



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112018070164-5 B1



(22) Data do Depósito: 31/03/2017

(45) Data de Concessão: 27/09/2022

(54) Título: CORANTES DIMÉRICOS OU POLIMÉRICOS ULTRABRILHANTES

(51) Int.Cl.: C09B 69/10; C07F 9/572; C07C 215/68; C07F 9/09; C07F 9/24; (...).

(30) Prioridade Unionista: 01/04/2016 US 62/317,192.

(73) Titular(es): SONY CORPORATION OF AMERICA; SONY CORPORATION.

(72) Inventor(es): TRACY MATRAY; SHARAT SINGH; MICHAEL VANBRUNT.

(86) Pedido PCT: PCT US2017025530 de 31/03/2017

(87) Publicação PCT: WO 2017/173355 de 05/10/2017

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/09/2018

(57) Resumo: São divulgados compostos úteis como corantes fluorescentes ou coloridos. Os compostos têm a seguinte estrutura (I) ou um estereoisômero, tautômero ou sal seus, em que R1, R2, R3, R4, R5, L1, L2, L3, L4, M, m e n são tais como aqui definidos. Também são fornecidos métodos associados à preparação e uso de tais compostos.

Relatório Descritivo do Pedido de Patente para: **"CORANTES
DIMÉRICOS OU POLIMÉRICOS ULTRABRILHANTES"**

ANTECEDENTES

Campo

[001] A presente invenção dirige-se, em geral, a corantes fluorescentes ou coloridos diméricos e poliméricos, e métodos para a sua preparação e uso em vários métodos analíticos.

Descrição do Assunto Relacionado

[002] Sabe-se que os corantes fluorescentes e/ou coloridos são particularmente adequados para aplicações em que é desejável um reagente de detecção altamente sensível. Os corantes que são capazes de marcar preferencialmente um ingrediente ou componente específico em uma amostra permitem ao pesquisador determinar a presença, quantidade e/ou localização desse ingrediente ou componente específico. Além disso, sistemas específicos podem ser monitorados em relação à sua distribuição espacial e temporal em diversos ambientes.

[003] Os métodos de fluorescência e colorimétricos são extremamente difundidos em química e biologia. Estes métodos fornecem informações úteis sobre a presença, estrutura, distância, orientação, complexação e/ou localização de biomoléculas. Além disso, métodos resolvidos no tempo são cada vez mais usados em medições de dinâmica e

cinética. Como resultado, muitas estratégias para a fluorescência ou marcação de cores de biomoléculas, como ácidos nucléicos e proteínas, foram desenvolvidas. Uma vez que a análise de biomoléculas ocorre tipicamente em um ambiente aquoso, o foco tem sido no desenvolvimento e uso de corantes solúveis em água.

[004] São desejáveis corantes altamente fluorescentes ou coloridos, pois o uso de tais corantes aumenta a relação sinal/ruído e fornece outros benefícios relacionados. Por conseguinte, foram feitas tentativas para aumentar o sinal proveniente dos grupamentos fluorescentes e/ou coloridos conhecidos. Por exemplo, compostos diméricos e poliméricos compreendendo dois ou mais grupamentos fluorescentes e/ou coloridas foram preparados na expectativa de que tais compostos resultariam em corantes mais brilhantes. No entanto, como resultado da supressão de fluorescência intramolecular, os corantes diméricos e poliméricos conhecidos não atingiram o aumento de brilho desejado.

[005] Existe, assim, uma necessidade na técnica de corantes solúveis em água que tenham um brilho molar aumentado. Idealmente, tais corantes e biomarcadores deveriam ser intensamente coloridos ou fluorescentes e deveriam estar disponíveis em uma variedade de cores e comprimentos de onda fluorescentes. A presente invenção

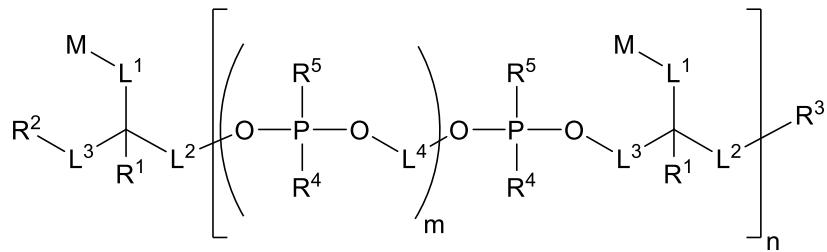
satisfaz esta necessidade e fornece outras vantagens relacionadas.

BREVE RESUMO

[006] Em resumo, as modalidades da presente dirigem-se, em geral, a compostos úteis como corantes e/ou sondas fluorescentes e/ou coloridas, solúveis em água, que permitem a detecção visual de moléculas de analitos, tais como biomoléculas, bem como reagentes para a sua preparação. Também são descritos métodos para detectar visualmente moléculas de analitos usando-se os corantes.

[007] Os corantes fluorescentes ou coloridos, solúveis em água, das modalidades da invenção são intensamente coloridos e/ou fluorescentes e podem ser prontamente observados por inspeção visual ou outros meios. Em algumas modalidades, os compostos podem ser observados sem iluminação ou ativação química ou enzimática prévias. Por seleção apropriada do corante, como aqui descrito, podem ser obtidas moléculas de analito, visualmente detectáveis, de diversas cores.

[008] Em uma modalidade, são fornecidos os compostos com a seguinte estrutura (I):



(I)

ou um estereoisômero, tautômero ou sal seus, em que R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , M , m e n são como aqui definidos. Compostos de estrutura (I) encontram utilidade em diversas aplicações, incluindo o uso como corantes fluorescentes e/ou coloridos em vários métodos analíticos.

[009] Em uma outra modalidade, é fornecido um modo para corar uma amostra, sendo que o modo compreende adicionar à dita amostra um composto de estrutura (I) em uma quantidade suficiente para produzir uma resposta óptica quando a dita amostra é iluminada a um comprimento de onda apropriado.

[010] Ainda em outras modalidades, a presente divulgação fornece um método para detectar visualmente uma molécula de analito, compreendendo:

- (a) fornecer um composto de (I); e
- (b) detectar o composto por suas propriedades visíveis.

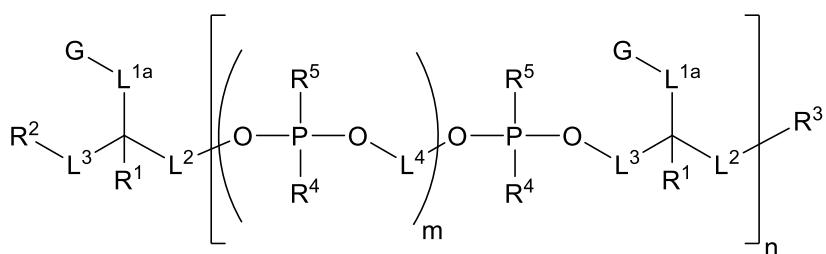
[011] Outros métodos divulgados incluem um método para detectar visualmente uma biomolécula, compreendendo o método:

- (a) misturar um composto de estrutura (I) com uma ou mais biomoléculas; e

(b) detectar o composto por suas propriedades visíveis.

[012] Outras modalidades dirigem-se a uma composição compreendendo um composto de estrutura (I) e uma ou mais biomoléculas. Também é fornecido o uso de tais composições em métodos analíticos para detecção da uma ou mais biomoléculas.

[013] Em algumas outras modalidades diferentes, é fornecido um composto de estrutura (II):



(II)

ou um estereoisômero, sal ou tautômero seus, em que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, L^{1a}, L², L³, L⁴, A, G, m e n são como aqui definidos. Compostos de estrutura (II) encontram utilidade em diversas aplicações, incluindo o uso como intermediários para a preparação de corantes fluorescentes e/ou coloridos de estrutura (I).

[014] Ainda em outras modalidades, é fornecido um método para marcar uma molécula de analito, compreendendo o método:

(a) misturar um composto de estrutura (II), em que R² ou R³ é Q ou um linker que compreende uma ligação covalente a Q, com a molécula de analito;

(b) formar um conjugado do composto e da molécula de analito; e

(c) fazer reagir o conjugado com um composto de fórmula $M-L^{1b}-G'$, formando-se, desse modo, pelo menos, uma ligação covalente por reação de G e G' , em que R^2 , R^3 , Q , G e $M-L^{1b}-G'$ são como aqui definidos.

[015] Em algumas modalidades diferentes, é fornecido um outro método para marcar uma molécula de analito, compreendendo o método:

(a) misturar um composto de estrutura (II), em que R^2 ou R^3 é Q ou um linker que compreende uma ligação covalente a Q , com um composto de fórmula $M-L^{1b}-G'$, formando-se, desse modo, pelo menos uma ligação covalente por reação de G e G' ; e

(b) fazer reagir o produto da etapa (A) com a molécula de analito, formando-se, assim, um conjugado do produto da etapa (A) e a molécula de analito, em que R^2 , R^3 , Q , G e $M-L^{1b}-G'$ são como aqui definidos.

[016] Em mais modalidades diferentes, é fornecido um método para preparar um composto de estrutura (I), compreendendo o método misturar um composto de estrutura (II) com um composto de fórmula $M-L^{1b}-G'$, formando-se, desse modo, pelo menos uma ligação covalente por reação de G e G' , em que L e $M-L^{1b}-G'$ são como aqui definidos.

[017] Estes e outros aspectos da invenção ficarão evidentes uma vez que se refira à seguinte descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[018] Nas figuras, números de referência idênticos identificam elementos similares. Os tamanhos e posições relativas dos elementos nas figuras não estão necessariamente desenhados em escala e alguns destes elementos estão arbitrariamente aumentados e posicionados de modo a melhorar a legibilidade das figuras. Além disso, não se pretende que as formas particulares dos elementos transmitam qualquer informação relativa à forma real dos elementos particulares, tendo sido selecionadas apenas para facilitar o reconhecimento nas figuras.

[019] A Figura 1 fornece espectros de fluorescência para compostos corantes de cumarina 3-méricos, 5-méricos e 10-méricos.

[020] A Figura 2 fornece espectros de fluorescência para compostos corantes de fluoresceína 3-méricos, 5-méricos e 10-méricos

DESCRIÇÃO DETALHADA

[021] Na descrição a seguir, certos detalhes específicos são apresentados de modo a fornecer uma compreensão completa de várias modalidades da invenção.

Contudo, um técnico especialista no assunto compreenderá que a invenção pode ser concretizada sem estes detalhes.

