



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

(21) **PI0618833-8 A2**

(22) Data de Depósito: 12/09/2006
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)



* B R P I 0 6 1 8 8 3 3 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C07H 21/00

(54) Título: POLINUCLEOTÍDEO CONTENDO UM FOSFATO MIMÉTICO

(30) Prioridade Unionista: 23/11/2005 EP 05 025499.4

(73) Titular(es): F. Hoffmann-La Roche AG

(72) Inventor(es): Dieter Heindl, Dirk Kessler

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006008842 de 12/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/059816 de 31/05/2007

(57) Resumo: OLINUCLEOTÍDEO CONTENDO UM FOSFATO MIMÉTICO. A presente invenção refere-se a oligonucleotídeos modificados e a processos para sua produção, em que esses oligonucleotídeos contêm, pelo menos uma vez, a estrutura P=N-Acc, onde Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R e R é qualquer substituinte orgânico.



PI0618833-8

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "POLINUCLEOTÍDEO CONTENDO UM FOSFATO MIMÉTICO".

A presente invenção refere-se a novas substâncias e processos para produção das mesmas no campo da química de nucleotídeo. Essas substâncias são chamadas de fosfatos miméticos, em que um grupo hidroxila é substituído por um mimético correspondente.

Em particular, a presente invenção refere-se a uma nova classe de oligonucleotídeos modificados e processos para sua produção.

Estado da Técnica

Diversos processos já foram anteriormente descritos para produzir nucleotídeos ou oligonucleotídeos com um resíduo de fosfato modificado.

(Desóxi)oligonucleotídeos sintéticos são normalmente preparados em uma fase sólida com a ajuda da química de fosforamidita. Pérolas de vidro com poros de tamanho definido são normalmente usadas como fase sólida (abreviado em seguida como CPG = vidro de poro controlado). O primeiro monômero é ligado ao suporte por um grupo de clivagem, de modo que o oligonucleotídeo livre possa ser clivado após completar a síntese de fase sólida. Além disso, o primeiro monômero contém um grupo hidroxila protegido, em cujo caso dimetoxitritila (DMT) é normalmente usado como grupo protetor. O grupo protetor pode ser removido mediante tratamento ácido. Depois, no terminal 5', derivados de fosforamidita de terminal 3' de (desóxi) ribonucleosídeos que são também providos de um grupo protetor DMT, são sucessivamente acoplados ao grupo reativo que é liberado em cada caso do grupo protetor de DMT em um processo cíclico. Alternativamente, fosforamiditas de terminal 5', protegidos por dimetoxitritila de terminal 3' são usados na síntese inversa de oligonucleotídeo. A estratégia de H-fosfonato é também usada para introduzir, em particular, modificações na estrutura principal do fosfato, por exemplo, para a preparação de fosforotioatos marcados radioativamente. Diversas estratégias já são também conhecidas para a preparação de oligonucleotídeos modificados ou marcados: materiais de suporte trifuncional são usados, de acordo com o estado da técnica, para pre

parar oligonucleotídeos marcados no terminal 3' (Patentes U.S. Nºs 5.290.925 e 5.401.837). Fosforamiditas marcadas em que o grupo de marcação é ligado à fosforamidita através de um ligante C3-12 são normalmente usadas para preparar oligonucleotídeos marcados no terminal 5' (Patentes U.S. Nºs 4.997.928 e 5.213.191). Adicionais modificações podem ser introduzidas nos oligonucleotídeos em bases individuais (Patentes U.S. Nºs 5.241.060, 5.260.433, 5.668.266) ou mediante introdução de ligantes não-nucleosídeos (Patentes U.S. Nos. 5.656.744 e 6.130.323).

Alternativamente, um fosfato de internucleosídeo pode ser marcado por meio de marcação pós-sintética de fosforotioatos (Hodges R.R., et al. *Biochemistry* 28 (1989) 261-7) ou por meio de pós-marcação de uma fosforamidita funcionalizada (Agrawal S., *Methods in Mol. Biology*, 26 (1993), *Protocols for Oligonucleotide Conjugates*, Humana Press, Totowa, NJ, Capítulo 3). Entretanto, esses métodos ainda não receberam aceitação devido à instabilidade das fosforamiditas e dos tioésteres de ácido fosfórico.

Também já é conhecido do estado da técnica que as modificações podem ser introduzidas no resíduo de fosfato internucleosídeo dos oligonucleotídeos. Nos casos mais importantes, tais resíduos são fosfotioatos (Burgers P.M., e Eckstein F., *Biochemistry* 18, (1979) 592-6), metilfosfonatos (Miller P.S., et al., *Biochemistry* 18 (1979) 5134-43) ou boranofosfatos (Patente WO 91/08213). Monômeros especiais têm de ser sintetizados a fim de preparar os oligonucleotídeos de metilfosfonato. Ao contrário, as fosforamiditas convencionais ou H-fosfonatos podem ser usados para sintetizar fosfotioatos e boranofosfatos, em cujo caso a modificação de borano ou de tio pode ser introduzida diretamente, durante ou após a síntese do oligonucleotídeo, mediante uso de reagentes especiais que reagem com o H-fosfonato trivalente ou com o triéster de ácido fosfônico. Embora todos esses métodos levem a oligonucleotídeos modificados, as exigências da química de síntese usada para isso não permitem marcações que possam ser detectadas dessa maneira ou grupos funcionais serem diretamente introduzidos na estrutura principal de fosfato da cadeia do oligonucleotídeo durante a síntese de oligonucleotídeo.

Baschang G. e Kvita V., *Angewandte Chemie* 85(1) (1973) 43-44 descrevem a reação de um nucleotídeo de triéster de ácido fosfórico com azidas, tais como, metilsulfonilazida, para preparar trialquil(aril)imidofosfatos que são, entretanto, instáveis e se decompõem.

5 Nielsen J. e Caruthers M.H., *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 6275-6276, descrevem a reação de fosfitos de desoxinucleosídeos providos com um grupo protetor de 2-ciano-1,1-dimetiletila, na presença de alquilazida. Além disso, os autores sugerem que este princípio seja adequado para a preparação de nucleotídeos que são modificados no resíduo de fosfato, sem
10 elucidar quais tipos de modificações preparadas com a ajuda do método descrito podem ter particulares vantagens. Particularmente, os autores sugerem a introdução de resíduos alquílicos.

O documento de patente WO 89/091221 descreve N-alkilfosforamiditas ou outros oligonucleotídeos substituídos por N-alkila em pelo
15 menos um resíduo de fosfato, que são preparados mediante oxidação de fosfitos de nucleosídeos (providos com um grupo protetor) com iodo, na presença de alquilaminas adequadas.

O documento de patente WO 03/02587 descreve a preparação de oligonucleotídeos modificados, em que os H-fosfonatos são convertidos
20 por aminação em fosforamidatos.

Assim, todas essas publicações descrevem a preparação de moléculas que contêm um fosforamidato ao invés de um resíduo de fosfato. No entanto, as moléculas contendo fosforamidato são suscetíveis de hidrólise, uma vez que o grupo amino é protonado em um ambiente ácido e depois
25 substituído por água.

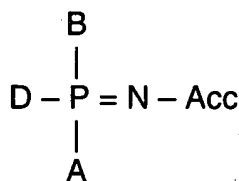
Além disso, o documento de patente WO 01/14401 propõe blocos de construção de nucleotídeos ou oligonucleotídeos, em que um resíduo de fosfato é substituído por N—ClO₃, N—NO₂ ou N—SO₂R. De acordo com o ensinamento do documento WO 01/14401, essas substâncias podem ser
30 preparadas mediante reação do grupo hidroxila de um desoxinucleosídeo com cloreto de amidofosfonila, na presença de piridina. Entretanto, esse tipo de preparação é complicado, dispendioso de tempo e inadequado para as

sínteses rotineiras de nucleotídeos e oligonucleotídeos.

O objeto técnico que forma a base da presente invenção é, portanto, de preparar oligonucleotídeos marcados aperfeiçoados e proporcionar um processo simples para sua preparação.

5 Breve Descrição da Invenção

Portanto, a presente invenção concerne um composto químico, o qual é preferivelmente um oligonucleotídeo contendo, pelo menos uma vez, a seguinte estrutura:



na qual:

- 10 - A representa o terminal 5' de um nucleotídeo ou de uma cadeia de nucleotídeos ou representa um ligante ligado a uma fase sólida; e
- B representa o terminal 3' de um nucleotídeo ou de uma cadeia de nucleotídeos ou representa um ligante;
- D é OH ou CH₃; e
- 15 - Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R, e R é qualquer substituinte orgânico.

O aceitador de elétrons Acc é preferivelmente selecionado do grupo que consiste em:

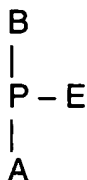
- CN;
- 20 -SO₂-R', em que R' contém pelo menos um grupo alquila substituído por amino, um grupo arila opcionalmente substituído ou um heterociclo opcionalmente substituído;

 e N⁺-heterociclos de seis membros deficientes de elétrons, em que pelo menos um átomo de nitrogênio é alquilado e localizado na posição *orto* ou *para* e onde esses heterociclos podem ser opcionalmente substituídos por R.

25

São particularmente preferidos os oligonucleotídeos em que R ou R' individualmente ou em combinação com o aceitador de elétrons contém uma unidade detectável ou um grupo funcional.

Esses oligonucleotídeos são preparados conforme a invenção por meio de processos que são caracterizados pelo fato de um derivado de fósforo trivalente, de estrutura química:

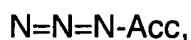


5 - em que E representa um grupo metila ou um grupo hidroxila protegido,

- em que A representa o terminal 5' de um nucleotídeo ou de uma cadeia de nucleotídeos ou representa um ligante ligado a uma fase sólida, e

10 - em que B representa o terminal 3' de um nucleotídeo ou de uma cadeia de nucleotídeos ou representa um ligante,

é reagido com uma azida da seguinte estrutura:



- em que Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R e R é qualquer substituinte orgânico.

15 O aceitador de elétrons Acc é preferivelmente selecionado do grupo que consiste em:

20 -CN, -SO₂-R e N⁺-heterociclos de seis membros deficientes de elétrons, em que pelo menos um átomo de nitrogênio é alquilado e localizado na posição *orto* ou *para* e onde esses heterociclos podem ser opcionalmente substituídos por R.

