

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0611474-1 A2**

(22) Data de Depósito: 26/05/2006
(43) Data da Publicação: 14/09/2010
(RPI 2071)



(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/68
G01N 33/53

(54) Título: **BIODETECÇÃO POR QUÍMICA
MODELADA COM ÁCIDO NUCLEÍCO**

(30) Prioridade Unionista: 26/05/2005 US 60/685.047,
21/07/2005 US 60/701,165, 31/08/2005 US 60/713.038, 07/10/2005
US 60/724.743, 13/01/2006 US 60/758.837, 27/03/2006 US
60/786.247, 21/07/2005 US 60/701,165, 31/08/2005 US 60/713.038,
26/05/2005 US 60/685.047, 07/10/2005 US 60/724.743, 26/05/2005
US 60/685.047, 21/07/2005 US 60/701,165, 31/08/2005 US
60/713.038, 07/10/2005 US 60/724.743, 13/01/2006 US 60/758.837,
26/05/2005 US 60/685.047, 21/07/2005 US 60/701,165, 27/03/2006
US 60/786.247

(73) Titular(es): ENSEMBLE DISCOVERY CORPORATION

(72) Inventor(es): ANDREW M. STERN, BARBARA S. FOX,
JAMES M. COULL, LAWRENCE A. HAFF, YUMEI HUANG

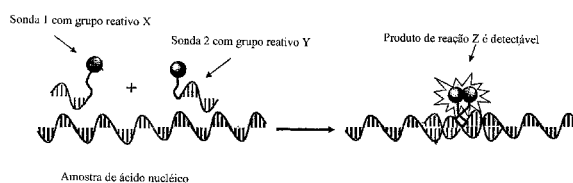
(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel Shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2006020834 de 26/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/128138 de 30/11/2006

(57) Resumo: BIODETECÇÃO POR QUÍMICA MODELADA COM
ÁCIDO NUCLEÍCO. A invenção fornece composições e métodos para
a detecção de alvos biológicos (e.g., ácidos nucleicos e proteínas) por
química modelada com ácido nucleico, por exemplo, pela geração de
sinais fluorescentes, quimiluminescentes e/ou cromofórico.

Detecção de ácido nucleico



"BIODETECÇÃO POR QUÍMICA MODELADA COM ÁCIDO NU-
CLÉICO"

PEDIDOS CORRELATOS

Esse pedido reivindica o benefício e prioridade
5 dos Pedidos de Patente US números de série 60/685.047, depo-
sitado em 26 de maio de 2005; 60/701.165 depositado em 21 de
julho de 2005; 60/713.038 depositado em 31 de agosto de
2005; 60/724.743 depositado em 7 de outubro de 2005;
60/758.837 depositado em 13 de janeiro de 2006 e 60/786.247,
10 depositado em 27 de março de 2006, a revelação total de cada
um sendo incorporada aqui como referência, para todas as fi-
nalidades.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere, de modo geral, às
15 sondas e seu uso na biodetecção e diagnósticos. Mais especifi-
camente, a invenção se refere às composições e métodos da
química modelada com ácido nucléico (por síntese de compos-
tos fluorescentes, quimioluminescentes e cromofóricos) na
biodetecção e diagnóstico (por exemplo, a detecção de ácidos
20 nucléicos e proteínas).

ANTECEDENTES

Compostos fluorescentes e coloridos vêm sendo usa-
dos nos campos de pesquisa biológica e medicina para detec-
tar a presença, ausência, estado, quantidade e composição de
25 biomoléculas. Os ensaios usando compostos fluorescentes e
coloridos podem ser realizados *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*.
Exemplos de uso comum nos ensaios *in vitro* para detecção de
DNA e RNA são PCR em tempo real e de ponto final, sequencia-

mento de DNA e tecnologias de microarray de DNA.

Detecção do Ácido Nucléico

O requisito de sondas de DNA e/ou iniciadores que portam marcadores fluorescentes é comum aos ensaios de detecção de DNA e RNA. Esses são tipicamente criados por síntese enzimática e/ou química. Outros exemplos de ensaios fluorescentes *in vitro* incluem ensaios ELISA nos quais um anticorpo é marcado com um fluoróforo. Um exemplo de um ensaio fluorescente *in situ* é a marcação das células integrais (vivas ou mortas) com anticorpos fluorescentemente modificados, de modo que eles podem ser detectados, imageados e isolados, por exemplo usando um classificador de fluxo. Mais recentemente, vêm sendo feitos esforços para utilizar a fluorescência como uma tecnologia de detecção minimamente invasiva em animais intactos. Essencialmente um anticorpo ou alguma outra molécula bioativa é marcada com um composto fluorescente infravermelho ou perto do infravermelho e, seguindo-se a injeção ao animal; a localização da fluorescência é detectada usando iluminação apropriada e equipamento de imageamento. Dessa forma, cânceres e outras doenças podem ser encontrados e monitorados sem a necessidade de cirurgia exploratória. Os precedentes são apenas alguns exemplos que ilustram a penetração da fluorescência como uma tecnologia para biodetecção.

Tipicamente, para a maioria desses tipos de ensaios, existe a necessidade de se remover sonda não ligada ou anticorpo por uma etapa de lavagem para obter sinal adequado ao ruído e sensibilidade. Isso adiciona etapas ao procedi-

mento do ensaio que resultam em acréscimo de tempo e custo (reagentes e possivelmente equipamento). Para ensaios de amplificação de DNA/RNA, tais como, RT-PCR, as etapas de lavagem não são necessárias, uma vez que o alvo é ampliado, reduzindo efetivamente a complexidade da amostra, enquanto provendo abundância de analisado para o ensaio. Ainda, mesmo a PCR sofre de algumas limitações. Por exemplo, o número de analisados que podem ser detectados em um ensaio simples é limitado a quatro ou menos e o ensaio requer equipamento caro e consumidor de energia, o que limita a sua aplicabilidade ao uso no laboratório e especificamente no campo. Seria vantajoso ter-se uma tecnologia de ensaio que fosse tão sensível e específica quanto a PCR, ainda fosse mais robusta e portátil. No caso de um imageamento *in vivo*, uma etapa de lavagem "biológica" é realizada, uma vez que um período de tempo é necessário seguindo-se a injeção e antes do imageamento, de modo a permitir que o composto bioativo encontre seu alvo e permita que o excesso de reagente seja retirado do corpo.

Detecção da Proteína

As proteínas desempenham um papel central em muitas reações biológicas, que são basicamente compostas de ação intermolecular e reconhecimento molecular envolvendo várias proteínas. Um método comum empregado na identificação e determinação quantitativa da proteína utiliza eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Outro método emprega cromatografia de líquido e espectrometria de massa. Para a detecção da interação e a identificação das proteínas,

chips de anticorpos vêm também sendo usados, os quais são providos com vários anticorpos manchados na superfície plana. Métodos convencionais empregando eletroforese possuem problemas em termos de resolução e sensibilidade de detecção.

A Publicação de Patente US número 20020064779 de Landergren e outros descreve um ensaio de ligação de proximidade onde duas sondas que se ligam ao alvo a ser detectado são enzimaticamente ligadas às extremidades de dois oligonucleotídeos que são anexados às duas sondas de ligação. Os oligos unidos são ampliados para determinar a presença da molécula alvo. A Publicação de Pedido de Patente US número 2005/0009050 de Nadeau e outros descreve o princípio semelhante de formação de um amplicon.

A Publicação do Pedido de Patente US número 20050095627 de Kolman e outros descreve um ensaio com base na proximidade onde os dois padrões de ligação unidos aos dois oligonucleotídeos formam uma estrutura de DNA híbrida, de fita parcialmente dupla, mediante ligação a um alvo. A estrutura de fita parcialmente dupla pode então ser estendida com um DNA polimerase para produzir um produto que pode ser adicionalmente ampliado pela PCR.

Existe a necessidade de novas tecnologias fluorescentes e colorimétricas que se apliquem as muitas desvantagens inerentes aos métodos de biodeteção mencionados acima. Muitos métodos de detecção existentes requerem ampliação. Existe também a necessidade de serem descobertos novos compostos fluorescentes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção se baseia, em parte, na descoberta de que a química modelada com ácido nucléico pode ser aplicada na detecção de alvos biológicos, por exemplo, ácidos nucléicos, proteínas, autoanticorpos, células, etc. A presente invenção se baseia, em parte, na descoberta de que os compostos fluorescentes, quimioluminescentes e cromofóricos e reações gerando sinais fluorescentes, quimioluminescentes e cromofóricos podem ser sintetizados por química modelada com ácido nucléico. Tais métodos, compostos, reações químicas e outras composições são úteis na detecção das moléculas biológicas, tais como, ácidos nucléicos e proteínas. Os ensaios dessa invenção usando compostos fluorescentes, quimioluminescentes e coloridos podem ser realizados *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*.

Em um aspecto, a presente invenção se refere a um método para detectar uma sequência nucleotídica alvo. O método inclui: a) provisão 1) de uma primeira sonda compreendendo i) uma primeira sequência oligonucleotídica e ii) um primeiro grupo reativo ligado à primeira sequência de oligonucleotídeo e 2) uma segunda sonda compreendendo i) uma segunda sequência oligonucleotídica e ii) um segundo grupo reativo ligado à segunda sequência oligonucleotídica, onde a primeira sequência oligonucleotídica e a segunda sequência oligonucleotídica são complementares às duas regiões separadas do nucleotídeo alvo; b) combinação da primeira sonda e da segunda sonda com uma amostra a ser testada quanto a presença da sequência de nucleotídeo alvo, sob condições onde a

primeira sonda e a segunda sonda hibridizam em suas respectivas regiões complementares da sequência de nucleotídeo alvo caso presente na amostra, pelo que, colocando em proximidade reativa o primeiro grupo reativo e o segundo grupo reativo; e c) detectando uma reação entre o primeiro grupo reativo e o segundo grupo reativo pelo que, determinando a presença da sequência de nucleotídeo alvo.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para detectar uma sequência de nucleotídeo alvo. O método inclui: a) provisão de um conjunto de pares de sondas cada par de sonda compreendendo 1) uma primeira sonda compreendendo i) uma primeira sequência de nucleotídeo e ii) um primeiro grupo reativo ligado à primeira sequência oligonucleotídica e 2) uma segunda sonda compreendendo i) uma segunda sequência oligonucleotídica compreendendo i) uma segunda sequência oligonucleotídica e ii) um segundo grupo reativo correspondente ligado à segunda sequência oligonucleotídica, onde a primeira sequência oligonucleotídica e a segunda sequência oligonucleotídica são complementares às duas regiões separadas do nucleotídeo alvo; b) combinação do conjunto de pares de sonda com uma amostra a ser testada quanto a presença da sequência de nucleotídeo alvo, sob condições, onde cada uma dentre primeira sonda e segunda sondas dos pares de sonda hibridizam na respectiva região complementar da sequência de nucleotídeo alvo, caso presente na amostra, pelo que, colocando em proximidade reativa os pares correspondentes dos primeiro e segundo grupos de reação; e c) detecção de uma ou mais reações entre os pares dos primeiros grupos

de reação e os segundos grupos de reação correspondentes, pelo que, determinando a presença da seqüência de nucleotídeo alvo.

Ainda em outro aspecto, a invenção se refere a um método para realizar química modelada com ácido nucléico. O método inclui realização das reações químicas modeladas com ácido nucléico múltiplas por uma seqüência de nucleotídeo modelada simples, por exemplo, sob condições substancialmente semelhantes e/ou substancialmente simultâneas.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um método para detectar um alvo biológico. O método inclui o que se segue. Uma primeira sonda é provida. A primeira sonda inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação com relação ao alvo biológico, 2) uma primeira seqüência oligonucleotídica, e 3) um primeiro grupo reativo associado à primeira seqüência oligonucleotídica. Uma segunda sonda é provida incluindo: 1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação com relação ao alvo biológico, 2) uma segunda seqüência oligonucleotídica, e 3) um segundo grupo reativo associado à segunda seqüência oligonucleotídica. O segundo oligonucleotídeo é capaz de hibridizar em relação à primeira seqüência oligonucleotídica. O segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo quando colocados em proximidade reativa um com o outro. A primeira e a segunda sonda são combinadas com uma amostra a ser testada quanto a presença do alvo biológico sob condições onde as primeira e segunda frações de ligação se ligam ao alvo biológico. O segundo oligonucleotídeo é deixado hibridizar

em relação à primeira seqüência oligonucleotídica para colocar em proximidade de reação os primeiro e segundo grupos reativos. Uma reação entre o primeiro e o segundo grupos reativos é detectada, pelo que, determinando a presença do alvo biológico. Em uma modalidade, a reação entre o primeiro e o segundo grupo reativo produz uma fração fluorescente. Em outra modalidade, a reação entre o primeiro e o segundo grupos de reação produz uma fração quimioluminescente e/ou cromofórica.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um método para detectar um alvo biológico. O método inclui o que se segue. Um complexo de ligação é provido do alvo biológico com uma primeira sonda. A primeira sonda inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, 2) uma primeira seqüência de oligonucleotídeo e 3) um primeiro grupo reativo associado à primeira seqüência oligonucleotídica. O complexo de ligação é contatado com uma segunda sonda. A segunda sonda inclui: 1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, 2) uma segunda seqüência oligonucleotídica e 3) um segundo grupo reativo associado à segunda seqüência oligonucleotídica. O segundo oligonucleotídeo é capaz de hibridizar com relação à primeira seqüência oligonucleotídica e o segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo, quando colocados em proximidade reativa um com o outro. O segundo oligonucleotídeo é deixado hibridizar com relação ao primeiro oligonucleotídeo para colocar em proximidade reativa o primeiro e o segundo grupos de reação. Uma

reação é detectada entre o primeiro e o segundo grupos de reação, pelo que, para determinar se o alvo biológico está presente na amostra.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um método para detectar a presença de um alvo biológico. O método inclui o que se segue. Uma primeira sonda e uma segunda sonda são ligadas ao alvo. A primeira sonda inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, 2) uma primeira sequência oligonucleotídica, e 3) um primeiro grupo reativo associado com a primeira sequência oligonucleotídica. A segunda sonda inclui: 1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, 2) uma segunda sequência oligonucleotídica e 3) um segundo grupo reativo associado à segunda sequência oligonucleotídica. O segundo oligonucleotídeo é capaz de hibridizar com relação à primeira sequência oligonucleotídica. O segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo quando colocados em proximidade reativa um com o outro. O segundo oligonucleotídeo hibridiza com a primeira sequência oligonucleotídica, pelo que, colocando em proximidade reativa os primeiro e segundo grupos de reação. A reação entre os primeiro e segundo grupos reativos é detectada para determinar se o alvo biológico está presente na amostra. Em uma modalidade, a reação entre os primeiro e segundo grupos de reação produz uma fração fluorescente. Em outra modalidade, a reação entre os primeiro e segundo grupos de reação produz uma fração quimioluminescente e/ou cromofórica.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um método

para detectar a presença de um alvo biológico. O método inclui o que se segue. É provida uma primeira sonda, que inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação ao alvo biológico e 2) uma primeira sequência oligonucleotídica de código zip. É provida uma segunda sonda que inclui: 1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação ao alvo biológico e 2) uma segunda sequência oligonucleotídica de código zip. A primeira sonda é hibridizada em uma primeira sonda repórter que inclui: 1) uma sequência oligonucleotídica de código anti-zip de complementar a primeira sequência oligonucleotídica de código zip, 2) um primeiro oligonucleotídeo repórter, e 3) um primeiro grupo reativo. A segunda sonda é hibridizada a uma segunda sonda repórter que inclui: 1) uma sequência oligonucleotídica de código anti-zip complementar a uma segunda sequência de código zip, 2) um segundo oligonucleotídeo repórter, e 3) um segundo grupo reativo. O segundo oligonucleotídeo repórter é capaz de se hibridizar a uma primeira sequência oligonucleotídica repórter e o segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo quando colocado em proximidade reativa de um outro. A primeira e a segunda sonda são colocadas em contato com uma amostra a ser testada quanto à presença do alvo biológico. É permitido que a primeira e a segunda sonda se liguem ao alvo biológico, caso presente na amostra, por meio do que o segundo oligonucleotídeo repórter hibridiza a primeira sequência oligonucleotídica repórter para colocar em proximidade reativa o primeiro e o segundo grupos reativos. A reação entre o primeiro e o segundo grupos reativos é

detectada, pelo que, para determinar se o alvo biológico está presente na amostra.

É importante frisar que os métodos da invenção não requerem ligação enzimática ou química das primeira e segunda seqüência oligonucleotídica.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um kit útil para detecção de um analisado biológico. O kit inclui uma primeira sonda que inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação ao analisado biológico, 2) uma primeira seqüência oligonucleotídica, e 3) um primeiro grupo reativo associado à primeira seqüência oligonucleotídica; e b) uma segunda sonda que inclui 1) uma segunda fração de ligação tendo afinidade de ligação ao analisado biológico, 2) uma segunda seqüência oligonucleotídica, e 3) um segundo grupo reativo associado à segunda seqüência oligonucleotídica. A segunda seqüência oligonucleotídica é capaz de hibridizar a primeira seqüência oligonucleotídica. O segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo quando colocado em proximidade reativa um com o outro.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um kit útil para detecção de um analisado biológico. O kit inclui uma primeira sonda que inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação ao alvo biológico e 2) uma primeira seqüência de código zip de oligonucleotídeo; e uma segunda sonda que inclui 1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade ao alvo biológico, e 2) uma segunda seqüência oligonucleotídica de código zip. A primeira sonda é hibridizável para a primeira sonda repórter compreendendo:

1) uma seqüência de código anti-zip de oligonucleotídeos complementares para a primeira seqüência oligonucleotídica de código zip, 2) um primeiro oligonucleotídeo repórter e 3) um primeiro grupo reativo. A segunda sonda é hibridizável na
5 segunda sonda repórter compreendendo: 1) uma seqüência oligonucleotídica de código anti-zip complementar à segunda seqüência oligonucleotídica de código zip, 2) um segundo oligonucleotídeo repórter e 3) um segundo grupo reativo. O segundo oligonucleotídeo repórter é capaz de hibridizar na
10 primeira seqüência oligonucleotídica repórter e o segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo, quando colocados em proximidade reativa um do outro.

A invenção engloba um kit que provê, uma, duas ou mais sondas descritas aqui. Mais especificamente, a invenção
15 engloba um kit que provê uma, duas ou mais sondas que utilizam química modelada com ácido nucléico para a geração de sinais detectáveis, como um modo para detectar a presença de um alvo ou alvos biológicos, por exemplo, um ou mais ácidos nucléicos, uma ou mais proteínas, um ou mais autoanticorpos,
20 e/ou uma ou mais células.

Os aspectos precedentes e modalidades da invenção podem ser melhor entendidos com referência às Figuras que se seguem, descrição detalhada e reivindicações.

DEFINIÇÕES

25 O termo, "química programada de DNA" ou "PDC" conforme usado aqui, se refere à química modelada com ácido nucléico, por exemplo, controle específico da seqüência de reagentes químicos para render produtos específicos realizado

por: 1) provisão de um ou mais modelos, que possuem grupo(s) reativo(s) associado(s); 2) contato de um ou mais grupos de transferência (reagentes) possuindo um anti-códon (por exemplo, sequência complementar com um ou mais modelos) e grupo(s) reativo(s) sob condições que permitem a hibridização nos modelos e 3) reação de grupos reativos para render produtos. Por exemplo, em uma reação modelada com ácido nucléico de uma etapa, a hibridização de um oligonucleotídeo "modelo" e um "complementar" coloca juntos grupos reativos seguidos por uma reação química que resulta no produto desejado. Estruturas dos reagentes e produtos não precisam ser relacionadas àquelas dos ácidos nucléicos compreendendo os oligonucleotídeos modelo e de grupo de transferência. Vide, por exemplo, Publicações de Pedido de Patente US números 2004/0180412 A1 (USSN 10/643.752; 19 de agosto de 2003) por Liu e outros e 2003/0113738 A1 (USSN 10/101.030, 19 de março de 2002), por Liu e outros; Gartner e outros, 2004, Science, volume 305 pp. 1601-1605; Doyon e outros, 2003, JACS, volume 125, páginas 12372-12373, todos os quais são expressamente incorporados aqui como referência em sua totalidade. Vide também, "Turn Over Probes and Use Thereof" por Coull e outros, Pedido de Patente Internacional PCT PCT/US06/16999, depositado em 3 de maio de 2006.

Os termos, "ácido nucléico", "oligonucleotídeo" (algumas vezes simplesmente referidos como "oligo") ou "polinucleotídeo" ou conforme usados aqui se referem a um polímero de nucleotídeos. O polímero pode incluir, sem limitação, nucleotídeos naturais (isto é, adenosina, timidina,

guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina e desoxicitidina), análogos de nucleosídeo (por exemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrol-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C5-bromouridina, C5-fluoridina, C5-iodouridina, C5-propiniluridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina e 2-tiocitidina), bases quimicamente modificadas, bases biologicamente modificadas (por exemplo, bases metiladas), bases intercaladas, açúcares modificados (por exemplo, 2'-fluoribose, ribose, 2'-desoxiribose, arabiose e hexose) ou grupos fosfato modificados (por exemplo, fosforotioatos e ligações 5'-N-fosforamidita). Ácidos nucléicos e oligonucleotídeos podem também incluir outros polímeros de bases possuindo uma estrutura modificada, tal como, um ácido nucléico travado (LNA), um ácido nucléico de peptídeo (PNA), um ácido nucléico de treose (TNA).

Através de toda a descrição, quando as composições forem descritas como possuindo, incluindo ou compreendendo componentes específicos, ou onde os processos são descritos como possuindo, incluindo ou compreendendo etapas de processo específicas, é contemplado que as composições da presente invenção também consistem essencialmente ou consistem nos compostos citados e que os processos da invenção também consistem essencialmente ou consistem nas etapas de processo citadas. Adicionalmente, deve ser entendido que a ordem das etapas ou a ordem para realização de determinadas ações não

é importante à medida que a invenção permaneça operável. Além disso, duas ou mais etapas ou ações podem ser conduzidas simultaneamente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

5 A invenção pode ser adicionalmente entendida a partir das Figuras que se seguem, onde:

 A Figura 1 é uma representação esquemática de um método para detecção dos alvos de ácido nucléico de acordo com uma modalidade da invenção.

10 A Figura 2 é uma representação esquemática de um exemplo de detecção de genes numéricos de cópia inferior através da pintura do gene.

 A Figura 3 é uma representação esquemática de um exemplo de detecção de alvos de ácido nucléico por um ensaio
15 de liberação de cofator.

 A Figura 4 é uma representação esquemática de um método para a detecção de um alvo biológico de acordo com uma modalidade da presente invenção.

 A Figura 5 é uma representação esquemática de um
20 método para a detecção de um alvo biológico de acordo com uma modalidade da presente invenção.

 A Figura 6 mostra exemplos de hibridização como afetados pela concentração, temperatura e presença ou ausência de uma não combinação de par de base simples.

25 A Figura 7 mostra oligonucleotídeos exemplares usados em determinados experimentos de curva de fusão.

 A Figura 8 é uma representação esquemática de um método para detecção de um alvo biológico de acordo com uma

modalidade da presente invenção.

A Figura 9 é uma representação esquemática de um método para detecção do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) de acordo com uma modalidade da presente
5 invenção.

A Figura 10 mostra a modalidade exemplar de um sistema de detecção codificado zip, fragmentado, com aptâmeros como frações de ligação alvo.

A Figura 11 mostra uma modalidade exemplar de um
10 sistema de detecção codificado zip, fragmentado, com anticorpos como as frações de ligação alvo.

A Figura 12 é uma representação esquemática de um método para detecção de um alvo de proteína de acordo com a modalidade da presente invenção.

15 A Figura 13 mostra estruturas gerais de corantes de polimetina, cianinas e hemicianinas.

A Figura 14 mostra um exemplo da geração de sinal fluorescente e detecção de alvo biológico através da química repórter de trifenilfosfina (TPP) e azidocoumarina (AzC).

20 A Figura 15 mostra um exemplo da geração de sinal fluorescente e detecção de alvo biológico através da química repórter de TPP e AzC.

A Figura 16 mostra determinados exemplos de curvas de fusão ilustrando o efeito da concentração de oligonucleotídeo em T_m .
25

A Figura 17 mostra determinados exemplos com curvas de fusão de hibridização de DNA dos oligonucleotídeos biotinilados com e sem avidina.

A Figura 18 mostra determinados exemplos de alterações de T_m de oligos biotinilados complementares mediante ligação à avidina.

5 A Figura 19 mostra determinados exemplos do efeito das concentrações de sal e magnésio mediante T_m de oligonucleotídeos +/- biotina.

A Figura 20 mostra determinados exemplos do comportamento da temperatura de fusão dos oligonucleotídeos biotinilados em razões diferentes de oligonucleotídeos para
10 avidina.

A Figura 21 mostra determinados exemplos de curvas de fusão de oligos de fita-biotina 5' e 3' (-) duplexados com oligo e fita biotina-5' (+) na ausência e presença de avidina.

15 A Figura 22 mostra determinados exemplos de curvas de fusão de dímeros oligo biotinilados enriquecidos com AT com e sem avidina.

A Figura 23 é uma representação esquemática de um método para detecção de um alvo biológico de acordo com uma
20 modalidade da presente invenção.

A Figura 24 mostra exemplos de resultados experimentais na detecção de um alvo biológico de acordo com uma modalidade da presente invenção.

As Figuras 25A e Figura 25B mostram exemplos de
25 resultados experimentais (o efeito da formamida na mistura de reação) na detecção de um alvo biológico de acordo com uma modalidade da presente invenção.

A Figura 27 mostra exemplos de resultados experi-

mentais (o efeito da formamida na mistura de reação) na detecção de um alvo biológico de acordo com uma modalidade da presente invenção.

5 A Figura 28 mostra exemplos de resultados experimentais (o curso de tempo das misturas de reação) na detecção de um alvo biológico de acordo com uma modalidade da presente invenção.

10 A Figura 29 mostra exemplos de resultados experimentais (o curso de tempo das misturas de reação) na detecção de um alvo biológico de acordo com uma modalidade da presente invenção.

A Figura 30 mostra exemplos de resultados experimentais (razões de sonda) na detecção de um alvo biológico de acordo com uma modalidade da presente invenção.

15 A Figura 31 mostra um exemplo de detecção de PDGF por um sistema de detecção codificado zip.

A Figura 32 mostra experimentos em razões de aptâmeros e repórteres.

20 A Figura 33 ilustra uma modalidade de um sistema de detecção de "uma peça" para a detecção em PDGF.

A Figura 34 mostra a modalidade exemplar de um sistema de detecção codificado zip, fragmentado, com anticorpos como frações de ligação alvo.

25 A Figura 35 mostra um espectro MALDI-MS de uma mistura de reação.

A Figura 36 mostra absorção e espectros de emissão fluoresceínica de uma mistura de reação.

A Figura 37 mostra absorção e espectros de emissão

fluoresceínica de uma hemicianina purificada.

A Figura 38 mostra um dado de massa de electrospray de um composto.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 Em seu sentido mais simples, deve ser gerado um sinal detectável através de uma reação modelada com ácido nucléico que indica a presença de um analisado alvo, por exemplo, um ácido nucléico ou uma proteína. Mais especificamente, a presente invenção provê uma abordagem excitante com
10 relação à geração de compostos fluorescentes, quimioluminescentes ou cromofóricos e sinais e para utilizar sua tecnologia nas aplicações de biodetecção e/ou diagnóstico. A criação e detecção de um composto colorido, fluorescente ou quimioluminescente ou precursor devido à formação ou clivagem
15 de uma ligação química ou a transformação química de um grupo funcional, diretamente como o resultado de uma reação química modelada com ácido nucléico, provê uma única tecnologia que pode ser aplicada a muitas áreas incluindo detecção de agente de bioterrorismo e diagnósticos de doença.

20 Assim, um evento de hibridização mesmo entre sondas é realizado por uma reação química que é mediada por moldes de DNA (oligonucleotídeos) que aumentam substancialmente a razão de uma reação química devido ao efeito de proximidade e é capaz de mediar uma variedade de reações químicas.
25 Portanto, a presença de uma biomolécula alvo (por exemplo, ácido nucléico ou proteína) conduz ao início da reação química detectável. Como resultado, a presente invenção provê facilidade de uso e sinal alto para detecção de alvo bio-

lógico por ruído.

Deteccção do Ácido Nucléico

A Figura 1 ilustra uma modalidade de detecção de um ácido nucléico. Duas sondas de oligonucleotídeo se ligam a um DNA ou RNA alvo (um analisado, por exemplo, em uma amostra que se acredita contenha agentes de bioterrorismo ou outros agentes infecciosos). As duas sondas são marcadas com espécies quimicamente reativas X e Y. Mediante hibridização, X e Y reagem para criar um composto Z de geração de sinal (por exemplo, composto fluorescente, quimioluminescente ou colorido). Z pode ou não ligar covalentemente as duas sondas, e se não, Z pode ser ligado a cada sonda. Z pode ser liberado dos oligonucleotídeos quando da sua formação.

Se o fluoróforo ou cromóforo for liberado, ele pode ser separado do complexo de hibridização e analisado separadamente, ou pode ser removido uma vez que for detectado, de modo que as etapas adicionais de interrogação da amostra podem ser conduzidas (por exemplo, rotação das sondas). Se o fluoróforo ou cromóforo não for liberado, ele pode também ser separado do restante da mistura de reação, por exemplo, migrando como uma estrutura de fita dupla que pode ser decomposta por eletroforese de gel, por exemplo. O fluoróforo anexado às sondas DNA no DNA ou RNA alvo pode ser anexado a uma fase sólida, tal como, a superfície de uma microesfera, deslizamento em vidro (microarray), etc. ou estar na solução, quando nesse caso a reação constitui um ensaio homogêneo.

Assim, em um aspecto, a presente invenção se refe-

re a um método para detectar uma sequência nucleotídica alvo. O método inclui: a) provisão de 1) uma primeira sonda compreendendo i) uma primeira sonda compreendendo i) uma primeira sequência oligonucleotídica e ii) um grupo reativo
5 ligado à primeira sequência oligonucleotídica e 2) uma segunda sonda compreendendo i) uma segunda sequência oligonucleotídica e ii) um segundo grupo reativo ligado à segunda sequência oligonucleotídica, onde a primeira sequência oligonucleotídica e a segunda sequência oligonucleotídica são
10 complementares à duas regiões separadas do nucleotídeo alvo; b) combinando a primeira sonda e a segunda sonda com uma amostra a ser testada quanto a presença da sequência nucleotídica alvo sob condições onde a primeira sonda e a segunda sonda hibridizam nas suas respectivas regiões complementares
15 da sequência nucleotídica alvo, se presente na amostra, pelo que, colocando em relativa proximidade o primeiro grupo reativo e o segundo grupo reativo; e c) detecção da reação entre o primeiro grupo reativo e o segundo grupo reativo, pelo que, determinando a presença da sequência nucleotídica alvo.

20 A Figura 2 ilustra um exemplo de detecção de uma sequência de ácido nucléico por detecção química permitida modelada com ácido nucléico dos genes de número de cópia baixo. O gene de interesse é "marcado" com um conjunto de pares de sonda (por exemplo, ~400/gene). O número de pares
25 de sonda pode estar entre, por exemplo, 2, 5, 10 e 1.000, 5.000 ou 10.000. As reações químicas entre os pares de sonda (os primeiros grupos reativos e os segundos grupos reativos correspondentes) podem ser idênticas através de todos os pa-

res de sonda e podem ser diferentes. Os grupos diferentes de pares de sondas gerando fluoroforos diferentes podem ser alvo-
vejados contra seqüências diferentes no alvo.

A modalidade ilustrada na Figura 2 também pode ser
5 aplicada às aplicações que não a biodetecção. O princípio das múltiplas reações modeladas de ácido nucléico que ocorrem no modelo de DNA simples não está limitado à geração do sinal fluorescente.

Assim, em outro aspecto, a invenção se refere a um
10 método para detecção de uma seqüência nucleotídica alvo. O método inclui: a) provisão de um conjunto de pares de sonda, cada par de sonda compreendendo 1) primeira sonda compreendendo i) uma primeira seqüência de nucleotídeo e ii) um primeiro grupo reativo ligado à primeira seqüência oligonucleotídica, e 2) uma segunda sonda compreendendo i) uma segunda
15 seqüência oligonucleotídica e ii) um segundo grupo reativo correspondente ligado à segunda seqüência oligonucleotídica, onde a primeira seqüência oligonucleotídica e a segunda seqüência oligonucleotídica são complementares às duas regiões
20 separadas do nucleotídeo alvo; b) combinação do conjunto de pares de sonda com uma amostra a ser testada quanto a presença da seqüência nucleotídica alvo em condições onde cada uma as primeiras sondas e segundas sondas do par de sondas hibridizam em sua respectiva região complementar da seqüên-
25 cia nucleotídica alvo, caso presente na amostra, pelo que, colocado em proximidade reativa os pares correspondentes dos primeiro e segundo grupos reativos; e c) detecção de uma ou mais reações entre os pares dos primeiros grupos reativos e

dos segundos grupos reativos correspondentes, pelo que, determinando a presença da sequência nucleotídica alvo.

A Figura 3 ilustra um exemplo de outra modalidade onde um esquema de detecção indireta envolve a reação modelada com ácido nucléico seguida por uma liberação de cofator e uma reação subsequente detectável.

Deteção da Proteína

A Figura 4 e a Figura 5 ilustram uma modalidade da invenção para a detecção de uma proteína alvo.

10 A Figura 4 mostra uma modalidade de detecção de uma proteína alvo pela presente invenção. Duas sondas contêm frações de ligação alvo, oligonucleotídeos complementares, e espécies quimicamente reativas X e Y, respectivamente. Mediante hibridização, X e Y reagem para criar um composto de
15 geração de sinal (por exemplo, fluorescente), que pode ou não ligar covalentemente ambas as sondas. O produto de reação de X e Y pode também ser liberado como um composto solúvel, não ligado na solução. A proteína alvo pode ser anexada a uma fase sólida, tal como, a superfície de uma microesfe-
20 ra, deslizamento por vidro (microarray), etc. ou estar na solução. As frações de ligação alvo podem ser aptâmeros, anticorpos, fragmentos de anticorpo (isto é, Fab), proteínas receptoras ou moléculas pequenas, por exemplo.

A Figura 5 ilustra, mais especificamente, um exemplo
25 plo de uma abordagem de sonda dupla com duas sondas, cada uma portando um precursor "prefluoroforo" (F1 e F2) e contendo uma fração de ligação a um alvo e uma sequência oligonucleotídica que é projetada para recombinar uma com a ou-

tra. Nessa modalidade, a detecção é realizada sob condições, tais que, os oligos de prefluorfloro não recombina-
tro na ausência de um alvo. Essas condições são geralmente selecionadas, tal que, a temperatura ambiente é maior que a
5 T_m dos pares oligonucleotídicos na ausência do alvo (de modo que os pares oligo não recombinarão na ausência do analisado alvo destinado). Na presença do alvo pretendido, contudo, a alta concentração localizada dos oligos então comuta a T_m de seu complexo de fita dupla a montante, de modo que a hibridização ocorra, que é seguido por uma reação modelada com
10 ácido nucléico de geração de sinal (uma reação entre F1 e F2). A reação modelada com ácido nucléico de geração de sinal é acelerada devido a concentração maior localizada dos prefluoroforos, porém pode também ser facilitada pela proximidade e orientação dos grupos prefluoroforo um na direção
15 do outro. Essa configuração de geração de sinal tem o potencial de permitir a criação de kits para a detecção de várias biomoléculas, células, superfícies e para o projeto dos ensaios *in situ*. A geração de sinal não requer enzimas e o
20 formato homogêneo não requer manipulação da amostra.

A Figura 5 mostra dois oligonucleotídeos, cada um sendo ligado através de um braço espaçador opcional a um ligante separado, conforme mostrado nesse caso sendo um anticorpo, porém podendo ser outros ligantes, tais como, aptâ-
25 mos ou moléculas pequenas. Cada anticorpo reconhece um epítopo separado em um analisado alvo comum, tal como, proteína. Os braços espaçadores podem ser adicionados a um ou ambos os oligonucleotídeos entre o oligo e o ligante. Em de-

terminados casos, esse braço espaçador pode ser necessário para satisfazer os requisitos de proximidade de modo a obter uma reatividade desejada. Os braços espaçadores em princípio, podem ser quaisquer grupos apropriados, por exemplo, grupos de cadeias de carbono alifático lineares ou ramificados C3 a C5, C10, C15, C20, C25, C30, C35, C40 ou C100, uma sequência de DNA de 1 a 10, 15, 20, 30, 50 ou 100 bases de comprimento ou oligômeros de polietileno glicol de comprimento apropriado.

Os prefluoroforos podem residir em uma configuração de "extremidade da hélice" (Figura 5, superior), um anexoado à extremidade 5' de um oligo e outro anexoado à extremidade 3'. (Outras configurações podem ser aplicadas incluindo colocação de dois prefluoroforos dentro da sequência ou com um oligo hibridizando em relação à estrutura de grampo parcial (por exemplo, de 100 Angstroms de comprimento), por exemplo). No primeiro exemplo, um oligonucleotídeo é anexoado em 5' a um braço espaçador e um ligante alvo, e o outro anexoado em 3' a um braço espaçador e ligante alvo separado. Os braços espaçadores, que podem consistir em sequências de DNA não complementares ou braços espaçadores sintéticos, tais como, oligômeros de etileno glicol, podem ser adicionados para satisfazer requisitos de proximidade. Tais braços espaçadores podem ser muito flexíveis, o que possui a vantagem de superar qualquer impedimento estérico à ligação que possa ocorrer com um espaçador rígido. Um braço espaçador de comprimento adequado pode permitir que ambos os oligonucleotídeos sejam ligados em 5' aos seus ligantes (Figura 5 inferior).

or) ou ambos ligados em 3', à medida que os oligonucleotídeos possam recombinar na configuração antiparalela e permitir que os grupos reativos reajam um com o outro. Um comprimento de braço espaçador ótimo pode ser designado para cada
 5 alvo. Os braços espaçadores que são excessivamente longos seriam evitados, uma vez que eles podem reduzir a especificidade no sistema ou um efeito reduzido de T_m aumentada.

O efeito de proximidade fornecido por aprisionamento do par de oligonucleotídeos pode afetar a cinética de
 10 recombinação de duas seqüências oligonucleotídicas complementares em comparação aos dois oligonucleotídeos livres na solução. De forma mais importante, uma concentração localizada alta comuta a curva de fusão a montante, em comparação ao complexo livre, isto é, aumento da T_m do complexo. Em uma
 15 solução em volume, é conhecido que a T_m depende da concentração de oligonucleotídeo total, conforme ilustrado na equação a seguir. Wetmur, *Crit. Rev. In Biochem. and Mol. Biol.* 26, 227-259 (1991).

$$T_m = (1000 \cdot \Delta H) / (A + \Delta S + R \ln(C_t/4) - 273,15 + 16,6 \log Na^+)$$

20 onde ΔH e ΔS são a entalpia e entropia para formação da hélice, R é a constante de gás molar, C_t é a concentração total de oligômeros, e Na^+ é a concentração molar de íon sódio na solução.

A Figura 6 mostra a inclinação de T_m versus a con-
 25 centração dentro da faixa de oligonucleotídeos curtos em 0,1 M de sal possuindo uma dependência de cerca de +7°C por aumento de dez vezes na concentração de oligonucleotídeos (seqüências na Figura 7) com base na equação acima. Assim, por

exemplo, um aumento de 1.000 vezes na concentração local seria esperado que elevasse a T_m para cerca de $+21^{\circ}\text{C}$.

Produtos de reação de F1 e F2 podem ser liberados do complexo de hibridização como resultado da transformação química. Assim, o fluoroforo ou cromoforo pode ser separado do complexo de hibridização e analisado independentemente ou o fluoroforo ou cromoforo e os oligonucleotídeos recombinados podem ser removidos uma vez detectados, de modo que etapas adicionais de interrogação da amostra possam ser conduzidas. A reação entre F1 e F2 pode ou não ligar covalentemente as duas sondas, uma vez que o(s) produto(s) é(são) formado(s).

Assim, em um aspecto, a invenção provê um método para detectar um alvo biológico. O método inclui o que se segue. Uma primeira sonda é provida. A primeira sonda inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, 2) uma primeira sequência de oligonucleotídeo e 3) um primeiro grupo reativo associado à primeira sequência oligonucleotídica. A segunda sonda é provida incluindo: 1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação ao alvo biológico, 2) uma segunda sequência de oligonucleotídeo, e 3) um segundo grupo reativo associado à sequência oligonucleotídica. O segundo oligonucleotídeo é capaz de hibridizar para formar a primeira sequência de oligonucleotídeo. O segundo grupo reativo é reativo em relação ao primeiro grupo reativo quando colocado em proximidade de reação um com o outro. A primeira e a segunda sonda são combinadas com uma amostra a ser testada, quanto a

presença do alvo biológico sob condições onde as primeira e segunda frações de ligação se ligam ao alvo biológico. O segundo oligonucleotídeo é deixado hibridizar na primeira sequência oligonucleotídica para colocar em proximidade reativa os primeiro e segundo grupos reativos. Uma reação entre o primeiro e o segundo grupos reativos é detectada, pelo que, determinando a presença do alvo biológico. Em uma modalidade, a reação entre o primeiro grupo e o segundo grupo reativos produz uma fração fluorescente. Em outra modalidade, a reação entre o primeiro e o segundo grupos reativos produz uma fração quimioluminescente e/ou cromofórica.

