mercado, de procedencia de la firma Bachem Bioscience, Suiza); y resina TentaGel S AC, TentaGel PHB ó TentaGel S NH_2 , (resinas de copolímeros de poliestireno - polietileno, comercialmente obtenibles en el mercado, de procedencia de la firma Rappe Polymere, Tubingen, Alemania).
25 Otros soportes preferidos, son comercialmente obtenibles en el mercado, y se describen por parte de Novabiochem, La Jolla, Calif. En otras formas de presentación. El sustrato sólido, es plano o, de una forma alternativa, éste puede tomar unas configuraciones de la superficie alternativas. Así, por ejemplo, el sustrato sólido, puede contener regiones que sobresalen, o regiones hundidas, sobre las cuales, tiene lugar las síntesis, o se encuentra recubierto con SiO_2 poroso/vidrio. En algunas forma de presentación, el sustrato sólido, se elegirá de tal forma que, éste, proporcione unas características apropiadas de absorción de la luz. Así, por ejemplo, el sustrato, puede ser una película polimerizada de Langmuir Blodgett, vidrio funcionarizado, Si, Ge, GeAs, GaP, SiO_2 , SiN_4 , silicio modificado, o cualesquiera de
30 entre una variedad de geles o polímeros, tales como el (poli)tetrafluoroetileno, (poli)vinilidendifluoruro, poliestireno, policarbonato, ó combinaciones de éstos. Otros materiales apropiado para el sustrato sólido, serán fácilmente evidentes, para aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. De una forma preferible, la superficie de los sustratos sólidos, contendrá grupos reactivos, los cuales podrían ser carbonilo, amino, hidroxilo, tiol, o por el estilo. De una forma más preferible, las superficie, será ópticamente transparente, y tendrá funcionalidades Si-OH en la superficie, tal y como se encuentran en las superficies de la sílice. Así, por lo tanto, es particularmente preferida, una composición, en donde, el sustrato sólido, se selecciona de entre el grupo consistente en sílice, materiales poliméricos, vidrio, vidrio poroso, perlas, cortes o astillas, y platinas.

35 En una forma de presentación particularmente preferida, la composición en concordancia con la presente invención, comprende un compuesto de enlace de ácido nucleico, usado en la presente invención, de una forma preferible, $R^1=\text{Br}$, ó $R^1=\text{I}$. Adicionalmente, además, se prefiere una composición la cual comprenda cualquier serie de distribución de compuestos de enlace de ácido nucleico, de 5 a 20 nucleótidos de longitud.

40 En el producto de enlace de una composición en concordancia con la presente invención, con un segundo compuesto de enlace de ácido nucleico, la composición y el segundo compuesto de enlace de ácido nucleico, pueden enlazarse, el uno con el otro, mediante apareamiento de bases, en orientación paralela o en orientación antiparalela.

45 En la forma de presentación mayormente preferida, el grupo heterocíclico, es 7-bromo-7-desaza-8-aza-2,6-diamino-purina ó 7-yodo-7-desaza-8-aza-2,6-diamino-purina. Los compuestos de enlace de ácido nucleico utilizados en la presente invención, presentan adicionalmente la ventaja de tener un enlace o eslabón glicosídico muy estable, como contraste a la 2-amino-adenosina, la cual tiene un enlace o eslabón glicosídico lábil, extremadamente ácido, y podría únicamente utilizarse en la síntesis de oligonucleótidos, si se utilizaran unas condiciones específicas. En una forma adicional de presentación de la presente invención, los halogenuros, en las posición 7 de la 7-desaza-8-aza-2,6-diamino-purina utilizada en la presente invención, pueden encontrarse sustituidos por pseudohalogenuros como, por ejemplo, -SCN ó -CN.

50 Los sustituyentes preferidos mencionados anteriormente, arriba, se prefieren, también, en los procedimientos y usos en concordancia con la presente invención.

ES 2 300 346 T3

Los grupos heterocíclicos de la fórmula I, se caracterizan, principalmente, por las siguientes propiedades:

- La base, se encuentra enlazada al esqueleto de la cadena, de una forma preferida, a una porción de azúcar, vía la posición 9 (numeración de purina).

- La base, contiene un sistema de electrón π , el cual es capaz de formar interacciones de amontonamiento, con otros constituyentes del ácido nucleico.

- La base, contiene (un) sitio(s) donante(s) y/o (un) sitio(s) aceptor(es), para el enlace del hidrógeno al nucleósido natural T.

Con objeto de incrementar la T_m , en un compuesto de enlace de ácido nucleico, una o más A, en una hebra complementaria a un T, en el ácido nucleico a ser determinado, podría reemplazarse por los grupos heterocíclicos en concordancia con la presente invención. El oligonucleótido, se enlazaría específicamente a la secuencia diana, que contiene el T opuesto a las bases en concordancia con la presente invención, con una energía de enlace en el orden de un par de bases G-C, pero con una mayor estabilidad que un par de bases A-T. Esto funciona igual de bien, tanto para dúplex paralelos como para dúplex antiparalelos, con lo cual, los pares de bases naturales A-T, tienen iguales capacidades para enlazar en dúplex paralelos, o en dúplex antiparalelos, pero con una menor energía de enlace, en el dúplex paralelo. No obstante, el grupo heterocíclico del compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, cuando se incorpora en un compuesto de enlace de ácido nucleico, se enlazará a T, en la hebra opuesta, igualmente bien, en un dúplex paralelo, o en un dúplex antiparalelo. Con objeto de efectuar un enlace antiparalelo en un dúplex, las bases naturales G ó C que forman normalmente un par de bases G-C en dúplex antiparalelos, deben sustituirse por pares de bases no naturales, como, por ejemplo, G-iC (isocitosina) ó mejor, G-^{me}iC (isoguanosina), tal y como se ha dado a conocer, anteriormente, arriba. Un resumen de dúplex paralelos y antiparalelos, puede encontrarse en la patente europea EP 0 624 161, ó en Seela *et al.* (Tetrahedron 55 (1999), 9481 - 9500), y se muestra, de una forma esquemática, en el esquema 11 y 12, en el ejemplo 4.

El principio general, por supuesto, no se encuentra limitado, dado que se esperará el hecho de que, las bases que muestren la mismas características en el anillo de 6 miembros, tengan las mismas propiedades, basadas en la explicación facilitada anteriormente, arriba, debido a que contienen la estructura en concordancia con la presente invención. De una forma particular, cuanto más alejada se encuentre la parte del grupo heterocíclico, con respecto a la parte que participa en el apareamiento de bases, más tolerante será el oligómero, con respecto a las modificaciones en la estructura química, por ejemplo, la unión de los grupos a esta parte de los anillos heterocíclicos. En la parte que sigue de este documento, cuando se hace referencia al grupo heterocíclico de un compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, se hace referencia a un grupo heterocíclico en concordancia con la fórmula I.

La presente invención, contempla, también, formas tautoméricas y sales de grupos heterocíclicos de la fórmula I.

El compuesto de enlace de ácido nucleico usado en la presente invención, tiene preferentemente una longitud de menos de 100 subunidades, teniendo, de una forma más preferible, una longitud comprendida dentro de unos márgenes que van de 10 a 30 unidades. Con objeto de ser activo, como compuesto de enlace de ácido nucleico, los sustituyentes, deben elegirse de tal forma que, los enlaces o eslabones de hidrógeno a grupos heterocíclicos, en el ácido nucleico a ser enlazado, se encuentren habilitados con dicha función, de una forma preferible, mediante apareamiento de bases, por ejemplo, mediante apareamiento de bases de Watson-Crick ó Hoogsteen. Los compuestos en los cuales los sustituyentes no se encuentren habilitados para la realización de tal tipo de enlace preferido de hidrógeno, pueden ser de utilidad como intermediarios para la preparación de compuestos de enlace de ácido nucleico. Los compuestos de enlace de ácido nucleico utilizados en la presente invención, que se prefieren, son aquéllos que se sintetizan químicamente.

El compuesto de enlace ácido nucleico, se construirá de tal forma que, éste, contenga una secuencia de nucleasa, la cual sea sustancialmente complementaria al ácido nucleico a ser determinado o al ácido nucleico al cual se pretende que se enlace, mediante apareamiento de bases, dependiente de la formación de un dúplex paralelo o antiparalelo. Puesto que, tales tipos de ácidos nucleicos contienen usualmente por lo menos una de las nucleobases de origen natural Ade, Cyt, Gua y Thy ó Ura, el compuesto de enlace de ácido nucleico en concordancia con la presente invención, contendrá también cualquiera de estas cuatro bases. No obstante, por lo menos uno de los grupos heterocíclicos, se reemplaza por la base heterocíclica de la fórmula I.

Si el compuesto de enlace del ácido nucleico debe utilizarse como una sonda, para la determinación de un ácido nucleico, o si se pretende cualquier otra identificación del compuesto o del ácido nucleico, cualesquiera de los sustituyentes, se selecciona de una forma tal como para que contenga el grupo reportador. Mientras que, muchos grupos reportadores pueden unirse, de una forma útil, para marcar el compuesto de enlace de ácido nucleico, de una forma suficiente, se prefiere unir únicamente un limitado número de grupos reportadores a una subunidad individual, de tal forma que no se afecte el reconocimiento de ácidos nucleicos, las afinidades a ácidos nucleicos y la solubilidad, ya que, en tal caso, la sonda, no sería de utilidad en los ensayos de hibridación. En un caso muy preferido, habrá únicamente de 1 a 4 grupos reportadores, de una forma preferible, 1 ó 2 grupos reportadores ó, de una forma mayormente preferida, únicamente un grupo reportador, en cada compuesto de enlace de ácido nucleico. Existen formatos para la determinación del ácido nucleico, los cuales requieren más de un grupo reportador unido a la sonda. Un ejemplo para

tales tipos de formatos, es el que se da a conocer en la publicación de patente internacional WO 92/02 638. En este caso, uno de los grupos reportadores, será un emisor de fluorescencia, mientras que, el otro, es un extintor de fluorescencia. El grupo reportador, puede también encontrarse unido a una base heterocíclica, la cual no sea en concordancia con la presente invención.

5 Los grupos reportadores, son generalmente grupos que convierten al compuesto de enlace de ácido nucleico, así como a cualesquiera ácidos nucleicos enlazados a éste, en distinguibles con respecto al resto del líquido, es decir, de la muestra (los compuestos de enlace de ácidos nucleicos que tienen unido un grupo reportador, pueden también denominarse compuestos de enlace de ácidos nucleicos, marcados, sondas marcadas o meramente sondas). Esta distinción, puede efectuarse tanto mediante la selección del grupo reportador de entre el grupo consistente en grupos directamente o indirectamente detectables, como de entre los grupos consistentes en grupos inmovilizados o inmovilizables. Los grupos directamente detectables son, por ejemplo, compuestos fluorescentes, como la fluoresceína y sus derivados, como la hexaclorofluoresceína y la hexafluorofluoresceína, rodamidadas, psoralenos esquiranos, porfirinas, partículas fluorescentes, compuestos biofluorescentes, como los ésteres de acridinio, y luminol, o los colorantes de cianina, como el Cy-5. Los ejemplos de tales tipos de compuestos, se dan a conocer en la patente estadounidense EP 0 680 969. Adicionalmente, además, los marcadores de espín, como TEMPO, los grupos electroquímicamente detectables, el ferroceno, el viologeno, los quelatos de metales pesados y los grupos electroquímicamente detectables, como los complejos de rutenio-bisperidilo, y las naftaquinonas, los colorantes de extinción, como el dabculo, y los complejos activos de nucleasa, como por ejemplo, Fe y Cu, son de utilidad como grupos detectables. Otros ejemplos de tales tipos de compuestos, son los complejos de europio. Los grupos indirectamente detectables, son grupos que pueden reconocerse mediante anticuerpos contra la digoxigenina. Tales tipos de anticuerpos, o bien puede marcarse directamente, o bien pueden reconocerse mediante anticuerpos marcados, dirigidos contra los anticuerpos (antidigoxigenina).

25 Los formatos basados en el reconocimiento de digoxigenina, se dan a conocer en el documento de patente europea EP - B - 0 324 474. La biotina, puede reconocerse mediante la avidina y compuestos similares, como la estreptavidina y otros compuestos de enlace de biotina. De nuevo, otra vez, tales tipos de compuestos, pueden marcarse directamente o indirectamente. Otros marcadores interesantes, son aquéllos que son directamente detectables mediante microscopia de fuerza atómica (AFM - [del inglés, atomic force microscopy] -), o microscopia de exploración por túnel (STM - [del inglés, scanning tunneling microscopy] -). El grupo reportador, puede ser adicionalmente una secuencia nucleotídica, la cual no interfiera con otras secuencias nucleotídicas en la muestra. La secuencia, puede a dicho efecto reconocerse de una forma específica mediante nucleótidos que contengan una secuencia complementaria. Esta secuencia nucleotídica, puede marcarse directamente o indirectamente, o puede ser inmovilizable o inmovilizada. Un grupo reportador, puede ser, adicionalmente, una fase sólida. La unión al compuesto de enlace de ácido nucleico, con fase sólida, puede ser de forma directa o de forma indirecta, tal y como se ha indicado anteriormente, arriba, para el grupo detectable. Son ejemplos de tales tipos de fases sólidas, las perlas de látex y las partículas de oro. En otra forma de presentación de la presente invención, un grupo reportador adicional unido al compuesto de enlace de ácido nucleico, puede ser cualquier grupo cargado positivamente o negativamente, de una forma preferible, un grupo carboxilato o un amonio $N^+R^5R^6R^{12}$ con sustituyentes tal y como se especifica en la fórmula I descrita anteriormente, arriba. Éstos, pueden unirse vía un enlazador de propargileno, a la base, e intensificar la sensibilidad de espectrografía de masa MALDI-TOF (MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight - [desorción por láser, asistida mediante matriz/tiempo de vuelo) en el modo positivo o negativo. Los sustituyentes del grupo amonio, se introducen, de una forma preferible, en el oligonucleótido, vía post-marcaje, es decir, pueden post-marcarse compuestos de enlace, con grupos reportadores, cuando un grupo reactivo apropiado, se introduce durante la síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, un grupo amino protegido en el precursor de síntesis de oligonucleótidos, vía un grupo pftalolilo.

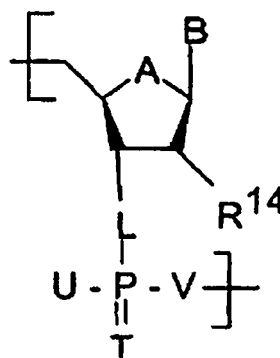
El marcaje directo, puede efectuarse mediante acoplamiento covalente de un compuesto de enlace de ácido nucleico, a un grupo reactivo, sobre la fase sólida, es decir, de una forma preferible, vía un enlazador. El marcaje indirecto, puede ser similar a la revelación efectuada anteriormente, arriba, para los grupos detectables. De una forma preferible, la unión indirecta, es no covalente, mediante interacciones bioespecíficas, por ejemplo, aquéllas seleccionadas de entre el grupo de hapteno - anticuerpo, vitamina - receptor, y ácido nucleico - ácido nucleico complementario. También, otra vez, estas interacciones y su uso en ensayos de ácidos nucleicos, son conocidas por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica.

55 Las fases sólidas que son de utilidad para la inmovilización de la sonda en concordancia con la presente invención, se selecciona, de una forma preferible, de entre el grupo consistente en poliestireno, polietileno, polipropileno, vidrio, SiO_2 y TiO_2 . Los de tales tipos de fases sólidas, pueden seleccionarse en concordancia con las necesidades de la instrumentación y formato del ensayo. Así, por ejemplo, una fase sólida, puede asumir la forma de una perla o de un vaso.

65 El esqueleto de cadena más popular, es el esqueleto de la cadena de fosfato de azúcar de origen natural, de ácidos nucleicos que contienen o bien ya sea subunidades de ribonucleótidos (RNA) o subunidades de desoxirribonucleósidos (DNA). Así, por lo tanto, en una forma preferida de presentación, el esqueleto de la cadena del compuesto de enlace de ácido nucleico, comprende enlaces de fosfodiéster, y ribosa. En los últimos años, habían descripciones de compuestos de enlace de ácido nucleico, que tenían unas propiedades similares a las de los oligonucleótidos, pero que diferían en su esqueleto de cadena, las cuales tienen estructuras formadas a partir de cualesquiera medios y la totalidad de los medios de nucleótidos que enlazan químicamente, como contraste a los esqueletos de cadena de fosfodiéster-

ribosa. Así, por lo tanto, es evidente el hecho de que, la presente invención, todavía funcionaría, incluso si el esqueleto de la cadena del compuesto de enlace de ácido nucleico, no fuera un oligonucleótido en sentido estricto, es decir, que éste tuviera un esqueleto de cadena modificado. El esqueleto de cadena, puede incluir, por ejemplo, enlaces fosforotioatos, metilfosfonatos, fosforamidatos y fosforotriésteres. Los ácidos nucleicos de péptidos, tienen también enlaces no naturales. Las modificaciones, en el esqueleto de la cadena, pueden variar las propiedades del compuesto de enlace de ácido nucleico, es decir, éstas pueden intensificar la estabilidad y la afinidad. Así, por lo tanto, los compuestos de enlace de ácido nucleico usados en la presente invención, pueden ser aquéllos, en donde, el esqueleto de la cadena, comprenda una o más porciones de la fórmula general II

Fórmula II



en donde,

A, se selecciona de entre el grupo consistente en O, S, CH₂, N-CO-alquilo-(C₁-C₁₀),

L, se selecciona de entre el grupo consistente en oxi, sulfanodilo, -CH₂-, y -NR²²,

T, se selecciona de entre el grupo consistente en oxo, tioxo y selenoxo,

U, se selecciona de entre el grupo consistente en -OH, -O⁻, grupo reportador -O-, -SH, grupo reportador -S-, -SeH, -alcoxi(C₁-C₁₀), -alquilo(C₁-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), -aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₁₀), -NR²³R²⁴, y -(O-alquilo(C₁-C₁₀))_nR²⁵, en donde, n, puede ser un número entero entre 1 y 6, ó en donde, -NR²³R²⁴, puede ser, conjuntamente con N, un anillo heterocíclico de 5 a 6 miembros,

V, se selecciona de entre el grupo consistente en -CH₂-, ó -NR²²-,

R¹⁴, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OH, -alquilo(C₁-C₁₀), -alcoxi(C₁-C₁₀), -alquinoxilo(C₂-C₁₀), -halógeno, -azido, -O-alilo, -O-alquilo, y -NH₂,

R²², se selecciona, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, y -alquilo(C₁-C₁₀),

R²³ y R²⁴, se seleccionan, de una forma independiente, de entre grupo consistente en -alquilo(C₁-C₁₀), -arilo(C₁-C₂₀), -aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₁₀), -alquilo(C₁-C₆)-[NH(CH₂)_c]_d-NR²⁶R²⁷, y un grupo reportador,

R²⁵, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OH, -halógeno, -amino, alquilamino(C₁-C₁₈), -COOH, -CONH₂, y -COO-alquilo(C₁-C₄), y un grupo reportador,

R²⁶ y R²⁷, se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, alquilo(C₁-C₆), y -alcoxi(C₁-C₄)-alquilo(C₁-C₆), y un grupo reportador,

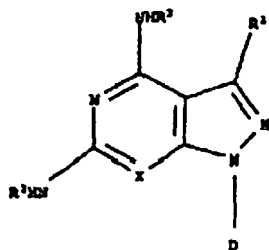
c, es un número entero de 2 a 6,

d, es un número entero de 0 a 6, y

ES 2 300 346 T3

B, es una porción de la fórmula I

Fórmula I



en donde,

R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

- (1) -H
- (2) alquilo(C_1-C_{10})
- (3) alquenilo(C_2-C_{10})
- (4) alquinilo(C_2-C_{10})
- (5) arilo(C_6-C_{22})
- (6) -Z-alquilo(C_1-C_{10}), -Z-alquenilo(C_2-C_{10}), -Z-alquinilo(C_2-C_{10}), -Z-arilo(C_6-C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,
- (7) Sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede substituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C_1-C_{10}), -alquenilo(C_2-C_{10}), -alquinilo(C_2-C_{10}), -arilo(C_6-C_{22}), y un grupo reportador,

encontrándose insustituido, el citado alquilo, alqueno, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o substituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), -alcoxi(C_1-C_6), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico;

o cualesquiera sales de éstos.

Las definiciones preferidas de los grupos tal y como se han definido en la fórmula I, se aplican a la fórmula II y las fórmulas que se facilitan a continuación, si no se indica de otro modo.

De una forma preferible, en los compuestos de la fórmula II, R¹⁴, es hidrógeno. La definición preferida de L, es oxi. La definición preferida de U, es -OH y el grupo reportador. La definición preferida de V, es oxi. La definición preferida de c, es un número entero de 2 a 4 y, la definición preferida de d, es un número entero de 0 a 2. Los compuestos de la fórmula II, son especialmente apropiados para contener la porción heterocíclica, como una parte integrada (de una forma preferible, no en uno de los términos) del compuesto de enlace de ácido nucleico. El grupo NR²³R²⁴, se selecciona, de una forma preferible, de entre el grupo consistente en grupos dialquilamino. En el caso de este grupo, conjuntamente con la formación del anillo de 5 ó 6 miembros, éste asume preferiblemente la definición de morfolinilo, pirrolidinilo o piperidinilo.

ES 2 300 346 T3

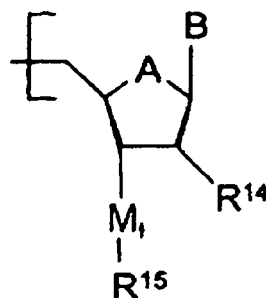
La configuración del azúcar, puede seleccionarse de entre el grupo consistente en las configuraciones α -D, β -D, α -L- y β -L, y de una forma mayormente preferida, el compuesto, contiene por lo menos una porción 2'-desoxi- β -D-eritro-pentofuranosilo ó una porción β -D-ribofuranosilo. En una forma preferida de presentación de la invención, D, es glicósido C-1 de una porción de azúcar, del compuesto en concordancia con la presente invención.

El azúcar, puede encontrarse en una configuración bloqueada. LNA (Locked Nucleic Acid - [Ácido nucleico bloqueado]-), es una nueva clase de análogo de ácido nucleico. Los oligómeros de LNA, obedecen a las reglas de apareamiento de bases de Watson - Crack, e hibridan a oligonucleótidos complementarios. No obstante, cuando se compara a DNA y a otros derivados de ácidos nucleicos, el LNA, proporciona una amplio y mejorado rendimiento de la hibridación. Los dúplex LNA/DNA ó LNA/RNA, son mucho más térmicamente estables, que los dúplex formados por DNA y RNA. De hecho, el LNA, tiene la máxima afinidad hacia las DNA y RNA complementarias, que se haya reportado jamás. De una forma general, la estabilidad térmica de un dúplex LNA/DNA, se incrementa en un valor que va de 3°C a 8°C, por base modificada, en el oligo. Dentro de los sectores de la biología molecular general y de diagnósticos moleculares, se han identificado cinco mayores sectores para la aplicación de LNA, los cuales son las sondas de captura, la preparación de muestras, la detección de SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms-[Poliformismos de nucleótidos individuales]-), PCR alelo-específica, y sondas de hibridación, balizados moleculares (Molecular Beacons), sondas de Padlock, sondas de Taqman (publicación de patente internacional WO 92/02 638, y las correspondientes patentes estadounidenses US 5.210.015, US 5.804.375, US 5.487.972), y sondas para hibridaciones *in situ*. En muchos aspectos, el LNA, puede manipularse de la misma forma que el DNA. El LNA, es por lo menos tan estable como el DNA, y es soluble en tampones acuosos. El LNA, puede precipitarse en etanol, secarse, y resuspenderse, y puede analizarse sobre geles, HPLC y MALDI-TOF. Los LNAs, son nuevos análogos de ácido nucleico, que pueden incrementar de una forma dramática, el rendimiento de, no únicamente ensayos de diagnósticos que ensayan y evalúan la información genética, sino también, de otros métodos de medicina genética antisentido y de otros tipos. Estos análogos, los cuales puede utilizarse en la mayoría de aplicaciones, simplemente del mismo modo que sus contrapartes naturales, bloquean el ácido nucleico en la conformación más productiva para la hibridación. La hibridación, o el bloqueo complementario de sondas genéticas, es la forma predominante de evaluación de la información genética, en los diagnósticos. Se ha desarrollado una amplia variedad de aplicaciones para el LNA, incluyendo un determinado número de ensayos extremadamente sensibles y específicos, aptos para detectar mutaciones de bases individuales específicas en las causas de enfermedades, en los genes de un individuo. En la detección de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms - [Poliformismos de nucleótidos individuales]-), los cuales son las pequeñas variaciones en nuestros genes, que pueden provocar una predisposición hacia una enfermedad, existen datos que muestran el hecho de que, las sondas de captura de LNA de únicamente ocho nucleótidos de longitud, son capaces de discriminar de una forma más efectiva, entre los genes mutados y genes del tipo salvaje, en una muestra, que las sondas de captura de ácidos nucleicos convencionales, mucho más largos. Así, por lo tanto, la presente invención, contempla también compuestos en concordancia con la presente invención, en donde, por ejemplo, por lo menos un átomo de la porción de azúcar, por ejemplo, un átomo de carbono o un átomo de oxígeno, se conecta a por lo menos otro átomo de la porción de azúcar, vía por lo menos una porción de puente, que contiene por lo menos un átomo, con lo cual, se forma un azúcar conformacionalmente impedido, tal y como se ha indicado anteriormente, arriba. Con ello, el azúcar, se fija en una conformación bloqueada.

Para la síntesis de los compuestos utilizados en la presente invención, al lector, se le dirige, como referencia, a la obra Chemistry of Nucleosides and Nucleotides Part I, - Química de los nucleósidos y los nucleótidos, Parte I -, editado por L.B. Townsend, Plenum Press New Cork (1998), Capítulo 2: Synthesis and Properties of Purine Nucleosides and Nucleotides, - Síntesis y propiedades de los nucleósidos y los nucleótidos de purina -, páginas 113 - 281, ó la patente estadounidense US 5.594.121. No obstante, abajo, a continuación, se proporciona una mayor información.

Pueden utilizarse diferentes estructuras químicas en el esqueleto de la cadena del compuesto de enlace de ácido nucleico. La persona experta en el arte especializado de la técnica, apreciará el hecho de que, el compuesto de enlace de ácido nucleico, puede también poseer un extremo 3' modificado. Así, por lo tanto, el compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, el esqueleto de la cadena, puede comprender una o más porciones de la fórmula general III, en donde, t, es 0 ó 1,

Fórmula III



en donde, en el caso en que t = 1,

ES 2 300 346 T3

A, se selecciona de entre el grupo consistente en O, S, CH₂, y N-alquilo(C₁-C₆),

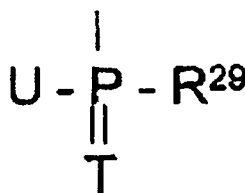
M, se selecciona de entre el grupo consistente en oxi, sulfanodilo, -NR²²-, -alquilo(C₁-C₁₀)-, u -O-alquil(C₁-C₁₀)-O, y -S-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y -NR²²-alquil(C₁-C₆)-O-,

R²², se selecciona de entre el grupo consistente en -H, alquilo(C₁-C₁₀), un grupo protector y un grupo reportador,

R¹⁴, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OH, -alquilo(C₁-C₃), -alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinoxilo(C₂-C₁₀), -(O-CH₂)_n-, en donde, n, puede ser un número entero de 1 a 18, -halógeno, -azido, SH, -alquilmercapto(C₁-C₁₀), grupo reportador O, fase sólida O, y -NH₂,

R¹⁵, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₆), -alqueno(C₂-C₁₀), -alquino(C₂-C₁₀), -alquil-(C₂-C₁₀)-carbonilo, -alqueno(C₃-C₁₉)-carbonilo, -alquino(C₃-C₁₉)-carbonilo, aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₁₀), una fase sólida y un grupo de la fórmula IV

Fórmula IV



en donde,

T, se selecciona de entre el grupo consistente en oxo, tioxo y selenoxo,

U, se selecciona de entre el grupo consistente en -OH, -O⁻, grupo reportador -O-, -SH, -SeH, -alcoxi(C₁-C₁₀), -alquilo(C₁-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), -aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₁₀), -NR²³R²⁴, y -(O-alquilo(C₁-C₁₀))_nR²⁵, en donde, n, puede ser un número entero entre 1 y 6, ó en donde, -NR²³R²⁴, puede ser, conjuntamente con N, un anillo heterocíclico de 5 a 6 miembros,

R²³ y R²⁴, se seleccionan, de una forma independiente, de entre grupo consistente en -alquilo(C₁-C₁₀), -arilo(C₁-C₂₀), -aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₁₀), -alquilo(C₁-C₆)-[NH(CH₂)_c]_d-NR²⁶R²⁷,

R²⁵, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OH, -halógeno, -amino, alquilamino(C₁-C₁₈), -COOH, -CONH₂, y -COO-alquilo(C₁-C₄),

R²⁶ y R²⁷, se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, alquilo(C₁-C₆), y -alcoxi(C₁-C₄)-alquilo(C₁-C₆),

R²⁹, se selecciona de entre el grupo consistente en -OR³⁰ y -SR³⁰,

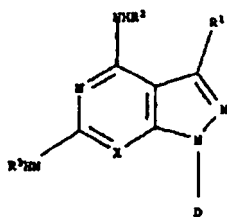
R³⁰, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alqueno(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), un grupo protector, una fase sólida, y un grupo reportador,

c, es un número entero de 2 a 6,

d, es un número entero de 0 a 6, y

B, es una porción de la fórmula I

Fórmula I



ES 2 300 346 T3

en donde,

R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

5 R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

(2) alquilo(C_1-C_{10})

10

(3) alquenilo(C_2-C_{10})

(4) alquinilo(C_2-C_{10})

15

(5) arilo(C_6-C_{22})

(6) -Z-alquilo(C_1-C_{10}), -Z-alquenilo(C_2-C_{10}), -Z-alquinilo(C_2-C_{10}), -Z-arilo(C_6-C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

20

(7) Sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, $-NO_2$, OR^{12} , -CN, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

25

en donde, R^{11} , se selecciona de entre el grupo consistente en $-NHR^{12}$ y OR^{12} ,

30

en donde, R^5 , R^6 y R^{12} , se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C_1-C_{10}), -alquenilo(C_2-C_{10}), -alquinilo(C_2-C_{10}), -arilo(C_6-C_{22}), y un grupo reportador,

encontrándose insustituído, el citado alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), -alcoxi(C_1-C_6), -OH, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

35

X, es independiente de R^1 , R^2 ó R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

40

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

y en donde, en el caso en que $t = 0$, R^{15} , es -H,

45

o cualesquiera sales de éstos.

Para las definiciones y preferencias, las particularidades se aplican tal y como se ha indicado para los sustituyentes en las fórmulas I y II, si no se especifica de otro modo, específicamente, para la fórmula III. El extremo 3', puede ser 2',3'-didesoxirribosa, es decir, en donde $t = 0$, R^{15} es -H, y R^{14} es -H, o un análogo de ésta. Esto es de interés, si es necesaria una terminación enzimática, cuando el compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, se extiende con compuestos de trifosfato, también de origen natural, como los trifosfatos de adenosina, guanosina, uridina, citidina o timidita o los desoxiderivados de los trifosfatos de adenosina, guanosina, uridina, citidina o timidita. No obstante, la invención, se refiere, también, a la extensión de cebadores que contienen únicamente nucleótidos de origen natural, o compuestos de enlace de ácido nucleico en concordancia con la presente invención con compuestos de trifosfato en concordancia con la presente invención, con la fórmula general VIII.

50

55

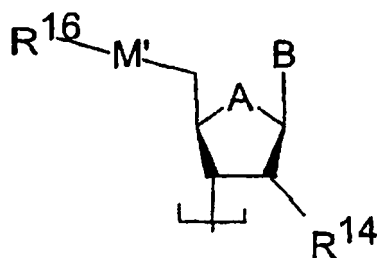
Los compuestos de enlace de ácido nucleico, en donde, el grupo de la fórmula I, se encuentra unido a subunidades, por ejemplo, el nucleótido, en el extremo 3' del compuesto, son de utilidad, o como compuesto de partida para la síntesis de compuestos más largos o/y como sondas de extremos marcados. Este grupo de compuestos, se prefiere de una forma especial, debido al hecho de que, la posición terminal de las sondas, generalmente, es la más tolerante en vistas a una unión de las porciones químicas.

60

En vistas a las modificaciones del extremo 3' del compuesto de enlace de ácido nucleico, es evidente el hecho de que, el extremo 5' del compuesto de enlace de ácido nucleico, puede modificarse. Así, por lo tanto, un compuesto de enlace de ácido nucleico, tal y como se ha indicado anteriormente, arriba, puede comprender una porción del esqueleto de la cadena de la fórmula V

65

Fórmula V



5

10

15 en donde,

A, se selecciona de entre el grupo consistente en O, S, CH₂, N-CO-alquilo-(C₁-C₆),

20 M', se selecciona de entre el grupo consistente en oxi, sulfanodilo, -NR²²-, -alquilo(C₁-C₁₀)-, u -O-alquil(C₁-C₁₀)-O, y -S-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y -NR²²-alquil(C₁-C₆)-O-,

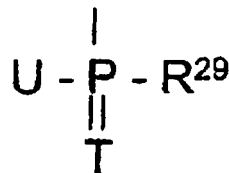
R²², se selecciona de entre el grupo consistente en -H, un grupo protector, un grupo reportador, y alquilo(C₁-C₁₀),

25 R¹⁴, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OH, -alcoxi(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -halógeno, azido, -SH, -alquilmercapto(C₁-C₆), grupo reportador O, fase sólida O, y -NH₂,

30 R¹⁶, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₈), -alqueno(C₂-C₁₈), -alquino(C₂-C₁₈), -alquil-(C₂-C₁₈)-carbonilo, -alqueno(C₃-C₁₉)-carbonilo, -alquino(C₃-C₁₉)-carbonilo, aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₈), un grupo protector, o un compuesto de la fórmula IV

en donde,

Fórmula IV



35

40

en donde,

45 T, se selecciona de entre el grupo consistente en oxo, tioxo y selenoxo,

50 U, se selecciona de entre el grupo consistente en -OH, -O⁻, grupo reportador -O-, -SH, -SeH, -alcoxi(C₁-C₁₀), -alquilo(C₁-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), -aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₁₀), -NR²³R²⁴, y -(O-alquilo(C₁-C₁₀))_nR²⁵, en donde, n, puede ser un número entero entre 1 y 6, ó en donde, -NR²³R²⁴, puede ser, conjuntamente con N, un anillo heterocíclico de 5 a 6 miembros,

R²³ y R²⁴, se seleccionan, de una forma independiente, de entre grupo consistente en -alquilo(C₁-C₁₀), -arilo(C₁-C₂₀), -aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₁₀), -alquilo(C₁-C₆)-[NH(CH₂)_c]_d-NR²⁶R²⁷,

55 R²⁵, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OH, -halógeno, -amino, alquilamino(C₁-C₁₈), -COOH, -CONH₂, y -COO-alquilo(C₁-C₄),

60 R²⁶ y R²⁷, se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, alquilo(C₁-C₆), y -alcoxi(C₁-C₄)-alquilo(C₁-C₆),

R²⁹, se selecciona de entre el grupo consistente en -OR³⁰ y -SR³⁰,

65 R³⁰, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), un grupo protector, una fase sólida, y un grupo reportador, y

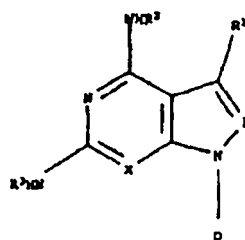
c, es un número entero de 2 a 6,

ES 2 300 346 T3

d, es un número entero de 0 a 6, y

B, es una porción de la fórmula I

Fórmula I



en donde,

R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

(2) alquilo(C_1-C_{10})

(3) alquenilo(C_2-C_{10})

(4) alquinilo(C_2-C_{10})

(5) arilo(C_6-C_{22})

(6) -Z-alquilo(C_1-C_{10}), -Z-alquenilo(C_2-C_{10}), -Z-alquinilo(C_2-C_{10}), -Z-arilo(C_6-C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

(7) Sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede substituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, $-NO_2$, OR^{12} , -CN, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R^{11} , se selecciona de entre el grupo consistente en $-NHR^{12}$ y OR^{12} ,

en donde, R^5 , R^6 y R^{12} , se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C_1-C_{10}), -alquenilo(C_2-C_{10}), -alquinilo(C_2-C_{10}), -arilo(C_6-C_{22}), y un grupo reportador,

encontrándose insustituido, el citado alquilo, alqueno, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o substituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), -alcoxi(C_1-C_6), -OH, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R^1 , R^2 ó R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

y cualesquiera sales de éstos.