Em uma especial modalidade para produção de um oligonucleotídeo de acordo com a invenção:

a) uma 3'-fosforamidita é primeiro reagida com o terminal 5'-OH de uma cadeia nascente de oligonucleotídeos; e, em seguida,

25 b) reação de uma azida da seguinte estrutura:



em que Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R e R é qualquer substituinte orgânico.

São particularmente preferidos os processos em que R contém

uma unidade detectável ou um grupo funcional.

Os oligonucleotídeos de acordo com a invenção que são produzidos dessa maneira podem ser usados para todas as aplicações em que parceiros de hibridização em qualquer forma e, em particular, parceiros de hibridização derivatizados ou marcados são requeridos.

Em particular, esses oligonucleotídeos podem ser usados como sondas de hibridização para detectar certas seqüências-alvo.

Outro uso potencial concerne o uso de oligonucleotídeos modificados conforme a invenção, para inativação de expressão de gene na forma de oligonucleotídeos de anti-sentido ou siRNAs.

Descrição Detalhada da Invenção

O objetivo da presente invenção é produzir nucleotídeos e oligonucleotídeos de uma maneira simples, os quais contêm resíduos de fosfato modificados e, assim, podem também preferivelmente conter marcadores detectáveis.

A idéia central da presente invenção é no sentido de se começar com um átomo de fósforo trivalente e reagir o mesmo com um reagente, de tal modo que seja formado um fosfato mimético estável. De acordo com a invenção, um átomo de fósforo contendo pelo menos um resíduo hidroxila que é provido de um grupo protetor, é para esta finalidade reagido com uma azida tendo a estrutura $N=N=N-Acc$, em que Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R e R é qualquer substituinte orgânico. Isso resulta na formação de um átomo de fósforo pentavalente ao qual um grupo aceitador de elétrons de forte atração de elétrons é covalentemente ligado através de um átomo de N . Esse grupo garante que os compostos produzidos dessa maneira são, ao contrário dos compostos de fosforamidata conhecidos do estado da técnica, estabilizados por ressonância e não suscetíveis à hidrólise.

A idéia que fundamenta a invenção pode ser aplicada a todos os processos em que é formado fósforo trivalente como intermediário.

Durante a síntese convencional de oligonucleotídeo usando fosforamiditas, são formados triésteres de ácido fosfônico com um átomo de

fósforo trivalente como produtos intermediários. As primeira e segunda ligações de éster representam a ligação de internucleosídeo. O átomo de fósforo é ligado a um grupo hidroxila protegido, tal como, por exemplo, um grupo beta-cianoetilóxi, através da terceira ligação de éster. Ao invés de uma oxidação com iodo, o oligonucleotídeo nascente pode ser depois reagido conforme a invenção com uma apropriada azida no processo pelo qual o átomo de fósforo trivalente é oxidado a um átomo pentavalente mediante ligação covalente -N-Acc ao átomo de fósforo, durante a clivagem com nitrogênio.

A síntese de oligonucleotídeo pode depois ser subsequente-mente continuada conforme conhecido do estado da técnica. Oligonucleotídeos estáveis são obtidos como um produto final, sendo modificados de quase todas as maneiras em um ou mais resíduos de fosfato de internucleotídeo.

Definições

Dentro do escopo da presente invenção, alguns dos termos usados são definidos como segue.

O termo "grupo reativo" refere-se a grupos de uma molécula que são capazes de reagir sob condições adequadas com outra molécula, formando ao mesmo tempo uma ligação covalente. Exemplos de grupos reativos incluem grupos hidroxila, grupos amino, tiol, hidrazino, hidroxilamino, dieno, alcino e grupos de ácido carboxílico.

O termo "grupo protetor" indica moléculas que reagem com um ou mais grupos reativos de uma molécula, de modo que como parte de uma reação de síntese de múltiplas etapas, somente um grupo reativo particular não-protetido pode reagir com o desejado parceiro de reação. Exemplos de grupos protetores freqüentemente usados para proteger grupos hidroxila incluem beta-cianoetila, trialkilsilila e alila. Grupos protetores para proteção de grupos amino incluem trifluoroacetila e Fmoc. Outros possíveis grupos protetores se encontram resumidos em livros de texto padrões (Greene T.W., "Protective groups in organic synthesis"; Wiley Interscience Publications, John Wiley&Sons (1981) New York, Chichester, Brisbane, Toronto; Souveaux E., "Methods in Mol. Biology", Vol. 26, Protocols for Oligonucleotide Conjugates, Humana Press, Totowa, NJ, 1994, Capítulo 1, editor S. A-

gawal).

O termo "ligantes" indica cadeias de carbono tendo uma extensão de 1-30 átomos de carbono. Essas cadeias ligantes podem também adicionalmente apresentar um ou mais átomos internos de nitrogênio, oxigênio, enxofre e/ou fósforo. Os ligantes podem também ser ramificados, por exemplo, também serem dendríticos. A interconexão de um ligante com um nucleotídeo ou uma cadeia de nucleotídeos é feita com uma unidade detectável ou um grupo reativo, que é opcionalmente protegido por um grupo protetor.

Uma unidade detectável é entendida para indicar substâncias que podem ser detectadas com a ajuda de métodos analíticos. Essa unidade, por exemplo, pode consistir em unidades que podem ser detectadas por espectroscopia de massa, imunologicamente ou com a ajuda de RMN. As unidades detectáveis são, em particular, substâncias que também podem ser detectadas por métodos ópticos, tais como, fluorescência e espectroscopia de UV/VIS, tais como, fluoresceínas, rodaminas e partículas de ouro. Elas também incluem intercaladores e ligantes de fendas menores, os quais podem também causar efeito no comportamento de fusão e cuja fluorescência é modificada por hibridização.

O termo "fosforamiditas" indica moléculas contendo um átomo de fósforo trivalente que pode ser acoplado ao terminal 5' de um nucleosídeo ou derivado de nucleosídeo. Assim, as fosforamiditas podem ser usadas na síntese de oligonucleotídeo. Além das fosforamiditas de desoxirribonucleotídeo que são usadas para extensão de cadeia, existem também as fosforamiditas derivatizadas com um marcador que podem ser usadas em processos similares durante ou ao final de uma síntese de oligonucleotídeo, para marcar o oligonucleotídeo (Beaucage S.L., "Methods in Molecular Biology", 20 (1993) 33-61, ed. S. Agrawal; Wojczewski C., et al., Synlett, 10 (1999) 1667-1678).

Em conexão com a presente invenção, o termo "oligonucleotídeos" abrange não apenas (desóxi)oligorribonucleotídeos, mas, também, oligonucleotídeos que contêm um ou mais análogos de nucleotídeo com

modificações na estrutura principal do fosfato (tal como, por exemplo, metilfosfonatos, fosfotioatos), no açúcar (tal como, derivados de 2'-O-alquila, 3' e/ou 5'-aminorribose, LNA, HNA, TCA) ou bases modificadas, tais como, 7-deazapurina. Em tal contexto, a invenção também abrange conjugados e quimeras contendo análogos não-nucleosídicos; tais como, PNAs ou outros biopolímeros, por exemplo, peptídeos. Além disso, os oligonucleotídeos de acordo com a invenção podem também conter uma ou mais unidades não-nucleosídicas, tais como, espaçadores em cada posição, por exemplo, hexaetilenoglicol ou C_n (n=3,6) espaçadores.

10 O termo "aceitador de elétrons" abrange estruturas atômicas que possuem a tendência de se ligar a pares de elétrons livres. Uma medida para isso é a constante de Hammett. A presente invenção concerne, em particular, modalidades em que a constante de Hammett σ_p excede um determinado valor de 0,30, preferivelmente, 0,45 e, particularmente e preferivelmente, de 0,60.

O aceitador de elétrons deve, além disso, ser compatível com todas as reações químicas na síntese de oligonucleotídeo, isto é:

- não deve ser oxidado por iodo;
- deve ser inerte para o ácido dicloroacético e ácido tricloroacético, e
- deve ser inerte para bases e, em particular, para amônia, e
- não deve reagir com fosforamidatos trivalentes.

Exemplos de aceitadores de elétrons que atendem a essas condições são: -NO₂, SO₂-R, -CN, -CO-R, pirinidinila, piridinila, piridazinila, hexafluorofenila, benzotriazolila (Hansch C., et al., "Chem. Reviews", 91 (1991), 165-195). Além disso, esses aceitadores podem também ser ligados ao átomo de nitrogênio em um modo de ligação de vinila ou fenila.

O termo "substituído" significa que a estrutura que é referida como sendo substituída, contém outro resíduo em qualquer posição, desde que essa posição não seja definida em maiores detalhes. O termo "opcionalmente substituído" indica que a estrutura referida dessa maneira compreende modalidades com e sem adicional resíduo.

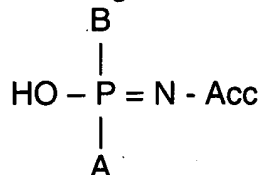
O termo "alquila substituído por amino" abrange C₁-C₃₀ alquila linear ou ramificada, contendo pelo menos um grupo amino, em que o grupo amino é protegido ou é ligado a uma unidade detectável através de um ligante.

5 O termo "N⁺-heterociclo de seis membros" abrange N-heterociclos que são alquilados em um nitrogênio sp², de modo que a carga global do heterociclo é positiva. Exemplos destes incluem piridínio, pirimidínio e quino-
línio. Esses heterociclos são conhecidos na técnica como sendo deficientes de elétrons.

10 O termo "cadeia de nucleotídeos" é entendido como uma molé-
cula ou parte de uma molécula contendo pelo menos dois resíduos de nu-
cleosídeo que são interligados nos terminais 5'-3' por uma porção de fosfato.

Compostos Químicos de acordo com a Invenção

15 A presente invenção compreende qualquer composto químico
contendo, pelo menos uma vez, a seguinte estrutura:



em que:

- A representa o terminal 5' de um nucleotídeo ou de uma cadeia
de nucleotídeos ou representa um ligante ligado a uma fase sólida; e
- B representa o terminal 3' de um nucleotídeo ou uma cadeia de
20 nucleotídeos ou representa um ligante, e

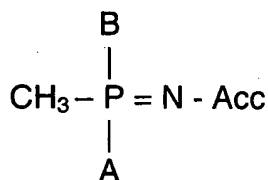
- Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons
substituído por um resíduo R e R é qualquer substituinte orgânico. O resíduo
deve ser ainda compatível com todas as reações químicas que ocorrem na
síntese de oligonucleotídeo, isto é:

25 - não deve ser oxidado por iodo;
- deve ser inerte para o ácido dicloroacético e ácido tricloroacéti-
co, e
- deve ser inerte para bases e, em particular, para amônia, e
- não deve reagir com fosforamidatos trivalentes.