[022] A menos que o contexto exija de outra maneira, ao longo da presente descrição e reivindicações, a palavra "compreender" e suas variações, tais como "compreende" e "compreendendo" devem ser interpretadas em um sentido aberto e inclusivo, isto é, como "inclusivo, mas não se limitado a".

[023] A referência ao longo desta especificação a "uma modalidade" significa que um aspecto, estrutura ou característica particular descrito relacionado com a modalidade está incluída em pelo menos uma modalidade da presente invenção. Assim, as ocorrências da frase "em uma modalidade" em vários lugares ao longo desta especificação não são necessariamente todas referentes à mesma modalidade. Além disso, os aspectos, estruturas ou características particulares podem ser combinados de qualquer maneira adequada em uma ou mais modalidades.

"Amino" refere-se ao grupo $-\text{NH}_2$.

"Carbóxi" refere-se ao grupo $-\text{CO}_2\text{H}$.

"Ciano" refere-se ao grupo $-\text{CN}$.

"Formila" refere-se ao grupo $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$.

"Hidróxi" ou "hidroxila" referem-se ao grupo $-\text{OH}$.

"Imino" refere-se ao grupo $=\text{NH}$.

"Nitro" refere-se ao grupo $-\text{NO}_2$.

"Oxo" refere-se ao grupo substituinte =O.

"Sulfidrila" refere-se ao grupo -SH.

"Tioxo" refere-se ao grupo =S.

[024] "Alquila" refere-se a um grupo hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada que consiste apenas em átomos de carbono e hidrogênio, não contendo nenhuma insaturação, tendo de um a doze átomos de carbono (alquila C₁-C₁₂), um a oito átomos de carbono (alquila C₁-C₈) ou um a seis átomos de carbono (alquila C₁-C₆), e que está ligado ao resto da molécula por uma ligação simples, por exemplo, metila, etila, *n*-propila, 1-metiletil (*iso*-propila), *n*-butila, *n*-pentila, 1,1-dimetiletil (*t*-butila), 3-metil-hexila, 2-metil-hexila e semelhantes. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, grupos alquila são opcionalmente substituídos.

[025] "Alquíleno" ou "cadeia de alquíleno" referem-se a uma cadeia de hidrocarboneto divalente linear ou ramificada ligando o restante da molécula a um grupo radical, consistindo apenas em carbono e hidrogênio, não contendo insaturação e tendo de um a doze átomos de carbono, por exemplo, metíleno, etíleno, propíleno, *n*-butíleno, eteníleno, propeníleno, *n*-buteníleno, propiníleno, *n*-butiníleno e semelhantes. A cadeia de alquíleno é ligada ao restante da molécula através de uma ligação simples e ao grupo radical através de uma ligação simples. Os pontos de

junção da cadeia de alquíleno ao restante da molécula e ao grupo radical podem ser através de um carbono ou de quaisquer dois carbonos dentro da cadeia. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, alquíleno é opcionalmente substituído.

[026] "Alqueníleno" ou "cadeia de alqueníleno" referem-se a uma cadeia de hidrocarboneto divalente linear ou ramificada ligando o restante da molécula a um grupo radical, consistindo apenas em carbono e hidrogênio, contendo pelo menos uma dupla ligação carbono-carbono e tendo de dois a doze átomos de carbono, por exemplo, eteníleno, propeníleno, n-buteníleno e semelhantes. A cadeia de alqueníleno é ligada ao restante da molécula através de uma ligação simples e ao grupo radical através de uma ligação dupla ou de uma ligação simples. Os pontos de junção da cadeia de alqueníleno ao restante da molécula e ao grupo radical podem ser através de um carbono ou de quaisquer dois carbonos dentro da cadeia. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, alqueníleno é opcionalmente substituído.

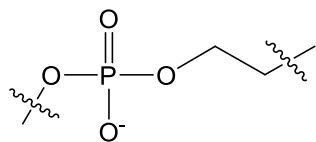
[027] "Alquiníleno" ou "cadeia de alquiníleno" referem-se a uma cadeia de hidrocarboneto divalente linear ou ramificada ligando o restante da molécula a um grupo radical, consistindo apenas em carbono e hidrogênio, contendo pelo menos uma tripla ligação carbono-carbono e

tendo de dois a doze átomos de carbono, por exemplo, etenileno, propenileno, n-butenileno e semelhantes. A cadeia de alquinileno é ligada ao restante da molécula através de uma ligação simples e ao grupo radical através de uma ligação dupla ou de uma ligação simples. Os pontos de junção da cadeia de alquinileno ao restante da molécula e ao grupo radical podem ser através de um carbono ou de quaisquer dois carbonos dentro da cadeia. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, alquinileno é opcionalmente substituído.

[028] "Éter alquílico" refere-se a qualquer grupo alquila tal como definido acima, em que pelo menos uma ligação carbono-carbono é substituída por uma ligação carbono-oxigênio. A ligação carbono-oxigênio pode estar na extremidade terminal (como em um grupo alcóxi) ou a ligação carbono-oxigênio pode ser interna (isto é, C-O-C). Os éteres alquílicos incluem pelo menos uma ligação carbono-oxigênio, mas podem incluir mais do que uma. Por exemplo, o polietilenoglicol (PEG) está incluído no significado do éter alquílico. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo éter alquílico é opcionalmente substituído. Por exemplo, em algumas modalidades, um éter alquílico é substituído por um álcool ou $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, em que cada um dentre R_a , R_b e R_c é tal como definido para os compostos de estrutura (I).

[029] "Alcóxi" refere-se a um grupo da fórmula $-OR_a$, onde R_a é um grupo alquila tal como definido acima, contendo de um a doze átomos de carbono. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo éter alquílico é opcionalmente substituído.

[030] "Heteroalquíleno" refere-se a um grupo alquíleno, tal como definido acima, compreendendo pelo menos um heteroátomo (por exemplo, N, O, P ou S) dentro da cadeia de alquíleno ou no terminal da cadeia de alquíleno. Em algumas modalidades, o heteroátomo está dentro da cadeia de alquíleno (isto é, o heteroalquíleno compreende pelo menos uma ligação carbono-heteroátomo-carbono). Em outras modalidades, o heteroátomo está em uma extremidade terminal do alquíleno e, assim, serve para unir o alquíleno ao restante da molécula (por exemplo, M1-HA-M2, onde M1 e M2 são porções da molécula, H é um heteroátomo e A é um alquíleno). Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo éter alquílico é opcionalmente substituído. Um exemplo de grupo de ligação heteroalquíleno é ilustrado abaixo:



"C linker"

[031] Multímeros do "C-linker" acima estão incluídos em várias modalidades de linkers heteroalquilenos.

[032] "Heteroalquenileno" é um heteroalquenileno, tal como definido acima, compreendendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo heteroalquenileno é opcionalmente substituído.

[033] "Heteroalquinileno" é um heteroalquinileno compreendendo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo heteroalquinileno é opcionalmente substituído.

[034] "Heteroatômico" em referência a um "linker heteroatômico" refere-se a um grupo ligante que consiste em um ou mais heteroátomos. Exemplos de linkers heteroatômicos incluem átomos individuais selecionados do grupo consistindo de O, N, P e S e heteroátomos múltiplos, por exemplo, um linker com a fórmula $-P(O^-)(=O)O-$ ou $-OP(O^-)(=O)O-$ e multímeros e suas combinações.

[035] "Fosfato" refere-se ao grupo $-OP(=O)(R_a)R_b$, em que R_a é OH, O⁻ ou OR_c; e R_b é OH, O⁻, OR_c, um grupo tiofosfato ou ainda um grupo fosfato, em que R_c é um contra-íon (por exemplo, Na⁺ e semelhantes).

[036] "Fosfoalquila" refere-se ao grupo $-OP(=O)(R_a)R_b$, em que R_a é OH, O⁻ ou OR_c; e R_b é -Oalquila, em

que R_c é um contra-íon (por exemplo, Na^+ e semelhantes). Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo fosfoalquila é opcionalmente substituído. Por exemplo, em certas modalidades, o grupamento -Oalquila em um grupo fosfoalquila é opcionalmente substituído por um ou mais de hidroxila, amino, sulfidrila, fosfato, tiofosfato, fosfoalquila, tiofosfoalquila, éter fosfoalquílico ou éter tiofosfoalquílico.

[037] "Éter fosfoalquílico" refere-se ao grupo $-OP(=O)(R_a)R_b$, em que R_a é OH , O^- ou OR_c ; e R_b é éter -Oalquílico, em que R_c é um contra-íon (por exemplo, Na^+ e semelhantes). Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo éter fosfoalquílico é opcionalmente substituído. Por exemplo, em certas modalidades, o grupamento éter -Oalquílico em um grupo éter fosfoalquílico é opcionalmente substituído por um ou mais de hidroxila, amino, sulfidrila, fosfato, tiofosfato, fosfoalquila, tiofosfoalquila, éter fosfoalquílico ou éter tiofosfoalquílico.

[038] "Tiofosfato" refere-se ao grupo $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, em que R_a é O ou S , R_b é OH , O^- , S^- , OR_d ou SR_d ; e R_c é OH , SH , O^- , S^- , OR_d , SR_d , um grupo fosfato ou ainda um grupo tiofosfato, em que R_d é um contra-íon (por exemplo, Na^+ e semelhantes) e, desde que: i) R_a seja S ; ii)

R_b seja S^- ou SR_d ; iii) R_c seja SH , S^- ou SR_d ; ou iv) uma combinação de i), ii) e/ou iii).

[039] "Tiofosfoalquila" refere-se ao grupo $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, em que R_a é O ou S, R_b é OH, O^- , S^- , OR_d ou SR_d ; e R_c é -Oalquila, em que R_d é um contra-íon (por exemplo, Na^+ e semelhantes) e desde que: i) R_a seja S; ii) R_b seja S^- ou SR_d ; ou iii) R_a seja S e R_b seja S^- ou SR_d . Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo tiofosfoalquila é opcionalmente substituído. Por exemplo, em certas modalidades, o grupamento -Oalquila em um grupo tiofosfoalquila é opcionalmente substituído por um ou mais de hidroxila, amino, sulfidrila, fosfato, tiofosfato, fosfoalquila, tiofosfoalquila, éter fosfoalquílico ou éter tiofosfoalquílico.