Un compuesto muy preferido, es un compuesto de la fórmula V, en donde, M^2 , es O, R^{16} , es H y, R^{14} , se selecciona de entre el grupo consistente en hidrógeno e hidroxilo.

Tales tipos de compuestos, pueden por ejemplo utilizarse en sondas marcadas en los extremos 5'. En cuanto a lo referente a las definiciones de los substituyentes, se aplican las definiciones, tal y como se proporcionan anteriormente, arriba, si no se indica de otro modo.

ES 2 300 346 T3

El esqueleto de la cadena del compuesto de enlace de ácido nucleico, tiene la función de portar los heterociclos de apareamientos de bases, de tal forma que, el compuesto, pueda unirse a un ácido nucleico que tenga una secuencia complementaria. De una forma preferible, el grado de complementariedad en las bases de origen natural, será el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 70% a un 100% en una extensión de bases, en una región que afecta al enlazado, en comparación con una extensión de la misma longitud, en la región del ácido nucleico a ser enlazado. Las deleciones e inserciones de subunidades de cada secuencia, deberán contarse, por lo tanto, como brechas o vacíos, hasta la siguiente base de encaje y así, de este modo, reducir la complementariedad, mediante tantas bases como contenga la brecha.

Los esqueletos de cadena preferidos, contienen porciones de fosfatos de azúcares. De entre éstos, se prefieren, adicionalmente, los esqueletos de cadena que contienen desoxi-azúcares.

Cada porción, en el esqueleto de la cadena, que porte una porción capaz de realizar un apareamiento de bases, a una secuencia complementaria de bases de ácidos nucleicos, incluyendo a la porciones de la invención, se denomina una subunidad.

Se conocen compuestos, los cuales tienen esqueletos de cadena mezclados a diferentes clases de subunidades. Recientemente, se han descrito nuevas clases de compuestos de enlace de ácidos nucleicos, no naturales. Éstos de denominan ácidos nucleicos péptidos (PNA - [del inglés, Peptide Nuclíc Acids] -), ya que, éstos, contienen por lo menos un péptido enlazado entre las subunidades (véase la publicación de patente internacional WO 92/20 702). El compuesto de enlace de ácidos nucleicos utilizado, en la presente invención, puede tener cualquier longitud. No obstante, debido a la covalencia de la síntesis química, se prefieren los compuestos de una longitud de menos de 100 subunidades, de una forma preferible, de 10 a 30 subunidades, por ejemplo los nucleósidos.

Procediendo a modificar la estabilidad térmica (T_m) de un dúplex formado entre un compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, por ejemplo, que se utilice como una sonda, y un segundo compuesto de enlace de ácido nucleico, utilizando los grupos heterocíclicos de los compuesto de enlace de ácidos nucleicos utilizados en la presente invención, y otro análogos, se consigue la optimización de la estabilidad de dúplex y de discriminación de apareamientos fallidos (véanse, por ejemplo, los trabajos de Kwok, Shirley; Chang, Sheng Yung; Sninski, John J.; Wang Alice. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers, - Una guía para el diseño y uso de cebadores de apareamiento fallido y degenerados -, PCR Methods Appl. (1994), 3 (4), 39 - 47). Un aspecto de utilidad para la modificación de la T_m , es el que aparece a raíz del hecho de que los dúplex de Adenina - Timida (A - T), tienen una menor T_m que la correspondiente a los dúplex de Guanina - Citosina (G-C), debido, en parte, al hecho de que, los dúplex de A-T, tienen 2 enlaces de hidrógeno por par de bases, mientras que, los dúplex de G-C, tienen 3 enlaces de hidrógeno por par de bases. Así, de este modo, en algunas formas de presentación, es deseable el desestabilizar los dúplex ricos en G-C y/o incrementar las estabilidad de los dúplex ricos en A-T, al mismo tiempo que mantener la especificidad de la secuencia de hibridación. Esto tiene como resultado una armonización o igualación de la contribución de cada par de bases a la temperatura de fusión de un dúplex. Esto se cumple, por ejemplo, procediendo a reemplazar uno o más de los grupos heterocíclicos en el compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado como sonda (o como ácido nucleico diana), con ciertas bases no standard modificadas. Así, por lo tanto, la invención, puede relacionarse a compuestos de enlace de ácidos nucleicos utilizados en la presente invención, en donde, los compuestos de enlace de ácidos nucleicos, adicionalmente al grupo de la fórmula general I, comprenden, además, un grupo heterocíclico distinto del grupo de la fórmula general I, es decir, por lo menos otro grupo heterocíclico. Las sustitución de residuos de guanina con 7-desazaguanina, por ejemplo, de una forma general, desestabilizará los dúplex, a cuyo efecto, las sustitución de los residuos de adenina con 2,6-diaminopurina, mejorará la estabilidad de los dúplex. Se incorporan, también, en los ácidos nucleicos, una variedad de bases modificadas, con objeto de mejorar o hacer decrecer la estabilidad de los dúplex en su totalidad, al mismo tiempo que mantener la especificidad de la hibridación. La incorporación de análogos de 6-aza-pirimidina, en sondas oligonucleótidos, de una forma general, hace decrecer su afinidad de enlace, para los ácidos nucleicos complementarios. Muchas pirimidinas 5-sustituidas, incrementan substancialmente la estabilidad de los híbridos, en los cuales éstos se han sustituido, en lugar de las pirimidinas nativas, en las secuencia. Los ejemplos, incluyen a los derivados 5-bromo, 5-metilo, 5-propinilo, 5-(imidazol-2-ilo)- y 5-(tiazol-2-ilo) de citosina y uracilo. De una forma preferible, el grupo heterocíclico adicional, es una pirrolo-[2,3-d]-pirimidina ó una pirazolo[3,4-d]-pirimidina, o un análogo de éstas, de una forma particular, de los citados análogos de adenina o guanina. Deberá enfatizarse el hecho de, la presente invención, se refiere, también, al caso en donde, la totalidad de otros grupos heterocíclicos, son aquéllos de origen natural, como la adenina, la guanina, el uracilo, la citosina o la timina. Muchos nucleósidos modificados, nucleótidos, y varias bases apropiadas para su incorporación en nucleótidos, son comercialmente obtenibles, en el mercado, de procedencia de una variedad de fabricantes, incluyendo a las firmas SIGMA Chemical Company (Saint Louis, Mo.), R&D Systems (Minneapolis, Minn.), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, N.J), CLONTECH Laboratorios, Inc. (Palo Alto, California), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Md.), Fluka Química-Biochemika Analytika (FLuka Chemie AG. Buchs. Switzerland), Invitrogen, San Diego, Calif. y Applied Biosystems (Foster City, Calif.), así como también muchas otras fuentes comerciales, que son conocidas por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Los procedimientos para la unión de bases a azúcares, son ya conocidos. Véase, por ejemplo, Lukevics y Zablocka (1991), Nucleoside Synthesis: Organosilicon Methods, - Síntesis de nucleótidos: Procedimientos de organosilicio -, Ellis Horwood Limited Chichester, West Sussex, Inglaterra, y las referencias aquí incluidas. Los procedimientos para fosforilar nucleósidos, para formar nucleótidos, y para incorporar nucleótidos en oligonucleótidos, se conocen bien. Véase, por ejemplo, Agrawal (ed)(1993) Protocols

ES 2 300 346 T3

for Oligonucleotides and Analogues, Synthesis and Properties, - Protocolos para oligonucleótidos y análogos, Síntesis y propiedades -, Methods in Molecular Biology, volumen 20, Humana Press, Towota, N.J., y las referencias incluidas aquí. Véase, también, Crooke y Lebleu, y Sanghvi y Cook, y las referencias citadas aquí, ambas anteriormente, arriba.

5 En todavía otra forma de presentación, la invención, se refiere a compuesto de enlace de ácido nucleico usado en la presente invención, en donde, el compuesto de enlace de ácido nucleico, contiene adicionalmente, en el extremo 3', además de un grupo heterocíclico de la fórmula I, un grupo heterocíclico diferente de I, es decir, por lo menos otro grupo heterocíclico. De una forma preferible, el compuesto de enlace de ácido nucleico, comprende, adicionalmente, un grupo que es una pirrolo[2,3-d]-pirimidina, o una pirazolo[2,3-]pirimidina o un análogo de éstas, de una forma
10 preferible, los citados análogos de guanina o adenina.

El compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, puede enlazarse a un segundo compuesto de enlace de ácido nucleico, enlazándose, el compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención y el segundo compuesto de enlace de ácido nucleico, el uno con el otro, mediante apareamiento de bases,
15 en orientación paralela o en orientación antiparalela. Adicionalmente a los grupos heterocíclicos con fórmula I, con sustituyentes tales como los que se han definido anteriormente, arriba, el compuesto de unión de ácido nucleico utilizado en la presente invención, puede contener otra nucleobase natural, o nucleobases que no tienen origen natural, tales como, por ejemplo, nucleobases con grupos heterocíclicos en concordancia con la presente invención, grupos heterocíclicos tales como pirrolo[2,3-d]-pirimidina, ó pirazolo[2,3-d]-pirimidina o análogos de éstas, de una forma
20 preferible, los citados análogos de guanina o adenina ó 7-desaza-guanina. Los grupos heterocíclicos no naturales, son conocidos por parte de aquéllas personas especializadas en el arte especializado de la técnica.

Un compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, en donde, el grupo heterocíclico de la fórmula I, tal y como se ha definido anteriormente, arriba, puede incorporarse, con objeto compensar para un decrecimiento del punto de fusión creado mediante la unión de los grupos reportadores, de una forma preferible, 1 a 5 nucleótidos separados del nucleótido al cual se encuentra unido el grupo reportador. Esto es debido al hecho de que, un grupo reportador, conduce a disturbios de la eficacia de hibridación de un compuesto de ácido nucleico, cerca del punto o nucleótido, en donde se encuentra unido el grupo reportador.

30 Un compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, en donde, el grupo heterocíclico de la fórmula I, tal y como se ha definido anteriormente, arriba, puede incorporarse, con objeto compensar para un decrecimiento del punto de fusión creado mediante la discriminación de apareamientos fallidos. Este problema, se ha discutido por parte de Kwok, Shirley; Chang, Chang, Sheng Yung; Sninski, John J.; Wang Alice. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers, - Una guía para el diseño y uso de cebadores de apareamiento fallido y degenerados -, PCR Methods Appl. (1994), 3 (4), 39 - 47). Esto es particularmente de utilidad, para aplicaciones de
35 subtipos de virus, en donde, la extensión de hibridación, no contiene bases complementarias en la longitud total de la extensión.

Un compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, en donde, un grupo protector puede
40 sustituir a uno o dos átomos de hidrógeno, de un grupo -OH, -SH, NH₂, -NH-alquilo, -NH-alquileo, ó NH-arilo, si bien se prefiere el hecho de que, los compuestos de enlace de ácido nucleico utilizados en la presente invención, únicamente contengan pocos grupos protectores o incluso ninguno.

El compuesto de enlace de ácido nucleico, puede prepararse en solución o, de una forma preferible, en una fase
45 sólida, utilizándose, allí en donde sea apropiado, un dispositivo automático de síntesis. Los oligómeros, pueden ensamblarse por etapas, procediendo a condensar sucesivamente un mononucleótido, el cual, en cada caso, posee una base nucleótida, sobre un soporte apropiadamente derivatizado, o sobre una cadena oligómera creciente. De una forma alternativa, los compuestos de enlace de ácido nucleico, pueden ensamblarse procediendo a unir conjuntamente dinucleótidos o trinucleótidos [véase Beaucage *et al.*, Tetrahedron, 48 (12), 2223 - 2311, (1992); y Tetrahedron 48 (28)
50 6123 - 6192, (1993)]. Esto es particularmente ventajoso, cuando se sintetizan oligonucleótidos que poseen puentes de fosfatos modificados.

Los oligonucleótidos, se ensamblan utilizando procedimientos que son conocidos por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, tales como el procedimiento de triésteres, el procedimiento de H-fosfonatos, o el procedimiento de la fosforomidita [E. Sonveaux, (1986), Biorganic Chemistry, 14, 274 - 325; S. L. Beaucage *et al.*, (1992), Tetrahedron, 49, 2223 - 2311].

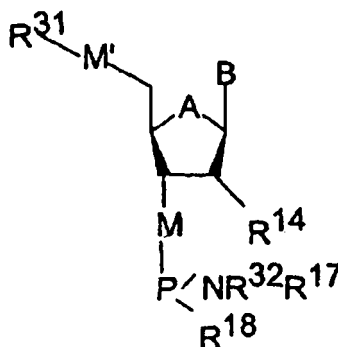
Los compuestos de la presente invención, pueden utilizarse de una forma ventajosa en la síntesis de oligonucleótidos, puesto que, la hidrólisis del amoníaco de los grupos protectores de los nucleósidos de pirazolo[3,4-d]pirimidina, es más rápida que la lenta hidrólisis del amoníaco de la 2-amino-adenosina, la cual se prolonga durante un transcurso de tiempo de algunos días.

Un procedimiento para la síntesis química de compuestos de enlace de ácido nucleico de subunidades activadas de la presente invención, en donde, la citada subunidad, contiene un grupo de la fórmula I. El procedimiento mayormente preferido de síntesis química, utiliza el método de la fosforamidita. Un procedimiento particularmente preferido, utiliza una subunidad activada de uno o más compuestos de la fórmula VII. Este procedimiento, tiene la ventaja de que es muy conveniente y, los reactivos necesarios, por ejemplo, una fosforamidita que contiene un grupo de la fórmula I, tienen la posibilidad de poderse incluir de una forma sencilla.

ES 2 300 346 T3

Los compuestos de la fórmula general VII, son compuestos de la

Fórmula VII



en donde,

A, se selecciona de entre el grupo consistente en O, S, CH₂ y N-alquilo(C₁-C₆),

M y M', se seleccionan de una forma independiente, de entre el grupo consistente en oxi, sulfanedilo, NR²³, -alquilo (C₁-C₁₀), u -O-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y S-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y -NR²²-alquil(C₁-C₆)-O-,

R²², se selecciona de entre -H y alquilo(C₁-C₁₀),

R¹⁴, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OR³¹, -alcoxi(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -halógeno, -azido, -NHR³¹, SR³¹,

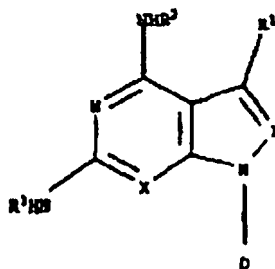
R³¹, es un grupo protector o un grupo reportador,

R³² y R¹⁷, se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), o en donde, NR³²R¹⁷, puede formar, conjuntamente con N, un heterocíclico de 5 a 6 miembros,

R¹⁸, se selecciona de entre grupo consistente en -alquenilo(C₂-C₆), -alquilo(C₁-C₆) sustituido o insustituido, -alcoxi(C₁-C₆) insustituido o -alcoxi(C₁-C₆), sustituido una o varias veces por un grupo seleccionado de entre el grupo consistente en -halógeno, p-nitroariloxi y -ciano, y,

B, es un grupo de la fórmula I

Fórmula I



en donde,

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R², R³, es independiente de X, R¹, R² y R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en,

- (1) -H
- (2) alquilo(C₁-C₁₀)
- (3) alquenilo(C₂-C₁₀)
- (4) alquinilo(C₂-C₁₀)

ES 2 300 346 T3

en donde,

A, se selecciona de entre el grupo consistente en O, S, CH₂ y N-alquilo(C₁-C₆),

5 M y M', se seleccionan de una forma independiente, de entre el grupo consistente en oxi, sulfanedilo, NR²³, -alquilo (C₁-C₁₀), u -O-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y S-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y -NR²²-alquil(C₁-C₆)-O-,

R²², se selecciona de entre -H y alquilo(C₁-C₁₀),

10 R¹⁴, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OR³¹, -alcoxi(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -halógeno, -azido, -NHR³¹, SR³¹, o un grupo reportador,

R³¹, es un grupo protector o un grupo reportador,

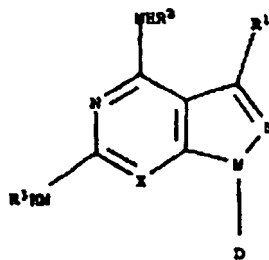
15 R³² y R¹⁷, se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), o en donde, NR³²R¹⁷, puede formar, conjuntamente con N, un heterocíclico de 5 a 6 miembros,

20 R¹⁸, se selecciona de entre grupo consistente en -alquenilo(C₂-C₆), -alquilo(C₁-C₆) sustituido o insustituido, -alcoxi(C₁-C₆) insustituido o -alcoxi(C₁-C₆), sustituido una o varias veces por un grupo seleccionado de entre el grupo consistente en -halógeno, p-nitroariloxi y -ciano, y,

B, es un grupo de la fórmula I

25

Fórmula I



30

35

en donde,

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

40

R², R³, es independiente de X, R¹, R² y R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

45

(2) alquilo(C₁-C₁₀)

(3) alquenilo(C₂-C₁₀)

(4) alquinilo(C₂-C₁₀)

50

(5) arilo(C₆-C₂₂)

(6) -Z-alquilo(C₁-C₁₀), -Z-alquenilo(C₂-C₁₀), -Z-alquinilo(C₂-C₁₀), -Z-arilo(C₆-C₂₂) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

55

(7) sustituyentes (2) a (6),

60

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

65

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), y un grupo reportador,

ES 2 300 346 T3

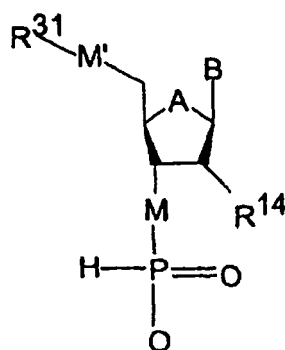
encontrándose insustituído, el citado alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₆), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico, con la condición de que, uno o dos átomos de hidrógeno de cualesquiera de los grupos -OH, -SH, -NH₂, -NH-alquilo, -NH-alquenileno, -NH-alquinileno, ó -NH-arilo, se sustituyan por un grupo protector, y cualesquiera sales de éstos.

Los compuestos de utilidad en la síntesis química de compuestos de enlace de ácido nucleico, tal y como se ha mencionado anteriormente arriba, y los precursores de éstos, son compuestos de la fórmula general X

Fórmula X



en donde,

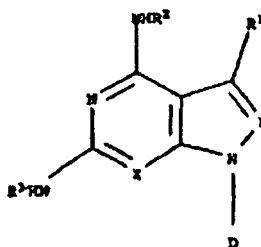
M y M', se seleccionan de una forma independiente, de entre el grupo consistente en oxi, sulfanedilo, NR²³, -alquilo (C₁-C₁₀), u -O-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y S-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y -NR²²-alquil(C₁-C₆)-O-,

R²², se selecciona de entre -H y alquilo(C₁-C₁₀),

R¹⁴, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OR³¹, -alcoxi(C₁-C₁₀), -alqueniloxi(C₂-C₁₀), -alquiniloxi (C₂-C₁₀), -halógeno, -azido, -NHR³¹, SR³¹, ó reportador O,

R³¹, es un grupo protector o un grupo reportador,

Fórmula I



en donde,

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

ES 2 300 346 T3

R^2 , R^3 , es independiente de X , R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

(2) alquilo(C_1 - C_{10})

(3) alqueniilo(C_2 - C_{10})

(4) alquinilo(C_2 - C_{10})

(5) arilo(C_6 - C_{22})

(6) -Z-alquilo(C_1 - C_{10}), -Z-alqueniilo(C_2 - C_{10}), -Z-alquinilo(C_2 - C_{10}), -Z-arilo(C_6 - C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

(7) sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede substituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C_1 - C_6), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C_1 - C_{10}), -alqueniilo(C_2 - C_{10}), -alquinilo(C_2 - C_{10}), -arilo(C_6 - C_{22}), y un grupo reportador,

encontrándose insustituido, el citado alquilo, alqueniilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o substituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C_1 - C_6), -alcoxi(C_1 - C_6), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

con la condición de que, uno o dos átomos de hidrógeno de cualesquiera de los grupos -OH, -SH, -NH₂, -NH-alquilo, -NH-alqueniilo, -NH-alquinilo, ó -NH-arilo, se substituyan por un grupo protector,

y cualesquiera sales de éstos.

En otra opción, la cual es más apropiada para oligómeros largos, y aquéllos basados en esqueletos de cadena naturales, los oligómeros, se producen de una forma enzimática. En este caso, se procede a hacer reaccionar un oligómero de partida, con una polimerasa y un trifosfato, o trifosfato modificado, de tal forma que, un monofosfato o un monofosfato modificado, se una a un extremo del oligómero, alargándose así el oligómero. También, para este procedimiento, la persona experta en el arte especializado de la técnica, conocerá algunos posibles formatos, como el método de traslación de cortes, o la extensión de cebadores individuales (J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, - Clonación Molecular - Un Manual de Laboratorio -, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989).

Un procedimiento para la síntesis enzimática de un compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, puede comprender el hacer reaccionar una subunidad de trifosfato con un cebador, utilizando un ácido nucleico como molde, para el alargamiento del cebador, en donde, la subunidad de trifosfato, contiene un heterocíclico de la fórmula I. La unidad de trifosfato, puede tener la fórmula VI. Así, por ejemplo, la 7-desaza-2'-desoxiadenosina 7- u 8-sustituida y los trifosfatos de guanina, pueden incorporarse enzimáticamente en el DNA, de una forma fácil, mediante varias DNA-polimerasas (WO 00/68 422).

ES 2 300 346 T3

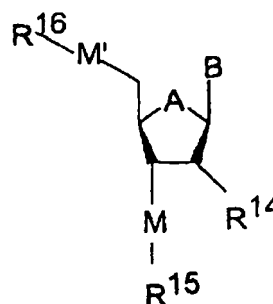
Los compuestos de la fórmula general VI, son compuestos, en donde,

Fórmula VI

5

10

15



en donde,

20

A, se selecciona de entre el grupo consistente en O, S, CH₂ y N-alquilo(C₁-C₆),

M y M', se seleccionan de una forma independiente, de entre el grupo consistente en oxi, sulfanedilo, NR²³, -alquilo (C₁-C₁₀), u -O-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y S-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y -NR²²-alquil(C₁-C₆)-O-,

25

R²², se selecciona de entre -H y alquilo(C₁-C₁₀), un grupo protector y un grupo reportador,

R¹⁴, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OR³¹, -alcoxi(C₁-C₁₀), un grupo O-protector un grupo S-protector, un grupo NH₂-protector, -alquenoiloxi(C₂-C₁₀), -alquinoiloxi(C₂-C₁₀), -halógeno, -azido, SH, alquil-mercapto (C₂-C₁₀), y fase sólida -O-,

30

R¹⁵ y R¹⁶, se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₆), -alquenoil(C₂-C₁₀), -alquinoil(C₂-C₁₀), -alquilcarbonilo(C₂-C₁₀), -alquenoilcarbonilo(C₃-C₁₉), -aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₁₀), un grupo protector y una fase sólida,

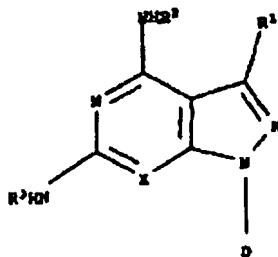
35

B, es un grupo de la fórmula I

Fórmula I

40

45



en donde,

50

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R², R³, es independiente de X, R¹, R² y R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en,

55

(1) -H

(2) alquilo(C₁-C₁₀)

60

(3) alquenoil(C₂-C₁₀)

(4) alquinoil(C₂-C₁₀)

(5) arilo(C₆-C₂₂)

65

(6) -Z-alquilo(C₁-C₁₀), -Z-alquenoil(C₂-C₁₀), -Z-alquinoil(C₂-C₁₀), -Z-arilo(C₆-C₂₂) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

ES 2 300 346 T3

(7) sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquínilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alquénilo(C₂-C₁₀), -alquínilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), y un grupo reportador,

encontrándose insustituído, el citado alquilo, alquénilo, alquínilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₆), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

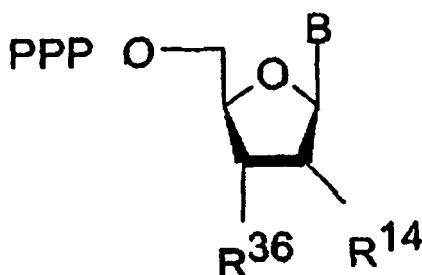
X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

a cuyo efecto, y opcionalmente, por lo menos un grupo protector, sustituya a uno o dos átomos de hidrógeno de un grupo -OH, -SH, NH₂, NH-alquilo, -NH-alquénilo, -NH-alquínilo, ó un grupo -NH-arilo, y cualesquiera sales de éstos.

Los compuestos para la síntesis enzimática de un compuesto de enlace de ácido nucleico utilizados en la presente invención, pueden ser de la fórmula VIII

Fórmula VIII



en donde,

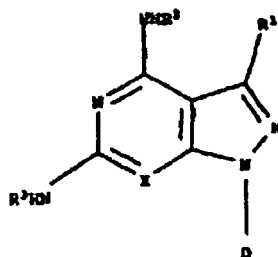
PPP, es un grupo trifosfato, un grupo tiotrifosfato o análogos de éstos,

R¹⁴, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OH, -alcoxi(C₁-C₁₀), -alquénilo(C₂-C₁₀), -alquínilo(C₂-C₁₀), -halógeno, -azido, y NH₂,

R³⁶, se selecciona de entre el grupo de -H y -OH, y

B, es un grupo de la fórmula I

Fórmula I



ES 2 300 346 T3

en donde,

R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

5 R^2 , R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

(2) alquilo(C_1 - C_{10})

10

(3) alqueniilo(C_2 - C_{10})

(4) alquinilo(C_2 - C_{10})

15

(5) arilo(C_6 - C_{22})

(6) -Z-alquilo(C_1 - C_{10}), -Z-alqueniilo(C_2 - C_{10}), -Z-alquinilo(C_2 - C_{10}), -Z-arilo(C_6 - C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

20

(7) sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C_1 - C_6), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

25

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

30

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C_1 - C_{10}), -alqueniilo(C_2 - C_{10}), -alquinilo(C_2 - C_{10}), -arilo(C_6 - C_{22}), y un grupo reportador,

encontrándose insustituído, el citado alquilo, alqueniilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C_1 - C_6), -alcoxi(C_1 - C_6), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

35

40 X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

a cuyo efecto, de una forma opcional, por lo menos un grupo protector, sustituye a uno o dos átomos de hidrógeno de un grupo -OH, -SH, -NH₂, -NH-alquilo, -NH-alqueniilo, -NH-alquinilo, ó -NH-arilo, y cualesquiera sales de éstos.

45

Las subunidades 3'-desoxi- y 2'-3'-didesoxitri-fosfato en concordancia con la fórmula VIII, por ejemplo, pueden utilizarse como nucleótidos de terminación, en procedimientos de secuenciación.

50

De una forma más preferible, el procedimiento anteriormente mencionado, arriba, para la síntesis enzimática, utiliza, como subunidad de trifosfato, un compuesto de la fórmula VIII, tal y como se define anteriormente, arriba.

Mediante los procedimientos anteriores, de arriba, es principalmente posible el introducir únicamente un monómero que contiene la porción de la invención, en un componente de enlace de ácido nucleico, pero también más de uno, según sea el caso. Esto es especialmente posible, mediante la utilización de procedimientos químicos para la síntesis de compuestos de enlace de ácido nucleico.

55

Los compuestos de ácidos nucleicos utilizados en la presente invención, pueden aplicarse, de una forma útil, en procedimientos de hibridación. Así, por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención, es un procedimiento para la determinación de un ácido nucleico, que comprende las etapas de proporcionar una muestra sospechosa de contener el citado ácido nucleico, proporcionando un compuesto de enlace de ácido nucleico, el cual es esencialmente complementario a una parte o la totalidad del citado ácido nucleico, poner en contacto la citada muestra con el citado compuesto de enlace de ácido nucleico, bajo unas condiciones para enlazar el citado compuesto de enlace de ácido nucleico al citado ácido nucleico, y determinar el grado de hibridación para el producto de enlace formado a partir del citado ácido nucleico y el citado compuesto de enlace de ácido nucleico, como una medida para la presencia del citado ácido nucleico.

60

65

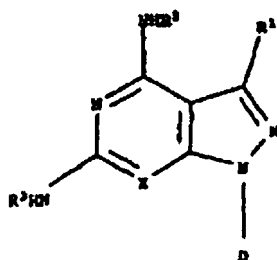
ES 2 300 346 T3

Los procedimientos para la determinación de ácidos nucleicos, mediante la hibridación, son generalmente conocidos, por ejemplo, a raíz del trabajo de Sambrook *et al.*, (citado anteriormente, arriba). Éstos pueden adaptarse fácilmente, para el uso de las sondas de la presente invención.

5 Las sondas de la presente invención, permiten, también, la determinación de patógenos, como las bacterias y virus, por ejemplo, de la hepatitis A, B o C (HBV, HCV), el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el virus del papiloma humano, o parvovirus B19. No obstante, son posibles cualesquiera otros virus.

10 En una forma preferida de presentación, se utiliza un compuesto de enlace de ácido nucleico, como sonda de captura, a cuyo efecto, el compuesto de enlace de ácido nucleico, tiene un esqueleto de cadena, al cual se encuentran unidos grupos heterocíclicos capaces de apareamiento de bases a nucleobases, caracterizado por el hecho de que, un grupo heterocíclico, tiene la fórmula general I

15 Fórmula I



en donde,

30 R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R^2 , R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

35 (2) alquilo(C_1 - C_{10})

(3) alqueniilo(C_2 - C_{10})

40 (4) alquinilo(C_2 - C_{10})

(5) arilo(C_6 - C_{22})

45 (6) -Z-alquilo(C_1 - C_{10}), -Z-alqueniilo(C_2 - C_{10}), -Z-alquinilo(C_2 - C_{10}), -Z-arilo(C_6 - C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

(7) sustituyentes (2) a (6),

50 en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C_1 - C_6), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

55 en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C_1 - C_{10}), -alqueniilo(C_2 - C_{10}), -alquinilo(C_2 - C_{10}), -arilo(C_6 - C_{22}), y un grupo reportador,

60 encontrándose insustituído, el citado alquilo, alqueniilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C_1 - C_6), -alcoxi(C_1 - C_6), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

65 X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

o cualesquiera sales de éstos.

ES 2 300 346 T3

En la forma de presentación mayormente preferida, el compuesto de enlace de ácido nucleico, se un compuesto de enlace de ácido nucleico en concordancia con la presente invención, en donde, $R^1 = Br$ ó $R^1 = I$.

5 Todos los usos descritos anteriormente, arriba, se realizan, de una forma preferible, en forma de reacciones múltiples de hibridación, es decir, encontrándose presentes múltiples ácidos nucleicos diana como segundos compuestos de enlace de ácido nucleico, y múltiples primeros compuestos de enlace de ácido nucleico. Esto se realiza, de una forma preferible, en forma de una serie de distribución, es decir, el primer compuesto de enlace de ácido nucleico, comprende una multitud de diferentes compuestos de enlace de ácido nucleico, con diferentes secuencias, y se encuentra unido en forma de una serie de distribución, a una fase sólida, en diferentes localizaciones a las que se le puede
10 dirigir.

Los compuestos de enlace de ácido nucleico utilizados en la presente invención, pueden también aplicarse en procedimientos de determinación de ácidos nucleicos, en el caso en el que, el ácido de nucleico a ser determinado, se amplifique. Desde la publicación original de la amplificación de ácidos nucleicos, se han descrito varios procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos, basados en cebadores, incluyendo, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a Lygasa Chain Reaction, - Reacción en Cadena de la Ligasa -, (LCR, Wu y Wallace, 1989, Genomics 4 : 560 - 569 y Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 189 - 193); Polymerasa Lygasa Chain Reaction, Reacción en cadena de la polimerasa y ligasa (Barany, 1991, PCR Methods and Applic. 1 : 5 - 16), Gap-LCR (LCR de brechas)(Solicitud de patente - documento de prioridad PCT n° WO 90/01 069); Repair Chain Reaction (Reacción en cadena de compostura, Publicación de Patente Europea n° 439.182 A2), 3SR (Kwoh *et al.*, 2989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 1173 - 1177); Guatelli *et al.*, 1990, Proc. Acad. Sci. USA 87 : 1874 - 1878; Publicación de patente - documento de prioridad PCT n° WO 92/0880 A), y NASBA (patente estadounidense US n° 5.130.238). Adicionalmente, además, existe la amplificación de desplazamiento de membrana (SDA), la amplificación mediatizada por transcripción (TMA), y la amplificación $Q\beta$ (para una revisión, véase, por ejemplo, Whelen y Persing (1996). Annu. Rev. Microbiol. 50, 349 - 373; Abramson y Myers, 1993, Current Opinion in Biotechnology 4 : 41 - 47). Un procedimiento preferido, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La invención, se refiere, también, a la amplificación de ácido nucleico diana, en presencia de los trifosfatos de grupos heterocíclicos en concordancia con la invención, como las pirazolo-[3,4-d]-pirimidinas, variantes sustituidas de éstas, o análogos de éstas, prefiriéndose, de una forma particular, las variantes 7-sustituidas de éstas. Los mayormente preferidos, son los trifosfatos de los grupos heterocíclicos en concordancia con la fórmula I, con los sustituyentes tal y como se han definido anteriormente, arriba.
30

Los compuestos de enlace de ácido nucleico utilizados en la presente invención, pueden utilizarse como cebadores y sondas, como por ejemplo, como una sonda de captura. En el caso en que, el compuesto de enlace de ácido nucleico, deba utilizarse como sonda, éste contendrá, de una forma preferible, un grupo reportador detectable. Cualesquiera híbridos formados a partir del compuesto de enlace de ácido nucleico y un ácido nucleico, pueden entonces determinarse, vía el grupo reportador detectable. Este grupo de ensayos, puede dividirse adicionalmente en dos grupos, siendo uno de ellos, el grupo de ensayos homogéneos, y siendo el otro de ellos, el grupo de ensayos heterogéneos. En los ensayos heterogéneos, de una forma preferible, el híbrido (grupo de enlace), se determinará cuando se enlace a una fase sólida. Esta forma de presentación, tiene la ventaja de que, cualquier exceso de sonda y otros componentes, puede retirarse fácilmente del híbrido, convirtiéndose así, de este modo, a la determinación, en más fácil. El híbrido formado, puede capturarse a una fase sólida, bien ya sea de una forma covalente, bien ya sea de una forma no covalente, bien ya sea específicamente, o bien ya sea inespecíficamente. Existen varias formas de presentación, las cuales son conocidas por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica.
40

45 En los denominados ensayos homogéneos, el híbrido formado, no se unirá a una fase sólida, sino que se determinará bien ya sea directamente, o bien ya sea indirectamente, en solución. Un ejemplo preferido de tal tipo de ensayo, es el que se da a conocer en el documento de prioridad de patente estadounidense PCT/US 91/05 571, el cual se incorpora aquí, en este documento, a título de referencia.

50 De una forma particular, cuando se utilizan varios compuestos de enlace de ácido nucleico, por ejemplo, cuando se realizan procedimientos de hibridación por PCR, procedimientos hibridación de PCR múltiple, o procedimientos de hibridación múltiple, es a menudo difícil el encontrar unas condiciones apropiadas de hibridación, que aseguren una buena especificidad, sin perder algunos complejos de hibridación específicos, resultantes de una T_m más baja, lo cual significa, también, una menor estabilidad. En el caso de procedimientos de diagnóstico, esto puede conducir a resultados de falsos negativos, los cuales deben evitarse. Una dificultad adicional, recae en la complejidad de las muestras biológicas, por ejemplo, sangre o esputo. Tales tipos de muestras, tienen a menudo ácidos nucleicos de fondo, los cuales pueden perturbar al procedimiento de determinación, por ejemplo, conduciendo a unos resultados de falsos positivos.
55

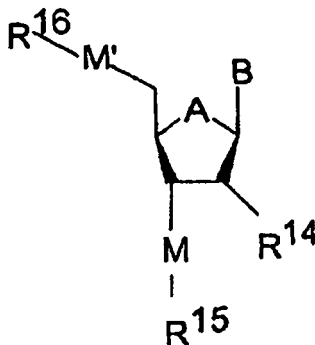
60 Así, por lo tanto, los grupos heterocíclicos de la fórmula I, pueden también utilizarse en procedimientos de hibridación múltiple, con objeto de incrementar la T_m , de uno o más complejos de hibridación formados en un ensayo. Mediante la introducción de un grupo heterocíclico de la fórmula I, en lugar de una base natural contenida en un compuesto de enlace de ácido nucleico, en este ensayo, puede incrementarse la T_m del complejo de hibridación formado con su ácido nucleico diana. Tales tipos de cambios de la T_m , permiten todavía la hibridación específica del compuesto de enlace de ácido nucleico con su ácido nucleico diana, a una temperatura diferente. Un campo de aplicación preferido, son los procedimientos de hibridación múltiple en cortes (obleas), los cuales utilizan, a menudo, de cientos a miles de sondas de hibridación.
65

ES 2 300 346 T3

Los intermediarios y compuestos precursores para la síntesis química de los compuestos de enlace de ácido nucleico, se describen abajo, a continuación.

