

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 931 081**

51 Int. Cl.:

C07D 405/12 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2016** **PCT/US2016/000010**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2016** **WO16118305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2016** **E 16740489 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022** **EP 3247710**

54 Título: **Compuestos a base de cumarina y métodos relacionados**

30 Prioridad:

20.01.2015 US 201562125431 P

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

23.12.2022

73 Titular/es:

BIOSEARCH TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
2199 South McDowell Blvd.
Petaluma, CA 94954-6904, US

72 Inventor/es:

SANCHEZ, ANTHONY DE JESUS

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 931 081 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos a base de cumarina y métodos relacionados

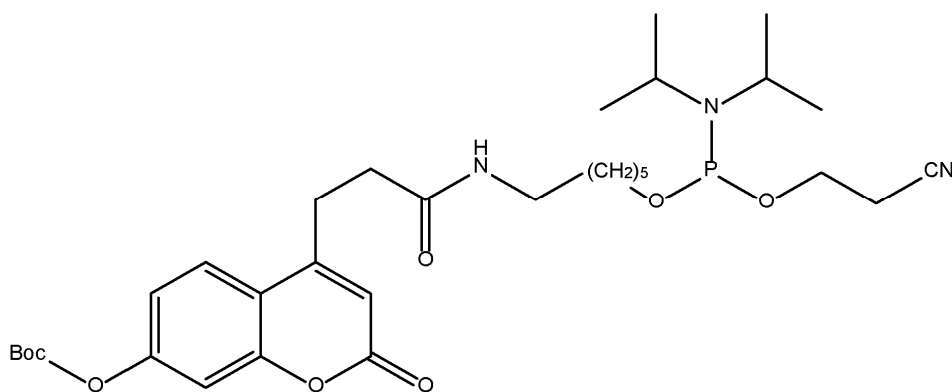
5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a compuestos a base de cumarina que pueden ser utilizados para el etiquetado de moléculas biológicas, así como a métodos sintéticos y de ensayo relacionados.

10 **Antecedentes de la invención**

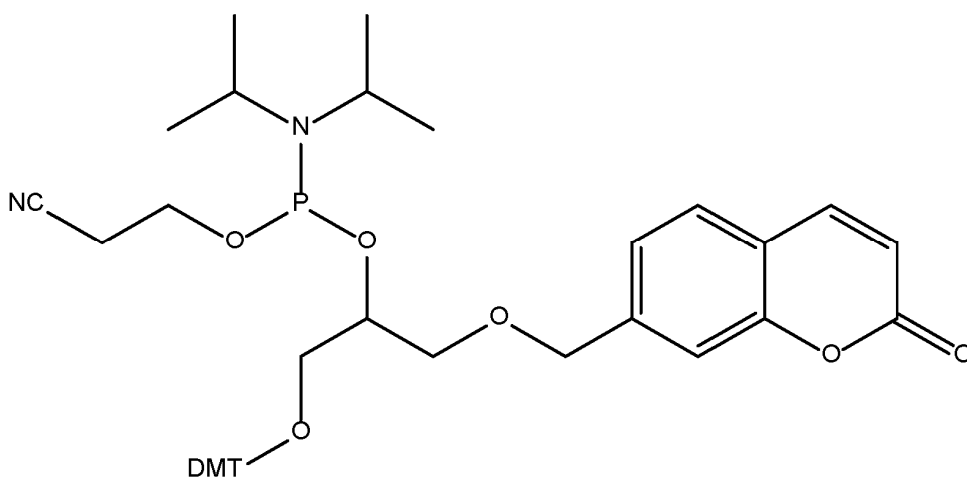
Los investigadores han investigado el uso de cumarinas para el etiquetado de oligonucleótidos. Estos han observado las dificultades inherentes asociadas a la manipulación sintética de dichos compuestos: "Los tintes de cumarina representan fluoróforos orgánicos de emisión brillante que no son estables en las condiciones básicas normalmente fuertes durante la escisión y desprotección del ADN. Por consiguiente, estas etiquetas no pueden incorporarse a los oligonucleótidos utilizando la química convencional de fosforamidita". Berndt, S. *et al.* "Comparison of a Nucleosidic vs Non-Nucleosidic Postsynthetic 'Click' Modification of DNA with Base-Labile Fluorescent Probes" *Bioconjugate Chem.* 2009, 20, 558-564.

20 Las cumarinas se han conjugado con oligonucleótidos de forma postsintética utilizando químicas de "clic" y de ésteres activados. Hay pocos ejemplos de incorporación de cumarinas a oligonucleótidos utilizando las correspondientes fosforamiditas de cumarina. El documento US2004191796, por ejemplo, analiza una fosforamidita de cumarina única (**Estructura 1**) como se muestra a continuación:

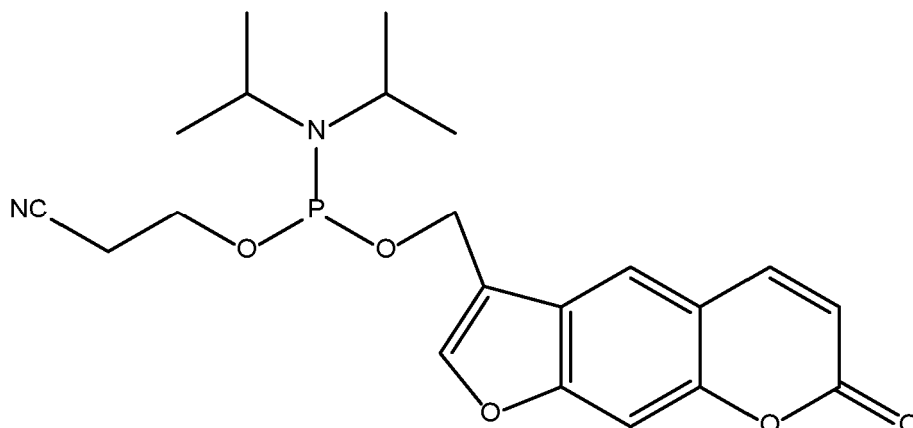


Estructura 1

El documento WO1996028438 analiza unas cuantas fosforamiditas de cumarina (**Estructuras 2-5**). En todos los casos, la porción de fosforamidita se une al anillo aromático de la cumarina. Se utilizó amoníaco caliente para desproteger los oligonucleótidos correspondientes.

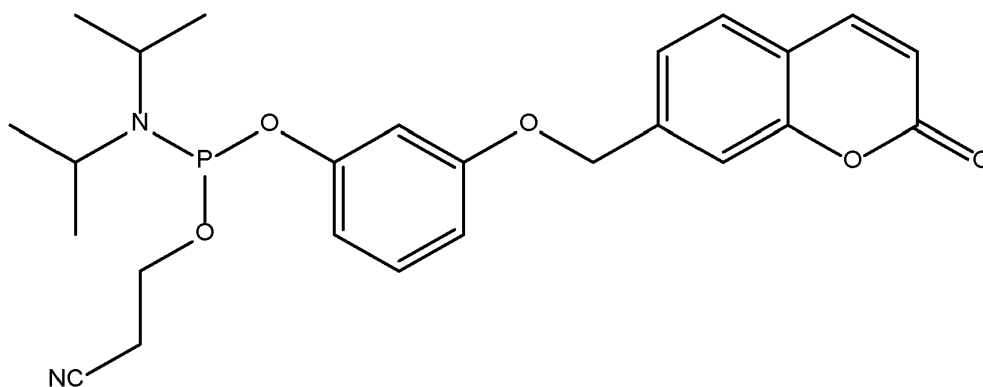


Estructura 2

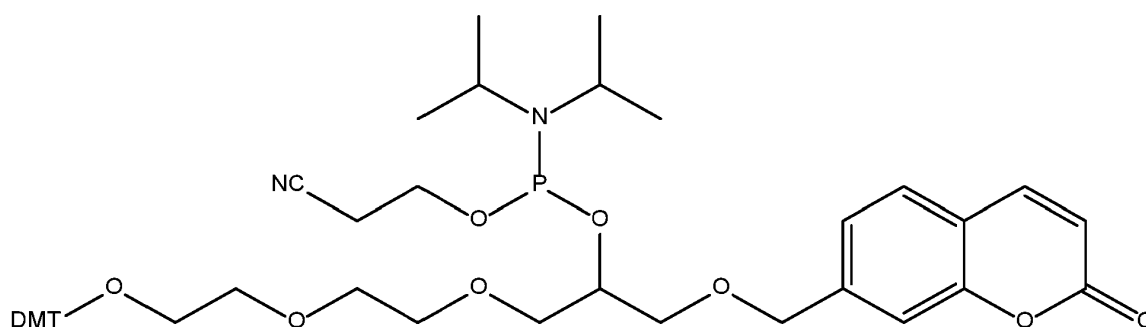


Estructura 3

5



Estructura 4

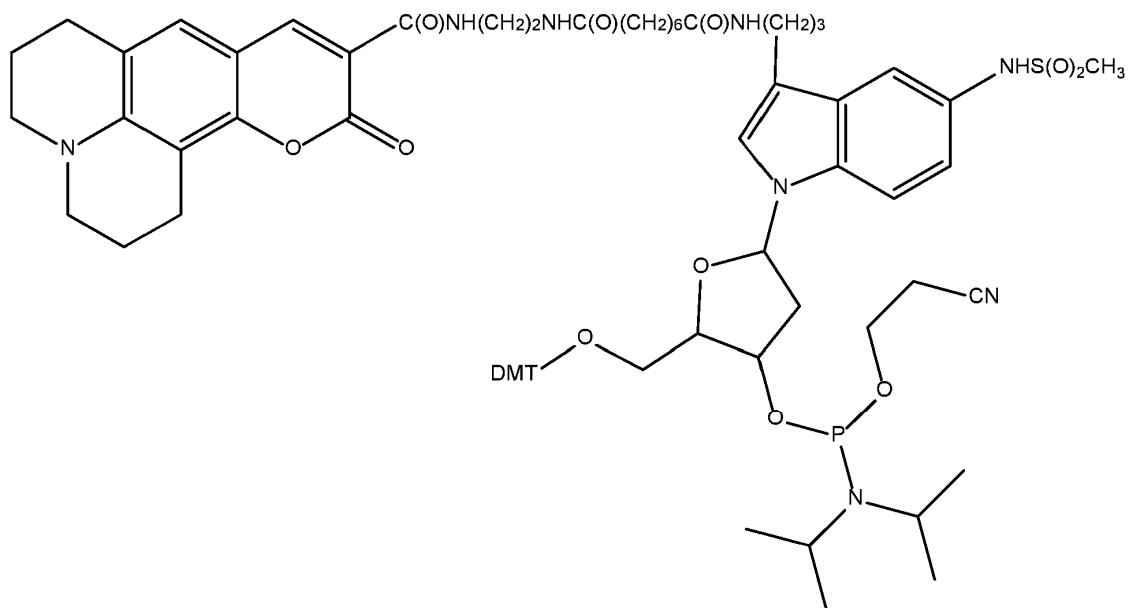


Estructura 5

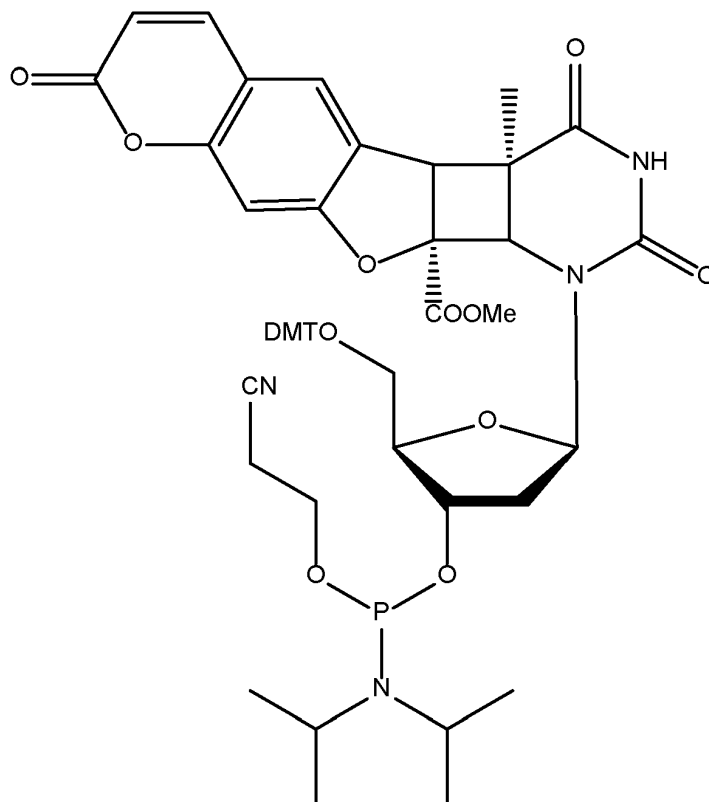
10

15

El documento EP1842923 hace referencia a derivados de nucleótidos marcados con tintes. La referencia analiza una cumarina unida a través de un metanosulfonilaminoindol a una fosforamidita. Los oligonucleótidos preparados a partir de este reactivo se desprotegeron utilizando amoníaco a temperatura ambiente durante 2 horas. Este compuesto, Estructura 6, es vendido como Cyan 500 por Roche.

**Estructura 6**

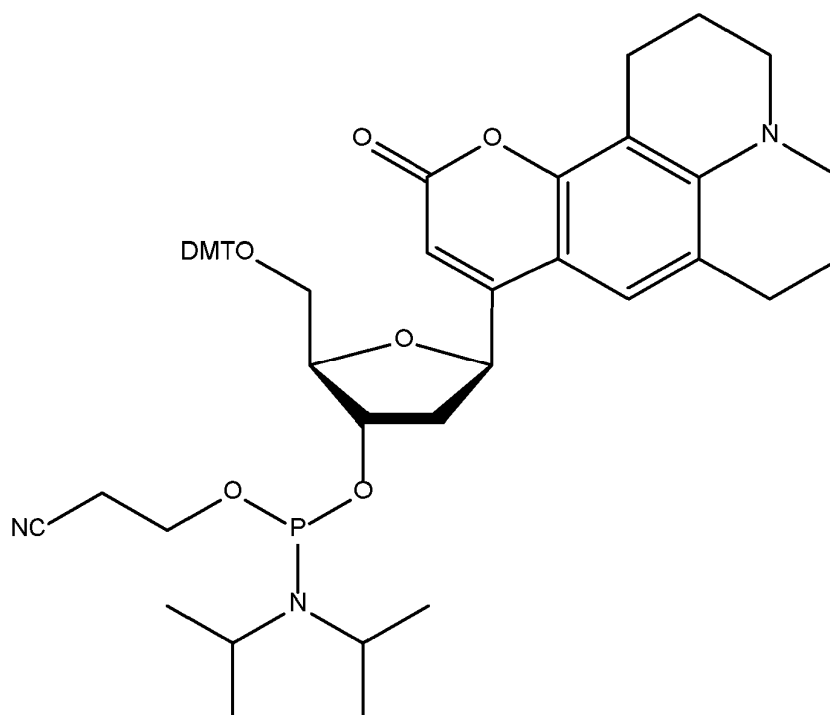
- 5 Kobertz *et al.* informan de una fosforamidita de ribosa a base de psoraleno (Estructura 7) J. Am. Chem. Soc., 1997, 119 (25), pág. 5960-5961. La referencia analiza la preparación de oligonucleótidos utilizando tales compuestos junto con fosforamiditas protegidas por PAC. Los productos se escindieron y desprotegeron con DBU al 10 % en EtOH a temperatura ambiente durante 24 horas.

**Estructura 7**

10

- 15 Brauns *et al.* informan de una fosforamidita de cumarina y C-ribosida (Estructura 8) J. Am. Chem. Soc., 1999, 121 (50), pág. 11644-11649. La escisión de un oligonucleótido correspondiente de un soporte y la desprotección se

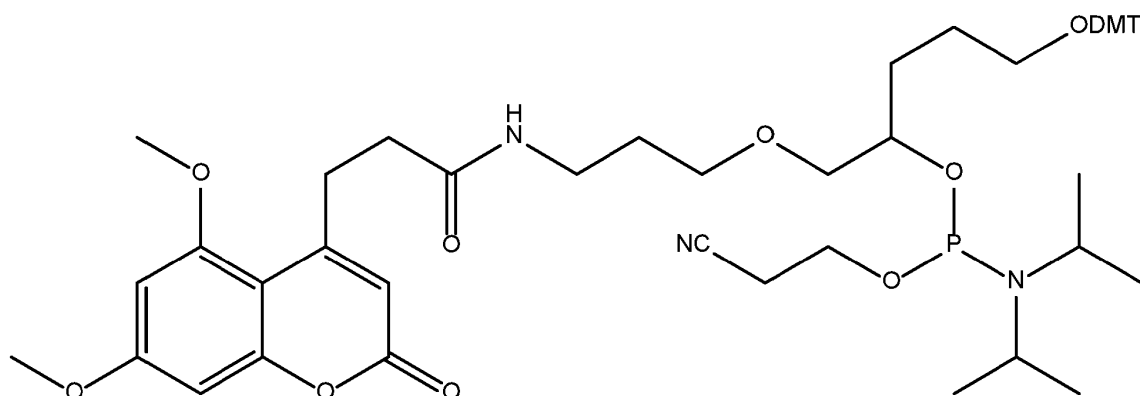
realizaron mediante un tratamiento con NH_4OH concentrado durante 16 horas a 25 °C.



5

Estructura 8

Ivana *et al.* informan de una fosforamidita de cumarina única (Estructura 9) Collect. Czech. Chem. Commun. 2007, 72, 996-1004. La referencia no analiza ningún ejemplo de síntesis de ADN.

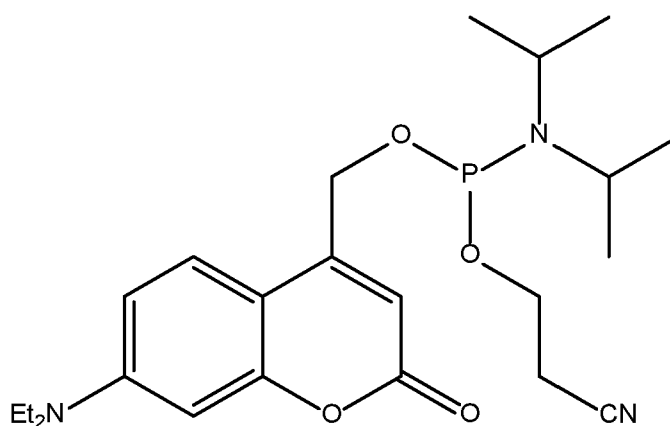


10

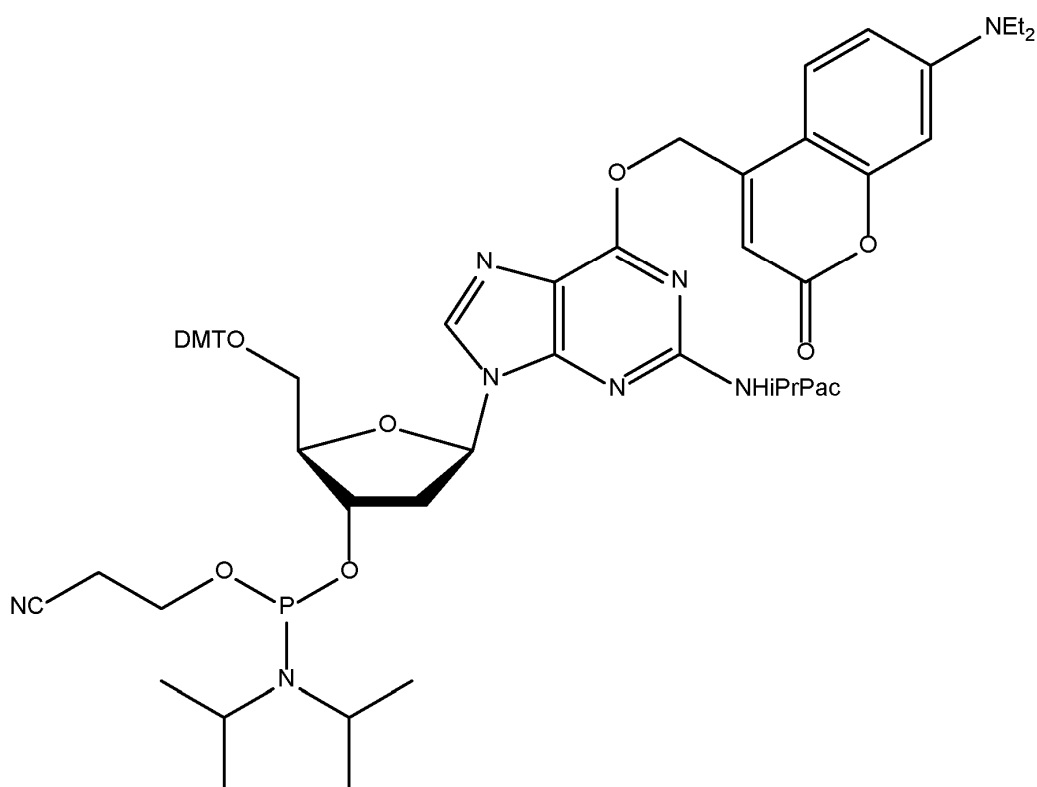
Estructura 9

Goguen *et al.* informan de la preparación de una fosforamidita de cumarina como producto intermedio en la preparación de fosfoaminoácidos (Estructura 10) J. Am. Chem. Soc., 2011, 133 (29), pág. 11038-11041.

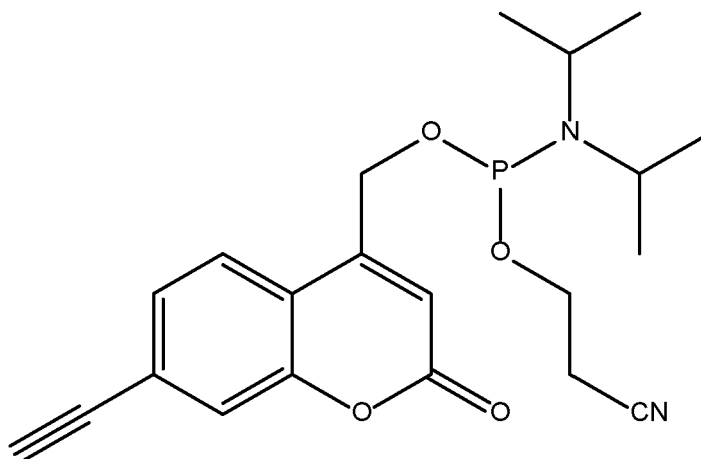
15

**Estructura 10**

- 5 Menge *et al.* informan de la preparación de una cumarina unida a una fosforamidita nucleotídica a través de la nucleobase (Estructura 11) Org. Lett., 2011, 13 (17), pág. 4620-4623. El correspondiente oligonucleótido sintetizado utilizando la fosforamidita fue escindido y desprotegido con amoníaco a temperatura ambiente.

**Estructura 11**

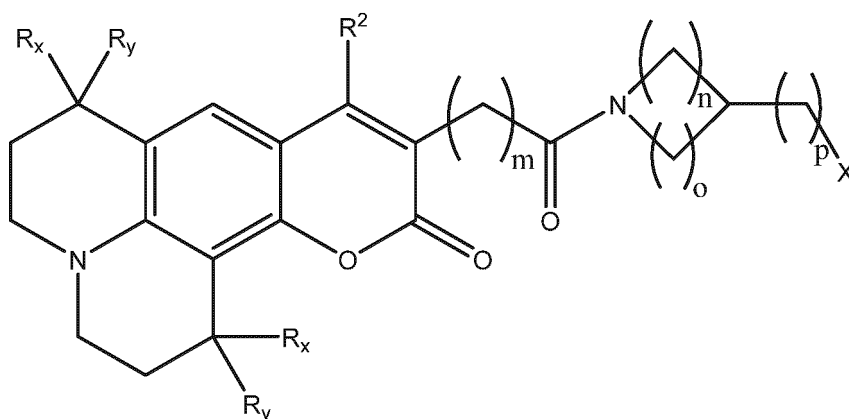
- 10 Sun *et al.* informan del uso de una fosforamidita de cumarina modificada con alquino en la conjugación por clic
15 (Estructura 12) Bioconj. Chem. 2013, 24(7): 1226-34.



Estructura 12

5 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un compuesto de Estructura 15:

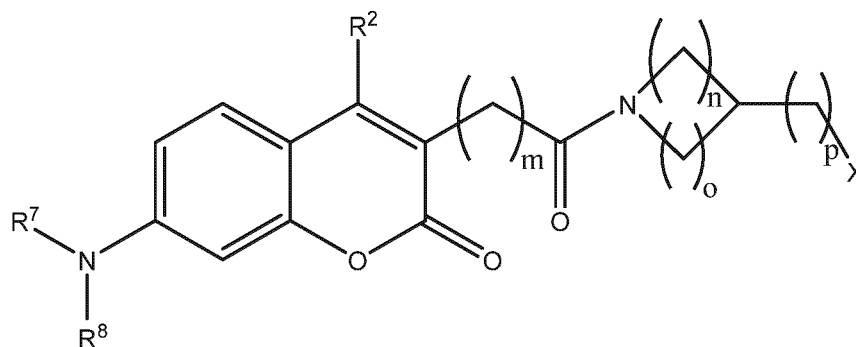


Estructura 15

donde

- 15 m es 1, 2 o 3;
n es 1 o 2;
o es 1 o 2;
p es 0, 1, 2 o 3;
R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃;
20 X es -OH, -NH₂, -SH, -OR¹¹, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -OC(O)R¹⁵, -NHC(O)R¹⁶, -SC(O)R¹⁷, -C(O)OH, -C(O)OR¹⁸, -C(O)NHR¹⁹, -C(O)NR²⁰R²¹, -N₃;
R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ se seleccionan independientemente entre alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido, -CH₂CH(OH)CH₂(OH), -CH(CH₂OH)₂, -CH₂CCH, -(CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OH donde a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, -P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, -P(O)(O-)-Oligonucleótido, -(CH₂)_bCC-Nucleósido, -(CH₂)_bCC-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNH-Nucleósido, -(CH₂)_bNH-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], donde b es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;
EWG es un grupo aceptor de electrones;
R_x y R_y son independientemente H o CH₃;
30 R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo.
El compuesto mencionado anteriormente, en donde X es -OH, -OR¹¹ u -OC(O)R¹⁵.
El compuesto mencionado anteriormente, en donde X es -NH₂, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -NHC(O)R¹⁶.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de estructura 16:



Estructura 16

donde

m es 1, 2 o 3;

n es 1 o 2;

o es 1 o 2;

p es 0, 1, 2 o 3;

R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃;

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente entre H, alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido o R⁷ y R⁸ juntos forman un heterociclo de cinco, seis o siete miembros;

X es -OH, -NH₂, -SH, -OR¹¹, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -OC(O)R¹⁵, -NHC(O)R¹⁶, -SC(O)R¹⁷, -C(O)OH, -C(O)OR¹⁸, -C(O)NHR¹⁹, -C(O)NR²⁰R²¹, -N₃;

R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ se seleccionan independientemente entre alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido, -CH₂CH(OH)CH₂(OH), -CH(CH₂OH)₂, -CH₂CCH, -(CH₂CH₂O)ₐ-CH₂CH₂OH donde a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, -P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, -P(O)(O-)-Oligonucleótido, -(CH₂)ᵇCC-Nucleósido, -(CH₂)ᵇCC-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)ᵇNucleósido, -(CH₂)ᵇ-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)ᵇNH-Nucleósido, -(CH₂)ᵇNH-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)ᵇNHC(O)(CH₂)ᵇ-Nucleósido, -(CH₂)ᵇNHC(O)(CH₂)ᵇ-[Nucleósido Trifosfato], donde b es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

EWG es un grupo aceptor de electrones;

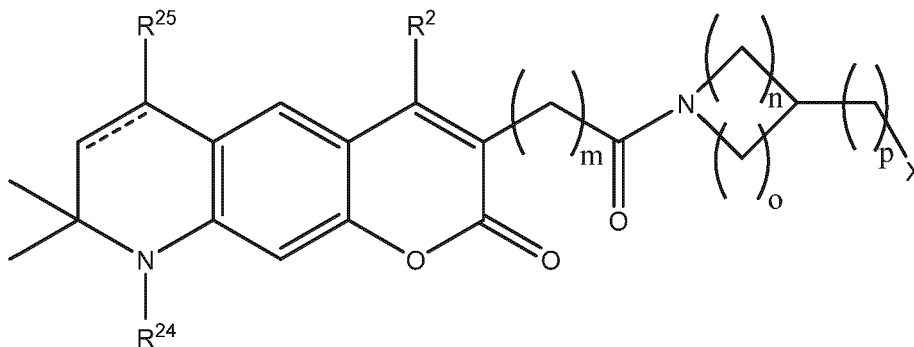
R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo.

El compuesto mencionado anteriormente, en donde R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente entre H o alquilo (C₁-C₈).

El compuesto mencionado anteriormente, en donde X es -OH, -OR¹¹ u -OC(O)R¹⁵.