[040] "Éter tiofosfoalquílico" refere-se ao grupo $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, em que R_a é O ou S, R_b é OH, O^- , S^- , OR_d ou SR_d ; e R_c é éter -Oalquílico, em que R_d é um contra-íon (por exemplo, Na^+ e semelhantes) e desde que: i) R_a seja S; ii) R_b seja S^- ou SR_d ; ou iii) R_a seja S e R_b seja S^- ou SR_d . Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo éter tiofosfoalquílico é opcionalmente substituído. Por exemplo, em certas modalidades, o grupamento éter -Oalquílico em um grupo tiofosfoalquila é opcionalmente substituído por um ou mais de hidroxila, amino, sulfidrila,

fosfato, tiofosfato, fosfoalquila, tiofosfoalquila, éter fosfoalquílico ou éter tiofosfoalquílico.

[041] "Carbocíclico" refere-se a um anel aromático estável com 3 a 18 membros ou não-aromático compreendendo 3 a 18 átomos de carbono. A menos que especificado de outro modo especificamente na especificação, um anel carbocíclico pode ser um sistema de anel monocíclico, bicíclico, tricíclico ou tetracíclico, o qual pode incluir sistemas de anéis fundidos ou em ponte, e pode ser parcial ou totalmente saturado. Radicais carbocíclicos não aromáticos incluem cicloalquila, enquanto radicais carbocíclicos aromáticos incluem arila. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo carbocíclico é opcionalmente substituído.

[042] "Cicloalquila" refere-se a um anel carbocíclico aromático monocíclico ou policíclico estável, que pode incluir sistemas de anéis fundidos ou em ponte, tendo de três a quinze átomos de carbono, preferencialmente tendo de três a dez átomos de carbono, e que é saturado ou insaturado e ligado ao restante da molécula por uma única ligação. Cicloalquinas monocíclicas incluem, por exemplo, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, ciclo-heptila e ciclo-octila. Cicloalquinas policíclicas incluem, por exemplo, adamantila, norbornila, decalinila, 7,7-dimetil-biciclo-[2.2.1]heptanila e semelhantes. Salvo

indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo cicloalquila é opcionalmente substituído.

[043] "Arila" refere-se a um sistema de anel compreendendo pelo menos um anel aromático carbocíclico. Em algumas modalidades, uma arila compreende de 6 a 18 átomos de carbono. O anel arila pode ser um sistema de anel monocíclico, bicíclico, tricíclico ou tetracíclico, o qual pode incluir sistemas de anel fundidos ou em ponte. Arilas incluem, mas não estão limitadas a, arilas derivadas de aceantrileno, acenaftileno, acefanantrileno, antraceno, azuleno, benzeno, criseno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, *s*-indaceno, indano, indeno, naftaleno, fenaleno, fenantreno, pleiadeno, pireno e trifenileno. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo arila é opcionalmente substituído.

[044] "Heterocíclico" refere-se a um anel aromático ou não aromático estável com 3 a 18 membros compreendendo de um a doze átomos de carbono e de um a seis heteroátomos selecionados do grupo consistindo em nitrogênio, oxigênio e enxofre. A menos que especificado de outro modo especificamente na especificação, o anel heterocíclico pode ser um sistema de anel monocíclico, bicíclico, tricíclico ou tetracíclico, o qual pode incluir sistemas de anel fundidos ou em ponte; e os átomos de nitrogênio, carbono ou enxofre no anel heterocíclico podem ser opcionalmente oxidados; o

átomo de nitrogênio pode ser opcionalmente quaternizado; e o anel heterocíclico pode estar parcial ou totalmente saturado. Exemplos de anéis heterocíclicos aromáticos são listados abaixo na definição de heteroarilas (isto é, heteroarila sendo um subconjunto de heterocíclico). Exemplos de anéis heterocíclicos não aromáticos incluem, mas não estão limitados a, dioxolanila, tienil[1,3]ditianila, deca-hidroisoquinolila, imidazolinila, imidazolidinila, isotiazolidinila, isoxazolidinila, morfolinila, octa-hidroindolila, octa-hidroisoindolila, 2-oxopiperazinila, 2-oxopiperidinila, 2-oxopirrolidinila, oxazolidinila, piperidinila, piperazinila, 4-piperidonila, pirrolidinila, pirazolidinila, pirazolopirimidinila, quinuclidinila, tiazolidinila, tetra-hidrofurila, trioxanila, tritianila, triazinanila, tetra-hidropiranila, tiomorfolinila, tiamorfolinila, 1-oxo-tiomorfolinila e 1,1-dioxo-tiomorfolinila. Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo heterocíclico é opcionalmente substituído.

[045] "Heteroarila" refere-se a um sistema de anel com 5 a 14 membros compreendendo de um a treze átomos de carbono, de um a seis heteroátomos selecionados do grupo consistindo em nitrogênio, oxigênio e enxofre, e pelo menos um anel aromático. Para fins de certas modalidades desta invenção, o radical heteroarila pode ser um sistema de anel

monocíclico, bicíclico, tricíclico ou tetracíclico, o qual pode incluir sistemas de anel fundidos ou ligados em ponte; e os átomos de nitrogênio, carbono ou enxofre no radical heteroarila podem ser opcionalmente oxidados; o átomo de nitrogênio pode ser opcionalmente quaternizado. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, azepinila, acridinila, benzimidazolila, benzotiazolila, benzindolila, benzodioxolila, benzofuranila, benzooxazolila, benzotiazolila, benzotiadiazolila, benzo[b][1,4]dioxepinila, 1,4-benzodioxanila, benzonafotofuranila, benzoxazolila, benzodioxoliloa, benzodioxinila, benzopiranila, benzopiranonila, benzofuranila, benzofuranonila, benzotienila (benzotiofenila), benzotriazolila, benzo[4,6]imidazo[1,2-*a*] piridinila, benzoxazolinonila, benzimidazoltionila, carbazolila, cinolinila, dibenzofuranila, dibenzotiofenila, furanila, furanonila, isotiazolila, imidazolila, indazolila, indolila, indazolila, isoindolila, indolinila, isoindolinila, isoquinolila, indolizinila, isoxazolila, naftiridinilo, oxadiazolilo, 2 - oxoazepinyl, oxazolyl, oxiranyl, 1 - 1 - oxidopiridinil, 1 - oxidopirimidinilo, 1 - oxidopirazinilo, 1-oxidopiridazinilo, 1 - fenil - 1 *H* - pirrolilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, pteridinilo, pteridinonilo, purinilo, pirrolilo, pirazolilo, piridinilo, piridinonilo, pirazinilo,

pirimidinilo, pirimidinonilo, piridazinilo, pirrolilo, pirido [2,3- d] pirimidinonilo, quinazolinilo, quinazolinonilo, quinoxalinilo, quinoxalinonilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetra-hidroquinolinilo, tiazolilo, tiadiazolilo, tieno [3,2- d] pirimidin-4-onilo, tieno [2,3- d] pirimidin-4-onilo, triazolilo, tetrazolilo, triazinilo e tiofenilo (ie tienil). Salvo indicação em contrário especificamente na especificação, um grupo heteroalila é opcionalmente substituído.

[046] "Fundido" refere-se a um sistema de anel compreendendo pelo menos dois anéis, em que os dois anéis compartilham pelo menos um átomo do anel em comum, por exemplo dois átomos do anel em comum. Quando o anel fundido é um anel heterociclico ou um anel heteroarila, o(s) átomo(s) do anel em comum podem ser carbono ou nitrogênio. Anéis fundidos incluem bicíclico, tricíclico, tertracíclico e semelhantes.

[047] O termo "substituído" aqui usado significa qualquer um dos grupos acima (por exemplo, alquila, alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, heteroalqueníleno, heteroalquiníleno, alcóxi, éter alquílico, fosfoalquila, éter fosfoalquílico, tiofosfoalquila, éter tiofosfoalquílico, carbocíclico, cicloalquila, arila, heterocíclico e/ou heteroarila) em que pelo menos um átomo de hidrogênio (por exemplo, 1, 2, 3 ou

todos os átomos de hidrogênio) é substituído por uma ligação a átomos que não o hidrogênio, tais como, mas não limitados a: um átomo de halogênio, tal como F, Cl, Br e I; um átomo de oxigênio em grupos tais como grupos hidroxila, grupos alcóxi e grupos éster; um átomo de enxofre em grupos tais como grupos tiol, grupos tioalquila, grupos sulfona, grupos sulfonila e grupos sulfóxido; um átomo de nitrogênio em grupos tais como aminas, amidas, alquilaminas, dialquilaminas, arilaminas, alquilarilaminas, diarilaminas, N-óxidos, imidas e enaminas; um átomo de silício em grupos tais como grupos trialquilsilila, grupos dialquilarilsilila, grupos alquildiarilsilila e grupos triarilsilila; e outros heteroátomos em vários outros grupos. "Substituído" também significa qualquer um dos grupos acima em que um ou mais átomos de hidrogênio são substituídos por uma ligação de ordem mais alta (por exemplo, uma ligação dupla ou tripla) a um heteroátomo, tal como oxigênio em grupos oxo, carbonila, carboxila e éster; e nitrogênio em grupos tais como iminas, oximas, hidrazonas e nitrilas. Por exemplo, "substituído" inclui qualquer um dos grupos acima em que um ou mais átomos de hidrogênio são substituídos por $-NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)R_h$, $-NR_gC(=O)NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)OR_h$, $-NR_gSO_2R_h$, $-OC(=O)NR_gR_h$, $-OR_g$, $-SR_g$, $-SOR_g$, $-SO_2R_g$, $-OSO_2R_g$, $-SO_2OR_g$, $=NSO_2R_g$ e $-SO_2NR_gR_h$. "Substituído" também significa qualquer um dos grupos acima em que um ou mais átomos de hidrogênio

são substituídos por $-C(=O)R_g$, $-C(=O)OR_g$, $-C(=O)NR_gR_h$, $-CH_2S$
 O_2R_g , $-CH_2SO_2NR_gR_h$. Acima, R_g e R_h são iguais ou diferentes e
independentemente hidrogênio, alquila, alcóxi, alquilamina,
tioalquila, arila, aralquila, cicloalquila,
cicloalquilalquila, haloalquila, heterociclila, N -
heterociclila, heterociclilalquila, heteroarila, e N -
heteroarila e/ou heteroarilalquila. "Substituído"
significa ainda qualquer um dos grupos acima em que um ou
mais átomos de hidrogênio são substituídos por uma ligação
a um grupo amino, ciano, hidroxila, imino, nitro, oxo, tioxo,
halo, alquila, alcóxi, alquilamino, tioalquila, arila,
aralquila, cicloalquila, cicloalquilalquila, haloalquila,
heterociclila, N - heterociclila, heterociclilalquila,
heteroarila, N -heteroarila e/ou heteroarilalquila.
Adicionalmente, cada um dos substituintes anteriores pode
também ser opcionalmente substituído por um ou mais dos
substituintes acima.