Un precursor enlazado de base sólida, para la síntesis de un compuesto de enlace de ácido nucleico, comprende un esqueleto de cadena, en donde, el esqueleto de cadena, comprende una porción de la fórmula general VI

Fórmula VI



en donde,

A, se selecciona de entre el grupo consistente en O, S, CH₂ y N-alquilo(C₁-C₆),

M y M', se seleccionan de una forma independiente, de entre el grupo consistente en oxi, sulfanedilo, NR²³, -alquilo (C₁-C₁₀), u -O-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y S-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y -NR²²-alquil(C₁-C₆)-O-,

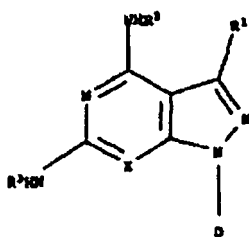
R²², se selecciona de entre -H y alquilo(C₁-C₁₀), un grupo protector y un grupo reportador,

R¹⁴, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OR³¹, -alcoxi(C₁-C₁₀), un grupo O-protector un grupo S-protector, un grupo NH₂-protector, -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -halógeno, -azido, SH, alquilmercapto (C₂-C₁₀), y fase sólida -O-,

R¹⁵ y R¹⁶, se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₆), -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinilo-(C₂-C₁₀), -alquilcarbonilo(C₂-C₁₀), -alquenilcarbonilo(C₃-C₁₉), -aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₁₀), un grupo protector y una fase sólida,

B, es enlace a una porción de la fórmula I

Fórmula I



en donde,

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R², R³, es independiente de X, R¹, R² y R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en,

- (1) -H
- (2) alquilo(C₁-C₁₀)
- (3) alquenilo(C₂-C₁₀)
- (4) alquinilo(C₂-C₁₀)
- (5) arilo(C₆-C₂₂)

ES 2 300 346 T3

(6) -Z-alquilo(C₁-C₁₀), -Z-alquenilo(C₂-C₁₀), -Z-alquinilo(C₂-C₁₀), -Z-arilo(C₆-C₂₂) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

5 (7) sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede substituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

15 en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), y un grupo reportador,

encontrándose insustituido, el citado alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o substituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₆), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

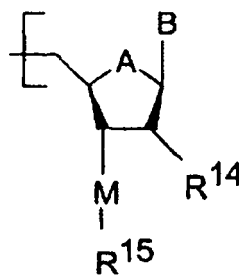
X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

25 D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

con la condición de que, uno o dos hidrógenos de uno cualquiera de los grupos -OH, -SH, NH₂, NH-alquilo, -NH-alquenileno, -NH-alquinileno, ó -NH-arilo, se encuentre substituido por un grupo protector y cualesquiera sales de éstos. Tales tipos de compuestos de la fórmula VI, pueden utilizarse para la síntesis química de compuestos de enlace de ácido nucleico en concordancia con la presente invención, como precursores. En este caso, los compuestos, se encuentran enlazados a la fase sólida, de una forma preferida, R¹⁴, R¹⁵ ó R¹⁶, es una fase sólida O, siendo R¹⁵, de una forma mayormente preferida, una fase sólida. Se prefiere, también, que los grupos reactivos, se protejan mediante grupos reactivos.

35 Los precursores e intermediarios de un compuesto de enlace de ácido nucleico utilizados en la presente invención, son compuestos en donde, el esqueleto de la cadena, comprende una porción de la fórmula general III

Fórmula III



50 en donde, en el caso en que t = 1,

A, se selecciona de entre el grupo consistente en O, S, CH₂, y N-alquilo(C₁-C₆),

55 M, se selecciona de entre el grupo consistente en oxi, sulfanodilo, -NR²²-, -alquilo(C₁-C₁₀)-, u -O-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y -S-alquil(C₁-C₁₀)-O-, y -NR²²-alquil(C₁-C₆)-O-,

R²², se selecciona de entre el grupo consistente en -H, alquilo(C₁-C₁₀), un grupo protector y un grupo reportador,

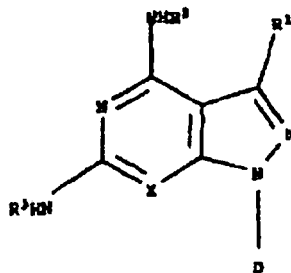
60 R¹⁴, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -OH, -alcoxi(C₁-C₁₀), -alqueniloxi(C₂-C₁₀), -alquiniloxi(C₂-C₁₀), -halógeno, -azido, SH, -alquilmercapto(C₁-C₁₀), grupo reportador O, fase sólida O, y -NH₂, unido a un grupo protector,

65 R¹⁵, se selecciona de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₆), -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -alquil-(C₂-C₁₀)-carbonilo, -alquenil-(C₃-C₁₉)-carbonilo, -alquinil-(C₃-C₁₉)-carbonilo, aril(C₆-C₁₄)-alquilo(C₁-C₁₀), y una fase sólida,

ES 2 300 346 T3

B, es un enlace a una porción de la fórmula I y un grupo de la fórmula I

Fórmula I



5

10

15 en donde,

R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

20

R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

(2) alquilo(C_1-C_{10})

25

(3) alquenilo(C_2-C_{10})

(4) alquinilo(C_2-C_{10})

30

(5) arilo(C_6-C_{22})

(6) -Z-alquilo(C_1-C_{10}), -Z-alquenilo(C_2-C_{10}), -Z-alquinilo(C_2-C_{10}), -Z-arilo(C_6-C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

35

(7) Sustituyentes (2) a (6),

40

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

45

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C_1-C_{10}), -alquenilo(C_2-C_{10}), -alquinilo(C_2-C_{10}), -arilo(C_6-C_{22}), y un grupo reportador,

50

encontrándose insustituído, el citado alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), -alcoxi(C_1-C_6), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

55

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

con la condición de que, uno o dos átomos de hidrógeno de cualesquiera de los grupos -OH, -SH, -NH₂, -NH-alquilo, -NH-alquenileno, -NH-alquinileno, ó -NH-arilo, se sustituyan por un grupo protector, y cualesquiera sales de éstos,

60

en donde, R¹⁴, es una fase sólida O, ó R¹⁵, es una fase sólida.

65

Las fases sólidas para la síntesis química de compuestos de enlace de ácido nucleico utilizados en la presente invención, de una forma preferible, incluyen también a engarces para fijar el compuesto de enlace de ácido nucleico en crecimiento. Tales tipos de engarces, son conocidos en el arte especializado de la técnica. De una forma preferible, tales tipos de engarces, pueden segmentarse después de la síntesis para liberar el citado compuesto de enlace de ácido nucleico, y pueden también utilizarse, por ejemplo, para generar un grupo 3'-hidroxi libre, en el citado compuesto de enlace de ácido nucleico. Tales tipos de engarces, son conocidos, en el arte especializado de la técnica, por ejemplo,

ES 2 300 346 T3

ácido succínico enlazado vía un enlace amida a la fase sólida, y vía un éster al precursor o intermediario. De una forma preferible, R¹⁵, es una fase sólida, pero, en el precursor para las síntesis química de un compuesto de enlace de ácido nucleico en concordancia con la fórmula III, de una forma alternativa, R¹⁴, puede también ser una fase sólida. Los grupos reactivos del citado compuesto, se protegen, de una forma preferible, mediante un grupo protector.

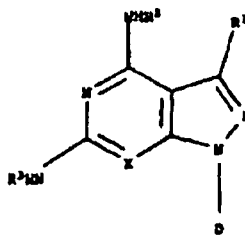
5

Una fórmula más general de los precursores e intermediarios preferidos, son compuestos que comprenden un esqueleto de cadena, teniendo unidos, el citado esqueleto de cadena, grupos heterocíclicos, caracterizados por el hecho de que, un grupo heterocíclico, es un grupo de la fórmula general I

10

Fórmula I

15



20

25 en donde,

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

30

R², R³, es independiente de X, R¹, R² y R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en,

35

(1) -H

(2) alquilo(C₁-C₁₀)

40

(3) alqueno(C₂-C₁₀)

(4) alquinilo(C₂-C₁₀)

(5) arilo(C₆-C₂₂)

(6) -Z-alquilo(C₁-C₁₀), -Z-alqueno(C₂-C₁₀), -Z-alquinilo(C₂-C₁₀), -Z-arilo(C₆-C₂₂) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

45

(7) sustituyentes (2) a (6),

50

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

55

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alqueno(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), y un grupo reportador,

60

encontrándose insustituido, el citado alquilo, alqueno, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₆), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

65

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

en donde, el citado esqueleto de cadena, está unido a una fase sólida,

ES 2 300 346 T3

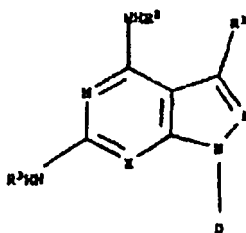
con la condición de que, uno o dos átomos de hidrógeno de cualesquiera de los grupos -OH, -SH, -NH₂, -NH-alquilo, -NH-alquilenilo, -NH-alquinileno, ó -NH-arilo, se sustituyan por un grupo protector,

y cualesquiera sales de éstos.

Aparte de la posibilidad de que, el compuesto precursor o intermediario se acople a la fase sólida, en el esqueleto de la cadena, éste puede también enlazarse al grupo heterocíclico de la fórmula I, incluido en el citado compuesto, por ejemplo, utilizando grupos -OH, -SH ó -NH₂, como sitio de unión. De una forma preferible, los otros grupos reactivos del citado compuesto, se protegen mediante grupos protectores.

Una forma preferida de presentación de la presente invención, es un procedimiento para la determinación de la presencia, ausencia o cantidad de ácido nucleico que comprende las etapas de proporcionar una muestra sospechosa de contener el ácido nucleico, proporcionando un compuesto de enlace de ácido nucleico que comprende un esqueleto de cadena, teniendo unidos, el citado esqueleto de cadena, grupos heterocíclicos capaces de emparejar bases a nucleobases, caracterizado por el hecho de que, un grupo heterocíclico, es un grupo de la fórmula general I

Fórmula I



en donde,

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R², R³, es independiente de X, R¹, R² y R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en,

- (1) -H
- (2) alquilo(C₁-C₁₀)
- (3) alquenilo(C₂-C₁₀)
- (4) alquinilo(C₂-C₁₀)
- (5) arilo(C₆-C₂₂)
- (6) -Z-alquilo(C₁-C₁₀), -Z-alquenilo(C₂-C₁₀), -Z-alquinilo(C₂-C₁₀), -Z-arilo(C₆-C₂₂) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,
- (7) sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), y un grupo reportador,

encontrándose insustituído, el citado alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₆), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

ES 2 300 346 T3

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

o cualesquiera sales de éstos.

5 El citado compuesto de enlace de ácido nucleico, es esencialmente complementario a una parte o a la totalidad del ácido nucleico, contactando la citada muestra con el compuesto de enlace de ácido nucleico, bajo unas condiciones para enlazar el compuesto de enlace de ácido nucleico al ácido nucleico, determinando el producto de enlace o el grado de hibridación entre el ácido nucleico y el compuesto de enlace del ácido nucleico, como una medida de la presencia, ausencia o cantidad de ácido nucleico.

10

En una forma de presentación muy preferida, en los procedimientos en concordancia con la presente invención, los ácidos nucleicos, se aíslan a partir de material biológico, de una forma preferible, a partir de un humano o de un animal. De una forma preferible, los procedimientos en concordancia con la presente invención, se utilizan para el sector de diagnósticos.

15

En todavía otra forma de presentación de la presente invención, se contempla un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, arriba, en donde, el compuesto de enlace de ácido nucleico en concordancia con la presente invención, comprende un grupo reportador, el cual es un marcador fluorescente, de una forma preferible, fluoresceína. De una forma preferible, el compuesto de enlace de ácido nucleico en concordancia con la presente invención, comprende múltiples marcadores fluorescentes, en donde, las longitudes de onda de emisión de uno de los marcadores fluorescentes, se solapa con la longitudes de onda de otro de los marcadores fluorescentes. El compuesto de enlace, puede adicionalmente comprender un agente de extinción, el cual extinga la emisión de fluorescencia del marcador fluorescente, el cual puede ser fluoresceína. De una forma preferible, el agente de extinción, es una rodamina o cianina fluorescente. De una forma preferible, el procedimiento, comprende adicionalmente la etapa de modificar la relación espacial entre el marcador fluorescente y el agente de extinción, subsiguientemente a la hibridación, de una forma preferible, mediante hidrólisis de exonucleasa del compuesto de enlace de ácido nucleico, con lo cual, acontece una liberación del marcador, como resultado de la hidrólisis de exonucleasa. En una forma preferida de presentación, el grado de hibridación entre el compuesto de enlace de ácido nucleico y el ácido nucleico, se determina mediante la cantidad de marcador que se libera a partir del compuesto de enlace de ácido nucleico subsiguientemente a la hibridación.

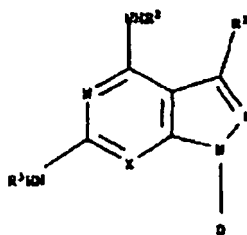
30

En todavía otra forma de presentación de la presente invención, se da a conocer un procedimiento de extensión de cebadores, el cual comprende las etapas de proporcionar un ácido nucleico que contiene una secuencia diana, proporcionar uno o más compuestos de enlace de ácido nucleico complementarios a la secuencia diana, proporcionar una enzima de polimerización y substratos de nucleótidos, e incubar el ácido nucleico, los compuestos de enlace de ácido nucleico, la enzima y los substratos, bajo unas condiciones favorables para polimerización, en donde, el compuesto de enlace de ácido nucleico, comprende un esqueleto de cadena, teniendo unidos, el citado esqueleto de cadena, grupos heterocíclicos capaces de aparear bases a nucleobases, caracterizado por el hecho de que, un grupo heterocíclico, es un grupo de la fórmula general I

40

Fórmula I

45



50

en donde,

55 R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

60

(1) -H

(2) alquilo(C_1-C_{10})

(3) alqueno(C_2-C_{10})

65

(4) alquino(C_2-C_{10})

(5) arilo(C_6-C_{22})

ES 2 300 346 T3

(6) -Z-alquilo(C₁-C₁₀), -Z-alqueni(C₂-C₁₀), -Z-alquini(C₂-C₁₀), -Z-arilo(C₆-C₂₂) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

5 (7) Sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alqueni(C₂-C₁₀) o arilo, puede substituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

15 en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alqueni(C₂-C₁₀), -alquini(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), y un grupo reportador,

encontrándose insustituido, el citado alquilo, alqueni(C₂-C₁₀) o alquini(C₂-C₁₀) o arilo, en las posiciones (2) a (7), o substituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₆), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH; y

25 D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

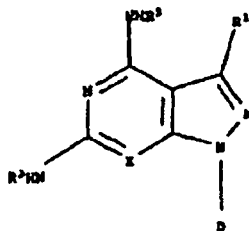
o cualesquiera bases de éstos.

De una forma preferible, el procedimiento, es parte de una reacción de amplificación, de una forma mayormente preferible, de una reacción en cadena de la polimerasa. El procedimiento, puede utilizarse en la síntesis de una molécula de cDNA.

Es todavía otra forma de presentación de la presente invención, un procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos de una secuencia diana, en un ácido nucleico, comprendiendo, el procedimiento, las etapas de proporcionar un ácido nucleico que comprende una secuencia diana, proporcionando por lo menos dos compuestos de enlace de ácido nucleico con una secuencia conocida, y en donde, uno de los por lo menos dos compuestos de enlace de ácido nucleico, tiene una secuencia que es perfectamente complementaria a las secuencia de ácido nucleico, incubar los compuestos de enlace de ácido nucleico con el ácido nucleico, bajo condiciones de hibridación, y determinar el grado de hibridación entre cada uno de los compuestos de enlace de ácido nucleico y el ácido nucleico,

40 caracterizado por el hecho de que, el compuesto de enlace de ácido nucleico, es un compuesto de enlace de ácido nucleico que comprende un esqueleto de cadena, teniendo unidos, dicho esqueleto de cadena, grupos heterocíclicos capaces de aparear bases a nucleobases, caracterizado por el hecho de que, un grupo heterocíclico, es un grupo de la fórmula general I

Fórmula I



en donde,

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

65 R², R³, es independiente de X, R¹, R² y R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

ES 2 300 346 T3

(2) alquilo(C₁-C₁₀)

(3) alqueni(C₂-C₁₀)

5 (4) alquinilo(C₂-C₁₀)

(5) arilo(C₆-C₂₂)

10 (6) -Z-alquilo(C₁-C₁₀), -Z-alqueni(C₂-C₁₀), -Z-alquinilo(C₂-C₁₀), -Z-arilo(C₆-C₂₂) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

(7) sustituyentes (2) a (6),

15 en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede substituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

20 en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alqueni(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), y un grupo reportador,

25 encontrándose insustituido, el citado alquilo, alqueni, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o substituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₆), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

30 X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH; y

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

35 o cualesquiera bases de éstos.

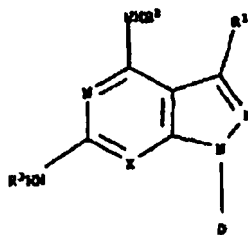
De una forma preferible, el por lo menos otro compuesto de enlace de ácido nucleico, tiene un nucleótido individual fallido con la secuencia diana.

40 La invención, se refiere adicionalmente a un compuesto de enlace de ácido nucleico utilizado en la presente invención, para su uso en medicina. De una forma bastante general, la presente invención, se extiende al uso de tales tipos de compuestos de ácido nucleico, en composiciones terapéuticamente efectivas. Tales composiciones, se entenderán como queriendo significar que incluyen los compuestos de enlace de la presente invención utilizado en la presente invención, como oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos que forman una triple hélice, aptámeros, o ribozimas, de una forma particular, oligonucleótidos antisentido, a cuyo efecto, el ácido nucleico, comprende un esqueleto de cadena, teniendo unidos, dicho esqueleto de cadena, grupos heterocíclicos capaces de aparear bases a nucleobases, caracterizado por el hecho de que, un grupo heterocíclico, es un grupo de la fórmula general I

50

Fórmula I

55



60

en donde,

65

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

ES 2 300 346 T3

R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

(2) alquilo(C_1-C_{10})

(3) alqueniilo(C_2-C_{10})

(4) alquinilo(C_2-C_{10})

(5) arilo(C_6-C_{22})

(6) -Z-alquilo(C_1-C_{10}), -Z-alqueniilo(C_2-C_{10}), -Z-alquinilo(C_2-C_{10}), -Z-arilo(C_6-C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

(7) sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede substituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, $-NO_2$, OR^{12} , -CN, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R^{11} , se selecciona de entre el grupo consistente en $-NHR^{12}$ y OR^{12} ,

en donde, R^5 , R^6 y R^{12} , se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C_1-C_{10}), -alqueniilo(C_2-C_{10}), -alquinilo(C_2-C_{10}), -arilo(C_6-C_{22}), y un grupo reportador,

encontrándose insustituido, el citado alquilo, alqueniilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o substituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), -alcoxi(C_1-C_6), -OH, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R^1 , R^2 ó R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH; y

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico,

o cualesquiera bases de éstos.

Estos ejemplos, pretenden ilustrar posibles aplicaciones, y no deben limitar el ámbito de la invención.

La presente invención, se explica, en mayor detalle, mediante los ejemplos que se facilitan a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis y datos en los nucleósidos de 7-bromo-8-aza-desazapurin-2,5-diamina

1.1.- Síntesis y propiedades de los monómeros

Los alcoxi-nucleósidos 4a,b [18], sirvieron como precursor para la síntesis de los 8-aza-7-desazapurin-2,6-diamina (pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina)-nucleósidos 2a,b (se utiliza la numeración de purina, a través de la totalidad de la sección de la discusión). La aminación, se realizó en una bomba de acero (4 días, 25% aq. NH_3 , 70°). Ambos nucleósidos (2a,b) se aislaron como cristalinos. Previamente, se prepararon algunos pocos nucleósidos de 8-aza-7-desazapurin-2,6-diamina [19-22].

El tratamiento del compuesto 2a, con adenosina-desaminasa (ADA), tuvo como resultado la formación de 8-aza-7-desaza-2'-desoxiguanosina [18]. La reacción, se siguió mediante espectrofotometría UV (Figura 1a).

El espectro dependiente del tiempo, muestra dos puntos isobésticos ($\lambda = 234$ nm y 267 nm), indicando la conversión del material de partida, en únicamente un producto de reacción. La desaminación de 2a, acontece de una forma mucho más lenta que la del nucleósido de purina 1. El derivado de 7-bromo 2b [18], no se desaminó bajo estas condiciones, incluso a altas concentraciones de enzima, tal y como se observó previamente [20].

Esquema I

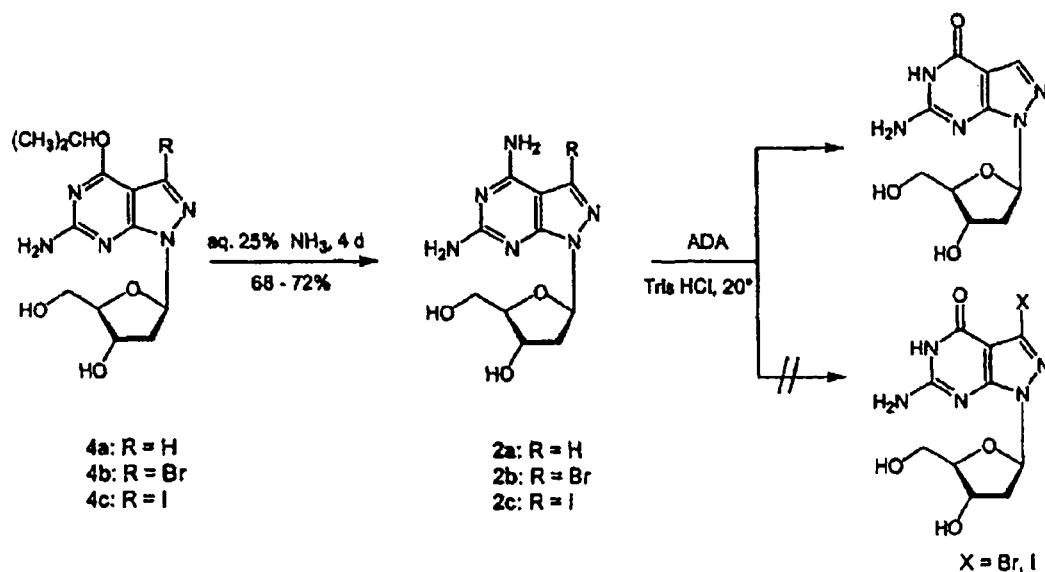
5

10

15

20

25



A continuación, se procedió a medir las vidas medias de los enlaces N-glicosílicos de los compuestos 2a,b, en medio ácido, y se compararon con las del compuesto 1. La reacción, se realizó en HCl 0,5 N, a la temperatura ambiente, y se siguió mediante espectrometría UV, así como mediante análisis de HPLC (Tabla 1).

30

TABLA 1

Valores de vida media (τ) de los derivados de 2'-desoxiadenosina en HCl, a 25°

35

40

45

| Compuesto | τ (minutos) | λ (nm) | Compuesto | τ (minutos) | λ (nm) |
|-----------------------|------------------|-------------------------------|-----------|------------------|----------------|
| 1 | 6 | 252 | 2b | (estable) | 252 |
| 2a | 91 | 253 | 2b | 87° | 253 |
| a) Medido en HCl 0,5N | | b) en un tiempo de 4 horas | | | |
| c) Medido en HCl 2N | | d) determinado mediante HPLC. | | | |

50

A raíz de los datos de la tabla, resulta evidente que, el nucleósido de 8-aza-7-desazapurina-2,6-diamina (2a), muestra una estabilidad del enlace glicosílico, aproximadamente 15 veces mayor que la de la 2-amino-2'-desoxiadenosina progenitora (1). El enlace glicosílico de 2b, es estable, bajo estas condiciones. La hidrólisis, acontece cuando la reacción, se realiza en HCl 2N (Tabla 1). Adicionalmente, además, el sustituyente 7-bromo, incrementa el carácter lipofílico de la molécula, descendiendo, con ello, la movilidad cromatográfica del compuesto 2b, en comparación con los compuestos 2a ó 1, en HPLC de fase inversa (figura 1b).

55

60

65

Con objeto de estudiar la influencia de las nucleosbases en el equilibrio pseudo-rotativo N \leftrightarrow S de la porción de azúcar, se procedió a medir el espectro $^1\text{H-NMR}$ de los nucleósidos 1 - 3, en D_2O . El análisis, se realizó en base a la cinco constantes vecinales ^1H , de acoplamiento de ^1H , utilizando el programa PSEUROT [23]. En concordancia con la tabla 2, el nucleósido de 8-aza-7-desazapurina-2,6-diamina 2a, muestra una población más pronunciada de N-conformadores que el correspondiente nucleósido de purina 1, mientras que, la población del tipo N, del nucleósido de 7-desazapurina, 3, decrece. Esto se encuentra en línea con un incremento de la π -deficiencia de electrones del sistema de 8-aza-7-desazapurina. No se observa un efecto adicional de la retirada del sustituyente 7-bromo, (2b), pero ésta, se observó, para el grupo ciano, más atractivo, introducido en la posición 7 de la 8-aza-7-desaza-2'-desoxiguanosina [24]. La conformación alrededor del enlace C(4')-C(5'), indica el hecho de que, los nucleósidos de 8-aza-7-desazapurin-2,6-diamina 2a y b, como las 8-aza-7-desaza-2'-desoxiguanosinas [24], prefieren la población del rotámero $\gamma^{\text{L}}(-\text{sc})$, mientras que, para los nucleósidos regulares de purina, es predominante la conformación de $\gamma^{\text{L}(+)g}(-\text{sc})$ ó $\gamma^{\text{L}(-)g}(-\text{ap})$, [25].

TABLA 2

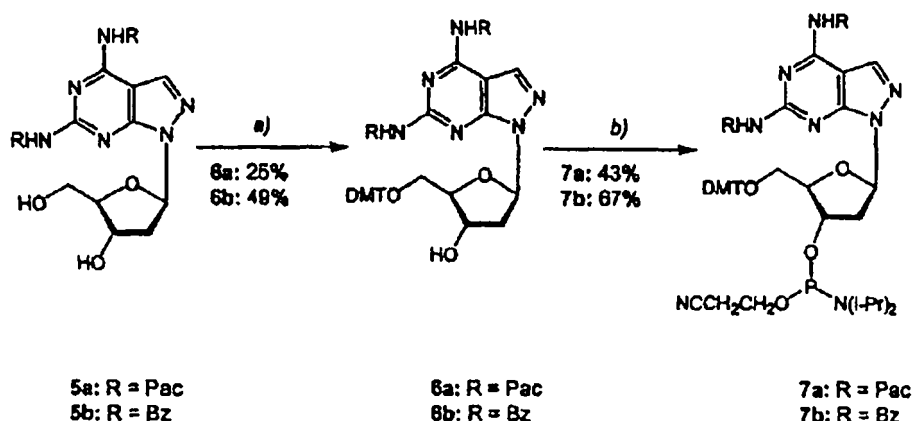
Constantes de acoplamiento $^3J(H,H)$ de las porciones de azúcar de poblaciones de conformadores N/S de los 2-desoxinucleósidos 1 - 3, a 303 K. ^{a)}

| | $^3J_{H,H}/\text{Hz}$ | | | | | | | | | | | |
|----|-----------------------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|----|----|----|-----------------|------------|
| | Conformación | | | | | | | | %N | %S | $\gamma^{(*)g}$ | γ^f |
| | 1',2' | 1',2'' | 2',3' | 2'',3' | 3',4' | 4',5' | 4',5'' | | | | | |
| 1 | 7.30 | 6.10 | 7.00 | 3.10 | 3.40 | 3.20 | 4.30 | 31 | 69 | 62 | 25 | 13 |
| 2a | 6.60 | 6.80 | 6.90 | 3.70 | 3.60 | 4.00 | 5.80 | 37 | 63 | 36 | 42 | 22 |
| 2b | 6.60 | 6.70 | 6.80 | 3.70 | 3.90 | 4.30 | 5.90 | 37 | 63 | 32 | 43 | 25 |
| 3 | 7.90 | 6.40 | 6.20 | 3.10 | 3.00 | 3.87 | 4.82 | 25 | 75 | 48 | 32 | 20 |

^{a)} Disolvente D₂O; rms < 0,4Hz; $|\Delta J_{\text{msx}}| < 0,4 \text{ Hz}$.

En el pasado, varios laboratorios, reportaron sobre la un sencillo protocolo de protección para la 2-amino-2'-deoxiadenosina (1). Son necesarias unas condiciones drásticas de hidrólisis, para la retirada completa de los grupos protectores de benzoilo [4], mientras que, los residuos más lábiles de fenoxiacetilo (pac), se retiraron sin dificultad [26],[27]. No obstante, la formación de los derivados N-bis-acilados, tropieza con dificultades, debido a la monoprotección de la molécula [28] y a una tendencia incrementada de los derivados acilados, a someterse a despurinación [4]. En concordancia con la observación del hecho de que, los nucleósidos 2a,b, son significativamente más estables que los nucleósidos de purina 1 (tabla 1), los derivados de N-acilo de 2a,b, deben mostrar unas propiedades similares. Así, por lo tanto, el derivado de fenoxiacetilo 5a, así como el compuesto de benzoilo 5b, se prepararon empleando el protocolo de la protección transitoria [29]. Como reactivos de acilación, se utilizaron el 2,4,5-triclorofenoxiacetato [27] o el cloruro de benzoilo [30]. El derivado bis-fenoxiacilado 5a, se formó del modo que se describe para el compuesto de purina 1 [19]. No obstante, el rendimiento productivo de 5a, fue algo inferior (30%). El nucleósido bisbenzoilado 5b, se aisló con un rendimiento productivo mucho mejor (63%) (Esquema 2; a) 6a: Piridina, Me₃SiCl, 2,4,5-triclorofenilfenoxiacetato, 40°, 12 horas. 6b: Piridina, Me₃SiCl, PhCOCl, temperatura ambiente, 12 horas. b) Piridina/(MeO)₂Tr-Cl, temperatura ambiente, 4 horas. c) THF, 2-cianoetildisopropilfosforamidoclorhidrato, temperatura ambiente, 30 minutos). Ambos componentes (5a,b), se convirtieron en los derivados de DMT, 6a,b, utilizando las condiciones standard de reacción [31]. La fosforilación, en presencia de 2-cianoetildisopropilfosforamido-clorhidrato y (iPr)₂EtN, proporcionó las fosforoamiditas 7a, b [32]. No obstante, puesto que el derivado benzoilado 6b es poco soluble en solución de THF, tuvo que utilizarse un gran volumen de éste. Correspondientemente en concordancia, la fosforilación, fue menos efectiva y, el rendimiento productivo, el cual es normalmente de un 80%, decreció a un 67% (esquema 2).

Esquema 2



La desprotección del compuesto 5a (25% aq. NH₃, 40°, control mediante HPLC), mostró el hecho de que, el primer grupo pac, se retira en un transcurso de tiempo de 5 minutos, al mismo tiempo que, la retirada del segundo grupo pac, requirió un transcurso de tiempo de 20 minutos. A la temperatura ambiente, tiene lugar una completa desprotección, en un transcurso de tiempo inferior a una hora. La retirada completa de los dos grupos benzoilo del compuesto 5b (25% aq. NH₃, 40°, control mediante HPLC), requiere un transcurso de tiempo de 8 - 9 horas, mientras que, la despro-

tección del nucleósido de purina bis-benzoilada 1, requiere un transcurso de tiempo de algunos días [4]. Desde este punto de vista, la fosoramidita protegida con benzoílo, 7b, representa un bloque de construcción útil para la incorporación del compuesto 2a en oligonucleótidos. No obstante, la reducida solubilidad del intermediario 6b, representa un problema.

5

A pesar de lo anteriormente indicado, se procedió a emprender la síntesis de los derivados de N,N'-dialquilmetilideno, 8a,b. Los intentos originales para introducir los residuos de N,N'-dialquilmetilideno en el nucleósido de purina 1, fallaron, debido a la inestabilidad de los grupos protectores [28]. El grupo N,N-dibutilaminometilideno [33] para la protección de la función amino exocíclica de un análogo 8-aza-desazapurina de 2'-desoxiguanosina, se utilizó ya previamente [34]. El mismo grupo, se introdujo entonces en los nucleósidos 2a,b. Las bis-amidinas 8a,b, se obtuvieron como los productos mayores (17%). La formación del mono-aducto, puede evitarse, cuando se utilizan unas condiciones más vigorosas. Para el nucleósido protegido 8a,b, el tiempo de la desprotección completa (amoníaco concentrado, 40°, control mediante HPLC a 260 nm), se determinó que era de 440 minutos para 8a, y de 450 minutos para 8b. Un valor de vida media, no puede proporcionarse, debido al hecho de que se forma un intermediario mono-

15

Esquema 3

20

25

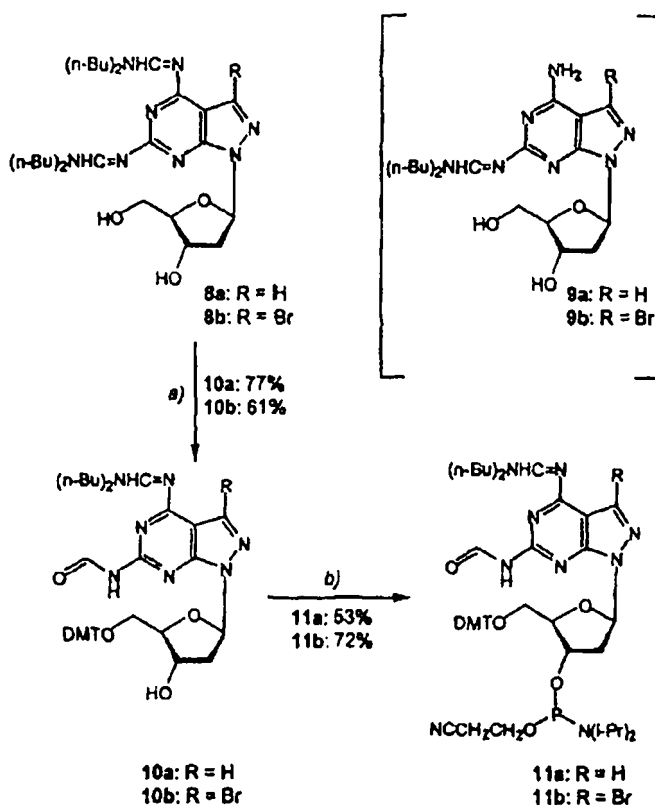
30

35

40

45

50



55

60

65

A continuación, se procedió a introducir los residuos de 4,4'-dimetoxitritilo. Después del procesado de la reacción, seguido por cromatografía flash (de evaporación instantánea) en gel de sílice, se hidrolizó un residuo de N,N'-dibutilaminometilideno, para proporcionar un grupo formilo (Esquema 3; a) Piridina/(MeO)₂Tr-Cl, temperatura ambiente, 4 horas. b) THF, 2-cianoetil-diisopropil-fosoramidoclorhidrato, temperatura ambiente, 30 minutos). Este grupo, protege ahora a la función 2-amino, mientras que, el grupo 6-amino, todavía porta el residuo de dibutilaminometilideno. La estructura de los compuestos 2a,b, se estableció en base al espectro de NMR. El grupo amino (10,77 ppm) y el protón del residuo de formilo (9,56 ppm), se divide en dobletes con J = 9,88 Hz. El modelo patrón de acoplamiento característico, ha sido ya observado, para los derivados de formilo de 5-aza-7-desaza-2'-desoxiguanosina [35] y 2-amino-8-aza-7-desazapurina-2'-desoxinucleósido [36]. La fosforilización de los derivados de DMT 10a,b, se realizó en THF, en presencia de cloro(2-cianoetil)-(diisopropilamino)fosfina, proporcionando las fosoramiditas 11a,b (Esquema 3). Estas fosoramiditas, así como el correspondiente bloque de construcción 7b que porta grupos protectores de benzoílo, pueden utilizarse, de una forma eficiente, en síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, dando como resultado unos altos rendimientos productivos de acoplamiento. Todos los compuestos, se caracterizaron mediante espectros de ¹H-, ¹³C-, y ³¹P-NMR, y mediante análisis elemental (Tabla 3 y parte experimental).