Em outro aspecto, a invenção provê um método para detectar um alvo biológico. O método inclui o que se segue. Um complexo de ligação é provido do alvo biológico com uma primeira sonda. A primeira sonda inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, 2) uma primeira sequência de oligonucleotídeo e 3) um primeiro grupo reativo associado à primeira sequência oligonucleotídica. O complexo de ligação é contatado com uma segunda sonda. A segunda sonda inclui: 1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, 2) uma segunda sequência oligonucleotídica e 3) um segundo grupo reativo associado à segunda sequência oligonucleotídica. O segundo oligonucleotídeo é capaz de hibridizar na primeira sequência de oligonucleotídeo e o segundo grupo reativo é reativo com relação ao primeiro grupo reativo quando colocado em proximidade reativa um com o outro. O segundo oligonucleotídeo é deixado hibridizar no primeiro oli-

gonucleotídeo para colocar em proximidade reativa o primeiro e o segundo grupos reativos. Uma reação é detectada entre o primeiro e o segundo grupos reativos, pelo que, para determinar se o alvo biológico está presente na amostra.

5 Ainda em outro aspecto, a invenção provê um método para detectar a presença de um alvo biológico. O método inclui o que se segue. A primeira e a segunda sonda são ligadas ao alvo. A primeira sonda inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, 2) uma primeira sequência oligonucleotídica, e 3) um primeiro grupo reativo associado à primeira sequência oligonucleotídica. A segunda sonda inclui: 1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, 2) uma segunda sequência oligonucleotídica e 3) um segundo grupo reativo associado à segunda sequência oligonucleotídica. O segundo oligonucleotídeo é capaz de hibridizar na primeira sequência de oligonucleotídeo. O segundo grupo reativo é reativo em relação ao primeiro grupo reativo quando colocado em proximidade de reação um com o outro. O segundo oligonucleotídeo é deixado hibridizar em relação à primeira sequência oligonucleotídica, pelo que, colocando em proximidade reativa o primeiro e o segundo grupos reativos. Uma reação entre o primeiro e o segundo grupos reativos é detectada para determinar se o alvo biológico está presente na amostra. Em uma modalidade, a reação entre o primeiro e o segundo grupos reativos produz uma fração fluorescente. Em outra modalidade, a reação entre o primeiro e o segundo grupo reativo produz uma fração quimioluminescente e/ou cromo-

fórica.

A Figura 8 ilustra outra modalidade da invenção, que emprega uma arquitetura fendiad "codificada zip" para biodetecção à base de molde com ácido nucléico. Nessa modalidade, ao invés das frações de ligação alvo serem diretamente ligadas (opcionalmente através dos grupos espaçadores) aos oligonucleotídeos complementares que hibridizam e estabelecem as reações modeladas com ácido nucléico, as frações de ligação alvo são ligadas a uma sequência oligonucleotídica de "código zip". Cada um dos oligonucleotídeos repórter correspondentes possui uma sequência de "código anti-zip" complementar (além da sequência "repórter" que estabelece a reação modelada com ácido nucléico). As reações químicas modeladas com ácido nucléico são estabelecidas por hibridização dos oligos alvos, que são ligados aos grupos reativos que reagem e geram sinais detectáveis. É importante que cada sequência oligonucleotídica das sondas seja complementar apenas ao seu parceiro de hibridização pretendido e não complementar a outros oligonucleotídeos no sistema de detecção.

A arquitetura codificada zip sustenta a criação de um conjugado de oligonucleotídeo-repórter simples que seria montado com oligonucleotídeos repórter através de uma sequência de código anti-zip. As bibliotecas de repórteres diferentes ligados a um único código anti-zip podem ser testadas simplesmente por mistura de cada com quantidades estequiométricas do conjugado de oligonucleotídeo de código zip do ligante com seu código zip complementar.

A Figura 9 é uma ilustração de uma abordagem de

arquitetura fendida codificada zip, onde as frações de ligação alvo são dois aptâmeros. Nesse exemplo para detecção do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) com seqüências de oligo ilustrativas e química de repórter (por exemplo, trifenilfosfina, TPP, 7-azidocoumarina, AzC), os oligonucleotídeos repórter TPP se agrupam no oligonucleotídeo aptâmero PDGF através da hibridização da seqüência de código zip (NNN ...) na seqüência de código anti-zip complementar (N',N',N' ...) no oligonucleotídeo repórter de TPP. O oligonucleotídeo repórter termina com a seqüência repórter de base 10 exemplar e um grupo 5'-TPP. Um segundo par de oligonucleotídeos, com códigos zip diferentes e códigos anti-zip (complementares a cada outro emparelhamento), também se agrupam para prover a seqüência repórter AzC e um grupo 3'-AzC. Os oligonucleotídeos AzC são complementares e antiparalelos aos oligonucleotídeos TPP, de modo que os grupos TPP e AzC terminam extremidade-a-extremidade quando os oligonucleotídeos TPP e AzC recombina-
5
10
15

A Figura 10 ilustra em mais detalhes a abordagem de arquitetura fendida codificada zip para detecção de PDGF com seqüências oligo ilustrativas e química de repórter (TPP e AzC). Os pares de TTP incluem primeiro, um aptâmero de PDGF na extremidade 5', um espaçador com base em C18 polietileno glicol e uma seqüência de código zip de 18-mer. A seqüência repórter TPP inclui uma seqüência de código anti-zip complementar em seu término 3', um espaçador C18 PEG e uma seqüência repórter de dez pares de base terminando em um grupo 5' TPP. O par AzC dos oligonucleotídeos inclui um 3'-
20
25

aptâmero ligado através de um espaçador C18 PEG a um código zip separado, e uma detecção de oligonucleotídeo ligada a um código anti-zip 5', um espaçador C18 PEG e um oligonucleotídeo repórter (complementar ao oligonucleotídeo TPP) terminando em um grupo 3' AzC.

A Figura 11 ilustra um exemplo da arquitetura correspondente, onde os anticorpos são empregados ao invés do aptâmeros como frações de ligação alvo.

Uma vantagem da abordagem "codificada zip" é a capacidade de criar os oligonucleotídeos repórter separadamente e ter os mesmos agrupados com ligantes sob condições que mantêm as atividades de ambos os ligantes e da química ativada modelada com ácido nucléico.

O sistema codificado baseia-se em dois pares de oligonucleotídeos, onde cada par é mantido junto pelo emparelhamento de base de um único código zip e um par de código anti-zip. "Códigos zip" são seqüências oligonucleotídicas que se ligam especificamente às suas seqüências complementares, e preferivelmente são designadas tal que não sejam complementares às seqüências genômicas conhecidas (relevante se a amostra puder conter DNA genômico), possuem valores de T_m semelhantes, não possuem estrutura secundária significativa e não recombinaem em outras seqüências de código zip ou código anti-zip no sistema de detecção.

Assim, outro aspecto da invenção provê um método para detecção da presença de um alvo biológico. O método inclui o que se segue. É provida uma primeira sonda que inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade

de ligação ao alvo biológico e 2) uma sequência de código zip de oligonucleotídeo. É provida uma segunda sonda que inclui: 1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico e 2) uma segunda sequência de código zip de nucleotídeo. A primeira sonda é hibridizada em uma primeira sonda repórter que inclui: 1) uma sequência de código anti-zip de oligonucleotídeos complementar à primeira sequência de código zip de oligonucleotídeo, 2) um primeiro oligonucleotídeo repórter, e 3) um primeiro grupo reativo. A segunda sonda é hibridizada em uma segunda sonda repórter que inclui: 1) uma sequência de código anti-zip de oligonucleotídeos complementar à segunda sequência de código zip de oligonucleotídeo, 2) um segundo oligonucleotídeo repórter e 3) um segundo grupo reativo. O segundo oligonucleotídeo repórter é capaz de hibridizar em relação à primeira sequência de oligonucleotídeo repórter e o segundo grupo reativo é reativo em relação ao primeiro grupo reativo, quando colocados em proximidade um com o outro. A primeira e a segunda sonda são contatadas com uma amostra a ser testada quanto a presença do alvo biológico. A primeira e a segunda sonda se ligam ao alvo biológico, se presente na amostra, pelo que, o segundo oligonucleotídeo repórter hibridiza em relação a primeira sequência de oligonucleotídeo repórter para colocar em proximidade reativa o primeiro e o segundo grupos reativos. Uma reação entre o primeiro e o segundo grupos reativos é detectada, pelo que, para determinar se o alvo biológico está presente na amostra.

É importante ressaltar que os métodos da invenção

não requerem ligação enzimática ou química da primeira e/ou segunda seqüências oligonucleotídicas.

Fatores que podem ser considerados na otimização de um projeto de uma arquitetura codificada zip incluem, por exemplo: 1) grupos espaçadores (por exemplo, oligonucleotídeos e/ou grupos diferentes de base) entre o aptâmero/anticorpo e códigos zip (espaçador 1), por exemplo, para permitir que os parceiros de hibridização alcancem um ao outro, para impedir qualquer impedimento estérico; 2) comprimento de uma seqüência de código zip a fim de formar uma combinação suficientemente estável em relação à seqüência de código anti-zip para formar o complexo; e 3) grupos espaçadores (espaçador 2) entre o código anti-zip e a seqüência repórter, por exemplo, para prevenir qualquer impedimento estérico.

Os ligantes (frações de ligação do alvo) anexados aos oligonucleotídeos podem ser frações químicas que se ligam especificamente a uma molécula alvo e permitem que o projeto da invenção funcione. Exemplos incluem uma ampla variedade de funcionalidades, tais como: 1) anticorpos: exemplo, IgG, IgM, IgA, IgE, Fab's, Fab', F(ab)₂, Dab, Fv ou fragmentos ScFv; 2) ligantes de molécula pequena, tais como inibidores, medicamentos, co-fatores; 3) receptores para detecção de proteína e vice-versa; 4) aptâmeros de DNA, RNA, PNA; 5) seqüências de DNA para ligação de DNA e proteínas reguladoras; 6) peptídeos representando motivos de ligação de proteína; 7) peptídeos descobertos através da mostra de fago, síntese aleatória, mutagênese; 8) pares de proteína de

ligação natural e complexos; 9) antígenos (para detecção de anticorpo); e 10) um anticorpo policlonal simples anexado separadamente aos dois oligonucleotídeos pode servir como dois ligantes separados de especificidade diferente.

5 As frações de ligação do alvo anexadas aos oligonucleotídeos podem ser dos tipos heterogêneos direcionados contra sítios diferentes dentro do mesmo alvo. Por exemplo, os dois ligantes podem ser de dois anticorpos diferentes, um anticorpo e um receptor, um anticorpo e um ligante de molé-
10 cula pequena, um receptor e um peptídeo, um aptâmero e um co-fator ou qualquer outra combinação.

Os analisados alvo podem ser de qualquer tipo, contanto que suportem dois (ou mais) sítios de ligação. Os dois sítios de ligação podem ser idênticos ou não idênticos.
15 No caso de sítios idênticos, os benefícios de especificidade aumentada obtidos com dois ligantes não idênticos não serão obtidos. As moléculas que existem em equilíbrio com uma forma monomérica e uma homodimérica ou fase de polimerização superior podem ser detectadas por um par de sondas contendo
20 o mesmo ligante, porém seqüências de DNA complementar diferentes. Alvos apropriados incluem proteínas, superfícies de células, anticorpos, antígenos, vírus, bactérias, superfícies orgânicas, membranas, organelas, análise *in situ* das células fixas, complexos de proteína. A invenção pode ser
25 especificamente apropriada para a detecção de proteínas de fusão (por exemplo, BCR-ABL na presença de BCR e ABL).

A Figura 12 mostra uma modalidade de como um ensaio de ligação de proteína ou molécula pequena pode ser re-

portado usando a síntese de um fluoróforo ou cromóforo através de química modelada com ácido nucléico. Nesse exemplo, os ligantes de proteína, tais como, aptâmeros, um anticorpo, ou ligante de molécula pequena, representados por um pentágono são conjugados a um oligonucleotídeo (um "modelo") possuindo um grupo reativo X em seu término. A amostra é misturada com modelo de ligante e se o analisado de interesse estiver presente (representado por um círculo), será formado um complexo. Modelo de ligante em excesso é removido e uma sonda portando um grupo reativo Y e um oligonucleotídeo complementar ao modelo acima é adicionado. A hibridização dos oligonucleotídeos estabelece uma reação entre X e Y, criando uma molécula de sinal detectável (por exemplo, fluoróforo ou cromóforo).

A molécula de sinal (representada por uma estrela) pode permanecer anexada ao híbrido de modelo-sonda ou pode ser liberada do complexo. O analisado pode ser anexado a uma fase sólida ou pode estar livre na solução, à medida que o excesso de modelo-ligante seja removido antes da adição da sonda portando Y.

Uma vez que o modelo e a sonda codificam unicamente a síntese do repórter, e muitos repórteres diferentes podem ser previstos, um sistema multiplexo pode ser designado. Por exemplo, uma faixa de fluoróforos com emissão espaçada (por exemplo, espaçada proporcionalmente) pode ser criada, permitindo que dois, três, quatro, cinco ou mais analisados sejam detectados simultaneamente. Além disso, um sistema pode ser projetado, onde ambos os compostos fluorescente e co-

lorido são criados simultaneamente.

No projeto das sondas, uma consideração é a T_m das duas seqüências repórter transportando os grupos reativos. Uma vez que a T_m do duplexo estaria abaixo da temperatura ambiente, na ausência de um alvo, essa seqüência normalmente seria curta, por exemplo, de 6-15 bases e/ou rica em A-T. O comprimento do repórter típico de 10 pares de base pode ter uma T_m de cerca de 30°C em uma concentração baixa de sal. Portanto, é freqüentemente necessário mesmo com uma seqüência curta adicionar a 10% a 40% de formamida volume/volume para adicionalmente abaixar a temperatura para menos da temperatura do ensaio ou para elevar a temperatura do ensaio. Oligonucleotídeos repórter muito curtos podem sofrer da falta de especificidade e exibem alguma ligação à seqüências de código zip (quando essas são empregadas) o que é indesejável.

Outro fator no projeto das sondas é o comprimento do oligonucleotídeo entre a fração de ligação e a seqüência repórter, incluindo quaisquer seqüências de código zip. Essas devem ser longas o suficiente para que os oligonucleotídeos repórter alcancem um ao outro e recombinem. As seqüências podem ser entremeadas com ligantes de polietileno glicol (PEG) que são flexíveis e podem fornecer proteção adicional contra qualquer impedimento estérico. Por exemplo, comprimentos totais dos oligonucleotídeos podem se ao redor de 35 bases de comprimento. Os oligonucleotídeos contendo 0, 1 ou 2 espaçadores C18 PEG ou traços de homopolímero podem também ser utilizados (isto é, C₁₀).

Uma terceira consideração é o comprimento das seqüências zip e anti-zip quando essas forem empregadas (isto é, Figura 9 e Figura 34). Fora a necessidade de cada código zip recombinar apenas em seu código anti-zip, e não qualquer
5 outro código zip, código anti-zip ou seqüência repórter, um parâmetro importante é a T_m do duplexo entre os códigos zip e códigos anti-zip. A T_m seria substancialmente maior que a temperatura mais alta que será usada no ensaio, de modo que os oligonucleotídeos repórter permaneçam firmemente anexados
10 à fração de ligação. Na prática, os códigos zip de cerca de duas vezes o comprimento das seqüências repórter (isto é, comprimento total de 15-30 bases) são desejáveis e geralmente satisfazem esses critérios.

Com relação à geração de sinal, a química modelada
15 com ácido nucléico pode ser empregada para criar ou destruir uma marcação que afeta um sinal óptico, por exemplo, criando ou destruindo uma molécula fluorescente, quimioluminescente ou colorimétrica. Adicionalmente, uma reação de detecção pode ser projetada para criar ou destruir um produto que dire-
20 ta ou indiretamente cria uma marca detectável, por exemplo, um produto que catalisa uma reação que cria uma marcação óptica; inibe uma reação que cria uma marcação óptica; é um saturador fluoresceínico; é uma molécula de transferência de energia fluorescente; cria uma marca Ramen; cria uma marca
25 eletroquimioluminescente (isto é, rutênio bipyridila); produz uma molécula de marcação de rotação do elétron.

Adicionalmente, uma reação de detecção pode ser projetada para envolver uma detecção "isenta de marca". A

química modelada com ácido nucléico pode ser usada para criar ou destruir uma molécula discernível por uma propriedade nativa inerente da molécula, por exemplo, um produto que cria marca de difusão de luz ou agregação; é detectável por microcalorimetria; é detectável (por exemplo, um epítopo) por ressonância de plasmônio de superfície (isto é, ligação a um anticorpo imobilizado); criação ou destruição de um epítopo reconhecido por um anticorpo (isto é, ELISA); com massa discernível, medida por espectrometria de massa; de tamanho alterado, discernível por difusão da luz, eletroforese de gel ou cromatografia de exclusão por tamanho; de hidrofobicidade alterada ou teor iônico discernido por cromatografia; separação de cromatografia de afinidade para afinidade alterada.

Outro aspecto da invenção provê um kit útil para detecção de um analisado biológico. O kit inclui uma primeira sonda que inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação para o analisado biológico, 2) uma primeira seqüência oligonucleotídica, e 3) um primeiro grupo de reação associado à primeira seqüência de oligonucleotídeo, e uma segunda sonda que inclui: 1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o analisado biológico, 2) uma segunda seqüência nucleotídica e 3) um segundo grupo reativo associado à segunda seqüência oligonucleotídica. O segundo nucleotídeo é capaz de hibridizar com a primeira seqüência de oligonucleotídeo. O segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo, quando colocado em proximidade reativa um com o outro.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um kit útil para detecção de um analisado biológico. O kit inclui uma primeira sonda que inclui: 1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, e
 5 2) uma primeira seqüência oligonucleotídica de código zip; e uma segunda sonda que inclui 2) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação ao alvo biológico e 2) segunda seqüência oligonucleotídica de código zip. A primeira sonda é hibridizável com uma primeira sonda repórter compreendendo: 1) uma seqüência de código anti-zip de oligonucleotídeos complementares em relação à primeira seqüência oligonucleotídica de código zip, 2) um primeiro oligonucleotídeo repórter, e 3) um primeiro grupo reativo. A segunda sonda é hibridizável em relação a segunda sonda repórter
 10 compreendendo 1) uma seqüência oligonucleotídica de código anti-zip complementar à seqüência oligonucleotídica de código zip, um segundo oligonucleotídeo repórter e 3) um segundo grupo reativo. O segundo oligonucleotídeo repórter é capaz de hibridizar na primeira seqüência de nucleotídeo repórter
 15 e o segundo grupo reativo é reativo no primeiro grupo reativo quando colocado em proximidade reativa um do outro.

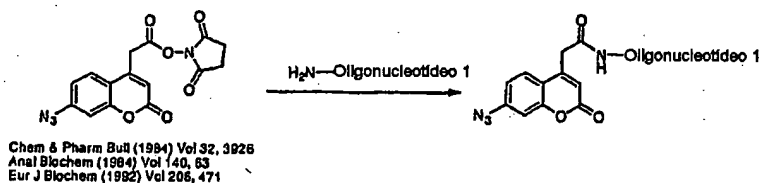
A invenção engloba um kit que provê uma, duas ou mais sondas descritas aqui. Mais especificamente, a invenção engloba um kit que fornece uma, duas, ou mais sondas que u-
 25 tilizam química modelada com ácido nucléico para a geração de sinais detectáveis como um modo de detectar a presença de um alvo biológico (por exemplo, ácido nucléico e proteínas).

Químicas Repórter

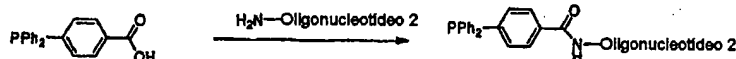
Coumarinas

As coumarinas podem ser usadas na química repórter, especificamente coumarinas portando substituintes doadores de elétron na posição 7. O esquema abaixo ilustra como a redução de uma 7-azidocoumarina (conhecida como sendo não fluorescente) no derivado 7-amido (fluorescente) pode ser realizada usando química modelada com ácido nucleico.

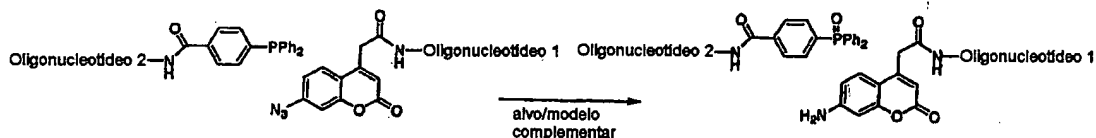
Preparação do primeiro oligo



Preparação do segundo oligo



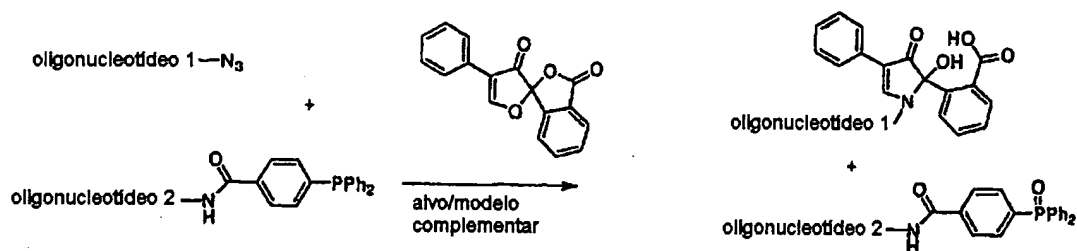
Reação de 1 e 2 na presença do modelo



Fluorescamina

Seguindo com o uso de fosfinas para reduzir azidas em aminas, pode-se reagir a amina resultante com um reagente livre (não anexado ao DNA) para formar um derivado de amina fluorescente. Um primeiro exemplo é fluorescamina que é intrinsecamente não fluorescente, porém produz um produto fluorescente verde azulado quando da reação com uma amina primária ou secundária.

Marcação com fluorescamina

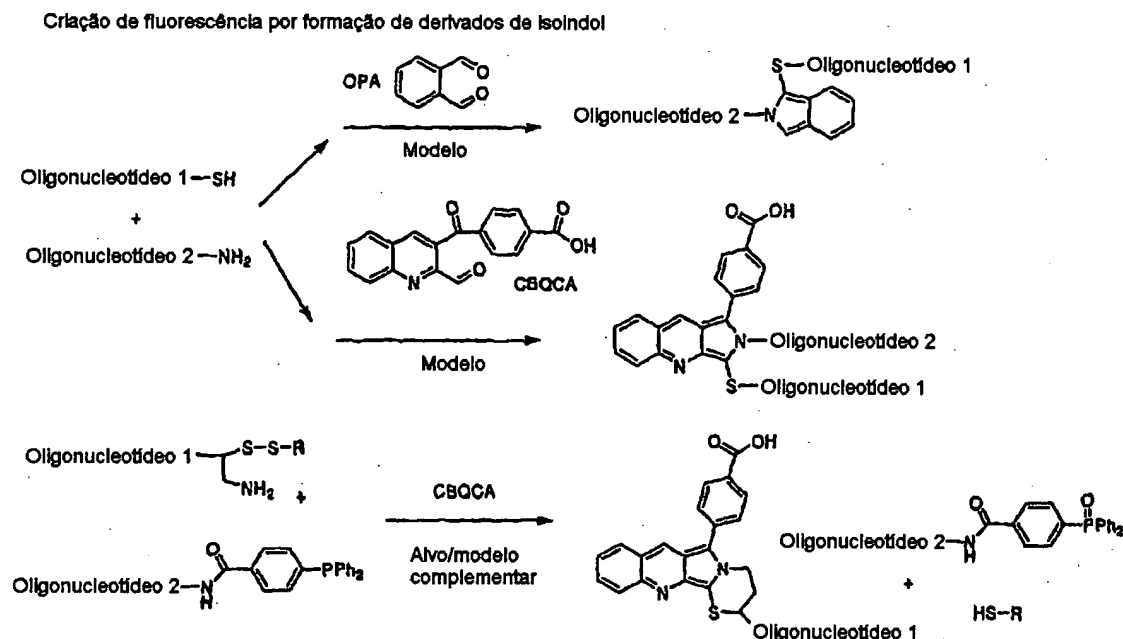


Derivados de Isoindol

A reação ou aprisionamento de dois grupos funcionais que estão em proximidade estreita com um reagente de derivatização também pode ser utilizada. Esses dois grupos

5 funcionais podem estar em dois oligos diferentes e serem colocados juntos pelo evento de hibridização ou eles podem estar ambos em um primeiro oligo, pelo que, um segundo oligo é usado para desmascarar ou transformar um ou mais dos grupos

10 seguir para a formação de isoindóis de o-dialdeídos e cetonas que são geralmente usados como reagentes de detecção de amina. O limite de detecção para aminas derivatizadas 3-(4-carboxibenzoil)quinolina-2-carboxaldeído (CBQCA) é reportado como estando na faixa de attomol.



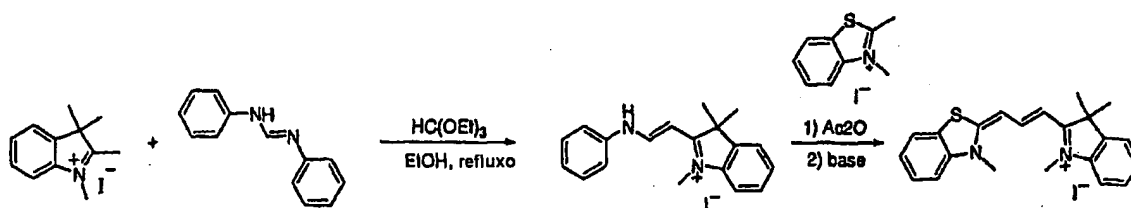
Química Repórter de Corante Polimetina

O corante polimetina é caracterizado por uma corrente de grupos metina (-CH=) com um doador de elétron e um aceitador de elétron em extremidades opostas de sua cadeia de polieno (Figura 13, Zollinger, Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments, 3ª Edição, Verlag Helvetica Chimica Acta, Postfach, Suíça, 2003). Terminais típicos A e D para corantes de polimetina (conforme mostrado na Figura 13) incluem tiazóis, pirazóis, pirrolinas, indóis, 1,3,3-trimetilindolinas, tetrazóis, pirimidina, piridinas, quinolinas e heterociclos N fundidos superiores ou quaisquer anéis benzila substituídos. Se os terminais forem ambos heterociclos contendo átomo N, o composto é denominado cianina. Se apenas um átomo N fizer parte do sistema do anel, o composto é denominado hemicianina. Alterando-se o número do grupo vinila na cadeia de polieno, o comprimento de onda de emissão fluoresceínica do co-

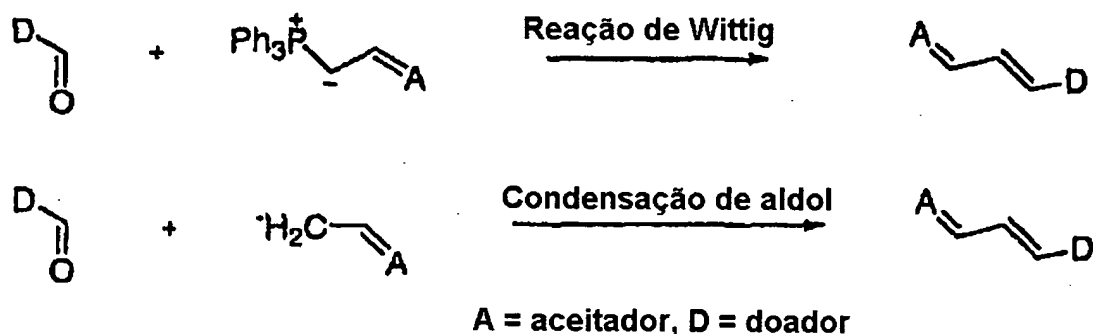
rante polimetina pode ser sintonizado para perto do ultravioleta ou perto do infravermelho. O grupo terminal também pode prover meios para sintonização mais fina.

Os corantes polimetina são geralmente sintetizados por substituições nucleófilas e/ou eletrófilas, precedido ou seguido por desprotonação (Raue, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5ª edição, UCH, Weinheim 1990, volume A16, p487). O esquema 1 a seguir é um exemplo de uma síntese de corante cianina assimétrico. Sal quaternário heterocíclico de 2-metila reage com um equivalente do reagente de acoplamento eletrófilo difenilformamidina para formar amidina ou hemicianina. A adição nucleófila escalonada do segundo sal quaternário heterocíclico conduz ao corante de cianina assimétrico. Hemicianina acilada N pode reagir com segundo heterociclo na fase sólida sob condição relativamente branda (Mason, e outros, *J. Org. Chem.* 2005, 70, 2939-2949).

Esquema 1: Rota sintética geral para corante de cianina assimétrica



Esquema 2: Geração de corante polimetina através de reação de Wittig e condensação de aldol



A condensação do aldol vem sendo freqüentemente usada para sintetizar corantes hemicianina (Hassner, e outros, *J. Org. Chem.* 1984, 49, 2546-2551; Jedrzejewska, e outros, *Dyes and Pigments* 2003, 58, 47-58; Sczegan, e outros, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2003, 2, 1264-1271). Aqui, o componente de hidrogênio ativo é um sal quaternário embora o componente carbonila possua um substituinte amino no anel aromático. Esse tipo de condensação de aldol é geralmente realizado sob condição de refluxo no álcool anidro com quantidade catalítica de base, contudo, a condição aquosa foi também tentada para alguns aldeídos ativos (solução diluída de carbonato de potássio, pH 8, 70°C, 24 horas; referência: Wang, e outros, *Dyes and Pigments* 2003, 59, 163-172).

Quando se escolhe aldeído e sal quaternário portando hidrogênio ativo com atividades químicas otimizadas, a condensação do aldol pode ser usada para a síntese do corante polimetina sob condições de reação modelada com ácido nucleico. O aldeído conjugado com DNA e o sal quaternário portando hidrogênio ativo podem ser utilizados nos sistemas de detecção da presente invenção. A abordagem geral descrita

aqui pode também ser usada para anexar esses precursores aos outros biopolímeros, tais como, açúcares, peptídeos e proteínas. O método geral para síntese do corante polimetina por condensação de aldol sob condição aquosa e a geração do corante de polimetina através da reação modelada com ácido nucleico são químicas repórter úteis.

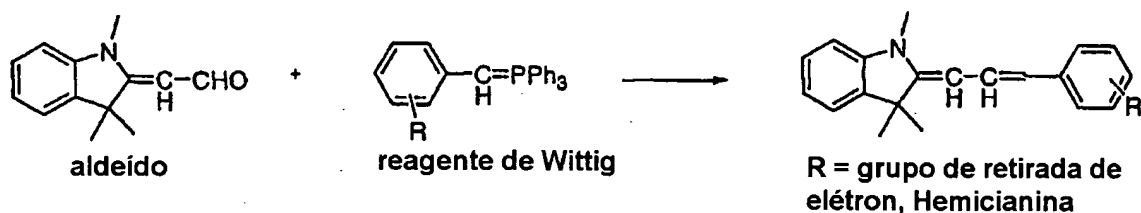
A reação de Wittig permite a preparação de um alceno por reação de um aldeído ou cetona com o ilídio gerado de um sal fosfônio. Assim existe pouca literatura com relação à síntese da hemicianina através da reação de Wittig (Zhmurova, e outros, *Zhurnal Organicheskoi Khimii*, 1975, 11, 2160-2162). Aqui, o aldeído e o ilídio foram refluxados no fenolato de sódio contendo benzeno por 9 horas.

Embora o reagente de Wittig seja conhecido como sendo capaz de reagir com o aldeído em condição básica branda através da química modelada com ácido nucleico (Gartner e outros, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 10304-10306), a estratégia geral da síntese do corante polimetina por reação de Wittig modelada com ácido nucleico, bem com metodologias para sintetização dos precursores do reagente de Wittig aqui são químicas repórter úteis.

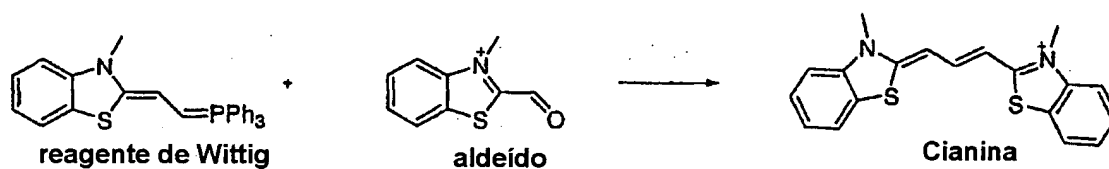
i) Síntese de corante polimetina por reação de Wittig em solução aquosa

Comutação da condição de reação de Wittig do meio anidro para aquoso, reação rápida e alto rendimento a ser obtido para a síntese de corantes polimetina. Os Esquemas 3 e 4 a seguir fornecem dois exemplos separados para a síntese de cianinas e hemicianinas sob condição aquosa.

Esquema 3: Síntese de Hemicianinas através de reação de Wittig na condição aquosa



Esquema 4: Síntese de Cianinas com reação de Wittig na condição aquosa



5 *ii) Anexação dos precursores ao DNA*

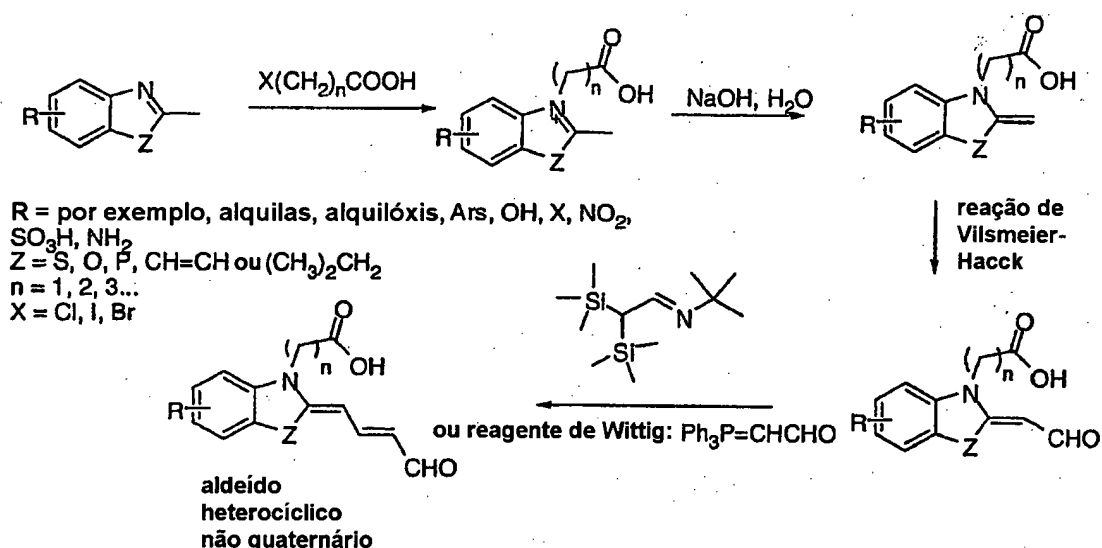
O precursor para as reações de aldol e Wittig pode ser facilmente conjugado ao DNA através da formação de ligação de amida. Primeiro, um heterocíclico ácido ou precursor aromático é sintetizado. O ácido é então convertido no éster N-hidroxisuccinimida ativo que prontamente reage com DNA portando funcionalidade de amina.

(iii) Síntese dos precursores de aldeído para condensação de aldol e reação de Wittig

A funcionalidade ácida nos precursores de aldeído é introduzida tanto através da quaternização se um heterociclo contendo nitrogênio estiver envolvido (Esquema 5 e Esquema 6) ou hidrólise de um grupo ciano por peróxido de hi-

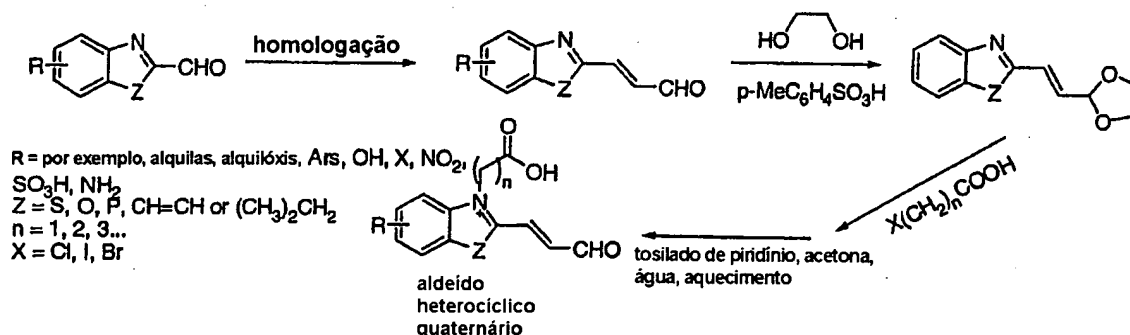
drogênio se um aldeído aromático substituído com ciano estiver envolvido, por exemplo. Reagentes de Wittig ou t-butilacetaldimina desililada podem ser usados repetidamente para a homologação de dois carbonos dos aldeídos nos α, β -
 5 enais correspondentes, se o aldeído conjugado extensivamente for necessário (Bellassoued e outros, *J. Org. Chem.* 1993, 58, 2517-2522).

Esquema 5: Síntese dos precursores de aldeído heterocíclico não quaternário para conjugação de biopolímero



10

Esquema 6: Síntese dos precursores de aldeído heterocíclico quaternário para conjugação de biopolímero

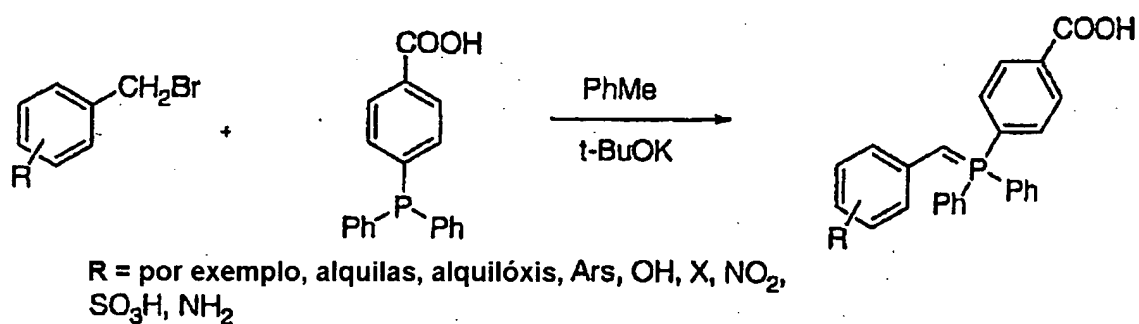


(iv) *Síntese dos precursores para reação de Wittig ou Horner*

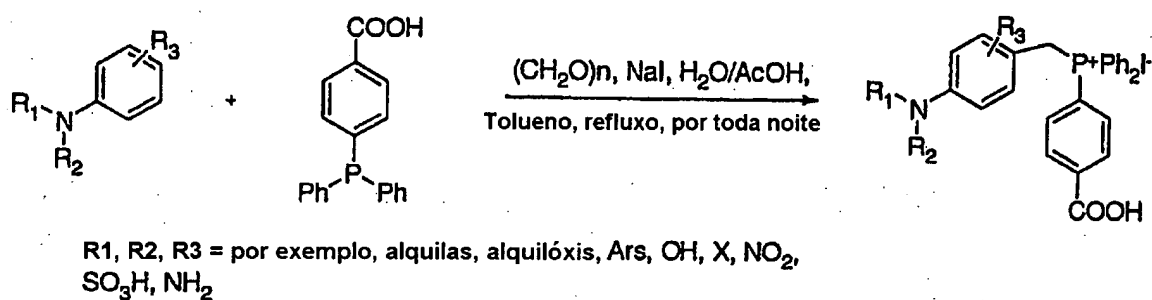
O precursor de trifenil fosfina heterocíclica pode ser convenientemente ligado ao DNA através de um dos grupos fenila. O esquema 7 provê um método geral para sintetização de fosforano do tipo benzílico (reagente de Wittig). O haleto reativo é primeiro sintetizado do álcool benzílico correspondente e então reage com ácido 4-(difenilfosfino)benzóico para formar o sal de fosfônio. Para sintetização de algum sal de fosfônio aromático substituído amino especial, um procedimento de um recipiente conveniente, sem isolamento do reagente de haleto foi empregado (Esquema 8, Porrès, e outros, *Synthesis* 2003, 10, 1541-1544). Contudo, existem alguns desafios para sintetização específica dos reagentes de Wittig em cianina. Em primeiro lugar é difícil se obter o precursor do sal de fosfônio heterocíclico. Em segundo lugar, pouco se sabe a cerca das reatividades desses reagentes na direção do aldeído.