El compuesto mencionado anteriormente, en donde X es -NH₂, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -NHC(O)R¹⁶.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto de estructura 17:



Estructura 17

donde

m es 1, 2 o 3;

n es 1 o 2;

o es 1 o 2;

p es 0, 1, 2 o 3;

R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃; la línea discontinua representa un doble enlace opcional;

X es -OH, -NH₂, -SH, -OR¹¹, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -OC(O)R¹⁵, -NHC(O)R¹⁶, -SC(O)R¹⁷, -C(O)OH, -C(O)OR¹⁸, -C(O)NHR¹⁹, -C(O)NR²⁰R²¹, -N₃;

R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ se seleccionan independientemente entre alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido, -CH₂CH(OH)CH₂(OH), -CH(CH₂OH)₂, -CH₂CCH, -(CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OH donde a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, -P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, -P(O)(O-)-Oligonucleótido, -(CH₂)_bCC-Nucleósido, -(CH₂)_bCC-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNH-Nucleósido, -(CH₂)_bNH-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], donde b es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

EWG es un grupo aceptor de electrones;

R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo; R²⁴ es alquilo (C₁-C₈) o alquilo (C₁-C₈) sustituido;

R²⁵ es alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido o CH₂SO₃H.

El compuesto mencionado anteriormente, en donde X es -OH, -OR¹¹ u -OC(O)R¹⁵.

El compuesto mencionado anteriormente, en donde R²⁴ y R²⁵ son alquilo (C₁-C₈).

En un aspecto adicional, se proporciona un método para fabricar una sonda de oligonucleótidos que comprende un resto de cumarina, en donde el método comprende las etapas de:

1) sintetizar un oligonucleótido usando un método de síntesis en fase sólida para proporcionar un oligonucleótido unido a un soporte sólido;

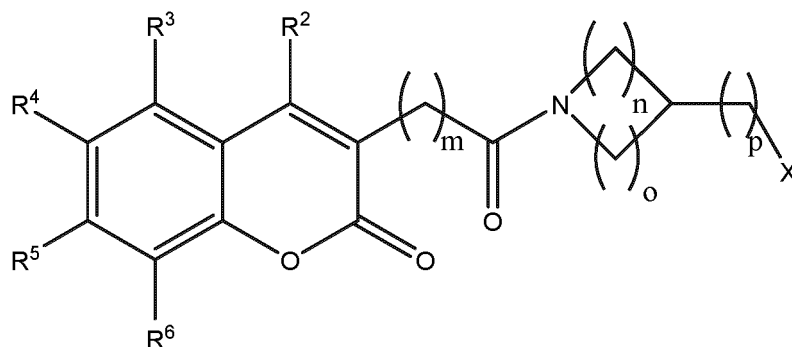
2) hacer reaccionar el oligonucleótido unido a un soporte sólido con un compuesto de cumarina dentro del alcance de las estructuras 15-17 como se define anteriormente o en las reivindicaciones que comprende un resto de fosforamidita para proporcionar una sonda de oligonucleótido unido a un soporte sólido que comprende un resto de cumarina;

3) retirar la sonda del soporte sólido a una temperatura entre 50 °C y 70 °C, en amoníaco concentrado, durante un período de 2 h a 8 h;

4) aislar la sonda en el que el resto de cumarina de la sonda aislada se degrada en una medida inferior al 5,0 por ciento.

El método enumerado anteriormente, en el que el resto de cumarina de la sonda aislada se degrada en una medida inferior al 2,5 por ciento.

El método mencionado anteriormente, en donde el compuesto de cumarina que comprende un resto de fosforamidita tiene la siguiente estructura:



en donde m es 1, 2 o 3;

n es 1 o 2;

o es 1 o 2;

p es 0, 1, 2 o 3;

R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃;

R^3 es H;

R^4 es H o R^4 junto con R^5 forman un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco o seis miembros (por ejemplo, piperidinilo);

R^5 es $-NR^7R^8$ donde R^7 y R^8 se seleccionan independientemente entre H, alquilo (C_1-C_8), o R^7 y R^8 juntos forman un heterociclo de cuatro, cinco, seis o siete miembros, o R^4 , R^5 y R^6 juntos forman sistemas de anillos condensados que tienen anillos de cinco o seis miembros;

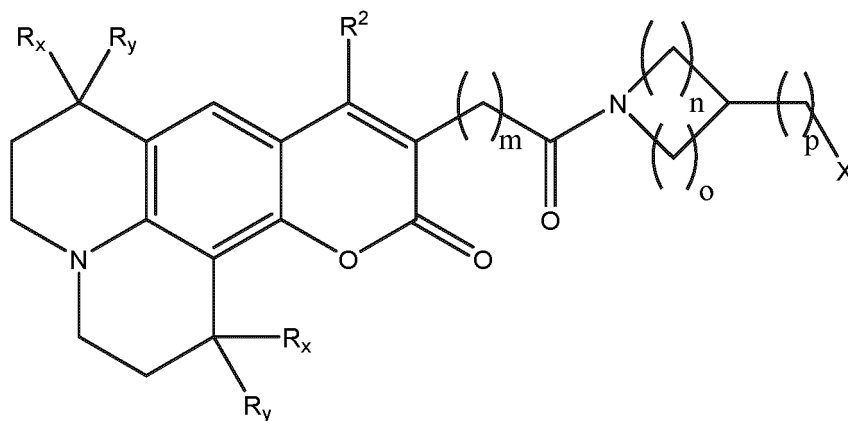
R^6 es H o R^4 , R^5 y R^6 juntos forman sistemas de anillos carbocíclicos o heterocíclicos condensados que tienen anillos de cinco o seis miembros;

X es $-O-P(NR^{22}R^{23})OCH_2CH_2-EWG$ o $(CH_2CH_2O)_a-CH_2CH_2OP(NR^{22}R^{23})OCH_2CH_2-EWG$, en donde a es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

EWG es un grupo aceptor de electrones;

R^{22} y R^{23} se seleccionan independientemente entre $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)_2$ o R^{22} y R^{23} juntos forman un heterociclo.

El método mencionado anteriormente, en donde el compuesto de cumarina que comprende un resto de fosforamidita tiene la siguiente estructura:



en donde m es 1, 2 o 3;

n es 1 o 2;

o es 1 o 2;

p es 0, 1, 2 o 3;

R^2 es $-H$ o $-CH_3$;

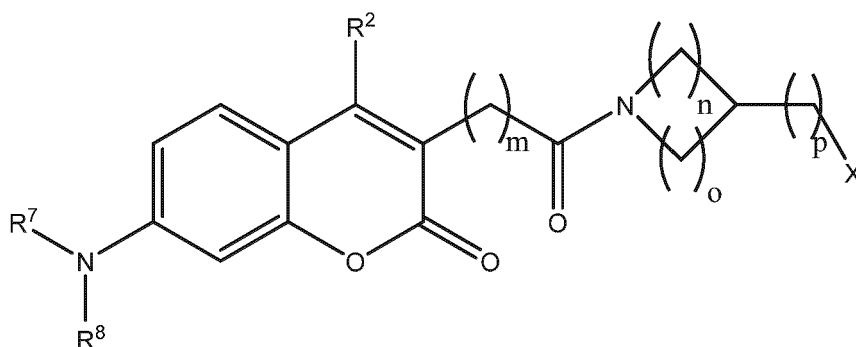
X es $-O-P(NR^{22}R^{23})OCH_2CH_2-EWG$ o $(CH_2CH_2O)_a-CH_2CH_2OP(NR^{22}R^{23})OCH_2CH_2-EWG$, en donde a es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

EWG es un grupo aceptor de electrones;

R_x y R_y son independientemente H o CH_3 ;

R^{22} y R^{23} se seleccionan independientemente entre $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)_2$ o R^{22} y R^{23} juntos forman un heterociclo.

El método mencionado anteriormente, en donde el compuesto de cumarina que comprende un resto de fosforamidita tiene la siguiente estructura:



en donde m es 1, 2 o 3;

n es 1 o 2;

o es 1 o 2;

p es 0, 1, 2 o 3;

R² es -H o -CH₃;

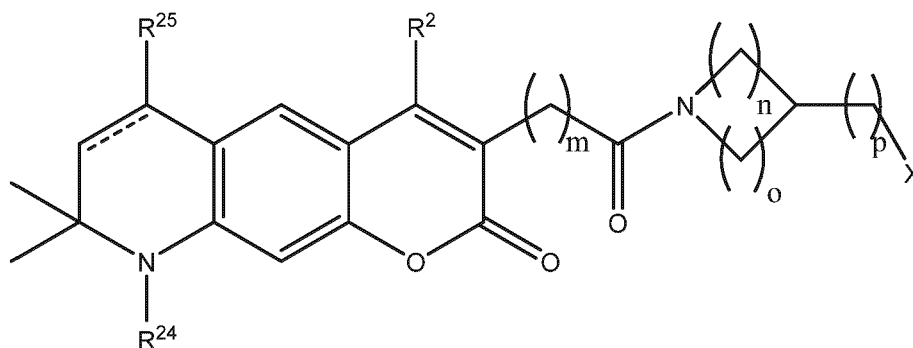
X es -O-P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG o (CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OP(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, en donde a es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

EWG es un grupo aceptor de electrones;

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente entre H, alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido o R⁷ y R⁸ juntos forman un heterociclo de cinco, seis o siete miembros;

R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo.

El método mencionado anteriormente, en donde el compuesto de cumarina que comprende un resto de fosforamidita tiene la siguiente estructura:



en donde m es 1, 2 o 3;

n es 1 o 2;

o es 1 o 2;

p es 0, 1, 2 o 3;

R² es -H o -CH₃;

X es -O-P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG o (CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OP(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, en donde a es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

EWG es un grupo aceptor de electrones;

R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo;

R²⁴ es alquilo (C₁-C₈) o alquilo (C₁-C₈) sustituido;

R²⁵ es alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido o CH₂SO₃H.

Descripción detallada de la invención

Salvo que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tienen los significados proporcionados más adelante:

Definiciones

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento, por lo general, tienen el mismo significado que el que comúnmente entendería una persona normalmente versada en la materia a la que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura que se utiliza en el presente documento y los procedimientos de laboratorio, en cultivo celular, genético molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos que se describen a continuación son bien conocidos y habitualmente empleados en la técnica. Para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos se utilizan técnicas estándar. Generalmente, las reacciones enzimáticas y las etapas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales de la técnica y varias referencias generales (véase, en general, Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se proporcionan a lo largo de este documento. La nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en química analítica y química orgánica sintética descritos a continuación son bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Las técnicas estándar, o modificaciones de las mismas, se utilizan para las síntesis químicas y los análisis químicos.

"Analito", como se utiliza en el presente documento, significa cualquier compuesto o molécula de interés para el que se realiza una prueba de diagnóstico. Un analito puede ser, por ejemplo, una proteína, péptido, hidrato de carbono, polisacárido, glucoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, tinte, nutriente, factor de crecimiento, *etc.*, sin limitación.

Tal como se usa en el presente documento, "transferencia de energía" se refiere al proceso por el cual un grupo modificador altera la energía de estado excitado de un grupo excitado, tal como un desactivador. Si el grupo modificador de la energía de estado excitado es un grupo de desactivación, entonces la emisión de fluorescencia del grupo fluorescente se atenúa (se desactiva). La transferencia de energía puede ocurrir a través de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, o a través de la transferencia directa de energía. Los mecanismos exactos de transferencia de energía en estos dos casos son diferentes. Debe entenderse que cualquier referencia a la transferencia de energía en la presente solicitud abarca todos estos fenómenos distintos en cuanto a mecanismo.

Tal como se usa en el presente documento, "par de transferencia de energía" se refiere a dos moléculas cualquiera que participan en la transferencia de energía. Típicamente, una de las moléculas actúa como un grupo fluorescente, y la otra actúa como un grupo modificador de la fluorescencia. El par de transferencia de energía preferente de la presente invención comprende un grupo fluorescente y un grupo de desactivación de la invención. En esta aplicación no hay ninguna limitación en la identidad de los miembros individuales del par de transferencia de energía. Todo lo que se requiere es que, si la distancia entre los miembros individuales se altera en alguna cantidad crítica, las propiedades espectroscópicas del par de transferencia de energía en su conjunto cambien de alguna manera medible. La expresión "par de transferencia de energía" se utiliza para referirse a un grupo de moléculas que forman un complejo dentro del cual ocurre la transferencia de energía. Dichos complejos pueden incluir, por ejemplo, dos grupos fluorescentes, que pueden ser diferentes entre sí y un grupo de desactivación, dos grupos de desactivación y un grupo fluorescente, o múltiples grupos fluorescentes y múltiples grupos de desactivación. En los casos en que hay múltiples grupos fluorescentes y/o múltiples grupos de desactivación, los grupos individuales pueden ser diferentes entre sí.

Tal como se usa en el presente documento, "grupo modificador de la fluorescencia" se refiere a una molécula de la invención que puede alterar de alguna manera la emisión de fluorescencia de un grupo fluorescente. Un grupo modificador de la fluorescencia generalmente logra esto a través de un mecanismo de transferencia de energía. Dependiendo de la identidad del grupo modificador de la fluorescencia, la emisión de fluorescencia puede sufrir una serie de alteraciones, incluyendo, aunque no de forma limitativa, atenuación, desactivación completa, mejora, un cambio en la longitud de onda, un cambio en la polaridad, y un cambio en el tiempo de vida de la fluorescencia. Un ejemplo de un grupo modificador de la fluorescencia es un grupo de desactivación.

Tal como se usa en el presente documento, "grupo de desactivación" se refiere a cualquier grupo modificador de la fluorescencia de la invención que pueda atenuar, al menos parcialmente, la luz emitida por un grupo fluorescente. Esta atenuación se menciona en el presente documento como "desactivación". Por consiguiente, la iluminación del grupo fluorescente en presencia del grupo de desactivación conduce a una señal de emisión menos intensa de lo esperado, o incluso completamente ausente. La desactivación ocurre normalmente a través de la transferencia de energía entre el grupo fluorescente y el grupo de desactivación.

Tal como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" significa ADN, ARN, monocatenario, bicatenario o motivos de hibridación con alto grado de agregación, y cualquier modificación química de los mismos. Las modificaciones incluyen, aunque sin limitación, las que proporcionan grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y fluxionalidad con las bases de ligando de ácido nucleico o con el ligando de ácido nucleico en su conjunto. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, ácidos peptidonucleicos (PNA, por sus siglas en inglés), modificaciones de grupo fosfodiéster (por ejemplo, fosforotioatos, metilfosfonatos), modificaciones del azúcar en posición 2', modificaciones de pirimidina en posición 5, modificaciones de purina en posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o de 5-yodo-uracilo; modificaciones de la cadena principal, metilaciones, combinaciones inusuales de emparejamiento de bases tales como isobases, isocitidina e isoguanidina y similares. Los ácidos nucleicos también pueden incluir bases

no naturales, tales como, por ejemplo, nitroindol. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5' tales como el encapuchado con BHQ, un fluoróforo u otro resto.

5 "Péptido" se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen mediante enlaces amida, denominado, como alternativa, polipéptido. Cuando los aminoácidos son α -aminoácidos, puede utilizarse el isómero L-óptico o el isómero D-óptico. Adicionalmente, aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina también se incluyen. Los aminoácidos más frecuentes que no están codificados por genes también pueden utilizarse en la presente invención. Todos los aminoácidos utilizados en la presente invención pueden ser bien el isómero D o bien el isómero L. Generalmente, se prefieren los isómeros L. De manera adicional, otros
10 peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983).

15 "Especies bioactivas", se refiere a moléculas que, cuando se administran a un organismo, afectan a ese organismo. Las especies bioactivas ilustrativas incluyen productos farmacéuticos, plaguicidas, herbicidas, reguladores del crecimiento y similares. Las especies bioactivas abarcan moléculas pequeñas (es decir, aproximadamente <1000 daltons), oligómeros, polímeros y similares. También se incluyen ácidos nucleicos y sus análogos, péptidos y sus análogos y similares.

20 El término "alquilo" se usa en el presente documento para referirse a un radical hidrocarburo ramificado o no ramificado, saturado o insaturado, monovalente y divalente, generalmente que tiene de aproximadamente 1-30 carbonos y preferentemente, de 4-20 carbonos y más preferentemente de 6-18 carbonos. Cuando el grupo alquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono, se le denomina "alquilo inferior". Radicales alquilo adecuados incluyen, por ejemplo, estructuras que contienen uno o más grupos metileno, metino y/o metino. Las estructuras ramificadas tienen un motivo
25 de ramificación similar al *i*-propilo, *t*-butilo, *i*-butilo, 2-etilpropilo, etc. Como se usa en el presente documento, la expresión abarca "alquilos sustituidos", y "alquilo cíclico". la expresión alquilo (C₁-C₈) se refiere a un alquilo que tiene entre uno y ocho átomos de carbono.

30 "Alquilo sustituido" se refiere a alquilo como se acaba de describir que incluye uno o más sustituyentes tales como, por ejemplo, alquilo inferior, arilo, acilo, halógeno (es decir, alquilhalos, por ejemplo, CF₃), hidroxi, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, tioamido, aciloxi, ariloxi, ariloxialquilo, mercapto, tia, aza, oxo, hidrocarburos cíclicos tanto saturados como insaturados, heterociclos y similares. Estos grupos pueden estar unidos a cualquier carbono o sustituyente del resto alquilo. Adicionalmente, estos grupos pueden ser colgantes o integrales a la cadena de alquilo.

35 El término "arilo" se usa en el presente documento para referirse a un sustituyente aromático, que puede ser un solo anillo aromático o múltiples anillos aromáticos que se fusionan, se unen covalentemente o se unen a un grupo común como un resto diazo, metileno o etileno. El grupo de enlace común también puede ser un carbonilo como en la benzofenona. El(los) anillo(s) aromático(s) puede(n) incluir fenilo, naftilo, bifenilo, difenilmetilo y benzofenona entre otros. El término "arilo" abarca "arilalquilo" y "arilo sustituido".

40 "Arilo sustituido" se refiere a arilo como se acaba de describir que incluye uno o más grupos funcionales como alquilo inferior, acilo, halógeno, alquilhalos (por ejemplo, CF₃), hidroxi, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, aciloxi, fenoxi, mercapto e hidrocarburos cíclicos tanto saturados como insaturados que están fusionados con el(los) anillo(s) aromático(s), enlazados covalentemente o enlazados a un grupo común tal como un resto diazo, metileno o etileno.
45 El grupo de enlace también puede ser un carbonilo tal como en ciclohexil fenil cetona. El término "arilo sustituido" abarca "arilalquilo sustituido".

El término "arilalquilo" se usa en el presente documento para referirse a un subconjunto de "arilo" en el que el grupo arilo está unido a otro grupo por un grupo alquilo como se define en el presente documento.

50 "Arilalquilo sustituido" define un subconjunto de "arilo sustituido" en donde el grupo arilo sustituido está unido a otro grupo por un grupo alquilo como se define en el presente documento.

El término "acilo" se usa para describir un sustituyente de cetona, C(O)R, donde R es alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido como se define en el presente documento.

El término "halógeno" se usa en el presente documento para referirse a átomos de flúor, bromo, cloro y yodo.

60 El término "hidroxi" se usa en el presente documento para referirse al grupo -OH.

El término "amino" se usa para -NRR', donde R y R' son independientemente H, alquilo, arilo o análogos sustituidos de los mismos. "Amino" abarca "alquilamino" que denota aminas secundarias y terciarias y "acilamino" que describe el grupo RC(O)NR'.

65 El término "alcoxi" se usa en el presente documento para referirse al grupo -OR, donde R es alquilo, o un análogo sustituido del mismo. Los radicales alcoxi adecuados incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, t-butoxi, etc.

Como se usa en el presente documento, el término "ariloxi" denota grupos aromáticos que están unidos a otro grupo directamente a través de un átomo de oxígeno. Este término abarca restos de "ariloxi sustituido" en los que el grupo aromático está sustituido como se describe anteriormente por "arilo sustituido". Los restos ariloxi ejemplares incluyen fenoxi, fenoxi sustituido, benciloxi, fenetiloxi, etc.

Como se usa en el presente documento "ariloxialquilo" define grupos aromáticos unidos, a través de un átomo de oxígeno, a un grupo alquilo, como se define en el presente documento. El término "ariloxialquilo" abarca restos de "ariloxialquilo sustituido" en los que el grupo aromático está sustituido como se describe para "arilo sustituido".

Como se usa en el presente documento, el término "mercapto" define fracciones de la estructura general $-S-R$ en donde R es H, alquilo, arilo o heterocíclico como se describe en el presente documento.

La expresión "hidrocarburo cíclico saturado" denota grupos, tales como el ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, etc. y análogos sustituidos de estas estructuras. Estos hidrocarburos cíclicos pueden ser estructuras de uno o varios anillos.

La expresión "hidrocarburo cíclico insaturado" se usa para describir un grupo no aromático monovalente con al menos un doble enlace, como ciclopenteno, ciclohexeno, etc. y análogos sustituidos de los mismos. Estos hidrocarburos cíclicos pueden ser estructuras de uno o varios anillos.

El término "heteroarilo", como se usa en el presente documento, se refiere a anillos aromáticos en los que uno o más átomos de carbono del(de los) anillo(s) aromático(s) se reemplazan por un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre. Heteroarilo se refiere a estructuras que pueden ser un solo anillo aromático, anillo(s) aromático(s) múltiple(s) o uno o más anillos aromáticos acoplados a uno o más anillos no aromáticos. En estructuras que tienen múltiples anillos, los anillos se pueden fusionar entre sí, enlazarse covalentemente o enlazarse a un grupo común tal como un resto diazo, metileno o etileno. El grupo de unión común también puede ser un carbonilo como en la fenilpiridilcetona. Como se usa en el presente documento, anillos como el tiofeno, piridina, isoxazol, ftalimida, pirazol, indol, furano, etc. o análogos benzocondensados de estos anillos se definen mediante el término "heteroarilo".

"Heteroarilalquilo" define un subconjunto de "heteroarilo" en el que un grupo alquilo, como se define en el presente documento, une el grupo heteroarilo a otro grupo.

"Heteroarilo sustituido" se refiere a heteroarilo como se acaba de describir, en donde el núcleo de heteroarilo está sustituido con uno o más grupos funcionales tales como alquilo inferior, acilo, halógeno, alquilhalos (por ejemplo, CF_3), hidroxilo, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, aciloxi, mercapto, etc. Por lo tanto, análogos sustituidos de anillos heteroaromáticos tales como tiofeno, piridina, isoxazol, ftalimida, pirazol, indol, furano, etc. o análogos benzocondensados de estos anillos se definen mediante la expresión "heteroarilo sustituido".

"Heteroarilalquilo sustituido" se refiere a un subconjunto de "heteroarilo sustituido" como se describe anteriormente en el que un grupo alquilo, como se define en el presente documento, une el grupo heteroarilo a otro grupo.

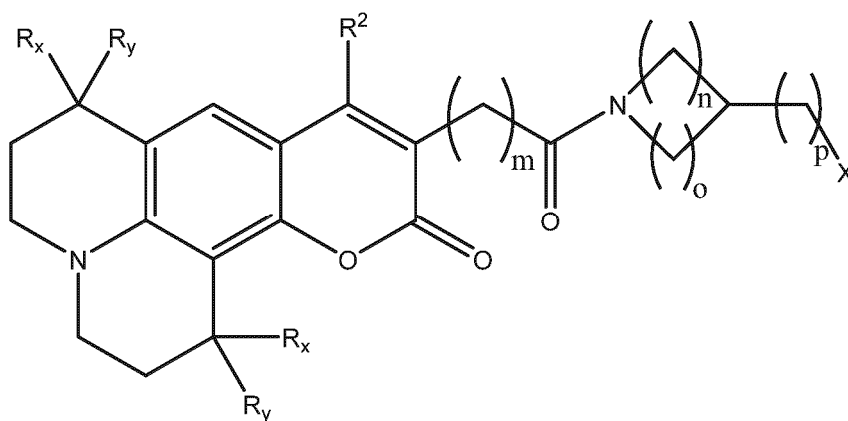
El término "heterocíclico" se usa en el presente documento para describir un grupo no aromático monovalente saturado o insaturado que tiene un solo anillo o múltiples anillos condensados de 1 a 12 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, azufre u oxígeno dentro del anillo. Tales heterociclos son, por ejemplo, tetrahidrofurano, morfina, piperidina, pirrolidina, etc.

El término "heterocíclico sustituido" tal como se usa en el presente documento, describe un subconjunto de "heterocíclico" en donde el núcleo del heterociclo está sustituido con uno o más grupos funcionales como alquilo inferior, acilo, halógeno, alquilhalos (por ejemplo, CF_3), hidroxilo, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, aciloxi, mercapto, etc.

El término "heterocicloalquilo" define un subconjunto de "heterocíclico" en donde un grupo alquilo, como se define en el presente documento, une el grupo heterocíclico a otro grupo

Compuestos

En un aspecto, la presente invención se refiere a compuestos. Un conjunto de compuestos está representado por la Estructura 15, a continuación:



Estructura 15

5 donde

m es 1, 2 o 3;

n es 1 o 2;

o es 1 o 2;

10 p es 0, 1, 2 o 3;

R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃;

X es -OH, -NH₂, -SH, -OR¹¹, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -OC(O)R¹⁵, -NHC(O)R¹⁶, -SC(O)R¹⁷, -C(O)OH, -C(O)OR¹⁸, -C(O)NHR¹⁹, -C(O)NR²⁰R²¹, -N₃;

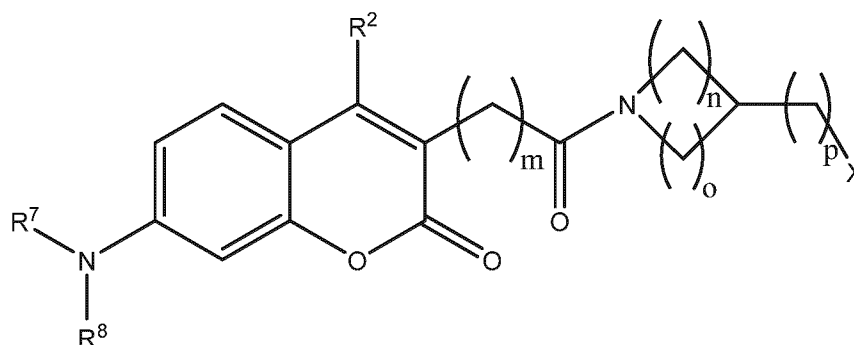
15 R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ se seleccionan independientemente entre alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido, -CH₂CH(OH)CH₂(OH), -CH(CH₂OH)₂, -CH₂CCH, -(CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OH donde a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, -P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, -P(O)(O-)-Oligonucleótido, -(CH₂)_bCC-Nucleósido, -(CH₂)_bCC-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNH-Nucleósido, -(CH₂)_bNH-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], donde b es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

20 EWG es un grupo aceptor de electrones;

R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo;

R_x y R_y son independientemente H o CH₃.

25 Otro conjunto de compuestos está representado por la Estructura 16, a continuación:



Estructura 16

30

donde

m es 1, 2 o 3;

n es 1 o 2;

35 o es 1 o 2;

p es 0, 1, 2 o 3;

R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃;

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente entre H, alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido o R⁷ y R⁸ juntos

forman un heterociclo de cinco, seis o siete miembros;

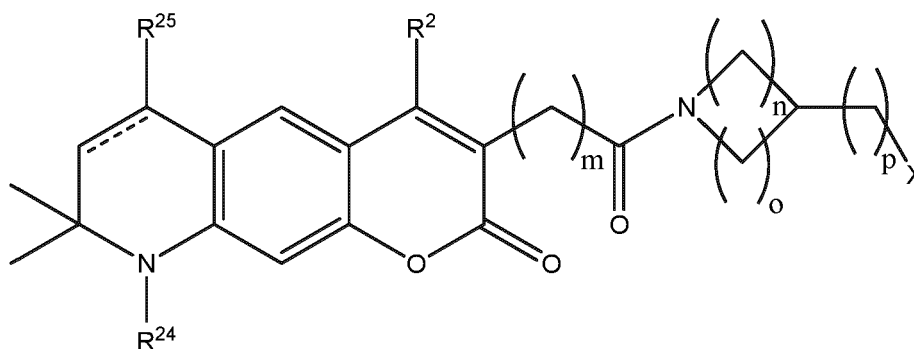
X es -OH, -NH₂, -SH, -OR¹¹, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -OC(O)R¹⁵, -NHC(O)R¹⁶, -SC(O)R¹⁷, -C(O)OH, -C(O)OR¹⁸, -C(O)NHR¹⁹, -C(O)NR²⁰R²¹, -N₃;

R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ se seleccionan independientemente entre alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido, -CH₂CH(OH)CH₂(OH), -CH(CH₂OH)₂, -CH₂CCH, -(CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OH donde a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, -P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, -P(O)(O-)-Oligonucleótido, -(CH₂)_bCC-Nucleósido, -(CH₂)_bCC-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNH-Nucleósido, -(CH₂)_bNH-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], donde b es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

EWG es un grupo aceptor de electrones;

R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo.