Os resíduos que são inicialmente per si incompatíveis, podem, entretanto, ser convertidos em derivados que se comportam de modo inerte sob condições químicas de síntese de oligonucleotídeo, mediante uso de grupos protetores conhecidos para alguém versado na técnica.

5 Deve ser também entendido por um versado na técnica que os grupos -OH do oligonucleotídeo estão normalmente presentes em uma condição desprotonada.

Além disso, a presente invenção também compreende fosfonatos de metila da seguinte estrutura:



10 com as definições fornecidas acima.

Em uma primeira modalidade preferida, o composto químico da presente invenção é um oligonucleotídeo. Nesse oligonucleotídeo, A representa o terminal 5' de um nucleotídeo ou de uma cadeia de nucleotídeos e/ou B representa o terminal 3' de um nucleotídeo ou uma cadeia de nucleotídeos. Assim, A e B juntos compreendem pelo menos dois resíduos de nucleotídeo.

15 Dependendo do uso pretendido do oligonucleotídeo, as estruturas descritas acima podem ocorrer uma vez, duas vezes ou diversas vezes ou mesmo em todos os resíduos de fosfato presentes no oligonucleotídeo.

20 Os resíduos de fosfato dentro do oligonucleotídeo são chamados de fosfatos de internucleosídeo, de modo que:

- A representa o terminal 5' de um primeiro nucleosídeo, e
- B representa o terminal 3' de um segundo nucleosídeo dentro da cadeia de nucleotídeo.

25 Além disso, as estruturas de acordo com a invenção podem ser localizadas no terminal 3' ou terminal 5' de um oligonucleotídeo. Caso elas estejam presentes no terminal 5' do oligonucleotídeo, então:

- A representa o terminal 5' da cadeia do nucleotídeo, e
- B representa um grupo hidroxila opcionalmente protegido ou

um ligante que pode opcionalmente conter um grupo detectável ou outro grupo reativo e pode ser usado para introduzir um grupo detectável no oligonucleotídeo.

5 Se o aceitador de elétrons contiver um substituinte que também representa uma unidade detectável, um oligonucleotídeo estando presente, conforme a invenção, poderá realizar uma dupla marcação no terminal 5'.

Se a estrutura de acordo com a invenção ocorrer no terminal 3' de uma cadeia de nucleotídeos, então:

- B representará o terminal 3' do dito oligonucleotídeo, e
- 10 - A será hidroxila ou um ligante ligado a uma fase sólida, em que a fase sólida será preferivelmente controlada por partículas de poros de vidro, tais como, aquelas que são usadas como material de partida para a síntese rotineira de oligonucleotídeo.

Os nucleosídeos individuais dentro dos oligonucleotídeos de acordo com a invenção, podem conter qualquer tipo de nucleosídeos ou nucleosídeos modificados ou derivados de nucleosídeos. As unidades de açúcar são normalmente desoxirribose para oligonucleotídeos de DNA ou ribose para oligonucleotídeos de RNA. As nucleobases contidas nos oligonucleotídeos de acordo com a invenção podem ser bases de ocorrência natural, tais como, adenina, guanina, timidina, citidina, uridina, derivados das mesmas ou as chamadas bases universais, como nitroindol. Os oligonucleotídeos de acordo com a invenção podem conter quaisquer grupos aceitadores de elétrons que sejam ligados através de uma ligação de amida ao respectivo fosfato. Em particular, os seguintes grupos aceitadores de elétrons podem ser usados:

- a) -CN,
- b) -SO₂-R', em que R' contém pelo menos um grupo alquila substituído por amino, um grupo arila opcionalmente substituído ou um heterociclo opcionalmente substituído;
- 30 c) N⁺-heterociclos de seis membros deficientes de elétrons, em que pelo menos um átomo de nitrogênio é alquilado e localizado na posição *orto* ou *para* e onde esses heterociclos podem ser opcionalmente substituí-

dos por R.

A invenção também compreende ainda modalidades de $\text{SO}_2\text{-R}'$, em que R' , tal como, alquila substituída por amino, é uma arila opcionalmente substituída ou um heterociclo opcionalmente substituído.

5 A presença dos ditos aceitadores de elétrons dentro dos oligonucleotídeos de acordo com a invenção resulta em oligonucleotídeos modificados que podem ser usados para uma ampla variedade de aplicações. Entretanto, todos os aceitadores de elétrons que podem conter qualquer resí-
10 nucleotídeos modificados contendo quaisquer resíduos orgânicos serem preparados de uma maneira simples dentro do escopo dos processos de síntese descritos no presente pedido de patente.

Conseqüentemente, a presente invenção concerne, em particular, também os oligonucleotídeos em que um aceitador de elétrons substituí-
15 do por um resíduo R contém uma unidade detectável como R ou, alternativamente, contém um grupo funcional como R, ao qual uma unidade detectável pode ser acoplada após a síntese do oligonucleotídeo mediante pós-marcação. Alternativamente, a presente invenção também compreende mo-
20 dalidades em que o aceitador de elétrons é um componente da unidade detectável. Alternativamente, o resíduo R pode ser a própria unidade detectável ou um grupo funcional.

Esses oligonucleotídeos marcados podem ser usados, de forma vantajosa, em numerosas e diferentes aplicações na biologia molecular, tal como, em PCR de tempo real. A marcação detectável, preferivelmente, é um
25 corante fluorescente ou uma molécula de rápida fluorescência. Corantes correspondentes e moléculas que podem servir como uma unidade detectável para oligonucleotídeos são bem-conhecidos para aqueles versados na técnica. Exemplos dos mesmos não-limitativos do escopo de proteção da presente invenção são: fluoresceínas, rodaminas, cianinas, merocianinas, carbocianinas e compostos azo e poliazó.
30

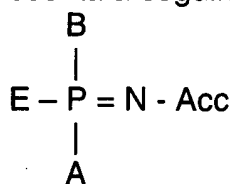
A presente invenção também concerne sondas de PCR em tempo real tendo a estrutura descrita acima, em que pelo menos uma marcação

fluorescente é ligada ao átomo de fosfato da cadeia de oligonucleotídeos por meio de um grupo amida aceitador de elétrons. Exemplos de tais sondas são as sondas de hibridização FRET (documento de patente WO 97/46707) ou as chamadas sondas de marcação única (documento de patente WO 02/14555). Em tal contexto, as sondas de oligonucleotídeos em que existe uma modificação interna de acordo com a invenção em um resíduo de fosfato de internucleosídeo são particularmente preferidas.

Nesse contexto, a presente invenção também particularmente concerne oligonucleotídeos de dupla marcação que apresentam duas unidades detectáveis. Exemplos de tais sondas são os sinais moleculares (Patente U.S. No. 5.118.801) das sondas TaqMan (Patente U.S. No. 5.804.375). Nesse contexto, a presente invenção concerne oligonucleotídeos de dupla marcação em que uma primeira marcação fluorescente é ligada a um átomo de fosfato de internucleosídeo da cadeia de oligonucleotídeos por meio de um grupo amida aceitador de elétrons e uma segunda unidade detectável se faz presente terminantemente no terminal 5' ou terminal 3' do oligonucleotídeo.

As moléculas que apresentam essas marcações e métodos para sua preparação são bem-conhecidas dos especialistas versados na técnica.

Em um adicional aspecto, a presente invenção é dirigida para um composto químico que apresenta a seguinte estrutura:



em que:

- A representa um ligante ligado a uma fase sólida;
- B representa um ligante que, preferivelmente, é veículo de um grupo reativo protegido ou uma unidade detectável;
- E é um grupo metila ou um grupo hidroxila protegido;
- Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R e R é qualquer substituinte orgânico.

Com relação a B, o grupo reativo protegido preferido é um grupo

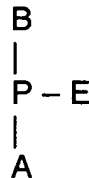
hidroxila protegido por dimetoxitritila (DMT). Com relação a E, o grupo protetor preferido é um grupo beta-cianoetila.

5 Tal composto pode ser usado como material de partida para síntese de oligonucleotídeo, em que o fosforamidato seguinte reage com o restante grupo hidroxila do dito composto. Além disso, no caso de A representar um ligante trifuncional com uma ligação extra, é possível se produzir um oligonucleotídeo com dupla marcação no seu terminal 3', caracterizado pelo fato de que uma marcação é introduzida através do substituinte de Acc e a segunda marcação é introduzida através de uma adicional porção conectada
10 ao ligante.

Produção de Oligonucleotídeos de acordo com a Invenção

A presente invenção também concerne processos para produção de oligonucleotídeos modificados e, em particular, processos para produção dos oligonucleotídeos que foram descritos acima.

15 Em geral, a presente invenção concerne processos para produção de oligonucleotídeos modificados, que são caracterizados pelo fato de que um derivado de fósforo trivalente de estrutura química:



em que:

20 - E representa um grupo metila ou um grupo hidroxila protegido, que, preferivelmente, é protegido por um grupo beta-cianoetila;

- A representa o terminal 5' de um nucleotídeo ou de uma cadeia de nucleotídeos ou representa um ligante ligado a uma fase sólida; e

- B representa o terminal 3' de um nucleotídeo ou uma cadeia de nucleotídeos ou representa um ligante;

25 é reagido com uma azida da seguinte estrutura:



em que Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R e R é qualquer substituinte orgânico.

Grupos protetores particularmente preferidos incluem beta-

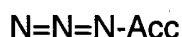
cianoetila, metila, alila ou silila. Alternativamente, os compostos de metilfosfonato podem ser produzidos, de acordo com a invenção, em que E representa CH_3 .

De acordo com a invenção, as azidas podem conter quaisquer grupos aceitadores de elétrons. Esses grupos são depois ligados ao respectivo átomo de fósforo. Em particular, os seguintes grupos aceitadores de elétrons podem ser usados:

- a) -CN,
- b) $-\text{SO}_2\text{-R}$,
- 10 c) N^+ -heterociclos de seis membros deficientes de elétrons, em que pelo menos um átomo de nitrogênio é alquilado e localizado na posição *orto* ou *para* e onde esses heterociclos podem ser opcionalmente substituídos por R.

