



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 239**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01104012 .8**
86 Fecha de presentación : **08.03.1995**
87 Número de publicación de la solicitud: **1113021**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2001**

54 Título: **Derivados de poliamida-oligonucleótidos, su preparación y uso.**

30 Prioridad: **14.03.1994 DE 4408528**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

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

72 Inventor/es: **Uhlmann, Eugen y**
Breipohl, Gerhard

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 269 239 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

Derivados de poliamida-oligonucleótidos, su preparación y uso.

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de poliamida-oligonucleótidos con valiosas propiedades físicas, biológicas y farmacológicas. Su aplicación se refiere al uso como inhibidores de la expresión génica (oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos sentido y oligonucleótidos formadores de triplex), como sondas para la detección de ácidos nucleicos y como adyuvantes en la biología molecular.

10 Oligonucleótidos encuentran aplicación, en medida creciente, como inhibidores de la expresión génica (G. Zon, Pharmaceutical Research 5, 539 (1988); J. S. Cohen, Topics in Molecular and Structural Biology 12 (1989) Macmillan Press; C. Helene y J. J. Toulme, Biochimica et Biophysica Acta 1049, 99 (1990); E. Uhlmann y A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990)). Los oligonucleótidos antisentido son fragmentos de ácido nucleico cuya secuencia de bases es complementaria a un ARNm a inhibir. Este ARNm diana puede ser de origen celular, viral o de otro origen patógeno. Como secuencias diana celulares entran en cuestión, por ejemplo, las de receptores, proteínas de la adhesión celular, enzimas, inmunomoduladores, citoquinas, factores de crecimiento, canales de iones u oncogenes. La inhibición de la multiplicación del virus con ayuda de oligonucleótidos antisentido se describió, por ejemplo, para VHB (virus de la hepatitis B), VHS-1 y -2 (virus Herpes Simplex tipos I y II), VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y virus de la influenza. En este caso, se emplean oligonucleótidos que son complementarios al ácido nucleico viral. Por el contrario, los oligonucleótidos sentido están concebidos en su secuencia de manera que, por ejemplo, fijan ("captan") proteínas fijadoras de ácidos nucleicos o enzimas que procesan ácidos nucleicos y, así, inhiben su actividad biológica (C. Helene y J. J. Toulme, Biochimica et Biophysica Acta 1049, 99 (1990)). Como dianas virales se han de mencionar aquí, por ejemplo, la transcriptasa inversa, la ADN-polimerasa y proteínas transactivador. Los oligonucleótidos formadores de triplex tienen en general el ADN como diana y forman, después de unirse a él, una estructura de triple hélice. Mientras que con ayuda de los oligonucleótidos antisentido se inhibe, en general, el procesamiento (corte y empalme, etc.) del ARNm o su traducción en la proteína, los oligonucleótidos formadores de triplex inhiben la transcripción o replicación del ADN (C. Helene y J.J. Toulme; Biochim. Biophys. Acta 1049 (1990) 99-125; E. Uhlmann y A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990)). Pero también es posible unir ácidos nucleicos de cadena sencilla en una primera hibridación con un oligonucleótido antisentido con la formación de una doble cadena que luego configura una estructura triple en una segunda hibridación con un oligonucleótido formador de triplex. Las regiones de unión antisentido y de triplex pueden, en este caso, estar albergadas ya sea en dos oligonucleótidos separados o en un oligonucleótido. Otra aplicación de oligonucleótidos sintéticos son las denominadas ribozimas que destruyen el ARN diana como consecuencia de su actividad de ribonucleasa (J.J. Rossi y N. Sarver, TIBTECH (1990) 8, 179; Castanetto *et al.*, Critical Rev. Eukar. Gene Expr. (1992) 2, 331).

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden emplearse también en terapia en el sentido de aptámeros. Los aptámeros son ácidos nucleicos oligómeros o sus análogos que se fijan con elevada afinidad a proteínas. El hallazgo de los aptámeros se realiza mediante selección *in vitro* a partir de una mezcla arbitraria (Famulok y Szostak (1992) Angew. Chem. 104, 1001-1011) y se llevó a cabo con éxito para un aptámero fijador de trombina (Bock *et al.* (1992) Nature 355, 564-566). En este caso, se puede proceder de forma que la secuencia de bases del aptámero puede ser determinada mediante rastreo de una mezcla de oligonucleótidos, y esta secuencia de bases puede transferirse luego a análogos de poliamida-oligonucleótidos. Otra posibilidad consiste en que la región fijadora del aptámero, para facilitar la identificación, es codificada por una parte de la molécula no fijadora, separada (Brenner y Lerner (1992) PNAS 89, 5381-5383).

En el diagnóstico de ADN se emplean fragmentos de ácidos nucleicos con un marcaje adecuado como las denominadas sondas de ADN (o DNA-probes) para la hibridación específica a un ácido nucleico a detectar. La configuración específica de la nueva cadena doble se vigila en este caso con ayuda del marcaje, que preferiblemente no es radiactivo. De este modo se pueden detectar enfermedades genéticas, malignas, virales o provocadas por otros agentes patógenos.

Para la mayoría de las aplicaciones mencionadas los oligonucleótidos son poco o absolutamente inadecuados en su forma que se presentan en la naturaleza. Deben modificarse químicamente de manera que cumplan con los requisitos especiales. Para que los oligonucleótidos puedan utilizarse en sistemas biológicos, por ejemplo para la inhibición de la multiplicación viral, deben cumplir con las siguientes premisas:

1. Bajo condiciones *in vivo*, es decir tanto en el suero como intracelularmente, deben presentar una estabilidad suficientemente grande.
2. Deben estar constituidos de forma tal que puedan atravesar la membrana celular y nuclear.
3. Se deben unir bajo condiciones fisiológicas de una forma específica de bases con su ácido nucleico diana para desplegar su efecto inhibitor.

Para las sondas de ADN los puntos 1 a 3 no son ninguna premisa; sin embargo, estos oligonucleótidos deben estar derivatizados de manera que sea posible una detección, por ejemplo mediante fluorescencia, quimioluminiscencia, colorimetría o tinción específica (Beck y Köster, Anal. Chem. 62, 2258 (1990)).

ES 2 269 239 T3

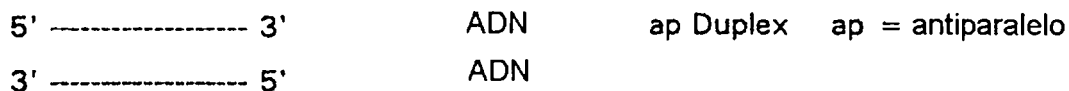
La modificación química de los oligonucleótidos se efectúa, la mayoría de las veces, de modo que son modificadas de manera correspondiente la cadena principal del fosfato, la unidad de ribosa o las nucleobases (J. S. Cohen, Topics in Molecular and Structural Biology 12 (1989) Macmillan Press; E. Uhlmann y A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990)). Otro método utilizado frecuentemente es la producción de conjugados de oligonucleótidos 5' por reacción del grupo 5'-hidroxi con los pertinentes reactivos de fosforilación. Si, por el contrario, se modifican todos los restos de fosfato internucleótidos, a menudo se modifican drásticamente las propiedades de los oligonucleótidos. Por ejemplo, está fuertemente reducida la solubilidad de metilfosfonatos en medio acuoso, mientras que los oligonucleótidos todo fosforioato actúan a menudo de manera inespecífica para la secuencia.

Recientemente se han descrito derivados de poliamida-ácido nucleico (Michael Egholm, Peter E. Nielsen, Rolf H. Berg y Ole Buchardt, Science 1991, 254, 1497-1500; documento WO 92/20702; M. Egholm *et al.* Nature (1993) 365, 566-568; P. Nielsen, (1994) Bioconjugate Chem. 5, 3-7), que se fijan con una alta afinidad como oligonucleótidos naturales a secuencias diana complementarias (ADN o ARN). Estos denominados péptidos o poliamida-ácidos nucleicos (PNA - siglas en inglés) son compuestos análogos a ADN, en los que el esqueleto de desoxirribosa-fosfato ha sido reemplazado por una poliamida-oligómero. Estos compuestos tienen la ventaja frente a los oligonucleótidos naturales que son muy estables en el suero. Sin embargo, por otra parte, tienen las siguientes propiedades desventajosas:

- (1) No son absorbidos en células o sólo lo son en una cantidad no detectable. Dado que los oligonucleótidos antisentido o formadores de triplex sólo pueden desplegar su actividad en la célula, los PNAs, como tales, son inadecuados para la expresión génica *in vivo*.
- (2) Los PNAs tienden a la agregación en solución acuosa, es decir también bajo condiciones fisiológicas. Por lo tanto, son malamente solubles en tampón acuoso y no están a disposición para la hibridación a secuencias complementarias.
- (3) Además, los PNAs tienen una elevada afinidad por diversos materiales tales como [®]Sephadex (Firma Pharmacia) o [®]Bond Elut (Firma Varian), que encuentran aplicación en la purificación de los oligómeros, de manera que los PNAs sólo se pueden aislar, a menudo, en malos rendimientos.
- (4) Otra desventaja agravante de los PNAs consiste en que no se fijan a ácidos nucleicos complementarios en una orientación inequívoca. Por lo tanto, la especificidad para la secuencia está reducida con respecto a los oligonucleótidos naturales. Mientras que los ácidos nucleicos naturales se hibridan, en general, en orientación antiparalela, a ácidos nucleicos complementarios, los PNAs se pueden fijar tanto en orientación antiparalela como paralela.
- (5) En el documento WO 92/20702 se menciona un conjugado de oligonucleótido-PNA (T)₇(5'-L-N)(t)₆-Ala (Fig. 25; hoja sustitutiva), en donde (T)₇ significa un oligonucleótido heptatimidilato, que está fijado a través de su 5'-O-fosfato y ácido 4-hidroxi-butírico (L) a la función amino primaria (N) de un PNA-hexatimidilato (t)₇ y alanina (Ala). No se describieron ni la síntesis de este compuesto ni cualesquiera propiedades.
- (6) Los PNAs muestran en experimentos con cultivos de células en el intervalo μ molar fuertes propiedades citotóxicas.

La orientación de las cadenas de ácidos nucleicos aparentes de bases se define como sigue: (véase Egholm *et al.*; Nature 365 (1993) 566-568).

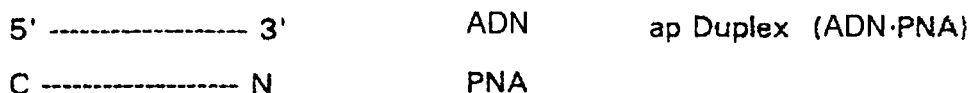
A)

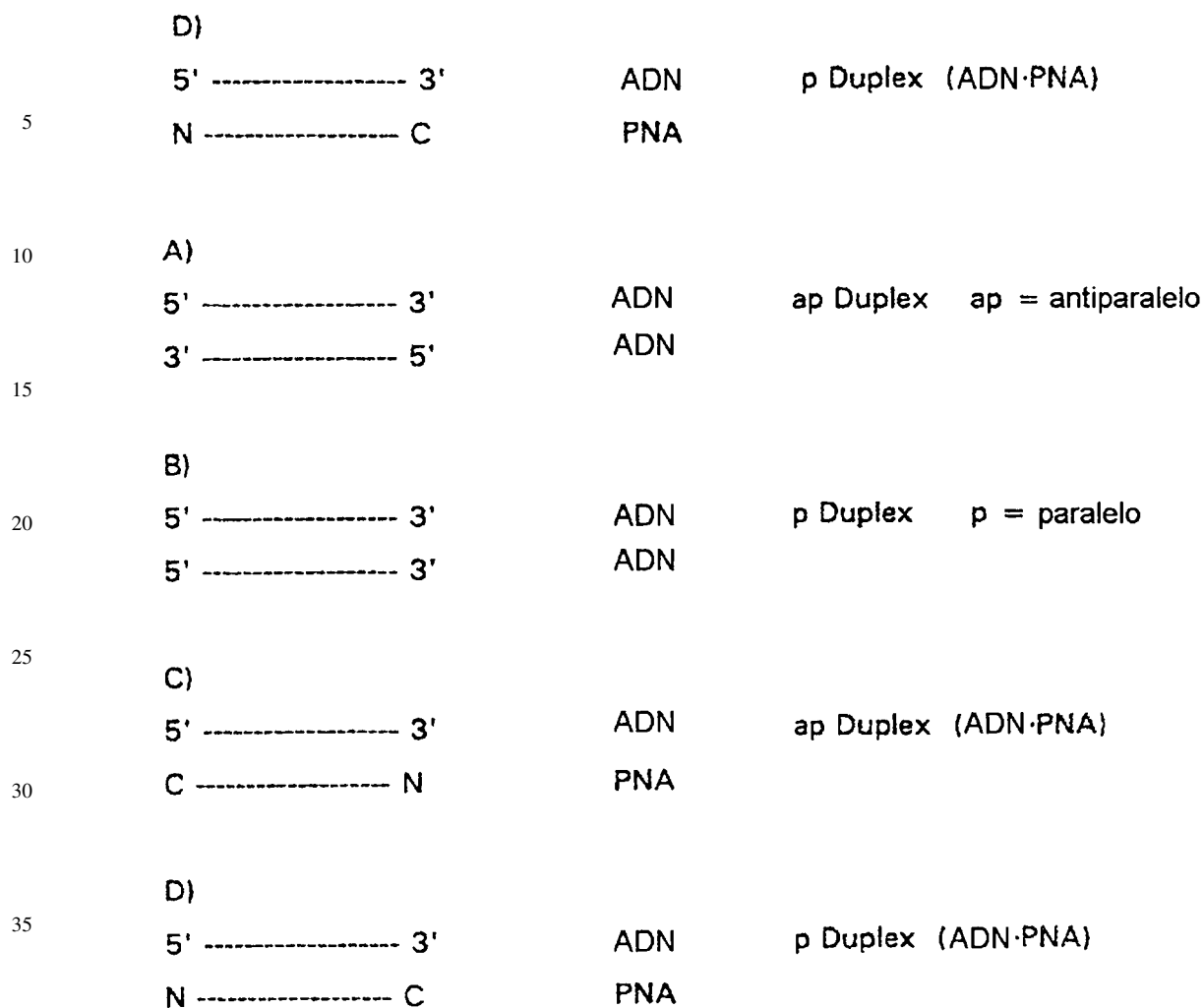


B)



C)





40 en donde

5' significa el extremo 5' de un oligonucleótido,

45 3' significa el extremo 3' de un oligonucleótido,

N significa el extremo amino de un PNA

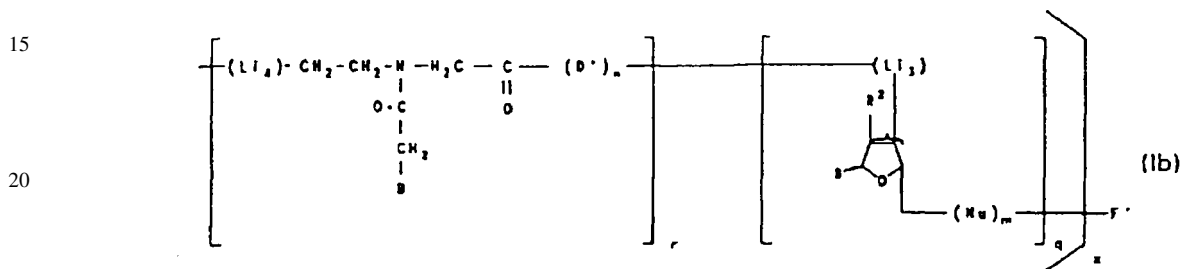
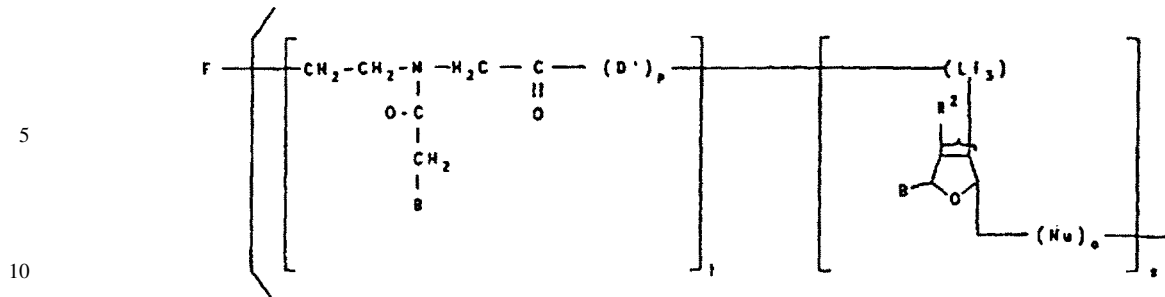
C significa el extremo carboxi de un PNA.

50 Los casos A) - D) son a título de ejemplo para los tipos de orientación, en principio posibles, de los oligómeros antisentido. Los casos E) - F) muestran posibilidades de la formación de triplex en ácidos nucleicos de cadena sencilla o de cadena doble. En este caso, dos de las cadenas sencillas de PNA o de ADN pueden estar enlazadas entre sí. Por ejemplo, en E) el extremo N del PNA puede estar enlazado con el extremo 5' del ADN, o en F) el extremo C del PNA puede estar enlazado con el extremo 5' del ADN.

55 La misión de la invención consistía, por lo tanto, en preparar derivados de poliamida-oligonucleótidos en los que se eliminen las desventajas arriba mencionadas.