O Esquema 9 descreve uma metodologia geral para a síntese de fosforano heterocíclico não quaternário. Alternativamente, o regente de fosfonato é também proposto aqui para reação de Horner (Esquema 10).

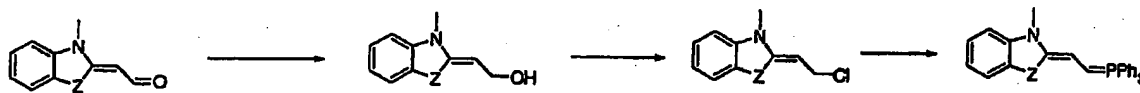
Esquema 7: Síntese de fosforano do tipo benzílico



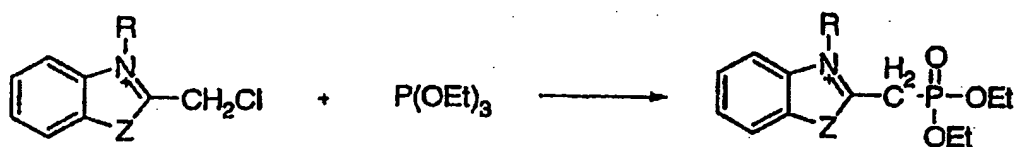
Esquema 8: Síntese de sal de fosfônio aromático substituído



Esquema 9: Síntese de reagente fosforano heterocíclico não quaternário



Esquema 10: Síntese de reagente fosfonato heterocíclico quaternário

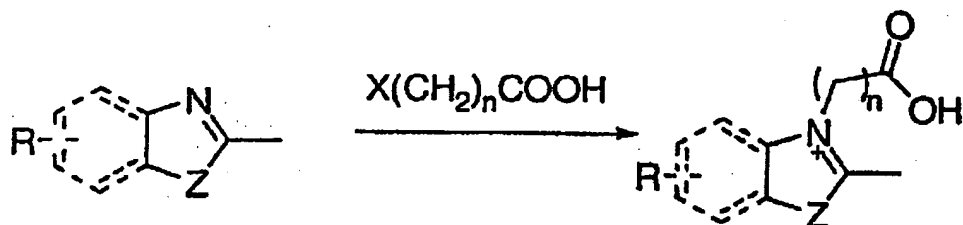


Z = por exemplo, S, O, P, CH=CH ou fosfonato $(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$
 R = por exemplo, alquilas, alquilóxis, Ars, OH, X, NO_2 ,
 SO_3H , NH_2

(v) *Síntese de precursores heterocíclicos portando hidrogênio ativo para condensação de aldol*

A maioria dos precursores heterocíclicos portando hidrogênio ativo, tais como, grupo metila está disponível comercialmente. A funcionalidade do ácido pode ser facilmente introduzida nesses compostos através da quaternização de N (Esquema 11).

Esquema 11: Síntese de precursores heterocíclicos portando hidrogênio ativo



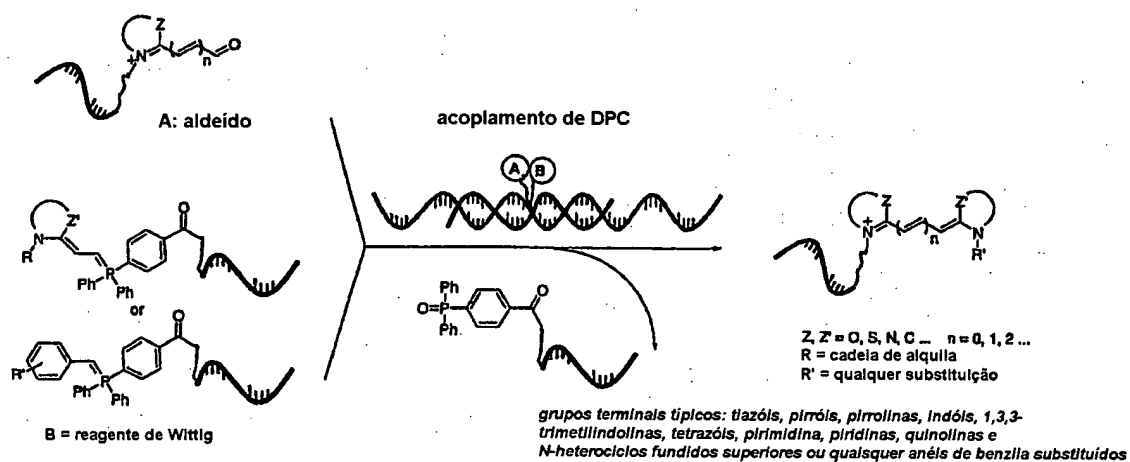
R = por exemplo, alquilas, alquilóxis, Ars, OH, X, NO_2 ,
 SO_3H , NH_2
 Z = por exemplo, S, O, P, CH=CH ou $(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$
 $n = 1, 2, 3 \dots$
 $X = \text{Cl}, \text{I}, \text{Br}$

10 (vi) *Geração de polimetina através da reação de Wittig modelada com ácido nucléico*

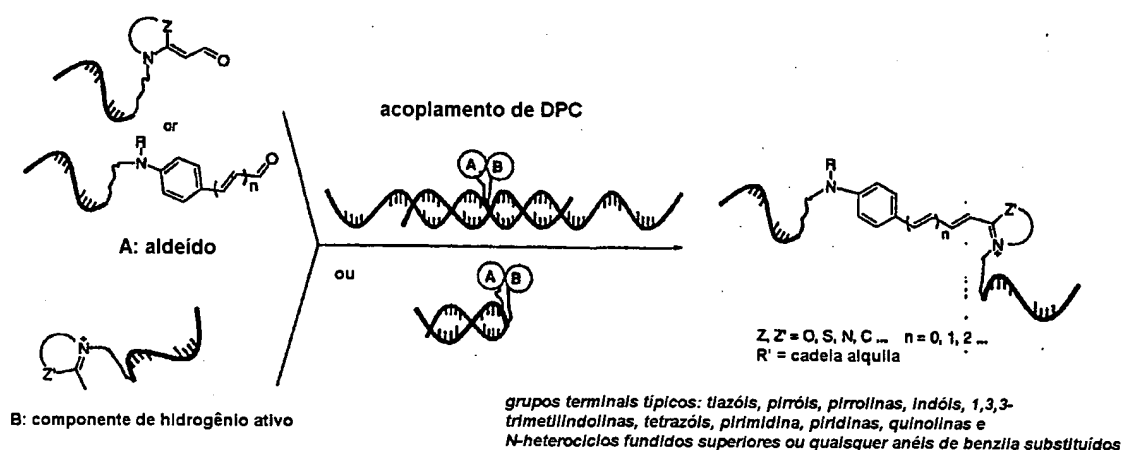
O Esquema 12 e o Esquema 13 ilustram a síntese do corante de polimetina através das reações modeladas com áci-

do nucléico incluindo reação de Witt e condensação do aldol. Para a reação de Wittig modelada com ácido nucléico, um DNA de fita simples conjugado com corante de polimetina fluoresceínico é gerado com óxido de fosfina não fluoresceínico conjugado com outra fita de DNA. Para condensação do aldol, o corante de polimetina é covalentemente ligado a ambas as fitas de DNA. Elas fornecem a química repórter útil e o método para o ensaio fluoresceínico homogêneo do sistema biológico ambos *in vitro* e *in vivo*.

10 Esquema 12: Geração de corante de polimetina através da reação de Wittig modelada com ácido nucléico



Esquema 13: Geração de corante de polimetina através da condensação de aldol modelada com ácido nucléico



Vários corantes polimetina podem ser gerados (faixa próxima a ultravioleta ou próxima ao infravermelho) através de reações modeladas com ácido nucléico. Uma vez que a química modelada com ácido nucléico se baseia no emparelhamento de base Watson-Crick, um sistema de múltiplos corantes pode ser estabelecido por emprego de múltiplas sondas de DNA com diferentes precursores de corante polimetina.

Reações químicas úteis na biodeteccção empregando química modelada com ácido nucléico

10 i) Reações de Acoplamento

Os grupos de reação podem ser, por exemplo, eletrófilos (por exemplo, acetila, amidas, cloretos ácidos, ésteres, nitrilas, iminas), nucleófilos (por exemplo, aminas, grupos hidroxila, tióis), catalisadores (por exemplo, catalisadores organometálicos) ou cadeias laterais.

ii) Transformações do Grupo Funcional

Química modelada com ácido nucléico pode ser usada para efetuar as transformações do grupo funcional que tanto i) não mascaram ou ii) interconvertem a funcionalidade usada nas reações de acoplamento, iii) interconversões dos grupos

funcionais presentes no grupo reativo.

iii) Condições de Reação

Reações modeladas com ácido nucléico podem ocorrer nas soluções aquosas ou não aquosas (isto é, orgânicas) ou uma mistura de uma ou mais soluções não aquosas e aquosas. Condições de reação preferivelmente são otimizadas para se adequar a natureza dos grupos reativos, oligonucleotídeos usados e as condições de detecção da amostra.

(iv) Classes de Reações Químicas

Reações químicas conhecidas podem ser consideradas para uso nas reações modeladas com ácido nucléico, por exemplo, reações, tais como aquelas listadas no *March's Advanced Organic Chemistry, Organic Reactions, Organic Syntheses*, livros textos de orgânica, jornais, tais como, *Journal of the American Chemical Society, Journal of Organic Chemistry, Tetrahedron, etc.*, e Carruther's *Some Modern Methods of Organic Chemistry*. As reações escolhidas seriam compatíveis com ácidos nucléicos, tais como, DNA ou RNA ou são compatíveis com o ambiente da detecção.

As reações úteis na química modelada com ácido nucléico incluem, por exemplo, reações de substituição, reações de formação de ligação carbono-carbono, reações de eliminação, reações de acilação e reações de adição. Uma lista ilustrativa, porém não exaustiva de reações de substituição nucleófila alifática úteis na presente invenção inclui, por exemplo, reações S_N2 , reações S_N1 , reações S_Ni , redistribuições alílicas, substituição nucleófila, em um carbono trigonal alifático e substituição nucleófila em um carbono vinílico.

Reações de substituição nucleófila alifática específica com nucleófilos de oxigênio incluem, por exemplo, hidrólise de haletos de alquila de gen-dialetos, hidrólise de 1,1,1-trialetos, hidrólise de ésteres alquila ou ácidos inorgânicos, hidrólise de diazo cetonas, hidrólise de éteres acetal e enol, hidrólise de epóxidos, hidrólise de haletos de acila, hidrólise de anidridos, hidrólise de ésteres carboxílicos, hidrólise de amidas, alquilação com haletos de alquila (Reação de Williamson), formação de epóxido, alquilação com ésteres inorgânicos, alquilação com compostos diazo, desidratação de álcoois, transesterificação, alcoólise de epóxidos, alquilação com sais de ônio, hidroxilação de silanos, alcoólise de haletos de acila, alcoólise de anidridos, esterificação de ácidos carboxílicos, alcoólise de ésteres carboxílicos (transesterificação), alcoólise de amidas, alquilação de sais de ácido carboxílico, clivagem de éter com anidrido acético, alquilação de ácidos carboxílicos com compostos diazo, acilação de ácidos carboxílicos com haletos de acila, acilação de ácidos carboxílicos com ácidos carboxílicos, formação de sais de oxônio, preparação de peróxidos e hidroperóxidos, preparação de ésteres inorgânicos (por exemplo, nitritos, nitratos, sulfonatos), preparação de álcoois de aminas e preparação de anidridos orgânicos-inorgânicos misturados.

Reações de substituição nucleófila alifática com nucleófilos de enxofre que tendem a ser nucleófilos melhores que seus análogos de oxigênio, incluem, por exemplo, ataque por SH em um carbono alquila para formar tióis, ataque por S

em um carbono alquila para formar tioésteres, ataque por SH ou SR a um carbono acila, formação de dissulfetos, formação de sais de Bunte, alquilação de sais de ácido sulfínico e formação de tiocianatos de alquila.

5 Reações de substituição nucleófila alifática com nucleófilos de nitrogênio incluem, por exemplo, alquilação de aminas, N-arilação de aminas, substituição de um hidróxi por um grupo amino, transaminação, transamidação, alquilação de aminas com grupos diazo, aminação de epóxidos, aminação
10 de oxetanos, aminação de aziridinas, aminação de alcanos, formação de isocianatos, acilação de aminas por haletos de acila, acilação de aminas por anidridos, acilação de aminas por ácidos carboxílicos, acilação de aminas por ésteres carboxílicos, acilação de aminas por amidas, acilação de aminas
15 por outros derivados de ácido, N-alquilação ou N-arilação de amidas e imidas, N-acilação de amidas e imidas, formação de aziridinas dos epóxidos, formação de compostos nitro, formação de azidas, formação de isocianatos e isotiocianatos e formação de compostos azóxi.

20 As reações de substituição nucleófila alifática com nucleófilos de halogênio incluem, por exemplo, ataque em um carbono alquila, troca de haleto, formação de haletos de alquila de ésteres de ácidos sulfúrico e sulfona, formação de haletos de alquila dos álcoois, formação de haletos de
25 alquila de éteres, formação de haloidrinas de epóxidos, clivagem de ésteres carboxílicos com iodeto de lítio, conversão de diazo cetonas em α -halo cetonas, conversão de aminas em haletos, conversão de aminas terciárias em cianamidas (a re-

ação de von Braun), formação de haletos de acila de ácidos carboxílicos e formação de haletos de acila de derivados de ácido.

Reações de substituição nucleófila alifática usando do hidrogênio como um nucleófilo incluem, por exemplo, redução de haletos de alquila, redução de tosilatos, outros sulfonatos e compostos semelhantes, hidrogenólise do álcool, hidrogenólise de ésteres (reação de Barton-McCombie), hidrogenólise de nitrilas, substituição de alcoxila por hidrogênio, redução dos epóxidos, clivagem redutiva dos ésteres carboxílicos, redução de uma ligação C-N, dessulfurização, redução de haletos de acila, redução de ácidos carboxílicos, ésteres e anidridos em aldeídos, e redução de amidas em aldeídos.

Embora determinados nucleófilos de carbono possam ser muito nucleófilos e/ou básicos para o emprego em determinadas modalidades da invenção, as reações de substituição nucleófila alifática empregando nucleófilos de carbono incluem, por exemplo, acoplamento com silanos, acoplamento de haletos de alquila (a reação de Wurtz), a reação de haletos de alquila e ésteres de sulfonato com reagentes organometálicos do Grupo I (I A) e II (II A), reação de haletos de alquila e ésteres sulfonato com organocupratos, reação de haletos de alquila e ésteres sulfonato com outros reagentes organometálicos, acoplamento alílico e propargílico com um substrato de haleto, acoplamento de reagentes organometálicos com ésteres de ácidos sulfúrico e sulfônico, sulfóxidos e sulfonas, acoplamento envolvendo álcoois, acoplamento de

reagentes organometálicos com ésteres carboxílicos, acoplamento de reagentes organometálicos com compostos contendo uma ligação éster, reação de reagentes organometálicos com epóxidos, reação de organometálicos com aziridina, alquilação em um carbono portando um hidrogênio ativo, alquilação de cetonas, nitrilas e ésteres carboxílicos, alquilação de sais de ácido carboxílico, alquilação em uma posição α para um heteroátomo (alquilação de 1,3-ditianas), alquilação de diidro-1,3-oxazina (a síntese de Mayers dos aldeídos, cetonas, e ácidos carboxílicos), alquilação com trialquilboranos, alquilação em um carbono alquinila, preparação de nitrilas, conversão direta de haletos alquila em aldeídos e cetonas, conversão de haletos de alquila, álcoois, ou alcanos nos ácidos carboxílicos e seus derivados, a conversão de haletos de acila em cetonas com compostos organometálicos, a conversão de anidridos, ésteres carboxílicos ou amidas em cetonas com compostos organometálicos, o acoplamento de haletos de acila, acilação em um carbono portando um hidrogênio ativo, acilação de ésteres carboxílicos por ésteres carboxílicos (a condensação de Claisen e Dieckmann), acilação de cetonas e nitrilas com ésteres carboxílicos, acilação de sais de ácido carboxílico, preparação de cianetos de acila e preparação de diazo cetonas, descarboxilação cetônica.

As reações que envolvem ataque nucleófilo no átomo de enxofre sulfonila podem também ser usadas na presente invenção e incluem, por exemplo, hidrólise de derivados do ácido sulfônico (ataque por OH), formação de ésteres sulfônicos (ataque por OR), formação de sulfonamidas (ataque por

nitrogênio), formação de haletos de sulfonila (ataque por haletos), redução dos cloretos de sulfonila (ataque por hidrogênio) e preparação de sulfonas (ataque por carbono).

Reações de substituição eletrófilas aromáticas podem também empregadas na química modelada com nucleotídeo. As reações de troca de hidrogênio são exemplos de reações de substituição de eletrófilo aromáticas que utilizam hidrogênio como o eletrófilo. As reações de substituição de eletrófilo aromáticas que empregam eletrófilos de nitrogênio incluem, por exemplo, nitração e desidrogenação de nitro, nitrosação de desidrogenação nitrosa, acoplamento de diazônio, introdução direta de grupo diazônio e aminação ou desidrogenação de amino. As reações desse tipo com eletrófilos de enxofre incluem, por exemplo, sulfonação, desidrogenação de sulfa, halossulfonação, desidrogenação de halossulfa, sulfuração e sulfonilação. As reações usando eletrófilos de halogênio incluem, por exemplo, halogenação e desidrogenação de halo. As reações de substituição eletrófilas aromáticas com eletrófilos de carbono incluem, por exemplo, alquilação de Friedel-Crafts, alquilação, desidrogenação de alquila, arilação de Friedel-Crafts (a reação de Scholl), acilação de Friedel-Crafts, formilação com formamidas dissustituídas, formilação com cianeto de zinco e HCl (a reação de Gatterman), formilação com clorofórmio (a reação de Reimer-Tiemann), outras formilações, desidrogenação de formila, carboxilação com haletos de carbonila, carboxilação com dióxido de carbono (a reação de Kolbe-Schmitt), amidação com isocianatos, desidrogenação de N-alquilcarbamoila, hidroxii-

alquilação, desidrogenação de hidroxialquila, ciclodesidra-
tação de aldeídos e cetonas, haloalquilação, desidrogenação
de halo, aminoalquilação, amidoalquilação, dialquilaminoal-
quilação, desidrogenação de dialquilamino, tioalquilação,
5 acilação com nitrilas (a reação de Hoesch), cianação e desi-
drogenação de ciano. As reações usando eletrófilos de oxigê-
nio incluem, por exemplo, hidroxilação e desidrogenação de
hidróxi.

Reações de redistribuição incluem, por exemplo, a
10 redistribuição de Fries, migração de um grupo nitro, migração
de um grupo nitroso (a Redistribuição de Fischer-Hepp), migra-
ção de um grupo arilazo, migração de um halogênio (a Redis-
posição Orton), migração de um grupo alquila, etc. Outra re-
ação em um anel aromático inclui a reversão de uma alquila-
15 ção de Friedel-Crafts, descarboxilação de aldeídos aromáti-
cos, descarboxilação de ácidos aromáticos, a reação de Ja-
cobsen, desoxigenação, dessulfonação, desidrossulfonação,
desalogenação, desidroalogenação e hidrólise dos compostos
organometálicos.

20 As reações de substituição de eletrófilo alifática
são também úteis. As reações empregando S_E1 , S_E2 (frente),
 S_E2 (costas), S_{Ei} , adição-eliminação e mecanismos cíclicos
podem ser usadas na presente invenção. Reações desse tipo
com hidrogênio como o grupo abandonador incluem, por exem-
25 plo, troca de hidrogênio (desidrogenação de deutério, deute-
riação), migração de uma ligação dupla e tautomerização de
ceto-enol. As reações com eletrófilos de halogênio incluem,
por exemplo, halogenação de aldeídos e cetonas, halogenação

de ácidos carboxílicos e haletos de acila e halogenação de sulfóxidos e sulfonas. As reações com eletrófilos de nitrogênio incluem, por exemplo, acoplamento alifático de diazônio, nitrosação em um carbono portando um hidrogênio ativo, formação direta de compostos diazo, conversão de amidas em amidas α -azido, aminação direta em uma posição ativada e inserção de nitrenos. Reações com eletrófilos de enxofre ou selênio incluem, por exemplo, sulfenilação, sulfonação e selenilação de cetonas e ésteres carboxílicos. Reações com eletrófilos de carbono incluem, por exemplo, acilação em um carbono alifático, conversão dos aldeídos em β -ceto ésteres ou cetonas, cianação, desidrogenação de ciano, alquilação de alcanos, a reação de amina de Stork e inserção de carbenos. As reações com eletrófilos de metal incluem, por exemplo, metalação com compostos organometálicos, metalação com metais e bases fortes e conversão de enolatos em éteres enol silila. As reações de substituição eletrófila alifática com metais e grupos de partida incluem, por exemplo, substituição de metais por hidrogênio, reações entre reagentes organometálicos e oxigênio, reações entre reagentes organometálicos e peróxidos, oxidação de trialquilboratos em boratos, conversão de reagentes de Grignard em compostos de enxofre, desmetalção de halo, a conversão de compostos organometálicos em aminas, a conversão de compostos organometálicos em cetonas, aldeídos, ésteres carboxílicos e amidas, desmetalção de ciano, transmetalção com um metal, transmetalção com um haleto de metal, transmetalção com um composto organometálico, redução de haletos de alquila, desalogenação de

metalo, substituição de um halogênio por um metal de um composto organometálico, descarboxilação de ácidos alifáticos, clivagem de alcóxidos, substituição de um grupo carboxila por um grupo acila, clivagem básica de β -ceto ésteres e β -dicetonas, reação de haloforma, clivagem de cetonas não enolizáveis, a reação de Haller-Bauer, clivagem de alcanos, descianação e desidrocianação. Reações de substituição eletrófila em nitrogênio incluem, por exemplo, diazotização, conversão de hidrazinas em azidas, N-nitrosação, desidrogenação de N-nitroso, conversão de aminas em compostos azo, N-halogenação, desidrogenação de N-halo, reações de aminas com monóxido de carbono e reações de aminas com dióxido de carbono.

As reações de substituição nucleófila aromática podem também ser usadas na presente invenção. As reações processadas através do mecanismo S_NAr , o mecanismo S_N1 , o mecanismo benzina, o mecanismo $S_{RN}1$, ou outro mecanismo, por exemplo, podem ser empregadas. As reações de substituição nucleófila aromática com nucleófilos de oxigênio incluem, por exemplo, desalogenação de hidróxi, fusão de alquila de sais sulfonato e substituição de OR ou OAr. As reações com nucleófilos de enxofre incluem, por exemplo, substituição por SH ou SR. As reações usando nucleófilos de nitrogênio incluem, por exemplo, substituição por NH_2 , NHR ou NR_2 e substituição de um grupo hidróxi por um grupo amino. As reações com nucleófilos incluem, por exemplo, os halogênios de introdução. Reações de substituição nucleófilas aromáticas com hidrogênio como o nucleófilo incluem, por exemplo, redu-

ção de ésteres fenóis e fenólicos e éteres e redução de ha-
letos e compostos nitro. As reações com nucleófilos de car-
bono incluem, por exemplo, a reação de Rosenmund-von Braun,
acoplamento de compostos organometálicos com haletos de ari-
5 la, éteres e ésteres carboxílicos, arilação em um carbono
contendo um hidrogênio ativo, conversões de substratos de
arila em ácidos carboxílicos, seus derivados, aldeídos e ce-
tonas e reação de Ullmann. As reações com hidrogênio como o
grupo abandonador incluem, por exemplo, alquilação, arilação
10 e aminação de heterociclos de nitrogênio. Reação com N_2^+ co-
mo o grupo abandonador incluem, por exemplo, desdiazonização
de hidróxi, substituição por grupos contendo enxofre, desdi-
azonização de iodo e a reação de Schiemman. As reações de
redisposição incluem, por exemplo, a redisposição de Rich-
15 ter, a redisposição de Sommelet-Hausser, a redisposição de
hidroxilaminas de arila, e a redisposição de Smiles.

As reações envolvendo radicais livres também podem
ser usadas, embora as reações de radical livre empregadas na
química modelada com nucléico possam ser escolhidas cuidado-
20 samente para evitar modificação ou clivagem do modelo de nu-
cleotídeo. Com aquela limitação, as reações de substituição
de radical livre podem ser usadas na presente invenção. Rea-
ções de substituição de radical livre específicas incluem,
por exemplo, substituição por halogênio, halogenação em um
25 carbono alquila, halogenação alílica, halogenação benzílica,
halogenação de aldeídos, hidroxilação em um carbono alifáti-
co, hidroxilação em um carbono aromático, oxidação dos alde-
ídos em ácidos carboxílicos, formação de éteres cíclicos,

formação de hidroperóxidos, formação de peróxidos, aciloxilação, desidrogenação de acilóxi, clorossulfonação, nitração de alcanos, conversão direta de aldeídos em amida, amidação e aminação em um carbono alquila, acoplamento simples em uma
5 posição suscetível, acoplamento de alcinas, arilação de compostos aromáticos por sais de diazônio, arilação de alcenos ativados por sais de diazônio (a arilação de Meerwein), arilação e alquilação de alcenos por compostos organopaládio (a reação Heck), arilação e alquilação de alcenos por compostos
10 vinilestanho (a reação de Stille), alquilação e arilação de compostos aromáticos por peróxidos, arilação fotoquímica de compostos aromáticos, alquilação, acilação e carboalcoxilação de heterociclos de nitrogênio. Reações específicas nas
quais N_2^+ é o grupo abandonador incluem, por exemplo, substituição do grupo diazônio por hidrogênio, substituição do
15 grupo diazônio por cloro ou bromo, desdiazonização de nitro do grupo diazônio por grupos contendo enxofre, dimerização de arila com sais diazônio, metilação de sais diazônio, vinilação de sais diazônio, arilação de sais diazônio e con-
20 versão de sais diazônio em aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos. As reações de substituição de radical livre com metais como grupos abandonadores incluem, por exemplo, acoplamento de reagentes de Grignard, acoplamento de boranos e acoplamento de outros reagentes organometálicos. A reação
25 com halogênio como o grupo abandonador está incluída. Outras reações de substituição de radical livre com vários grupos abandonadores incluem, por exemplo, dessulfurização com níquel Raney, conversão de sulfetos em compostos organolítio,

dimerização descarboxilativa (a reação de Kolbe), a reação de Hunsdiecker, alilação descarboxilativa e descarbonilação de aldeídos e haletos de acila.

As reações envolvendo adições de ligações múltiplas de carbono-carbono são também usadas na química modelada com nucleotídeo. Qualquer mecanismo pode ser usado na reação de adição incluindo, por exemplo, adição de eletrófilo, adição de eletrófilo, adição de nucleófilo, adição de radical livre e mecanismos cíclicos. As reações envolvendo adições aos sistemas conjugados podem também ser usadas. Adição aos anéis ciclopropano podem também ser utilizadas. Reações específicas incluem, por exemplo, isomerização, adição de haletos de hidrogênio, hidratação de ligações duplas, hidratação de ligações triplas, adição de álcoois, adição de ácidos carboxílicos, adição de H_2S e tióis, adição de amônia e aminas, adição de amidas, adição de ácido hidrazóico, hidrogenação de ligações duplas e triplas, outra redução de ligações duplas e triplas, redução de ligações duplas e triplas de sistemas conjugados, hidrogenação de anéis aromáticos, clivagem redutiva de ciclopropanos, hidroboração, outras hidrometalações, adição de alcanos, adição de alcenos e/ou alcinas aos alcenos e/ou alcinas (por exemplo, reações de ciclização de pi-cátion, adição de hidro-alcenila), reações eno, a reação de Michael, adição de organometálicos às ligações duplas e triplas não conjugadas às carbonilas, a adição de dois grupos alquila a uma alcina, adição de 1,4 dos compostos organometálicos às ligações duplas ativadas, adição de boranos às ligações duplas ativadas, adição de estanho e

hidretos de mercúrio às ligações duplas ativadas, acilação de ligações duplas ativadas e de ligações triplas, adição de álcoois, aminas, ésteres carboxílicos, aldeídos, etc., carbonilação de ligações duplas e triplas, hidrocarboxilação, 5 hidroformilação, adição de aldeídos, adição de HCN, adição de silanos, adição de radical, ciclização de radical, halogenação de ligações duplas e triplas (adição de halogênio, halogênio), halolactonização, halolactamização, adição de ácidos hipoalosos e hipoaletos (adição de halogênio, oxigênio), 10 adição de compostos de enxofre (adição de halogênio, enxofre), adição de halogênio e um grupo amino (adição de halogênio, nitrogênio), adição de NO_x e NO_2X (adição de halogênio, nitrogênio), adição de XN_3 (adição de halogênio, nitrogênio), adição de haletos de alquila (adição de halogênio, carbono), 15 adição de haletos de acila (adição de halogênio, carbono), hidroxilação (adição de oxigênio, oxigênio) (por exemplo, reação de diidroxilação assimétrica com OsO_4), diidroxilação de anéis aromáticos, epoxidação (adição de oxigênio, oxigênio) (por exemplo, epoxidação assimétrica de 20 Sharpless), fotooxidação de dienos (adição de oxigênio, oxigênio), hidroxissulfenilação (adição de oxigênio, enxofre), oxiaminação (adição de oxigênio, nitrogênio), diaminação (adição de nitrogênio, nitrogênio), formação de aziridinas (adição de nitrogênio), aminossulfenilação (adição de nitrogênio, enxofre), 25 acilaciloxilação e acilamidação (adição de oxigênio, carbono ou nitrogênio, carbono), adição de 1,3-dipolar (adição de oxigênio, nitrogênio, carbono), reação de Diels-Alder, reação de heteroátomo Diels-Alder, todas 3 + 2

cicloadições de carbono, dimerização de alcenos e adição de carbenos e carbenóides às ligações duplas e triplas, trimerização e tetramerização de alcinas e outras reações de cicloadição.

- 5 Além das reações envolvendo adições às ligações múltiplas de carbono-carbono, as reações de adição às múltiplas ligações carbono-hetero podem ser usadas na química modelada com nucleotídeo. Reações exemplares incluem, por exemplo, a adição de água aos aldeídos e cetonas (formação de
- 10 hidratos), hidrólise de ligação dupla de carbono-nitrogênio, hidrólise de compostos nitro alifáticos, hidrólise de nitrilas, adição de álcoois e tióis aos aldeídos e cetonas, alquilação redutiva dos álcoois, adição de álcoois aos isocianatos, alcoólise de nitrilas, formação de xantatos, adição
- 15 de H_2S e tióis aos compostos carbonila, formação de produtos de adição de bissulfeto, adição de aminas aos aldeídos e cetonas, adição de amidas aos aldeídos, alquilação redutiva de amônia ou aminas, a reação de Mannich, a adição de aminas aos isocianatos, adição de amônia ou aminas às nitrilas, a-
- 20 dição de aminas ao dissulfeto de carbono e dióxido de carbono, adição de derivado de hidrazina aos compostos carbonila, formação de oximas, conversão de aldeídos em nitrilas, formação de gem-dialetos de aldeídos e cetonas, redução de aldeídos e cetonas nos álcoois, redução da ligação dupla de
- 25 carbono-nitrogênio, redução de nitrilas em aminas, redução de nitrilas em aldeídos, adição de reagentes de Grignard e reagentes organolítio aos aldeídos e cetonas, adição de outros organometálicos aos aldeídos e cetonas, adição de tri-

alquilalilssilanos aos aldeídos e cetonas, adição de alcenos conjugados aos aldeídos (a reação de Baylis-Hillman), a reação de Reformatsky, a conversão de sais de ácido carboxílico nas cetonas com compostos organometálicos, a adição de reagentes de Grignard aos derivados de ácido, a adição de compostos organometálicos ao CO_2 e CS_2 , adição de compostos organometálicos aos compostos $\text{C}=\text{N}$, adição de carbenos e diazoalcanos aos compostos $\text{C}=\text{N}$, adição de reagentes de Grignard às nitrilas e isocianatos, a reação do Aldol, Aldol Mukaiyama e reações correlatas, reações do tipo Aldol entre ésteres carboxílicos ou amidas e aldeídos ou cetonas, a reação de Knoevenagel (por exemplo, a reação Nef, a reação Favorskii), a reação de alquenação de Peterson, a adição de compostos de hidrogênio ativo ao CO_2 e CS_2 , a reação de Perkin, a condensação do éster glicídico Darzens, a reação de Tollen, a reação de Wittig, a alquenação de Tebbe, a alquenação de Petasis, alquenações alternativas, a reação de Thorpe, a reação de Thorpe-Ziegler, adição de silanos, formação de cianoidrinas, adição de HCN a $\text{C}=\text{N}$ e ligações $\text{C}=\text{N}$, a reação de Prins, a condensação de benzoina, adição de radicais aos compostos $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{N}$, a reação de Ritter, acilação de aldeídos e cetonas, adição de aldeídos em aldeídos, adição de isocianatos em isocianatos (formação de carbodiimidas), a conversão de sais de ácido carboxílico em nitrilas, a formação de epóxidos de aldeídos e cetonas, a formação de episulfetos e epissulfonas, a formação de β -lactonas e oxetanos (por exemplo, a reação de Paterno-Büchi), a formação de β -lactamas, etc. As reações envolvendo adição de isocianetos

incluindo a adição de água aos isocianetos, a reação de Passerini, a reação de Ug e a formação de aldiminas metalizadas.

Reações de eliminação, incluindo α , β e γ eliminações, bem como reações de extrusão, podem ser realizadas usando química modelada com nucleotídeo, embora a resistência dos reagentes e condições empregadas devam ser consideradas. As reações de eliminação preferidas incluem reações que são realizadas por mecanismos E1, E2, E1cB ou E2C. Reações exemplares incluem, por exemplo, reações onde o hidrogênio é removido de um lado (por exemplo, desidratação de álcoois, clivagem dos éteres em alcenos, a reação de Chugaev, decomposição do éster, clivagem dos hidróxidos de amônio quaternários, clivagem de sais de amônio quaternários com bases fortes, clivagem de óxidos de amina, pirólise de cetoilídeos, decomposição de tolueno-p-sulfonilidrazonas, clivagem de sulfóxidos, clivagem de selenóxidos, clivagem de sulfonas, desidroalogenação de haletos de alquila, desidroalogenação de haletos de acila, desidroalogenação de haletos de sulfonila, eliminação de boranos, conversão de alcenos em alcinas, descarbonilação de haletos de acila), reações nas quais nem o átomo abandonador é hidrogênio (por exemplo, desoxigenação de dióis vicinais, clivagem de tionocarbonatos cíclicos, conversão de epóxidos em epissulfetos e alcenos, a reação de Ramberg-Bäcklund, conversão de aziridinas em alcenos, desalogenação de dialetos vicinais, desalogenação de haletos α -halo acila e eliminação de um halogênio e um grupo hetero), reações de fragmentação (isto é, reações nas quais

o carbono é o grupo abandonador positivo ou a eletrofuga, tal como, por exemplo, fragmentação de haletos γ -amino e γ -hidróxi, fragmentação de 1,3-dióis, descarboxilação de ácidos carboxílicos β -hidróxi, descarboxilação de β -lactonas, fragmentação de α,β -epóxi hidrazonas, eliminação de CO dos compostos bicíclicos ligados em ponte e eliminação de CO₂ dos compostos bicíclicos ligados em ponte), reações nas quais as ligações C $\equiv$ N ou C=N são formadas (por exemplo, desidrogenação de aldoximas ou compostos semelhantes, conversão de cetoximas em nitrilas, desidratação de amidas não substituídas e conversão de N-alkilformamidas em isocianetos), reações onde as ligações C=O são formadas (por exemplo, pirólise de β -hidróxi alcenos) e reações onde as ligações N=N são formadas (por exemplo, eliminações para fornecer os diazoalcenos). As reações de extrusão incluem, por exemplo, extrusão de N₂ de pirazolinas, extrusão de N₂ dos pirazóis, extrusão de N₂ das triazolinas, extrusão de CO, extrusão de CO₂, extrusão de SO₂, a síntese Story e síntese de alceno por extrusão dobrada.

Redisposições, incluindo, por exemplo, redisposições nucleófilas, redisposições eletrófilas, redisposições prototrópicas e redisposições de radical livre podem também ser realizadas usando química modelada com nucleotídeo. Ambas as redisposições 1,2 e redisposições não 1,2 podem ser realizadas. Reações exemplares incluem, por exemplo, migrações de carbono para carbono de R, H e Ar (por exemplo, reações de Wagner-Meerwein e correlata, a redisposição de Pina-col, reações de expansão de anel, reações de contração de

anel, redistribuições catalisadas por ácido de aldeídos e cetonas, a redistribuição de dienona-fenol, a redistribuição de Favorskii, a síntese de Arndt-Eistert, a homologação dos aldeídos e homologação das cetonas), migrações carbono para carbono de outros grupos (por exemplo, migrações de halogênio, hidroxila, amino, etc.; migração de boro e a redistribuição de Neber), migrações carbono para nitrogênio de R e Ar (por exemplo, redistribuição de Hofmann, a redistribuição de Curtius, a redistribuição de Lossen, a reação de Schmidt, a redistribuição de Beckman, a redistribuição de Stieglitz e as redistribuições correlata), migrações de carbono para oxigênio de R e Ar (por exemplo, a redistribuição de Baeyer-Villiger e redistribuição de hidroperóxidos), migração de nitrogênio para carbono, oxigênio para carbono e enxofre para carbono (por exemplo, redistribuição de Stevens e a redistribuição de Wittig), migrações de boro para carbono (por exemplo, conversão de boranos em álcoois (primários ou de outra forma), conversão de boranos em aldeídos, conversão de boranos em ácidos carboxílicos, conversão de boranos vinílicos em alcenos, formação de alcinas de boranos e acetilidas), redistribuições eletrocíclicas (por exemplo, de ciclobutenos e 1,3-ciclohexadienos ou conversão de estilbenos em fenantrenos), redistribuições sigmatrópicas (por exemplo, (1J) migrações sigmatrópicas de hidrogênio, (1J) migrações sigmatrópicas de carbono, conversão de vinilciclopropanos em ciclopentenos, a redistribuição Cope, a redistribuição Claisen, a síntese de indol Fischer, (2,3) redistribuições sigmatrópicas e a redistribuição benzidina), outras redistribuições cíclicas (por exem-

5 plo, metátese de alcenos, o di- π -metano e redistribuições correlatas, e as reações de Hofmann-Löffler e correlatas), e redistribuições não cíclicas (por exemplo, deslocamentos de hidreto, a redistribuição de Chapman, a redistribuição de Wallach e redistribuições diotrópicas).

Reações oxidativas e redutivas pode também ser realizadas usando química modelada com nucleotídeo. Reações exemplares podem envolver, por exemplo, transferência de elétrons direta, transferência de hidreto, transferência de átomo de hidrogênio, formação de intermediários de éster, mecanismos de deslocamento ou mecanismos de eliminação de adição. Oxidações exemplares incluem, por exemplo, eliminações de hidrogênio (por exemplo, aromatização de anéis de seis elementos, desidrogenações rendendo ligações duplas de carbono-carbono, oxidação ou desidrogenação de álcoois em aldeídos e cetonas, oxidação de fenóis e aminas aromáticas em quinonas, clivagem oxidativa de cetonas, clivagem oxidativa de aldeídos, clivagem oxidativa de álcoois, ozonólise, clivagem oxidativa de ligações duplas e anéis aromáticos, oxidação de cadeias laterais aromáticas, descarboxilação oxidativa e bisdescarboxilação), reações envolvendo substituição de hidrogênio por oxigênio (por exemplo, oxidação de metileno em carbonila, oxidação de metileno em OH, CO₂R ou OR, oxidação de arilmetanos, oxidação de éteres em ésteres carboxílicos e reações correlatas, oxidação de hidrocarbonetos aromáticos em quinonas, oxidação de aminas ou compostos nitro em aldeídos, cetonas e dialetos, oxidação de álcoois primários em ácidos carboxílicos ou ésteres carboxílicos,

oxidação de alcenos em aldeídos ou cetonas, oxidação de amina-
 nas em compostos nitrosos e hidroxilaminas, oxidação de ami-
 nas primária, oximas, azidas, isocianatos ou compostos ni-
 trosos, em compostos nitro, oxidação de tióis e outros com-
 5 postos de enxofre em ácidos sulfônicos), reações onde o oxi-
 gênio é adicionado ao substrato (por exemplo, oxidação de
 alcinas em α -dicetonas, oxidação de aminas terciárias em ó-
 xidos de amina, oxidação de tioésteres em sulfóxidos e sul-
 fonas, e oxidação de ácidos carboxílicos em ácidos peróxi) e
 10 reações de acoplamento oxidativo (por exemplo, acoplamento
 envolvendo carbanoínas, dimerização de éteres silil enol de
 enolatos de lítio e oxidação de tióis em dissulfetos).