[048] "Conjugação" refere-se à sobreposição de um orbital p com outro orbital p através de uma ligação sigma entre os dois. Pode ocorrer conjugação em compostos cíclicos ou acíclicos. Um "grau de conjugação" refere-se à sobreposição de pelo menos um orbital p com outro orbital p através de uma ligação sigma entre os dois. Por exemplo, 1,3-butadina tem um grau de conjugação, ao passo que o benzeno e outros compostos aromáticos têm tipicamente

múltiplos graus de conjugação. Compostos fluorescentes e coloridos compreendem tipicamente pelo menos um grau de conjugação.

[049] "Fluorescente" refere-se a uma molécula que é capaz de absorver luz de uma frequência particular e emitir luz de uma frequência diferente. A fluorescência é bem conhecida pelos técnicos especialistas na técnica.

[050] "Colorido" refere-se a uma molécula que absorve luz dentro do espectro colorido (isto é, vermelho, amarelo, azul e similares).

[051] Um "linker" refere-se a uma cadeia contígua de pelo menos um átomo, tal como carbono, oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo e suas combinações, que conecta uma porção de uma molécula a outra porção da mesma molécula ou a uma molécula diferente, grupamento ou suporte sólido (por exemplo, micropartícula). Os linkers podem conectar a molécula através de uma ligação covalente ou outros meios, tais como interações iônicas ou por ligações de hidrogênio.

[052] O termo "biomolécula" refere-se a qualquer um de uma variedade de materiais biológicos, incluindo ácidos nucleicos, carboidratos, aminoácidos, polipeptídeos, glicoproteínas, hormônios, aptâmeros e suas misturas. Mais especificamente, o termo destina-se a incluir, sem limitação, RNA, DNA, oligonucleotídeos, nucleotídeos modificados ou derivatizados, enzimas, receptores, príons,

ligantes de receptores (incluindo-se hormônios), anticorpos, antígenos e toxinas, bem como bactérias, vírus, células sanguíneas e células de tecidos. As biomoléculas visualmente detectáveis da invenção (por exemplo, compostos de estrutura (I) tendo uma biomolécula ligada aos mesmos) são preparadas, tal como aqui descrito adiante, colocando-se em contato uma biomolécula com um composto que tenha um grupo reativo que permita a ligação da biomolécula ao composto através de qualquer átomo ou grupo funcional disponíveis, tal como um grupo amino, hidróxi, carboxila ou sulfidrila na biomolécula.

[053] Um "grupo reativo" é um grupamento capaz de reagir com um segundo grupo reativo (por exemplo, um "grupo reativo complementar") para formar uma ou mais ligações covalentes, por exemplo, por uma reação de deslocamento, oxidação, redução, adição ou cicloadição. Exemplos de grupos reativos são fornecidos na Tabela 1 e incluem, por exemplo, nucleófilos, eletrófilos, dienos, dienófilos, aldeído, oxima, hidrazona, alcino, amina, azida, acilazida, acil-haleto, nitrila, nitrona, sulfidrila, dissulfeto, haleto de sulfonila, isotiocianato, imidoéster, éster ativado, cetona, carbonila α,β -insaturada, alceno, maleimida, α -haloimida, epóxido, aziridina, tetrazina, tetrazol, fosfina, biotina, tiirano e semelhantes.

[054] Os termos "visível" e "visualmente detectável" são aqui usados para se referirem a substâncias que são observáveis por inspeção visual, sem iluminação prévia, ou ativação química ou enzimática. Tais substâncias visualmente detectáveis absorvem e emitem luz em uma região do espectro que varia de cerca de 300 e cerca de 900 nm. Preferencialmente, tais substâncias são intensamente coloridas, preferencialmente têm um coeficiente de extinção molar de pelo menos 40.000, mais preferivelmente de pelo menos 50.000, ainda mais preferencialmente de pelo menos 60.000, ainda mais preferencialmente de pelo menos 70.000, e o mais preferencialmente de pelo menos cerca de 80.000 M⁻¹cm⁻¹. Os compostos da invenção podem ser detectados por observação a olho nu, ou com o auxílio de um dispositivo de detecção de base óptica, incluindo-se, sem limitação, espectrofotômetros de absorção, microscópios de luz de transmissão, câmeras digitais e scanners. Substâncias visualmente detectáveis não estão limitadas àquelas que emitem e/ou absorvem luz no espectro visível. Substâncias que emitem e/ou absorvem luz na região do ultravioleta (UV) (cerca de 10 nm a cerca de 400 nm), na região do infravermelho (cerca de 700 nm a cerca de 1 mm) e substâncias que emitem e/ou absorvem em outras regiões do espectro eletromagnético também estão incluídas no escopo das substâncias "visualmente detectáveis".

[055] Para fins de modalidades da invenção, o termo "corante visível fotoestável" refere-se a um grupamento químico que é visualmente detectável, como definido acima, e não é significativamente alterado ou decomposto com a exposição à luz. Preferencialmente, o corante visível fotoestável não exibe descoloração ou decomposição significativa após ser exposto à luz durante pelo menos uma hora. Mais preferencialmente, o corante visível é estável após exposição à luz durante pelo menos 12 horas, ainda mais preferencialmente durante pelo menos 24 horas, ainda mais preferencialmente pelo menos durante uma semana e o mais preferencialmente durante pelo menos um mês. Exemplos não limitativos de corantes visíveis fotoestáveis adequados para uso nos compostos e métodos da invenção incluem corantes azo, corantes tioíndigo, pigmentos quinacridona, dioxazina, ftalocianina, perinona, dicetopirrolopirrol, quinoftalona e truaricarbônio.

[056] Tal como aqui usado, o termo "derivado de perileno" destina-se a incluir qualquer perileno substituído que seja visualmente detectável. No entanto, o termo não se destina a incluir o próprio perileno. Os termos "derivado de antraceno", "derivado de naftaleno" e "derivado de pireno" são usados de maneira análoga. Em algumas modalidades preferidas, um derivado (por exemplo, perileno, pireno, antraceno ou derivado de naftaleno) é um derivado imida,

bisimida ou hidrazamimida de perileno, antraceno, naftaleno ou pireno.

[057] As moléculas visualmente detectáveis de várias modalidades da invenção são úteis para uma ampla variedade de aplicações analíticas, tais como aplicações bioquímicas e biomédicas, nas quais é necessário determinar a presença, localização ou quantidade de um analito particular (por exemplo, biomolécula). Em um outro aspecto, portanto, a invenção fornece um método para detectar visualmente uma biomolécula, compreendendo: (a) fornecer um sistema biológico com uma biomolécula visualmente detectável compreendendo o composto de estrutura (I) ligado a uma biomolécula; e (b) detectar a biomolécula por suas propriedades visíveis. Para fins da invenção, a frase "detectar a biomolécula por suas propriedades visíveis" significa que a biomolécula, sem iluminação ou ativação química ou enzimática, é observada a olho nu, ou com o auxílio de um dispositivo de detecção de base óptica, incluindo, sem limitação, espectrofotômetros de absorção, microscópios de luz de transmissão, câmeras digitais e scanners. Um densitômetro pode ser usado para quantificar a quantidade de biomolécula visualmente detectável presente. Por exemplo, a quantidade relativa da biomolécula em duas amostras pode ser determinada medindo-se a densidade óptica relativa. Se a estequiometria das moléculas de corante por

biomolécula é conhecida e o coeficiente de extinção da molécula de corante é conhecido, então a concentração absoluta da biomolécula também pode ser determinada a partir de uma medição de densidade óptica. Tal como aqui usado, o termo "sistema biológico" é usado para se referir a qualquer solução ou mistura compreendendo uma ou mais biomoléculas além da biomolécula visualmente detectável. Exemplos não limitativos de tais sistemas biológicos incluem células, extratos celulares, amostras de tecidos, géis electroforéticos, misturas para ensaios e misturas para reações de hibridização.

[058] "Suporte sólido" refere-se a qualquer substrato sólido conhecido na técnica para suporte de moléculas em fase sólida, por exemplo, uma "micropartícula" refere-se a qualquer uma de várias partículas pequenas úteis para ligação a compostos da invenção, incluindo, mas não se limitando a, esferas de vidro, esferas magnéticas, esferas poliméricas, esferas não poliméricas e semelhantes. Em certas modalidades, uma micropartícula compreende esferas de poliestireno.

[059] "Grupamento de emparelhamento de bases" refere-se a um grupamento heterocíclico capaz de se hibridizar com um grupamento heterocíclico complementar através de ligações de hidrogênio (por exemplo, emparelhamento de bases de Watson-Crick). Grupamentos de

emparelhamento de bases incluem bases naturais e não naturais. Exemplos não limitativos de grupamentos de emparelhamento de bases são bases de RNA e DNA, tais como adenosina, guanosina, timidina, citosina e uridina e seus análogos.

[060] As modalidade da invenção aqui divulgadas também se destinam a abranger todos os compostos de estrutura (I) ou (II) sendo isotopicamente marcados por terem um ou mais átomos substituídos por um átomo com uma massa atômica ou número de massa diferentes. Exemplos de isótopos que podem ser incorporados nos compostos divulgados incluem isótopos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo, flúor, cloro e iodo, tais como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I e ^{125}I , respectivamente.

[061] Compostos isotopicamente marcados de estrutura (I) (II) podem geralmente ser preparados por técnicas convencionais conhecidas dos técnicos especialistas na técnica ou por processos análogos aos descritos abaixo e nos Exemplos seguintes, usando-se um reagente isotopicamente marcado apropriado no lugar do reagente não marcado previamente empregado.

[062] "Composto estável" e "estrutura estável" destinam-se a indicar um composto que é suficientemente robusto para sobreviver ao isolamento até um grau útil de

pureza a partir de uma mistura reacional e formulação sob a forma de um agente terapêutico eficaz.

[063] "Opcional" ou "opcionalmente" significam que o evento ou circunstâncias descritos subsequentemente podem ou não ocorrer e que a descrição inclui casos em que ocorre o dito evento ou circunstância e casos em que não ocorre. Por exemplo, "alquila opcionalmente substituída" significa que o grupo alquila pode ou não ser substituído e que a descrição inclui tanto grupos alquila substituídos como grupos alquila sem nenhuma substituição.

[064] "Sal" inclui sais de adição tanto de ácido como de base.