Otro conjunto de compuestos está representado por la Estructura 17, a continuación:



Estructura 17

donde

m es 1, 2 o 3;

n es 1 o 2;

o es 1 o 2;

p es 0, 1, 2 o 3;

R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃; la línea discontinua representa un doble enlace opcional;

X es -OH, -NH₂, -SH, -OR¹¹, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -OC(O)R¹⁵, -NHC(O)R¹⁶, -SC(O)R¹⁷, -C(O)OH, -C(O)OR¹⁸, -C(O)NHR¹⁹, -C(O)NR²⁰R²¹, -N₃;

R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ se seleccionan independientemente entre alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido, -CH₂CH(OH)CH₂(OH), -CH(CH₂OH)₂, -CH₂CCH, -(CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OH donde a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, -P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, -P(O)(O-)-Oligonucleótido, -(CH₂)_bCC-Nucleósido, -(CH₂)_bCC-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNH-Nucleósido, -(CH₂)_bNH-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], donde b es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

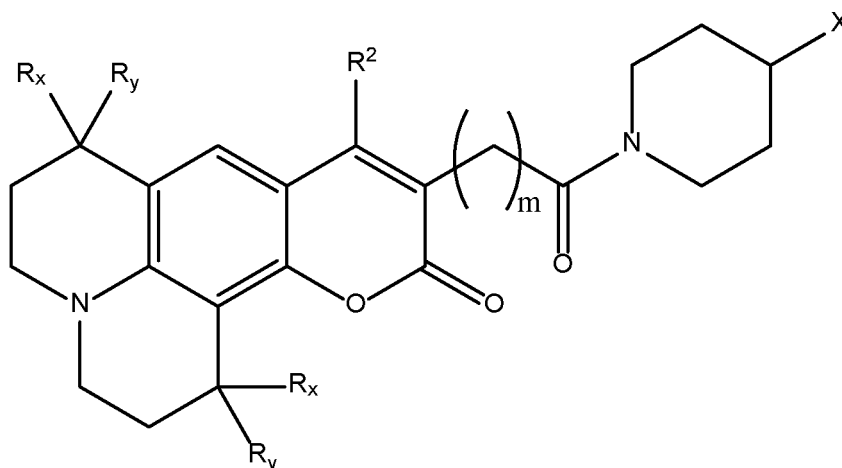
EWG es un grupo aceptor de electrones;

R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo;

R²⁴ es alquilo (C₁-C₈) o alquilo (C₁-C₈) sustituido;

R²⁵ es alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido o CH₂SO₃H.

Otro conjunto de compuestos está representado por la Estructura 32, a continuación:



Estructura 32

5 donde

m es 1, 2 o 3;

R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃;

10 X es -OH, -NH₂, -SH, -OR¹¹, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -OC(O)R¹⁵, -NHC(O)R¹⁶, -SC(O)R¹⁷, -C(O)OH, -C(O)OR¹⁸, -C(O)NHR¹⁹, -C(O)NR²⁰R²¹, -N₃;

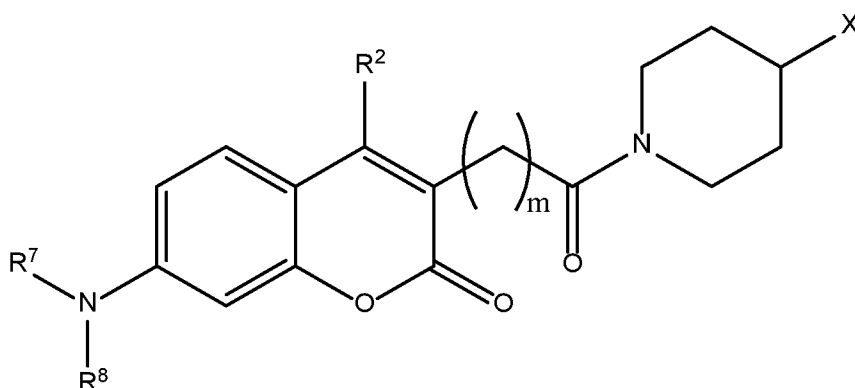
R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ se seleccionan independientemente entre alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido, -CH₂CH(OH)CH₂(OH), -CH(CH₂OH)₂, -CH₂CCH, -(CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OH donde a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, -P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, -P(O)(O-)-Oligonucleótido, -(CH₂)_bCC-Nucleósido, -(CH₂)_bCC-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNH-Nucleósido, -(CH₂)_bNH-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], donde b es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

EWG es un grupo aceptor de electrones;

R_x y R_y son independientemente H o CH₃;

20 R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo.

Otro conjunto de compuestos está representado por la Estructura 33, a continuación:



Estructura 33

donde

30 m es 1, 2 o 3;

R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃;

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente entre H, alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido o R⁷ y R⁸ juntos forman un heterociclo de cinco, seis o siete miembros;

35 X es -OH, -NH₂, -SH, -OR¹¹, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -OC(O)R¹⁵, -NHC(O)R¹⁶, -SC(O)R¹⁷, -C(O)OH, -C(O)OR¹⁸, -C(O)NHR¹⁹, -C(O)NR²⁰R²¹, -N₃;

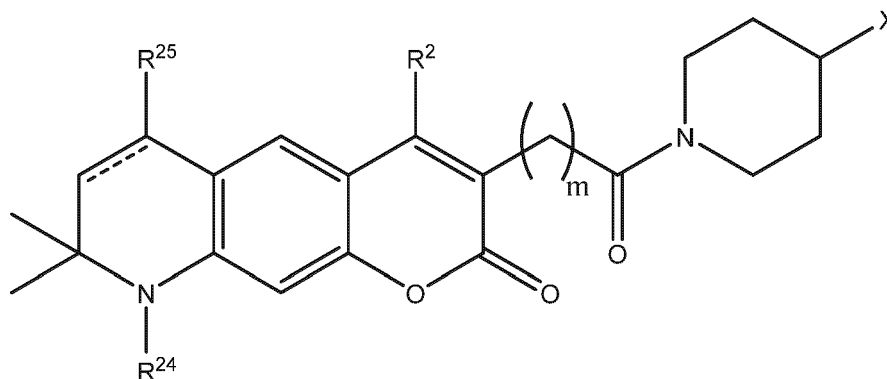
R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ se seleccionan independientemente entre alquilo (C₁-C₈), alquilo

(C₁-C₈) sustituido, -CH₂CH(OH)CH₂(OH), -CH(CH₂OH)₂, -CH₂CCH, -(CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OH donde a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, -P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, -P(O)(O-)-Oligonucleótido, -(CH₂)_bCC-Nucleósido, -(CH₂)_bCC-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNH-Nucleósido, -(CH₂)_bNH-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], donde b es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

EWG es un grupo aceptor de electrones;

R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo.

Otro conjunto de compuestos está representado por la Estructura 34, a continuación:



Estructura 34

donde

m es 1, 2 o 3;

R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃;

X es -OH, -NH₂, -SH, -OR¹¹, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -OC(O)R¹⁵, -NHC(O)R¹⁶, -SC(O)R¹⁷, -C(O)OH, -C(O)OR¹⁸, -C(O)NHR¹⁹, -C(O)NR²⁰R²¹, -N₃;

la línea discontinua representa un doble enlace opcional;

R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ se seleccionan independientemente entre alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido, -CH₂CH(OH)CH₂(OH), -CH(CH₂OH)₂, -CH₂CCH, -(CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OH donde a es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, -P(NR²²R²³)OCH₂CH₂-EWG, -P(O)(O-)-Oligonucleótido, -(CH₂)_bCC-Nucleósido, -(CH₂)_bCC-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNH-Nucleósido, -(CH₂)_bNH-[Nucleósido Trifosfato], -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-Nucleósido, -(CH₂)_bNHC(O)(CH₂)_b-[Nucleósido Trifosfato], donde b es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

EWG es un grupo aceptor de electrones;

R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂ o R²² y R²³ juntos forman un heterociclo;

R²⁴ es alquilo (C₁-C₈) o alquilo (C₁-C₈) sustituido;

R²⁵ es alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido o CH₂SO₃H.

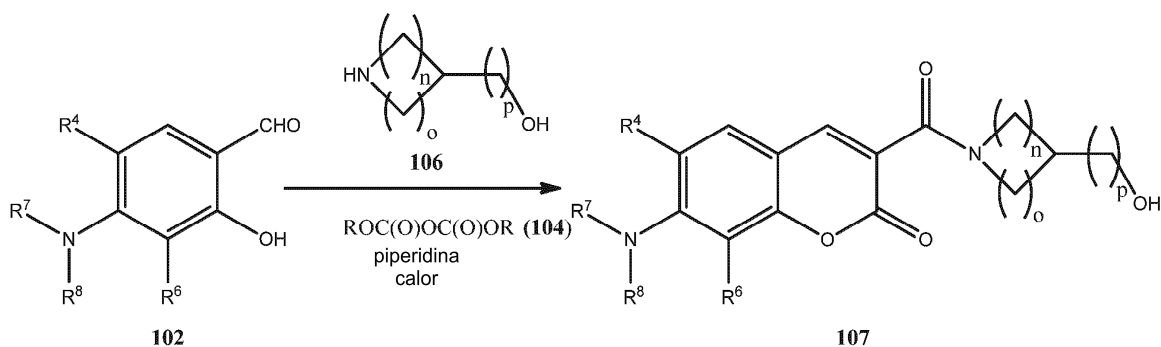
Síntesis de compuestos

A. 3-Carboxamidas de cumarina

Las 3-carboxamidas de cumarina de fórmula 107 se preparan por reacción de un 4-amino-2-hidroxibenzaldehído 102 adecuadamente sustituido con un malonato de dialquilo 104 y un aminoalcohol 106 adecuadamente sustituido en presencia de un catalizador tal como piperidina.

Esquema de reacción 1

Preparación de 3-Carboxamidas de cumarina

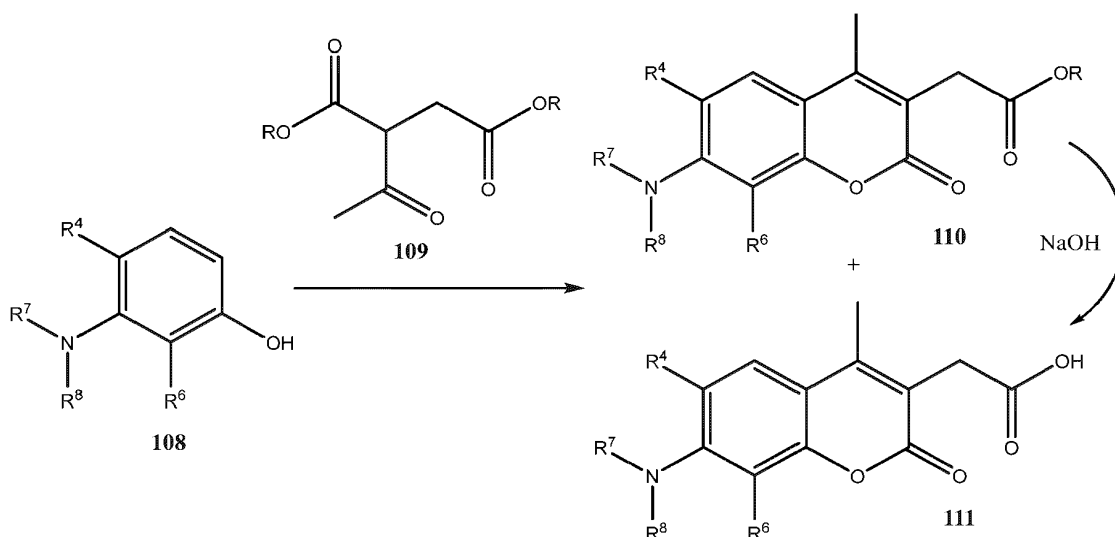


B. 3-Acetamidas de cumarina

- 5 La reacción de un 3-aminofenol 108 adecuadamente sustituido con un succinato de acetildialquilo 109 en presencia de un catalizador adecuado como ZnCl_2 , H_2SO_4 o TFA produce ésteres 3-acéticos de cumarina 110 y ácidos 3-acéticos de cumarina 111. Los ésteres 3-acéticos de cumarina 110 se convierten en ácidos 3-acéticos de cumarina 111 mediante hidrólisis.

10 Esquema de reacción 2

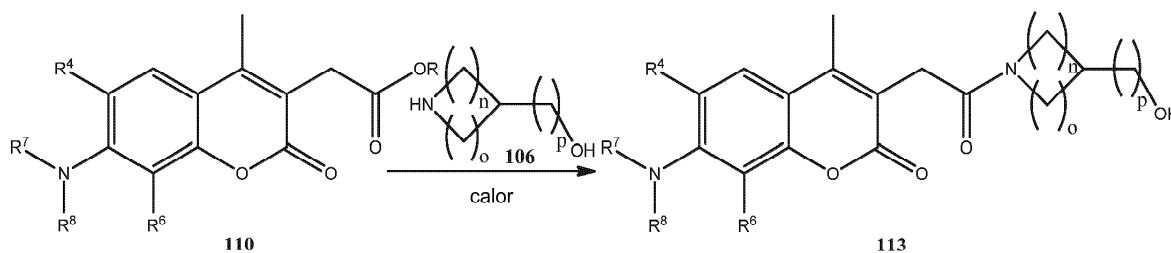
Preparación de ésteres y ácidos cumarin 3-acéticos



- 15 Las 3-acetamidas de cumarina se pueden preparar por múltiples métodos a partir de los ésteres cumarin 3-acéticos 110 o los ácidos cumarin 3-acéticos 111. En el método A, el éster 3-acético de cumarina 110 se hace reaccionar directamente con un aminoalcohol 106 adecuadamente sustituido que contiene un resto carbocíclico para producir la 3-acetamida de cumarina 113.

20 Esquema de reacción 3

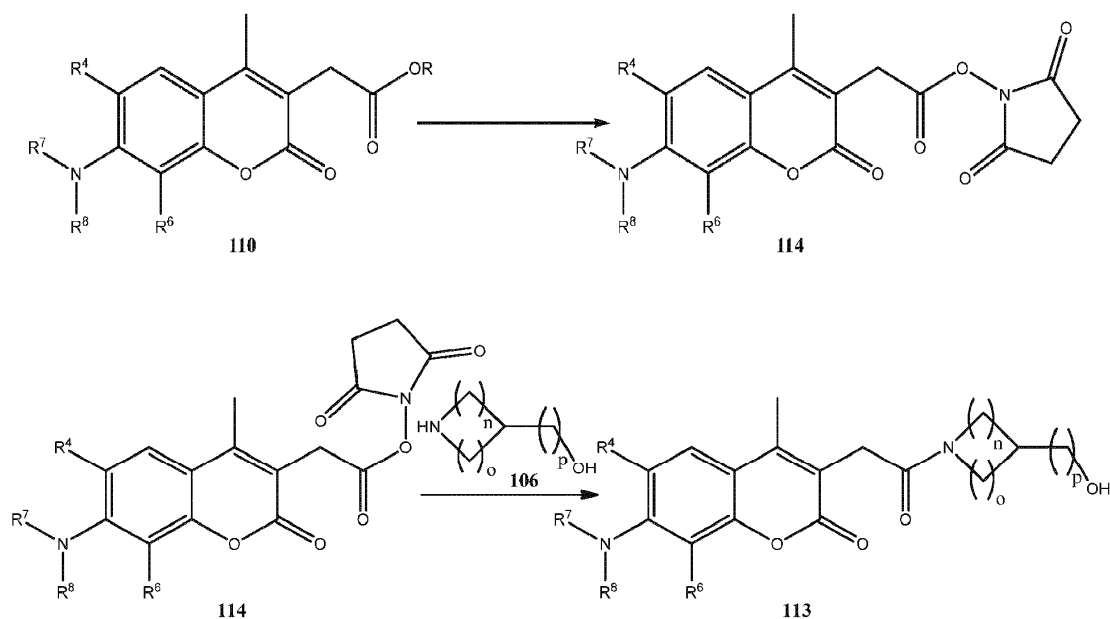
Preparación de 3-Acetamidas de cumarina: Método A



En el método B, el ácido cumarin 3-acético 111 se convierte en el éster NHS 114 a través de NHS y un agente de acoplamiento, tal como DCC, EDCI, BOP o con un reactivo para introducir directamente un resto NHS como DSC (carbonato de disuccinimido). El éster NHS 114 se hace reaccionar con un aminoalcohol 106 adecuadamente sustituido que contiene un resto carbocíclico para producir la 3-acetamida de cumarina 113.

Esquema de reacción 4

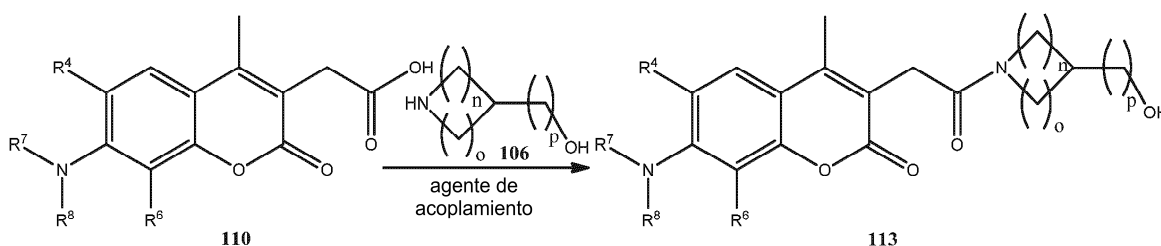
Preparación de 3-acetamidas de cumarina: Método B



En el método C, el ácido cumarin 3-acético 111 se acopla directamente con un aminoalcohol 106 adecuadamente sustituido que contiene un resto carbocíclico mediante el uso de un agente de acoplamiento, tal como DCC, EDCI o BOP para producir la 3-acetamida de cumarina 113.

Esquema de reacción 5

Preparación de 3-acetamidas de cumarina: Método C

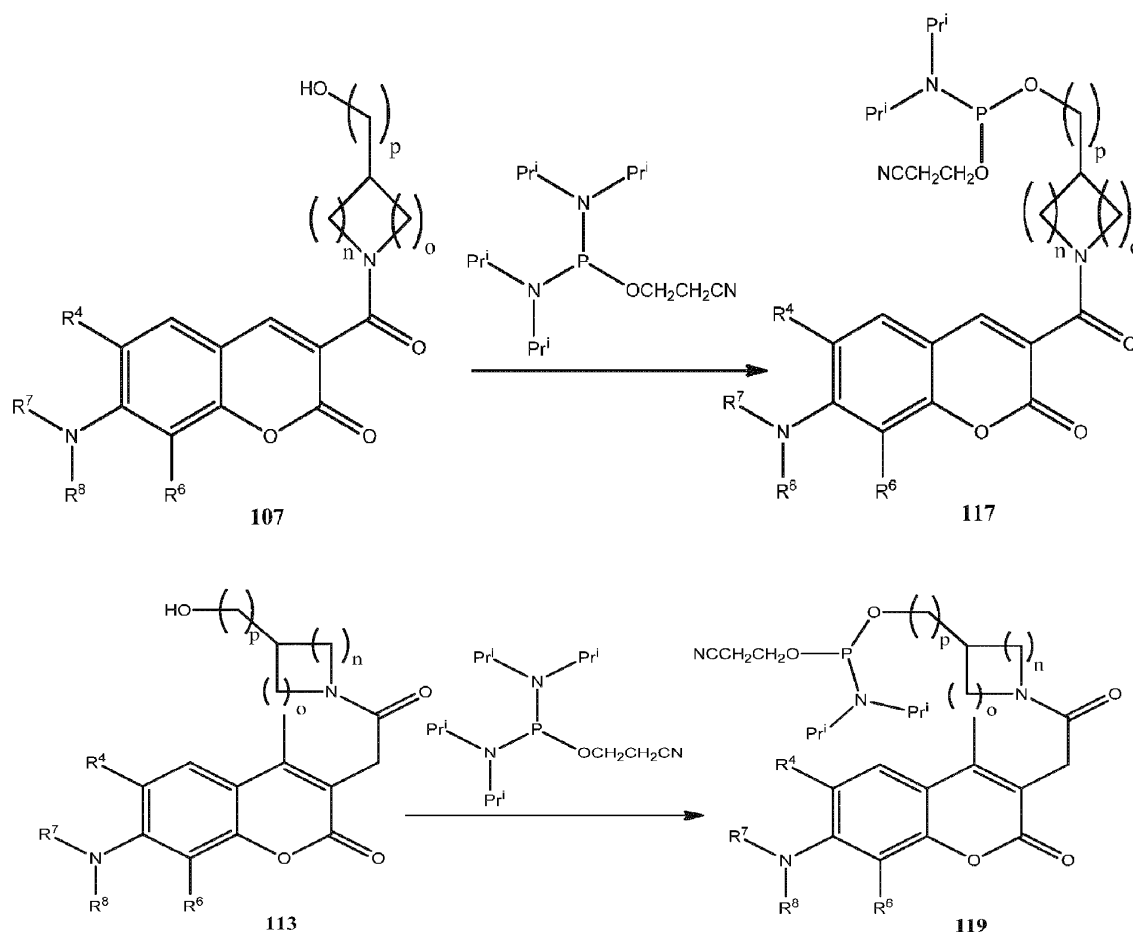


C. Fosforamiditas de cumarina

Los derivados de cumarina 107 o 113 se convierten en fosforamiditas de cumarina por reacción con 3-((bis(diisopropilamino)fosfino)oxi)propanonitrilo en presencia de un activador como 1H-tetrazol o etiltiotetrazol.

Esquema de reacción 7

Preparación de fosforamiditas de cumarina a partir de derivados de 3-carboxamida de cumarina y 3-acetamida de cumarina



5 Otro conjunto de compuestos proporcionados por la presente invención se encuentra en las sondas. Las sondas incluyen fluoróforos a base de cumarina - Estructuras 15, 16, 17, 32, 33 y 34 anteriores - que se conjugan, por ejemplo, con especies diana (por ejemplo, receptor, enzima, etc.) un ligando para una especie diana (por ejemplo, ácido nucleico, péptido, etc.), una molécula pequeña (por ejemplo, fármaco, pesticida, etc.) y similares. Las sondas pueden utilizarse para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*.

10 Los fluoróforos de la presente invención son robustos en una variedad de condiciones sintéticas utilizadas para unirlos a una molécula portadora. Por ejemplo, muchos de los fluoróforos derivados de cumarina sobreviven a las condiciones necesarias para la síntesis automatizada de ácidos nucleicos sin sufrir ningún grado sustancial de degradación o alteración. En cambio, muchos de los derivados de cumarina reconocidos en la técnica requieren condiciones especiales para ensamblar la molécula portadora a la que están unidos, o tienen que ser unidos después de la finalización de la síntesis de la molécula portadora. La complejidad adicional de la síntesis de una sonda aumenta tanto la duración de la síntesis como su coste.

20 En ciertos casos, cuando los fluoróforos de la presente invención se incluyen en la síntesis automatizada de ácidos nucleicos, los fluoróforos se degradan o alteran en menos del 10,0 por ciento de los ácidos nucleicos del producto. En otros casos, los fluoróforos se degradan o alteran en menos del 5,0 por ciento, 2,5 por ciento, 1,0 por ciento o 0,5 por ciento de los ácidos nucleicos del producto.

25 Otro conjunto de compuestos proporcionados por la presente invención se encuentra en las sondas de molécula pequeña. Los fluoróforos a base de cumarina de la presente invención pueden utilizarse como componentes de sondas de molécula pequeña. En un diseño preferido, una sonda de molécula pequeña incluye un fluoróforo de acuerdo con la presente invención, o un precursor de dicha molécula, y un desactivador. En una realización a modo de ejemplo, un agente, tal como una enzima, escinde el desactivador, el fluoróforo o ambos de la molécula pequeña que genera fluorescencia en el sistema objeto de investigación (véase, por ejemplo, Zlokarnik *et al.*, Science 279: 84-88 (1998)).

30 Otro conjunto de compuestos proporcionados por la presente invención se encuentra en las sondas de ácido nucleico. Los fluoróforos a base de cumarina de la presente invención son útiles junto con las sondas de ácidos nucleicos, y pueden utilizarse como componentes de agentes de detección en una variedad de estrategias de amplificación/cuantificación de ADN que incluyen, por ejemplo, ensayo de 5'-nucleasa, amplificación por

desplazamiento de cadena (SDA, por sus siglas en inglés), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA, por sus siglas en inglés), amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés), así como para la detección directa de dianas en ensayos en fase de solución o en fase sólida (por ejemplo, matriz). Es más, los ácidos nucleicos derivados de fluoróforos pueden utilizarse en sondas de prácticamente cualquier formato, incluyendo, por ejemplo, sondas con formato seleccionado de balizas moleculares, Scorpion Probes™, Sunrise Probes™, sondas asistidas conformacionalmente, sondas Light up, sondas de detección Invader y sondas TaqMan™. Véanse, por ejemplo, Cardullo, R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8790-8794 (1988); Dexter, D. L., J. Chem. Physics, 21:836-850 (1953); Hochstrasser, R. A., *et al.*, Biophysical Chemistry, 45:133-141 (1992); Selvin, P., Methods in Enzymology, 246:300-334 (1995); Steinberg, I., Ann. Rev. Biochem., 40:83-114 (1971); Stryer, L., Ann. Rev. Biochem., 47:819-846 (1978); Wang, G., *et al.*, Tetrahedron Letters, 31:6493-6496 (1990); Wang, Y., *et al.*, Anal. Chem., 67:1197-1203 (1995); Debouck, C., *et al.*, en el suplemento de Nature Genetics, 21:48-50 (1999); Rehman, F. N., *et al.*, Nucleic Acids Research, 27:649-655 (1999); Cooper, J. P., *et al.*, Biochemistry, 29:9261-9268 (1990); Gibson, E. M., *et al.*, Genome Methods, 6:995-1001 (1996); Hochstrasser, R. A., *et al.*, Biophysical Chemistry, 45:133-141 (1992); Holland, P. M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 88:7276-7289 (1991); Lee, L. G., *et al.*, Nucleic Acids Resch., 21:3761-3766 (1993); Livak, K. J., *et al.*, PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Press (1995); Vamosi, G., *et al.*, Biophysical Journal, 71:972-994 (1996); Wittwer, C. T., *et al.*, Biotechniques, 22:176-181 (1997); Wittwer, C. T., *et al.*, Biotechniques, 22:130-38 (1997); Giesendorf, B. A. J., *et al.*, Clinical Chemistry, 44:482-486 (1998); Kostrikis, L. G., *et al.*, Science, 279:1228-1229 (1998); Matsuo, T., Biochemica et Biophysica Acta, 1379:178-184 (1998); Piatek, A. S., *et al.*, Nature Biotechnology, 16:359-363 (1998); Schofield, P., *et al.*, Appl. Environ. Microbiology, 63:1143-1147 (1997); Tyagi S., *et al.*, Nature Biotechnology, 16:49-53 (1998); Tyagi, S., *et al.*, Nature Biotechnology, 14:303-308 (1996); Nazarenko, I. A., *et al.*, Nucleic Acids Research, 25:2516-2521 (1997); Uehara, H., *et al.*, Biotechniques, 26:552-558 (1999); D. Whitcombe, *et al.*, Nature Biotechnology, 17:804-807 (1999); Lyamichev, V., *et al.*, Nature Biotechnology, 17:292 (1999); Daubendiek, *et al.*, Nature Biotechnology, 15:273-277 (1997); Lizardi, P. M., *et al.*, Nature Genetics, 19:225-232 (1998); Walker, G., *et al.*, Nucleic Acids Res., 20:1691-1696 (1992); Walker, G. T., *et al.*, Clinical Chemistry, 42:9-13 (1996); y Compton, J., Nature, 350:91-92 (1991).

Puede utilizarse una sonda que lleve tanto un desactivador como un fluoróforo a base de cumarina de acuerdo con la presente invención o, como alternativa, uno o más de los ácidos nucleicos pueden ser marcados individualmente con un desactivador o fluoróforo. Cuando un ácido nucleico marcado individualmente con un fluoróforo de acuerdo con la presente invención es la sonda, la interacción entre los ácidos nucleicos primero y segundo puede detectarse observando la interacción entre el fluoróforo y el ácido nucleico o, más preferentemente, la desactivación de la fluorescencia del fluoróforo por el desactivador unido al segundo ácido nucleico.

Además de su utilidad general en las sondas diseñadas para investigar la amplificación, detección y cuantificación del ácido nucleico, los presentes fluoróforos pueden utilizarse en prácticamente cualquier formato de sonda de ácido nucleico conocido en la actualidad o descubierto posteriormente. Por ejemplo, los fluoróforos a base de cumarina de la invención pueden incorporarse a motivos de sonda, tales como sondas Taqman™ (Held *et al.*, Genome Res. 6: 986-994 (1996), Holland *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280 (1991), Lee *et al.*, Nucleic Acids Res. 21: 3761-3766 (1993)), balizas moleculares (Tyagi *et al.*, Nature Biotechnology 14:303-308 (1996), Jayasena *et al.*, patente de EE.UU. N.º 5.989.823, publicada el 23 de noviembre de 1999), sondas Scorpion (Whitcomb *et al.*, Nature Biotechnology 17: 804-807 (1999)), sondas Sunrise (Nazarenko *et al.*, Nucleic Acids Res. 25: 2516-2521 (1997)), sondas asistidas conformacionalmente (Cook, R., solicitud provisional de EE.UU. 60/138.376, presentada el 9 de junio de 1999), sondas Light up basadas en ácidos peptidónucleicos (PNA) (Kubista *et al.*, documento WO 97/45539, diciembre de 1997), tintes de ADN específicos bicatenarios (Higuchi *et al.*, Bio/Technology 10: 413-417 (1992), Wittwer *et al.*, BioTechniques 22: 130-138 (1997)) y similares. Estos y otros motivos de sonda con los que se pueden utilizar los presentes desactivadores se revisan en NONISOTOPIC DNA PROBE TECHNIQUES, Academic Press, Inc. 1992.