60 Objeto de la invención son derivados de poliamida-oligonucleótidos de la fórmula Ib

65



en la que

x significa 1, en donde

r = s = 1 y, al mismo tiempo, q = t = cero

o q = r = 1 y s = t = cero

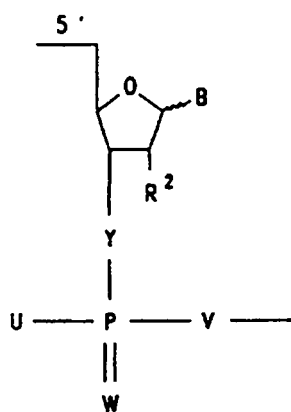
o q = r = s y t = cero;

R² significa hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C₁-C₁₈, preferiblemente alcoxi C₁-C₆, halógeno, tal como F o Cl, preferiblemente F, azido o amino;

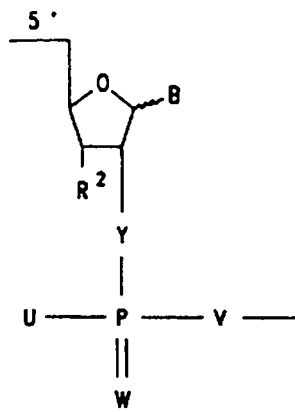
B, independientemente uno de otro, representan una base habitual en la química de los nucleótidos, por ejemplo representa bases naturales tales como adenina, citosina, timina, guanina, uracilo, inosina, o bases no naturales tales como, por ejemplo, purina, 2,6-diaminopurina, 7-deazaadenina, 7-deazaguanina, N⁴N⁴-etanocitosina, N⁶N⁶-etano-2,6-diaminopurina, pseudoisocitosina, 5-metilcitosina, 5-fluoruracilo, 5-alquil (C₃-C₆)-uracilo, 5-alquil (C₃-C₆)-citosina o sus formas de profármaco,

y los "corchetes" indican que R² y el sustituyente vecino se pueden encontrar en posición 2' y 3' o, también, a la inversa, en posición 3' y 2'; y en donde la estructura de poliamida contiene al menos una nucleobase que es distinta de timina;

Nu representa un radical de las fórmulas IIa o IIb



(IIa)



(IIb)

ES 2 269 239 T3

G' significa oxi, sulfanidilo, imino, -C(O)-, -C(O)NH-, un enlace o un radical de la fórmula VI, en donde U, V, W e Y están definidos como arriba; y

F y F' están enlazados a través de un enlace (compuestos cíclicos) y/o

F representa $R^0-(A)_k-V$ y

F' en la fórmula Ib representa $V^1-(A)$, $-R^1$,

en donde

R⁰ significa hidrógeno, alcanoílo C₁-C₁₈, preferiblemente alcanoílo C₈-C₁₈, alcoxi C₁-C₁₈-carbonilo, cicloalcanoílo C₃-C₈, aroílo C₇-C₁₅, heteroaróílo C₃-C₁₃ o un grupo que favorece la absorción intracelular del oligómero o sirve como marcaje de una sonda de ADN o, en la hibridación del oligómero al ácido nucleico diana, ataca a éste bajo fijación, reticulación o separación; o,

en el caso de k = cero, R⁰ es hidrógeno o, junto con V, representa un radical de la fórmula VII,



en donde

Z y Z', independientemente uno de otro, significa hidroxilo, mercapto, alcoxi C₁-C₂₂, preferiblemente alcoxi C₁₂-C₁₈, alquilo C₁-C₁₈, preferiblemente alquilo C₁₂-C₁₈, arilo C₆-C₂₀, preferiblemente arilo C₆-C₁₆, aril C₆-C₁₄-alquilo C₁-C₁₈, preferiblemente aril C₆-alquilo C₁-C₄, alquiltio C₁-C₂₂, preferiblemente alquiltio C₁₂-C₁₈, NHR³, NR³R⁴, o un grupo que favorece la absorción intracelular del oligómero o sirve como marcaje de una sonda de ADN o, en la hibridación del oligómero al ácido nucleico diana, ataca a éste bajo fijación, reticulación o separación, y en donde

R³, R⁴, V y W están definidos como arriba;

R¹ significa hidrógeno o Q⁰,

en donde R¹ siempre únicamente es hidrógeno cuando al mismo tiempo I = cero y

en la fórmula Ib q = 1 o q = r = cero y en F' = V¹-(A), -R¹ con V¹ = V,

A significa el radical de un aminoácido natural o no natural, preferiblemente de la serie glicina, leucina, histidina, fenilalanina, cisteína, lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, ácido tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido octahidroindol-2-carboxílico, N-(2-aminoetil)glicina

Q⁰ significa hidroxilo, OR', NH₂, NHR'', con

R' = alquilo C₁-C₁₈, preferiblemente alquilo C₁₂-C₁₈ y

R'' = alquilo C₁-C₁₈, preferiblemente alquilo C₁₂-C₁₈, aminoalquilo C₁-C₁₈, preferiblemente aminoalquilo C₁₂-C₁₈, hidroxialquilo C₁-C₁₈, preferiblemente hidroxialquilo C₁₂-C₁₈;

V está definido como arriba;

V¹ es un enlace o V, en donde F' sólo en la fórmula Ib con q = cero y r = 1, V¹ representa siempre un enlace;

k es cero a 10;

l es cero a 10;

con la condición de que

a) en el caso de que en el compuesto de la fórmula Ib t = cero y s = 1, Li₃ representa un enlace;

b) en el caso de que en el compuesto de la fórmula Ib s = t = cero, Li₄ representa un enlace;

en donde cada nucleótido puede presentarse en su configuración D o L y la base se puede encontrar en posición α o β.

ES 2 269 239 T3

Se prefieren particularmente compuestos de la fórmula Ib, en los cuales la base se encuentra en el azúcar en posición β ,

$$x = 1 \text{ y}$$

$$q = r = 1, s = t = \text{cero o}$$

$$r = s = 1, q = t = \text{cero o}$$

$$q = r = s = 1, t = \text{cero o}$$

$$r = s = t = 1, q = \text{cero.}$$

Se prefieren especialmente oligómeros de la fórmula Ib, en donde V', V, Y y W tienen el significado de tio, oxo, oxo o hidroxilo; de manera muy especialmente preferida son éstos, en el caso de que adicionalmente R² sea igual a hidrógeno.

Son especialmente preferidos también oligómeros de la fórmula Ib con $\varepsilon = 1$, en los cuales

Li₄ es a) un compuesto de la fórmula V, en la que V' = oxígeno o un compuesto de la fórmula VI, G = alquileo C₁-C₁₀, G' = -CONH-

b) un compuesto de la fórmula V, en la que G, V' es un enlace y G' es un compuesto de la fórmula VI, preferiblemente con U = V = W = Y = oxígeno o U = W = Y = oxígeno y V = imino

Li₃ es a) un compuesto de la fórmula V con V' = imino, G = alquileo C₁-C₁₀ y G' = compuesto de la fórmula VI

b) un compuesto de la fórmula V con V' = imino, G y G' = enlace

c) un compuesto de la fórmula V con V' = imino, G = alquileo C₁-C₁₀ y G' = V, preferiblemente con U = V = W = Y = oxígeno.

Muy particularmente preferidos son oligómeros de la fórmula Ib, en donde V', V, Y y W tienen el significado de tio, oxo, oxo o hidroxilo, R² es igual a hidrógeno, Li₁ tiene el significado de -V'-[CH₂]_nC(O)NH- con V' = compuesto de la fórmula VI con U = V = W = Y = oxígeno o Li₂ tiene el significado de -HN-[CH₂]_n(G')-, en donde n = 2 a 5 y G' es igual a la fórmula VI con U, V, W e Y = oxígeno.

Además, se prefieren oligómeros de la fórmula Ib, en donde V', V, Y y W tienen el significado de tio, oxo, oxo o hidroxilo, R² es igual a hidrógeno, Li₁ tiene el significado de -O-[CH₂]_nC(O)NH- o Li₂ tiene el significado de -HN-[CH₂]_n(G')-, en donde n = 2 a 5 y G' es igual a la fórmula VI con U, V, W e Y = oxígeno y q = cero y r = s = t = 1.

Se prefieren, además, oligómeros de la fórmula b, en donde los corchetes significan que R² se encuentra en posición 3' (véase la fórmula IIb). En este caso, la base preferida es adenina.

La invención no se limita a α - y β -D- o L-ribofuranosida, α - y β -D- o L-desoxirribofuranosida y correspondientes análogos de cinco anillos carbocíclicos, sino que también es válido para análogos de oligonucleótidos que están constituidos por otros eslabones de azúcar, por ejemplo azúcares ampliados en el anillo y reducidos en el anillo, derivados de azúcares acíclicos, puenteados en el anillo u otros adecuados. La invención no se limita, además, a los derivados del radical fosfato recogidos a título de ejemplo en la fórmula I, sino que se refiere a los derivados defosfo conocidos.

La parte de oligonucleótido (ADN en la fórmula I) también puede estar modificado de múltiples formas de la estructura natural. Modificaciones de este tipo, que se introducen según métodos en sí conocidos, son, por ejemplo:

a) Modificaciones del puente fosfato

A modo de ejemplo se mencionan: fosforotioatos, fosforoditioatos, metilfosfonatos, fosforamidatos, boranofosfatos, éster fosfatometílico, éster fosfatoetilico, fenilfosfonatos. Modificaciones preferidas del puente fosfato son fosforotioatos, fosforoditioatos y metilfosfonatos.

b) Reemplazo del puente fosfato

A modo de ejemplo se mencionan: reemplazo por grupos formacetal, 3'-tioformacetal, metilhidroxilamina, oxima, metilendimetilhidrazo, dimetilensulfona, grupos sililo. Se prefiere el reemplazo por formoacetales y 3'-tioformoacetales.

c) *Modificaciones del azúcar*

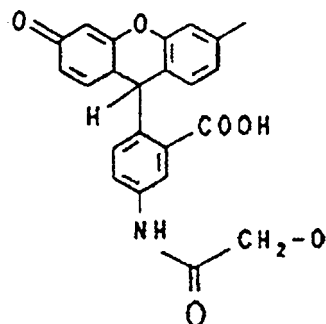
A modo de ejemplo se mencionan: azúcares α -anómeros, 2'-O-metilribosa, 2'-O-butilribosa, 2'-O-alilribosa, 2'-fluoro-2'-desoxirribosa, 2'-amino-2'-desoxirribosa, α -arabinofuranosa, análogos de azúcares carbocíclicos. Modificación preferida es la 2'-O-metilribosa y 2'-O-n-butilribosa.

d) *Modificaciones de las bases que no modifican la especificidad para el apareamiento de bases de Watson-Crick*

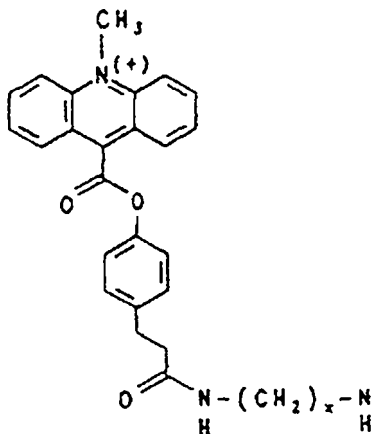
A modo de ejemplo se mencionan: 5-propinil-2'-desoxiuridina, 5-propinil-2'-desoxicidina, 5-hexinil-2'-desoxiuridina, 5-hexinil-2'-desoxicidina, 5-fluoro-2'-desoxicidina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina, 5-metil-2'-desoxicidina, 5-bromo-2'-desoxicidina. Modificaciones preferidas son 5-propinil-2'-desoxiuridina, 5-hexinil-2'-desoxiuridina, 5-hexinil-2'-desoxicidina y 5-propinil-2'-desoxicidina.

e) *Inversiones 3'-3' y 5'-5'* [p. ej. M. Koga *et al.*, J. Org. Chem. 56 (1991) 3757]f) *5'- y 3'-fosfatos, así como 5'- y 3'-tiofosfatos*

Ejemplos de grupos que favorecen la absorción intracelular son diferentes radicales lipófilos tales como $-\text{O}-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}_3$, en donde x significa un número entero de 6 a 18, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$, en donde n y m, independientemente uno de otro, significan un número entero de 6 a 12, $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}_3$, $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8-(\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}_3$ y $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_7-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$, pero también radicales esteroideos tales como colesterol o radicales de vitamina tales como vitamina E, vitamina A o vitamina D y otros conjugados, que aprovechan sistemas de soporte naturales tales como ácido biliar, ácido fólico, 2-(N-alquil,N-alcoxi)-aminoantraquinona y conjugados de la manosa y péptidos de los correspondientes receptores, que conducen a la endocitosis inducida por receptores de los oligonucleótidos tales como EGF (Epidermal Growth Factor - factor de crecimiento epidermal), bradiquinina y PDGF (Platelet Derived Growth Factor - factor de crecimiento derivado de plaquetas). Por grupos de marcaje se han de entender grupos fluorescentes, por ejemplo de derivados de dansilo-(=N-dimetil-1-aminonaftil-5-sulfonilo), fluoresceína o cumarina, o grupos quimioluminiscentes, por ejemplo de derivados de acridina, así como el sistema de digoxigenina detectable a través de ELISA, el grupo biotina detectable a través del sistema biotina/avidina o bien brazos de enlazador con grupos funcionales que permiten una posterior derivatización con grupos de informador detectables, por ejemplo un enlazador aminoalquilo que se hace reaccionar con un éster activo de acridinio para dar la muestra de quimioluminiscencia. Típicos grupos de marcaje son:

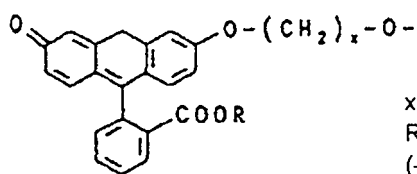


Derivado de fluoresceína



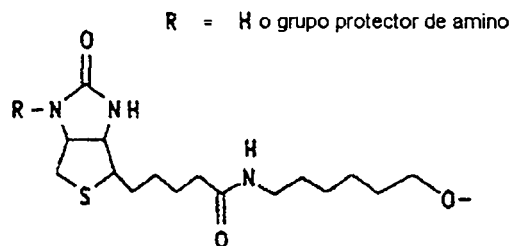
Éster de acridinio

ES 2 269 239 T3

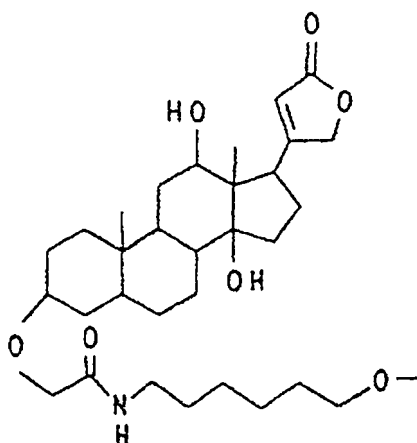


$x = 2 - 18$, preferiblemente 4
 $R = N$ o alquilo $C_1 - C_4$
 (- "fluoresceina" para $x = 4$ y $R = CH_3$)

Derivado de fluoresceina



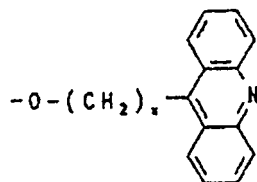
conjugado de biotina (- "biotina" para $R = Fmoc$)



Conjugado de digoxigenina

45

Análogos de oligonucleótidos que se unen a o intercalan entre y/o separan o reticulan ácidos nucleicos, contienen, p. ej., conjugados de acridina, psoraleno, fenantridina, naftoquinona, daunomicina o cloroetilaminoarilo. Típicos radicales intercalantes y reticulantes son:

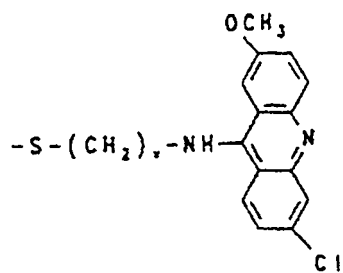


Derivado de acridina $x = 2 - 12$, preferiblemente 4

65

ES 2 269 239 T3

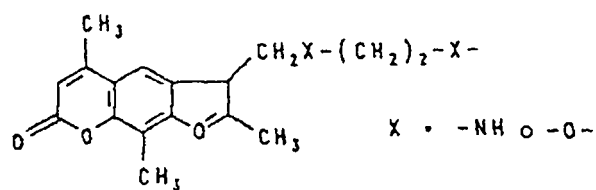
5



10

$x = 2-12$, preferiblemente 4

15

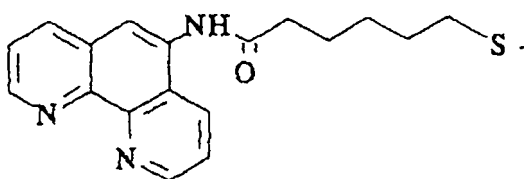


20

25

Conjugado de trimetilpsoraleno (= "Psoraleno" para $X = O$)

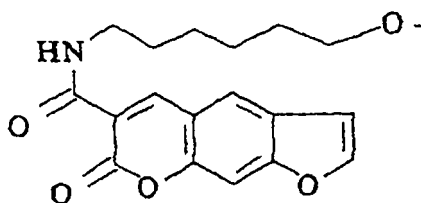
30



35

Conjugado de fenantrolina

40

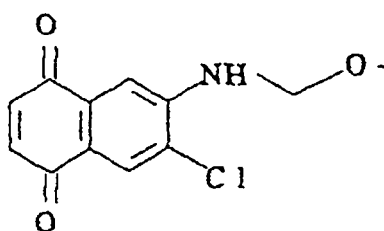


45

50

Conjugado de psoraleno

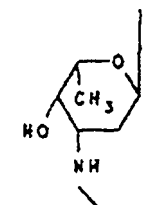
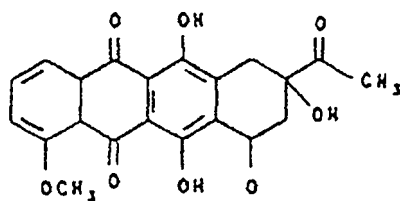
55



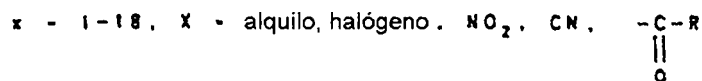
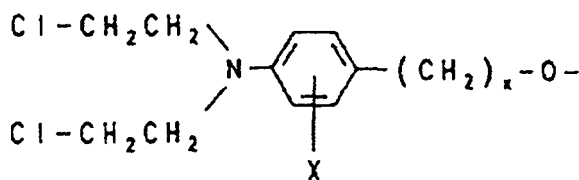
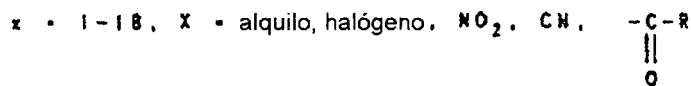
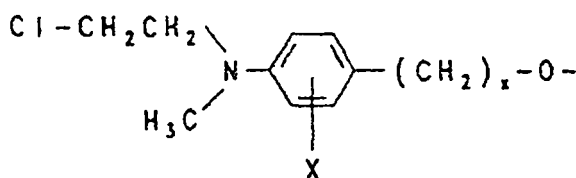
60

Conjugado de naftoquinona

65



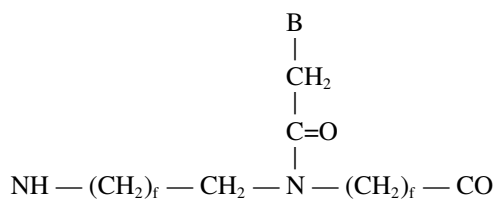
Derivado de daunomicina



Ejemplos de grupos NR^3R^4 , en los que R^3 y R^4 , junto con el átomo de nitrógeno que los porta, forman un anillo heterocíclico de 5 a 6 miembros que adicionalmente contiene otro heteroátomos, se pueden mencionar el radical morfolinilo y el radical imidazolidinilo.

