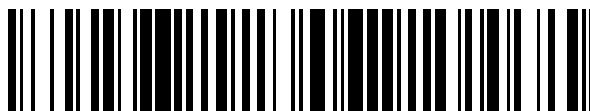


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 858**

51 Int. Cl.:

C07F 9/40 (2006.01)

C07F 9/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2005 E 05786453 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 1781675**

54 Título: **Colorantes fluorescentes de fosfonato y conjugados**

30 Prioridad:

13.08.2004 US 601599 P

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

21.05.2014

73 Titular/es:

**EPOCH BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
21720 23RD DRIVE SE, SUITE 150
BOTHELL, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**LUKHTANOV, EUGENY y
VOROBIEV, ALEXEI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 461 858 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).

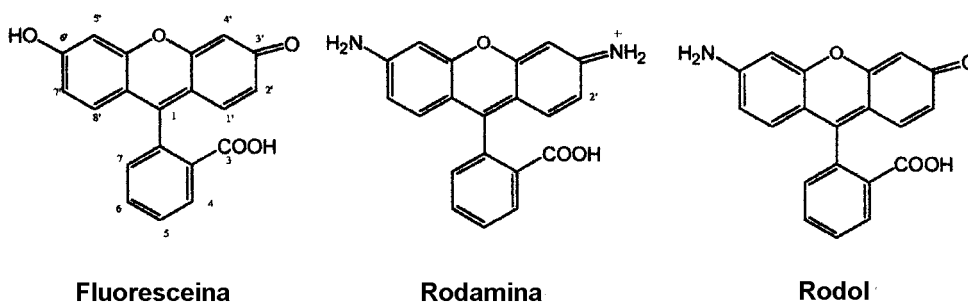
DESCRIPCIÓN

Colorantes fluorescentes de fosfonato y conjugados

Antecedentes de la invención

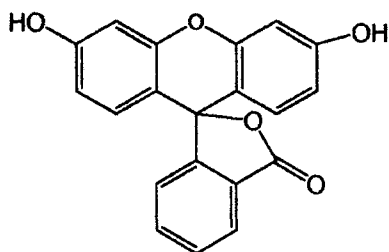
5 La presente invención proporciona varios colorantes modificados, tales como colorantes de xanteno, incluyendo rodaminas, rodoles y fluoresceínas que están sustituidos con uno o dos grupos fosfonato de ión dipolar protegidos. Los colorantes de la invención, que incluyen colorantes y conjugados de colorantes químicamente reactivos, son útiles como sondas fluorescentes, particularmente en muestras biológicas.

10 Se sabe que los colorantes fluorescentes son particularmente útiles en aplicaciones biológicas en las que se requiere un reactivo de detección que sea altamente sensible. Los colorantes fluorescentes se usan para marcar tanto con un color visible como con fluorescencia a otros materiales. Los colorantes de la presente invención son derivados de fosfonato de colorantes basados en xanteno que son típicamente derivados de fluoresceína, rodamina o rodol:



15 Los colorantes de "fluoresceína" incluyen derivados de 3H-xanten-6-ol-3-ona que están sustituidos típicamente en la posición 9 por un grupo 2-carboxifenilo. Los colorantes de "rodamina" incluyen derivados de 6-amino-3H-xanten-3-imina que están sustituidos típicamente en la posición 9 por un grupo 2-carboxifenilo. Los colorantes de "rodol" incluyen derivados de 6-amino-3H-xanten-3-ona que están sustituidos típicamente en la posición 9 por un grupo 2-carboxifenilo. Las fluoresceínas, rodaminas y rodoles están sustituidos típicamente por un derivado capaz de formar un anillo de lactona o lactama de 5 o 6 miembros. Por ejemplo, en el caso de la fluoresceína, la forma espirolactona del colorante tiene la siguiente estructura:

20



25 Muchos colorantes fluorescentes comerciales tienen una naturaleza aromática policíclica y son hidrófobos. Esas moléculas son también propensas a minimizar la exposición a cualquier entorno hidrófilo mediante interacciones con superficies y residuos hidrófobos cercanos. Estas interacciones incluyen interacción colorante-colorante e interacciones colorante-biomolécula (p.ej. proteínas, lípidos, oligonucleótidos). Las interacciones hidrófobas pueden causar un efecto inactivador sustancial para colorantes fluorescentes (véase por ejemplo Randolph, J.B.; Waggoner, A.S. Nucleic Acids Res. 1997, 25(14), 2923-2929, y las referencias allí citadas). Un método para vencer este problema es mejorar el carácter hidrófilo del colorante introduciendo, por ejemplo, un sustituyente sulfonato en la molécula del colorante (se describen colorantes de carbocianina sulfonados en la patente de EE.UU. 5.268.486, y se describen colorantes de xantenos sulfonados en la patente de EE.UU. 6.130.101).

30

Johnson et al (1991) Analytical Biochemistry 198, 228-237 describe sondas de membrana fluorescentes que incorporan fluoróforos de difluoruro de dipirrometenoboro. Monti et al (1992) Biochemica et Biophysica Acta. 1124, 80-87, describe la absorción y metabolismo de análogos de sulfatida fluorescentes en fibroblastos de piel cultivados. Xu et al (1996) Bioimaging, 4, 198-207, describe secciones transversales de excitación por multifotones de fluoróforos moleculares. Mattjus et al (1999) Analytical Biochemistry 268, 297-304, describe un planteamiento de transferencia de energía de resonancia energética de fluorescencia para hacer un seguimiento de la transferencia de glicolípidos mediada por proteínas entre membranas vesiculares. La patente de EE.UU. N° 3.809.694 describe fosfonatos de dihidrofenantridina. La patente de EE.UU. N° 5.916.877 describe derivados fluorescentes de 1-peptidilaminoalcanofosfonato, y su uso en la detección y estudio de la distribución de serina proteasas en células y

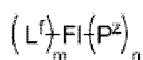
35

sistemas biológicos. La solicitud de patente internacional WO 03/023357 describe un método para preparar un agente biológico marcado con colorante fluorescente, comprendiendo el método poner en contacto el agente biológico no marcado con un derivado de lactona condensado con un colorante fluorescente. La solicitud de patente internacional WO 2004/101579 describe sensores fluorescentes de fosfonatos sustituidos y el uso de los mismos. Yang et al (2005) Chem. Eur. J. 11, 4191-4198, describe propiedades de absorción de dos fotones de derivados de 2,6-bis(estiril)antraceno.

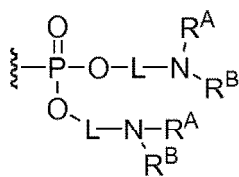
5 La presente invención describe colorantes, que incluyen colorantes de fluoresceína, rodol y rodamina, que están sustituidos por al menos un resto de fosfonato de ión dipolar protegido. Los colorantes sustituidos con fosfonato de la invención poseen considerables ventajas sobre sus análogos hidrófobos no sustituidos. Estando ionizado, el grupo fosfonato protegido lleva hidrofiliidad adicional a las moléculas de colorante, aumentando su solubilidad en disoluciones acuosas, de manera importante, el rendimiento cuántico de los nuevos colorantes no disminuye por la introducción de un resto fosfonato. En contraste con los colorantes sulfonados, los colorantes de la invención son compatibles con las condiciones de síntesis usadas en los sintetizadores comerciales de oligonucleótidos.

Breve compendio de la invención

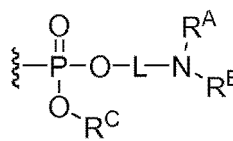
15 En un aspecto, la presente invención proporciona un reactivo colorante fluorescente que tiene la fórmula:



20 en donde FI es un componente colorante fluorescente; L^f es un grupo enlazante que tiene un miembro unido seleccionado del grupo que consiste en un grupo funcional protegido o no protegido, un grupo reactivo, un resto enlazante polifuncional, un resto de fosforamidita y un soporte sólido; el subíndice m es un número entero de 0 a 1; P^z es un grupo fosfonato protegido que tiene la fórmula (a) o (b):



(a)



(b)

25 en donde la línea ondulada indica la unión directa a un carbono sp^2 de dicho componente colorante fluorescente; L es un grupo enlazante; cada uno de R^A y R^B se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo(C_1-C_8) y un grupo protector lábil, el subíndice n es un número entero de 1 a 2; R^C es H, alquilo(C_1-C_8), arilo, aril-alquilo(C_1-C_4), un grupo protector lábil o un grupo enlazante alquileo que tiene un grupo hidroxil distal o hidroxil protegido; y una sal del mismo.

En otros aspectos, la presente invención proporciona métodos para preparar reactivos colorantes fluorescentes de fosfonato, así como métodos para usar sondas (p.ej., sondas de oligonucleótidos) que tienen unidos colorantes fluorescentes de fosfonato como los proporcionados en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra las estructuras de clases seleccionadas de colorantes de benzoxanteno de la presente invención.

La Figura 2 ilustra las estructuras de clases seleccionadas de colorantes de benzofenoxazina de la presente invención.

La Figura 3 ilustra un cromatograma de HPLC de un MB-Q-oligonucleótido-XP (véase el Ejemplo 9).

35 La Figura 4 ilustra la valoración de un ensayo de sonda 1,2 MGB Eclipse para HSV en donde la sonda marcada con FAM está multiplexada con una sonda marcada con XP (Ejemplo 13).

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas y definiciones

40 A menos que se indique otra cosa, los siguientes términos usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones tienen los significados dados a continuación:

El término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente lineal, ramificado o cíclico saturado, o una combinación de radicales hidrocarbonados monovalentes saturados cíclicos y lineales o ramificados que tienen el

- número de átomos de carbono indicado en el prefijo. Por ejemplo, alquilo(C₁-C₈) pretende incluir metilo, etilo, n-propilo, 2-propilo, terc-butilo, pentilo, ciclopentilo, ciclopropilmetilo y similares. Para cada una de las definiciones en la presente memoria (p.ej. alquilo, alqueno, alcoxi, arilalcoxi), cuando no está incluido un prefijo para indicar el número de átomos de carbono de la cadena principal en una porción alquilo, el radical o porción del mismo tendrá
- 5 ocho o menos átomos de carbono en la cadena principal.
- El término "alquileno" significa un radical hidrocarbonado divalente saturado lineal o un radical hidrocarbonado divalente saturado ramificado que tiene el número de átomos de carbono indicado en el prefijo. Por ejemplo, alquileno(C₁-C₆) pretende incluir metileno, etileno, propileno, 2-metilpropileno, pentileno, y similares.
- El término "alqueno" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente lineal o un radical hidrocarbonado monovalente ramificado que tiene el número de átomos de carbono indicado en el prefijo y que contiene al menos un
- 10 doble enlace. Por ejemplo, alqueno(C₂-C₆) pretende incluir etenilo, propenilo y similares.
- El término "alquino" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente lineal o un radical hidrocarbonado monovalente ramificado que contiene al menos un triple enlace y que tiene el número de átomos de carbono indicado en el prefijo. Por ejemplo, alquino(C₂-C₆) pretende incluir etinilo, propinilo y similares.
- 15 Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tialcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos al resto de la molécula por medio de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente. De manera similar, el término dialquilamino se refiere a un grupo amino que tiene dos grupos alquilo unidos, que pueden ser los mismos o diferentes.
- El término "arilo" significa un radical hidrocarbonado aromático monocíclico o bicíclico monovalente de 6 a 10
- 20 átomos en el anillo que está no sustituido o sustituido independientemente con uno a cuatro sustituyentes, preferiblemente uno, dos o tres sustituyentes seleccionados de alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, halo, ciano, hidroxilo, alcoxi, amino, acilamino, mono-alquilamino, di-alquilamino, haloalquilo, haloalcoxi, heteroalquilo, COR (donde R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, fenilo o fenilalquilo, arilo o arilalquilo), -(CR'R'')_nCOOR (donde n es un número entero de 0 a 5, R' y R'' son independientemente hidrógeno o alquilo, y R es hidrógeno,
- 25 alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo, arilo o arilalquilo) o -(CR'R'')_n-CON-R^aR^b (donde n es un número entero de 0 a 5, R' y R'' son independientemente hidrógeno o alquilo, y R^a y R^b son, independientemente uno de otro, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo, arilo o arilalquilo). Más específicamente el término arilo incluye, pero no se limita a, fenilo, bifenilo, 1-naftilo y 2-naftilo, y las formas sustituidas de los mismos. De manera similar, el término "heteroarilo" se refiere a aquellos grupos arilo en donde uno o más heteroátomos o grupos funcionales de heteroátomos tienen reemplazado un carbono del anillo, aunque
- 30 retienen propiedades aromáticas, p.ej. piridilo, quinolinilo, quinazolinilo, tienilo, y similares. Por brevedad, el término arilo, cuando se usa en combinación con otros radicales (p.ej., ariloxi, arilalquilo) pretende incluir tanto grupos arilo como grupos heteroarilo como los descritos anteriormente.
- El término "arilalquilo" se refiere a un radical -R^aR^b, donde R^a es un grupo alquileno (que tiene el número indicado de átomos de carbono, o si no se especifica, que tiene seis o menos átomos de carbono en la cadena principal) y R^b es un grupo arilo como se define en la presente memoria. Los ejemplos de grupos arilalquilo incluyen bencilo, feniletilo,
- 35 3-(3-clorofenil)-2-metilpentilo, y similares.
- De manera similar, el término "arilalqueno" significa un radical -R^aR^b donde R^a es un grupo alqueno y R^b es un grupo arilo como se define en la presente memoria, p.ej., 3-fenil-2-propenilo, y similares.
- 40 "Arlheteroalquilo" significa un radical -R^aR^b donde R^a es un grupo heteroalquileno (que tiene el número indicado de átomos de carbono) y R^b es un grupo arilo como se define en la presente memoria, p.ej., 2-hidroxi-2-fenil-etilo, 2-hidroxi-1-hidroximetil-2-fenil-etilo, y similares.
- El término "ariloxi" se refiere a un radical -OR, donde R es un grupo arilo, p.ej., fenoxi, naftiloxi y similares.
- El prefijo "halo" y el término "halógeno", cuando se usan para describir un sustituyente, se refiere a -F, -Cl, -Br y -I.
- 45 El término "heteroalquilo" se refiere a un radical alquilo como se define en la presente memoria con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente de ciano, -OR^a, -NR^bR^c, y -S(O)_nR^d (donde n es un número entero de 0 a 2), con el entendimiento de que el punto de unión del radical heteroalquilo es mediante un átomo de carbono del radical heteroalquilo. R^a es hidrógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, alcocarbonilo, ariloximetilo, carboxamido, o mono- o dialquilcarbamoilo. R^b es hidrógeno, alquilo, arilo o arilalquilo. R^c es hidrógeno, alquilo, arilo, arilalquilo,
- 50 alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, carboxamido, o mono- o dialquilcarbamoilo o alquilsulfonilo. R^d es hidrógeno (a condición de que n sea 0), alquilo, arilo, arilalquilo, amino, mono-alquilamino, di-alquilamino, o hidroxialquilo. Los ejemplos representativos incluyen, por ejemplo, 2-hidroxietilo, 2,3-dihidroxipropilo, 2-metoxietilo, benciloximetilo, 2-cianoetilo, y 2-metilsulfonil-etilo. Para cada uno de los anteriores, R^a, R^b, R^c y R^d pueden estar sustituidos además por NH₂, flúor, alquilamino, di-alquilamino, OH o alcoxi. Adicionalmente, el prefijo que indica el número de átomos de
- 55 carbono (p.ej., C₁-C₁₀) se refiere al número total de átomos de carbono en la porción del grupo heteroalquilo excluyendo las porciones ciano, -OR^a, -NR^bR^c, o -S(O)_nR^d.

El término "heterocíclico" se refiere a un radical cíclico no aromático saturado o insaturado de 3 a 8 átomos en el anillo en el que uno o dos átomos del anillo son heteroátomos seleccionados de O, NR (donde R es independientemente hidrógeno o alquilo) o S(O)_n (donde n es un número entero de 0 a 2), siendo los restantes átomos del anillo C, donde uno o dos átomos de C pueden estar reemplazados opcionalmente por un grupo carbonilo. El anillo heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados de alquilo, halo, ciano, hidroxilo, alcoxi, amino, mono-alquilamino, di-alquilamino, haloalquilo, haloalcoxi, -COR (donde R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, fenilo o fenilalquilo), - (CR'R'')_n-COOR (n es un número entero de 0 a 5, R' y R'' son independientemente hidrógeno o alquilo, y R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquil-alquilo, fenilo o fenilalquilo), o -(CR'R'')_n-CONR^aR^b (donde n es un número entero de 0 a 5, R' y R'' son independientemente hidrógeno o alquilo, y R^a y R^b son, independientemente uno del otro, hidrógeno, alquilo, fenilo o fenilalquilo). Más específicamente el término heterocíclico incluye, pero no se limita a, tetrahidropirranilo, piperidino, n-metilpiperidin-3-ilo, piperazino, n-metilpirrolidin-3-ilo, 3-pirrolidino, 2-pirrolidon-1-ilo, morfolino, tiomorfolino, tiomorfolino-1-óxido, tiomorfolino-1,1-dióxido, pirrolidinilo, y los derivados de los mismos. El prefijo que indica el número de átomos de carbono (p.ej., C₃-C₁₀) se refiere al número total de átomos de carbono en la porción del grupo heterocíclico a parte del número de heteroátomos.

El término "heteroalquileno" significa un radical hidrocarbonado divalente saturado línea de uno a seis carbonos o un radical hidrocarbonado saturado ramificado de tres a seis átomos de carbono con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente de -OR^a, -NR^bR^c, y -S(O)_nR^d (donde n es un número entero de 0 a 2) donde, R^a, R^b, R^c y R^d son como se definieron en la presente memoria para un radical heteroalquilo. Los ejemplos incluyen 2-hidroxietan-1,2-diilo, 2-hidroxipropan-1,3-diilo y similares.

Cada uno de los términos anteriores (p.ej., "alquilo", "heteroalquilo" y "arilo") pretende incluir formas tanto sustituidas como no sustituidas del radical indicado. Se proporcionan a continuación sustituyentes preferidos para cada tipo de radical.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos denominados a menudo alquilenos, alquenilos, heteroalquilenos, heteroalquenilos, alquinilos, heterocicloalquilo y heterocicloalquenilo) pueden ser diversos grupos seleccionados de -OR', =O, =NR', N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'C(O)NR''R''', -NR'C(O)₂R', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN y -NO₂ en un número que varía de cero a cuatro, preferiblemente, cero, uno, dos o tres sustituyentes. R', R'' y R''' se refieren independientemente cada uno a hidrógeno, alquilo(C₁-C₈) y heteroalquilo no sustituidos, arilo no sustituido, arilo sustituido 1-3 halógenos, grupos alquilo, alcoxi o tioalcoxi no sustituidos, o grupos aril-alquilo(C₁-C₄). Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo", en su sentido más amplio, pretende incluir grupos tales como haloalquilo (p.ej., -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (p.ej., -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂ o CH₃, y similares. Preferiblemente, los grupos alquilo tendrán entre 0-3 sustituyentes, más preferiblemente 0, 1 o 2 sustituyentes, a menos que se especifique otra cosa.

De manera similar, los sustituyentes para los grupos arilo son variados y se seleccionan de: -halógeno, -OR', -OC(O)R', -NR'R'', -SR', -CN, -NO₂, -CO₂R', -CONR'R'', -C(O)R', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'C(O)₂R', -NR'C(O)NR''R''', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -N₃, -CH(Ph)₂, perfluoroalcoxi(C₁-C₄), y perfluoroalquilo(C₁-C₄), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema anular aromático; y donde R', R'' y R''' se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo(C₁-C₈) y heteroalquilo no sustituidos, arilo y heteroarilo no sustituidos, (arilo no sustituido)-alquilo(C₁-C₄) y (arilo no sustituido)oxi-alquilo(C₁-C₄).

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente reemplazados con un sustituyente de la fórmula -T-C(O)-(CH₂)_q-U-, en donde T y U son independientemente -NH-, -O-, -CH₂- o un enlace simple, y q es un número entero de 0 a 2. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente reemplazados con un sustituyente de la fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en donde A y B son independientemente -CH₂-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace simple, y r es un número entero de 1 a 3. Uno de los enlaces simples del nuevo anillo así formado puede estar opcionalmente reemplazado con un sustituyente de la fórmula -(CH₂)_s-X-(CH₂)_t-, donde s y t son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, o -S(O)₂NR'-, El sustituyente R' en -NR'- y -S(O)₂NR'- se selecciona de hidrógeno o alquilo(C₁-C₆) no sustituido.

Ciertos compuestos u oligonucleótidos de la presente invención pueden existir en una forma de sal. Tales sales incluyen sales de adición de base tales como sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos u oligonucleótidos modificados de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien puro o bien en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o fosforoso, y similares, así como las sales

derivadas de ácidos orgánicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, láctico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten convertir los compuestos en sales de adición de base o bien de ácido.

Las formas neutras de los compuestos pueden ser regeneradas poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto parental de manera convencional. La forma parental del compuesto difiere de las diversas formas salinas en ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a la forma parental del compuesto para los fines de la presente invención.

Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas, y se pretende que estén abarcadas dentro del alcance de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención, y se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención.

Ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; se pretende que todos los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales estén abarcados dentro del alcance de la presente invención. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y la separación de isómeros son bien conocidos en la técnica (véase la discusión en el Capítulo 4 de ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 4ª edición, J. March, John Wiley and Sons, Nueva York, 1992).

Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen tales compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radiactivos, tales como por ejemplo tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sean radioactivas o no (p.ej., ^2H) estén abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

"Grupo protector" o "forma protegida del mismo" se refiere a una agrupación de átomos que cuando están unidos a un grupo reactivo en una molécula enmascara, reduce o impide esa reactividad. Se pueden encontrar ejemplos de grupos protectores en T.W. Greene y P.G. Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC CHEMISTRY, (Wiley, 2ª ed., 1991), Beaucage e Iyer, Tetrahedron 48:2223-2311 (1992), y Harrison y Harrison et al., COMPENDIUM OF SYNTHETIC ORGANIC METHODS, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996). Los grupos protectores de amino representativos incluyen formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo (CBZ), terc-butoxicarbonilo (Boc), trimetilsililo (TMS), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (SES), grupos tritilo y tritilo sustituido, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), nitroveratrilocarbonilo (NVOC) y similares (véase también, Boyle, A. L. (Editor), CURRENT PROTOCOLS IN NUCLEIC ACID CHEMISTRY, John Wiley and Sons, Nueva York, Volumen 1, 2000). Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen aquellos donde el grupo hidroxilo es acilado o bien alquilado, tales como éteres de bencilo y tritilo, así como éteres de alquilo, éteres de tetrahidropirano, éteres de trialkilsililo y éteres de alilo. Adicionalmente, los grupos hidroxilo pueden ser protegidos por grupos fotoretirables tales como α -metil-6-nitropiperonil-oxicarbonilo (McGall, G.H. y Fidanza, J. A., Photolithographic synthesis of high-density oligonucleotide arrays, en DNA ARRAYS METHODS AND PROTOCOLS, editado por Rampal J. B., METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 170:71-101 (2001), Humana Press, Inc., NY; Boyle, Ann L. (Editor), Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley and Sons, Nueva York, Volumen 1, 2000).

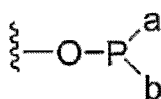
El término "grupo protector lábil" se refiere a aquellos grupos protectores que son retirables bajo condiciones suaves que no afectan significativamente al resto de la molécula.

Como se emplea en la presente memoria, el término "grupo reactivo" se refiere a un grupo electrófilo o un grupo nucleófilo que se puede usar para formar un enlace covalente con otro componente. Los ejemplos de grupos nucleófilos incluyen $-\text{NH}_2$, $-\text{NHNH}_2$, $-\text{ONH}_2$, $-\text{NHC}=\text{O}(\text{NHNH}_2)$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ o $-\text{SH}$. Los grupos electrófilos pueden ser ésteres activados, acilamidas, acilazidas, haluros de acilo, aldehídos o cetonas, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, anhídridos, haluros de arilo, aziridinas, boranatos, ácidos carboxílicos, carbodiimidas, diazoalcanos, epóxidos, haloacetamidas, halotriazinas, imidoésteres, isocianatos, isotiocianatos, maleimidias, fosforamiditas, haluros de sililo, ésteres de sulfonato y haluros de sulfonilo. Adicionalmente, un espaciador puede incluir heteroátomos en porciones lineales o acíclicas, porciones cíclicas, anillos aromáticos o combinaciones de los mismos. Dentro de lo anterior, un "grupo éster activado" se refiere a un éster de ácido carboxílico que es más reactivo que un éster de alquilo (p.ej., éster de metilo) en reacciones en las que el resto carbonilo es un centro electrófilo hacia, por ejemplo, formación de amidas. Los ejemplos de ésteres activados incluyen ésteres de pentafluorofenilo (PFP), ésteres de N-hidroxisuccinimida, y similares.

Un "resto enlazante polifuncional" es un grupo enlazante que tiene dos o más grupos funcionales que se pueden usar para unir o conjugar dos o más componentes, que pueden ser los mismos o diferentes. Los restos enlazantes

polifuncionales incluyen, por ejemplo, grupos enlazantes trivalentes y grupos enlazantes tetravalentes (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 5.512.677; 5.419.966; 5.585.481; 5.942.610 y 5.736.626).

Una "fosforamidita" es un término de la técnica usado para hacer referencia a un grupo de fósforo trivalente usado típicamente en la síntesis de oligonucleótidos. Se proporcionan descripciones detalladas de la química usada para formar oligonucleótidos por el método de las fosforamiditas en Caruthers et al., patentes de EE.UU. Nos. 4.458.066 y 4.415.732; Caruthers et al., Genetic Engineering, 4:1-17 (1982); Users Manual Model 392 and 394 Polynucleotide Synthesizers, páginas 6-1 a 6-22, Applied Biosystems, Part No. 901237 (1991), cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad. Se pueden sintetizar oligonucleótidos marcados enzimáticamente, p.ej., usando una ADN polimerasa o ligasa, p.ej., Stryer, Biochemistry, Capítulo 24, W. H. Freeman and Company (1981), o por síntesis química, p.ej., por un método de fosforamidita, un método de fosfito-triéster, y similares, p.ej., Gait, OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS, IRL Press (1990). Las marcas pueden ser introducidas durante la síntesis enzimática utilizando monómeros de nucleósido-trifosfato marcados, o introducidas durante síntesis química usando fosforamiditas de nucleótido o no nucleótido marcadas, o pueden ser introducidas posteriormente a la síntesis. Un reactivo de fosforamidita típico usado en la síntesis de oligonucleótidos se representa por la estructura a continuación:



en donde la línea ondulada indica la unión al resto del reactivo, y los sustituyentes "a" y "b" son independientemente cada uno isopropilamino, diisopropilamino, 2-cianoetiloxi, metoxi o morfolino; y "a" y "b" no son los mismos.

"Opcional" u "opcionalmente" en las definiciones anteriores significa que el evento o circunstancia descrita posteriormente puede ocurrir pero no necesariamente, y que la descripción incluye casos donde el evento o circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, "grupo heterociclo opcionalmente mono- o disustituido con un grupo alquilo" significa que el alquilo puede estar presente pero no necesariamente, y la descripción incluye situaciones donde el grupo heterociclo está mono- o disustituido con un grupo alquilo y situaciones donde el grupo heterociclo no está sustituido con el grupo alquilo.

El término "agente biológico" se refiere esencialmente a cualquier nucleósido, oligonucleótido, péptido, proteína, aminocarbhidrato o ligando, así como análogos de los mismos (p.ej., oligonucleótidos que tienen bases modificadas o no naturales).

El término "conjugado" se refiere a una molécula formada por la unión covalente de dos o más componentes tales como oligonucleótidos, fluoróforos, desactivadores, ligantes del surco menor, y similares.

"Oligonucleótido" y "polinucleótido" se usan de manera intercambiable y se refiere a un polímero de nucleótidos, bien naturales o bien sintéticos, que incluyen, pero no se limitan a, aquellos nucleótidos que tienen bases modificadas, análogos de azúcares, y similares. Como se apuntó anteriormente, un conjugado de oligonucleótido se referirá a un oligonucleótido como el definido, que tiene al menos un fluoróforo, desactivador, ligante del surco menor (MGB) u otros fragmentos útiles unido covalentemente, así como combinaciones de los componentes citados.

El término "soporte sólido" se refiere esencialmente a cualquier matriz sólida o semisólida que sea útil para, y compatible con, técnicas automatizadas de oligonucleótidos, e incluye vidrio, poliestireno, nylon, plástico, combinaciones y similares. Se han descrito ejemplos de soportes sólidos útiles en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 5.262.530, 5.419.966, 5.512.667 y 5.589.586.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales en química orgánica, bioquímica, síntesis y modificación de oligonucleótidos, química de bioconjugados, hibridación de ácidos nucleicos, biología molecular, microbiología, genética, ADN recombinante, y campos relacionados como los que están dentro de la experiencia en la técnica. Estas técnicas están totalmente explicadas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch & Sambrook, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982); Sambrook, Fritsch & Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Gait(ed.), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1984); Eckstein (ed.), OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1991).

General

La presente invención reside en el descubrimiento de que se puede preparar una amplia variedad de colorantes fluorescentes (o fluoróforos) que tienen un grupo fosfonato de ión dipolar protegido, proporcionando reactivos que son auto-estables y que se pueden usar para marcar esencialmente cualquier agente biológico (p.ej., oligonucleótidos, péptidos, proteínas, sondas y similares). Por consiguiente, la invención proporciona nuevos "colorantes de fosfonato" así como métodos para marcar agentes biológicos usando estos "colorantes de fosfonato".

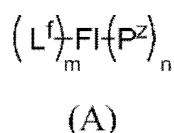
La invención proporciona además reactivos tales como colorantes derivatizados con fosforamiditas que se pueden preparar a partir de los colorantes de fosfonato descritos en la presente memoria. Adicionalmente, también se describen colorantes unidos a soportes, preparados de manera similar a partir de los colorantes de fosfonato.

5 Se ha encontrado que los "colorantes de fosfonato" (es decir, colorantes que tienen un grupo fosfonato de ión dipolar protegido f), así como los reactivos que incorporan esos colorantes (p.ej., colorantes unidos a soportes y fosforamiditas) son compatibles con, por ejemplo, colorantes de cumarina, colorantes de benzocumarina, colorantes de fluoresceína, colorantes de rodol, colorantes de fenoxazina, colorantes de benzofenoxazina, colorantes de xanteno, colorantes de benzoxanteno, y colorantes de cianina.

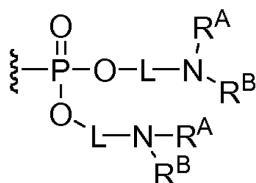
10 Se pueden encontrar ejemplos de estas y otras clases adecuadas de colorantes en Haugland, et al., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, SIXTH ED., Molecular Probes, Eugene, Ore. 1996; patentes de EE.UU. Nos. 3.194.805; 3.128.179; 5.187.288; 5.188.934; 5.227.487; 5.248.782; 5.304.645; 5.433.896; 5.442.045; 5.556.959; 5.583.236; 5.808.044; 5.852.191; 5.986.086; 6.020.481; 6.162.931; 6.180.295; y 6.221.604; patente europea EP 1408366; Smith, et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1993, 1195-1204; Whitaker, et al., Anal. Biochem. 207:267-279 (1992); Krasoviskii y Bolotin, ORGANIC LUMINESCENT MATERIALS, VCH Publishers, NY., 1988; Zolliger, COLOR CHEMISTRY, 2ª Edición, VCH Publishers, NY., 1991; Hirschberg, et al., Biochemistry 37:10381-10385 (1998); Fieser y Fieser, REAGENTS FOR ORGANIC SYNTHESIS, Volúmenes 1 a 17, Wiley, EE.UU., 1995. Geiger, et al., Nature 359:859-861 (1992). Se proporcionan aún otros colorantes por medio de sitios on-line tales como <http://www.zeiss.com>.

Realizaciones de la invención

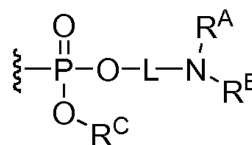
20 En un aspecto, la presente invención proporciona reactivos colorantes fluorescentes que tienen la fórmula general (A):



25 en donde FI es un componente colorante fluorescente; L^f es un grupo enlazante que tiene un miembro unido seleccionado del grupo que consiste en un grupo funcional protegido o no protegido, un grupo reactivo, un resto enlazante polifuncional, un resto de fosforamidita y un soporte sólido; el subíndice m es un número entero de 0 a 1; P^z es un grupo fosfonato de ión dipolar protegido que tiene la fórmula (a) o (b):



(a)



(b)

30 en donde la línea ondulada indica la unión directa a un carbono sp^2 de dicho componente colorante fluorescente; L es un grupo enlazante; cada uno de R^A y R^B se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo (C_1-C_8) y un grupo protector lábil; el subíndice n es un número entero de 1 a 2; R^C es H, alquilo (C_1-C_8), arilo, aril-alquilo (C_1-C_4), un grupo protector lábil o un grupo enlazante alquilenos que tiene un grupo hidroxilo distal o hidroxilo protegido; y sales de los mismos. Los ejemplos de un grupo protector lábil incluyen $C(O)CF_3$, Fmoc, tButilo, tBOC, ftalimida y monometoxitritilo.

35 En el contexto de la presente invención, se puede modificar esencialmente cualquier colorante fluorescente para incluir cualquiera de L^f y P^z . Típicamente, P^z se une a un átomo de carbono hibridado en sp^2 en un anillo aromático del colorante fluorescente usando los métodos sintéticos descritos más adelante. De manera similar, L^f puede ser unido a un grupo funcional existente en el colorante o puede ser un vestigio de, por ejemplo, un colorante de lactona (véase la solicitud en tramitación con la presente con n° de serie 10/026.374).