Los ácidos nucleicos para su uso en las sondas de la invención pueden ser de cualquier tamaño adecuado, y están preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nucleótidos y más preferentemente aún, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos. La secuencia y la longitud precisas de una sonda de ácido nucleico de la invención dependen, en parte, de la naturaleza del polinucleótido diana al que se une. El lugar de unión y la longitud se pueden variar para conseguir las propiedades de recocido y fusión adecuadas para una realización particular. En muchas referencias reconocidas en la técnica se puede encontrar una guía para realizar tales elecciones de diseño.

Preferentemente, el nucleótido 3'-terminal de la sonda de ácido nucleico se bloquea o no puede extenderse por una polimerasa de ácido nucleico. Dicho bloqueo se lleva a cabo de manera conveniente mediante la unión de un resto donante o aceptor a la posición 3' terminal de la sonda de ácido nucleico, directamente o mediante un resto de unión.

El ácido nucleico puede comprender ADN, ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos. Tanto la sonda como el ácido nucleico diana pueden estar presentes como una sola hebra, dúplex, tríplex, etc. Asimismo, el ácido nucleico puede modificarse en el resto base, resto de azúcar o la cadena principal de fosfato con otros grupos, tales como etiquetas radiactivas, aglutinantes del surco menor, agentes intercalantes, restos donantes y/o aceptores y similares.

Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender al menos un resto de base modificado que se selecciona entre el

grupo que incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N.sup.2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, nitroindol y 2,6-diaminopurina.

En otra realización, el ácido nucleico comprende al menos un resto de azúcar modificado seleccionado entre el grupo que incluye, pero no se limita a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

En otra realización más, el ácido nucleico comprende al menos un esqueleto de fosfato modificado seleccionado entre el grupo que incluye, pero no se limita a, un híbrido de ácido nucleico peptídico, un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforoamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un alquilfosfotriéster y un formacetal o análogo del mismo.

Los ácidos nucleicos unidos a fosfodiéster de la invención se pueden sintetizar mediante métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como los disponibles comercialmente de P.E. Biosystems, etc.) usando químicas de amidita disponibles comercialmente. Los ácidos nucleicos que llevan grupos de enlace fosfodiéster modificados pueden sintetizarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de fosforotioato pueden sintetizarse mediante el método de Stein *et al.* (Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988)), los ácidos nucleicos de metilfosfonato se pueden preparar mediante el uso de soportes de polímero de vidrio de poro controlado (Sarin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451 (1988)). Otros métodos para sintetizar ácidos nucleicos unidos tanto a fosfodiéster como a fosfodiéster modificado serán evidentes para los expertos en la materia.

Las sondas de ácido nucleico de la invención se pueden sintetizar mediante una serie de enfoques, por ejemplo, Ozaki *et al.*, Nucleic Acids Research, 20: 5205-5214 (1992); Agrawal *et al.*, Nucleic Acids Research, 18: 5419-5423 (1990); o similares. Las sondas de ácido nucleico de la invención se sintetizan convenientemente en un sintetizador de ADN automatizado, por ejemplo, un sintetizador de ADN/ARN modelo 392 o 394 de P.E. Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.), usando químicas estándar, tal como la química de fosforamidita (véase, por ejemplo, desvelado en las siguientes referencias, Beaucage *et al.*, Tetrahedron, 48: 2223-2311 (1992); Molko *et al.*, Pat. de Estados Unidos n.º 4.980.460; Koster *et al.*, Pat. de Estados Unidos n.º 4.725.677; Caruthers *et al.*, las Patentes de EE.UU. n.º 4.415.732; 4.458.066 y 4.973.679. También pueden emplearse químicas alternativas que den como resultado grupos principales no naturales, tales como fosforotioato, fosforamidato y similares.

Cuando los ácidos nucleicos se sintetizan usando un sintetizador de ácidos nucleicos automatizado, los restos donador y aceptor se introducen preferentemente durante la síntesis automatizada. Alternativamente, uno o más de estos restos pueden introducirse antes o después de que haya comenzado el procedimiento de síntesis automatizado. Por ejemplo, se pueden introducir grupos donantes y/o aceptores en el extremo 3' usando un soporte sólido modificado con el(los) grupo(s) deseado(s). Adicionalmente, los grupos donantes y/o aceptores se pueden introducir en el extremo 5', por ejemplo, mediante un derivado del grupo que incluye una fosforamidita. En otra realización ilustrativa, uno o más de los grupos donantes y/o aceptores se introducen después de que se complete la síntesis automatizada.

En las sondas doblemente marcadas, el fluoróforo está preferentemente separado del extintor por al menos aproximadamente 10 nucleótidos, y más preferentemente por al menos aproximadamente 15 nucleótidos. El resto donante se une preferentemente a los nucleótidos terminales 3' o 5' de la sonda. El fluoróforo también se une preferentemente a los nucleótidos terminales 3' o 5' de la sonda. Más preferentemente, los restos donante y aceptor se unen a los nucleótidos terminales 3' y 5' o 5' y 3' de la sonda, respectivamente, aunque también es útil la colocación interna.

Una vez que se sintetiza el ácido nucleico deseado, se escinde preferiblemente del soporte sólido sobre el que se sintetizó y se trató, mediante métodos conocidos en la técnica, para retirar cualquier grupo protector presente (por ejemplo, 60 °C, 5 h, amoníaco concentrado). En aquellas realizaciones en las que se une un grupo sensible a bases a los ácidos nucleicos (por ejemplo, TAMRA), la desprotección usará preferentemente condiciones más suaves (por ejemplo, *tert*-butilamina/agua 1:3, 8 horas, 70 °C). La desprotección en estas condiciones se ve facilitada por el uso de amiditas de desprotección rápida (por ejemplo, dC-acetilo, dG-dmf).

Después de la escisión del soporte y la desprotección, el ácido nucleico se purifica mediante cualquier método conocido en la técnica, incluidas la cromatografía, la extracción y la purificación en gel. En una realización preferida, el ácido nucleico se purifica mediante HPLC. La concentración y pureza del ácido nucleico aislado se determina preferentemente midiendo la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro.

Otro conjunto de compuestos proporcionado por la presente invención son las sondas peptídicas. Los péptidos,

proteínas y ácidos nucleicos peptídicos que están marcados con un fluoróforo de la presente invención y un inhibidor pueden usarse en ensayos enzimáticos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Un conjunto de materiales proporcionados por la presente invención son fluoróforos a base de cumarina inmovilizados en un soporte sólido. Los fluoróforos de la presente invención se pueden inmovilizar sustancialmente en cualquier polímero, biomolécula y material sólido o semisólido que tenga cualquier configuración útil. Asimismo, cualquier conjugado que comprenda uno o más fluoróforos puede inmovilizarse de manera similar. Cuando el soporte es sólido o semisólido, los ejemplos de tipos preferidos de soportes para la inmovilización de la sonda de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan, vidrio de poro controlado, placas de vidrio, poliestireno, perlas de poliestireno recubiertas de avidina, celulosa, nailon, gel de acrilamida y dextrano activado. Estos soportes sólidos son los preferidos debido a su estabilidad química, facilidad de funcionalización y área superficial bien definida. Los soportes sólidos tales como vidrio de poro controlado (CPG, 500 angstroms, 1000 angstroms) y poliestireno altamente reticulado que no se hincha (1000 angstroms) son particularmente preferidos.

De acuerdo con la presente invención, la superficie de un soporte sólido se funcionaliza con un fluoróforo de la invención o una especie que incluye un fluoróforo de la invención. Para mayor claridad de ilustración, la siguiente discusión se centra en unir un fluoróforo reactivo a un soporte sólido. La siguiente discusión también es ampliamente relevante para unir una especie que incluye dentro de su estructura un fluoróforo reactivo a un soporte sólido, y la unión de tales especies y fluoróforos reactivos a otras moléculas y estructuras.

Los fluoróforos se unen preferentemente a un soporte sólido formando un enlace entre un grupo reactivo en el fluoróforo y un grupo reactivo en la superficie del soporte sólido o un conector unido al soporte sólido, derivatizando así el soporte sólido con uno o más fluoróforos. Los ejemplos no limitantes de grupos reactivos incluyen: aminas, grupos hidroxilo, ácidos carboxílicos, derivados de ácidos carboxílicos, alquenos, sulfhidrilos, siloxanos, etc.

Un conjunto de compuestos proporcionados por la presente invención son las sondas de captura de ácidos nucleicos. En una realización, un ácido nucleico inmovilizado que comprende un fluoróforo basado en cumarina de acuerdo con la presente invención se usa como sonda de captura. La sonda de ácido nucleico se puede unir directamente a un soporte sólido, por ejemplo mediante la unión del nucleótido terminal 3' o 5' de la sonda al soporte sólido. Más preferentemente, sin embargo, la sonda está unida al soporte sólido por un conector. El conector sirve para distanciar la sonda del soporte sólido. El conector es más preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 átomos de longitud, más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 átomos de longitud.

En otra realización preferida más, el soporte sólido también se usa como soporte de síntesis en la preparación de la sonda. La longitud y la estabilidad química del conector entre el soporte sólido y la primera unidad 3' del ácido nucleico juegan un papel importante en la síntesis e hibridación eficientes de los ácidos nucleicos unidos al soporte. El brazo conector debe ser lo suficientemente largo para que se pueda lograr un alto rendimiento (>97 %) durante la síntesis automatizada. La longitud requerida del conector dependerá del soporte sólido particular usado. Por ejemplo, un conector de seis átomos suele ser suficiente para lograr un rendimiento >97 % durante la síntesis automatizada de ácidos nucleicos cuando se usa poliestireno altamente reticulado como soporte sólido. El brazo conector tiene preferentemente una longitud de al menos 20 átomos para lograr un alto rendimiento (>97 %) durante la síntesis automatizada cuando se usa CPG como soporte sólido.

La hibridación de una sonda inmovilizada en un soporte sólido generalmente requiere que la sonda esté separada del soporte sólido por al menos 30 átomos, más preferentemente al menos 50 átomos. Para lograr esta separación, el conector generalmente incluye un espaciador colocado entre el conector y el extremo 3'. Para la síntesis de ácidos nucleicos, el brazo conector generalmente se une al 3'-OH del extremo 3' mediante un enlace éster que se puede escindir con reactivos básicos para liberar el ácido nucleico del soporte sólido.

En la técnica se conoce una amplia variedad de conectores, que se pueden usar para unir la sonda de ácido nucleico al soporte sólido. El conector puede estar formado por cualquier compuesto que no interfiera significativamente con la hibridación de la secuencia diana con la sonda unida al soporte sólido. El conector puede estar formado, por ejemplo, por un ácido nucleico homopolimérico, que se puede añadir fácilmente al conector mediante síntesis automatizada. Alternativamente, se pueden usar como conector polímeros tales como polietilenglicol funcionalizado. Tales polímeros se prefieren actualmente a los ácidos nucleicos homopoliméricos porque no interfieren significativamente con la hibridación de la sonda con el ácido nucleico diana. Se prefiere particularmente el polietilenglicol porque está disponible comercialmente, es soluble en medios tanto orgánicos como acuosos, es fácil de funcionalizar y es completamente estable en las condiciones de síntesis y post-síntesis de ácidos nucleicos.

Los enlaces entre el soporte sólido, el conector y la sonda preferiblemente no se escinden durante la síntesis o eliminación de los grupos protectores de bases en condiciones básicas a alta temperatura. Sin embargo, estos enlaces se pueden seleccionar de grupos que se pueden escindir en una variedad de condiciones. Los ejemplos de enlaces actualmente preferidos incluyen enlaces carbamato, éster y amida.

Un conjunto de materiales proporcionados por la presente invención son sondas inmovilizadas con acrilamida. En otra realización preferida, una especie está dentro de una matriz, tal como una matriz de acrilamida y la especie lleva un

fluoróforo a base de cumarina de acuerdo con la presente invención, o la presencia de la especie inmovilizada se determina utilizando una sonda que lleva un fluoróforo. En una realización preferida, la inmovilización se lleva a cabo junto con el proceso "Acrydite" inventado y comercializado por Mosaic Technologies (Cambridge, Mass., véase, Rehman *et al.*, Nucleic Acids Research, 27: 649-655 (1999)). El método Acrydite permite la inmovilización de sondas de captura marcadas con alqueno dentro de una red de poliacrilamida polimerizada. Cuando las mezclas diana pasan por la banda de sonda inmovilizada en condiciones de electroforesis, el ácido nucleico diana es capturado sustancialmente de forma cuantitativa. No obstante, la detección de este evento requiere actualmente una segunda sonda. En una realización, las sondas que llevan un fluoróforo, y/o un desactivador, se inmovilizan en una matriz de acrilamida y posteriormente se ponen en contacto con la mezcla diana. Utilizando sondas fluorescentes como sondas de captura, las señales de las mezclas diana pueden detectarse directamente en tiempo real.

Una colección de compuestos proporcionados por la presente invención es una micromatriz. Las micromatrices incluyen fluoróforos y compuestos a base de cumarina inmovilizados (por ejemplo, péptidos, ácidos nucleicos, agentes bioactivos, etc.) funcionalizados con fluoróforos a base de cumarina. Asimismo, la invención proporciona métodos de interrogación de micromatrices utilizando sondas funcionalizadas con fluoróforos. Las especies inmovilizadas y las sondas se seleccionan entre sustancialmente cualquier tipo de molécula, incluyendo, aunque no de forma limitativa, moléculas pequeñas, péptidos, enzimas, ácidos nucleicos y similares.

Las micromatrices de ácidos nucleicos que consisten en una multitud de ácidos nucleicos inmovilizados son herramientas importantes para la generación de información genómica, véase, Debouck *et al.*, en el suplemento de Nature Genetics, 21:48-50 (1999). El análisis que figura a continuación se centra en el uso de fluoróforos de acuerdo con la presente invención junto con micromatrices de ácidos nucleicos. Este enfoque tiene como objeto ser ilustrativo y no limita el alcance de los materiales con los que se puede poner en práctica este aspecto de la presente invención.

En otra realización preferida, los compuestos de la presente invención se utilizan en un formato de micromatriz. Los fluoróforos, o las especies que llevan fluoróforos, pueden ser componentes de una micromatriz o, como alternativa, pueden ser utilizados como una herramienta para identificar selectivamente los componentes de una micromatriz.

Un método para realizar matrices ordenadas de sondas a base de cumarina en un sustrato es el enfoque de transferencia en mancha. En este método, un colector de vacío transfiere una pluralidad, p. ej., 96, muestras acuosas de sondas de pocillos de 3 milímetros de diámetro a un sustrato. La sonda se inmoviliza en la membrana porosa horneando la membrana o exponiéndola a la radiación UV. Una variante común de este procedimiento es el método de transferencia por ranuras, en el que los pocillos tienen formas ovaladas muy alargadas.

Otra técnica empleada para realizar matrices ordenadas de sondas utiliza una matriz de pines sumergidos en los pocillos, p. ej., los 96 pocillos de una placa de microtitulación, para transferir una matriz de muestras a un sustrato, tal como una membrana porosa. Una matriz incluye pines que están diseñados para marcar una membrana de forma escalonada, para crear un conjunto de 9216 puntos en un área de 22 x 22 cm. Véanse, Lehrach, *et al.*, HYBRIDIZATION FINGERPRINTING IN GENOME MAPPING AND SEQUENCING, GENOME ANALYSIS, Vol. 1, Davies *et al.*, Eds., Cold Springs Harbor Press, págs. 39-81 (1990).

Un método alternativo para crear matrices ordenadas de sondas es análogo al descrito por Pirrung *et al.* (patente de EE. UU. N.º 5.143.854, publicada en 1992), y también por Fodor *et al.*, (Science, 251: 767-773 (1991)). Este método consiste en sintetizar diferentes sondas en diferentes regiones discretas de una partícula u otro sustrato. Este método se utiliza preferentemente con moléculas de sonda relativamente cortas, p. ej., menos de 20 bases. Un método relacionado ha sido descrito por Southern *et al.* (Genomics, 13: 1008-1017 (1992)).

Khrapko, *et al.*, DNA Sequence, 1: 375-388 (1991) describen un método para realizar una matriz de ácido nucleico depositando ADN en una fina capa de poliacrilamida. La deposición se realiza manualmente con una micropipeta.

El sustrato también puede ser modelado utilizando técnicas tales como fotolitografía (Kleinfield *et al.*, J. Neurosci. 8:4098-120 (1998)), fotograbado, grabado químico e impresión por microcontacto (Kumar *et al.*, Langmuir 10:1498-511 (1994)). Otras técnicas para formar patrones en un sustrato serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

El tamaño y la complejidad del patrón en el sustrato están limitados únicamente por la resolución de la técnica utilizada y el fin para el que se pretende el patrón. Por ejemplo, utilizando impresión por microcontacto, elementos tan pequeños como 200 nm se forman en capas en un sustrato. Véase, Xia, Y., J. Am. Chem. Soc. 117:3274-75 (1995). De forma similar, utilizando fotolitografía, se producen patrones con elementos tan pequeños como 1 µm. Véase, Hickman *et al.*, J. Vac. Sci. Technol. 12:607-16 (1994). Los patrones que son útiles en la presente invención incluyen aquellos que incluyen elementos tales como pocillos, cerramientos, separaciones, rebajes, entradas, salidas, canales, canalizaciones, rejillas de difracción y similares.

En una realización preferente actual, la formación de patrones se utiliza para producir un sustrato que tiene una pluralidad de pocillos adyacentes, indentaciones u orificios para contener las sondas. En general, cada uno de estos elementos del sustrato está aislado de los otros pocillos por una pared elevada o separación y los pocillos no se

comunican fácilmente de forma fluida. Así, una partícula, reactivo u otra sustancia, colocado en un pocillo particular permanece sustancialmente confinado en ese pocillo. En otra realización preferida, la formación de patrones permite la creación de canales a través del dispositivo mediante los cuales un analito u otra sustancia puede entrar y/o salir del dispositivo.

En otra realización, las sondas se inmovilizan "imprimiéndose" directamente sobre un sustrato o, como alternativa, se puede utilizar una técnica de "despegue". En la técnica de despegue, se coloca una capa protectora con patrones sobre el sustrato, y se coloca una sonda en las áreas no cubiertas por la capa protectora y la capa protectora se retira posteriormente. Las capas protectoras apropiadas para su uso con los sustratos de la presente invención son conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Kleinfield *et al.*, J. Neurosci. 8:4098-120 (1998). Después de la retirada de la fotocapa protectora, una segunda sonda, que tiene una estructura diferente de la primera sonda, puede adherirse al sustrato en las áreas inicialmente cubiertas por la capa protectora. Utilizando esta técnica, se pueden producir sustratos con patrones de sondas que tienen diferentes características. Se puede acceder a configuraciones de sustrato similares mediante la microimpresión de una capa con las características deseadas directamente sobre el sustrato. Véase, Mrkish *et al.* Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 25:55-78 (1996).

Métodos

En el presente documento se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para realizar una sonda que incluye un resto de cumarina. El método implica: 1) sintetizar la sonda que contiene un resto de cumarina utilizando un método de síntesis en fase sólida; 2) retirar la sonda del soporte sólido a una temperatura entre 50 °C y 70 °C, en amoníaco concentrado, durante un periodo de 2 h a 8 h; 3) aislar la sonda. El resto de cumarina aislado se degrada en un grado inferior al 10,0 por ciento como resultado de la retirada de la sonda. Normalmente, el resto de cumarina se degrada en un grado inferior al 5,0 por ciento, 2,5 por ciento o 1,0 por ciento.

En el presente documento se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para realizar una sonda que incluye un resto de cumarina. El método implica: 1) sintetizar la sonda que contiene un resto de cumarina utilizando un método de síntesis en fase sólida; 2) retirar la sonda del soporte sólido a una temperatura entre 50 °C y 70 °C, en amoníaco concentrado, durante un periodo de 2 h a 8 h; 3) aislar la sonda. El resto de cumarina aislado se degrada en un grado inferior al 10,0 por ciento como resultado de la retirada de la sonda. Normalmente, el resto de cumarina se degrada en un grado inferior al 5,0 por ciento, 2,5 por ciento o 1,0 por ciento.

En el presente documento se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para realizar una sonda que incluye un resto de cumarina. El método implica: 1) sintetizar la sonda que contiene un resto de cumarina utilizando un método de síntesis en fase sólida; 2) retirar la sonda del soporte sólido a una temperatura entre 60 °C y 80 °C, en 1:3 de *terc*-butilamina/agua, durante un periodo de 4 h a 12 h; 3) aislar la sonda. El resto de cumarina aislado se degrada en un grado inferior al 10,0 por ciento como resultado de la retirada de la sonda. Normalmente, el resto de cumarina se degrada en un grado inferior al 5,0 por ciento, 2,5 por ciento o 1,0 por ciento.

En un aspecto del método, la presente invención proporciona un método para determinar si una muestra contiene una enzima. El método incluye: (a) poner en contacto la muestra con una construcción peptídica que incluye un fluoróforo a base de cumarina de la presente invención; (b) excitar dicho fluoróforo; y (c) determinar una propiedad de fluorescencia de dicha muestra, en donde la presencia de dicha enzima en dicha muestra da lugar a un cambio en dicha propiedad de fluorescencia.

Las construcciones peptídicas preferidas incluyen: i) un fluoróforo, donde el fluoróforo es un fluoróforo a base de cumarina de la presente invención; ii) un desactivador; y iii) un sitio de reconocimiento de escisión para la enzima. Asimismo, el péptido se encuentra preferentemente en una conformación que permite la transferencia de energía donante-aceptor entre el fluoróforo y el desactivador cuando se excita el fluoróforo.

En el presente documento se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para determinar si un compuesto altera la actividad de una enzima. Las realizaciones preferidas de este aspecto incluyen las etapas citadas en relación con el aspecto de la invención anteriormente citado y además incluyen una etapa (c) que determina una propiedad de fluorescencia de la muestra, en donde dicha actividad de dicha enzima en dicha muestra da lugar a un cambio en la propiedad de fluorescencia.

En el presente documento se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para detectar una secuencia diana de ácido nucleico. El método incluye: (a) poner en contacto la secuencia diana con un ácido nucleico detector; (b) hibridar la secuencia de unión con la secuencia diana, alterando así la conformación del ácido nucleico detector, provocando un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (c) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, detectando así la secuencia diana del ácido nucleico.

En los métodos descritos en el presente documento, salvo que se indique lo contrario, un ácido nucleico detector preferido incluye una secuencia de unión a la diana monocatenaria. La secuencia de unión tiene unida a la misma: i) un fluoróforo a base de cumarina de la presente invención; y ii) un desactivador.

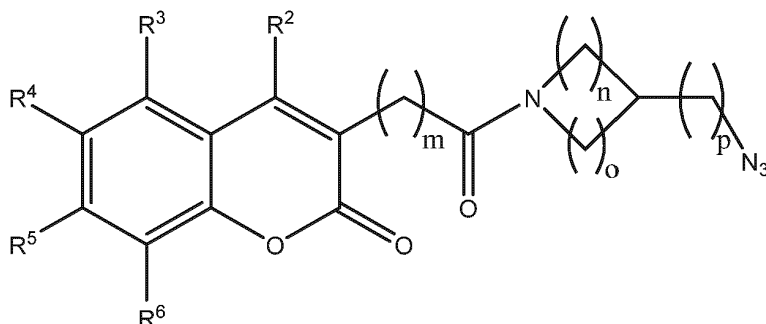
En el presente documento se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para detectar la amplificación de una secuencia diana. El método incluye el uso de una reacción de amplificación que incluye las siguientes etapas: (a) hibridar la secuencia diana y un ácido nucleico detector. El ácido nucleico detector incluye una secuencia de unión a la diana monocatenaria y una estructura secundaria asociada intramolecularmente 5' a la secuencia de unión a la diana. Al menos una parte de la secuencia detectora forma una cola monocatenaria que está disponible para la hibridación con la secuencia diana; (b) extender el ácido nucleico detector hibridado en la secuencia diana con una polimerasa para producir un producto de extensión de ácido nucleico detector y separar el producto de extensión del ácido nucleico detector de la secuencia diana; (c) hibridar un cebador con el producto de extensión del ácido nucleico detector y extender el cebador con la polimerasa, linealizando así la estructura secundaria asociada intramolecularmente y produciendo un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (d) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, detectando así la secuencia diana.

En el presente documento se divulga, pero no forma parte de la presente invención, un método para determinar si una muestra contiene una enzima. El método comprende: (a) poner en contacto la muestra con una construcción peptídica; (b) excitar el fluoróforo a base de cumarina; y (c) determinar una propiedad de fluorescencia de la muestra, en donde la presencia de la enzima en la muestra da lugar a un cambio en la propiedad de fluorescencia.

Las construcciones peptídicas útiles para la práctica de la invención incluyen aquellas con las siguientes características: i) un fluoróforo, donde el fluoróforo es un fluoróforo a base de cumarina de la presente invención; ii) un desactivador; y iii) un sitio de reconocimiento de escisión para la enzima.

En otro aspecto del método, la invención proporciona un método para conjugar una primera molécula con una segunda molécula utilizando la química de clic (adición de azida a alquino, normalmente mediada por un catalizador metálico) para obtener una sonda que contenga al menos un fluoróforo a base de cumarina de la presente invención. La primera o la segunda molécula incluye un resto de azida; la molécula primera o segunda que no incluye un resto de azida incluye un resto de alquino. El al menos un fluoróforo a base de cumarina de la presente invención surge originalmente de la primera molécula y/o de la segunda molécula.

Los ejemplos no limitantes de azidas usadas en el método Click Chemistry discutido anteriormente incluyen la Estructura 165.



Estructura 165

Los sustituyentes y las variables para las Estructuras 165 se definen a continuación: m es 1, 2 o 3; n es 1 o 2; o es 1 o 2; p es 0, 1, 2 o 3; R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃;

R³ es H;

R⁴ es H o R⁴ junto con R⁵ forman un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco o seis miembros (por ejemplo, piperidinilo);

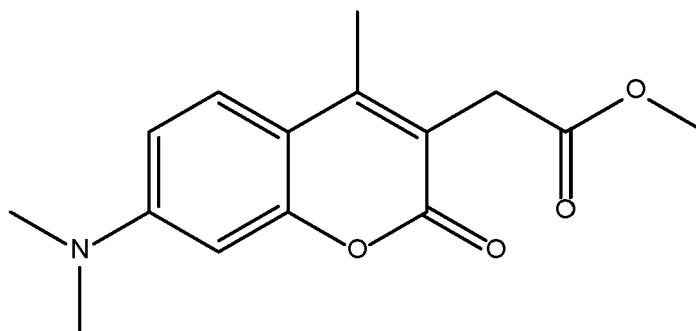
R⁵ es -NR⁷R⁸ donde R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente entre H, alquilo (C₁-C₈), o R⁷ y R⁸ juntos forman un heterociclo de cuatro, cinco, seis o siete miembros; ; o R⁴, R⁵ y R⁶ juntos forman sistemas de anillos carbocíclicos o heterocíclicos condensados que tienen anillos de cinco o seis miembros;

R⁶ es H, o R⁴, R⁵ y R⁶ juntos forman sistemas de anillos carbocíclicos o heterocíclicos condensados que tienen anillos de cinco o seis miembros.

En el presente documento se divulga, pero no forman parte de la presente invención, son métodos para determinar la cantidad de actividad de una enzima en una muestra de un organismo. El método incluye: (a) poner en contacto una muestra que comprende la enzima y el compuesto con una construcción peptídica que comprende (b) excitar el fluoróforo; y (c) determinar una propiedad de fluorescencia de la muestra, en donde la actividad de la enzima en la muestra da como resultado un cambio en la propiedad de fluorescencia. Las construcciones peptídicas útiles en este aspecto de la invención son sustancialmente similares a las descritas inmediatamente antes.

Ejemplos*Ejemplo 1*

5 Preparación del compuesto 201

**201****2-(7-(Dimetilamino)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-3-il)acetato de metilo**

10

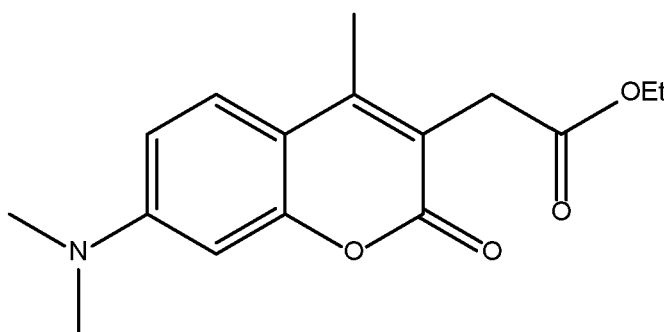
Un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético se cargó con 3-dimetilaminofenol (66,3 g, 483 mmol), 2-acetilsuccinato de dimetilo (86,2 g, 531 mmol) y cloruro de cinc (92,2 g, 676 mmol). La mezcla se calentó a 120 °C durante 24 horas y se enfrió. La masa de reacción se repartió entre DCM (1,5 l) y agua (4 l) más HCl concentrado (70 ml). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (2 x 1 l). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (2 x 4 l). La fase orgánica se extrajo con KOH 0,5 N (1 l, 2 x 500 ml) estos lavados se guardaron para la extracción del ácido cumarínico siguiente. La fase orgánica se lavó con salmuera (4 l), se secó con MgSO₄ y se concentraron para dar 31,0 gramos de un semisólido de color rojo. La recristalización en IPA (150 ml) dio el compuesto 21 en forma de color rosa (14,6 g, rendimiento del 11 %). p.f. 130-132 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,18 (3H, t, J=7,0 Hz), 3,00 (6H, s), 3,88 (2H, s), 4,10 (2H, c, J=7,1 Hz), 6,05 (1H, s), 6,56 (1H, d, J=2,8 Hz), 6,73 (1H, dd, J = 2,8, 9,2 Hz), 7,43 (1H, d, J = 9,2 Hz). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₅H₁₇NO₄: 276,12; encontrado: 276,12. Anál. calc. para C₁₅H₁₇NO₄: C, 65,44; H, 6,22; N, 5,09; Encontrado: C, 65,49; H, 6,18; N, 5,08.