ES 2 300 346 T3

TABLA 3

Cambios químicos mediante ¹³C-NMR, de 2'-desoxinucleósidos de pirazolo[3,4]-pirimidina ^{a)}

| | C (2) ^{b d)} C(6) ^{c)} | C(4) ^{d)} C(7a) | C(5) C (3a) | C(6) ^{d)} C(4) | C(7) C(3) | C=O/ =CH | C=O/ =CH | C (1') | C(2') | C(3') | C(4') | C(5') | |
|----|------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------|--------------|-------------|-------------|-----------|-------|---------------|-------|-------|------|
| 5 | 2a | 156.9 | 158.3 | 95.5 | 162.7 | 133.3 | --- | --- | 83.3 | 38.0 | 71.3 | 87.4 | 62.7 |
| 10 | 2b | 157.4 | 157.6 | 94.5 | 162.7 | 119.2 | --- | --- | 83.0 | 37.5 | 70.9 | 87.3 | 62.4 |
| | 5a | 152.2 | 154.8 | 100.5 | 156.1 | 136.1 | 168.5 | 169.1 | 83.6 | 37.7 | 71.1 | 87.7 | 62.5 |
| | 5b | 153.3 | 155.2 | 102.2 | 156.1 | 134.0 | 165.6 | 166.3 | 83.5 | 37.6 | 70.9 | 87.5 | 62.3 |
| | 6a | 152.2 | 154.8 | 100.5 | 155.9 | 135.9 | 168.5 | 169.2 | 83.7 | 38.1 | 70.8 | 85.6 | 64.3 |
| 15 | 6b | 153.3 | 155.3 | 102.3 | 156.1 | 132.2 | 165.7 | 166.4 | 83.7 | 38.0 | 70.9 | 85.6 | 64.4 |
| | 8a ^{f)} | 157.1 | 157.6 | 106.0 | 158.9 | 134.9 | 164.1 | 166.2 | 86.1 | 41.2 | 73.7 | 89.1 | 64.3 |
| | 8b | 156.1 | 156.1 | 103.6 | 157.9 | 121.4 | 162.1 | 164.4 | 83.3 | 37.5 | 70.8 | 87.5 | 62.2 |
| | 8b ^{g)} | 157.1 | 157.7 | 104.7 | 159.2 | 122.9 | 163. | 166.7 | 86.2 | 41.0 | 73.8 | 89.0 | 64.2 |
| 20 | 9 ^{o)} | 156.6 | 157.3 | 102.4 | 162.3 | 133.7 | 162.9 | --- | 83.1 | 37.8 | 71.2 | 87.3 | 62.6 |
| | 10a ^{h)} | 155.5 | 155.5 | 107.1 | 156.8 | 134.9 | 161.8 | 163.7 | 84.2 | 38.3 | 73.6 | 86.7 | 64.9 |
| | 10b | 156.0 | 156.1 | 103.8 | 157.8 | 121.3 | 162.1 | 164.4 | 83.5 | ^{e)} | 70.5 | 85.3 | 64.1 |

^{a)} Medido en (D₆)DMSO, a 298 K.°),

^{b)} Numeración de purina,

^{c)} Numeración sistemática,

^{d)} Tentativa

^{e)} Sobreimpuesto mediante (D₆)DMSO

^{f)} Medido en CDCl₃

1.2.- Oligonucleótidos

1.2.1.- Síntesis y caracterización

Se procedió a realizar la síntesis automática en fase sólida de los oligonucleótidos 102 - 116 (Tablas 4 -6), utilizando las fosforamiditas 7b y 11b, así como las fosforamiditas standard. Los oligonucleótidos, se desritilaron y se purificaron sobre cartuchos de purificación de oligonucleótidos, o mediante HPLC de fase inversa (condiciones para la purificación de la parte experimental). La homogeneidad de los compuestos, se probó, mediante cromatografía de intercambio de iones, en una columna de Nucleo-pac PA-100, de 4 x 250 nm (DIONEX P/N 043018, USA). La composición de lo oligómeros, se determinó mediante hidrólisis tándem, con fosfodiesterasa de veneno de serpiente y fosfatasa alcalina, tal y como se ha descrito anteriormente (véase la figura 2a,b)[2].

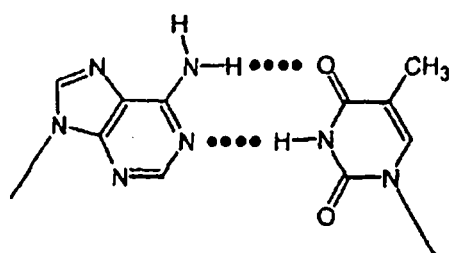
Los nucleósidos de 8-aza-desazapurina-2,6-diamina 2a, migran de una forma ligeramente más lenta que dA. El compuesto de bromo 2b, es mucho más hidrofóbico, tal y como puede verse a raíz de la figura 2b. A partir de los oligonucleótidos modificados, se tomaron espectros de masas MALDI-TOF (Tabla 6, parte experimental). En todos los casos, se encontró la masa correcta, la cual hacía resaltar el hecho de que, todos los grupos protectores, se separaban, con un tratamiento de un transcurso de tiempo de 10 horas, a 60°.

1.2.2.- Estabilidad de los dúplex

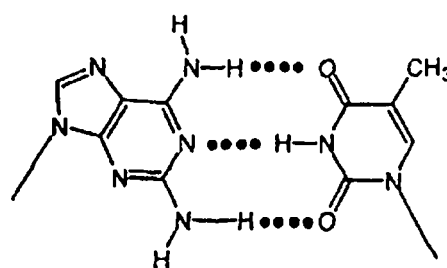
Debido a la presencia de los tres enlaces de hidrógeno, se espera que, el par de bases n²A_d-dT (II), muestre la misma estabilidad, o una estabilidad similar, que el par dG-dC (III). Los datos experimentales obtenidos a partir de los

experimentos de fusión de DNA, muestran el hecho de que, la estabilidad termodinámica de los dúplex que contienen un par de bases n^2A_d -dT, es algo mayor que aquél con un par dA-dT, pero permanece todavía muy por debajo de aquél de un par dG-dC. Se han realizado varios estudios, con objeto de explicar este dilema, pero no se obtenido, hasta ahora, una respuesta convincente. Un examen algo detallado sobre este asunto, es el que se ha emprendido por parte de Sagy y al. [11]. Este autor, procedió a comparar las estabilidades térmicas de un par de bases bidentado, representada por las formaciones dA-dU, dI-dC, dA-dT y dI- m^5C_d , con las de los pares tridentados tales como los n^2A_d -dT, dG-dC, dG- m^5C_d , y otros. Los experimentos, se realizaron con polinucleótidos alternantes sintetizados enzimáticamente. Siempre que el grupo 2-amino esté ausente (pares de bases bidentados), los varios dúplex, muestran todos ellos una estabilidad muy similar, independientemente de la estructura de bases particular. Mediante la inserción de un grupo 2-amino, lo cual conduce a la par de bases tridentado, esta similitud, desaparece. El par de bases dG-dC, es ahora mucho más estable que el par de bases n^2_d -dT. Los autores, notaron, también, un significativo efecto de los sustituyentes 5, unidos a la porción de pirimidina, mientras que, la presencia de un grupo 5-metilo, tiene como resultado una estabilización algo pequeña, los grupos alquilo superiores, desestabilizan el DNA.

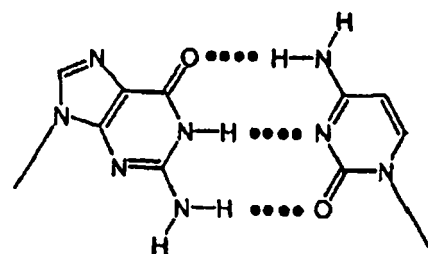
Esquema 4



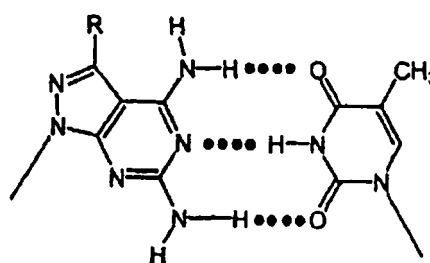
Par de bases I
de Watson Crick



Par de bases II
de Watson Crick



Par de bases III
de Watson Crick



Par de bases IV
de Watson Crick

R = H, Br

Con objeto de evaluar la influencia de los nucleósidos de 8-aza-7-desazapurina-2,6-diamina 2a,b, en la estabilidad del par de bases, en comparación con el nucleósido de purina 1, se procedió a incorporar la totalidad de los tres compuestos, en el dúplex no auto-complementario 5'-d(TAGGTCAATACT)(102) y 5'-d(AGTATTGACCTA)(103). Este dúplex, se utiliza como un patrón standard, en nuestro laboratorio, con objeto de estudiar la influencia de nucleósidos modificados en la estabilidad térmica y el comportamiento estructural de la formación helicoidal. El valor T_m de (102 · 103), es de 46°, en NaCl 0,1 M, en presencia de tampón de $MgCl_2$ 10 mM y de Na-cacodilato 10 mM. La incorporación de seis residuos de n^2A_d , en lugar de seis residuos de dA, incrementa el valor de T_m , en únicamente 4° (véase dúplex 104 · 105, Tabla 4). Esto corresponde a un incremento de T_m de 0,7° por residuo. Se han reportado unos descubrimientos similares, a partir de los experimentos realizados en otros laboratorios [5 - 12]. Cuando cuatro nucleósidos de 8-aza-7-desazapurina-2,6-diamina 2a, se encontraban reemplazando a dA, se midió un incremento del valor de T_m , que era ya de 46° a 52°, lo cual corresponde a un incremento de 1,5° por residuo modificado (compárense los dúplex 102 · 103 *versus* 108 · 109). Puesto que, el incremento de la estabilidad provocada por un residuo de n^2A_d , era de únicamente 0,7°, la 8-aza-7-desazapurina-2,6-diamina, forma un par de bases tridentado con dT, más estable, que el de la purin-2,6-diamina.

ES 2 300 346 T3

TABLA 4

Valor de la T_m y datos termodinámicos de oligonucleótidos de hebra antiparalela, que contienen 2'-desoxirribonucleótidos de purin-2,5-diamina y análogos relacionados de pirazolo[3,4-d]pirimidina.^{a)}

| | T_m [°C] | ΔH^0 [kcal/mol] | ΔS^0 [cal/mol·K] | ΔG^0_{310} [kcal/mol] |
|------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) | 46 | -86 | -230 | -10.3 |
| 5'-d(TIG GTC 11T 1CT) (104) • (105) 3'-d(ATC C1G TT1 TGA) | 50 | -58 | -155 | -11.2 |
| 5'-d(TAG GCC GGC ACT) (106) • (107) 3'-d(ATC CGG CCG TGA) | 65 | -92 | -247 | -16.0 |
| 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) • (109) 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) | 52 | -105 | -299 | -12.7 |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) • (111) 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) | 68 | -110 | -297 | -17.9 |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) | 56 | -85 | -232 | -12.9 |
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) • (111) 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) | 58 | -88 | -239 | -13.4 |

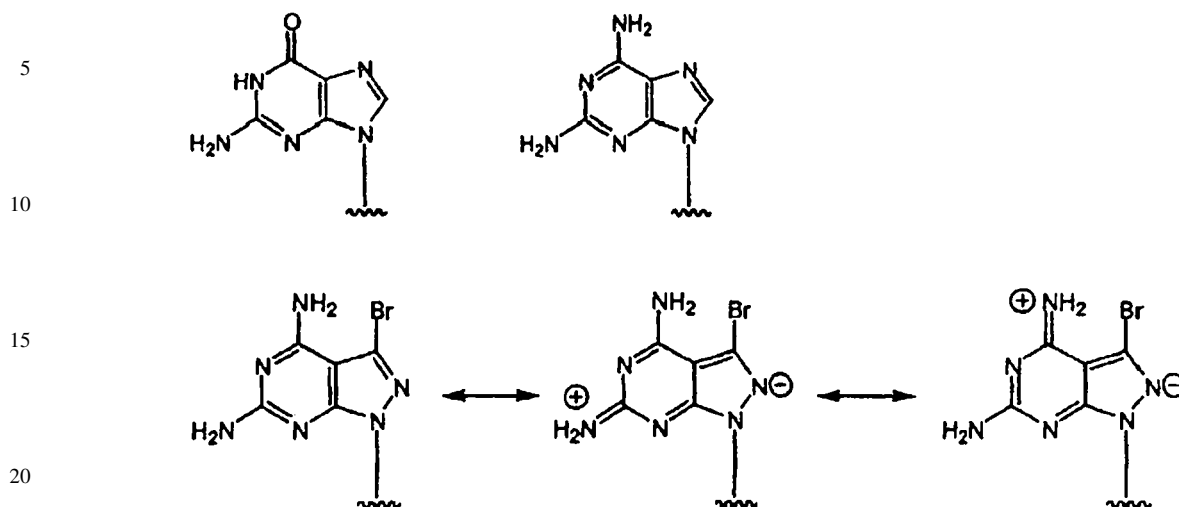
^{a)} Medido a 260 nm, en tampón de NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,1 M, y de Na-cacodilato 10 mM, pH 7,0, con una concentración de oligómeros de 5 + 5 μ M.

Se ha mostrado el hecho de que, los sustituyentes en la posición 7, de las 7-desazopurinas, así como de la 8-aza-7-desazopurina, se acomodan bien, en la estría mayor del DNA [1-3]. De una forma particular, los sustituyentes de halógeno, muestran unas propiedades muy favorables con respecto a la estabilidad de los dúplex. Esto, nos incitó a reemplazar los residuos de dA, ahora, por el derivado 7-bromo 2b. En concordancia con la Tabla 4, el dúplex (20 · 21), muestra una remarcable estabilidad. El valor de T_m , era de 68°, comparado al de 46° del dúplex con pares dA-dT. La estabilidad del dúplex, se refuerza con 5,5°, por base modificada. El dúplex (106 · 107), que contiene cuatro residuos de dG, en las mismas posiciones, conduce a un valor de T_m de 65°, lo cual corresponde a un incremento de la T_m de 5°. Así, de este modo, la estabilidad de una formación de par de bases IV (Esquema 4), el cual sigue a una formación de reconocimiento de dA-dT, es ahora tan estable como un par dG-dC (par de bases III).

Una explicación para esta inesperada observación, es la que puede darse en base a las diferencias de basicidad de los grupos amino de los nucleósidos de 8-aza-7-desazapurina-2,6-diamina 2a,b, en comparación con el nucleósido de purin-2,6-diamina 1. Tal y como se ha discutido anteriormente, arriba, el tercer enlace de hidrógeno del compuesto 1, contribuye muy poco a la estabilidad del par de bases n²A_d-dT (Esquema 4, par de bases II), mientras que, el grupo 2-amino de dG, realiza una gran contribución a la estabilidad de un par dG-dC. Con respecto a la estructura química de la molécula, ambos, el grupo amino de dG e isoG_d, son parte de una porción de guanidina acilada, la cual se espera que sea considerablemente menos básica que el grupo 2-amino de n²A_d, el cual es también una parte del sistema de guanidina siendo ahora aromático, pero que no se encuentra conectado con una porción de atracción del electrón. Estas diferencias, provocan la baja acidez del grupo 2-amino de 1, en comparación con dG ó isoG_d. Esta propiedad, es ya perceptible, en la extraordinaria resistencia del grupo 2-amino acilado de 1, contra la desprotección alcalina (véase anteriormente, arriba). A continuación, debe contestarse la cuestión referente al hecho de por qué, los compuestos 1 y 2b, son diferentes. Contrariamente al compuesto 1, pueden dibujarse estructuras mesoméricas de la base de compuestos 2a,b, con una carga positiva, bien ya sea en el grupo 2-amino, o bien ya sea en el grupo 6-amino, y uno negativo en el pirazol-nitrógeno-2.

Estas fórmulas mesoméricas, explican la acidez (basicidad reducida) del grupo 2-amino de 2a, con respecto a la de 1. Cuando se introduce un sustituyente de bromo u otros sustituyentes atrayentes de electrones, en la posición 7, este efecto, incluso se ve reforzado. Así, de este modo, el grupo 2-amino de 2a, se convertirá en un donante mejor para los enlaces de hidrógeno con dT, que el grupo 2-amino de 1. el sustituyente adicional de bromo, puede provocar algunos efectos favorables: (i) éste acidifica adicionalmente el grupo 2-amino; (ii) éste representa un grupo hidrofóbico en la estría mayor del dúplex de DNA; (iii) éster puede formar un enlace de hidrógeno con el grupo 2-amino. Aparte de estas propiedades de las unidades monoméricas, las condiciones del entorno medioambiental de la base, en los dúplex de ácido nucleico, deben modular la estabilidad de los pares de bases n²A-dT. De otro modo, no puede explicarse el motivo por el cual, la estabilidad de dichos pares de bases, es diferente, en los dúplex de DNA, los híbridos de DNA-RNA, o los dúplex de PNA.

Esquema 5



25 Todavía no se ha probado, si el valor de la T_m se incrementa linealmente, con el número de residuos de 8-aza-7-desazapurina incorporados. En el caso del compuesto 1, se ha emprendido dicho estudio, el cual mostró el hecho de que, en poli(dA-dT), existía una relación lineal, cuando el reemplazo de residuos de dA, por los residuos de n^2A_d , no excedía de un 50%. No obstante, no había un incremento adicional de la T_m , a una incorporación mayor de n^2A_d , cuando los valores de la T_m , se medían a una reducida concentración de sal. Se obtuvo una observación similar a la que se había realizado en oligonucleótidos sintéticos, para DNA del ciano-fago S-2L, que contiene n^2A_d , en lugar de dA [38].

35 Con objeto de identificar la estructura helicoidal de los dúplex, se procedió a medir el espectro CD de los dúplex 102 · 103 a 110 · 111 [39]. El espectro CD de todos los dúplex, indicaba una estructura de DNA semejante a B, con un efecto de Cotton positivo, a un valor de aproximadamente 270 nm a 290 nm, y un lóbulo negativo, a aproximadamente 250 nm (véase la figura 3a).

40 Se ha reportado el hecho de que, el nucleósido de purina 1, forma dúplex más estables, con RNA complementario, que con DNA [40]. Así, por lo tanto, los oligonucleótidos que contienen 1 ó 2a,b, se hibridaron con un oligorribonucleótido complementarios 114 (Tabla 5). En concordancia con la Tabla 5, el híbrido de DNA-RNA 104 · 114, muestra un incremento de la T_m , con respecto al del residuo progenitor 102 · 114. el residuo de 8-aza-7-desazapurin-2,6-diamina 2a, muestra un efecto similar al de 1. Se observa una estabilización adicional, cuando se incorpora el compuesto de bromo 2b. Todos los espectros CD del híbrido de DNA-RNA (véase la figura 3b), adoptan la forma de un A-DNA.

TABLA 5

45 *Valores de la T_m y valores termodinámicos de híbridos de RNA-DNA y DNA-DNA. ^{a)}*

50

55

| | T_m [°C] | ΔH^0 [kcal/mol] | ΔS^0 [cal/mol · K] | ΔG^0_{310} [kcal/mol] |
|---------------------------------------------------------------|------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) · (114) 3'-(AUC CAG UUA UGA) | 45 | -92 | -264 | -10.2 |
| 5'-d(TIG GTC 11T 1CT) (104) · (114) 3'-(AUC CAG UUA UGA) | 48 | -60 | -162 | -11.0 |
| 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) · (114) 3'-(AUC CAG UUA UGA) | 48 | -89 | -263 | -11.0 |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) · (114) 3'-(AUC CAG UUA UGA) | 53 | -93 | -258 | -12.4 |

60

65 ^{a)} Véase la Tabla 4.

ES 2 300 346 T3

Finalmente, se procedió a estudiar las propiedades de apareamiento de bases de los nucleósidos 1 y 2a,b, en DNA de hebras paralelas (ps.DNA)[37],[42]. Para este propósito, fue necesario el proceder a cambiar el par dC-dG por un par m⁵iC_d-dG y/o un par dC-iG_d. Como dúplex standard, se eligieron los híbridos (102 · 115) ó (116 · 103). En ambas series de experimentos, la purin-2,6-diamina (1), desestabilizó los ps-híbridos (104 · 115 y 116 · 105). El nucleósido 2a, condujo ya a dúplex ligeramente más estabilizados (véase la tabla 6). Como en el caso del DNA antiparalelo, el derivado de bromo 2b, dio como resultado un significativo incremento del valor de T_m (110 · 115 t 116 · 111). Los dos juegos del espectro CD (Figuras a,b), de los ps-dúplex, son algo diferentes a los de los aps-híbridos (véase la Figura 4a).

A raíz de estos resultados, se evidencia el hecho de que, el grupo 2-amino, provoca la desestabilización en las series de los compuestos de purina, y reduce el efecto estabilizante observado en aps-DNA, de una forma significativa. Este comportamiento, no es sorprendente, puesto que se había observado ya el hecho de que, la purin-2-amina u 8-aza-7-desazapurin-2-amina, mono-sustituídas, tienen una influencia algo desfavorable en la estabilidad del ps-DNA [36][42].

TABLA 6

Valores de la T_m y valores termodinámicos de oligonucleótidos de hebra paralela, formados mediante oligonucleótidos que contienen iG_d y m⁵iC_d.^{a,b})

| | | | | |
|---------------------------------------------|----|-----|------|-------|
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102)·(115) [37] | 39 | -74 | -211 | -8.8 |
| 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) | | | | |
| 5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) ·(115) | 36 | -76 | -200 | -7.9 |
| 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108)· (115) | 41 | -62 | -171 | -9.0 |
| 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) · (115) | 45 | -67 | -184 | -10.2 |
| 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) | | | | |
| 5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) · (103)[37] | 44 | -85 | -242 | -10.3 |
| 5'-d(AGT ATT GAC CTA) | | | | |
| 5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) · (105) | 39 | -61 | -170 | -8.4 |
| 5'-d(AGT 1TT G1C CTA) | | | | |
| 5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) · (109) | 45 | -80 | -230 | -10.3 |
| 5'-d(AGT 2aTT G2aC CTA) | | | | |
| 5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) · (111) | 48 | -68 | -186 | -10.9 |
| 5'-d(AGT 2bTT G2bC CTA) | | | | |

^a) Medido a 260 nm, en tampón de NaCl 0,1 M, I₂ 60 mM, y Na-cacodilato 60 mM, pH 7,0, con una concentración de oligómeros de 5 + 5 μM.

^b) d(iC) = m⁵iC_d = 2'-desoxi-5-metilisocitidina.

Los dos grupos amino de los nucleósidos de 8-aza-7-desazapurina 2a,b, pueden protegerse con, o bien ya sea residuos de benzofilo, o bien ya sea grupos de dibutilaminometileno, sin provocar problemas de despurinación, durante la destrilación ácida o la desprotección, bajo condiciones standard, en amoníaco. No se observan los problemas de despurinación y una estabilidad extraordinariamente alta de los grupos protectores 2-amino del nucleósido de purin-2,6-diamina, 1.

ES 2 300 346 T3

1.3.- Parte experimental

Monómeros

5 General. Véase [2]. Cromatografía flash (de evaporación instantánea)(FC): 0,4 bar en gel de sílice 60 H (Merck, Darmstadt, Alemania). Cromatografía de capa fina (TLC): gel de sílice en hojas de aluminio, 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck, Alemania). Exploración TLC: Scanner CS-930 TLC (Shimadzu, Japón). Sistema de disolventes para cromatografía flash (FC)(de evaporación instantánea) y TLC: CH₂Cl₂/MeOH 98 : 2 (A) CH₂Cl₂/MeOH 95 : 5 (B), CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1 (C), CH₂Cl₂/acetona 95 : 5 (D), CH₂Cl₂/acetona 9 : 1 (E), CH₂Cl₂/EtAc 85 : 15 (F), M.p.: Aparato Büchi - SMP-20
10 (Büchi, Suiza); incorregido. Espectro de NMR: Espectrómetros Avance -DPX-250 y AMX-500 (Bruker, Alemania); los valores δ , son en ppm, campo abajo del SiMe₄(¹H, ¹³C) interno. Se realizó un microanálisis, por Mikroanalytisches Labor Beller (Göttingen, Alemania).

Oligonucleótidos

15 Síntesis y purificación de oligonucleótidos 102 - 116. la síntesis, se llevó a cabo en un sintetizador automático de DNA (Applied Biosystems, model ABI 392 - 08, para la química de la fosforamidita), en una escala de 1 μ mol, con 3'-fosforamiditas de [(MeO)₂Tr]b²G_d, [(MeO)₂Tr]bz⁶A_d, [(MeO)₂Tr]bz⁴G_d, y [(MeO)₂Tr]T_d, conjuntamente con las fosforamiditas de los derivados 7d y 11b. La síntesis de los oligómeros, siguió el protocolo regular del sintetizador de ADN para fosforamiditas. Después de la segmentación del soporte sólido, los oligómeros, se desprotegieron en 25% NH₃/H₂O (12 - 15 horas, a una temperatura de 60°). La purificación de los 5'-(dimetoxitritil)-oligómeros, se realizó mediante cartuchos de OPC, así como mediante HPLC de fase inversa (RP-18). Se utilizó el siguiente gradiente de disolventes (A, MeCN, B, 0,1 M (Et₃NH)OAc (pH 7,0)/MeCN 95 : 5): 3 minutos 20% A en B, 12 minutos 15 - 40% A en B, con un caudal de flujo de 1,0 ml/minuto. Para retirar los residuos de 4,4'-dimetoxitritilo, éstos se trataron con
25 2,5% CHCl₂COOH/CH₂Cl₂, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, a la temperatura ambiente. Los oligómeros destritolados, se purificaron mediante HPLC de fase inversa, con el gradiente: 20 minutos 0 - 20% A en B, con un caudal de flujo de 1 ml/minuto. Los oligómeros, se desalaron en una columna corta (RP-18, gel de sílice), utilizando H₂O para la elución de la sal, mientras los oligómeros, se eluyeron con MeOH/H₂O 3 : 2. Los oligómeros, se liofilizaron en un evaporador Speed - Vac, para proporcionar sólidos incoloros, los cuales se congelaron a una temperatura de
30 -24°.

TABLA 7

35 Masas moleculares M⁺ de los oligonucleótidos 12,13 y 18 - 21, determinadas por Espectrografía de Masas MALDI-TOFF

| 40 | 1.- Oligómero | 2.- M+ (calculado) | 3.- M+ (encontrado) |
|----|-------------------------------|--------------------|---------------------|
| | 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 3644.4 | 3645 |
| | 5'-d(AGT ATT GAC CTA) (103) | 3644.4 | 3645 |
| | 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) | 3674.4 | 3677 |
| 45 | 5'-d(AGT 2aTT G2aC CTA) (109) | 3674.4 | 3675 |
| | 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) | 3832.5 | 3830 |
| | 5'-d(AGT 2bTT G2bC CTA) (111) | 3832.5 | 3832 |

50

Los espectros de MALDI-TOF, se midieron en un Biflex III, por parte de Dr. T. Wenzel (Bruker Sajonia, Alemania). Análisis de la composición de nucleótidos. Los análisis, se realizaron tal y como se describe en [37]. Coeficientes de extinción de los constituyentes nucleósidos: ϵ_{260} : dA 15400, dT 8800, dG 11700, dC 7600, iG_d 7400, m⁵iC_d 6300, 2a 8800, 2b 8700. La fosfodiesterasa de veneno de serpiente (EC 3.1.4.1., Crotallus durissus) y la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1., *E. coli*), se obtuvieron de procedencia de la firma Roche Diagnostics GmbH, Alemania.

55

La determinación de los valores de T_m, y los datos termodinámicos, *versus* perfiles de temperatura, se midieron en un espectrómetro Cary-1/1E UV/VIS (Varian, Australia), equipado con un controlador termoelectrónico Cary. Los valores de T_m, se determinaron en la célula de referencia con un resistor Pt-100, y los datos termodinámicos, se calcularon utilizando el programa Meltwin 3.0 [43].

60

Espectro de dicroísmo circular. El espectro CD, se registró con un espectropolarímetro Jasco-600 (Jasco, Japón), con cubetas de 1 cm, termostáticamente controladas (Baño Lauda - RSC-6).

65

Espectro UV: Espectrómetro 150 - 20 (Hitachi, Japón).

ES 2 300 346 T3

3-bromo-1-[2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (2b)

Se procedió a calentar una solución del compuesto 4b [18], en NH₃ acuoso al 25% (80 ml), a una temperatura de 70°C, durante un transcurso de tiempo 4 días, en un recipiente de acero. El disolvente, se evaporó y, el residuo, se disolvió en H₂O. Después del enfriado, aconteció una cristalización. Agujas incoloras (646 mg, 72%). Punto de fusión 155°. TLC (C): R_f 0,2. UV (MeOH): 260 (8700), 278 (9000).

¹H-NMR(D₆)DMSO: 2,16 2,68 (2m, H₂-C(2')); 3,38, 3,48 (2m, H₂-C(5')); 3,77 (m, H-C(4')); 4,36 (m, H-C(3')); 4,72 (t, J = 4,9 HO-C(5')); 5,19 (d, J = 4,1 HO-C(3')); 6,23 ('t', J = 6,5, H-C(1')); 6,39 (s, NH₂); 6,77 (br, NH₂).

Cálculo analítico para C₁₀H₁₃BrN₆O₃ (345,2): C 34,80, H 3,80, N 24,35; encontrado: C 34,97, H 3,97, N 24,21.

N⁴,N⁶-bis(fenoxiacetil)-1-[2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (5a)

Se procedió a secar el compuesto 2a [15] (1,5 g, 5,6 mmol), mediante evaporación, con piridina. El residuo, se disolvió en piridina (25 ml), y se añadió cloruro de trimetilsililo (3,3 ml, 26 mmol), a la temperatura ambiente, bajo régimen de agitación. Se continuó con la agitación, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, y se añadió una solución de 2,4,5-triclorofenilfenoxiacetato (5,4 g, 16,4 mmol) [27] en piridina (15 ml), en una porción. La mezcla de reacción, se agitó durante un transcurso de tiempo de 16 horas, a una temperatura de 40°. Ésta se enfrió (baño de hielo), y se añadió H₂O (4,2 ml). Después de un transcurso de tiempo de 5 minutos, se introdujo NH₃ acuoso al 25% (6 ml) y, la mezcla, se concentró hasta secado. Al residuo se le aplicó FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]) (eluyente: A -> C), proporcionando una espuma incolora (900 mg, 30%). TLC (C): R_f 0,4. UV (MeOH): 266 (9100).

¹H-NMR(D₆)DMSO: 2,66, 2,82 (2m, H₂-C(2')); 3,34, 3,48 (2m, H₂-C(5')); 3,82 (m, H-C(4')); 4,44 (m, H-C(3')); 4,73 (t, J = 5,5, HO-C(5')); 5,14 (s, OCH₂); 5,17 (d, J = 4,3 HO-C(3')); 6,60 ('t', J = 6,5, H-C(1')); 6,92 - 7,32 (m, arom. H); 8,41 (s, H-C(3)); 10,77 (s, NH); 11,30 (s, NH).

Cálculo analítico para C₂₆H₂₆N₆O₇ (534,5): C 58,42, H 4,90, N 15,72; encontrado: C 58,68, H 4,78, N 15,20.

N⁴,N⁶-bis(fenoxiacetil)-1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (6a)

Se procedió a co-evaporar el compuesto 5a (0,8 g, 1,5 mmol), dos veces, con piridina. El residuo, se disolvió en piridina (25 ml), y se añadió cloruro de trimetilsililo (2 ml), y se añadió cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,6 g, 1,77 mmol). Se continuó con el régimen de agitación, a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo de 4 horas y, a continuación, se procedió a diluir la solución con MeOH (5 ml), y ésta se lavó con bicarbonato sódico acuoso, al 5% (3 x 20 ml). La fase orgánica, se lavó (Na₂SO₄) y se concentró hasta secado. El residuo, se purificó mediante FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]) (eluyente: D -> E), proporcionando una espuma incolora (310 mg, 250%). TLC (E): R_f 0,4. UV (MeOH): 266 (8900).

¹H-NMR(D₆)DMSO: 2,32 - 2,81 (2 m, H₂-C(2')); 2,99 (2 m, H₂-C(5')); 3,67 (2s, OCH₃); 3,95 (m, H-C(4')); 4,53 (m, H-C(3')); 5,15 (s, OCH₂); 5,33 (d, J = 4,7, HO-C(3')); 6,62 ('t', J = 6,3 H-C(1')); 6,69 - 7,31 (m, arom. H); 8,36 (s, H-C(3)); 10,83 (s, NH); 11,56 (s, NH).

Cálculo analítico para C₄₇H₄₄N₆O₉ (836,9): C 67,45, H 5,30; N 10,04; encontrado: C 66,95, H 5,41, N 10,15.

N⁴,N⁶-bis(fenoxiacetil)-1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamin-3'-(2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidita(7a)

Se procedió a añadir, a una solución del compuesto 7^a (0,15 g, 0,18 mmol) en THF (0,5 ml), (¹Pr)₂EtN (0,12 ml, 0,71 mmol, y 2-cianoetildiisopropilfosforamidoclorhidrato. A continuación, la mezcla, se diluyó con CH₂CH₂ (20 ml) y NaHCO₃ acuoso al 5%. La mezcla, se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 15 ml). Las fases orgánicas combinadas, se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron, para proporcionar un aceite. El residuo, se sometió a FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]) (eluyente: F), proporcionando una espuma incolora (80 mg, 43%). TLC (F): R_f 0,8. ³¹P-NMR (CDCl₃): 149,2, 149,4.

N⁴,N⁶-bis(benzoil)-1-[2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (5b)

Se procedió co-evaporar el compuesto 2a [17] (1 g, 3,8 mmol), dos veces, con tolueno, y se disolvió en piridina (40 ml) y TMS-Cl (4,0 g, 36,8 mmol). La mezcla de reacción, se agitó bajo atmósfera de argón, se enfrió a una temperatura de 0°, y se añadió PhCOCl (6,6 ml, 57 mmol), mediante goteo, a la solución, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Después de agitar durante el transcurso de toda la noche, a la temperatura ambiente, la mezcla, se diluyó en EtAc (200 ml) y se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico (200 ml) y H₂O enfriada con hielo (200 ml).

ES 2 300 346 T3

La capa acuosa, se extrajo con EtOAc (2 x 400 ml). Las capas orgánicas combinadas, se evaporaron hasta secado, y se disolvieron en THF/MeOH/H₂O 5 : 4 : 1 (250 ml). La solución de color naranja oscuro obtenida, se enfrió a una temperatura de 0°, y se añadió NaOH 2N (25 ml), mientras se continuaba la agitación, durante un transcurso de tiempo de 40 minutos. El residuo, se purificó mediante FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]-) (eluyente: A -> C), proporcionando un sólido amorfo. TLC (B): R_f 0,3. UV (MeOH): 245 (16400), 274 (15200).

¹HNMR(D₆)DMSO: 2,13, 2,67 (2m, H₂-C(2')); 3,38, 3,52 (2m, H₂-C(5')); 3,84 (m, H-C(4')); 4,46 (m, H-C(3')); 4,72 (t, J = 5,7, HO-C(5')); 5,29 (d, J = 4,4, HO-C(3')); 6,66 (*t', J = 6,5, H-C(1')); 7,51 - 8,11 (m, arom. H); 8,40 (s, H-C(3)); 10,95 (s, NH); 11,49 (s, NH).

Cálculo analítico para C₂₄H₂₂N₆O₅ (774,5): C 60,75, H 4,67, N 17,71; encontrado: C 61,03, H 4,70, N 17,58.

N⁴,N⁶-bis(benzoil)-1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pento-furanosil]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (6a)

Se procedió de la misma forma que la descrita para 6a, con 5a (500 mg, 1,05 mmol), y DMT-Cl (460 mg, 1,25 mol) en piridina (3 ml). El residuo, se purificó mediante FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]-) (eluyente: D -> E), proporcionando 400 mg (49%) de una espuma incolora. TLC (E): R_f 0,4. UV (MeOH): 244 (16400), 275 (15200).

¹HNMR(D₆)DMSO: 2,35, 2,67 (2m, H₂-C(2')); 3,07, 3,10 (2m, H₂-C(5')); 3,68, 3,69 (2s, OCH₃); 3,97 (m, H-C(4')); 4,56 (m, H-C(3')); 5,35 (d, J = 4,8, HO-C(3')); 6,72 - 8,11 (m, arom. H); 8,36 (s, H-C(3)); 11,01 (s, NH); 11,54 (s, NH).

N⁴,N⁶-bis(benzoil)-1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pento-furanosil]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamin-3'[(2-cianoetil)N,B-diisopropilfosforamidita] (7b)

Se procedió de la misma forma que la descrita para 7a, con 6b (110 mg, 0,14 mmol), (iPr)₂EtN (75 μl, 0,43 mmol) y 2-cianoetildiisopropilfosforamidoclorhidrato (38, 0,43 mmol) y 2-cianoetildiisopropilfosforamidoclorhidrato (38 μl, 0,17 mmol) en THF (3 ml), a una temperatura de 30°. El único residuo, se sometió a FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]-) (eluyente: F), proporcionando 92 mg (67%) de una espuma incolora. TLC (F): R_f 0,8. ³¹P-NMR (CDCl₃): 149,82, 149,63.