La parte de poliamida (PNA en la fórmula I) se compone de estructuras de amida, que contienen al menos una nucleobase que es diferente de timina. Estructuras de poliamida de este tipo están constituidas, por ejemplo, por los siguientes eslabones a) a h), preferiblemente a), en donde f representa 1 a 4, preferiblemente representa 1 ó 2 y g representa cero a 3, preferiblemente representa cero a 2:

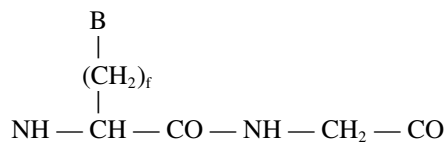
a)



ES 2 269 239 T3

b)

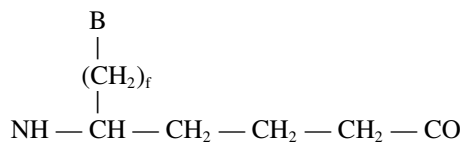
5



10 De Konig *et al.* (1971) Rec. Trav. Chim. 91, 1069

c)

15

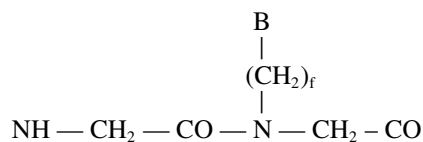


20

Huang *et al.* (1991) J. Org. Chem. 56, 6007

d)

25

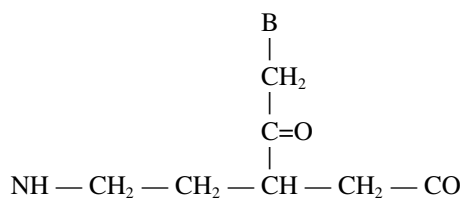


30

Almarsson *et al.* (1993) Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7518

e)

35

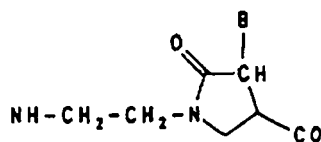


40

45 Froehler *et al.* (1991) documento WO 93/10820

f)

50

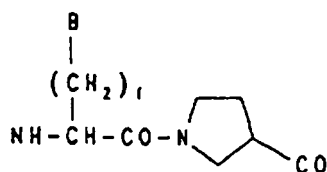


55

Froehler *et al.* (1991) documento WO 93/10820

g)

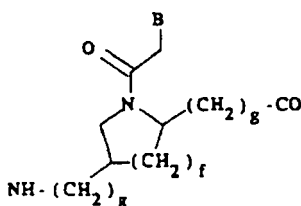
60



65

Lewis (1993) Tetrahedron Lett. 34, 5697.

h)



Grupos extremos de PNAs se describen en las solicitudes, presentadas al mismo tiempo, con los títulos “Síntesis de PNA con el uso de un grupo protector amino lábil frente a ácidos débiles” (HOE 94/F 060, documento DE-P 44 08 531.1) y “Síntesis de PNA con el uso de un grupo protector amino lábil frente a bases” (HOE 94/F 059, documento DE-P 44 08 533.8).

Se prefieren estructuras de poliamida que están constituidas por estructuras correspondientes a a). Estas últimas son las especialmente preferidas, en el caso de que $f = 1$.

La preparación de derivados de poliamida-oligonucleótidos de la fórmula I se efectúa de manera similar a la síntesis de oligonucleótidos en solución o, preferiblemente, en fase sólida, eventualmente con ayuda de un aparato de síntesis automático. La constitución del oligómero de la fórmula I puede efectuarse escalonadamente, en donde, sucesivamente, una unidad de PNA o una unidad de ADN se condensa en cada caso con una nucleobase a un soporte correspondientemente derivatizado o a una cadena de oligómeros en crecimiento. Sin embargo, la constitución se puede realizar también a modo de fragmentos, sintetizándose los fragmentos primeramente como estructuras de poliamida o de oligonucleótidos, que se enlazan luego para formar el poliamida-oligonucleótido de la fórmula I. Sin embargo, se pueden emplear también eslabones a base de PNA y nucleótido, preferiblemente dímeros, que después se constituyen, según los métodos de la química de los nucleótidos o la química de los péptidos, para formar derivados de poliamida-oligonucleótidos.

La constitución de la parte de oligonucleótido se efectúa según los procedimientos conocidos por el experto en la materia tales como el método del triéster, el método del H-fosfonato o el método de la fosforoamidita, preferiblemente según la química estándar de la fosforoamidita según Caruthers (M. D. Matteucci y M. H. Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 (1981)). La síntesis de la parte de poliamida se puede realizar según los métodos de la química de los péptidos conocidos por el experto en la materia. En el caso de que la parte de oligonucleótido y la parte de poliamida no se sinteticen por separado y se unan seguidamente, deben ser compatibles entre sí los procedimientos utilizados para la constitución de la estructura del oligonucleótido y de la poliamida, describiéndose una forma de realización preferida para la síntesis de la parte de poliamida en la solicitud presentada al mismo tiempo con el título “Síntesis de PNA con el uso de un grupo protector de amino lábil frente a ácidos débiles” (HOE 94/F 060, documento DE-P 44 08 531.1).

En función de que q , r , s y t sean igual a 1 o cero, la síntesis se realiza comenzando con la parte de oligonucleótido o con la parte de poliamida. La síntesis de compuestos de la fórmula I, cuya parte de oligonucleótido está modificada en el extremo 3' y/o en el extremo 5', se realiza, en relación con estas modificaciones, según los procedimientos descritos en el documento EP-A 0 552 766 (HOE 92/F 012) (véase el esquema de síntesis del ADN). La síntesis de compuestos de la fórmula I se realiza, con relación a la parte de poliamida, según el procedimiento descrito en la solicitud presentada al mismo tiempo, con el título “Síntesis de PNA con el uso de un grupo protector amino lábil frente a ácidos débiles” (HOE 94/ F 060, documento DE-P 44 08 531.1) (véase el esquema de síntesis de PNA).

Esquema de síntesis para ADN

[grupo de anclaje]-[polímero]

1. ↓ acoplamiento de PG-(Nu')-activo

PG-(Nu')-[grupo de anclaje]-[polímero]

2. ↓ separación del grupo protector PG

H-(Nu')-[grupo de anclaje]-[polímero]

3. ↓ repetición de las etapas 1 y 2 (n-1) veces

H-(Nu')-[grupo de anclaje]-[polímero]

4. ↓ acoplamiento de R⁰-V-activo

R⁰-V-(Nu')_n-[grupo de anclaje]-[polímero]

5. ↓ separación de polímero y grupos protectores

R⁰-V-(Nu')_n

Esquema de síntesis para PNA

[grupo de anclaje]-[polímero]

- 5 1. ↓ acoplamiento de PG-(Q')-OH
PG-(Q')-[grupo de anclaje]-[polímero]
- 10 2. ↓ separación del grupo protector PG
H-(Q')-[grupo de anclaje]-[polímero]
- 15 3. ↓ repetición de las etapas 1 y 2 (l-1) veces
H-(Q')-[grupo de anclaje]-[polímero]
- 20 4. ↓ acoplamiento de PG-[B'/X]-OH
PG-[B'/X]-(Q')₁-[grupo de anclaje]-[polímero]
- 25 5. ↓ separación del grupo protector PG
H[B'/X]-(Q')₁-[grupo de anclaje]-[polímero]
- 30 6. ↓ repetición de las etapas 4 y 5 (n-1) veces
H[B'/X]_n-(Q')₁-[grupo de anclaje]-[polímero]
- 35 7. ↓ acoplamiento de PG-(A')-OH
PG-(A')-[B'/X]_n-(Q')₁-[grupo de anclaje]-
[polímero]
- 40 8. ↓ separación del grupo protector PG
H-(A')-[B'/X]_n-(Q')₁-[grupo de anclaje]-
[polímero]
- 45 9. ↓ repetición de las etapas 7 y 8 (k-1) veces
H-(A')_k-[B'/X]_n-(Q')₁-[grupo de anclaje]-
[polímero]
- 50 10. ↓ acoplamiento del grupo R⁰
R⁰-(A')_k-[B'/X]_n-(Q')₁-[grupo de anclaje]-
[polímero]
- 55 11. ↓ separación de polímero y grupos protectores
R⁰-(A')_k-[B'/X]_n-(Q')₁-Q⁰

60 En ella significan:

PG grupo protector, preferiblemente un grupo protector lábil frente a ácidos débiles;

65 Nu' unidad de nucleótido, cuyo grupo amino exocíclico está protegido por un grupo protector adecuado;

Nu'-activo un derivado activado habitual en la química de los nucleótidos tal como, p. ej., de una fosfoamidita, un fósfor-diéster o un H-fosfonato; R', B' y Q' representan las formas de A, B y Q eventualmente protegidas.

ES 2 269 239 T3

Esquema de síntesis de híbridos de PNA/ADN de la fórmula I



5

Para $q=r=s=t=1$ y $x=1$ es válido el siguiente transcurso de síntesis:

10

1. ↓ **síntesis del grupo extremo F' ; eventual conjugación sobre el polímero PG-F'**



15

2. ↓ **separación del grupo protector PG**



20

3. ↓ **conjugación de la estructura de poliamida**



25

4. ↓ **acoplamiento de un enlazador**



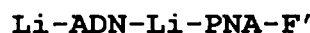
30

5. ↓ **conjugación de la estructura de nucleótido**



35

6. ↓ **acoplamiento de un enlazador**



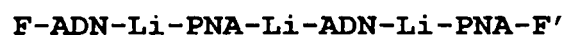
40

7. ↓ **repetición de las etapas 3 a 5**



45

8. ↓ **acoplamiento del grupo extremo F**



Puede suprimirse el acoplamiento del eslabón de enlazador, siempre que se encuentren correspondientes transiciones en los eslabones de PNA o ADN.

50

Para fines explicativos se muestra un esquema de síntesis para híbridos de PNA/ADN de la fórmula I, el cual explica a modo de ejemplo la preparación de un oligómero híbrido, en el que $q=r=s=t=1$ y $x=1$. Primero se sintetiza el grupo extremo F según procedimientos conocidos y, en el caso de la síntesis en fase sólida, se acopla en un soporte polímero (etapa 1). Después de la separación del grupo protector PG (etapa 2), que preferiblemente se realiza en un medio débilmente ácido, los eslabones de poliamida se acoplan hasta alcanzar la longitud deseada de la parte de PNA (etapa 3). Como transición a la parte de ADN puede realizarse entonces el enlace de una unidad de enlazador (etapa 4). A continuación, se realiza la conjugación de la estructura de nucleótido mediante la condensación sucesiva de los eslabones de nucleótido (etapa 5), preferiblemente según el método de fosforoamidita conocido. Después de la condensación de un enlazador (etapa 6), que posibilita la transición de ADN a PNA, se constituye de nuevo una estructura de poliamida. La introducción de un enlazador que posibilita la transición de PNA a ADN, la conjugación de otra estructura de ADN (etapa 7) y el subsiguiente acoplamiento del grupo extremo F (etapa 8) proporcionan la molécula híbrida [F-ADN-Li-PNA-Li-ADN-Li-PNA-F']. Los eslabones del enlazador pueden contener, con ello, también nucleobases. Para la síntesis de un híbrido F-ADN-Li-PNA-Li-F' ($q=r=1$, $s=t=cero$) se llevan a cabo, por ejemplo, primero las etapas 1-5 y la síntesis se termina con la etapa 8.

65

Para la síntesis de un híbrido F-PNA-Li-ADN-F' ($r=s=1$, $q=t=cero$) se llevan a cabo, por ejemplo, primero las etapas 1-2, luego le siguen las etapas 5-6, seguidas de la etapa 3 y finalización de la síntesis con la etapa 8. Para la síntesis de un híbrido F-PNA-Li-ADN-Li-PNA-F' ($r=s=t=1$, $q=cero$) la síntesis comienza con las etapas 1-6. Después de repetir la etapa 3, la síntesis se cierra con la etapa 8.

ES 2 269 239 T3

Si x en la fórmula I > 1 , entonces deben repetirse eventualmente las etapas 2-7. Después de la constitución de las cadenas polímeras, los híbridos de PNA/ADN deben separarse del soporte en el caso de la síntesis en fase sólida y, eventualmente, los grupos protectores deben separarse en las bases, cadenas laterales de aminoácidos y grupos extremos.

5

Las partes de PNA y ADN también se pueden sintetizar, sin embargo, por separado según métodos conocidos y, a continuación, se pueden acoplar entre sí a través de la correspondiente activación de al menos un componente. La activación de la parte de PNA se realiza preferiblemente a través del grupo ácido carboxílico, por ejemplo como éster activo o isotiocianato, los cuales se hacen reaccionar luego con grupos reactivos en la parte de ADN, preferiblemente con una función amino. La activación de la parte de ADN se realiza, por ejemplo, en forma de una condensación con bromocianógeno en sí conocida, en la que la función fosfato se hace reaccionar con un grupo reactivo en la parte de PNA, preferiblemente con una función amino.

10

Sorprendentemente, se encontró que los oligómeros de las fórmulas Ia y Ib, en comparación con los PNAs puros, poseen una absorción celular fuertemente incrementada. Esta absorción celular mejorada es muy decisiva, ya que oligómeros antisentido o formadores de triplex sólo pueden actuar cuando son absorbidos eficazmente en las células. Su comportamiento de hibridación es igualmente más favorable que en el caso de PNAs puros, ya que conducen preferiblemente a una formación de dúplex antiparalela. En comparación con los oligonucleótidos normales, poseen una estabilidad a la nucleasa mejorada, lo que se traduce en una actividad biológica incrementada. La afinidad de unión a ácidos nucleicos complementarios es mejor que la de otros oligonucleótidos estables frente a la nucleasa tales como, p. ej., fosforotioatos o metilfosfonatos. La afinidad de unión de los compuestos de acuerdo con la invención es igual de buena o, la mayoría de las veces, mejor en comparación con oligonucleótidos naturales que son rápidamente degradados bajo condiciones del suero. El incremento de la afinidad de unión depende de la longitud de la parte de PNA. Los PNAs puros mostraron en los ensayos con cultivos celulares, a concentraciones de $> 5 \mu\text{M}$, un fuerte efecto citotóxico, mientras que los compuestos de acuerdo con la invención no dañaban a las células. Además, se encontró que compuestos de la fórmula I, en función de la secuencia de bases de las partes de PNA y de ADN, inhiben la expresión de genes específicos, por ejemplo de enzimas, receptores o factores de crecimiento en el cultivo celular y en ejemplos seleccionados en el modelo con animales.

15

20

25

30

Otras ventajas de los oligómeros de PNA/ADN u oligómeros de PNA/ARN consisten en la posibilidad de la estimulación de endonucleasas celulares tales como, por ejemplo, RNasa H y RNasa L. En contraposición a los PNAs las quimeras de PNA-ADN de acuerdo con la invención, que presentan algunas unidades de desoxirribonucleótido, después de la unión al ARN diana complementario, separan a éste, de un modo específico para la secuencia, mediante inducción de la RNasa H celular. Una forma de realización particular de los oligómeros de acuerdo con la invención son, además, aquellos que están constituidos por una parte de PNA y una parte de oligoadenilato 2'5'-enlazada, preferiblemente tetraadenilato o su análogo de cordicepina, y que activan la RNasa L celular.

35

De manera muy general, la presente invención se extiende al uso de compuestos de la fórmula I como componentes terapéuticamente activos de un medicamento. En calidad de derivados de poliamida-oligonucleótidos terapéuticamente activos se entienden, en general, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos formadores de una hélice triple, aptámeros o ribozimas, en particular oligonucleótidos antisentido.

40

Los medicamentos de la presente invención se pueden utilizar, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades que son provocadas por virus, por ejemplo por VIH, VHS-1, VHS-2, influenza, VSV, hepatitis B o papilomavirus.

45

Derivados de poliamida-oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, que son activos frente a dianas de este tipo, tienen por ejemplo la siguiente secuencia de bases. La longitud y posición de las partes de PNA y ADN puede variarse en estas secuencias de manera correspondiente para conseguir propiedades óptimas.

50

a) contra HIV, por ejemplo.

5'-ACACCCAATTCTGAAAATGG-3' o (I)

55

5'-AGGTCCTGTTCCGGGCGCCA-3' o (II)

5'-GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA-3' o (III)

5'-GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAA-3' o (IV)

60

5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTCCTGCCA o (VI)

b) contra HSV-1, por ejemplo,

65

5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCG-3' (VII)

ES 2 269 239 T3

Los medicamentos de la presente invención se adecuan, por ejemplo, también para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, en este caso pueden pasar a emplearse secuencias de poliamida-oligonucleótidos que están dirigidas contra dianas que son las responsables de la formación del cáncer o el desarrollo del cáncer. Dianas de este tipo son, por ejemplo:

- 1) Oncoproteínas nucleares tales como, por ejemplo, c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120
- 2) Oncoproteínas citoplásmicas/asociadas a la membrana tales como, por ejemplo, EJras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl
- 3) Receptores celulares tales como, por ejemplo, receptor del EGF, c-erbA, receptores de retinoides, subunidad reguladora de la proteína quinasa, c-fms
- 4) Citoquinas, factores de crecimiento, matriz extracelular tal como, por ejemplo, CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, bFGF, mieloblastina, fibronectina,

Poliamida-oligonucleótidos antisentido de la fórmula I de acuerdo con la invención, que son activos frente a dianas de este tipo, tienen por ejemplo la siguiente secuencia de bases:

a) contra c-Ha-ras, p. ej.

6'-CAGCTGCAACCCAGC-3'

(VIII)

b) bFGF, p. ej.

5'-GGCTGCCATGGTCCC-3'

(XXX)

c) c-myc, p. ej.

5'-GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC-3'

(IX)

5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'

(X)

d) c-myb, p. ej.

5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3'

(XI)

e) c-fos, p. ej.

5'-GGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'

(XII)

5'-CCCGAGAACATCATGGTCGAAG-3'

(XIII)

5'-GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG-3'

(XIV)

f) p 120, p. ej.

5'-CACCCGCCTTGGCCTCCCAC-3'

(XV)

ES 2 269 239 T3

g) receptor del EGF, p. ej.

5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3'

(XVI)

5'-GGCAAACCTTTCTTTTCCTCC-3'

(XVII)

h) supresor tumoral p53, p. ej.

5'-GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3'

(XVIII)

5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3'r

(XIX)

Los medicamentos de la presente invención se adecuan, por ejemplo, además para el tratamiento de enfermedades que son influenciadas por integrinas o receptores de adhesión célula-célula, por ejemplo por VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM o ELAM.

Derivados de poliamida-oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la invención, que son activos frente a dianas de este tipo, tienen por ejemplo la siguiente secuencia de bases:

a) VLA-4, p. ej.

5'-GCAGTAAGCATCCATATC-3' o

(XX)

b) ICAM, p. ej.

5'-CCCCCACCCTCCCTCTC-3'

(XXI)

5'-CTCCCCCACCCTCCCTCTC-3'

(XXII)

5'-GCTGGGAGCCATAGCGAGG-3'

(XXIII)

c) ELAM-1, p. ej.

5'-ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG-3'

(XXIV)

5'-CAATCAATGACTTCAAGAGTTC-3'

(XXV)

Los medicamentos de la presente invención se adecuan, por ejemplo, también para evitar la restenosis. Por ejemplo, en este caso pueden pasar a emplearse secuencias de poliamida-oligonucleótidos que están dirigidas contra dianas que son las responsables de la proliferación o migración. Estas dianas son, por ejemplo:

- 1) Proteínas transactivador nucleares y ciclinas tales como, por ejemplo, c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, ciclinas y cdc2-quinasa
- 2) Mitógenos o factores de crecimiento tales como, por ejemplo, PDGF, bFGF, EGF, HB-EGF y TGF- β
- 3) Receptores celulares tales como, por ejemplo, receptor del bFGF, receptor del EGF y receptor del PDGF.

