

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 98.488

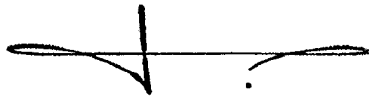
REQUERENTE: CHIRON CORPORATION

**EPÍGRAFE: "METODO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UMA SEQUEN-
CIA OLIGONUCLEOTIDICA DE INTERESSE"**

INVENTORES: Michael S. Urdea, cientista norte americano, residente
em 100 Bunce Meadow Road, Alamo, California 94507;
Thomas Horn, cientista dinamarquês, residente em 1583 A
Arch Street, Berkeley, California 94708, Estados Unidos da América

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

27 de Julho de 1990 e 24 de Julho de 1991, nos Estados Unidos da
América, sob os N.ºs. 559.961 e 736.445



Titular: CHIRON CORPORATION

Epigrafe: "METODO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UMA SEQUENCIA
OLIGONUCLEOTIDICA DE INTERESSE"

M E M O R I A D E S C R I T I V A

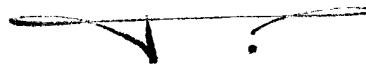
Descrição

Campo técnico

A invenção relaciona-se, de um modo geral, com a incorporação de sites não básicos e/ou selectivamente cliváveis em cadeias oligonucleotídicas e, mais particularmente, relaciona-se com novos reagentes úteis para estes fins. A invenção também se relaciona com métodos de utilização dos novos reagentes em ensaios bioquímicos e em reacções de fosforilação.

Antecedentes da Invenção

A incorporação de sites selectivamente cliváveis em cadeias oligonucleotídicas e polinucleotídicas tem sido descrita no Pedido da Patente Norte Americana No. de série 251.152 e noutro documento bastante anterior, a Patente Norte Americana 4.775.619 cujas descrições são aqui incorporadas por referência. Sites de clivagem selectiva são úteis num certo número de tipos de formatos de ensaios de hibridação. Por exemplo, num tipo de



ensaio em que a hibridação dá origem a um duplex de suporte sólido de uma sonda marcada e uma amostra de DNA, um site de clivagem selectiva contido na estrutura híbrida, vai permitir a pronta separação do marcador do suporte sólido. A Patente Norte Americana No. 4.775.619 é primeiramente dirigida à utilização de sites de clivagem para uma endonuclease de restrição em tais ensaios. Sites quimicamente cliváveis, e. g., ligações dissulfito, 1,2-diois e outros semelhantes, podem ainda ser usados e podem ser introduzidos durante a síntese dos oligonucleótidos, sendo a clivagem efectuada por reagentes químicos particulares, e.g., com tiois, periodatos, ou outros semelhantes.

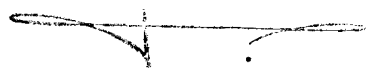
A presente invenção é também dirigida para sites selectivamente cliváveis. No entanto, o presente método envolve a introdução de sites que são cliváveis por fotólise, assim como sites cliváveis por outros processos, e.g., utilizando reagentes químicos ou enzimáticos, e.g., agentes redutores. Os sites cliváveis da invenção são criados por incorporação de radicais químicos, preferencialmente radicais fotolábeis, em cadeias oligonucleotídicas ou polinucleotídicas. Os novos radicais fotolábeis são úteis num certo número de diferentes tipos de formatos de ensaios de hibridação, incluindo os descritos nos Pedidos acima citados, assim como na amplificação do ácido nucleico do ensaio de hibridação descrito pelos requerentes da Publicação EPO No. 88.30967.6.

Outra utilização para os reagentes da invenção é, em termos gerais, a criação de sites não básicos dentro dos oligonucleótidos. Por "site não básico" entende-se um radical

éter -OR, numa posição que normalmente contém um grupo hidroxilo, -OH ou uma nucleobase. A utilidade desta derivação é extensa como se vai revelar em detalhe mais abaixo.

Ainda outra utilização dos reagentes desta invenção é na fosforilação química. Em muitos aspectos diferentes da química oligonucleotídica, é necessária a fosforilação química de grupos hidroxilo. Por exemplo, na síntese oligonucleotídica, após síntese e desprotecção, o grupo 5'-hidroxil livre do oligonucleotido tem que ser fosforilado para utilização em processos mais biológicos. Também é necessária a fosforilação da função 3'-hidroxil: (1) para evitar a extensão do terminal 3' por uma polimerase; e (2) na ligação química do DNA, i.e, um radical 3' fosfato é tipicamente necessário no acoplamento de oligonucleótidos utilizando meios químicos.

A fosforilação da extremidade 5' tem, convencionalmente, sido efectuada com a T4 polinucleótido quinase e ATP, uma reacção que não é particularmente fiável ou eficiente. São também conhecidos vários métodos para a fosforilação química em 5', incluindo os descritos por Nadeaux et al., Biochemistry **23**: 6153-6159 (1984), Van der Marel et al., Tetrahedron Lett. **22**: 1463-1466 (1981), Himmelsbach e Pfeleiderer, Tetrahedron Letters **23**: 4793-4796 (1982), Marugg et al., Nucleic Acids Research **12**:8639-8651(1984), e Kondo et al., Nucleic Acids Research Symposium Series **16**:161-164 (1985). **16**: 161-164 (1985). No entanto, a maioria destes métodos envolve a utilização de reagentes instáveis ou requer extensivas modificações de desprotecções standard e procedimentos de purificação. Têm sido encontrados problemas semelhantes com reagentes de fosforilação



em 3', monofuncionais e bifuncionais (ver Sonveaux, *supra*, em 297).

Assim, em adição à utilidade em fornecerem sites cliváveis e/ou não básicos em cadeias oligonucleotídicas ou polinucleotídicas, muitos dos compostos da presente invenção são adicionalmente úteis como reagentes de fosforilação que superam as limitações dos processos de fosforilação correntes (e podem também ser úteis em reacções de fosforilação que são usadas nos esquemas convencionais de purificação do dimetoxitritil [DMT]). Referências de origem que se relacionam geralmente com métodos para a síntese de oligonucleótidos incluem as relacionadas com a síntese de 5' para 3', baseados na utilização de grupos protectores beta-cianoetilfosfato, e.g., de Napoli et al., Gazz Chim Ital 114: 65 (1984), Rosenthal et al., Tetrahedron Letters 24: 1691 (1983), Belagaje e Brush, Nucleic Acids Research 10: 6295 (1977), em referências que descrevem a fase de solução da síntese de 5' para 3' incluem Hayatsu e Khorana, J American Chemical Society 89: 3880 (1957), Gait e Sheppard, Nucleic Acids Research 4: 1135 (1977), Cramer e Koster, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 7: 473 (1968), e Blackburn et al., Journal of the Chemical Society, Parte C, 2438 (1967).

Em adição à técnica acima citada, Matteucci e Caruthers, J. American Chemical Society 103: 3185-3191 (1981), descreve a utilização de fosfocloridrites na preparação de oligonucleótidos. Beaucage e Caruthers, Tetrahedron Letters 22: 1859-1862 (1981), e a Patente Norte American No. 4.415.732 descreve a utilização de fosforamidites na preparação dos oligonucleótidos. Smith, ABL 15-24 (Dezembro 1983), descreve a



síntese automática de oligodesoxiribonucleótidos em fase sólida. Ver também as referências aí citadas e em Warner et al., DNA 3: 401-411 (1984), cuja revelação está incorporada no presente texto por referência.

Horn e Urdea, DNA 5,5: 421-425 (1986), descreve a fosforilação de fragmentos de DNA em suporte sólido utilizando bis(cianoetoxi)-N,N-di-isopropil-aminofosfina. Ver também Horn e Urdea, Tetrahedron Letters 27: 4705-4708 (1986).

Referências que se relacionam com técnicas de hibridação incluem em geral o seguinte: Meinkoth e Wahl, Anal. Biochemistry 138: 267-284 (1984), fornecem uma excelente revisão das técnicas de hibridação. Leary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80: 4045-4049 (1983), descreve a utilização de DNA bionitilado em conjunto com o conjugado de uma enzima avidina para a detecção de sequências oligonucleotídicas específicas. Ranki et al., Gene 21: 77-85, descreve aquilo a que se referem como hibridação em "sandwich" para a detecção de sequências oligonucleotídicas. Pfeuffer e Helmrich, J. Biol. Chem. 250: 867-876 (1975), descreve o acoplamento da guanosina-5'-O-(3-tiotrifosfato) à sefarose 4B. Bauman et al., J. Histochem. and Cytochem. 29: 227-237, descreve a marcação da extremidade 3' do RNA com substâncias fluorescentes. O Pedido PCT WO/8302277 descreve a adição a fragmentos de DNA de ribonucleótidos modificados para marcação e métodos para analisar esses fragmentos de DNA. Renz e Kurt, Nucl. Acids Res. 12: 3435-3444, descreve as ligações covalentes das enzimas aos oligonucleótidos. Wallace, DNA Recombinant Technology (Woo, S., ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, fornece uma informação geral

1

sobre o uso de sondas no diagnóstico. Chou e Merigan, N. Eng. J. of Med. 308: 921-925, descreve a utilização de uma sonda marcada com um radioisótopo para a detecção de CMV. Inman, Methods in Enzymol. 34B, 24: 77-102 (1974), descreve procedimentos para ligações a poliacrilamidas, enquanto Parikh et al., Methods in Enzymol. 34B, 24: 77-102 (1974), descreve as reações de acoplamento com a agarose. Alwine et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74: 5350-5354 (1977), descreve um método de transferência de oligonucleótidos de geles para um suporte sólido para hibridação. Chu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 11: 6513-6529, descreve uma técnica para derivatização de nucleótidos terminais. Ho et al., Biochemistry 20: 64-67 (1981), descreve a derivatização de nucleótidos terminais através de fosfatos para formação de ésteres. Ashley e McDonald, Anal. Biochem. 140: 95-103 (1984), relata um método para preparação de sondas a partir de um molde ligado a uma superfície.

Hebert e Gravel, Can. J. Chem. 52: 187-189 (1974), e Rubinstein et al., Tetrahedron Lett., No.17, pp. 1445-1448 (1975), descreve a utilização de compostos contendo 2-nitrofenil como grupos protectores sensíveis à luz.

K. Groebke et al., Helvetica Chimica Acta. 73: 608-617 (1990) é relevante até à data uma vez que a referência descreve a utilização do radical t-butildimetilsilil para proteger uma função hidroxil.



Sumário das Revelações

De acordo com o referido, um primeiro objectivo da invenção é corresponder às necessidades da técnica acima mencionadas e fornecer métodos e reagentes para a introdução de sites de clivagem selectiva e/ou não básicos em cadeias oligonucleotídicas.

Outro objectivo da invenção é fornecer esses métodos e reagentes para introdução de sites selectivamente cliváveis em cadeias oligonucleotídicas, em que os ditos sites são quimicamente cliváveis.

Ainda outro objectivo da invenção é fornecer esses métodos e reagentes para a introdução de sites de clivagem selectiva em cadeias oligonucleotídicas, em que os referidos sites são cliváveis pela luz.

Outro objectivo da invenção é fornecer métodos e reagentes para a introdução de sites não básicos em cadeias oligonucleotídicas.

Outro objectivo da invenção é ainda fornecer métodos e reagentes para a fosforilação química de grupos hidroxilo.

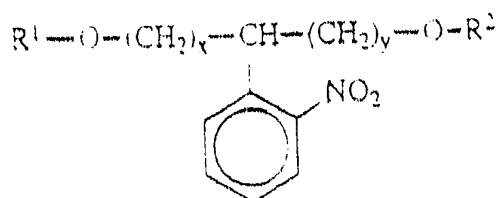
Constitui ainda outro objectivo da invenção fornecer reagentes para a incorporação de sites não básicos em cadeias oligonucleotídicas que podem então ser usadas para criar um multímero de ácido nucleico ramificado.

Outro objectivo da invenção é fornecer determinados reagentes em que os sites não básicos sejam não nucleotídicos.

Objectivos adicionais, vantagens e novas características da invenção serão, em parte, expostas na descrição que se segue e, por outro lado, tornar-se-ão evidentes

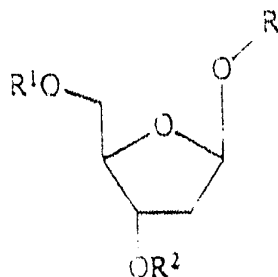
para os peritos nestas técnicas ao examinarem o que se refere adiante, ou podem ser apreendidas por prática da invenção.

Assim, num aspecto, são fornecidos novos reagentes, que são compostos químicos fotolábeis tendo a estrutura geral:



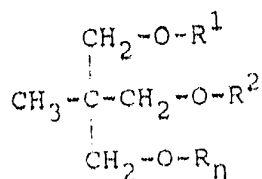
em que R^1 , R^2 , x e y são definidos abaixo. Estes compostos podem ser incorporados em cadeias oligonucleotídicas de modo a permitir a clivagem pela luz.

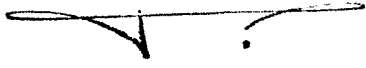
Por outro lado, são fornecidos novos reagentes tendo a estrutura geral:



em que onde R^1 , R^2 , e R estão definidos abaixo. Estes compostos são úteis na criação de sites não básicos em cadeias oligonucleotídicas, que podem ou não ser cliváveis.

Segundo um outro aspecto, são fornecidos novos reagentes tendo a estrutura geral:





em que R^1 , R^2 e R_n são definidos abaixo. Estes compostos são úteis para criar pontos de ramificação na síntese de multímeros de ácidos nucleicos.

Noutros aspectos, são ainda revelados métodos de utilização destes reagentes numa grande variedade de contextos.

Modos de Realização da Invenção

A. Definições:

Por "site selectivamente clivável" entende-se uma funcionalidade ou pluralidade de funcionalidades que podem ser selectivamente clivadas. O foco da presente invenção, como se faz notar acima no presente texto, são primeiramente os sites que são cliváveis especificamente utilizando a fotólise.