[065] "Sal de adição de ácido" refere-se aos sais que são formados com ácidos inorgânicos, tais como, mas não limitados a, ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e semelhantes, e ácidos orgânicos, tais como, mas não limitados a, ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido benzenossulfônico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido canfórico, ácido cânfor-10-sulfônico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido carbônico, ácido cinâmico, ácido cítrico, ácido ciclâmico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etan-1,2-dissulfônico, ácido etanossulfônico, ácido 2-

hidroxietanossulfônico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glico-heptônico, ácido glucônico, ácido glucurônico, ácido glutâmico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-glutárico, ácido glicerofosfórico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido isobutírico, ácido láctico, ácido lactobiônico, ácido láurico, ácido maleico, ácido mállico, ácido malônico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido múcico, ácido naftalen-1,5-dissulfônico, ácido naftalen-2-sulfônico, ácido 1-hidróxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido propiônico, ácido piroglutâmico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido 4-aminossalicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tiociânico, ácido *p*-toluenossulfônico, ácido trifluoroacético, ácido undecilênico e semelhantes.

[066] "Sal de adição de base" refere-se àqueles sais que são preparados a partir da adição de uma base inorgânica ou de uma base orgânica ao ácido livre. Sais derivados de bases inorgânicas incluem, mas não estão limitados a, sais de sódio, potássio, lítio, amônio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, manganês, alumínio e semelhantes. Sais derivados de bases orgânicas incluem, mas não estão limitados a, sais de aminas primárias, secundárias e terciárias, aminas substituídas incluindo aminas

substituídas de ocorrência natural, aminas cíclicas e resinas de troca iônica básicas, tais como amônia, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaina, hidrabamina, colina, betaina, benetamina, benzatina, etilenodiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, trietanolamina, trometamina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliaminas e semelhantes. Bases orgânicas particularmente preferidas são isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, diciclo-hexilamina, colina e cafeína.

[067] Cristalizações podem produzir um solvato dos compostos aqui descritos. Modalidades da presente invenção incluem todos os solvatos dos compostos descritos. Tal como aqui usado, o termo "solvato" refere-se a um agregado que compreende uma ou mais moléculas de um composto da invenção com uma ou mais moléculas de solvente. O solvente pode ser água, caso em que o solvato pode ser um hidrato. Alternativamente, o solvente pode ser um solvente orgânico. Assim, os compostos da presente invenção podem existir como um hidrato, incluindo um mono-hidrato, di-hidrato, hemi-hidrato, sesqui-hidrato, tri-hidrato, tetra-hidrato e semelhantes, bem como as formas solvatadas correspondentes.

Os compostos da invenção podem ser solvatos verdadeiros, enquanto em outros casos, os compostos da invenção podem apenas reter água ou outro solvente adventícios ou ser uma mistura de água mais algum solvente adventício.

[068] Modalidades dos compostos da invenção (por exemplo, compostos de estrutura I ou II), ou seus sais, tautômeros ou solvatos podem conter um ou mais centros assimétricos e podem assim dar origem a enantiômeros, diastereômeros e outras formas estereoisoisoméricas que podem ser definidas, em termos de estereoquímica absoluta, como (R)- ou (S)- ou, como (D)- ou (L)- para aminoácidos. Modalidades da presente invenção destinam-se a incluir todos esses isômeros possíveis, assim como as suas formas racêmica e opticamente pura. Isômero opticamente ativos (+) e (-), (R)- e (S)-, ou (D)- e (L)- podem ser preparados usando-se síntons quirais ou reagentes quirais, ou resolvidos usando-se técnicas convencionais, por exemplo, cromatografia e cristalização fracionada. Técnicas convencionais para a preparação/isolamento de enantiômeros individuais incluem síntese quiral de um precursor opticamente puro adequado ou resolução do racemato (ou do racemato de um sal ou derivado) usando-se, por exemplo, cromatografia líquida de alta pressão quiral (HPLC). Quando os compostos aqui descritos contêm ligações duplas olefínicas ou outros centros de assimetria geométrica, e salvo indicação em contrário,

pretende-se que os compostos incluam tanto os isômeros geométricos E como Z. Da mesma maneira, todas as formas tautoméricas também se destinam a ser incluídas.

[069] Um "estereoisômero" refere-se a um composto constituído pelos mesmos átomos ligados pelas mesmas ligações, mas que têm estruturas tridimensionais diferentes, as quais não são intercambiáveis. A presente invenção contempla vários estereoisômeros e suas misturas e inclui "enantiômeros", o que se refere a dois estereoisômeros cujas moléculas são imagens especulares não sobreponíveis uma da outra.

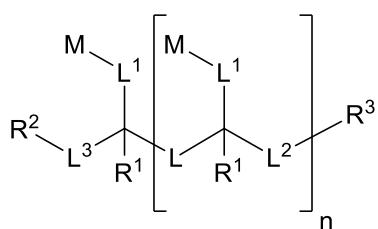
[070] Um "tautômero" refere-se a um deslocamento de próton de um átomo de uma molécula para outro átomo da mesma molécula. A presente invenção inclui tautômeros de quaisquer dos ditos compostos. Várias formas tautoméricas dos compostos são facilmente deriváveis pelos técnicos especialistas na técnica.

[071] O protocolo de nomenclatura química e os diagramas de estrutura aqui usados são uma forma modificada do sistema de nomenclatura I.U.P.A.C., usando-se o *software* ACD/Name Versão 9.07 e/ou o *software* de nomenclatura ChemDraw Ultra Versão 11.0 (CambridgeSoft). Também são usados nomes comuns familiares a um técnico especialista na técnica.

[072] Como notado acima, em uma modalidade da presente invenção, são fornecidos compostos úteis como

corantes fluorescentes e/ou coloridos em vários métodos analíticos. Em outras modalidades, são fornecidos compostos úteis como intermediários sintéticos para a preparação de compostos úteis como corantes fluorescentes e/ou coloridos. Em termos gerais, as modalidades da presente invenção são dirigidas a dímeros e polímeros superiores de grupamentos fluorescentes e/ou coloridos. Os grupamentos fluorescentes e/ou coloridos são ligados por uma ligação contendo fósforo. Sem se pretender estar limitado pela teoria, acredita-se que o linker ajuda a manter uma distância espacial suficiente entre os grupamentos fluorescentes e/ou coloridos, de modo que a supressão intramolecular seja reduzida ou eliminada, resultando assim em um composto corante com um elevado "brilho" molar (por exemplo, alta emissão de fluorescência).

[073] Por conseguinte, em algumas modalidades, os compostos têm a seguinte estrutura (A):

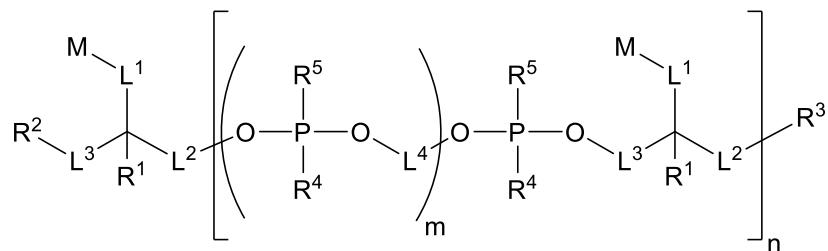


(A)

em que L é uma ligação que contém fósforo suficiente para manter a separação espacial entre um ou mais (por exemplo, cada) grupos M de modo que a supressão

intramolecular seja reduzida ou eliminada, e R^1 , R^2 , R^3 , L^1 , L^2 , L^3 e n são tais como definidos para a estrutura (I).

[074] Em outras modalidades é fornecido um os compostos com a seguinte estrutura (I):



(I)

ou um estereoisômero, sal ou tautômero seus, em que:

M é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende duas ou mais ligações duplas carbono-carbono e pelo menos um grau de conjugação;

L^1 é, em cada ocorrência, independentemente, um linker que compreende um grupo funcional capaz de se formar pela reação de dois grupos reativos complementares;

L^2 and L^3 são, em cada ocorrência, independentemente, um linker opcional alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, heteroalqueníleno, heteroalquiníleno ou heteroatômico;

L^4 é, em cada ocorrência, independentemente, um linker alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, heteroalqueníleno ou heteroalquiníleno;

R^1 é, em cada ocorrência, independentemente, H, alquila ou alcóxi;

R^2 e R^3 são cada um, independentemente, H, OH, SH, alquila, alcóxi, éter alquílico, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, um linker que compreende uma ligação covalente a Q, um linker que compreende uma ligação covalente a uma molécula de analito, um linker que compreende uma ligação covalente a um suporte sólido ou um linker que compreende uma ligação covalente a um outro composto de estrutura (I), em que: R_a é O ou S; R_b é OH, SH, O^- , S^- , OR_d ou SR_d ; R_c é OH, SH, O^- , S^- , OR_d , SR_d , alquila, alcóxi, éter alquílico, éter alcóxi-alquílico, fosfato, tiofosfato, fosfoalquila, tiofosfoalquila, éter fosfoalquílico ou éter tiofosfoalquílico; e R_d é um contraión;

R^4 é, em cada ocorrência, independentemente, OH, SH, O^- , S^- , OR_d ou SR_d ;

R^5 é, em cada ocorrência, independentemente, oxo, tioxo ou está ausente;

Q é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito, um suporte sólido ou um grupo reativo complementar Q';

m é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro igual a zero ou maior; e

n é um número inteiro igual a um ou maior.

Em algumas modalidades, pelo menos, uma ocorrência de m é um número inteiro igual a um ou maior. Em outras

modalidades, pelo menos uma ocorrência de m é um número inteiro igual a dois ou maior. Ainda em modalidades diferentes, pelo menos uma ocorrência de m é um número inteiro igual a três ou maior. Ainda em modalidades diferentes, pelo menos uma ocorrência de m é um número inteiro igual a quatro ou mais. Ainda em modalidades diferentes, pelo menos uma ocorrência de m é um número inteiro igual a cinco ou mais.

[075] Os vários linkers e substituintes (por exemplo, M , Q , R^1 , R^2 , R^3 , R_c , L^1 , L^2 , L^3 e L^4) no composto de estrutura (I) são opcionalmente substituídos por mais um substituinte. Por exemplo, em algumas modalidades, o substituinte opcional é selecionado para optimizar a solubilidade em água ou outra propriedade do composto de estrutura (I). Em certas modalidades, cada alquila, alcóxi, éter alquílico, éter alcóxi-alquílico, fosfoalquila, tiofosalquila, éter fosfofoalquílico e éter tiofosfoalquílico no composto de estrutura (I) é opcionalmente substituído por mais um substituinte selecionado a partir do grupo que consiste em hidroxila, alcóxi, éter alquílico, éter alcóxi-alquílico, sulfidrila, amino, alquilamino, carboxila, fosfato, tiofosfato, fosfoalquila, tiofosfoalquila, éter fosfoalquílico e éter tiofosalquílico.