15

20

Ejemplo 2

25 Preparación del Compuesto 202

**202**

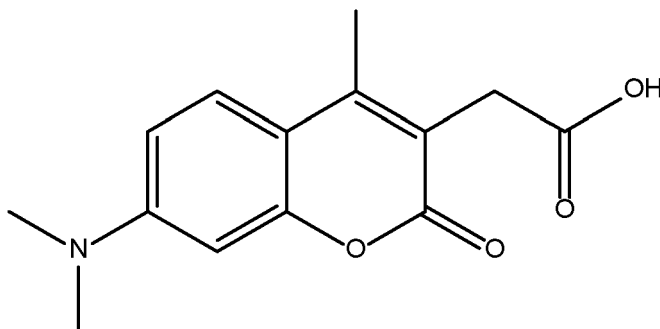
30

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 1 usando 2-acetilsuccinato de dietilo en lugar de 2-acetilsuccinato de dimetilo para producir el compuesto **202** en forma de un sólido de color púrpura claro con un rendimiento del 24 %. p.f. 125-127 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,18 (3H, t, J=7,0 Hz), 3,00 (6H, s), 3,88 (2H, s), 4,10 (2H, c, J=7,1 Hz), 6,05 (1H, s), 6,56 (1H, d, J=2,8 Hz), 6,73 (1H, dd, J = 2,8, 9,2 Hz), 7,43 (1H, d, J = 9,2 Hz). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₆H₁₉NO₄: 290,14; encontrado: 290,14. Anál. calc. para C₁₆H₁₉NO₄: C, 66,42; H, 6,62; N, 4,84; Encontrado: C, 66,25; H, 6,57; N, 5,00.

35

Ejemplo 3

Preparación del compuesto 203

**203****5 ácido 2-(7-(dimetilamino)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-3-il)acético**

Procedimiento A: Los lavados alcalinos del Ejemplo 1 se acidificaron con AcOH. Los sólidos se filtraron y secaron para producir el compuesto 203 en forma de un sólido de color rosa (25,2 g, rendimiento del 20 %). De forma similar, los lavados alcalinos del Ejemplo 2 se acidificaron con AcOH para dar **203** con un rendimiento del 11 %.

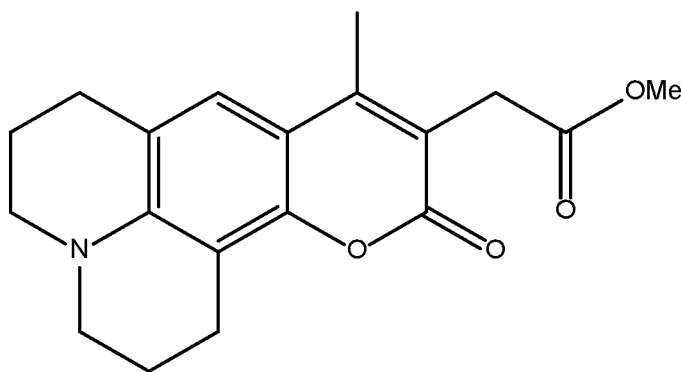
10

Procedimiento B: El compuesto **202** (4 g) se disolvió en MeOH (25 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético. Se añadió KOH al 10 %/MeOH (25 ml) y la reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla se acidificó con AcOH y los sólidos se retiraron por filtración y se secaron para producir el compuesto **203** en forma de un sólido de color rosa (3,43 g, rendimiento del 95 %). p.f. 206-208 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2,31 (3H, s), 3,01 (6H, s), 3,52 (2H, s), 6,55 (1H, d, J=2,4 Hz), 6,74 (1H, dd, J = 2,4, 9,2 Hz), 7,58 (1H, d, J=9,2 Hz), 12,34 (1H, s). EM (ES⁺) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₄H₁₅NO₄: 262,11, encontrado: 262,11.

15

Ejemplo 4

20 Preparación del compuesto 204

**204****25 2-(9-Metil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetato de metilo**

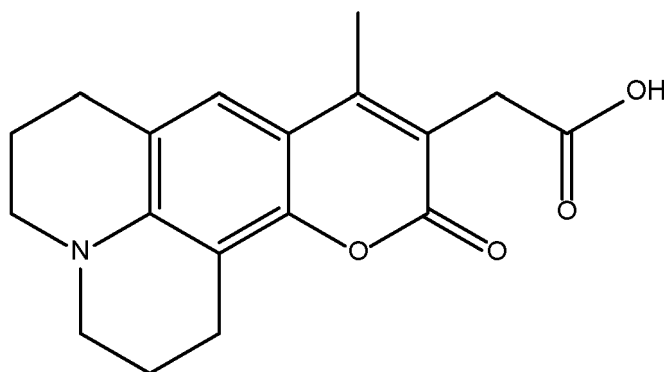
Se siguió el procedimiento del Ejemplo 1 usando 8-hidroxi-julolidina en lugar de 3-dimetilaminofenol para producir el compuesto **204** en forma de un sólido de color canela claro (rendimiento del 28 %). p.f. 117-119 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,88 (4H, m, J=5,6 Hz), 2,25 (3H, s), 2,71 (4H, c, J=6,8 Hz), 3,21 (4H, c, J=6,3 Hz), 3,58 (2H, s), 3,59 (3H, s), 7,15 (1H, s). EM (ES⁺) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₉H₂₁NO₄: 327,15, encontrado: 327,15. Anál. calc. para C₁₉H₂₁NO₄: C, 69,71; H, 6,47; N, 4,28; Encontrado: C, 69,55; H, 6,38; N, 4,20.

30

Ejemplo 5

Preparación del compuesto 205

35

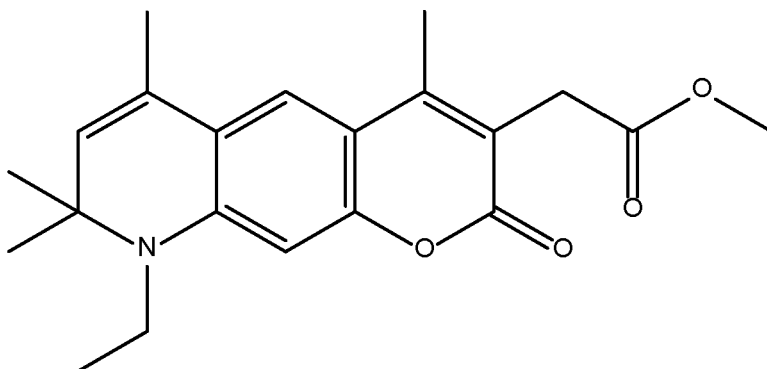
**205**

ácido 2-(9-metil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acético

- 5 Los lavados alcalinos del Ejemplo 4 se acidificaron con AcOH. Los sólidos se retiraron por filtración y se secaron para producir el compuesto **205** en forma de un sólido de color amarillo pálido (rendimiento del 27 %). p.f. 182-186 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,89 (4H, m), 2,25 (3H, s), 2,73 (4H, c, J=6,1 Hz), 3,22 (4H, c, J=5,9 Hz), 3,47 (2H, s), 7,16 (1H, s), 12,45 (1H, s muy a). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₈H₁₉NO₄: 314,14, encontrado: 314,14.

10 *Ejemplo 6*

Preparación del compuesto 206

**206**

15

2-(9-Etil-4,6,8,8-tetrametil-2-oxo-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-3-il)acetato de metilo

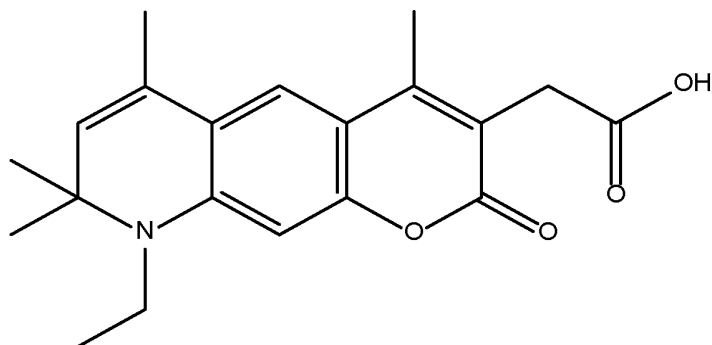
20

Un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético se cargó con bromhidrato de 1-etil-2,2,4-trimetil-1,2-dihidroquinolin-7-ol (14,9 g, 50 mmol), 2-acetilsuccinato de dimetilo (18,8 g, 100 mmol) y cloruro de cinc (19,1 g, 140 mmol). La mezcla se calentó a 125 °C durante 20 horas y después se enfrió. La masa de reacción se repartió entre DCM (400 ml) y agua (600 ml) más HCl concentrado (10 ml). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (2 x 300 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (2 x 600 ml) y salmuera (800 ml), se secaron con MgSO₄ y se concentraron para dar un jarabe de color verde oscuro (13,7 g, rendimiento del 77 %). Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con MeOH del 0 % al 2 %/DCM para dar un sólido de color verdoso (7,0 g, rendimiento del 39 %). La recrystalización en IPA (50 ml) dio el compuesto **206** en forma de un sólido de color amarillo (3,54 g, rendimiento del 20 %). p.f. 107-109 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,13 (3H, t, J=5,6 Hz), 1,34 (6H, s), 1,98 (3H, d, J=0,8 Hz), 2,31 (3H, s), 3,40 (2H, c, J=5,6 Hz), 3,60 (2H, s), 3,61 (3H, s), 5,40 (1H, s), 6,34 (1H, s), 7,21 (1H, s). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₁H₂₅NO₄: 356,19, encontrado: 356,19

30

Ejemplo 7

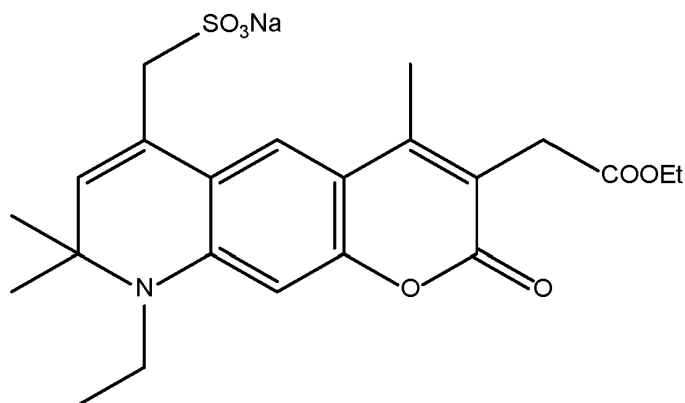
Preparación del compuesto 207

**207****Ácido 2-(9-etil-4,6,8,8-tetrametil-2-oxo-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-3-il)acético**

Se disolvió éster cumarínico **206** (3 g, 8,44 mmol) en MeOH (20 ml) y se añadió KOH al 10 %/MeOH (20 ml). Después de 14 horas agitándose a TA, se añadió ácido acético (1,2 ml) y la mezcla se concentró. El residuo se disolvió y se añadió ácido acético adicional (1,5 ml) para formar una suspensión que se mantuvo a 4 °C durante una noche. Al día siguiente se decantó el sobrenadante de la masa gomosa de color oscuro. La goma se disolvió en DCM (100 ml) y se lavó con agua (50 ml) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se concentró para dar el compuesto **207** en forma de un sólido de color parduzco amarillo (2,44 g, rendimiento del 85 %). P.f. 223-227 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,14 (3H, t, J=5,6 Hz), 1,34 (6H, s), 1,99 (3H, d, J=0,8 Hz), 2,31 (3H, s), 3,40 (2H, c, J=5,6 Hz), 3,51 (2H, s), 5,40 (1H, d, J=1,2 Hz), 6,39 (1H, s), 7,21 (1H, s), 12,31 (1H, s). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₀H₂₃NO₄: 342,17, encontrado: 342,17.

Ejemplo 8

Preparación del compuesto 208

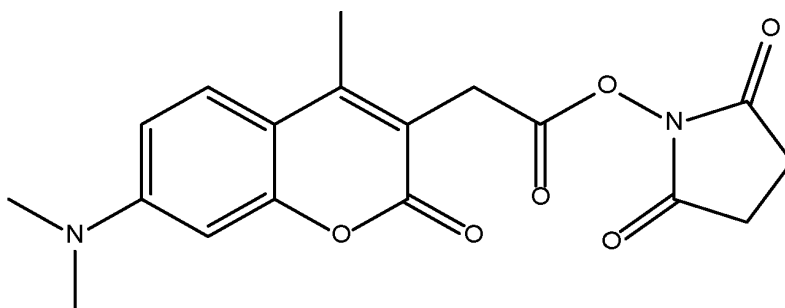
**208****(3-(2-Etoxi-2-oxoetil)-9-etil-4,8,8-trimetil-2-oxo-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-6-il)metanosulfonato sódico**

Se hizo reaccionar (1-etil-7-hidroxi-2,2-dimetil-1,2-dihidroquinolin-4-il)metanosulfonato sódico (2,14 g, 6,70 mmol) con acetilsuccinato de dietilo (2,90 g, 13,4 mmol) y cloruro de cinc (2,56 g, 18,8 mmol) a 125 °C durante 20 horas. La mezcla se enfrió y se trituró con EtOH (3 x 40 ml). Los lavados de EtOH se concentraron para dar un residuo de color negro (5,35 g). Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con MeOH al 0-15 %/DCM. La concentración de las fracciones de producto, produjo el compuesto **208** en forma de una goma de color oscuro (482 mg, rendimiento del 15 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,15 (3H, t, J=6,4 Hz), 1,18 (3H, t, J=6,4 Hz), 1,34 (6H, s), 2,31 (3H, s), 3,17 (3H, d, J=3,2 Hz), 3,40 (2H, c, J=5,2 Hz), 3,58 (2H, s), 3,61 (3H, s), 4,08 (4H, superpuesto m), 5,48 (1H, s), 6,30 (1H, s), 7,77 (1H, s). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₂H₂₇NO₇S (forma ácida):

450,16, encontrado: 450,16.

Ejemplo 9

5 Preparación del compuesto 209



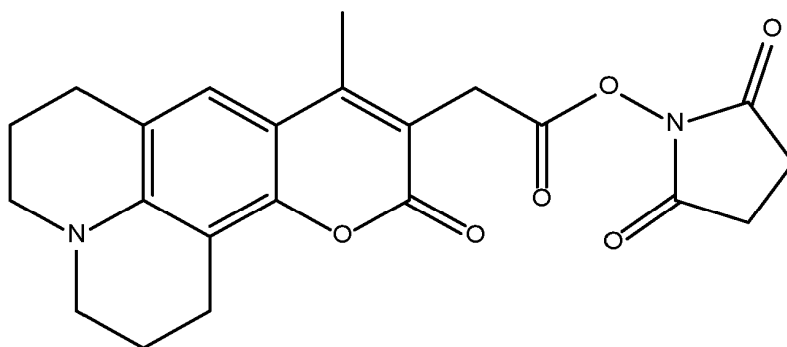
209

10 2-(7-(dimetilamino)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-3-il)acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Se disolvieron el compuesto **203** (20 g, 76,5 mmol) y NHS (10,6 g, 91,8 mmol) en DMF (800 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético. Se añadió dicitclohexil carbodiimida (20,5 g, 99,5 mmol) y la reacción se agitó a TA durante 48 horas. La suspensión se filtró y el filtrado se vertió en agua enfriada con hielo (3 l) con agitación. El precipitado se retiró por filtración, se lavó con agua y se secó para producir el compuesto **206** en forma de un sólido de color amarillo pálido (31,9 g, rendimiento del 121 %). La RMN indicó que este material contenía 18 % molar de DCU que no afectó a la reacción subsiguiente. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2,37 (3H, s), 2,79 (4 H, s a), 3,03 (6H, s), 4,01 (2H, s), 6,57 (1H, d, J=2,4 Hz), 6,75 (1H, dd, J = 2,4, 8,8 Hz), 7,63 (1H, d, J = 9,2 Hz).

Ejemplo 10

20 Preparación del compuesto 210



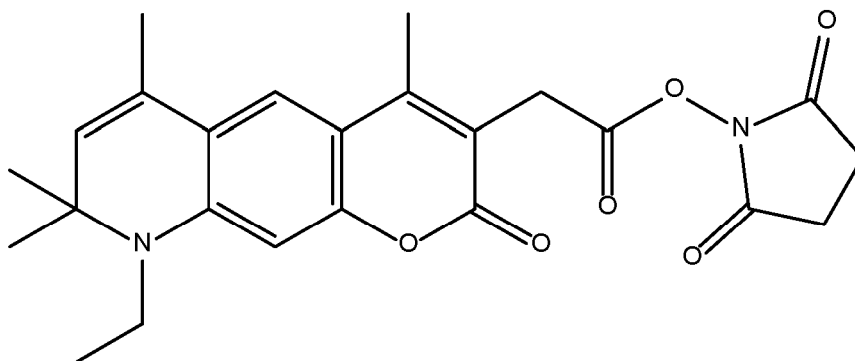
210

25 2-(9-metil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 9 usando el compuesto **205** en lugar del compuesto **203** para producir el compuesto **210** en forma de un sólido de color amarillo con un rendimiento del 116 %. La RMN indicó que este material contenía 25 % molar de DCU. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,88 (4H, m, J=6,0 Hz), 2,32 (3H, s), 2,73 (4H, m, J=4,4 Hz), 2,79 (4H, s a), 3,24 (4H, c, J=5,9 Hz), 3,98 (2H, s), 7,22 (1H, s).

Ejemplo 11

35 Preparación del compuesto 211



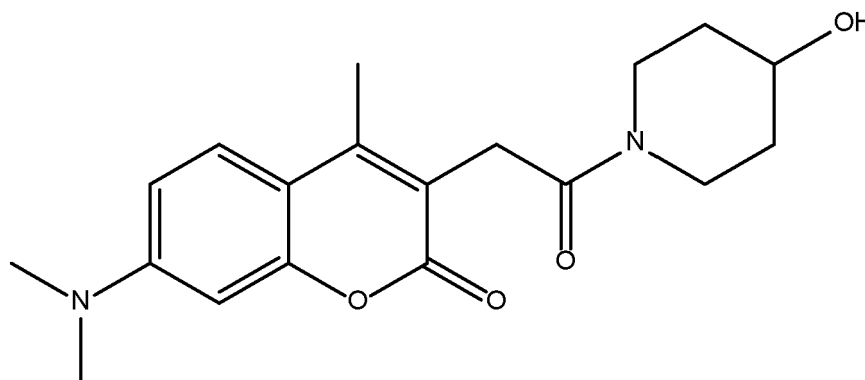
211

2-(9-etil-4,6,8,8-tetrametil-2-oxo-8,9-dihidro-2H-pirano [3,2-g] quinolin-3-il)acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

- 5 Se hizo reaccionar ácido cumarínico **207** (2,0 g, 5,86 mmol) con carbonato de N,N'-disuccinimidilo (1,95 g, 7,62 mmol) y DIEA (909 mg, 7,03 mmol) en DMF (30 ml). Después de 4 horas de agitación a TA, la mezcla se vertió en agua fría (400 ml) para dar una suspensión de color amarillo que se mantuvo a 4 °C durante una noche. La filtración por succión dio un sólido de color amarillo que se disolvió en DCM (40 ml) y se lavó con agua (20 ml) y salmuera (20 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se concentró para dar el compuesto **211** en forma de una espuma de color ámbar (2,32 g, rendimiento del 90 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,15 (3H, t, J=6,4 Hz), 1,35 (6H, s), 2,00 (3H, d, J=0,4 Hz), 2,38 (3H, s), 2,80 (4H, s a), 3,42 (2H, c, J=6,4 Hz), 4,00 (2H, s), 5,42 (1H, s), 6,34 (1H, s), 7,24 (1H, s).
- 10

Ejemplo 12

- 15 Preparación del compuesto 212



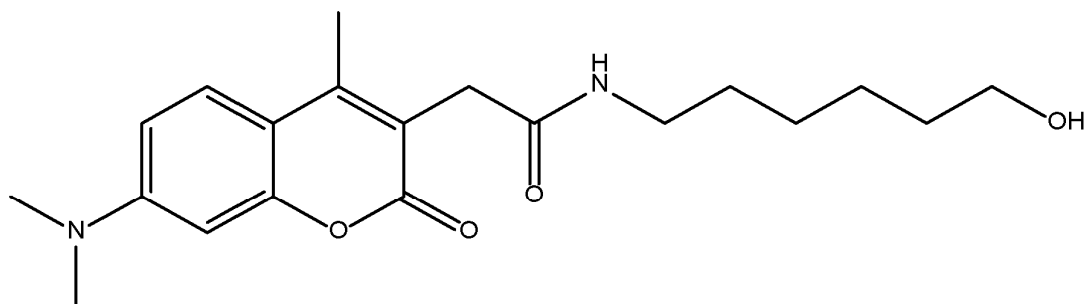
212

7-(dimetilamino)-3-(2-(4-hidroxipiperidin-1-il)-2-oxoetil)-4-metil-2H-cromen-2-ona

- 20 Se disolvieron el compuesto **211** (15 g, 34,6 mmol) y 4-hidroxi-piperidina (4,55 g, 45 mmol) en DMF (200 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético. Después de agitar durante 4 horas a TA, el matraz se mantuvo a 4 °C durante una noche. El precipitado se retiró por filtración, se lavó con DMF (2 x 25 ml), DCM (2 x 25 ml) y se secó para producir el compuesto **212** en forma de un sólido de color blanco con un rendimiento del 125 %. La RMN indicó la presencia de 26 % en moles de DCU. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,24 (3H, m), 1,39 (1H, m), 1,69 (3H, m), 2,23 (3H, s), 2,90 (1H, m), 3,01 (6H, s), 3,25 (1H, m), 3,48 (1H, m), 3,60 (2H, d, J=2,8 Hz), 3,70 (1H, m), 3,87 (2H, m), 6,54 (1H, d, J=2,4 Hz), 6,69 (1H, dd, J = 2,4, 8,8 Hz), 7,43 (1H, d, J = 8,8 Hz). EM (ES⁺) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₉H₂₄N₂O₄: 345,18, encontrado: 345,18.
- 25

- 30 *Ejemplo de referencia 13*

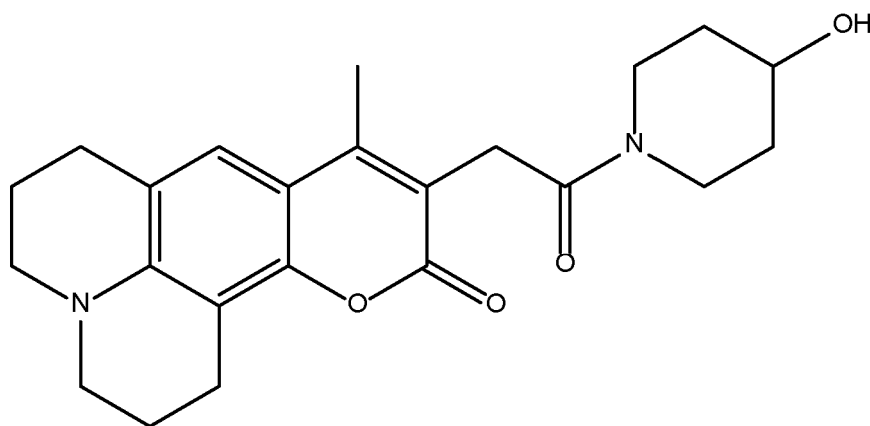
Preparación del compuesto 213

**213****2-(7-(dimetilamino)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-3-il)-N-(6-hidroxi-hexil)acetamida**

- 5 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 12 usando aminohexanol en lugar de 4-hidroxipiperidina para producir el compuesto **213** en forma de un sólido de color blanco crema con un rendimiento del 100 %. La RMN indicó que este material contenía 16 % molar de DCU. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,24 (4H, m), 1,37 (3H, m), 2,28 (3H, s), 3,01 (6H, s), 3,37 (2H, m), 4,33 (1H, t, J=5,2 Hz), 6,54 (1H, d, J=2,4 Hz), 6,73 (1H, dd, J = 2,4, 8,8 Hz), 7,56 (1H, d, J=8,8 Hz), 7,83 (1H, t, J = 5,7 Hz). EM (ES+) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$: 361,21, encontrado: 361,21.

Ejemplo 14

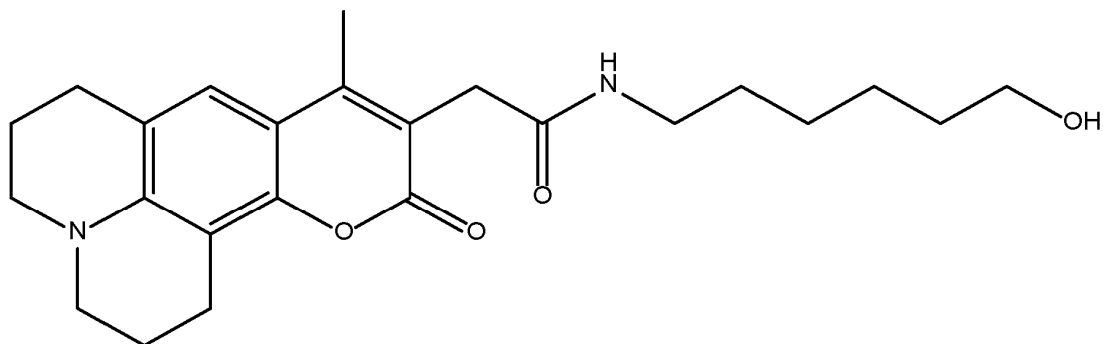
Preparación del compuesto 214

**214****10-(2-(4-hidroxipiperidin-1-il)-2-oxoetil)-9-metil-2,3,6,7-tetrahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-11(5H)-ona**

- 20 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 12 usando el compuesto **210** en lugar del compuesto **209** para producir el compuesto **214** en forma de un sólido de color amarillo pálido con un rendimiento del 116 %. La RMN indicó que este material contenía 25 % molar de DCU. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,23 (2H, m), 1,68 (2H, m), 1,88 (4H, m, J=5,9 Hz), 2,19 (3H, s), 2,74 (4H, c, J=6,4 Hz), 3,22 (4H, c, J=6,4 Hz), 3,57 (2H, d, J=3,2 Hz), 3,57 (1H, m), 3,70 (1H, m), 3,86 (2H, m), 7,14 (1H, s). EM (ES+) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$: 397,21, encontrado: 397,21.

Ejemplo de referencia 15

Preparación del compuesto 215



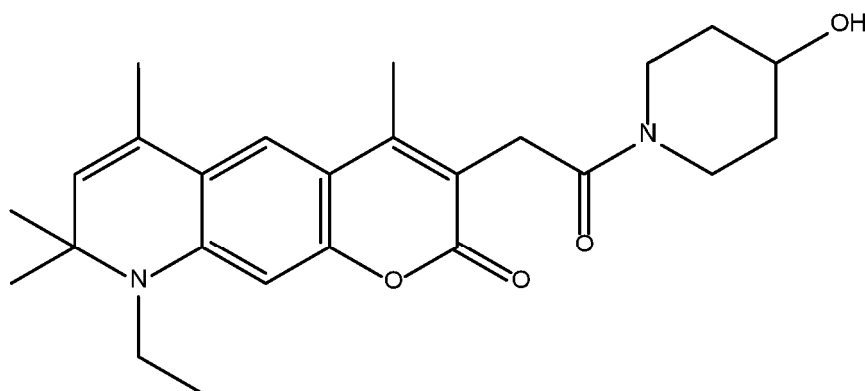
215

N-(6-hidroxihexil)-2-(9-metil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetamida

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 13 usando aminohexanol en lugar de 4-hidroxi-piperidina para producir el compuesto **215** en forma de un sólido de color amarillo pálido con un rendimiento del 98 %. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,24 (4H, m), 1,38 (4H, c, J=6,9 Hz), 1,88 (4H, c, J=5,9 Hz), 2,73 (4H, c, J=6,3 Hz), 3,00 (2H, c, J=6,6 Hz), 3,22 (2H, c, J=5,9 Hz), 3,37 (4H, m), 4,32 (1H, t, J=5,2 Hz) 7,14 (1H, s), 7,76 (1H, t, J = 5,6 Hz). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₄H₃₂N₂O₄: 413,24, encontrado: 413,24.