ES 2 269 239 T3

Poliamida-oligonucleótidos antisentido de la fórmula I de acuerdo con la invención, que son activos frente a dianas de este tipo, tienen por ejemplo la siguiente secuencia de bases:

- 5 a) c-myb
5'-GTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'
(XXVI)
- 10 b) c-myc
5'-CACGTTGAGGGGCAT-3'
(XXVII)
- 15 c) cdc2-quinasa
5'-GTCTTCCATAGTTACTCA-3'
20 (XXVIII)
- 25 d) PCNA (proliferating cell nuclear antigen - antígeno nuclear de células proliferantes de rata)
5'-GATCAGGCGTGCCTCAAA-3'
(XXIX)

30 Los medicamentos pueden utilizarse, p. ej., en forma de preparados farmacéuticos que se pueden administrar por vía oral, p. ej. en forma de comprimidos, grageas, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones, emulsiones o suspensiones. La inclusión de los medicamentos en liposomas que eventualmente contienen otros componentes tales como proteínas, es asimismo una forma de aplicación adecuada. También se pueden administrar por vía rectal, p. ej. en forma de supositorios, o por vía parenteral, p. ej. en forma de soluciones para inyección. Para la producción de
35 preparados farmacéuticos, estos compuestos se pueden elaborar en soportes orgánicos e inorgánicos terapéuticamente inertes. Ejemplos de soportes de este tipo para comprimidos, grageas y cápsulas de gelatina dura son lactosa, almidón de maíz o sus derivados, talco y ácido esteárico o sus sales. Soportes adecuados para la preparación de soluciones son agua, polioles, sacarosa, azúcar invertido y glucosa. Soportes adecuados para soluciones para inyección son agua, alcohol, polioles, glicerol y aceites vegetales. Soportes adecuados para supositorios son aceites vegetales y endu-
40 recidos, ceras, grasas y polioles semilíquidos. Los preparados farmacéuticos pueden contener también conservantes, disolventes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saboreantes, sales para modificar la presión osmótica, tampones, agentes de revestimiento, antioxidantes, así como, eventualmente, otras sustancias activas terapéuticas.

45 Formas de administración preferidas son aplicaciones tópicas, aplicaciones locales tales como, por ejemplo, con ayuda de un catéter o también inyecciones. Para la inyección los derivados de poliamida-oligonucleótidos antisentido se formulan en una solución líquida, preferiblemente en un tampón fisiológicamente aceptable tal como, p.ej., solución de Hank o solución de Ringer. Sin embargo, los poliamida-oligonucleótidos antisentido pueden formularse también en forma sólida y disolverse o suspenderse antes del uso. Las dosificaciones preferidas para la administración sistémica
50 ascienden a aprox. 0,01 mg/kg hasta aprox. 50 mg/kg de peso corporal y día.

De forma muy general, la invención se extiende al uso de compuestos de la fórmula I en calidad de sondas de ADN o cebadores en el diagnóstico de ADN, en particular en el sentido de las sondas de genes mencionadas en HOE 92/F 406 (documento EP-A 0 602 524) y, en general, como coadyuvantes en la biología molecular.

55 En el diagnóstico de ADN las sondas de genes, también denominadas sondas de ADN o sondas de hibridación, juegan un gran papel para la detección específica para la secuencia de determinados genes. Una sonda de genes se compone, en general, de una secuencia de reconocimiento y de un grupo de marcaje (marcador) adecuado. La especificidad de la determinación de una secuencia diana en una muestra de análisis mediante hibridación con una sonda de genes complementaria es determinada por la secuencia de reconocimiento y su estructura química. Los PNA's tienen la ventaja, con respecto a los oligonucleótidos de estructura natural, de que poseen una afinidad más elevada por la secuencia diana. Sin embargo, la especificidad de la hibridación está reducida, ya que los PNA's, en contraposición al ADN natural, pueden unirse a ácidos nucleicos de cadena sencilla tanto en orientación paralela como en orientación antiparalela. Los oligómeros de PNA/ADN de acuerdo con la invención muestran igualmente
60 una afinidad a la unión incrementada, pero se unen, de forma fuertemente preferida, en la orientación antiparalela deseada.

ES 2 269 239 T3

Mediante la correspondiente elección de la parte de PNA o de la parte de ADN en una sonda de genes se puede influir positivamente, además, sobre la capacidad de diferenciación, ya que un mal apareamiento de bases en la parte de PNA conduce a una depresión más fuerte de la temperatura de fusión de un híbrido que un mal apareamiento de bases en la parte de ADN. Esto es particularmente importante en relación con la diferenciación en mutaciones puntuales tal como se presentan, por ejemplo, en la transición de protooncogenes en los correspondientes oncogenes (estado patógeno). La ventaja de la mejor discriminación entre estado patógeno y no patógeno se puede también aprovechar en forma de la propiedad del cebador de los oligómeros de PNA/ADN de acuerdo con la invención, siempre que estos posean una función 3'-hidroxi libre en la parte de ADN. Los PNAs como tales, no poseen ninguna función de cebador para polimerasas. Sorprendentemente, se encontró que ya es suficiente una unidad de nucleósido en el extremo de un oligómero de PNA/ADN para iniciar la reacción de ADN-polimerasa, por ejemplo con ayuda de la ADN-polimerasa (fragmento de Klenow). En función de la naturaleza del cebador de PNA/ADN y del tipo del molde al que se hibrida el cebador de una manera específica para la secuencia, pueden emplearse distintas polimerasas. Éstas son, por lo general, accesibles en el comercio tales como, por ejemplo, Taq-polimerasa, polimerasa de Klenow o transcriptasa inversa.

Otra ventaja con respecto al uso de cebadores de oligonucleótidos naturales consiste en que la cadena de ácidos nucleicos copiada con ayuda del cebador de PNA/ADN, que contiene la parte de PNA en el extremo 5', es estable frente a 5'-exonucleasas. Por consiguiente, pueden degradarse todas las secuencias de ADN o ARN naturales en la mezcla de reacción mediante 5'-exonucleasas, sin que sea atacada la cadena con contenido en PNA.

Otra ventaja de los oligómeros de PNA/ADN consiste en que, con ello, también se pueden llevar a cabo otras reacciones bioquímicas en la parte de ADN, que no son posibles en el caso de los propios PNAs. Ejemplos de reacciones de este tipo son la "3'-cola" con transferasa 3'-terminal, la digestión con enzimas de restricción en la zona de la doble cadena de ADN, así como reacciones de ligasa. Por ejemplo, un oligómero (PNA)-(DNA)-OH con un grupo 3'-hidroxi libre puede enlazarse con un segundo oligómero p-(DNA)-(PNA), que en el extremo 5' contiene un nucleósido 5'-fosfato, después de la hibridación a una secuencia auxiliar de ADN complementaria de origen natural en presencia de una ADN-ligasa.

Además, se pueden incorporar en genes oligómeros de (DNA)-(PNA)-(DNA), lo que actualmente no es posible con los PNAs.

El enlace de grupos de marcaje a oligómeros de PNA/ADN se efectúa según métodos en sí conocidos, tal como se describen para oligonucleótidos o péptidos. El tipo del grupo de marcaje puede variarse ampliamente y se orienta en esencia según el tipo del ensayo utilizado. Formas de realización conocidas de ensayos de sondas de genes son ensayos "Hybridization Protection", "Energy-Transfer" y "Kissing Probes". Oligómeros de PNA/ADN se adecuan, además, de manera particularmente bien para un ensayo "Strand Displacement". En muchos casos es ventajosa la separación del híbrido formado de sonda de genes en exceso con ayuda de partículas magnéticas. La estabilidad de las sondas de genes de PNA/ADN de acuerdo con la invención es mayor que la de sondas de ADN habituales.

"Polymerase Chain Reaction- reacción en cadena de la polimerasa" (PCR) y "Ligase Chain Reaction - reacción en cadena de la ligasa" (LCR) son técnicas para la amplificación de la diana, en la que pueden emplearse asimismo como cebadores los oligómeros de acuerdo con la invención. De manera especialmente ventajosa, los oligómeros de PNA/ADN se pueden utilizar como sondas de genes según el principio del "árbol de Navidad", ya que en este caso las sondas de PNA/ADN pueden ser más cortas que las correspondientes sondas de ADN.

Ejemplos

Las abreviaturas utilizadas para los aminoácidos corresponden al código de tres letras habitual en la química de los péptidos, tal como se describe en Europ. J. Biochem. 138, 9 (1984). Se listan seguidamente otras abreviaturas utilizadas.

Aeg	N-(2-aminoetil)glicilo, -NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-CH ₂ -CO-
Aeg (a ^{MeOBz})	N-(2-aminoetil)-N-((9-(N ⁶ -4-metoxibenzoil)-adenosil)acetil)-glicilo
Aeg (c ^{Bz})	N-(2-aminoetil)-N-((1-(N ⁴ -benzoil)-citosil)acetil)-glicilo
Aeg (c ^{MeOBz})	N-(2-aminoetil)-N-((1-(N ⁴ -4-metoxibenzoil)-citosil)acetil)-glicilo
Aeg (c ^{iBuOBz})	N-(2-aminoetil)-N-((1-(N ⁴ -4-terc.-butilbenzoil)-citosil)acetil)-glicilo
Aeg(g ^{iBu})	N-(2-aminoetil)-N-((9-(N ² -isobutanoil)-guanosisil)acetil)-glicilo
Aeg (g ^{2-Ac,4-Dpc})	N-(2-aminoetil)-N-((9-(N ² -acetil-O ⁴ -difenilcarbamoil)-guanosisil)glicilo
Aeg (t)	N-(2-aminoetil)-N-((1-timinil)acetil)-glicilo
Bnpeoc	2,2-[bis(4-nitrofenil)]-etoxicarbonilo

ES 2 269 239 T3

	Boc	terc.-butiloxicarbonilo
	BOI	hexafluorofosfato de 2-(benzotriazol-1-il)oxi-1,3-dimetil-imidazolidinio
5	BOP	hexafluorofosfato de benzotriazolil-1-oxi-tris(dimetilamino)-fosfonio
	BroP	hexafluorofosfato de bromo-tris(dimetilamino)-fosfonio
	BSA	N,O-bis-(trimetilsilil)-acetamida
10	But	terc.-butilo
	Bz	benzoílo
15	Bzl	bencilo
	Cl-Z	4-cloro-benciloxicarbonilo
	CPG	Controlled Pore Glas - vidrio de poros controlados
20	DBU	1, 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
	DCM	diclorometano
25	Ddz	3.5-dimetoxifenil-2-propil-2-oxicarbonilo
	DMF	dimetilformamida
	Dmt	Di-(4-metoxifenil)fenilmetilo
30	Dnpeoc	2-(2,4-dinitrofenil)-etoxicarbonilo
	Dpc	difenilcarbamoílo
35	FAM	radical fluoresceína
	Fm	9-fluorenilmetilo
	Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
40	H-Aeg-OH	N-(2-aminoetil)glicina
	HAPyU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-bis(tetrametilen)uronio
45	HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
	HBTU	hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
	HOBt	1-hidroxibenzotriazol
50	HONSu	N-hidroxisuccinimida
	HOObt	3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidrobenzotriazina
55	iBu	isobutanoílo
	MeOBz	4-metoxibenzólo
	Mmt	4-metoxitriifenilmetilo
60	Moz	4-metoxibenciloxicarbonilo
	MSNT	2,4,6-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazolida
65	Mtt	4-metilfenil)difenilmetilo
	NBA	alcohol nitrobenfílico

ES 2 269 239 T3

	NMP	N-metilpirrolidina
	Obg	N-(4-oxibutil)glicilo, -O-(CH ₂) ₄ -NH-CH ₂ -CO-
5	Obg (t)	N-(4-oxibutil)-N-((1-timinil)acetil)-glicilo
	Oeg	N-(2-oxietil)glicilo, -O-CH ₂ -CH ₂ -NH-CH ₂ -CO-
	Oeg (t)	N-(2-oxietil)-N-((1-timinil)acetil)-glicilo
10	Opeg	N-(5-oxipentil)glicilo, -O-(CH ₂) ₅ -NH-CH ₂ -CO-
	Opeg (t)	N-(5-oxipentil)-N-((1-timinil)acetil)-glicilo
15	Oprg	N-(3-oxipropil)glicilo, -O-(CH ₂) ₃ -NH-CH ₂ -CO-
	Oprg (t)	N-(3-oxipropil)-N-((1-timinil)acetil)-glicilo
	Pixilo	9-(9-fenil)xantenilo
20	PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazolil-1-oxi-tripirrolidinofosfonio
	PyBroP	hexafluorofosfato de bromo-tripirrolidinofosfonio
25	TAPipU	tetrafluoroborato de O-(7-azabenzotriazo)-1-il)-1,1,3,3-bis(pentametilen)uronio
	TBTU	tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
	tBu	terc.-butilo
30	tBuBz	4-terc.-butilbenzoílo
	TDBTU	tetrafluoroborato de O-(3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
35	TDO	2,5-difenil-2,3-dihidro-3-oxo-4-hidroxitiofendióxido
	Teg	N-(2-tioetil)glicilo, -S-CH ₂ -CH ₂ -NH-CH ₂ -CO-
	Teg (t)	N-(2-tioetil)-N-((1-timinil)acetil)-glicilo
40	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
45	TNTU	tetrafluoroborato de O-[(5-norbornen-2,3-dicarboximido]-1,1,3,3-tetrametiluronio
	TOTU	tetrafluoroborato de O-[(ciano(etoxicarbonil)metilen)amino]-1,1,3,3-tetrametiluronio
	TPTU	tetrafluoroborato de O-(1,2-dihidro-2-oxo-1-piridil)-1,1,3,3'-tetrametiluronio
50	Trt	tritulo
	TSTU	tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio
55	Z	benciloxicarbonilo
	MS(ES ⁺)	espectro de masas por electroproyección (ion positivo)
	MS(ES ⁻)	espectro de masas por electroproyección (ion negativo)
60	MS(DCI)	espectro de masas por desorción ionización química
	MS(FAB)	espectro de masas por bombardeo con átomos rápidos.

65

ES 2 269 239 T3

Ejemplo 1

1-hidroxi-6-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)-hexano Mmt-hex

6-aminoheptan-1-ol (1 g; 8,55 mmol) se disuelve en piridina anhidra (7 ml) y se mezcla con trietilamina (0,2 ml). A esta solución se añade, en el espacio de 45 minutos, una solución de cloruro de (4-metoxifenil)-difenilmetilo (2,5 g; 8,12 mmol) en piridina anhidra (9 ml). La solución de reacción se continúa agitando durante 30 minutos a 22°C y se detiene mediante la adición de metanol (3 ml). La solución se concentra en el evaporador rotatorio y el residuo obtenido se co-evapora tres veces con tolueno para separar la piridina. El residuo obtenido se disuelve en acetato de etilo y esta solución se lava sucesivamente con una solución saturada de bicarbonato de sodio, con agua y una solución saturada de cloruro de potasio. La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y concentra en vacío. El producto bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice con heptano:acetato de etilo:trietilamina/49,5:49,5:1. Rendimiento: 1,64 g

MS (FAB,NBA/LiCl) 396,3 (M+Li)⁺, 390,3 (M+H)⁺, 273,2 (Mmt)⁺

R_f 0,44 (heptano:acetato de etilo = 1:1).

Ejemplo 2

Hemisuccinato de 6-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)-hex-1-ilo Mmt-hex-succ

1-hidroxi-6-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)-hexano (1,00 g; 2,57 mmol) se disuelve en piridina anhidra (10 ml). A esta solución se añade anhídrido de ácido succínico (0,257 g; 2,57 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (31,3 mg; 0,257 mmol). Al cabo de 3 horas de agitación a 22°C se añade más anhídrido de ácido succínico (25,7 mg; 0,257 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (62,6 mg; 0,56 mmol) y esta solución se calienta durante 6 horas hasta 50°C. Después de otras 16 horas a 22°C se concentra, el residuo se recoge en acetato de etilo y la solución obtenida se lava con ácido cítrico acuoso al 5% helado. Después de secar la fase org. (Na_2SO_4), la solución se concentra en el evaporador rotatorio. La purificación del residuo mediante cromatografía en gel de sílice con CH_2Cl_2 al 50%/trietilamina al 1% en acetato de etilo y luego con metanol al 5%/trietilamina al 1% en diclorometano, proporciona el compuesto deseado en forma de aceite incoloro.

MS (ES⁻) 978,0 (2M-H)⁻, 488,3 (M-H)⁻

R_f 0,30 (CH_2Cl_2 : acetato de etilo = 1:1).

Ejemplo 3

6-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)-hex-1-il-succinilamido-Tentagel (Mmt-hex-succ Tentagel)

La forma amino de Tentagel® (Rapp Polymere) (0,5 g; 0,11 mmol de grupos amino) se deja hinchar durante 10 minutos en 4-etilmorfolina (0,1 ml) y DMF (5 ml). Luego se añade una solución de hemisuccinato de 6-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)-hex-1-ilo (97,4 mg; 0,165 mmol), 4-etilmorfolina (15,9 mg; 0,138 mmol; 17,4 ml) y TBTU (52,9 mg; 0,165 mmol) en DMF (3 ml) y la suspensión se sacude durante 16 horas a 22°C. El soporte de Tentagel derivatizado se separa por filtración y se lava sucesivamente con DMF (3x3 ml), CH_2Cl_2 (3x1 ml) y dietiléter (3x1 ml) y se seca. Las funciones amino que no han reaccionado se bloquean mediante tratamiento durante 1 hora con acetanhídrido/lutidina/1-metilimidazol en THF (1 ml). El soporte sólido se lava con CH_2Cl_2 (3x1 ml) y dietiléter (3x1 ml) y se seca en vacío. La carga, referida a la función monometoxitritilo incorporada, asciende a 168 mmol g⁻¹.

Ejemplo 4

6-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)-hex-1-ilo-succinilamidopropilo-vidrio de poros controlados (Mmt-hex-succ-CPG)

La preparación se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 3, partiendo de aminopropilo-CPG (Firma Fluka) (550 Å; 1,0 g;) y hemisuccinato de 6-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)-hex-1-ilo (48,7 mg; 0,082 mmol), 4-etilmorfolina (7,6 ml) y TBTU (26,4 mg; 0,082 mmol) en DMF (3 ml). La carga del Mmt-hex-succCPG asciende a 91 mmol g⁻¹.

Ejemplo 5

N-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)etil-N-((1-(N⁴-(4-terc.-butilbenzoil)-citosil)acetil)glicina (Mmt-Aeg(c^{tBuBz})-OH)

1,63 g (2,28 mmol) de éster metílico de N-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)etil-N-((1-(N⁴-(4-terc.-butilbenzoil)-citosil)acetil)glicina se disolvieron en una mezcla a base de 10 ml de dioxano y 1 ml de agua y se mezclaron a 0°C, con agitación y gota a gota, con 4,56 ml de NaOH 1 N. Después de 2h se ajustó el pH a 5 mediante la adición, gota a gota, de KHSO_4 1 N, se separa por filtración de sales precipitadas y se continuó lavando con un poco de dioxano. Los filtrados

ES 2 269 239 T3

reunidos se concentran por evaporación en vacío y el residuo se co-evaporó dos veces con metanol y diclorometano. El producto bruto, así obtenido, se purificó mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de metanol al 2-10% y trietilamina al 1% en diclorometano. Las fracciones que contienen el producto se reunieron y se concentraron en vacío. Mediante la co-evaporación con piridina y, a continuación, con tolueno, se separó trietilamina en exceso, todavía presente. Se obtuvieron 0,831 g de producto en forma de una espuma casi blanca. MS por electroproyección (ion negativo) 700,7 (M-H).