Os termos "oligonucleótido" e "polinucleótido", como são usados no presente texto, serão genéricos para polidesoxiribonucleótidos (contendo 2'-desoxi-D-ribose ou formas modificadas desta), poliribonucleótidos (contendo D-ribose ou formas modificadas), e para qualquer outro tipo de polinucleótido que seja um N-glucósido de uma base purínica ou pirimidínica ou uma base purínica ou pirimidínica modificada. O termo "nucleósido" será, similarmente, genérico para ribonucleósidos, desoxiribonucleósidos, ou para qualquer outro nucleósido que seja um N-glucósido de uma base purínica ou pirimidínica, ou de modificações destas bases. Não existe intenção na distinção do comprimento no que se refere à utilização dos termos "oligonucleótido" e "polinucleótido" e estes termos serão usados indistintamente. Estes oligonucleótidos e polinucleótidos podem

ser de cadeia simples ou dupla, tipicamente, são de cadeia simples. Também, os oligonucleótidos da presente invenção são, normalmente, de cerca de 2 a cerca de 2000 unidades de monómeros e mais tipicamente, para a maioria das aplicações baseadas em sondas, desde cerca de 2 a 100 unidades de monómeros.

Por "analisado de ácido nucleico" entende-se o DNA ou o RNA na referida amostra de ácido nucleico contendo a sequência de interesse.

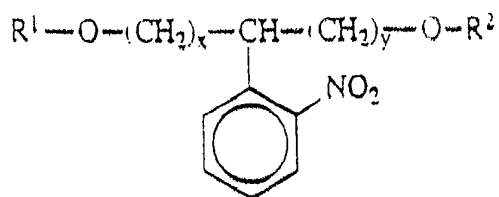
Por "reagentes de fosforilação", como se utiliza no presente texto, entendem-se compostos que, numa reacção ou série de reacções com um composto contendo um grupo hidroxilo, vão produzir fosfatos monoéster.

Por "baixo alquil" e "baixo alcoxi" entendem-se substituintes alquil e alcoxi, respectivamente, tendo cerca de 1 a 8, mais tipicamente de 1 a 6, átomos de carbono.

Onde se indicam substituintes aromáticos, deve entender-se que cada anel aromático individual pode ser substituído, em um ou mais átomos de carbono, com radicais que não afectam substancialmente a função ou reactividade.

B. Estrutura dos Novos Reagentes Fotolábeis:

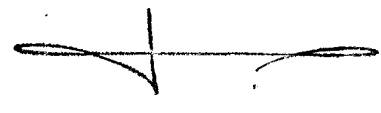
Numa incorporação da invenção, são fornecidos novos reagentes que são compostos químicos fotolábeis tendo a seguinte estrutura:



em que R^1 é um grupo bloqueador base-estável, sensível aos ácidos, R^2 é um derivado do fósforo seleccionado para permitir a adição do reagente à posição 5' de um nucleósido ou uma cadeia oligonucleotídica, e um dos dois, x ou y, é zero, enquanto o outro é um número inteiro entre 1 e 12 inclusivé. Dois tipos básicos de estruturas encontram-se dentro da fórmula genérica acima: (1) aqueles em que o x é diferente de zero e o y é zero (por vezes referido no presente texto como reagentes "tipo-NP1"); e (2) aqueles onde o x é zero e o y é diferente de zero (por vezes referido no presente texto como reagentes "tipo-NP2". Estes dois tipos de estruturas são, como se pode rapidamente deduzir a partir da fórmula genérica apresentada acima, bastante semelhantes. Ambos são úteis para a introdução de sites específicos em cadeias oligonucleotídicas, que, devido ao radical nitrofenil, são rapidamente cliváveis por fotólise. No entanto, como se discutirá abaixo em maior detalhe, as duas famílias de reagentes químicos são distinguíveis até à data, uma vez que se revelam úteis em contextos ligeiramente diferentes.

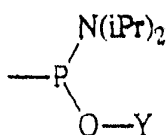
Tornando agora em maior detalhe para os vários substituintes dos novos reagentes fotolábeis:

R^1 é, como se fez notar acima, um grupo bloqueador base-estável, sensível aos ácidos. Estes grupos bloqueadores são bem conhecidos pelos peritos nas técnicas de síntese de oligonucleótidos e incluem grupos aril ou alcoxi substituídos ou não substituídos, onde o grupo aril é, e.g., fenil, naftil, furanil, bifenil ou outros smelhantes e onde os substituintes são de 0 a 3, usualmente de 0 a 2 e incluem qualquer grupo estável não interferente, neutro ou polar, dador ou aceitador de



electrões. Exemplos destes grupos são o dimetoxitritil (DMT), monometoxitritil (MMT), tritil e pixil. Um radical preferencialmente utilizado nestas técnicas é o DMT.

R^2 é um derivado do fósforo que é seleccionado de modo a facilitar a condensação do reagente com o grupo 5'-hidroxil de um nucleósido ou uma cadeia oligonucleotídica. Estes grupos incluem as fosforamidites, fosfotriésteres, fosfodiésteres, fosfites, H-fosfonatos, fósforotioatos e outros semelhantes (ver, e.g., Publicação EP No. 0225807 por Urdea et al., "Solution Phase Nucleic Acid Sandwich Assay and polynucleotide Probes Useful Therein", cujas revelações são aqui incorporadas por referência). Grupos particularmente preferidos úteis como R^2 são as fosforamidites tendo a seguinte estrutura:



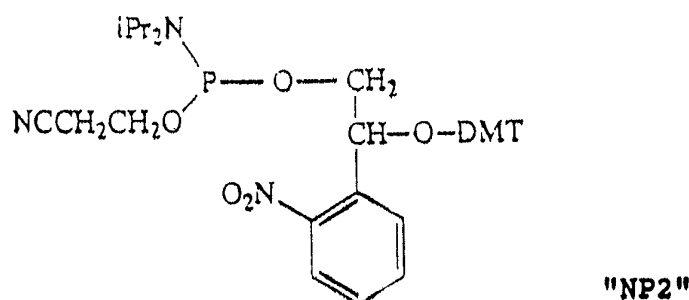
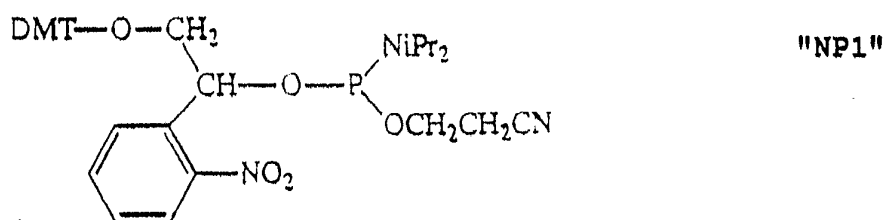
em que y é seleccionado do grupo constituído por metil e beta-cianoetil, e "iPr" representa o isopropil. De preferência, y é beta-cianoetil.

Como se pode prontamente deduzir das definições acima, os substituintes R^1 e R^2 são geralmente seleccionados de modo a permitir a incorporação do reagente fotolábil num fragmento de DNA usando os protocolos químicos standard para a fosforamidite. Isto é, durante a síntese oligonucleotídica, o substituinte R^2 é seleccionado de modo a reagir com o grupo 5'-hidroxil de um nucleósido ou uma cadeia oligonucleotídica, enquanto que o radical de R^1 é seleccionado de modo a permitir a reacção com o

grupo 3'-hidroxil de um nucleósido ou uma cadeia oligonucleotídica.

Quanto aos índices x e y, enquanto um é zero, o outro é um número inteiro entre 1 e 12 inclusivé, mais preferencialmente entre 1 e 4 inclusivé, preferencialmente 1.

Exemplos de reagentes pertencentes à categoria geral acima mencionada são os seguintes:

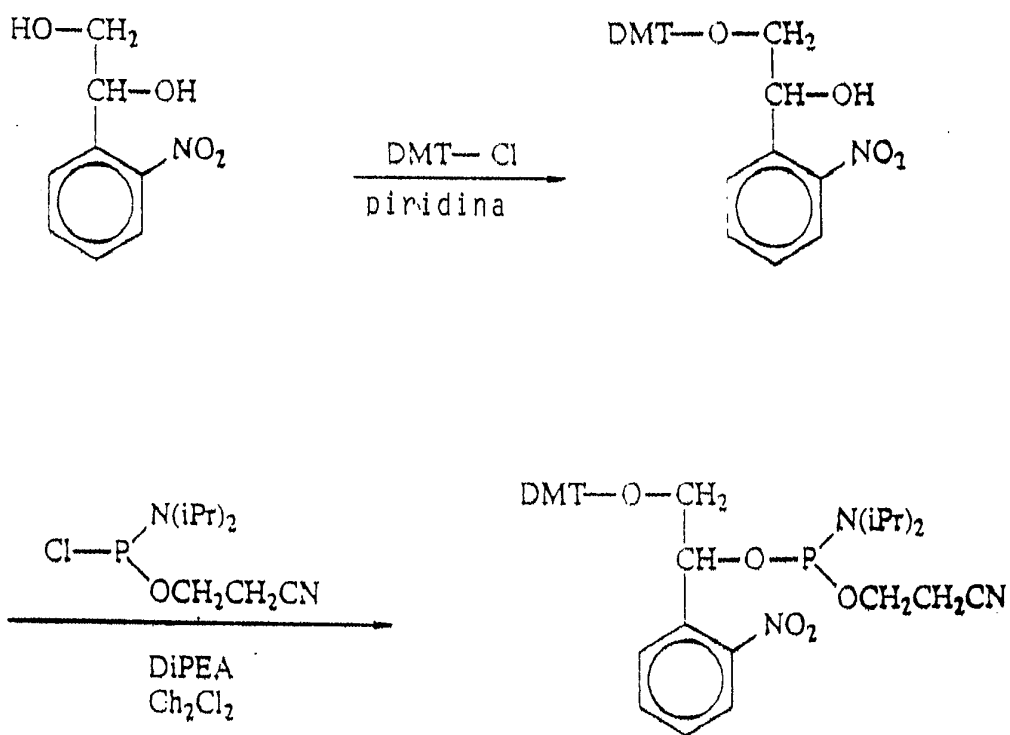


Como se indica, estas estruturas específicas, [2-(2-nitrofenil)-2-(O-dimetoxitritiloxi)etoxi]-N,N-diisopropilamino-2-cianoetoxi-fosfina e [2-(2-nitrofenil)-1-(O-dimetoxitritiloxi)etoxi]-N,N-diisopropilamino-2-cianoetoxifosfina, são designados no presente texto como compostos "NP1" e "NP2", respectivamente, e são os reagentes específicos sintetizados nos Exemplos 1 e 2 apresentados abaixo.

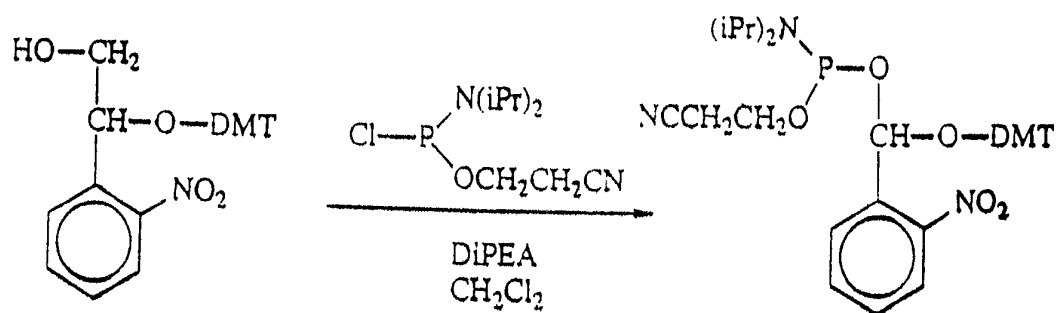
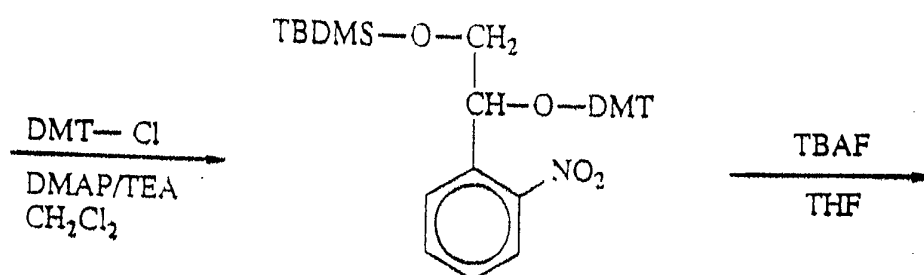
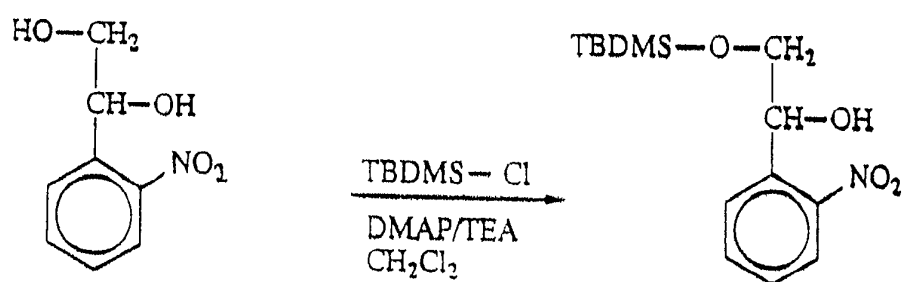
C. Síntese dos Reagentes Referidos Acima:

Reagentes do tipo "NP1", isto é, onde o x é diferente de zero e y é zero, são sintetizados de acordo com a sequência reaccional apresentada no esquema 1. Reagentes do tipo "NP2" são sintetizados de acordo com o conjunto de reacções apresentados no esquema 2.