N⁴,N⁶-bis(di-n-butilamino)metilen)-1-[2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (8a)

A una suspensión de 2a (300 mg, 1,13 mmol) en MeOH (5 ml), régimen de agitación, se le añadió N,N-di-n-butiformamida-dimetilacetil (790 ó N,N-di-n-butiformamida-dimetilacetil (790 μl, 3,39 mmol). Se continuó con el régimen de agitación, durante un transcurso de tiempo de 2 horas, a una temperatura de 40°C. La mezcla de reacción, se evaporó hasta secado y, el residuo, se adsorbió en gel de sílice. La FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]-) (eluyente: A -> B), proporcionó dos productos principales.

De la zona que migró más rápidamente, se aisló una espuma incolora (330 mg, 53%). TLC (B): R_f 0,4. UV (MeOH): 235 (22800), 274 (13800), 322 (25700).

¹HNMR(D₆)DMSO: 0,87 - 0,95 (m, CH₂CH₃); 1,26 - 1,38 (m, CH₂CH₃); 2,42, 2,92 (m, H₂-C(2')); 3,26 - 3,72 (2m, H₂-C(5'), NCH₂); 3,88 (m, H-C(4')); 4,39 (m, H-C(3')); 4,78 (t, J = 5,8, HO-C(3')); 5,21 (d, J = 4,8, HO-C(3')); 6,55 (*t', J = 6,9 H-C(1')); 7,93 (s, H-C(3)); 8,66 (s, N = CH); 8,88 (s, N=CH).

Cálculo analítico para C₂₈H₄₉N₈O₃ (544,7): C 61,74, H 8,88, N 20,57; encontrado: C 61,71, H 8,91, N 20,57.

De la zona que migró más lentamente, se obtuvo la [2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil]-N⁶-((di-n-butilamino)metilen)-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (9a) (80 mg, 17%). TLC (B): R_f 0,3. UV (MeOH): 235 (23000), 275 (14900), 320 (22100).

¹HNMR(D₆)DMSO: 0,88 - 0,95 (m, CH₂CH₃); 1,27 - 1,38 (m, CH₂CH₃); 1,53, 1,62 (m, CH₂CH₂), 2,21 (m, H-C(2')); 2,91 (m H-C(2')); 3,38 - 3,59 (2m, H₂-C(5'), NCH₂); 3,79 (m, H-C(4')); 4,40 (m, H-C(3')); 4,78 (t, J = 5,8, HO-C(3')); 5,19 (d, J = 4,4, HO-C(3')); 6,36 (s, NH₂); 6,40 (*t', J = 6,5 H-C(1')); 7,77 (s, H-C(3)); 8,69 (s, N = CH).

Cálculo analítico para C₁₉H₃₁N₇O₃ (404,5): C 56,28, H 7,71, N 24,18; encontrado: C 55,98, H 7,52, N, 24,5.

ES 2 300 346 T3

N⁴,N⁶-bis((di-n-butilamino)metilen)-3-bromo-1-[2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (8b)

Se procede de la misma forma que la que se ha descrito para 8a, con 2b (350 mg, 1 mmol) y N,N-di-n-butilformamida-dimetilacetil (720 μl, 3,1 mmol) en MeOH (7 ml), agitando durante un transcurso de tiempo de 2 horas, a 40°. Después de haber procedido a realizar la FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]-) (eluyente: A -> B), se aislaron dos productos principales.

La zona que migró más rápidamente, proporcionó 8a, como una espuma (310 mg, 50%). TLC (B): R_f 0,3. UV (MeOH): 235 (22500), 275 (14500), 320 (22100).

¹HNMR(D₆)DMSO: 0,94 - 0,99 (m, CH₂CH₃); 1,32 - 1,44 (m, CH₂CH₃); 1,59, 1,73 (m, CH₂CH₂), 2,21 (m, H-C(2')); 2,91 (m, H-C(2')); 3,32 - 3,78 (2m, H₂-C(5'),NCH₂); 3,89 (m, H-C(4')); 4,40 (m, H-C(3')); 4,78 (t, J = 5,8, HO-C(5')); 5,19 (d, J = 4,4, HO-C(3')); 6,81 ('t', J = 6,5 H-C(1')); 8,69 (s, N=CH); 8,94 (s, N=CH).

Cálculo analítico para C₂₈H₄₇BrN₈O₃ (623,6): C 53,93, H 7,60, N 17,97; encontrado: C 50,01, H 7,52, N 18,05.

La zona que migró más lentamente, proporcionó la 3-bromo-1-[2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil]-N⁶-((di-n-butilamino)-metilen)-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (9b) (75 mg, 16%). TLC (B): R_f 0,3. UV (MeOH): 236 (21600), 276 (14000), 320 (21900).

¹HNMR(D₆)DMSO: 0,90 - 0,96 (m, CH₂CH₃); 1,30 - 1,39 (m, CH₂CH₃); 1,59, 1,73 (m, CH₂CH₂), 2,23 (m, H-C(2')); 2,89 (m H-C(2')); 3,35 - 3,78 (2m, H₂-C(5'),NCH₂); 3,84 (m, H-C(4')); 4,43 (m, H-C(3')); 4,80 (t, J = 5,7, HO-C(3')); 5,23 (d, J = 4,6, HO-C(3')); 6,40 (s, NH₂); 6,81 ('t', J = 6,4 H-C(1')); 8,65 (s, N = CH).

Cálculo analítico para C₁₉H₂₀BrN₇O₃ (484,4): C 47,11, H 6,24, N 20,24; encontrado: C 47,23, H 6,52, N 20,35.

1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-N⁴-((di-n-butilamino)metilen)-N⁶-formil-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (10a)

Se procede de la misma forma que la que se ha descrito para 6a, con 8a (80 mg, 0,15 mmol), DMT-Cl (60 mg, 0,18 mmol) en piridina (0,5 ml). El residuo, se purificó mediante FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]-) (eluyente: D -> E), proporcionando 85 mg (77%) de una espuma incolora. TLC (E): R_f 0,3. UV (MeOH): 235 (22800), 276 (20000), 320 (24800).

¹HNMR(CDCl₃): 0,98 - 1,05 (m, CH₂CH₃); 1,14 - 1,48 (m, CH₂CH₃); 1,65 - 1,78 (m, CH₂CH₂), 2,42 2,92 (m, H₂-C(2')); 3,35 - 3,70 (2m, H₂-C(5')NCH₂), 3,71 (s, OCH₃); 4,06 (m, H-C(4')); 4,39 (m, H-C(3')); 5,21 (d, J = 4,8,HO-C(3')); 6,55 ('t', J = 6,6, H -C(1')); 6,76 - 7,96 (m, arom. H); 7,94 (d, J = 10,5, NH); 7,96 (s, H-C(3)); 8,81 (s, N=CH); 9,57 (d, J = 10,5 CHO).

Cálculo analítico para C₄₁H₄₉N₇O₆ (735,9): C 66,92, H 6,71, N 13,32; encontrado: C 66,81, H 6,56, N 13,40.

3-bromo-1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-N⁴-((di-n-butilamino)metilen)-N⁶-formil-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (10b)

Se procede de la misma forma que la que se ha descrito para 6a, con 8b (310 mg, 0,5 mmol), DMT-Cl (222 mg, 0,6 mmol) en piridina (0,2 ml). El residuo, se purificó dos veces mediante FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]-) (eluyente: D -> E), proporcionando 250 mg (61%) de una espuma incolora. TLC (E): R_f 0,3. UV (MeOH): 235 (22900), 276 (21100), 320 (25300).

¹HNMR(D₆)DMSO: 0,90 - 0,96 (m, CH₂CH₃); 1,28 - 1,37 (m, CH₂CH₃); 1,61 - 1,68 (m, CH₂CH₂), 2,21 (m, H-C(2')); 2,91 (m, H-C(2')); 3,03 (2m, H₂-C(5')NCH₂), 3,35 - 3,52 (m, NCH₂); 3,69 (s, OCH₃); 3,90 (m, H-C(4')); 4,48 (m, H-C(3')); 5,32 (d, J = 4,7, HO-C(3')); 6,46 ('t', J = 6,2, H-C(1')); 6,73 - 7,31 (m, arom. H); 8,99 (s, N=CH); 9,56 (d, J = 9,89, NH); 10,77 (d, J = 9,88, CHO).

Cálculo analítico para C₄₁H₄₈BrN₇O₆ (814,8): C 60,44, H 5,94, N 12,03; encontrado: C 60,,36, H 5,73, N 11,85.

1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-N⁴-((di-n-butilamino)metilen)-N⁶-formil-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamin-3'[(2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidita (11a)

Se procede de la misma forma que la que se ha descrito para 7a, con 10a (110 mg, 0,15 mmol), (iPr)₂EtN (78 μl, 45 mmol) y 2-cianoetildiisopropilfosforamidoclorhidrato (47 μl, 0,2 mmol) en THF (2 ml). El aceite resultante, se sometió a FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]-) (eluyente: F), proporcionando 75 mg (53%) de una espuma incolora. TLC (F): R_f 0,8. ³¹P-NMR(CDCl₃)DMSO: 149,58, 149,52.

ES 2 300 346 T3

3-bromo-1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-N⁴-((di-n-butilamino)metilen)-N⁶-formil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamin-3'[(2-ciano-etil)N,N-diisopropilfosforamidita (11a)

Se procede de la misma forma que la que se ha descrito para 7a, con 10b (90 mg, 0,11 mmol), (iPr)₂EtN (63 μl, 0,36 mmol) y 2-cianoetildiisopropilfosforamidoclorhidrato (31 μl, 0,14 mmol) en THF (1 ml). El aceite resultante, se sometió a FC (cromatografía flash - [de evaporación instantánea]-) (eluyente: F), proporcionando 80 mg (72%) de una espuma incolora. TLC (F): R_f 0,8. ³¹P-NMR(CDCl₃)DMSO): 149,58, 149,53.

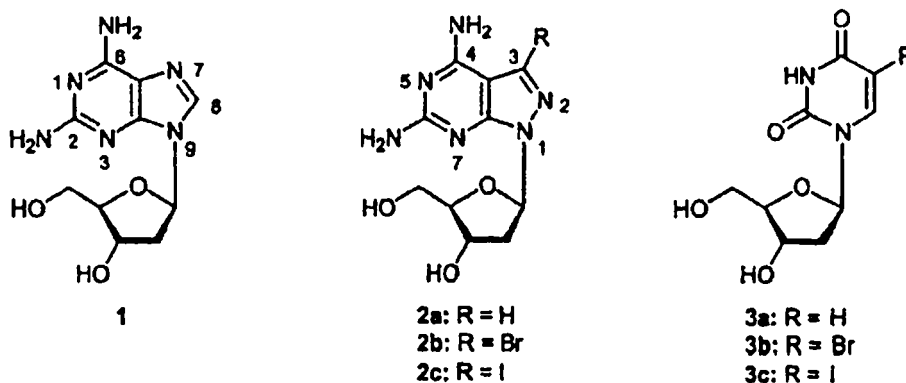
Ejemplo 2

Síntesis de los 7-yodo-derivados

Se procedió a sintetizar los oligonucleótidos que contenían bases de "purina" halogenada y de pirimidina. se introdujeron los sustituyentes bromo y yodo, en la posición 7 de la 8-aza-7-desazapurin-2,6-diamina (2b,c), o en la posición 5 de residuos de uracilo (3b,c). La fosforamiditas, se sintetizaron utilizando el residuo isobutirilo, para la protección de 2b, y el grupo benzoilo, para 2c. Los dúplex que contenían residuos 2b ó 2c, proporcionaban siempre unos mayores valores de la T_m, que los correspondientes a aquéllos de las contrapartes no modificadas que contenían 2'-desoxiadenosina, la purni-2,6-diamin-2'-desoxirribonucleósido, ó 2a, en las mismas proporciones. Dos residuos 2b, reemplazando a dA, en los dúplex 5'-d(TAGGTCAATACT) (102) · 5'-d(AGTATTGACCTA) (103), aumentaron el valor de la T_m, de 48° a 75° (4,5° por modificación). Contrariamente a esto, la incorporación de 2'-desoxiuridinas 5-halogenadas 3b ó 3c, en los dúplex de oligonucleótidos, mostraron muy poca influencia en la estabilidad térmica, independientemente del hecho de cual sea el nucleósido de "purina" que se encuentre localizado opuesto a éstos. Los efectos positivos de la estabilidad térmica observada en el DNA, se encontraron en los híbridos de DNA - RNA ó DNA con orientación de cadena paralela.

Los datos que se proporcionan a continuación, comparan los efectos de los sustituyentes de halógeno, tales como el bromo y el yodo, introducidos en la posición 7 de los 8-aza-7-desazapurin-2,6-diamin-2'-desoxirribonucleósidos 2b, c, y los derivados de 2'-desoxiuridina 3b, c (se utiliza la numeración de purina; véase el esquema 6). Estos nucleósidos, se incorporarán en varias posiciones de dúplex de DNA y, el número de incorporaciones, se incrementará, por etapas. Puesto que, los sustituyentes de halógeno, se dirigen a la estría o acanaladura mayor, en ambas series, los nucleósidos de "purina" y pirimidina, era de interés el proceder a cuantificar los efectos. Adicionalmente, además, el efecto de la múltiple incorporación, se investigará, ya que se conoce, a raíz de otros nucleósidos estabilizadores de dúplex, el hecho de que, el nivel de efectos estabilizadores, se nivelan, con un incrementante número de incorporaciones de nucleósidos modificados (C. Bailly, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 4309, y las referencias citadas en éste; J. Sági, E. Szakonyi, M. Vorlickova, J. Kypr., *J. Biomolec. Struct. Dyn.* 1996. 13, 1035). Los dúplex de oligonucleótidos que incorporan 7-desazapurinas 7-halogenadas (= pirrolo(2,3-dipirimidinas), muestran diferencias en las series de los compuestos 7-yodo y 7-bromo (F. Seela, M. Zulauf, *Chem. Eur. J.* 1998, 4, 1781), las cuales resultan de los requerimientos espaciales de los halógenos (van der Waals radii: Br = 1,85 Å; I = 1,98 Å (A. Bondi, *H. Phys. Chem.* 1964, 68, 441) y/o el carácter más hidrofóbico de los sustituyentes de yodo, en comparación con los residuos de bromo. Así, de este modo, el 7-yodo-derivado del nucleósido 8-aza-7-desazapurin-2,6-diamina (2c), se sintetizó, se convirtió en una fosforamidita, y se sintetizaron un gran número de oligonucleótidos que contenían el nucleósido 8-aza-7-desazapurin-2,6-diamina 7-yodado 2c. Una comparación de la estabilidad térmica de estos dúplex, ilustrará las diferencias de encuentro en la estabilización de dúplex, en halógenos introducidos en residuos de pirimidina u 8-desaza-7-desazapurina, localizados en un entorno medioambiental similar de la estría o acanaladura mayor de un B-DNA.

Esquema 6



numeración
de purina

numeración
sistemática

ES 2 300 346 T3

2.1.- Síntesis y propiedades de monómeros

El 2'-desoxinucleósido de 8-aza-7-desazapurin-3,6-diamina 7-yodada 2c, se preparó a partir del compuesto de 6-isopropoxi 4 (F. Seela, G. Becher, Synthesis 1998, 2, 207), mediante tratamiento con NH₃ acuoso al 25%, a una temperatura de 70°C, durante un transcurso de tiempo de 4 días, en una autoclave. Los nucleósidos halogenados 2a, b F. (Seela, G. Becher, Synthesis 1998, 2, 2007), así como los derivados 2'-desoxiyuridina 3a-c, se han descrito ya, en otros sitios (J. Asakua, M. J. Robins, J. Org. Chem. 1990, 55, 4928). Los sustituyentes de halógeno, cambian al movilidad de los nucleósidos en una columna de RP-HPLC, con los 2c y 3c yodados, como los compuestos que migran más lentamente (Figura 5a,b). Los tiempos de retención, se refieren al carácter hidrofóbico de los nucleósidos; los datos, se utilizaron, más tarde, para el análisis de composición de los oligonucleótidos modificados en la base.

Datos del compuesto de yodo

TABLA 8

Valores de vida media (τ) de 2c, a 25°

| Compuesto | τ (minutos) | λ (nm) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------|
| I ⁷ NH ₂ ² C ⁷ Z ⁸ A _d (2c) | estable ^{b)} | 242 |
| I ⁷ NH ₂ ² C ⁷ Z ⁸ A _d (2c) | 61 ^{c)} | 242 |

a) Medido en HCl 0,5 N.

b) En un transcurso de tiempo de 3 horas

c) Medido en 2N HCl.

Las nucleobases de los nucleósidos modificados 2a-c y 3a-c, influyen en equilibrio pseudo-rotativo N ↔ S de la porción de azúcar. Esto, afecta a la conformación del esqueleto de la cadena de fosfato del azúcar del DNA. Por esta razón, el espectro de ¹HNMR del nucleósido de pirazolo[3,4-d]pirimidina 2c, así como los nucleósidos de pirimidina 3a-c, se midieron en D₂O, y se determinaron las constantes de acoplamiento ³J[¹H,¹H]. El análisis conformacional, se realizó en base a los acoplamientos ³J[¹H,¹H], utilizando el programa PSEUROT (Van J. Wijk, C. Altona, 'PSEUROT 6,2 - A Program for the Conformational Analysis of the Five-membered Rings', - PSEUROT 6,2, Un programa para el análisis conformacional de los anillos de cinco miembros' -, Universidad de Leiden, Julio (1993). En concordancia con la tabla 9, el nucleósido de 8-aza-7-desazapurina 2a, muestra una población de N-conformador superior que la del correspondiente nucleósido de purina. La conformación, alrededor del enlace C(4)'-C(5')- indica el hecho de que, el nucleósido de 8-aza-7-desazapurin-3,6-diamina 2c, como las 8-aza-7-desaza-2'-desoxi-guanosinas (F. Seela, G. Becher, H. Rosenmeyer, H. Reuter, G. Kastner, I. A. Mikhailopulo, Hev. Chim. Acta 1999, 82 105), prefiere la población del rotámero $\gamma^l(-sc)$, mientras que, para los nucleósidos regulares de purina, la conformación $\gamma^{(+)\text{g}}(-sc)$, o la conformación $\gamma^{(-)\text{g}}(-ap)$, es predominante (G. Blackburn, M. J. Gait, "Nucleic Acids in Chemistry and Biology", - Ácidos nucleicos en química y biología -, IRL Pres, Oxford University Press 1990, página 28). La conformación de las porciones de azúcar de los nucleósidos de pirimidina 3a-c, está también influenciada mediante la sustitución en la posición 5 (Tabla 9). El cambio principal, se observa entre 3a, sin un sustituyente 5 y los derivados 3b,c, con sustituyentes de Me ó de halógeno.

ES 2 300 346 T3

TABLA 9

Constantes de acoplamiento $^3J(H,H)$ de las porciones de azúcar y poblaciones de conformador N-S de los 2'-desoxirribonucleósidos 1 - 3, a 303 K^a)

5

| | $^3J_{H,H}/\text{Hz}$ | | | | | | | Conformación | | | | | |
|----|-----------------------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|--------------|----|----------------|-----------|----------------|-----|
| | 1',2' | 1',2'' | 2',3' | 2'',3' | 3',4' | 4',5' | 4',5'' | %N | %S | $\gamma^{(+)}$ | γ' | $\gamma^{(-)}$ | |
| 10 | 1 | 7.30 | 6.10 | 7.00 | 3.10 | 3.40 | 3.20 | 4.30 | 31 | 69 | 62 | 25 | 13 |
| | 2a | 6.60 | 6.80 | 6.90 | 3.70 | 3.60 | 4.00 | 5.80 | 37 | 63 | 36 | 42 | 22 |
| | 2c | 6.60 | 6.70 | 6.85 | 3.90 | 3.85 | 4.30 | 5.90 | 38 | 62 | 31 | 43 | 26 |
| | dT [16] | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 36 | 64 | --- | --- | --- |
| 15 | 3a | 6.70 | 6.60 | 6.50 | 4.30 | 4.10 | 3.60 | 5.20 | 30 | 70 | 47 | 35 | 18 |
| | 3b | 6.45 | 6.50 | 6.50 | 4.70 | 4.50 | 3.40 | 4.70 | 34 | 66 | 55 | 30 | 15 |
| | 3c | 6.50 | 6.50 | 6.50 | 4.50 | 4.40 | 3.40 | 4.80 | 33 | 67 | 54 | 31 | 15 |

20

^a) Disolvente D₂O; rms < 0,4 Hz | (ΔJ_{max}) < 0,4 Hz

25

[16] C. Thibudeau, J. Plavec, J. Chattopadhyaya,

J: Org. Chem. 1996, 61, 266.

30

Puesto que, la reactividad de los grupos amino del nucleósido 2b, es algo diferente de 1, se estudiaron varios residuos, para la protección de bases. Antes, el nucleósido 2b, se protegió con el residuo N,N-di-(n-butyl)formamida (dnb). Ahora, el grupo isobutírico, se introdujo empleando el protocolo de protección transitoria (2b → 13a) (G. S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones, J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 1316). Como producto secundario, se aisló en nucleósido mono-protegido 14 (22%). Se observó la formación de productos mono-acilados, en el caso de otros nucleósidos de 2,6-diaminopurina (I. Luyten, A. V. Aerschot, J. ROzenski, R. Busson, y P. Hederwijn, Nucleosides Nucleotides 1997, 16, 1649). Cuando se procedió a realizar la hidrólisis alcalina de los compuestos 13a ó 14, en NH₃ acuoso al 25%, a una temperatura de 40°, se observó una rápida desprotección (véase el esquema 7). Se determinaron las vidas medias para 13a y 14, y se encontró que éstas eran de 4,5 minutos y de 20,5 minutos, respectivamente. Esto indica el hecho de que, este grupo protector, es apropiado para la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Para el nucleósido de yodo 2c, se utilizó el protocolo de protección transitoria, como para 2bm pero, en este caso, se eligió un grupo benzoilo (2c → 13b). El tiempo para la desprotección completa de 13b (NH₃ acuoso al 25%, 40°C, control de HPLC a 260 nm), fue de 450 minutos. No se determinó el tiempo de vida media, debido al carácter de la reacción, que era por etapas.

45

Los nucleósidos de bases protegidas 13a, b, así como los nucleósidos de pirimidina 3a-c, se convirtieron en los derivados de DMT, 15a, b y 17a-c, utilizando condiciones standard de reacción (Y. S. Sanghvi, G.D. Hoke, S. M. Freier, M.C. Zounes, C. Gonzalez, L. Cummins, H. Sasmor, P. D. Cook, Nucleic Acids Res. 1993, 21, 3197). La fosfitilación de los derivados de DMT 15a,b, se realizó en THF, en presencia de 2-cianoetil-diisopropilfosforamiditoclorhidrato, proporcionando las fosforamiditas 16a, b (Esquema 7); los bloques de pirimidina 18a-c, se prepararon a partir de 17a-c en diclorometano (Y. S. Sanghvi, G.D. Hoke, S. M. Freier, M.C. Zounes, C. Gonzalez, L. Cummins, H. Sasmor, P. D. Cook, Nucleic Acids Res. 1993, 21, 3197). Estas fosforamiditas (16a,b y 18a-c) se emplearon en la síntesis de oligonucleótidos de fase sólida. Todos los compuestos, se caracterizaron mediante espectros de ¹H-, ¹³C-, y ³¹P-NMR y mediante análisis elemental (Tabla 10). La Tabla 11, resume los datos de ¹³C-NMR de la 8-aza-7-desazapurina, así como aquéllos de los nucleósidos de pirimidina. La asignación, se realizó en concordancia con espectros barrados-desacoplados. Se incluyeron los datos de NMR de 3a-c, ya que, la búsqueda, en la literatura, proporcionó poca información sobre la materia en cuestión.

60

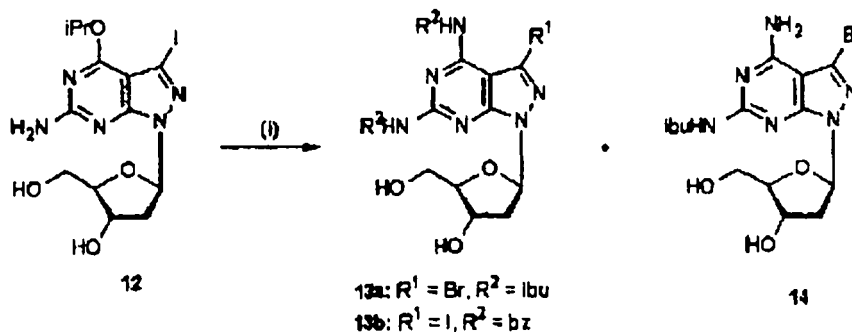
65

Esquema 7

5

10

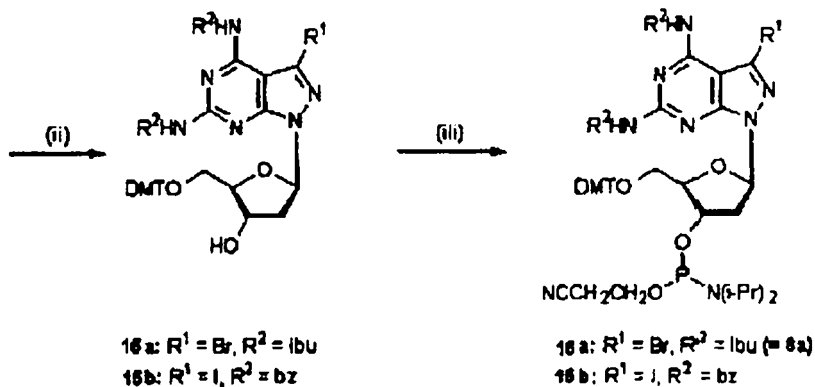
15



20

25

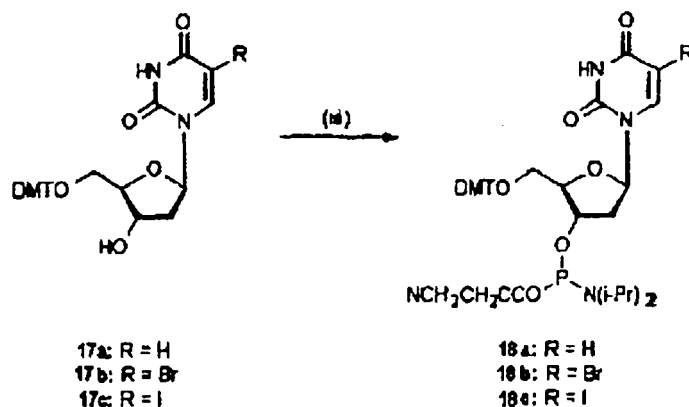
30



35

40

45



50

55

(i)3a: Me_3SiCl , piridina, anhídrido isobutírico, temperatura ambiente, 4 horas; 3b: M_3SiCl , piridina, cloruro de benzoílo, temp. ambiente, 24 horas; (ii) $(\text{MeO})_2\text{TrCl}$, piridina, temp. ambiente, 4 horas; (iii) 2-cianoetil-diisopropilfosforamidoclorhidrato, CH_2Cl_2 , temp. ambiente, 30 minutos.

60

65

ES 2 300 346 T3

TABLA 10

Cambios químicos mediante ¹³-CNM, de los pirazolo[3,4,d]pirimidina-4,6-diamina-2'-desoxirribonucleósidos^{a)}

5

| | C(2) ^{c)} C(6) ^{d)} | C(4) ^{c)} C (7°) ^{d)} | C(5) ^{c)} C (3°) ^{d)} | C(6) ^{e)} C(4) ^{d)} | C(7) ^{d)} C(3) ^{d)} | C=O/ =CH | C=O/ =CH | C(1') | C(2') | C(3') | C(4') | C(5') |
|----|------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 10 | 2b | 157.6 | 157.4 | 94.5 | 162.7 | 119.2 | | 83.0 | 37.5 | 70.9 | 87.3 | 62.4 |
| | 2c | 157.0 | 157.6 | 91.2 | 162.2 | 98.3 | | 83.1 | 37.6 | 70.9 | 87.3 | 62.4 |
| | 3a | 163.2 | 150.5 | 101.8 | 140.6 | | | 84.2 | 38.5 | 70.5 | 87.4 | 61.3 |
| | 3b | 159.1 | 149.7 | 95.6 | 140.6 | | | 84.7 | 38.4 | 69.9 | 87.5 | 60.7 |
| 15 | 3c | 160.4 | 150.0 | 69.9 | 145.0 | | | 84.6 | f) | 69.2 | 87.4 | 60.7 |
| | 13a | 155.8 | 153.8 | 104.7 | 156.2 | 121.4 | 175.2 | 176.5 | 83.6 | 37.5 | 70.7 | 87.7 |
| | 13b | 149.6 | 152.1 | 105.7 | 153.4 | 96.3 | 169.4 | 177.5 | 84.4 | 38.7 | 71.6 | 88.6 |
| | 14 | 156.0 | 156.5 | 97.4 | 157.5 | 119.1 | 175.3 | | 83.3 | 37.5 | 70.8 | 87.5 |
| 20 | 15a | 155.6 | 154.9 | 98.5 | 157.5 | 117.2 | 174.7 | 175.2 | 83.5 | 37.6 | 72.2 | 85.4 |
| | 15b | 149.5 | 152.1 | 105.8 | 153.2 | 96.2 | -- | 177.5 | 84.8 | f) | 71.6 | 86.7 |
| | 17a | 163.0 | 158.0 | 101.5 | 144.7 | | | | 84.1 | f) | 69.9 | 85.3 |
| | 17b | 158.0 | 159.1 | 96.0 | 144.7 | | | | 84.9 | 38.4 | 70.3 | 85.7 |
| 25 | 17c | 158.0 | 160.5 | 69.8 | 144.2 | | | | 84.8 | 38.4 | 70.4 | 85.8 |

30

a) Medio mediante (D₆)DMSO a 303 K.°).

c) Numeración de purina.

35

d) Numeración sistemática.

e) Tentativa.

40

f) Sobreimpuesto mediante (D₆)DMSO.

45

2.2- Oligonucleótidos

2.2.1.- Síntesis y caracterización

50

Se procedió a realizar la síntesis de los oligonucleótidos (Tablas 11 - 17), utilizando las fosforomiditas 16a,b y 18a-c, así como los bloques de construcción standard. Las síntesis, se realizaron siguiendo el protocolo standard (S. L. Reauge, M. Caruthers, Tetrahedron Lett. 1981, 22, 1859) y los rendimientos productivos de acoplamiento, fueron siempre mayores de un 97%. Los oligonucleótidos que contenían residuos de dU halogenados, requieren el uso de grupos 4-tert-butilfenoxiacetilo (tac), para la protección de las fosforamiditas canónicas. (E. Ferrer, C. Fábrega, R. G. Garcia, F. Azorín, R. Eritija, Nucleosids Nucleotids 1996, 15, 907; J. C. Schuholf, D. Molko, y R. Teoule, Nucleic Acids Res. 1987, 15, 397; R. D. Sheardy y N. C. Seeman, J. Org. Chem. 19986, 51, 4301). En estos casos, la desprotección, se realizó con amoníaco concentrado, a la temperatura ambiente, mientras que, en todos los otros casos, la desprotección, se realizó a una temperatura de 60°C. Los oligonucleótidos, se destritaron y se purificaron, en cartuchos de purificación (Applied Biosystems, "Users Manual for Oligonucleotide Purification Cadridges", - Manual del usuario para cartuchos de purificación de oligonucleótidos -, o mediante HPLC de fase inversa (para las condiciones de purificación, véase Parte Experimental). La homogeneidad de los compuestos, se probó mediante cromatografía de intercambio de iones (véase el apartado de Parte Experimental). La composición de los oligonucleótidos, se determinó mediante hidrólisis en tándem, con fosfordiestearasa de veneno de serpiente y fosfatasa alcalina, seguido de HPLC RP 18, tal y como se describe (F. Seela, C. Wei, Helv. Chim. Acta 1999, 82, 726). Los ejemplos típicos, se muestran en la figura 5c,d. Los oligonucleótidos nuevamente incorporados 2c ó 3c, migran más lentamente que los constituyentes canónicos del DNA. Los oligonucleótidos, se caracterizaron, también, mediante espectros de masas de MALDI-TOF. Las masas detectadas, concordaban bien con los valores calculados.

65

ES 2 300 346 T3

TABLA 18

Masas moleculares (MH⁺) de oligonucleótidos, calculadas mediante Espectrografía de masas de MALDI-TOF

| 5 | 1.- Oligómero | 2.- MH ⁺ (calculada) | 3.- MH ⁺ (encontrada) |
|----|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 10 | | | |
| 15 | 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 3644.4 | 3645 |
| | 5'-d(AGT ATT GAC CTA) (103) | 3644.4 | 3645 |
| | 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) | 3674.4 | 3677 |
| 20 | 5'-d(AGT 2aTT G2aC CTA) (109) | 3674.4 | 3675 |
| | 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) | 3832.5 | 3830 |
| | 5'-d(AGT 2bTT G2bC CTA) (111) | 3832.5 | 3832 |
| | 5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT) (201) | 4020 | 4021 |
| 25 | 5'-d(AGT ATT G2cC CTA) (202) | 3786 ? | 3787 |
| | 5'-d(AGT 2cTT GAC CTA) (203) | 3786? | 3792 |
| | 5'-d(AGT 2cTT G2cC CTA) (100) | 3926.5 | 3927 |
| | 5'-d(TAG GTC 2c2cT ACT) (204) | 3927 | 3931 |
| 30 | 5'-d(T2cG GTC 2c2cT 2cCT) (205) | 4206.3 | 4210 |
| | 5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) | 3613.1 | 3616 |
| | 5'-d(AGT A3a3a GAC CTA) (301) | 3613.1 | 3615 |
| 35 | 5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) | 3774.1 | 3775 |
| | 5'-d(AGT A3b3b GAC CTA) (303) | 3774.1 | 3772 |
| | 5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) | 3868.1 | 3871 |
| 40 | 5'-d(AGT A3c3c GAC CTA) (305) | 3868.1 | 3871 |

2.2.2.- Estabilidades de pares de bases de los dúplex de oligonucleótidos

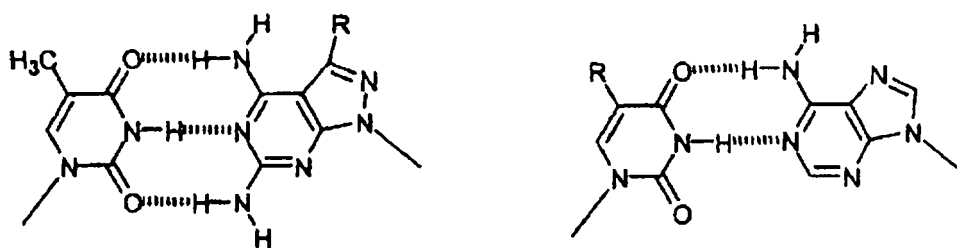
45 Se encontró el hecho de que, el nucleósido de 7-bromo 2b, estabilizaba fuertemente los dúplex de DNA, mientras que, el compuesto no halogenado 2a, contribuye muy poco a la estabilidad de los dúplex (véase, también, F. Seela, G. Becher, *Helv. Chim. Acta* 2000, 83, 928; F. Seela, G. Becher, M. Zulauf, *Nucleosides Nucleotides* 1999, 18, 1399). La contribución del nucleósido de purin-2,6-diamina 1, en la estabilidad del dúplex, es incluso inferior (C. Cheong, I. J. Tinoco, A. Chollet, *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 5115; J. D. Hoheisel, H. Lehrach, *FEBS Lett.* 1990, 274, 50 103). Así, de este modo, los dúplex de DNA que contienen pares de base compuestos de 1-timina, son únicamente ligeramente más estables que aquéllos con pares de dA-dT. Puesto que no se sabía si el efecto de estabilización del bromo-nucleósido 2b se incrementaría de una forma continua mediante un número creciente de incorporaciones o se nivelaría, mediante incorporaciones múltiples, - tal y como se reporta para otros nucleósidos modificados (C. Bailly, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 4308, y referencias incluidas en éste) -, se sintetizó una serie de oligonucleótidos que contenía el compuesto halogenado 2b, de una forma sucesiva, o en una posición distante. Los residuos modificados, se incorporaron en una o en ambas hebras del DNA de doble hebra. El número total de incorporaciones, se incrementó en dúplex, de 1 a 6. Los dúplex no halogenados que contenían el compuesto 2a, se prepararon a efectos comparativos. Aparte de la incorporación de nucleósido de bromo 2b, se estudió, también, el compuesto de yodo 2c. Para todos los experimentos, se eligió el dúplex no autocomplementario 5'-d(TAGGTCAACT) (102) · 5'(AGTATTGACCTA) (103).