Reações redutivas exemplares incluem, por exemplo,
 reações envolvendo substituição de oxigênio por hidrogênio
 15 (por exemplo, redução de carbonila no metileno em aldeídos e
 cetonas, redução de ácidos carboxílicos em álcoois, redução
 de amidas em aminas, redução de ésteres carboxílicos em éte-
 res, redução de anidridos cíclicos em lactonas e derivados
 ácidos em álcoois, redução de ésteres carboxílicos em álco-
 20 ois, redução de ácidos carboxílicos e ésteres em alcanos,
 redução completa de epóxidos, redução de compostos nitro em
 aminas, redução de compostos nitro em hidroxilaminas, redu-
 ção de compostos nitrosos e hidroxilaminas em aminas, redu-
 ção de oximas em aminas primárias ou aziridinas, redução de
 25 azidas em aminas primárias, redução de compostos nitrogênio
 e redução de haletos sulfonila e ácidos sulfônicos em ti-
 óis), remoção de oxigênio do substrato (por exemplo, redução
 de óxidos de amina e compostos azóxi, redução de sulfóxidos

e sulfonas, redução de hidroperóxidos e peróxidos e redução de compostos nitro alifáticos em oximas ou nitrilas), reduções que incluem clivagem (por exemplo, desalquilação de a-
5 minas e amidas, redução de azo, azóxi, e compostos hidrazo em aminas, e redução de dissulfetos em tióis), reações de acoplamento redutivas (por exemplo, redução bimolecular de aldeídos e cetonas em 1,2-dióis, redução bimolecular de aldeídos ou cetonas em alcenos, condensação do éster aciloína, redução de compostos nitro em azóxi e redução de compostos
10 nitro em azo) e reduções onde um substrato orgânico é oxidado e reduzido (por exemplo, a reação de Cannizzaro, a reação de Tishchenko, a redistribuição de Pummerer e a reação de Willgerodt).

Vários aspectos gerais da química modelada com ácido
15 nucléico são discutidos em detalhes a seguir. Informações adicionais podem ser encontradas nas Publicações de Pedido de Patente US números 2004/0180412 A1 (USSN 10/643.752) de Liu e outros e 2003/0113738 A1 (USSN 10/101.030) de Liu e outros.

20 Existem várias vantagens em relação aos métodos de criação de sinal englobados pela invenção revelada aqui. Por exemplo, em razão as frações reativas anexadas à sondas inicialmente não possuem propriedades detectáveis até um evento de hibridização (ou no caso de alvos de ácido não nu-
25 cléico, um evento de hibridização seguindo um evento de ligação) e reação subsequente acontecerem, os ensaios empregando sondas e química de acordo com a invenção possuem pouco ou nenhuma base e portanto razão de sinal alto para ruí-

do. Isso por sua vez provê vantagens práticas de ensaios possuindo alta sensibilidade e uma ampla faixa dinâmica. Assim, quantidades menores de analisados podem ser detectadas com o potencial para proceder assim, usando instrumentação de detecção que é mais simples e de custo mais abaixo. Muitos tipos diferentes de geração de sinal (geração fluoresceínica, liberação de fluorescência, liberação de cofator, etc.) podem ser suportados através desse mecanismo.

Uma vantagem prática importante e adicional é que os ensaios devem ser construídos de modo a serem homogêneos. Ensaios homogêneos requerem pouca ou nenhuma preparação da amostra, ou não requerem tipicamente que os analisados sejam imobilizados sobre um suporte de sólido com a finalidade de remoção do reagente, redução de base, troca de solvente ou tampão e/ou detecção como é tipicamente necessário para ensaios heterogêneos. Uma vez que a formação de um DNA de fita dupla de T_m alta é uma reação homogênea, a colocação de precursores de fluoroforo nos oligonucleotídeos suporta um ensaio de fase totalmente homogênea para ligação ao alvo. A formação da estrutura de fita dupla propriamente é proxima-mente instantânea.

Outro benefício prático da invenção é que as sondas e reagentes podem ser adicionados diretamente à amostra, e a solução resultante pode ser monitorada para a geração de sinal sem qualquer manipulação adicional, tal como, anexação ao suporte sólido, lavagem, etc. Como resultado, essa invenção provê ensaios muito simples que podem ser realizados fora dos laboratórios, sem a necessidade de equipamento caro e

trabalhoso.

Uma vez que a obtenção de DNA de fita dupla de T_m alta normalmente requer o uso de dois ligantes separados, localizados como distâncias compatíveis com os braços espaçadores nos oligonucleotídeos, a especificidade muito alta de ligação pode ser obtida.

Adicionalmente, o uso de dois ligantes que propriamente se tornam associados através de DNAs recombinados, resulta em um efeito de afinidade melhorada (avidez). Portanto, dois ligantes fracos exibiriam uma avidez de ligação melhorada. Dois ligantes, ambos podendo ser fracos, porém possuindo especificidade diferente (ligação aos sítios diferentes) exibiriam avidez e especificidade melhoradas. Isso é altamente vantajoso para detecção de baixo nível quando apenas ligantes fracos estão disponíveis.

Os exemplos que se seguem contêm informações adicionais importantes, exemplificação e diretrizes que podem ser adaptadas à prática dessa invenção em suas várias modalidades e equivalentes da mesma. A prática da invenção será mais completamente entendida desses exemplos que se seguem, que são apresentados aqui apenas com fins ilustrativos, e não devem ser tidos como limitando a invenção de que forma for.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Criação de fluorescência por redução de Azidocouramina induzida por hibridização

Cinco oligonucleotídeos foram preparados usando química de fosforamidita padrão (Glen Research, Sterling VA,

USA). Oligonucleotídeos portando grupos 5'-amino (Oligo2 e Oligo6) foram preparados usando Modificador 5 de 5'-Amino e Oligonucleotídeos portando grupos 3'-amino (Oligo4 e Oligo5) foram preparados usando Modificador C7CPG de 3'-Amino (Glen Research, Sterling VA, USA).

Oligo1 5'-GTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGA-3' (SEQ. ID. N°19)

Oligo2 5'-H2N-AGCTCCAACTACCAC-3' (SEQ. ID. N°20)

Oligo4 5'-GTGGTAGTTGGAGCT-NH2-3' (SEQ. ID. N°21)

Oligo5 5'-TCTTGCCTACGCCAC-NH2-3' (SEQ. ID. N°22)

Oligo6 5'-H2N-AGATCCCACTAGCAC-3' (SEQ. ID. N°23)

Oligo1, Oligo4 e Oligo5 foram removidos do suporte de síntese e purificados por HPLC de fase inversa. Os grupos amino de Oligo2 e Oligo6 foram convertidos, enquanto ligados a resina aos seus derivados de trifenil fosfina e esses foram purificados e isolados (Sakurai e outros J. Amer. Chem. Soc. (2005) Vol. 127, pp1660-1667) para fornecer os Oligo2-TPP e Oligo-6TPP, respectivamente.

O grupo amino portando Oligo4 e Oligo5 foi convertido em seus derivados de azidocoumarina (Oligo4-AzC e Oligo5-AzC, respectivamente) por reação de cada oligo com o éster N-hidroxisuccinimida do ácido 7-azido-4-metilcoumarin-3-acético (Thevenin e outros, Eur. J. Biochem (1992) Vol. 206, pp-471-477). A reação foi realizada por adição de 1 µL de

ácido trifluoracético a 5 μ L de N-metilmorfolina para preparação de um tampão ao qual foram adicionados 10 μ L de água contendo 6,6 nmol de Oligo 4 e Oligo 5, seguido por adição de 30 μ L de uma solução 0,16 M do éster NHS de coumarina em dimetilformamida. Cada reação foi deixada prosseguir por 2 horas a temperatura ambiente, pelo que, 50 μ L de acetato trietilamônio 0,1 M aquoso foram adicionados. As misturas foram aplicadas às colunas de desalinização NAP-5 (Amersham Biosciences, Piscataway NJ USA) eluíram de acordo com as instruções do fabricante, o eluato foi purificado por RP-HPLC para prover Oligo4-AzC e Oligo5-AzC, em rendimentos de 77% e 70%, respectivamente. A identidade do produto foi confirmada por espectrometria de massa Maldi -ToF.

Para demonstrar a criação específica de hibridização da fluorescência, várias combinações de oligonucleotídeos complementares e não complementares portando frações de azido-coumarina e trifenil fosfina foram deixadas reagir a temperatura ambiente em um tampão compreendido de 30% de formamida aquosa, 50 mM de NaCl e 10 mM de fosfato de sódio, pH 7,2. O progresso da reação foi monitorado com o tempo usando um conjunto de fluorímetro Victor Multilabel (EG&G Wallach, Turku Finlnd) para excitar a amostra a 360 nm e monitorar a emissão de luz a 455 nm.

A Figura 14 mostra que, quando Oligo4-AzC e Oligo2-TPP são combinados para concentrações finais de 200 nM e 400 nM respectivamente, um rápido aumento na fluorescência é observado. Nessa Figura, 004 indica Oligo4-AzC, 002 indica Oligo2-TPP e 006 indica Oligo6-TPP. A fluorescência não o-

corre quando o Oligo6-TPP é substituído por Oligo2-TPP. Considerando-se que o Oligo2-TPP é perfeitamente complementar em sua capacidade de emparelhamento de base com relação ao Oligo4-AzC, o Oligo6-TPP não é, uma vez que contém três nucleotídeos não combinados. Os resultados sustentam a conclusão de que a criação da fluorescência se deve a capacidade do Oligo2-TPP de hibridizar em Oligo4-AzC facilitando assim a reação entre TPP e as frações de azidocoumarina no híbrido resultante. A falta de sinal no caso da reação de Oligo6-TPP com Oligo4-AzC é consistente com a incapacidade desses dois oligonucleotídeos de formarem um duplexo, pelo que a reação não é facilitada. As reações de controle contendo cada um oligonucleotídeos simples foram realizadas para normalizar quaisquer efeitos não específicos.

Resultados dos experimentos adicionais envolvendo complexos ternários são mostrados na Figura 15. Nesses experimentos, Oligo1 é testado quanto a sua capacidade de colocar juntos, por hibridização, dois oligonucleotídeos perfeitamente complementares (Oligo5-AzC e Oligo-2TPP) versus sua capacidade de colocar juntos um oligonucleotídeo perfeitamente complementar (Oligo5-AzC) e um oligonucleotídeo perfeitamente complementar (Oligo6-TPP). Oligo1 e Oligo5-AzC estavam em concentração final de 200 nM, considerando-se que Oligo2-TPP e Oligo6-TPP foram empregados em concentração final de 400 nM. Na Figura 15, 001 indica Oligo1, 002 indica Oligo2-TPP, 005 indica Oligo5-AzC e 006 indica Oligo6-TPP. Os resultados mostram que a fluorescência é gerada apenas quando a combinação de oligonucleotídeos completamente com-

plementares está presente (Oligo1, Oligo5-AzC e Oligo2-TPP).

Exemplo 2 - Marcação do Gene

A marcação do gene é um método de detecção de seqüências com base no desenvolvimento de sinal em múltiplos
5 sítios dentro de um alvo. Os múltiplos sítios tipicamente repousam dentro de uma seqüência gênica que se deseja mostrar a presença, ausência ou quantidade. Dentro de uma seqüência relativamente longa, por exemplo, uma seqüência de 5.000 bases, pode-se alvejar seqüências menores, tipicamente
10 de 40-50 bases, que são únicas àquela seqüência. Essas são alvejadas por pares de sondas de oligonucleotídeo, cada uma tipicamente com 10-20 bases de comprimento. Se as sondas medirem cerca de 12 bases de comprimento, cerca de 400 pares de sondas podem "marcar" uma seqüência de 5.000 bases de
15 comprimento. Cada um desses pares de sonda é um par reativo (através da química modelada com ácido nucléico, conforme descrito na Figura 1) e produz um fluoroforo de precursores de pré-fluoroforo. A fluorescência total gerada é a soma da geração de todos 400 fluoroforos. Para detectar, por exemplo,
20 plo, uma seqüência gênica única de 5.000 bases de comprimento em uma amostra de DNA genômico de milho, é necessária simplesmente a preparação de uma amostra de DNA do milho e sua adição uma mistura de 400 sondas de detecção de oligonucleotídeo em resistência iônica, temperatura e concentração
25 de formamida apropriadas. Espera-se que a fluorescência total gerada seja proporcional à quantidade dessa seqüência gênica no DNA do milho. Os níveis de detecção calculados com base na sensibilidade conhecida dos instrumentos está dentro

da faixa calculada para o rendimento de fluorescência esperado da técnica de marcação de gene com base na química modelada com ácido nucléico.

Exemplo de Projeto de Ensaio

- 5 Uma aplicação exemplar da invenção é detectar uma cópia de um gene transgênico em uma planta transformada geneticamente, tal como, milho. O gene alvo pode ser, por exemplo, resistente a um herbicida. O gene poderia estar presente em uma cópia simples ou múltipla cópias por genoma.
- 10 Uma aplicação típica é determinar se uma batelada específica do milho continha esse gene ou não, e quantificar o número médio de cópias de genes por genoma.

- Um exemplo de um ensaio para esse gene, de acordo com a presente invenção, primeiro envolve o isolamento de
- 15 cerca de 100 µg de DNA de milho total por homogeneização do milho em um misturador. O DNA do milho pode ser isolado empregando qualquer um dos vários kits para extração e purificação do DNA da planta. O DNA é cisalhado a um tamanho médio pequeno, por exemplo, enviando o mesmo através de uma agulha
- 20 hiperdérmica para tornar fácil a desnaturação em fitas simples. O DNA então é aquecido brevemente a 100°C e rapidamente resfriado para tornar o mesmo em fita simples. Uma mistura de reação é então adicionada, contendo 400 partes de sondas de oligonucleotídeo, cada uma específica para uma se-
- 25 quência de DNA no gene alvo, e cada par contendo os dois pré-fluoroforos reativos com DPC. Quando da incubação, tipicamente em uma temperatura brandamente elevada (37°C) a fluorescência gerada é medida em um leitor de microplaca fluo-

rescente. A fluorescência gerada é calibrada usando amostras de referência de DNA do milho com quantidades conhecidas do gene alvo. A quantidade esperada de fluoróforo gerado nesse exemplo é de cerca de 30 fentomols, que está bem dentro dos limites de detecção dos leitores de microplaca disponíveis comercialmente.

Exemplo 3. Hibridização do Oligonucleotídeo, Concentração e Temperaturas de Fusão

Um sistema modelo foi preparado incluindo vinte e dois mer-oligonucleotídeos com uma região complementar de dez bases e braços espaçadores em fita simples de dez bases, adicionalmente ligados a um braço espaçador de seis carbonos. Esses oligos foram sintetizados ambos com e sem uma 5'-biotina (com um braço espaçador de 6 carbonos). Conforme mostrado abaixo, a região complementar é sublinhada. Um terceiro oligo era idêntico ao oligo de fita (-), porém com 4 bases não combinadas (em itálico) em relação à fita (+).

Oligo 26 (+)fita 5' CTTGGGCCCAGATATCGT (SEQ. ID. N°24)

Oligo 27 (-)fita 3' GTCTATAGCATCGACATC (SEQ. ID. N°25)

Oligo 28 (-)não combinação 3' TACTATAGTGTCGACATC (SEQ. ID. N°26)

As curvas de fusão do par de oligonucleotídeos de 10 pares de base (oligo 26+oligo 27) foram examinadas por medição da fluorescência de do corante SYBR ligando ao DNA de fita dupla em um Bio-Rad iCycler (Lipsky, e outros, Clinical Chemistry 47[4], 635-44. 2001). As curvas de ligação

são apresentadas como o primeiro derivado da inclinação da curva de fusão, tal que, um valor máximo representa um ponto de inflexão na curva (uma T_m , ou em uma população mista de sítios em fita dupla, uma T_m "local"). As curvas de ligação
5 podem ser obtidas até pelo menos 70°C, como a avidina retém atividade de ligação da biotina até essa temperatura e além dela.

Para verificar a dependência desse par específico de oligonucleotídeos quando da concentração, as curvas de
10 fusão foram geradas para o par de oligonucleotídeos que variou na faixa de 500 a 20 nM (Figura 16). (Vide, por exemplo, Lipsky, e outros, Clinical Chemistry 47[4], 635-44. 2001). A T_m observada caiu em uma faixa de cerca de 10°C para cada redução de dez vezes na concentração (onde RFU indica as unidades de fluorescência relativas) do par de oligonucleotídeo, semelhante à previsão no gráfico da Figura 16. As curvas de fusão foram essencialmente idênticas para pares de oligonucleotídeo biotinilados e não biotinilados. Os quatro pares não combinados de base não mostraram essencialmen-
15 te nenhuma estrutura de fita dupla.
20

De modo a testar se a ligação das fitas (+) e (-) a uma proteína alvo causaria um aumento na T_m , a versão biotinilada desses oligonucleotídeos foi incubada na presença da avidina. A avidina contém 4 sítios de ligação equivalentes, que são espaçados relativamente próximos e se ligam à
25 biotina muito apertadamente ($K_a \sim 10^{-15}$ M) e não cooperativamente.

Apresentados com concentrações molares iguais de

oligonucleotídeos #26 e #27 na forma biotinilada, poderia ser esperado que cerca da metade dos sítios de ligação de biotina fossem ocupados por pares complementares de oligonucleotídeos, e cerca da metade com o mesmo oligonucleotídeo (pares não complementares). A previsão é que sejam observadas duas máximas de curva de fusão na presença da avidina: Uma máxima seria o resultado de quaisquer pares de oligonucleotídeos que fossem tanto não ligados a avidina (livres na solução) ou que tivessem apenas um parceiro dos dois ligado a avidina, o que não exibiria um efeito de proximidade quando na T_m . Uma segunda máxima de T_m significativamente maior representaria um par de oligos biotinilados ambos ligados a avidina, que exibiriam um efeito de proximidade.

Tal experimento foi conduzido conforme mostrado na Figura 17. Os oligonucleotídeos foram adicionados a uma solução na presença ou ausência de uma avidina mantida a 60°C, uma assim denominada partida quente. Em uma "partida quente", os oligonucleotídeos se unem aos sítios de ligação de biotina a uma temperatura bem acima de sua T_m na solução, assegurando que eles sejam de fita simples. A solução foi então diminuída para 10°C e uma análise de curva de fusão foi realizada ascendendo a 70°C. Conforme mostrado na Figura 17, as curvas de fusão do par oligo não biotinilado na presença ou ausência de avidina mostraram uma T_m de 30-32°C (onde RFU indica unidades de fluorescência relativa). Na presença da avidina, contudo, duas máximas de T_m bem separadas foram geradas com valores de T_m de 33°C e 52°C. A máxima de temperatura elevada (T_m elevada a quase 20°C) foi obser-

vada apenas na presença de dois oligonucleotídeos biotinilados complementares, na presença de avidina. A diferença na T_m +/- biotina tendeu a ser maior em concentrações com teor de sal inferior (Figura 18) e ligeiramente maior na presença de cloreto de magnésio 10 mM (Figura 19) (onde RFU indica unidades de fluorescência relativa). A razão molar ótima dos oligonucleotídeos biotinilados para avidina foi verificada como sendo de cerca de 3,5:1 (com concentração total de oligos + avidina = 0,7 μ M) consistente com a avidina possuindo quatro sítios de ligação equivalentes (Figura 20) (RFU indica unidades de fluorescência relativa). Isso é importante porque substantia que o requisito de que os oligonucleotídeos se ligam à mesma molécula de avidina para o efeito T_m ocorrer. A substituição de um oligo de fita (-) 3' biotinilado por um oligonucleotídeo de fita 5' biotinilado mostrou pouca diferença nos valores de T_m (Figura 21) (RFU indica unidades de fluorescência relativa) com resultados anteriores onde ambos oligonucleotídeos eram 5' biotinilados.

Os resultados seriam essencialmente idênticos se o experimento fosse conduzido por adição de quantidades equimolares de ambos oligonucleotídeos a temperatura ambiente, elevando para 60°C e então obtendo as curvas de fusão. Nesse método (bem como no método de partida quente) curvas de fusão apropriadas podem ser geradas por adição de um excesso molar de cada oligo em relação à avidina, caso desejado. (Grandes excessos de pares de oligos aumentam o tamanho da máxima T_m baixa, contudo, conforme previsto). Isso não foi prejudicial na formação de DNA híbrido de T_m alta, uma vez

que os pares dos oligos competiam igualmente para sítios de ligação de biotina, à medida que eles eram adicionados em conjunto em quantidades molares iguais. Se os oligos fossem adicionados de uma vez, seria importante adicionar uma razão molar de cerca de 2:1 do primeiro oligo para avidina seguido por uma razão de 2:1 do segundo oligo. Com adição seqüencial, a adição de uma quantidade molar em excesso de cada oligo em relação à avidina ocupa todos os sítios de ligação da avidina com o primeiro oligo e impede a ocupação dos sítios adjacentes com o segundo oligo complementar e exibe o efeito de T_m elevada. Essas observações são consistentes com o mecanismo sendo de ligação de pares adjacentes de oligos complementares aos dois sítios de ligação de biotina adjacentes, de modo a obter híbridos exibindo máximas de T_m elevadas.

Os experimentos foram também conduzidos com um oligonucleotídeo auto complementar de 10 bases que era composto totalmente de A e T. (Oligo 31:5'-biotina-braço espaçador-TTTTTTTTTTTTAAATTAAA) (SEQ. ID. NO. 27). Uma vez que esse oligonucleotídeo era homogêneo na composição de base e composto totalmente de AT, ele fundiu a uma T_m inferior ao sistema modelo descrito acima e produziu uma curva pouco acentuada. Na presença de avidina, sua T_m foi aumentada de 30,5°C para 61,5°C (Figura 22) (onde RFU indica unidades de fluorescência relativa). Uma vez que esse oligonucleotídeo era auto complementar, todos os eventos de ligação levaram as fitas complementares, ao invés de apenas metade dos eventos. Assim, apenas uma máxima simples de T_m aumentada foi observada.

Esses experimentos foram repetidos usando anticorpo anti-biotina como um alvo ao invés da avidina. Anticorpo anti-biotina contém dois sítios de ligação de biotina localizados próximo às extremidades da porção Fab do anticorpo, porém os sítios de ligação são muito mais afastados que os sítios de ligação da biotina na avidina.

Exemplo 4. Detecção dos Alvos de Proteína - Aptâmeros como Ligantes Alvo

Aqui, um sistema exemplar foi projetado para utilizar azidocoumarina modelada com ácido nucleico (AzC)-química de trifenilfosfina (TPP) para detectar um alvo de proteína mediante ligação e recombinação de aptâmero de duas sondas de DNA complementares.

Materiais

PDGF-BB e PDGF-AA humanos foram combinados de Sistemas R&D (220-BB e 200-AA respectivamente). Anticorpo monoclonal de subunidade P DGF-B anti-humano foi obtido da R&D Systems (MAB2201). Os tampões incluíram tampão Tris/Mg, a 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 - 10 mM MgCl₂. Os oligonucleotídeos usados foram como se segue:

Sequências de Oligonucleotídeos Empregadas nesse Exemplo

Oligo

núme-

5' - 3' -

ro/SE Sequência (5' a 3')

Modif Modif Descrição

Q.ID.

núme-

ro

201	<u>CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATG</u> <u>ATCCTGC</u>				DPC-aptâmero
(28)	CCCCCCCCCATATTTAAGC	TPP	nen- huma	sonda	
202	GCTTAAATATCCCCCCCCCCCC <u>CAGGCTACG</u> <u>GCACGTA</u>				DPC-aptâmero
(29)	<u>GAGCATCACCATGATCCTG</u>	ne- nhuma	AZC	sonda	
203	GTGGGAATGGTGCCCCCCCCCCCC <u>CAGGCTA</u> <u>CGGCAC</u>				DPC-aptâmero
(30)	<u>GTAGAGCATCACCTGATCCTG</u>	ne- nhuma	AZC	sonda-não binada	com-
204					
(31)	GTGGTAGTTGGAGTCGTGGCGTAGGCAAG A	ne- nhuma	ne- nhuma	alvo	
205					
(32)	GTGGTAGTTGGAGTCACACGTGGCGTAGG CAAGA	ne- nhuma	ne- nhuma	alvo	
206	GTGGTAGTTGGAGCTCACACCACACGTGG CGTAGG				
(33)	CAAGA	ne- nhuma	ne- nhuma	alvo	
207					
(34)		ne- nhuma	ne- nhuma	alvo	

208				
(35)	ne- nhuma	ne- nhuma	alvo	
209				
(36)	ne- nhuma	ne- nhuma	alvo fragmentado	k-ras
210				
(37)	ne- nhuma	ne- nhuma	voltado fora	para
211				
(38)	ne- nhuma	TPP	sonda TPP	
212				
(39)	TPP	ne- nhuma	sonda TPP	
213				
(40)	TPP	ne- nhuma	TPP não combi- nado	
214				
(41)	ne- nhuma	AZC	Sonda AZC	
215				
(42)	ne- nhuma	ne- nhuma	aptâmero	

Métodos

Condições de Reação DPC. Exceto conforme observado, cada reação de 100 microlitros continha um volume total de 100 μ l, tampão 1 x Tris/Mg, 40 picomols de TPP e sondas

de reação de AzC, 40 picomols de oligonucleotídeo alvo ou de proteína alvo e tipicamente 25-30% v/v de formamida. As amostras foram incubadas a 25°C em um espectrofotômetro Wallac Victor 1420 e o aumento na fluorescência foi monitorado com excitação a 355 nm e emissão a 460 nm.

Resultados: Detecção de PDGF-BB por Aptâmero-Sondas PDC

Conforme ilustrado na Figura 23, uma sequência de aptâmero direcionada contra fator de crescimento derivado de subunidades de plaqueta (PDGF)B foi selecionada (Fang, e outros, Chem. BioChem. 4, 829-34. 2003). A mesma pertence a uma família de aptâmeros com forte afinidade com a unidade PDGF B ($\sim 10^{-9}$ M) e afinidade reduzida de cerca de 10 vezes para subunidade PDGF (Green, e outros, Biochemistry 35, 14413-24. 1996). As sequências da sonda foram sintetizadas, cada uma contendo uma sequência de 10-mer DNA, uma sequência espaçadora C₁₀, e a mesma sequência 35-mer aptâmero. (Oligos #201, #202). Cada sequência continha um grupo 5'-TPP ou 3'-AZC com o mesmo aptâmero ligado 3' ou 5', respectivamente. Uma segunda sonda AzC, oligo #203, era a mesma que a oligo #202, exceto que esta sequência recombinante era inteiramente não combinada com TPP oligo (#201).

Conforme mostrado na Figura 24, na presença de formamida a 30% (volume), a reação das sondas TPP e AzC propriamente foi inteiramente dependente da presença de PDGF-BB e sequências de DNA complementares nas sondas. A reação falhou na presença de cada sonda.

A dependência de DNA da reação foi criticamente

dependente da temperatura de fusão do DNA em relação à temperatura de ensaio. Na presença de formamida a 0% (com a $T_m > T_{\text{ensaio}}$ calculada e observada, a reação aconteceu na presença ou ausência da proteína alvo PDGF-BB (Figura 25A). De fato, sob essas condições, a adição de PDGF-BB não aumentou, porém reduziu a razão de reação em cerca de 50%. Na formamida a 10%, PDGF-BB foi menos inibidora (Figura 25B). Na formamida a 20% (Figura 25A), a situação foi completamente invertida - a razão de reação era agora fraca, exceto na presença de PDGF-BB. Na formamida a 30% (Figura 26B), a reação foi completamente dependente da presença de PDGF-BB. Na formamida a 40%, a reação era agora lenta com qualquer conjunto de reagentes (Figura 27). Em todos os casos, as sondas não combinadas produziram pouca ou nenhuma reação.

Experimentos de fusão de DNA com as seqüências complementares, monitorados com SYBR Green haviam indicado uma T_m da seqüência de cerca de 30°C no tampão Tris/Mg na ausência de formamida e cerca de 7°C menor a cada 10% de aumento na formamida. A T_m na concentração de formamida ótima para o ensaio de detecção, 30%, foi de 10°C.

Na formamida a 0%, os oligonucleotídeos podem formar pelo menos um duplexo parcial, mesmo na ausência de PDGF-BB (T_m ligeiramente superior a T_{ensaio}). A dependência do DNA alvo das reações em formamida a 20% e 30% é explicada pelo ensaio sendo conduzido a uma temperatura superior a T_m na ausência da proteína alvo. Nenhuma reação ocorre a menos que a T_m do complexo seja aumentada por ligação das duas sondas ao PDGF-BB alvo. Em formamida a 40%, a reação não o-

corre com qualquer conjunto de reações. A explicação provável é que tanto a T_m tenha sido reduzida a tão pouco que a ligação ao PDGF-BB não pudesse aumentar a mesma acima da T_{ensaio} , ou que a formamida havia inibido a ligação de PDGF-BB aos aptâmeros. Uma situação mais complexa é a inibição observada da razão de reação quando da adição de PDGF-BB na ausência da formamida. Uma vez que a metade dos duplexos formados por PDGF-BB não são produtivos (50% serão homoduplexos) a redução na razão é provavelmente devida a ligação de PDGF-BB impedindo esses homoduplexos de diassociação e então reassociação na solução com pares complementares para formar heteroduplexos. Essa situação não ocorreria usando pares de sondas especificamente direcionadas contra sítios de ligação diferentes em um alvo heterodimérico.

15 A sensibilidade do ensaio (Figura 28) foi calculada por medição das razões de reação geradas de uma série de diluição de concentrações de PDGF-BB. O nível de detecção mínimo no instrumento Wallac foi estimado em 0,8 picomols em um ensaio de 100 microlitros de volume, com base no valor calculado de três vezes o desvio padrão do ruído de fundo do ensaio.

25 A sensibilidade do ensaio foi também determinada usando PDGF-AA como o alvo. Espera-se que o monômero aptâmero tenha uma afinidade para PDGF-AA cerca de dez vezes mais fraca que PDGF-BB. Contudo, esse ensaio envolve a formação de um complexo de dois aptâmero-dímeros para cada tipo de PDGF, espera-se que a avidéz da ligação do dímero seja mais forte que a afinidade do monômero, e sua afinidade seria

substancialmente mais forte (K_i inferior) que as concentrações testadas dos PDGFs alvo (para baixo, para cerca de 1 nanomolar). Conforme mostrado na Figura 29, as razões de reação das sondas DPC de aptâmero para PDGF-AA em concentrações baixas ou altas (0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40 pmol de PDGF-AA) não eram substancialmente diferentes das razões de reação com PDGF-BB. Isso é consistente com o modelo de uma ligação de par de aptâmero como um dímero e exibindo avidéz aumentada.

10 *Razões de Sondas TPP para AzC.* Para confirmar o modelo do mecanismo de reação (Figura 4, a razão ótima de sondas TPP para AzC seria esperada como sendo de 1:1), a Figura 30 representa um experimento onde a quantidade total de duas sondas foi mantida constante, em 800 nMols sondas/reação, enquanto a razão das duas sondas variou. A taxa produzindo a razão de reação mais alta foi de aproximadamente 1:1, consistente com o mecanismo esperado.

Assim, nesse sistema modelo, a fluorescência não foi gerada a menos que os aptâmeros ligados e seqüências complementares nas duas sondas recombinaassem propriamente.

Exemplo 5. Arquitetura Codificada Zip para Química Modelada com Ácido Nucléico com Base na Biodetecção com Ligantes de Aptâmero

25 A Figura 10 ilustra em mais detalhes uma arquitetura de código zip exemplar. O par TPP continha, primeiro, um PDGF-aptâmero na extremidade 5', um espaçador à base de C18 polietileno-glicol e uma 18-mer seqüência de código zip. A seqüência repórter de TPP continha uma seqüência de código

anti-zip complementar em seu término 3', um espaçador C18 PEG, e uma sequência repórter de dez pares de base terminando em um grupo 5' TPP. O par de oligonucleotídeos compreendendo a sonda de detecção AzC continha um aptâmero 3' ligado
 5 através de um espaçador C18 PEG para um código zip separado e um oligonucleotídeo de detecção ligado a um código anti-zip 5', um espaçador C18 PEG, e um oligonucleotídeo repórter (complementar ao oligonucleotídeo TPP) terminando em um grupo 3' AzC.

10 A reação, em uma formamida a 35% a 22°C, era dependente da presença de ambos os oligonucleotídeos repórteres, ambos os oligonucleotídeos de aptâmero e o alvo, PDGF-BB (Figura 31). A 22°C na ausência de formamida, a reação
 prosseguiu independentemente da presença de PDGF. Isso é
 15 consistente com o comportamento da arquitetura de "uma peça" descrita acima, e reflete que o mecanismo de geração fluoresceínica em formamida a 35% depende da estabilidade térmica aumentada do duplexo da sequência repórter na formamida, quando da adição de PDGF. Na ausência de formamida a 22°C, o
 20 duplexo de oligonucleotídeo repórter é estável ambos na presença e ausência de PDGF.

A confirmação da exatidão do modelo foi obtida com experimentos variando a razão de TPP e aptâmero oligos AzC (Figura 32). Esses experimentos indicaram que a razão
 25 ótima do aptâmero oligos era a razão esperada 1:1 (isto é, TPP oligo a 50% com uma concentração total de PDGF e aptâmero oligos de 0,4 μ M). A razão ótima de oligonucleotídeos repórter total para aptâmero oligos total foi de 1:1. Nenhuma

reação dependente de PDGF ocorreu na ausência completa dos oligonucleotídeos repórter ou aptâmero. Em concentrações de oligonucleotídeos repórter superiores à estequiométrica, o sinal independente de PDGF aumentou (base), porém o sinal dependente de PDGF permaneceu constante. Ambas observações são consistenes com o modelo de que o complexo é montado na razão de 1:1:1 para cada um dos aptâmero oligos, cada um dos oligos repórter e PDGF.

Esses experimentos indicam que o complexo pode ser auto montado na solução, tal que, cada código zip e seu código anti-zip recombina um no outro com interferência mínima com a sequência de aptâmero ou sequências repórter.

Também foram realizados experimentos para determinar se a ordem de adição e assim o conjunto das sondas aptâmero e repórter, foi de qualquer importância. Razões de reação ligeiramente mais lentas foram obtidas se os oligonucleotídeos de aptâmero fossem primeiro incubados com PDGF antes da adição dos oligonucleotídeos repórter, em comparação com a adição de todas as sondas em conjunto como uma mistura. Razões de reação pouco maiores foram obtidas se cada par de oligonucleotídeos aptâmero e oligonucleotídeos repórter fossem primeiro incubados e deixados montar propriamente antes dos dois conjuntos serem misturados e incubados com PDGF. A razão para isso pode ser que exista algum impedimento estérico para código zip e anti-zip recombina com a sonda de aptâmero, se a sonda de aptâmero já estiver ligada ao alvo.

Como um controle, foi comparado um conjunto de TPP de uma peça e sondas AzC, o qual continha apenas as sequên-

cias de código zip e seqüências diferentes de código zip e anti-zip (Figura 33). As razões de reação desse sistema de uma peça foram semelhantes aquelas do sistema de duas peças, exceto que a razão melhorou devido a adição de PDGF que foi ligeiramente melhor que aquela do sistema de duas peças.

A seqüência das sondas AzC e TPP contendo aptâmero também variou sistematicamente para determinar qualquer contenção no projeto. TPP contendo aptâmero e AzC oligos foram sintetizadas, ambas possuindo as mesmas seqüências conforme descrito na Figura 10, porém com as seguintes alterações: (1) omissão do espaçador C18-PEG. (Oligos 119 & 122); (2) substituição do espaçador C18-PEG pela seqüência C₁₀. (Oligos 120 & 123); (3) substituição do espaçador C18-PEG com a seqüência C₂₀. (Oligos 121 & 124); (4) Omissão do espaçador C18-PEG e omissão de 3 bases 3' na região de código zip (redução para 15 bases de comprimento). (Oligos 127 & 129); e (5) omissão do espaçador C18-PEG e omissão de 6 bases 3' na região de código zip (redução para 12 bases de comprimento). (Oligos 128 & 130).

Os oligonucleotídeos usados nesse exemplo incluíam:

Oligo número	seqüência (5'-3')	modificação
--------------	-------------------	-------------

(SEQ. ID N° 43)

106 GGACTCGAGCACCAATAC-X-TATAAATTCG-AZC X = C18 PEG; AZC = 3' - AzC.

(SEQ. ID N° 44)

109 CGAATTTATA-X-CTGACCATCGATGGCAGC X = C18 PEG,

5'-TPP

(SEQ. ID N° 45)

112 CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG-X-
GCTGCCATCGATGGTCAG X= C18 PEG

(SEQ. ID N° 46)

113 GTATTGGTGCTCGAGTCC-X-
CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG X= C18 PEG

(SEQ. ID N° 47)

119 GTATTGGTGCTCGAGTCCCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG

(SEQ. ID N° 48)

120
GTATTGGTGCTCGAGTCCCCCCCCCCCCCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATC
CTG

(SEQ. ID N° 49)

121
GTATTGGTGCTCGAGTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCAT
GATCCTG

(SEQ. ID N° 50)

122 CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGGCTGCCATCGATGGTCAG

(SEQ. ID N° 51)

123
CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGCCCCCCCCCGCTGCCATCGATGGT
CAG

(SEQ. ID N° 52)

124
CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGCCCCCCCCCCCCCCCCCGCTGCCATCGA
TGGTCAG

(SEQ. ID N° 53)

127 CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGGCTGCCATCGATGGT

(SEQ. ID N° 54)

128 CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGGCTGCCATCGAT

(SEQ. ID N° 55)

129 TTGGTGCTCGAGTCCCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG

(SEQ. ID N° 56)

130 GTGCTCGAGTCCCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG

Nenhuma dessas alterações resultou em uma diferença significativa no desenvolvimento do sistema. Experimentos 4) e 5) também resultaram em uma estrutura de fita simples de 3 e 6 bases (não recombinadas para código zip) imediatamente a montante do espaçador C18 nos oligonucleotídeos repórter.

Os resultados desses experimentos indicam que o sistema de detecção de PDGF à base de aptâmero pode ser montado separando a ligação e as funções de DPC em dois oligonucleotídeos separados. Através da seleção das seqüências de código zip apropriado, o formato de detecção descrito na Figura 9 foi montado propriamente em pares de oligonucleotídeos recombinados que funcionarão similarmente em relação aos oligonucleotídeos em uma peça simples. Os oligonucleotídeos repórter e aptâmero podem ser montados separadamente para introdução do alvo, ou todas as espécies podem ser adicionadas em conjunto quase que em qualquer ordem. Esse processo pode ser estendido ao conjunto de solução-fase de mais de um par de oligos de detecção recombinados, por exemplo, para detectar múltiplos alvos. A detecção de alvos múltiplos pode requerer o uso de diferentes oligonucleotídeos repórter

que geram sinais separadamente discerníveis (por exemplo, diferentes comprimentos de onda de luz emitida).

Esses resultados indicam que uma abordagem de repórter codificada zip pode ser efetivamente projetada, por exemplo, usando oligômeros contendo aptâmero.

Embora os resultados com o sistema aptâmero indiquem que um complexo estável entre seqüências de ligação e repórter possa ser formado, simplesmente por recombinação de regiões de código zip e anti-zip, deve ser observado que existem tecnologias para ligar covalente e irreversivelmente os dois oligonucleotídeos, com uma alta probabilidade de reter atividade dos grupos de reação repórter. Por exemplo, os oligonucleotídeos podem ser incubados em pares (um oligonucleotídeo ligante e um oligonucleotídeo reativo para química modelada com ácido nucléico) a uma temperatura na qual os códigos zip e códigos anti-zip são em sua maior parte de fita dupla, porém o restante das seqüências são de fita dupla. Adição de um reticulador fotoativável, de intercalação, tal como, Trioxaleno, seguido por irradiação de UV, pode reticular irreversivelmente as duas fitas. De modo semelhante, a irradiação de UV pode introduzir dímeros de timidina entre fitas separadas de seqüências recombinadas. Alternativamente, uma seqüência pode ser introduzida complementarmente a um DNA de alvo curto (junção), adjacente 3' e 5', que pode então ser ligado com DNA ligase. O oligonucleotídeo em junção pode alternativamente ser composto de RNA, e removido após ligação com RNase H, que hidrolisa RNA recombinado para DNA. Isso pode resultar na conversão dos dois oligonucleotí-

deos em uma peça simples de DNA de filamento simples. Esses métodos podem conduzir à produção de custo-benefício de reagentes de oligonucleotídeo nos kits de detecção contra alvos específicos.

5 Referências relevantes para esse exemplo incluem Capaldi, e outros, *Nucleic Acid Res.* 28 [7], e21. 2000; Castiglioni, e outros, *Appl. and Exper. Microbio.* 2004, 7161-72. 2004; Fang, e outros, *Chem. BioChem.* 4, 829-34. 2003; Gerry, e outros, *J. Mol. Biol.* 292, 251-62. 1999.