ESQUEMA 1



ESQUEMA 2



+

As abreviaturas nos esquemas 1 e 2: "DMT" = dimetoxitritil; "DMT-Cl" = cloreto de dimetoxitritil; "iPr" = isopropil; "DiPEA" = diisopropiletilamina; "TBDMS-Cl" = cloreto de t-butildimetilsilil; "DMAP" = 4-dimetilaminopiridina; "TEA" = trietilamina; "TBAF" = fluoreto de tetrabutilamónio.

A síntese de reagentes tipo NP1 envolve a protecção do grupo hidroxil terminal do 2-(O-nitrofenil)-1,2-etanodiol por um "cap" com as espécies R^1 , e.g., com DMT ou outro semelhante, seguido por reacção do grupo hidroxil restante com um derivado do fósforo seleccionado para dar origem ao radical R^2 . Como se apresenta no esquema 1, um reagente exemplar para este último fim é o Cloro-N,N-diisopropilamino-2-cianoetoxifosfina. Variações neste esquema básico podem ser facilmente deduzidas. Por exemplo, para fornecer substituintes R^1 diferentes, usar-se-ia o cloreto de monometoxitritil, cloreto de tritil, cloreto de pixil ou outros semelhantes como alternativa ao cloreto de trimetoxitritil. Similarmente, para dar origem a diferentes substituintes R^2 , usar-se-iam fosfinas alternativas substituídas, no segundo passo da reacção. Para variar do x são necessários grupos metileno adicionais no material inicial de partida.

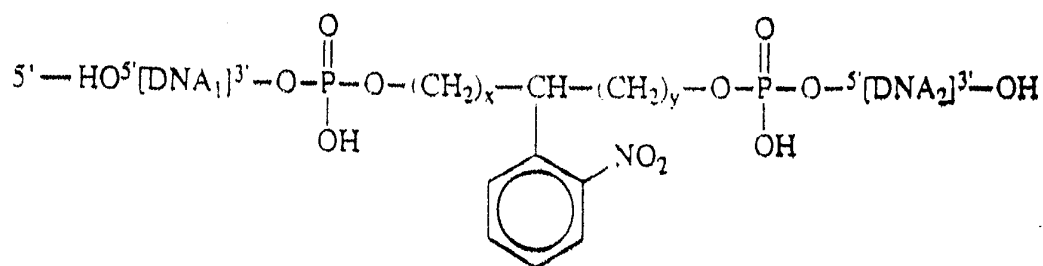
Para sintetizar reagentes do tipo NP2, i.e., onde o x é zero e o y é diferente de zero, é realizada uma sequência sintética semelhante, exceptuando o facto de a ordem de introdução dos substituintes R^1 e R^2 ser reversa. Assim, inicialmente, o grupo hidroxil terminal do material de partida 2-(O-nitrofenil)-1,2-etanodiol, reage com o cloreto de t-butildimetilsilil ("TBDMS-Cl") para bloquear aquele grupo hidroxil durante o passo seguinte da reacção, onde o restante

grupo hidroxil livre, reage com um grupo bloqueador da sensível aos ácidos, base-estável, e.g., cloreto de dimetoxitritil ("DMT-Cl"), para fornecer o substituinte R¹. O grupo hidroxil terminal é então desprotegido, e.g., com fluoreto de tetrabutylamônio e, como se apresenta no esquema 1, reage com um derivado da fosfina substituído, adequado para dar origem ao radical R².

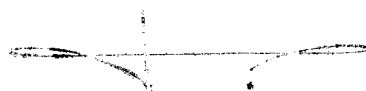
D. Utilização dos Reagentes Supracitados para Criação de Sites Selectivamente Cliváveis:

Os novos reagentes fotolábeis da invenção são prontamente incorporados num oligonucleótido ou cadeia polinucleotídica usando a química standard da fosforamidite, bem conhecida dos técnicos nestas áreas, e como se descreve, por exemplo, num certo número de referências citadas acima no presente texto. Em termos gerais, a incorporação do novo reagente num fragmento de DNA envolve a ligação ao grupo 5'-hidroxil em R² e ligação ao grupo 3'-hidroxil em R¹.

Assim, após incorporação do reagente fotolábil, a cadeia oligonucleotídica híbrida terá a seguinte estrutura:



em que o DNA₁ representa um primeiro segmento de DNA, o DNA₂ representa um segundo segmento de DNA, e x e y obedecem às definições anteriores. Os DNA₁ e DNA₂ podem ser lineares ou ramificados. Este reagente polinucleotídico pode ser utilizado em

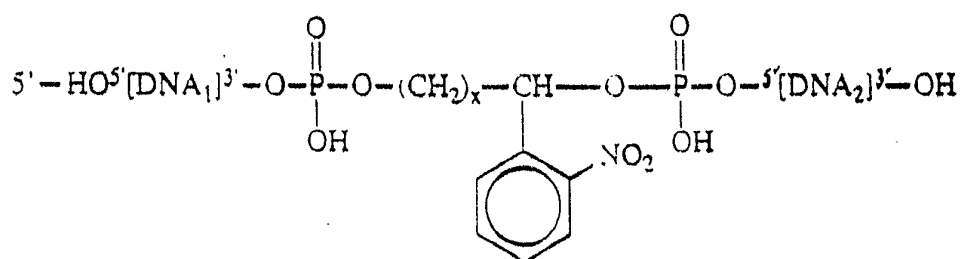


ensaios de hibridação como os que se descrevem nos Pedidos da Requerente EPO No.88.309203.3 e na Patente dos E.U. No. 4.775.619. Estes ensaios envolvem a utilização de reagentes polinucleotídicos lineares tendo sites de clivagem selectiva, i.e., em que os DNA₁ e DNA₂ são lineares. O reagente polinucleotídico contendo o radical fotolábil da invenção pode também ser usado nos ensaios de amplificação dos Pedidos de Patente dos E.U. Nos de Série 07/252.638 e 07/340.031, ambas incorporadas por referência no presente texto (ver também Publicações PCT No. WO89/03891). Como se descreve nestes Pedidos, podem ser incorporadas moléculas de ligação cliváveis em multímeros de amplificação em sites pré-determinados com a finalidade de analisar a estrutura do multímero ou como meios para libertar segmentos pré-determinados (como as porções do multímero que se ligam ao oligonucleótido marcado). Neste Pedidos o DNA₁ e/ou DNA₂ são segmentos polinucleotídicos ramificados. Subsequentemente à síntese e purificação dos multímeros, a estrutura polinucleotídica ramificada do multímero pode ser clivada especificamente sem degradação adicional da estrutura nucleotídica. E claramente preferível que os locais cliváveis sejam introduzidos nas junções dos multímeros ou perto delas para permitir a quantificação das ramificações do multímero individual.

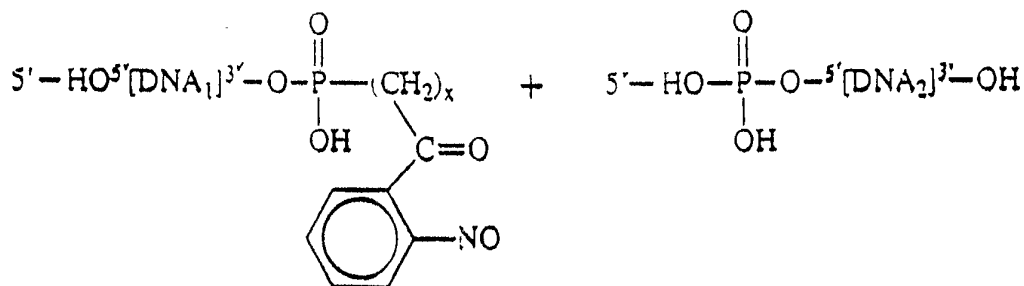
Dependendo do facto de o reagente fotolábil incorporado no oligonucleótido ou polinucleótido ser do tipo NP1 (i.e., onde o y é zero e o x é diferente de zero) ou do tipo NP2 (i.e., onde x é zero e y é diferente de zero), vão resultar dois tipos de fragmentos diferentes aquando da clivagem. Isto é, como se

ilustra no esquema 3, a clivagem de um oligonucleótido contendo um radical do tipo NP1 vai dar como resultado um primeiro fragmento tendo um fosfato 5' terminal e um segundo fragmento que na sua extremidade 3' contém um resíduo da espécie 2-nitrosifenil. Em contraste, como se ilustra no esquema 4, a clivagem de um polinucleótido contendo um radical do tipo NP2 vai originar um primeiro fragmento contendo o grupo residual 2-nitrosifenil na sua extremidade 5' e um segundo fragmento tendo um fosfato 3'-terminal.

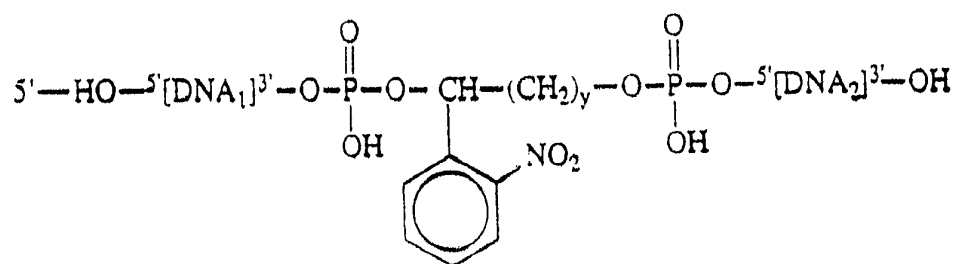
ESQUEMA 3



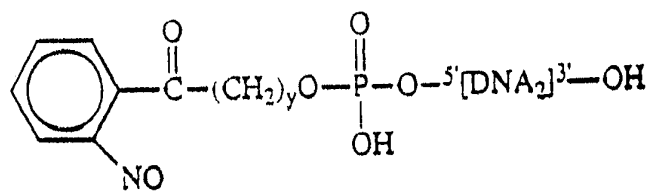
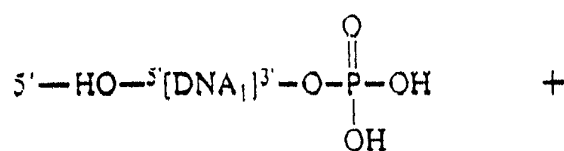
Fotólise
(Luz UV > 350nm; Lâmpada de Hg)



ESQUEMA 4



Fotólise
(Luz UV > 350 nm; Lâmpada de Hg)



Uma vez que a clivagem é efectuada via fotólise utilizando a luz uv tendo um comprimento de onda de, pelo menos, cerca de 350 nm, não são necessários quaisquer reagentes químicos ou enzimáticos. Assim fornece-se um procedimento mais limpo, resultando num produto que é necessariamente livre de contaminações com reagentes de clivagem externos. Em adição, o reagente polinucleotídico em si, é inerentemente mais estável, de clivagem própria por tratamento com luz uv de um comprimento de onda adequado.

E. Fosforilação Usando os Reagentes Acima Referidos:

Os reagentes descritos acima, para além da sua utilidade em fornecer sites cliváveis fotolábeis, são também úteis como reagentes químicos de fosforilação. A fosforilação usando estes reagentes envolve a condensação com um composto contendo um grupo hidroxil, seguido por clivagem fotoquímica e libertação do grupo nitrofenil. Os novos reagentes são bastante versáteis neste aspecto, uma vez que podem ser usados tanto para fosforilações 3' como 5' de um nucleósido ou uma cadeia oligonucleotídica.

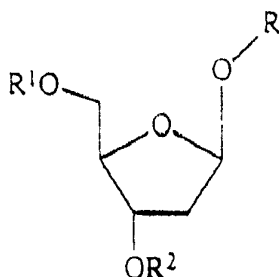
Para a fosforilação 5', é necessário um reagente do tipo NP1, i.e., um reagente onde o x é diferente de zero e o y é zero. Como se ilustra no esquema 3 acima, a clivagem de um reagente polinucleotídico contendo moléculas do tipo NP1 resulta num nucleósido ou fragmento de DNA contendo um grupo fosfato 5'.

Para a fosforilação 3', é necessário um reagente do tipo NP2, como se ilustra no esquema 4. A clivagem de um reagente polinucleotídico contendo moléculas do tipo NP2 dá origem a

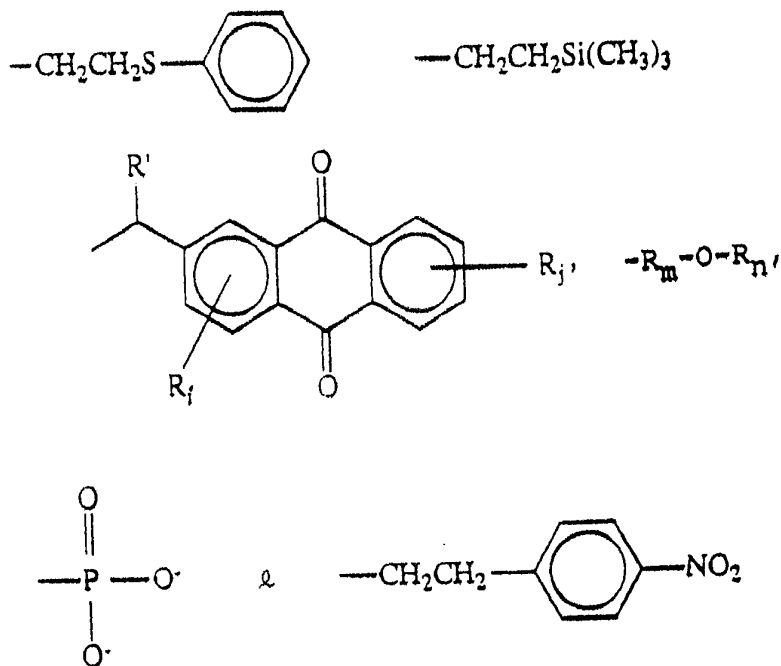
fragmentos de clivagem em que um dos fragmentos contém um grupo 3'-fosfato e o fragmento restante contém o residuo nitrosofenil.