65 El nucleósido no halogenado 2a, incrementa el valor de T_m de los dúplex standard 102 · 103, en un valor de únicamente 1° por residuo modificado (Tabla 11 y F. Seela, G. Becher, 2001, presentada). Contrariamente, el compuesto de bromo 2b, contribuye a una estabilización de 4 - 5° por residuo modificado, lo cual representa una sobresalientemente alta estabilización inducida mediante una base no canónica. La fuerza de este efecto, es dependiente de la secuencia, pero, la estabilidad de los dúplex, se incrementa con un número creciente de incorporaciones de 2b, tal y como se

muestra en la figura 6. Cuando el nucleósido de yodo 2c se reemplazó, el compuesto de bromo 2c, se observó un efecto similar con respecto a la estabilización de los dúplex (Tabla 11). Los efectos de los sustituyentes halógenos introducidos en los derivados de pirazolo[3,4-d]pirimidina de dG (F. Seela, G. Becher, *Helv. Chim. Acta* 1998, 82, 1640) ó dA (F. Seela, M. Zulauf, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1999, 479), ascendía únicamente a 2° por residuo modificado.

Se procedió a realizar una serie de experimentos tal y como se describe para los dúplex que contienen los nucleósidos de 8-aza-7-desazapurina halogenada 2b ó 2c, con los derivados halogenados de 2'-desoxipurina 3b ó 3c (Tabla 12). Ni el nucleósido de bromo 3b ni el nucleósido de yodo 3c, incrementa la estabilidad de los dúplex de una forma significativa, si se compara con la de los no halogenados 2a ó dT. Así de este modo, únicamente los pares de bases del tipo I (Esquema 8) con sustituyentes de halógeno localizados en la posición 7 de la porción de 8-aza-7-desazapurina (pirazolo[3,4-d]pirimidina), se estabilizan mediante los sustituyentes de halógeno, mientras que, aquéllos del tipo II (Esquema 8) con los halógenos unidos a las posiciones 5 de la base de pirimidina, ejercen poca influencia en comparación con aquéllos de los pares dA - dT.

Esquema 8



par de bases Ia: R = H

Ib: R = Br

Ic: R = I

par de bases IIa: R = H

IIb: R = Br

IIc: R = I

ES 2 300 346 T3

TABLA 11

Valores de T_m y datos termodinámicos de formación de dúplex de oligonucleótidos que contienen los nucleósidos de pirazolo[3,4-d]pirimidina 2a-c, opuestos a dT^a)

| Compuesto | T_m [°C] | ΔH° [kcal/mol] | ΔS° [cal/mol K] | ΔG°_{310} [kcal/n] |
|-----------------------------------|------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 47 | -83.8 | -235.9 | -10.6 |
| 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) | 50 | -93.3 | -263.09 | -11.7 |
| 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 50 | -98.79 | -279.63 | -12.06 |
| 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) (109) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) | 51 | -98.66 | -278.58 | -12.26 |
| 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) (109) | | | | |
| | 54 | -99.96 | -280.74 | -12.89 |
| 5'-d(TAG GTC 2bAT ACT) (200) | | | | |
| 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) | 56 | -91.42 | -251.66 | -13.37 |
| 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC AT ACT) (102) | 59 | -91.85 | -251.25 | -13.92 |
| 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2bAT ACT) (200) | 63 | -100.70 | -274.04 | -15.70 |
| 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) | 67 | -105.40 | -285.02 | -17.00 |
| 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111) | | | | |
| 5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT)(201) | 64 | -99.08 | -268.47 | -15.81 |
| 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | | | | |
| 5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT)(201) | 75 | -107.43 | -283.41 | -19.53 |
| 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 51 | -90.65 | -254.58 | -11.69 |
| 3'-d(ATC C2cG TTA TGA) (202) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 54 | -93.22 | -260.43 | -12.45 |
| 3'-d(ATC CAG TT2c TGA) (203) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 57 | -95.09 | -263.29 | -13.43 |
| 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2c2cT ACT)(204) | 55 | -96.46 | -268.72 | -13.12 |
| 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (102) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2c2cT ACT)(204) | 59 | -102.95 | -284.63 | -14.67 |
| 3'-d(ATC C2cGT T A TGA) (202) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2c2cT ACT)(204) | 66 | -104.93 | -284.73 | -16.62 |
| 3'-d(ATC C2cGT T2c TGA) (100) | | | | |
| 5'-d(T2cG GTC2c2cT 2cCT) (205) | 72 | - | - | - |
| 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100) | | | | |

^{a)}Parámetros termodinámicos que se derivan de los ajustes de las curvas de fusión, medidos a 260 nm, en tampón de NaCl 0,1 M, MgCl₂ 10 mM y Na-cacodilato 10 mM, pH 7,0, con una concentración individual de 5 μ M + 5 μ M. Los valores de ΔG° , se toman directamente del programa Meltwin 3.0, haciendo referencia a 310°. Publicaciones anteriores de nuestro laboratorio, utilizando el programa de ajuste, se refieren a la misma temperatura, y no a 298°, tal y como se indica. Los datos termodinámicos, determinados de los registros gráficos de van't Hoff, utilizando la dependencia de concentración de los valores de T_m , son consistentes con aquéllos obtenidos a partir de la curva de ajuste, en un 15%. Los datos de van't Hoff de la formación del dúplex 102 · 103, son los siguientes: $\Delta H^\circ = 86,8$ Kcal/mol; $\Delta S^\circ = 243,7$ cal/kmol; $\Delta G^\circ_{310} = 11,3$ kcal/mol.

ES 2 300 346 T3

TABLA 12

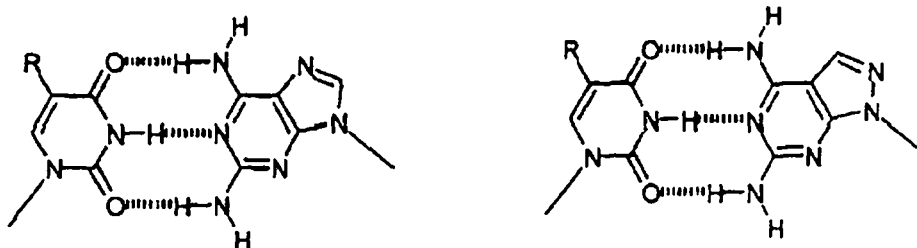
Valores de T_m y datos termodinámicos de formulación de dúplex de oligonucleótidos que contienen los nucleósidos de pirazolo[3,4-d]pirimidina 2a-c, opuestos a dA^a)

| Compuesto | T_m [°C] | ΔH° [kcal/mol] | ΔS° [cal/mol K] | ΔG°_{310} [kcal/mol] |
|-------------------------------|------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| 5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) | 47 | -86.35 | -244.74 | -10.45 |
| 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | | | | |
| 5'-d(TAGGTC AACTACT)(102) | 48 | -92.11 | -261.95 | -10.86 |
| 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301) | | | | |
| 5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) | 46 | -86.37 | -245.42 | -10.25 |
| 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301) | | | | |
| 5'-d(TAG G3bC AA3b ACT)(302) | 48 | -95.76 | -271.88 | -11.44 |
| 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC AA T ACT) (102) | 49 | -97.43 | -276.95 | -11.53 |
| 3'-d(ATC CAG 3b3bA TGA) (303) | | | | |
| 5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) | 49 | -94.25 | -267.57 | -11.26 |
| 3'-d(ATC CAG 3b3bA TGA) (303) | | | | |
| 5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) | 49 | -96.38 | -273.73 | -11.48 |
| 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 50 | -94.99 | -269.20 | -11.50 |
| 3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305) | | | | |
| 5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) | 50 | -99.14 | -281.47 | -11.85 |
| 3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305) | | | | |

^a) Véase la Tabla 11.

Cuando la estabilidad de los pares de bases de los nucleósidos de pirimidina halogenada 3b ó 3c con dA, se comparó de una forma reducida con los compuestos halogenados de pirazolo[3,4-d]pirimidina 2b ó 2c incorporados de forma opuesta a dT, se forman pares de bases tridentadas, en los cuales, los nucleósidos de pirimidina halogenada 3a-c, se encuentran localizados de una forma opuesta al nucleósido de purina-2,6-diamina en lugar de dA (Esquema 8, pb tipo III). En este caso, puede esperarse un fortalecimiento del par de bases, si es posible la formación de un tercer enlace de hidrógeno. No obstante, los valores de la T_m , de tales dúplex, tampoco se ven influenciados, de una forma significativa, mediante el reemplazo de los residuos dA por el nucleósido I (Tabla 13). Esto indica el hecho de que, el grupo 2-amino, no participa en posibles bases de pares, tal como se muestra en IIIa-c (Esquema 9), un descubrimiento que es similar al observado para un par de bases entre 1 y dT (F. Seela, G. Becher, 2001, presentado; C. Cheong, I. J. Tinoco, A. Chollet, Nucleic Acids Res. 1988, 16, 5115; J. D. Hoheisel, H. Lehrach, FEBS Lett. 1990, 274, 103). Se encontró un comportamiento similar, en el caso de dúplex que contenían el par de bases IVa (Esquema 9), formados entre el nucleósido 2a y los nucleósidos de pirimidina 3a-c (Tabla 13). No obstante, los dúplex que incorporan el par de bases IVb,c, son ligeramente más estables que aquéllos que contienen el par de bases IIIb,c.

Esquema 9



par de bases IIIa: R = H

par de bases IVa: R = H

IIIb: R = Br

IVb: R = Br

IIIc: R = I

IVc: R = I

ES 2 300 346 T3

TABLA 13

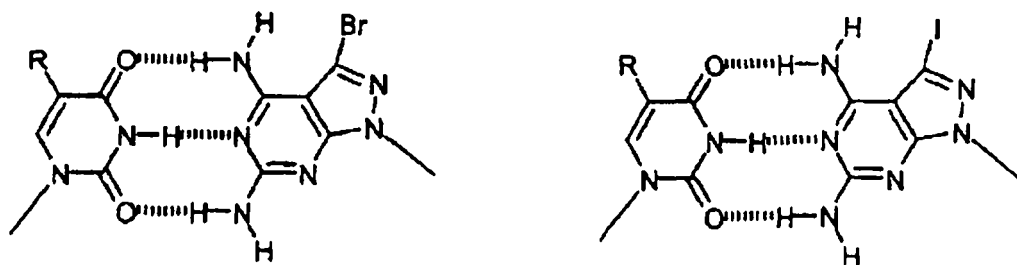
Valores de T_m y datos termodinámicos de dúplex de oligonucleótidos que contienen los nucleósidos de pirimidina halogenada 3a-c, opuestos al nucleósido de purin-2,6-diamina 1 ó al nucleósido de pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina 2a^a)

| | | T_m [°C] | ΔH° [kcal/mol] | ΔS° [cal/mol K] | ΔG°_{310} [kcal/mol] |
|----|--------------------------------|------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| 10 | 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 49 | -83.15 | -232.81 | -10.94 |
| | 3'-d(ATC C1G TT1 TGA) (105) | | | | |
| | 5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) | 48 | -73.03 | -202.44 | -10.25 |
| | 3'-d(ATC C1G TT1 TGA) (105) | | | | |
| 15 | 5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) | 49 | -73.84 | -203.94 | -10.59 |
| | 3'-d(ATC C1G TT1 TGA) (105) | | | | |
| | 5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) | 49 | -77.60 | -215.48 | -10.76 |
| | 3'-d(ATC C1G TT1 TGA) (105) | | | | |
| 20 | 5'-d(T1 G GTC 11 T 1 CT) (104) | 48 | -54.74 | -144.65 | -9.88 |
| | 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | | | | |
| | 5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) | 48 | -60.03 | -161.49 | -9.94 |
| | 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301) | | | | |
| 25 | 5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) | 48 | -60.09 | -160.37 | -10.35 |
| | 3'-d(ATC CAG 3b3b TGA) (303) | | | | |
| | 5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) | 48 | -62.35 | -167.33 | -10.45 |
| | 3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305) | | | | |
| 30 | 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) | 49 | -87.32 | -245.54 | -11.16 |
| | 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301) | | | | |
| | 5'-d(T1G GTC 2a2aT ACT) (108) | 50 | -89.11 | -250.34 | -11.47 |
| | 3'-d(ATC CAG 3b3b TGA) (303) | | | | |
| 35 | 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) | 51 | -81.32 | -225.60 | -11.35 |
| | 3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305) | | | | |
| | 5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) | 49 | -90.30 | -253.96 | -11.53 |
| | 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) (109) | | | | |
| 40 | 5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) | 51 | -93.05 | -261.91 | -11.82 |
| | 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) (109) | | | | |
| | 5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) | 50 | -90.58 | -254.11 | -11.77 |
| | 3'-d(ATC C2aG TT2a TGA) (109) | | | | |

^a) Véase la Tabla 11.

Se observó una significativa estabilización del dúplex, cuando los nucleósidos de 8-aza-7-desazapurina halogenada 3b ó 2c, se incorporaron de forma opuesta a los nucleósidos de pirimidina 3a-c (Tabla 14 y Esquema 2b ó 2c, pb del tipo V y VI). Los incrementos de la T_m , ascendían a aproximadamente 4 - 5°C por residuo incorporado de los nucleósidos halogenados 2b ó 2c. Todos los dúplex que contenían nucleósidos 2b ó 2c, (Esquema 10), proporcionaron unos valores de T_m muy similares, independientemente de cual monómero de pirimidina se encontraba localizado de una forma opuesta a éste. Así, de este modo, únicamente los sustituyentes de halógeno unidos a los residuos de purina modificada, conducen a una estabilización de los dúplex, mientras que, los halógenos unidos a la posición 5 de la porción de la 2'-desoxiuridina, contribuyen muy poco a la estabilización de los dúplex (S. M. Freier y K.-H. Altman, *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 4429; F. Seela, *Y. He. Helv. Chim. Acta* 2000, 83, 2527; S. Wang E. T. Kool, *Biochemistry* 1995; 34, 4125).

Esquema 10



par de bases Va: R = H

par de bases VIa: R = H

Vb: R = Br

VIb: R = Br

Vc: R = I

VIc: R = I

TABLA 14

Valores de T_m y datos termodinámicos de oligo-nucleótidos que contienen los nucleósidos de pirazolo[3,4-*d*] pirimidin-4,6-diamina 2b-c, de forma opuesta a dT u 3a-c^a)

| Duplex | T_m [°C] | ΔH° [kcal/mol] | ΔS° [cal/mol K] | ΔG°_{310} [kcal/mol] |
|---------------------------------|------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| 5'-d(TAG GTC 2bAT ACT) (200) | 52 | -92.88 | -260.97 | -11.94 |
| 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) | 55 | -96.78 | -269.67 | -13.14 |
| 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301) | | | | |
| 5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT) (201) | 64 | -101.57 | -276.51 | -15.82 |
| 3'-d(ATC CAG 3a3aA TGA) (301) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2bAT ACT) (200) | 54 | -98.06 | -275.03 | -12.76 |
| 3'-d(ATC CAG 3b3bA TGA) (303) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) | 55 | -95.42 | -266.68 | -12.71 |
| 3'-d(ATC CAG 3b3b TGA) (303) | | | | |
| 5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT) (201) | 65 | -106.49 | -290.34 | -16.44 |
| 3'-d(ATC CAG 3b3bA TGA) (303) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2bAT ACT) (200) | 54 | -87.97 | -244.29 | -12.20 |
| 5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) | 55 | -96.93 | -270.69 | -12.98 |
| 3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) | 55 | -89.17 | -246.44 | -12.74 |
| 3'-d(ATC CAG 3c3cTGA) (305) | | | | |
| 5'-d(T2bG GTC 2b2bT 2bCT) (201) | 65 | -101.57 | -275.34 | -16.18 |
| 3'-d(ATC CAG 3c3cA TGA) (305) | | | | |
| 5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) | 56 | -95.76 | -265.45 | -13.43 |
| 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111) | | | | |
| 5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) | 56 | -96.53 | -268.70 | -13.20 |
| 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111) | | | | |
| 5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) | 57 | -97.07 | -269.07 | -13.62 |
| 3'-d(ATC C2bG TT2b TGA) (111) | | | | |
| 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100) | | | | |
| 5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) | 55 | -100.82 | -282.19 | -13.29 |
| 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100) | | | | |
| 5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) | 55 | -98.00 | -273.26 | -13.25 |
| 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100) | | | | |

^a) Véase la Tabla 11.

2.2.3.- Discriminación de bases

Con objeto de investigar la discriminación del nucleósido de yodo 2c, hacia los cuatro constituyentes canónicos del DNA, se procedió a llevar a cabo experimentos de hibridación, en concordancia con la Tabla 15. Tal y como se esperaba, el par de bases 2c-dT, es el más fuerte (102 · 100, $T_m = 59^\circ$), mientras que, aquéllos de los dúplex que forman apareamientos fallidos, funden a una temperatura significativamente menor (Tabla 15). La discriminación del nucleósido de Yodo 2c, es similar a la de los nucleósidos canónicos, excepto en cuanto a lo referente al hecho de que, el dúplex 401 · 100 ($T_m = 52^\circ$), muestra un valor de T_m , 7° inferior, que el correspondiente al dúplex 102 · 100 ($T_m = 59^\circ$), mientras que, el dúplex 410 · 103 ($T_m = 46^\circ$), tiene casi la misma estabilidad que el dúplex progenitor 102 · 103 ($T_m = 48^\circ$). El alto valor de la T_m del 401 · 103, es el resultado de la formación del par de Hoogsteen dG-d, el cual, obviamente, no se forma entre el dG y el compuesto 2c.

TABLA 15

Valores de T_m de oligonucleótidos que contienen el nucleósido de pirazolo[3,4-d]pirimidin-4,6-diamina 2c, de forma opuesta a los cuatro nucleósidos canónicos^{a)}

| Duplex | T_m [°C] | Duplex | T_m [°C] |
|-------------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 57 | 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 48 |
| 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100) | | 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | |
| 5'-d(TAG GAC AAT ACT) (400) | 45 | 5'-d(TAG GAC AAT ACT) (400) | 38 |
| 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100) | | 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | |
| 5'-d(TAG GGC AAT ACT) (401) | 50 | 5'-d(TAG GGC AAT ACT) (401) | 46 |
| 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100) | | 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | |
| 5'-d(TAG GCC AATACT) (402) | 45 | 5'-d(TAG GCC AATACT) (402) | 36 |
| 3'-d(ATC C2cG TT2c TGA) (100) | | 3'-d(ATC CAG TTA TGA) (103) | |

^{a)} Véase la Tabla 11.

Se procedió, a continuación, a medir el espectro CD de los dúplex que contienen los derivados de 2-amino-8-aza-7-desazaadenina 2a,b. Puede deducirse una estructura de DNA semejante a B, a partir de las curvas que se exhiben en la figura 7a. Para el dúplex standard (102 · 103), se observa un efecto Cotton positivo, a alrededor de 270 a 29 nm, y un lóbulo negativo, a 250 nm. El espectro CD de los dúplex 104 · 105 que contienen 1, muestra unas diferencias significativas similares al del 110 · 111, mientras que, el dúplex 108 · 109, muestra un efecto Cotton negativo más fuerte, a 260 nm, y uno positivo, a 235 nm. Se reportaron unas diferencias similares, para los oligonucleótidos que contenían 8-aza-7-desaza-7-yodoguanina, 7-sustituida (N. Ramzaeva, F. Seela, Helv. Chim. Acta 1996, 79, 1549).

2.4.- Híbridos de DNA-RNA

Con objeto de estudiar la influencia de los 2,6-diaminonucleósidos 1 y 2a,b, en la estabilidad de los híbridos de DNA-RNA, se procedió a hibridar los oligodesoxirribonucleótidos 110, 300, 302, 304, 104 y 102, con el oligorribonucleótido 403. La tabla 16, muestra el hecho de que, las varias modificaciones, ejercen una significativa influencia en la estabilidad de los dúplex de los híbridos de DNA-RNA. Mientras que, la incorporación de los nucleósidos no halogenados 1 ó 2, estabiliza muy poco la estructura del DNA-RNA, la hibridación del oligonucleótido que contiene 2b con 403 (110 · 403), muestra un significativo incremento de la estabilidad de los dúplex, como en el DNA. Los compuestos 3b y 3c, mejoran la estabilidad térmica del DNA-RNA, a un grado reducido, la cual se observa, también, para otras modificaciones de la 2'-desoxiuridina (B. C. Frohler, S. Wadwani, T. J. Terhorst, S. R. Gerrard, Tetrahedron 1992, 33, 5307; J. Sági, A. Szemző, K. Ébinger, A. Szabolcs, G. Sági, É. Ruff, L. Ötvös, Tetrahedron Lett. 1993, 34, 2191). Las hipocromicidades de los híbridos quiméricos, se reducen ligeramente, con respecto a las de los dúplex de DNA - DNA (datos no mostrados). A raíz de los espectros de CD de la figura 7b, puede observarse el hecho de que, los híbridos de DNA-RNA, adoptan la forma A (N. Ramzaeva, C. Mittelbach, F. Seela, Helv. Chim. Acta 1997, 80, 1809).

ES 2 300 346 T3

TABLA 16

Valores de T_m y datos termodinámicos de híbridos de DNA-RNA^a)

5

| Duplex | T_m [°C] | ΔH^0 [kcal/mol] | ΔS^0 [cal/mol • K] | ΔG^0_{310} [kcal/mol] |
|-------------------------------------------------------------|------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403) | 45 | -92.1 | -264.0 | -10.2 |
| 5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403) | 48 | -60.46 | -162.12 | -10.18 |
| 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403) | 48 | - | - | - |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403) | 53 | -98.64 | -276.97 | -12.74 |
| 5'-d(TAG G3aC AA3a ACT) (300) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403) | 44 | -74.43 | -208.26 | -9.84 |
| 5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403) | 48 | -77.19 | -215.13 | -10.47 |
| 5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) 3'-(AUC CAG UUA UGA) (403) | 47 | -78.77 | -220.52 | -10.37 |

30

^a) Véase la Tabla 11.

35

2.5.- Dúplex con orientación de cadena paralela

Se procedió, también, a investigar el apareamiento de bases de los nucleósidos 1, 2a-c, así como 2b,c, en DNA de hebras paralelas [29]. Para este propósito, fue necesario el proceder a reemplazar el par de bases dC-dG, mediante un par de bases m⁵iC₄-iG₄. Los dúplex 102 · 115 y 116 · 103, sirvieron como patrones standard (F. Seela, C. Wei, G. Becher, M. Zulauf, P. Leonard, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000, 10, 289). La sustitución de residuos dA mediante el diamino-nucleósido 1, dio como resultado un insignificante decrecimiento de la estabilidad de los ps-dúplex 104 · 115 y 116 · 105 (Tabla 17). La incorporación de 2a-c, en el ps-DNA, dio como resultado un significativo incremento de los valores de la T_m . La incorporación de los nucleósidos de pirimidina sustituida 3b, c, en lugar de dT, conduce únicamente a cambios menores de los valores de la T_m . A raíz de esto, puede concluirse el hecho de que, de una forma similar a la del DNA, con una orientación paralela, los sustituyentes de halógeno de los nucleósidos de "purina" ab, c, estabilizan estos dúplex, mientras que, los sustituyentes de halógeno de los nucleósidos de pirimidina, contribuyen muy poco a la estabilidad de los dúplex.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 300 346 T3

TABLA 17

Valores de T_m y datos termodinámicos de dúplex de oligonucleótidos de hebras paralelas, que contienen los nucleósidos 1, 2a-c y 3a-c^{a,b})

| Duplex | T_m [°C] | ΔH^0 [kcal/mol] | ΔS^0 [cal/mol · K] | ΔG^0_{310} [kcal/mol] |
|---------------------------------|------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) | 39 | -74.4 | -212.3 | -8.5 |
| 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115) | | | | |
| 5'-d(T1G GTC 11T 1CT) (104) | 36 | -48.12 | -129.68 | -7.90 |
| 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2a2aT ACT) (108) | 41 | -61.77 | -170.95 | -8.75 |
| 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115) | | | | |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) | 45 | -66.59 | -183.94 | -9.54 |
| 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115) | | | | |
| 5'-d(TAG G3bC AA3b ACT) (302) | 37 | -50.64 | -137.87 | -7.88 |
| 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115) | | | | |
| 5'-d(TAG G3cC AA3c ACT) (304) | 36 | -55.09 | -152.14 | -7.90 |
| 5'-d(ATiC iCAiG TTA TiGA) (115) | | | | |
| 5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) | 44 | -85.0 | -242.0 | -10.0 |
| 5'-d(AGT ATT GAC CTA) (103) | | | | |
| 5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) | 39 | -61.00 | -169.68 | -8.38 |
| 5'-d(AGT 1TT G1C CTA) (105) | | | | |
| 5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) | 45 | -80 | -230 | -10.3 |
| 5'-d(AGT 2aTT G2aC CTA) (109) | | | | |
| 5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) | 48 | -68.34 | -186.29 | -10.56 |
| 5'-d(AGT 2bTT G2bC CTA) (111) | | | | |
| 5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) | 43 | -76.03 | -215.51 | -9.19 |
| 5'-d(AGT A3b3b GAC CTA) (303) | | | | |
| 5'-d(TiCA TAA iCTiG iGAT) (116) | 42 | -67.15 | -187.02 | -9.15 |
| 5'-d(AGT A3c3c GAC CTA) (305) | | | | |

^a) Medido a 260 nm, en tampón de NaCl 0,1 M, MgCl₂ 100 mM, y Na-cacodilato 60 mM, pH 7,0, con una concentración de oligómeros de 5 + 5 μM.

^b) d(iC) = m⁵iC_d = 2'-desoxi-5-metilisocitidina.

2.3.- Conclusión

Los sustituyentes de halógeno introducidos en la posición 7 de los 2'-deoxinucleósidos de 8-aza-7-desazapurina (2b, c) o la posición 5 de los residuos de 2'-desoxiuridina (3a-c), tienen unas influencias muy diferentes en la estabilidad de los dúplex de ácido nucleico. En el caso de los 2'-desoxinucleósidos de 8-aza-7-desazapurina 7-halogenada 2b, c, cada monómero, contribuye en aproximadamente 4° - 5°, en la estabilización del dúplex, mientras que los nucleósidos de pirimidina 3a-c, muestran muy poca influencia, o incluso ningún efecto. Este hecho, es sorprendente, debido al hecho de que, los halógenos, en ambas series de nucleobases, se dirigen a la estría o acanaladura mayor del B-DNA, encontrándose, ambos, en un entorno medioambiental no idéntico pero muy similar. Cuando ambos, las pirimidinas halogenadas y los nucleósidos de 8-aza-7-desazapurina, se encuentran presentes en un dúplex de DNA, únicamente el

ES 2 300 346 T3

último, realiza una contribución a la estabilización del dúplex. Por consiguiente, el incremento del carácter hidrofóbico de la acanaladura o estría mayor, inducido por los sustituyentes halógenos lipofílicos, y la expulsión de las moléculas de agua, no es el mayor efecto inducido por la halogenación de la estría o acanaladura mayor. Aparentemente, la interacción de apilamiento entre los vecinos más cercanos, se encuentra fortalecida, en el caso de 2b, c, pero no con 3b,c.

2.4.- Parte experimental

Monómeros

General. Véanse los manuscritos precedentes (F. Seela, G. Becher, *Helv. Chim. Acta* 2000, 83, 928; F. Seela, G. Becher, M. Zulauf, *Nucleosides Nucleotides* 1999, 18, 1399; F. Seela, M. Zulauf, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1999, 479). Cromatografía Flash (de evaporación instantánea) (PC): 0,4 bar en gel de sílice 60 H (Merck, Darmstadt, Alemania). Cromatografía de capa fina (TLC): Hojas de aluminio, gel de sílice 60 F₂₅₇ (0,2 mm, Merck, Alemania). Sistemas de disolventes para FC y TLC: CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1 (A), CH₂Cl₂/MeOH 95 : 5 (B), CH₂Cl₂/acetona 9 : 1 (C), CH₂Cl₂/EtOAc 85 : 15 (D), CH₂Cl₂/acetona 95 : 5 (E). M.p. (punto de fusión): aparato Büchi-SMP-20 (Büchi, Suiza); sin corregir. Espectro de NMR: espectrómetros Avance-DPX-250 y AMX-500 (Büchi, Alemania). Los valores de δ , son en ppm, campo abajo del SiMe₄ (¹H, ¹³C) interno. Los microanálisis, se realizaron por parte de Mikroanalytisches Labor Beller (Göttingen, Alemania).

Oligonucleótidos

La síntesis de oligonucleótidos, se realizó en un sintetizador de DNA, modelo 392 (Applied Biosystems, Witerstadt, Alemania). Las curvas de fusión, se midieron con un espectrofotómetro UV/VIS Cary-1/3 (Varian, Australia), equipado con un controlador termoeléctrico Gary. La temperatura, se midió de una forma continua, en la célula de referencia, con un resistor Pt-100 y, los datos termodinámicos de la formación de dúplex, se calcularon utilizando el programa Meltwin 3.0 (J. A. McDowell, D. H. Turner, *Biochemistry* 1996, 35, 14077). Los espectros CD, se registraron con un espectropolarímetro Jasco-600 (Jasco, Japón), con cubetas de 1 cm, termostáticamente controladas (baño Lauda-RSC). Espectro UV: espectrómetro 150 - 20 (Hitachi, Japón). La hidrólisis enzimática de los oligómeros, se realizó de la forma descrita (F. Seela, G. Becher, *Helv. Chim. Acta* 2000, 83, 92; F. Seela, G. Becher, M. Zulauf, *Nucleosides Nucleotides* 1999, 18, 1399), utilizando los siguientes coeficientes de extinción: $\epsilon_{260} \cdot 7G_d$ 2700, dT 8800, dc 7300, dA 15400, dG 11700, 2a 8800, 2b 8700, 3a 10000, 3b 4800, 3c 3700. La fosfodiesterasa de veneno de serpiente (EC 2.1.15.1, *Crotallus durissus*) y la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1, *E. coli*), fueron unas generosas donaciones a título de regalo, de la firma Roche Diagnostics GmbH, Alemania. Los espectros de MALDI-TOF, se midieron en un espectrómetro Biflex III (Broker, Sajonia, Leipzig, Alemania).

Síntesis y purificación de oligonucleótidos

La síntesis, se realizó en una escala de 1 μ mol, utilizando 3'-fosforamiditas de [(MeO)₂Tr]ib²G_d, [(MeO)₂Tr]bz⁶A_d, [(MeO)₂Tr]bz⁴C_d y [(MeO)₂Tr]T_d, para la síntesis de oligonucleótidos que contenían 2a-c, y [(MeO)₂Tr]tac⁶A_d, [(MeO)₂Tr]tac⁴C_d y [(MeO)₂Tr]T_d, para la síntesis de oligonucleótidos que contenían 3a-c. Después de la segmentación de los oligonucleótidos del soporte sólido, el primero, se desprotegió en NH₃ acuoso al 25%, durante un transcurso de tiempo de 12 - 15 horas, a una temperatura de 60°. Los últimos, se incubaron en NH₃ acuoso al 25%, durante un transcurso de tiempo de 1,5 - 2 horas, a la temperatura ambiente, para la desprotección. La purificación de los (dimetoxitritil)-oligómeros 5', se realizó mediante HPLC de fase inversa (RP-18). Se utilizó el siguiente gradiente de disolvente (A, 0,1 M (Et₃NH)₂Ac (pH 7,0)/MeCN 95 : 5; B, MeCN): 3 minutos 20% B en A; 12 minutos 20 - 40% B en A, con un caudal de flujo de 1,0 ml/minuto. Las soluciones concentradas de oligonucleótidos, se trataron con CHCl₂COOH/CH₂Cl₂, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, a la temperatura ambiente, para retirar los residuos de 4,4'-dimetoxitritilo. Los oligómeros destritilados, se purificaron con HPLC de fase inversa, con el gradiente de: 20 minutos 0 - 20% B en a, con un caudal de flujo de 1 ml/minuto. Los oligómeros, se desalaron en una columna corta (RP-18, gel de sílice) y, a continuación, se liofilizaron en un evaporador de vacío del tipo Speed-Vac evaporator, para proporcionar sólidos incoloros, los cuales se congelaron a una temperatura de -24°. Los oligómeros purificados, se disolvieron en 100 μ l de H₂O bi-distilada y, la pureza, se controló mediante cromatografía de intercambio de iones, en una columna de HPLC del tipo Dionex-Nucleopac-PA-100-HPLC (4 x 25 mm, P/N 043010; Dionex, Istein, Alemania).

Análisis de la composición de nucleósidos

Se procedió a disolver los oligonucleótidos en un tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 8,3, 200 μ l), y éstos se trataron con fosfodiesterasa de veneno de serpiente (3 μ l), a una temperatura de 37°C, durante un transcurso de tiempo de 45 minutos y, a continuación, con fosfatasa alcalina (3 μ l), durante otro transcurso de tiempo de 30 minutos. Las mezclas de reacción, se analizaron en HPLC de fase inversa (RP-18, a 260 nm, gradiente A, 0,47 ml/minuto). Los tiempos de retención de 2a-c y 3a-c, se utilizaron como patrones standard (Figura 5). Los coeficientes de extinción de los nucleósidos y las áreas pico, se utilizaron para la cuantificación de la composición de oligonucleótidos (Figura 5a-d).

ES 2 300 346 T3

1-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-4,6-diamina (2c)

Se procedió a calentar una solución del compuesto 6-amino-1-[2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil]-3-yodo-4-isopropoxi-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidina 12 (F. Seela, G. Becher, Synthesis 1998, 2, 207.) (1 g, 2,3 mmol) en una solución acuosa de NH₃ al 25% (80 ml), a una temperatura de 70°C, durante un transcurso de tiempo de 4 días. El disolvente, se evaporó hasta secado, el residuo se disolvió en agua caliente, y cristalizó. Agujas incoloras (640 mg, 71%), M.p. (punto de fusión) 154°C.

TLC (Cromatografía de capa fina) (A): R_f 0,2 UV (MeOH): 223 (31800), 260 (8700), 278 (9100).

¹H-NMR(D₆)DMSO: 2,12 (m, H_α-C(2')); 2,67 (m, H_β-C(2')); 2,38, 3,44 (m, H₂-C(5')); 3,73 (m, H-C(4')); 4,33 (m, H-C(3')); 4,73 (t, J = 5,7, OH-C(5')); 5,17 (d, J = 4,3, OH-C(3')); 6,27 ('t', J = 6,5 H-C(1')); 6,34 (br, NH₂), 6,62 (br, NH₂), 6,62 (br, NH₂).

Cálculo analítico para C₁₀H₁₃IN₆O₃ (392,2): C 30,63, H 3,34, N 21,43; encontrado: C 30,91, H 3,61, N 21,27.

3-bromo-1-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-4,6-[(2-metilpropanoil)amino]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidina (12a)

Se procedió a co-evaporar el compuesto 2b (F. Seela G. Becher, Synthesis 1998, 2, 207)(0,74 g 2,14 mol), con piridina anhidra, tres veces, y se disolvió en piridina anhidra (5 ml), al mismo tiempo que se agitaba, a la temperatura ambiente. A continuación, se añadió Me₃SiCl (1,37 mmol, 10,8 mmol), y después de un transcurso de tiempo de 15 minutos, se añadió anhídrido isobutírico (2,56 ml, 21,5 mmol). Se continuó con el régimen de agitación, durante un transcurso de tiempo de 3 horas. La mezcla de reacción, se enfrió en un baño de hielo y se diluyó con H₂O (2,5 ml) y, 5 minutos después, se añadió HN₃ acuoso al 25% (4,3 ml). Después de proceder a agitar durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, la mezcla de reacción, se evaporó hasta secado y se co-evaporó en tolueno (tres veces). El residuo, se purificó mediante FC (Cromatografía flash - de evaporación instantánea -) (CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1), proporcionando dos zonas. A partir de la zona que migró más rápidamente, se obtuvo el compuesto 13a, como un sólido amorfo incoloro (500 mg, 48%). R_f (A) 0,4 UV (MeOH): 284 (9500), 239 (33900).

¹H-NMR(D₆)DMSO: 1,15 (m, 2 CH(CH₃)₂); 2,25 (m, H_α-C(2')); 2,75 (m, H_β-C(2')); 2,86 (m, 2CH(CH₃)₂); 3,47 (m, H₂-C(5')); 3,81 (m, H-C(4')); 4,44 (m, H-C(3')); 4,73 (t, J = 5,5, OH-C(5')); 5,32 (d, J = 4,3, OH-C(3')); 6,54 ('t', J = 6,6 H-C(1')); 10,59 (2 s, 2 NH).

Cálculo analítico para C₁₈H₂₅BrN₆O₅ (485,3): C 44,55, H 5,19, N 17,32; encontrado: C 44,90, H 5,28, N 16,81.

4-amino-3-bromo-1-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-6-[(2-metilpropanoil)amino]-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidina (14)

La zona que migró más lentamente, de la reacción descrita anteriormente, arriba, proporcionó el compuesto 14, como un sólido amorfo incoloro (0,2 g, 22%).