R_f 0,28 (CH₂Cl₂:MeOH/9:1), 0,63 (CH₂Cl₂:MeOH/7:3).

10 Ejemplo 6

N-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)etil-N-((1-timinil)acetil)glicina (Mmt-Aeg(t))-OH

15 El producto de la reacción de arriba se disolvió en una mezcla a base de 10 ml de dioxano y 2 ml de agua. La solución se enfrió hasta 0°C y se añadió gota a gota lejía de sosa 1 N hasta alcanzar un valor del pH de 11. Después de un tiempo de reacción de 2 h, la reacción había finalizado y la solución se ajustó a pH 5 mediante la adición cuidadosa de solución de KHSO₄ 2 N. La solución se extrajo tres veces con acetato de etilo, las fases orgánicas reunidas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron en vacío. El producto bruto, así obtenido, se purificó mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de metanol al 5-10% y trietilamina al 1% en diclorometano. Las fracciones que contienen el producto se reunieron y se concentraron en vacío. Mediante la co-evaporación con piridina y, a continuación, con tolueno, se separó trietilamina en exceso, todavía presente. Se obtuvieron 1,065 g de producto en forma de una espuma incolora. MS por electroproyección (ion negativo) 1112,0 (2M-H)⁻, 555,3 (M-H)⁻.

R_f 0,28 (CH₂Cl₂:MeOH/8:2).

25 Ejemplo 7

N-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)etil-N-(9-(N²-(isobutanoil)-guanosil)acetil)glicina (Mmt-Aeg(ⁱBu))-OH

30 Éster metílico de N-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)etil-N-(9-(N²-(isobutanoil)-guanosil)acetil)glicina (1,15 g; 1,72 mmol) se disuelve en dioxano (10 ml) y, a lo largo de un espacio de tiempo de 2,5 h, se mezcla a 0°C, gota a gota, con lejía de sosa acuosa 1M (10,32 ml) en 5 partes. Después de un tiempo de reacción adicional de 2 h a la temperatura ambiente, la solución se ajusta a pH 5 mediante la adición, gota a gota, de solución acuosa de hidrógeno-sulfato de potasio 2 M. Las sales precipitadas se separan por filtración y se continúan lavando con un poco de dioxano.

35 Los filtrados reunidos se concentran por evaporación hasta sequedad en vacío y el residuo se co-evapora en cada caso dos veces con etanol, así como diclorometano:metanol 1/1. La purificación se efectúa por cromatografía en columna en gel de sílice mediante elución con un gradiente de metanol al 10-20% en diclorometano (con trietilamina al 1%). El producto se obtiene en forma de espuma blanca.

40 Rendimiento: 1,229 g

ESMS (ion negativo): 650,3 (M-H)⁻

45 R_f 0,25 (diclorometano:metanol/8:2).

Ejemplo 8

N-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)etil-N-(9-(N⁶-(4-metoxibenzoil)-adenosil)acetil)glicina (Mmt-Aeg(a^{MeoBz}))-OH

50 Éster metílico de N-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)etil-N-(9-(N⁶-(4-metoxibenzoil)-adenosil)acetil)glicina (1,70 g; 2,38 mmol) se disuelve en dioxano (10 ml) y, a lo largo de un espacio de tiempo de 2,5 h, se mezcla a 0°C, gota a gota, con lejía de sosa acuosa 1M (10,32 ml) en 5 partes. Después de un tiempo de reacción adicional de 2 h a la temperatura ambiente, la solución se ajusta a pH 5 mediante la adición, gota a gota, de solución acuosa de hidrógeno-sulfato de potasio 2 M. Las sales precipitadas se separan por filtración y se continúan lavando con un poco de dioxano.

60 Los filtrados reunidos se concentran por evaporación hasta sequedad en vacío y el residuo se co-evapora en cada caso dos veces con etanol, así como diclorometano:metanol 1/1. La purificación se efectúa mediante cromatografía en gel de sílice mediante elución con un gradiente de metanol al 10-20%. Diclorometano (con trietilamina al 1%). El producto se obtiene en forma de espuma blanca.

Rendimiento: 1,619 g

65 ESMS (ion negativo): 698,3 (M-H)⁻

R_f 0,10 (diclorometano:metanol/8:2).

ES 2 269 239 T3

Ejemplo 9

N-((4-metoxifenil)-difenilmetiloxi)etil-N-((1-timinil)acetil)glicina (Mmt-Oeg(t)-OH)

5 0,5 g (1,28 mmol) de N-((4-metoxifenil)-difenilmetiloxi)etilglicina se suspendieron en 10 ml de DMF y se añadieron gota a gota 0,47 ml (1,92 mmol) de BSA. Sucesivamente se agregaron luego 0,7 ml (5,1 mmol) de trietilamina y 0,26 g (1,28 mmol) de clorocarboximetiltimina. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a la temperatura ambiente, luego se añadieron otros 65 mg (0,32 mmol) de clorocarboximetiltimina y se agitó todavía durante 16 h. Luego se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de metanol al 5-15% y trietilamina al 1% en diclorometano. Las fracciones que contienen el producto se reunieron y se concentraron en vacío. El aceite parduzco obtenido se disolvió en un poco de diclorometano y se precipitó el producto mediante la adición de dietiléter. Se obtuvo el producto en forma de un polvo casi blanco.

Rendimiento: 0,219 g

15 MS por electroproyección (ion negativo) 556,3 (M-H)⁻

R_f 0,54 (CH₂Cl₂:MeOH/8:2).

20 Ejemplo 10

4-(4, 4'-dimetoxitritiloxi)-butirato de 4-nitrofenilo Dmt-but-NPE

25 La sal sódica del ácido 4-hidroxi-butírico (1,26 g; 10 mmol) se disuelve en piridina anhidra (30 ml) y se mezcla con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (3,39 g; 3,05 mmol). Después de 16 horas se añaden 4-nitrofenol (1,39 g; 10 mmol) y N,N'-díciclohexilcarbodiimida (2,06 g; 10 mmol) y se agita a 22°C durante otras 48 horas. La díciclohexilurea separada se separa por filtración y se lava con diclorometano. El filtrado se concentra y el residuo obtenido se co-evapora dos veces con tolueno. El residuo se purifica a través de una columna de gel de sílice (acetato de etilo al 10-50% y trietilamina al 1% en éter de petróleo). El compuesto deseado precipita en forma de un aceite de color débilmente amarillento.

Rendimiento: 2,694 g

MS (FAB, MeOH/NBA/LiCl) 534,2 (M+Li) 527,2 M⁺.

35 R_f 0,34 (éter de petróleo:acetato de etilo = 75:25).

Ejemplo 11

40 *H-Oprg(t)-OH*

3,68 g de ácido timinilacético se disuelven en 20 ml de DMF seca y se añaden 6,65 g de TOTU y 2,77 ml de trietilamina. La mezcla se continúa agitando durante 30 min a la temperatura ambiente y luego se añade lentamente, gota a gota, a una solución consistente en 5,32 g de (3-hidroxi-propil)-glicina, 20 ml de agua, 20 ml de DMF y 5,54 ml de trietilamina. Se agita todavía durante 1 h a la temperatura ambiente y se concentra luego en el evaporador rotatorio en vacío. El residuo se recoge en agua, se ajusta a pH 1,5 con ácido clorhídrico 1 N y se extrae con acetato de etilo. La fase acuosa se ajusta a pH 5 con solución saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y se concentra en el evaporador rotatorio. El residuo se mezcla con 250 ml de etanol y el cloruro de sodio que precipita en este caso se filtra con succión. El filtrado se concentra y el producto bruto se purifica por cromatografía en gel de sílice con diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:2:1 bajo la adición de trietilamina al 1%, seguido de diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:4:1 bajo la adición de trietilamina al 1%. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se concentran en vacío en el evaporador rotatorio.

Rendimiento: 3,2 g

55 R_f 0,15 (diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:2:1 + trietilamina al 1%)

EM (ES⁺): 300,2 (M+H)⁺.

60 Ejemplo 12

Dmt-Oprg(t)-OH

65 3,2 g de H-Oprg(t)-OH se disuelven en 40 ml de DMF, se añaden 5,93 ml de trietilamina y, a 0°C, se añade gota a gota una solución de 7,25 g de Dmt-Cl en 40 ml de diclorometano en el espacio de 20 min. Se continúa agitando todavía durante 2 h a la temperatura ambiente, luego se separa por filtración el hidrocloreuro de trietilamina precipitado y el filtrado se concentra en vacío en el evaporador rotatorio. El residuo se recoge en diclorometano, se extrae con agua, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio y se concentra en vacío en el evaporador rotatorio. La purificación

ES 2 269 239 T3

del producto bruto se efectúa en gel de sílice con diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:2:1 bajo la adición de trietilamina al 1%. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se concentran en vacío en el evaporador rotatorio.

5 Rendimiento: 3,46 g

R_f 0,28 (diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:2:1 + trietilamina al 1%)

MS(ES⁺) 602,4 (M+H)⁺.

10

Ejemplo 13

H-Obg(t)-OH

15 2,76 g de ácido timinilacético se disuelven en 15 ml de DMF seca y se añaden 4,92 g de TOTU y 2,08 ml de trietilamina. La mezcla se continúa agitando durante 30 min a la temperatura ambiente y luego se añade lentamente, gota a gota, a una solución consistente en 4,41 g de (4-hidroxibutil)-glicina, 10 ml de agua, 10 ml de DMF y 4,16 ml de trietilamina. Se continúa agitando todavía durante 3 h a la temperatura ambiente y la mezcla se concentra en el evaporador rotatorio en vacío. El residuo se recoge en agua, se ajusta a pH 1,5 con ácido clorhídrico 1 N y se extrae con acetato de etilo. La fase acuosa se ajusta a pH 5 con solución saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y se concentra en el evaporador rotatorio. El producto bruto se purifica por cromatografía en gel de sílice con diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:2:1 bajo la adición de trietilamina al 1%. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se concentran en vacío en el evaporador rotatorio.

25 Rendimiento: 3,7 g

R_f 0,11 (diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:2:1 + trietilamina al 1%)

MS(ES⁺) 314,2 (M+H)⁺.

30

Ejemplo 14

Dmt-Obg(t)-OH

35 3,6 g de H-Obg(t)-OH se disuelven en 40 ml de DMF, se añaden 9,5 ml de trietilamina y, a 0°C, se añade gota a gota una solución de 15,4 g de Dmt-Cl en 40 ml de diclorometano en el espacio de 15 min. Se continúa agitando todavía durante 2 h a la temperatura ambiente, se añaden otros 40 ml de diclorometano, luego se separa por filtración el hidrocloreto de trietilamina precipitado y el filtrado se concentra en vacío en el evaporador rotatorio. El residuo se recoge en diclorometano, se extrae con agua, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio y se concentra en vacío en el evaporador rotatorio. La purificación del producto bruto se efectúa en gel de sílice con diclorometano/metanol/acetato de etilo 15:1:1 bajo la adición de trietilamina al 1%. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se concentran en vacío en el evaporador rotatorio.

45 Rendimiento: 3,45 g

R_f 0,29 (diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:2:1 + trietilamina al 1%)

MS(ES⁺ + LiCl) 622,3 (M+Li)⁺.

50 Ejemplo 15

H-Opeg(t)-OH

55 2,76 g de ácido timinilacético se disuelven en 15 ml de DMF seca y se añaden 4,92 g de TOTU y 2,08 ml de trietilamina. La mezcla se continúa agitando durante 30 min a la temperatura ambiente y luego se añade lentamente, gota a gota, a una solución consistente en 4,83 g de (5-hidroxipentil)-glicina, 10 ml de agua, 10 ml de DMF y 4,16 ml de trietilamina. Se agita todavía durante 3 h a la temperatura ambiente y la mezcla se concentra luego en el evaporador rotatorio en vacío. El residuo se recoge en agua, se ajusta a pH 1,5 con ácido clorhídrico 1 N y se extrae con acetato de etilo. La fase acuosa se ajusta a pH 5 con solución saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y se concentra en el evaporador rotatorio. El producto bruto se purifica por cromatografía en gel de sílice con diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:2:1 bajo la adición de trietilamina al 1%. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se concentran en vacío en el evaporador rotatorio.

65 Rendimiento: 3,34 g

R_f 0,19 (diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:2:1 + trietilamina al 1%)

MS(DCI) 328,2 (M+H)⁺.

Ejemplo 16

Dmt-Opeg(t)-OH

5 3,2 g de H-Opeg(t)-OH se disuelven en 40 ml de DMF, se añaden 6,77 ml de trietilamina y, a 0°C, se añade gota a gota una solución de 9,94 g de Dmt-Cl en 40 ml de diclorometano en el espacio de 15 min. Se continúa agitando todavía durante 2 h a la temperatura ambiente, se añaden otros 40 ml de diclorometano, luego se separa por filtración el hidrocloreuro de trietilamina precipitado y el filtrado se concentra en vacío en el evaporador rotatorio. El residuo se recoge en diclorometano, se extrae con agua, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio y se concentra en vacío en el evaporador rotatorio. La purificación del producto bruto se efectúa en gel de sílice con diclorometano/metanol/acetato de etilo 15:1:1 bajo la adición de trietilamina al 1%. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se concentran en vacío en el evaporador rotatorio.

Rendimiento: 3,6 g

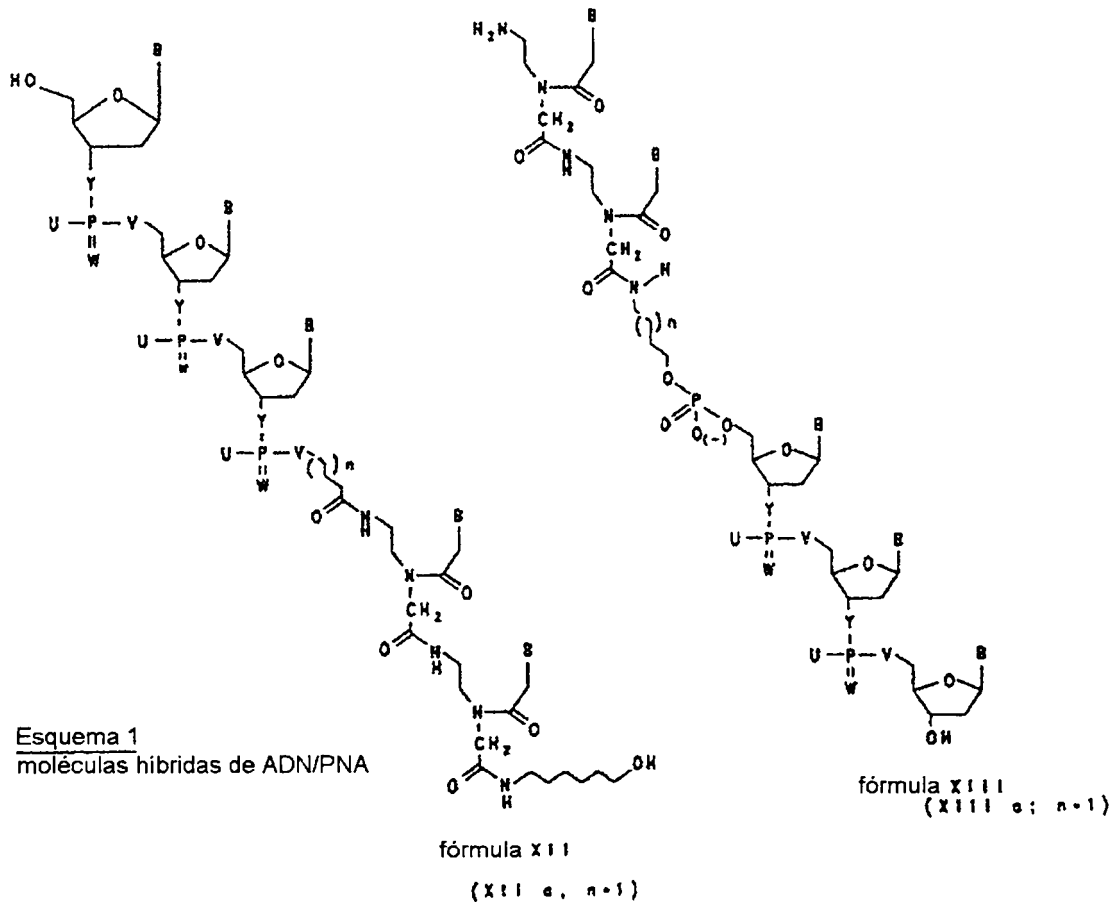
R_f 0,27 (diclorometano/metanol/acetato de etilo 10:2:1 + trietilamina al 1%)

MS(ES⁺ + LiCl): 636,4 (M+Li)⁺.