F. Incorporação de Sites Não Básicos e Sites para a Síntese de Cadeias Oligonucleotídicas Secundárias:

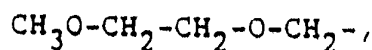
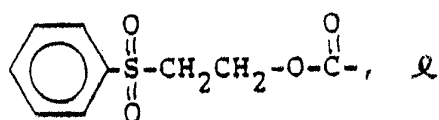
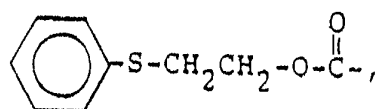
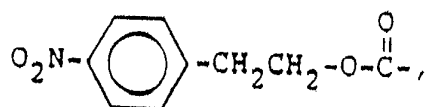
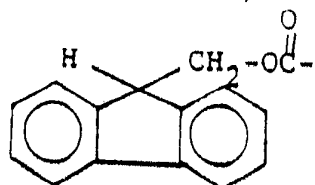
Noutra incorporação da invenção, são fornecidos reagentes que são úteis para a introdução de sites não básicos em cadeias oligonucleotídicas, cujos sites podem ou não ser cliváveis. Estes reagentes têm a estrutura:



em que R^1 e R^2 estão descritos na parte A desta secção, acima, e onde R é seleccionado do grupo constituído por 2-nitrobenzil, 4-penteno-1-il,



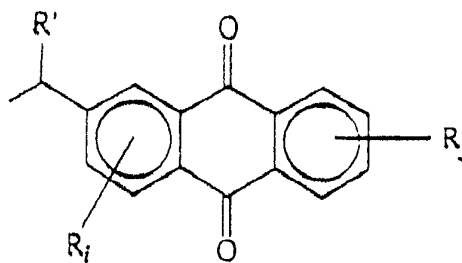
em que o R' é hidrogénio, aril ou aralquil, e se aril ou aralquil, preferencialmente C_1 - C_8 aril ou alquil, O R_i pode ser igual ou diferente e são seleccionados do grupo constituído por amino, nitro, halogénios, hidroxil, baixo alquil e baixo alcoxi, o R_j pode ser igual ou diferente e são seleccionados do grupo constituído por amino, nitro, halogénios, hidroxil, baixo alquil e baixo alcoxi, i é zero, 1, 2 ou 3, j é zero, 1, 2, 3 ou 4. R_N representa o grupo levulinil $-(CO)CH_2CH_2(CO)CH_3$ ou qualquer outro grupo protector ou bloqueante que pode ser removido e substituído por hidrogénio sem afectar R^1 , como:



e R_m ou é alquilenos de 1 a 16 átomos de carbono, preferencialmente de 2 a 12 átomos de carbono, ou um oligómero oxietilénico $-(CH_2CH_2O)_Z-$, onde Z é um inteiro entre 1 e 16, tipicamente entre 2 e 12, inclusivé. Em condições óptimas, quando R é $-R_m-O-R_N$, R_N é levulinil e R_m é $-(CH_2CH_2O)_4-$. Estes reagentes baseados na desoxirribose não apenas introduzem sites não básicos

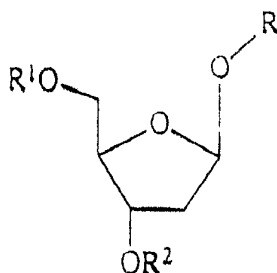
em oligonucleótidos ou cadeia polinucleotídica, mas são também, como os reagentes que se descrevem abaixo, úteis para fornecer sites cliváveis.

em que o R é:



é preferível que o R' seja hidrogénio ou fenil. O R_i e R_j, como se indica, podem representar qualquer um de um certo número de substituintes diferentes. Numa incorporação particularmente preferida, a estrutura acima mencionada é o éster de carbonato 2-metileno-9,10-antraquinona, i. e., R_i e R_j são hidrogénios assim como R'.

Os reagentes com a fórmula:



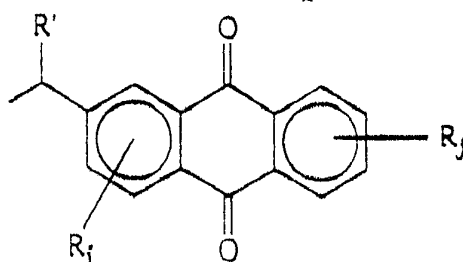
podem ser prontamente sintetizados a partir da desoxirribose e o derivado do álcool de radical R, i.e., R-OH. No caso do 2-nitrobenzil, por exemplo, a desoxirribose reagiria com o álcool 2-nitrobenzil para dar o derivado 1'-O-(2-nitrobenzil).



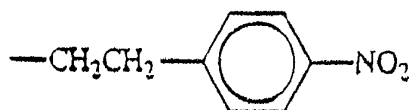
em que o DNA₁ e o DNA₂ são os primeiro e segundo segmentos de DNA como está descrito acima. Um reagente polinucleotídico como este pode ser usado numa variedade de ensaios de hibridação.

A clivagem dos oligonucleótidos ou cadeias polinucleotídicas contendo estes reagentes pode ser conduzida como se segue. Quando o R é um 2-nitrobenzil, a clivagem pode ser efectuada por fotólise usando a luz uv tendo um comprimento

de onda de, pelo menos, 350 nm, seguido de uma hidrólise básica com, e.g., hidróxido de amónio ou outro semelhante. Quando o R é $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-\emptyset$ (onde o $\emptyset$ representa um grupo fenil), a clivagem é efectuada por oxidação do átomo de enxofre a $-\text{SO}$ ou $-\text{SO}_2$ com, e.g., periodato de sódio, seguido de tratamento por uma base. Quando o R é $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, o oligonucleótido pode ser clivado por tratamento com, por exemplo, com ião fluoreto, de novo seguido por tratamento com uma base. Quando o R é:



por exemplo, a clivagem do acetal de 2-metileno-9-10-antraquinona pode ser realizada por oxidação com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, seguido de tratamento com uma base. Em que o R é:

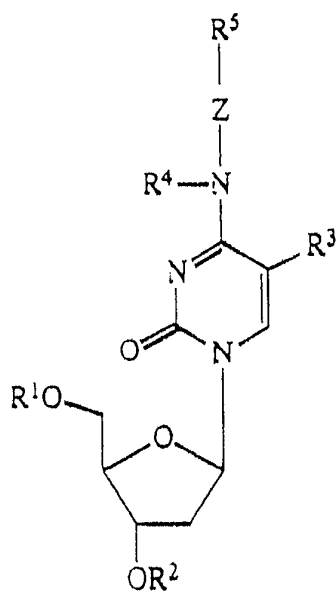


a clivagem pode ser efectuada utilizando DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno]. Quando o R é um fosfato, a remoção pode ser efectuada com a fosfatase alcalina seguida de tratamento com uma base, enquanto que, quando o R é um 4-penteno-1-il, a clivagem será realizada tipicamente usando N-bromosuccinimida, seguida de tratamento com uma base.

Como se faz notar acima, os reagentes da presente invenção que permitem a clivagem de um oligonucleótido ou cadeia polinucleotídica podem ser usados em ensaios de amplificação descritos no Pedido EPO da requerente No. 88.309697.6,

✍

referenciada anteriormente no presente texto. Com os reagentes baseados na desoxirribose descritos nesta secção, os pontos de ramificação do "multímero" de ácido nucleico podem ser criados usando monómeros de ácidos nucleicos multifuncionais tendo a estrutura:



em que:

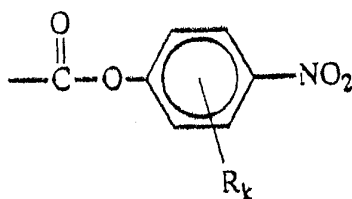
R^1 é um grupo bloqueador sensível aos ácidos base-estável;

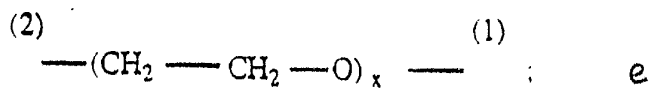
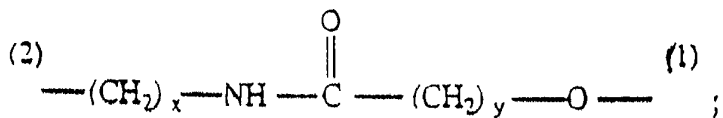
R^2 é um derivado do fósforo que permite a adição do ácido nucleico à posição 5' de uma cadeia oligonucleotídica durante a síntese química;

R^3 é seleccionado do grupo constituído por hidrogénio, metil, I, Br, e F;

R^4 é hidrogénio ou metil;

R^5 é seleccionado do grupo constituído por levulinil,

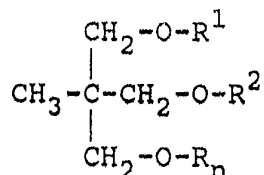




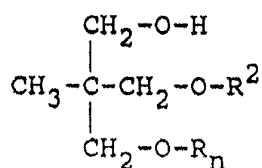
em que x e y podem ser iguais ou diferentes e são números inteiros entre 1 e 8.

Estes monómeros de ácidos nucleicos podem então ser incorporados num oligonucleótido ou cadeia polinucleotídica como se descreve acima, com o radical R⁵, clivável ou removível, definindo o site onde cadeias oligonucleotídicas secundárias serão sintetizadas.

Pontos de ramificação dos "multímeros" de ácidos nucleicos podem também ser criados usando compostos multifuncionais, não nucleotídicos tendo a estrutura geral:



em que R¹, R² e R_n são como se definiu acima no presente texto. Numa incorporação particularmente preferida, R¹ é o DMT, R² é a beta-cianoetil fosforamidite, e R_n é levulinil. Estes compostos podem ser sintetizados a partir de tris-hidroximetil etano por: (1) protecção de um dos grupos hidroxil por reacção com, e.g., trifenilclorosilano ou cloreto de tosil; (2) fazendo reagir o composto protegido com um sal de R², e.g., cloreto de dimetoxitritil, de modo a que um dos dois grupos hidroxilos livres seja convertido para -OR²; (3) fazendo reagir o composto fornecido com R_n-OH ou um sal de "R_n", e.g., ácido levulínico ou um sal deste ácido, retirando assim o grupo protector da fase (1); e (4) fazendo reagir o composto intermédio:



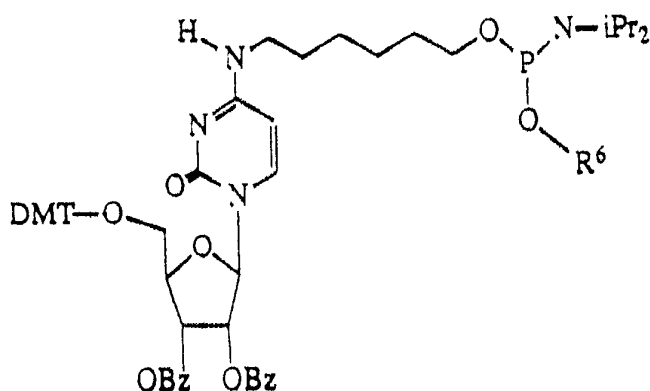
~

com um reagente eficaz na conversão do restante grupo hidroxil livre a $-OR^1$, e.g., beta-cianoetoxi-N,N-diisopropilaminacloro-fosfina.

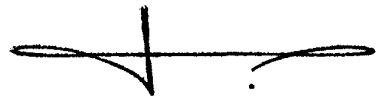
Estes sites não básicos são extremamente úteis quer para permitir a clivagem de uma cadeia oligonucleotídica num ponto particular, quer para os outros propósitos, e.g., síntese de um multímero de ácido nucleico ramificado.

G. Radicais de Ligação Adicionais de Clivagem Selectiva:

Ainda um outro reagente útil para fornecer um site selectivamente clivavel dentro de uma cadeia oligonucleotídica é representado pela estrutura:



em que o DMT representa dimetoxitritil, Bz representa um grupo benzil, iPR representa um isopropil e R^6 é um grupo metil ou beta-cianoetil. Como os reagentes descritos anteriormente, este radical pode ser prontamente incorporado numa cadeia oligonucleotídica usando métodos convencionais. A clivagem no site contendo este radical é conseguida com um procedimento químico em dois passos: (1) oxidação com periodato de sódio aquoso durante 1 hora seguido de (2) tratamento com n-propilamina



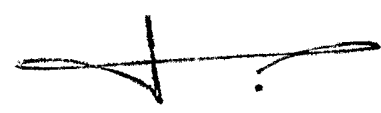
aguosa.

Deve compreender-se que, enquanto a invenção foi descrita em conjunto com as incorporações específicas preferidas da mesma, a anterior descrição, assim como os exemplos que se seguem, pretendem ilustrar e não limitar o âmbito da invenção.

Exemplo 1

A síntese do [2-(2-nitrofenil)-2-(O-dimetoxitritiloxi) etoxi] -N,N-diisopropilamino-2-cianoetoxifosfina ("NP1"): 2-(O-nitro-fenil)-1,2-etanodiol (2,5 g, 13,6 mmole) foi seco uma vez por co-evaporação com piridina. O resíduo foi dissolvido em piridina (50 ml) e foram adicionadas 13,6 mmoles de cloreto de 4,4'-dimetoxitritil (DMT-Cl). A mistura reaccional foi agitada durante 18 h a 20°C. A maior parte da piridina foi então destilada e o óleo residual dissolvido em 250 ml de etil acetato. A fase orgânica foi lavada com NaHCO₃ a 5% (2 x 250 ml), solução aquosa de NaCl saturada a 80% (1 x 250 ml), e seca sobre Na₂SO₄ sólido. Após filtração, o solvente foi removido no vácuo e o resíduo co-evaporado com tolueno (1 x 200 ml) e CH₃CN (1 x 200 ml). O produto foi purificado numa coluna de sílica gel (eluido com CH₂Cl₂ - 0,5% de trietilamina) para dar 6,5 g (13,6 mmole) de produto puro (produção a 100%).