10 Exemplo 6. Arquitetura Codificada Zip para Biode-
tecção com Base em PDC - Ligantes de Anticorpo

Em outra concretização, as seqüências de aptâmero são substituídas com ligantes não DNA, tais como, anticorpos. Para PDGF e outras proteínas alvo, as seqüências de aptâmero são substituídas com grupos quimicamente ativos, tais como, aldeídos, e reagidos com seqüências de ligante não DNA, tais como, anticorpos ou receptores para as proteínas alvo (Figura 34). O projeto ótimo para os oligonucleotídeos de ligante e repórter podem ser obtidos com considerações no tamanho e geometria do ligante e tamanho e geometria dos sítios de ligação do alvo. Braços espaçadores mais longos ou mais curtos, por exemplo, podem ser usados para transpor a distância entre os sítios de ligação no alvo e evitar impedimento estérico devido aos ligantes propriamente.

25 Com referência à Figura 34, o oligonucleotídeo codificado zip projetado para hibridizar na molécula repórter TPP foi sintetizado contendo um grupo 5'-amino. O oligonucleotídeo codificado zip projetado para hibridizar na molé-

cula repórter AzC continha um grupo 3'-amino. A síntese dos conjugados entre os oligonucleotídeos e anticorpo anti-PDGF-BB foi realizada pela SoluLink Biosciences (San Diego, CA).

A tecnologia SoluLink para conjugação do anticorpo e oligonucleotídeos requer primeiro a modificação dos grupos amino primários de anticorpo com succinimidil 2-hidrazinonicotinato acetona hidrazona) para incorporar uma acetona hidrozona no anticorpo. As amins primárias dos oligonucleotídeos são ativadas separadamente com succinimidil 4-formilbenzoato. As duas moléculas ativadas são misturadas na razão desejada (tipicamente 6:1) e reagidas em um pH brandamente ácido para formar uma ligação de hidrozona estável. Os detalhes dessa química são disponíveis no www.SoluLink.com. Dois conjugados foram preparados: um contendo o código zip para recombinar o oligonucleotídeo repórter contendo AzC, e o outro contendo o código zip para recombinar no oligonucleotídeo repórter contendo TPP.

Os conjugados de oligonucleotídeo-anticorpo recebidos da SoluLink foram adicionalmente purificados por cromatografia de gel em uma coluna 1,6 x 60 cm de Superdex S-200 (Amersham Biosciences) em tampão PBS (0,01 M de fosfato de potássio, pH 7,4 - 0,138M de cloreto de sódio). A máxima de anticorpo, eluindo a cerca de 0,6 vezes o volume da coluna, foi coletada e uma máxima de eluição adicional posterior de oligonucleotídeo não conjugado de contaminação foi descartada. O conjugado de anticorpo foi concentrado por diálise inversa com um Slide-A-Lyzer de corte de peso molecular de 30 K Pierce usando Solução de Concentração Pierce. O teor

da proteína foi determinado usando o kit de reagente Bio-Rad Micro BCA e o teor de oligonucleotídeo determinado usando corante de ligante de DNA SYBR Gold (Molecular Probes (Eugene, OR)). Os conjugados foram ambos determinados para conter
 5 uma média de cerca de 3 oligonucleotídeos por molécula de proteína.

PDGF-BB humano recombinante (220-BB) e anti-PGF-BB monoclonal de camundongo foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, MN).

10 As seqüências usadas nesse estudo incluíram (onde AzC indica azidocoumarina e TPP indica trifenilfosfina):

Nome	Seqüência (5'-3')
------	-------------------

Repórter TPP	TPP-(modificador amino C6)-CGAATTTATA-C18PEG-TCAGCATCGTACCTCAGC
--------------	---

(SEQ. ID N°: 9) (SEQ. ID N°: 58)

Repórter AzC	GGACTCGAGCACCAATAC-C18 PEG-TATAAATTCG-(modificador amino C7)-AzC
--------------	--

(SEQ. ID N°: 14) (SEQ. ID N°: 10)

Código zip AzC	TTGGTGCTCGAGTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-(modificador amino C7)
----------------	---

(SEQ. ID N°: 59)

Código zip TPP	(modificador amino C6)-CCCCCCCCCCCCCCCCCGCTGAGGTACGATGCTGA
----------------	--

(SEQ. ID N°: 60)

Além disso, o modificador 5' amino C6 foi obtido da Glen Research (da Glen Research phosphoramidite 10-1906). O modificador 3'-amino C7 foi obtido da Glen Research (da

Glen Research CPG 20-2957). O C18 PEG foi obtido da Glen Research (da Glen Research phosphoramidite 10-1918).

Conjunto de Conjugados de Anticorpo-Oligo com Oligonucleotídeos Repórter

5 Os dois conjugados anticorpo-oligo com seus repórteres foram primeiro montados separadamente em um volume de 10 μ l. Cada conjunto continha 0,5 μ M (5 picomols) de conjugado de anticorpo-oligonucleotídeo e 0,15 μ M de (15 pmols) de oligonucleotídeo repórter complementar em 0,05 M de 10 Tris/HCl pH 8, 0,01M cloreto de magnésio. Cada um foi incubado por pelo menos 15 minutos a 4°C antes do uso na detecção da mistura de reação.

Detecção da Reação de Conjugados anti-PDGF-BB DPC/Repórteres com PDGF-BB

15 Para conduzir a reação de detecção, cada reação pode conter em um volume de 50 μ L: 10 μ L de cada conjunto de conjugado, preparados conforme descrito acima, e quantidades variáveis de PDGF-BB, em um tampão de 0,05 M Tris/HCl pH 8, 0,01M cloreto de magnésio-40% volume/volume de formamida. Os 20 conjuntos estão presentes nessa mistura de reação a 0,2 μ M. As amostras são incubadas nos poços de uma microplaca de 96 poços preta em um Luminômetro Wallac Victor a 25°C. A fluorescência pode ser seguida versus tempo com excitação a 355 nm e emissão a 460 nm.

25 As reações podem tipicamente ser realizadas a 25°C, monitorando a geração de fluorescência no comprimento de onda ótimo do produto de reação, 7-amino coumarina.

Exemplo 7. Desenvolvimento e Significado Clínico

de um Ensaio de Proteína de Fusão BCR-ABL

Uma plataforma de ensaio modular pode ser desenvolvida provendo aplicações amplas para a detecção específica *in vitro* e *in vivo* de proteínas nos meios biológicos complexos. Essa plataforma utiliza química modelada com ácido nucléico (ou Química Programada de DNA, "DPC") que permite o acoplamento de reconhecimento da proteína *in situ* para a geração de sinal de novo.

Espera-se que essa abordagem tenha um impacto significativo para diagnóstico precoce e monitoramento terapêutico dos pacientes com câncer. Para determinadas aplicações, essa abordagem é vantajosa pela provisão de um formato de ensaio homogêneo simples, para facilitar o desenvolvimento de ensaios de ponto de cuidado. Para outras aplicações, essa abordagem pode ser usada com citometria de fluxo, por exemplo, ou adaptada para imageamento *in vivo*.

Um ensaio à base de citometria de fluxo pode ser estabelecido para que a proteína de fusão BCR-ABL identifique subpopulação(ões) de células responsáveis por doença residual mínima (MRD) em pacientes com CML. A heterogeneidade dentro do mesmo tumor provou ser um desafio maior à farmacoterapia de sucesso. Mesmo naqueles casos, tais como, leucemia mieloide crônica CML (Goldman, e outros, N Engl J Med 349 1451-1464 (2003); Sawyers, N Engl J Med 340 1330-1340 (1999)), onde a causa foi elucidada no nível molecular (Rowley, Nature 243 290-293 (1973); Lugo, e outros, Science 247 1079-1082 (1990)) e alvejamento específico (Druker, e outros, Nat Med, 2, 561-566 (1996); Deininger, e outros, J.

Blood, 105, 2640-2653 (2005)) resultaram em razões altas de remissão (Sawyers, e outros, Blood, 99, 3530-3539 (2002); Kantarjian, e outros, N Engl J Med 346, 645-652, (2002); Talpaz, e outros, Blood 99, 1928-1937 (2002)), diversos mecanismos fundamentando resistência primária e secundária e persistência da doença (Deininger, e outros Blood, 105, 2640- 2653 (2005); Bhatia, e outros Blood 101, 4701-4707 (2003); Elrick, e outros Blood 105 1862-1866 (2005)) até agora, apresentaram altas razões de cura. Embora as abordagens à base de PCR sejam muito sensíveis para detecção de MRD (Cortes, e outros, Blood 102, 83-86 (2003)), elas sozinhas não fornecem informações com relação à base molecular para MRD em um paciente individual. O ensaio à base de proteína descrito aqui pode permitir uma abordagem à base de célula específica, usando citometria de fluxo de múltiplos parâmetros (Irish, e outros, Cell 118, 217-228 (2004)) para definir as células que causam MRD (por exemplo, estado das bombas de influxo e efluxo (Grossman, e outros, Blood 106, 1133-1134 (2005); Thomas, e outros, Blood 104 3739-3745 (2004); Mountford, e outros, Blood 104 Abstract 716 (ASH) (2004)), receptores de integrina (Bueno-da-Silva, e outros, Cell Death Differ. 10, 592-598 (2003)) e de citocina (Chu, e outros, Blood 103 3167-3174 (2004)), moduladores de apoptose (Aichberger, e outros, Blood 106 Abstract 1987 (ASH) (2005); Aichberger, e outros, Blood 105, 33003-3311 (2005)), e ativação de via de sinalização (Jamieson e outros, N Engl J Med 351, 657-667 (2004)) em pacientes individuais. A posse dessa informação permite decisões clínicas mais conscientes e aju-

da a definir um foco para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Por analogia, os resultados desse objetivo específico, focado na CML, podem ser estendidos para identificar as subpopulações de células responsáveis por MRD em pacientes com ALL e AML. A modulação inerente dessa abordagem de ensaio de proteína facilitaria o desenvolvimento de ensaios à base de citometria de fluxo para proteínas de fusão E2A-PBX1, TEL/AML1, ML/AF4 e PML/RARa, AML-ETO associadas a ALL e AML, respectivamente.

Dentro do objetivo de estender as medições em escala para incluírem a medição das proteínas em seu contexto funcionalmente relevante e/ou (pato)fisiológico, essa abordagem é projetada para permitir a detecção específica de homodímeros, heterodímeros e interações proteína-proteína indicativas do conjunto de complexos de transdução de sinal, todos na presença de suas contrapartes monoméricas. Assim, essa abordagem pode não ter valor para identificação e validação de novos biomarcadores *bonafide*, que são mecanicamente ligados à patofisiologia de tipos específicos de câncer. Isso pode aperfeiçoar o projeto de experimento clínico permitindo um melhor tratamento para o paciente individual.

Os princípios fundamentais da química modelada com ácido nucléico e sua especificidade inerente podem ser usados nos ambientes biológicos complexos para biodetecção de acordo com condições onde a integridade estrutural e funcional dos analisados alvos sejam preservadas. A anexação dos grupos reativos a um elemento de reconhecimento de analisado (por exemplo, anticorpos, aptâmeros ou moléculas pequenas)

direcionam a reação química para ocorrer especificamente naqueles sítios contendo o analisado de interesse. Onde os reagentes são não fluorescentes e o produto de reação é fluorescente, então um sinal de fundo não específico ("zero") muito baixo pode ser obtido, permitindo a medição dos analisados nos ambientes complexos, sem comprometer a especificidade ou sensibilidade.

Conforme representado na Figura 4, um par de sondas é usado. Cada elemento do par se liga independentemente à proteína através de seu respectivo elemento de reconhecimento não mutuamente exclusivo. Cada elemento do par contém uma região de desoxioligonucleotídeo complementar, projetada para recombinar uma com a outra apenas em concentrações muito maiores que aquelas usadas no ensaio. Contudo, quando ambas as sondas são ligadas à proteína simultaneamente, suas concentrações efetivas são aumentadas através da proximidade, permitindo a hibridização de DNA entre os elementos do par. Esse evento de hibridização dependente de proteína permite que os reagentes não fluorescentes anexados reajam para sofrer uma reação modelada com ácido nucléico que gera o produto fluorescente. Dessa forma, o reconhecimento do analisado envolvendo dois eventos de ligação independentes dispara a geração do sinal de novo. A hibridização dependente de proteína entre os elementos do par de sonda pode servir como um ponto de avidez no complexo ternário resultante. A especificidade inerente e afinidade de cada elemento de reconhecimento (por exemplo, anticorpo, aptâmero ou ligante de peso molecular baixo) sozinho é melhorada nesse formato de

ensaio de reconhecimento duplo, aperfeiçoando sua especificidade e sensibilidade efetivas.

Um dos estudos iniciais empregou a forma BB homodimérica de PDGF como o analisado e empregou aptâmeros como elementos de reconhecimento de proteína conjugados para de-
5 soxoligonucleotídeos complementares. Esses, por sua vez, são anexados aos reagentes não fluorescentes de trifenilfosfina (ligados em 5') e 7-azido-coumarina (ligados em 3'). A geração da fluorescência, estritamente dependente da presença de
10 PDGF, foi observada (Figura 28). Os espectros de excitação e emissão foram indicativos de 7-amino-coumarina, o produto esperado. O aumento das concentrações de PDGF sob condições onde os conjugados de aptâmeros não eram limitantes, forneceu aumentos proporcionais ao sinal de fluorescência. O si-
15 nal máximo ocorreu quando a razão de conjugados complementares foi de 1:1. Adicionalmente, a geração da fluorescência dependeu estritamente do emparelhamento de base correto Watson-Crick dos conjugados complementares. A introdução de de-
soxoligonucleotídeos não combinados de base simples não con-
20 duziu à geração de fluorescência dependente de PDGF.

Esses dados são consistentes com o modelo que se segue: a porção de aptâmero dos conjugados se liga ao PDGF induzindo, através da proximidade, altas molaridades efetivas. Isso conduz à formação de um duplexo de DNA entre o par
25 complementar de conjugados que, por sua vez, sustenta a formação do produto de reação modelado com ácido nucléico. Isso permite que os precursores não fluorescentes reajam entre si para gerar um sinal que é diretamente acoplado para reconhe-

cimento do analisado. A geração de fluorescência pode ser bloqueada usando aptâmeros não conjugados que competem com os conjugados de aptâmero-desoxoligonucleotídeos para ligação de PDF. Um excesso molar de 25 vezes o aptâmero não conjugado foi necessário para competir com o aptâmero conjugado de modo a reduzir a geração de sinal em 50%.

Ensaio para Identificar Populações de Células Positivas para BCR-ABL em Pacientes com CML com Doença Residual Mínima

Um ensaio de proteína aplicando a presente invenção que caracteriza reconhecimento duplo de um analisado desencadeando a geração do sinal de novo pode ser usado para a medição de BCR-ABL no contexto de uma célula. Utilizando a citometria de fluxo de múltiplos parâmetros, essa abordagem pode identificar a população de células responsáveis pela MRD. Essa seria a etapa crítica para definir o perfil da célula causando MRD levando a uma determinação com base no mecanismo do melhor curso do tratamento para pacientes individuais.

Preparação de Conjugados DPC Anti-BCR e Anti-ABL Desoxioligonucleotídeo-Anticorpo

Um protocolo geral foi desenvolvido para conjugar tanto 5' quanto 3' desoxioligonucleotídeos aldeídicos para anticorpos usando o reagente hetero-bifuncional succinimidil 6-hidrazinonicotinato acetona hidrazona (SANH) com base nos protocolos publicados, por exemplo, (www.solulink.com). Os conjugados foram purificados usando cromatografia de exclusão de gel seguido por cromatografia de troca de ânion e o

grau de conjugação de oligonucleótido por molécula de anticorpo foi quantificado usando melhoramento de fluorescência SYRB Gold. Essa abordagem pode se aplicada para disposição comercial de anticorpos anti-BCR e anti-ABL monoclonais.

5 Uma instalação de anticorpo monoclonal de alta qualidade pode também ajudar a gerar novos anticorpos para BCR e ABL. As capacidades de modelagem molecular podem ser aplicadas para prever epítomos que: 1) estão presentes em dois subtipos de proteína de fusão clinicamente relevante, 10 B3/A2 e B2/A2, 2) topologicamente orientados para permitir que pares de anticorpos se liguem favoravelmente, 3) provavelmente sendo insensíveis à dimerização da proteína de fusão, ligação de Gleevec, mutações conferindo resistência conhecida e talvez ligação de substrato.

15 Deteccão de Proteína de Fusão BCR-ABL Purificada

Os pares de sonda gerados podem ser usados para desenvolver um ensaio para proteína de fusão BCR-ABL em uma maneira análoga ao ensaio PDGF descrito acima. Um elemento do par de sonda terá anticorpo anti-BCR como seu elemento de 20 reconhecimento, enquanto o elemento complementar utilizará anti-ABL como seu elemento de reconhecimento. A proteína de fusão BCR-ABL (B3/B2) foi expressa a partir da construção de expressão de baculovirus P210(bcr-abl) gerada por junção de DNAs bcr e abl com um fragmento de junção bcr-abl de K562 25 DNAC e colocando o mesmo em pDEST8. BCR e ABL de comprimento pleno podem ser usados para garantir que o ensaio seja específico para a proteína de fusão. O limite de detecção é determinado usando a proteína de fusão B3/A2 purificada e pro-

teína de fusão derivada de lisados de célula positivos B2/A2 e B3/A2. A extensão da interface de lisados de célula negativos BCR-ABL pode também ser determinada.

Reações para Geração de Fluoroforo

5 A química repórter descrita aqui pode ser aplicada para geração de fluoroforo. Preferivelmente, a química renderá fluoroforos com excitação máxima > 500 nm, emissão máxima > 600 nm com rendimentos quantitativos superiores a 0,5 de precursores á base de DPC relativamente estáveis não possuindo fluorescência própria apreciável.

Ensaio de Citometria de Fluxo para Identificar Populações de Célula Positivas BCR-ABL de Pacientes com CML

Preparar conjugados desoxioligonucleotídeo anti-BCR e anti-ABC que possuem corantes fluorescentes padrão usados para citometria de fluxo ligada no lugar do composto reativo modelado com ácido nucléico (reagentes). Esses podem ser usados como controles positivos para otimizar as condições de fixação e permeabilização para garantir o acesso intracelular dos pares de sonda de detecção. Linhagens de células derivadas de paciente com mielóide humana podem ser usadas. As condições iniciais podem ter como base protocolos implementados por estudo de ativação das vias de transdução de sinal intracelular (Jamieson, e outros, N Engl J Med 351, 657-667 (2004)) usando anticorpos cinase específicos de estado de ativação (Irish, e outros, Cell 118, 217-228 (2004)). Com base nesses resultados, um par de sonda otimizado para citometria de fluxo é designado e preparado.

Um ensaio de citometria de fluxo com base em pro-

tótipo DPC pode ser desenvolvido. Inicialmente, várias linhagens de células derivadas de paciente B3/A2 e B2/A2 positivas que incluíam células K562 podem ser usadas. A especificidade e sensibilidade podem ser determinadas por diluição dessas células positivas com células negativas BCR-ABL. O objetivo é detectar 10-30 células BCR-ABL positivas na presença de 1 milhão de células BCR-ABL negativas. Uma vez que esse objetivo é encontrado, o ensaio pode ser adicionalmente validado com amostras de pacientes com CML e voluntários saudáveis. A especificidade e a sensibilidade desse ensaio podem ser comparadas aos métodos validados que utilizam hibridização fluoresceínica *in situ* (FISH) (Schoch, e outros, Leukemia 1653-59 (2002)) e reação em cadeia da DNA/RNA polimerase (PCR) (Elrick, e outros, Blood 105 1862-1866 (2005)). Portanto, uma análise de classificação de células ativadas por fluorescência (FACS) nas amostras dos vários pacientes pode ser realizada.

Existe uma evidência considerável sugerindo que alguns dos mecanismos são responsáveis pela resistência primária e secundária a Gleevec e persistência da doença em pacientes com CML. Além das mutações no domínio de base de BCR-ABL, bombas de influxo e efluxo, receptores de integrina e citocina, moduladores de apoptose e vias de sinalização envolvendo MAPcinase e beta-catenina estão implicados. Tendo esses resultados como guia, seria possível estabelecer perfis de células que causam a MRD em pacientes individuais por emprego do ensaio de proteína BCR-ABL proposto em um formato de citometria de fluxo de múltiplos parâmetros. Essa aborda-

gem seria análoga ao perfil celular de redes de fosfo-
 proteína potencializada em células cancerígenas. As "bioas-
 sinaturas" dessas células causando MRD poderiam então ser
 comparadas entre pacientes individuais antes e em resposta
 5 aos vários regimes terapêuticos. Em vista da diversidade de
 mecanismos em potencial antecipando curas, o perfil celular
 provaria não ter valor para assegurar que cada paciente in-
 dividual receba a farmacoterapia mais apropriada. Irish, e
 outros, Cell 118, 217-228 (2004); Crossman, e outros, Blood
 10 106, 1 133-1 134 (2005); Thomas, e outros, Blood 104 3739-
 3745 (2004); Mountford, e outros, Blood 104 Abstract 716
 (ASH) (2004); Bueno-da-Silva, e outros, Cell Death Differ.
 10, 592-598 (2003); Chu, e outros, Blood 103 3167-3174
 (2004); Aichberger, e outros, Blood 106 Abstract 1987 (ASH)
 15 (2005); Aichberger, e outros, Blood 105, 33003-331 1 (2005);
 Jamieson, e outros, N Engl J Med 351, 657-667 (2004).

Aspectos variados e gerais da química modelada com
 ácido nucléico são discutidos a seguir. Informações adicio-
 nais podem ser encontradas nas Publicações de Pedido de Pa-
 20 tente US números 2004/0180412 A1 (USSN 10/643.752) por Liu e
 outros e 2003/01 13738 A1 (USSN 10/101 .030) por Liu e ou-
 tros.

Exemplo 8. Geração de Vários Corantes Modelados com Ácido Nucléico

25 Três oligonucleotídeos foram preparados usando
 química de fosforamidita padrão e purificados por C18 coluna
 de fase inversa (Glen Research, Sterling VA, USA). Oligonu-
 cleotídeos, portanto grupo 5'-amino (EDC2 e EDC3) foram pre-

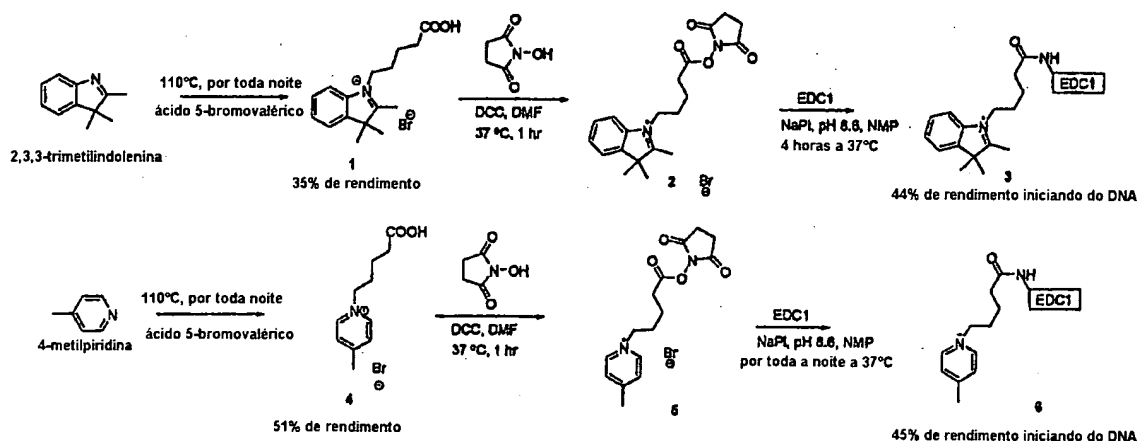
parados usando grupos 5'-Amino-Modificador 5 e Oligonucleotídeos portando 3'-amino)EDC1) foram preparados usando 3'-Amino-Modificador C7 GPC (Glen Research, Sterling VA, USA). A concentração de DNA e DNA conjugado heterocíclico foi determinada pela absorvência de UV a 260 nm. A contribuição da absorvência de UV a 260 nm da fração heterocíclica no DNA conjugado heterocíclico era insignificante e não foi considerada.

Oligo número	Seqüência (5'-3')	SEQ. ID.
EDC1	GTGGT AGTTG GAGCT-NH ₂	(SEQ. ID. N° 61)
EDC2	H2N-AGCTCCAACCTACCAC	(SEQ. ID. N° 62)
EDC3	H2N-AGATCCCACTAGCAC	(SEQ. ID. N° 63)

10 Síntese dos Precursores Heterocíclicos Conjugados com DNA para Condensação de Aldol

O Esquema 14 fornece dois exemplos de síntese de precursores heterocíclicos conjugados com DNA para condensação de aldol.

15 Esquema 14. Síntese dos Precursores Heterocíclicos Conjugados com DNA 3 e 6



Síntese do composto 1: Ao ácido 5-bromovalérico

(2,435 g, 13,45 mmols) foi adicionada 2,3,3-trimetilindolenina (2,141 g, 13,45 mmols). A mistura de reação foi aquecida com agitação vigorosa a 110°C por toda noite. O óleo aglutinante vermelho escuro obtido foi transferido para um extrator Gregar e extraído com EtOAc por toda noite. Um sólido vermelho claro foi obtido. O sólido foi redissolvido em 30 mL de MeOH. MeOH foi removido sob pressão reduzida e o resíduo remanescente foi tratado com 10 mL de EtOAc. O sólido amarronzado foi precipitado e filtrado. O sólido foi lavado com 2 x 50 mL de acetona e 2 x 100 mL de EtOAc. No total foram obtidas 1.590 g de sólido amarronzado claro (35% de rendimento). ¹HNMR (DMSO) δ_{ppm} : 7,98 (m, 1H), 7,84 (m, 1H), 7,61 (m, 2H), 4,49 (t, 2H), 2,84 (s, 3H), 2,30 (t, 2H), 1,84 (m, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,53 (s, 6H), MALDI-MS (modo positivo): 260.2419.

Síntese do composto 2: O composto 1 (0,1 g, 0,294 mmols), N-hidróxi succinimida (0,068 g, 0,588 mmols) e N,N'-dicicloexilcarbodiimida (DCC) (0,085 g, 0,11 mmols) foram precipitados em 1,5 mL de DMF. A mistura de reação foi agitada a 37°C por 1 hora. A dicicloexiluréia precipitada (DCU) foi removida por filtração, e o filtrado foi tratado com 15 mL de éter. O sólido laranja claro foi lavado três vezes com 10 mL de éter e seco sob vácuo por várias horas. O sólido obtido foi usado diretamente para a próxima reação. MALDI-MS (modo positivo): 357.1590.

Síntese do composto 3: A um frasco de centrifugação de 1,5 mL contendo 20 nmols de DNA (EDC1) foram adicionados 41,6 μL de 0,1M tampão fosfato de sódio (NaPi), pH

8,6, 41,6 μL do composto 2 em NMP (96 mM) e 41,6 μL de NMP. O frasco foi colocado em um agitador e agitado por 4 horas a 37°C. A mistura de reação foi desalinizada por filtração em gel usando Sephadex G-25 e então purificada por coluna C18 de fase inversa. Um total de 8,81 nmols do produto desejado foram obtidos (44% de rendimento). LC-MS (modo negativo): calculado para $\text{C}_{172}\text{H}_{221}\text{N}_{60}\text{O}_{96}\text{P}_{15}$ (monoisotópico): 1024.4070 $[\text{M}-5\text{H}]^{-5}$; 1280.7473 $[\text{M}-4\text{H}]^{-4}$ Encontrado: 1024.3986 $[\text{M}-5\text{H}]^{-5}$; 1280.7473 $[\text{M}-4\text{H}]^{-4}$

10 Síntese do composto 4 (procedimento semelhante do composto de sintetização 1): 4-metilpiridina (1,245 g, 13,37 mmols) e ácido 5-bromovalérico (2.4203 g, 13,37 mmols) aquecida com agitação vigorosa a 110°C por toda noite. Foram adicionados 50 mL de EtOAc ao óleo viscoso. Um sólido borgo-
 15 nha obtido foi rompido e lavado extensivamente com EtOAc e acetona. O sólido foi filtrado e seco sob vácuo para fornecer 1,886 g de 4 como um sólido branco (51% de rendimento). ^1H NMR (CD_3OD) δ_{ppm} : 8,84 (d, 1H), 7,96 (d, 1H), 4,6 (t, 2H), 2,69 (s, 3H) 2,40 (t, 2H), 2,05 (t, 2H) 1,65 (m, 2H). MALDI-
 20 MS (modo positivo): 194.1457.

Síntese do composto 5: O composto 5 foi sintetizado seguindo-se o mesmo procedimento de síntese do composto 2 e foi usado diretamente para conjugação de DNA sem precipitação de éter. MALDI-MS (modo positivo): 291.1605.

25 Síntese do composto 6: Seguindo-se o procedimento geral de marcação do DNA, 20 nmol de DNA (EDC1) foram reagidos com o composto 5, por toda a noite, a 37°C para fornecer 9,05 nmol de DNA 6 conjugado com piridínio puro (45% de ren-

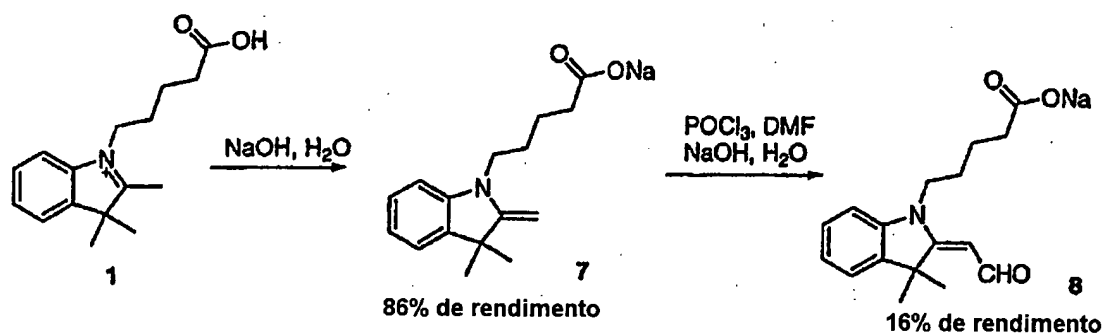
dimento). LC-MS (modo negativo): calculado para $C_{168}H_{217}N_{60}O_{96}P_{15}$ (monoisotópico): 1264.2385 $[M-4H]^{4-}$; 1685.9872 $[M-3]^{3-}$ Encontrado: 1264.2313 $[M-4H]^{4-}$; 1685.9871 $[M-3H]^{3-}$

Síntese de Precursores de Aldeído Conjugados com

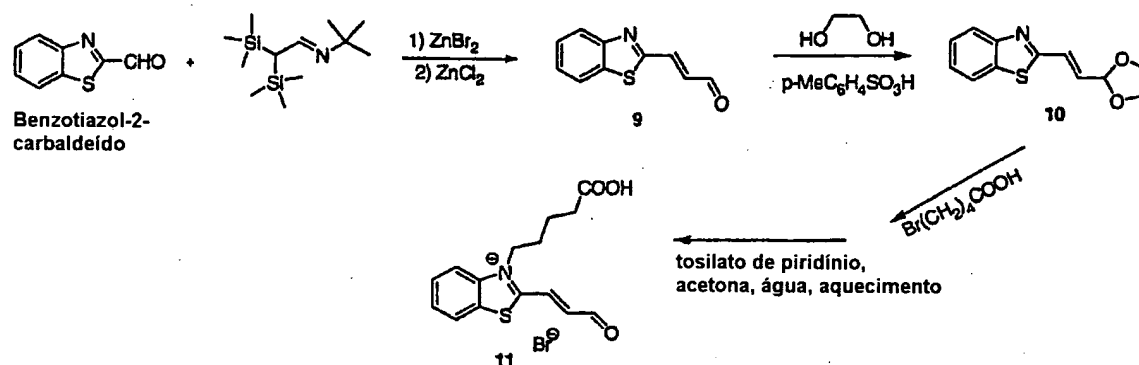
5 DNA para Condensação de Aldol e Reação de Wittig

O Esquema 15 e o Esquema 16 mostram dois exemplos de introdução da funcionalidade do ácido aos heterocíclicos através de quaternização de N. O Esquema 17 fornece um exemplo de conversão de um grupo ciano em um grupo ácido para
10 conjugação com DNA.

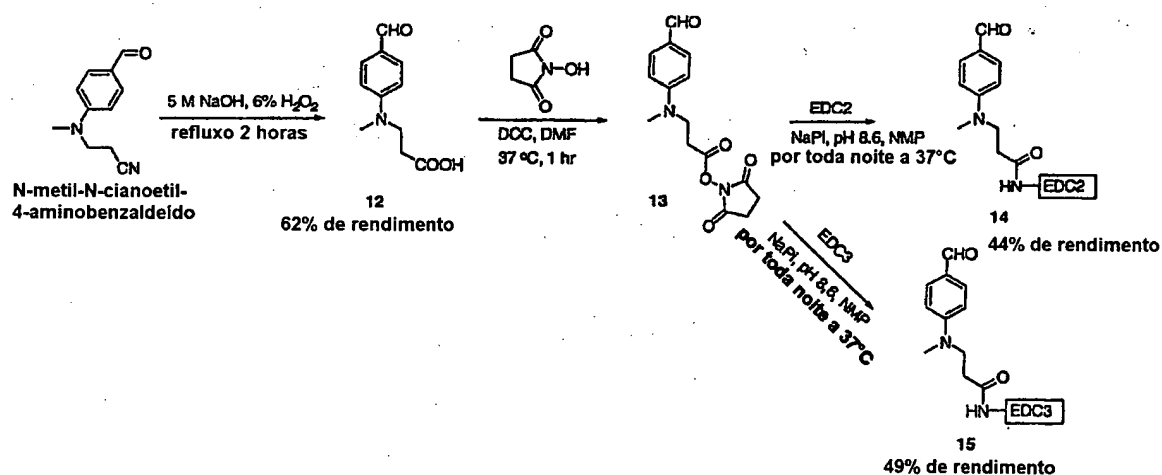
Esquema 15: Síntese de aldeído heterocíclico não quaternário para conjugação de biopolímero



Esquema 16: Síntese de Aldeídos Heterocíclicos Quaternários para Conjugação de Biopolímero



Esquema 17: Síntese de Aldeídos Aromáticos Substituídos com Amino Conjugados com DNA



Síntese do composto 7: Uma mistura de 1 (0,25 g, 0,735 mmol) e hidróxido de sódio (0,039 g, 0,970 mmol) foi dissolvida em 1,9 m de água e agitada vigorosamente a temperatura ambiente. Após 3 horas, a mistura de reação foi carregada diretamente em uma C18 coluna de fase inversa de 4,3 g RediSep. A coluna foi lavada primeiro com água para retirada do excesso de sal e então com acetonitrila para eluir o produto. Um total de 0,178 g do produto foram obtidos (86% de rendimento). ^1H NMR (DMSO) δ_{ppm} : 7,11 (dd, 1H), 7,05 (dt,

1H), 6,66 (dt, 1H), 6,61 (dd, 1H), 3,85 (d, 2H), 3,45 (t, 2H), 1,48 (m, 4H), 1,88 (t, 2H), 1,24 (s, 6H). (Wang, e outros, Dyes and Pigments 2003, 57, 171-179).

Síntese do composto 8: Em um frasco de vidro de 4 mL com septo de PTFE/silicone sob Ar foram adicionados 300 μ L de DMF anidro. O frasco e seu conteúdo foram resfriados em um banho de gelo-sal por 10 minutos, então 84 μ L de oxícloreto de fósforo foram adicionados. Após mais 10 minutos, uma solução do composto 7 (0,15 g, 0,533 mmol) em 300 μ L de DMF foi adicionada lentamente. A solução se tornou viscosa. O frasco foi transferido para um agitador pré-aquecido a 37°C e agitado por mais 45 minutos. 200 mg de gelo foram adicionados à mistura de reação com agitação cuidadosa, seguido por 450 mg de NaOH em 1,2 mL de água. A suspensão resultante foi primeiro purificada por uma C18 coluna de fase inversa RediSep de 12 g em um sistema de Cromatografia CombiFlash Companion (Teledyne ISCO) (acetonitrila/água) e então por cromatografia de camada fina de semi-preparação (sistema solvente: 70:29:1 CH₂Cl₂ : MeOH: AcOH). Um total de 26 mg de produto puro foram obtidos (16% de rendimento). ¹H NMR (CD₂OD) δ_{ppm} : 9,79 (d, 1H), 7,35 (d, 1H), 7,35 (d, 1H), 7,31 (t, 1H), 7,11 (t, 2H), 5,51 (d, 1H), 3,85 (t, 2H), 2,25 (t, 2H), 1,73 (m, 4H), 1,65 (s, 6H). (Wang, e outros., Dyes and Pigments 2003, 57, 171-179).

Síntese do composto 9: A uma solução de benzotiazol-2-carbaldeído (102 mg, 0,623 mmol) e ZnBr₂ (140 mg, 0,623 mmol) em 1,5 mL de THF foi adicionada uma solução de (E)-N-(2,2-bis(trimetilssilil)etilideno)-2-metilpropan-2-

amina (167 mg, 0,685 mmol) em THF (0,3 mL) gota a gota a temperatura ambiente. Após ser agitada por 2 horas, a mistura resultante foi hidrolisada por adição de uma solução aquosa de ZnCl₂ (297 mg em 2,2 mL de água) e éter (2,56 mL) (a extensão da hidrólise foi monitorada por análise de HPLC). THF foi removido por uma corrente de Ar. A camada aquosa foi extraída com CH₂Cl₂. Após secagem sobre MgSO₄, o produto bruto foi purificado por uma coluna de gel de sílica RediSep de 12 g em um sistema de cromatografia CombiFlash Companion (EtOAc/hexanos). 97 mg do produto foram obtidos (82% de rendimento). ¹H NMR (CD₃Cl) δ_{ppm}: 9,8 (d, 1H), 8,1 (d, 1H), 7,9 (d, 1H), 7,7 (d, 1H), 7,6 (t, 1H), 7,5 (t, 1H), 6,9 (dd, 1H). (Bellassoued, e outros., A. J. Org. Chem. 1993, 58, 2517-2522)

Síntese do composto 12: Em um frasco de forma redonda de 50 mL contendo N-metil-N-cianoetil-4-aminobenzaldeído (1,024 g, 5,44 mmol) foram adicionados 27,2 mL de solução 5N NaOH e 6,8 mL de H₂O₂ a 30%. A mistura de reação foi refluxada por 2 horas. Após resfriamento, a mistura de reação foi neutralizada por adição de HCl concentrado (37%, peso), e extraída com 2 x 100 mL de EtOAc e 1 x 100 mL de CH₂Cl₂. As camadas orgânicas foram combinadas e lavadas uma vez com 50 mL de salmoura e concentradas à secura. O produto bruto foi purificado por uma coluna de gel de sílica RediSep de 40 g em um sistema de cromatografia CombiFlash Companion (EtOAc/MeOH). Um total de 0,702 g de sólido de cor rosa claro foi obtido (62%). Electrospray MS: M+H 208,0735. (Brady, e outros, J. Biol. Chem. 2001, 276, 18812-18818).

Síntese do composto 13: O composto 13 foi sintetizado, seguindo-se o mesmo procedimento de sintetização do composto 2 e foi usado diretamente para conjugação de DNA sem precipitação de éter.

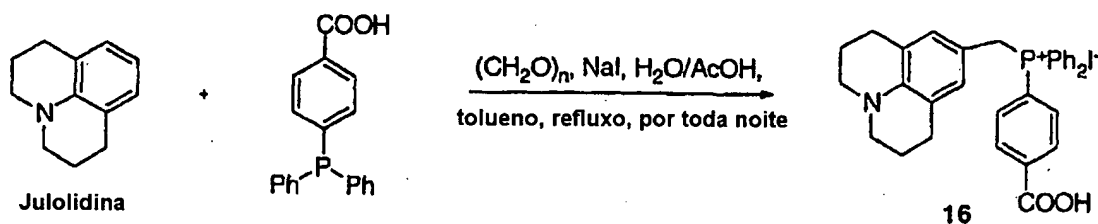
5 Síntese do composto 14: Seguindo-se o procedimento geral de marcação com DNA, 20 nmol de DNA (EDC2) foram reagidos com o composto 13, por toda a noite, a 37°C, para fornecer 8,8 nmol de 14 (44%). LC-MS: Calculado para $C_{158}H_{204}N_{57}O_{91}P_{15}$ (monoisotópico): 1203.9710 $[M-4H]^{4-}$; 1605.6309
10 $[M-3H]^{3-}$ Encontrado: 1203.9664 $[M-4H]^{4-}$; 1605.6305 $[M-3H]^{3-}$

Síntese do composto 15: Seguindo-se o procedimento geral de marcação com DNA, 20 nmol de DNA (EDC3) foram reagidos com o composto 13, por toda a noite, a 37°C, para fornecer 9,7 nmol de 15 (49%). LC-MS: Calculado para
15 $C_{159}H_{204}N_{59}O_{91}P_{15}$ (monoisotópico): 1213.9725 $[M-4H]^{4-}$; 1618.9660 $[M-3H]^{3-}$ Encontrado: 1213.9620 $[M-4H]^{4-}$; 1618.9590 $[M-3H]^{3-}$

Síntese de Precursores para Reação de Wittig e Horner

20 Um exemplo de sintetização de sal de fosfônio aromático substituído com amino foi apresentado (Esquema 18) aqui, empregando um procedimento conveniente de um recipiente, sem isolamento do reagente haleto.