[076] O linker L^1 pode ser usado como um ponto de ligação do grupamento M para o restante do composto. Por exemplo, em algumas modalidades é preparado um precursor sintético para o composto de estrutura (I), e o grupamento M é ligado ao precursor sintético usando-se qualquer número de métodos fáceis conhecidos na técnica, por exemplo, métodos aos quais se refere como "química *click*" ("click chemistry", em inglês). Para este fim, qualquer reação que seja rápida e substancialmente irreversível pode ser usada para ligar M ao precursor sintético a fim de se formar um composto de estrutura (I). Exemplos de reações incluem a reação catalisada por cobre de uma azida e um alcino para se formar um triazol (cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen), reação de um dieno e um dienófilo (Diels-Alder), cicloadição de alcino-nitrona promovida por tensão, reação de uma alceno tensionado com uma azida, tetrazina ou tetrazol, cicloadição de alceno e azida [3+2], Diels-Alder de demanda inversa entre alceno e tetrazina, fotorreação de alceno e tetrazol e várias reações de deslocamento, tais como deslocamento de um grupo de saída por ataque nucleofílico em um átomo eletrofílico. Em algumas modalidades, a reação para se formar L^1 pode ser realizada em um ambiente aquoso.

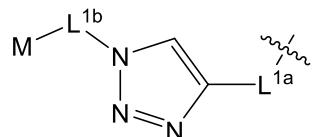
[077] Por conseguinte, em algumas modalidades, L^1 é um grupo funcional que é o produto de uma das reações "click" anteriores. Em diversas modalidades, para pelo menos uma

ocorrência de L¹, o grupo funcional pode ser formado por reação de um grupo funcional aldeído, oxima, hidrazona, alcino, amina, azida, acilazida, haleto de acila, nitrila, nitrona, sulfidrila, dissulfeto, haleto de sulfonila, isotiocianato, imidoéster, éster ativado, cetona, carbonila α, β -insaturada, alceno, maleimida, α -haloimida, epóxido, aziridina, tetrazina, tetrazol, fosfina, biotina ou tiirano com um grupo reativo complementar.

[078] Em outras modalidades, para pelo menos uma ocorrência de L¹, o grupo funcional pode ser formado por reação de um alcino e uma azida.

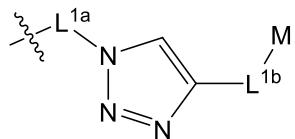
[079] Em mais modalidades, para, pelo menos uma ocorrência de L¹, o grupo funcional compreende um grupo alceno, éster, amida, tioéster, dissulfeto, carbocíclico, heterocíclico ou heteroarila. Em algumas modalidades mais específicas, para pelo menos uma ocorrência de L¹, L¹ é um linker que compreende um grupo funcional triazolila.

[080] Ainda em outras modalidades, para pelo menos uma ocorrência de L¹, L¹-M tem a seguinte estrutura:



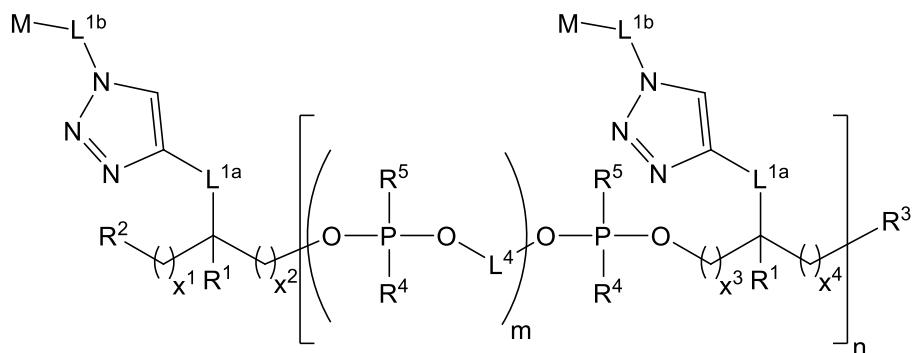
em que L^{1a} e L^{1b} são, cada um, independentemente, linkers opcionais.

[081] Em modalidades diferentes, para pelo menos uma ocorrência de L^1 , L^{1-M} tem a seguinte estrutura:



em que L^{1a} e L^{1b} são, cada um, independentemente, linkers opcionais.

[082] Por conseguinte, em algumas modalidades, o composto tem a seguinte estrutura (IA):



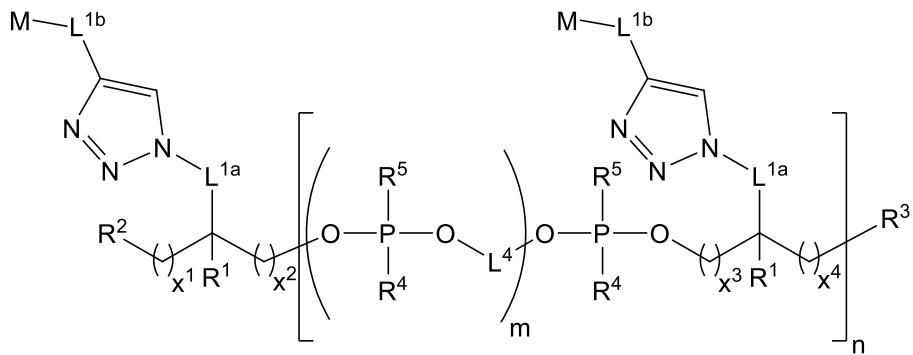
(IA)

em que:

L^{1a} e L^{1b} são, em cada ocorrência, independentemente, linkers opcionais; e

x^1, x^2, x^3 e x^4 são, em cada ocorrência, independentemente um número inteiro de 0 a 6.

[083] Em modalidades diferentes, o composto tem a seguinte estrutura (IA):



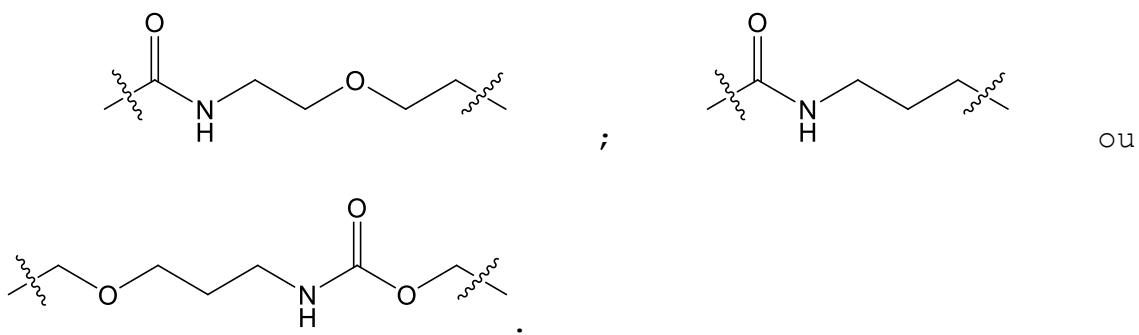
(IB)

em que:

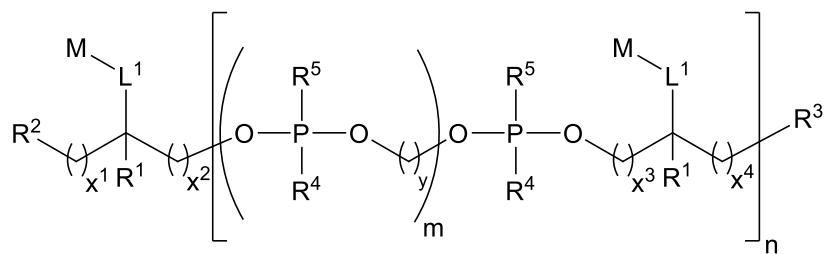
L^{1a} e L^{1b} são, em cada ocorrência, linkers independentemente opcionais; e x^1 , x^2 , x^3 e x^4 são, em cada ocorrência, independentemente um número inteiro de 0 a 6.

[084] Em várias modalidades dos anteriores, L^{1a} ou L^{1b} , ou ambos, estão ausentes. Em outras modalidades, L^{1a} ou L^{1b} , ou ambos, estão presentes.

[085] Em algumas modalidades, L^{1a} e L^{1b} , quando presentes, são cada um independentemente alquíleno ou heteroalquíleno. Por exemplo, em algumas modalidades, L^{1a} e L^{1b} , quando presentes, têm independentemente uma das seguintes estruturas:



[086] Em mais modalidades, L², L³ e L⁴ são, em cada ocorrência, independentemente, alquíleno C₁-C₆, alqueníleno C₂-C₆ ou alquiníleno C₂-C₆. Em outras modalidades, L⁴ é, em cada ocorrência, independentemente, alquíleno C₁-C₆, alqueníleno C₂-C₆ ou alquiníleno C₂-C₆. Por exemplos, em algumas modalidades, o composto tem a seguinte estrutura (IC) :



(IC)

em que:

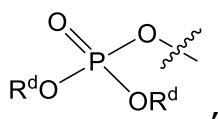
x¹, x², x³ e x⁴ são, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 0 a 6; e y é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 1 a 6.

[087] Em algumas modalidades de estrutura (IC), L¹, em cada ocorrência, independentemente compreende um grupo funcional triazolila. Em outras modalidades de (IC), y é 2 para cada valor inteiro de m.

[088] Em certas modalidades do composto de estrutura (IC), x³ e x⁴ são ambos 2 em cada ocorrência. Em outras modalidades, x¹, x², x⁵ e x⁶ são, cada, 1 em cada

ocorrência. Em modalidades diferentes, x^2 e x^4 são, cada um, 0, e x^3 é 1.