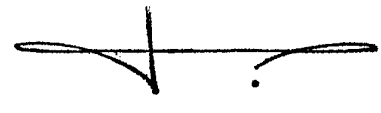
O produto purificado de 1-O-DMT-2-(O-nitrofenil)-1,2-etanodiol foi convertido em beta-cianoetil fosforamidite por reacção em CH₂Cl₂ (50 ml) com cloro-N,N-diisopropilamino-2-cianoetoxifosfina (15 mmole), na presença de diisopropiletilamina (30 mmole) a 10°C durante 30 min. O etil acetato (200 ml) foi então adicionado e a fase orgânica combinada lavada com solução



de NaCl aquoso saturado a 80% (2 x 250 ml) e seco sobre Na₂SO₄ sólido. Após remoção do solvente no vácuo, o resíduo foi coevaporado com tolueno (100 ml) e CH₃CN (100 ml) para dar 9,5 g de 2-O-fosforamidite de 1-O-dimetoxitritil-2-(O-nitrofenil)-1,2-etanodiol (produção a 100%)

Exemplo 2

A síntese de [2-(2-nitrofenil)-1-(O-dimetoxitritiloxi) etoxi]-N,N-diisopropilamino-2 ciano etoxi fosfina ("NP2"): 2-(O-nitrofenil) 1,2-etanodiol (2,5 g, 13,6 mmole) foi seco por coevaporação com CH₃CN. O composto seco foi então dissolvido em CH₂Cl₂ (100 ml) -CH₃Cl (10 ml). Foram adicionados N,N-dimetilaminopiridina (100 mg) e trietilamina (3,6 ml, 26 mmole), e com agitação, foi adicionado cloreto de t-butildimetilsilil (TBDMS-Cl) (2,6 g, 15 mmole). A agitação foi continuada por 18 horas a 20°C. Depois foi adicionado mais TBDMS-Cl (200 mg). Após uma hora a mistura reaccional foi diluída com 400 ml de etil acetato. A fase orgânica foi lavada com NaHCO₃ a 5% (2 x 250 ml) e solução aquosa de NaCl saturada a 80% (1 x 250 ml) e seca sobre Na₂SO₄ sólido. Após remoção dos solventes no vácuo, o resíduo foi coevaporado com tolueno (200 ml) e CH₃CN (200 ml) para dar 2,5 g de 1-O-TBDMS-2-(O-nitrofenil)-1,2-etanodiol bruto. O material bruto foi coevaporado com piridina, e o resíduo foi dissolvido em piridina (50 ml). Foi adicionado DMT-Cl (30 mmole) e a mistura reaccional agitada a 20°C durante 48 horas. Após remoção do solvente no vácuo, o resíduo foi dissolvido em etil acetato (250 ml). A fase orgânica foi lavada com 5% de NaHCO₃ (2 x 250 ml) e solução aquosa de NaCl saturada a 80 % (1 x 250 ml) e seca sobre Na₂SO₄ sólido. Após remoção do solvente no vácuo, o resíduo foi



coevaporado com tolueno e CH₃CN. O resíduo foi dissolvido em THF (100 ml) e foram adicionados também 10 ml de solução 1M de fluoreto de tetrabutílamônio em THF. A remoção do grupo 1-O-TBDMS ficou completa em 30 minutos. O produto foi purificado numa coluna de sílica gel para dar 2-O-DMT-2-(O-nitrofenil)-1,2-etanodiol (2,4 g, 4,5 mmole) puro. Este material foi convertido em 2-cianoetilfosforamidite, como se descreve acima, numa produção quantitativa.

Exemplo 3

Um fragmento teste 5'-T₁₅-3'-p-NP1-p-5'-T₂₀-3'-OH ("p"= fosfato) foi conseguido usando procedimentos sintéticos standard para a fosforamidite. Após completa desprotecção, o oligómero de DNA purificado dissolvido em água, foi sujeito a fotólise durante 15 minutos (lâmpada de Hg, c.o. > 350 nm). As análises de PAGE da amostra sujeita a fotólise revelaram que o tratamento tinha resultado na clivagem completa do fragmento teste em novos fragmentos que migraram, como seria de esperar, para os segmentos T₂₀ e T₁₅.

Exemplo 4

Síntese do 5'-DTM-1'-O-(2-nitrobenzil)-2-desoxirribose 3'-O-metilfosforamidite:

A desoxirribose (10 mmole), 2-nitrobenzil álcool (30 mmole) e ácido dicloroacético ("DCA"; 100ml) em 100 ml de acetonitrilo seco foram aquecidos a refluxo lento por duas horas. Após arrefecimento até 20°C foi adicionada piridina para neutralizar o DCA e o solvente removido no vácuo. O resíduo foi



dissolvido em 500 ml de etil acetato e a fase orgânica lavada com 400 ml de NaHCO_3 a 5%, 400 ml de solução aquosa de NaCl saturada a 80% e seca sobre Na_2SO_4 sólido. Após filtração, o solvente foi removido no vácuo e o residuo coevaporado com tolueno e acetonitrilo. A mistura reaccional bruta foi dissolvida em CH_2Cl_2 e o produto foi isolado por cromatografia em sílica gel usando um gradiente de metanol de 0-6%. As fracções contendo o produto (mistura de alfa- e beta- isómeros, razão 1:1) foram misturadas e o solvente removido no vácuo para dar 2,5 g de um sólido levemente amarelo (5,2 mmole; produção a 52%).

O residuo da desoxirribose-O-nitrobenzil foi dissolvido em 25 ml de CH_2Cl_2 contendo 200 mg de dimetilamino piridina ("DMAP") e 1,4 ml de trietilamina. A esta solução foi adicionada gota a gota DMT-Cl (1,7 g; 5 mmole) dissolvidas em 25 ml de CH_2Cl_2 . Quando todo o material de partida foi consumido, a mistura reaccional foi diluída com 250 ml de etil acetato e extraída, seca e coevaporada como se descreveu acima. A mistura reaccional bruta foi sujeita a cromatografia em sílica gel e os isómeros do 5'-DMT-1'-O-2-nitrobenzil-2'-desoxirribose foram eluidos com um gradiente de metanol 0-3% para dar 2,3 g de espuma amarela (2,65 mmole).

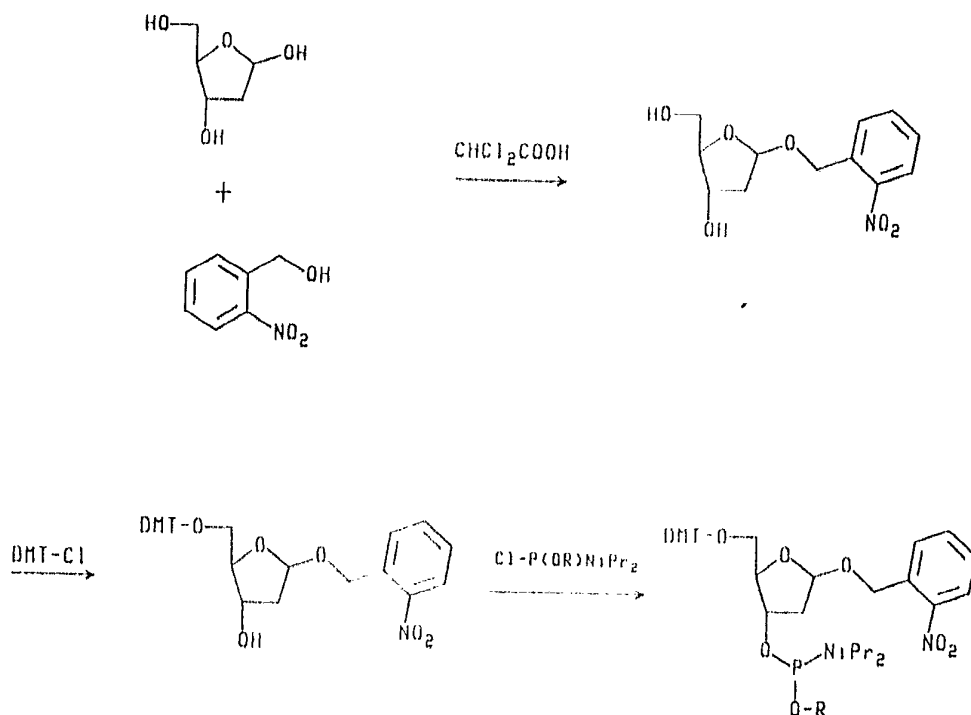
O 3-metilfosforamidite foi preparado usando procedimentos standard. O 5'-DMT-1'-O-(2-nitrobenzil)-2'-desoxirribose foi dissolvido em 40 ml de CH_2Cl_2 contendo 2,8 ml de DiPEA e foi adicionado N,N-diisopropilaminometilclorofosfina (2,0 mmole) a 0°C. Após 30 minutos a mistura reaccional foi diluída com 200 ml de etil acetato que foi lavado com 3 x 200 ml de solução aquosa de NaCl saturada a 80%, seca sobre Na_2SO_4

sólido e filtrada. O solvente foi removido no vácuo e o resíduo coevaporado com tolueno e acetonitrilo. Este material foi então usado sem mais qualquer purificação.

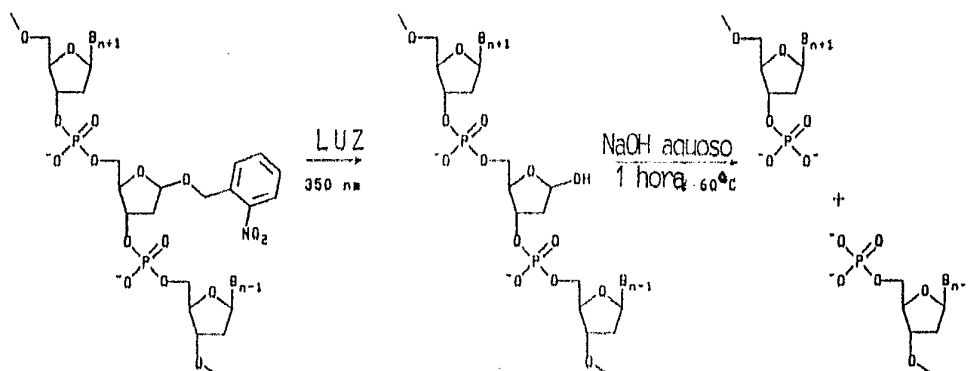
Este nucleósido não básico e protegido, de fosforamidite foi incorporado sob condições standard num oligómero 3'-T₂₀-[1'-O-(2-nitrobenzil)-2'-desoxirribose]-T₁₀ num suporte sólido. O fragmento foi desprotegido com DCA (para remover o 5'-DMT), tiofenol (tiofenol/trietilamino/dioxano, 1:1:2 v/v por uma hora a 20°C para remover o metil), e NH₄OH (hidróxido de amónio aquoso por uma hora a 20°C, para clivar a ligação 3'-succinato). O sobrenadante foi aquecido a 60°C durante 18 horas. Não foi observada nenhuma clivagem demonstrando a estabilidade da base do radical 5'-DMT-1'-O-(2-nitrobenzil)-2'-desoxirribose. Uma amostra deste material em água foi sujeita a fotólise durante 20 minutos utilizando uma lâmpada de Hg de elevada densidade para remover o grupo O-nitrobenzil do radical 5'-DMT-1'-O-(2-nitrobenzil)-2'-desoxirribose. Não foi observada clivagem do oligómero durante o passo da fotólise. Uma amostra do oligómero que havia sido sujeita à fotólise foi incubada em NH₄OH a 60°C durante 2 horas. O tratamento básico resultou na completa clivagem do oligómero nos dois oligómeros componentes T₁₀-3'-p e 5'-p-T₂₀.

Estas reacções são apresentadas nos esquemas 5 e 6.

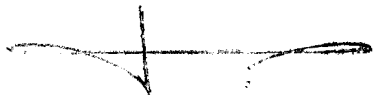
ESQUEMA 5



ESQUEMA 6



CLIVAGEM DE
FRAGMENTOS DE DNA LIGADOS DE 2-NITROBENZIL 2'-DESOXIRIBOSIDOS



Exemplo 5

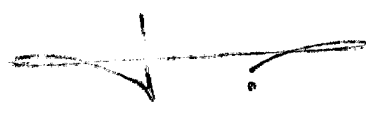
Preparação do N-4-(O-N,N-diisopropilaminometoxi fosfinil-6-oxihexil)-5'-DMT-2',3'-dibenzoil citidina:

A uridina (24,5 g, 100 mmole) foi seca por coevaporação com piridina (2 x 150 ml). O residuo foi dissolvido em 150 ml de piridina e cloreto de dimetoxitritil-Cl (34g, 100 mmole) adicionado gota a gota com agitação. A mistura reaccional foi deixada a agitar durante 48 horas. Foi adicionado metanol (100 ml) e após 30 minutos os solventes foram removidos no vácuo. O residuo foi dissolvido em 800 ml de etil acetato e a fase orgânica foi lavada com 3 x 800 ml de NaHCO₃ a 5%, 3 x 800 ml de solução aquosa de NaCl saturada a 80%, seco sobre Na₂SO₄, filtrado e evaporado até à secura, seguido por coevapopração com tolueno e acetonitrilo. A cromatografia em silica gel do produto em bruto utilizando um gradiente de 0-7% metanol/1% trietilamina rendeu 46,36 g, 84,9 mmole de (5'-DMT-ribouridine) foi seco por coevaporação com piridina e o residuo foi dissolvido em 250 ml de piridina. Foi adicionado gota a gota cloreto de benzoil (20 ml, 170 mmole) em 100 ml de cloreto de metileno, à solução de piridina a 0°C. Após agitação a 20°C durante 2 horas, o solvente foi removido no vácuo e o residuo coevaporado com tolueno. O residuo foi dissolvido em etil acetato e sujeito ao mesmo tratamento aquoso como se descreveu acima para a 5'-DMT-uridina.