Ejemplo 16

Preparación del compuesto 216



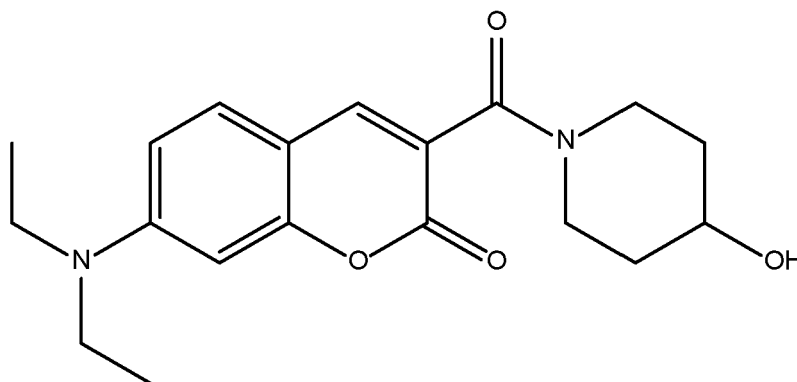
216

9-etil-3-(2-(4-hidroxipiperidin-1-il)-2-oxoetil)-4,6,8-tetrametil-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-2-ona

Se hizo reaccionar el compuesto **211** (2,00 g, 4,56 mmol) con HO-piperidina (554 mg, 5,47 mmol) en DMF (10 ml) a TA. Después de 2 horas la reacción se mantuvo a 4 °C durante una noche. La filtración por succión dio el compuesto **216** en forma de un polvo de color amarillo pálido (872 mg, rendimiento del 45 %). Se añadió agua (20 ml) al filtrado para precipitar más producto. La filtración por succión dio **216** adicional (1,00 g, rendimiento del 52 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,14 (3H, t, J=5,6 Hz), 1,22 (2H, m), 1,34 (6H, s), 1,68 (2H, m), 1,79 (1H, m), 1,99 (3H, s), 2,24 (3H, s), 2,44 (2H, m), 2,54 (3H, s), 2,89 (1H, m), 2,99 (1H, m), 3,26 (1H, m), 3,40 (2H, c, J=6 Hz), 3,45 (1H, m), 3,60 (2H, d, J = 3,6), 3,71 (1H, m, J=3,2 Hz), 3,86 (2H, m), 5,39 (1H, d, J = 0,4 Hz), 6,33 (1H, s), 7,19 (1H, s). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₅H₃₂N₂O₄: 425,24, encontrado: 425,24.

Ejemplo de referencia 17

Preparación del compuesto 217

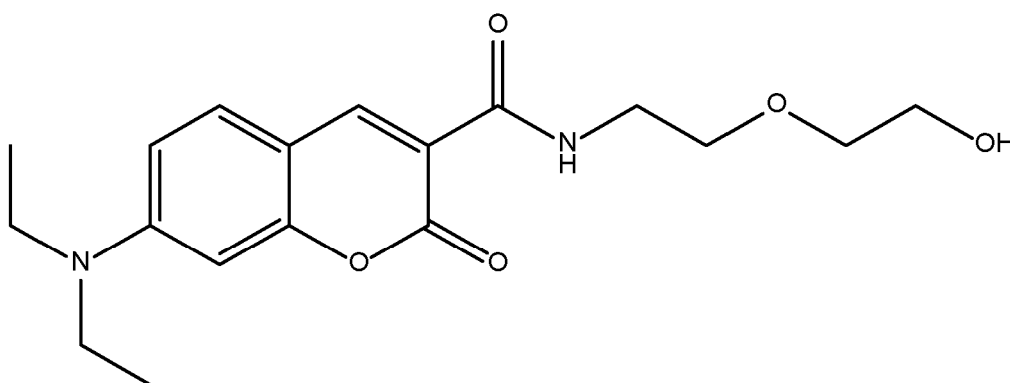
**217****7-(dietilamino)-3-(4-hidroxipiperidin-1-carbonil)-2H-cromen-2-ona**

- 5 Se añadieron 4-(dietilamino)-2-hidroxibenzaldehído (10 g, 51,7 mmol), malonato de dietilo (9,95 g, 62,1 mmol), 4-hidroxipiperidina (26,2 g, 259 mmol), piperidina (5 gotas) y ácido acético (5 gotas) a un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético. La reacción se calentó a 100 °C durante 4 horas. Después de enfriar, el jarabe se vertió en agua (400 ml) y se extrajo con DCM (3 x 200 ml). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 300 ml), ácido cítrico 1 M acuoso (3 x 300 ml) y salmuera (500 ml), después se secó con MgSO₄ y se concentró para dar 13,0 gramos
- 10 de una espuma de color amarillo. Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con MeOH del 0 % al 5 %/DCM para dar el compuesto **217** en forma de una espuma de color amarillo (12,2 g, rendimiento del 68 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,12 (6H, t, J=7,2 Hz), 1,35 (2H, m), 1,73 (2H, m), 3,12 (2H, m), 3,44 (4H, c, J=7,1 Hz), 3,71 (1H, m, J=4,1 Hz), 3,97 (1H, m), 4,78 (1H, d, J=4,0 Hz), 6,54 (1H, d, J=2,8 Hz), 6,73 (1H, dd, J = 2,4, 8,8 Hz), 7,48 (1H, d, J=9,2 Hz), 7,92 (1H, s). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₉H₂₄N₂O₄: 345,81, encontrado: 345,81.
- 15

Ejemplo de referencia 18

Preparación del compuesto 218

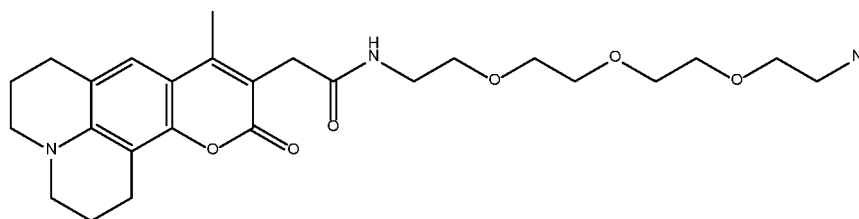
20

**218****7-(dietilamino)-N-(2-(2-hidroxietoxi)etil)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida**

- 25 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 17 usando aminoetoxietanol en lugar de 4-hidroxi piperidina para dar el compuesto **218** en forma de un sólido de color amarillo pálido con un rendimiento del 65 %. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,14 (6H, t, J=7,0 Hz), 3,49 (12H, m), 4,60 (1H, t, J=5,6 Hz), 6,61 (1H, d, J=2,0 Hz), 6,80 (1H, dd, J = 2,4, 6,8 Hz), 7,68 (1H, d, J=8,8 Hz), 8,67 (1 H, s), 8,77 (1H, t, J=5,4 Hz) EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₈H₂₄N₂O₅: 349,18, encontrado: 349,18.
- 30

Ejemplo de referencia 19

Preparación del compuesto 219

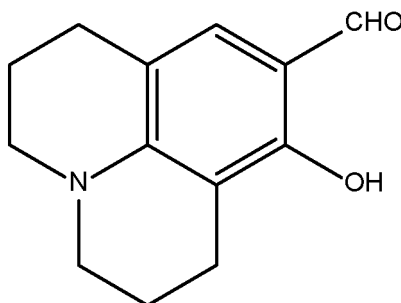
**219**

5 **N-(2-(2-(2-(2-Azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-2-(9-metil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetamida**

Se hicieron reaccionar el compuesto **211** (2,05 g, 5 mmol) y 2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)-etanamina (1,42 g, 6,5 mmol) en DMF (15 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético. Después de agitar durante 18 horas a TA, la mezcla de reacción se concentró. El residuo se disolvió en DCM (75 ml), se lavó con HCl 1 N (2 x 50 ml) y salmuera (75 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se concentró para dar un residuo de color ámbar (2,59 g). Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con MeOH del 0 % al 2 %/DCM para dar el compuesto **219** en forma de un semisólido de color naranja pálido (1,84, rendimiento del 85 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,55-1,90 (2H, m), 1,97 (4H, quint., J=6,0 Hz), 2,44 (3H, s), 2,79 (2H, t, J=6,2 Hz), 2,88 (2H, t, J=6,6 Hz), 3,25 (4H, c, J=6,4 Hz), 3,39 (4H, quint., J=5,1 Hz), 3,53 (2H, t, J=5,2 Hz), 3,53 (2H, s), 3,55-3,80 (8H, m), 6,72 (1H, t a), 7,01 (1H, s). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₆H₃₅N₅O₆: 514,27, encontrado: 514,27.

Ejemplo de referencia 20

20 Preparación del compuesto 220

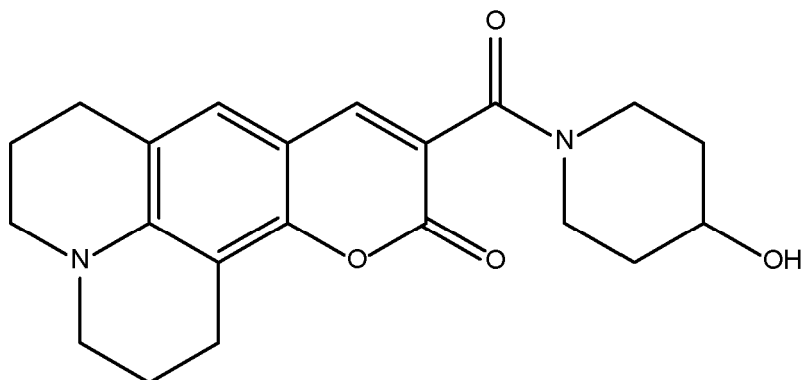
**220**

25 **8-Hidroxi-1,2,3,5,6,7-hexahidropirido[3,2,1-ij]quinolin-9-carbaldehído, (8-hidroxi-julolidin-9-carbaldehído)**

Un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético se cargó con DMF (100 ml) y se enfrió en un baño de hielo a 0-5 °C. Se añadió gota a gota oxiclورو de fósforo (39,5 g, 257 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Se añadió gota a gota 8-hidroxi-julolidina (34 g, 180 mmol) disuelta en DMF (75 ml) y la mezcla se dejó calentar gradualmente a TA. La mezcla se calentó a 85 °C en un baño de aceite durante 1 hora. Después de enfriar a TA, la reacción se vertió en hielo (400 g) con agitación. Después de mantenerse a 4 °C durante una noche los sólidos se filtraron por succión y se lavaron con agua (4 x 50 ml). La torta de filtro se disolvió en DCM (500 ml) y la solución se lavó con bicarbonato sódico saturado (100 ml). El lavado acuoso se extrajo con DCM (50 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con MgSO₄ y se concentraron para dar el compuesto **220** en forma de un sólido cristalino de color verde pálido (36,0 g, rendimiento del 92 %). p.f. 72-73 °C. RMN ¹H 400 MHz, CDCl₃) δ 1,93 (4H, m, J=5,6 Hz), 2,68 (4H, t, J=6,4 Hz), 3,27 (4H, c, J=6,4 Hz), 6,84 (1H, s), 9,37 (1H, s), 11,81 (1H, s). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₃H₁₅NO₂: 218,12, encontrado: 218,12.

Ejemplo de referencia 21

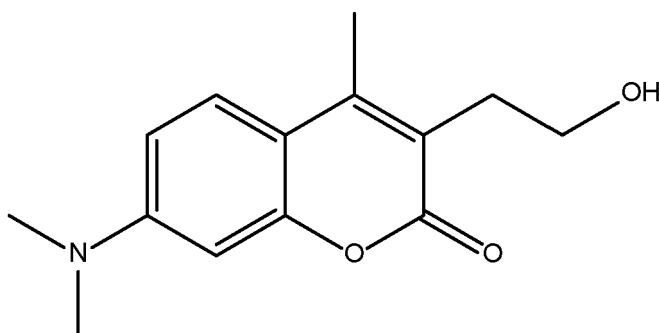
40 Preparación del compuesto 221

**221****10-(4-hidroxipiperidin-1-carbonil)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-11(5H)-ona**

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 17 usando el compuesto **220** en lugar de 4-(dietilamino)-2-hidroxibenzaldehído para dar el compuesto **221** en forma de un sólido de color amarillo con un rendimiento del 82 %. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,60 (2H, s a), 1,92 (2H, s a), 1,97 (4H, t, J=4,4 Hz), 2,75 (2H, t, J=5,0 Hz), 2,87 (2H, t, J=5 Hz), 3,22 (1H, m), 3,30 (4H, t, J=4,8 Hz), 3,36 (1H, m), 3,60 (1H, m), 3,95 (1H, m), 4,17 (1H, m), 6,88 (1H, s), 7,73, (1H, s). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₁H₂₄N₂O₄: 369,18, encontrado: 369,18.

Ejemplo de referencia 22

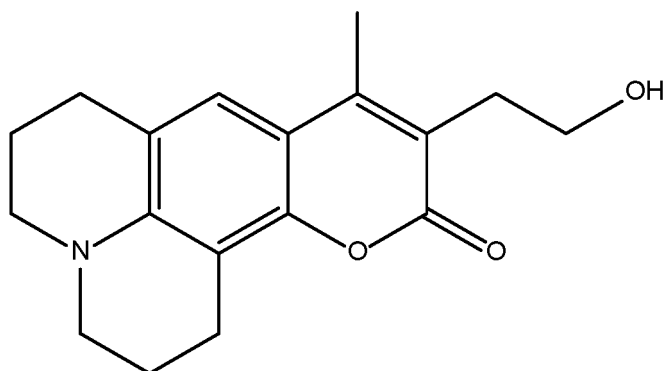
Preparación del compuesto 222

**222****7-(Dimetilamino)-3-(2-hidroxietil)-4-metil-2H-cromen-2-ona**

Un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético y un condensador de reflujo se cargó con 3-dimetilaminofenol (10 g, 72,9 mmol), α-acetil-butirolactona (10,3 g, 80,2 mmol), cloruro de cinc (13,9 g, 102 mmol) y etanol absoluto (100 ml). La reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. Después de enfriar la reacción se concentró y se vertió en agua (600 ml) más HCl 1 N (120 ml). La mezcla se extrajo con DCM (3 x 200 ml). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 500 ml) y salmuera (500 ml), se secó con MgSO₄ y se concentró para dar 9,40 gramos de un sólido de color castaño rojizo. Este sólido se recrystalizó en IPA (25 ml) para dar el compuesto **222** en forma de un sólido de color castaño claro (3,96 g, rendimiento del 22 %). p.f. 141-145 °C RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2,34 (3H, s), 2,68 (2H, t, J=7,0 Hz), 2,99 (6H, s), 3,47 (2H, c, J=6,5 Hz), 4,65 (1H, t, J=5,8 Hz), 6,51 (1H, d, J=2,4 Hz), 6,71 (1H, dd, J = 2,8, 9,2 Hz), 7,53 (1H, d, J = 8,8 Hz). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₄H₁₇NO₃: 248,13, encontrado: 248,13. Anál. calc. para C₁₄H₁₇NO₃: C, 68,00; H, 6,93; N, 5,66; Encontrado: C, 67,73, H, 6,74; N, 5,82.

Ejemplo de referencia 23

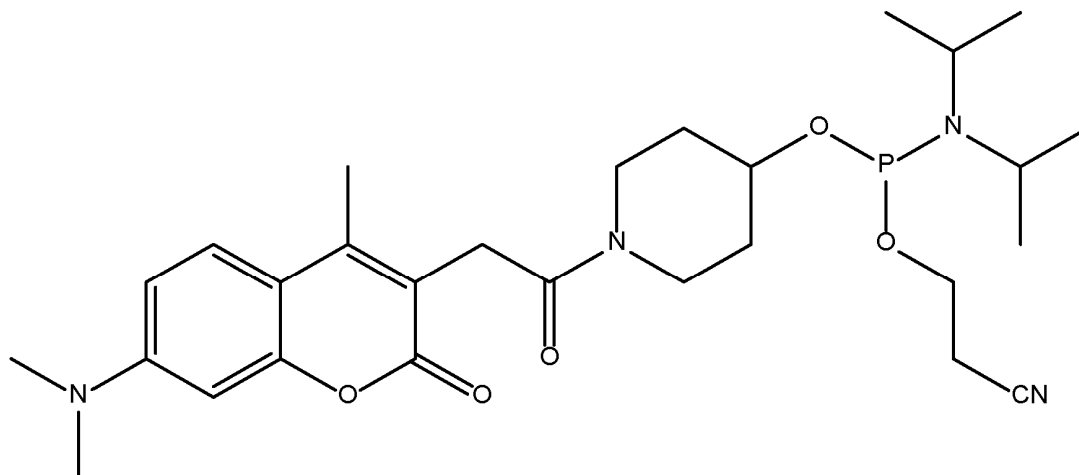
Preparación del compuesto 223

**223****10-(2-hidroxietil)-9-metil-2,3,6,7-tetrahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-11(5H)-ona**

- 5 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 21 usando 8-hidroxi julolidina en lugar de 3-dimetil-aminofenol para dar el compuesto **223** en forma de un sólido de color castaño con un rendimiento del 34 %. p.f. 146-148 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,87 (4H, c, J=6,0 Hz), 2,29 (3H, s), 2,66 (3H, t, J=7,2 Hz), 2,71 (3H, c, J=6,8 Hz), 3,20 (4H, c, J=6,0 Hz), 3,44 (1H, c, J=6,0 Hz), 4,62 (1H, t, J=5,6 Hz), 7,11 (1H, s). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₈H₂₁NO₃: 300,16, encontrado: 300,16. Anál. calc. para C₁₈H₂₁NO₃: C, 72,22; H, 7,07; N, 4,68; Encontrado: C, 71,82; H, 7,07; N, 4,75.

Ejemplo 24

Preparación del compuesto 224

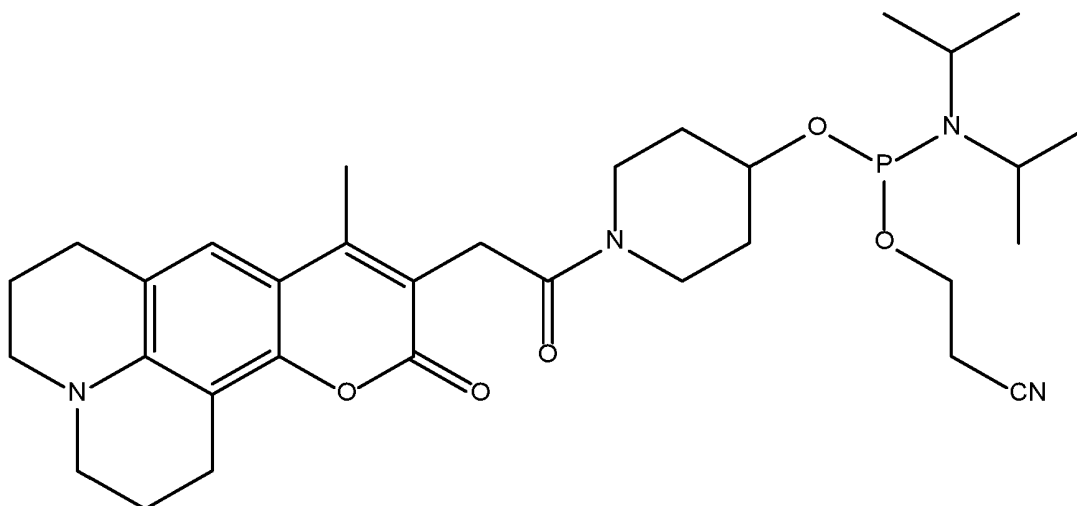
**224****(1-(2-(7-(dimetilamino)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-3-il)acetil)piperidin-4-il) diisopropilfosforamidita de 2-cianoetilo**

- 20 Un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético se cargó con el compuesto **212** (6 g, 14,0 mmol, 80 % puro) y DMF (50 ml). Se añadió 1H-tetrazol (294 mg, 4,2 mmol) se añadió a la suspensión, seguido de una solución de 3-((bis(diisopropilamino)fosfino)oxi)-propanonitrilo (5,05 g, 16,8 mmol) en DMF (15 ml). Después de agitar durante 15 horas a TA, se añadió 3-((bis(diisopropilamino)fosfino)oxi)propanonitrilo adicional (2,52 g, 8,4 mmol).
- 25 Después de un adicional de 15 horas, la solución se vertió en una solución saturada de bicarbonato sódico (700 ml) y se extrajo con DCM (3 x 200 ml). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico (2 x 400 ml) y salmuera (400 ml). El secado con MgSO₄, seguido de la concentración dio 11,7 gramos de jarabe de color verde pálido. Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna en alúmina con DCM del 50 % al 100 %/éter de petróleo más TEA al 1 % para dar el compuesto **224** en forma de un sólido de color amarillo pálido
- 30 (4,58 g, rendimiento del 60 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,19 (12H, m), 1,25 (6H, m), 1,41 (3H, d, J=6,4 Hz), 1,6-

1,9 (5H, m), 2,40 (3H, m), 2,64 (2H, m), 3,04 (6H, s), 3,5-3,9 (10H, m), 4,11 (2H, m), 6,50 (1H, d, J=2,8 Hz), 6,62 (1H, dd, J = 2,4, 8,8 Hz), 7,45 (1H, d, J = 8,8 Hz). RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) δ 146,209, 146,397. EM (ES⁺) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₈H₄₁N₄O₅P: 545,29, encontrado: 545,29.

5 Ejemplo 25

Preparación del compuesto 225



225

10

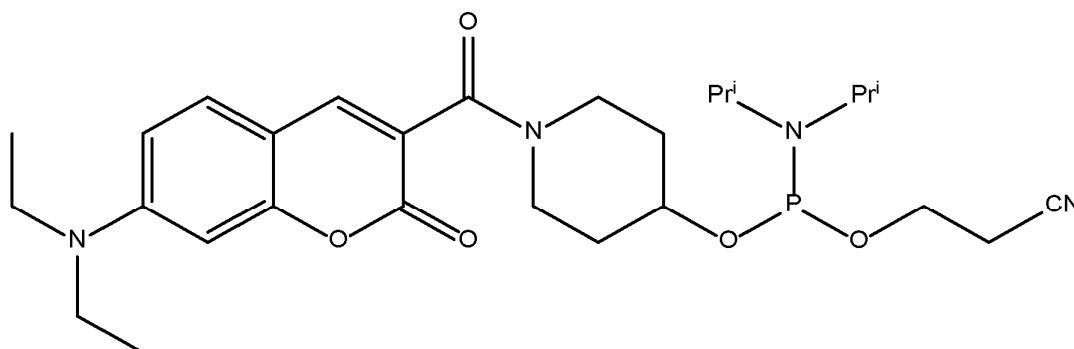
(1-(2-(9-metil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetil)piperidin-4-il) diisopropilfosforamidita de 2-cianoetilo

15

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 24 usando el compuesto **214** en lugar del compuesto **212** para dar el compuesto **225** en forma de un semisólido de color amarillo con un rendimiento del 38 %. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,17-1,25 (12H, m), 1,30 (2H, d, J=6,8 Hz), 1,16-2,0 (4H, m), 1,97 (4H, m), 2,36 (3H, d, J=2,8 Hz), 2,64 (2H, dt, J=2,4 Hz), 2,78 (2H, t, J=6,2 Hz), 2,88 (2H, m), 3,23 (4H, m), 3,4-3,9 (10H, m), 7,02 (1H, s). RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) δ 146,159, 146,329. EM (ES⁺) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₃₂H₄₅N₄O₅P: 597,32, encontrado: 496,20 (M-iPr₂N).

20 Ejemplo de referencia 26

Preparación del compuesto 226



226

25

(1-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromene-3-carbonil)piperidin-4-il) diisopropilfosforamidita de 2-cianoetilo

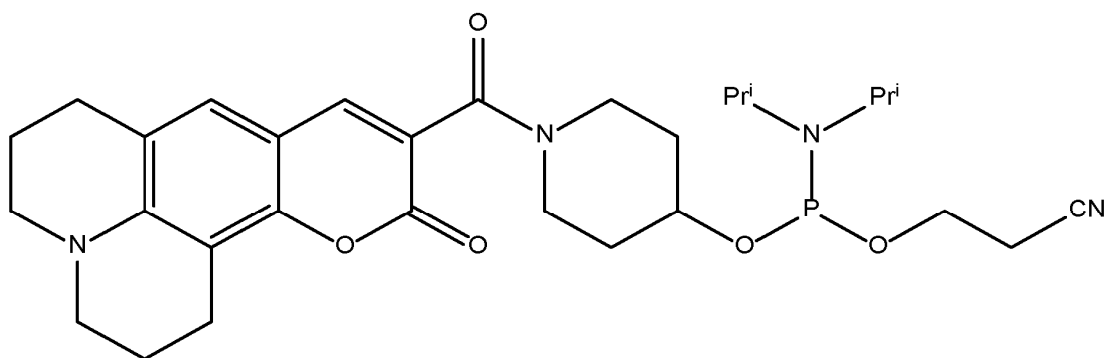
30

Un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético se cargó con el compuesto **217** (8 g, 23,2 mmol) y DCM (75 ml). Se añadió 1H-tetrazol (488 mg, 7,0 mmol), seguido de una solución de 3-((bis(diisopropilamino)fosfino)oxi)propanonitrilo (8,40 g, 27,9 mmol) en DCM (25 ml). Después de agitar durante 15

horas a TA, la solución se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico (2 x 250 ml), se secó con MgSO_4 y se concentró para dar 12,7 gramos de espuma de color dorado. Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna en alúmina con DCM del 50 % al 100 %/éter de petróleo más TEA al 1 % para dar el compuesto **226** en forma de un jarabe de color dorado (10,3 g, rendimiento del 81 %). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,1-1,3 (18H, m), 1,77 (2H, m), 1,92 (2H, m), 2,63 (2H, c, $J=6,8$ Hz), 3,35 (1H, m), 3,43 (4H, c, $J=7,1$ Hz), 3,62 (3H, m), 3,76 (2H, m), 3,83 (2H, m), 4,13 (1H, m), 6,47 (1H, d, $J=2,4$ Hz), 6,59 (1H, dd, $J=2,8, 5,0$ Hz), 7,29 (1H, m), 7,81 (1H, s). RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) δ 146,208, 146,384. EM (ES+) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$: 545,29, encontrado: 545,29.

Ejemplo de referencia 27

Preparación del compuesto 227



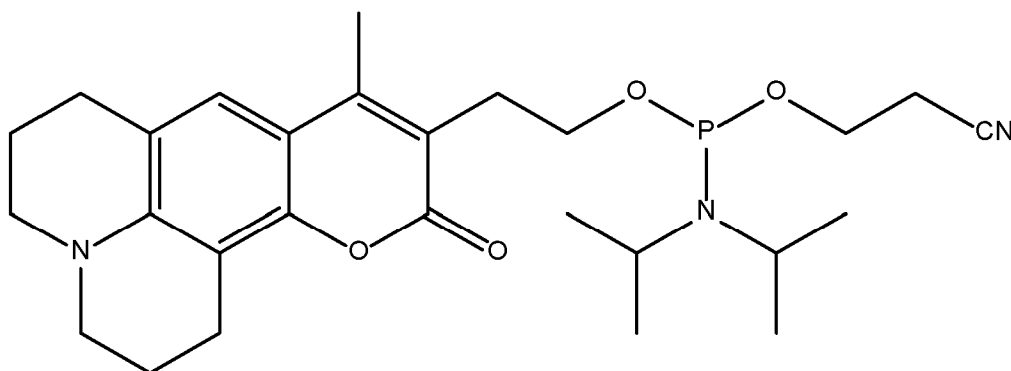
227

(1-(11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-carbonil)piperidin-4-il)diisopropilfosforamidita de 2-cianoetilo

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 26 usando el compuesto **221** en lugar del compuesto **217** para dar el compuesto **227** en forma de una espuma de color amarillo con un rendimiento del 40 %. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0,97 (2H, s a), 1,14 (12H, m), 1,55 (2H, m), 1,76 (2H, m), 1,97 (4H, m), 2,73 (5H, m), 3,26 (4H, m), 3,43 (1H, m), 3,57 (1H, m), 3,71 (1H, m), 4,06 (1H, m), 7,06 (1H, s), 7,84 (1H, s). RMN ^{31}P (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 145,985. EM (ES+) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$: 569,29; encontrado: 569,29.

Ejemplo de referencia 28

Preparación del compuesto 228



228

(2-(9-metil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)etil)diisopropilfosforamidita de 2-cianoetilo

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 18 usando el compuesto **223** en lugar del compuesto **217** para dar el compuesto **228** en forma de un vidrio de color amarillo pálido con un rendimiento del 72 %. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,15 (12H, t, $J=7,2$ Hz), 1,98 (4H, m), 2,37 (3H, s), 2,60 (2H, t, $J=6,8$ Hz), 2,79 (2H, t, $J=6,2$ Hz), 2,88 (2H, t, $J=6,4$ Hz), 3,23

(4H, m), 3,56 (2H, m), 3,77 (4H, m) 7,01 (1H, s). RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) δ 147,581. EM (ES+) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_4\text{P}$: 500,27, encontrado: 399,15 ($\text{M}-i\text{-Pr}_2\text{N}$).

Ejemplo 29

5

Síntesis en fase sólida de oligonucleótidos marcados con reactivos de síntesis de fosforamidita de cumarina

Para los reactivos de cumarina estables a amoniaco (**224**, **225** o **228**), los grupos protectores de los grupos amino exocíclico de A, C y G eran benzoil, acetilo y dimetilformamida, respectivamente. En el caso de las cumarinas inestables a amoniaco (**226** o **227**) A, C y G se protegieron con fenoxiacetilo, acetilo y 4-isopropilfenoxacetilo.