40 Se pueden seleccionar colorantes adecuados de, por ejemplo, cumarinas, benzocumarinas, xantenos, benzo[a]xantenos, benzo[b]xantenos, benzo[c]xantenos, cianinas, acridinas, difluoruros de dipirrometenoboro, fenoxazinas, benzo[a]fenoxazinas, benzo[b]fenoxazinas y benzo[c]fenoxazinas. Aún otros tipos de colorantes útiles son los colorantes de rutenio bipyridilo, colorantes de transferencia de energía, colorantes de naranja de tiazol, colorantes de N-aril-1,8-naftilimida, y otros colorantes mostrados en la presente solicitud.

En un grupo de realizaciones, los reactivos colorantes fluorescentes son aquellos en los que el subíndice m es 1 y el

subíndice n es 1. Dentro de este grupo de realizaciones, P^z puede tener la fórmula (a).

En otro grupo de realizaciones, los reactivos colorantes fluorescentes son aquellos en los que el subíndice m es 0 y el subíndice n es 1. Dentro de este grupo de realizaciones, P^z puede tener la fórmula (a).

5 En aún otro grupo de realizaciones, los reactivos colorantes fluorescentes son aquellos en los que el subíndice m es 0 y el subíndice n es 2. Dentro de este grupo de realizaciones, cada uno de los grupos P^z puede ser el mismo o diferente y puede tener la fórmula (a) o (b).

10 En varias realizaciones, L es alquileo C₂-C₈. En otras realizaciones de la fórmula general anterior, N^a es un grupo iónico de amonio que tiene la fórmula -N⁺(R^D)₃, en donde cada R^D se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₈, arilo y aril-alquilo C₁-C₄. Aún más preferiblemente, cada R^D se selecciona independientemente de H o alquilo C₁-C₈.

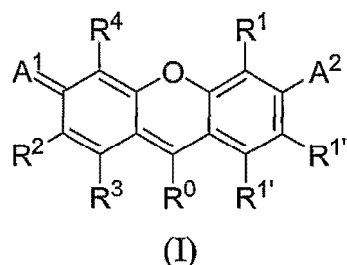
15 Volviendo a la fórmula general anterior, L^f pueden ser diversos grupos enlazantes conocidos por los expertos en la técnica. Están disponibles muchos grupos enlazantes en fuentes comerciales, y se pueden utilizar en los reactivos anteriores acoplado un extremo del enlazante al colorante fluorescente y el otro extremo del enlazante a un grupo protector. En un grupo de realizaciones, L^f es un grupo alquileo(C₂-C₂₀), que termina en un grupo funcional tal como hidroxilo, hidroxilo protegido, amino, amino protegido, carboxilo, éster de carboxilato, carboxamida, urea, y similares. En otras realizaciones, L^f es un grupo alquileo que tiene un resto fosforamidita unido, preferiblemente 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita. De manera similar, el grupo enlazante L se puede seleccionar de diversos grupos enlazantes que tienen de 2 a 50 átomos de carbono principales (p.ej., grupos enlazantes alquileo, grupos enlazantes heteroalquileo, grupos enlazantes poliéter y similares).

20 En las secciones a continuación, se discuten específicamente varios colorantes y grupos de colorantes, y representan realizaciones de particular interés. Un experto en la técnica, no obstante, apreciará que la invención no está limitada a esas realizaciones.

Colorantes de xanteno

25 En un grupo de realizaciones, FI se selecciona de la familia de los colorantes de xanteno, incluyendo benzoxantenos, y más específicamente, colorantes de fluoresceína, colorantes de rodamina y colorantes de rodol.

En un grupo particular de realizaciones, el reactivo colorante fluorescente tiene la fórmula (I):



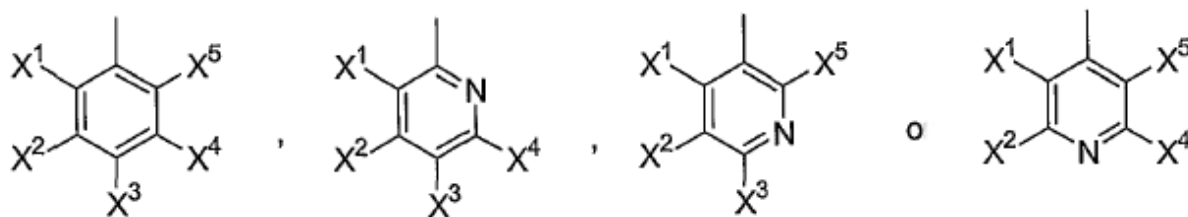
en donde

30 A¹ representa O, N-Z o N⁺(Z)₂, en el que cada Z es H o alquilo(C₁-C₈), o está opcionalmente combinado con R² o R⁴ para formar un anillo de 5 o 6 miembros o está combinado con cada uno de R² y R⁴ para formar dos anillos de 6 miembros condensados;

A² representa OR o N(Z)₂, en el que cada Z es H o alquilo(C₁-C₈), o está opcionalmente combinado con R¹ o R^{1''} para formar un anillo de 5 o 6 miembros o está combinado con cada uno de R¹ y R^{1''} para formar dos anillos de 6 miembros condensados; y R se selecciona de H, alquilo(C₁-C₈), arilo, aril-alquilo(C₁-C₄) y L^f.

35 R¹, R^{1''}, R¹, R², R³ y R⁴ se seleccionan independientemente cada uno de H, halógeno, ciano, CF₃, alquilo(C₁-C₈), alquil(C₁-C₈)tio, alcoxi(C₁-C₈), arilo, heteroarilo, L^f y P^z; u opcionalmente dos miembros adyacentes de R¹, R^{1''}, R¹, R² y R³ están combinados para formar un anillo condensado de cinco o seis miembros que es aromático, no aromático o heteroaromático y que está opcionalmente sustituido con P^z; en donde las porciones alquilo de cualquiera de R¹, R^{1''} y R¹ a R⁴ están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxilo, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones alquilo de los sustituyentes tienen de 1 a 6 átomos de carbono; y las porciones arilo o heteroarilo de cualquiera de R¹, R^{1''} y R¹ a R⁴ están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxilo, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C₁-C₆)amino, alquilo(C₁-C₆), alquil(C₁-C₆)tio, alcoxi(C₁-C₆), L^f y P^z.

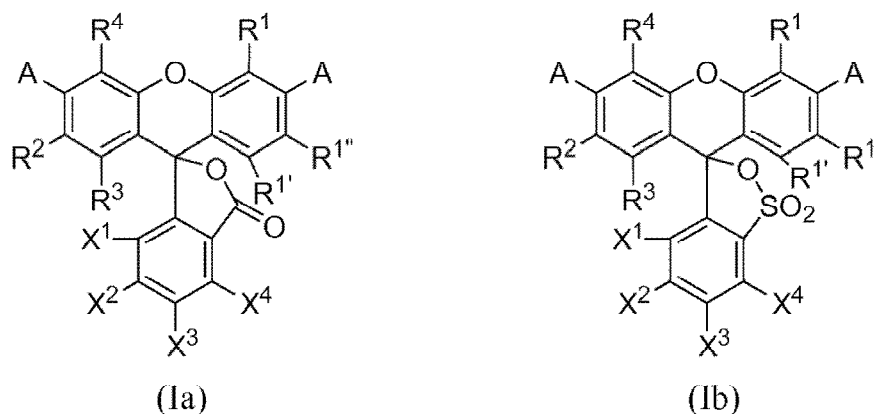
45 R⁰ es halógeno, ciano, CF₃, alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), heteroarilo sustituido o no sustituido o arilo que tiene la fórmula:



en donde X^1 , X^2 , X^3 , X^4 y X^5 se seleccionan independientemente cada uno del grupo que consiste en H, halógeno, ciano, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alcoxi(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alquenilo(C_2-C_8), alquinilo(C_2-C_8), arilo, heteroarilo, SO_3H , PO_3H_2 , CO_2H , L^f y P^z , y opcionalmente, cualquiera de dos X^1 a X^5 adyacentes están combinados para formar un anillo aromático o heteroaromático; y están presentes de 0 a 1 grupos L^f y de 1 a 4 grupos P^z . Preferiblemente hay 1 a 2 grupos P^z . Como antes, cualesquiera porciones arilo o heteroarilo de R^0 están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C_1-C_6)amino, alquilo(C_1-C_6), alquil(C_1-C_6)tio, alcoxi(C_1-C_6), L^f y P^z .

En realizaciones relacionadas, los reactivos colorantes fluorescentes utilizan un colorante fluorescente que es un colorante fluorescente protegido. Los ejemplos de tales colorantes fluorescentes protegidos son bien conocidos por los expertos en la técnica, y serán evidentes a partir de la descripción de realizaciones particulares más adelante.

En algunas realizaciones, el colorante fluorescente es un colorante de xanteno protegido que tiene la fórmula (Ia) o (Ib):



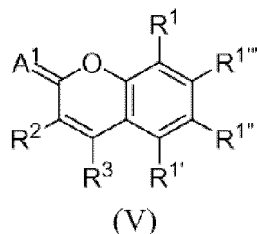
en donde cada A es hidroxilo, amino, hidroxilo protegido, o amino protegido; R^1 , $R^{1'}$, R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente cada uno de H, halógeno, ciano, arilo, heteroarilo, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alcoxi(C_1-C_8), L^f y P^z , u opcionalmente dos miembros adyacentes de R^1 , $R^{1'}$, R^2 y R^3 están combinados para formar un anillo condensado de cinco o seis miembros que es aromático, no aromático o heteroaromático y que está opcionalmente sustituido con P^z , en donde las porciones alquilo de cualquiera de R^1 , $R^{1'}$ y R^1 a R^4 están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxi, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones alquilo de los sustituyentes tienen de 1 a 6 átomos de carbono y las porciones arilo o heteroarilo de cualquiera de R^1 , $R^{1'}$ y R^1 a R^4 están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C_1-C_6)amino, alquilo(C_1-C_6), alquil(C_1-C_6)tio, alcoxi(C_1-C_6), L^f y P^z ; X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se seleccionan independientemente cada uno del grupo que consiste en H, halógeno, ciano, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alcoxi(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alquenilo(C_2-C_8), alquinilo(C_2-C_8), arilo, heteroarilo, SO_3H , PO_3H_2 , CO_2H , L^f y P^z , y opcionalmente, cualesquiera dos X^1 a X^4 adyacentes están combinados para formar un anillo aromático o heteroaromático que está opcionalmente sustituido además con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados de halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C_1-C_6)amino, alquilo(C_1-C_6), alquil(C_1-C_6)tio, alcoxi(C_1-C_6), L^f y P^z ; y están presentes de 0 a 1 grupos L^f y de 1 a 2 grupos P^z en los compuestos de fórmulas (Ia) y (Ib). Los grupos preferidos para A son -O-C(O)-tButilo y -O-C(O)-isopropilo.

En aún otras realizaciones, la presente invención proporciona compuestos en donde FL es un colorante de benzoxanteno tal como, por ejemplo, un benzo[a]xanteno, un benzo[b]xanteno o un benzo[c]xanteno (véanse las fórmulas II, IIa, III, IIIa, IV y IVa en la Figura 1, en donde los sustituyentes tienen los significados proporcionados anteriormente, y además el subíndice n en cada una de las fórmulas es un número entero de 0 a 3 y cada X^0 se selecciona del grupo que consiste en halógeno, ciano, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alcoxi(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alquenilo(C_2-C_8), alquinilo(C_2-C_8), arilo, heteroarilo, SO_3H , PO_3H_2 , CO_2H , L^f y P^z , y cualesquiera porciones arilo o heteroarilo de R^0 están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C_1-C_6)amino, alquilo(C_1-C_6), alquil(C_1-

C₆)tio, alcoxi(C₁-C₆), L^f y P^z.

Colorantes de cumarina

En aún otro grupo de realizaciones, el reactivo colorante fluorescente tiene la fórmula:



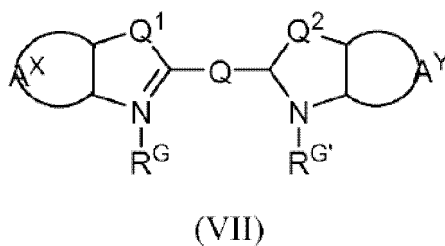
- 5 en donde R', R¹, R^{1''}, R^{1'''}, R² y R³ se seleccionan independientemente cada uno del grupo que consiste en H, halógeno, ciano, CF₃, alquilo(C₁-C₈), alquil(C₁-C₈)tio, alcoxi(C₁-C₈), arilo, heteroarilo, L^f y P^z; en donde las porciones alquilo de cualquiera de R¹, R^{1'}, R^{1''} y R^{1'''} y R¹ a R³ están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxi, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones alquilo de los sustituyentes tienen de 1 a 6 átomos de carbono; y las porciones arilo y heteroarilo de cualquiera de R¹, R^{1''}, R^{1'''} y R¹ a R³ están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C₁-C₆)amino, alquilo(C₁-C₆), alquil(C₁-C₆)tio, alcoxi(C₁-C₆), L^f y P^z; y A¹ representa O o N-Z, en el que Z es H o alquilo(C₁-C₈); y está presente de 0 a 1 grupos L^f y de 1 a 2 grupos P^z en los compuestos de fórmula (V).

- 15 La serie de benzocumarinas (VI) de colorantes son aquellas de fórmula V en las que R² y R³ están combinadas para formar un anillo de benceno condensado, opcionalmente sustituido con uno a cuatro sustituyentes seleccionados de halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C₁-C₆)amino, alquilo(C₁-C₆), alquil(C₁-C₆)tio y alcoxi(C₁-C₆).

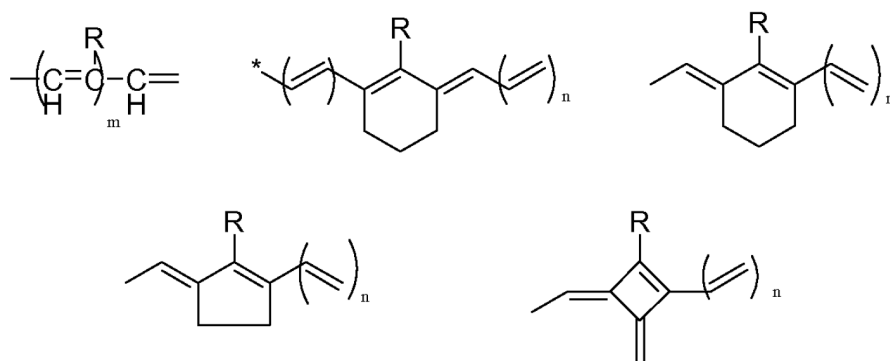
Colorantes de cianina

- 20 En aún otras realizaciones, la presente invención proporciona reactivos colorantes de cianina que tienen la fórmula general anterior en donde FI es un componente colorante de cianina.

Son útiles en la presente invención diversos colorantes de cianina, y tienen generalmente la fórmula proporcionada a continuación.



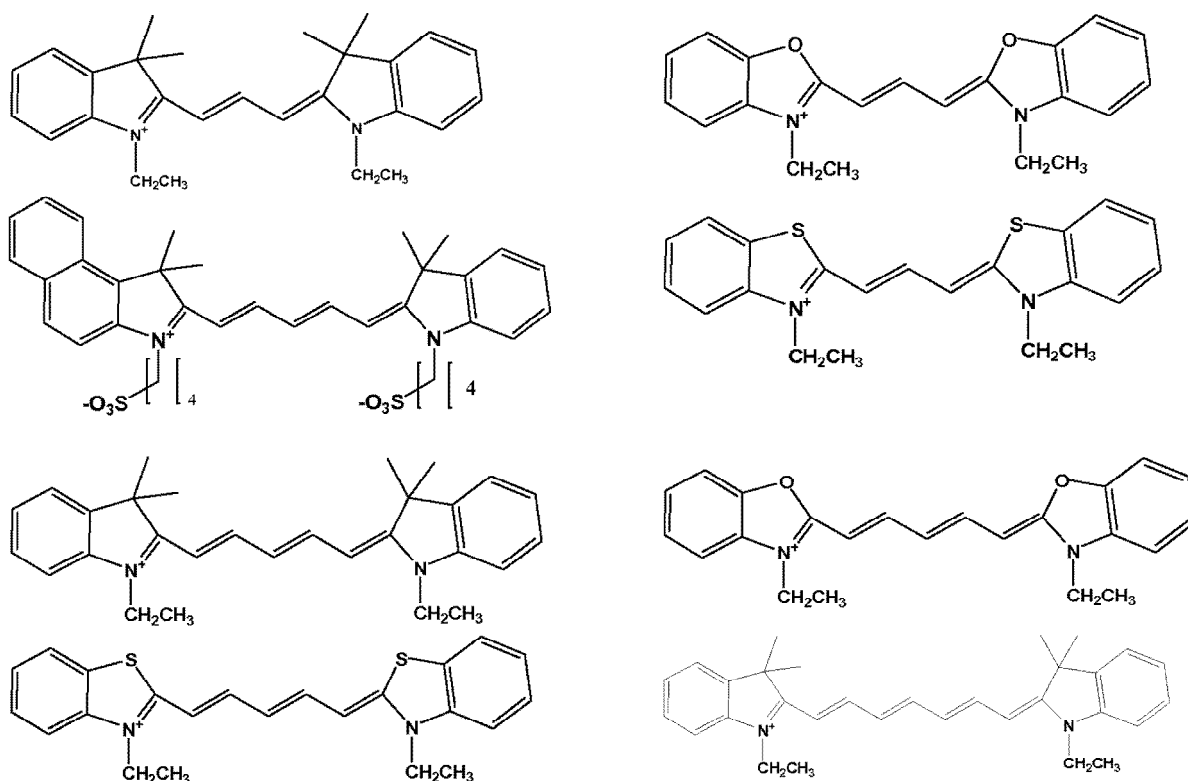
- 25 En la fórmula anterior, cada uno de Q¹ y Q² se seleccionan independientemente de O, S, N y CR^aR^b, o -C(=CH₂)-, en donde R^a y R^b son independientemente H, metilo, etilo o L^f. Los anillos A^x y A^y representan independientemente anillos de arilo o heteroarilo sustituidos o no sustituidos condensados, en donde los anillos de arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos. La letra Q representa un sistema enlazante conjugado opcionalmente sustituido con L^f. Se muestran anillos arilo y heteroarilo adecuados en la Tabla 1 más adelante. Estos pueden estar sustituidos como se proporciona en la fórmula (I) anterior. Son sistemas enlazantes conjugados adecuados los que se muestran a continuación (en donde R es H, alquilo inferior o L^f) así como los sistemas conjugados proporcionados en la tabla de colorantes de cianina.



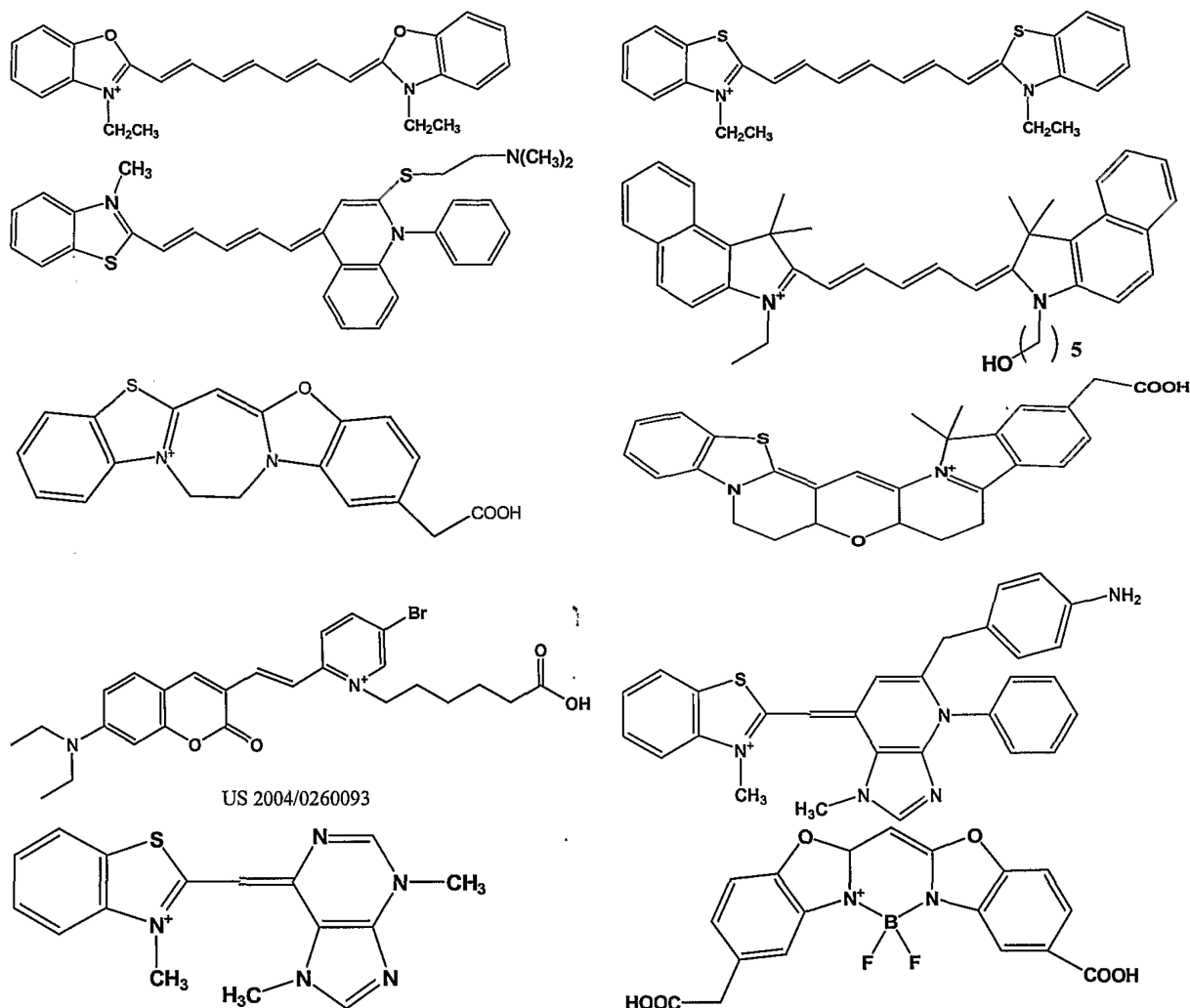
5 Volviendo a la fórmula de los colorantes de cianina anterior, los símbolos R^G y R^G se seleccionan independientemente de H, alquilo C_1 - C_8 , heteroalquilo, ácido alquenosulfónico, ácido alquencarboxílico, L^f y P^z , y en donde uno o dos grupos P^z y cero a uno grupos L^f están presentes en dicho reactivo. Un resto enlazante presente en R^a , R^b , R , A^x o A^y contiene un grupo funcional tal como un nucleófilo de N, O o S, o contiene una funcionalidad capaz de reaccionar con nucleófilos de N, O o S.

10 Aunque la fórmula anterior pretende expresar el alcance de los colorantes de cianina que pueden ser modificados según los métodos descritos en la presente memoria, el término "colorantes de cianina" o "cianinas" se refiere a cualquiera de los colorantes de cianina que son bien conocidos en la técnica. Se han descritos estrategias de síntesis en la patente europea EP 1.065.250; la solicitud de patente internacional WO 05/014723; WO 99/31181; las patentes de EE.UU. Nos. 5.268.486; 5.658.751; 5.808.044; 5.981.747; 5.658.751; 4.937.198; 4.937.198; 6.080.868; 6.110.630; 6.225.050; 6.238.838; 6.716.994 y 6.207.464, así como la publicación de EE.UU. N° 2003/0113755. Se muestran ejemplos representativos de colorantes de cianina conocidos en la Tabla 1. Los expertos en la técnica apreciarán que la síntesis de los colorantes de la Tabla 1 puede ser modificada para dar colorantes halogenados que pueden ser convertidos en los colorantes de fosfonato de ión dipolar usando los métodos generales descritos en la presente memoria. Además, se pueden incorporar en estos colorantes o análogos de colorante sustituyentes, enlazadores o grupos enlazantes con grupos funcionales reactivos apropiados por otros métodos estándar conocidos en la técnica.

Tabla 1. Colorantes de cianina conocidos

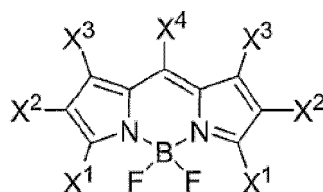


20



Colorantes de difluoruro de dipirrometenoboro (Colorantes de Bodipy)

Se proporcionan colorantes de difluoruro de dipirrometenoboro de fosfonato mostrados en la fórmula:

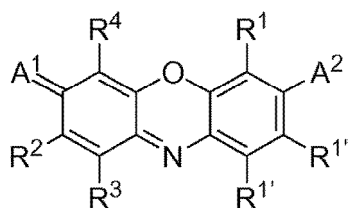


(VIII)

- 5 en donde X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se seleccionan independientemente cada uno del grupo que consiste en H, halógeno, ciano, CF_3 , alquilo (C_1-C_8), alcoxi (C_1-C_8), alquil (C_1-C_8)tio, alqueno (C_2-C_8), alquino (C_2-C_8), SO_3H , PO_3H_2 , CO_2H , L^f y P^z y opcionalmente, cualesquiera dos X^1 a X^4 adyacentes están combinados para formar un anillo de cinco o seis miembros no aromático, aromático o heteroaromático que está opcionalmente sustituido además con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados de halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxí, amino, mono- o dialquil (C_1-C_6)amino,
- 10 grupos P^z .

Colorantes de fenoxazina

En aún otro grupo de realizaciones, los reactivos colorantes fluorescentes tienen la fórmula:



(IX)

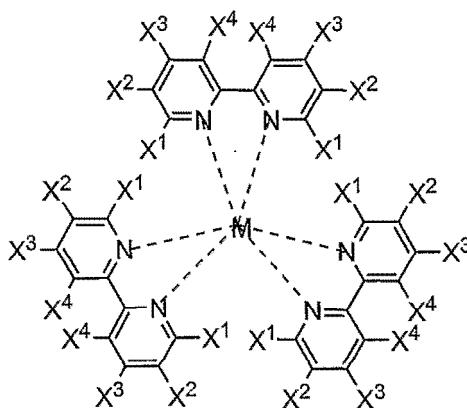
en donde A¹ representa O o N-Z, en el que Z es H o alquilo(C₁-C₈), o está opcionalmente combinado con R² o R⁴ para formar un anillo de 5 o 6 miembros o está combinado con cada uno de R² y R⁴ para formar dos anillos de 6 miembros condensados; A² representa OR o N(Z)₂, en el que cada Z es H o alquilo(C₁-C₈), o está opcionalmente combinado con R¹ o R^{1'} para formar un anillo de 5 o 6 miembros, y R se selecciona del grupo que consiste en H, (C o está combinado con cada uno de R¹ y R^{1'} para formar dos anillos de 6 miembros condensados, y R se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo(C₁-C₈), arilo, aril-alquilo(C₁-C₄) y L^f.

Los símbolos R¹, R^{1'}, R², R³ y R⁴ se seleccionan independientemente cada uno de H, halógeno, ciano, CF₃, alquilo(C₁-C₈), alquil(C₁-C₈)tio, alcoxi(C₁-C₈), arilo, heteroarilo, L^f y P^z; en donde las porciones alquilo de cualquiera de R¹, R^{1'} y R² a R⁴ están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxi, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones alquilo de los sustituyentes tienen de 1 a 6 átomos de carbono; y las porciones arilo o heteroarilo de cualquiera de R¹, R^{1'} y R² a R⁴ están opcionalmente sustituidas con uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C₁-C₆)amino, alquilo(C₁-C₆), alquil(C₁-C₆)tio, alcoxi(C₁-C₆), L^f y P^z; y están presentes de 0 a 1 grupos L^f y de 1 a 2 grupos P^z en los compuestos de fórmula (IX).

En aún otras realizaciones de la invención, FI es un colorante de fenoxazina tal como, por ejemplo, un colorante de benzo[a]fenoxazina, un colorante de benzo[b]fenoxazina y un colorante de benzo[c]fenoxazina (véase la fórmula X, XI y XII en la **Figura 2**, en donde los sustituyentes tienen los significados proporcionados anteriormente, y además el subíndice n en cada una de las fórmulas es un número entero de 0 a 3 y cada X⁰ se selecciona del grupo que consiste en halógeno, ciano, CF₃, alquilo(C₁-C₈), alcoxi(C₁-C₈), alquil(C₁-C₈)tio, alqueno(C₂-C₈), alquileno(C₂-C₈), arilo, heteroarilo, SO₃H, PO₃H₂, CO₂H, L^f y P^z, y cualesquiera porciones arilo o heteroarilo de X⁰ están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C₁-C₆)amino, alquilo(C₁-C₆), alquil(C₁-C₆)tio, alcoxi(C₁-C₆), L^f y P^z.

25 Complejos de metales de transición

Se proporcionan complejos metálicos de fosfonato tales como colorantes complejados con 2,2'-dipiridil-rutenio (II) mostrados en la fórmula:



(XIII)

en donde cada uno de X¹, X², X³ y X⁴ se selecciona independientemente de H, OH, halógeno, ciano, CF₃, alquilo(C₁-C₈), alquil(C₁-C₈)tio, alcoxi(C₁-C₈), arilo, heteroarilo, L^f y P^z; en donde las porciones alquilo de X¹, X², X³ y X⁴ están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxi, ésteres de carboxi, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones alquilo de los sustituyentes tienen de 1 a 6 átomos de carbono; y las porciones arilo o heteroarilo de cualquiera de X¹, X², X³ y X⁴ están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C₁-C₆)amino, alquilo(C₁-C₆), alquil(C₁-C₆)tio, alcoxi(C₁-C₆), L^f y P^z; u opcionalmente, cualquier combinación

adyacentes de dos X^{1-4} forman

anillos de 5 o 6 miembros sustituidos o no sustituidos saturados o no saturados que contienen 0, 1 o más átomos de anillo heterocíclico seleccionados de N o S. M es un ión metálico seleccionado de un metal lantánido y un metal de transición. Dentro de la fórmula anterior (XIII), habrá de 0 a 1 grupos L^f y de 1 a 2 grupos P^z .

5 En otra realización relacionada, uno de X^{1-4} es L^f o P^z y el resto de X^{1-4} son hidrógeno.

En aún otra realización relacionada, M se selecciona de rutenio, renio u osmio.

En otra realización ilustrativa, el complejo de ión metálico es estable en condiciones de síntesis de ácidos nucleicos, así como a reactivos de desprotección y escisión de ácidos nucleicos.

Otros colorantes de fosfonato

10 Diversos otros colorantes pueden ser modificados hasta los reactivos colorantes de la presente invención, empleando los métodos descritos en la presente memoria. Un experto en la técnica conoce aún otros métodos de síntesis útiles en las transformaciones. En particular, el colorante puede ser preparado a) por halogenación para permitir la introducción del grupo fosfonato, y b) puede ser hecho reactivo a diversos grupos funcionales en agentes biológicos o proteínas materiales, péptidos, oligonucleótidos, sustratos y similares (véase la Tabla 2). Se muestran

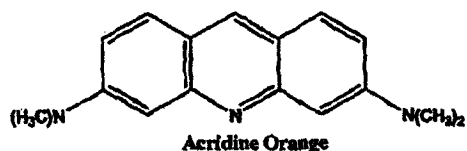
15 estructuras de colorantes fluorescentes conocidas en la Tabla 2 en la columna de la izquierda. Un ejemplo de un precursor de colorante halogenado basado en la estructura de colorante de la columna de la izquierda se muestra en la columna de la derecha de la Tabla 2. Los expertos en la técnica apreciarán que el grupo fosfonato puede ser introducido en cualquiera de los anillos halogenados o donde la halogenación sea posible. Además, pueden ser

20 introducidos en diversas posiciones en los colorantes de la Tabla 2 grupos para unir los colorantes de fosfonato a materiales biológicos. Se apreciará además que los colorantes propuestos de la Tabla 2 no sólo contienen uno o más grupos fosfonato, un grupo para la unión del colorante a un sustrato biológico u otro, sino que pueden contener opcionalmente uno o más sustituyentes en cualquiera de los anillos para modular las propiedades de emisión de fluorescencia.