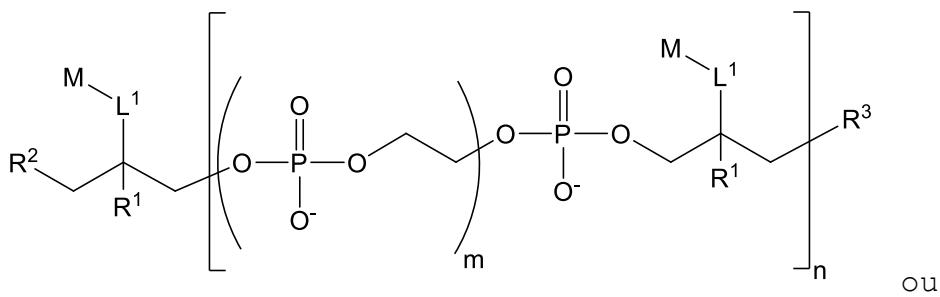
[089] Ainda em outras modalidades de qualquer um dos compostos anteriores de estrutura (I), R^4 é, em cada ocorrência, independentemente, OH , O^- ou OR_d . Entende-se que "OR_d" e "SR_d" se referem a O^- e S^- associados a um cátion. Por exemplo, o sal dissódico de um grupo fosfato pode ser representado como:



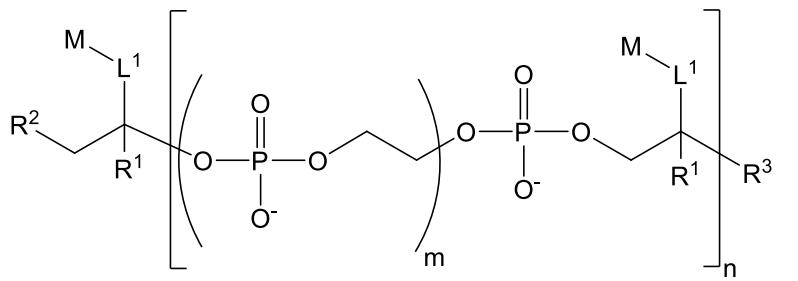
onde R_d é sódio (Na^+).

[090] Em outras modalidades de qualquer um dos compostos de estrutura (I), R^5 é, em cada ocorrência, oxo.

[091] Ainda em modalidades diferentes, o composto tem uma das seguintes estruturas (ID) ou (IE):



(ID)



(IE)

[092] Em algumas modalidades específicas de (ID) e (IE), L^1 , em cada ocorrência, independentemente compreende um grupo funcional triazolila.

[093] Em algumas modalidades diferentes de qualquer um dos compostos anteriores, R^1 é H.

[094] Em várias modalidades, R^2 e R^3 são cada um, independentemente, OH ou $-OP(=R_a)(R_b)R_c$. Em algumas modalidades diferentes, R^2 ou R^3 é OH ou $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, e o outro de R^2 ou R^3 é Q ou um linker que compreende uma ligação covalente a Q.

[095] Ainda em outras modalidades, Q é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito ou com um suporte sólido. Em outras modalidades, Q é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com um grupo reativo complementar Q'. Por exemplo, em algumas modalidades, Q' está presente em um outro composto de estrutura (I) (por exemplo, na posição R^2

ou R^3), e Q e Q' compreendem grupos reativos complementares de tal modo que a reação do composto de estrutura (I) e o outro composto de estrutura (I) resulta em um dímero ligado covalentemente do composto de estrutura (I). Compostos multiméricos de estrutura (I) também podem ser preparados de uma maneira análoga e estão incluídos dentro do escopo de modalidades da invenção.

[096] O tipo de grupo Q e conectividade do grupo Q ao restante do composto de estrutura (I) não é limitado, desde que Q compreenda um grupamento com reatividade apropriada para se formar a ligação desejada.

[097] Em certas modalidades, o Q é um grupamento que não é suscetível a hidrólise em condições aquosas, mas é suficientemente reativo para formar uma ligação com um grupo correspondente em uma molécula de analito ou do suporte sólido (por exemplo, uma amina, azida ou alcino).

[098] Certas modalidades de compostos de estrutura (I) compreendem grupos Q comumente empregados na área de bioconjugação. Por exemplo, em algumas modalidades, Q compreende um grupo reativo nucleofílico, um grupo reativo eletrofílico ou um grupo reativo de cicloadição. Em algumas modalidades mais específicas, Q compreende um grupo funcional sulfidrila, dissulfeto, éster ativado, isotiocianato, azida, alcino, alceno, dieno, dienófilo, haleto de ácido, haleto de sulfonila, fosfina, α -haloamida,

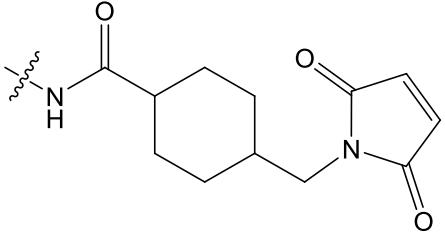
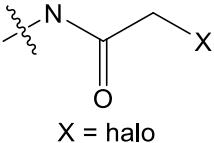
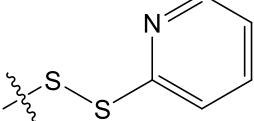
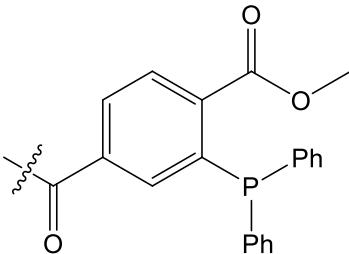
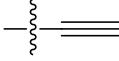
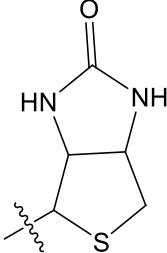
biotina, amino ou maleimida. Em algumas modalidades, o éster ativado é um éster de N-succinimida, imidoéster ou éster de polifluorofenila. Em outras modalidades, o alcino é uma alquilazida ou acilazida.

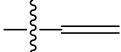
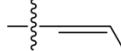
[099] São fornecidos exemplos de grupamentos Q na Tabela I abaixo.

Tabela 1. Exemplos de Grupamentos Q

Estrutura	Classe
	Sulfidrila
	Isotiocianato
	Imidoéster
	Acilazida
	Éster Ativado
	Éster Ativado

Estrutura	Classe
	Éster ativado
	Haleto de sulfonila X = halo
	Maleimida

Estrutura	Classe
	Maleimida
	α -haloimida
	Dissulfeto
	Fosfina
	Azida
	Alcino
	Biotina
	Dieno

Estrutura	Classe
	Alceno/dienófilo o
 EWG = grupo atraente de elétrons	Alceno/dienófilo
$-\text{NH}_2$	Amino

[100] Deve-se notar que, em algumas modalidades, em que Q é SH, o grupamento SH tenderá a formar ligações dissulfeto com um outro grupo sulfidrila em um outro composto de estrutura (I). Por conseguinte, algumas modalidades incluem compostos de estrutura (I), que estão na forma de dímeros dissulfeto, sendo a ligação dissulfeto derivada de grupos SH Q.

[101] Em algumas outras modalidades, R² ou R³ é OH ou -OP(=R_a)(R_b)R_c, e o outro de R² ou R³ é um linker que comprehende uma ligação covalente a um suporte sólido. Por exemplo, em algumas modalidades, a molécula de analito é um ácido nucleico, um aminoácido ou um polímero seus. Em outras modalidades, a molécula de analito é uma enzima, receptor, ligante de receptor [NT: receptor ligand], anticorpo, glicoproteína, aptâmero ou príon. Ainda em modalidades diferentes, o suporte sólido é uma esfera polimérica ou uma esfera não polimérica.

[102] O valor para m é uma outra variável que pode ser selecionada com base na intensidade desejada de fluorescência e/ou de cor. Em algumas modalidades, m é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 1 a 10, de 3 a 10 ou de 7 a 9. Em outras modalidades, m é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5. Em outras modalidades, m é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 5 a 10, por exemplo, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em outras modalidades, cada ocorrência de m é um número inteiro igual a um ou maior. Por exemplo, em algumas modalidades, cada ocorrência de m é um número inteiro igual a dois ou maior ou igual a três ou maior.

[103] A intensidade de fluorescência também pode ser ajustada pela seleção de diferentes valores de n . Em certas modalidades, n é um número inteiro de 1 a 100. Em outras modalidades, n é um número inteiro de 1 a 10. Em algumas modalidades, n é 1.

[104] M é selecionado com base nas propriedades ópticas desejadas, por exemplo, com base em uma cor e/ou comprimento de onda de emissão de fluorescência desejados. Em algumas modalidades, M é o mesmo em cada ocorrência; no entanto, é importante notar que cada ocorrência de M não precisa ser um M idêntico e certas modalidades incluem compostos em que M não é o mesmo em cada ocorrência. Por

exemplo, em algumas modalidades, cada M não é o mesmo e os diferentes grupamentos M são selecionados para terem absorbância e/ou emissões para uso nos métodos de transferência de energia por ressonância de fluorescência (*FRET - fluorescence resonance energy transfer*). Por exemplo, em tais modalidades, os diferentes grupamentos M são selecionados de tal modo que a absorbância da radiação em um comprimento de onda provoque a emissão de radiação a um comprimento de onda diferente por um mecanismo *FRET*. Exemplos de grupamentos M podem ser apropriadamente selecionadas por um técnico especialista na técnica com base no uso final desejado. Exemplos de grupamentos M para métodos *FRET* incluem corantes fluoresceína e 5-TAMRA (5-carboxitetrametil-rodamina, éter succinimidílico).

[105] M pode ser ligado ao restante da molécula a partir de qualquer posição (isto é, átomo) em M. Um técnico especialista na técnica reconhecerá meios para ligar M ao restante da molécula. Exemplos de métodos incluem as reações "click" aqui descritas.

[106] Em algumas modalidades, M é um grupamento fluorescente ou colorido. Pode ser usado qualquer grupamento fluorescente e/ou colorido, por exemplo, podendo ser usados aqueles conhecidos na técnica e tipicamente empregados em ensaios colorimétricos, com UV e/ou fluorescentes. Exemplos de grupamentos M que são úteis em várias modalidades da

invenção incluem, mas não estão limitados a: derivados de xanteno (por exemplo, fluoresceína, rodamina, verde do Oregon - "Oregon green"; eosina; ou vermelho do Texas - "Texas red"); derivados de cianina (por exemplo, cianina, indocarbocianina, oxacarbocianina, tiacarbocianina ou merocianina); derivados de esquaraina e esquarainas substituídas no anel, incluindo-se os corantes Seta, SeTau e Square; derivados de naftaleno (por exemplo, derivados de dansila e prodan); derivados de cumarina; derivados de oxadiazol (por exemplo, piridiloxazol, nitrobenzoxadiazol ou benzoxadiazol); derivados de antraceno (por exemplo, antraquinonas, incluindo-se DRAQ5; DRAQ7; e Laranja CyTRAK - "CyTRAK Orange"); derivados de pireno, como o azul cascata ("Cascade blue"); derivados de oxazina (por exemplo, vermelho do Nilo - "Nile red"; azul do Nilo - "Nile blue"; cresil violeta; oxazina 170); derivados de acridina (por exemplo, proflavina, laranja de acridina, amarelo de acridina); derivados de arilmetina: auramina, violeta cristal, verde malaquita; e derivados de tetrapirrol (por exemplo, porfina, ftalocianina ou bilirrubina). Outros exemplos de grupamentos M exemplares incluem: corantes de cianina, corantes de xantato (por exemplo, Hex, Vic, Nedd, Joe ou Tet); e os corantes amarelo de Yakima ("Yakima yellow"); vermelho de Redmond ("Redmond red"); tamra; vermelho do Texas ("Texas red") e alexa fluor®.