Esquema 18: Síntese do Sal de Fosfônio Aromático
25 Substituído com Amino



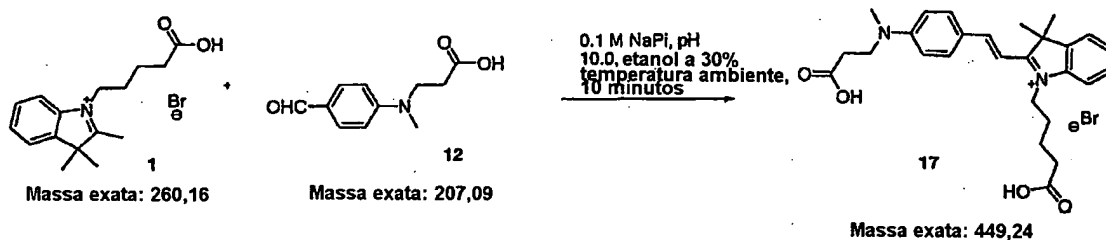
Síntese do composto 16: A uma solução de julolidina (0,97 g, 5,60 mmol), ácido 4-(difenilfosfino)benzóico (1,715 g, 5,60 mmol) e aldeído paraformico (0,168 g) em 8 mL de tolueno foram adicionados NaI (0,84 g, 5,60 mmol), água (0,397 mL) e HOAc (1,13 mL). A mistura foi refluxada por toda noite. Após adição de 15 mL de água, a mistura de reação foi extraída duas vezes com CH₂Cl₂. A camada de CH₂Cl₂ combinada foi lavada duas vezes com NaHCO₃ saturado, então uma vez com água e seca sobre Na₂SO₄. Após remoção do solvente, o resíduo foi purificado por uma coluna de gel de sílica RediSep de 40 g em um sistema de cromatografia CombiFlash Companion (EtOAc/hexanos). Foram obtidos 1,77 g de sólido amarelo (51% de rendimento). ¹H NMR (CD₃Cl) δ_{ppm}: 8,01 (dd, 2H), 7,86 (t, 2H), 7,77 (m, 4H), 7,62 (m, 4H), 7,52 (m, 2H), 6,20 (s, 2H), 4,77 (d, 2H), 3,03 (t, 4H), 2,36 (t, 4H), 1,75 (m, 4H), MS (modo positivo): 492,205

Geração de Polimetina Através da Condensação de Aldol na Condição Aquosa

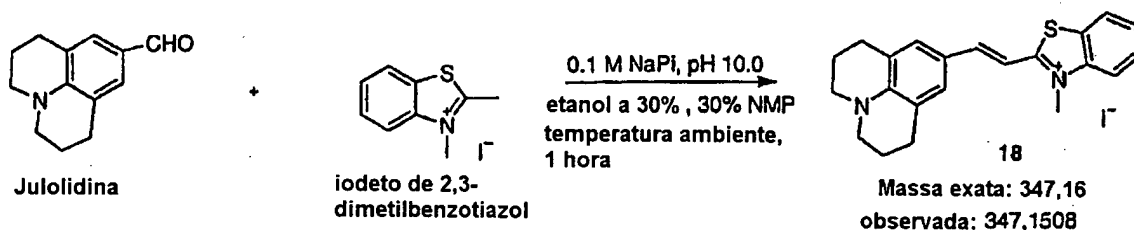
Embora a maior parte dos dados da literatura precedente indiquem que a condensação do aldol apenas acontece em condições severas (refluxo de etanol em condição básica), nós mostramos aqui dois exemplos onde o precursor heterocíclico *N*-quaternário portando hidrogênio ativo participa da condensação do aldol em condição aquosa branda. No Esquema

19, após mistura do composto 1 e 12 no tampão aquoso por poucos minutos, uma cor púrpura profunda foi observada. A análise da massa indica a formação do produto de condensação de Aldol (Figura 35) e a mistura de reação diluída mostra a fluorescência do corante hemicianina característica (Figura 36, Excitação: 543 nm e Emissão: 586 nm). O Esquema 20 ilustra outro exemplo de condensação de aldol em condições aquosas, onde o produto de hemicianina purificado exibe fluorescência em 615 nm (Excitação a 540 nm, Figura 37).

10 Esquema 19. Condensação de Aldol dos Compostos 1 e 12 na Condição Aquosa



Esquema 20. Condensação de Aldol de Julolidina e Benzotiazólio em Condição Aquosa



15 Geração de Polimetina Através da Reação Modelada com Ácido Nucléico

O Esquema 21 ilustra um exemplo da condensação de

5



10

A invenção pode ser concretizada em outras formas, sem com isto fugir do espírito ou características da mesma. As modalidades precedentes devem, ser consideradas e todos os aspectos como ilustração limitando a invenção descrita aqui. O escopo da é assim indicado pelas reivindicações apenas, ao descrição precedente e todas alterações que se encontrem dentro do significado e faixa de equivalência das

15

20

reivindicações serão entendidas como sendo englobadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detecção de uma sequência de nucleotídeos alvo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) fornecer (1) uma primeira sonda compreendendo

5 (i) uma primeira sequência de nucleotídeos e (ii) um primeiro grupo reativo ligado à primeira sequência de oligonucleotídeos, e (2) uma segunda sonda compreendendo (i) uma segunda sequência de oligonucleotídeos e (ii) um segundo grupo reativo ligado à segunda sequência de oligonucleotídeos, onde a primeira sequência de oligonucleotídeos e a segunda sequência de oligonucleotídeos são complementares a duas regiões separadas do nucleotídeo alvo;

(b) combinar a primeira sonda e a segunda sonda com uma amostra a ser testada quanto à presença da sequência de nucleotídeos alvo sob condições em que a primeira sonda e a segunda sonda hibridizam para suas respectivas regiões complementares da sequência de nucleotídeos alvo, se presente na amostra, trazendo, desta forma, o primeiro grupo reativo e o segundo grupo reativo a uma proximidade reativa; e

20 (c) detectar uma reação entre o primeiro grupo reativo e o segundo grupo reativo, determinando, assim, a presença da sequência de nucleotídeos alvo.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o produto da reação do primeiro grupo reativo e do segundo grupo reativo compreende uma fração cromófora ou fluorescente.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o produto da reação do pri-

meiro grupo reativo e do segundo grupo reativo compreende uma fração fluorescente.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a fração fluorescente é selecionada do grupo consistindo em corantes de cianina, corantes de hemocianina e corantes de coumarina.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a fração fluorescente é um corante de polimetina.

10 6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a reação do primeiro grupo reativo e do segundo grupo reativo é pelo acoplamento químico do primeiro grupo reativo e do segundo grupo reativo.

15 7. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a fração cromófora ou fluorescente está covalentemente ligada a uma ou ambas primeira sonda e segunda sonda.

20 8. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a fração cromófora ou fluorescente não está covalentemente ligada à primeira sonda, nem à segunda sonda.

25 9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a reação do primeiro grupo reativo e do segundo grupo reativo resulta na liberação de um co-fator de enzima.

10. Método para detecção de uma sequência de nucleotídeos alvo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) fornecer um conjunto de pares de sondas, cada

par de sondas compreendendo (1) uma primeira sonda compreendendo (i) uma primeira seqüência de oligonucleotídeos e (ii) um primeiro grupo reativo ligado à primeira seqüência de oligonucleotídeos, e (2) uma segunda sonda compreendendo (i) uma segunda seqüência de oligonucleotídeos e (ii) um segundo grupo reativo correspondente ligado à segunda seqüência de oligonucleotídeos, onde a primeira seqüência de oligonucleotídeos e a segunda seqüência de oligonucleotídeos são complementares às duas regiões separadas do nucleotídeo alvo;

10 (b) combinar o conjunto de pares de sondas com uma amostra a ser testada quanto à presença da seqüência de nucleotídeos alvo sob condições onde cada uma das primeiras sondas e segundas sondas dos pares de sondas hibridizam para sua respectiva região complementar da seqüência de nucleotídeos alvo, se presente na amostra, trazendo, desta forma, os pares correspondentes dos primeiros e segundos grupos reativos a uma proximidade reativa; e

15 (c) detectar uma ou mais reações entre os pares dos primeiros grupos reativos e dos segundos grupos reativos correspondentes, determinando, assim, a presença da seqüência de nucleotídeos alvo.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o número de pares de sondas está entre 2 e 10.000.

25 12. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o número de pares de sondas está entre 5 e 5.000.

13. Método, de acordo com a reivindicação 10,

CARACTERIZADO pelo fato de que o número de pares de sondas está entre 10 e 1.000.

14. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as reações entre os primeiros
5 grupos reativos e os segundos grupos reativos são idênticas ao longo dos pares de sondas.

15. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as reações entre os primeiros
10 grupos reativos e os segundos grupos reativos correspondentes não são todas idênticas ao longo dos pares de sondas.

16. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a hibridização dos pares de sondas para sequência de nucleotídeos alvo ocorre sob condições substancialmente idênticas e simultaneamente.

15 17. Método para realizar uma química moldada com ácido nucléico, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende realizar múltiplas reações químicas moldadas com ácido nucléico moldadas por uma única sequência de nucleotídeos.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as múltiplas reações químicas
20 moldadas com ácido nucléico acontecem em condições substancialmente similares.

19. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as múltiplas reações químicas
25 moldadas com ácido nucléico acontecem substancialmente de modo simultâneo.

20. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as múltiplas reações químicas

moldadas com ácido nucléico são reações idênticas.

21. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as múltiplas reações químicas moldadas com ácido nucléico não são reações idênticas.

5 22. Método para detecção de um alvo biológico, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) fornecer uma primeira sonda, a primeira sonda compreendendo (i) uma primeira fração de ligação tendo afinidade de ligação com o alvo biológico, (2) uma primeira sequência de oligonucleotídeos, (3) um primeiro grupo reativo associado à primeira sequência de oligonucleotídeos;

10

(b) fornecer uma segunda sonda, a segunda sonda compreendendo (1) uma segunda fração de ligação tendo uma afinidade de ligação com o alvo biológico, (2) uma segunda sequência de oligonucleotídeos, e (3) um segundo grupo reativo associado à segunda sequência de oligonucleotídeos, onde o segundo oligonucleotídeo é capaz de hibridizar-se para a primeira sequência de oligonucleotídeos e o segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo quando trazidos a uma proximidade reativa;

15 20

(c) combinar a primeira sonda e a segunda sonda com uma amostra a ser testada quanto à presença do alvo biológico sob condições onde as primeira e segunda frações de ligação se ligam ao alvo biológico;

25 (d) permitir que o segundo oligonucleotídeo hibridize para o primeiro oligonucleotídeo para trazer os primeiro e segundo grupos reativos a uma proximidade reativa; e

(e) detectar uma reação entre os primeiro e segun-

do grupos, determinando, assim, a presença do alvo biológico.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22,
CARACTERIZADO pelo fato de que a primeira sonda compreende
ainda um primeiro ligante entre a primeira fração de ligação
5 e a primeira seqüência de oligonucleotídeos.

24. Método, de acordo com a reivindicação 22,
CARACTERIZADO pelo fato de que a segunda sonda compreende
ainda um segundo ligante entre a segunda fração de ligação e
a segunda seqüência de oligonucleotídeos.

10 25. Método, de acordo com a reivindicação 22,
CARACTERIZADO pelo fato de que o alvo biológico é uma prote-
ína.

26. Método, de acordo com a reivindicação 22,
CARACTERIZADO pelo fato de que o alvo biológico é um autoan-
15 ticorpo.

27. Método, de acordo com a reivindicação 22,
CARACTERIZADO pelo fato de que o alvo biológico é uma célula.

28. Método, de acordo com a reivindicação 22,
CARACTERIZADO pelo fato de que pelo menos uma dentre as pri-
20 meira e segunda frações de ligação é um anticorpo para o al-
vo biológico.

29. Método, de acordo com a reivindicação 22,
CARACTERIZADO pelo fato de que ambas as primeira e segunda
frações de ligação são anticorpos para o alvo biológico.

25 30. Método, de acordo com a reivindicação 22,
CARACTERIZADO pelo fato de que pelo menos uma dentre as pri-
meira e segunda frações de ligação não é um anticorpo para o
alvo biológico.

31. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma dentre as primeira e segunda frações de ligação é um aptâmero que se liga ao alvo biológico.

5 32. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que ambas as primeira e segunda frações de ligação são aptâmeros que se ligam ao alvo biológico.

10 33. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma dentre as primeira e segunda frações de ligação é um pequeno ligante de molécula.

15 34. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que ambas as primeira e segunda frações de ligação são pequenos ligantes de molécula.

35. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira seqüência de oligonucleotídeos e a segunda seqüência de oligonucleotídeos compreendem uma região complementar com 6 a 30 bases.

20 36. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a reação entre os primeiro e segundo grupos reativos produz uma fração fluorescente.

25 37. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a reação entre os primeiro e segundo grupos reativos produz uma fração cromófora ou quimioluminescente.

38. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que na ausência do alvo biológico

na amostra, nenhuma reação substancialmente detectável ocorre entre os primeiro e segundo grupos reativos.

39. Método para detecção de um alvo biológico, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

5 (a) fornecer um complexo de ligação do alvo biológico com uma primeira sonda compreendendo (1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, (2) uma primeira seqüência de oligonucleotídeos, e (3) um primeiro grupo reativo associado à primeira seqüência
10 de oligonucleotídeos;

 (b) colocar o complexo de ligação de (a) em contato com uma segunda sonda, a segunda sonda compreendendo (1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, (2) uma segunda seqüência de oligonucleotídeo, e (3) um segundo grupo reativo associado à
15 segunda seqüência de oligonucleotídeo, onde o segundo oligonucleotídeo é capaz de hibridizar para a primeira seqüência de oligonucleotídeo e o segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo quando se traz para dentro da pro-
20 ximidade reativa um do outro;

 (c) permitir que o segundo oligonucleotídeo hibridize para o primeiro oligonucleotídeo para trazer o primeiro e segundo grupos reativos a uma proximidade reativa; e

 (d) detectar uma reação entre os primeiro e segun-
25 do grupos reativos, desse modo, determinando a presença do alvo biológico.

40. Método para detecção de um alvo biológico, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) ligar ao alvo biológico uma primeira e uma segunda sonda, onde

(1) a primeira sonda compreende (i) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, (ii) uma primeira sequência de oligonucleotídeos, e (iii) um primeiro grupo reativo associado com a primeira sequência de oligonucleotídeos e

(2) a segunda sonda compreende (i) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação com o alvo biológico, (ii) uma segunda sequência de oligonucleotídeo, e (iii) um segundo grupo reativo associado à segunda sequência de oligonucleotídeo, onde o segundo oligonucleotídeo é capaz de hibridizar para a primeira sequência de oligonucleotídeo e o segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo quando trazido para dentro da proximidade reativa um do outro;

(b) permitir que o segundo oligonucleotídeo hibridize para a primeira sequência de oligonucleotídeo para trazer os primeiro e segundo grupos reativos a uma proximidade reativa; e

(c) detectar uma reação entre os primeiro e segundo grupos reativos, desse modo, determinando a presença do alvo biológico.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira sonda compreende um primeiro ligante entre a primeira fração de ligação e a primeira sequência de oligonucleotídeo.

42. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda sonda compreende um segundo ligante entre a segunda fração de ligação e a segunda sequência de oligonucleotídeo.

5 43. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o alvo biológico é uma proteína.

 44. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o alvo biológico é um auto-
10 anticorpo.

 45. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o alvo biológico é uma célula.

 46. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma das primeira e
15 segunda frações de ligação é um anticorpo para o alvo biológico.

 47. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que ambas as primeira e segunda frações de ligação são anticorpos para o alvo biológico.

20 48. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma das primeira e segunda frações de ligação não é um anticorpo para o alvo biológico.

 49. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma das primeira e
25 segunda frações de ligação é um aptâmero que se liga ao alvo biológico.

 50. Método, de acordo com a reivindicação 40,

CARACTERIZADO pelo fato de que ambas as primeira e segunda frações de ligação são aptâmeros que se ligam para o alvo biológico.

51. Método, de acordo com a reivindicação 40,
5 **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma das primeira e segunda frações de ligação é um pequeno ligante de molécula.

52. Método, de acordo com a reivindicação 40,
CARACTERIZADO pelo fato de que ambas as primeira e segunda frações de ligação são pequenos ligantes de moléculas.

10 53. Método, de acordo com a reivindicação 40,
CARACTERIZADO pelo fato de que a primeira seqüência oligonucleotídica e a segunda seqüência oligonucleotídica compreendem uma região de complementaridade de 6 a 30 pares de base.

54. Método para detectar um alvo biológico,
15 **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) fornecer uma primeira sonda, a primeira sonda compreende (1) uma primeira fração de ligação tendo afinidade de ligação ao alvo biológico, e (2) uma primeira seqüência oligonucleotídica de código zip;

20 (b) fornecer uma segunda sonda, a segunda sonda compreende (1) uma segunda fração de ligação tendo afinidade de ligação a um alvo biológico, e (2) uma segunda seqüência oligonucleotídica de código zip,

onde a primeira sonda é hibridizada para uma primeira sonda repórter que compreende (1) um seqüência de código anti-zip de oligonucleotídeos complementares a primeira seqüência oligonucleotídica de código zip (2) um primeiro oligonucleotídeo repórter, e (3) um primeiro grupo reativo;

onde a segunda sonda é hibridizada para uma segunda sonda repórter compreendendo (1) uma sequência de código anti-zip de oligonucleotídeos complementares a uma segunda sequência de código zip zip de oligonucleotídeos, (2) um segundo oligonucleotídeo repórter, e (3) um segundo grupo reativo;

onde o segundo oligonucleotídeo repórter é capaz de se hibridizar a uma primeira sequência oligonucleotídica repórter e o segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo quando colocado em proximidade reativa de um outro;

(c) colocar em contato as primeira e segunda sondas com a amostra a ser testada quanto à presença do alvo biológico;

(d) permitir as primeira e segunda sondas a se ligarem ao alvo biológico, se presente na amostra, por meio do qual o segundo oligonucleotídeo repórter hibridiza para a primeira sequência oligonucleotídica repórter para trazer o primeiro e segundo grupos reativos a uma proximidade reativa; e

(e) detectar uma reação entre os primeiro e segundo grupos reativos e, desse modo, determinar a presença do alvo biológico.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as primeira e segunda frações de ligação são anticorpos.

56. Método, de acordo com a reivindicação 54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as primeira e segunda frações de ligação são aptâmeros.

57. Método, de acordo com a reivindicação 54, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que as primeira e segunda frações de ligação são pequenos ligantes de moléculas.

58. Método, de acordo com a reivindicação 54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a química repórter entre os primeiro e segundo grupos reativos gera uma polimetina ou um
10 derivado da mesma.

59. Método, de acordo com a reivindicação 54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a química repórter entre os primeiro e segundo grupos reativos gera uma cianina ou um derivado da mesma.

60. Método, de acordo com a reivindicação 54, **15 CARACTERIZADO** pelo fato de que a reação entre os primeiro e segundo grupos reativos é uma reação de Wittig.

61. Método, de acordo com a reivindicação 54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a reação entre os primeiro e
20 segundo grupos reativos é uma reação de condensação de aldol.

62. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a reação entre os primeiro e segundo grupos reativos produz uma fração de
25 fluorescente.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a reação entre

os primeiro e segundo grupos reativos produz uma fração quimioluminescente ou cromófora.

64. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a o método não
5 inclui ligação enzimática da primeira e/ou da segunda seqüências oligonucleotídicas.

65. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método não
10 inclui ligação química da primeira e/ou da segunda seqüências oligonucleotídicas.

66. Kit, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma ou mais sondas conforme definidas em qualquer um dos métodos conforme definidos nas reivindicações 1-65.

67. Kit, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende
15 duas ou mais sondas conforme definidas em qualquer um dos métodos conforme definidos nas reivindicações 1-65.

68. Kit útil para detecção de uma analito biológico, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) uma primeira sonda que compreende (1) uma pri-
20 meira fração de ligação tendo afinidade de ligação ao analito biológico, (2) uma primeira seqüência oligonucleotídica, e (3) um primeiro grupo reativo associado com a primeira seqüência oligonucleotídica; e

(b) uma segunda sonda que compreende (1) uma se-
25 gunda fração de ligação tendo afinidade de ligação a um analito biológico, (2) uma segunda seqüência oligonucleotídica, e (3) um segundo grupo reativo associado com a segunda seqüência oligonucleotídica, onde o segundo oligonucleotídeo é

capaz de hibridizar para a primeira seqüência oligonucleotídica e o segundo grupo reativo é reativo com o primeiro grupo reativo quando colocado em proximidade reativa um com o outro.

5 69. Kit útil para detecção de um analito biológico, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

 (a) uma primeira sonda, a primeira sonda compreendendo (1) uma primeira fração de ligação possuindo afinidade de ligação ao alvo biológico, e (2) uma primeira seqüência
10 de código zip de oligonucleotídeo;

 (b) uma segunda sonda, a segunda sonda compreendendo (1) uma segunda fração de ligação possuindo afinidade de ligação ao alvo biológico, e (2) uma segunda seqüência de código zip de oligonucleotídeo, onde a primeira sonda é hi-
15 bridizável para uma primeira sonda repórter compreendendo (1) uma seqüência de código anti-zip de oligonucleotídeos complementares para a primeira seqüência de códigos zip de oligonucleotídeo, (2) um primeiro oligonucleotídeo repórter, e (3) um primeiro grupo reativo;

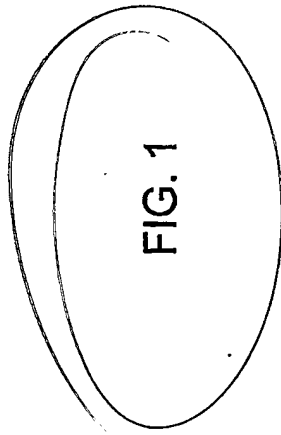
20 onde a segunda sonda é hibridizável a uma segunda sonda repórter compreendendo (1) uma seqüência de código anti-zip de oligonucleotídeos complementares para a segunda seqüência de código zip de oligonucleotídeo, (2) um segundo oligonucleotídeo repórter, e (3) um segundo grupo reativo;

25 onde o segundo oligonucleotídeo repórter é capaz de hibridizar para a primeira seqüência de oligonucleotídeo repórter e o segundo grupo reativo é reativo para o primeiro

grupo reativo quando trazido para dentro da proximidade reativa um do outro.

70. Kit, de acordo com a reivindicação 68 ou 69, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o analito biológico a ser detectado compreende uma proteína de fusão.

71. Kit, de acordo com a reivindicação 68 ou 69, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o analito biológico a ser detectado compreende interação proteína-proteína.



Deteção de ácido nucléico

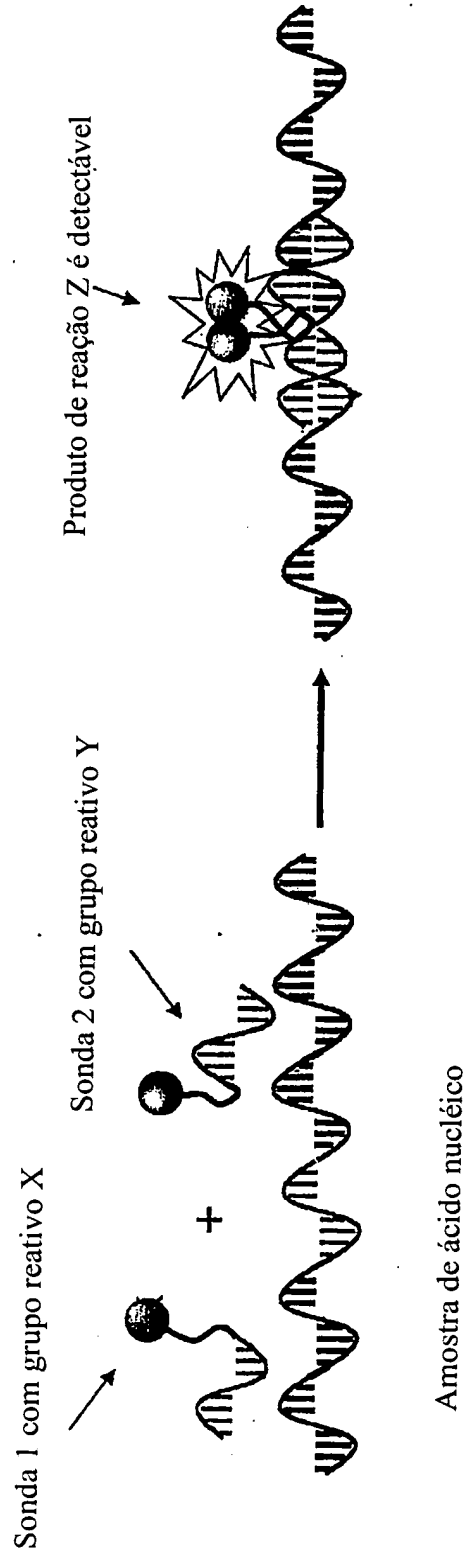


FIG. 2

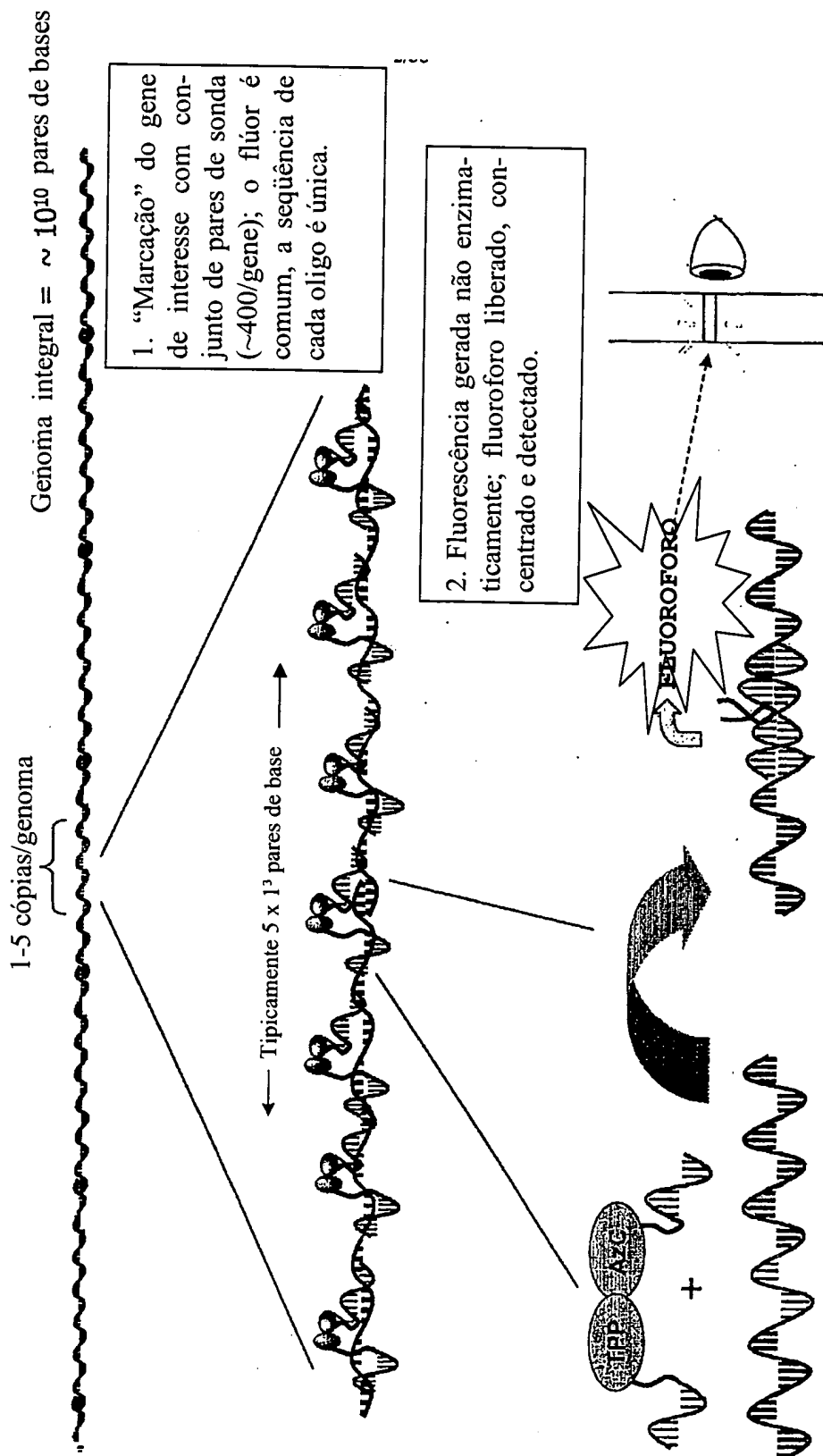
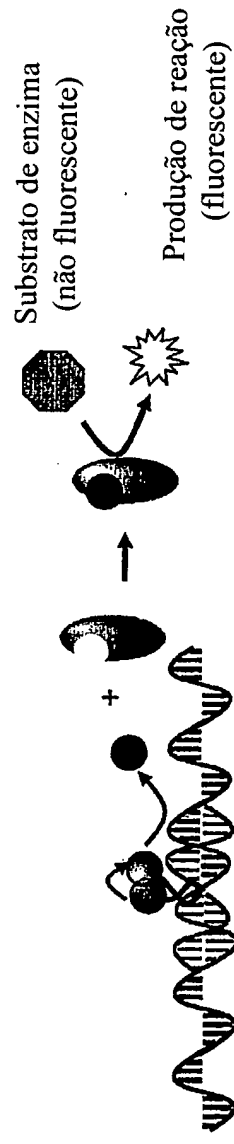


FIG. 3

Ensaio de Liberação de Co-Fator



- Ligação das sondas conduz à reação modelada com ácido nucleico
- Liberação do produto seguido por uma reação detectável
- Muitas moléculas de produto liberadas por evento de ligação de sonda

● Primeiro fragmento de co-fator (reativo)

○ Segundo fragmento de co-fator (reativo)

● Fragmentos reagidos = co-fator ativo

Enzima com sítio de ligação de co-fator (inativo)

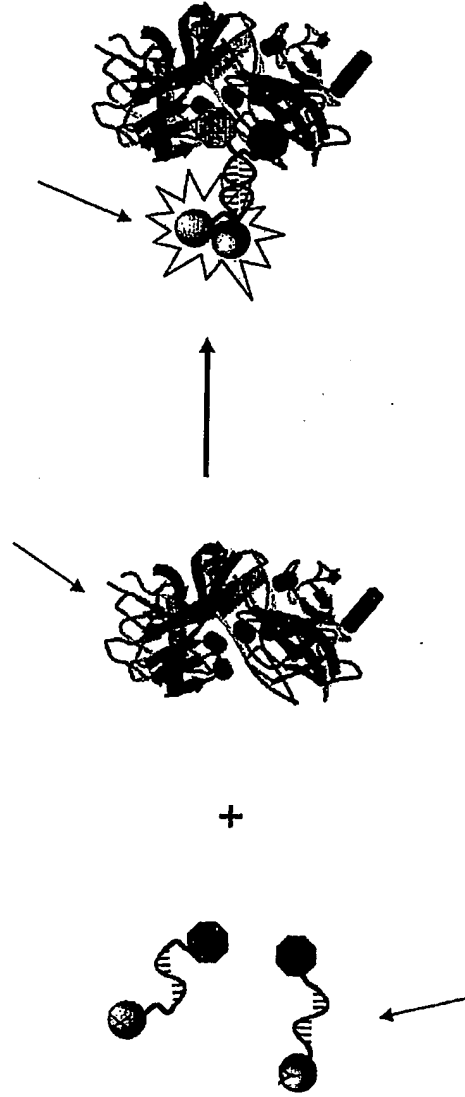
Enzima ativa com co-fator de ligação

FIG. 4

Deteção da Proteína

Sinal detectável (por exemplo, fluorescência ou quimioluminescência).

Proteína simples



- Par de sonda com anticorpo, aptâmero ou proteína com base em molécula pequena ligando frações e grupos reativos.
- Reação detectável de modelo de oligonucleotídeos complementares entre grupos reativos

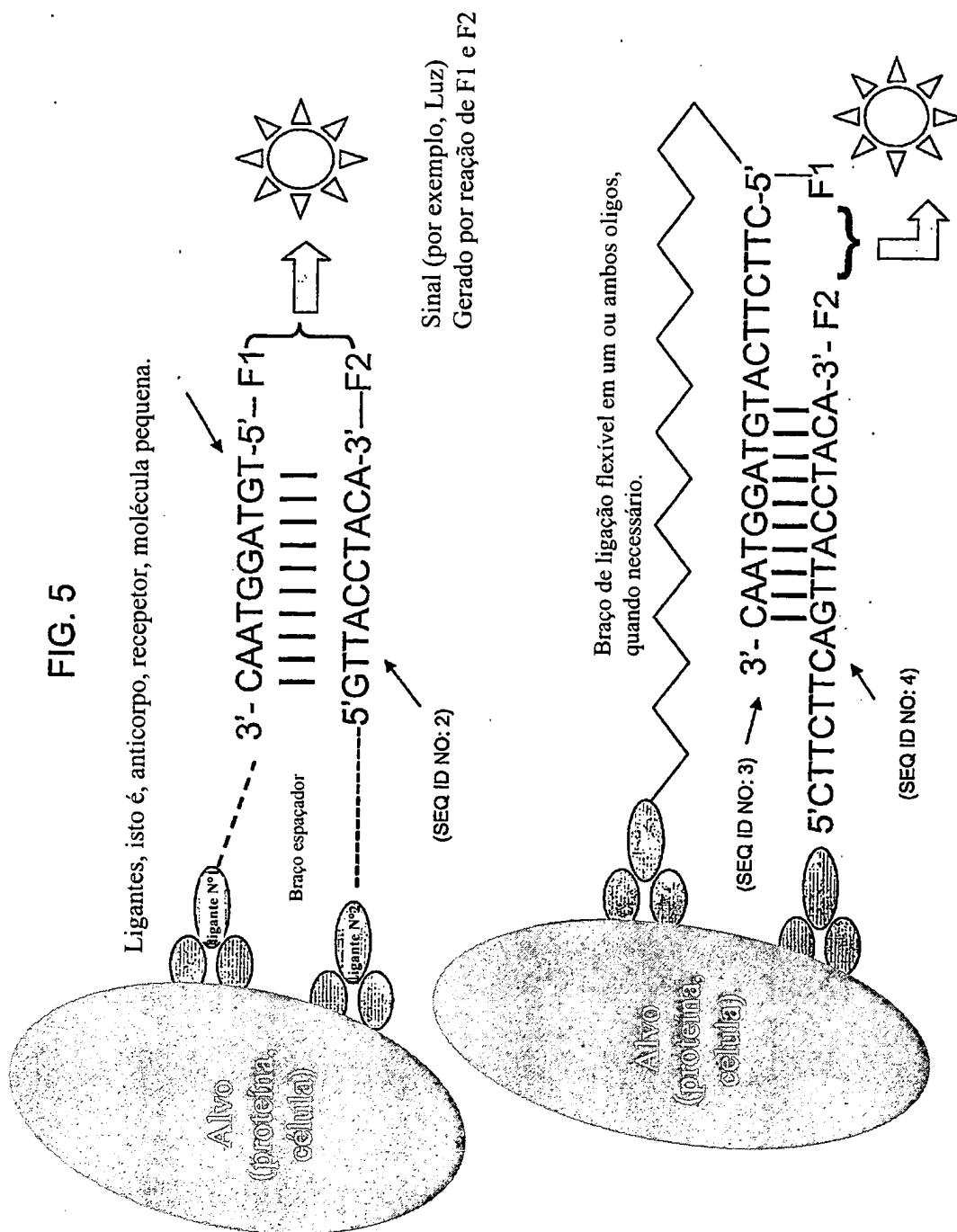
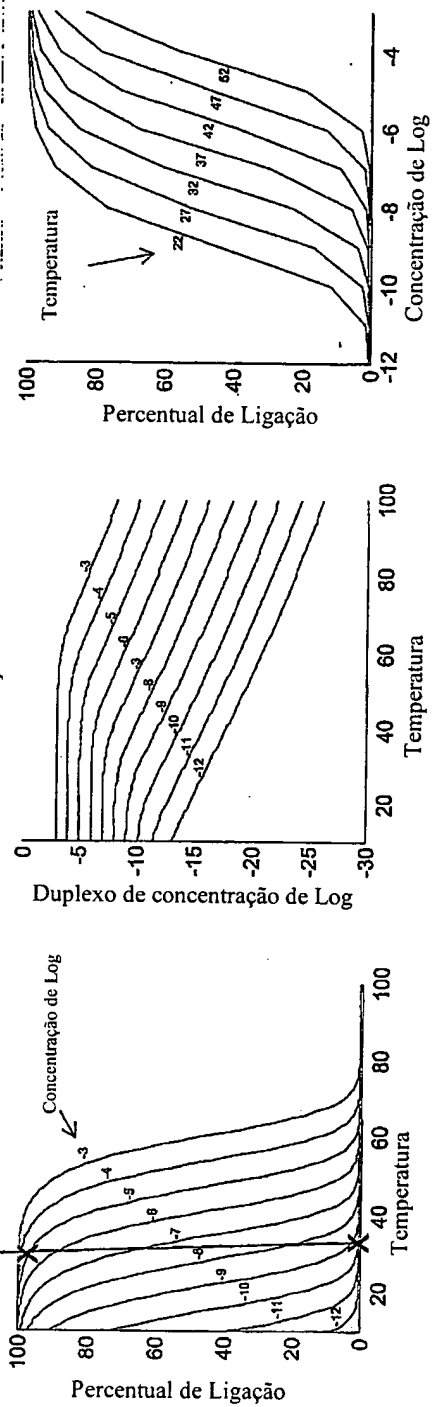


FIG. 6

Combinação Perfeita



A 37°C & 10^{-10} M , 1% hidrolisado

A 10^{-5} M , 99% hidrolisado

Combinação Simples

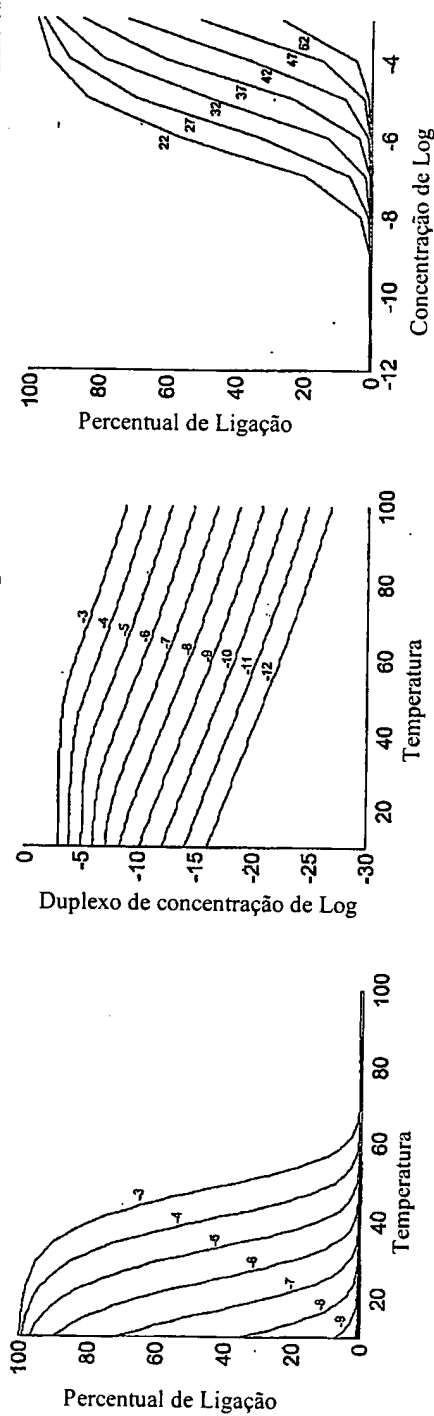


FIG. 7

Oligos empregados para construir curvas de fusão

(SEQ ID NO: 5)

5' (+) CAATGGATGTA**CTTCTTC**

|||||

(-) CTTCTTCAGTTAC**CTACA** 3'

Combinação Perfeita:

(SEQ ID NO: 6)

(SEQ ID NO: 7)

5' (+) CAATGGATGTA**CTTCTTC**

|||||

(-) CTTCTTCAGTT**CCCTACA** 3'

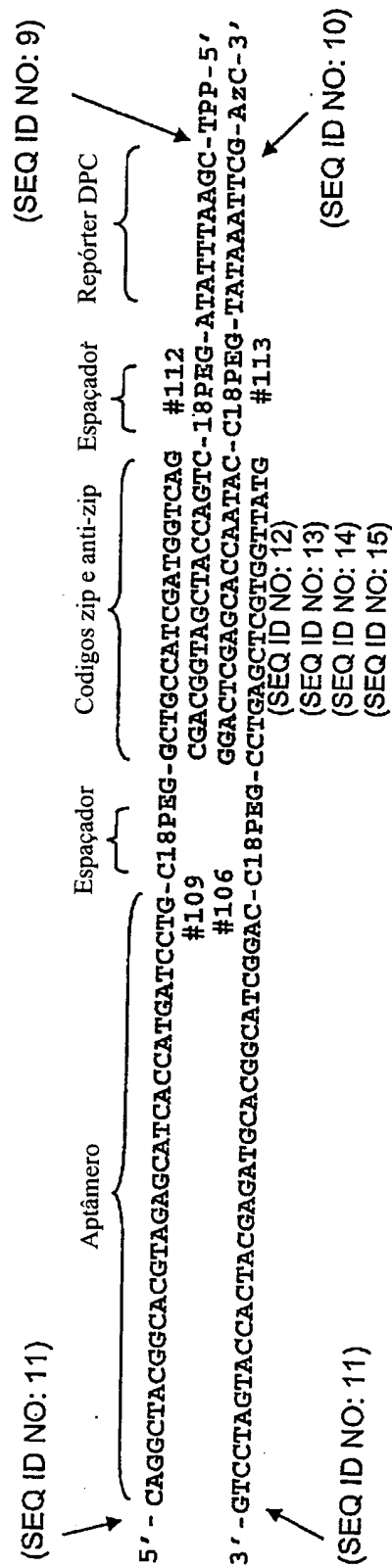
Combinação Simples:

(SEQ ID NO: 8)

Diagram illustrating the anti-zip coding system. A target cell (Alvo (proteína, célula)) is shown with a target protein (Alvo (proteína)). An anti-zip sequence (Sequência anti-zip) is shown binding to the target protein. The anti-zip sequence is composed of two parts: Espaço 1 (Space 1) and Espaço 2 (Space 2). Espaço 1 is a sequence of 10 N's (NNNNNNNNNN) followed by a 3' end. Espaço 2 is a sequence of 10 N's (NNNNNNNNNN) followed by a 5' end. The anti-zip sequence is labeled as Sequência F1 (SEQ ID NO: 9) and Sequência F2 (SEQ ID NO: 10). The anti-zip sequence is shown binding to the target protein via its 3' end.