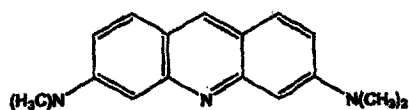
Tabla 2

Estructura y propiedades físicas de colorantes conocidos y estructura de colorantes halogenados

Colorante conocido

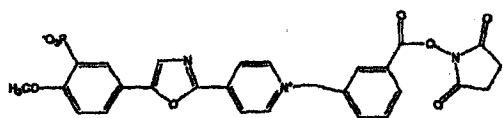


λ_{ex} 400 λ_{em} 500 (etanol)



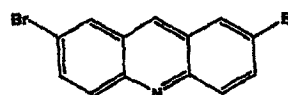
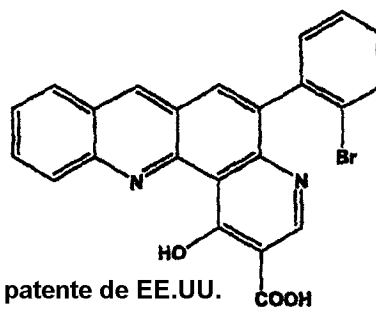
λ_{ex} 420 λ_{em} 490 (etanol)

λ_{ex} 409 λ_{em} 558



(DMSO; MP)

Precursor de colorante halogenado

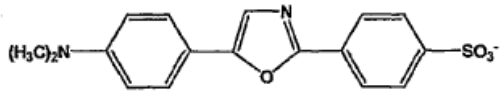


Zeitschrift fuer Angewandte Physik, 14: 43-8 (1962)

(continuación)

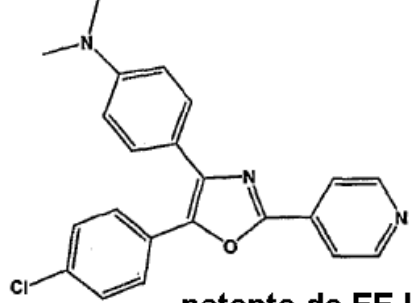
Estructura y propiedades físicas de colorantes conocidos y estructura de colorantes halogenados

Colorante conocido

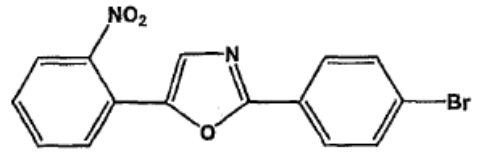


λ_{ex} 358 λ_{em} 517 (H₂O; MP)

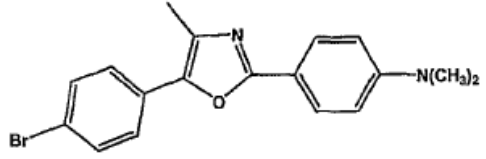
Precursor de colorante halogenado



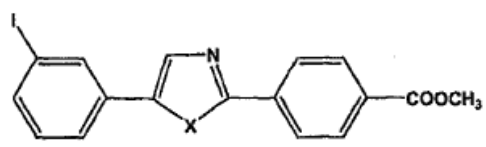
patente de EE.UU.
3.257.203



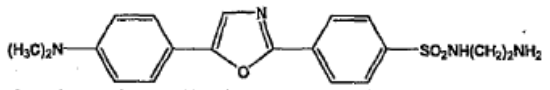
Tetrahedron Letters 1321-1324 (1976)



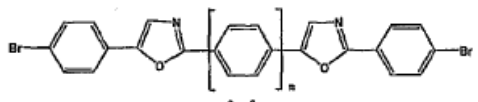
J. Combinatorial Chemistry 7:463-473 (2005)



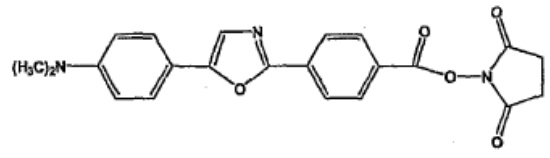
X=O or S
WO 04014366



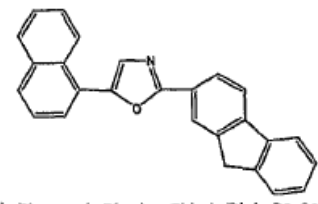
λ_{ex} 370 λ_{em} 570 (metanol; MP)



$n=0$ or 2
Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao 13: 1251-4 (1992) OR CAN 119: 8716



λ_{ex} 395 λ_{em} 601 (metanol; MP)

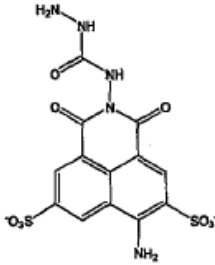


J de Chimie Phys. et de Physico-Chimie Biol., 75: 961-8 (1978)

(continuación)

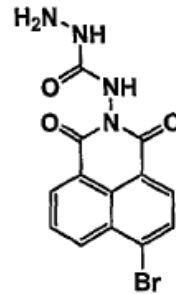
Estructura y propiedades físicas de colorantes conocidos y estructura de colorantes halogenados

Colorante conocido

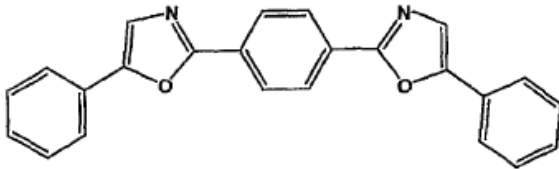


λ_{ex} 380 λ_{em} 540 (**agua**)

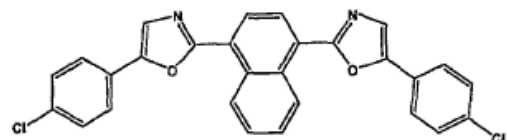
Precursor de colorante halogenado



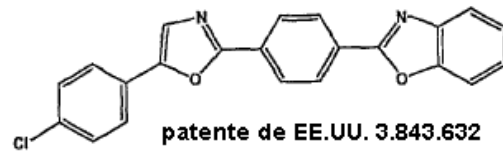
J. Org. Chem., 42:2426 (1977)



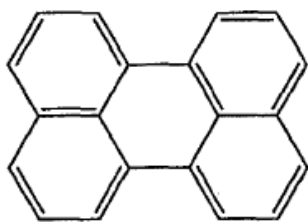
λ_{ex} 350 λ_{em} 410, 470 (**hexano**)



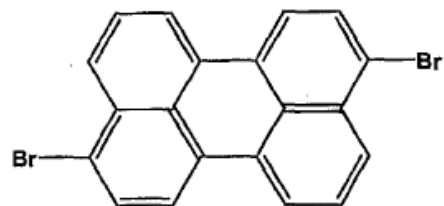
patente de EE.UU. 3.843.632



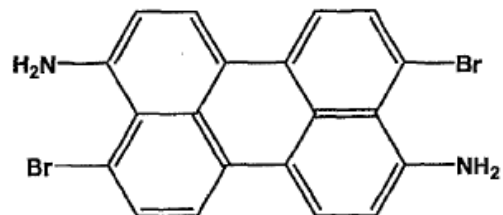
patente de EE.UU. 3.843.632



λ_{ex} 410 λ_{em} 430, 460, 490 (**ciclohexano**)



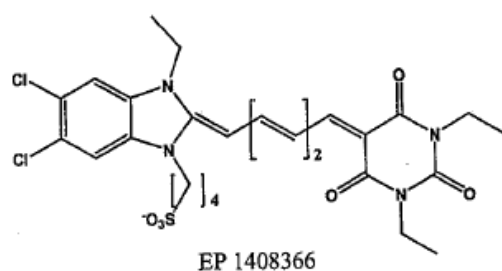
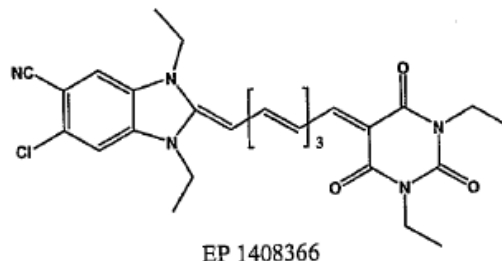
Ber., 73B: 1187-92 (1940)



Monalsh. 52: 1-6 (1929) (CAN 23:36005)

(continuación)

Estructura y propiedades físicas de colorantes conocidos y estructura de colorantes halogenados
Colorante conocido **Precursor de colorante halogenado**

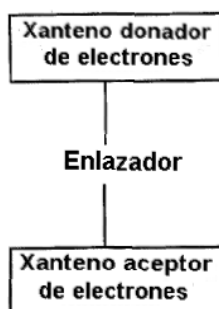


5 A menos que se indique otra cosa, las longitudes de excitación y emisión se tomaron de los espectros químicos del paquete PhotochemCAD de Jonathan Lindsey. (<http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/>). Las longitudes de onda de emisión se estimaron a partir de los espectros de emisión.

10 Los compuestos intermedios de colorantes halogenados mostrados en la Tabla 2 pueden ser convertidos en los colorantes de fosfonato por los métodos de la invención. Será evidente para los expertos en la técnica que los colorantes fluorescentes reportados en la técnica pueden ser convertidos en los correspondientes colorantes halogenados por diversos métodos. Un método tal es empezar con un compuesto intermedio de colorante halogenado, o en algunos casos será posible introducir un sustituyente halógeno en uno de sus anillos aromáticos. Será evidente además que se puede introducir un resto enlazador en la molécula de colorante por métodos conocidos en la técnica o los enseñados por esta invención. La halogenación de anillos aromáticos con cloro y bromo es bien conocida en la técnica, para una revisión véase Breandlin y McBee, en Olah, "FRIEDEL-CRAFTS AND RELATED REACTIONS" Vol 3, págs. 1517-1593, Interscience Publishers, Inc., NY, 1964, y Berliner, J. Chem. Educ. 43:124-132 (1966)). Alternativamente, el grupo haluro puede ser introducido en un anillo aromático por diazotización de un grupo amino usando la reacción de Sandmeyer (Hodgson, Chem. Rev., 40:251-277 (1947)). Será evidente además para los expertos en la técnica que los restos arilo y heteroarilo presentes en los colorantes de la Tabla 2 pueden estar sustituidos. Los sustituyentes pueden ser introducidos en los colorantes por métodos conocidos en la técnica. Como resultado, los análogos estructurales (p.ej., los que incorporan opcionalmente L^f y P^z) de los colorantes de la Tabla 2 también están contemplados como realizaciones específicas de la presente invención.

Colorantes de transferencia de energía

25 Los colorantes de transferencia de energía de fosfonato son otro ejemplo de los reactivos colorantes de la presente invención. Un ejemplo de tales colorantes de transferencia de energía es el par colorante de xanteno donador de electrones y aceptor de electrones mostrado a continuación. Un experto en la técnica apreciará que son también parte de la presente invención otras combinaciones de colorantes.



Más particularmente, los colorantes de transferencia de electrones que emplean restos xanteno pueden incluir esencialmente cualquiera de los colorantes de xanteno (p.ej., los proporcionados anteriormente en la Fórmulas I, la y Ib) o los colorantes de benzoxanteno. La porción enlazadora pueden ser diversos enlazadores, que tienen generalmente de aproximadamente 3 a 50 átomos principales seleccionados de C, N, O, P y S, que son cíclicos, acíclicos, aromáticos o bien una combinación de los mismos, y que tienen átomos de hidrógeno adicionales para llenar valencias disponibles. Se han descrito ejemplos de colorantes de transferencia de energía en la patente de EE.UU. N° 5.800.996; 5.863.727 y 5.565.554; y en la patente europea N° 0 747 700. La Tabla 4 ilustra algunos ejemplos de colorantes de transferencia de energía que pueden ser modificados según los métodos descritos en la presente memoria para unir un resto fosfonato (y opcionalmente un grupo enlazante adicional proporcionado en la fórmula general anterior).

Tabla 4

Ejemplos de colorantes de transferencia de energía de fluorescencia diméricos	
	Ejemplo
41	
42	

(continuación)

Ejemplos de colorantes de transferencia de energía de fluorescencia diméricos			
	Ejemplo		Ejemplo
4 ³		4 ⁴	
4 ⁵		4 ⁶	

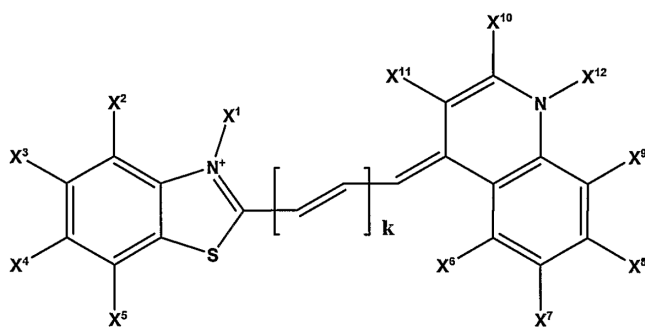
(continuación)

Ejemplos de colorantes de transferencia de energía de fluorescencia diméricos	
Ejemplo	Ejemplo
47	48
49	

Se han descrito procedimientos de síntesis para los colorantes de transferencia de energía diméricos mostrados en la Tabla 4 en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 5.800.996, 5.863.727 y 5.565.554, y en la patente europea N° 0 747 700. Se describen etiquetas de transferencia de energía fluorescentes que contienen más que dos restos fluorescentes en la patente de EE.UU. N° 6.627.748. Los colorantes en la Tabla 4 contienen al menos un resto xanteno o al menos un resto cianina, y la introducción de un grupo fosfonato en los colorantes de xanteno o cianina puede ser llevada a cabo fácilmente por los métodos descritos en la presente memoria.

Análogos de naranja de tiazol

En aún otras realizaciones, se proporcionan reactivos fluorescentes de naranja de tiazol de fosfonato mostrados en la fórmula:

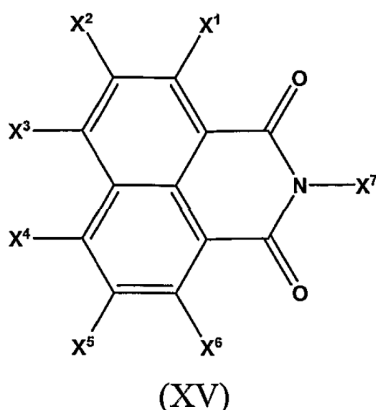


(XIV)

en donde $X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}$ y X^{11} se seleccionan independientemente cada uno de H, halógeno, ciano, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alcoxi(C_1-C_8), arilo, heteroarilo, L^f y P^z ; u opcionalmente dos miembros adyacentes de X^2 a X^{11} están combinados para formar un anillo condensado de cinco o seis miembros que es aromático, no aromático o heteroaromático y que está opcionalmente sustituido con P^z ; y X^1 y X^{12} son independientemente cada uno H, alquilo(C_1-C_6), arilo y arilo sustituido; en donde las porciones alquilo de cualquiera de X^1 a X^{12} están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxi, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones alquilo de los sustituyentes tienen de 1 a 6 átomos de carbono; y las porciones arilo o heteroarilo de cualquiera de X^1 a X^{12} están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C_1-C_6)amino, alquilo(C_1-C_6), alquil(C_1-C_6)tio, alcoxi(C_1-C_6), L^f y P^z .

N-Aril-1,8-naftalimidás

Se proporcionan análogos de fosfonato-aril-1,8-naftalimidás mostradas en la fórmula XV

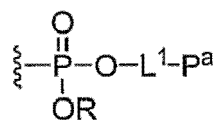


en donde $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6$ se seleccionan independientemente cada uno de H, halógeno, ciano, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alcoxi(C_1-C_8), arilo, heteroarilo, L^f y P^z ; u opcionalmente dos miembros adyacentes de X^1 a X^6 están combinados para formar un anillo condensado de cinco o seis miembros que es aromático, no aromático o heteroaromático y que está opcionalmente sustituido con P^z ; y X^7 es arilo o heteroarilo; en donde las porciones alquilo de cualquiera de X^1 a X^6 están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxi, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones alquilo de los sustituyentes tienen de 1 a 6 átomos de carbono; y las porciones arilo o heteroarilo de cualquiera de X^1 a X^7 están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C_1-C_6)amino, alquilo(C_1-C_6), alquil(C_1-C_6)tio, alcoxi(C_1-C_6), L^f y P^z .

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona reactivos colorantes fluorescentes que tienen la fórmula general (B):



en donde FI es un componente colorante fluorescente; y P^1 es un grupo fosfonato funcionalizado que tiene la fórmula:



en donde la línea ondulada indica la unión directa a un carbono sp^2 del componente colorante fluorescente; L^1 es un grupo enlazante; R se selecciona de H, alquilo (C_1-C_8), arilo, aril-alquilo(C_1-C_4), $-L^a-N^a$, y $-L^a-NR^A R^B$; en donde L^a es un grupo enlazante alquileo, N^a es un grupo iónico de amonio, y cada uno de R^A y R^B se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo(C_1-C_8) y un grupo protector lábil, tal como $C(O)CF_3$, Fmoc, $C(O)t$ -Butilo, ftalimida y monometoxitritilo; y P^a es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un resto fosforamida, un grupo enlazante mono-, di- o trifuncional que tiene al menos un grupo funcional terminal o grupo funcional protegido, un soporte sólido y un grupo reactivo (p.ej., un grupo electrófilo o nucleófilo descrito más adelante); y sales de los mismos. Para las realizaciones en las que R es alquilo, los grupos alquilo preferidos son aquellos que pueden ser retirados en presencia de otros grupos funcionales en la molécula (p.ej., terc-butilo, terc-amilo, metilo).

Como con los reactivos colorantes fluorescentes descritos inicialmente, este aspecto de la invención incluye diversos

componentes colorantes fluorescentes (F1) que se seleccionan típicamente de cumarinas, benzocumarinas, xantenos, benzo[a]xantenos, benzo[b]xantenos, benzo[c]xantenos, cianinas, acridinas, difluoruros de dipirrometenoboro, fenoxazinas, benzo[a]fenoxazinas, benzo[b]fenoxazinas y benzo[c]fenoxazinas. En algunas realizaciones, el componente colorante fluorescente se selecciona de colorantes de cumarina, colorantes de resorufina, colorantes de difluoruro de dipirrometenoboro, colorantes de rutenio bipiridilo, colorantes de transferencia de energía, colorantes de naranja de tiazol, colorantes de N-aril-1,8-naftilimida, merocianinas, estilbenos, colorantes basados en estirilo y dipirrininas. En aún otras realizaciones, componente colorante fluorescente se selecciona de colorantes de fluoresceína, colorantes de rodamina y colorantes de rodol. Más particularmente, el colorante fluorescente puede ser cualquiera de los colorantes proporcionados en las fórmulas I, Ia, Ib, II, IIa, III, IIIa, IV, IVa, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII o XIII o los colorantes de las Tablas 1 o 2, en donde P¹ está unido a un átomo de carbono hibridado en sp² en una posición como la descrita anteriormente para P².

El resto fosfonato puede ser unido al componente colorante usando métodos descritos en la presente memoria (p.ej., por fosfonilación de un compuesto intermedio colorante halogenado) seguido de etapas de síntesis adecuadas en las que el fosfonato se dota de un enlace a un grupo terminal (p.ej., P^a).

15 Síntesis general de colorantes de fosfonato

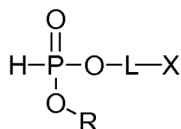
En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un derivado colorante fluorescente de fosfonato, comprendiendo el método poner en contacto un sustrato colorante halo-fluorescente que tiene al menos un átomo de halógeno unido a un átomo de carbono de un anillo aromático con un reactivo de fosfito bajo condiciones suficientes para retirar el átomo de halógeno, y unir covalentemente un grupo fosfonato al átomo de carbono del anillo aromático para formar el derivado colorante fluorescente de fosfonato.

En varias realizaciones, el sustrato colorante halo-fluorescente se selecciona de halocumarinas, halobenzocumarinas, haloxantenos, halobenzo[a]xantenos, halobenzo[b]xantenos, halobenzo[c]xantenos, halocianinas, haloacridinas, difluoruros de halodipirrometenoboro, halofenoxazinas, halobenzo[a]fenoxazinas, halobenzo[b]fenoxazinas, halobenzo[c]fenoxazinas.

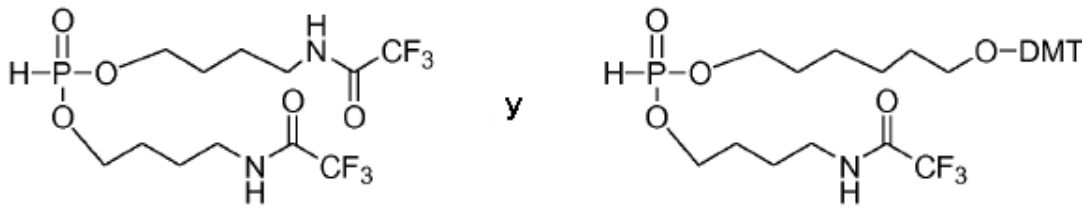
25 Los reactivos de fosfito de la invención pueden ser simétricos o no simétricos. Los reactivos de fosfito simétricos son aquellos que tienen la fórmula: HP(=O)(OR)₂, en donde cada uno de los grupos R de éster fosfito es -L^a-NR^AR^B; en donde L^a es un grupo enlazante alquileo, y cada uno de R^A y R^B se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo(C₁-C₈) y un grupo protector lábil; y al menos uno de R^A y R^B es un grupo protector. Son ejemplos de tales grupos protectores C(O)CF₃, ftalimida, C(O)Ot-Bu, C(O)OBn, monometoxitritilo, Fmoc y similares.

30 Los reactivos de fosfito no simétricos son aquellos que tienen la fórmula: HP(=O)(OR)(OR'), en donde el grupo R' del éster fosfito es un grupo protector que puede ser retirado en presencia de R o es -L^a-NR^AR^B; y el grupo R es L¹-P^a o -L^a-NR^AR^B; en donde L¹ es un grupo enlazante alquileo, y P^a es un grupo funcional protegido o no protegido; para cada uno de R y R', L^a es un grupo enlazante alquileo, y cada uno de R^A y R^B se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo(C₁-C₈) y un grupo protector lábil; y al menos uno de R^A y R^B es un grupo protector. Son ejemplos de grupos éster R' útiles t-butilo, bencilo, fenilo y similares. Para las realizaciones en las que R es también -L^a-NR^AR^B, en donde cada uno de R^A y R^B es independientemente H, alquilo(C₁-C₈) o un grupo protector lábil; y al menos uno de R^A y R^B es un grupo protector, los ejemplos de tales grupos protectores son C(O)CF₃, ftalimida, C(O)Ot-Bu, C(O)OBn, monometoxitritilo, Fmoc y similares. Un experto en la técnica apreciará que para aquellas realizaciones en las que R^A o R^B es un grupo protector, y el grupo R' es un éster (o grupo protector) y los grupos R^A o R^B son grupos protectores ortogonales (es decir, grupos protectores que pueden ser retirados selectivamente en presencia del otro grupo protector).

A la vista de lo anterior, la presente invención proporciona compuestos que tienen la fórmula:



45 en donde L es un miembro seleccionado del grupo que consiste en un grupo enlazante de alquileo(C₁-C₂₀) y heteroalquileo(C₁-C₂₀); X es un miembro seleccionado del grupo que consiste en un grupo funcional y un grupo funcional protegido en donde dicho grupo funcional es hidroxidiol, carboxi, formilo, carbonilo, tio, aminoxi, azida, carbazoílo, hidrazina o amino que tiene la fórmula NR^AR^B; R es un miembro seleccionado del grupo que consiste en un grupo protector lábil y -L-NR^AR^B; y cada uno R^A y R^B se selecciona independientemente de H, alquilo(C₁-C₈) y un grupo protector lábil y al menos uno de R^A y R^B es distinto de H o alquilo(C₁-C₈). En algunas realizaciones, R es butilo terciario. En otras realizaciones, R es -L-NR^AR^B, y X es -NR^AR^B. Más preferiblemente, cada R^A es H y cada R^B es un grupo protector, seleccionado de -C(O)CF₃, -C(O)OtBu, Fmoc, ftalimida y -C(O)O-bencilo. En otras realizaciones, X es -O-dimetoxitritilo. En las realizaciones más preferidas, el compuesto se selecciona de:



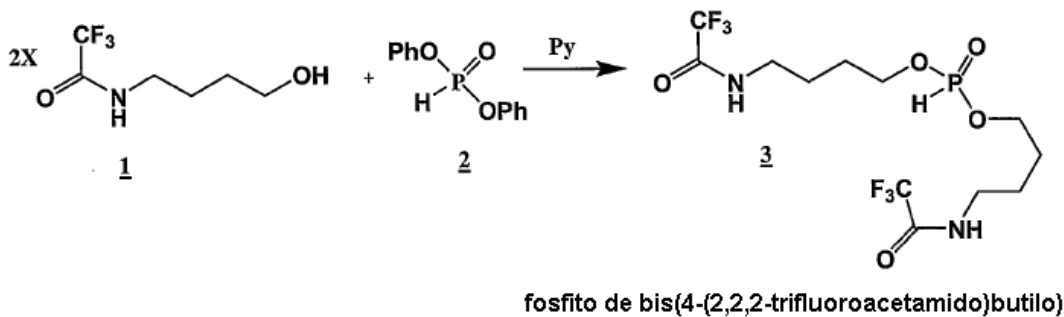
Aunque las estructuras anteriores se proporcionan en una sola forma tautomérica, un experto en la técnica apreciará que la recitación pretende incluir además todas las fórmulas, incluyendo la forma de fosfito trivalente comúnmente usada.

- 5 En los esquemas a continuación se proporcionan esquemas más específicos para la preparación de reactivos de fosfito seleccionados y para su uso en la preparación de reactivos colorantes fluorescentes de la presente invención.

Reactivos para la síntesis de colorantes de fosfonato y preparación de colorantes de fosfonato

El Esquema de Reacción 1 ilustra la síntesis de un reactivo de fosfito simétrico, fosfito de bis(4-(2,2,2-trifluoroacetamido)butilo) (3).

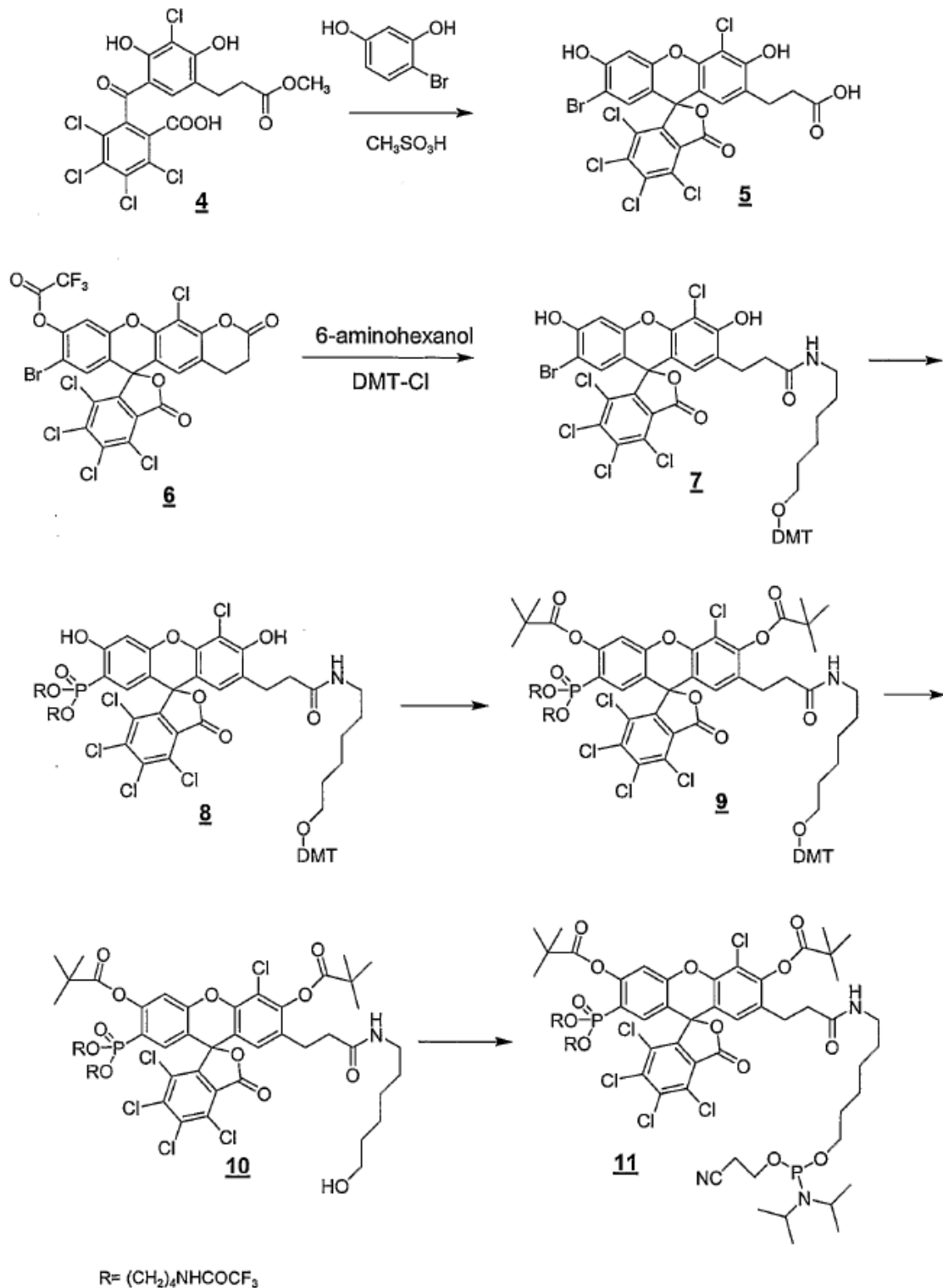
Esquema de Reacción 1



10

Se hizo reaccionar 2,2,2-trifluoro-N-(4-hidroxibutil)-acetamida (1) con fosfito de difenilo (2) en piridina para dar (3). Este reactivo se utilizó para preparar los colorantes aromáticos de bis-trifluoroacetamidofosfonato de la presente invención. La desprotección del diéster en NH_4OH concentrado genera el grupo 4-aminobutilfosfonato de ión dipolar.

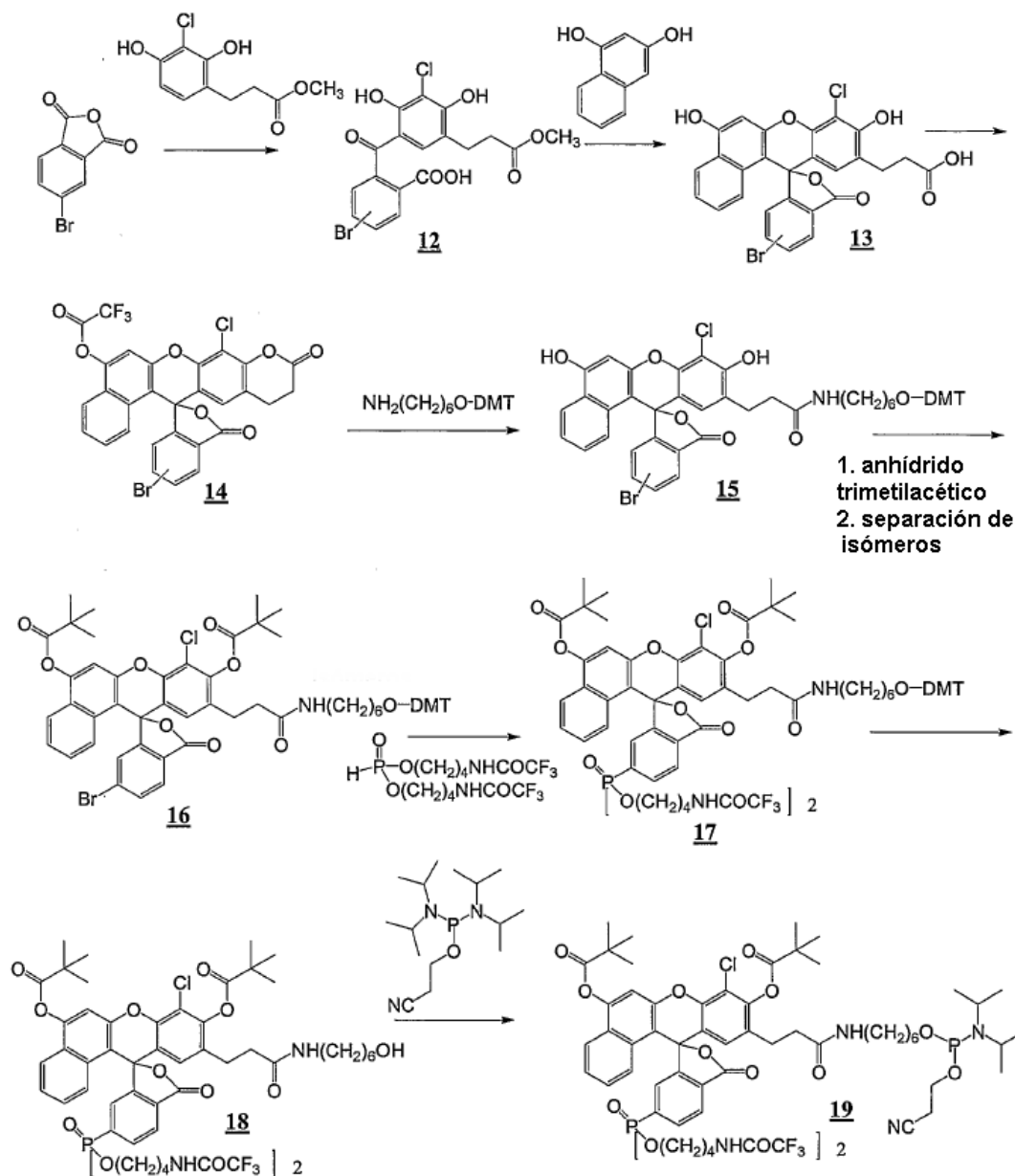
Esquema de Reacción 2



El Esquema de Reacción 2 ilustra la síntesis de un reactivo de pentaclorofosfonato-fluoresceína-fosforamidita (**11**). Se hizo reaccionar el éster metílico (**4**) con 4-bromobenceno-1,3-diol en presencia de ácido metilsulfónico para dar el compuesto intermedio de 3'-hidroxil-2'-ácido propiónico-fluoresceína (**5**), que fue convertido con ácido trifluoroacético/anhidrido de ácido trifluoroacético en la lactona (**6**). Después la lactona se hizo reaccionar con 6-aminohexanol y dimetoxitritilo para formar en compuesto intermedio de DMT (**7**) que se hizo reaccionar después con el reactivo de fosfito para dar el éster de fosfonato (**8**). El éster (**8**) se trató con anhídrido trimetilacético para proteger

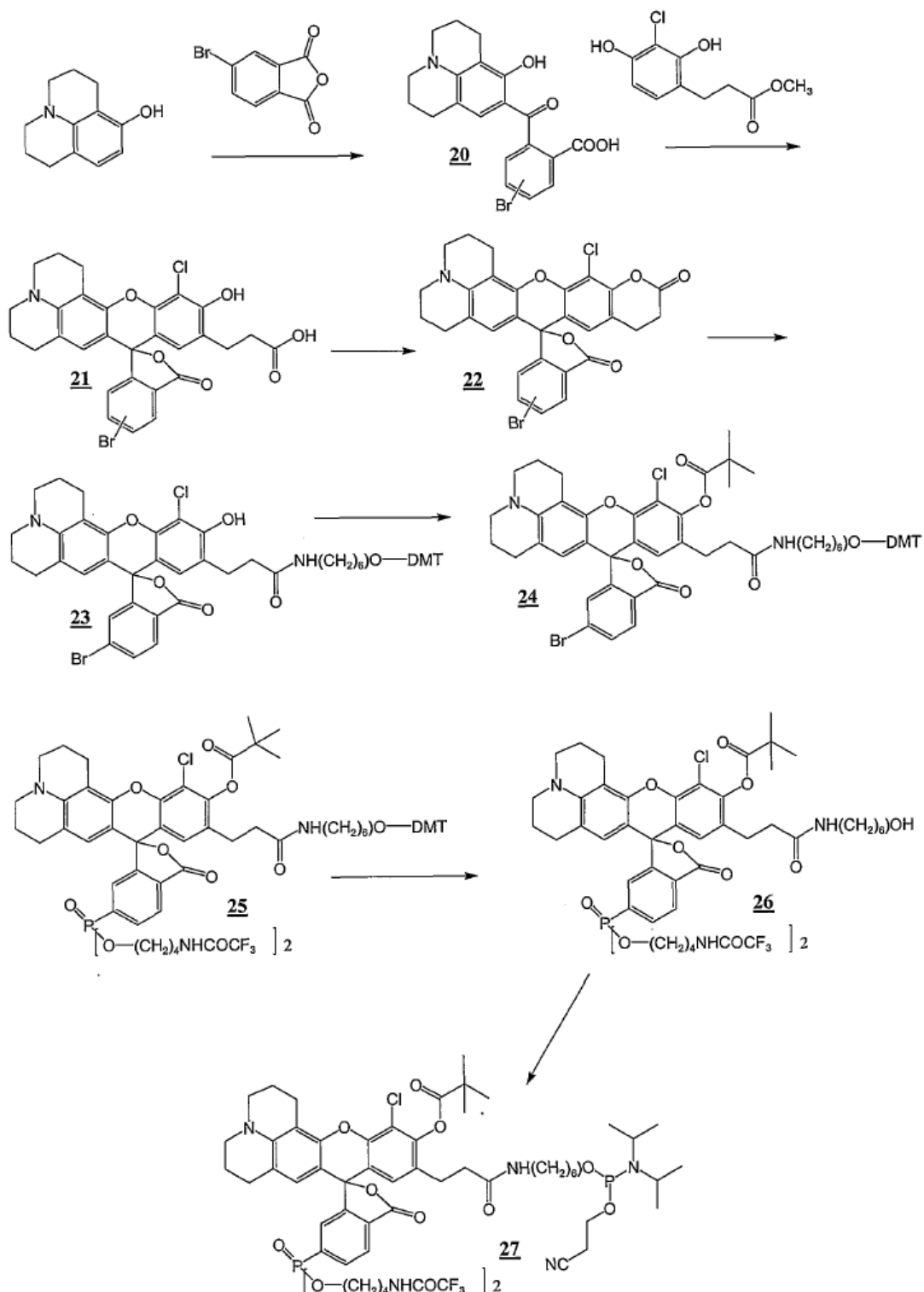
los grupos hidroxilo y después de la purificación en SiO₂ dio el análogo totalmente protegido (**9**). La retirada del grupo protector DMT con tratamiento con TFA dio el alcohol (**10**) que tras el tratamiento con 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (Aldrich, St. Louis, MO) dio como resultado la fosforamidita deseada (**11**).