A 5'-DMT-2',3'-dibenzoil-uridina em bruto, que foi utilizada sem mais purificações, foi dissolvida em 150 ml de acetonitrilo. O 1,2,4-Triazole (88,19 g) foi suspenso em 400 ml de acetonitrilo a 0°C, e foi adicionado POCl₃ (27,56 ml) com agitação rápida. Depois foi adicionada trietilamina (106,7 ml)

gota a gota, durante 15 minutos, à mistura semi-líquida agitada a 0°C. Após 30 minutos, a 5'-DMT-2',3'-dibenzoil-uridina diluída em 150 ml de acetonitrilo foi adicionada gota a gota à mistura semi-líquida, agitada a 0°C, acima referida. O banho de água gelada foi removido e a agitação continuada durante uma hora à temperatura ambiente. A mistura reaccional foi diluída com 1400 ml de etil acetato, extraída e seca, como se refere acima. Os solventes foram removidos no vácuo, co-evaporados com tolueno e depois acetonitrilo para dar 4-(triazolo)-1-b-D-5'-O-DMT-2',3'-dibenzoil-(ribofuranosil)-2(1H)-pirimidinona, sob a forma de uma espuma branca, em produção quantitativa. A uma solução agitada deste último composto em 350 ml de CH₃CN foi adicionado directamente 6-aminohexanol sólido (11,89 g, 101,5 mmole). A agitação foi continuada durante 18 horas. A mistura reaccional foi então diluída com 700 ml de acetato de etilo e extraída como se refere acima. Após secagem da fase orgânica sobre Na₂SO₄, o solvente foi removido no vácuo. O produto foi purificado numa coluna de sílica 60H, eluído com um gradiente de 0-5% de acetato de etilo em CH₂Cl₂ para dar 35,4 g (41,5 mmole) de espuma amarela de N-4-(6-hidroxihexil)-5'-O-DMT-2',3'-dibenzoilcitidina.

A metilfosforamidite correspondente foi preparada utilizando procedimentos standard. O nucleósido modificado N-4-(6-hidroxihexil)-5'-O-DMT-2',3'-dibenzoil citidina (8,7 g, 10,2 mmole) foi dissolvido em 50 ml de cloreto de metileno contendo 8,8 ml (50 mmole) diisopropiletilamina e a N,N-diisopropilaminometoxi clorofosfina (1,94 ml, 10 mmole) foi adicionada lentamente a 0°C. Após 30 minutos, a mistura reaccional foi diluída com 250 ml de acetato de etilo e a fase



orgânica foi lavada com 2 x 250 ml de NaHCO_3 a 5%, 2 x solução aquosa de NaCl saturada a 80%, seca sobre Na_2SO_4 sólido e filtrada. O solvente foi removido no vácuo e o resíduo co-evaporado com tolueno e acetonitrilo. O material fosforilado em bruto foi purificado numa coluna de sílica gel usando um gradiente de acetato de etilo de 50-70% em cloreto de metileno contendo 2% de trietilamina para dar 7,25 g de N-4-(O-N,N-diisopropilaminimetoxi fosfinil - 6 - oxihexil) - 5'- DMT-2',3'-dibenzoil citidina.

Exemplo 6

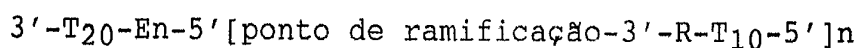
A clivagem oxidativa do sistema cis-diol com periodato de sódio prontamente ocorre no ribonucleósido terminal das moléculas de RNA. Na presença de aminas, o dialdeído resultante, prontamente elimina quer o radical da base, quer o fosfato no carbono 5'. Este exemplo descreve a utilização deste conceito no projecto de um site clivável de uma molécula onde dois oligómeros de DNA estão ligados através de 5' e da cadeia lateral de grupos hidroxilo de uma molécula de N-4-(6-hidroxihexil)-citidina.

O ribonucleósido modificado R contendo um grupo hidroxil exo-alquil cíclico foi sintetizado a partir da uridina. A fosforamidite ribonucleosídica R protegida foi incorporada sob condições standard num oligómero 5'-T₁₀-R-T₁₅-3' num suporte sólido. As amostras purificadas do produto foram sujeitas a uma série de tratamentos químicos, e as amostras analisadas por PAGE. Não foi observada clivagem do oligómero após tratamento com hidróxido de amónio a 60°C durante 18 horas. O tratamento com periodato de sódio em água a 4°C, durante 30 minutos, resultou



numa clivagem parcial. Uma outra exposição do oligómero tratado com periodato de sódio, a n-propilamina em acetato de trietilamônio, a 60°C durante 90 minutos, resultou na clivagem completa do oligómero nas espécies T₁₀-3'-p e T₁₅ modificadas na extremidade 5'. O esquema 7 representa a clivagem do ribonucleósido R ligado aos fragmentos de DNA.

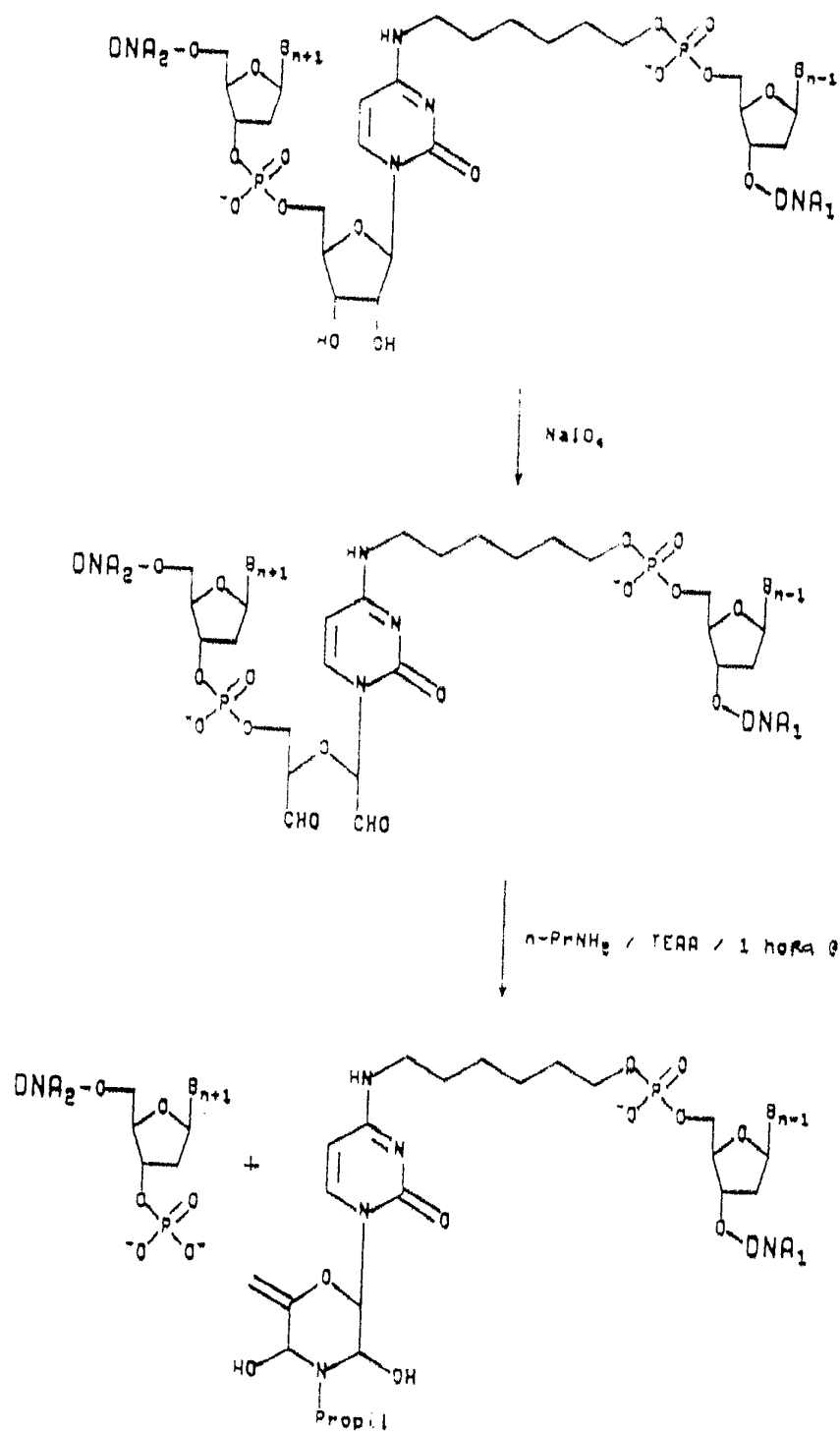
O esquema de clivagem tem sido aplicado a diversos oligómeros de DNA ramificados, em que o ribonucleósido de fosforamidite R protegido, foi incorporado durante o primeiro ciclo da síntese secundária de oligómeros lineares, presos a um suporte sólido contendo 10, 20 e 30 pontos de ramificação em pente, respectivamente. Em cada caso a síntese secundária foi um oligómero T₁₀ resultando em oligómeros ramificados com a seguinte estrutura:



$$n = 10, 20, 30$$

Estas moléculas foram sujeitas às condições de clivagem. As análises por PAGE indicaram que todos os braços laterais oligoméricos foram clivados, e o T₁₀-3'-p foi o produto principal em todos os casos. As análises revelaram ainda que a distribuição do produto depende do número de ramificações nas moléculas de DNA ramificadas, nas quais a quantidade de oligómeros menores aumenta com o aumento do número de ramificações da molécula. A diminuição na homogeneidade do produto parece ser principalmente, o resultado de pressões estéricas dentro do suporte sólido durante a síntese química.

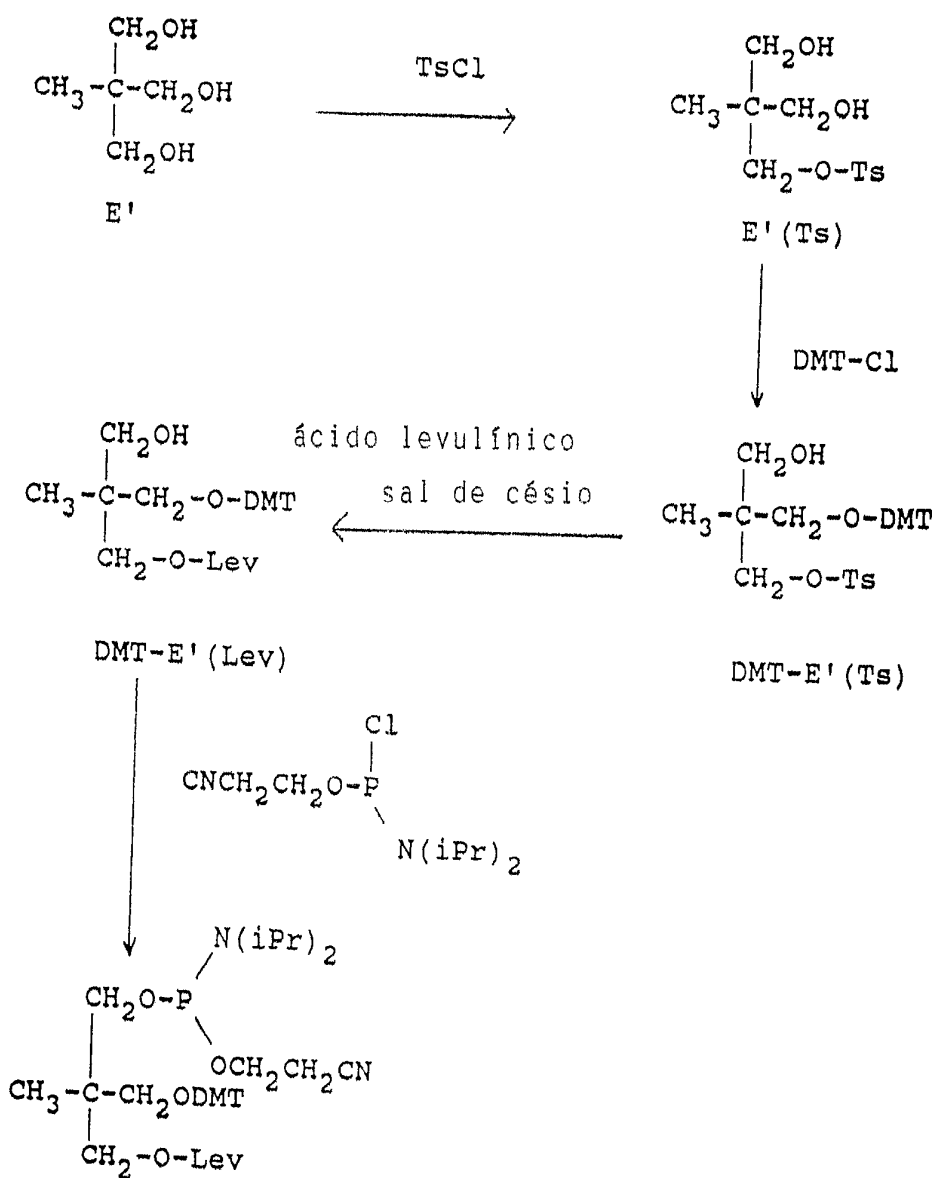
ESQUEMA 7



Exemplo 7

Este exemplo descreve a preparação do ligando multifuncional "DMT-E' (Lev) BCE amidite" como se mostra no esquema 8.