R_f (A) 0,36 UV (MeOH): 282 (10900), 237 (59500).

¹H-NMR(D₆)DMSO: 1,04, 1,07 (m, CH(CH₃)₂); 2,21 (m, H_α-C(2')); 2,71 (m, H_β-C(2')); 2,90 (m, CH(CH₃)₂); 3,46 (m, H₂-C(5')); 3,78 (m, H-C(4')); 4,38 (m, H-C(3')); 4,72 (t, J = 5,6, OH-C(5')); 5,28 (d, J = 4,3, OH-C(3')); 6,42 ('t', J = 6,4 H-C(1')); 6,96 (br, NH₂); 10,08 (br, NH).

Cálculo analítico para C₁₄H₁₉BrN₆O₄ (415,2): C 40,49, H 4,61, N 20,24; encontrado: C 40,58, H 4,72, N 10,93.

1-[2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil]-4,6-dibenzamido-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidina (13b)

Se procedió a co-evaporar el compuesto 2c (1,0 g, 2,55 mmol), dos veces, con tolueno. Éste se disolvió en piridina anhidra (40 ml), y se añadió TMS-Cl (2,25 ml, 25,5 mmol), al mismo tiempo que se agitaba. La mezcla de reacción, se agitó bajo atmósfera de argón, se enfrió a una temperatura de 0°C, y se añadió lentamente PhCOCl (3,0 ml, 25,8 mmol), por procedimiento de goteo, en un transcurso de tiempo de 30 minutos. Después de haber procedido a agitar durante toda la noche, a la temperatura ambiente, la mezcla, se diluyó con EtOAc (200 ml), se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (200 ml), y con H₂O enfriada con hielo (200 ml). La fase acuosa, se extrajo con EtOAc (2 x 400 ml). Las fases orgánicas combinadas, se evaporaron hasta secado y, el residuo, se disolvió en THF/MeOH/H₂O (250 ml, 5 : 4 : 1). La solución de tonalidad oscura, de color naranja, se enfrió a una temperatura de 0°C y, a continuación, se añadió NaOH 2N (25 ml), y se continuó con el régimen de agitación, durante un transcurso de tiempo adicional de 40 minutos. El residuo, se purificó mediante FC (Cromatografía flash - de evaporación instantánea -) (CH₂Cl₂/MeOH 98 : 2 → CH₂Cl₂/MeOH 95 : 5), para proporcionar un sólido amorfo. (1,15 g, 75%).

TLC (Cromatografía de capa fina) (B): R_f 0,4 UV (MeOH): 244 (17400), 276 (14200).

ES 2 300 346 T3

¹H-NMR(D₆)DMSO: 2,13 (m, H_α-C(2')); 2,67 (m, H_β-C(2')); 2,38, 3,52 (m, H₂-C(5')); 3,84 (m, H-C(4')); 4,46 (m, H-C(3')); 4,72 (t, J = 5,7, OH-C(5')); 5,29 (d, J = 4,4, OH-C(3')); 6,66 ('t', J = 6,6 H-C(1')); 7,51 - 8,11 (m, arom. H)), 10,54, 10,78 (s, 2 NH).

5 Cálculo analítico para C₂₄H₂₁IN₆O₅ (584,6): C 48,01, H 3,53, N 14,00; encontrado: C 47,93, H 3,53, N 14,05.

3-bromo-1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-4,6-diisobutirilamino-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidina (15a)

10

Se procedió a co-evaporar el compuesto 13a (0,5 g, 1,03 mmol), con piridina anhidra, tres veces, y se disolvió en piridina (1,5 ml). Se añadió DMT-Cl (0,45 g, 1,33 mmol) y, la mezcla, se agitó a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo de 3 horas. La reacción, se extinguió mediante la adición de MeOH y, la mezcla, se evaporó hasta secado, y se co-evaporó con tolueno, tres veces. La FC (Cromatografía flash - de evaporación instantánea -) (CH₂Cl₂/MeOH 10 : 1), proporcionó el compuesto 15a, como una espuma incolora (0,57 g, 70%). R_f (B) 0,3 UV (MeOH): 237 (52000), 283 (10500).

15

¹H-NMR(D₆)DMSO: 1,04 - 1,17 (m, 2(CH₃)₂CH), 2,29 (m, H_α-C(2')); 2,85 (m, H_β-C(2')); 2,89 (m, 2(CH₃)₂CH; 3,07 (m, H₂-C(5')); 3,71 (s, 2 MeO); 3,94 (m, H-C(4')); 4,46 (m, H-C(3')); 5,35 (m, OH-C(3')); 6,57 (m, H-C(1')); 10,57, 10,74 (s, 2 NH).

20

Cálculo analítico para C₃₉H₄₃BrN₆O₇ (787,2): C 59,47, H 5,46, N 10,67; encontrado: C 59,08, H 5,37, N 10,39.

25 *3-bromo-1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-4,6-diisobutirilamino-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita (16a)*

A una solución del compuesto 15a (0,24 g, 0,3 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (3 ml), se le añadió (Ar)(iPr₂EtN (0,16 ml, 0,9 mmol) y 2-cianoetildisopropilfosforamidoclorhidrato (91 mg, 0,41 mmol) y, la mezcla, se agitó a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. La reacción, se controló en TLC (cromatografía de capa fina). A continuación, la mezcla de reacción, se diluyó con CH₂Cl₂ y, la solución, se lavó dos veces con una solución acuosa de NaHCO₃ al 5% y con salmuera. La fase orgánica, se secó (Na₂SO₄), se concentró y, el producto, se separó mediante FC (Cromatografía flash - de evaporación instantánea -) para proporcionar una espuma incolora (0,25 g, 84%). R_f (E), 0,63, 0,69 UV (MeOH): 282 (1000), 237 (49500).

35

³¹P-NMR (CDCl₃), 149,65.

¹H-NMR(D₆)DMSO: 1,11 - 1,35 (m, 4 CH(CH₃)₂), 2,51 (m, H_α-C(2')); 2,66 (m, H_β-C(2')); 2,95 - 3,91 (m, H₂-C(5')); CH(CH₃)₂;CH₂CH₂); 3,80 (s, MeO), 4,26 (m, H-C(4')); 4,82 (m, H-C(3')); 6,71 (m, H-C(1')); 6,75 - 7,44 (m, arom. H)); 8,39, 8,59 (br, 2 NH).

40

Cálculo analítico para C₁₈H₆₀BrN₈O₈P (921,2): C 58,36, H 6,08, N 11,35; encontrado: C 58,86, H 6,18, N 11,55.

45 *1-[2-desoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-4,6-dibenzamido-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidina (15b)*

Se procedió a co-evaporar el compuesto 13b (450 mg, 0,75 mmol), dos veces, con piridina anhidra. El residuo, se disolvió en piridina (2 ml), y se añadió cloruro de dimetoxitritilo (305 mg, 0,9 mmol). Después de un tiempo de agitación de 4 horas, la solución, se diluyó con 5 ml de MeOH, y se lavó con una solución acuosa de NaHCO₃ al 5% (3 x 20 ml). La fase orgánica, se secó (Na₂SO₄), y se concentró hasta secado. El residuo, se purificó mediante FC (Cromatografía flash - de evaporación instantánea -) (CH₂Cl₂/acetona, 95 : 5 → CH₂Cl₂/acetona 9 : 1), proporcionando 375 mg (55%), de una espuma incolora.

55

TLC (Cromatografía de capa fina) (CH₂Cl₂/acetona, 9:1): R_f 0,4 UV (MeOH): 244 (16900), 276 (16200).

¹H-NMR(D₆)DMSO: 2,35 (m, H_α-C(2')); 2,67 (m, H_β-C(2')); 3,07, 3,09 (m, H₂-C(5')); 3,70 (s, 2 OCH₃), 3,96 (m, H-C(4')); 4,56 (m, H-C(3')); (d, J = 4,8, OH-C(5')); 6,72 - 8,11 (m, arom. H)), 10,54, 10,78 (2 s, 2 NH).

60

Cálculo analítico para C₄₅H₃₉IN₆O₇ (902,73): C 59,87, H 4,35, N 9,31; encontrado C 59,93, H 4,33, N 9,39.

1-[2-desoxi-5-O-(dimetoxitritil)-β-D-eritro-pentofuranosil]-4,6-dibencilamido-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita (16b)

65

Se procedió a disolver el compuesto 15b (330 mg, 0,37 mmol) en THF (5 ml). A continuación, se añadió, bajo atmósfera de argón, (iPr₂EtN (186 μl, 0,48 mmol) y 2-cianoetildisopropilfosforamidoclorhidrato (108 μl, 0,48 mmol). Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos, la mezcla, se diluyó con CH₂Cl₂ (20 ml) y una solución acuosa

ES 2 300 346 T3

de NaHCO₃ al 5% (2 x 20 ml). La mezcla, se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 15 ml). La capa orgánica combinada, se secó, (Na₂SO₄), y se evaporó a un aceite. El residuo, se sometió FC (Cromatografía flash - de evaporación instantánea -) para proporcionar 280 mg (69%) de una espuma incolora.

5 TLC (Cromatografía de capa fina) (D): R_f 0,8 U.

³¹P-NMR (CDCl₃), 149,37, 149,38.

10 Ejemplo 3

Investigación de los compuestos precursores de series

15 En concordancia con la metodología standard, los oligonucleótidos mostrados en la tabla 19, se sintetizaron a partir de las forforamiditas en concordancia con la presente invención 19 (= 8a y 16a) a 23, en el esquema 11, y las fosforamiditas standard A, G, C y T, tal y como se han descrito ya, anteriormente, arriba. Las fosforamiditas, son también obtenibles en el mercado, de procedencia de la firma Glen Research, y se utilizaron en concordancia con las instrucciones del fabricante (Números de orden: 10 - 1906 - 02 (20), 10 - 1964 - 02 (21), 10 1056 - 02 (22), 10 - 1067 - 02 (23). El comportamiento de la hibridación, se investigó de la forma descrita, utilizando espectroscopia UV/VIS
20 de medición de la absorción en dependencia de la temperatura, a una longitud de onda de 260 nm.

25 (Esquema pasa a página siguiente)

30

35

40

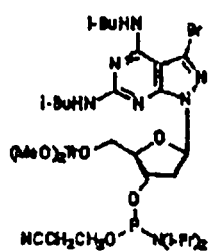
45

50

55

60

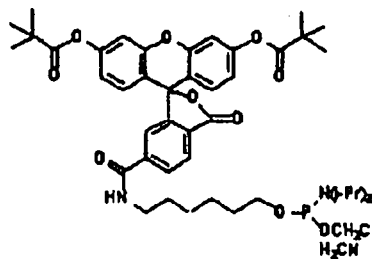
65



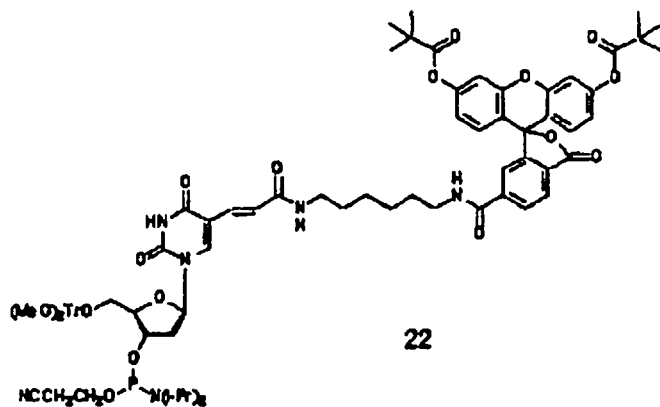
19 (= 8a = 16a)



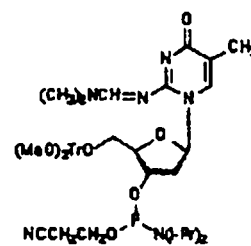
20



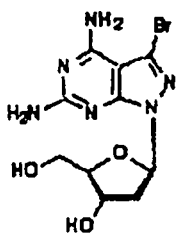
21



22



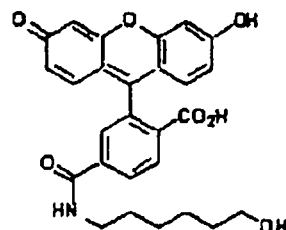
23



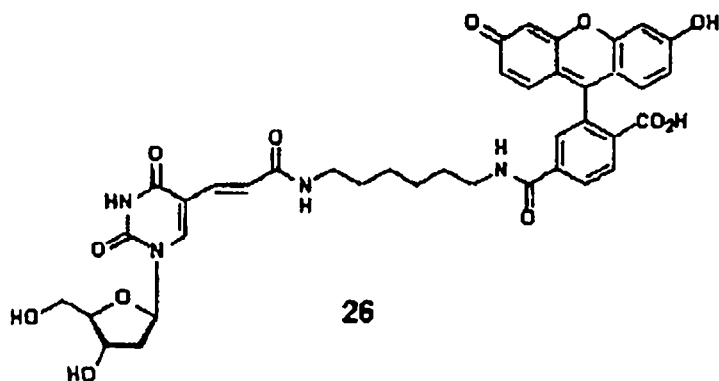
2b



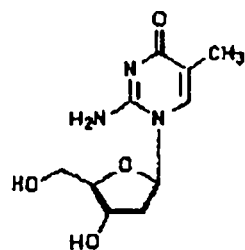
24



25



26



27

ES 2 300 346 T3

TABLA 19

Valores de T_m y datos termodinámicos de formación de dúplex de oligonucleótidos antiparalelos o paralelos, que portan grupos reportadores fluorescentes y/o engarces de aminolaquilo, para la inmovilización, en series ^{a)}

| Oligonucleótido | T_m [°C] | ΔH° [kcal/mol] | ΔS° [cal/K mol] | ΔG°_{310} [kcal/mol] |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| 5'-d(TAG GTC AAT ACT) (102) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) | 47 | -86.8 | -243.7 | -11.3 |
| 5'-d(TAG GTC 2b2bT ACT) (110) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) | 56 | -91.4 | -251.7 | -13.4 |
| 5'-d(24 TAG GTC AAT ACT) (500) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) | 49 | -90.0 | -254.4 | -11.1 |
| 5'-d(24 TAG GTC 2b2bT ACT) (501) • (103) 3'-d(ATC CAG TTA TGA) | 56 | -87.2 | -239.3 | -13.0 |
| 5'-d(24 TAG GTC AAT ACT) (500) • (502) 3'-d(ATC CAG TTA TGA 2b) | 49 | -95.2 | -270.8 | -11.2 |
| 5'-d(24 TAG GTC 2b2bT ACT) (501) • (502) 3'-d(ATCCAGT T ATGA2b) | 56 | -92.7 | -266.6 | -13.1 |
| 5'-d(24 TAG GTC AAT ACT) (500) • (503) 3'-d(ATC CAG TTA TGA 2b) | 50 | -96.5 | -242.7 | -11.2 |
| 5'-d(24 TAG GTC 2b2bT ACT) (501) • (503) 3'-d(ATC CAG TTA TGA 2b) | 58 | -95.1 | -262.1 | -13.8 |
| 5'-d(T 27 A TAA 27 T 27 27 T A) (504) • (505) 5'-d(A G T ATT G A G G AT) | 42 | -77.1 | -220.6 | -8.7 |
| 5'-d(24 T 27 A TAA 27 T 27 27 T A) (506) • (507) 5'-d(A G T ATT G A G G AT 2b) | 43 | -71.9 | -201.8 | -9.3 |
| 5'-d(24 T 27 A T 2b2b 27 T 27 27 T A) (508) • (507) 5'-d(A G T ATT G A G G AT 2b) | 48 | -93.7 | -265.4 | -11.3 |

^{a)} Medido UV-espectrofotométricamente a 260 nm, en Na-cacodilato 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM (pH 7) a una concentración de hebras individuales de 5 μ M + 5 μ M.

Pudo observarse el hecho de que, el comportamiento de fusión, es muy similar, en la forma paralela y antiparalela, incluso cuando se han marcado con grupos reportadores. La situación, es similar a la situación en donde, el compuesto de enlace de ácido nucleico en concordancia con la presente invención, se encuentra enlazado a la superficie, o forma una serie, o cuando éste se enlaza a una serie de compuestos de enlace de ácido nucleico, no naturales, ejemplificando la utilidad de la presente invención. Esto viene ejemplificado mediante los oligonucleótidos 501, que contienen un engarce, mediante el cual, éste puede unirse a una fase sólida, e hibrida a un ácido nucleico diana marcado, como el oligonucleótido 503.

10 Ejemplo 4

Visualización de la hibridación antiparalela y paralela

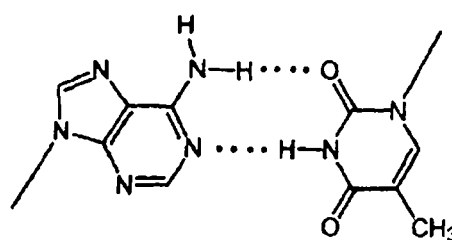
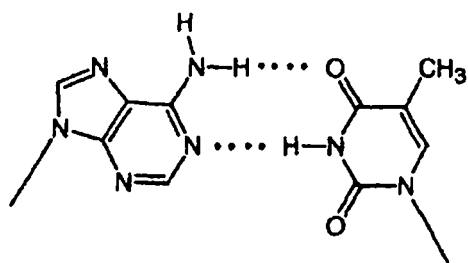
15 El modelo patrón de la interacción de enlace de hidrógeno, en dúplex antiparalelos o paralelos, se visualiza en los esquemas 12 y 13.

Esquema 12

20

25

30



35

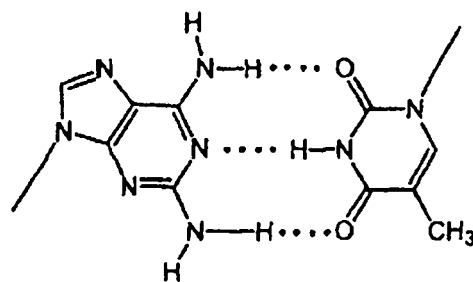
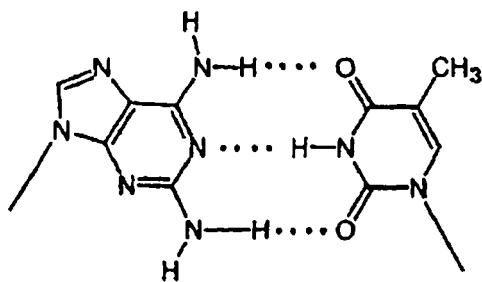
Par de bases AT, I
antiparalelo de
Watson Crick

Par de bases AT, II
paralelo de
Watson Crick

40

45

50

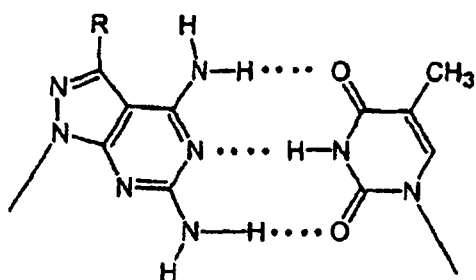


Par de bases n²AT, III
antiparalelo de
Watson Crick

Par de bases N²AT, IV
paralelo de
Watson Crick

60

65

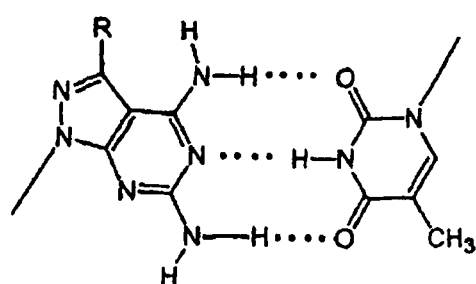


15 Par de bases PT, V

R = H, Br, I

20 antiparalelo de

Watson Crick



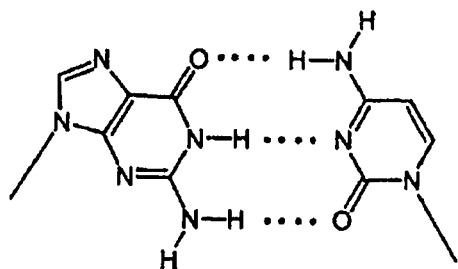
15 Par de bases AT, VI

R = H, Br, I

20 paralelo de

Watson Crick

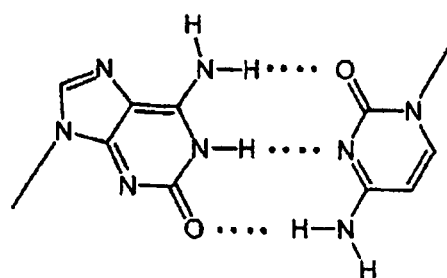
25 Esquema 13



40 Par de bases GC, VII

antiparalelo de

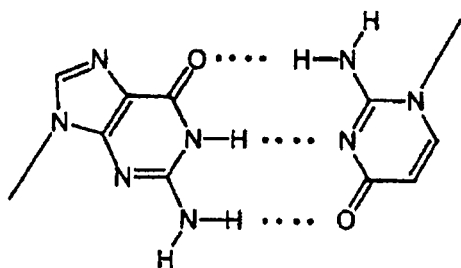
45 Watson Crick



40 Par de bases IGC, VIII

paralelo de

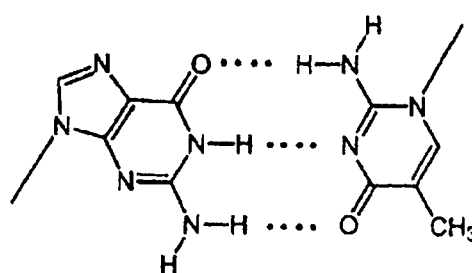
45 Watson Crick



60 Par de bases GIC, IX

antiparalelo de

65 Watson Crick



60 Par de bases G^{me}IC, X

paralelo de

65 Watson Crick

Referencias

- [1] N. **Ramzaeva**, F. **Seela**, *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1549.
- 5 [2] F. **Seela**, M. **Zulauf**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1999, 479.
- [3] F. **Seela**, G. **Becher**, *Helv. Chim. Acta* 1999, 82, 94.
- [4] B. L. **Gaffney**, L. A. **Marky**, R. A. **Jones**, *Tetrahedron* 1984, 40, 3.
- 10 [5] C. **Bailly**, M. J. **Waring**, *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 4309.
- [6] A. **Chollet**, E. H. **Kawashima**, *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 305.
- 15 [7] A. **Chollet**, A. **Chollet - Damerius**, E. H. **Kawashima**, *Chem. Scri.* 1986, 26,37.
- [8] F. B. **Howard**, H. T. **Miles**, *Biochemistry* 1983, 22, 597.
- [9] G. M. **Lamm**, B. J. **Blencowe**, B. S. **Sproat**, A. M. **Iribarren**, U. **Ryder**, A. I. **Lamond**, *Nucleic Acids Res.*
20 1991, 19, 3193.
- [10] J. D. **Hoheisel**, H. **Lehrach**, *FEBS Lett.* 1990, 274, 103.
- [11] J. **Sági**, E. **Szakonyi**, M. **Vorlicková**, J. **Kypr**, *J. Biomolec. Struct. Dyn.* 1996, 13, 1035.
- 25 [12] S. **Gryaznov**, R. G. **Schultz**, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 2489.
- [13] G. **Haaima**, H. F. **Hansen**, L. **Christensen**, O. **Dahl**, P. E. **Nielsen**, *Nucleic Acids Res.* 1997, 25,4639.
- 30 [14] V. **Boudou**, L. **Kerremans**, B. De **Bouvere**, E. **Lesclinier**, G. **Schepers**, R. **Busson**, A. Van **Aerschot**, P. **Herdewijn**; *Nucleic Acids Res.* 1999, 27, 1450.
- [15] F. **Seela**, H. **Driller**, *Helv. Chim. Acta* 1988, 71, 757.
- 35 [16]. G. **Balow**, V. **Mohan**, E. A. **Lesnik**, J. F. **Johnston**, B.P. **Mania**, O. L. **Acevedo**, *Nucleic Acids Res.* 1998,
26, 3350.
- [17] F. **Seela**, H. **Steker**, H. **Driller**, U. **Bindig**, *Liebigs Ann. Chem.* 1987. 15.
- 40 [18] F. **Seela**, G. **Becher**, *Synthesis* 1998, 207.
- [19] L. D. **Garaeva**, I. V. **Yartseva**, S. Y. **Melnik**, *Nucleosides Nucleotides* 1991, 10, 1295.
- [20] P. **Oertel**, H. **Winter**, Z. **Kazinimmzuk** J. A. **Vilpo**, P. **Richter**, F. **Seela**, *Liebigs Ann. Chem.* 1992 1165.
- 45 [21]J. **Davoll**, K. A. **Kerridge**, *J. Chem. Soc.* 1961, 2589.
- [22] L. D. **Garaeva**, I. A. **Korbukh**, Y. V. **Dobryrn**, T. G. **Nikolaeva**, M. N. **Preobrazhenskaya**. *Pharm. Chem J*
(Engl. Transl) 1988. 22, 523.
- 50 [23] J. van **Wijk**, C. **Altona**, 'PSEUROT 6.2-A Program for the Conformational Analysis of the Five-Mernbered
Rings', University of Leiden, July 1993: C. A. C. **Haasnoot**, F. A. A. M. de **Leeuw**, C. **Mona**, *Tetrahedron* 1980, 86,
2783.
- 55 [24] F. **Seela**, C. **Becher**, H. **Romemeyer**, H. **Reuter**, G. **Kastner** I.A. **Mikhailopulo**. *Helv. Chim. Acta* 1999, 82,
105.
- [25] G. **Blackburn**, M.J. **Gait**, in "Nucleic Acids in Chemistry and Biology", IRL Press, Oxford University Press
1990, p.28.
- 60 [26] B.S. **Sproat**, A. M. **Iribaren**, R. G. **Garcia**, B. **Beijer**, *Nucleic Acids Res.* 1891. 19 733
- [27] A. **Cano**, M. F. **Goodman**, R. **Eritja**, *Nucleosides Nucleotides* 1994,13, 501.
- 65 [28] I. **Luyten**, A. Van **Aerschot**, J. **Fozenaki** R. **Busson**, P. **Herdewn**, *Nucleosides Nucleotides* 1997. 16. 1649.
- [29]. S. **Ti**, B. L. **Gaffney**, R. A. **Jones**, *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104.1316.

ES 2 300 346 T3

[30] K. Groebke, J. Hunzicker, W. Fraser, L. Peng, U. Diederichsen, K. Zimmerman, A. Holzner, Ch. Lau-
mann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* 1998, 81.175.

[31] B. C. Froehier, P. C. Ng, M. D. Matteucci, *Nucleic Acids Res.* 1986, 14.5399.

[32] N. O. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster, *Nucleic Acids Res.* 1984, 12.4539.

[33] L. J. McBride, R. Kierzeh, S. L. Beaucage, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Sci.* 1986, 108.2040.

[34] F. Seela, C. Wei, A. Melenewslci, Y. He, R. Kröschel, E. Feiling, *Nucleosides Nucleotides* 1999, 18.1543

[35] F. Seela, A. Meleneswski, *Eur. Org. Chem* 1999, 485.

[36] F. Seela, G. Becher, *Helv. Chim. Acta* 2000, 83.928.

[37] F. Seela, C. Wei, *Helv. Chim. Acta* 1999, 82, 726.

[38] M. D. Kirnos, I. Y. Khudyakov, N I. Alexandrushkina, B. F. Vanyushin, *Nature* 1977, 270, 369.

[39] F. B. Howard, C. Chen, J. S. Cohen, H. T. Milles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984. 118.848

[40] E. A. Lesnik, S. M. Freier, *Biochemistry*, 1995, 34.10807.

[41] Ribuzyme Pharmaceuticals Inc., 2950 Wilderness, Place, Boulder, CO 80301, USA.

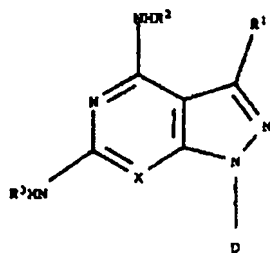
[42] F. Seela, C. Wei, G. Becher, M. Zulauf, P. Leonard, *Bio. Org. Med. Chem. Lett.* 2000, 10.289.

[43] J. A. McDowell, D. H. Turner, *Biochemistry*, 1996, 35, 14077.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para analizar interacciones entre los compuestos de enlace de ácido nucleico, que comprende una serie de distribución de una pluralidad de compuestos de enlace de ácido nucleico, que tienen diferentes secuencias, en donde la citada pluralidad de compuestos de enlace de ácido nucleico, se acoplan a un sustrato sólido, en localizaciones conocidas, y se seleccionan para enlazar los compuestos de enlace de ácidos nucleicos complementarios, a cuyo efecto, solamente los compuestos de enlace de ácidos nucleicos, o los compuestos de enlace de ácidos nucleicos y los compuestos de enlace de ácidos nucleicos complementarios, son compuestos de enlace de ácido nucleico, que comprenden un esqueleto de la cadena, teniendo unidos, el citado esqueleto de la cadena, grupos heterocíclicos, capaces de aparear bases a nucleobases, **caracterizada** por el hecho de que, el grupo heterocíclico, es un grupo de la fórmula general I

Fórmula I



en donde,

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R², R³, es independiente de X, R¹, R² y R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en,

- (1) -H
- (2) alquilo(C₁-C₁₀)
- (3) alqueno(C₂-C₁₀)
- (4) alquinilo(C₂-C₁₀)
- (5) arilo(C₆-C₂₂)
- (6) -Z-alquilo(C₁-C₁₀), -Z-alqueno(C₂-C₁₀), -Z-alquinilo(C₂-C₁₀), -Z-arilo(C₆-C₂₂) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,
- (7) sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alqueno(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), y un grupo reportador,

encontrándose insustituído, el citado alquilo, alqueno, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₆), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

ES 2 300 346 T3

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico;

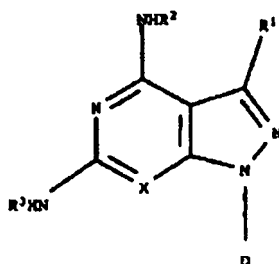
o cualesquiera sales de éstos.

5 2. Una composición, según la reivindicación 1, en donde, el citado sustrato sólido, se selecciona de entre el grupo consistente en sílice, materiales poliméricos, vidrio, vidrio poroso, perlas y sales, cortes o astillas y platinas.

3. Una composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde, R^1 , es -Br ó -I.

10 4. Uso de un ácido nucleico que tiene un esqueleto de cadena, como sonda de captura, en donde, el esqueleto de cadena, tiene unidos a éste, grupos heterocíclicos capaces de aparear bases a nucleobases, **caracterizado** por el hecho de que, un grupo heterocíclico, es un grupo de la fórmula general I

Fórmula I



en donde,

30 R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

(2) alquilo(C_1-C_{10})

(3) alquenilo(C_2-C_{10})

(4) alquinilo(C_2-C_{10})

(5) arilo(C_6-C_{22})

(6) -Z-alquilo(C_1-C_{10}), -Z-alquenilo(C_2-C_{10}), -Z-alquinilo(C_2-C_{10}), -Z-arilo(C_6-C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

(7) sustituyentes (2) a (6),

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, $-NO_2$, OR^{12} , -CN, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R^{11} , se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR^{12} ,

en donde, R^5 , R^6 y R^{12} , se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C_1-C_{10}), -alquenilo(C_2-C_{10}), -alquinilo(C_2-C_{10}), -arilo(C_6-C_{22}), y un grupo reportador,

encontrándose insustituído, el citado alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), -alcoxi(C_1-C_6), -OH, $-NR^5R^6$, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R^1 , R^2 ó R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

ES 2 300 346 T3

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico;

o cualesquiera sales de éstos.

5 5. Uso, según la reivindicación 4, en donde, R^1 , es Br- ó -I.

6. Un procedimiento para la determinación de la presencia, ausencia o cantidad de un ácido nucleico, que comprende las etapas de

10 - proporcionar una muestra sospechosa de contener el citado ácido nucleico,

- proporcionar un compuesto de enlace de ácido nucleico, el cual es esencialmente complementario a una parte o la totalidad del citado ácido nucleico,

15 - poner en contacto la citada muestra con el citado compuesto de enlace de ácido nucleico, bajo unas condiciones para enlazar el citado compuesto de enlace de ácido nucleico al citado ácido nucleico, para formar dúplex,

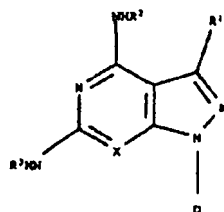
20 - determinar el grado de hibridación para el producto de enlace formado a partir del citado ácido nucleico y el citado compuesto de enlace de ácido nucleico, como una medida para la presencia, ausencia o cantidad del ácido nucleico

caracterizado por el hecho de que,

25 el compuesto de enlace de ácido nucleico complementario, es un compuesto de enlace de ácido nucleico, que comprende un esqueleto de la cadena, teniendo unidos, el citado esqueleto de la cadena, grupos heterocíclicos capaces de aparear bases a nucleobases, **caracterizado** por el hecho de que, el grupo heterocíclico, es un grupo de la fórmula general I

30

Fórmula I



35

en donde,

R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

45

R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

(2) alquilo(C_1-C_{10})

50

(3) alqueno(C_2-C_{10})

(4) alquino(C_2-C_{10})

55

(5) arilo(C_6-C_{22})

(6) -Z-alquilo(C_1-C_{10}), -Z-alqueno(C_2-C_{10}), -Z-alquino(C_2-C_{10}), -Z-arilo(C_6-C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-$, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

60

(7) sustituyentes (2) a (6),

65

en donde, cualquier alquilo, alquino o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, $-NO_2$, OR^{12} , -CN, -SH, -S-alquilo(C_1-C_6), $-NR^5R^6$, $-N^+R^5R^6R^{12}$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

ES 2 300 346 T3

en donde, R^{11} , se selecciona de entre el grupo consistente en $-NHR^{12}$ y OR^{12} ,

en donde, R^5 , R^6 y R^{12} , se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en $-H$, $-alquilo(C_1-C_{10})$, $-alqueni(C_2-C_{10})$, $-alquinilo(C_2-C_{10})$, $-arilo(C_6-C_{22})$, y un grupo reportador,

5 encontrándose insustituído, el citado alquilo, alqueni, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en $-halógeno$, $-SH$, $-S-alquilo(C_1-C_6)$, $-alcoxi(C_1-C_6)$, $-OH$, $-NR^5R^6$, $-COR^{11}$, $-NH-CONR^5R^6$, $-NH-CSNR^5R^6$ y $-(CH_2)_n-[O-(CH_2)_r]_s-NR^5R^6$, r y s , son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n , es 0 ó 1, independientemente de r y s ;

10 X , es independiente de R^1 , R^2 ó R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH ;

D , es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico;

15 o cualesquiera sales de éstos.

7. El procedimiento, según la reivindicación 6, en donde, el compuesto de enlace de ácido nucleico, comprende un grupo reportador.

20 8. El procedimiento, según la reivindicación 7, en donde, el grupo reportador, es un marcador fluorescente.

9. El procedimiento, según la reivindicación 8, en donde, el compuesto de enlace de ácido nucleico, comprende un agente de extinción, que extingue la emisión de fluorescencia del marcador fluorescente.

25 10. El procedimiento, según la reivindicación 9, en donde, el marcador, es una fluoresceína, y en donde, el agente de extinción, es una rodamina o cianina fluorescente.

30 11. El procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, que comprende adicionalmente la etapa de modificar la relación espacial entre el marcador fluorescente y el agente de extinción, subsiguientemente a la hibridación.

35 12. El procedimiento, según la reivindicación 11, en donde, la modificación espacial entre el marcador fluorescente y el agente de extinción, se realiza mediante hidrólisis de la exonucleasa del compuesto de enlace de ácido nucleico, en donde, la liberación del marcador, acontece como resultado de la hidrólisis de la exonucleasa.

40 13. El procedimiento, según la reivindicación 12, en donde, en donde, el grado de hibridación entre el compuesto de enlace de ácido nucleico y el ácido nucleico, se determina mediante la cantidad que se libera a partir del compuesto de enlace de ácido nucleico, subsiguientemente a la hibridación.

45 14. El procedimiento, según la reivindicación 6, en donde, el grado de hibridación entre el compuesto de enlace de ácido y el ácido nucleico, se determina mediante la capacidad cebadora del compuesto de enlace de ácido nucleico.

50 15. El procedimiento, según la reivindicación 14, en donde, en donde, el cebado, acontece como parte de una reacción en cadena de la polimerasa.

55 16. El procedimiento, según la reivindicación 8, en donde se utiliza más de un compuesto de enlace de ácido nucleico.

60 17. El procedimiento, según la reivindicación 16, en donde se utilizan dos compuestos de enlace de ácido nucleico.

65 18. El procedimiento, según la reivindicación 17, en donde, el primero de los dos compuestos de enlace de ácido nucleico, comprende un donante de fluorescencia y, el segundo de los dos compuestos de enlace de ácido nucleico, comprende un aceptor de fluorescencia, y en donde, las longitudes de onda de emisión del donante de fluorescencia, se solapan con las longitudes de absorción del aceptor de fluorescencia.