Esquema de Reacción 3



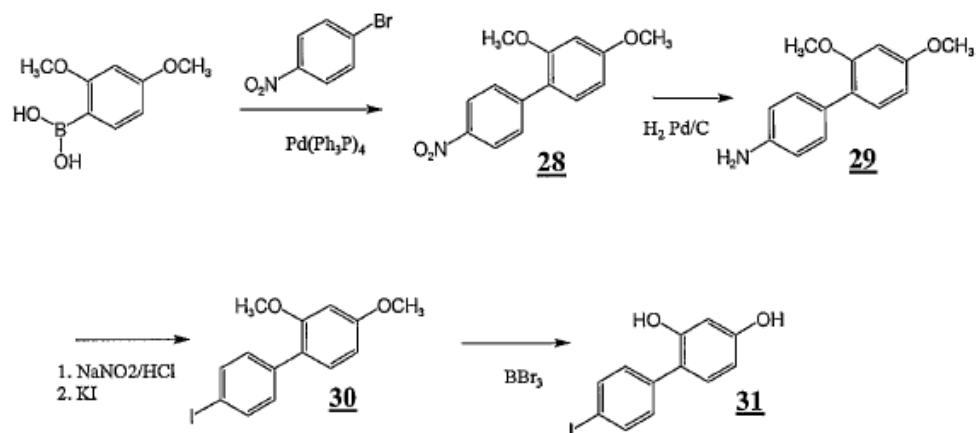
- 5 El Esquema de Reacción 3 ilustra la síntesis de un análogo totalmente protegido de 4'-cloro-6-fosfonatofluoresceína (**19**). Anhídrido 4-bromoftálico y 3-(3-cloro-2,4-dihidroxifenil)propionato de metilo en presencia de AlCl₃ dieron la benzofenona (**12**), que se hizo reaccionar con 1,3-dihidroxinaftaleno para formar dos isómeros del análogo de fluoresceína (**13**). El compuesto intermedio (**13**) se convirtió con ácido trifluoroacético/anhídrido de ácido trifluoroacético en la lactona (**14**). Después la lactona se hizo reaccionar con O-dimetoxitritil-6-aminohexanol (Tetrahedron Letters, 2004, 45(2):317-320) para formar los isómeros intermedios de DMT que se separaron en gel de sílice para dar el isómero 6 principal puro (**15**). El isómero 6 se hizo reaccionar después con anhídrido trimetilacético para dar el análogo totalmente protegido (**16**), que se hizo reaccionar con el reactivo de fosfito (**3**) para dar el éster de fosfonato (**17**). La retirada del grupo protector DMT por tratamiento con TFA dio el alcohol (**18**), que tras el tratamiento con 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita dio como resultado la fosforamidita deseada (**19**).
- 10
- 15

Esquema de Reacción 4



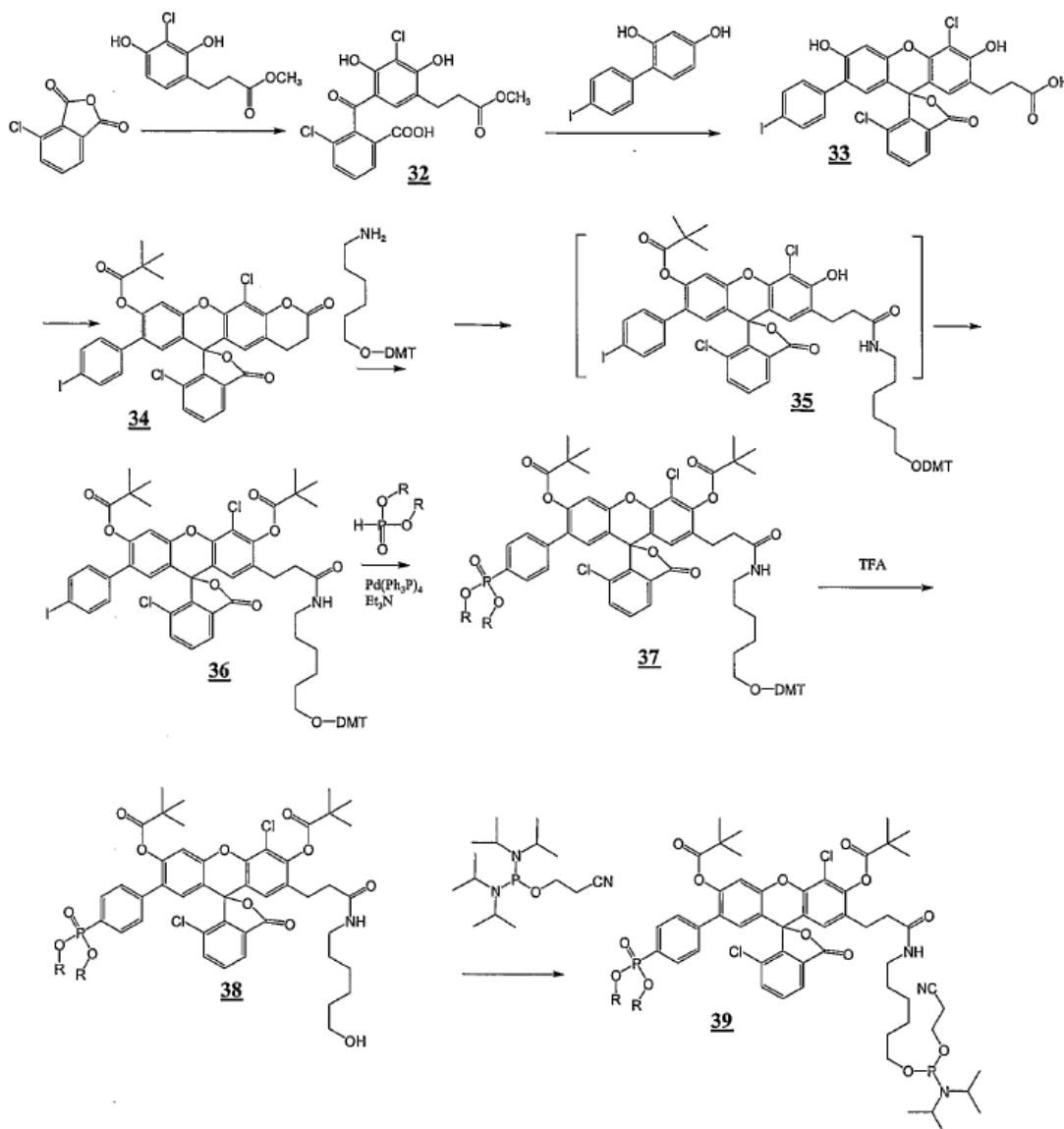
5 El Esquema de Reacción 4 ilustra la síntesis de un 6-fosfonilrodol totalmente protegido (27). La reacción de anhídrido 4-bromoftálico y 8-hidroxijulolidina dio la benzofenona (20), que se hizo reaccionar con 3-(3-cloro-2,4-dihidroxifenil)propionato de metilo para formar el análogo de rodol (21) que se convirtió con ácido trifluoroacético/anhídrido de ácido trifluoroacético en la lactona (22). Después la lactona se hizo reaccionar con O-dimetoxitritil-6-aminohexanol para formar el intermedio de DMT (23), que se hizo reaccionar después con anhídrido trimetilacético para dar el análogo totalmente protegido (24). Se separaron los isómeros en gel de sílice y se siguió adelante con el isómero-6. La retirada del grupo protector DMT con tratamiento con TFA dio el alcohol (26) tras el tratamiento con 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita dio como resultado la fosforamidita (27) deseada.

Esquema de Reacción 5



5 El Esquema de Reacción 5 ilustra la síntesis de 4-(4-yodofenil)resorcinol (**31**). El ácido 2,4-dimetoxifenilborónico y 1-bromo-4-nitrobenceno en presencia de tetrakis(trifenilfosfina)paladio dieron 4-(4-nitrofenil)-2,4-metoxibenceno (**28**). La hidrogenación de **28** en presencia de un catalizador de paladio dio la amina bruta (**29**) que, sin purificación, fue diazotizada y tratada con una disolución de KI para dar el 4-(4-yodofenil)-2,4-dimetoxibenceno (**30**) deseado. El análogo de dimetoxi 30 se trató con tribromuro de boro para dar el 4-(4-yodofenil)resorcinol (**31**).

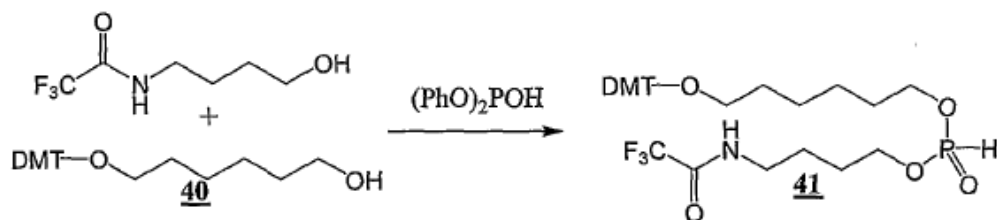
Esquema de Reacción 6



El Esquema de Reacción 6 ilustra la síntesis de la fosforamidita (**39**). La reacción de anhídrido 3-cloroftálico y 3-(3-cloro-2,4-dihidroxifenil)propionato de metilo en presencia de AlCl_3 para formar el análogo de benzofenona, que tras la cristalización dio el cloroisómero 6 puro (**32**). Este isómero se hizo reaccionar con **31** para dar el análogo de fluoresceína sustituida con 7'-(4-yodofenilo) (**33**), que se trató con anhídrido trimetilacético y N-metilimidazol para dar la lactona (**34**). Después la lactona se hizo reaccionar con O-dimetoxitritil-6-aminohexanol para formar el compuesto intermedio de DMT (**35**), que se hizo reaccionar después con anhídrido trimetilacético para dar el análogo total mente protegido (**36**). Este análogo se hizo reaccionar con el reactivo de fosfito (**3**) para dar el éster de fosfonato (**37**). La retirada del grupo protector DMT con tratamiento con TFA dio el alcohol (**38**) que tras el tratamiento con 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita dio como resultado la fosforamidita (**39**) deseada.

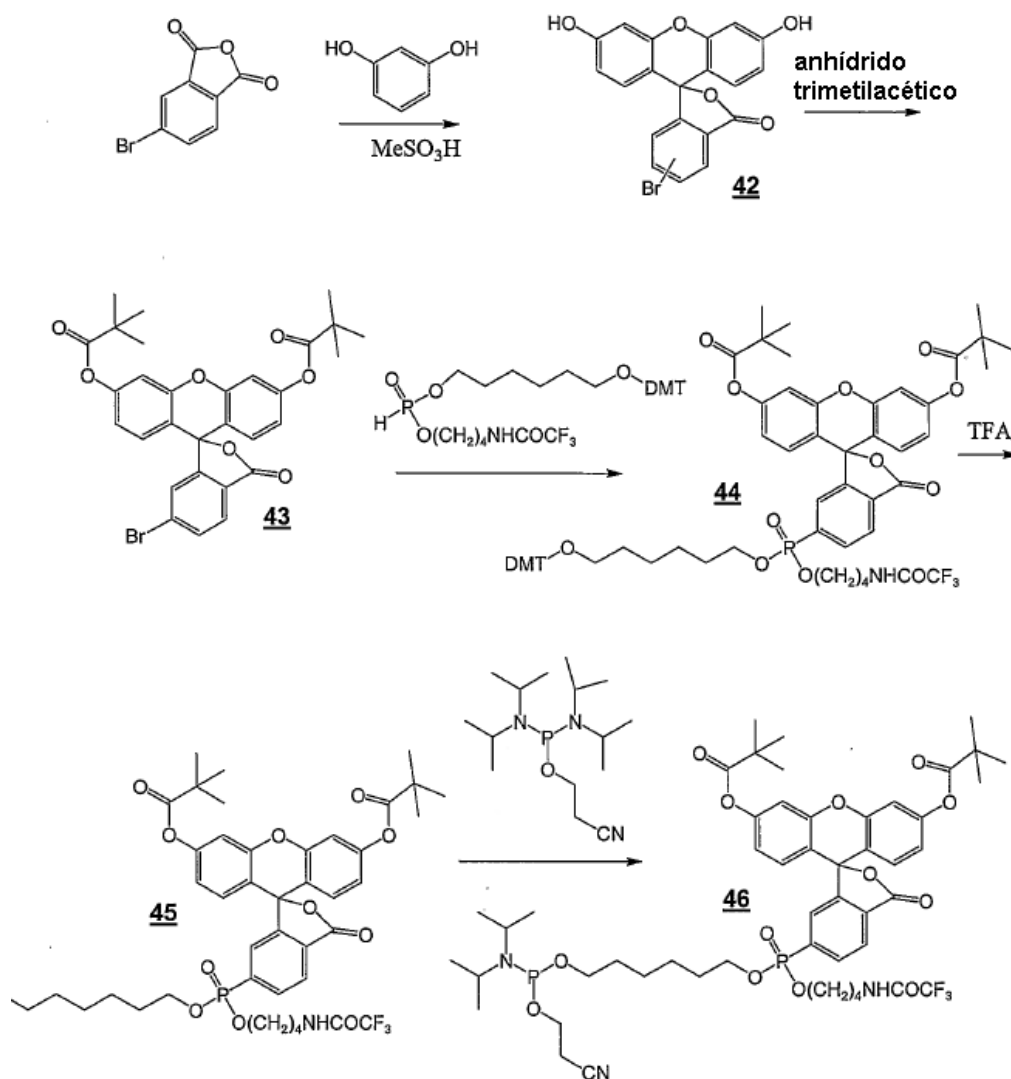
La síntesis de un reactivo de fosfito **41** no simétrico útil se muestra en el Esquema de Reacción 7. El Reactivo **41** permite la introducción de grupos enlazantes reactivos tales como fosforamidita mediante el resto fosfonato.

Esquema de Reacción 7



En un ejemplo, se usó el fosfito **41** para la preparación de una fosoramidita de fluoresceína (**46**) como se muestra en el Esquema de Reacción 8.

Esquema de Reacción 8

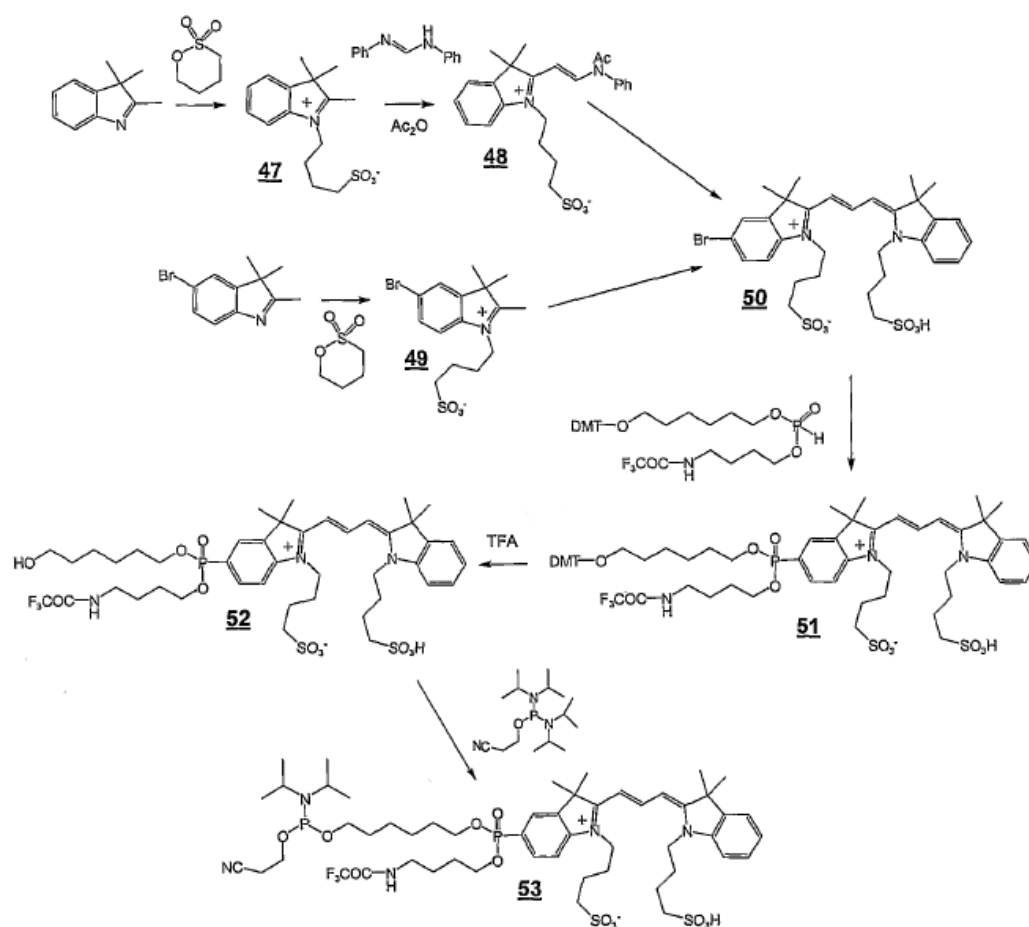


- 5 El Esquema de Reacción 8 ilustra la síntesis de la fosoramidita (**46**). La reacción de anhídrido 4-bromoftálico y resorcinol en presencia de ácido metanosulfónico dio una mezcla de isómeros 5 y 6 de bromofluoresceína (**42**) que se trató con anhídrido trimelítico y N-metilimidazol para dar después de cromatografía en gel de sílice el isómero 6 puro del diéster bloqueado (**43**). El compuesto intermedio (**43**) se hizo reaccionar con el compuesto intermedio **41** para dar el fosfonato (**44**) que se trató después con ácido trifluoroacético para dar el alcohol (**45**). El alcohol, tras el tratamiento con 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita dio como resultado la fosoramidita (**46**) deseada.
- 10

Síntesis de reactivos colorantes de cianina de fosfonato

El Esquema de Reacción 9 ilustra la síntesis de una fosoramidita de cianina de fosfonato (**53**).

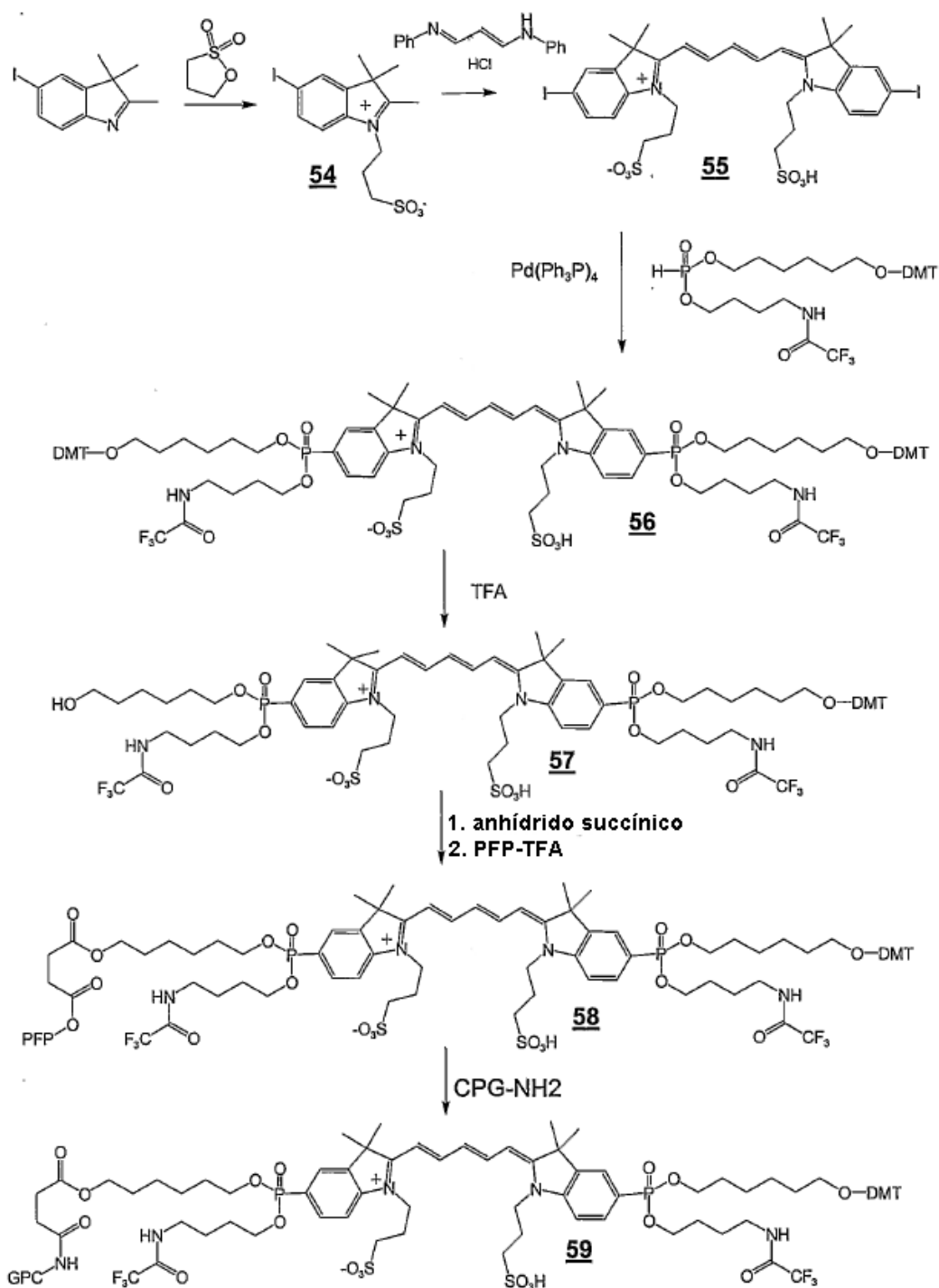
Esquema de Reacción 9



La reacción de 2,3,3-trimetilindolenina y 1,4-butanosulfona (5,4 g, 40 mmol) dio la sal de indolinio deseada (**47**) que reaccionó con N,N'-difenilformamida para dar la formamida (**48**). La reacción de (**48**) con 1-(sulfobutil)-2,3,3-trimetil-5-bromoindolinio, sal interna (**49**) (véase J. Heterocycle Chem., 39:263-269 (2002)) dio el compuesto intermedio de cianina (**50**). El compuesto intermedio (**50**) se hizo reaccionar con el fosfito **41** para dar el fosfonato (**51**), que se trató después con ácido trifluoroacético para dar el alcohol (**52**). El alcohol tras un tratamiento con 2-cianoetil-N,N-diisopropilclorofosoramidita dio como resultado la fosforamidita (**53**) deseada.

El Esquema de Reacción 10 muestra la preparación de un reactivo colorante unido a un soporte sólido de la presente invención.

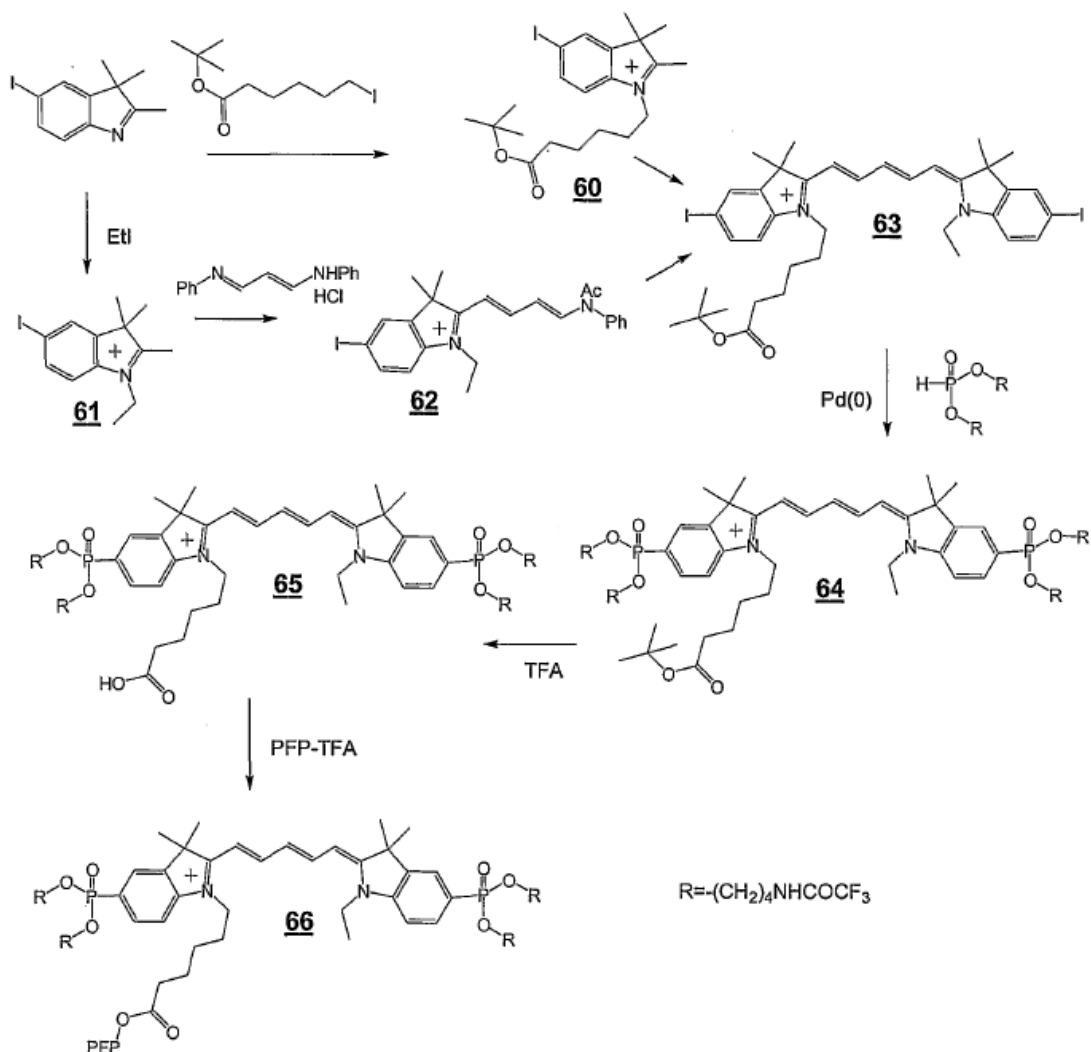
Esquema de Reacción 10



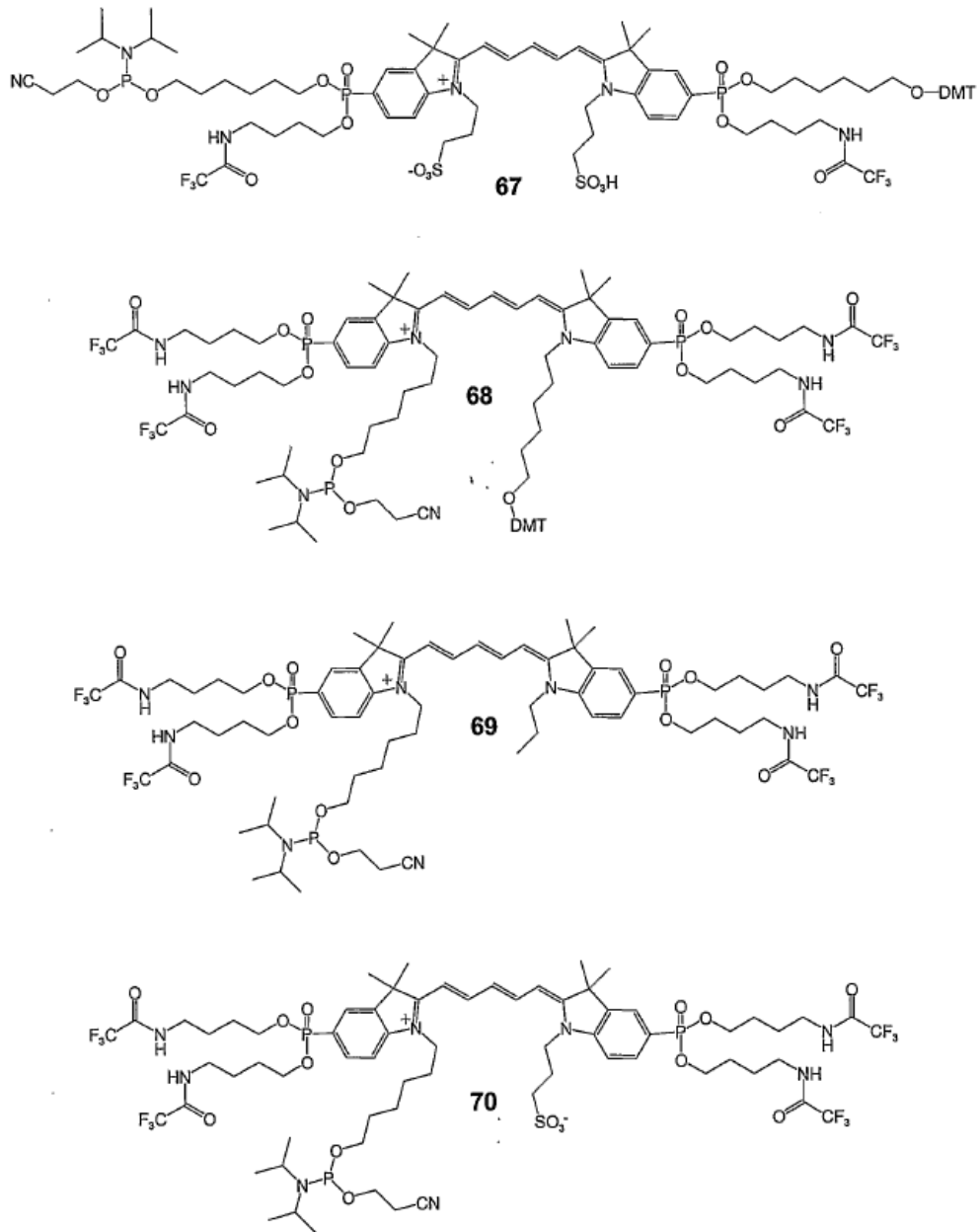
El Esquema de Reacción 10 ilustra la síntesis del soporte sólido de cianina (59). La reacción de 5-yodo-2,3,3-trimetil-3H-indol con 1,3-propanosultona proporcionó la sal de indolinio (54) deseada, que reaccionó con N,N' -difenilformamidina para dar el compuesto intermedio de cianina (55). El compuesto intermedio (55) se hizo reaccionar con el fosfito 41 para dar el dimetiloxitritil-fosfonato (56) que se trató después con ácido trifluoroacético para dar el compuesto intermedio de monometoxitritilfosfonato (57). El compuesto intermedio (57) se hizo reaccionar primero con anhídrido succínico y después con PFP-TFA para dar el éster PFP-activo (58). El éster PFP se hizo reaccionar después con NH₂-CPG para dar el soporte sólido (59) deseado.

El Esquema de Reacción 11 muestra la preparación de un reactivo colorante de cianina de éster-fosfonato de la presente invención.