Ligantes, isto é, anticorpo, receptor, molécula pequena

FIG. 10



Exemplo de sondas de detecção codificadas zip, fragmentadas, usando ligantes de aptâmero

- Os dois oligonucleotídeos superior e inferior incluem sequência de aptâmero ligada às sequências de código zip separadas com espaçador C18PEG
- Os dois oligonucleotídeos internos (oligonucleotídeos repórter) incluem código anti-zip (sequência cada uma complementar a um código zip em um dos oligonucleotídeos superior e inferior) ligados através de um espaçador C18 PEG a um oligonucleotídeo repórter.
- Um oligonucleotídeo repórter conter um resíduo TPP de termino 5', o outro resíduo AzC de termino 3'. Cada código zip é complementar apenas ao seu código anti-zip.
- As sequências repórter são complementares uma a outra.

Exemplo de sondas de detecção codificadas zip, fragmentadas, usando anticorpos

- Um anticorpo anti-PDGF-BB covalente marcado através de ligações hidrazona a uma sequência de código zip de 15 bases com um espaçador de 20 bases de citosina (C20).
- Oligonucleotídeo repórter TPP com uma sequência de código anti-zip de 15 bases complementar, ligada através de um espaçamento C18 PEG a uma sequência repórter de 10 bases.
- Oligonucleotídeo repórter AzC com uma sequência de código anti-zip e uma sequência repórter TPP. A sequência de código anti-zip tinha 20 bases de comprimento, com 15 bases complementares em relação à sequência de código zip.

FIG. 12

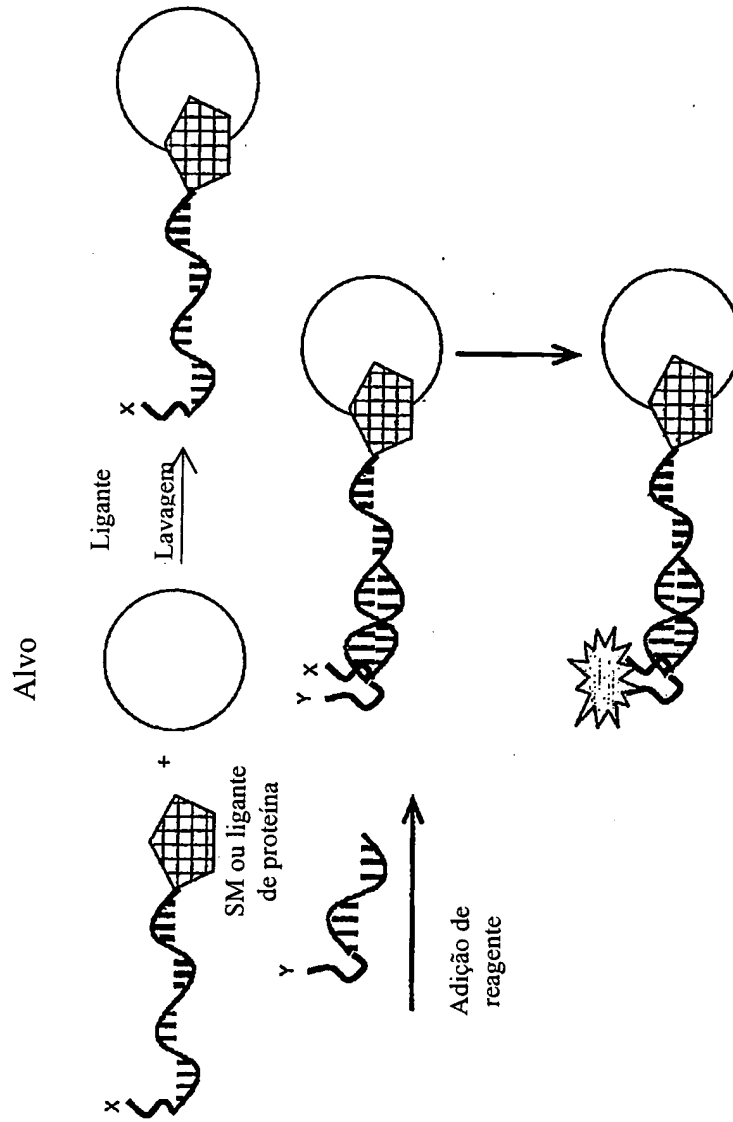
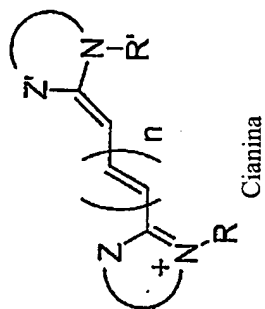


FIG. 13

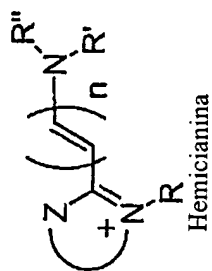
Estruturas Gerais de Corante Polimetina, Cianina e Hemicianina



Corantes de polimetina



Cianina



Hemicianina

A = aceitador D = doador Z, Z' = O, S, N, C ... n = 0, 1, 2 ... R, R', R'' = cadeia de alquila

A e D típicos para corantes de polimetina: tiazóis, pirróis, pirrolinas, indóis, 1,3,3-trimetilindolinas, tetrazóis, pirimidina, piridinas, quinolinas e N-heterociclos fundidos superiores ou quaisquer anéis de benzila substituídos.

FIG. 14

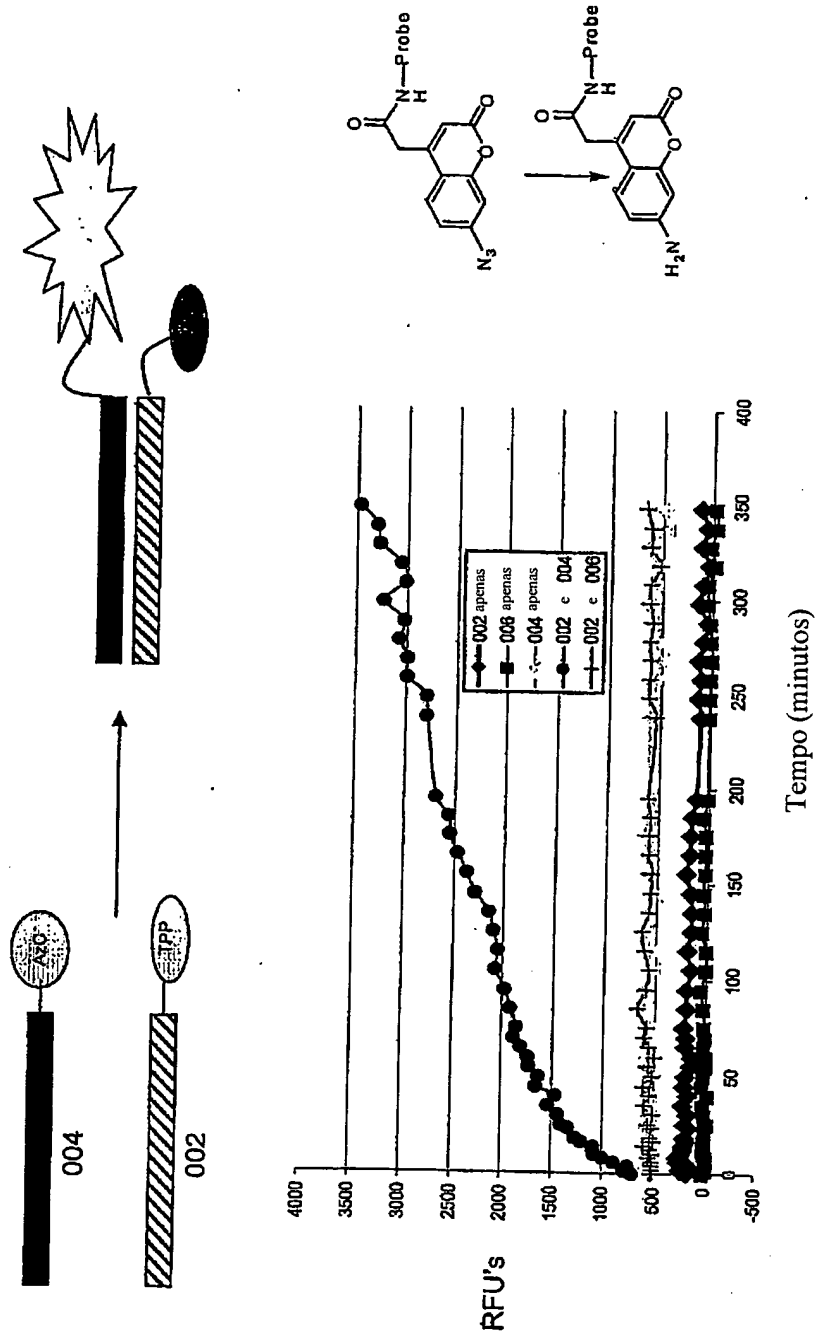


FIG. 15

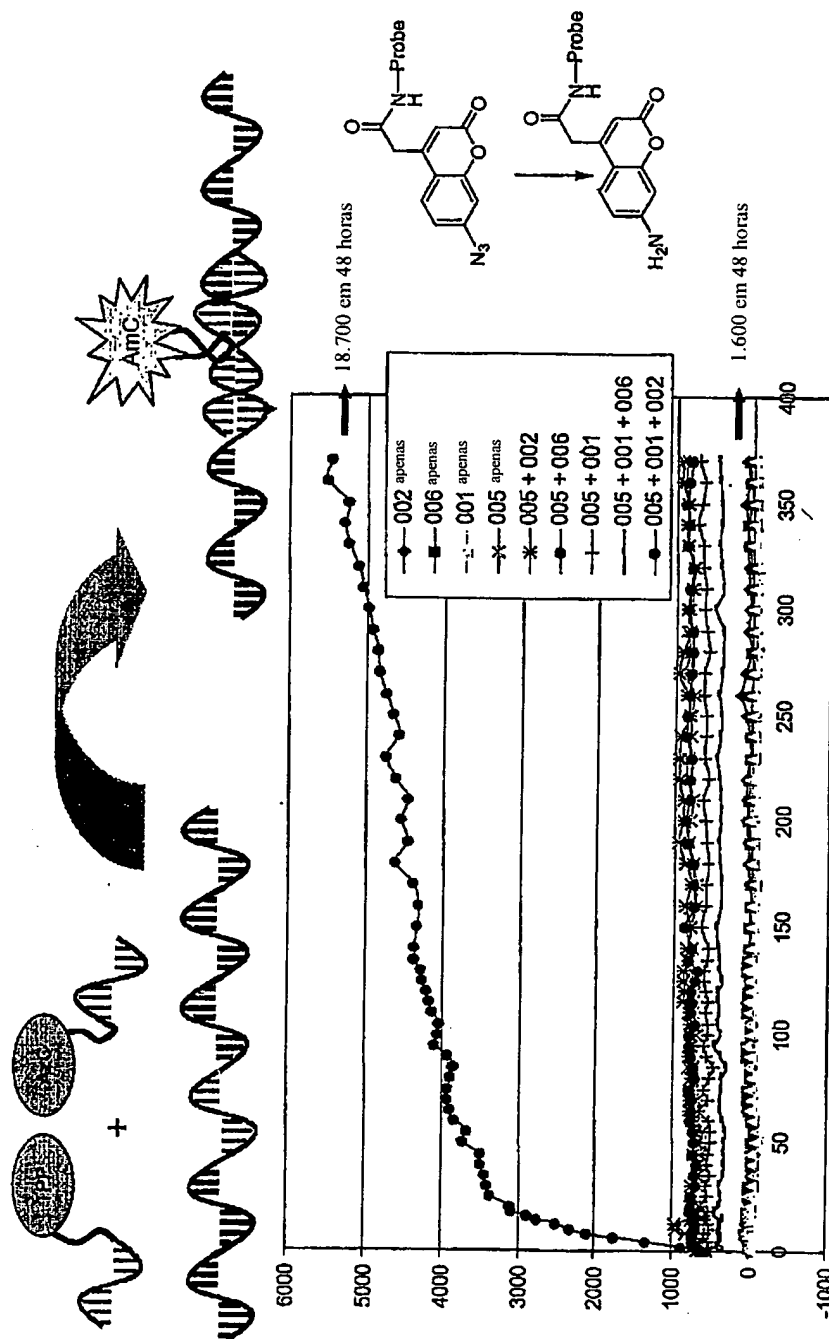
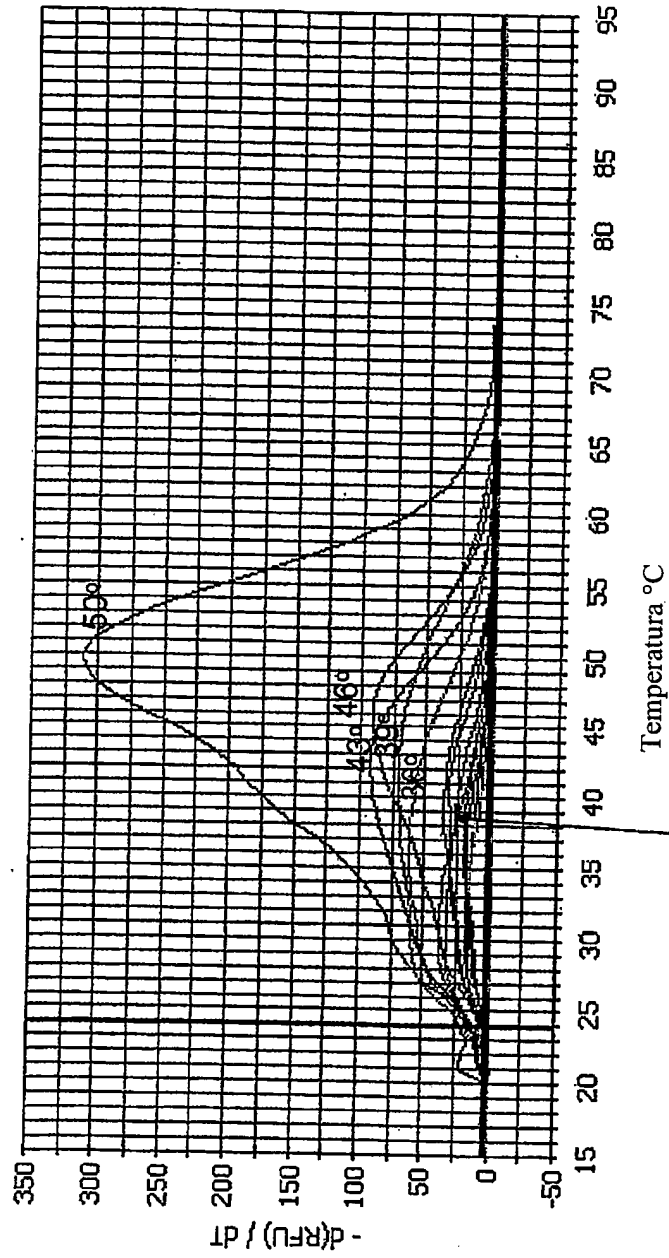


FIG. 16

Curvas de Fusão, Oligos Complementares de 10 bseses, 1,0 M NaCl,
500 nM - 20 nM Oligos

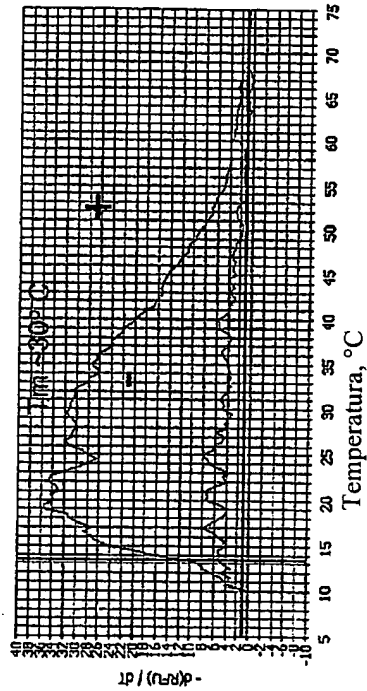


Combinações de 2-bases, T_m 's 42°C a 31°C

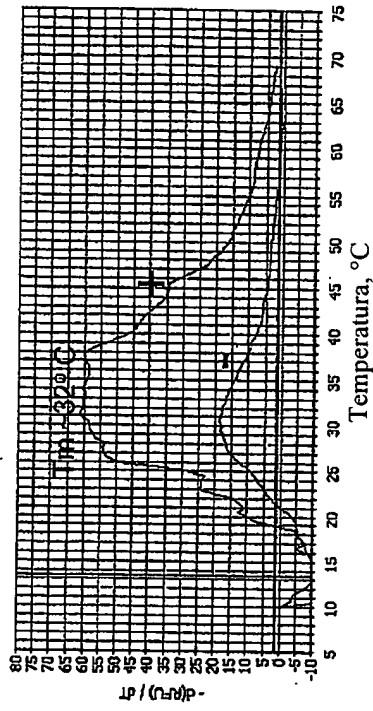
Queda em $T_m \sim 10^\circ\text{C}$ por concentração de oligos de 10 vezes

FIG. 17

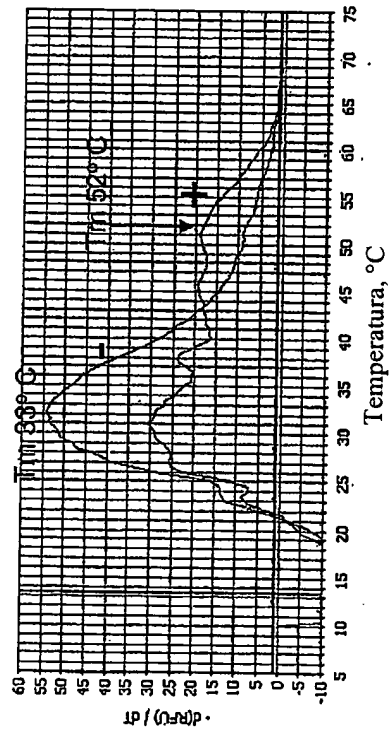
Oligo 23 não biotinilados



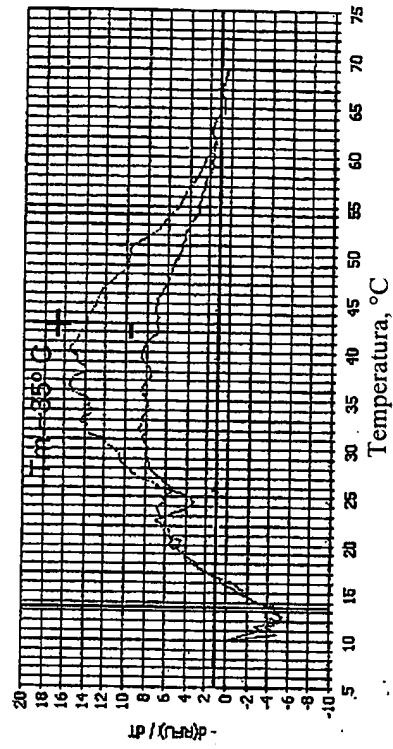
Oligod não biotinilados complementares



Oligos biotinilados complementares



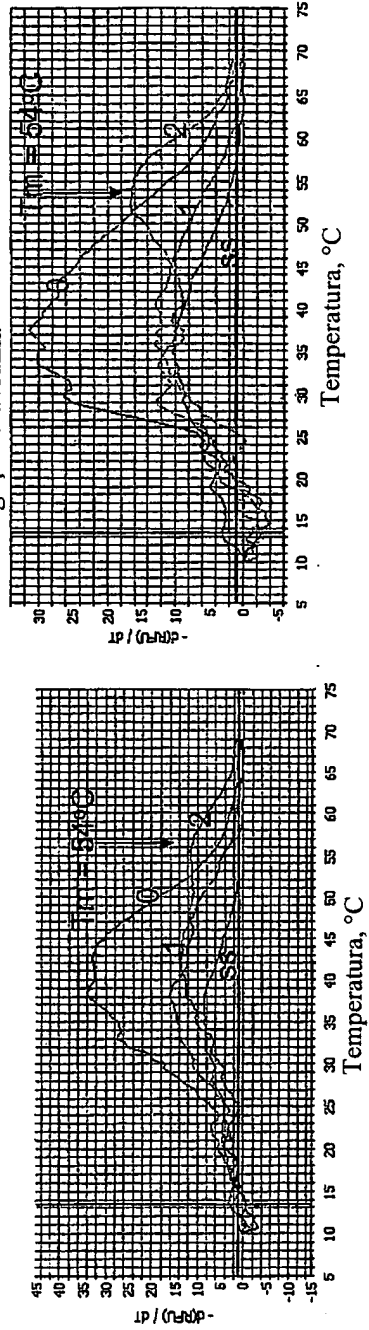
Oligos biotinilados parcialmente complementares



Curvas de Fusão Híbridas de DNA "Partida Aquecida" +/-
Avidina 100 nM oligos, 100 nM avidina, 25 nM sal

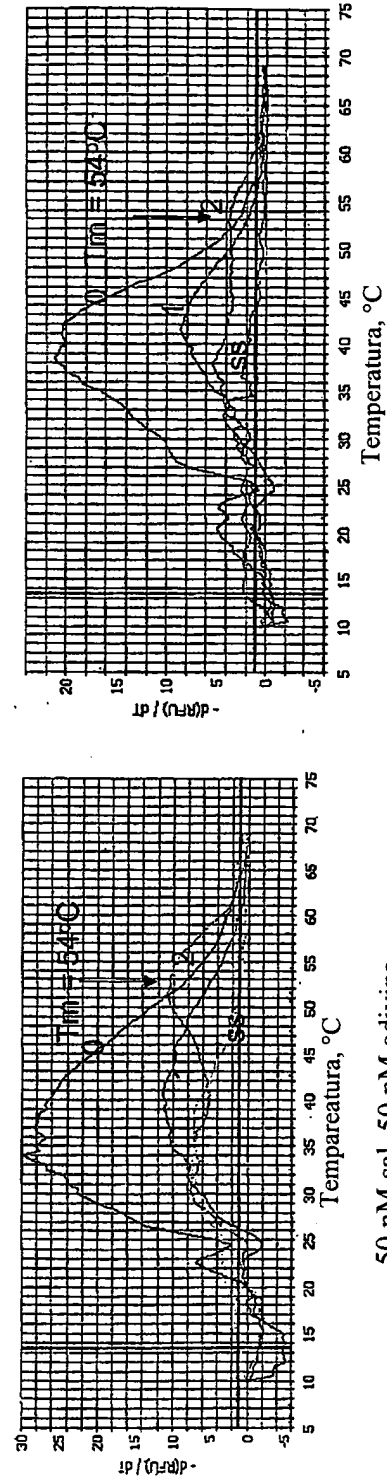
FIG. 18

Oligos biotinilados complementares

 T_m Aumnta de $\sim 35^\circ\text{C}$ a $\sim 54^\circ\text{C}$ mediante ligação a avidina

100 nM sal, 50 nM avidina

25 nM sal, 50 nM avidina



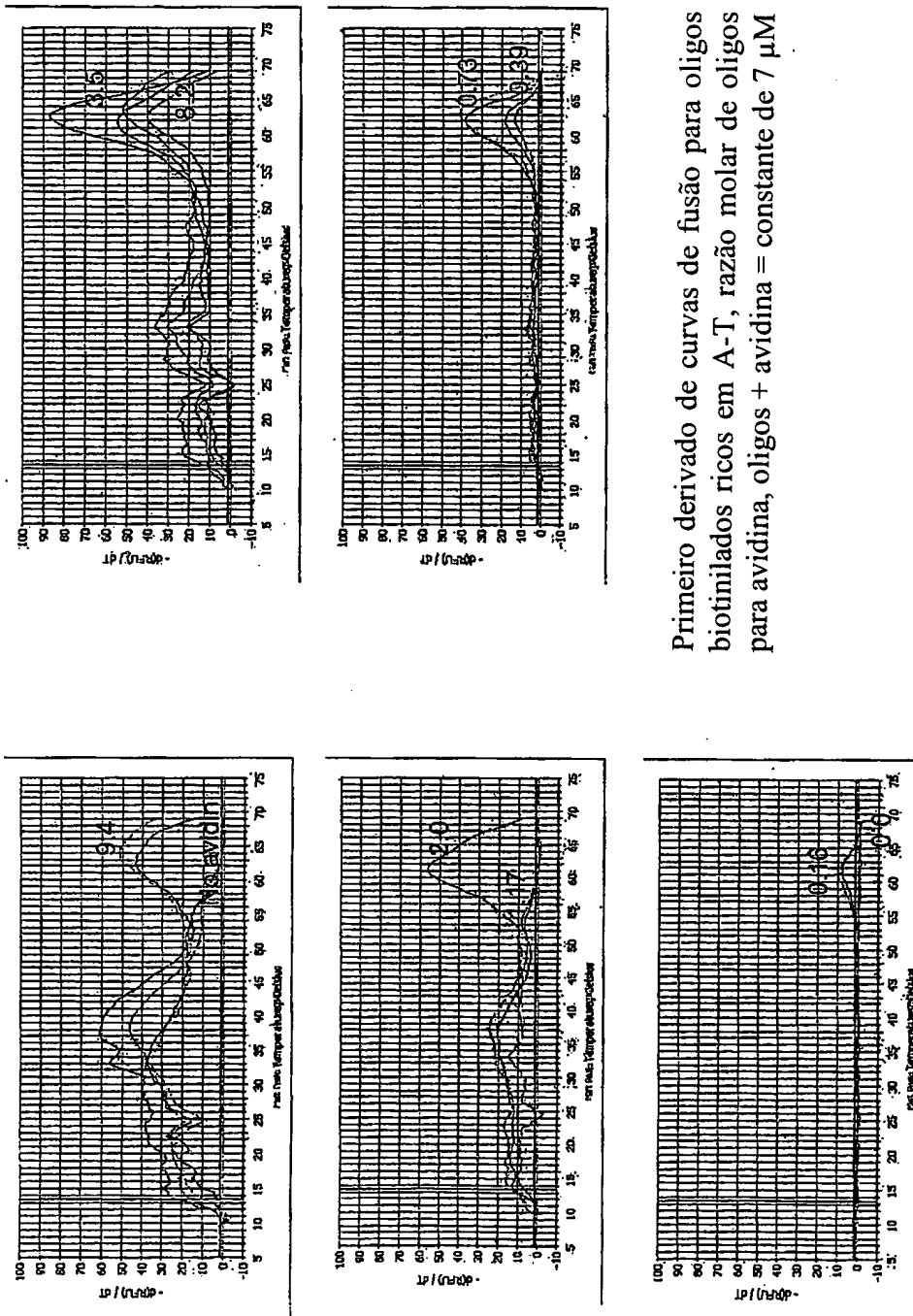
50 nM sal, 50 nM avidina

200 nM sal, 50 nM avidina

2 = ambas fitas biotiniladas, 1 = 1 fita de duas biotiniladas 0 = ambas fitas não biotiniladas, ss = apenas uma fita biotinilada.

Razões de oligo biotinilados em avidina

FIG. 20



Primeiro derivado de curvas de fusão para oligos biotinilados ricos em A-T, razão molar de oligos para avidina, oligos + avidina = constante de 7 μ M

FIG. 21

Curvas de Fusão de (-) oligos de biotina-fita 5' e 3' duplezados com biotina 5' (+) Fita oligo

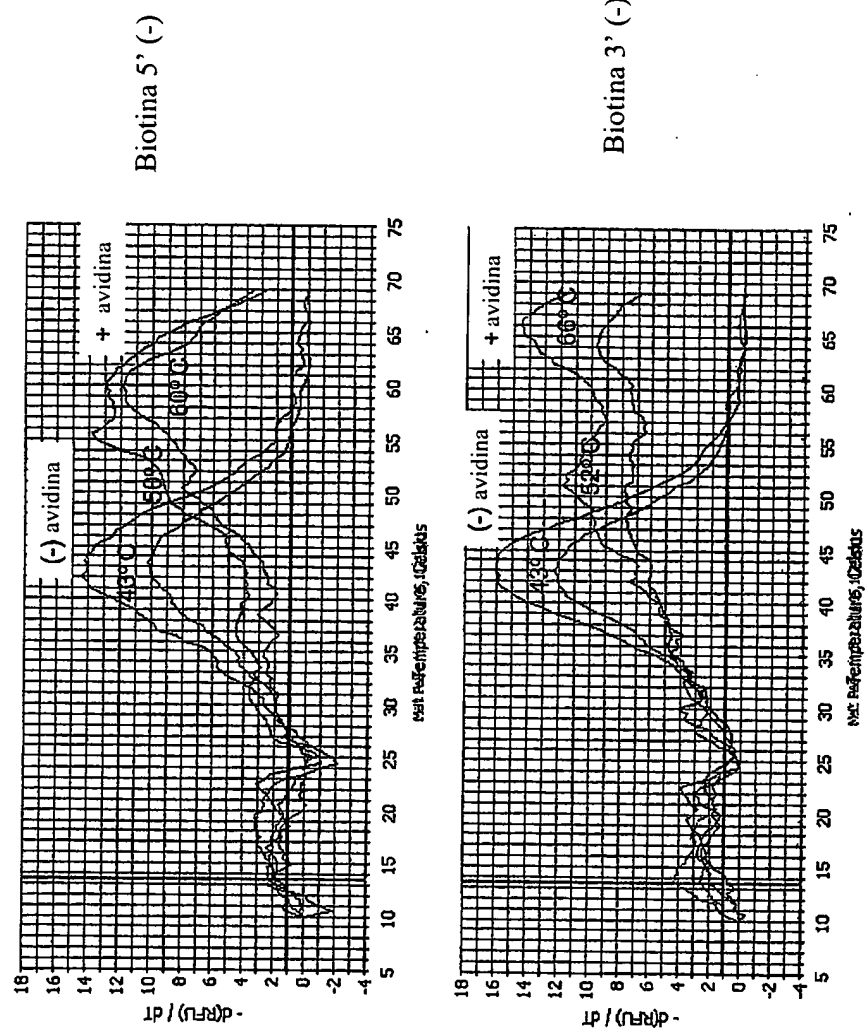
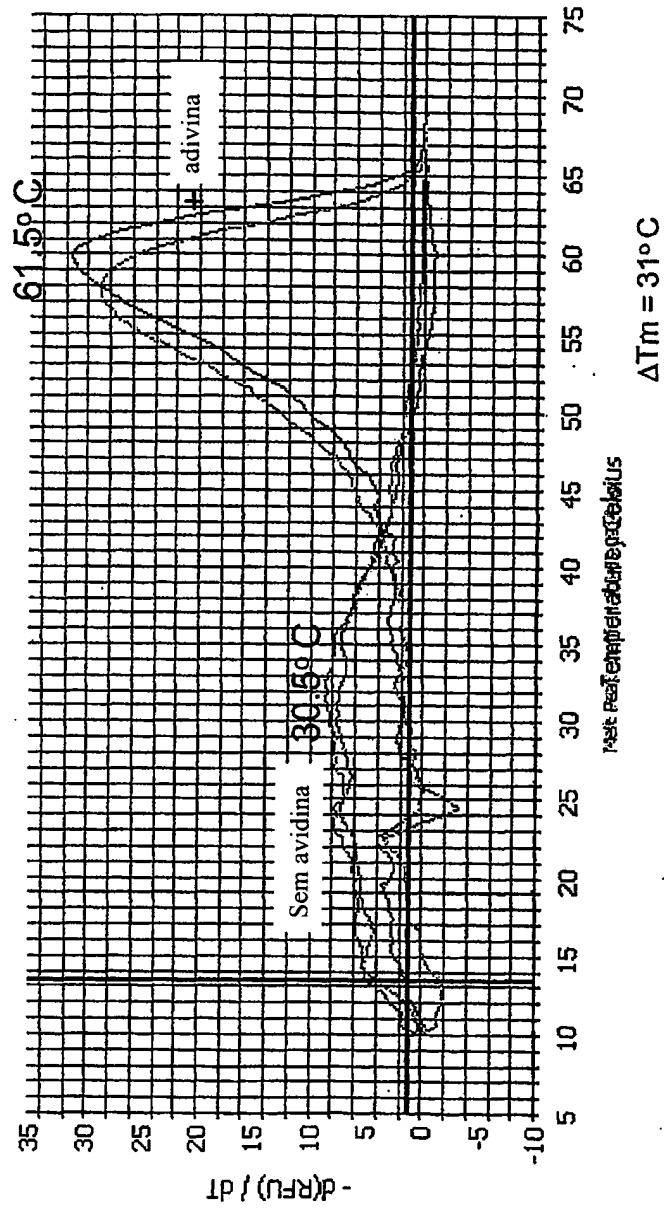


FIG. 22

Curvas de fusão de oligo dímeros biotinizados ricos em AT +/- Alvo

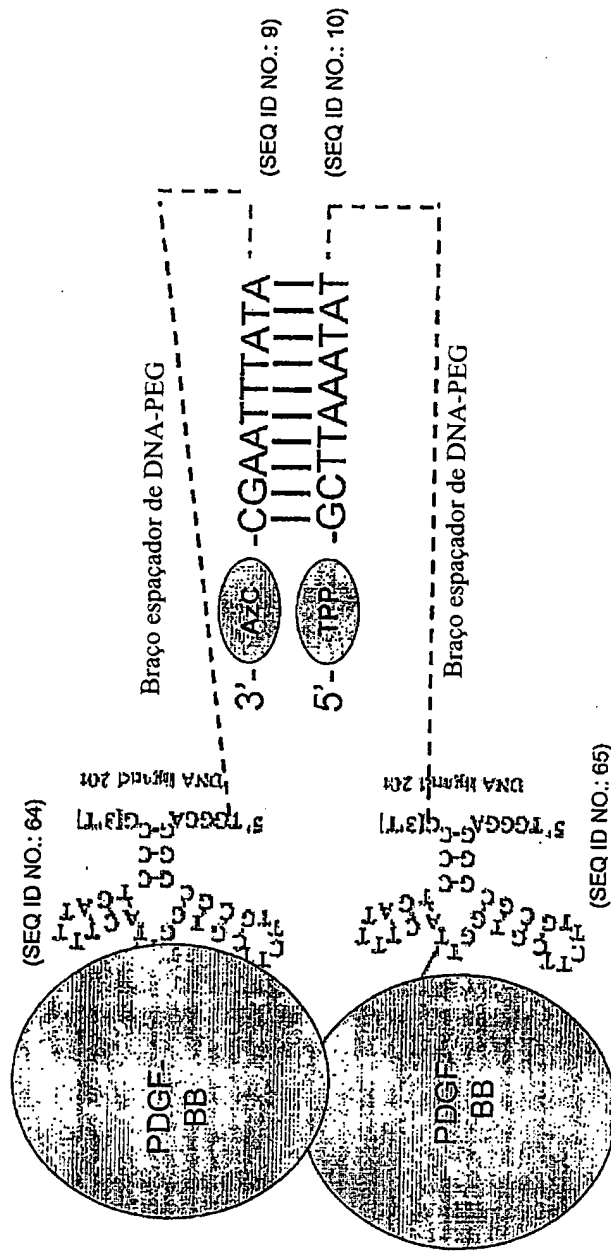


(+) 5' -TTTTTTTTTTTTTTAAATTAAA-3' (SEQ ID NO.: 27)

(-) 3' AAATTAAATTTTTTTTTTTTTTTT-5' (SEQ ID NO.: 27)

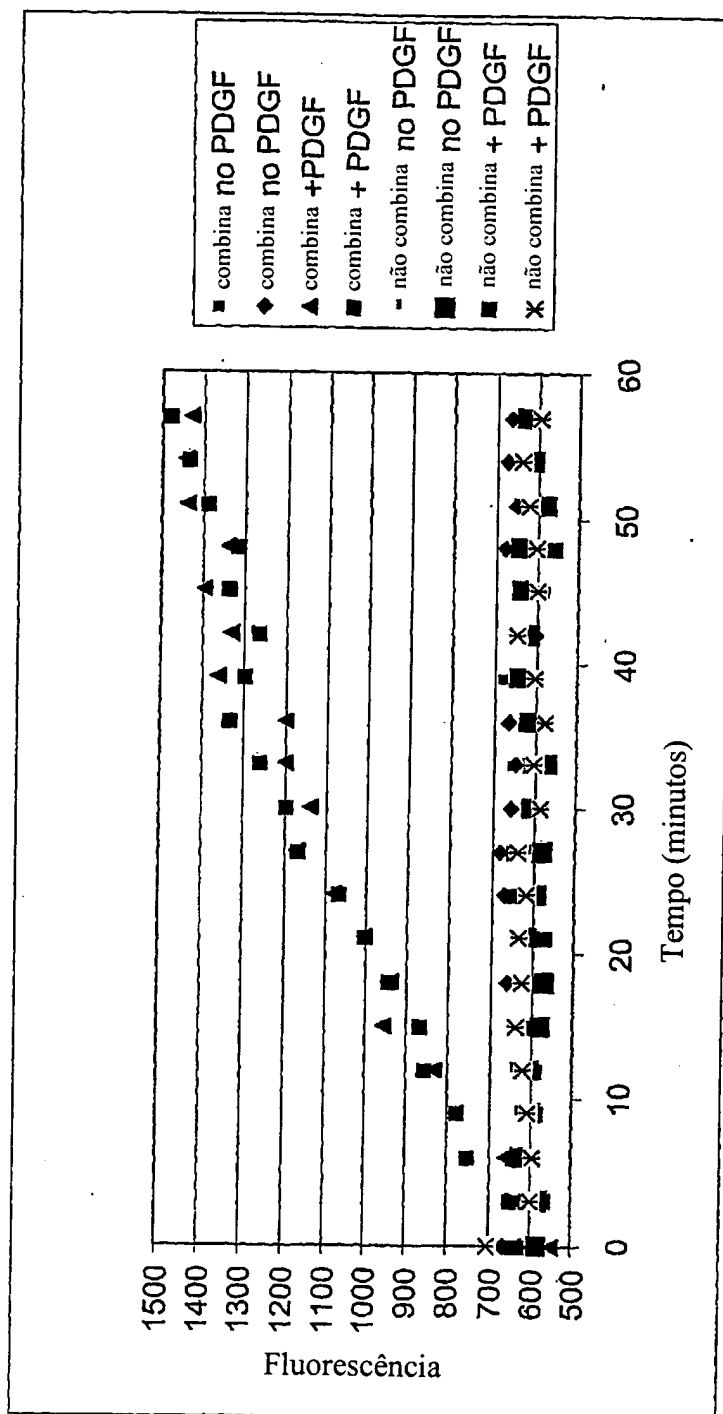
FIG. 23

Deteccão de PDGF-BB com aptâmero – oligonucleotídeos de DPC



- Aptâmeros para subunidades o tipo B de PDGF são conjugados em dois oligonucleotídeos diferentes, complementares, através de um braço espaçador DNA-PEG de fita simples.
- Os precursores de azidocoumarina e trifenilfosfina estão em uma estrutura helicoidal apenas quando a T_m for elevada pelos aptâmeros se ligando ao PDGF.