70 19. El procedimiento, según la reivindicación 18, en donde, el grado de hibridación, se mide mediante la cantidad de transferencia de luz entre el donante de fluorescencia y el aceptor de fluorescencia y emitida por el aceptor de fluorescencia.

75 20. El procedimiento, según la reivindicación 19, en donde, el grado de hibridación, se determina mediante la medición de la temperatura de fusión entre el compuesto de enlace de ácido nucleico y el ácido nucleico.

21. El procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 20, en donde, R^1 , es Br ó $-I$.

80 22 Un procedimiento para la extensión de cebadores, que comprende las etapas siguientes:

a) proporcionar un ácido nucleico que contiene una secuencia diana,

ES 2 300 346 T3

b) proporcionar uno o más compuestos de enlace de ácido nucleico, complementarios a la secuencia diana,

c) proporcionar una enzima de polimerización y substratos nucleótidos, y

5 d) incubar el ácido nucleico, los compuestos de enlace de ácido nucleico, la enzima y los substratos, bajo unas condiciones favorables para la polimerización,

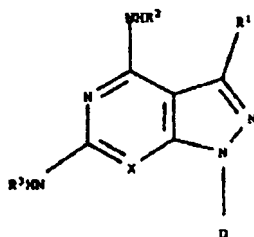
caracterizado por el hecho de que,

10 el compuesto de enlace de ácido nucleico, es un compuesto de enlace de ácido nucleico, que comprende un esqueleto de la cadena, teniendo unidos, el citado esqueleto de la cadena, grupos heterocíclicos capaces de aparear bases a nucleobases, **caracterizado** por el hecho de que, el grupo heterociclo, es un grupo de la fórmula general I

15

Fórmula I

20



25

en donde,

30

R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

35

(1) -H

(2) alquilo(C₁-C₁₀)

(3) alqueni(C₂-C₁₀)

40

(4) alquinilo(C₂-C₁₀)

(5) arilo(C₆-C₂₂)

45

(6) -Z-alquilo(C₁-C₁₀), -Z-alqueni(C₂-C₁₀), -Z-alquinilo(C₂-C₁₀), -Z-arilo(C₆-C₂₂) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

(7) sustituyentes (2) a (6),

50

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

55

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alqueni(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), y un grupo reportador,

60

encontrándose insustituido, el citado alquilo, alqueni, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₆), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

65

X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

ES 2 300 346 T3

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico;

o cualesquiera sales de éstos.

5 23. El procedimiento, según la reivindicación 22, en donde, el procedimiento, es parte de una reacción en cadena de la polimerasa.

10 24. El procedimiento, según la reivindicación 22, en donde, el procedimiento, se utiliza en la síntesis de una molécula de cDNA.

25. el procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde, R^1 , es -Br ó -I.

15 26. Un procedimiento para determinar la secuencia nucleótida de una secuencia DINA, en un ácido nucleico, comprendiendo, el procedimiento, las etapas siguientes:

a) proporcionar una ácido nucleico que comprende la secuencia diana,

20 b) proporcionar por lo menos dos compuestos de enlace de ácido nucleico, con una secuencia conocida, y en donde, uno de los por lo menos dos compuestos de enlace de ácido nucleico, tiene una secuencia que es perfectamente complementaria a la secuencia de enlace de ácido nucleico y, por lo menos otro de los compuestos de enlace de ácido nucleico, tiene una secuencia diana relacionada,

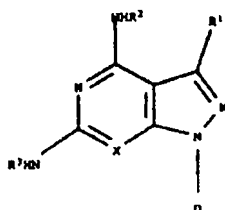
25 c) incubar los por lo menos dos compuestos de enlace de ácido nucleico, con el ácido nucleico, bajo condiciones de hibridación,

30 d) determinar el grado de hibridación entre cada uno de los compuestos de enlace de ácido nucleico y el ácido nucleico,

caracterizado por el hecho de que,

35 el compuesto de enlace de ácido nucleico, es un compuesto de enlace de ácido nucleico, que comprende un esqueleto de la cadena, teniendo unidos, el citado esqueleto de la cadena, grupos heterocíclicos capaces de aparear bases a nucleobases, **caracterizado** por el hecho de que, el grupo heterocíclico, es un grupo de la fórmula general I

Fórmula I



en donde,

50 R^1 , es independiente de X, R^2 ó R^3 , y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R^2, R^3 , es independiente de X, R^1 , R^2 y R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

55 (2) alquilo(C_1 - C_{10})

(3) alqueniilo(C_2 - C_{10})

60 (4) alquinilo(C_2 - C_{10})

(5) arilo(C_6 - C_{22})

65 (6) -Z-alquilo(C_1 - C_{10}), -Z-alqueniilo(C_2 - C_{10}), -Z-alquinilo(C_2 - C_{10}), -Z-arilo(C_6 - C_{22}) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, $-(CH_2)_n$ -[O-(CH_2) $_r$] $_s$ -, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

(7) sustituyentes (2) a (6),

ES 2 300 346 T3

en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -NO₂, OR¹², -CN, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -NR⁵R⁶, -N⁺R⁵R⁶R¹², -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R¹¹, se selecciona de entre el grupo consistente en -NHR¹² y OR¹²,

en donde, R⁵, R⁶ y R¹², se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en -H, -alquilo(C₁-C₁₀), -alquenilo(C₂-C₁₀), -alquinilo(C₂-C₁₀), -arilo(C₆-C₂₂), y un grupo reportador,

encontrándose insustituido, el citado alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, -SH, -S-alquilo(C₁-C₆), -alcoxi(C₁-C₆), -OH, -NR⁵R⁶, -COR¹¹, -NH-CONR⁵R⁶, -NH-CSNR⁵R⁶ y -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-NR⁵R⁶, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R¹, R² ó R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico;

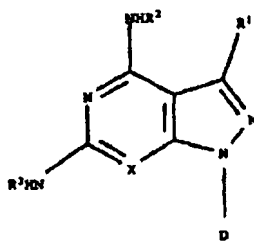
o cualesquiera sales de éstos.

27. El procedimiento, según la reivindicación 26, en donde, el por lo menos otro de los compuestos de enlace de ácido nucleico, tiene un enlace fallido de nucleótido individual, con la secuencia diana.

28. El procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, en donde, R¹, es -Br ó -I.

29. Un compuesto de enlace de ácido nucleico, para su uso en medicina, en donde, el compuesto de enlace de ácido nucleico, es un compuesto de enlace de ácido nucleico, que comprende un esqueleto de la cadena, teniendo unidos, el citado esqueleto de la cadena, grupos heterocíclicos capaces de aparear bases a nucleobases, **caracterizado** por el hecho de que, el grupo heterociclo, es un grupo de la fórmula general I

Fórmula I



en donde,

R¹, es independiente de X, R² ó R³, y es -F, -Cl, -Br, -I ó ciano;

R², R³, es independiente de X, R¹, R² y R³, y se selecciona de entre el grupo consistente en,

(1) -H

(2) alquilo(C₁-C₁₀)

(3) alquenilo(C₂-C₁₀)

(4) alquinilo(C₂-C₁₀)

(5) arilo(C₆-C₂₂)

(6) -Z-alquilo(C₁-C₁₀), -Z-alquenilo(C₂-C₁₀), -Z-alquinilo(C₂-C₁₀), -Z-arilo(C₆-C₂₂) ó Z-H, en donde, A = -CO-, -CO-NH-, -CS-NH-, -(CH₂)_n-[O-(CH₂)_r]_s-, en donde, r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 1 ó 2, independientemente de r y s,

(7) sustituyentes (2) a (6),

ES 2 300 346 T3

5 en donde, cualquier alquilo, alquinilo o arilo, puede sustituirse por uno o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en -halógeno, $-\text{NO}_2$, OR^{12} , $-\text{CN}$, $-\text{SH}$, $-\text{S}$ -alquilo(C_1 - C_6), $-\text{NR}^5\text{R}^6$, $-\text{N}^+\text{R}^5\text{R}^6\text{R}^{12}$, $-\text{COR}^{11}$, $-\text{NH}-\text{CONR}^5\text{R}^6$, $-\text{NH}-\text{CSNR}^5\text{R}^6$ y $-(\text{CH}_2)_n$ - $[\text{O}-(\text{CH}_2)_r]_s$ - NR^5R^6 , r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s,

en donde, R^{11} , se selecciona de entre el grupo consistente en $-\text{NHR}^{12}$ y OR^{12} ,

10 en donde, R^5 , R^6 y R^{12} , se seleccionan, de una forma independiente, de entre el grupo consistente en $-\text{H}$, $-\text{alquilo}(\text{C}_1$ - $\text{C}_{10})$, $-\text{alqueno}(\text{C}_2$ - $\text{C}_{10})$, $-\text{alquinilo}(\text{C}_2$ - $\text{C}_{10})$, $-\text{arilo}(\text{C}_6$ - $\text{C}_{22})$, y un grupo reportador,

15 encontrándose insustituído, el citado alquilo, alqueno, alquinilo o arilo, en las posiciones (2) a (7), o sustituido por una o más porciones seleccionadas de entre el grupo consistente en $-\text{halógeno}$, $-\text{SH}$, $-\text{S}$ -alquilo(C_1 - C_6), $-\text{alcoxi}(\text{C}_1$ - $\text{C}_6)$, $-\text{OH}$, $-\text{NR}^5\text{R}^6$, $-\text{COR}^{11}$, $-\text{NH}-\text{CONR}^5\text{R}^6$, $-\text{NH}-\text{CSNR}^5\text{R}^6$ y $-(\text{CH}_2)_n$ - $[\text{O}-(\text{CH}_2)_r]_s$ - NR^5R^6 , r y s, son, de una forma independiente la una con respecto a la otra, un número entero entre 1 a 18, y n, es 0 ó 1, independientemente de r y s;

X, es independiente de R^1 , R^2 ó R^3 , y se selecciona de entre el grupo consistente en N y CH;

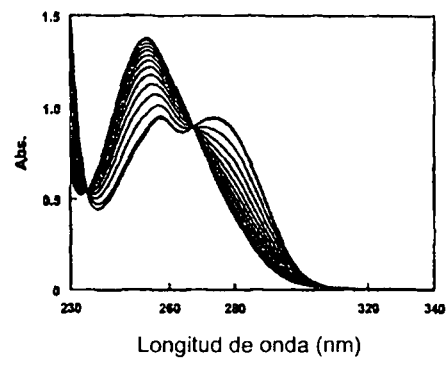
20 D, es la posición de unión del grupo al residuo del compuesto de enlace de ácido nucleico;

o cualesquiera sales de éstos.

30. El compuesto de enlace de ácido nucleico, según la reivindicación 29, en donde, R^1 , es $-\text{Br}$, ó $-\text{I}$.

Figura 1

a)



b)

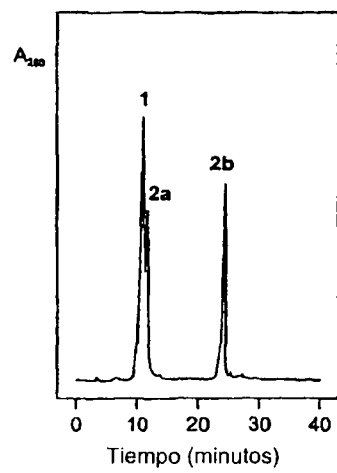
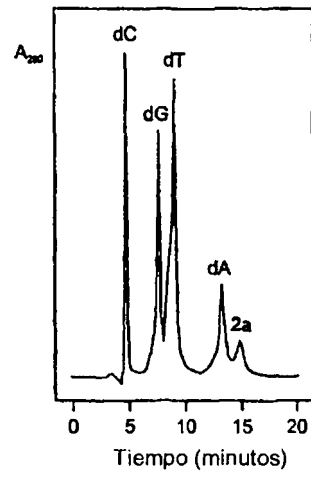


Figura 2

a)



b)

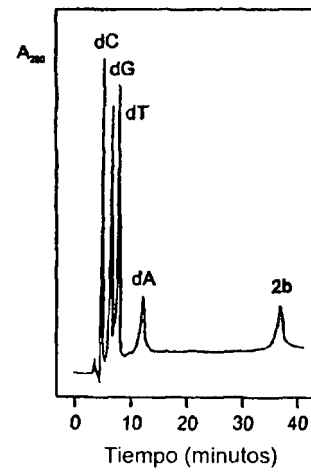
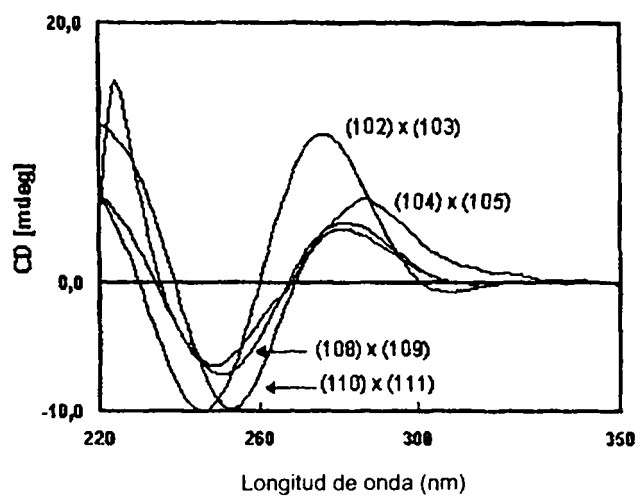


Figura 3

a)



b)

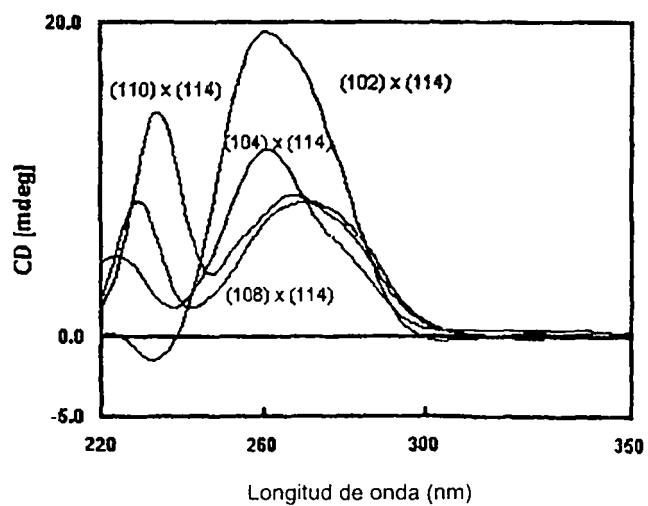
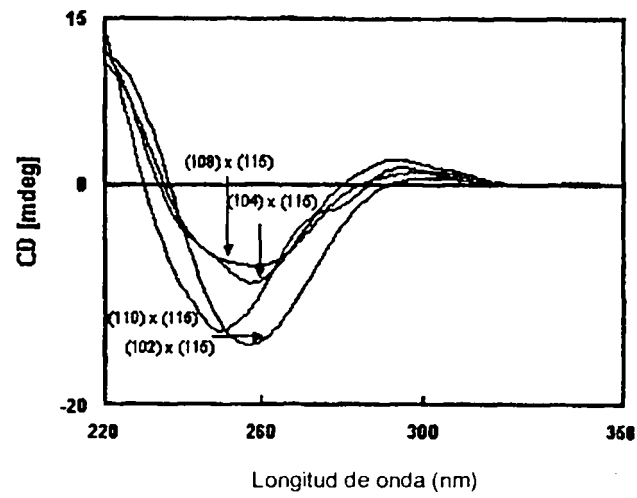


Figura 4

a)



b)

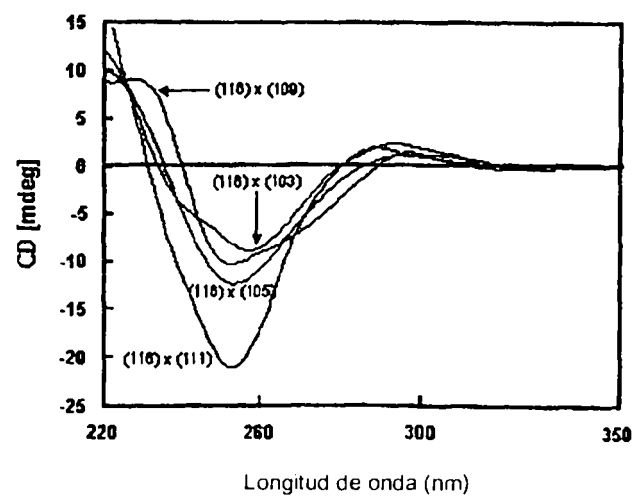


Figura 5a,b

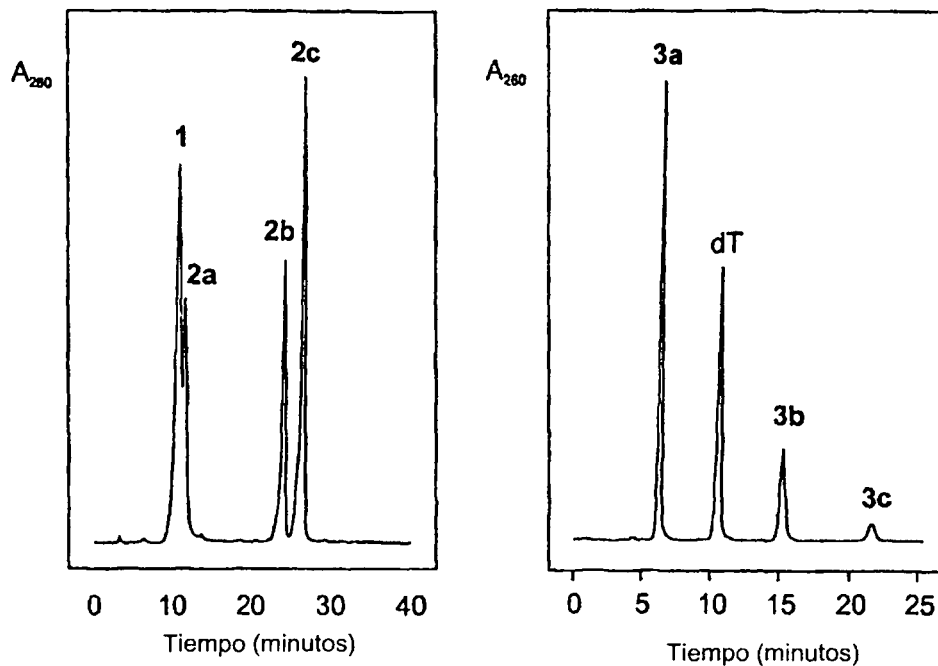


Figura 5c,d

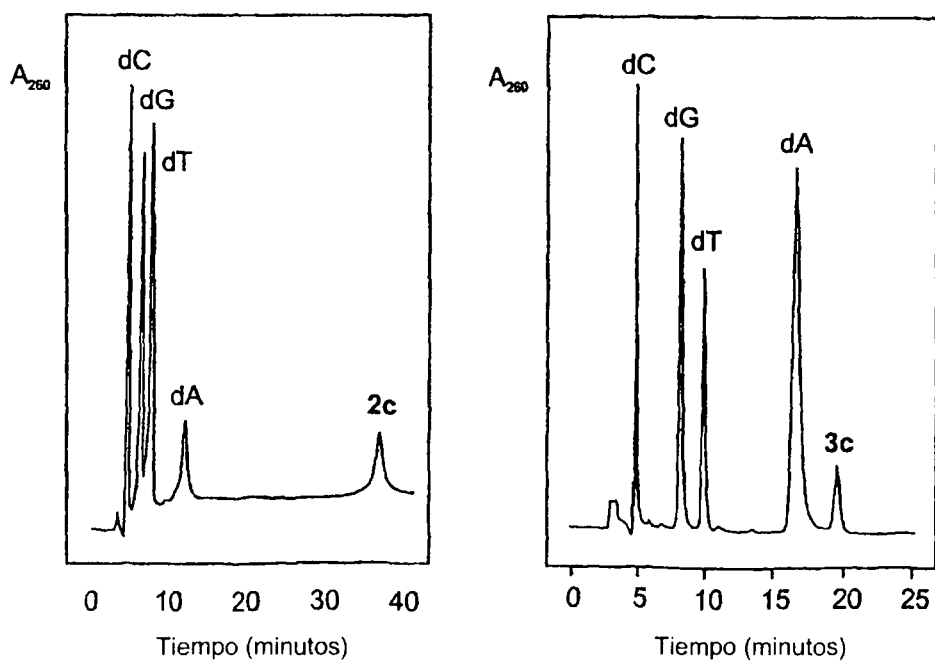


Figura 6

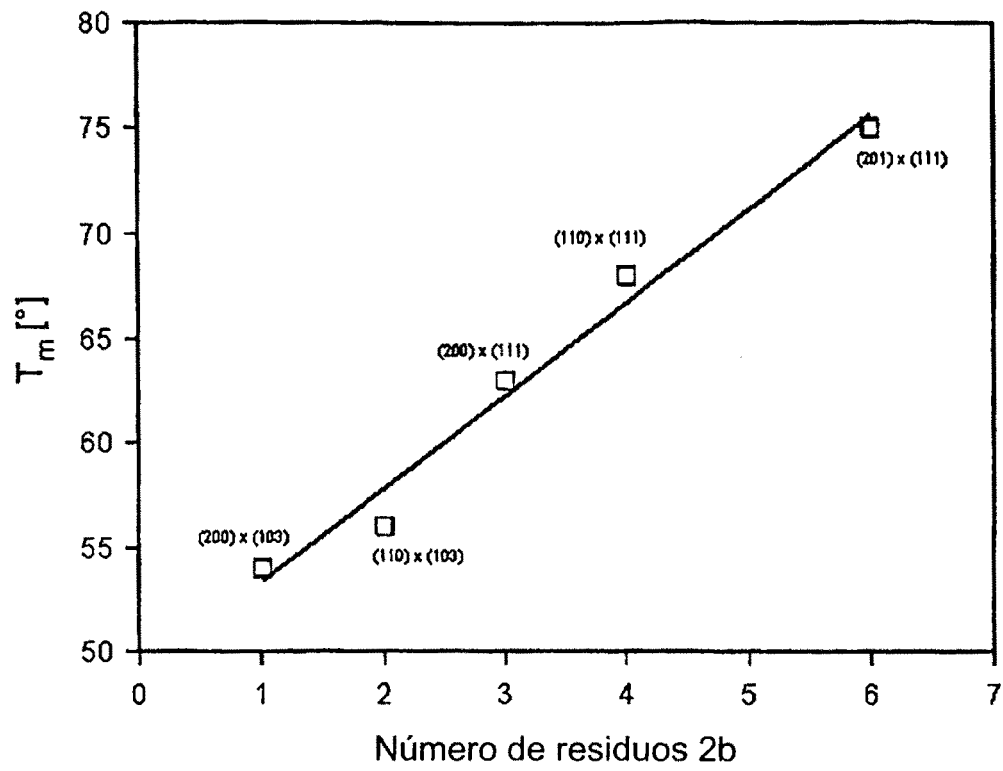


Figura 7a

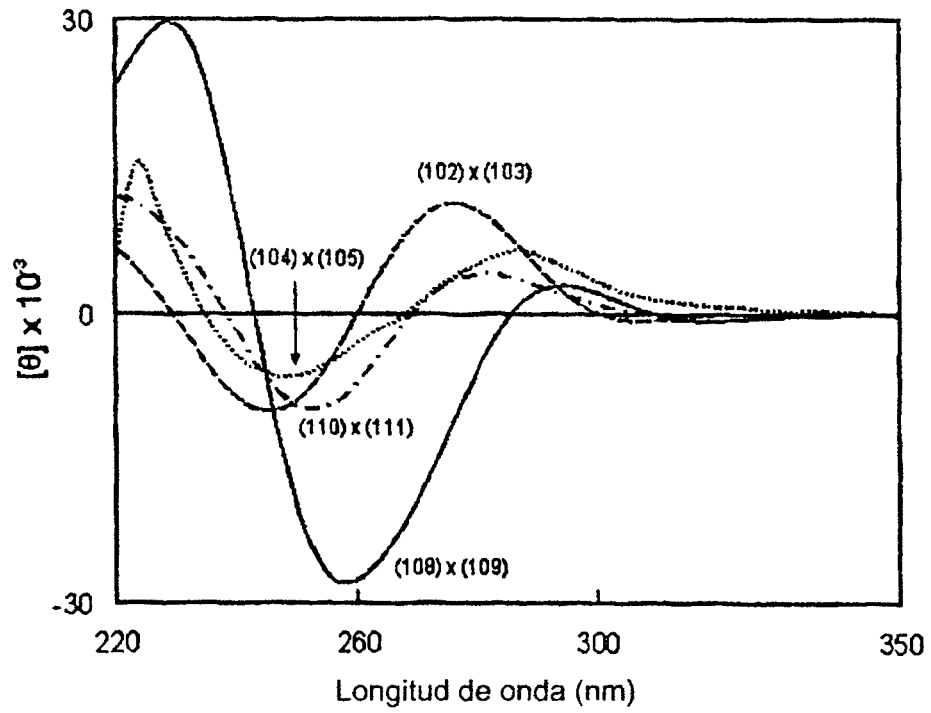
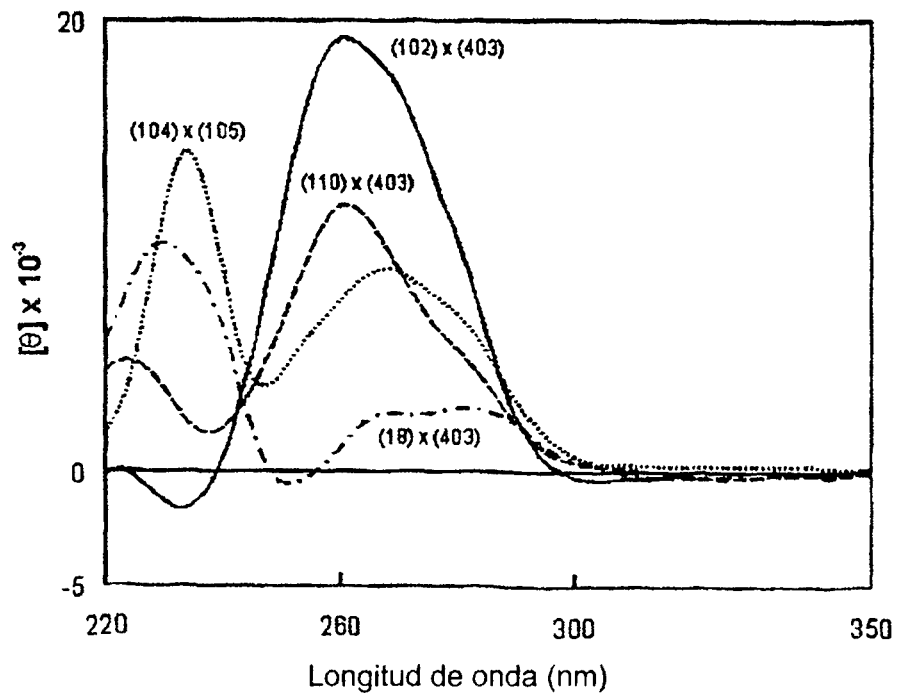


Figura 7b



ES 2 300 346 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Roche Diagnostics GmbH
F. HOFFMANN - LA ROCHE
- 5 <120> Oligonucleótidos que contienen análogos de pirazolo(3,4-d)pirimidina de purin-2,6-diamina y sus usos
<139> 5419(0A)
<140>
<141>
- 10 <150> EP 00116816.0
<151> 2000 - 08 - 03
<160> 39
- 15 <170> PatetentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 12
- 20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
- 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (100)
<220>
<223> n, en las posiciones 4 y 8, denota compuesto 2c
- 30 <400> 1

agtnntncc ta 12
- 35 <210> 2
<211> 12
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (102)
- 45 <400> 2

taggtcaata ct 12
- 50 <210> 3
<211> 12
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (103)
- 60 <400> 3

agtattgacc ta 12
- 65 <210> 4
<211> 12
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

ES 2 300 346 T3

| | | |
|----|---------------------------------------------------------------------|----|
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (104) | |
| | <220> | |
| 5 | <223> n, en las posiciones 2, 7, 8 y 9, denota el compuesto 1 | |
| | <400> 4 | |
| 10 | tnggtcnntn ct | 12 |
| | <210> 5 | |
| | <211> 12 | |
| 15 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 20 | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (105) | |
| | <220> | |
| | <223> n, en las posiciones 4 y 8, denota el compuesto 1 | |
| 25 | <400> 5 | |
| | agtnttgnc ta | 12 |
| 30 | <210> 6 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (106) | |
| | <400> 6 | |
| 40 | taggccggca ct | 12 |
| | <210> 7 | |
| 45 | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 50 | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (107) | |
| | <400> 7 | |
| 55 | agtgccgggcc ta | 12 |
| | <210> 8 | |
| | <211> 12 | |
| 60 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 65 | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (108) | |
| | <220> | |
| | <223> n en las posiciones 7 y 8, denota el compuesto 2a | |

ES 2 300 346 T3

| | | |
|----|---------------------------------------------------------------------|----|
| | <400> 8 | |
| | taggtcnnta ct | 12 |
| 5 | <210> 9 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| 10 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (109) | |
| | <220> | |
| 15 | <223> n, en las posiciones 4 y 8, denota compuesto 2a | |
| | <400> 9 | |
| 20 | agtnttgnc ta | 12 |
| | <210> 10 | |
| | <211> 12 | |
| 25 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 30 | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (110) | |
| | <220> | |
| | <223> n, en las posiciones 7 y 8, denota compuesto 2b | |
| 35 | <400> 10 | |
| | taggtcnnta ct | 12 |
| 40 | <210> 11 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (111) | |
| | <220> | |
| 50 | <223> n en las posiciones 4 y 8, denota el compuesto 2b | |
| | <400> 11 | |
| 55 | agtnttgnc ta | 12 |
| | <210> 12 | |
| | <211> 12 | |
| 60 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (114) | |
| 65 | | |

ES 2 300 346 T3

| | | |
|----|----------------------------------------------------------------------------|----|
| | <400> 12 | |
| | aguauugacc ua | 12 |
| 5 | <210> 13 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| 10 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (115) | |
| | <220> | |
| 15 | <223> n, en las siguientes posiciones, denota: 2 + 4 = isoC, 6 + 11 = isoG | |
| | <400> 13 | |
| 20 | atnnantt na | 12 |
| | <210> 14 | |
| | <211> 12 | |
| 25 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 30 | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (116) | |
| | <220> | |
| | <223> n, en las siguientes posiciones, denota: 2 + 7 = isoC, 9 + 10 = isoG | |
| 35 | <400> 14 | |
| | tnataantnn at | 12 |
| 40 | <210> 15 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (200) | |
| | <220> | |
| 50 | <223> n, en la posición 7, denota el compuesto 2b | |
| | <400> 15 | |
| 55 | taggtcnata ct | 12 |
| | <210> 16 | |
| | <211> 12 | |
| 60 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (201) | |
| 65 | <220> | |
| | <223> n, en las posiciones 2, 7 y 10, denota el compuesto 2b | |

ES 2 300 346 T3

| | | |
|----|---------------------------------------------------------------------|----|
| | <400> 16 | |
| | tnggtcnntn ct | 12 |
| 5 | <210> 17 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| 10 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (202) | |
| | <220> | |
| 15 | <223> n, en la posición 8, denota el compuesto 2c | |
| | <400> 17 | |
| 20 | agtattgncc ta | 12 |
| | <210> 18 | |
| | <211> 12 | |
| 25 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 30 | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (203) | |
| | <220> | |
| | <223> n, en la posición 4, denota el compuesto 2c | |
| 35 | <400> 18 | |
| | agtnttgacc ta | 12 |
| 40 | <210> 19 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (204) | |
| | <220> | |
| 50 | <223> n en las posiciones 7 y 8, denota el compuesto 2c | |
| | <400> 19 | |
| 55 | taggtcnnta ct | 12 |
| | <220> 20 | |
| | <211> 12 | |
| 60 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (205) | |
| 65 | <220> | |
| | <223> n, en las posiciones 2, 7 y 8, denota el compuesto 2c | |

ES 2 300 346 T3

| | | |
|----|---------------------------------------------------------------------|----|
| | <400> 20 | |
| | tnggtcnmtn ct | 12 |
| 5 | <210> 21 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| 10 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (300) | |
| | <220> | |
| 15 | <223> n, en las posiciones 5 y 9 denota el compuesto 3a | |
| | <400> 21 | |
| 20 | taggncaana ct | 12 |
| | <210> 22 | |
| | <211> 12 | |
| 25 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 30 | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (301) | |
| | <220> | |
| | <223> n, en las posiciones 5 y 6 denota el compuesto 3a | |
| 35 | <400> 22 | |
| | agtanngacc ta | 12 |
| 40 | <210> 23 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (302) | |
| | <220> | |
| 50 | <223> n, en las posiciones 5 y 9 denota el compuesto 3b | |
| | <400> 23 | |
| 55 | taggncaana ct | 12 |
| | <210> 24 | |
| | <211> 12 | |
| 60 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (103) | |
| 65 | <220> | |
| | <223> n, en las posiciones 5 y 6 denota el compuesto 3b | |

ES 2 300 346 T3

| | | |
|----|---------------------------------------------------------------------|----|
| | <400> 24 | |
| | agtanngacc ta | 12 |
| 5 | <210> 25 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| 10 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (304) | |
| | <220> | |
| 15 | <223> n, en las posiciones 5 y 9 denota el compuesto 3c | |
| | <400> 25 | |
| 20 | tagncaana ct | 12 |
| | <210> 26 | |
| | <211> 12 | |
| 25 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 30 | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (305) | |
| | <220> | |
| | <223> n, en las posiciones 5 y 6 denota el compuesto 3c | |
| 35 | <400> 26 | |
| | agtanngacc ta | 12 |
| 40 | <210> 27 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (400) | |
| | <220> | |
| 50 | <223> n, en las posiciones 4 y 8, denota el compuesto 1 | |
| | <400> 27 | |
| 55 | taggacaata ct | 12 |
| | <210> 28 | |
| | <211> 12 | |
| 60 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (401) | |
| 65 | | |

ES 2 300 346 T3

| | | |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| | <400> 28 | |
| | tagggcaata ct | 12 |
| 5 | <210> 29 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| 10 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (402) | |
| 15 | <400> 29 | |
| | taggccaata ct | 12 |
| 20 | <210> 30 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 25 | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (403) | |
| 30 | <400> 30 | |
| | aguauugacc ua | 12 |
| 35 | <210> 31 | |
| | <211> 13 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 40 | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (500) | |
| | <220> | |
| 45 | <223> n, en la posición 1, denota el compuesto 24 | |
| | <400> 31 | |
| | ntaggtcaat act | 13 |
| 50 | <210> 32 | |
| | <211> 13 | |
| | <212> DNA | |
| 55 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (501) | |
| 60 | <220> | |
| | <223> n, en la posición 1, denota el compuesto 24 y, en las posiciones 8 y 9, denota el compuesto 2b | |
| | <400> 32 | |
| 65 | ntaggtcnnt act | 13 |

ES 2 300 346 T3

| | | |
|----|---------------------------------------------------------------------|----|
| | <210> 33 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| 5 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (502) | |
| | <220> | |
| 10 | <223> n, en la posición 1, denota el compuesto 25 | |
| | <400> 33 | |
| 15 | nagtattgac cta | 13 |
| | <210> 34 | |
| | <211> 13 | |
| 20 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 25 | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (503) | |
| | <220> | |
| | <223> n, en la posiciones 1, denota el compuesto 26 | |
| 30 | <400> 34 | |
| | nagtattgac cta | 13 |
| 35 | <210> 35 | |
| | <211> 12 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 40 | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (504) | |
| | <220> | |
| 45 | <223> n, en las posiciones 2, 7 y 9, denota el compuesto 27 | |
| | <400> 35 | |
| 50 | tnataantnn ta | 12 |
| | <210> 36 | |
| | <211> 12 | |
| 55 | <212> DNA | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (505) | |
| 60 | <400> 36 | |
| | agtattgagg at | 12 |
| 65 | <210> 37 | |
| | <211> 13 | |

ES 2 300 346 T3

- <212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (506)
<220>
<223> n, en las posiciones 3, 8, 10 y 11, denota el compuesto 27 y, en la posición 1, denota el compuesto 24
- 10 <400> 37
nntaantn nta 13
- 15 <210> 38
<211> 13
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (507)
<220>
25 <223> n, en la posición 13, denota el compuesto 26
<400> 38
- 30 agtattgagg atn 13
<210> 39
<211> 13
35 <212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido (508)
40 <220>
<223> n, en las posiciones 3, 8, 10 y 11, denota el compuesto 127, n, en las posiciones 6 y 7, denota el compuesto 2b
y, n, en la posición 1, denota el compuesto 24
- 45 <400> 39
nntatnnntn nta 13
- 50
- 55
- 60
- 65