Esquema de Reacción 11



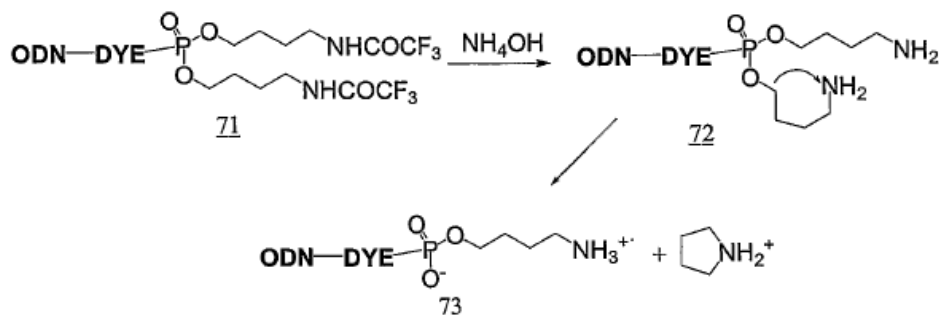
5 En el Esquema de Reacción 11 se hizo reaccionar 5-yodo-2,3,3-trimetil-3H-indolenina con 6-yodohexanoato de terc-butilo o bien con yoduro de etilo para dar las sales de indolinio **60** y **61**, respectivamente. Después el compuesto **61** fue convertido en el compuesto intermedio **62** por reacción con monohidrocloruro de malonaldehído-bis(fenilimino) en presencia de cloruro de acetilo y anhídrido acético. La condensación de **61** y **62** dio como resultado el colorante **63**, que se fosfoniló después por reacción con el fosfito **3** en presencia de tetrakis(trifenilfosfina)paladio y N-etilmorfolina para dar el colorante de fosfonato **64**. Para retirar el grupo protector terc-butilo, el compuesto **64** se trató con ácido trifluoroacético. El ácido **65** resultante fue convertido después en el éster de PFP **66** por reacción con trifluoroacetato de pentafluorofenilo.

Tabla 3. Fosforamiditas de cianina preferidas

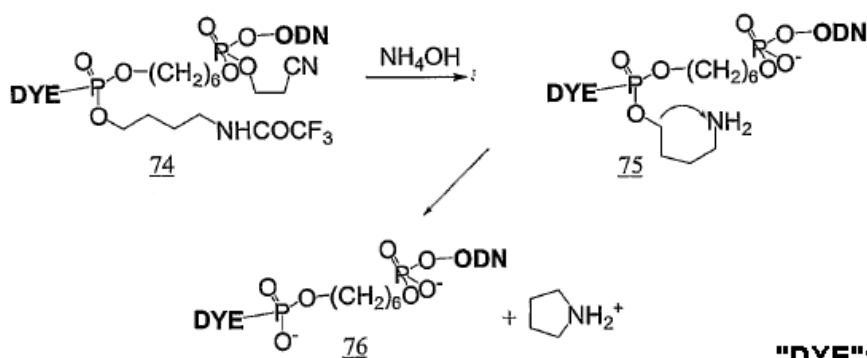
El Esquema de Reacción 13 ilustra la desprotección de los colorantes de fosfonato protegidos en un oligonucleótido sintetizado.

Esquema de Reacción 13

A



B

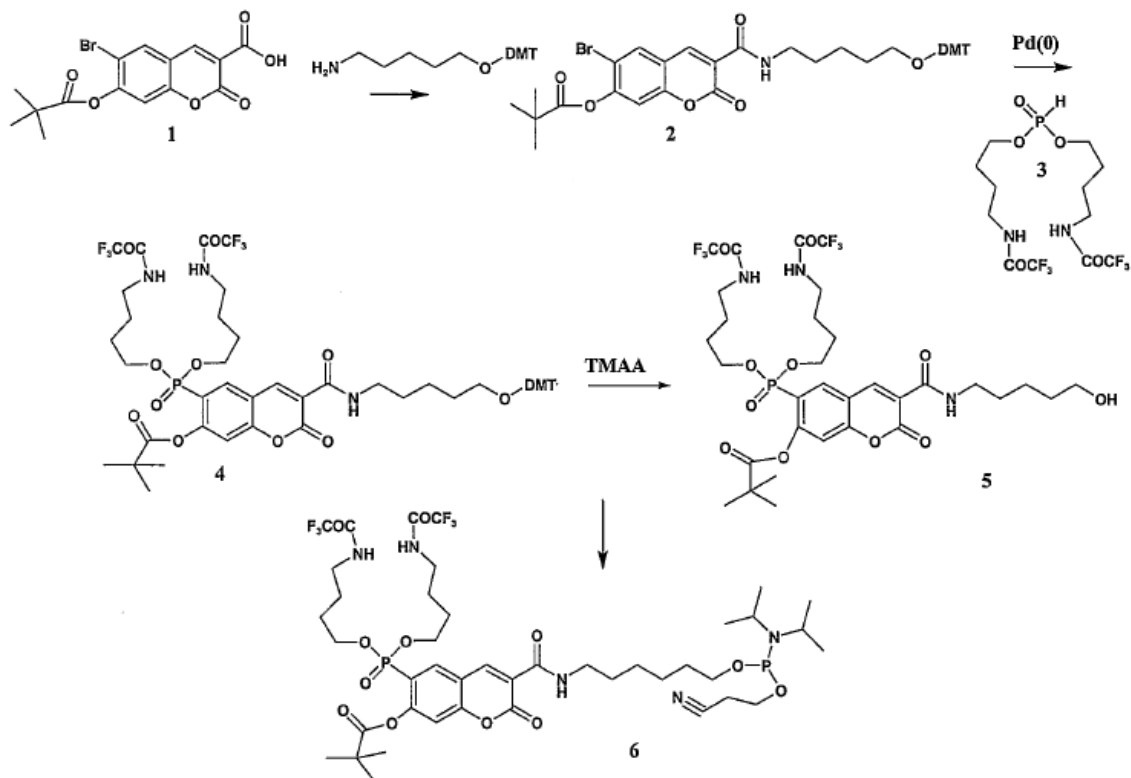
**"DYE"= colorante**

5 El conjugado oligonucleótido-colorante-fosfonato protegido (**71** y **74**) puede ser sintetizado con cualquiera de las fosforamiditas de la invención. La desprotección con hidróxido de amonio da los conjugados oligonucleótido-fosfonato de ión dipolar-colorante (**73** y **76**). Las estructuras de los conjugados **73** y **76** fueron confirmadas por espectroscopía de masas. Las estructuras **72** y **74** son compuestos intermedios postulados con un mecanismo sugerido para la hidrólisis.

El nuevo reactivo fosfito de bis(4-(2,2,2-trifluoroacetamido)butilo) (**3**) se puede usar en la síntesis de otros colorantes de la presente invención.

10 En las secciones a continuación, se proporcionan esquemas para síntesis ilustrativas de diversos colorantes. Un experto en la técnica apreciará que la invención no se limita a estos métodos. Además, los expertos en la técnica apreciarán que los esquemas de reacción propuestos pueden tener que ser modificados para conseguir los productos deseados en los Esquemas de Reacción 14 a 19.

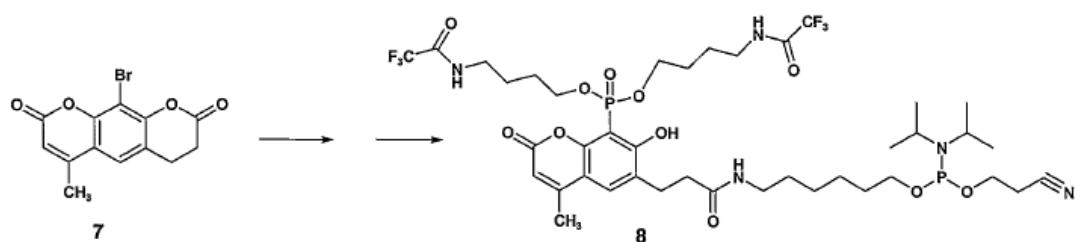
Esquema de Reacción 14



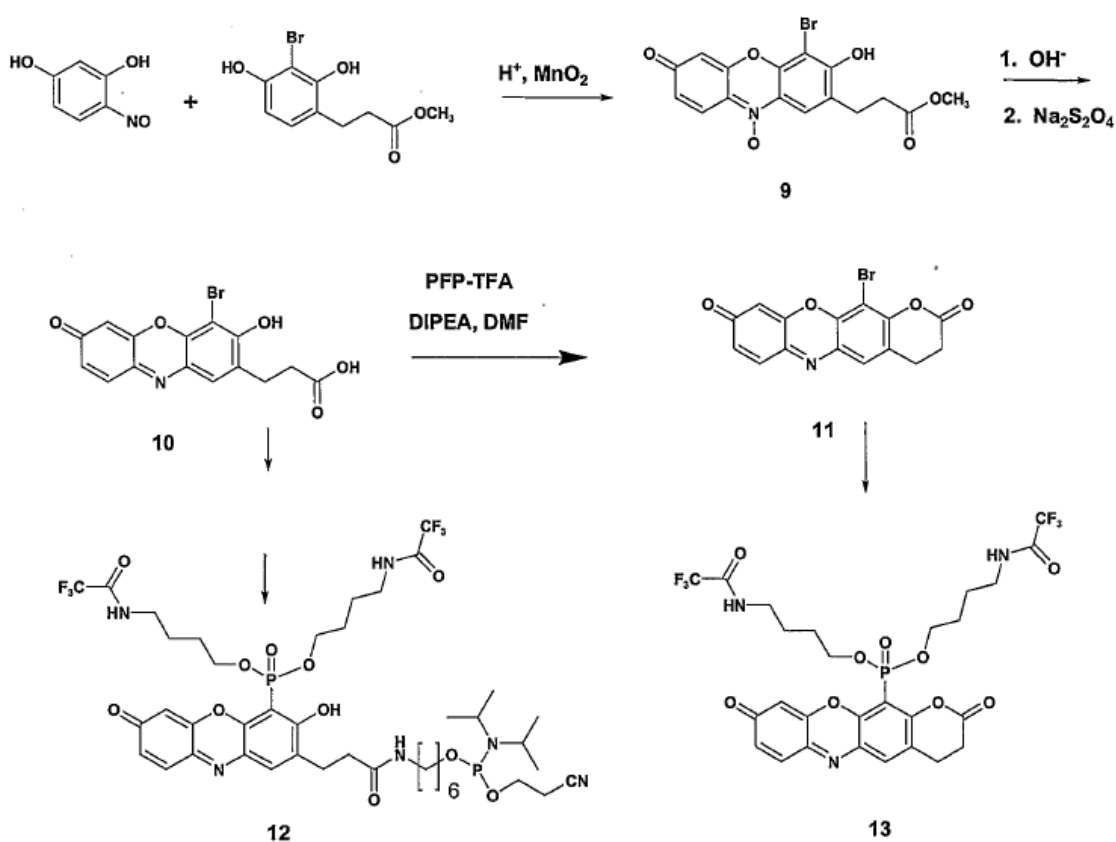
5 Se pueden sintetizar colorantes de cumarina de fosfonato sustituidos en 6 partiendo del ácido 6-bromo-7-hidroxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico protegido (**1**) (para síntesis véase Baker, et al., Chem. Soc. 170-173 (1970)) como se muestra en el Esquema de Reacción 14. El compuesto (**1**) se hace reaccionar con 5-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)pentan-1-amina para dar el análogo de DMT-amida **2**. La reacción de (**2**) con fosfito de bis(4-(2,2,2-trifluoroacetamido)butilo) (**3**) proporciona el colorante de fosfonato protegido (**4**). En la siguiente etapa se retira el grupo protector dimetoxitritilo para dar el alcohol (**5**) que puede ser convertido en la fosforamidita protegida (**6**).

10 La síntesis de análogos de cumarina halogenados sustituidos en 8 se describió en la solicitud de patente internacional WO03023357. La 8-bromocumarin-lactona (**7**) puede ser convertida de un modo similar descrito en el Esquema de Reacción 14 para dar la fosforamidita equivalente (**8**) mostrada en el Esquema de Reacción 14a.

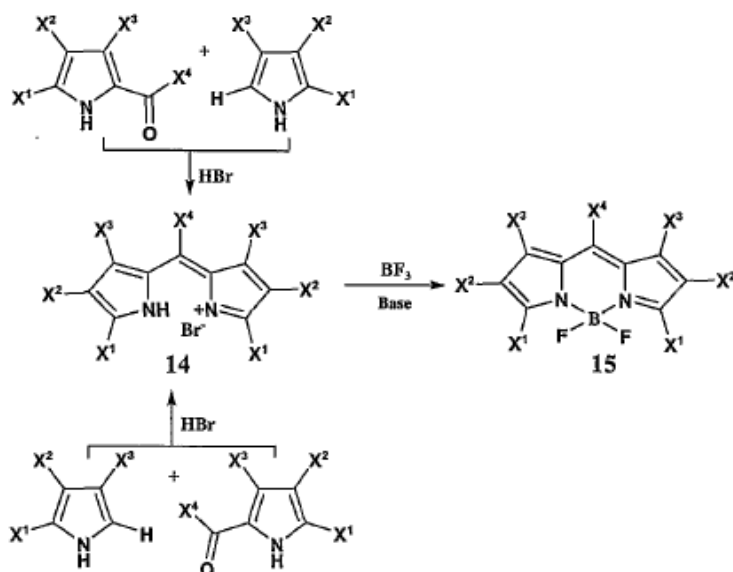
Esquema de Reacción 14a



Esquema de Reacción 15

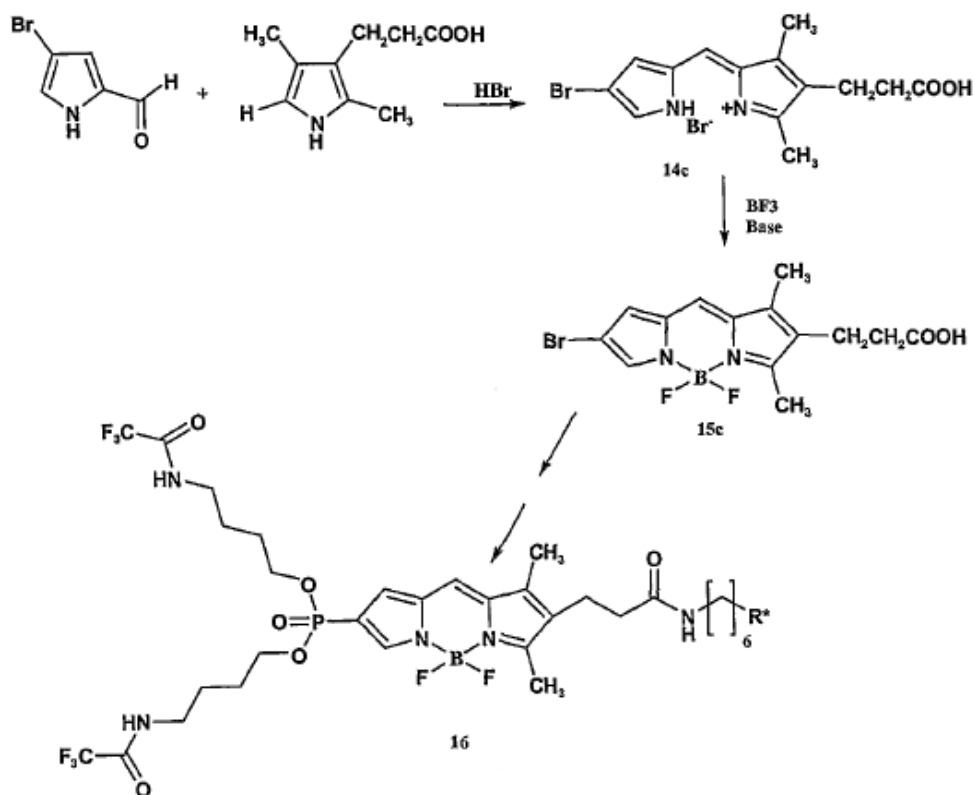


La síntesis de resorufin-lactonas halogenadas (**9**) se describió en la solicitud de patente internacional WO 03/0233357. Brevemente, la reacción de nitrosobenceno-1,3-diol y 3-(3-bromo-2,4-dihydroxyfenil)propanoato de metilo en presencia de MnO_2 ácido da la resofurina-N-óxido (**9**) que puede ser reducida al ácido bromoresorufinpropiónico (**10**) (Esquema de Reacción 15). Este compuesto fue lactonizado (**11**) y puede ser convertido en el análogo de fosfonato-lactona **12** de manera similar a la descrita en el Esquema de Reacción 15. El bromoácido (**10**) también puede ser convertido en la fosoramidita de fosfonato-resorufina **13**.

Esquema de Reacción 16

Los compuestos heterocíclicos parentales de difluoruro de dipirrometenoboro con un grupo reactivo para la unión a materiales biológicos se describió por primera vez en la patente de EE.UU. N° 4.774.339. Se reportó que los productos de difluoruro de dipirrometenoboro eran modificables en una reacción posterior por técnicas químicas conocidas por un experto en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, sulfonación, nitración, alquilación, acilación y halogenación. Se reportó además que los sustituyentes pueden en algunos casos ser modificados adicionalmente para introducir grupos funcionales químicamente reactivos. Brevemente, estos difluoruros de dipirrometenoboro se preparan como se muestra en el Esquema de Reacción 16. Se hizo reaccionar un pirrol-5-carboxaldehído sustituido con un pirrol sustituido en presencia de ácido bromhídrico para dar el compuesto intermedio de dipirrometeno sustituido (14), que fue convertido en el colorante de difluoruro de dipirrometenoboro sustituido (15). Los símbolos X¹, X², X³ y X⁴ tienen la misma definición que la descrita previamente para esta clase de colorantes.

Esquema de Reacción 17



Se pueden sintetizar colorantes de fosfonato de difluoruro de dipirrometenoboro de interés como se muestra en el Esquema de Reacción 17. La reacción que parte de 4-bromopirrol-2-carboxaldehído y ácido 3-(2,4-dimetil-1H-pirrol-3-il)propanoico da el compuesto intermedio de bromo **14**, que con la base BF_3 da el difluoruro de bromodipirrometenoboro **15**. El colorante **15** puede ser convertido adicionalmente por medio de un compuesto intermedio de fosfonato en el compuesto intermedio de difluoruro de dipirrometenoboro-fosfonato (**16**) donde R^* puede ser un soporte sólido o una fosforamidita.

En otra realización el grupo carboxílico en el compuesto intermedio **15c** puede ser convertido en un resto reactivo tal como un éster de pentafluorofenilo o succinimidilo.

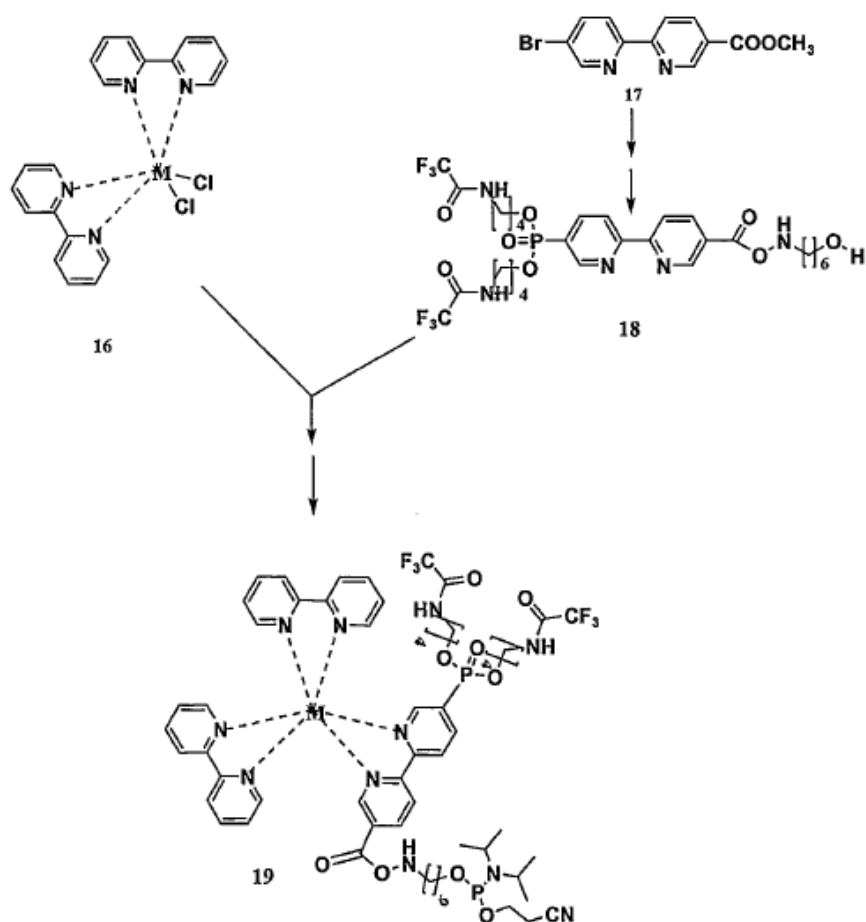
- 10 Los pirrol-2-carboxaldehídos necesitados para la síntesis de pirrolometenos están disponibles en el mercado o bien se preparan fácilmente a partir de los correspondientes pirroles por la formulación de Vilsmeier Haak (R. M. Silverstein, E. E. Riskiewicz y C. Willard. *ORG. SYNTH COLL VOL IV*, página 831).

- 15 Derivados de pirrol sustituidos apropiados (Esquema de Reacción 17) están disponibles en el mercado o bien pueden ser sintetizados por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como describe Corwin (R. Elderfield, *HETEROCYCLIC COMPOUNDS*, vol. 1, cap. 6, *THE CHEMISTRY OF PYRROLE AND ITS DERIVATIVES*) (1950); Silverstein, Riskiewicz y Willard. *ORG. SYNTH COLL VOL IV*, página 831, y Korostava et al., *Russ. J. Org. Chem.* 34, 1691 (1998)). Los ácidos grasos de pirrol se preparan de la manera más conveniente por la reacción de Wittig (véase Wittig & Schollkopf, *Ber.* 87: 1318 (1954)) de aldehídos de pirrol con derivados de fosfonio o fosfonato terminados con carboxi o carboxi protegido.

- 20 Colorantes de fosfonato complejado con rutenio (II)

- 25 La síntesis de colorantes de fosforamidita complejada con rutenio (II) de ligandos mixtos se ha reportado previamente partiendo de cloruro de *cis*-bis(2,2'-bipiridil)rutenio(II) deshidrato, disponible en el mercado (Khan et al, *Inorg. Chem.* 38:3922-3925 (1999)). Partiendo con cloruro de *cis*-bis(2,2'-bipiridil)rutenio(II) deshidrato (**16**) y ácido (2,2'-bipiridina)-5-carboxílico, éster 5-bromo-metilico (**17**; Haino et al, *Chem. Omm.*, 402-403 (2002)). El procedimiento de Khan et al permite la síntesis de una fosforamidita de rutenio bipiridilo (**19**) como se muestra en el Esquema de Reacción 18.

Esquema de Reacción 18



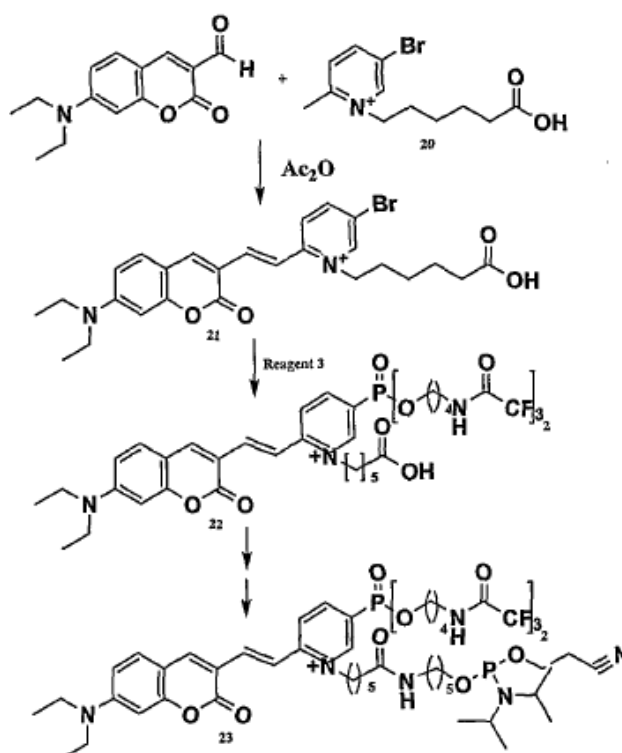
Brevemente, el procedimiento estándar convierte el éster metílico **17** en el alcohol de fosfonato-bipiridilo bloqueado (**18**), cuya reacción con **16** seguido de la introducción de la fosforamidita como enseña Khan et al puede proporcionar la fosforamidita de bipiridil-rutenio de fosfonato **19**.

- 5 En otra realización, el grupo carboxílico en el compuesto **19** puede ser convertido en un resto reactivo tal como un éster de pentafluorofenilo o succinimidilo en lugar del grupo fosforamidita.

Colorantes de fosfonato basados en polimetino

Los colorantes basados en polimetino de fosfonato se pueden sintetizar por el método básico descrito en el documento US 2004/0260093. La estrategia se bosqueja brevemente en el Esquema de Reacción 19.

Esquema de Reacción 19



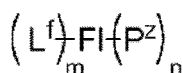
La reacción de 7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromeno-3-carbaldehído con un compuesto con -CH activo **20** en presencia de Ac₂O proporciona un bromo-intermedio (**21**) que tras la reacción con el reactivo de fosfito **3** proporciona el compuesto intermedio de fosfonato bloqueado (**22**). Este compuesto intermedio puede ser convertido en el reactivo de fosoramidita (**23**) del modo usual.

En una realización relacionada el grupo carboxílico en el compuesto intermedio **23** puede ser convertido en un resto reactivo tal como un éster de pentafluorofenilo o succinimidilo en lugar del grupo fosoramidita.

En aún otra realización, partiendo de un 2-oxo-2H-cromeno-3-carbaldehído sustituido con halógeno, el halógeno puede ser sustituido por el grupo fosfonato en una cualquiera de las posiciones de carbono hibridado en sp².

10 Sondas de oligonucleótidos y otros agentes biológicos marcados

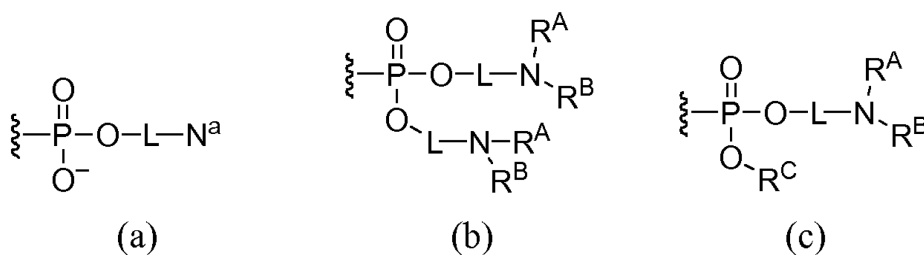
En otro aspecto, la presente invención proporciona una sonda de oligonucleótido que tiene un reactivo colorante fluorescente unido, en donde el reactivo colorante fluorescente tiene la fórmula:



en donde

15 FI es un componente colorante fluorescente;

L^f es un grupo enlazante que tiene un miembro unido seleccionado del grupo que consiste en un grupo funcional protegido o no protegido, un grupo reactivo, un resto enlazante polifuncional, un resto de fosoramidita y un soporte sólido; P^z es un grupo fosfonato de ión dipolar que tiene la fórmula (a) o un grupo fosfonato protegido que tiene la fórmula (b) o (c).



5 en donde la línea ondulada indica la unión directa a un carbono sp^2 de dicho componente colorante fluorescente; L es un grupo enlazante; N^a es un grupo de ión amonio; cada uno de R^A y R^B se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo (C_1-C_8) y un grupo protector lábil; R^C se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo (C_1-C_8), arilo, aril-alquilo (C_1-C_4), un grupo protector lábil o un grupo enlazante alqueno que tiene un grupo hidroxilo distal o hidroxilo protegido; el subíndice n es un número entero de 1 a 2; m es 1;

y una sal del mismo; y

en donde la unión del reactivo colorante fluorescente al oligonucleótido es mediante un grupo funcional presente en L^i .

10 Como se apuntó anteriormente, la presente invención encuentra amplia aplicación en el marcado de ácidos nucleicos (incluyendo nucleótidos, nucleósidos, ADN, ARN, APN, ácidos nucleicos bloqueados, oligonucleótidos y similares), péptidos o proteínas, oligosacáridos, proteínas glicosiladas, y otros agentes biológicos. Adicionalmente, los ácidos nucleicos pueden incluir bases modificadas (p.ej., pirimidinas sustituidas en 5, purinas sustituidas en 3, deazapurinas sustituidas, pirazolo[3,4-d]pirimidinas sustituidas, y similares). La invención también encuentra utilidad
15 en el marcado de oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados que tienen grupos unidos tales como ligantes del surco menor, agentes de inactivación o inactivadores, intercaladores, grupos reticuladores y similares.

En una realización de la invención, los colorantes de fosfonato contienen al menos un grupo $-L-R^X$, donde R^X es el grupo reactivo que está unido al fluoróforo por un enlace covalente L. En ciertas realizaciones, el enlace covalente que une el colorante de fosfonato a R^X contiene múltiples átomos interpuestos que sirven como espaciador. Los colorantes con un grupo R^X reactivo marcan fluorescentemente una amplia variedad de sustancias orgánicas o inorgánicas que contienen o están modificadas para contener grupos funcionales con reactividad adecuada, dando como resultado la unión química de la sustancia conjugada (R^Y), representada por $-L-R^Y$. El grupo reactivo y grupo funcional son típicamente un electrófilo y un nucleófilo que pueden generar un enlace covalente. Típicamente, la reacción de conjugación entre el colorante reactivo y la sustancia a ser conjugada da como resultado que se incorporen uno o más átomos del grupo reactivo R^X a un nuevo enlace L que une el colorante de fosfonato a la sustancia conjugada R^Y .

Se muestran a continuación ejemplos seleccionados de grupos funcionales implicados en formar enlaces donde la reacción de un grupo electrófilo o un grupo nucleófilo da un enlace covalente.

Los ejemplos de grupos nucleófilos incluyen $-NH_2$, $-NHNH_2$, $-ONH_2$, $NHC(O)NHNH_2$, $-OH$, $-COOH$ o $-SH$. Los grupos electrófilos son ésteres activados, acrilamidas, azidas de acilo, haluros de acilo, aldehídos o cetonas, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, anhídridos, haluros de arilo, aziridinas, boranatos, ácidos carboxílicos, carbodiimidas, diazoalcanos, epóxidos, haloacetamidas, halotriazinas, imidoésteres, isocianatos, isotiocianatos, maleimidas, fosforamiditas, haluros de sililo, ésteres de sulfonato y haluros de sulfonilo. Adicionalmente, un espaciador puede incluir heteroátomos en porciones lineales o acíclicas, porciones cíclicas, anillos aromáticos o combinaciones de los mismos.

Las sustancias conjugadas incluyen ácidos nucleicos, oligonucleótidos, conjugados de oligonucleótidos, proteínas, péptidos, fármacos, inmunoglobulinas, receptores, toxinas, ligandos orgánicos de molécula pequeña, sustratos de enzimas, vitaminas, carbohidratos, biotina, estreptavidina, sustrato sólido, y un soporte sólido para síntesis de oligonucleótidos) descritos y usados en la presente memoria.

40 En una realización, los conjugados de polímeros biológicos tales como péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polímeros de ácidos nucleicos también son marcados con un segundo colorante fluorescente o no fluorescente, incluyendo un colorante adicional de la presente invención, para formar un par de transferencia de energía.

En aún otra realización, los conjugados de polímeros biológicos tales como péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polímeros de ácidos nucleicos también son marcados con un segundo colorante fluorescente o no fluorescente, además del colorante de la presente invención, para formar un par de transferencia de energía donde el fluorescencia de este último es inactivada. La unión de estos conjugados a su receptor o complemento natural da como resultado un cambio conformacional o escisión del enlace, con un aumento en la fluorescencia. Los ejemplos seleccionados preferidos de sondas de oligonucleótidos marcadas de manera dual son $5'-(MB)_n^y F1^A$ -oligonucleótido- $F1B-3', 5'-F1^A$ -oligonucleótido- $F1^B-M^B-3'$, donde $F1^A$ y $F1^B$ son un fluoróforo o bien un inactivador, a condición de que

una sonda pueda contener sólo un inactivador y un fluoróforo, MB es un ligante del surco menor y n^y es 0 o 1. En una realización el inactivador es no fluorescente.

5 En una realización relacionada las sondas conjugadas preferidas se usan en métodos de amplificación para detectar dianas de ácidos nucleicos, polimorfismos de ácidos nucleicos y análisis de expresión de genes. Estos métodos se describen en EE.UU. 6.312.894, la solicitud de patente internacional WO 2004/018626, Livak, KJ y Schmittgen, TD. Methods 25: 402-408 (2001).

Se describen ejemplos de ligantes del surco menor en la patente de EE.UU. 5.801.155 e inactivadores en la patente de EE.UU. 6.699.975 y la solicitud de patente internacional WO 02099141, todas las cuales se incluyen por referencia en sus totalidades.

10 En otra realización, la sustancia conjugada es una base de ácido nucleico, nucleósido, nucleótido o un polímero de ácido nucleico, incluyendo los que fueron modificados para poseer un enlazador o espaciador adicional para la unión de los colorantes de la invención, tal como un enlace alquililo (patente de EE.UU. 5.047.519; documento US RE 38.416), un enlace aminoalilo (patente de EE.UU. N° 4.711.955) u otro enlace.

15 En una realización un xantenofosfonato está unido a un soporte sólido mediante un enlazador escindible. La molécula del enlazador también contiene un grupo hidroxilo protegido con un grupo bloqueante de DMTr (o similar). Después de retirar el grupo DMTr, se sintetiza un oligonucleótido en un sintetizador de oligonucleótidos automatizado mediante la unión por etapas de unidades de nucleótido al grupo hidroxilo. Se introduce un inactivador en el extremo 5' con la fosfamiridita apropiada, o post-sintéticamente con un inactivador que contiene un grupo reactivo, para dar un ODN que tiene un resto xantenofosfonato (XP) unido y un inactivador (Q). Un soporte sólido compatible con la síntesis de oligonucleótidos incluye vidrio de poro controlado, poliestireno, plástico, nylon, oro y similares.