ESQUEMA 8



DMT-E' (Lev) BCE amidite

O tris-hidroximetil etano (E'; 200 mmole) foi co-evaporado com 250 ml de piridina e o residuo dissolvido em 125 ml de piridina. A esta soluçao, arrefecida a 0°C, foi adicionada gota a gota uma soluçao de cloreto de tosil ("TsCl"; 50 mmole) em 125 ml de CH₂Cl₂. Deixou-se a mistura reaccional atingir a temperatura ambiente com agitaçao continuada por um total de 5 horas. Depois, os solventes foram removidos no vcuo. Os residuos foram dissolvidos em 500 ml de acetato de etilo que foi lavado com 2 x 500 ml de soluçao NaHCO₃ a 5%, 1 x 500 ml soluçao aquosa de NaCl saturada a 80%, e finalmente seca sobre Na₂SO₄ sólido. Após filtraçao o solvente foi removido no vcuo para dar 13,7 g de E'(Ts) em bruto. Este material foi usado sem mais purificaçoes. Todo o E'(Ts) foi dissolvido em 250 ml de CH₂Cl₂ e trietilamina (14 ml; 100 mmole) e foi adicionada N,N-dimetilaminopiridina (100 mg). A esta soluçao foi adicionado DMT-Cl (13,6 g; 40 mmole) dissolvidas em 125 ml de CH₂Cl₂. Após 18 horas à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi diluida com 500 ml de acetato de etilo e sujeita ao mesmo tratamento aquoso descrito acima.

Os produtos brutos da reacçao foram purificados numa coluna de silica standard ("800 ml" de silica) eluidos com um gradiente de metanol em CH₂Cl₂/trietilamina a 0,5% para dar 14,8 g (25 mmole) de DMT-E'(Ts) puro. Todo este material foi tratado com 50 mmole de sal de césio do ácido levulínico acabado de preparar (preparado de acordo com M. Bodanszky e A. Bodanszky, em The Practice of Peptide Synthesis, p.37, Springer Verlag (1984)), em 50 ml de DMF. A soluçao foi aquecida numa placa quente num recipiente selado (condiçoes 3; temperatura ca. 100°C) durante 18

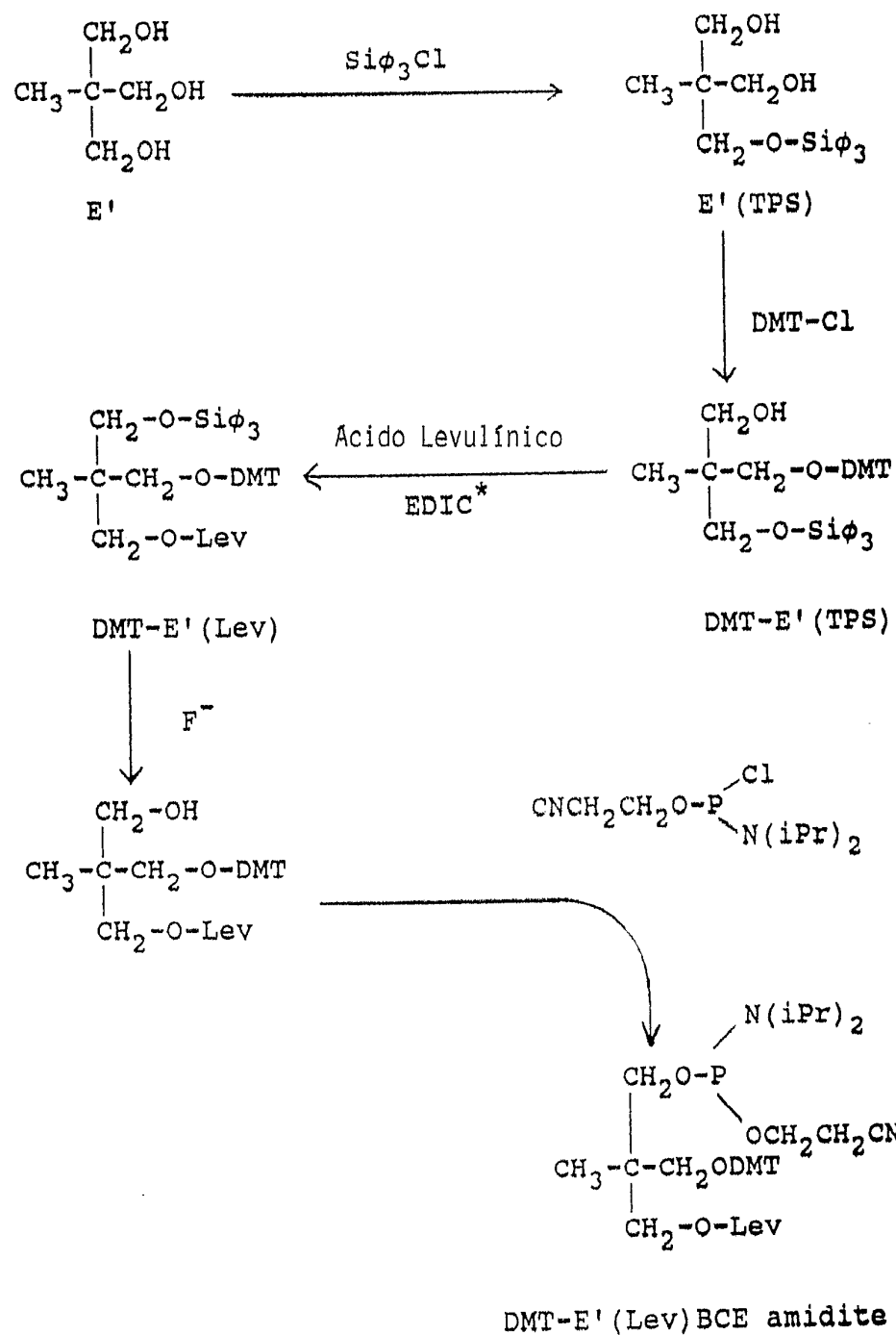


horas, e findo este tempo as análises revelaram que a reacção estava completa. O DMF foi removido no vácuo e o residuo dissolvido em acetato de etilo. A fase orgânica foi lavada como se descreve acima. O produto bruto foi sujeito a cromatografia em sílica gel e o produto puro foi eluido com CH₂Cl₂/triethylamina 0,5% para dar 2,5 g (4,8 mmole) de produto puro de DMT-E'(Lev). O DMT-E'(Lev) puro foi convertido em 2-cianoetil fosforamidite como se segue. O DMT-E'(Lev) foi dissolvido em 20 ml de CH₂Cl₂ contendo N,N-diisopropyletilamina (2,6 ml; 15 mmole) e arrefecido a 0°C; a esta solução foi adicionada 2-cianoetoxi-N,N-diisopropilaminoclorofosfina (1,1 ml; 5mmole) com uma seringa e sob argon. Após cerca de 30 minutos a reacção estava completa e a mistura reaccional foi diluída com 150 ml de acetato de etilo. A fase orgânica foi lavada com 2 x 150 ml de NaHCO₃ a 5% e 2 x 150 ml de solução de NaCl saturada a 80%. Após secagem sobre Na₂SO₄ sólido a solução foi filtrada e evaporada até à secura para dar 3,6 g de espuma branca de DMT-E'(Lev) BCE amidite. A amidite em bruto foi purificada numa coluna de sílica gel eluida com CH₂Cl₂/acetato de etilo/triethylamina (45:45:10 v/v) para dar uma espuma branca de DMT-E'(Lev) BCE amidite pura (3,24 g; 4,5 mmole). NMR (³¹P) δ 148,5 ppm, e eficiência de se acoplar 98%.

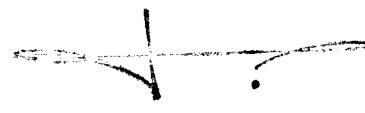
Exemplo 8

Este exemplo descreve uma síntese alternativa do ligando multifuncional "DMT-E'(Lev) BCE amidite" como se apresenta no esquema 9.

ESQUEMA 9



*EDIC = hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida



O tris-hidroximetil etano (200 mmole) foi co-evaporado com 250 ml de piridina e o residuo dissolvido em 125 ml de piridina. A esta soluçao, arrefecida até 0°C, foi adicionada gota a gota uma soluçao de trifenilclorosilano ("TPS"; 50 mmole) em 125 ml de CH₂Cl₂. Deixou-se a mistura reaccional aquecer até a temperatura ambiente e a agitaçao foi continuada até um total de 18 horas. Depois, os solventes foram removidos no vácuo. O residuo foi dissolvido em 500 ml de acetato de etilo que foi lavado com 2 x 500 ml de soluçao de NaHCO₃ a 5%, 1 x 500 ml de soluçao aquosa de NaCl saturada a 80%, e finalmente seco sobre Na₂SO₄ sólido. Após filtraçao, o solvente foi removido no vácuo para dar 18 g de E'(TPS) bruto. Este material foi usado sem mais purificaçoes. Todo o E'(TPS) (46 mmole) foi dissolvido em 250 ml de CH₂Cl₂ e trietanolamina (14 ml; 100 mmole) e foi adicionada N,N-dimetilaminopiridina (100 mg). A esta soluçao foi adicionado DMT-Cl (50 mmole) dissolvido em 125 ml de CH₂Cl₂. Após 18 horas a temperatura ambiente, a mistura reaccional foi diluida com 500 ml de acetato de etilo e sujeita ao mesmo tratamento aquoso como se descreve acima para dar 35,8 g de espuma amarela.

O produto da reacçao bruto foi purificado numa coluna standard de silica gel ("800 ml" silica) eluido com um gradiente de metanol em CH₂Cl₂/trietanolamina 0,5% para dar 14,8 g (25 mmole) de DMT-E'(TPS) puro. O DMT-E'(TPS) (10 mmole) purificado foi dissolvido em 50 ml contendo N,N-dimetilaminopiridina (100 mg) e 2,6-lutindine (2,3 ml, 20 mmole) e foi adicionado ácido levulínico (2,3 g, 20 mmole). A esta soluçao foi adicionado gota a gota hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (3,83 g, 20 mmole) dissolvido em 50 ml de CH₂Cl₂. Após 18

horas a reacção estava completa (análise por TLC), e a mistura reaccional foi dissolvida com 500 ml de acetato de etilo e sujeita ao mesmo tratamento aquoso descrito cima. O residuo obtido a partir deste tratamento foi dissolvido em THF (50 ml) e foram adicionados, primeiro, 40 ml de piridina e depois 10 ml ácido acético concentrado, seguidos de 20 ml de fluoreto de tetrabutylamónio 1M em THF (Aldrich). A análise por TLC após 30 minutos revelou que todo o material inicial havia sido consumido. A maior parte do solvente foi então removido no vácuo e o restante residuo sujeito ao seguinte tratamento aquoso: O acetato de etilo (250 ml) para dissolver a maior parte do material orgânico e 250 ml de solução de bicarbonato de sódio a 5% foram adicionados lentamente (evolução de CO₂). O NaHCO₃ sólido foi então adicionado com agitação e dissolvido até restar sal sólido e até cessar toda a evolução do CO₂. A solução aquosa/orgânica combinada foi transferida para uma ampola de decantação e a fase orgânica lavada como se descreve acima. A remoção do solvente produziu 5,6 g de DMT-E'(Lev) bruto, como um óleo claro. O produto foi isolado por cromatografia em sílica gel usando ca. 500 g de sílica e CH₂Cl₂/triethylamina a 0,25% contendo 0% e 1% de metanol como eluente para dar 2,7 g (5,2 mmole) de DMT-E'(Lev) como um óleo claro e sem cor.

O DMT-E'(Lev) puro foi convertido em 2-cianoetil fosforamidite como se segue: DMT-E'(Lev) foi dissolvido em 20 ml de CH₂Cl₂ contendo N,N-diisopropiletilamina (2,6 ml; 15 mmole) e arrefecido até 0°C; a esta solução foi adicionado, com uma seringa e sob argon, 2-cianoetoxi-N,N-diisopropilamino-clorofosfina (1,1 ml; 5 mmole). Após ca. 30 minutos a reacção

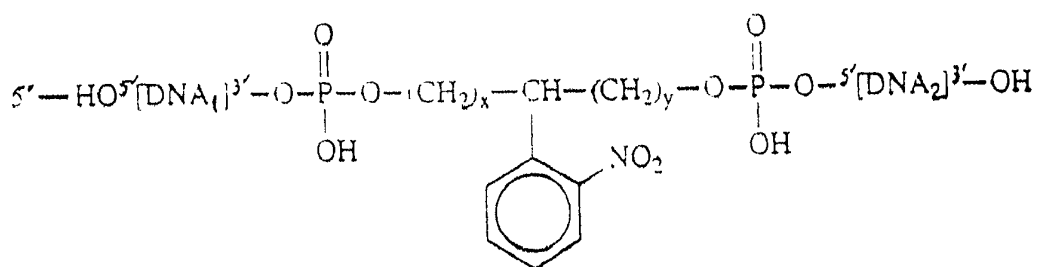


estava completa e a mistura reaccional foi diluída com 150 ml de acetato de etilo. A fase orgânica foi lavada com 2 x 150 ml de NaHCO_3 a 5% e 2 x 150 ml de solução saturada de NaCl a 80%. Após secagem sobre Na_2SO_4 sólido a solução foi filtrada e evaporada até à secura para dar 3,4 g de espuma branca de DMT-E'(Lev) BCE amidite. A amidite em bruto foi purificada numa coluna de sílica gel, eluída com CH_2Cl_2 /etil acetato/trietilamina (45:45:10 v/v), para dar uma espuma branca de DMT-E'(Lev) BCE amidite pura (2,4 g; 3,3 mmole). NMR (^{31}P) δ 148,5 ppm e eficiência de acoplamento 98%.