10

Procedimiento general: Los oligonucleótidos marcados con los reactivos de síntesis de fosforamida de cumarina se hicieron a una escala de 200 nm en CPGs de 3'-glicolato (van der Laan, et. Al, Tetrahedron Lett. 38: 2252 (1997)) con monómeros de cianoetil fosforamidita en un sintetizador de ADN automatizado Biosearch 8700 o Expedite NAS 8900. Una vez completada la síntesis, se eliminó el grupo 5' DMT (con ácido dicloroacético al 3 % en diclorometano) y se lavó la columna de síntesis con acetonitrilo seco.

15

Para acoplar la cumarina al oligonucleótido, se disolvieron 100 mg de fosforamiditas de cumarina en acetonitrilo o DCM (1500 μl). Una porción (500 μl) de la solución se aplicó a la columna con una jeringa de 1 ml. En el otro extremo de la columna se colocó una jeringa complementaria que contenía etil tiotetrazol 0,25 M o 1H-tetrazol 0,45 M en acetonitrilo (500 μl). Las soluciones se mezclaron sobre la CPG con las jeringas y se dejaron reposar durante 10 minutos. Este proceso se repitió dos veces más con el resto de la solución de fosforamidita. Las columnas se volvieron a colocar en el sintetizador de ADN y se lavaron con acetonitrilo seguido de una solución oxidante (yodo 0,02 M en una mezcla de THF (70 %):piridina (20 %):agua (10 %)). Después de 30 segundos, esta solución se lavó con acetonitrilo y el contenido de cada columna se arrojó en frascos de 2 ml.

20

25

Ejemplo 30

Corte y desprotección de oligonucleótidos en CPG

30

Procedimiento A (para oligonucleótidos estables a amoniaco preparados a partir de fosforamiditas de cumarina **224**, **225** o

228): Los oligonucleótidos en CPG se sometieron a una desprotección estándar con amoniaco (1 ml de NH_4OH concentrado, 60 °C, 1-2 horas). La CPG se separó por filtración y el filtrado se concentró al vacío para dar el oligonucleótido marcado con cumarina bruto. Las muestras se disolvieron en agua desionizada (1 ml) para el análisis de HPLC y LCMS. Las muestras se disolvieron en tampón qPCR para el análisis espectral.

35

Procedimiento B (para oligonucleótidos inestables a amoniaco preparados a partir de fosforamiditas de cumarina **226** o **227**): Los oligonucleótidos en CPG se trataron con 1 ml de $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ 50 mM durante la noche. La mezcla se acidificó con AcOH, la CPG se separó por filtración y el filtrado se concentró al vacío para dar el oligonucleótido marcado con cumarina bruto. Las muestras se disolvieron en agua desionizada (1 ml) para el análisis de HPLC y LCMS. Las muestras se disolvieron en tampón qPCR para el análisis espectral.

40

Ejemplo 31

Purificación de oligonucleótidos brutos

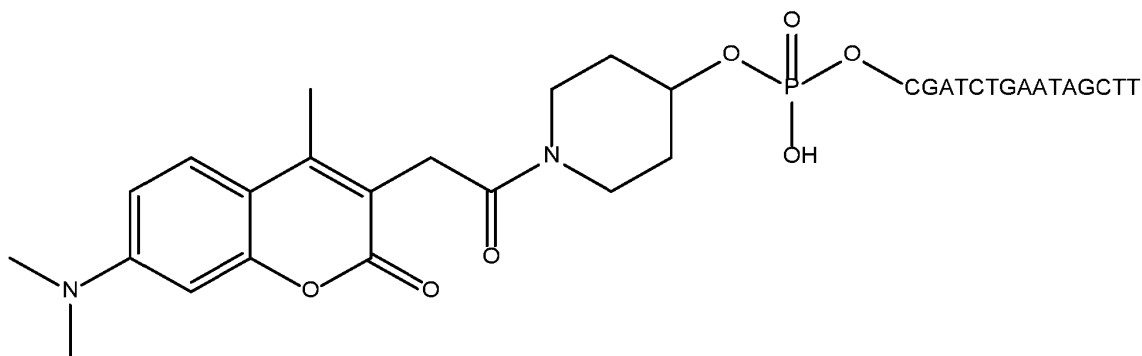
Los oligonucleótidos modificados se purificaron por HPLC en una columna preparativa RP-C18 (10 x 100 mm, 5 μM , 130 Å, Xbridge) utilizando las siguientes condiciones: A) tampón trietilamina/ácido acético (50 mM); B) acetonitrilo; gradiente B al 0-95 % durante 10 min, caudal 10 ml/min, detección UV/vis a 260 y 400 nm.

50

Ejemplo 32

Preparación del oligonucleótido 232

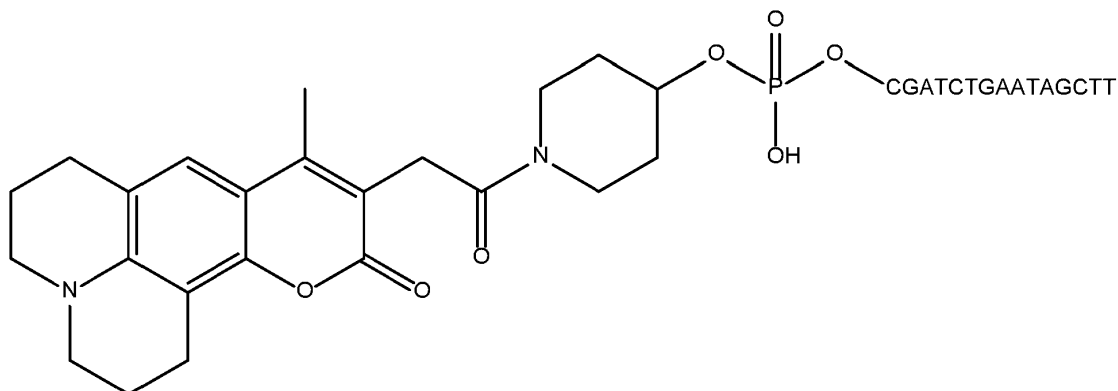
55

**232**

Se preparó un fragmento de ADN 3'-TTCGATAAGTCTAGC-5' marcado en el hidroxilo 5' con el compuesto **224** como se describe en el ejemplo 29. El producto **232** se escindió del soporte y se desprotegió como se describe en el Procedimiento A del ejemplo 30. MS (ESI): calc. 4973,4, encontrado: 4974,0. Abs/Em = 380/488 nm en tampón qPCR.

Ejemplo 33

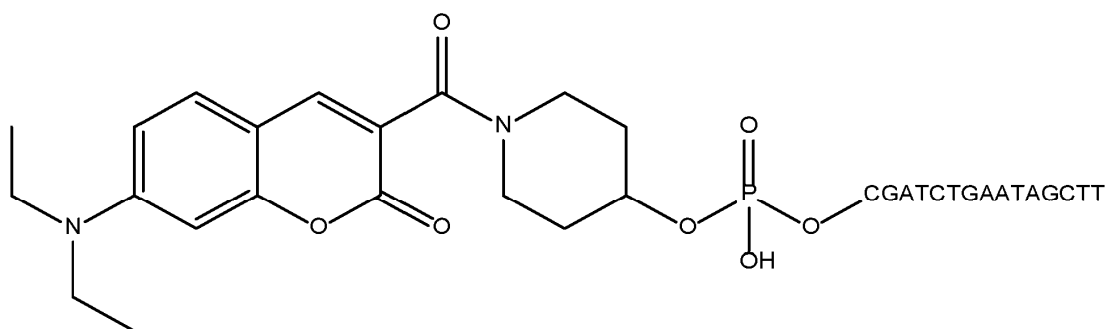
Preparación del oligonucleótido 233

**233**

Se preparó un fragmento de ADN 3'-TTCGATAAGTCTAGC-5' marcado en el hidroxilo 5' con el compuesto **225** como se describe en el ejemplo 29. El producto **233** se escindió del soporte y se desprotegió como se describe en el Procedimiento A del ejemplo 30. MS (ESI): calc. 5026,5, encontrado: 5025,0. Abs/Em = 398/498 nm en tampón qPCR.

Ejemplo 34

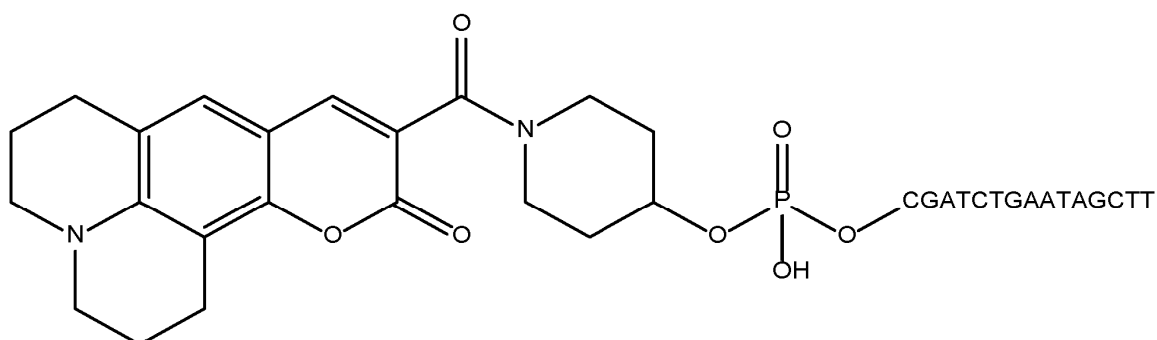
Preparación del oligonucleótido 234

**234**

Se preparó un fragmento de ADN 3'-TTCGATAAGTCTAGC-5' marcado en el hidroxilo 5' con el compuesto **226** como se describe en el ejemplo 29. El producto **234** se escindió del soporte y se desprotegió como se describe en el Procedimiento B del ejemplo 30. MS (ESI): calc. 4974,4, encontrado: 4974,0. Abs/Em = 418/490 nm en tampón qPCR.

Ejemplo 35

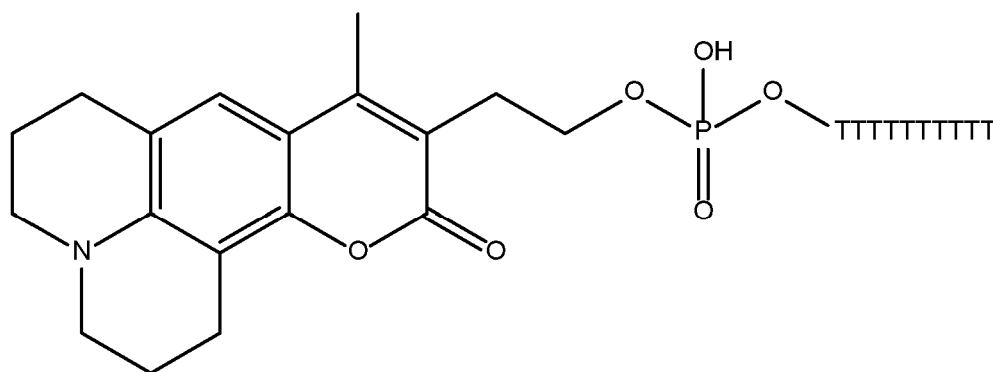
Preparación del oligonucleótido 235

**235**

Se preparó un fragmento de ADN 3'-TTCGATAAGTCTAGC-5' marcado en el hidroxilo 5' con **227** como se describe en el ejemplo 29. El producto **235** se escindió del soporte y se desprotegió como se describe en el Procedimiento B del ejemplo 30. MS (ESI): calc. 4997,4, encontrado: 4998,0 Abs/Em = 435/501 nm en tampón qPCR.

Ejemplo de referencia 36

Preparación del oligonucleótido 236

**236**

Se preparó un fragmento de ADN 3'-TTTTTTTTT-5' marcado en el hidroxilo 5' con el compuesto **228** como se describe en el ejemplo 29. El producto **236** se escindió del soporte y se desprotegió como se describe en el Procedimiento A del ejemplo 30. MS (ESI): calc. 3341,1, encontrado: 3341,0.

5

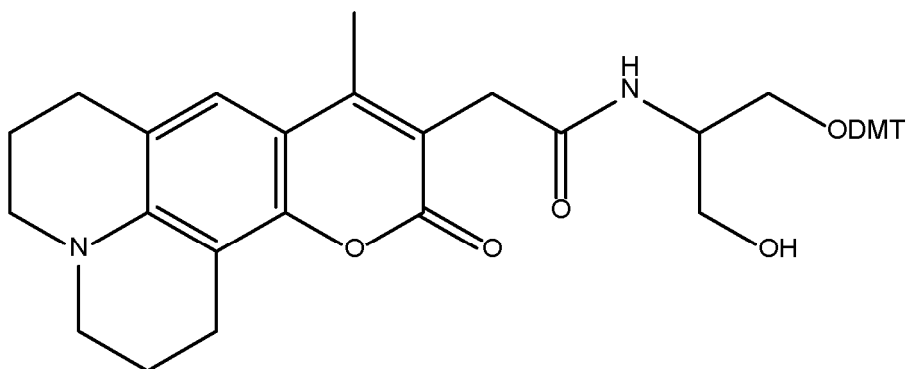
RESULTADOS

Tabla 1

Propiedades espectrales de los oligonucleótidos marcados con cumarina en tampón qPCR		
Compuesto	Absorbancia	Emisión
232	380 nm	480 nm
233	398 nm	498 nm
234	418 nm	490 nm
235	435 nm	501 nm

10 Ejemplo de referencia 37

Preparación del compuesto 237



237

15

N-(1-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3-hidroxiopropan-2-il)-2-(9-metil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetamida

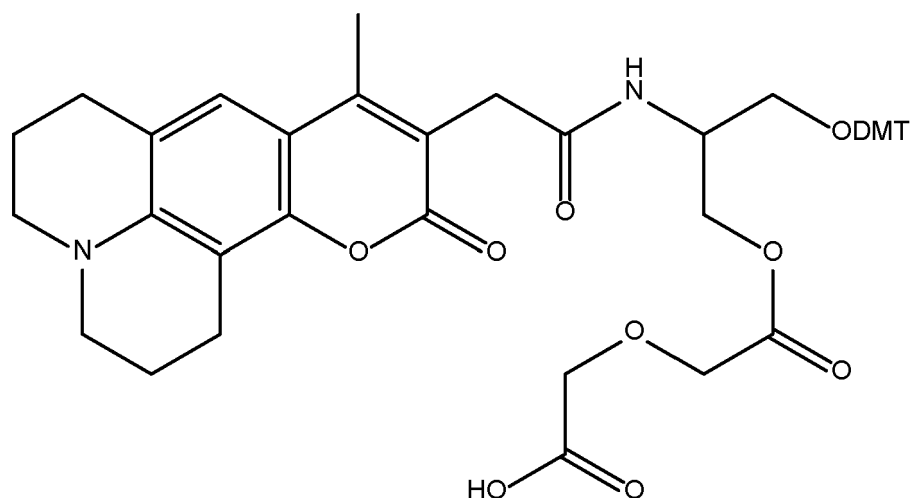
20

Se añadió el compuesto **210** (5 g, 12,2 mmol) a una solución de serinol ODMT (6,00 g, 15,2 mmol) y trietilamina (10 ml, 71,7 mmol) en DMF (200 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético. Después de agitar durante 72 horas a TA, la reacción se concentró al vacío para dar un residuo que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con piridina al 2 %/EtOAc para dar el compuesto **237** (7,2 g, rendimiento del 86 %).

25

Ejemplo de referencia 38

Preparación del Compuesto **238**

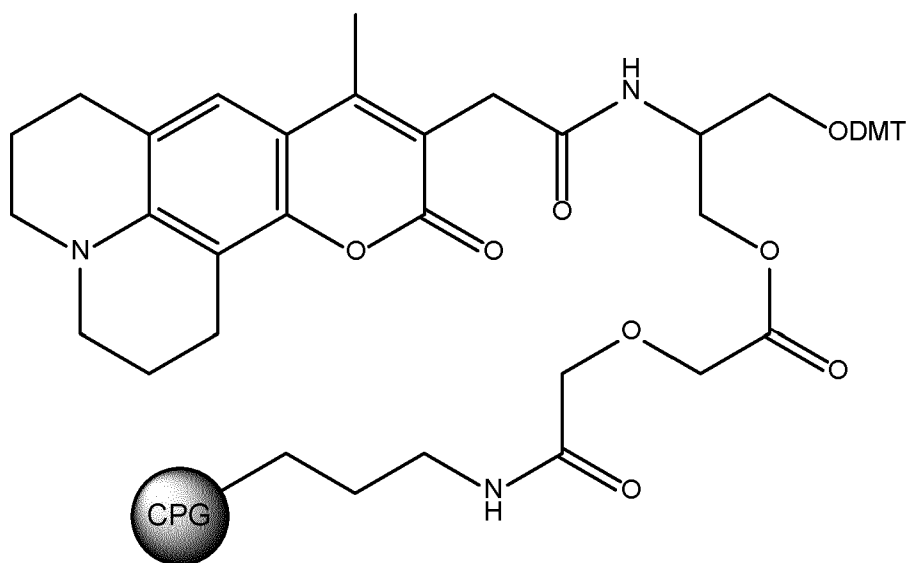
**238**

Ácido 2-(2-(3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-2-(2-(9-metil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetamido)propoxi)-2-oxoetoxi)acético

Se secó el compuesto **237** (5 g, 7,26 mmol) disolviéndolo en piridina en un matraz de fondo redondo y se concentró al vacío. Se añadieron piridina (200 ml) y anhídrido diglicólico (5,00 g, 43,1 moles). Después de agitar durante 72 horas, se añadió anhídrido diglicólico adicional (5,00 g, 43,1 moles). La mezcla se agitó durante un adicional de 24 horas y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en DCM (200 ml), se lavó con una solución saturada de KH_2PO_4 (200 ml), se secó (NaSO_4) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna en alúmina con MeOH al 5-30 %/DCM que contenía TEA al 2 % y piridina al 2 % para dar el compuesto **238** (6,00 g, rendimiento del 91 %) en forma de la sal de TEA.

Ejemplo de referencia 39

Preparación del Compuesto **239**

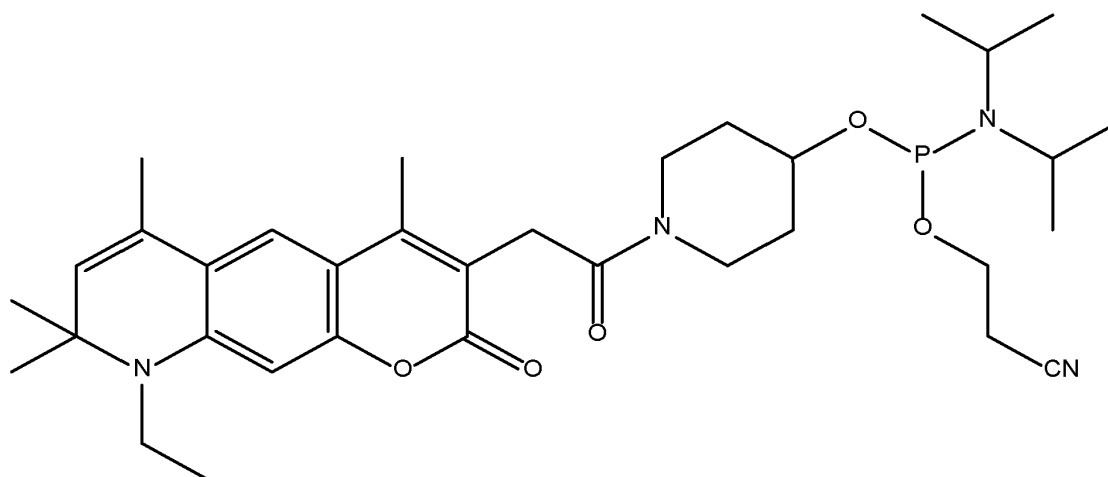
**239**

2-(2-oxo-2-((3-CPG-propil)amino)etoxi)acetato de 3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-2-(2-(9-metil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetamido)propilo

Se disolvió el compuesto **238** (3 g, 3,31 mmol) en DMF (75 ml). Se añadieron BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-ilo-tris(dimetilamino)fosfano, 3 g, 6,78 mmol), piridina (10 ml) y aminopropil CPG (10 g, 500 A, 130 μ mol/g carga). Después de la mezcla sat. a TA durante 18 horas, se enjuagó el CPG con MeCN (3 x 100 ml). Se añadieron N-metilimidazol (239 M en THF, 50 ml) y anhídrido acético (50 ml). Después de reposar a temperatura ambiente durante 10 min, la CPG se enjuagó con MeCN (2 x 100 ml), MeOH (2 x 100 ml) y DCM (2 x 100 ml) y se secó al vacío para el CPG derivatizado final **239**. La destilación y la cuantificación colorimétrica de una muestra indicaron una carga de 35 μ mol/g de CPG.

10 Ejemplo 40

Preparación del Compuesto **240**



240

15

(1-(2-(9-Etil-4,6,8,8-tetrametil-2-oxo-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-3-il)acetil)piperidin-4-il)diisopropilfosforamidita de 2-cianoetilo

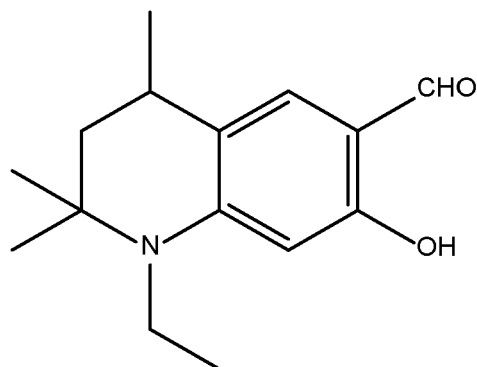
20

Un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético se cargó con el compuesto **216** (2,12 g, 5,0 mmol) y DCM (30 ml). Se añadió 1H-tetrazol (195 mg, 1,5 mmol) a la suspensión, seguido de una solución de 3-((bis(diisopropilamino)fosfino)oxi)-propanonitrilo (3,32 g, 11 mmol) en DCM (5 ml). Después de agitar durante 3,5 horas a TA, se añadió 3-((bis(diisopropilamino)fosfino)oxi)propanonitrilo adicional (2,00 g, 6,6 mmol). Después de un adicional de 15 horas, la solución se vertió en una solución saturada de bicarbonato sódico (250 ml) y se extrajo con DCM (3 x 100 ml). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico (2 x 200 ml) y salmuera (300 ml). El secado con Na_2SO_4 , seguido de la concentración dio 6,20 gramos de jarabe de color amarillo pálido. Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna en alúmina con DCM del 50 % al 100 %/éter de petróleo más TEA al 1 % para dar el compuesto **240** en forma de un jarabe de color amarillo pálido (1,74 g, rendimiento del 56 %). EM (ES+) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$: 624,34, encontrado: 523,22 ($\text{M}-i\text{-Pr}_2\text{N}$).

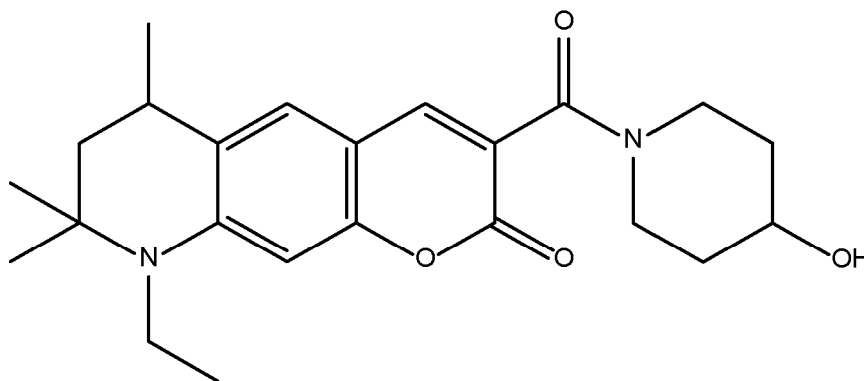
25

30 Ejemplo de referencia 41

Preparación del Compuesto **241**

**241****1-Etil-7-hidroxi-2,2,4-trimetil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-6-carbaldehído**

- 5 Se disolvió 1-etil-2,2,4-trimetil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-7-ol (21,9 g, 100 mmol) en anhídrido acético (70 ml) y se calentó a 100 °C en una atmósfera de N₂ durante 2 horas. Esta solución se concentró. Se añadieron agua (150 ml) y DCM (100 ml) al residuo y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con DCM (2 x 150 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con agua (2 x 500 ml), se lavó con salmuera (500 ml), se secaron (MgSO₄) y se concentraron para dar un jarabe. Se añadió POCl₃ lentamente a DMF (60 ml), se enfrió en un baño de hielo y la mezcla se agitó durante 30 min. El jarabe anterior se disolvió en DMF (25 ml) y se añadió durante 10 minutos a la mezcla de POCl₃/DMF. El baño de hielo se retiró y la reacción se agitó a TA durante 2 horas y después se calentó a 100 °C durante 1 hora. La reacción se enfrió y se vertió en hielo (250 g) con agitación. La mezcla se extrajo con DCM (2 x 250 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con agua (500 ml), se lavaron con salmuera (500 ml), se secaron (MgSO₄) y se concentraron para dar un jarabe de color verde oscuro (28,2 g). Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con MeOH del 0 al 1 %/DCM para dar el compuesto **241** en forma de un jarabe de color ámbar (22,7 g, rendimiento del 92 %). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₅H₂₁NO₂: 247,16, encontrado: 247,16.

*Ejemplo de referencia 42*Preparación del Compuesto **242****242****9-Etil-3-(4-hidroxipiperidin-1-carbonil)-6,8,8-trimetil-6,7,8,9-tetrahidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-2-ona**

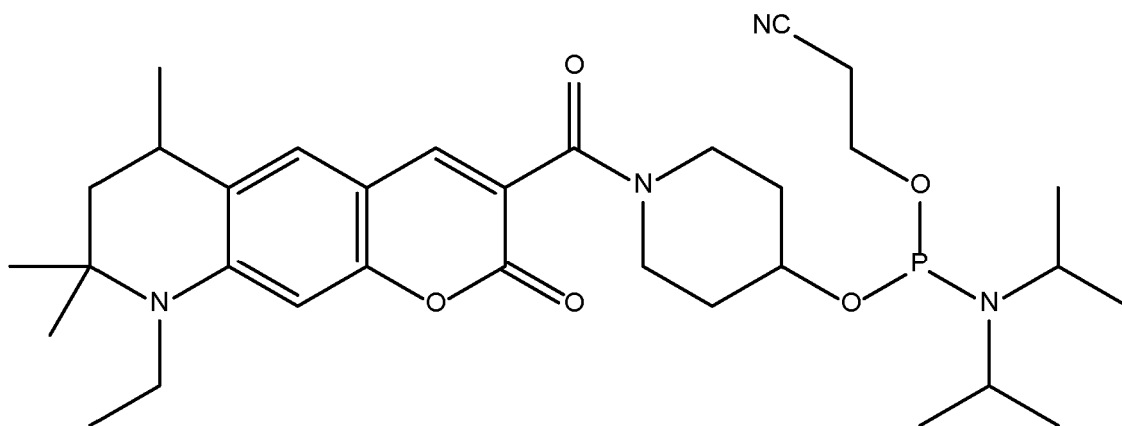
- Se añadieron el compuesto **241** (6,18 g, 25 mmol), malonato de dietilo (4,81 g, 30 mmol), 4-hidroxipiperidina (9,10 g, 90 mmol), piperidina (4 gotas) y ácido acético (4 gotas) a un vial equipado con una barra magnética. La reacción se calentó a 100 °C durante 3,5 horas. Después de enfriar, el jarabe se vertió en agua (300 ml) y se extrajo con DCM (3 x 150 ml). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 200 ml), ácido cítrico acuoso 1 M (3 x 200 ml) y salmuera (350 ml), después se secó con MgSO₄ y se concentró para dar 8,14 g de una espuma de color ámbar oscuro. Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con MeOH del 0 % al 5 %/DCM para dar el

compuesto **242** en forma de una espuma de color dorada (6,57 g, rendimiento del 66 %). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₃H₃₀N₂O₄: 398,22, encontrado: 398,22.

Ejemplo de referencia 43

5

Preparación del Compuesto **243**



243

10 (1-(9-Etil-6,8,8-trimetil-2-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-3-carbonil)piperidin-4-il)diisopropilfosforamidito de 2-cianoetilo

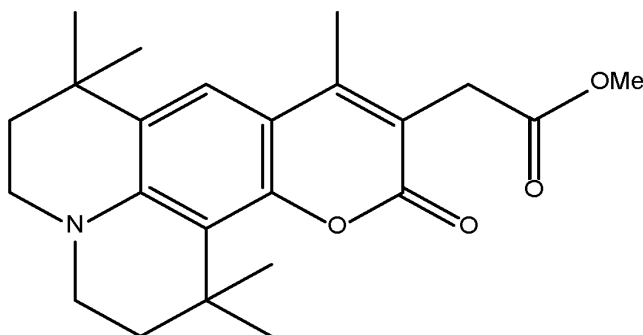
Un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético se cargó con el compuesto **242** (5,98 g, 15 mmol) y MeCN (100 ml). Se añadió 1H-tetrazol (315 mg, 4,5 mmol), seguido de una solución de 3-((bis(diisopropilamino)fosfino)oxi)propanonitrilo (5,43 g, 18 mmol) en MeCN (10 ml). Después de agitar durante 15 horas a TA, la solución se vertió en una solución saturada de bicarbonato sódico (100 ml) y se extrajo con DCM (2 x 100 ml). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato sódico (200 ml) y salmuera (200 ml). El secado con Na₂SO₄, seguido de la concentración dio 8,66 gramos de espuma de color dorado. Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna en alúmina con DCM del 50 % al 100 %/éter de petróleo más TEA al 1 % para dar el compuesto **243** en forma de una espuma pegajosa de color amarillo (6,90 g, rendimiento del 77 %). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₃₂H₄₇N₄O₅P: 598,33, encontrado: 598,33.