20 En una realización un xantenofosfonato (XP) está unido a un soporte sólido mediante un enlazador escindible. La molécula del enlazador también contiene un grupo hidroxilo protegido con un grupo bloqueante de DMTr (o similar). Después de retirar el grupo DMTr, se sintetiza un oligonucleótido en un sintetizador de oligonucleótidos automatizado mediante la unión por etapas de unidades de nucleótido al grupo hidroxilo. Un fluoróforo X^P se introduce en el extremo 3' con la fosforamidita apropiada, o post-sintéticamente con un fluoróforo X^P que contiene un grupo reactivo, para dar un ODN que tiene un resto X^P unido, o alternativamente un X^P y un inactivador (Q) o además del X^P y Q también un MB (MB-Q-ODN-L-F1). A este respecto se apunta que la síntesis de MBs y su unión a ODNs es bien conocida (véase por ejemplo la patente de EE.UU, N° 5.801.155, N° de serie 09/539.097 y 9/141.764; todas las cuales se incorporan expresamente en la presente memoria por referencia).

Ejemplos

Parte experimental general

35 Todas las reacciones sensibles al aire y al agua se llevaron a cabo bajo una ligera presión positiva de argón. Los disolventes anhidros se obtuvieron de Aldrich (Milwaukee, WI). La cromatografía de desarrollo rápido se realizó en gel de sílice de malla 230-400. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de puntos de fusión Mel-temp en capilaridad abierta, y no están corregidos. El análisis elemental fue realizado por Quantitative Technologies Inc. (Boundbrook, NJ). Los espectros de absorción UV-visible se registraron en el intervalo 200-400 nm en un espectrofotómetro UV-2100 (Shimadzu) o un Lambda 2 (Perkin Elmer). Los espectros de 1H NMR se ejecutaron a 20°C en un espectrofotómetro Varian 300; los desplazamientos químicos se reportan en ppm campo abajo desde Me_4Si ; la cromatografía de capa fina se ejecutó en placas de gel de sílice 60 F-254 (EM Reagents) con fondo de aluminio.

40 En los ejemplos a continuación, la numeración de compuestos se refiere a los números proporcionados en los Esquemas de Reacción 1-13.

Ejemplo 1

45 Fosfito de bis(4-(2,2,2-trifluoroacetamido)butilo) (**3**)

Este ejemplo demuestra la síntesis del nuevo reactivo de fosfonilación (**3**) mostrada en el Esquema de Reacción 1.

50 Se cargó un matraz de 250 ml con una barra de agitación magnética, compuesto **1** (véase J. Org. Chem., 62(20):6712-6713 (1997)) (9,455 g, 51 mmol), piridina (100 ml) y fosfito de difenilo (**2**) (7,035 g, 25,5 mmol). La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, después se concentró en un evaporador rotatorio, se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con ácido cítrico al 10% (2 x 150 ml). La fase acuosa se reextrajo con acetato de etilo (100 ml) y las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a vacío. El residuo se cromatografió en sílice eluyendo, primero, con acetato de etilo para separar el fenol y, segundo, con acetona para eluir el fosfito **3** deseado. La concentración de las fracciones de producto puro dio 8,0 g (75%) del fosfito **3** como un líquido viscoso. 1H NMR (dms o - d_6): 9,44 (s a, 2H), 6,82 (d, J=695 Hz; 1 H), 4,0 (m, 4H), 3,21 (1, J=6,2 Hz; 4 H), 1,70-1,50 (m, 8 H). ^{31}P NMR (dms o - d_6): 9,02 (d, J=695 Hz). ^{19}F NMR: 0,86 (s).

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la síntesis de un análogo de 4',4,5,6,7-pentacloro-7'-fosfonato-fluoresceína protegido (**11**) mostrado en el Esquema de Reacción 2.

Compuesto **5**

- 5 Se cargó un matraz de fondo redondo de 0,5 l equipado con barra de agitación magnética con 4-bromoresorcinol (3,62 g, 19,2 mmol), compuesto (**4**) (8,264 g, 16,0 mmol, preparado como se describe en la solicitud de patente internacional WO 03/023357) y ácido trifluoroacético (50 ml). Se añadió ácido metanosulfónico (50 ml) y la mezcla resultante se agitó a +80°C durante 3 h. La disolución roja resultante se enfrió y se vertió en hielo (~400 g). El sólido obtenido se recogió por filtración en un embudo de vidrio sinterizado, se lavó con agua (3 x 40 ml) y se disolvió en una mezcla de agua (300 ml) y trietilamina (10 ml). La disolución se calentó hasta el punto de ebullición con agitación, después se enfrió y se acidificó a pH ~2 añadiendo ácido clorhídrico acuoso. La suspensión fina resultante se extrajo con acetato de etilo, se lavó dos veces con salmuera, se secó sobre MgSO₄. La concentración proporcionó el producto **5** bruto, que estaban contaminado con su análogo desbromado, formado durante la reacción de condensación. La mezcla se separó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de metanol (0 a 15%) en trietilamina al 3% en diclorometano. Las fracciones que contenían el compuesto **5** puro (sal de trietilamonio) se recogieron y concentraron. El residuo se suspendió en ácido clorhídrico 1 N y se extrajo con acetato de etilo. La disolución orgánica se separó, se lavó dos veces con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró, se concentró y se secó a vacío para dar el producto **5** puro deseado (5,37 g, 51%).

Compuesto **7**

- 20 Se cargó un matraz de fondo redondo de 0,5 l con el compuesto **5** (2,1 g, 2,29 mmol), ácido trifluoroacético (10 ml), CH₂Cl₂ (10 ml) y anhídrido trifluoroacético (10 ml). Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 10 min, se concentró la disolución. El TFA residual se retiró por co-evaporación con diclorometano. El secado a vacío dio la lactona **6** como un sólido blanquecino. Se añadió a la lactona una disolución de 6-aminohexanol (0,75 g, 6,44 mmol) y trietilamina (2,1 ml, 1,53 g, 15,0 mmol) en DMF (30 ml) y la mezcla resultante se agitó durante 20 min. Se añadió trietilamina (4,2 ml, 3,03 g, 30,0 mmol) seguido de cloruro de dimetoxitritilo (13,47 g, 9,625 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche, se diluyó con acetato de etilo (300 ml) y se lavó con ácido cítrico al 10% (100 ml) y agua (4 x 30 ml). Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se cromatografió en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo para proporcionar 2,2 g (91%) del producto **7** deseado como un sólido rojo.

30 Compuesto **9**

- Se cargó un matraz de 25 ml con barra de agitación magnética, el compuesto **7** (2,10 g, 1,99 mmol), DMF (5,0 ml), trietilamina (0,50 ml, 0,362 g, 3,58 mmol) y el fosfito (**3**) (0,873 g, 3,15 mmol). Se burbujeó argón a través de la disolución durante 2 min y se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,30 g, 0,26 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 3 h. Se añadió otra porción de trietilamina (0,25 ml, 0,181 g, 1,8 mmol) y el fosfito **3** (0,426 g, 1,57 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (0,15 g, 0,13 mmol) para completar la reacción, para dar (**8**). Después de agitar a 80°C durante 1 h adicional, se enfrió la reacción y se trató con trietilamina (2,23 ml, 1,618 g, 16,0 mmol), 1-metilimidazol (0,1 ml, 0,104 g, 1,26 mmol) y anhídrido trimetilacético (1,622 ml, 1,49 g, 4,0 mmol). Se dejó proceder la reacción a temperatura ambiente durante una noche y después se concentró. El aceite obtenido se disolvió en acetato de etilo (200 ml), se lavó con bicarbonato de sodio saturado (50 ml), salmuera (2 x 30 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró del agente secante y se concentró. El residuo se cromatografió en sílice (eluyente 30% de DCM en acetato de etilo) para dar el producto (**9**) puro deseado (1,27 g, 0,81 mol, rendimiento=41%) como un sólido amorfo.

Compuesto **10**

- 45 Se trató una disolución del compuesto **9** (1,20 g, 0,83 mmol) en metanol (50 ml) con ácido trifluoroacético (0,5 ml, 0,74 g, 6,5 mmol). Después de mantenerse durante 1 h a temperatura ambiente, la disolución fue neutralizada añadiendo trietilamina (1,0 ml, 0,726 g, 7,2 mol), después se concentró a vacío y se redisolvió en acetato de etilo (100 ml). La disolución se lavó con ácido cítrico al 10% (30 ml), salmuera (2 x 30 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró del agente secante y se concentró. La cromatografía en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo seguido de concentración de las fracciones de producto puro proporcionó 0,37 g (38%) del compuesto **10** con un sólido amorfo.

Compuesto **11**

- 50 A una disolución del compuesto **10** (0,35 g, 0,28 mmol), 2-disopropilamonio-tetrazolida (53 mg, 0,31 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml) se añadió 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita (0,169 g, 0,56 mmol). La reacción se agitó durante 2 h y se diluyó con CH₂Cl₂ (80 ml). La disolución se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (30 ml), salmuera (10 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. El extracto se filtró y se concentró. El producto bruto se cromatografió en gel de sílice, que había sido prelavado con CH₂Cl₂/Et₃N seguido de CH₂Cl₂, usando gradiente (50-100%) de acetato de etilo en hexano para proporcionar la fosforamidita **11** deseada (0,22 g, 54%) como un sólido amorfo blanco.

Ejemplo 3

Análogo de 4'-cloro-6-fosfonato-benzofluoresceína protegido (19)

Este ejemplo ilustra la síntesis de un análogo de 4'-cloro-6-fosfonato-benzofluoresceína protegido (19) como se bosqueja en el Esquema de Reacción 3.

5 Compuesto 12

A una suspensión de anhídrido 4-bromoftálico (2,27 g, 10 mmol) en 30 ml de 1,2-dicloroetano anhidro se añadieron 3,3 g (25 mmol) de AlCl_3 seguido de 3-(3-cloro-2,4-dihroxifenil)propionato de metilo (solicitud de patente internacional WO03023357) (2,3 g, 10 mmol). La mezcla se agitó durante varios minutos para dar una disolución de color canela. La reacción se llevó a reflujo durante 30 min, después se enfrió y se concentró. El material gelatinoso resultante se repartió entre ácido clorhídrico 1 N frío (70 ml) y acetato de etilo (100 ml). La fase orgánica se lavó con NaCl saturado, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El aceite resultante se suspendió en diclorometano y se enfrió para iniciar la cristalización. Los cristales se recogieron por filtración, se lavaron con diclorometano frío y se secaron para proporcionar 2,3 g (51%) de una mezcla isomérica de la benzofenona 12.

Compuesto 13

15 Se combinaron 1,3-dihidroxinaftaleno (4,0 g, 25 mmol), la benzofenona 12 (7,5 g, 16,3 mmol) y ácido trifluoroacético (20 ml) y se agitaron hasta que se formó una disolución. A esta disolución se añadió ácido metanosulfónico (20 ml) y se calentó la reacción a 80°C durante 7 h. Se enfrió la reacción y se vertió en una mezcla de hielo y agua. El sólido precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua. El secado a vacío proporcionó 9,0 g (97%) del colorante 13 (mezcla de dos isómeros).

20 Compuesto 14

A una disolución del compuesto 13 (2,75 g, 4,84 mmol) en ácido trifluoroacético (20 ml) se añadieron 20 ml de anhídrido trifluoroacético. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 1 h, se evaporó la reacción y el residuo se secó por co-evaporación con acetato de etilo. El residuo sólido se suspendió en acetato de etilo (25 ml) y se filtró. El lavado con una pequeña cantidad de mezcla acetato de etilo/hexano (50%/50%) y secado a vacío proporcionaron 2,35 g (75%) de la lactona 14 deseada como un sólido blanquecino.

Compuesto 16

30 A una disolución de 6-(O-DMT)-hexilamina (3,07 g, 7,25 mmol) (Tetrahedron Letters (2004), 45(2), 317-320) y trietilamina (1,5 ml, 10,8 mmol) en 25 ml de DMF anhidra se añadieron 2,3 g (3,6 mmol) de la lactona 14 sólida. Después de agitar durante 1 h, se añadieron N-metilimidazol (4 ml, 50 mmol) y anhídrido trimetilacético (4 ml, 19,7 mmol). Se dejó proceder la reacción durante una noche. La DMF se evaporó en un evaporador rotatorio y el aceite resultante se repartió entre agua y acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 . El material obtenido después de la evaporación del disolvente se cromatógrafió en gel de sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo (30 a 50%) en hexano para retirar el exceso de subproductos de DMT (componentes que se mueven más rápido) y separar isómeros. El isómero 5, menor, se eluyó primero, seguido del mayor, isómero 6. Las fracciones que contenían el isómero 6 se combinaron y concentraron. El secado a vacío proporcionó 1,77 g (43%) del compuesto 16 como un sólido amorfo, amarillo pálido.

Compuesto 17

40 Se disolvieron el compuesto 16 (2,5 g, 2,2 mmol), el fosfito 3 (1,63 g, 3,9 mmol) y trietilamina (0,82 ml, 5,9 mmol) en una mezcla de DMF (1,5 ml) y tolueno (1,5 ml). A esta disolución se añadieron 0,163 g (0,14 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0). Se calentó la mezcla a ~50°C para disolver el catalizador y se puso en un baño de aceite a 80°C. El calentamiento con agitación se continuó durante 50 min. Se enfrió la reacción y se diluyó con acetato de etilo (30 ml). Esta mezcla se cargó sobre una columna de gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo. La concentración de las fracciones de producto puro y secado a vacío proporcionaron 2,2 g (68%) del fosfonato 17 deseado como un sólido amorfo, amarillo pálido.

45 Compuesto 18

50 A una disolución del compuesto 17 (2,1 g, 1,43 mmol) en una mezcla de MeOH (30 ml) y CH_2Cl_2 (60 ml) se añadieron 0,6 ml de ácido trifluoroacético. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 30 min, se neutralizó la reacción con trietilamina (0,9 ml) y se concentró. El aceite resultante se cromatógrafió en sílice eluyendo, primero, con acetato de etilo y, segundo, con 5% de MeOH en acetato de etilo. Las fracciones de producto puro se concentraron y se secaron para proporcionar 1,5 g (90%) de compuesto 18 como un sólido amorfo, amarillo pálido.

Compuesto 19

Se añadió gota a gota 2-cianoetil-tetraisopropilfosforodiamita (0,57 g, 1,9 mmol) a una disolución del compuesto 18

(1,4 g, 1,2 mmol) y diisopropilamonio-tetrazolida (0,27 g, 1,56 mmol) en 20 ml de CH₂Cl₂ anhidro. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante una noche, se diluyó la reacción con acetato de etilo y se lavó con NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró hasta aceite. Este material se cromatografió en sílice, que había sido prelavada con una mezcla de trietilamina y acetato de etilo, seguido de acetato de etilo, eluyendo con acetato de etilo. La concentración de las fracciones que contenían producto y el secado a vacío proporcionaron 1,2 g (73%) de la fosforamida **19** deseada como un sólido amorfo, amarillo pálido.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra la síntesis de un análogo de 6-fosfonato-rodol protegido (**27**) como se bosqueja en el Esquema de Reacción 4.

Compuesto **23**

Se disolvió anhídrido 4-bromoftálico (6,47 g, 28 mmol) en 7 ml de DMF anhidra. A esta disolución se añadieron 19 ml de tolueno seguido de 3,58 g (18,9 mmol) de 8-hidroxijulolidina. Se calentó la reacción con agitación a 110°C durante 30 min, después se enfrió hasta la temperatura ambiente y se concentró. El material obtenido se repartió entre agua y CH₂Cl₂ (200 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para dar un material oleoso oscuro. Se cromatografió en sílice eluyendo con CH₂Cl₂ seguido de 5% de MeOH en CH₂Cl₂. Las fracciones que contenían producto se combinaron y concentraron. El secado a vacío proporcionó 7,5 g (95%) de la benzofenona **20** deseada (mezcla de isómeros) como un sólido amorfo, amarillo.

Compuesto **21**

Se suspendieron el compuesto **20** (4,16 g, 10 mmol) y 3-(3-cloro-2,4-dihidroxifenil)propionato de metilo (2,31 g, 10 mmol) en 21 ml de ácido metanosulfónico y se calentó ligeramente para disolver los sólidos. Cuando se obtuvo una disolución, se puso en un baño de aceite y se calentó a 80°C durante 1 h. Se enfrió la reacción, se mezcló con hielo (300 ml) y se trató con 13,5 g de NaOH. La mezcla resultante se calentó a 65°C y se dejó enfriar lentamente hasta la temperatura ambiente. Se añadió ácido clorhídrico concentrado (2 ml) para acidificar la disolución a pH 2. El material precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua. El secado a vacío a 50°C sobre P₂O₅ proporcionó 5,3 g (89%) del colorante **21** deseado (mezcla de isómeros) como un sólido rojo oscuro.

Compuesto **24**

A una disolución del compuesto **21** (3,0 g, 5 mmol) en 30 ml de ácido trifluoroacético se añadieron 30 ml de anhídrido trifluoroacético. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 30 min, la reacción se concentró y el residuo se secó por co-evaporación con CH₂Cl₂ (2 x 100 ml) para dar la lactona **22** como un jarabe viscoso. Esta se disolvió en 40 ml de CH₂Cl₂ y se trató con una disolución de O-DMT-aminohexanol (2,5 g, 5,9 mmol) y trietilamina (10 ml) en 10 ml de CH₂Cl₂. Después de ser agitada a temperatura ambiente durante 2 h, se añadió a la reacción trietilamina (3 ml), 1-metilimidazol (3 ml) y 6 ml de anhídrido trimetilacético. A fin de acelerar la reacción, se concentró la mezcla hasta una forma de aceite y se calentó a 45°C durante 8 h. Se añadieron agua y acetato de etilo para repartir los componentes de la reacción. La fase orgánica se lavó con ácido cítrico al 10%, NaHCO₃ saturado, salmuera, y se secó sobre Na₂SO₄. El material obtenido después de la evaporación del disolvente se cromatografió en sílice eluyendo con 50% de acetato de etilo en hexano para retirar el exceso de subproductos de DMT (componentes que se mueven más rápido) y separar isómeros. El isómero 5, menor, se eluyó primero, seguido del mayor, isómero 6. Las fracciones que contenían el isómero 6 puro se combinaron y concentraron. El secado a vacío proporcionó 1,1 g (20%) del compuesto **24** como un sólido amorfo, rosa pálido.

Compuesto **25**

Se disolvieron el compuesto **24** (0,8 g, 0,72 mmol), **7** (0,6 g, 1,7 mmol) y trietilamina (0,3 ml, 2,1 mmol) en una mezcla de DMF (0,7 ml) y tolueno (0,7 ml). A esta disolución se añadieron 70 mg (0,06 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0). Se calentó la mezcla ligeramente (~50°C) para disolver el catalizador, y se puso en un baño de aceite a 80°C. el calentamiento con agitación se continuó durante 30 min. Se enfrió la reacción y se diluyó con acetato de etilo (10 ml). Esta mezcla se cargó en una columna de gel de sílice y se eluyó, primero, con acetato de etilo para retirar los subproductos, seguido de 5% de MeOH en CH₂Cl₂ para eluir el producto. La concentración de las fracciones que contenían producto y el secado a vacío proporcionaron 0,9 g (88%) del fosfonato **25** deseado como un jarabe viscoso, rosa claro.

Compuesto **26**

A una disolución del compuesto **25** (0,9 g, 0,63 mmol) en una mezcla de MeOH (15 ml) y CH₂Cl₂ (30 ml) se añadieron 0,3 ml de ácido trifluoroacético. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 30 min, la reacción se neutralizó con trietilamina (0,45 ml) y se concentró. El residuo rojo obtenido se cromatografió en gel de sílice eluyendo con un gradiente de metanol (5-15%) en diclorometano. Las fracciones de producto puro se concentraron y secaron para proporcionar 0,5 g (71%) del compuesto **26** como un sólido amorfo, amarillo pálido.

Compuesto **27**

Se añadió gota a gota 2-cianoetil-tetraisopropilfosforodiamidita (0,21 g, 0,7 mmol) a una disolución del compuesto **26** (0,45 g, 0,45 mmol) y diisopropilamonio-tetrazolida (90 mg, 1,56 mmol) en 10 ml de CH₂Cl₂ anhidro. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 3 h, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró hasta aceite. Este material fue precipitado desde una pequeña cantidad de acetato de etilo en pentano anhidro para dar inicialmente un precipitado oleoso, que al final solidificó tras trituración con una porción fresca de pentano. El sólido se recogió por filtración y se secó a vacío para proporcionar 0,4 g (74%) de fosforamidita **27** como un sólido amorfo, rosa claro.

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra la preparación del resorcinol **31** y el reactivo colorante **39** proporcionados en los Esquemas de Reacción 5 y 6.

4-(4-Nitrofenil)-2,4-metoxibenceno (**28**). A una disolución desgasificada de 4-bromonitrobenceno (24,37 g, 120,63 mmol) y ácido 2,4-dimetoxifenilborónico (20,95 g, 115,07 mmol) en 600 ml de 1,4-dioxano se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (8,0 g, 7 mmol) seguido de una disolución de carbonato de potasio (17,06 g, 124,3 mmol) en 120 ml de agua. La reacción se agitó con calentamiento a 80°C durante 24 h, se enfrió, se filtró y se concentró. El material resultante se repartió entre acetato de etilo y agua. la capa orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado, salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró. El material sólido resultante se recristalizó desde hexano-acetato de etilo para proporcionar 23,56 g del producto **28** deseado como cristales amarillos. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 8,22 (d, J=8,8 Hz, 2H), 7,73 (d, J=8,8 Hz, 2H), 7,34 (d, J=8,5 Hz, 1H), 6,71 (d, J=2,2 Hz, 1H), 6,67 (dd, J=8,5, 2,2 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,80 (s, 3H).

4-(4-Aminofenil)-2,4-metoxibenceno (**29**). Se hidrogenó una disolución de **28** (23,2 g, 89,5 mmol) en 300 ml de THF a 344,74 kPa (50 psi) en presencia de 2,0 g de Pd/C al 10% durante 8 h. Se retiró el catalizador por filtración a través de Celite. El filtrado se concentró para proporcionar la amina **29** bruta (20,8 g) que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 7,10 (d, J=8,3 Hz, 3H), 6,60-6,50 (m, 4H), 5,04 (s a, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,72 (s, 3H).

4-(4-Yodofenil)-2,4-metoxibenceno (**30**). A una disolución de la amina **29** bruta (20,8 g) en 80 ml de 1,4-dioxano se añadió una mezcla de HCl conc. (347 ml) y hielo (172 g). Se puso la reacción en un baño de hielo/agua y se dejó enfriar hasta 0-3°C. Se añadió una disolución de NaNO₂ en 420 ml de agua con agitación durante 20 min y se continuó la agitación durante otra 1 h. Se añadió una disolución de yoduro de potasio (150,5 g) con agitación durante 10 min. Se dejó calentar la reacción hasta la temperatura ambiente (~2 h) y se extrajo con acetato de etilo (1,2 l). La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado, Na₂SO₃ y salmuera, y se secó sobre Na₂SO₄. El producto bruto se cromatografió en sílice eluyendo con acetato de etilo al 20% en hexano. La concentración de las fracciones de producto bruto y el secado a vacío proporcionaron 15,83 g (51,3%) de **30**. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 7,72 (d, J=8,3 Hz, 2H), 7,24 (d, J=8,3 Hz, 2H), 7,20 (d, J=8,5 Hz, 1H), 6,66 (d, J=2,2 Hz, 1H), 6,61 (dd, J= 8,5, 2,2 Hz, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,75 (s, 3H).

4-(4-Yodofenil)resorcinol (**31**). A una disolución de **30** (15,83 g, 46,54 mmol) en 150 ml de diclorometano anhidro a -70°C se añadieron gota a gota 13,63 ml (144,3 mmol) de tribromuro de boro. Después de 40 min, se dejó calentar la disolución hasta la temperatura ambiente y se inactivó lentamente vertiéndola en 500 g de hielo. Se diluyó la mezcla con 1 N (~390 ml) a pH de ~10 y se extrajo con acetato de etilo (300 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. La evaporación del disolvente y el secado a vacío proporcionaron **31** puro (14,4 g, 99%) como un sólido rosa pálido. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 9,48 (s, 1H), 9,39 (s, 1H), 7,68 (d, J=8,3 Hz, 2H), 7,29 (d, J=8,3 Hz, 2H), 7,04 (d, J=8,5 Hz, 1H), 6,40 (d, J=2,2 Hz, 1H), 6,29 (dd, J=8,5, 2,2 Hz, 1H).

Ácido 6-cloro-2-([3-cloro-2,4-dihidroxi-5-[2-(metoxicarbonil)etil]fenil]carbonil)benzoico (**32**). A una disolución de anhídrido 3-cloroftálico (3,7 g, 20 mmol) (J. Org. Chem., 1987, 52, 129-134) en 60 ml de 1,3-dicloroetano anhidro se añadieron 6,6 g (50 mmol) de AlCl₃ seguido de 4,6 g (20 mmol) de 3-(3-cloro-2,4-dihidroxi-fenil)propanoato de metilo (solicitud de patente internacional WO 03/023357). Se calentó la reacción a reflujo durante 30 min, se enfrió y se concentró. El material gelatinoso resultante se repartió entre HCl 2 N frío (100 ml) y acetato de etilo (100 ml). La capa orgánica se lavó con HCl 1 N, salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para proporcionar un material oleoso (mezcla de cloroisómeros 6 y 2). Se disolvió el aceite en diclorometano (~40 ml) y se sonicó brevemente (baño de ultrasonidos) para iniciar la cristalización. Se enfrió la mezcla (baño de hielo/agua) y se dejó cristalizar durante 30 min (un tiempo de cristalización prolongado dará como resultado la co-cristalización del isómero 2-cloro indeseado). Los cristales se recogieron por filtración, se lavaron con diclorometano frío. El secado a vacío proporcionó 4,01 g del isómero 6-cloro deseado (**32**). ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 12,47 (s a, 1H), 10,78 (s a, 1H), 8,06 (d, J=7,7 Hz, 1H), 7,89 (d, J=7,9 Hz, 1H), 7,71 (t, J=7,9 Hz, 1H), 6,76 (s, 1H), 3,46 (s, 3H), 2,27 (m, 2H), 2,41 (t, J=6,6 Hz, 2H).

Ácido 3-(7,13-dicloro-16-(4-yodofenil)-12,15-dihidroxi-1-oxospiro[3-hidroisobenzofuran-3,9'-xanteno]-11-il)propanoico (**33**). Se calentó a 80°C una suspensión de **32** (2,45 g, 7,8 mmol) y **31** (2,48 g, 6,0 mmol) en una mezcla de TFA (21 ml) y ácido metanosulfónico (12 ml) con agitación durante 3 h. Se enfrió la reacción y se diluyó con agua (200 ml). El

sólido resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó. El material bruto se cristalizó desde acetato de etilo/hexano para proporcionar 3,2 g (78%) del colorante **33** deseado como un sólido naranja. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 12,07 (s a, 1H), 10,64 (s, 1H), 10,06 (s, 1H), 8,03 (d, J=7,2 Hz, 1H), 7,84 (d, J=7,6 Hz, 1H), 7,76 (t, J=7,6 Hz, 1H), 7,68 (d, J=8,2 Hz, 2H), 7,13 (d, J=8,2 Hz, 2H), 6,93 (s, 1H), 6,63 (s, 1H), 6,62 (s, 1H), 2,68 (m, 2H), 2,35 (t, J=7 Hz, 2H).

Compuesto **34**

A una disolución del ácido colorante **33** (3,4 g, 5 mmol) en 30 ml de DMF anhidra se añadieron 3 ml de anhídrido trimetilacético seguido de 3 ml de N-metilimidazol. Después de 1 h se concentró la reacción y se redisolvió en acetato de etilo. La disolución se lavó con ácido cítrico al 10%, salmuera, y se secó sobre Na₂SO₄. La evaporación del disolvente proporcionó el producto bruto, que se purificó adicionalmente por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con 50% de acetato de etilo en hexano. La concentración de las fracciones del producto puro proporcionó 1,6 g (43%) de la lactona **34** deseada como un sólido blanquecino. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 8,07 (d, J=7,2 Hz, 1H), 7,87 (d, J=7,7 Hz, 1H), 7,79 (t, J=7,7 Hz, 1H), 7,73 (d, J=8,2 Hz, 2H), 7,55 (s, 1H), 7,03 (s, 1H), 7,02 (d, J=8,2 Hz, 2H), 7,00 (s, 1H), 2,97 (m, 2H), 2,83 (t, J=7 Hz, 2H), 1,13 (s, 9H).

Compuesto **36**

Se añadió una disolución de la lactona **34** (1,6 g, 2,16 mmol) en 15 ml de DMF anhidra a una disolución fría (0°C, baño de hielo/agua) de 6-(O-DMT)-hexilamina (1,1 g, 2,6 mmol) (Tetrahedron Letters (2004), 45(2), 317-320) y trietilamina (0,3 ml) en 20 ml de DMF anhidra. Después de ser agitada a 0°C durante 2 h, la reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se trató con 1 ml de anhídrido trimetilacético y 0,44 ml de N-metilimidazol. Se dejó proceder la reacción durante 2 h y después se concentró. El residuo se disolvió en acetato de etilo (~75 ml), se lavó con NaHCO₃ saturado, salmuera, y se secó sobre Na₂SO₄. Se evaporó el disolvente y el material resultante se cromatografió en sílice eluyendo con acetato de etilo:hexano 2:1. La concentración de las fracciones de producto puro proporcionó 2,3 g (85%) de **36** como un sólido blanco, amorfo. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 8,06 (d, J=7,4 Hz, 1H), 7,86 (d, J=7,7 Hz, 1H), 7,78 (t, J=7,7 Hz, 1H), 7,73 (d, J=8,2 Hz, 2H), 7,65 (t ancho, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,4-7,2 (m, 9H), 7,01 (d, J=8,2 Hz, 2H), 6,99 (s, 1H), 6,91 (s, 1H), 6,87 (d, J=8,8 Hz, 4H), 3,72 (s, 6H), 2,92 (t, J=6,3 Hz, 2H), 2,86 (m, 2H), 2,58 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 1,15 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,25 (m, 4H), 1,51 (m, 2H), 1,12 (s, 9H).

Compuesto **37**

A una disolución de **36** (2,3 g, 1,85 mmol), fosfito de bis-(4-trifluoroacetamidobutilo) (1,15 g, 1,5 eq.), trietilamina (0,75 ml) en 4 ml de tolueno se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (130 mg, 0,11 mmol). La reacción se agitó a 80°C durante 1 h y se enfrió hasta la temperatura ambiente. La mezcla se cromatografió en sílice eluyendo con un gradiente de acetona (40 a 60%) en hexano. Las fracciones de producto puro se concentraron y se secaron a vacío para proporcionar 2,66 g (94%) del fosfonato **37** deseado como un sólido amorfo, blanco. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 9,42 (t ancho, 2H), 8,05 (d, J=7,4 Hz, 1H), 7,86 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,78 (t, J=7,9 Hz, 1H), 7,67 (m, 3H), 7,57 (s, 1H), 7,4-7,2 (m, 11H), 7,10 (s, 1H), 6,91 (s, 1H), 6,87 (d, J=8,8 Hz, 4H), 3,93 (m, 4H), 3,72 (s, 6H), 3,18 (m, 4H), 2,92 (t, J=6,3 Hz, 2H), 2,86 (m, 2H), 2,58 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 1,55 (m, 10H), 1,42 (s, 9H), 1,27 (m, 4H), 1,07 (s, 9H). ³¹P NMR (dms_o-d₆) δ 18,14 (s).

Compuesto **38**

A una disolución de **37** (2,4 g, 1,56 mmol) en una mezcla de diclorometano (50 ml) y metanol (50 ml) se añadieron 0,6 ml de TFA. La disolución fue mantenida a temperatura ambiente durante 30 min y se neutralizó añadiendo 0,9 ml de trietilamina. Se concentró la reacción y se cromatografió en sílice eluyendo con un gradiente de metanol (0 a 5%) en acetato de etilo. La concentración de las fracciones de producto puro proporcionó 1,86 g (97%) de compuesto **38** como un sólido amorfo, blanco. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 9,41 (t ancho, 2H), 8,08 (d, J=7,4 Hz, 1H), 7,87 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,80 (t, J=7,9 Hz, 1H), 7,67 (m, 3H), 7,58 (s, 1H), 7,38 (dd, J=13 Hz, 6 Hz, 2H), 7,10 (s, 1H), 6,91 (s, 1H), 4,33 (t, J=5 Hz, 1H), 4,11 (m, 4H), 3,37 (t, J=6 Hz, 2H), 3,18 (m, 4H), 2,88 (m, 2H), 2,58 (m, 2H), 2,16 (m, 2H), 1,55 (m, 10 H), 1,40 (s, 9H), 1,34-1,16 (m, 6H), 1,03 (s, 9H). ³¹P NMR (dms_o-d₆) δ 18,05 (s).