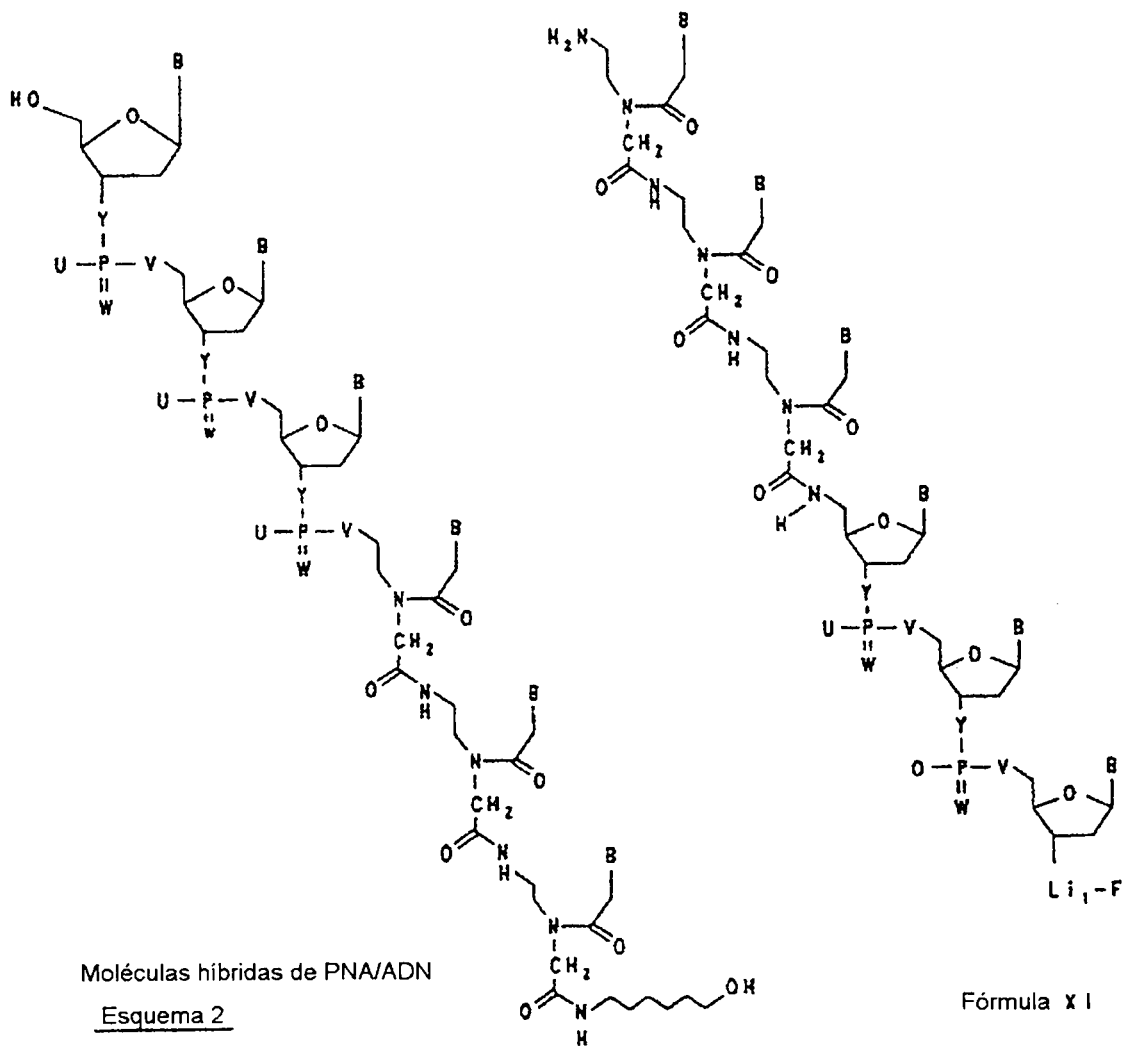
20 Ejemplo 17

5'-ATC GTC GTA TT-(but)-agtc-hex

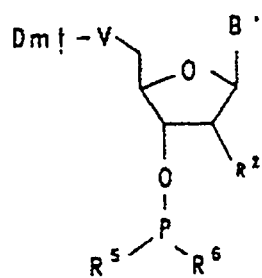
25 La secuencia de ADN está indicada en mayúsculas, la secuencia de PNA en minúsculas (ejemplo para el tipo de estructura XIIa en el Esquema 1). La síntesis de los PNAs se efectúa, por ejemplo, en un sintetizador de ADN Ecosyn D-300 (Firma Eppendorf/Biotronik, Maintal) o en un sintetizador de ADN ABI 380B (Firma Applied Biosystems, Weiterstadt). La síntesis de la parte de ADN se lleva a cabo, en principio, según la química estándar de fosfoamidita y los ciclos de síntesis comercialmente obtenibles. Para la síntesis de la parte de PNA se comparan los métodos de la síntesis de péptidos, tal como se explican seguidamente, con los ciclos de síntesis de ADN.



5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



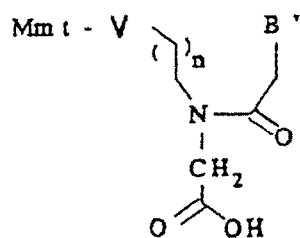
Fórmula X (Xa, Y-O; Xb, V-NH)



Fórmula VIII

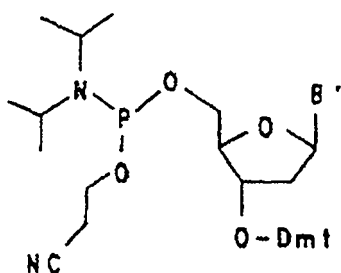
ES 2 269 239 T3

	R5	R ⁶	R2	V
VIII a	NC-CH ₂ CH ₂ -O-	-N(i-C ₃ H ₇) ₂	H	O
VIII b	CH ₃	-N(i-C ₃ H ₇) ₂	H	O
VIII c	C ₆ H ₅	-N(i-C ₃ H ₇) ₂	H	O
VIII d	C ₆ H ₅ -C(O)-S(CH ₂) ₂ -S	-N-pirrolidin-1-ilo	H	O
VIII e	NC-CH ₂ CH ₂ -O-	-N(i-C ₃ H ₇) ₂	OCH ₃	O
VIII f	NC-CH ₂ CH ₂ -O-	-N(i-C ₃ H ₇) ₂	H	NH

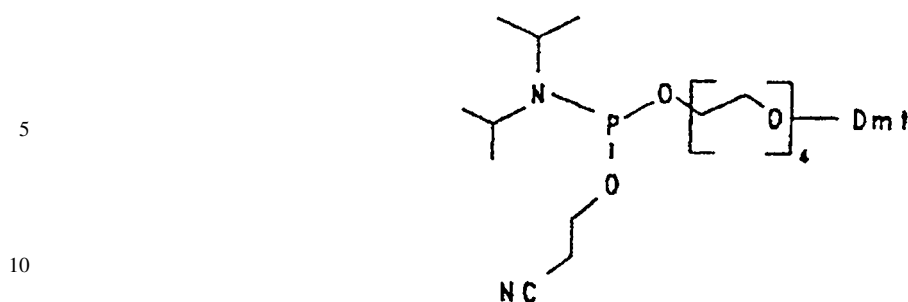


Fórmula IX (IXa, V=NH; IXb, V=O)

con n = 1-8, preferiblemente 1-5,

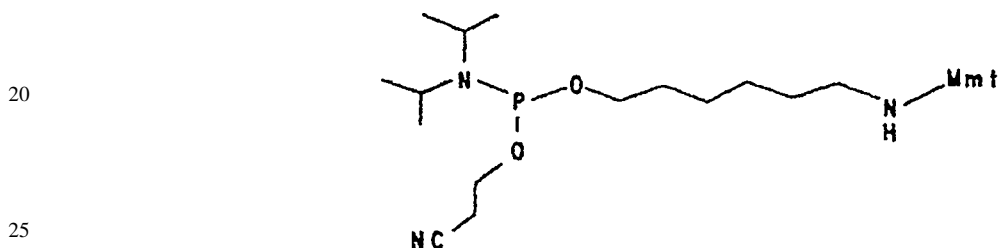


Fórmula XIV



Fórmula XV

15



Fórmula XVI

30

3 μmol del soporte de CPG cargado con Mmt-hex-succ (carga 91 $\mu\text{mol/g}$) del Ejemplo 4 se tratan sucesivamente con los siguientes reactivos:

Síntesis de la parte de PNA (agtc-hex)

35

1. diclorometano
2. ácido tricloroacético al 3% en diclorometano
3. acetonitrilo abs.
4. solución 3,5 M de 4-etilmorfolina en acetonitrilo (neutralización)
5. solución 0,4 M de (Mmt-Aeg(cⁱBuBz)-OH) del Ejemplo 5 en acetonitrilo:DMF 9:1/solución 0,9 M de ByBOP en acetonitrilo/solución 3,5 M de 4-etilmorfolina en acetonitrilo (10 minutos de tiempo de acoplamiento).
6. La etapa 5 se repite cuatro veces.
7. acetonitrilo

50

Las etapas 1 a 7, denominadas seguidamente un ciclo de reacción de PNA, se repiten 3 veces para la constitución de la parte de PNA, en donde en la etapa 5 se emplea en cada caso el eslabón de monómero de los Ejemplos 5 a 8, necesario de acuerdo con la secuencia.

Conjugación del enlazador (agtc-hex \rightarrow (but)-agtc-hex)

55

8. Repetir la etapas 1 a 4 de arriba
9. 4-nitrofenil-4-(4,4'-dimetoxitritiloxi)-butirato (105 mg) del Ejemplo 10 e hidroxibenzotriazol (27 mg) en 2 ml de NEM en DMF durante 15 horas
10. Lavar con DMF
11. Lavar con acetonitrilo
12. Diclorometano

65

ES 2 269 239 T3

Síntesis de la parte de ADN ((but)-agtc-hex) → 5'-ATC GTC GTA TT-(but)-agtc-hex)

13. Acetonitrilo abs.

5 14. Ácido tricloroacético al 3% en diclorometano

15. Acetonitrilo abs.

10 16. 10 μmol de éster β -cianoetílico-diisopropilamida de ácido 5'-O-dimetoxi-tritiltimidin-3'-fosforoso y 50 μmol de tetrazol en 0,3 ml de acetonitrilo abs.

17. Acetonitrilo

15 18. Acetanhdrido al 20% en THF con lutidina al 40% y dimetilaminopiridina al 10%

19. Acetonitrilo

20. Yodo (1,3 g en THF/agua/piridina; 70:20:5=v:v:v)

20 Las Etapas 13 a 20, seguidamente denominadas ciclo de reacción de ADN, se repiten 10 veces para la constitución de la parte de nucleótido, en donde en la etapa 16 en cada caso se emplea el éster β -cianoetílico-diisopropilamida de ácido 5'-O-dimetoxitritil(nucleobase)-3'-fosforoso.

25 Después de cerrada la síntesis se efectúa la separación del grupo dimetoxitritilo, como se describe en las Etapas 1 a 3. Mediante el tratamiento durante 1,5 horas con amoniaco, el oligómero se separa del soporte y, al mismo tiempo, se eliminan los grupos β -cianoetilo. Para la separación de los grupos protectores amino exocíclicos la solución amoniaca se mantiene durante 5 horas a 55°C. Del producto bruto obtenido (325 DO₂₆₀) de 5'-ATC GTC GTA TT-(but)-agtc-hex se purifican 180 DO₂₈₀ mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Después de la desalación a través de una columna Biogel® (Firma Biorad) se obtiene de ello 50 DO₂₆₀ de oligómero muy puro.

30 Ejemplo 18

5'-ATC GTC GTA TT-(Oeg(t)-agtc-hex)

35 (Ejemplo para el tipo de estructura Xa en el Esquema 2; explicación para Oeg(t), véase el Ejemplo 9)

40 La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 17, pero en donde en la Etapa 9 en lugar del éster p-nitrobenzílico del ácido Dmt-butírico se acopla el eslabón de enlazador Mmt-Oeg(t)-OH del Ejemplo 9 bajo las condiciones descritas en la Etapa 5. Del producto bruto obtenido (235 DO₂₆₀) de 5'-ATC GTC GTA TT-(Oeg(t))-agtc-hex se purifican 135 DO₂₈₀ mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Después de la desalación a través de una columna Biogel® (Firma Biorad) se obtiene de ello 20 DO₂₆₀ de oligómero muy puro.

Ejemplo 19

45 *N-ggg g(5'NH-C)T C_sC_sA_s TGG GG_sG_s T (Secuencia contra HSV-1)*

(Ejemplo para el tipo de estructura XI en el Esquema 2; _s significa un puente de fosforotioato; (5'NH-C) significa un radical 5'-aminocitidilato; N igual a extremo amino)

50 La síntesis se efectúa partiendo de un soporte de CPG, que mantiene unida a 5'-Dmt-timidina a través de su extremo 3'. Primero se lleva a cabo la síntesis de la parte de ADN como se describe en el Ejemplo 17 (Etapas 13 a 20), en donde en el caso de los puentes de fosforotioato (s) la oxidación se efectúa en la Etapa 20 con disulfuro de tetraetiltiuram (DTET; Boletín del Usuario N° 65 de la Firma Applied Biosystems Inc.). Como eslabón de enlazador se emplea un eslabón de 5'-amino-5'-desoxi-citidilato-3'-fosforamidita protegido con Dmt de la fórmula VIII f. Después se condensan los eslabones de PNA análogamente a las Etapas 1 a 7 en el Ejemplo 17. Después de concluida la síntesis, el oligómero se separa del soporte mediante tratamiento durante 1,5 horas con amoniaco y, al mismo tiempo, se eliminan los grupos β -cianoetilo. Para la separación de los grupos protectores amino exocíclicos la solución amoniaca se mantiene durante 5 horas a 55°C. Solo entonces se separa el grupo monometoxitritilo mediante tratamiento durante 2 horas con ácido acético al 80% a 22°C. El producto se purifica mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se desala a través de una columna Biogel® (Firma Biorad).

65

ES 2 269 239 T3

Ejemplo 20

5'-G_{Me}G_{Me}G GCT CCA (Oeg(t))gg ggg t-hex

- 5 (Ejemplo para el tipo de estructura Xa en el Esquema 2; _{Me} significa un puente de metilfosfonato; explicación para Oeg(t), véase el Ejemplo 9)

La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 18, pero en donde para la incorporación de los puentes de metilfosfonato _{Me} se emplean los correspondientes eslabones de metilfosfonato de la fórmula VIIIb en el ciclo de reacción de ADN.

Ejemplo 21

5'-C_{s,s}A_{s,s}C GT_{s,s}T GAG (but)Ggg cat-hex (c-myc antisentido)

- 15 (Ejemplo para el tipo de estructura XIIa en el Esquema 1; _{s,s} significa un puente de fosforoditioato).

La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 17, pero para la incorporación de los puentes de ditioato se emplea el eslabón VIIIId y en estos lugares se lleva a cabo la oxidación (Etapa 20) con DTET.

Ejemplo 22

N-cga g(5'NH-A)A CAT CA (Oeg(t))ggt cg-hex(c-fos antisentido)

- 25 (5'NH-A significa 5'-amino-5'-desoxiadenilato; explicación para Oeg(t), véase el Ejemplo 9)

La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 18, en donde después de la conclusión de la síntesis de ADN se condensa, análogamente al Ejemplo 13, un 5'-aminonucleótido, que permite la conjugación de la segunda parte de PNA. Es decir, primeramente se llevan a cabo seis ciclos de síntesis de PNA y luego se acopla el eslabón de enlazador del Ejemplo 9. Luego se llevan a cabo siete ciclos de síntesis de ADN, en donde en el último ciclo se emplea el eslabón de la fórmula VIIIIf. Después de haber llevado a cabo todavía cuatro ciclos de síntesis de PNA, se realiza la separación del soporte y un tratamiento ulterior tal como se describe en el Ejemplo 19.

Ejemplo 23

F-cga g(5'NH-A)A CAT CAT GGT_sC_sG-O-CH₂CH(OH)CH₂-O-C₁₆H₃₃

- 35 (5'NH-A significa 5'-amino-5'-desoxiadenilato; F significa un radical fluoresceína en el extremo amino del PNA y _s significa un puente de fosfortioato)

40 La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 19, pero partiendo de un soporte de CPG, que mantiene unido el glicerol-hexadeciléter. Después de realizar 12 ciclos de síntesis de ADN se condensa el eslabón de enlazador VIIIIf. Después de haber llevado a cabo cuatro ciclos de síntesis de PNA y de haber separado el grupo Mmt en posición terminal, se puede hacer reaccionar cuantitativamente la función amino libre con un exceso de 30 veces en isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Ejemplo 24

3'-CCC TCT T-5'-(PEG)(PEG)-(Oeg(t))tg tgg g-hex

- 50 (PEG significa un radical tetraetilenglicolfosfato)

55 La síntesis se efectúa, en relación con la parte de PNA, análogamente a como se describe en el Ejemplo 17. Después de haber condensado seis unidades PNA, se acopla (Mmt-Oeg(t)-OH) del Ejemplo 9. Como enlazador se condensa entonces, como se describe en el ciclo de síntesis de ADN, primeramente dos veces el derivado de tetraetilenglicol de la fórmula XV, antes de llevar a cabo la síntesis de la parte de ADN con orientación inversa (de 5' a 3'). Para ello se utilizan en los ciclos de síntesis de ADN, en lugar de las nucleósido-3'-fosforamiditas en la Etapa 16, en cada caso las correspondientes nucleósido-5'-fosforoamiditas de la fórmula XIV, que se pueden obtener comercialmente. La desprotección y el tratamiento ulteriores se efectúan como se describe en el Ejemplo 17.

Ejemplo 25

N-ccc tct t-(C6-link)(PEG)-3'-AAG AGG G-5'

- 65 (PEG significa un radical tetraetilenglicolfosfato; el enlace C6 es un radical 6-aminohexanolfosfato)

La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 17 (ciclo de síntesis de ADN), pero partiendo de un soporte de CPG, que mantiene unida a 3'-O-Dmt-desoxiguanosina a través de un grupo 5'-O-succinato. Después

ES 2 269 239 T3

de haber condensado seis unidades de ADN con ayuda de los eslabones de la fórmula XIV, como enlazador se condensa primero el derivado de tetraetilenglicol de la fórmula XV, antes de acoplar, para la introducción del enlace C6, la fosforoamidita de la fórmula XVI. Después se sintetiza la parte de PNA como en el Ejemplo 17 (ciclo de síntesis de PNA). La desprotección y el tratamiento ulteriores se efectúan como se describe en el Ejemplo 19.

5 Ejemplo 26

5'-TTT TTT TTT (but) ttt ttt-hex

10 La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 17. Antes de separar y desproteger el producto del soporte, se toma una mitad del híbrido de ADN/PNA unida al soporte para el marcaje por fluorescencia (Ejemplo 27). La otra mitad se desprotege y se elabora como se describe en el Ejemplo 17.

Ejemplo 27

15 (FAM es un radical fluoresceína)

5'-FAM TTT TTT (but) ttt ttt-hex

20 El híbrido de ADN/PNA unido al soporte del Ejemplo 26 se marca por fluorescencia, llevando a cabo las Etapas 13 a 20 como se describe en el Ejemplo 17, en donde en la Etapa 16 se emplea la fluoresceína-fosforamidita de la Firma Applied Biosystems.

Ejemplo 28

25 *5'-GGG GGG GGG (but) ttt ttt-hex*

30 La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 17. Antes de separar y desproteger el producto del soporte, se toma una mitad del híbrido de ADN/PNA unida al soporte para el marcaje por fluorescencia (Ejemplo 29). La otra mitad se desprotege y se elabora como se describe en el Ejemplo 17. El compuesto del título se une, como oligonucleótido formador de triplex, con alta afinidad a una doble cadena de ADN que contiene el motivo de homopurina 5'-AAA AAA GGG GGG GGG-3'.

Ejemplo 29

35 (FAM es un radical fluoresceína)

5'-FAM GGG GGG (but) ttt ttt-hex

40 El híbrido de ADN/PNA unido al soporte del Ejemplo 28 se marca por fluorescencia, llevando a cabo las Etapas 13 a 20 como se describe en el Ejemplo 17, en donde en la Etapa 16 se emplea la fluoresceína-fosforamidita de la Firma Applied Biosystems.