15

20

Ejemplo 44

25 Preparación del Compuesto **244**



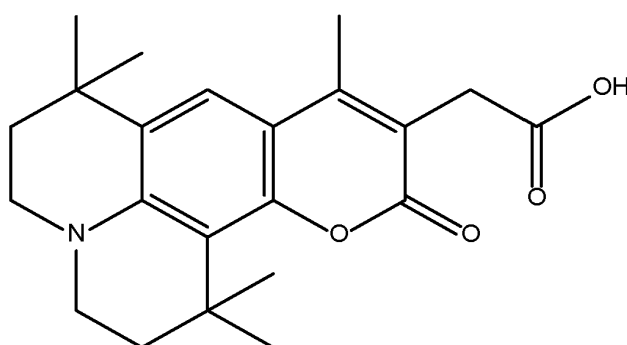
244

30 2-(1,1,7,7,9-Pentametil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetato de metilo

Un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético se cargó con 3-1,1,7,7-tetrametil-1,2,3,5,6,7-hexahidropirido[3,2,1-ij]quinolin-8-ol (24,5 g, 100 mmol), 2-acetilsuccinato de dimetilo (37,6 g, 200 mmol) y cloruro de cinc (38,2 g, 280 mmol). La mezcla se calentó a 120 °C durante 48 horas y se enfrió. La masa de reacción se repartió entre DCM (500 ml) y agua (1 l) más HCl concentrado (30 ml). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (3 x 400 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (1 l) más HCl concentrado (30 ml), con agua corriente (1 l) y con salmuera (1 l). La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se concentró para dar 36,0 gramos de un jarabe de color verde oscuro. Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con MeOH del 0 al 2 %/DCM para dar un jarabe de color pardo oscuro que se disolvió en éter (400 ml), se lavó con KOH 0,5 N (2 x 200 ml, 100 ml), se lavó con salmuera (400 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró para dar una espuma de color pardo oscuro (19,4 g). La recristalización en IPA (30 ml) dio el compuesto **244** en forma de una espuma pegajosa de color amarillo (9,33 g, rendimiento del 24 %). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₃H₂₉NO₄: 383,21, encontrado: 383,21.

Ejemplo 45

Preparación del Compuesto **245**



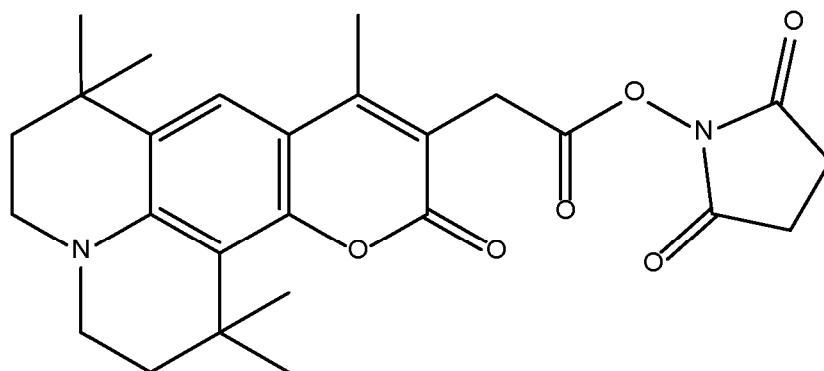
245

Ácido 2-(1,1,7,7,9-pentametil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acético

La elución adicional de la purificación en columna de gel de sílice del ejemplo 44 anterior con MeOH al 10 %/DCM más AcOH al 1 % dio el compuesto **245** (5,00 g, rendimiento del 14 %) en forma de un sólido de color verde oscuro. La acidificación de los extractos básicos del Ejemplo 44 anterior produjo 3,20 gramos adicionales del compuesto **245** (3,20 g, rendimiento del 9 %). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₂H₂₇NO₄: 369,19, encontrado: 369,19

Ejemplo 46

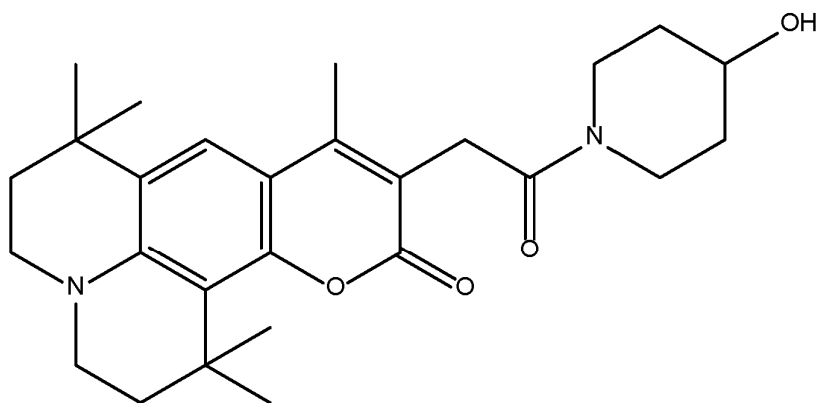
Preparación del Compuesto **246**



246

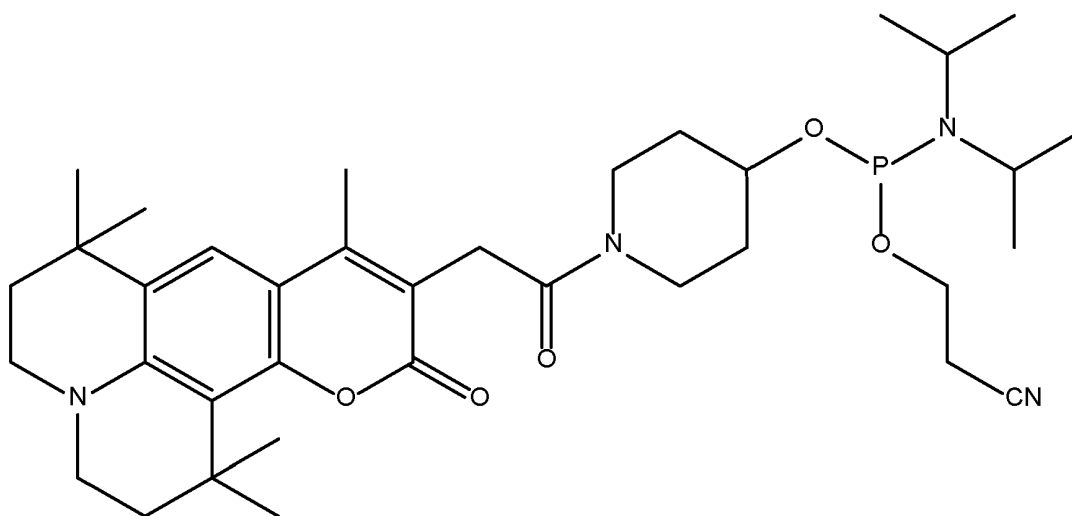
2-(1,1,7,7,9-Pentametil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

El compuesto **245** (8,10 g, 21,9 mmol) se hizo reaccionar con carbonato de N,N'-disuccinimidilo (6,74 g, 26,3 mmol) y DIEA (3,26 g, 25,2 mmol) en DMF (100 ml). Después de 15 horas de agitación a TA, la mezcla se vertió en HCl 40 mM frío (1,3 l). La filtración por succión dio un sólido de color amarillo que se lavó con agua (2 x 50 ml) y se secó para dar el compuesto **246** en forma de un sólido de color ámbar (8,70 g, rendimiento del 85 %).

*Ejemplo 47*Preparación del Compuesto **247****247****10-(2-(4-Hidroxipiperidin-1-il)-2-oxoetil)-1,1,7,7,9-pentametil-2,3,6,7-tetrahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-11(5H)-ona**

Se disolvieron el compuesto **246** (7,00 g, 15 mmol) y 4-hidroxi-piperidina (1,82 g, 18 mmol) en DMF (40 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético. Después de agitar durante 2,5 horas a TA, el matraz se mantuvo a -20 °C durante una noche. El precipitado se retiró por filtración y el filtrado se vertió en agua (800 ml). La mezcla se extrajo con DCM (4 x 100 ml), se lavó con agua (400 ml), se lavó con salmuera (400 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró para dar una espuma de color negro (6,56 g). Este material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con MeOH del 0 al 5 %/DCM para dar el compuesto **247** en forma de una espuma de color pardo oscuro (3,94 g, rendimiento del 58 %). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₇H₃₆N₂O₄: 452,27, encontrado: 452,27.

*Ejemplo 48*Preparación del Compuesto **248**

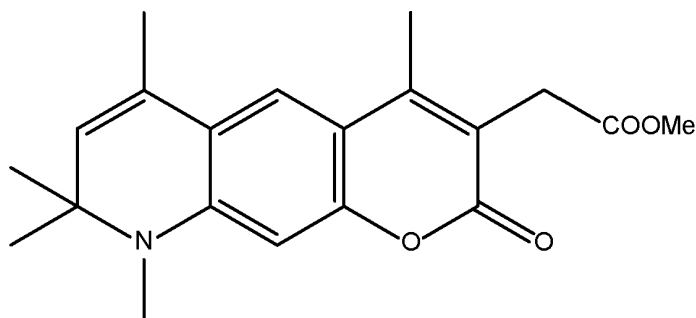
**248**

(1-(2-(1,1,7,7,9-Pentametil-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahidro-1H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]quinolin-10-il)acetil)piperidin-4-il) diisopropilfosforamidita de 2-cianoetilo

5 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 40 con el compuesto **247** (3,50 g, 7,73 mmol) en lugar del compuesto **216** y MeCN en lugar de DCM dio el compuesto **248** (4,75 g, rendimiento del 94 %) en forma de un jarabe de color ámbar. EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₃₆H₅₃N₄O₅P: 652,38, encontrado: 551,26 (M-*i*-Pr₂N).

10 *Ejemplo 49*

Preparación del Compuesto **249**

**249**

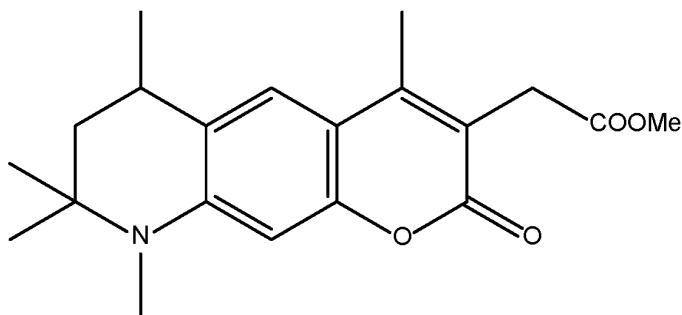
15 **2-(4,6,8,8,9-Pentametil-2-oxo-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-3-il)acetato de metilo**

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 6 usando 1,2,2,4-tetrametil-1,2-dihidroquinolin-7-ol (43,2 g, 228 mmol) en lugar de bromhidrato de 1-etil-2,2,4-trimetil-1,2-dihidroquinolin-7-ol para dar el compuesto **249** en forma de un sólido de color amarillo (26,2 g, rendimiento del 34 %). EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₀H₂₃NO₄: 341,16, encontrado: 341,16.

20 *Ejemplo 50*

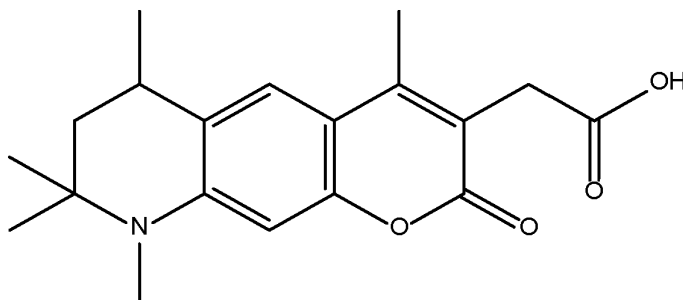
Preparación del Compuesto **250**

25

**250****2-(4,6,8,8,9-Pentametil-2-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-3-il)acetato de metilo**

- 5 Se disolvió el compuesto **249** (8,55 g, 25 mmol) en DCM (200 ml). Se añadieron trietilsilano (29,1 g, 250 mmol) y ácido trifluoracético (57,0 g, 500 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 13 horas. La mezcla se enfrió y se lavó con NaOH 1 N (500 ml), agua (500 ml) y salmuera (500 ml). El secado (MgSO₄) y la concentración dio el compuesto **250** (8,59 g, rendimiento del 100 %) en forma de un sólido de color castaño pálido. EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₀H₂₅NO₄: 343,18, encontrado: 343,18

10

*Ejemplo 51*Preparación del Compuesto **251**

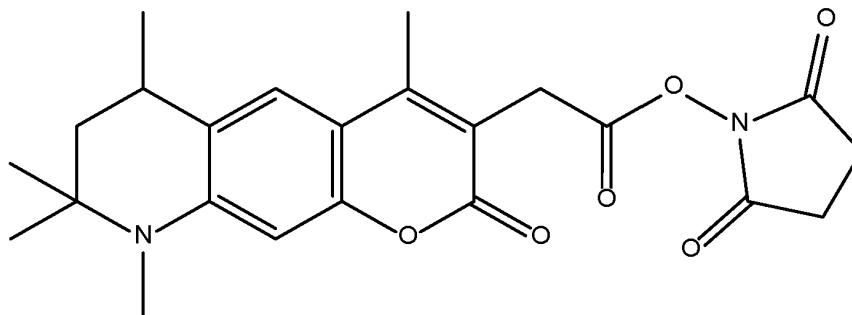
15

251**Ácido 2-(4,6,8,8,9-pentametil-2-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-3-il)acético**

- 20 Se siguió el procedimiento B del Ejemplo 3 usando el compuesto **250** (6,87 g, 20 mmol) en lugar del compuesto **202** para dar el compuesto **251** (5,09 g, rendimiento del 77 %) en forma de un sólido de color amarillo. EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₉H₂₃NO₄: 329,16, encontrado: 329,16.

Ejemplo 52

- 25 Preparación del Compuesto **252**



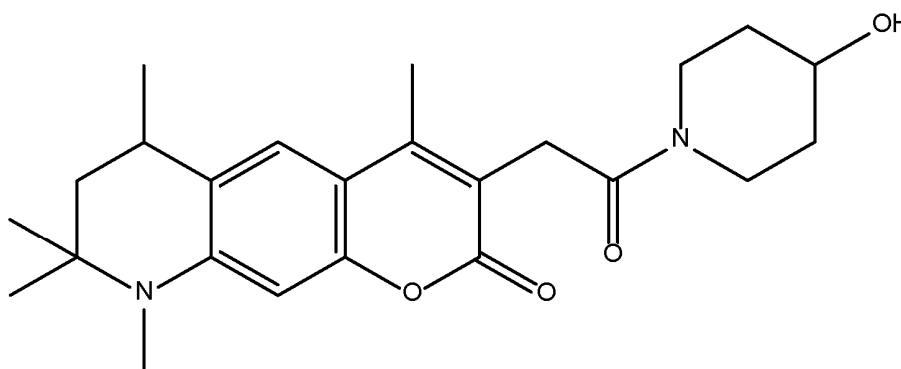
252

2-(4,6,8,8,9-Pentametil-2-oxo-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pirano[3,2-g] quinolin-3-il)acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 46 usando el compuesto **251** (3,95 g, 12 mmol) en lugar del compuesto **245** para dar el compuesto **252** (4,56 g, rendimiento del 89 %) en forma de un sólido de color amarillo.

Ejemplo 53

Preparación del Compuesto **253**



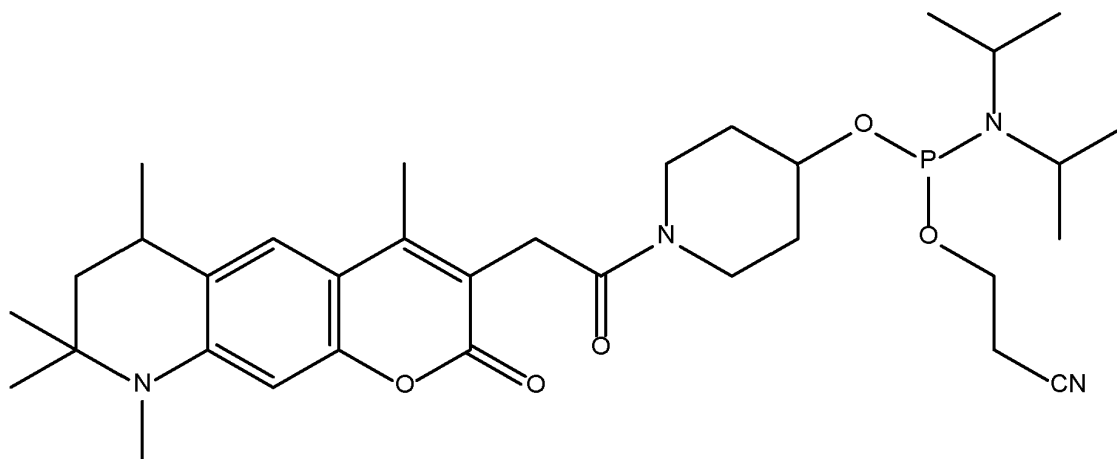
253

3-(2-(4-Hidroxipiperidin-1-il)-2-oxoetil)-4,6,8,8,9-pentametil-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-2-ona

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 16 con el compuesto **252** (4,00 g, 9,38 mmol) en lugar del compuesto **211** dio el compuesto **253** (3,90 g, rendimiento del 100 %) en forma de un sólido de color castaño. EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₄H₃₂N₂O₄: 412,24, encontrado: 412,24.

Ejemplo 54

Preparación del Compuesto **254**

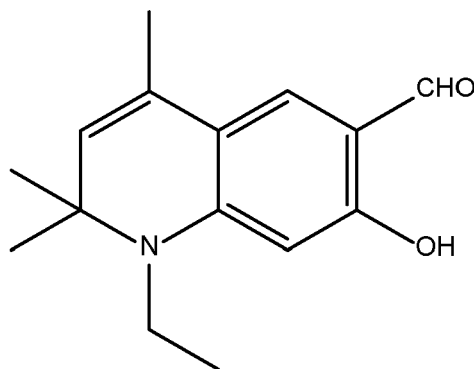
**254**

(1-(2-(4,6,8,8,9-Pentametil-2-oxo-6,7,8,9-tetrahidropirano[3,2-g]quinolin-3-il)acetil)piperidin-4-il)diisopropilfosforamidita de 2-cianoetilo

5 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 40 con el compuesto **253** (3,50 g, 8,48 mmol) en lugar del compuesto **216** y MeCN en lugar de DCM dio el compuesto **254** (3,90 g, rendimiento del 75 %) en forma de una espuma de color dorado. EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₃₃H₄₉N₄O₅P: 612,34, encontrado: 612,34.

10 *Ejemplo de referencia 55*

Preparación del Compuesto **255**

**255**

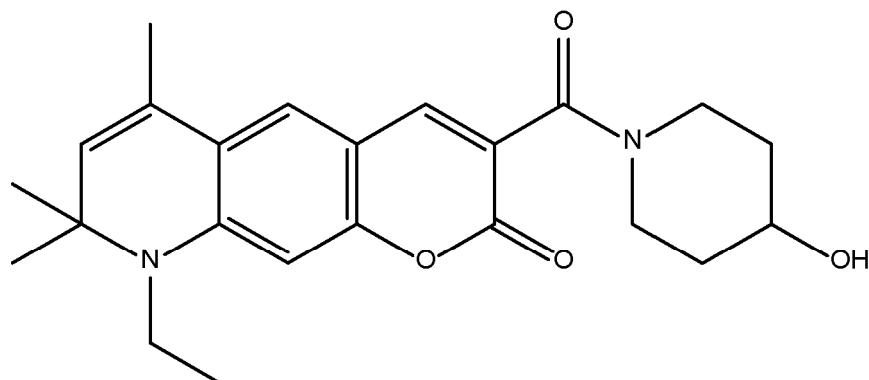
15 **1-Etil-7-hidroxi-2,2,4-trimetil-1,2-dihidroquinolin-6-carbaldehído**

20 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 41 con el compuesto 1-etil-2,2,4-trimetil-1,2-dihidroquinolin-7-ol (21,7 g, 100 mmol) en lugar de 1-etil-2,2,4-trimetil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-7-ol dio el compuesto **255** (12,1 g, rendimiento del 50 %) en forma de un jarabe de color negro. EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₁₅H₁₉NO₂: 245,14, encontrado: 245,14.

Ejemplo de referencia 56

Preparación del Compuesto **256**

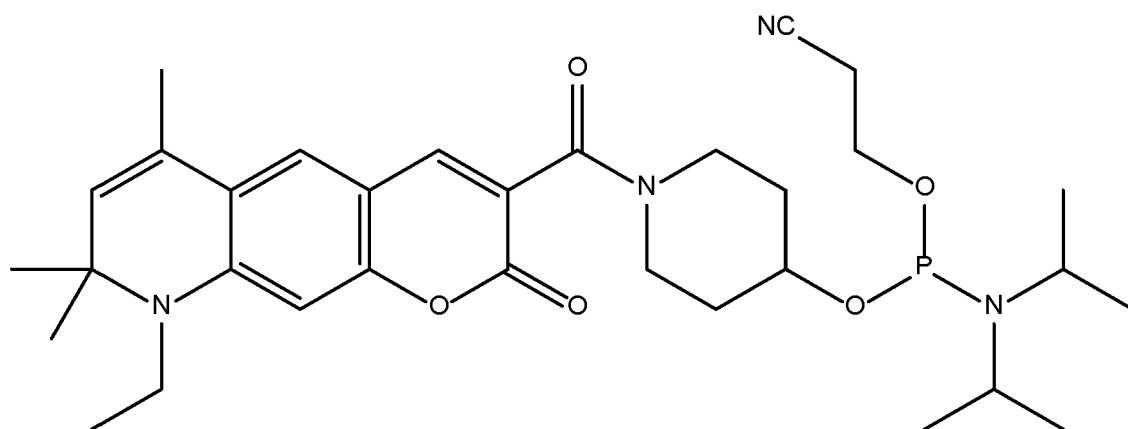
25

**256****9-Etil-3-(4-hidroxipiperidin-1-carbonil)-6,8,8-trimetil-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-2-ona**

- 5 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 42 con el compuesto **255** (8,52 g, 29,7 mmol) en lugar del compuesto **241** dio el compuesto **256** (9,52 g, rendimiento del 51 %) en forma de una espuma de color ámbar oscura. EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₂₃H₂₈N₂O₄: 396,20, encontrado: 396,20.

Ejemplo de referencia 57

10

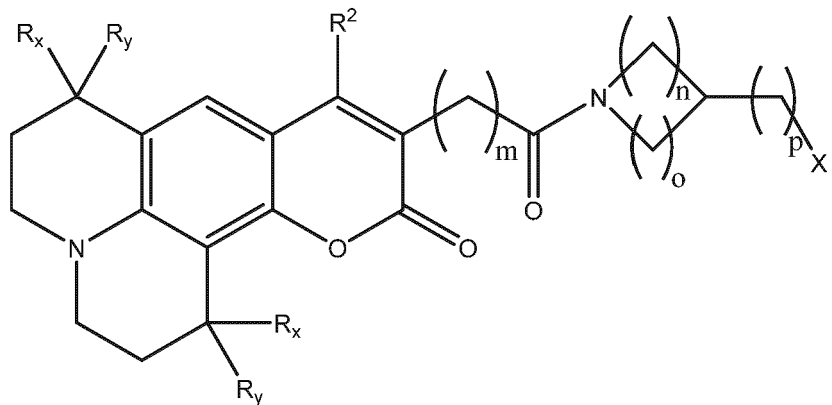
Preparación del Compuesto **257****257**

- 15 **(1-(9-Etil-6,8,8-trimetil-2-oxo-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]quinolin-3-carbonil)piperidin-4-il)diisopropilfosforamidita de 2-cianoetilo**

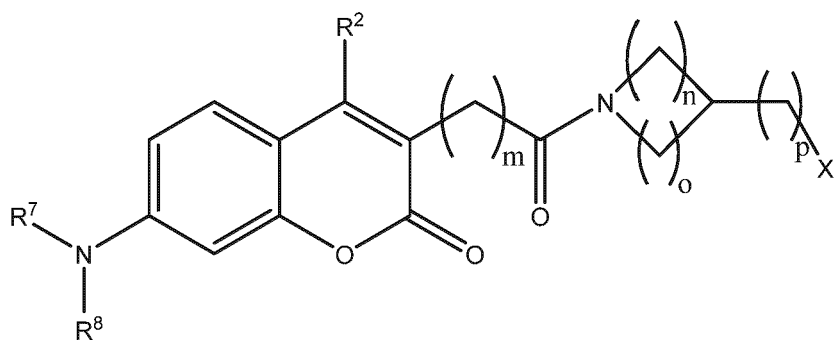
- 20 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 43 con el compuesto **256** (2,97, 7,5 mmol) en lugar del compuesto **242** dio el compuesto **257** (3,62 g, rendimiento del 80 %) en forma de una espuma naranja. EM (ES+) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₃₂H₄₅N₄O₅P: 596,31, encontrado: 596,31.

REIVINDICACIONES

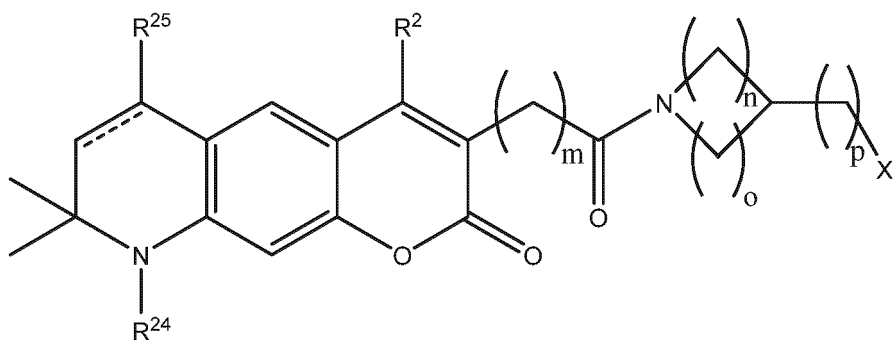
1. Un compuesto de estructura 15, 16 o 17:



Estructura 15



Estructura 16



Estructura 17

Donde

m es 1, 2 o 3;

n es 1 o 2;

o es 1 o 2;

p es 0, 1, 2 o 3;

R² se selecciona entre un grupo que consiste en -H o -CH₃;

X es -OH, -NH₂, -SH, -OR¹¹, -NHR¹², -NR¹³R¹⁴, -OC(O)R¹⁵, -NHC(O)R¹⁶, -SC(O)R¹⁷, -C(O)OH, -C(O)OR¹⁸, -C(O)NHR¹⁹, -C(O)NR²⁰R²¹, -N₃;

R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ se seleccionan independientemente entre alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₁-C₈) sustituido, -CH₂CH(OH)CH₂(OH), -CH(CH₂OH)₂, -CH₂CCH, -(CH₂CH₂O)_a-CH₂CH₂OH donde a es 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, $-P(NR^{22}R^{23})OCH_2CH_2-EWG$, $-P(O)(O^-)-Oligonucleótido$, $-(CH_2)_bCC-Nucleósido$, $-(CH_2)_bCC-[Nucleósido\ Trifosfato]$, $-(CH_2)_bNucleósido$, $-(CH_2)_b-[Nucleósido\ Trifosfato]$, $-(CH_2)_bNH-Nucleósido$, $-(CH_2)_bNH-[Nucleósido\ Trifosfato]$, $-(CH_2)_bNHC(O)(CH_2)_bNucleósido$, $-(CH_2)_bNHC(O)(CH_2)_b-[Nucleósido\ Trifosfato]$, donde b es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

5 EWG es un grupo aceptor de electrones;

R^{22} y R^{23} se seleccionan independientemente entre $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)_2$ o R^{22} y R^{23} juntos forman un heterociclo; y

en el compuesto de estructura 15, R_x y R_y son independientemente H o CH_3 ;

10 en el compuesto de estructura 16, R^7 y R^8 se seleccionan independientemente entre H, alquilo (C_1-C_8), alquilo (C_1-C_8) sustituido o R^7 y R^8 juntos forman un heterociclo de cinco, seis o siete miembros; y

en el compuesto de estructura 17, R^{24} es alquilo (C_1-C_8) o alquilo (C_1-C_8) sustituido;

R^{25} es alquilo (C_1-C_8), alquilo (C_1-C_8) sustituido o CH_2SO_3H ; y

la línea discontinua representa un doble enlace opcional.

15 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es de estructura 15.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es de estructura 16.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es de estructura 17.

20 5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde X es $-OH$, $-OR^{11}$ u $-OC(O)R^{15}$.

6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, en el compuesto de estructura 15 o 16, X es $-NH_2$, $-NHR^{12}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-NHC(O)R^{16}$.

25 7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 y 6, en donde, en el compuesto de estructura 16, R^7 y R^8 se seleccionan independientemente entre H o alquilo (C_1-C_8).

30 8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 7, en donde en el compuesto de estructura 17, R^{24} y R^{25} son alquilo (C_1-C_8).

9. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el grupo atractor de electrones es $-CN$.