Compuesto **39**

Se añadió diisopropilamonio-tetrazolida (0,26 g, 1,5 mmol) a una disolución de **38** (1,79 g, 1,46 mmol) en 20 ml de diclorometano anhidro. La reacción se agitó durante 5 min para disolver la tetrazolida. A la disolución resultante se añadieron 0,7 g (2,3 mmol) de 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita. Después de ser agitada durante 5 h, la reacción se diluyó con acetato de etilo (100 ml), se lavó con NaHCO₃ saturado, salmuera, y se secó sobre Na₂SO₄. El extracto se concentró y se redisolvió en una pequeña cantidad de acetato de etilo (~2 ml). Se añadió éter (10 ml) para precipitar el producto. La mezcla se diluyó adicionalmente con heptano anhidro (200 ml) y la emulsión resultante se dejó sedimentar (~10 min). El residuo, obtenido después de decantar la fase líquida, se secó a vacío para proporcionar 1,69 g (81%) de la fosforadimita **39** como un sólido amorfo, blanquecino. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 9,41 (t ancho, 2H), 8,08 (d, J=7,4 Hz, 1H), 7,87 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,80 (t, J=7,9 Hz, 1H), 7,67 (m, 3H), 7,58 (s, 1H), 7,38 (dd, J=13 Hz, 6 Hz, 2H), 7,10 (s, 1H), 6,91 (s, 1H), 3,93 (m, 4H), 3,72 (m, 2H), 3,54 (m, 4H), 3,18 (m, 4H), 2,88 (m, 2H), 2,92 (t, J=6,3 Hz, 2H), 2,58 (m, 2H), 2,16 (m, 2H), 1,55 (m, 10H), 1,40 (s, 9H), 1,34-1,16 (m, 6H), 1,12 (t, J=6 Hz, 12 H), 1,03 (s, 9H). ³¹P NMR(dms_o-d₆): δ 146,73 (s), 18,05 (s).

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la preparación de un reactivo de mono-DMT-mono-trifluoroacetamidobutilfosfito asimétrico (**41**) como un ejemplo de reactivo de fosfonilación alternativo. Se proporciona una representación esquemática de las reacciones en el Esquema de Reacción 7.

5 Compuesto **41**

A una disolución de mono-DMT-1,6-hexanodiol (**40**) (Nucleic Acids Research (1993), 21(1), 145-150) (4,0 g, 9,5 mmol) y compuesto **5** (1,76 g, 9,5 mmol) en 40 ml de piridina anhidra se añadieron 2,5 g (~10 mmol, contenía 10-15% de fenol) de fosfito de difenilo. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 1 h, la reacción se concentró y se disolvió en acetato de etilo (100 ml). La disolución se lavó con ácido cítrico al 10%, NaCl saturado, y se secó sobre Na₂SO₄. El material, que se obtuvo tras concentración, se cromatografió en sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo (60-100%) en hexano. El subproducto de bis-DMT se eluyó primero, seguido del derivado de mono-DMT-mono-trifluoroacetamido (**41**) deseado. Las fracciones apropiadas se combinaron, se concentraron y se secaron a vacío para proporcionar 2,0 g (32%) del fosfito **41** como un líquido viscoso, incoloro. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 9,44 (t ancho, 1H), 7,4-7,1 (m, 9H), 6,88 (d, J=8 Hz, 4H), 6,79 (d, J=694 Hz, 1H), 3,96 (m, 4H), 3,73 (s, 6H), 3,21 (m, 2H), 2,94 (t, J=6 Hz, 2H), 1,57 (m, 8H), 1,30 (m, 4H). ³¹P NMR (dms_o-d₆): δ 9,01 (d, J=694 Hz).

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la preparación de una hidroxihexil-6-fosfonofluoresceína y su fosforamidita (**36**) según los métodos bosquejados en el Esquema de Reacción 8.

Compuesto **42**

20 Una suspensión de anhídrido 4-bromoftálico (6,8 g, 30 mmol) y resorcinol (8,8 g, 80 mmol) en 50 ml de ácido metanosulfónico se calentó con agitación a 80°C durante 5 h. Se enfrió la reacción y se vertió en una mezcla de hielo y agua (300 ml). El precipitado sólido se recogió por filtración y se lavó con agua. El secado a vacío dio 12,1 g (98%) de bromofluoresceína **42** (mezcla de isómeros 5 y 6) como un sólido naranja.

Compuesto **43**

25 Una disolución del compuesto **42** (4,1 g, 10 mmol), 1-metilimidazol (1 ml) y anhídrido trimetilacético (8 ml, 40 mmol) se calentó a 50°C durante 2 h. El análisis TLC (20% de EtOAc en hexano) mostró la completa conversión del material de partida en dos nuevos productos (isómeros 5 y 6). Se añadió MeOH (5 ml) para inactivar el exceso de anhídrido. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 1 h, la reacción se concentró y se redisolvió en acetato de etilo. La disolución se lavó con ácido cítrico al 10%, NaCl saturado, y se secó sobre Na₂SO₄. Después de la evaporación del disolvente, la mezcla se cromatografió en sílice eluyendo con 20% de acetato de etilo en hexano. Se recogieron tres grupos de fracciones. La primera contenía el eluyente más rápido, el isómero 5. El segundo grupo era una mezcla de isómeros 5 y 6, y el tercer grupo de fracciones contenía el isómero 6 puro, producto eluyente más lento (compuesto **43**). La evaporación del disolvente y el secado a vacío proporcionaron 1,6 g del isómero 5, 1,6 g de mezcla isomérica y 1,9 g (33%) del isómero 6 deseado (compuesto **43**). ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 7,99 (m, 2H), 7,78 (s, 1H), 7,26 (d, 1,8 Hz, 2H), 6,95 (m, 4H), 1,31 (s, 18H).

Compuesto **44**

40 Una suspensión del compuesto **43** (1,16 g, 2,9 mmol), trietilamina (0,8 ml, 5,75 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (140 mg, 0,12 mmol) en 3 ml de tolueno se calentó a 80°C durante 1 h. Se enfrió la reacción y se diluyó con 20 ml de acetato de etilo al 66% en hexano. El bromuro de trimetilamonio precipitado se retiró por filtración. El filtrado se cargó en una columna de gel de sílice. La elución con un gradiente (50 a 80%) de acetato de etilo en hexano seguido de concentración y secado a vacío proporcionó 1,95 g (85%) del fosfonato **44** como un material sólido blanco, amorfo. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 9,34 (t, 1H), 8,20 (dd, J₁=8 Hz, J₂=3 Hz, 1H), 8,04 (dd, J₁=12,3 Hz, J₂=8 Hz, 1H), 7,66 (d, J=12,9 Hz, 1H), 7,4-7,1 (m, 11H), 6,8 (m, 8H), 3,92 (m, 4H), 3,71 (s, 6H), 3,07 (q, J=6 Hz, 2H), 2,89 (t, 6 Hz, 2H), 1,46 (m, 8H), 1,28 (s, 18H), 1,28-1,05 (m, 4H). ³¹P NMR (dms_o-d₆): δ 15,35 (s).

45 Compuesto **45**

50 A una disolución del compuesto **44** (1,85 g, 1,6 mmol) en una mezcla de MeOH (30 ml) y CH₂Cl₂ (60 ml) se añadieron 0,6 ml de ácido trifluoroacético. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 30 min, la reacción se neutralizó con trietilamina (1 ml) y se concentró. El residuo rojo obtenido se cromatografió en sílice eluyendo con un gradiente de MeOH (0-5%) en acetato de etilo. Las fracciones de producto puro se concentraron y se secaron para proporcionar 1,05 g (77%) del compuesto **45** como un sólido blanco, amorfo. ¹H NMR (dms_o-d₆): δ 9,35 (t ancho, 1H), 8,22 (dd, J₁=8 Hz, J₂=3 Hz, 1H), 8,06 (dd, J₁=12,6 Hz, J₂=8 Hz, 1H), 7,67 (d, J=12,9 Hz, 1H), 7,27 (s, 2H), 6,94 (m, 4H), 4,31 (t, J=5,4 Hz, 1H), 3,95 (m, 4H), 3,31 (t, 6 Hz, 2H), 3,07 (q, J=6 Hz, 2H), 1,46 (m, 8H), 1,31 (s, 18H), 1,18 (m, 4H). ³¹P NMR (dms_o-d₆): δ 15,27 (s).

Compuesto **46**

Se añadió gota a gota 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (0,57 g, 1,9 mmol) a una disolución del compuesto **45** (1,0 g, 1,18 mmol) y diisopropilamonio-tetrazolida (0,2 g, 1,17 mmol) en 20 ml de CH₂Cl₂ anhidro. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante una noche, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. El residuo se cromatografió en sílice, que había sido prelavada con una mezcla de trietilamina y acetato de etilo seguido de acetato de etilo, eluyendo con acetato de etilo. La concentración de las fracciones que contenían producto y el secado a vacío proporcionaron 0,72 g (58%) de la fosforamidita **46** deseada como un sólido amorfo, blanco.

Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra la síntesis de fosforamidita de fosfonato-cianina (**53**) usando los métodos bosquejados en el Esquema de Reacción 9.

1-(sulfobutil)-2,3,3-trimetilindolinio, sal interna (**47**). Una mezcla de 2,3,3-trimetilindolenina (6,3 g, 40 mmol) y 1,4-butanosulfona (5,4 g, 40 mmol) se calentó a 100°C durante 5 h. El semisólido oscuro resultante se suspendió en diclorometano y se enfrió para forzar la cristalización del producto. Los cristales se recogieron por filtración, se lavaron con diclorometano frío y éter. El secado a vacío proporcionó 9,9 g (83%) de la sal de indolinio **47** deseada como un sólido hidrosκόpico, rosa pálido.

El 1-(sulfobutil)-2,3,3-trimetil-5-bromoindolinio, sal interna (**49**) se preparó como se describió anteriormente para el análogo no bromado partiendo de 5-bromo-2,3,3-trimetilindolenina (J.Heterocycle Chem. 2002, 39(2), 263-269).

Compuesto **48**

Una suspensión de **47** (6,0 g, 20,3 mmol) y N,N'-difenilformamidina (4,0 g, 20,4 mmol) en 25 ml de anhídrido acético se calentó a 110°C con agitación durante 1,5 h. La disolución resultante se enfrió hasta la temperatura ambiente y se dejó para la cristalización del producto durante una noche. Los cristales se recogieron por filtración, se lavaron con una pequeña cantidad de diclorometano y bastante éter. El secado a vacío proporcionó 6,66 g (71%) del compuesto **48** como un sólido naranja-rojo.

Compuesto **50**

Una suspensión de **49** (3,7 g, 9,9 mmol) y **48** (4,0 g, 10 mmol) en 7 ml de anhídrido acético se calentó a 110°C con agitación durante 1 h y se enfrió hasta la temperatura ambiente. El material insoluble se recogió por filtración y se lavó con una pequeña cantidad de anhídrido acético y bastante éter. El secado a vacío proporcionó 4,0 g (61%) del compuesto **50**. El material bruto se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Compuesto **51**

Una mezcla de **50** (0,68 g, 1,0 mmol), trietilamina (0,5 ml, 3,75 mmol), el fosfito **41** (0,96 g, 1,46 mmol) en 1,5 ml de DMF se desgasificó a vacío. A esta suspensión se añadieron 70 mg (0,06 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0). Se calentó la reacción a 80°C con agitación durante 1 h y después se enfrió hasta la temperatura ambiente. La mezcla se cromatografió en sílice eluyendo con un gradiente de MeOH (0-15%) en 5% de trietilamina en diclorometano. La concentración de las fracciones que contenían producto y el secado a vacío proporcionaron 1,2 g (89%) del fosfonato **51** deseado como un sólido rojo, amorfo.

Compuesto **52**

A una disolución de **51** (1,1 g, 0,81 mmol) en una mezcla de diclorometano (50 ml) y MeOH (50 ml) se añadieron 0,1 ml de TFA. Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 1 h, la reacción se neutralizó con 0,2 ml de trietilamina y se concentró. El residuo se cromatografió después en sílice eluyendo con un gradiente de MeOH (0-5%) en diclorometano (más 10% de trietilamina). Las fracciones de producto puro se concentraron y secaron para dar 0,62 g (77%) del compuesto **52**.

Compuesto **53**

A una disolución de **52** (0,6 g, 0,6 mmol) y diisopropiletilamina (1 ml) en 10 ml de diclorometano anhidro se añadieron gota a gota con agitación 0,2 ml (0,9 mmol) de 2-cianoetil-N,N'-diisopropilclorofosforamidita. Después de ser mantenida a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con éter (100 ml). La fase líquida se decantó y el residuo se lavó con más éter. El material viscoso residual se espumó para proporcionar 0,7 g de la fosforamidita inestable **53** como un sólido amorfo, púrpura. Debido a la inestabilidad la fosforamidita tuvo que ser utilizada para la síntesis de ADN antes de un día después de su preparación. Desde una consideración práctica, la fosforamidita (**53**) se sintetizó diariamente a partir del compuesto intermedio **52** en cantidades suficientes para los requisitos de la síntesis de oligonucleótidos para el día.

Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra la preparación de un reactivo de Cy5 CPG de fosfonato **59** como se bosqueja en el Esquema de

Reacción 10.

Compuesto 54

Una mezcla de 5-yodo-2,3,3-trimetil-3H-indolenina (Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 1974, 9(3), 274-280) (4,74 g, 16,6 mmol) y propanosulfona (2,0 g, 16,4 mmol) se calentó a +100°C durante 30 min. La mezcla de reacción se enfrió y se trituró con éter. El material sólido se retiró por filtración, se lavó con éter, diclorometano, y se secó a vacío para dar el producto deseado (5,5 g, 82%) como un sólido blanquecino.

Compuesto 55

A una disolución de 54 (2,3 g, 5,6 mmol) y monohidrocloreuro de bis(fenilimino)malonaldehído (0,72 g, 2,8 mmol) en 20 ml de piridina se añadió anhídrido acético (3,4 g, 33,6 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y se concentró. El material resultante se cromatografió en sílice eluyendo con un gradiente de metanol (0-10%) en diclorometano (más 5% de piridina). El rendimiento del colorante 55 deseado fue 56% (sólido púrpura).

Compuesto 56

Una mezcla de 55 (0,46 g, 0,49 mmol), el fosfito 41 (1,0 g, 1,53 mmol), N-etilmorfolina (0,3 ml) y DMF (1 ml) se desgasificó a vacío durante 1 min. Se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,1 g, 0,086 mmol), y se agitó la mezcla a 80°C durante 1 h. Se enfrió la mezcla de reacción y se cromatografió en sílice eluyendo con un gradiente de metanol (0-10%) en diclorometano (más 5% de piridina). La concentración de las fracciones de producto puro y el secado a vacío proporcionaron 0,8 g (82%) del colorante de fosfonato 56 deseado.

Compuesto 57

A una disolución de 56 (0,7 g, 0,35 mmol) en 20 ml de diclorometano se añadió metanol (0,0115 g, 0,35 mmol) seguido de TFA (0,05 ml). Se dejó proceder la reacción durante 10 min y se neutralizó con trietilamina (0,1 ml). Se evaporó el disolvente y el material resultante se cromatografió en sílice eluyendo con un gradiente de metanol (0-20%) en diclorometano (más 5% de piridina). La concentración de las fracciones de producto puro y el secado a vacío proporcionaron 0,12 g (20%) del producto 57 deseado.

Compuesto 58

Una disolución de 57 (0,11 g, 0,065 mmol), N-metilimidazol (5 mg, 0,065 mmol), trietilamina (80 mg, 0,78 mmol) y anhídrido succínico (40 mg, 0,39 mmol) en 1,5 ml de DMF anhidra se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. Se añadió trifluoroacetato de pentafluorofenilo (0,22 g, 0,78 mmol). Después de ser mantenida a temperatura ambiente durante 1 h, la reacción se concentró y se trituró con éter seguido de acetato de etilo. El secado a vacío proporcionó el producto 58 bruto (contaminado con sales de TFA), que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

30 Preparación de soporte de tamaño de poro controlado (CPG) 59

Se añadió un aminoalquil-CPG de cadena larga, 500A (1,5 g, 105 µmol/g) a una disolución de 58 (90 mg, ~45 µmol) y trietilamina (50 mg, 0,49 mmol) en 8 ml de DMF anhidra. La suspensión se agitó usando un agitador orbital durante 3 h y después se trató con piridina (1 ml) y anhídrido acético (1 ml) para taponar grupos amino sin reaccionar. Después de ser agitada durante otra 1 h, el CPG se recogió por filtración, se lavó con DMF, acetato de etilo, y se secó a vacío. Carga de DMT: 18 µmol/g.

Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra la preparación de un reactivo de éster Cy5 PFP de fosfonato 66 como se bosqueja en el Esquema de Reacción 11.

Compuesto 60

40 Una mezcla de 5-yodo-2,3,3-trimetil-3H-indolenina (Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 1974, 9(3), 274-280) (1,0 g, 3,5 mmol) y 6-yodohexanoato de terc-butilo (1,382 g, 4,6 mmol) se calentó a +90°C durante 9 h. Se enfrió la mezcla de reacción y se trituró con éter. El material sólido se retiró por filtración, se lavó con éter y se secó a vacío para dar el producto deseado (1,2 g, 59%) como un sólido rosa pálido. ¹H NMR (dmso-d₆): δ 8,31 (s, 1H), 8,00 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,80 (d, J=8,4 Hz, 1H), 4,42 (t, J=7,4 Hz, 2H), 3,91 (s ancho, 2H), 2,81 (s, 3H), 2,19 (t, J=7,2 Hz, 2H), 1,80 (qn, J=7,0 Hz, 2H), 1,53 (s, 6H), 1,50 (qn, J=7,2 Hz, 2H), 1,36 (s, 9H).

Compuesto 61

50 Una mezcla de 5-yodo-2,3,3-trimetil-3H-indolenina (2,0 g, 7,0 mmol) y yoduro de etilo (1,76 ml, 3,42 g, 22 mmol) se calentó a +90°C durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió y se trituró con éter. El material sólido se retiró por filtración, se lavó con éter y se secó a vacío para dar el producto deseado (2,45 g, 79%) como un sólido rosa. ¹H NMR (dmso-d₆): δ 8,31 (s, 1H), 8,00 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,80 (d, J=8,4 Hz, 1H), 4,46 (t, J=7,4 Hz, 2H), 2,80 (s, 3H), 1,52 (s, 6H), 1,41 (t, J=7,2 Hz, 3H).

Compuesto 62

Una mezcla de 61 (1,5 g, 3,4 mmol), monohidrocloreto de bis(fenilimino)malonaldehído (1,76 g, 6,8 mmol), cloruro de acetilo (2,5 ml) y anhídrido acético (25 ml) se calentó a +120°C durante 1,5 h. Se enfrió la mezcla de reacción y se añadió gota a gota a éter agitado. El material sólido se retiró por filtración, se lavó con éter, EtOAc, y se secó a vacío para dar el producto bruto (1,87 g, 90%) como un sólido marrón, que se usó sin purificación adicional.

Compuesto 63

Una mezcla de 62 (1,25 g, 2,04 mmol), 60 (1,162 g, 2,0 mmol), anhídrido acético (2 ml) y piridina (20 ml) se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se concentró a vacío, el residuo se disolvió en una mezcla DCM/MeOH (9:1), y la disolución se añadió gota a gota a éter agitado. El material sólido se retiró por filtración, se lavó con éter y se secó a vacío para dar el producto bruto, que se purificó en columna de sílice (10% de MeOH/DCM) para dar el producto deseado (0,94 g, 50%) como un sólido púrpura. ¹H NMR (dmsó-d₆): δ 8,34 (t, J=13,0 Hz, 2H), 8,06 (s, 2H), 7,75-7,71 (m, 2H), 7,24 (d, J=8,5, 1H), 7,23 (d, J=8,5, 1H), 6,57 (t, J=12,2 Hz, 1H), 6,30 (d, J=13,3 Hz, 2H), 4,10 (m, 4H), 2,15 (t, J=7,2 Hz, 2H), 1,67 (s, 12H), 1,60 (m, 2H), 1,50 (m, 2H), 1,33 (s, 9H), 1,30 (m, 2H), 1,23 (t, J=7,2 Hz, 3H).

15 Compuesto 64

Se cargó un matraz de 25 ml con el compuesto 63 (0,84 g, 0,9 mmol), el fosfito 3 (2,24 g, 5,4 mmol), DMF (2 ml), tolueno (2 ml), y etilmorfolina (0,859 ml, 0,777 g, 6,75 mmol). Se inundó el matraz con argón y se burbujeó el argón a través de la disolución durante 2 min. Se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (208 mg, 0,18 mmol) y la mezcla de reacción se agitó magnéticamente a + 80°C durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadió gota a gota a éter metil-t-butílico agitado. Se decantó la disolución y el material oleoso residual se enjuagó con éter, se disolvió en una mezcla de MeOH/DCM (9:1) y se separó en columna de sílice (10-15% de MeOH en DCM) para dar el producto deseado (250 mg, 19%) como un sólido púrpura. ¹H NMR (dmsó-d₆): δ 9,42 (t, J=4,8 Hz, 4H), 8,46 (t, J=13,0 Hz, 2H), 7,95 (d, J=12,6 Hz, 2H), 7,80-7,70 (m, 2H), 7,54-7,52 (m, 2H), 6,67 (t, J=12,4 Hz, 1H), 6,41 (d, J=13,5 Hz, 2H), 4,15 (m, 4H), 3,95 (m, 8H), 3,17 (qr, J=6,1 Hz, 8H), 2,18 (t, J=7,2 Hz, 2H), 1,71 (s, 12H), 1,65-1,45 (m, 20H), 1,33 (s, 9H), 1,30-1,20 (m, 5H). ³¹P NMR (dmsó-d₆): δ 18,72.

Compuesto 65

Una mezcla de 64 (0,25 g, 0,16 mmol), diclorometano (5 ml), y ácido trifluoroacético (5 ml) se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se co-evaporó con DMF. El residuo se disolvió en acetona y se diluyó con éter. La disolución resultante se decantó, y el residuo oleoso remanente se enjuagó con éter y se secó a alto vacío para dar el producto deseado (0,20 g, 88%) como un sólido púrpura. ¹H NMR (dmsó-d₆): δ 9,42 (t, J=4,7 Hz, 4H), 8,45 (t, J=13,0 Hz, 2H), 7,95 (d, J=12,6 Hz, 2H), 7,80-7,70 (m, 2H), 7,53 (d, J=7,7 Hz, 2H), 6,68 (t, J=12,4 Hz, 1H), 6,42 (d, J=13,5, 1H), 6,41 (d, J=13,5, 1H), 4,15 (m, 4H), 3,98 (m, 8H), 3,55 (s ancho, 1H), 3,17 (qr, J=6,1 Hz, 8H), 2,20 (t, J=7,2 Hz, 2H), 1,71 (s, 12H), 1,65-1,45 (m, 20H), 1,40 (m, 2H), 1,27 (t, J=7,2 Hz, 3H). ³¹P NMR (dmsó-d₆): δ 18,72.

35 Compuesto 66

Se añadió trifluoroacetato de pentafluorofenilo (0,18 g, 0,64 mmol) a una mezcla de 65 (0,20 g, 0,14 mmol), DMF (3 ml), y N,N-diisopropiletilamina (0,082 g, 0,64 mmol). La mezcla resultante se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 10 min. Después se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y el residuo se disolvió en acetonitrilo y se diluyó con éter. La disolución resultante se decantó del residuo oleoso. Se repitió la operación, y después el residuo oleoso se enjuagó con éter y se secó a alto vacío para dar el producto deseado (0,15 g, 56%) como un sólido púrpura. ¹H NMR (dmsó-d₆): δ 9,43 (s ancho, 4H), 8,45 (t, J=13,0 Hz, 2H), 7,96 (d, J=12,4 Hz, 2H), 7,78-7,69 (m, 2H), 7,54 (d, J=6,2 Hz, 2H), 6,65 (t, J=12,3 Hz, 1H), 6,40 (d, J=12,9 Hz, 2H), 4,15 (m, 4H), 3,98 (m, 8H), 3,17 (qr, J=5,9 Hz, 8H), 2,80 (t, J=6,9 Hz, 2H), 1,8-1,7 (m, 2H), 1,71 (s, 12H), 1,65-1,40 (m, 18H), 1,3-1,2 (m, 5H). ³¹P NMR (dmsó-d₆): δ 18,72.

45 Ejemplo 11

Comparación de los tiempos de retención en HPLC de fase inversa para colorantes de fosfonato y no fosfonato-octatimidilatos

Este ejemplo demuestra (a) la síntesis de oligonucleótidos con una fosforamida de fosfonato de xanteno protegida, (b) el desbloqueo del conjugado del oligonucleótido, y (c) la polaridad aumentada del conjugado de oligonucleótido con el fosfonato de xanteno.

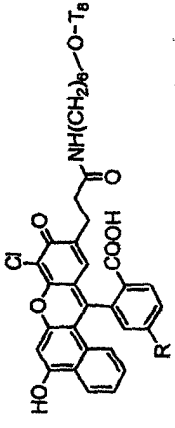
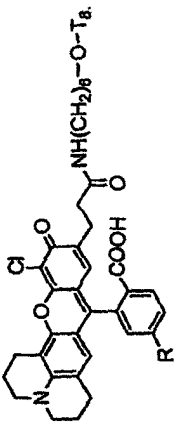
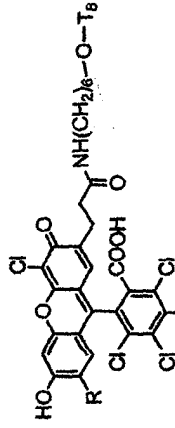
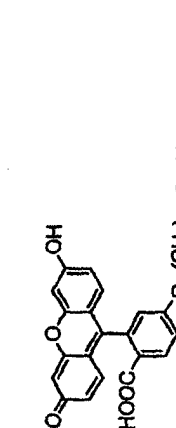
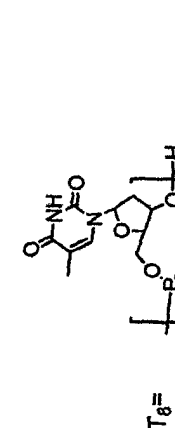

La síntesis de oligonucleótidos se realizó en un AB 3990 DNA Synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los conjugados de oligonucleótidos protegidos se trataron bajo condiciones estándar (10% de etanol en NH₄OH concentrado durante 2 horas a 70°C) para dar los conjugados de oligonucleótidos no protegidos puros.

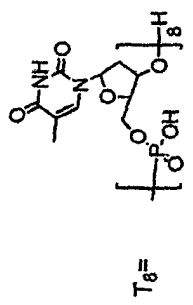
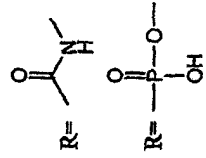
Los conjugados de oligonucleótidos purificados en la Tabla 4 se analizaron por cromatografía de fase inversa C18.

Las condiciones de HPLC fueron: fase inversa C18, Luna, columna de 4,6 x 100 mm, gradiente de acetonitrilo (0-45%) en 30 min, acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,5 con un caudal de 1 ml/min.

Como se muestra en la Tabla 4, los tiempos de retención de los xantenos de fosfonato son mucho más rápidos que los de xantenos no de fosfonato, confirmando su naturaleza más polar.

Tabla 4
 Comparación de tiempos de retención de HPLC de fase inversa, propiedades de absorción y fluorescencia para colorantes de fosfonato y no fosfonato-octatimidilatos

	R	Tiempo de retención (min)	Abs max (nm)	Fluor max (nm)	Brillo relativo
	R=H	17,6	520,5	550	1,0
	R=PO(OH)(O(CH ₂) ₄ NH ₂)	11,6	523	554	1,1
	R=H	20,7	552	576	1,0
	R=PO(OH)(O(CH ₂) ₄ NH ₂)	14,6	554	577	1,0
	R=H	17,5		540	
	R=PO(OH)(O(CH ₂) ₄ NH ₂)	15,7		548	
	R=	12,8	495	516	1,0
	R=	11,4	494	515	1,0



Ejemplo 12

Síntesis de oligonucleótidos de un conjugado MB-Q-Oligonucleótido-XP

Este ejemplo demuestra a) la síntesis de un conjugado MB-Q-oligonucleótido-XP, b) la retirada de grupos protectores, y c) la purificación del conjugado.

- 5 La Figura 3 muestra síntesis de oligonucleótidos de sondas 50-ligante del surco menor-ADN inactivador marcadas en el extremo 3' con un colorante de xanteno de fosfonato usando el reactivo de fosforamidita **22**. Este ejemplo demuestra la exitosa y reproducible química del acoplamiento a fosforamiditas y la eficaz retirada de grupos protectores durante la desprotección. El oligonucleótido se sintetizó como se describe en Kutayavin et al. Nucl. Acids Res., 28:655-661 (2000). El conjugado se purificó en un Wave System, Transgenomic, Inc., Omaha, Nebraska. El tiempo de retención del conjugado correspondió a una posición observada para conjugados totalmente desprotegidos similares.

Ejemplo 13

- 15 Este ejemplo demuestra el uso de una sonda Eclipse MGB marcada con fosfonato en un ensayo de detección multiplexado basado en hibridación, donde la sonda HSV 1,2 está marcada con FAM y el control interno está marcado con un colorante de fosfonato (**14**).

PCR en tiempo real usando sonda MGB Eclipse marcada con XP

- 20 Se realizó una PCR en tiempo real en un ABI Prism® 7900 Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems, Foster City, CA) o bien en un MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycle (Waltham, MA) (Afonina, et al., J. Clin. Ligand Assay, Vol. 25, Vol. 23, pág. 268). En ambos instrumentos, se ejecutaron 50 ciclos de un perfil de PCR de tres etapas (95°C durante 5 s, 58°C durante 20 s y 76°C durante 30 s), después de una inicial de 2 min a 95°C. Si fue necesario, se recogieron datos de fluorescencia a 58°C con un ABI 7900 SDS. Se usó el 2x Jump Start™ Taq Ready Mix™ para PCR cuantitativa, disponible en el mercado, con concentración final de Mg⁺⁺ de 2 mM (Sigma #D 74403) suplementado con Taq Polimerasa de JumpStart (Catálogo Sigma #90 4184) hasta una cantidad final de 0,37 U/μl. La concentración final de ambas sondas fue 0,2 μM; la concentración del cebador limitante fue 0,1 μM y el cebador en exceso fue 2 μM. Cada 5 μl de reacción contenían 10 ng de ADN genómico liofilizado en placas de 96 o 384 pocillos con un Speed vac antes de la configuración de la reacción. Se usó un Biomek® 2000 Laboratory Automation Station (Beckman Coulter, EE.UU.) para configurar las reacciones PCR.

Detección HSV 1,2

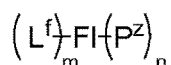
- 30 La multiplexación exitosa requiere que la amplificación tanto de la diana como del control interno esté próxima al 100% de eficacia (Livak, KJ, y Schmittgen, TD. 2001. Methods 25:402-408). Cuando tales reacciones PCR eficaces son multiplexadas en una sola reacción los datos a tiempo real de una curva de valoración de C_t frente a concentración deben dar una pendiente de -3,3333, con un valor R² mayor que 0,99. En el caso donde la sonda marcada con FAM de HSV 1,2 y el control interno marcado con fosfonato fueran multiplexados, la pendiente es -3,14, con un R² de 0,996, un valor aceptable para proceder con la detección de muestras desconocidas.

- 35 La Figura 4 ilustra la valoración de un ensayo con sonda MGB Eclipse de HSV 1,2 en donde la sonda marcada con FAM es multiplexada con una sonda de control interno (IC) marcada con PY. Los datos a tiempo real de la valoración para las sondas FAM y PY multiplexadas se muestran en a). La valoración se realiza con diana de plásmido HSV 1,2 clonado, con concentraciones de 10 veces de copias de 10⁰ a 10⁶. Se usaron 1.000 copias de IC en todas las diluciones de HSV, mientras que las concentraciones del cebador IC fueron 0,3 μM en todas las diluciones de HSV. Las secuencias para el ensayo HSV 1,2 son MGB-Q-CCCAGGTTZ*TCCTCGCT-FAM (sonda), MGB-Q-GCAAAGTCCCATCGTT-(**14**) (sonda de control interno), CCGTCCAGTCGTTTATCTTC (cebador limitante) y CGAACGCAGCCCCGCTGGA (cebador en exceso). El ligando MGB es DPl₃; Q es el inactivador Eclipse Dark Quencher y Z es una base universal.

- 45 Un experto habitual en la técnica reconocerá a partir de la descripción, figuras y ejemplos proporcionados que se pueden hacer modificaciones y cambios a las diversas realizaciones de la invención sin apartarse del alcance de la invención, definida por las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes. Adicionalmente, todas las referencias, patentes, publicaciones de patente y similares se incorporan expresamente en la presente memoria por referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo colorante fluorescente que tiene la fórmula:



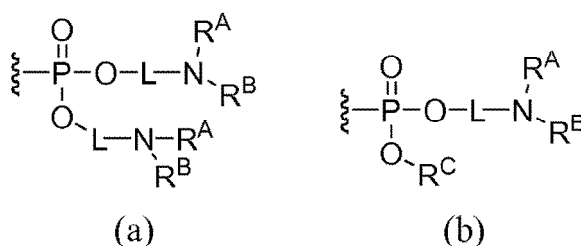
en donde

5 FI es un componente colorante fluorescente;

L^f es un grupo enlazante que tiene un miembro unido seleccionado del grupo que consiste en un grupo funcional protegido o no protegido, un grupo reactivo, un resto enlazante polifuncional, un resto de fosoramidita y un soporte sólido;

el subíndice m es un número entero de 0 a 1;

10 P^z es un grupo fosfonato de ión dipolar protegido que tiene la fórmula (a) o (b):



en donde la línea ondulada indica la unión directa a un carbono sp^2 de dicho componente colorante fluorescente; L es un grupo enlazante; cada uno de R^A y R^B se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo (C_1-C_8) y un grupo protector lábil; R^C se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo (C_1-C_8), arilo, arilalquilo (C_1-C_4), un grupo protector lábil o un grupo enlazante alquileno que tiene un grupo hidroxilo distal o hidroxilo protegido;

15

el subíndice n es un número entero de 1 a 2;

y una sal del mismo.

20 2. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, en donde dicho componente colorante fluorescente se selecciona del grupo que consiste en cumarinas, benzocumarinas, xantenos, benzo[a]xantenos, benzo[b]xantenos, benzo[c]xantenos, cianinas, acridinas, difluoruros de dipirrometenoboro, fenoxazinas, benzo[a]fenoxazinas, benzo[b]fenoxazinas y benzo[c]fenoxazinas.