FIG. 24

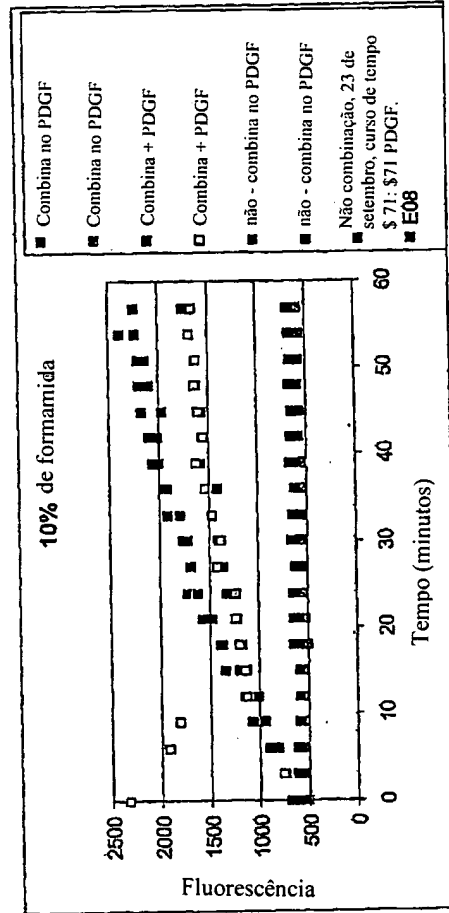
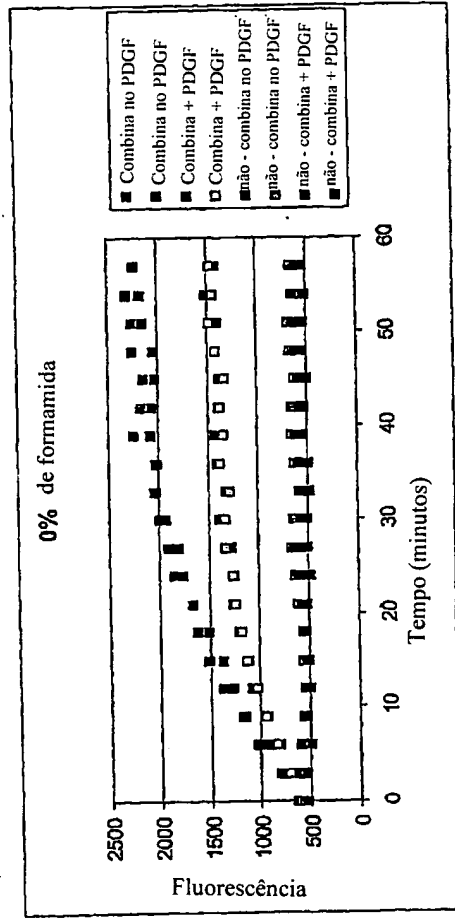


Reação das sondas de aptâmero para PDGF não corre

1) Na ausência de PDGF

2) Se a sonda de TPP não for combinada na sequência de DNA em relação à sonda Coumarina

Taxas na Formamida



Taxas na formamida

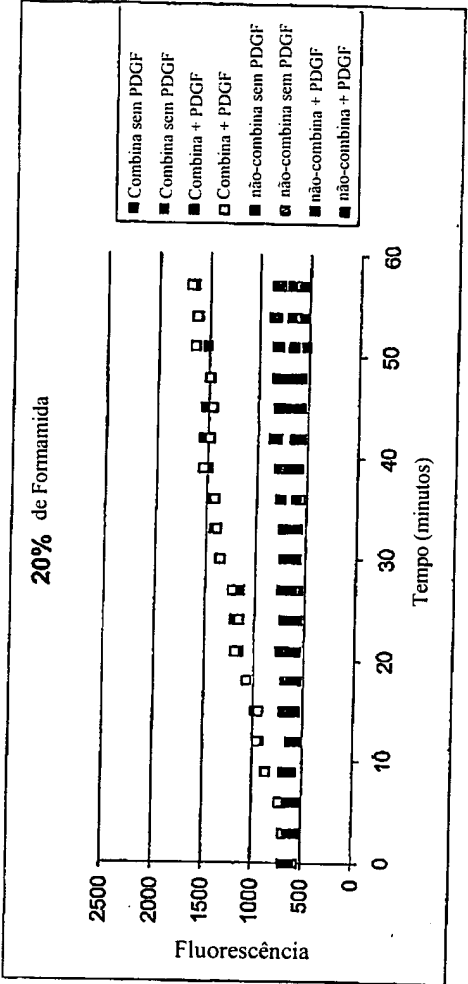


FIG. 26A

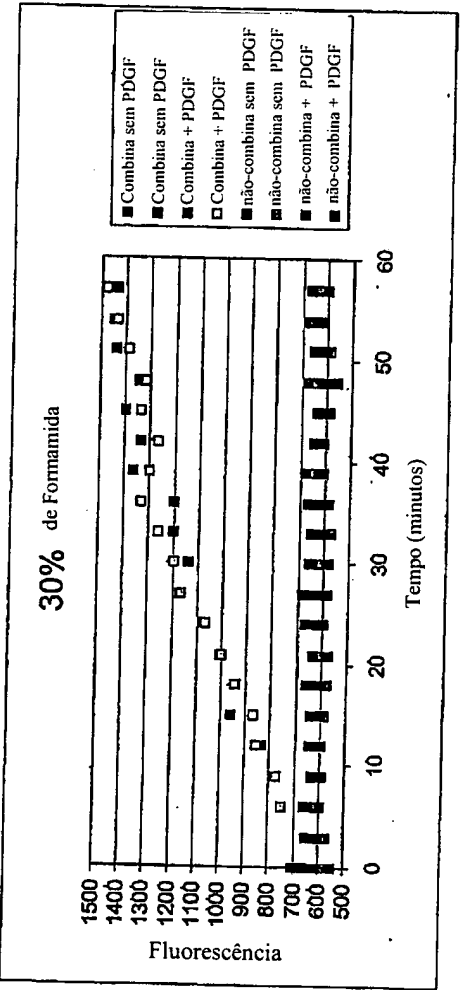


FIG. 26B

FIG. 27

Taxas na Formamida

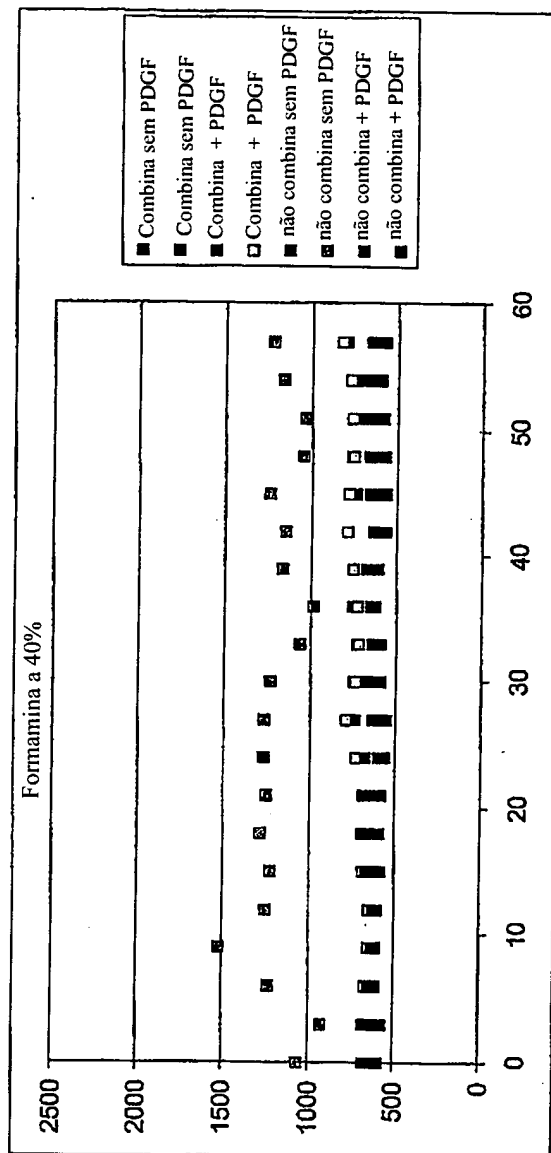


FIG. 28

Detecção de ensaio homogêneo de PDGF-AA com sondas de aptâmero -DPC

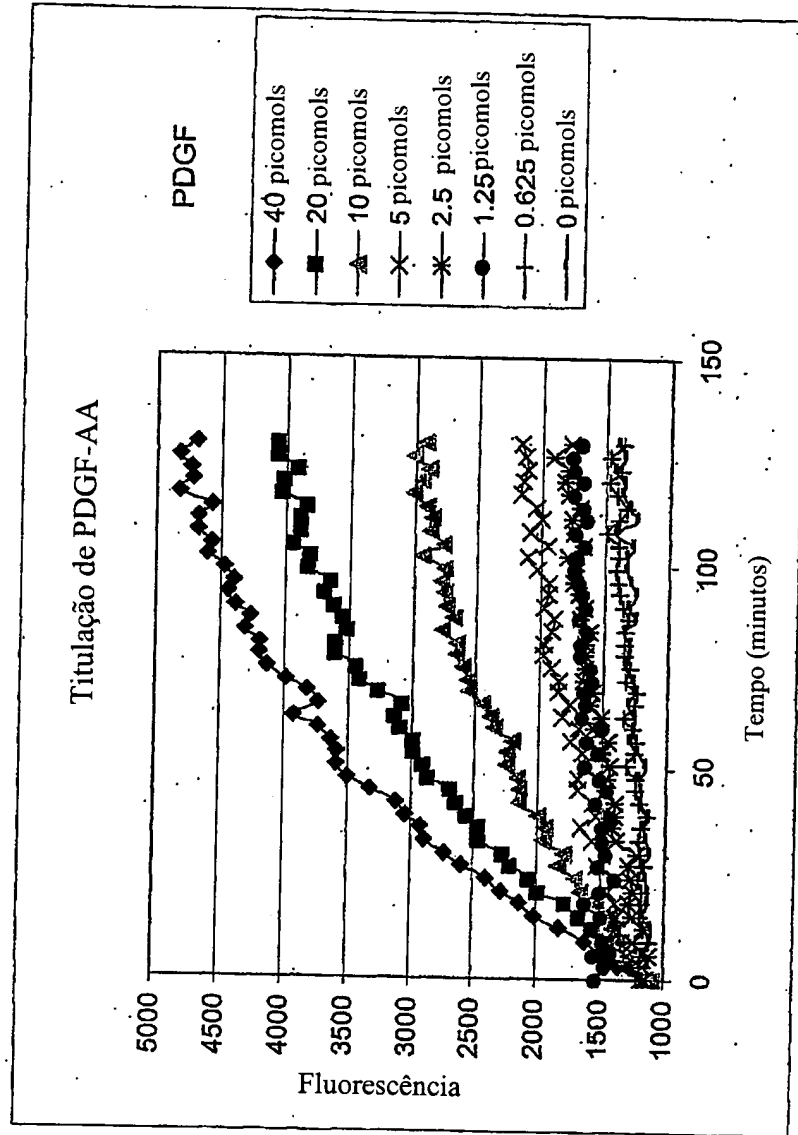


FIG. 29

Deteção de ensaio homogêneo de PDGF-AA com sondas de aptâmero-DPC

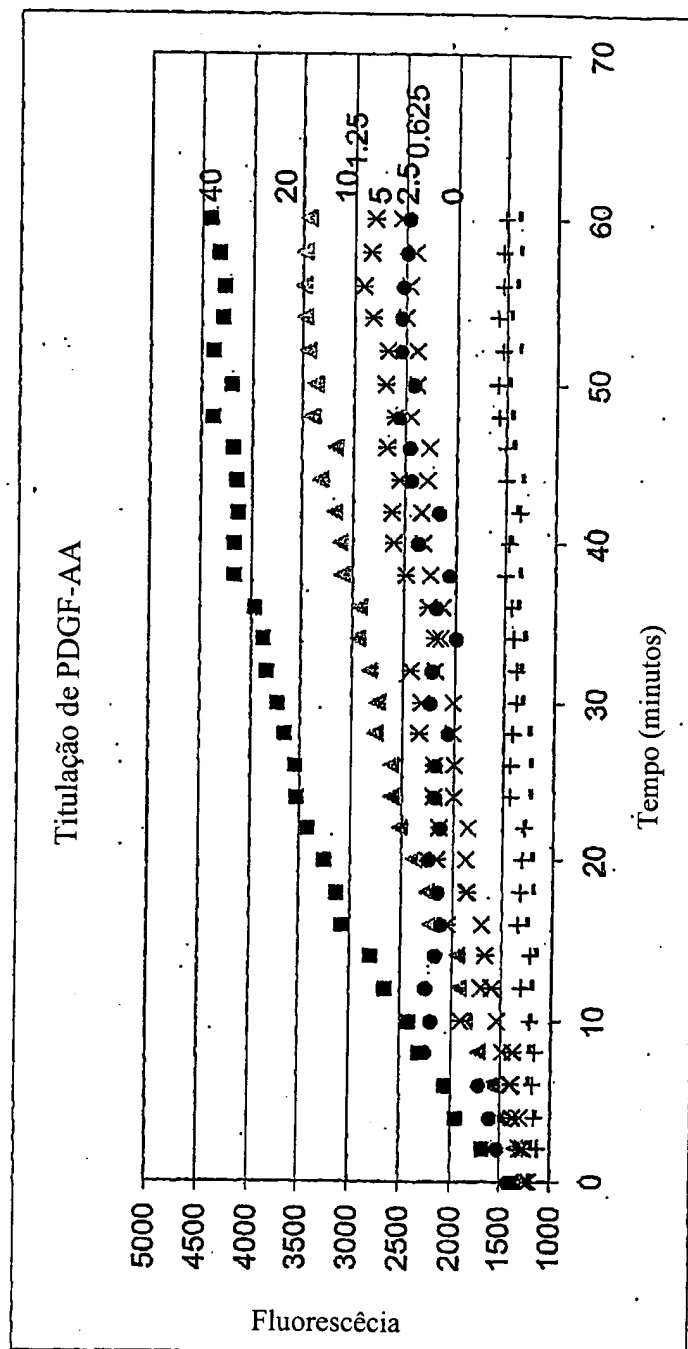


FIG. 30

Razão de Sondas TPP:AZC

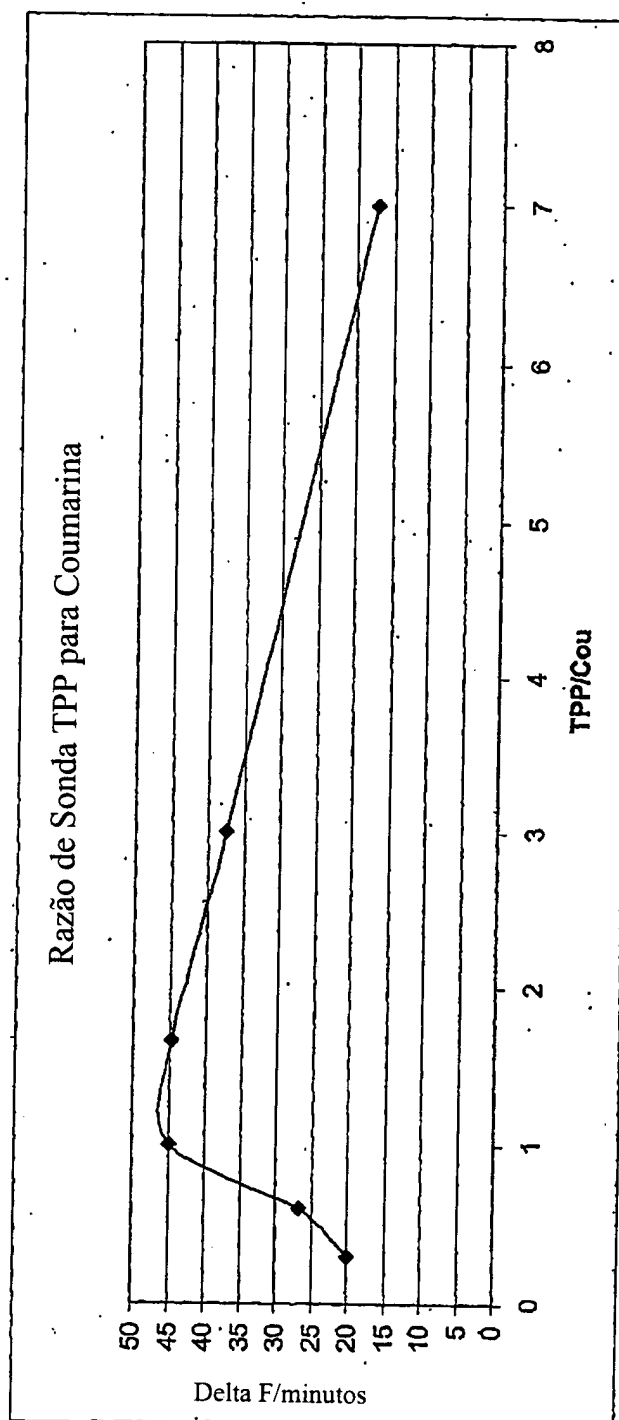
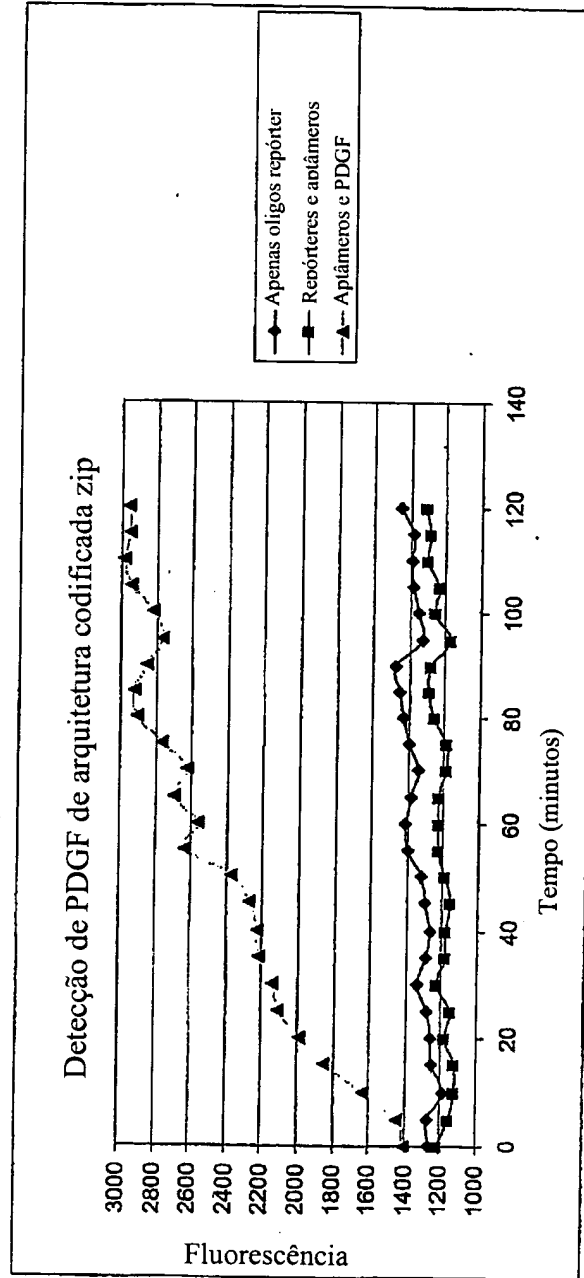
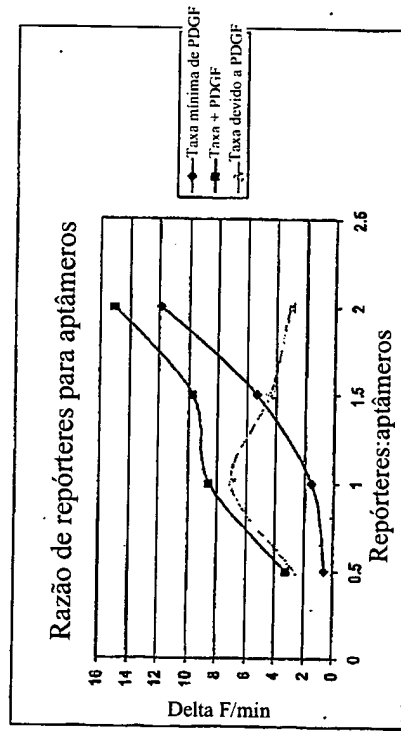
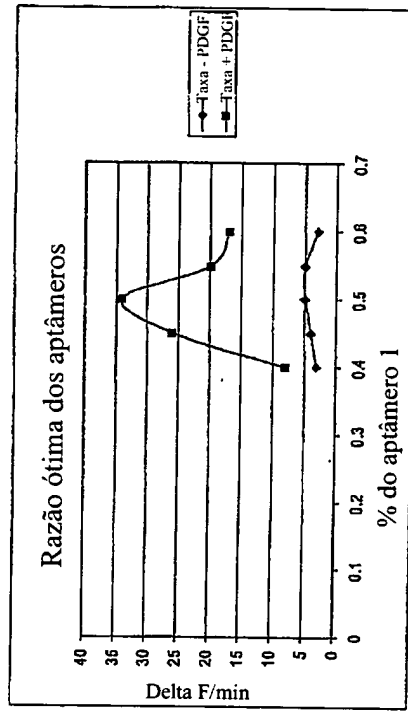


FIG. 31

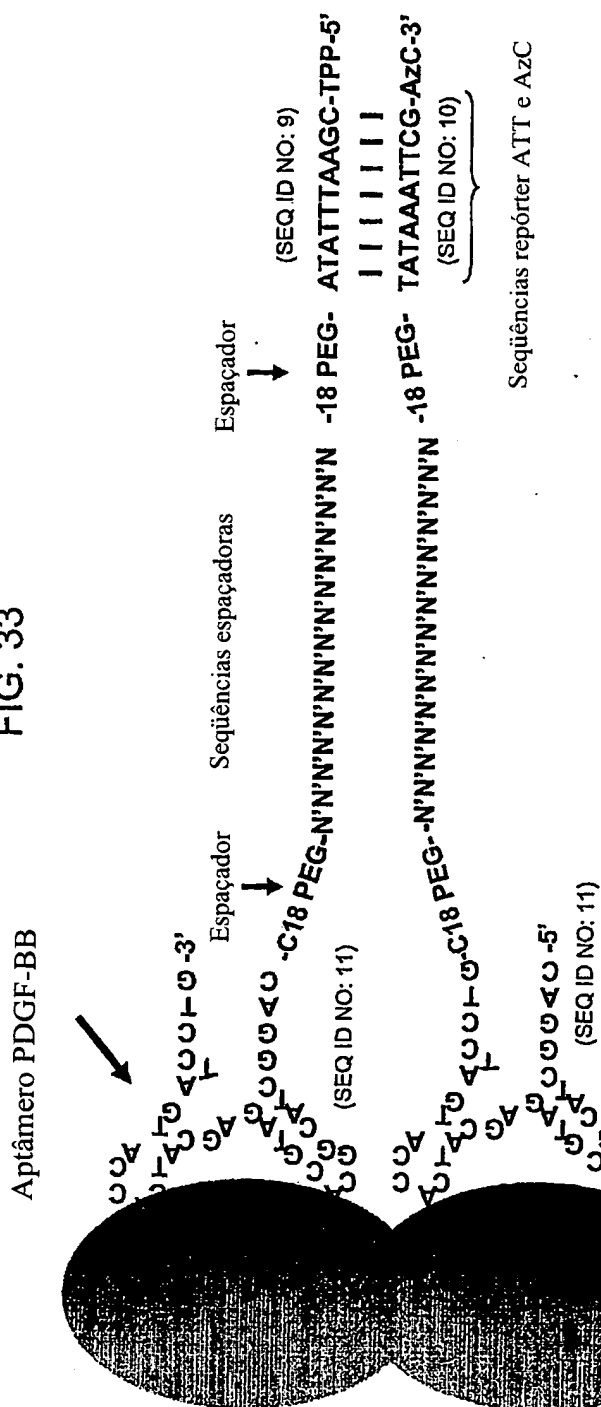


- Dependência da arquitetura mediante a presença de ambos oligonucleotídeos aptamero e repórter
- Todos reagentes foram testados em 0 ou 0,4 μ M de concentração, a 22°, em 50 nM Tris/HCL pH 8,5 – 10 nM MgCL₂ - formamida a 35% v/v
- A fluorescência foi medida em um Luminometro Wallac Victor com excitação a 350 nm e emissão a 460 nm

FIG. 32



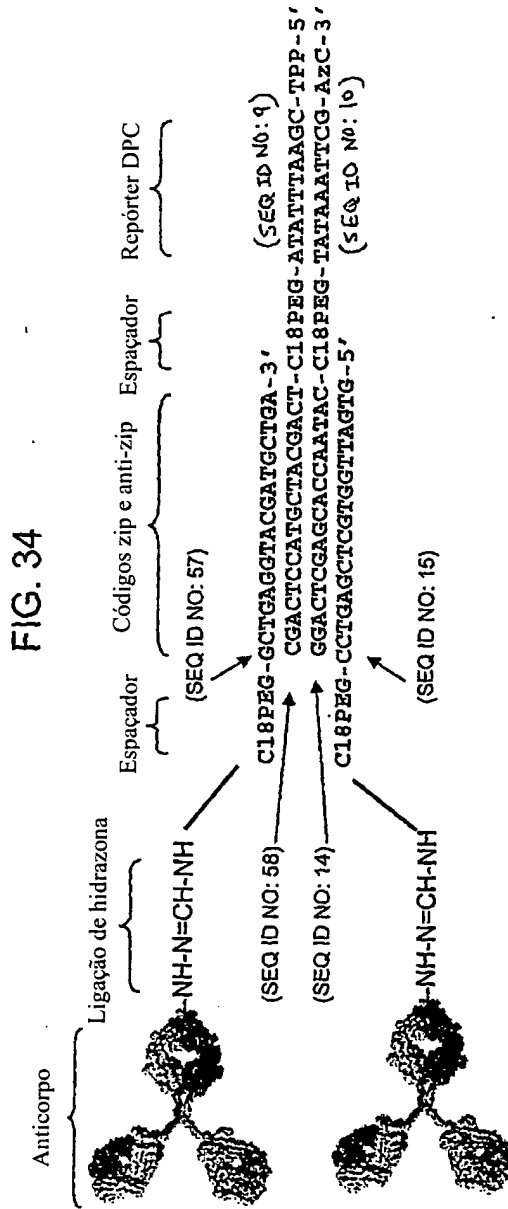
Taxas de reação em várias razões de oligonucleotídeos TPP para aptâmeros AzC (A) ou repórteres para aptâmeros (B).



Seqüências e alinhamentos exemplares para detecção de oligonucleotídeo de uma peça

Homodímero PDGF-BB

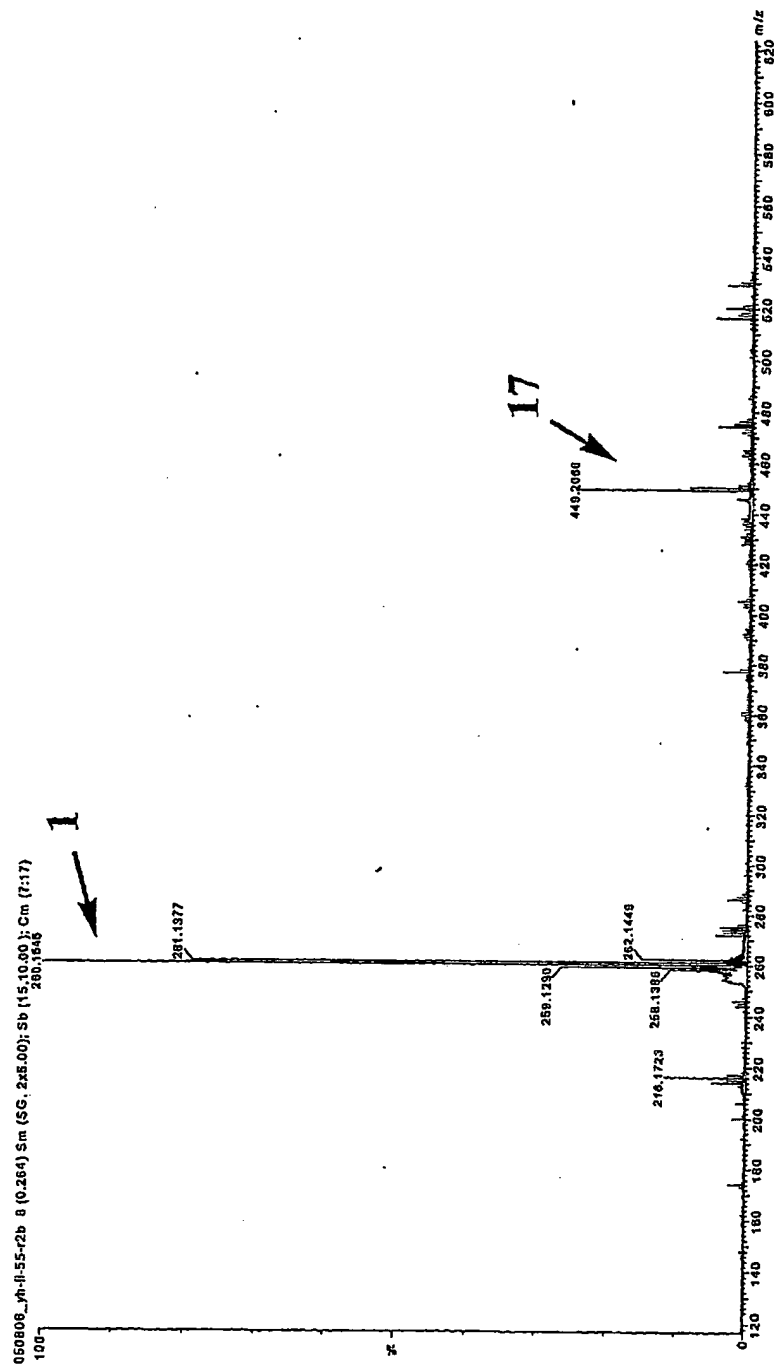
- As seqüências espaçadoras testadas nesse modelo eram as mesmas que as seqüências de código zip nos oligonucleotídeos aptâmeros na figura 10
- A seqüência superior é oligo número 104, a seqüência inferior é número 108. Essas duas seqüências não são complementares.



Conjunto Exemplar de Conjugados para Detecção codificados zip, ligados ao anticorpo

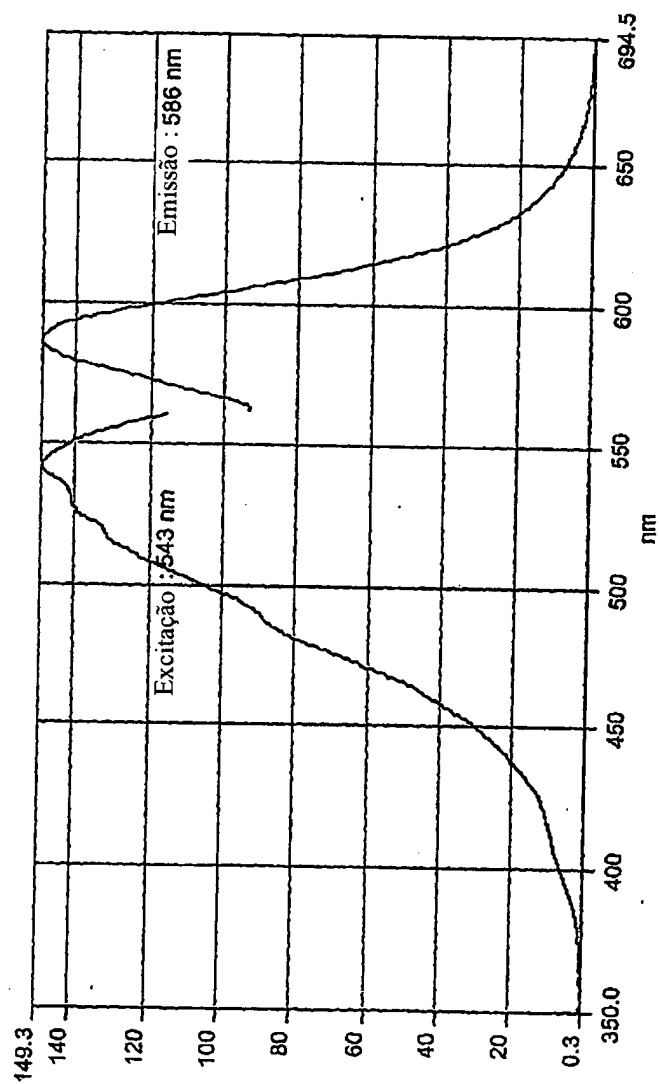
- Grupos amino primários nos anticorpos são ativados para hidrazinas e reagidos com oligonucleotídeos contendo aldeído 3' e 5' para formar ligações de hidrazona.
- Os dois oligonucleotídeos superior e inferior ligados aos anticorpos também contêm seqüências de código zip separadas, distanciadas do anticorpo por um braço espaçador C18
- Os dois oligonucleotídeos internos (oligonucleotídeos repórter) consistem em seqüências de código anti-zip ligadas através de um espaçador C18 PEG a um oligonucleotídeo repórter.
- Um oligonucleotídeo repórter contém um resíduo TPP de término 5', o outro um resíduo AzC de término 3'. Cada código zip é complementar apenas ao seu código anti-zip e as seqüências repórter DPC são complementares apenas uma a outra.

FIG. 35



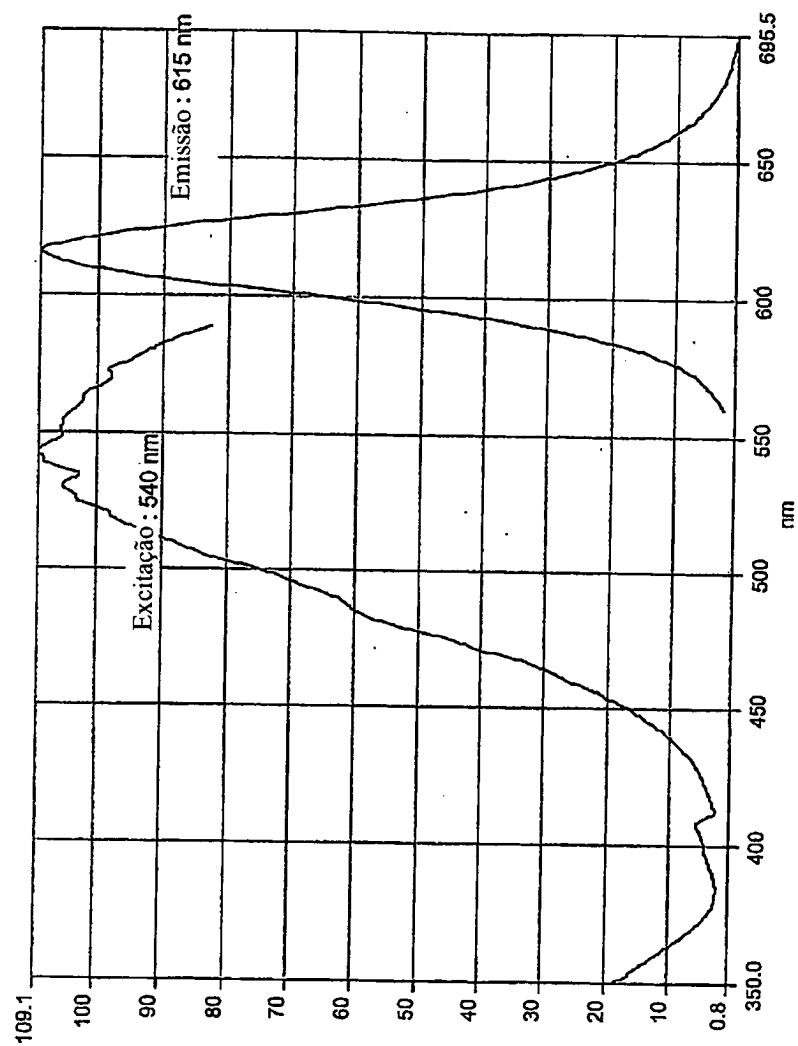
Espectro MALDI-MS da mistura de reação do composto 1 e 12 (modo positivo)

FIG. 36



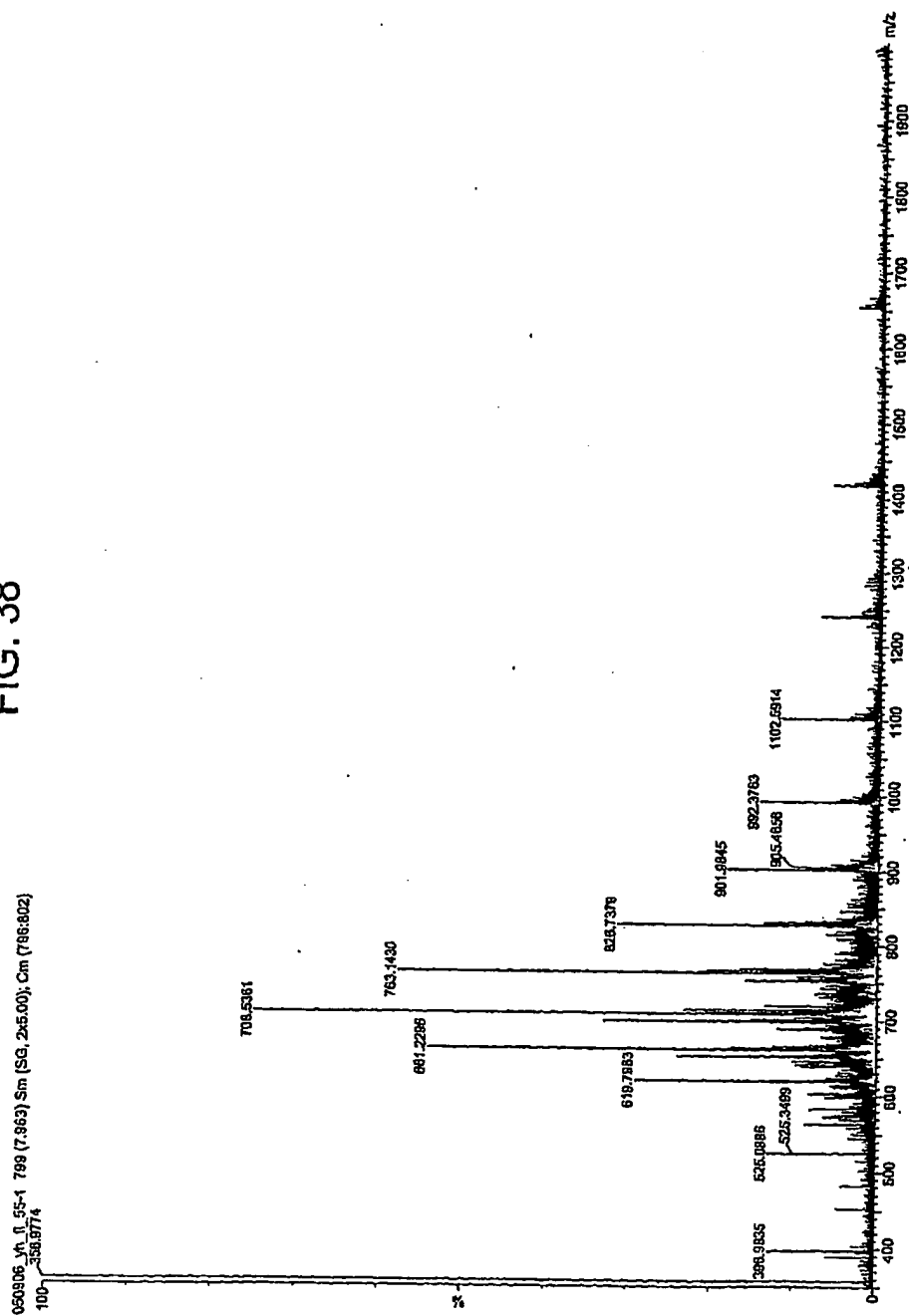
Espectros de absorção e emissão de fluorescência da mistura de reação do composto 1 e 12 em água.

FIG. 37



Espectros de absorção e emissão de fluorescência do composto 18 (10 μ M em Etanol).

FIG. 38



Dados de massa Electrospray do composto 19.

P1061474-1

RESUMO

"BIODETECÇÃO POR QUÍMICA MODELADA COM ÁCIDO
NUCLÉICO"

5 A invenção fornece composições e métodos para a
detecção de alvos biológicos (e.g., ácidos nucleicos e pro-
teínas) por química modelada com ácido nucléico, por exem-
plo, pela geração de sinais fluorescentes, quimiluminescentes
e/ou cromofórico.