REIVINDICAÇÕES

1- Um método para detectar a presença de uma sequência oligonucleotídica de interesse, num ácido nucleico analítico presente numa amostra de ácido nucleico, caracterizado pelo facto de compreender:

- a combinação, sob condições de hibridização, da referida amostra de ácido nucleico com o reagente polinucleotídico com a seguinte estrutura:

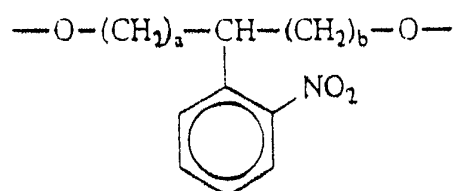


no qual:

DNA₁ é um primeiro segmento de DNA;

DNA₂ é um segundo segmento de DNA; e

um dos dois X e Y é zero, enquanto que o outro é um número inteiro da gama do 1 aos 12 inclusivé, em que um dos referidos, amostra e reagente, é ligado a um suporte, e a hibridização do referido analítico e do referido reagente polinucleotídico resulta na ligação de um marcador ao dito suporte, através do sitio de clivagem



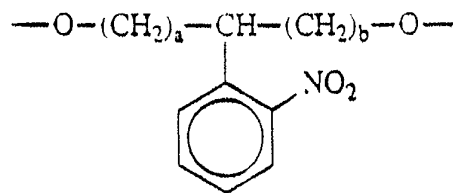
libertando substancialmente o referido suporte do marcador ligado ao referido suporte em vez de através do referido local de clivagem selectiva;

clivagem do referido local de clivagem através de fotólise, utilizando luz com um comprimento de onda de cerca de, pelo menos, 350 nm; e

detecção do marcador livre do referido suporte.

2- Um método para detectar a presença de uma sequência de oligonucleótidos de interesse, num ácido nucleico analítico presente numa amostra de ácido nucleico, caracterizado pelo facto de compreender:

a combinação, sob condições de hibridização num meio aquoso, da referida amostra de ácido nucleico com o reagente polinucleotídico citado na reivindicação 1, em que um dos referidos amostra ou um componente do referido reagente é ligado a um suporte, e a hibridização do referido analítico e do referido reagente polinucleotídico resulta na ligação de um marcador ao referido suporte através do sítio de clivagem



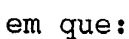
separação do referido suporte tendo ligado o reagente polinucleotídico e o ácido nucleico analítico, do referido meio aquoso;

lavagem do referido suporte com um meio de diferente rigor de hibridização, do referido meio aquoso, para remover o marcador ligado ao referido suporte, em vez de através do referido local de clivagem;

clivagem do referido local de clivagem via fotólise usando luz tendo um comprimento de onda de, pelo menos, 350 nm; e

detecção do marcador livre do referido suporte.

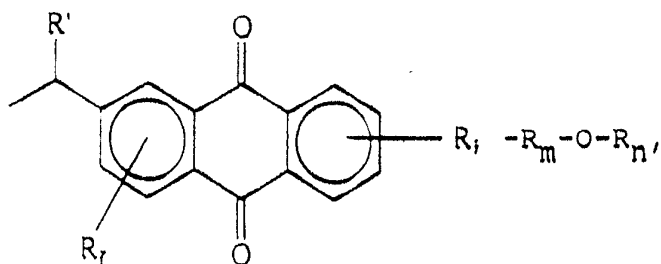
The diagram illustrates a two-dimensional lattice structure. It consists of a grid of points. Arrows indicate the types of interactions between these points: solid arrows represent nearest-neighbor interactions, and dashed arrows represent next-nearest-neighbor interactions. The distance between nearest neighbors is labeled as 'a', and the distance between next-nearest neighbors is labeled as 'b'.

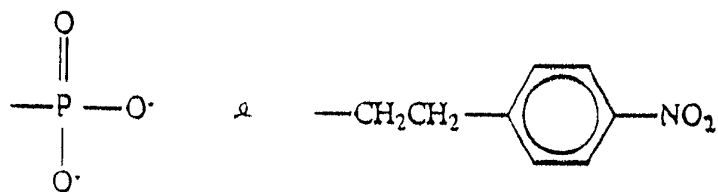


1

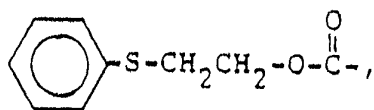
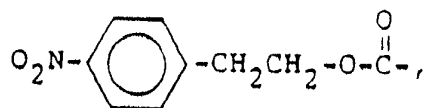
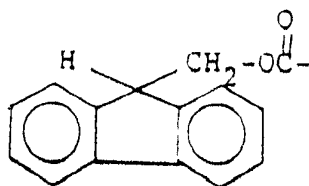
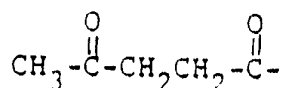
1

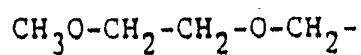
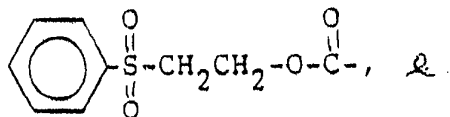
penten-1-il,



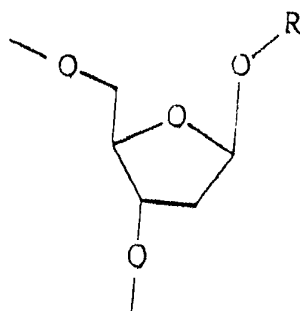


em que R' é hidrogénio, aril ou aralquil, o R_i pode ser o mesmo ou diferente, e são seleccionados do grupo consistindo em amino, nitro, halogénio, hidroxil, alquil inferior, e alcoxi inferior, o R_j pode ser o mesmo ou diferente e são seleccionados do grupo consistindo em amino, nitro, halogénio, hidroxil, alquil inferior e alcoxi inferior, i é zero, 1, 2 ou 3, j é zero, 1, 2, 3 ou 4, R_m é um C₁-C₁₆ alquileno ou um oligómero oxietileno - (CH₂CH₂O)_z-, em que z é um número inteiro na gama de 1 até 16 inclusive, e R_n é seleccionado do grupo consistindo em

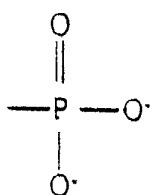
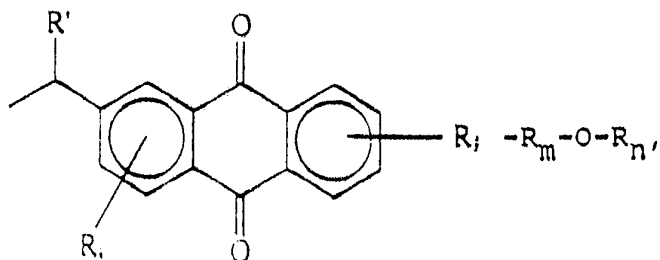




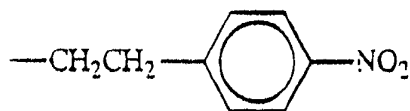
em que, um dos referidos amostra ou reagente é ligado a um suporte, e a hibridização do referido analítico e do referido reagente polinucleotídico resulta na ligação dum marcador ao referido suporte através do sítio de clivagem



R é seleccionado do grupo consistindo em 2-nitrobenzil, 4-penten-1-il

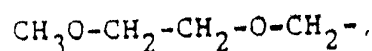
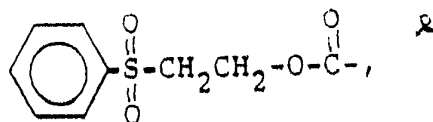
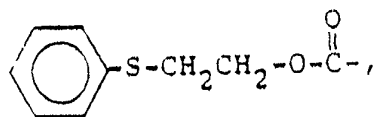
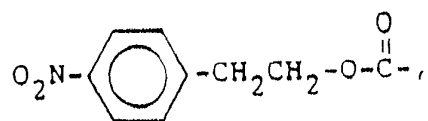
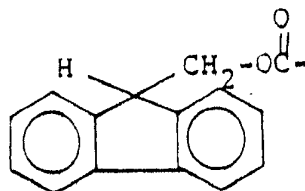
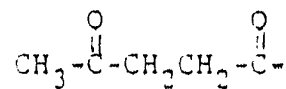


e



~

no qual R' é hidrogénio, aril ou aralquil, o R_i pode ser o mesmo ou diferente, e são seleccionados do grupo consistindo em amino, nitro, halogénio, hidroxil, alquil inferior e alcoxi inferior, o R_j pode ser o mesmo ou diferente e podem ser escolhidos do grupo consistindo em amino, nitro, halogénio, hidroxil, alquil inferior e alcoxi inferior, i é zero, 1, 2, ou 3, j é zero, 1, 2, 3, ou 4, R_m é alquileno C₁-C₁₆ ou um oligómero de oxietileno -(CH₂CH₂O)_z, em que z é um número inteiro na gama de 1 a 16 inclusivé, e R_n é seleccionado do grupo consistindo em



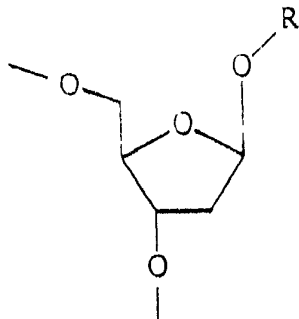
libertando substancialmente o referido suporte do marcador ligado ao referido suporte em vez de através do referido sitio de clivagem seleccionável;

clivagem do referido sitio de clivagem via fotólise utilizando luz com um comprimento de onda de, pelo menos, 350 nm; e

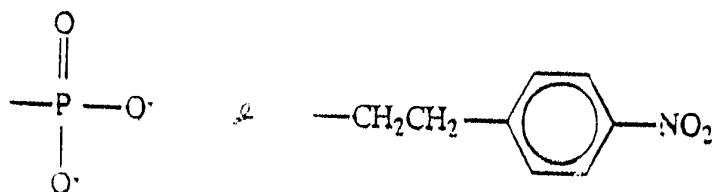
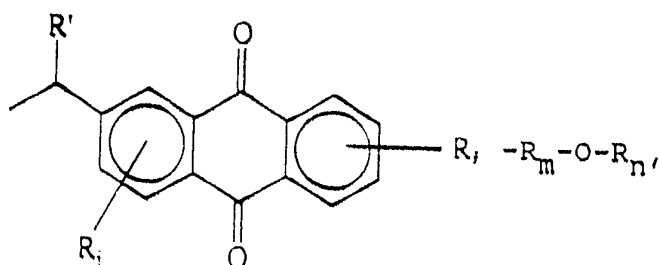
detecção do marcador livre do referido suporte.

4- Um método para detectar a presença de uma sequência oligonucleotídica de interesse, num ácido nucleico analítico presente numa amostra de ácido nucleico, caracterizado pelo facto de compreender:

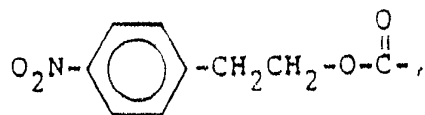
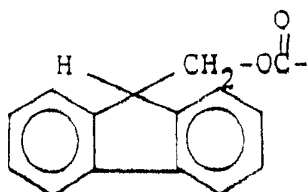
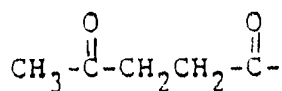
a combinação, sob condições de hibridização, num meio aquoso, da referida amostra de ácido nucleico com o reagente polinucleotídico citado na reivindicação 3, em que um dos referidos, amostra ou um componente do referido reagente, é ligado a um suporte, e a hibridização do referido analítico e do referido reagente polinucleotídico resulta num marcador sendo ligado ao referido suporte através do sitio de clivagem.

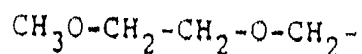
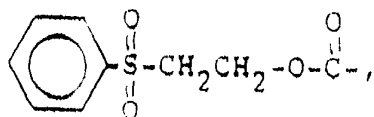
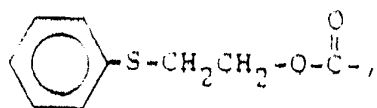


R é seleccionado do grupo consistindo em 2-nitrobenzil, 4-penten-1-il,



em que R' é hidrogénio, aril ou aralquil, o R_i pode ser o mesmo ou diferente e são escolhidos do grupo consistindo em amino, nitro, halogénio, hidroxil, alquil inferior e alcoxi inferior, o R_j pode ser o mesmo ou diferente e são escolhidos do grupo consistindo em amino, nitro, halogénio, hidroxil, alquil inferior e alcoxi inferior, i é zero, 1, 2 ou 3, j é zero, 1, 2, 3 ou 4, R_m é alquilenos C₁-C₁₆ ou um oligómero -(CH₂CH₂O)_z- em que z é um número inteiro da gama de 1 a 16 inclusivé, e R_n é seleccionado do grupo consistindo em





separando o dito suporte tendo ligado o reagente polinucleotídico e o ácido nucleico analítico, a partir do referido meio aquoso;

lavagem do referido suporte com um meio de rigor de hibridização diferente a partir do meio aquoso, para remover o marcador ligado ao referido suporte em vez de o referido local de clivagem;

clivagem do referido local de clivagem via fotólise, utilizando uma luz tendo um comprimento de onda de, pelo menos, cerca de 350 nm; e

detecção do referido marcador livre do referido suporte.

Lisboa, 29 de Julho de 1991

PELO AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
O ADJUNTO

13274 P 0199

1991/07/29

RESUMO

PAT.

98488 V

"METODO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UMA SEQUENCIA
OLIGONUCLEOTIDICA DE INTERESSE"

Este invento refere-se a um método para detectar a presença de uma sequência oligonucleotídica de interesse e a novos reagentes úteis numa variedade de contextos bioquímicos e químicos, incluindo ensaios de hibridização de ácidos nucleicos e fosforilação química de compostos contendo hidroxil. Os reagentes são particularmente úteis para introduzir sítios de clivagem e/ou sítios abásicos em cadeias oligonucleotídicas e polinucleotídicas.