O processo de acordo com a invenção pode ser também rotineiramente usado, em particular, em uma síntese convencional de oligonucleotídeo. Assim, a presente invenção também concerne um processo que compreende as seguintes etapas:

- a) reação de 3'-fosforamidita com o terminal 5'-OH de uma cadeia nascente de oligonucleotídeo;
- 20 b) reação com uma azida da seguinte estrutura:



onde Acc representa um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R e R é qualquer substituinte orgânico.

Nesse caso, o terminal 5'-OH da cadeia nascente de oligonucleotídeos pode ser o terminal 5' de um nucleotídeo de terminal 5' ou o grupo OH livre de um ligante fixado a um CPG.

A química convencional de oligonucleotídeo começa em um material suporte reativo de fase sólida. O material reativo de fase sólida se refere a substâncias poliméricas que formam uma fase sólida contendo um grupo reativo sobre o qual outras moléculas podem ser imobilizadas. No caso de síntese de oligonucleotídeos, o material suporte consiste normalmente em pérolas de vidro poroso com um tamanho de poro definido, chamadas de

partículas de vidro de poro controlado (CPG). Alternativamente, é também possível se utilizar resíduos de poliestireno e de outros polímeros e copolímeros orgânicos (Ghosh P. K., et al., J. Indian. Chem. Soc. 75 (1998) 206-218). Caso os oligonucleotídeos devam permanecer imobilizados após a síntese no substrato, podem ser usados vidro e também chips semicondutores como material suporte de fase sólida. Os materiais suporte de fase sólida são comercialmente disponíveis.

O suporte pode ser ligado por meio do chamado grupo ligante contendo uma ligação que pode ser clivada ao terminal do resíduo hidroxila reativo protegido por um grupo protetor, tal como, DMT (dimetoxitritila). Um grupo ligante com uma ligação que pode ser clivada indica aqueles grupos que se encontram entre o espaçador trifuncional e o material suporte de fase sólida e podem ser clivados por uma simples reação química. Exemplos de tais grupos incluem succinila ou oxalila ou outros grupos ligantes contendo uma ligação de éster que pode ser clivada. Outros grupos ligantes são conhecidos para aqueles versados na técnica (Ghosh P. K., et al., J. Indian. Chem. Soc. 75 (1998) 206-218).

Esses grupos ligantes são essenciais para o uso do material suporte para sintetizar os oligonucleotídeos que são pretendidos de estarem presentes na solução aquosa após a concretização da síntese. Se, ao contrário, o oligonucleotídeo deve permanecer sobre a superfície do material suporte após a síntese, como no caso da produção de sistemas de ácido nucléico (Patente U.S. No. 5,624,711, Shchepinov M.S., et al., Nucl. Acids. Res., 25 (1997) 1155-1161), grupos ligantes cliváveis são desnecessários, sendo preferidos grupo ligantes não-cliváveis.

Os detalhes de uma síntese de oligonucleotídeo para a incorporação de estruturas de acordo com a invenção são como segue.

Um grupo reativo hidroxila, no qual uma extensão de cadeia na direção dos terminais 3'-5' pode ocorrer, é formado após a remoção do grupo protetor DMT por tratamento ácido. Em seguida, derivados de 3'-fosforamidita de (desoxi)ribonucleosídeos que são também providos com um grupo protetor DMT e adicionais grupos protetores de base bem-conhecidos

na técnica, são sucessivamente acoplados ao terminal 5' em cada grupo reativo liberado do grupo protetor DMT, na presença de tetrazol. Um intermediário contendo um átomo de fósforo trivalente é formado nesse processo como um produto intermediário que forma uma ligação de éster com cada um dos nucleosídeos que são ligados pela reação e uma terceira ligação de éster com um grupo hidroxila protegido que já está presente na fosforamidita que é usada. Esse grupo protetor que, por exemplo, pode ser formado por beta-cianoetila, metila, alila ou silila, é subsequenteclivado com amônia, após concretização da síntese do oligonucleotídeo no processo, a partir do qual os grupos protetores de base e o ligante ao GPC são também clivados.

Ao invés de oxidação com a ajuda de iodo, o oligonucleotídeo nascente é reagido, de acordo com a invenção, com uma azida da seguinte estrutura:



nas posições em que os compostos miméticos do fosfato devem ser introduzidos na cadeia de nucleotídeo, onde Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R e R é qualquer resíduo orgânico. A química de síntese descrita permite a incorporação basicamente de quaisquer resíduos R e, em particular, a incorporação de qualquer tipo de corante fluorescente.

A preparação das azidas de Acc, tais como, azidas de acila e azidas de sulfonila é simples e conhecida há longo tempo (Consultar a análise de: Bräse S., et al., *Angewandte Chemie* 117, (2205), 5320-5374, 3.4 e 3.5.2). Tais azidas são referivelmente preparadas a partir de cloretos de acila ou cloretos de sulfonila, usando azidas de sódio ou a partir de hidrazidas usando ácido nitroso.

Corantes à base de azida de sulfonila são, por exemplo, também usados em processos de tingimento (por exemplo, documento de patente DE 19650252). A azida de cianogênio pode ser simplesmente produzida mediante reação de azida de sódio com bromocianogênio em acetonitrila (McMurry J.E., et al., *J. Organic Chemistry* 38(16) (1973) 2821-7). As azidas

heteroarílicas podem ser preparadas mediante substituição nucleofílica de um halogênio por azida ou a partir de hidrazinas heteroarílicas. Um pré-requisito é que o nitrogênio atrativo de elétron se encontre na posição *para* ou *orto* em relação ao grupo azido, uma vez que somente assim é formado um fosfato mimético estabilizado por ressonância. As azidas *orto* e *para* N-alkuil-piridínio são particularmente adequadas em tal contexto. Algumas azidas de acila, sulfonila e piridila são também comercialmente disponíveis.

A presente invenção adicionalmente concerne processos conforme descrito acima, em que o resíduo R é uma unidade detectável. R é preferivelmente um corante fluorescente ou uma molécula de rápida fluorescência.

Certas modalidades da presente invenção concernem a preparação de sondas de oligonucleotídeo de dupla marcação, em que uma marcação é preferivelmente introduzida internamente no oligonucleotídeo, de acordo com o processo da invenção, e outra marcação é introduzida no oligonucleotídeo, preferivelmente, nos terminais 5' ou 3', de acordo com um método conhecido do estado da técnica.

No caso de uma marcação 5' na posição 5' da ribose do nucleotídeo de terminal 5', a incorporação é executada por meio de métodos convencionais, usando uma fosforamidita marcada por corante ao final da síntese do oligonucleotídeo (Beaucage, S.L., *Methods in Molecular Biology* 20 (1993) 33-61, S. Agrawal Publishers).

A marcação no terminal 3' é realizada mediante uso de CPG comercialmente disponível como suporte de fase sólida reativo, já contendo uma marcação detectável além do grupo hidroxila tritilado. Após a clivagem do grupo protetor DMT, a síntese-padrão de oligonucleotídeo pode ser iniciada no grupo hidroxila que está agora livre.

Alternativamente, podem ser usados métodos conhecidos do estado da técnica para pós-marcação de uma adicional marcação 5' ou 3' (Patentes U.S. N^{os} 5.002.885 e 5.401.837).

A presente invenção também concerne intermediários de síntese, os quais podem ser preparados antes da síntese-padrão de oligonucleo-

tídeo. Nesse caso, os intermediários que ainda estão ligados à fase sólida e não estão ainda desprotegidos, podendo conter grupos espaçadores básicos, são os preferidos. Os CPGs que são familiares para aqueles versados na técnica, como o CPG de fosfato, são preferivelmente usados para a preparação, uma vez que se forma um oligonucleotídeo fosforilado em 3' após a síntese do oligonucleotídeo. Após a detritilação, esses CPGs de fosfato são reagidos com uma fosforamidita espaçadora, na presença de um ativador. O intermediário de fósforo trivalente que se forma é depois reagido com uma azida de Acc contendo uma unidade detectável. Esses intermediários de síntese podem ser armazenados e usados como CPGs trifuncionais para marcação 3' de caráter universal.

A presente invenção também concerne a síntese de fosforamiditas contendo um grupo N-Acc protegido, ao invés, por exemplo, de oxigênio protegido por beta-cianoetila, a fim de possibilitar a formação de fosforotioatos de N-Acc ou de miméticos de fosfato de bis-N-Acc a serem sintetizados. Tal estratégia de síntese é adequada em casos individuais, por exemplo, para preparação de oligonucleotídeos contendo P=N-CN.

Um intermediário de fósforo trivalente é também formado durante a síntese de metil-fosfonatos, o qual pode ser reagido com as azidas. Os compostos de metil-fosforamiditas são também comercialmente disponíveis.

Em uma estratégia de síntese inversa, (documento de patente EP 1 155 027), a qual é usada para oligonucleotídeos-padrão, assim como, em particular, para análogos, por exemplo, para síntese de oligonucleotídeos N3' -> P5', um intermediário contendo um fósforo trivalente é também formado, o qual pode ser reagido, conforme a invenção, com as azidas. As fosforamiditas correspondentes são comercialmente disponíveis.

Espectro de Aplicações

A estratégia de síntese de acordo com a invenção permite a preparação de uma ampla variedade de oligonucleotídeos modificados na estrutura principal de fosfato. O grau de modificação, a diversidade e a carga das modificações são determinadas pelo uso pretendido.

Por exemplo, os oligonucleotídeos de acordo com a invenção

podem ser usados para hibridizar com DNA e RNA naturais, por exemplo, para captura ou detecção. Os oligonucleotídeos contendo miméticos de fosfato de P-N=Acc, individualmente ou como quimeras com fosfatos normais, podem também ser usados com sucesso como iniciadores em reações de amplificação.

Essas sondas de oligonucleotídeos constituem a base para diversas aplicações, por exemplo, PCR em tempo real, FISH, técnicas de Blot, seqüenciamento (Jung P.M., et al., "Nucleic Acid Amplification Technologies BioTechniques Books", Div. Eaton Publishing (1997), Editors H.H. Lee, S.A. Morse, O. Olsvik; Bustin Stephen A. e Nolan Tania. "Chemistries IUL Biotechnology Series" (2004), 5(A-Z of Quantitative PCR, 215-278).

Os oligonucleotídeos marcados de acordo com a invenção são particularmente adequados como sondas marcadas de modo fluorescente em diversos formatos de PCR em tempo real.