Ejemplo 30

45 *Biotina-C_{Phe}G_{Phe}A GAA cat ca t(5'NH-G)G(Ome)U(Ome)C(Ome)G(Ome)-VitE (c-fos antisentido)*

(N(Ome) significa una unidad de nucleótido N con un grupo 2'-O-metoxi; _{Phe} significa un puente de fenilfosfonato; 5'NH-G significa 5'-amino-5'-desoxiguanilato)

50 La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 17, partiendo de CPG, que está cargado con vitamina E (MacKellar *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res*, 20(13), 3411-17) y acoplamiento durante cuatro veces del eslabón de la fórmula VIIIe después del ciclo de síntesis de ADN. Después del acoplamiento del eslabón de 5'-aminonucleótido de la fórmula VIII f, se condensan seis unidades de PNA después del ciclo de síntesis de PNA.
55 Después de la neutralización, según un método conocido, la fosforoamidita se acopla sobre la función amino y el ciclo de síntesis de ADN se repite de manera correspondiente para la constitución de la parte de ADN, en donde en el caso de los puentes de fenilfosfonato se emplean los eslabones de la fórmula VIIIc en la Etapa 16. Por último, se efectúa el acoplamiento del grupo extremo con la biotina-fosforoamidita de la Firma Glen Research. Después de concluida la síntesis, el oligómero se desprotege como se describe en el Ejemplo 19, en donde el grupo dimetoxitritilo se separa en
60 el extremo mediante tratamiento durante 2 horas con ácido acético al 80% a 22°C.

65

ES 2 269 239 T3

Ejemplo 31

A CAT CA (Oeg(t)) ggt cg-hex (c-fos antisentido)

5 (Explicación para Oeg(t), véase el Ejemplo 9)

La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 18. En este caso, primeramente se llevan a cabo cinco ciclos de síntesis de PNA y luego se acopla el eslabón de enlazador Oeg(t) del Ejemplo 9. Después, se llevan a cabo seis ciclos de síntesis de ADN. A continuación, se realiza la separación del soporte y el tratamiento ulterior se realiza como se describe en el Ejemplo 18.

Ejemplo 32

A TAA TG (Oeg(t)) tct cg-hex (oligómero control para c-fos)

15 La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 18. En este caso, primeramente se llevan a cabo cinco ciclos de síntesis de PNA y luego se acopla el eslabón de enlazador Oeg(t) del Ejemplo 9. Después, se llevan a cabo seis ciclos de síntesis de ADN. A continuación, se realiza la separación del soporte y el tratamiento ulterior se realiza como se describe en el Ejemplo 18.

20

Ejemplo 33

a cat cat ggt cg-hex (c-fos antisentido)

25 Este oligómero de PNA puro se preparó como compuesto de referencia análogamente al Ejemplo 18, pero con la excepción de que se llevaron a cabo doce ciclos de PNA. La desprotección de los grupos protectores amino exocíclicos se lleva a cabo en solución amoniacal (5 horas a 55°C). Solo entonces se separa el grupo monometoxitritilo mediante tratamiento durante 2 horas con ácido acético al 80% a 22°C.

Ejemplo 34

A (5-hexi-C)A(5-hexi-U) (5-hexi-C)A (Oeg(t)) ggt cg-hex (c-fos antisentido) (explicación para Oeg(t) véase el Ejemplo 9; 5-hexi-C significa 5-hexinil-citidina, 5-hexi-U significa 5-hexinil-uridina)

35 La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 31, pero en lugar de las pirimidina-fosforamiditas normales se emplean las correspondientes 5-hexinilpirimidina-nucleósido-fosforamiditas en la reacción de condensación.

Ejemplo 35

40

(FAM es un radical fluoresceína)

5'-FAM-TT (but) ttt ttt-hex

45 La síntesis de este oligómero de PNA/ADN se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 27, en donde, no obstante, solamente se condensan dos unidades timidilato.

Ejemplo 36

50

taa tac gac tca cta (5'HN-T)

(5'HN-T significa 5'-amino-5'-desoxitimidina)

55 Este oligómero de PNA/ADN, que está constituido por 15 unidades de PNA y una unidad de nucleósido, se sintetizó como cebador para la reacción de ADN-polimerasa. En este caso se parte de un soporte en fase sólida (aminoalquil-CPG) a partir del cual mantiene unida la 5'-monometoxitritilamino-5'-desoxitimidina a través de su grupo 3'-hidroxi como succinato. Después de la separación del grupo monometoxitritilo con TCA al 3% en diclorometano se llevan a cabo en 15 ciclos de PNA como se describe en el Ejemplo 17. La desprotección de los grupos protectores amino exocíclicos se lleva a cabo en solución amoniacal (5 horas a 55°C). Solo entonces se separa el grupo monometoxitritilo mediante tratamiento durante 2 horas con ácido acético al 80% a 22°C. Se obtiene un oligómero de PNA/ADN con un grupo 3'-hidroxi libre, que sirve como cebador para una ADN-polimerasa (Klenow).

60

Ejemplo 37

65

p_s-rA(2'5')rA(2'5')rA(2'5')rA-espaciador-(Oeg(t))tc ctc ctg cgg-hex

(p_s significa un 5'tiofosfato; espaciador significa un trietilenglicolfosfato; rA es un riboadenilato; (2'5') significa que la unión internucleótidos discurre de 2' hacia 5' en la ribosa)

ES 2 269 239 T3

La síntesis de este compuesto se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 18, condensando primeramente 14 unidades de PNA. Después de introducir el eslabón de enlazador Mmt-Oeg(t)-OH del Ejemplo 9 bajo las condiciones descritas en la Etapa 5, se separa el grupo Mmt con TCA al 3% y se introduce el espaciador con ayuda de Dmt-O-(CH₂CH₂O)₃-O-P(-OCH₂CH₂CN)N(i-C₃H₇)₃, espaciador-fosforamidita adquirible en el comercio (Firma Eurogentech; Bruselas). El tetra-adenilato (2'5')-enlazado se sintetiza como se describe en el Ejemplo 17 con ayuda de la N⁶-benzoil-5'-O-Dmt-3'-O-terc.-butildimetilsilil-adenosin-2'-O-cianoetil-di-isopropilamino-fosforamidita comercial (Firma Milligen, Bedford, EE.UU.), en donde el tiempo de condensación se prolongó a 2 x 5 min. En lugar del tetrazol, en la reacción de acoplamiento se emplea el activador más fuerte 5-etiltiotetrazol. Después de separar el último grupo Dmt se fosfita el oligómero con bis(β-cianoetilo)-diisopropilaminofosfano en el grupo 5'-OH. Después de la oxidación con DTET y de la desprotección con amoníaco y desililación con fluoruro se obtiene el compuesto del título que estimula RNasa L.

Ejemplo 38

15 *p_s-Co(2'5')Co(2'5')Co(2'5')Co-espaciador-(Oeg(t))tc ctc ctg cgg-hex*

(p_s significa un 5'tiofosfato; espaciador significa un trietilenglicolfosfato; Co es cordicepina (3'-desoxiadenosina); (2'5') significa que la unión internucleótidos discurre de 2' hacia 5')

20 La síntesis se lleva a cabo análogamente como en el Ejemplo 37, pero en lugar de la N⁶-benzoil-5'-O-Dmt-3'-O-terc.-butildimetilsilil-adenosin-2'-O-cianoetil-di-isopropilamino-fosforamidita se emplea la correspondiente N⁶-benzoil-5'-O-Dmt-cordicepin-2'-O-cianoetil-di-isopropilamino-fosforamidita (Firma Chemogen, Konstanz) y se suprime el tratamiento de fluoruro.

25 Ejemplo 39

5'-GG GGG GGG (Oeg(t)) ttt ttt ttt-hex

30 La síntesis se efectúa análogamente a como se describe en el Ejemplo 18, en donde después de nueve acoplamientos de PNA se condensa el eslabón de enlazador Mmt-Oeg(t)-OH del Ejemplo 9 bajo las condiciones descritas en la Etapa 5, que permite la subsiguiente condensación de ocho radicales guanilo. El oligómero de PNA/ADN resultante se une con alta afinidad en orientación antiparalela como oligonucleótido formador de triplex a ADN de doble cadena que presenta la secuencia 5' ..AAAAAAAAAAGGGGGGGG..3'.

35 Ejemplo 40

Caracterización de los híbridos de PNA/ADN

40 La caracterización se efectúa con ayuda de la HPLC, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y espectrometría de masas por electroproyección de iones negativos (ES-MS⁻). Los productos se purifican como se describe arriba y luego muestran en la PAGE (acrilamida al 20%, bisacrilamida al 2% y urea 7 M) una banda unitaria. La HPLC se efectúa en columnas de fase inversa RP-18 de la Firma Merck (eluyente A: agua con TFA al 0,1%, B: agua/acetonitrilo = 1:4; gradiente lineal) o en una columna PA-100 de la Firma Dionex (eluyente A: NaOH 20 mM y NaCl 20 mM; B: NaOH 20 mM y NaCl 1,5 M; gradiente lineal). Para la ES-MS⁻ los híbridos de PNA/ADN se transforman en las sales de amonio mediante precipitación con acetato de amonio u otra transformación en sales. La entrega de la muestra se realiza a partir de una solución en acetonitrilo/agua (1:1) con 5 DO₂₆₀/ml de oligómero. La precisión del método se encuentra en este caso en aprox. ± 1,5 Dalton.

Ejemplo 41

50 *Determinación de la absorción celular y estabilidad después de marcaje radiactivo*

Marcaje radiactivo

55 Un marcaje con ³⁵S aplicable de un modo general consiste en llevar a cabo, en la síntesis de la parte de ADN, al menos una oxidación en el ciclo de síntesis de ADN (Etapa 20 en el Ejemplo 17) con ³⁵S elemental. Híbridos de PNA/ADN que tienen un grupo 5'-hidroxi libre, pueden marcarse con ³²P o ³⁵S, con ayuda de la polinucleótido-quinasa, según métodos en sí conocidos. Híbridos de PNA/ADN que portan un grupo 3'-hidroxi libre, pueden marcarse, según un modo conocido, con transferasa 3'-terminal. Como ejemplo se presenta aquí el marcaje en 5' de la parte de ADN: el híbrido de PNA/ADN con un grupo 5'-hidroxi libre (500 pmol) del Ejemplo 17, 18 ó 26 se disuelve en 425 μl de agua, esta solución se calienta hasta 90°C y se enfría bruscamente. Luego se añaden 50 μl de tampón 10 x quinasa y 50 μl de ³²P-gamma-ATP (6000 Ci/ mmol) o ³⁵S-gamma-ATP y se incuba durante 1 hora a 37°C. La reacción se detiene mediante la adición de EDTA 0,5 M. La desalación se efectúa con ayuda de una columna NAP[®] de la Firma Pharmacia.

65

ES 2 269 239 T3

Determinación de la absorción celular

Se incuban células Vero en placas de microtitulación de 96 pocillos en DMEM, FCS al 5% durante 24 horas a 37°C. Después de separar el medio, las células se lavan todavía dos veces con DMEM exento de suero. El oligómero marcado radiactivamente (10^6 cpm) se diluye con oligómero no marcado hasta una concentración de $10 \mu\text{M}$ en suero y con ello las células se incuban a 37°C. Después de 1, 7 y 24 horas se retiran en cada caso $150 \mu\text{l}$ (denominación: “residuo 1”). Las células en los pocillos de las placas de microtitulación se lavan 7 veces con $300 \mu\text{l}$ de medio reciente y los medios de lavado reunidos (denominación: “residuo 2”) se miden en el contador de centelleo. Luego se añaden $100 \mu\text{l}$ de solución de tripsina, se espera 30 segundos y el sobrenadante se elimina. Para la disolución de las células de la placa se incuba durante 3 min a 37°C. Las células separadas por disolución se transfieren a recipientes Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugan a 2000 rpm durante 6 minutos (“residuo 3”). Los sobrenadantes 1 ($5 \mu\text{l}$), 2 y 3 (0,5 ml) se miden en cada caso por separado en el contador de centelleo. A partir de ello se calcula la absorción del oligómero en pmol por cada 100.000 células, representando el residuo 3 la fracción de oligómero unida a las células y representando la suma de los sobrenadantes 1 y 2 la fracción de oligómero no unida a las células.

Resultado

	Absorción celular		
	Tiempo de incubación en horas	en pmol de oligómero/ 10^5 células de híbrido de PNA/ADN	ADN
	1	0,25	0,36
	7	0,54	0,57
	24	0,75	0,78

Investigación de la estabilidad del oligómero en el medio con células

El sobrenadante 1 ($10 \mu\text{l}$) se mezcla con $5 \mu\text{l}$ de formamida al 80% (con xilencianol y azul de bromofenol), se calienta hasta 95°C (5 minutos) y se cargan en un gel de poliacrilamida (acrilamida al 20%, urea 7 M). Después del desarrollo del gel en el campo eléctrico, las bandas sobre el gel se asocian, mediante autorradiografía, al “oligómero estable” o las bandas erróneas se asocian al “oligómero degradado”.

El oligómero de PNA/ADN del Ejemplo 26 es estable en un 69% después de un tiempo de incubación de 24 horas; el oligómero de ADN es estable en un 3%.

El oligómero de PNA/ADN del Ejemplo 31 posee, bajo estas condiciones, un tiempo de semidesintegración de 32 h, mientras que el correspondiente oligonucleótido de ADN presenta un tiempo de semidesintegración de aprox. 2 h.

Ejemplo 42

Determinación de la absorción celular después de marcaje de fluorescencia

Las células COS se dejan desarrollar hasta confluencia en MEM de Dulbecco, que fue suplementado con FCS al 10%, en placas de Petri de 5 cm. Las células se lavan dos veces con DMEM exento de suero. Con ayuda de una aguja estéril se raspa una superficie de aprox. 1 cm^2 en el centro de la placa de Petri. En esta superficie se aplica la solución de oligómero de PNA/ADN a investigar ($0,1 \text{ mM}$). Se incuba a 37°C bajo una atmósfera de CO_2 . Al cabo de 2, 4 y 16 horas, las células se investigan mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, las células se lavan cuatro veces con DMEM exento de suero, se cubren con un soporte de vidrio y se evalúan bajo el microscopio de fluorescencia o mediante contraste de fases. Como comparación a las moléculas híbridas de PNA/ADN se investigó un PNA (sin parte de ADN) F-(but)-tttt ttt-hex marcado por fluorescencia. Después de dos horas de incubación de las células con este PNA > 90% de las células muestran síntomas de fuertes modificaciones morfológicas y la muerte de las células. La mayoría de las células presentan una fuerte vacuolización. La membrana plasmática, el citosol y el núcleo no muestran ninguna absorción de PNA. Después de otras dos horas de incubación con el PNA puro, todas las células han muerto. De manera distinta se comporta con los oligómeros de ADN/PNA de acuerdo con la invención. Ya después de un tiempo de incubación de dos horas de las células con los oligómeros de ADN/PNA, las células presentan una distribución intracelular puntual de los oligómeros de ADN/PNA. Las células no sufren ninguna muerte, tampoco de una incubación prolongada.

ES 2 269 239 T3

Ejemplo 43

Determinación de las temperaturas de fusión

5 La determinación de las temperaturas de fusión se realiza con ayuda de un espectrofotómetro de disposición de diodos HP 8452A, de un elemento Peltier HP 89090A y del software de control de la temperatura HP Rev. B5.1 (Firma Hewlett Packard). Se mide en etapas de 0,5°C/min en HEPES 10 mM y NaCl 140 mM (pH 7,5) como tampón. La concentración de los oligómeros asciende a 0,5 hasta 1 DO₂₆₀ por cada ml.

10 Resultado para el producto del Ejemplo 17 ó 18:

T_M frente a ADN

15 5'-ATC GTC GTA T(Oeg(t)a T_M = 51,5 °C
gtc-hex
3'-TAG CAG CAT A A T CAG-5' antiparalelo

20 5'-ATC GTC GTA T(Oeg(t)a T_M < 20 °C
gtc-hex
5'-TAG CAG CAT A A T CAG-3' paralelo

25 5'-ATC GTC GTA TT(but)a T_M = 51,0 °C
gtc-hex
3'-TAG CAG CAT AA T CAG-5' antiparalelo

30 5'-ATC GTC GTA TTA GTC-3' T_M = 50,5 °C
3'-TAG CAG CAT AAT CAG-5' ADN·ADN antipa-
ralelo

35 5'-ATC GTC GTA TT(but)a T_M < 20 °C
gtc-hex
5'-TAG CAG CAT AA T CAG-3' paralelo

40

45

50

55

60

65

ES 2 269 239 T3

Secuencia

		T_M	T_M
		frente ADN	a frente a ARN (T=U)
5			
10	5' - ACA TCA TGG TCG ADN ap -3'	50,7 °C	48,6 °C
15	3' - TGT AGT ACC AGC -5'		
20	5' - ACA TCA TGG TCG (PNA-ADN) ap -3'	54,5 °C	54,7 °C
25	3' - TGT AGT ACC AGC -5'		
30	5' - ACA TCA TGG TCG (PNA-ADN) p -3'	20 °C	< 20 °C
35	5' - TGT AGT ACC AGC -3'		
40	5' - ACA TCA TGG TCG PNA ap -3'	58,8 °C	66,6 °C
45	3' - TGT AGT ACC AGC -5'		
50	5' - ACA TCA TGG TCG PNA p -3'	46,3 °C	44,8 °C
55	5' - TGT AGT ACC AGC -3'		
60	5' - ACA TCA <u>TGG TCG</u> S-ADN ap -3'	46,7 °C	43,8 °C
65	3' - TGT AGT ACC AGC -5'		

TGG TCG significa una parte de ADN en la que todas las uniones internucleótido están presentes como fosforotioato. Definición para p y ap, véase la página 5.

55 Ejemplo 44

Ensayo en cuanto a la actividad antiviral

60 Se investiga la actividad antiviral de las sustancias de ensayo frente a diferentes virus herpes patógenos humanos en un sistema de ensayo de cultivo celular. Para el ensayo se siembran células de riñón de mono (Vero, 2×10^5 /ml) en MEM de Dulbecco con contenido en suero (suero de ternero fetal FCS al 5%) en placas de microtitulación de 96 pocillos y se incuban durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. El medio con contenido en suero se filtra luego con succión y las células se aclaran dos veces con MEM de Dulbecco exento de suero (-FCS). Las sustancias de ensayo se prediluyen en H₂O hasta una concentración de 600 μM y se almacenan a -18°C. Para el ensayo se efectúan otras etapas de dilución en medio esencial mínimo (MEM) de Dulbecco. En cada caso 100 μl de las diluciones individuales de las sustancias de ensayo se añaden, junto con 100 μl de MEM de Dulbecco exento de suero (-FCS), a las células aclaradas. Después de 3 h de incubación a 37°C y 5% de CO₂ se infectan las células con virus Herpes simplex de

tipo 1 (ATCC VR733, cepa F de HSV-1) o con virus Herpes simplex de tipo 2 (ATCC VR734, cepa G de HSV-2) en concentraciones a las que se destruyen por completo la capa de células en el espacio de 3 días. En el caso de HSV-1, el poder de infección asciende a 500 unidades formadoras de placas (PFU - siglas en inglés) por pocillo, a HSV-2 350 PFU/pocillo. Las tandas de ensayo contienen entonces sustancia de ensayo en concentraciones de 80 μ M a 0,04 μ M en MEM, completado mediante 100 U/ml de penicilina G y 100 mg/l de estreptomycin. Todos los ensayos se llevan a cabo como determinación doble, con excepción de los controles que se llevan a cabo ocho veces por cada placa. Las tandas de ensayo se incuban durante 17 h a 37°C y 5% de CO₂. La citotoxicidad de las sustancias de ensayo se determina, al cabo de 20 h de tiempo total de incubación, mediante verificación microscópica de los cultivos celulares. Como dosis tolerada máxima (DTM) se designa la concentración más alta de preparado que, bajo las condiciones de ensayo mencionadas, no provoca todavía lesiones de las células microscópicamente reconocibles. A continuación, se efectúa la adición de FCS hasta una concentración final de 4% con ulterior incubación durante 55 h a 37°C y 5% de CO₂. Los controles de infección no tratados muestran entonces un efecto citopático (ECP) completo. Después de la verificación microscópica de los cultivos celulares, éstos se tiñen luego con rojo neutro de manera correspondiente al procedimiento de tinción vital según Finter (1966). La actividad antiviral de una sustancia de ensayo se define como la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere para proteger al 30-60% de las células frente al efecto citopatógeno condicionado por el virus. La actividad de las quimeras de PNA/ADN es en cada caso mejor que la de los correspondientes oligómeros de ADN u oligómeros de PNA.