25 3. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, en donde dicho componente colorante fluorescente se selecciona del grupo que consiste en colorantes de cumarina, colorantes de resorufina, colorantes de difluoruro de dipirrometenoboro, colorantes de rutenio bipyridilo, colorantes de transferencia de energía, colorantes de naranja de tiazol y colorantes de N-aril-1,8-naftalimida.

4. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, en donde L es alquileno C_2-C_8 .

5. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, en donde P^z tiene la fórmula (a), L es un grupo enlazante alquileno y al menos uno de R^A y R^B es un grupo protector lábil.

30 6. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, en donde m es 0 y n es 1.

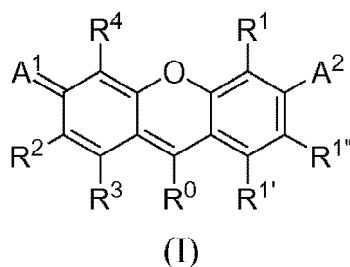
7. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, en donde m es 0 y n es 2.

8. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, en donde m es 1 y n es 1.

9. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 2, en donde dicho componente colorante fluorescente es un colorante de xanteno o benzoxanteno seleccionado del grupo que consiste en colorantes de fluoresceína, colorantes de rodamina y colorantes de rodol.

35

10. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 9, que tiene la fórmula I:



en donde

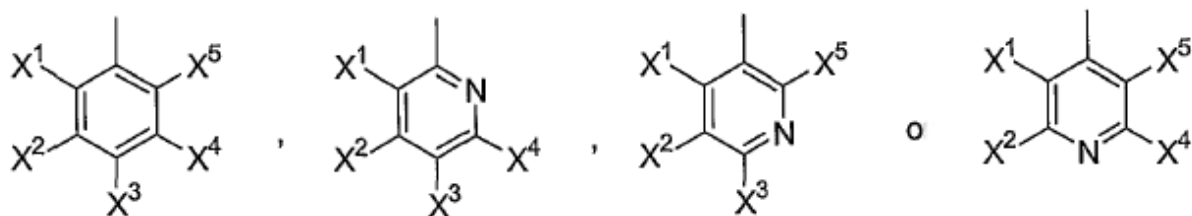
5 A^1 representa O, N-Z o $N^+(Z)_2$, en el que cada Z es H o alquilo(C_1-C_8), o está opcionalmente combinado con R^2 o R^4 para formar un anillo de 5 o 6 miembros o está combinado con cada uno de R^2 y R^4 para formar dos anillos de 6 miembros condensados;

A^2 representa OR o $N(Z)_2$, en el que cada Z es H o alquilo(C_1-C_8), o está opcionalmente combinado con R^1 o $R^{1''}$ para formar un anillo de 5 o 6 miembros o está combinado con cada uno de R^1 y $R^{1''}$ para formar dos anillos de 6 miembros condensados; y R se selecciona de H, alquilo(C_1-C_8), arilo, aril-alquilo(C_1-C_4) y L^f ;

10 R^1 , $R^{1''}$, R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente cada uno de H, halógeno, ciano, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alcoxi(C_1-C_8), arilo, heteroarilo, L^f y P^z ; u opcionalmente dos miembros adyacentes de R^1 , $R^{1''}$, R^1 , R^2 y R^3 están combinados para formar un anillo condensado de cinco o seis miembros que es aromático, no aromático o heteroaromático y que está opcionalmente sustituido con P^z ;

15 en donde las porciones alquilo de cualquiera de R^1 , $R^{1''}$ y R^1 a R^4 están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxi, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones alquilo de los sustituyentes tienen de 1 a 6 átomos de carbono; y las porciones arilo o heteroarilo de cualquiera de R^1 , $R^{1''}$ y R^1 a R^4 están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C_1-C_6)amino, alquilo(C_1-C_6), alquil(C_1-C_6)tio, alcoxi(C_1-C_6), L^f y P^z ;

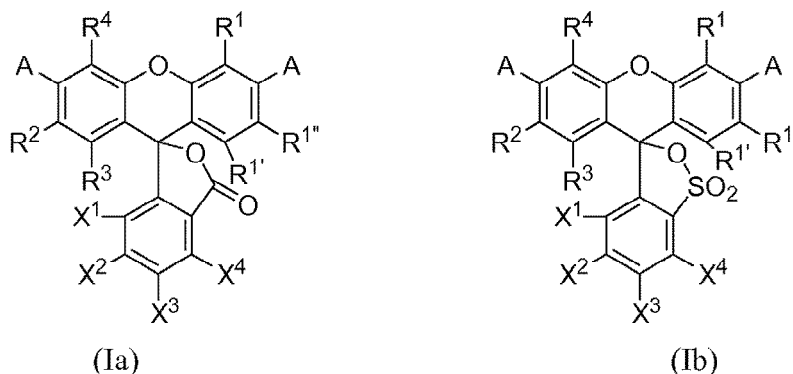
20 R^0 es halógeno, ciano, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alquenilo(C_2-C_8), alquinilo(C_2-C_8), heteroarilo sustituido o no sustituido o arilo que tiene la fórmula:



25 en donde X^1 , X^2 , X^3 , X^4 y X^5 se seleccionan independientemente cada uno del grupo que consiste en H, halógeno, ciano, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alcoxi(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alquenilo(C_2-C_8), alquinilo(C_2-C_8), arilo, heteroarilo, SO_3H , PO_3H_2 , CO_2H , L^f y P^z , y opcionalmente, cualquiera de dos X^1 a X^5 adyacentes están combinados para formar un anillo aromático o heteroaromático; y

están presentes de 0 a 1 grupos L^f y de 1 a 4 grupos P^z en los compuestos de fórmula I.

11. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 9, que tiene la fórmula I(a) o I(b):



en donde

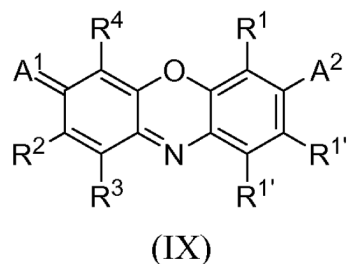
cada A es hidroxilo, amino, hidroxilo protegido, o amino protegido;

5 R^1 , $R^{1''}$, R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente cada uno de H, halógeno, ciano, arilo, heteroarilo, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alcoxi(C_1-C_8), L^f y P^z , u opcionalmente dos miembros adyacentes de R^1 , $R^{1''}$, R^2 y R^3 están combinados para formar un anillo condensado de cinco o seis miembros que es aromático, no aromático o heteroaromático y que está opcionalmente sustituido con P^z , en donde las porciones alquilo de cualquiera de R^1 , $R^{1''}$ y R^1 a R^4 están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxi, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones alquilo de los sustituyentes tienen de 1 a 6 átomos de carbono y las porciones arilo o heteroarilo de cualquiera de R^1 , $R^{1''}$ y R^1 a R^4 están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C_1-C_6)amino, alquilo(C_1-C_6), alquil(C_1-C_6)tio, alcoxi(C_1-C_6), L^f y P^z ;

10 X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se seleccionan independientemente cada uno del grupo que consiste en H, halógeno, ciano, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alcoxi(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alqueno(C_2-C_8), alquino(C_2-C_8), arilo, heteroarilo, SO_3H , PO_3H_2 , CO_2H , L^f y P^z , y opcionalmente, cualesquiera dos X^1 a X^4 adyacentes están combinados para formar un anillo aromático o heteroaromático que está opcionalmente sustituido además con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados de halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C_1-C_6)amino, alquilo(C_1-C_6), alquil(C_1-C_6)tio, alcoxi(C_1-C_6), L^f y P^z ; y

están presentes de 0 a 1 grupos L^f y de 1 a 2 grupos P^z en los compuestos de fórmulas (Ia) y (Ib).

20 12. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



en donde

25 A^1 representa O o N-Z, en el que Z es H o alquilo(C_1-C_8), o está opcionalmente combinado con R^2 o R^4 para formar un anillo de 5 o 6 miembros o está combinado con cada uno de R^2 y R^4 para formar dos anillos de 6 miembros condensados;

A^2 representa OR o $N(Z)_2$, en el que cada Z es H o alquilo(C_1-C_8), o está opcionalmente combinado con R^1 o $R^{1''}$ para formar un anillo de 5 o 6 miembros o está combinado con cada uno de R^1 y $R^{1''}$ para formar dos anillos de 6 miembros condensados, y R se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo(C_1-C_8), arilo, aril-alquilo(C_1-C_4) y L^f ;

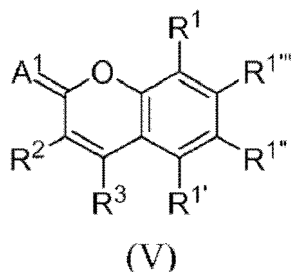
30 R^1 , $R^{1''}$, R^1 , R^2 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente cada uno de H, halógeno, ciano, CF_3 , alquilo(C_1-C_8), alquil(C_1-C_8)tio, alcoxi(C_1-C_8), arilo, heteroarilo, L^f y P^z ;

en donde las porciones alquilo de cualquiera de R^1 , $R^{1''}$ y R^1 a R^4 están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxi, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones alquilo de los sustituyentes tienen de 1 a 6 átomos de carbono; y las porciones arilo o heteroarilo de cualquiera de R^1 , $R^{1''}$ y R^1 a

R⁴ están opcionalmente sustituidas con uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C₁-C₆)amino, alquilo(C₁-C₆), alquil(C₁-C₆)tio, alcoxi(C₁-C₆), L^f y P^z; y

están presentes de 0 a 1 grupos L^f y de 1 a 2 grupos P^z en los compuestos de fórmula (IX).

- 5 13. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



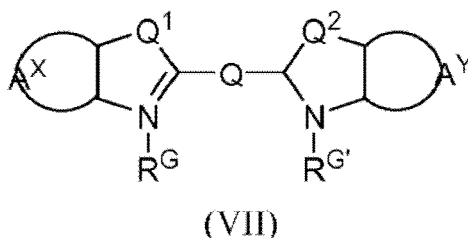
en donde R', R^{1'}, R^{1''}, R^{1'''}, R² y R³ se seleccionan independientemente cada uno del grupo que consiste en H, halógeno, ciano, CF₃, alquilo(C₁-C₈), alquil(C₁-C₈)tio, alcoxi(C₁-C₈), arilo, heteroarilo, L^f y P^z;

- 10 en donde las porciones alquilo de cualquiera de R^{1'}, R^{1''}, R^{1'''} y R¹ a R³ están opcionalmente sustituidas con halógeno, carboxi, sulfo, amino, mono- o dialquilamino, alcoxi, ciano, haloacetilo o hidroxilo, y las porciones arilo de cualquiera de R^{1'}, R^{1''}, R^{1'''} y R¹ a R³ están opcionalmente sustituidas con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C₁-C₆)amino, alquilo(C₁-C₆), alquil(C₁-C₆)tio, alcoxi(C₁-C₆), L^f y P^z;

- 15 A¹ representa O o N-Z, en el que Z es H o alquilo(C₁-C₈); y

están presentes de 0 a 1 grupos L^f y de 1 a 2 grupos P^z en los compuestos de fórmula (V).

14. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



en donde

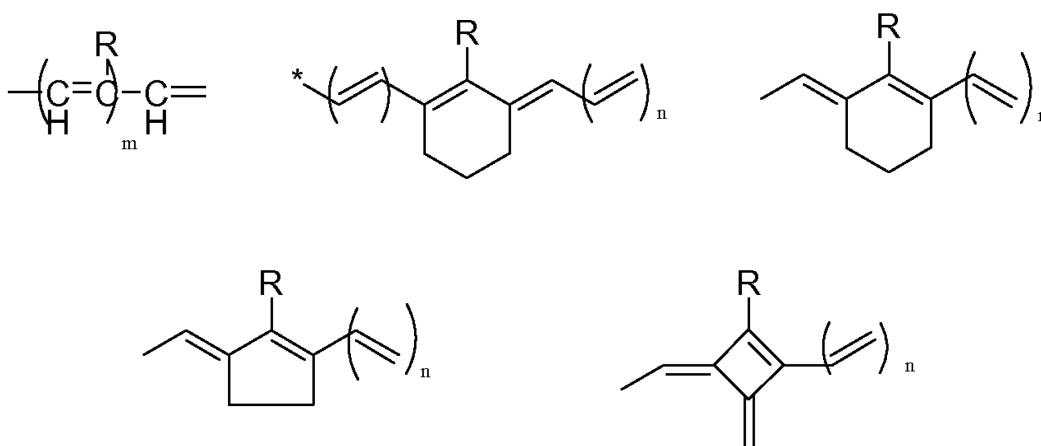
- 20 cada uno de Q¹ y Q² se seleccionan independientemente de O, S, N y CR^aR^b, o -C(=CH₂)-, en donde R^a y R^b se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, metilo, etilo y L^f;

los anillos A^x y A^y representan independientemente cada uno anillos de arilo o heteroarilo sustituidos o no sustituidos condensados;

Q es un sistema enlazante conjugado, opcionalmente sustituido con L^f; y

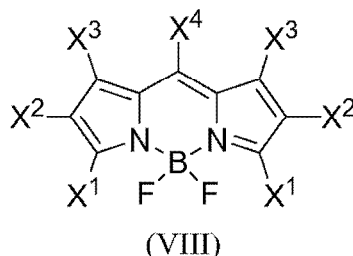
- 25 R^G y R^{G'} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₈, heteroalquilo, ácido alquilenosulfónico, ácido alquilenocarboxílico, L^f y P^z; en donde uno o dos grupos P^z y cero a uno grupos L^f están presentes en dicho reactivo.

15. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 14, en donde Q es un sistema enlazante conjugado seleccionado del grupo que consiste en:



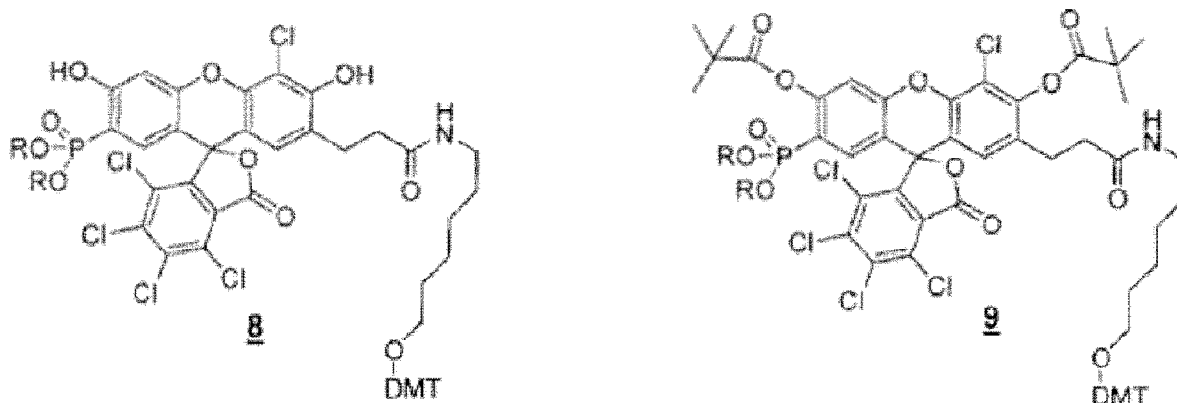
en donde R se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo inferior y L^f.

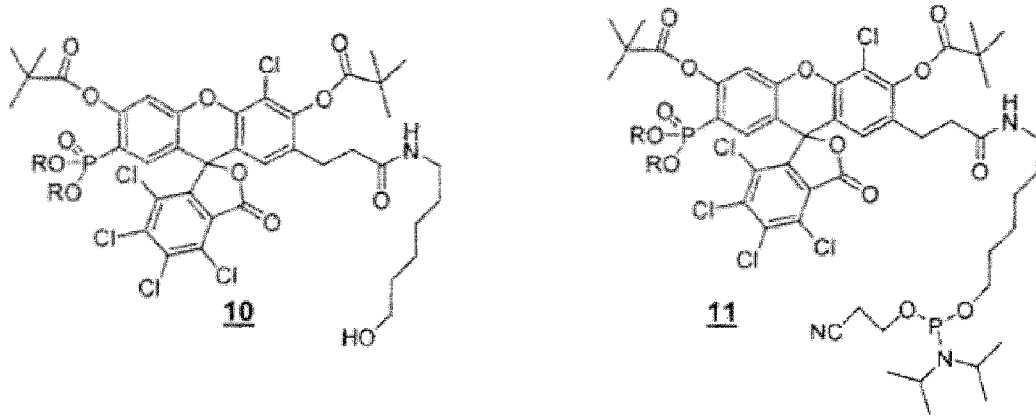
16. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



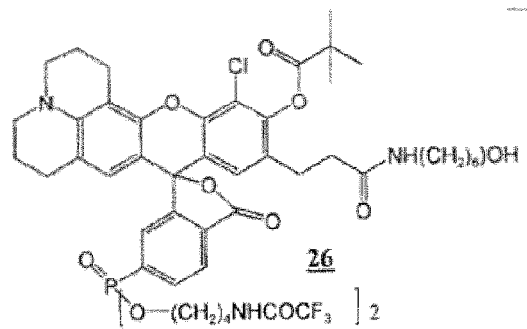
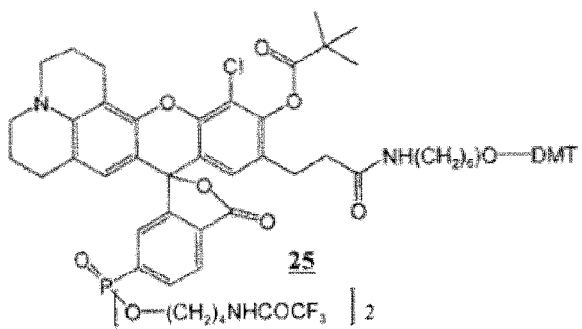
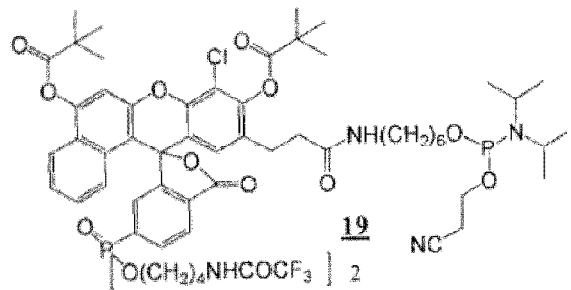
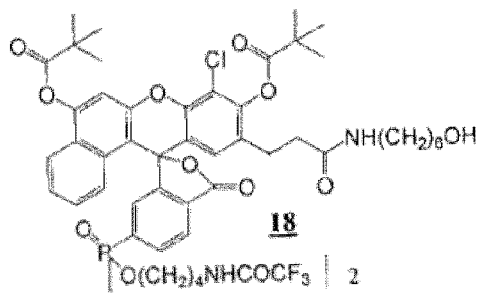
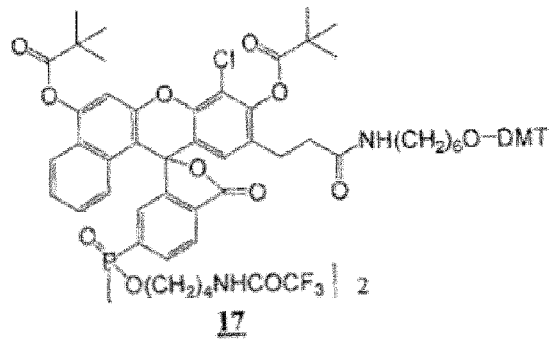
- 5 en donde X¹, X², X³ y X⁴ se seleccionan independientemente cada uno del grupo que consiste en H, halógeno, ciano, CF₃, alquilo(C₁-C₈), alcoxi(C₁-C₈), alquil(C₁-C₈)tio, alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), SO₃H, PO₃H₂, CO₂H, L^f y P^z; y opcionalmente, cualesquiera dos X¹ a X⁴ adyacentes están combinados para formar un anillo de cinco o seis miembros no aromático, aromático o heteroaromático que está opcionalmente sustituido además con de uno a cuatro sustituyentes seleccionados de halógeno, ciano, carboxi, sulfo, hidroxilo, amino, mono- o dialquil(C₁-C₆)amino,
- 10 alquilo(C₁-C₆), alquil(C₁-C₆)tio, alcoxi(C₁-C₆), L^f y P^z; y en donde están presentes de 0 a 1 grupos L^f y de 1 a 2 grupos P^z.

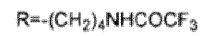
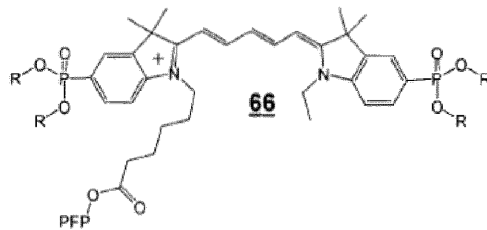
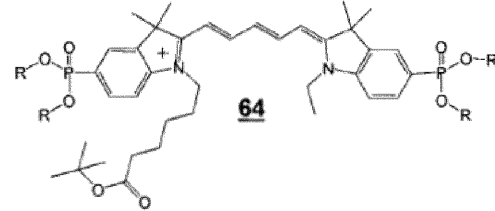
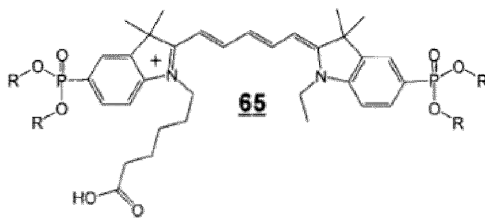
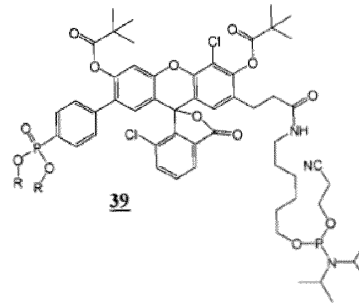
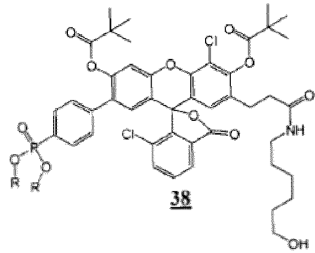
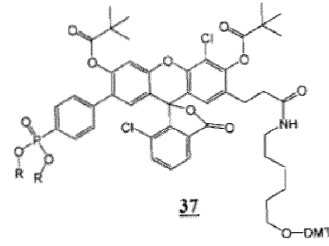
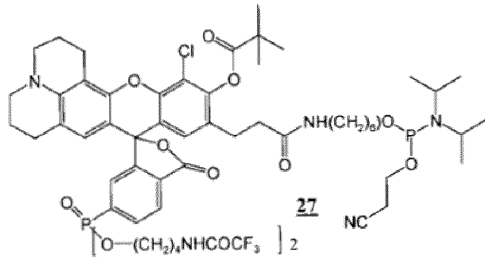
17. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 1, seleccionado de los compuestos 8, 9, 10, 11, 17, 18, 19, 25, 26, 27, 37, 38, 39, 64, 65 y 66:





R = $(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCF}_3$





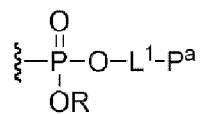
18. Un reactivo colorante fluorescente que tiene la fórmula:



en donde

5 FI es un componente colorante fluorescente; y

P₁ es un grupo fosfonato funcionalizado que tiene la fórmula:



en donde la línea ondulada indica la unión directa a un carbono sp² de dicho componente colorante fluorescente;

L¹ es un grupo enlazante;

R es un miembro seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₈, arilo, aril-alquilo(C₁-C₄), -L^a-N^a, y -L^a-NR^AR^B;

en donde L^a es un grupo enlazante alquileo, N^a es un grupo iónico de amonio, y cada uno de R^A y R^B se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo(C₁-C₈) y un grupo protector lábil; y

5 P^a es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un resto fosforamidita, un grupo enlazante mono-, di- o trifuncional que tiene al menos un grupo funcional terminal o grupo funcional protegido, un soporte sólido y un grupo reactivo;

y una sal del mismo.

10 19. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 18, en donde dicho componente colorante fluorescente se selecciona del grupo que consiste en cumarinas, benzocumarinas, xantenos, benzo[a]xantenos, benzo[b]xantenos, benzo[c]xantenos, cianinas, acridinas, difluoruros de dipirrometenoboro, fenoxazinas, benzo[a]fenoxazinas, benzo[b]fenoxazinas y benzo[c]fenoxazinas.

15 20. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 18, en donde dicho componente colorante fluorescente se selecciona del grupo que consiste en colorantes de cumarina, colorantes de resorufina, colorantes de difluoruro de dipirrometenoboro, colorantes de rutenio bipyridilo, colorantes de transferencia de energía, colorantes de naranja de tiazol y colorantes de N-aril-1,8-naftalimida.

21. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 18, en donde dicho componente colorante fluorescente es un colorante de xanteno o benzoxanteno seleccionado del grupo que consiste en colorantes de fluoresceína, colorantes de rodamina y colorantes de rodol.

20 22. Un reactivo colorante fluorescente de la reivindicación 21, seleccionado del grupo que consiste en los compuestos 44, 45 y 46 mostrados en el Esquema de Reacción 8; los compuestos 51, 52 y 53 mostrados en el Esquema de Reacción 9; y los compuestos 56, 57 y 58 mostrados en el Esquema de Reacción 10.

25 23. Un método para preparar un derivado colorante fluorescente de fosfonato, comprendiendo dicho método poner en contacto un sustrato colorante halo-fluorescente que tiene al menos un átomo de halógeno unido a un átomo de carbono de un anillo aromático, con un reactivo de fosfito bajo condiciones suficientes para retirar dicho átomo de halógeno y unir covalentemente un grupo fosfonato a dicho átomo de carbono del anillo aromático para formar dicho derivado colorante fluorescente de fosfonato.

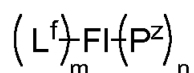
30 24. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicho sustrato colorante halo-fluorescente se selecciona del grupo que consiste en una halocumarina, una halobenzocumarina, una halocianina, un halodifluoruro de dipirrometenoboro, una halofenoxazina, una halobenzo[a]fenoxazina, una halobenzo[b]fenoxazina y una halobenzo[c]fenoxazina.

25. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicho reactivo de fosfito es un miembro seleccionado del grupo que consiste en fosfito de difenilo, fosfito de dietilo y fosfito de bis(4-(2,2,2-trifluoroacetamido)butilo).

35 26. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicho reactivo de fosfito es fosfito de bis(4-(2,2,2-trifluoroacetamido)butilo) o el compuesto 41 mostrado en el Esquema de Reacción 7.

27. Un derivado colorante fluorescente de fosfonato preparado según el método de la reivindicación 26.

28. Una sonda de oligonucleótido que tiene un reactivo colorante fluorescente unido, en donde el reactivo colorante fluorescente tiene la fórmula:



40 en donde

FI es un componente colorante fluorescente;

L^f es un grupo enlazante que tiene un miembro unido seleccionado del grupo que consiste en un grupo funcional protegido o no protegido, un grupo reactivo, un resto enlazante polifuncional, un resto de fosforamidita y un soporte sólido;

45 P^z es un grupo fosfonato de ión dipolar protegido que tiene la fórmula (a) o un grupo fosfonato protegido que tiene la fórmula (b) o (c):

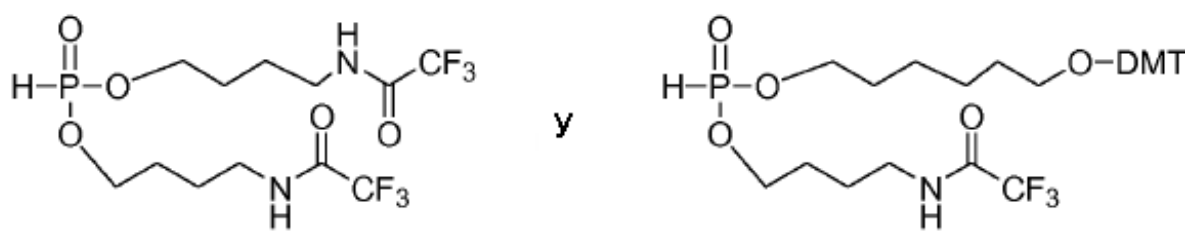


FIGURA 1

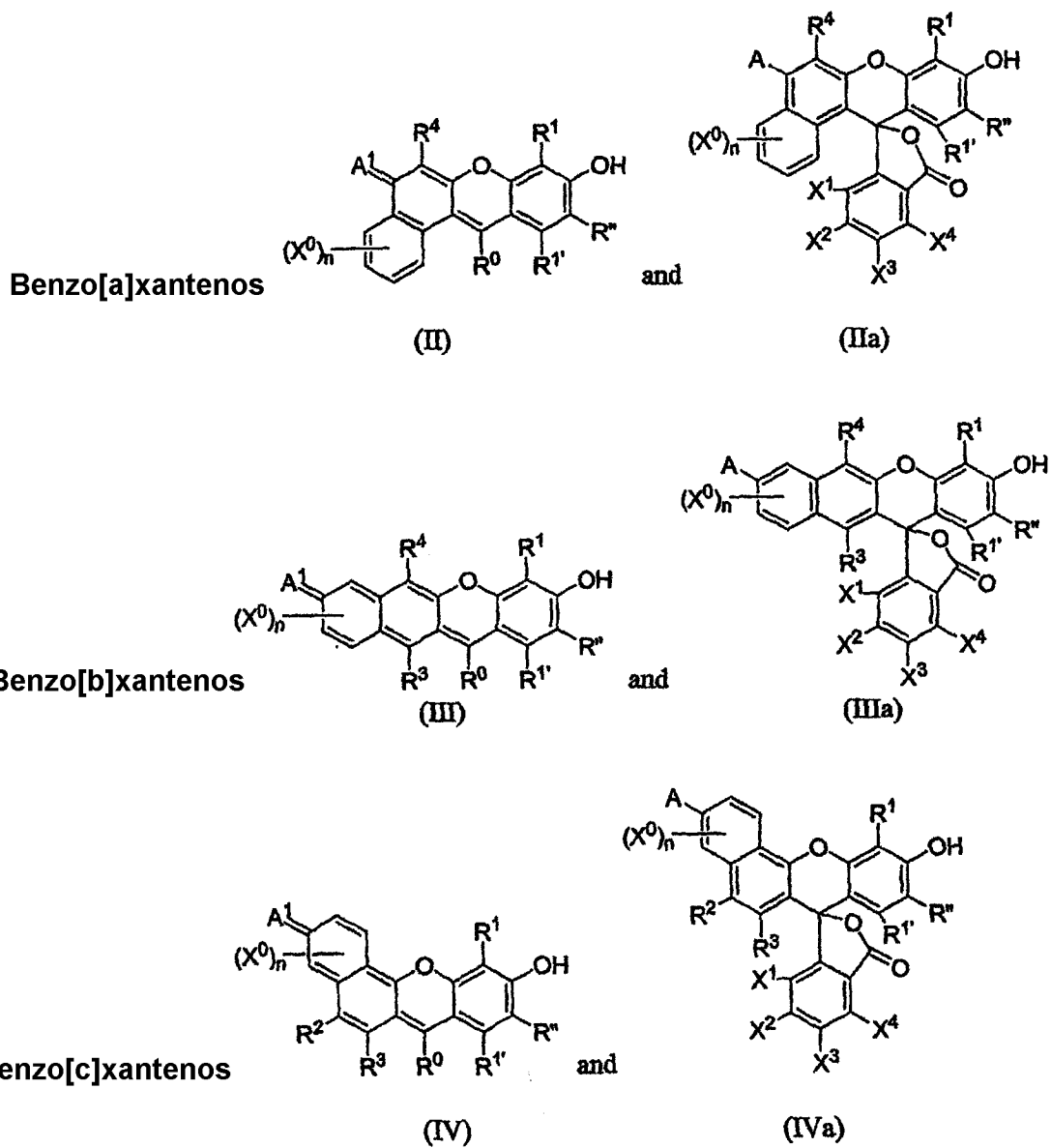


Figura 2

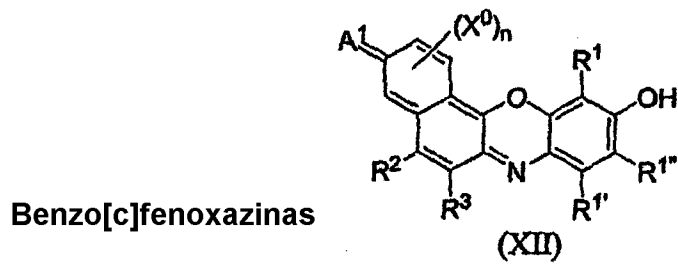
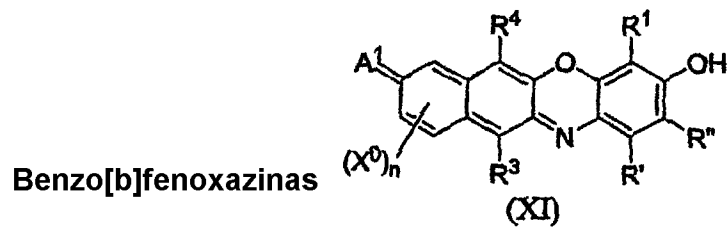
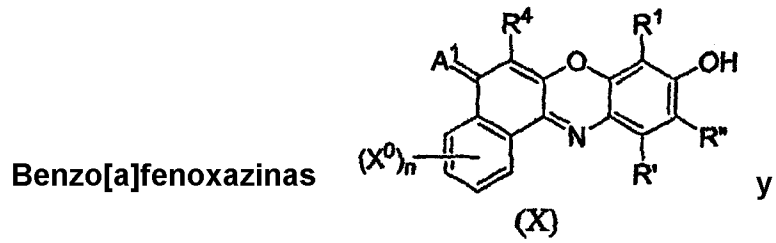


Figura 3



Figura 4