Duas sondas marcadas são normalmente usadas para o formato de sinal molecular (Patentes U.S. Nos. 5.118.801) e para o formato de sonda de TaqMan (Patentes U.S. Nos. 5.210.015, 5.538.848 e Patentes U.S. Nos. 5.487.972, 5.804.375), em que uma marcação é preferivelmente introduzida internamente e uma segunda marcação se encontra localizada nos terminais 5' ou 3' da sonda. É especialmente vantajoso marcar internamente as sondas usando um processo de acordo com a invenção como parte de uma síntese de oligonucleotídeo, baseado na química de fosforamidita. A segunda unidade detectável nos terminais 5' ou 3' da sonda pode também ser introduzida na sonda correspondente por meio de um dos processos descritos na invenção ou com a ajuda de processos conhecidos do estado da técnica.

Uma sonda marcada no terminal 5' e uma sonda marcada no terminal 3' são normalmente usadas para o formato de sonda de hibridização de FRET (Matthews J.A., e Kricka L.J., "Analytical Biochemistry", 169, (1988), 1-25), (Bernard P.S., et al., "Analytical Biochemistry", 255, (1998), 101-107). Nesse caso, é particularmente vantajoso se realizar a marcação no terminal 5' da sonda usando um processo de acordo com a invenção, como parte de uma síntese de oligonucleotídeo baseada na química de fos-

foramidita.

A presente invenção permite a oligonucleotídeos funcionalizados serem preparados de uma maneira simples, em que o aceitador de elétrons Acc é modificado por um resíduo R, o qual contém um grupo funcional que é adequadamente protegido para a síntese do oligonucleotídeo. Se este resí-
5 duo for um grupo amino ou hidroxilamino, então, ele pode ser usado para preparar, por exemplo, sistemas de oligonucleotídeos mediante marcação de superfícies modificadas por epóxi (Seliger H., et al., "Current Pharmaceutical Biotechnology", 4, (2003), 379-395). Ao contrário, grupos tiol podem ser u-
10 sados para imobilização em superfícies de ouro ou partículas de ouro. Nesse caso, é particularmente vantajoso, de acordo com a invenção, quando diversos grupos tiol são introduzidos de uma maneira simples, a fim de se obter uma ligação estável de uma sonda de captura na superfície de ouro. Se um grupo OH protegido for incorporado como grupo funcional, então, oligonu-
15 cleotídeos ramificados ou dendríticos podem também ser preparados.

Tais grupos funcionais e, em particular, grupos amino, podem também ser usados para preparar oligonucleotídeos marcados, mediante reação dos mesmos com um éster ativo de um corante, após a síntese do oligonucleotídeo. Entretanto, é mais vantajoso se introduzir a unidade detec-
20 tável diretamente durante a síntese de oligonucleotídeo, de acordo com o processo da invenção.

Uma vez que os oligonucleotídeos de acordo com a invenção são resistentes a nucleases, eles também são adequados para uso em diversos experimentos de cultura celular, conhecidos dos especialistas para
25 inativação de expressão de genes, isto é, os oligonucleotídeos de acordo com a invenção são usados como oligonucleotídeos de anti-sentido ou como um componente de ingredientes ativos de siRNA. Nesse caso, as modificações podem ser selecionadas de modo a facilitar a absorção celular e/ou melhorar a ligação ao ácido nucléico-alvo. A inativação da expressão de um
30 respectivo gene alvo pode ser subsequente monitorada por meio de análise de Northern blot, um procedimento de PCR-RT (em uma etapa ou duas etapas de tempo real (RT)), mediante hibridização em apropriados mi-

crossistemas.

Além disso, os oligonucleotídeos de acordo com a invenção podem ser usados como ligantes hidrofílicos entre uma unidade detectável e uma proteína ou como uma marcação de uma massa definida. Além disso, 5 bibliotecas de substâncias aptâmeras podem ser estabelecidas, em cujo caso é possível se introduzir diversos resíduos R no fosfato durante a síntese, mediante uso de diferentes azidas de sulfonila e azidas de acila ou azidas de heteroarila. Essas bibliotecas podem, então, ser testadas quanto a sua ligação a proteínas ou outras biomoléculas. Uma vantagem sobre os aptâmeros 10 conhecidos do estado da técnica é que o processo de acordo com a invenção permite um grande número de diferentes e adicionais modificações serem produzidas e testadas de uma maneira simples.

A invenção é esclarecida em maiores detalhes mediante os exemplos seguintes, publicações e protocolos de seqüências, cujo escopo de 15 proteção é derivado das reivindicações de patente. Os métodos descritos devem ser entendidos como exemplos, que ainda descrevem o objetivo da invenção, mesmo após algumas modificações.

Os exemplos seguintes e a listagem de seqüências são fornecidos para ajudar no entendimento da presente invenção, cujo verdadeiro escopo é estabelecido nas reivindicações anexas. Deve ser entendido que podem ser feitas modificações nos procedimentos estabelecidos, sem que seja 20 afastado o espírito da invenção.

Exemplo 1

Síntese de um dT(P(=NSO₂PhNHAc)dT Modificado

25 A síntese de dímero foi realizada em uma escala de 10 μ mol, em um sintetizador ABI 394. Um suporte dT CPG comercialmente disponível foi usado como fase sólida. Todos os produtos químicos para a síntese-padrão foram obtidos da Glen Research.

30 A solução oxidante convencional contendo iodo foi substituída por uma solução 0,1M de azida de fenilsulfonila (p-NAc) (Sigma Aldrich) em acetonitrila anidra. O tempo de oxidação foi prolongado para 16 minutos.

O produto foi clivado do suporte por 2 horas à temperatura am-

biente com amônia a 33% e separado por cromatografia de fase reversa em uma coluna Poros Oligo R3, de 4,6 x 50 mm. Cromatografia: tampão A: acetato de trietilamônio a 0,1M em água, pH de 6,8; tampão B: acetato de trietilamônio a 0,1M em água/acetonitrila 1:1, gradiente de 2 minutos, 0% de B a 5 100% de B em 45 minutos. A absorção de UV do eluente foi medida em 260 nm. Ocorreu uma fração principal que continha o produto desejado. O solvente foi removido em uma centrífuga a vácuo. O resíduo foi tomado em água redestilada e foi novamente separado a vácuo. Esse procedimento foi repetido três vezes. O resíduo foi então, dissolvido em água redestilada e 10 liofilizado.

^1H RMN: (Bruker DPX 300) em D_2O : 7,82 d[2H, arila], 7,56 d[2H arila], 7,47 s[1H, C6-H], 7,40[1H, C6-H], 6,21 m [1H, H1'], 6,21 m [1H, H1'], 6,07 m[1H, H1'], 4,38 m [1H, H3'], 4,10 [m, 4H, H4', H5'], 2,38-2,24 m [4H, H2'], 2,22 [3H, CH_3], 2,16 [3H, CH_3], 2,14 [3H, CH_3];

15 ^{31}P RMN: (Bruker DPX 300) em D_2O : 2,14

Espectroscopia de Massa (ESI-MS): calculado: 742,66; encontrado: [M-H] 741,73.

Exemplo 2

Síntese de um Oligonucleotídeo T(P(=NSO₂PhNHAc)T₉)

20 A síntese de oligonucleotídeo foi realizada em uma escala de 1 μmol , em um sintetizador ABI 394. Um suporte de dT CPG comercialmente disponível foi usado como fase sólida. Todos os produtos químicos para a síntese-padrão foram obtidos da Glen Research.

25 No primeiro ciclo de síntese, o oxidante contendo iodo foi substituído por uma solução a 0,1M de azida de fenilsulfonila (p-NAc) (Sigma Aldrich) em acetonitrila anidra. O tempo de oxidação foi prolongado para 16 minutos. A ligação das restantes dT-fosforamiditas foi realizada de acordo com protocolos-padrão.

30 O produto foi clivado do suporte por 2 horas à temperatura ambiente com amônia a 33% e separado por cromatografia de fase reversa em uma coluna Poros Oligo R3, de 4,6 x 50 mm. Cromatografia: tampão A: acetato de trietilamônio a 0,1M em água, pH de 6,8; tampão B: acetato de trieti-

lamônio a 0,1M em água/acetonitrila 1:1, gradiente de 2 minutos, 0% de B a 100% de B em 45 minutos. A absorção de UV do eluente foi medida em 260 nm. Ocorreu uma fração principal que continha o produto desejado. O solvente foi removido em uma centrífuga a vácuo. O resíduo foi tomado em água redestilada e foi novamente separado a vácuo. Esse procedimento foi repetido três vezes. O resíduo foi, então, dissolvido em água redestilada e liofilizado.

Espectroscopia de Massa (ESI-MS): calculado: 3176,25; encontrado: [M-H] 3176,0.

10 Exemplo 3

Síntese de um Oligonucleotídeo marcado com Fluoresceína

5' AAT ACC TGT ATT CCT CGC CTG TC fluoresceína-3', em que cada P=O é substituído por P=N-pPh-NAc (SEQ ID NO:4).

15 A síntese de oligonucleotídeo foi realizada em uma escala de 1 µmol, em um sintetizador ABI 394. Um CPG de fluoresceína LightCycler comercialmente disponível foi usado como fase sólida. Todos os produtos químicos para a síntese-padrão foram obtidos da Glen Research. Foram usadas fosforamiditas com grupos protetores terc-butilfenóxi-acetila (conhecidos como monômeros "tac" ou "Expedite") da Proligo.

20 O protocolo-padrão foi usado para a síntese, em que o oxidante contendo iodo foi substituído por uma solução a 0,1M de azida de fenilsulfonila (p-NAc) (Sigma Aldrich) em acetonitrila anidra e o tempo de oxidação foi prolongado para 16 minutos.

25 O produto foi clivado do suporte por 2 horas à temperatura ambiente com amônia a 33% e separado por cromatografia de fase reversa em uma coluna Poros Oligo R3, de 4,6 x 50 mm. Cromatografia: tampão A: acetato de trietilamônio a 0,1M em água, pH de 6,8; tampão B: acetato de trietilamônio 0,1M em água/acetonitrila a 1:1, gradiente de 2 minutos, 0% de B a 100% de B em 45 minutos. A absorção de UV do eluente foi medida em 260 nm. Ocorreu uma fração principal que continha o produto desejado. O solvente foi removido em uma centrífuga a vácuo. O resíduo foi tomado em água redestilada e foi novamente separado a vácuo. Esse procedimento foi

30

repetido três vezes. O resíduo foi então, dissolvido em água redestilada e liofilizado.

Espectroscopia de Massa (ESI-MS): calculado: 11839; encontrado: [M-H] 11839,9.