Ejemplo 45

Determinación de la actividad in vivo: inhibición de la expresión de proteína c-Fos en la rata

La determinación se efectúa como se describe (Sandkühler *et al.* (1991) en: Proceedings of the VIth World Congress on Pain, Charlton y Woolf, compiladores; Elsevier, Amsterdam; páginas 313-318) mediante superfusión de la médula ósea. Tras la laminectomía de una rata Sprague-Dawley anestesiada con barbiturato se forma un recipiente de dos cámaras a base de silicona para la absorción del oligómero antisentido. Una cámara se llena con el derivado de PNA/ADN antisentido, mientras que la otra cámara se llena con el oligómero control (concentración, en cada caso 75 μ M). En cada caso después de una hora, se intercambia el superfusato. Al cabo de 6 horas de superfusión se estimula la expresión c-fos mediante tratamiento térmico (52°C) de las extremidades posteriores. La inhibición de la expresión de c-fos se puede detectar inmunohistoquímicamente en correspondientes muestras de corte de tejidos. El oligonucleótido antisentido c-fos del Ejemplo 31 determina una inhibición más intensa de la expresión c-fos que el correspondiente oligonucleótido de ADN o el correspondiente oligómero de PNA del Ejemplo 33.

Ejemplo 46

Ensayo de RNasa-H

Para la determinación de la actividad de RNasa-H se disuelven 1,3 DO del oligómero de PNA/ADN a investigar con 0,5 DO de la secuencia de ARN complementaria (secuencia diana) en 50 μ l de agua tratada con DEPC (pirocarbonato de dietilo); se calienta durante 5 minutos hasta 80°C y, a continuación, en el espacio de 15 minutos hasta 37°C. Con ello se desnaturalizan primero los dos oligómeros que, después del enfriamiento, forman de manera específica para la secuencia una doble cadena de ácidos nucleicos.

Para el ensayo, este dúplex de ARN·PNA/ADN se incuba con 10 μ l de tampón de RNasa H 10x, 1 μ l de ditiotreitól (DTT) y 2 μ l (correspondiente a 10 u) de RNasa H de la Firma USB. La tanda de incubación se completa con agua tratada en autoclave, con DEPC, hasta el volumen total deseado de 100 μ l. Las muestras se incuban a 37°C. Para el ensayo cinético se calentaron, al cabo de 0, 2 min, 10 min y 1 h, en cada caso 20 μ l de la solución, durante 5 minutos hasta 95°C y se congelan a -70°C hasta el análisis. La investigación de la separación de la RNasa H del ARN se efectúa mediante electroforesis en gel. Se demostró que los híbridos de PNA/ADN, que contienen eslabones de desoxirribonucleótido, activan la RNasa H, separándose la cadena de ARN complementaria, mientras que el oligómero de PNA/ADN se desprende de forma intacta de la reacción. La reacción de separación con el oligómero de PNA/ADN discurre algo más lenta que con un correspondiente oligodesoxirribonucleótido de igual longitud y secuencia.

Ejemplo 47

Preparación de un extracto de células HeLa con actividad de RNasa L

Con el fin de estimular la actividad de la endorribonucleasa L celular mediante los conjugados de 2'5'-tetraadenilato-PNA/ADN, se preparó un extracto de células HeLa. Para ello, 35 frascos se mezclan con sendos 20 ml de medio con MEM (medio esencial mínimo) de Dulbecco y FCS (suero de ternero fetal) al 10%. La cosecha de las células puede realizarse después del tratamiento con tripsina. Después de la centrifugación a 1000 rpm, se obtienen 4 ml de cosecha de células. Ésta se carga primero con 4 ml de agua y, después de 3 minutos, se añaden 4 ml de tampón A (5,48 g HEPES; 15,5 g de KCl; 2,488 g de acetato de Mg; 1232 μ l de 2-mercapto-etanol a 1 l de agua), con el fin de lisar las células. A continuación, la solución se centrifuga durante 30 minutos a 0°C en una ultracentrífuga a 30.000 rpm (aprox. 100.000 g). El sobrenadante se retira de 8 ml de extracto de células y se almacena a -20°C para las investigaciones siguientes.

ES 2 269 239 T3

Ejemplo 48

Investigación en cuanto a la activación de la RNasa L

5 Para la investigación de este extracto en cuanto a la endonucleasa L se calientan primeramente 0,3 DO de la secuencia diana de ARN con los respectivos oligómeros de PNA/ADN durante 5 minutos hasta 80°C y, a continuación, se enfría hasta 37°C para la hibridación. El dúplex se mezcla con 20 μ l del extracto, 1,2 μ l de glicerina y tampón de RNasa L y se incuba a 37°C. El volumen total asciende a continuación a 70 μ l. Para las investigaciones cinéticas se separan por pipeteado muestras en los instantes de 0, 20 y 60 minutos y, para la desnaturalización de las enzimas, se calientan durante 5 minutos hasta 95°C. Las muestras se liofilizan en una Speedvac y se analizan mediante electroforesis en gel. Los conjugados de PNA-2'5'-tetraadenilato o los análogos de tetracordicepina activan la RNasa celular, mientras que correspondientes compuestos sin la parte de tetraadenilato no estimulan la RNasa L.

Ejemplo 49

15

Reacción de la ADN-polimerasa

Como molde para la reacción de la ADN-polimerasa sirve el siguiente oligodesoxinucleótido 81-mero:

20

5'-GCC CCA GGG AGA AGG CAA CTG GAC CGA AGG CGC TTG TGG AGA
AGG AGT TCA TAG CTG GGC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA-3'

La secuencia del cebador de PNA/ADN es:

25

H-taa tac gac tca cta (5NH-T)-OH 3'.

Como cebador control se emplea un correspondiente oligodesoxinucleótido de la secuencia 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3'.

30

El cebador (0,15 nmol) y el molde (0,15 nmol) en 5 μ l de tampón 10x PCR (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9, Triton X-100 al 1%, MgCl₂ 15 mM) se diluyen en 35 μ l de agua y se hibridan mediante calentamiento hasta 95°C y enfriamiento. Luego se añaden 10 μ l de una mezcla de dNTP 2 mM (nucleósido-5'-trifosfatos) y 3 μ l de ADN-polimerasa (fragmento de Klenow) y se incuba en cada caso durante 0,5 horas a 22°C y 37°C. La solución de reacción se analiza luego en un gel de poliacrilamida al 10% (con bis al 1%). Como marcador se aplica digestión con pBR322/HaeIII. La reacción con el cebador de control muestra un fragmento de ADN de doble cadena con el tamaño esperado en relación con el marcador, mientras que el producto del cebador de PNA/ADN migra algo más rápido. En ambos casos, la doble cadena migra en la electroforesis en gel de forma esencialmente más rápida que la cadena sencilla del molde.

40

45

50

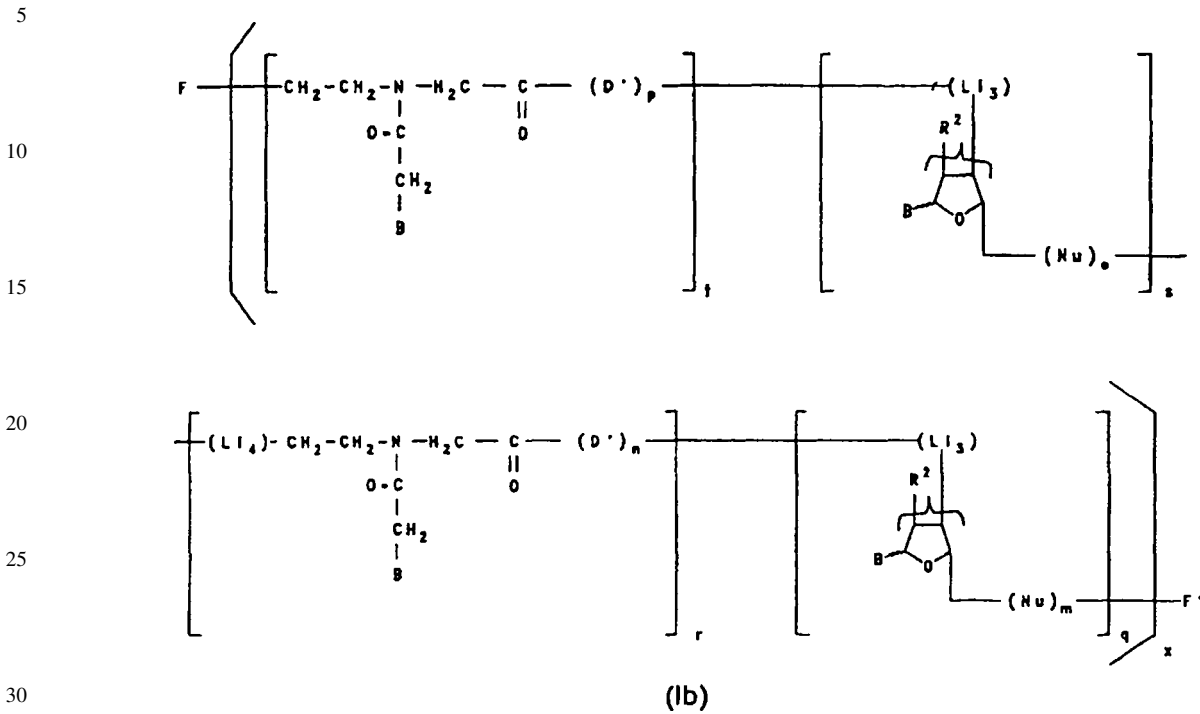
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Derivados de poliamida-oligonucleótidos de la fórmula Ib,



caracterizado porque

x es 1 y

q = r = 1 y s = t = cero o

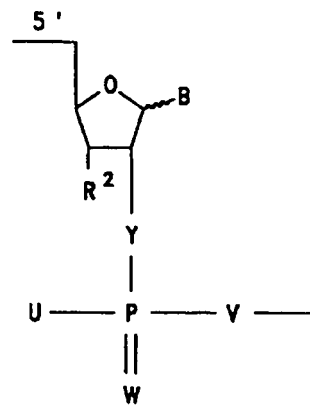
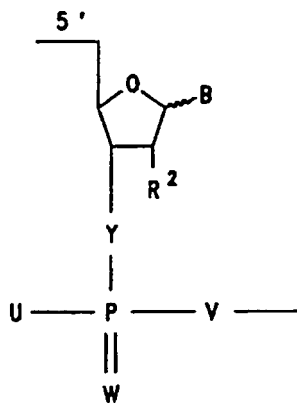
r = s = 1 y q = t = cero o

q = r = s y t = cero;

R² significa hidrógeno, hidroxilo, alcoxi C₁-C₁₈, halógeno, azido o amino;

B, independientemente uno de otro, representa una base usual en la química de los nucleótidos, y el "corchete" indica que R² y el sustituyente vecino se pueden encontrar en las posiciones 2' y 3' o, también a la inversa, en las posiciones 3' y 2'; y en donde la estructura de poliamida contiene al menos una nucleobase que es distinta de timina;

Nu representa un radical de las fórmulas IIa o IIb



ES 2 269 239 T3

en la que

R² y B están definidos como arriba;

5 U significa hidroxilo, mercapto, alquilo C₁-C₁₈, alcoxi C₁-C₁₈, arilo C₆-C₂₀, aril C₆-C₁₄-alquilo C₁-C₈, NHR³ o NR³R⁴ y

R³ es alquilo C₁-C₁₈ o alcoxi C₁-C₄-alquilo C₁-C₄, y

10 R⁴ es alquilo C₁-C₁₈ o

R³ y R⁴, junto con el átomo de nitrógeno que los porta, significan un anillo heterocíclico de 5-6 miembros, que adicionalmente puede contener otro heteroátomo de la serie O, S, N;

15 V significa oxo, sulfanidilo o imino;

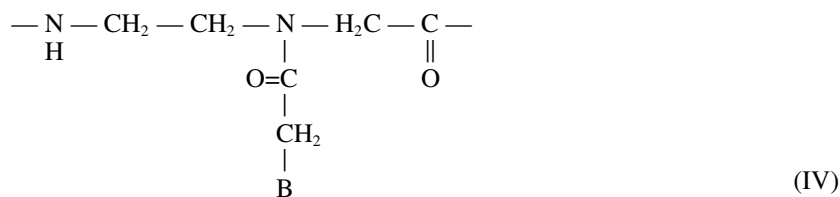
W es oxo o tioxo;

20 Y significa oxo, sulfanidilo, metileno o imino;

m = cero a 20;

o = cero a 20;

25 D' significa un radical de la fórmula IV



35 en donde B está definido como arriba;

n = cero a 20;

40 p = cero a 20;

Li₃ y Li₄, independientemente uno de otro, es en cada caso una estructura de la fórmula V



45

en donde, independientemente uno de otro,

ε = 1 a 5,

50

V' significa oxígeno, NH, un enlace o un radical de la fórmula VI

55



60

en donde U, V, W e Y están definidos como arriba;

G significa alcanodiilo C₁-C₁₂, en donde alcanodiilo puede estar eventualmente sustituido con halógeno, amino, hidroxilo, alquilo C₁-C₁₈, alcoxi C₁-C₁₈, arilo C₆-C₁₄ o aril C₆-C₁₄-alquilo C₁-C₁₈; aril C₆-C₁₄-dialcanodiilo C₁-C₁₂ o un grupo de la fórmula (CH₂CH₂O)_δCH₂CH₂, en donde δ puede ser igual a 1 hasta 11; o puede representar un enlace; y

65

G' significa oxo, sulfanidilo, imino, -C(O)-, -C(O)NH-, un enlace o un radical de la fórmula VI, en donde U, V, W e Y están definidos como arriba; y

ES 2 269 239 T3

F y F' están enlazados a través de un enlace y/o

F representa $R^0-(A)_k-V$ y

5 F' en la fórmula Ib representa $V^1-(A)_l-R^1$,

en donde

10 R^0 significa hidrógeno, alcanoílo C_1-C_{18} , alcoxi C_1-C_{18} -carbonilo, cicloalcanoílo C_3-C_8 , aroílo C_7-C_{15} , heteroaróílo C_3-C_{13} o un grupo que favorece la absorción intracelular del oligómero o sirve como marcaje de una sonda de ADN o, en la hibridación del oligómero al ácido nucleico diana, ataca a éste bajo fijación, reticulación o separación; o,

15 en el caso de $k = \text{cero}$, R^0 es hidrógeno o, junto con V, representa un radical de la fórmula VII,



en donde

25 Z y Z', independientemente uno de otro, significan hidroxilo, mercapto, alcoxi C_1-C_{22} , alquilo C_1-C_{18} , arilo C_6-C_{20} , aril C_6-C_{14} -alquilo C_1-C_{18} , alquiltio C_1-C_{22} , NHR^3 , NR^3R^4 , o un grupo que favorece la absorción intracelular del oligómero o sirve como marcaje de una sonda de ADN o en la hibridación del oligómero al ácido nucleico diana ataca a éste bajo unión, reticulación o separación, y en donde

30 R^3 , R^4 , V y W están definidos como arriba;

R^1 significa hidrógeno o Q^0 ,

en donde R^1 siempre únicamente es hidrógeno cuando $l = \text{cero}$ y

35 en la fórmula Ib $q = 1$ o $q = r = \text{cero}$ y en $F' = V^1-(A)$, $-R^1$ con $V^1 = V$,

A significa el radical de un aminoácido natural o no natural;

40 Q^0 significa hidroxilo, OR' , NH_2 , NHR'' , con

$R' = \text{alquilo } C_1-C_{18}$ y

$R'' = \text{alquilo } C_1-C_{18}$, amino-alquilo C_1-C_{18} , hidroxialquilo C_1-C_{18} ;

45 V está definido como arriba;

V^1 es un enlace o V, en donde en F' solamente en la fórmula Ib con $q = \text{cero}$ y $r = 1$ V^1 siempre representa un enlace;

50 k es cero a 10;

l es cero a 10;

55 con la condición de que

a) en el caso de que en el compuesto de la fórmula Ib $t = \text{cero}$ y $s = 1$, Li_3 representa un enlace;

b) en el caso de que en el compuesto de la fórmula Ib $s = t = \text{cero}$, Li_4 representa un enlace;

60 en donde cada nucleótido puede presentarse en su configuración D o L y la base se puede encontrar en posición α o β .

2. Derivados de péptido-oligonucleótidos de la fórmula Ib según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la base se encuentra en posición β .

65 3. Procedimiento para la preparación de derivados de péptido-oligonucleótidos según las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque sucesivamente se condensa una unidad de PNA o una unidad de ADN con en cada caso una nucleobase a un soporte correspondientemente derivatizado o a una cadena de oligómeros en crecimiento.

ES 2 269 239 T3

4. Derivados de péptido-oligonucleótidos según las reivindicaciones 1 ó 2, para uso como agente curativo.

5. Derivados de péptido-oligonucleótidos según las reivindicaciones 1 ó 2, para uso como agente curativo en el tratamiento de enfermedades que son provocadas por virus, o de enfermedades que son influenciadas por integrinas o receptores de la adhesión célula-célula, en el tratamiento del cáncer o para evitar la restenosis.

6. Medicamento que contiene un derivado de péptido-oligonucleótido según las reivindicaciones 1 ó 2.

10 7. Derivados de péptido-oligonucleótidos según las reivindicaciones 1 ó 2, para uso como sonda de genes.

8 Derivados de poliamida-oligonucleótidos según las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque al menos un extremo de una unidad de nucleósido se encuentra un grupo 3'-hidroxi, para su aplicación como cebador.

15 9. Ensayo de sonda de genes para la determinación de una diana de oligonucleótidos o de polinucleótidos (ARN o ADN), **caracterizado** porque se emplea una sonda de genes según la reivindicación 7 en un ensayo homogéneo o heterogéneo.

20 10. Ensayo de sonda de genes para la determinación de una diana de oligonucleótidos o de polinucleótidos (ARN o ADN), **caracterizado** porque se emplea un cebador según la reivindicación 8.

25 11. Ensayo de sonda de genes según las reivindicaciones 9 ó 10, **caracterizado** porque la diana se determina después de una amplificación de la diana.

30

35

40

45

50

55

60

65