5 Exemplo 4

Síntese de Oligonucleotídeos Quiméricos em que P=O foi substituído por P=N-Acc em Posições Específicas

10 A síntese foi realizada em escala de 1 µmol em um sintetizador ABI 394. A fim de não ter modificação do oxidante durante a síntese, o programa de síntese foi modificado, de modo que a solução N3-Acc possa ser fixada em uma posição básica extra. Devido às limitações da programação, a azida foi reagida juntamente com o ativador. Isto não afetou a modificação. O tempo de reação de N3-Acc com o intermediário de fósforo trivalente foi de 5 minutos.

15 Todos os produtos químicos para a síntese-padrão foram obtidos da Glen Research. As fosforamiditas, com grupos de proteção de terc-butilfenóxi-acetila (conhecido como monômeros "tac" ou "Expedite") da Prologo foram usadas. A purificação foi realizada conforme descrito acima.

20 Suporte: CPG de fluoresceína: N3-Acc; azida de p-Nac-fenilsulfonila (Sigma Aldrich).

As seguintes sondas, cada qual com uma idêntica SEQ ID NO: 4 foram sintetizadas e subseqüentemente analisadas por espectroscopia de massa.

Modificação (SEQ:ID:NO:4)	Massa calculada	Massa encontrada
5'-AATACCTGTATTCCTCGCCTGTP1Cfluoresceína-3'	7718	7718,6
5'-Ap1ATACCTGTATTCCTCGCCTGTC fluoresceína-3'	7718	7718,9
5'-AATACCTGp1TATTCCTCp1GCCTGTC-fluoresceína-3'	7915	7914,9
5'-Ap1Ap1Tp1Ap1Cp1Cp1Tp1Gp1Tp1Ap1Tp1TCCTCGCCTGTC-fluoresceína-3'	9681	9681,9
5'-AATACCTGTATTP1Cp1Cp1Tp1Cp1Gp1Cp1Cp1Tp1Gp1Tp1C-fluoresceína-3'	9681	9681,8
5'-Ap1Ap1Tp1ACCTGTATp1Tp1Cp1CTCGCCTp1Gp1Tp1C-fluoresceína-3'	9288	9289,8

p1 é um P=N-pPh-NAc mimético

Exemplo 5Marcação de Terminal-3' de acordo com a Invençãoa) Preparação de dabsil-azida

0,71 g (2,19 mmols) de cloreto de dabsila foi dissolvido em 10
 5 mL de acetona. Uma solução de 142 mg (2,19 mmols) de azida de sódio em
 2 mL de água foi lentamente adicionada em gotas, sob resfriamento em gelo
 e agitação. A agitação ocorreu durante 2 horas à temperatura de 0°C e de-
 pois durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, uma solução de
 32 mg de azida de sódio (0,5 mmol) em 500 µL de água foi adicionada e agi-
 10 tada por 1 hora à temperatura ambiente (TLC, sílica gel, CH₂Cl₂). 200 mL de
 cloreto de metileno foram depois adicionados à suspensão e esta foi, então,
 filtrada. O filtrado foi agitado duas vezes com água e uma vez com uma so-
 lução de carbonato ácido de sódio a 5% e depois duas vezes com água. A
 fase orgânica separada foi seca sobre sulfato de sódio. O solvente foi remo-
 15 vido mediante destilação em um evaporador rotativo a uma temperatura de
 banho inferior a 20°C. O resíduo foi suspenso em 2 mL de acetonitrila e fil-
 trado. O resíduo foi lavado com éter.

Rendimento bruto : 280 mg. A azida é usada diretamente no sin-
 tetizador de DNA ou para preparar um suporte sem posterior purificação.

20 b) Preparação de um Suporte de dabsila para Síntese de Oligonucleotídeos
 CPG-1caa-NHC(=O)-CH₂-CH₂-C(=O)-O-CH₂-CH₂-SO₂-CH₂-CH₂-O-P(O-CH₂-
 CH₂-CN) (=N-SO₂-Ph-p-N=N-Ph-p-NMe₂)-O CH₂-CH₂-CH₂-ODMT

Uma carga de 1,2 g de CPG ligada a fósforo (49 µmol/g) foi in-
 troduzida em uma frita de Schlenk e lavada com acetonitrila anidra sob at-
 25 mosfera de argônio. Depois, foi lavada com ácido dicloroacético a 0,1 M em
 cloreto de metileno até o filtrado se tornar incolor. Em seguida, foi intensa-
 mente lavado com acetonitrila anidra. Após isso, foi lavada com 2 mL de di-
 cianoimidazol em acetonitrila a 0,25 M (ativador) e 2 mL de ativador e, ime-
 diatamente, foram usados 2 mL de uma solução a 0,1M de espaçador C3
 30 fosforamidita. A suspensão foi depois deixada repousar por 3 minutos e foi
 filtrada sob pressão de argônio. Depois, foi lavada com 2 mL de ativador e,
 novamente, com 2 mL de ativador e, imediatamente, foram adicionados 2

mL de uma solução a 0,1 M de espaçador C3 fosforamidita. Depois, a preparação foi deixada repousar por 12 minutos. O solvente foi removido mediante filtração sob pressão de argônio, foram adicionados 2 mL de uma solução a 0,1 M de dabsil-azida em cloreto de metileno e a mistura foi deixada repousar por 15 minutos. O CPG modificado foi finalmente lavado com 100 mL de cloreto de metileno e depois com 100 mL de acetonitrila anidra e seco a vácuo.

c) Síntese de Oligonucleotídeo usando Suporte de dabsila:

5' fluorescein-GCA CCA GAT CCA CGC CCT TGA TGA GC-O-CH₂-CH₂-
10 CH₂-O (O₂)P(=N-SO₂-Ph-p-N=N-Ph-p-NMe₂)

A síntese de oligonucleotídeo foi realizada em escala de 1 µmol em um sintetizador ABI 394. O dabsil-CPG do exemplo 5^a foi usado como material de suporte. O produto de 6-carboxifluorescein-fosforamidita (Glen Research, Report No. 10 (GR10-1), (1997), 1-12) foi usado para a marcação do terminal 5'.

Todos os produtos químicos para a síntese-padrão foram obtidos da Glen Research. Conforme descrito no Exemplo 4, foram usadas as fosforamiditas com grupos de proteção de terc-butilfenóxi-acetila (conhecido como monômeros "tac" ou "Expedite") da Proligo. A síntese foi realizada de acordo com o protocolo-padrão. A clivagem e purificação foi também realizada conforme descrito no Exemplo 4.

Espectroscopia de Massa (ESI-MS): calculado 8973; encontrado [M-H]: 8973,1

Exemplo 6

25 PCR em Tempo Real e Análise de Curva de Fusão

Um procedimento de PCR quantitativo em tempo real de DNA de fator V subsequente à análise de curva de fusão foi realizado em um instrumento LightCycler 1.2[®] (Roche Diagnostics GmbH), a fim de analisar o efeito de miméticos de fosfato sobre a hibridização. Os iniciadores foram usados em combinação com um par de sondas de hibridização de fluoresceína (LightCycler Red 640 FRET). Os iniciadores e a sonda de 5' (LightCycler Red 640) foram mantidas constantes. As diversas sondas de 3'-fluoresceína mo-

dificadas no fosfato do Exemplo 4 e a sonda não-modificada de fluoresceína tomada como referência, foram usadas como sondas doadoras FRET. O efeito com relação ao ponto de cruzamento, que é uma medida para ampliação de eficiência, e o efeito com relação ao ponto de fusão foram avaliados.

5 20 µl de uma mistura reacional de PCR foram preparados como segue, para a amplificação de um fragmento de DNA de fator V.

- 106 cópias de um plasmídeo que contém o gene tipo selvagem de fator V e mutantes (Gene Bank Accession No. M_014335);

- 13 mM de MgCl₂;

10 - 500 nM de iniciadores tendo as seqüências SEQ ID NO: 1 e 2;

- 200 nM de sondas de hibridização FRET tendo as seqüências

SEQ ID NO: 3 e 4

O kit de sondas de DNA LightCycler Master Hyb (Roche Applied Science, Cat. No. 2158825) foi usado para todos os outros componentes de PCR, de acordo com as instruções do fabricante.

15

As seguintes seqüências foram usadas como iniciadores e sondas:

SEQ ID NO:1

iniciador dianteiro:

20 5' GAG AGA CAT CGC CTC TGG GCT A

SEQ ID NO:2

iniciador inverso:

5' TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA

SEQ ID NO:3

25 sonda aceitadora FRET:

5' LC-Red 640 AGG GAT CTG CTC TTA CAG ATT AGA AGT AGT CCT ATT

SEQ ID NO:4

sonda doadora FRET:

5' AAT ACC TGT ATT CCT CGC CTG TC-fluoresceína

30

O seguinte programa de temperatura foi usado para a amplificação no LightCycler 1.2 (Roche Applied Science).

	T[°C]	t[s]	Veloc. Declive [°C/s]	Aquisição	Ciclos
Desnaturação	95	30	20,0	Nenhuma	1
Amplificação	95	0	20,0	Nenhuma	
	55	10	20,0	Única	45
	72	10	20,0	Nenhuma	

O monitoramento em tempo real foi realizado durante 45 ciclos usando o segundo método limite derivado, em que o sinal de fluorescência foi medido em um canal de detecção que é específico para a emissão do LigthCycler Red 640 (em 640 nm) e o modo de correção aritmético de segundo plano foi usado para normalizar o sinal inicial.

Após a amplificação, foi realizada uma análise de curva de fusão de acordo com as instruções do manual do instrumento LightCycler (Roche Applied Sciences).

O seguinte programa de temperatura foi usado:

	T[°C]	t[s]	Veloc. Declive [°C/s]	Aquisição	Ciclos
Curva fusão	95	0	20,0	Nenhuma	
	45	60	20,0	Contínua	1
	75	10	0,1	Nenhuma	
Resfriamento	40	30	20,0	Nenhuma	1

Os sinais de fluorescência absolutos são medidos conforme acima no canal 640 nm e, subseqüentemente, o primeiro derivado foi calculado a partir disso.

Os pontos de cruzamento (CP) são mostrados na Tabela seguinte como uma medida para eficiência de amplificação quando do uso de diferentes sondas doadoras modificadas. A tabela também mostra as temperaturas de fusão (T_m) medidas de diversas sondas doadoras para a seqüência tipo selvagem (WT) de fator V e a seqüência mutante (mT) de fator V.

Modificação (SEQ ID NO:4)	Cp	T _m	T _m
		wt	mt
5' AATACCTGTATTCCTCGCCTGTC-fluoresceína-3' (ref)	22,11	64,92	56,98
5' AATACCTGTATTCCTCGCCTGTP1C fluoresceína-3'	22,61	64,32	56,26
5' Ap1AATACCTGTATTCCTCGCCTGTC fluoresceína-3'	22,51	64,80	56,80
5' AATACCTGp1TATTCCTCp1GCCTGTC-fluoresceína-3'	22,26	64,28	55,89
5' Ap1Ap1Tp1Ap1Cp1Cp1Tp1Gp1Tp1Ap1Tp1TCCTCGCCT	21,40	60,69	52,19

Modificação (SEQ ID NO:4)	Cp	Tm wt	Tm mt
GTC-fluoresceína-3' 5' AATACCTG- TATTp1Cp1Cp1Tp1Cp1Gp1Cp1Cp1Tp1Gp1Tp1C-fluoresceína- 3'	21,91	60,74	52,14
5' Ap1Ap1Tp1ACCTGTATp1Tp1Cp1CTCGCCTp1Gp1Tp1C- fluoresceína-3'	22,00	61,40	52,83

p1 é um mimético de P=N-pPh-Nac.

Conforme mostrado na Tabela, o ponto de cruzamento não é significativamente afetado pela introdução de modificações conforme a invenção, isto é, a eficiência de PCR não é modificada.

5 Além disso, nenhum efeito é encontrado na temperatura de fusão medida em caso de sondas modificadas uma ou duas vezes. Além disso, sondas multiplamente modificadas apenas exibem uma mudança moderada no ponto de fusão, não superior a 4°C, enquanto que a capacidade de discriminação malcombinada é retida.

10 Exemplo 7

Análise de PCR em tempo real + curva de fusão

a) Preparação de lissamina-azida (= rodamina B)

Uma solução de 195 mg (3,0 mmols) de azida de sódio em 5 mL de água foi adicionada em gotas à temperatura de 0°C a uma solução de 15 577 mg (1 mmol) de cloreto ácido de sulforrodamina B em 20 mL de acetona. A mistura foi agitada por 2 horas à temperatura de 0°C e depois por 6 horas à temperatura ambiente. A mistura foi transferida para um funil de separação e foram adicionados 300 mL de água e 300 mL de cloreto de metileno. A fase orgânica foi separada e lavada duas vezes com 100 mL de 20 água. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio. O solvente foi removido mediante destilação em um evaporador rotativo. O resíduo (140 mg) foi usado sem qualquer purificação posterior para a síntese de oligonucleotídeos.

b) Síntese de uma sonda aceitadora de FRET de SEQ ID NO:3

Ap*GG GAT CTG CTC TTA CAG ATT AGA AGT AGT CCT ATT-p

25 p* = P=NS(O)2-rodamina-B

A síntese de oligonucleotídeo foi realizada em uma escala de 1 µmol, em um sintetizador ABI 394. Um CPG (vidro de poro controlado) liga-

do a fósforo comercialmente disponível (Glen Research) foi usado como material de suporte. Todos os produtos químicos para a síntese-padrão foram obtidos da Glen Research. Foram usadas fosforamiditas com grupos protetores terc-butilfenóxi-acetila (conhecidos como monômeros "tac" ou "Expedite") da Proligo.

5 O protocolo-padrão (sem tritila) foi usado para a síntese, em que o oxidante no último ciclo foi substituído por uma solução a 0,1M de azida de lissamina em acetonitrila anidra e o tempo de oxidação foi prolongado para 16 minutos.

10 O produto foi clivado do suporte por 2 horas à temperatura ambiente com amônia a 33% e separado por cromatografia de fase reversa em uma coluna Poros Oligo R3, de 4,6 x 50 mm. Cromatografia: tampão A: acetato de trietilamônio a 0,1M em água, pH de 6,8; tampão B: acetato de trietilamônio a 0,1M em água/acetonitrila 1:1, gradiente de 2 minutos, 0% de B a 15 100% de B em 45 minutos. A absorção de UV do eluente foi medida em 260 nm. Ocorreu uma fração principal que continha o produto desejado. O solvente foi removido em uma centrífuga a vácuo. O resíduo foi tomado em água redestilada e foi novamente separado a vácuo. Esse procedimento foi repetido três vezes. O resíduo foi, então, dissolvido em água redestilada e 20 liofilizado.

Espectroscopia de Massa (ESI-MS): calculado: 11710; encontrado: [M-H] 11710,5.

c) PCR em Tempo Real

25 A fim de demonstrar a adequabilidade em PCR de tempo real, um procedimento de PCR em tempo real de DNA de fator V foi realizado em um instrumento LightCycler 2.0. Os iniciadores foram usados em combinação com um par de sondas de hibridização FRET fluoresceína/lissamina, em que a lissamina (rodamina B) atuou como um aceitador de FRET. Curvas de quantificação foram registradas e o valor de cp foi determinado como função 30 da concentração do ácido nucléico-alvo.

Uma análise de PCR em tempo real e de curva de fusão foi realizada, de acordo com o Exemplo 6, para a amplificação de 10^4 e 10^6 cópias

de um fragmento de DNA de fator V. Para isso, foram usadas uma sonda doadora de fluoresceína, de acordo com o Exemplo 6 (SEQ ID No: 4) que não foi posteriormente modificada e uma sonda aceitadora de FRET, de acordo com o Exemplo 7b (SEQ ID NO: 3).

	T[°C]	t[s]	Veloc. Declive [°C/s]	Aquisição	Ciclos
Desnaturação	95	30	20,0	Nenhuma	1
Amplificação	95	0	20,0	Nenhuma	
	55	10	20,0	Única	45
	72	10	20,0	Nenhuma	

5 O sinal de fluorescência foi medido em um canal de detecção de 610 nm. O modo de correção de segundo plano 610/530 foi usado para normalizar o sinal bruto. Um valor de cp de 22 foi determinado para 10^6 cópias e um valor de cp de 26 foi determinado para 10^4 cópias.

10 O ponto de fusão para o tipo selvagem foi determinado nos valores de 64,69 °C e 56,24 °C foi determinado como ponto de fusão para o mutante (10^6 cópias).

Exemplo 8

PCR em Tempo Real com Iniciadores Modificados

15 Um procedimento de PCR quantitativo em tempo real de um DNA humano de fator V foi realizado em um instrumento LightCycler 1.2® (Roche Diagnostics GmbH), a fim de analisar o efeito dos miméticos de fosfato com relação ao alongamento do iniciador. O mimético P=N-pPh-NAc foi introduzido em diferentes posições de um par de iniciadores usado para a amplificação de DNA humano de fator V. Os iniciadores modificados foram
20 sintetizados de acordo com o Exemplo 4. A purificação foi feita através de cromatografia de fase reversa, conforme o Exemplo 3, no modo de realização de Tritila. A destitilação foi executada mediante tratamento com ácido acético a 80%, durante 20 minutos.

25 Estes iniciadores foram usados em combinação com um par de sondas de hibridização, fluoresceína/LightCycler Red 640 FRET, de acordo com o Exemplo 6. A sonda de fluoresceína e a sonda de 5' LightCycler Red 640 (Seq. ID. No: 3 e 4) foram mantidas constantes. Diversas combinações de iniciadores modificados e não-modificados foram testadas. Como refe-

rência, foram usados iniciadores não-modificados. O efeito com relação ao ponto de cruzamento, que é uma medida para a eficiência de amplificação, foi avaliado.

O monitoramento em tempo real foi realizado durante 45 ciclos usando o segundo método limite derivado, em que o sinal de fluorescência foi medido em um canal de detecção que é específico para a emissão do LigthCycler Red 640 (em 640 nm) e o modo de correção aritmético de segundo plano foi usado para normalizar o sinal inicial.

Os sinais absolutos de fluorescência são medidos como acima no canal de 640 nm e, subseqüentemente, o primeiro derivado foi calculado a partir disso. Os pontos de cruzamento são mostrados na Tabela seguinte como uma medida de eficiência de amplificação, quando do uso de diferentes iniciadores modificados.

Combinções de Iniciador	Cp
SEQIDNO:1	
SEQ ID NO:2	
5' GAG AGA CAT CGC CTC TGG GCT A 5' TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA	20,36
5' GAG AGA CAT CGC CTC TGG GCTA 5' TGT TAT CAC ACT GGT GCT Ap1A	22,08
5' GAG AGA CAT CGC CTC TGG GCT A 5' TGT TAT CAC ACT GGT Gp1CT AA	22,50
5' GAG AGA CAT CGC CTC TGG GCT A 5' TGT TAT CAC ACT p1GGT GCT AA	21,36
5' GAG AGA CAT CGC CTC TGG GCT p1A 5' TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA	20,80
5' GAG AGA CAT CGC CTC TGG p1GCT A 5' TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA	20,85
5' GAG AGA CAT CGC CTp1C TGG GCT A 5' TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA	20,61
5' GAG AGA CAT CGC CTC TGG GCT p1A 5' TGT TAT CAC ACT GGT GCT Ap1A	21,76
5' GAG AGA CAT CGC CTp1C TGG p1GCT A 5' TGT TAT CAC ACT GGT Gp1CT AA	22,75
5' GAG AGA CAT CGC CTp1C TGG GCT A 5' TGT TAT CAC ACT p1GGT GCT AA	21,36

p1 é um mimético de P=N-pPh-NAc.

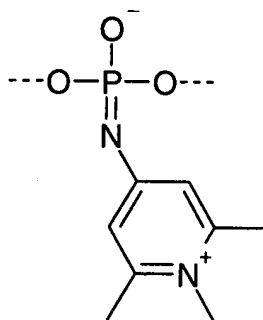
Conforme mostrado na Tabela, o ponto de cruzamento não é significativamente afetado pela introdução de modificações de acordo com a invenção, nos iniciadores que mostram que a eficiência do procedimento de PCR é praticamente não-modificada.

Exemplo 9

Síntese de um oligonucleotídeo marcado de fluoresceína compreendendo um mimético de piridínio-fosfato

A síntese de um oligonucleotídeo de acordo com a SEQ ID NO: 4 foi realizada em uma escala de 1 μ mol, em um sintetizador ABI 394. Um CPG contendo fluoresceína, LightCycler, comercialmente disponível (Roche Applied Science) foi usado como material de suporte. Todos os produtos químicos para a síntese-padrão foram obtidos da Glen Research. Foram usadas fosforamiditas com grupos protetores terc-butilfenoxi-acetila (conhecidos como monômeros "tac" ou "Expedite") da Proligo.

O protocolo do Exemplo 4 foi usado para a síntese, enquanto durante o segundo ciclo, foi usado como oxidante uma solução a 0,1M de 1,2,6-trimetil-piridínio-4-azida (RareChem AQ N6 1054) em acetonitrila anidra e o tempo de oxidação foi prolongado para 16 minutos. Isto resultou em um composto intermediário compreendendo a seguinte estrutura:



O produto foi clivado do suporte por 2 horas à temperatura ambiente com amônia a 33% e separado por cromatografia de fase reversa em uma coluna Poros Oligo R3, de 4,6 x 50 mm. Cromatografia: tampão A: acetato de trietilamônio a 0,1M em água, pH de 6,8; tampão B: acetato de trietilamônio 0,1M em água/acetonitrila 1:1, gradiente de 2 minutos, 0% de B a 100% de B em 45 minutos. A absorção de UV do eluente foi medida em 260

nm. Ocorreu uma fração principal que continha o produto desejado. O solvente foi removido em uma centrífuga a vácuo. O resíduo foi tomado em água redestilada e foi novamente separado a vácuo. Esse procedimento foi repetido três vezes. O resíduo foi então dissolvido em água redestilada e

5 liofilizado.

Espectroscopia de Massa (Maldi-MS, Applied Biosystems Voyager System 6327): calculado: 7641,32; encontrado: [M-H] 7639,59 .

Exemplo 10

Estabilidade de um dinucleotídeo dA(P(=NSO₂PhNHAc)dT, em comparação com um dAdT não-modificado em diferentes temperaturas e pH

10

O dA(P(=NSO₂PhNHAc)dT foi sintetizado e purificado de acordo com o Exemplo 1. O dAdT foi também sintetizado de acordo com o Exemplo 1, porém, foram usados agentes oxidantes padrões (iodo a 0,02 M em THF).

Os dímeros foram expostos em diferentes tempos e temperaturas em um tampão de Tris a 10 mM, em diferentes valores de pH, 7,0, 8,0 e 9,0. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) por 24 horas ou sob a temperatura de 95°C por 60 minutos, respectivamente. Frações de 150 µL foram removidas antes e depois do experimento e volumes de 100 µL foram injetados no procedimento de HPLC.

15

A decomposição foi monitorada por cromatografia de HPLC de fase reversa em uma coluna analítica X-Bridge (2,5µm, diâmetro interno de 4,6 x 50 mm) com um módulo de separação Waters 2690. A detecção foi realizada em um detector Waters 2996 PAD (260 nm). Uma fase móvel de acetato de trietilamônio a 0,1 M (pH 6,8), bombeada com um gradiente de acetonitrila a 95%, a uma vazão de 1,0 mL/min, foi usada. A velocidade de destruição dos dímeros foi julgada por monitoramento do tempo de retenção (tr) do sinal de dímero (Software Millenium, Waters) e determinação da ocorrência de picos adicionais com diferentes tempos de retenção daquele do dímero de nucleotídeo. Os resultados são mostrados na Tabela seguinte:

20

25

	dAdT <u>pH 7,0</u>	dA(P(=NSO ₂ PhNHAc)dT
Solução de partida	tempo de retenção de HPLC= 2,39	tempo de retenção de HPLC= 2,93
24 horas sob a temperatura ambiente (24°C)	tempo de retenção de HPLC= 2,39	tempo de retenção de HPLC= 2,93
1 hora a 95°C (estufa de secagem)	tempo de retenção de HPLC= 2,48	tempo de retenção de HPLC= 2,99
16 horas a 95°C (estufa de secagem)	tempo de retenção de HPLC= 2,42 1 novo pico t=6,2	tempo de retenção de HPLC= 2,99 2 novos picos t = 1,2, 2,0.
	<u>pH 8,0</u>	
Solução de partida	tempo de retenção de HPLC= 2,38	tempo de retenção de HPLC= 2,96
24 horas sob a temperatura ambiente (24°C)	tempo de retenção de HPLC= 2,38	tempo de retenção de HPLC= 2,96
1 hora a 95°C (estufa de secagem)	tempo de retenção de HPLC= 2,42	tempo de retenção de HPLC= 2,92
16 horas a 95°C (estufa de secagem)	tempo de retenção de HPLC= 2,41 1 novo pico 6,2	tempo de retenção de HPLC= 2,92
	<u>pH 9,0</u>	
Solução de partida	tempo de retenção de HPLC= 2,41	tempo de retenção de HPLC= 2,92
24 horas sob a temperatura ambiente (24°C)	tempo de retenção de HPLC= 2,41	tempo de retenção de HPLC= 2,92
1 hora a 95°C (estufa de secagem)	tempo de retenção de HPLC= 2,42	tempo de retenção de HPLC= 2,95
16 horas a 95°C (estufa de secagem)	tempo de retenção de HPLC= 2,43	tempo de retenção de HPLC= 2,95

- O dímero não-modificado foi estável em um pH 7,0, 8,0 e 9,0 durante 24 horas à temperatura ambiente, por 1 hora à temperatura de 95°C e iniciou a decomposição após 16 horas em um pH 7,0 e pH 8,0. O dímero
- 5 modificado foi estável em um pH 7,0, 8,0 e 9,0 durante 24 horas à temperatura ambiente, por 1 hora à temperatura de 95°C e iniciou a decomposição após 16 horas em um pH 7,0.

Listagem de Seqüências

- <110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Polinucleotídeo contendo um fosfato mimético
- 5 <130> WO 23428
<150> EP 05025499
<151> 2005-11-23
<160> 4
<170> PatentIn versão 3.2
- 10 <210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
- 15 <223> iniciador
<400> 1
gagagacatc gcctctgggc ta 22
<210> 2
<211> 20
- 20 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> iniciador
<400> 2
- 25 tggtatcaca ctgggctaa 20
<210> 3
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial
- 30 <220>
<223> sonda
<400> 3

agggatctgc tcttacagat tagaagtagt cctatt 36

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

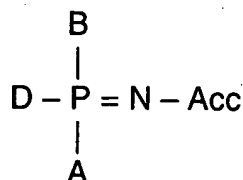
<223> sonda

<400> 4

aatacctgta ttctcgct gtc 23

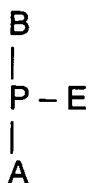
REIVINDICAÇÕES

1. Composto químico, o qual contém, pelo menos uma vez, a seguinte estrutura:



na qual:

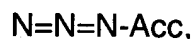
- 5 - A representa o terminal 5' de um nucleotídeo ou de uma cadeia de nucleotídeos ou representa um ligante ligado a uma fase sólida; e
- B representa o terminal 3' de um nucleotídeo ou de uma cadeia de nucleotídeos;
- D é OH ou CH₃; e
- 10 - Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R e R é qualquer substituinte orgânico, e Acc é selecionado do grupo que consiste em:
- (i) -CN;
- (ii) -SO₂-R', em que R' contém pelo menos um grupo alquila
- 15 substituído por amino, um grupo arila opcionalmente substituído ou um heterociclo opcionalmente substituído;
- (iii) N⁺-heterociclo de seis membros, em que pelo menos um átomo de nitrogênio é alquilado e localizado na posição *orto* ou *para*, dito heterociclo sendo selecionado de um grupo que consiste em piridínio, pirimidínio e quinolínio.
- 20
2. Composto químico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R ou R' individualmente ou em combinação com o aceitador de elétrons contém uma unidade detectável ou um grupo funcional.
3. Oligonucleotídeo de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de que A e B juntos compreendem pelo menos dois
- 25 resíduos de nucleotídeo.
4. Processo para produzir um oligonucleotídeo modificado, caracterizado pelo fato de que um derivado de fósforo trivalente, de estrutura química:



- em que E representa um grupo metila ou um grupo hidroxila protegido,

- em que A representa o terminal 5' de um nucleotídeo ou de uma cadeia de nucleotídeos ou representa um ligante ligado a uma fase sólida, e

- em que B representa o terminal 3' de um nucleotídeo ou de uma cadeia de nucleotídeos ou representa um ligante, é reagido com uma azida da seguinte estrutura:



- em que Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R, e R é qualquer substituinte orgânico, e Acc é preferivelmente selecionado do grupo que consiste em:

(i) -CN;

(ii) -SO₂-R', em que R' contém pelo menos um grupo alquila substituído por amino, um grupo arila opcionalmente substituído ou um heterociclo opcionalmente substituído;

(iii) N⁺-heterociclo de seis membros, em que pelo menos um átomo de nitrogênio é alquilado e localizado na posição *orto* ou *para*, dito heterociclo sendo selecionado de um grupo que consiste em piridínio, pirimidínio e quinolínio.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, compreendendo as seguintes etapas:

a) reagir uma 3'-fosforamidita com o terminal 5'-OH de uma cadeia nascente de oligonucleotídeos; e, em seguida,

b) reação com uma azida da seguinte estrutura:



em que Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R, e R é qualquer substituinte orgânico, e Acc é selecionado do grupo que consiste em:

(i) -CN;

(ii) -SO₂-R', em que R' contém pelo menos um grupo alquila substituído por amino, um grupo arila opcionalmente substituído ou um heterociclo opcionalmente substituído;

5 (iii) N⁺-heterociclo de seis membros, em que pelo menos um átomo de nitrogênio é alquilado e localizado na posição *orto* ou *para*, dito heterociclo sendo selecionado de um grupo que consiste em piridínio, pirimidínio e quinolínio.

6. Processo de acordo com as reivindicações 4 e 5, em que R ou
10 R' é uma unidade detectável.

7. Uso de um oligonucleotídeo como definido nas reivindicações 1 a 3, como um parceiro de hibridização.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, como uma sonda de hibridização.

15 9. Uso de acordo com a reivindicação 7, para inativar a expressão de gene em um experimento de cultura celular.

RESUMO

Patente de Invenção: **"POLINUCLEOTÍDEO CONTENDO UM FOSFATO MIMÉTICO"**.

5 A presente invenção refere-se a oligonucleotídeos modificados e a processos para sua produção, em que esses oligonucleotídeos contêm, pelo menos uma vez, a estrutura $P=N-Acc$, onde Acc é um aceitador de elétrons ou um aceitador de elétrons substituído por um resíduo R e R é qualquer substituinte orgânico.