[107] Ainda em outras modalidades de qualquer um dos, M compreende três ou mais anéis arila ou heteroarila, ou combinações suas, por exemplo quatro ou mais anéis arila ou heteroarila, ou combinações suas, ou mesmo cinco ou mais anéis arila ou heteroarila, ou combinações suas. Em algumas modalidades, M compreende seis anéis arila ou heteroarila, ou combinações suas. Em outras modalidades, os anéis são fundidos. Por exemplo, em algumas modalidades, M compreende três ou mais anéis fundidos, quatro ou mais anéis fundidos, cinco ou mais anéis fundidos, ou mesmo seis ou mais anéis fundidos.

[108] Em algumas modalidades, M é cíclico. Por exemplo, em algumas modalidades, M é carbocíclico. Em outra modalidade, M é heterocíclico. Ainda em outras modalidades dos anteriores, M, em cada ocorrência, compreende independentemente um grupamento arila. Em algumas destas modalidades, o grupamento arila é multicíclico. Em outros exemplos mais específicos, o grupamento arila é um grupamento arila multicíclico fundido, por exemplo, que pode compreender pelo menos 3, pelo menos 4, ou até mesmo mais do que 4 anéis arila.

[109] Em outras modalidades de qualquer um dos compostos anteriores de fórmula (I), M, em cada ocorrência, independentemente compreende pelo menos um heteroátomo. Por

exemplo, em algumas modalidades, o heteroátomo é nitrogênio, oxigênio ou enxofre.

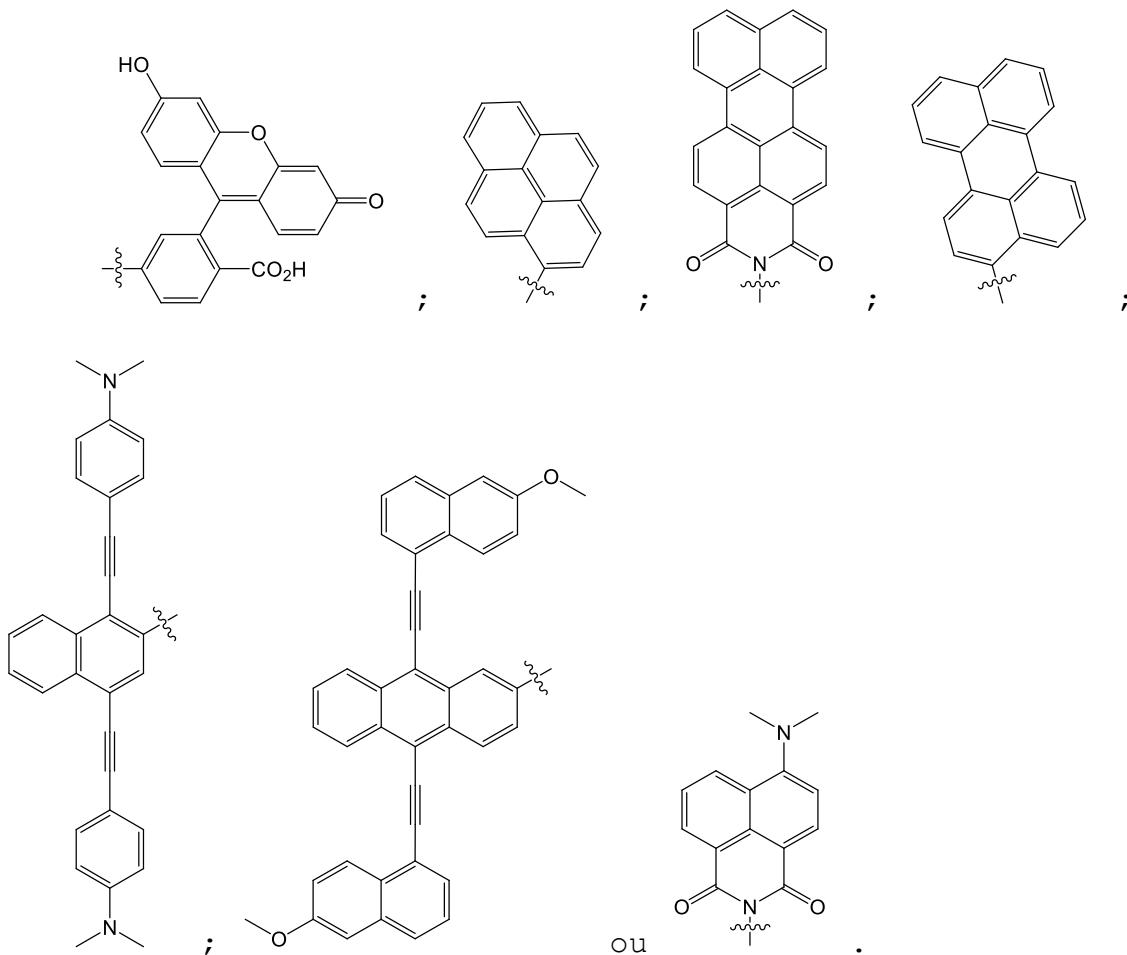
[110] Em ainda mais modalidades de qualquer um dos anteriores, M, em cada ocorrência, independentemente comprehende um substituinte. Por exemplo, em algumas modalidades, o substituinte é um grupo flúoro, cloro, bromo, iodo, amino, alquilamino, arilamino, hidróxi, sulfidrila, alcóxi, arilóxi, fenila, arila, metila, etila, propila, butila, isopropila, t-butila, carbóxi, sulfonato, amida ou formila.

[111] Em algumas modalidades ainda mais específicas dos anteriores, M, em cada ocorrência, independentemente, um dimetilaminostilbeno, quinacridona, fluorofenil-dimetil-BODIPA, his-fluorofenil-BODIPA, acridina, terrileno, sexifenilo, porfirina, benzopireno, (fluorofenil-dimetil-difluorobora-diaza-indaceno) fenil, (bis-fluorofenil-difluorobora-diaza-indaceno) fenil, quaterfenil, bi-benzotiazole, ter - porções benzotiazole, bi-naftilo, bi-antracil, squaraina, squarylium, 9, 10-etinilantraceno ou ternaftilo. Em outras modalidades, M é, em cada ocorrência, independentemente, p-terfenila, perileno, azobenzeno, fenazina, fenantrolina, acridina, tioxantreno, criseno, rubreno, coroneno, cianina, perileno imida ou perileno amida ou um derivado seu. Ainda em outras modalidades, M é, em cada ocorrência, independentemente, um corante cumarina, um

corante resorufina, um corante difluoreto de dipirrometenoboro, um corante rutênio bipiridila, um corante de transferência de energia, um corante laranja de tiazol, um corante polimetina ou N-aryl-1,8-naftalimida.

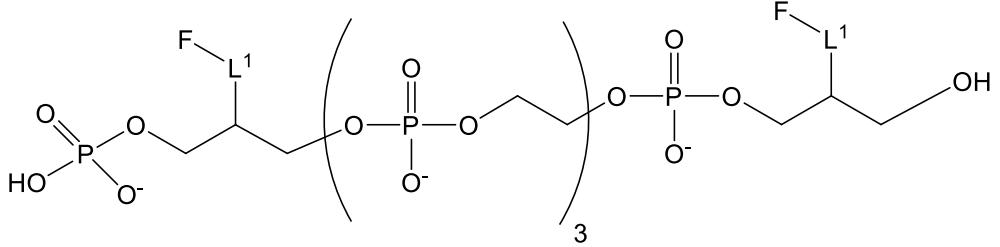
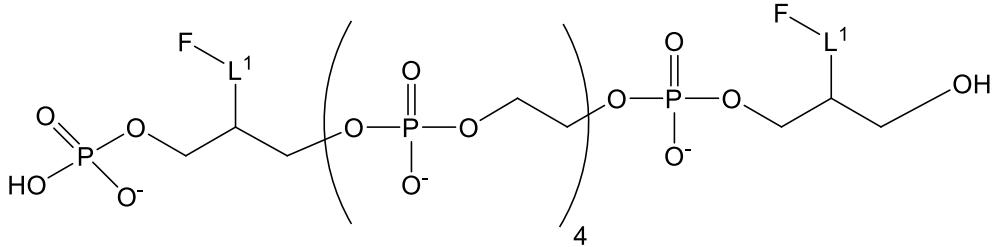
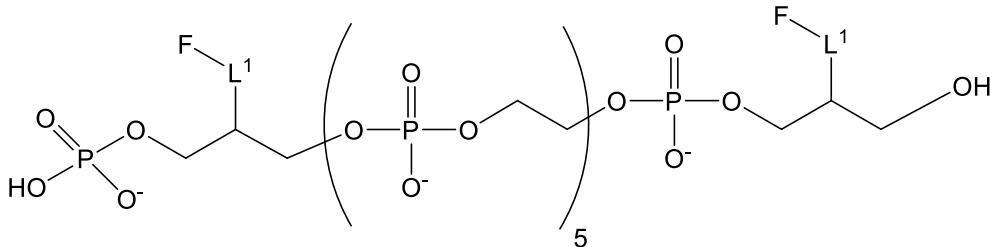
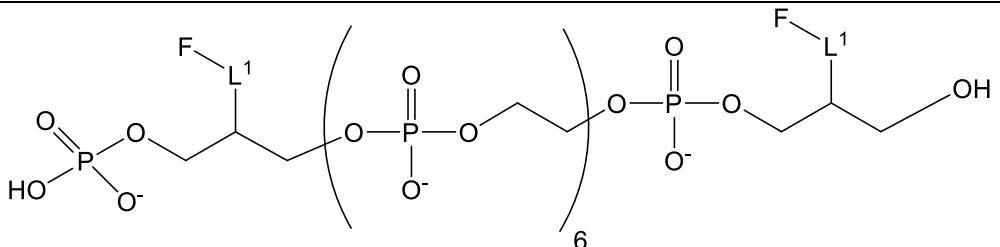
[112] Em ainda mais modalidades de qualquer um dos anteriores, M, em cada ocorrência, é o mesmo. Em outras modalidades, cada M é diferente. Em ainda mais modalidades, um ou mais M é o mesmo e um ou mais M é diferente.

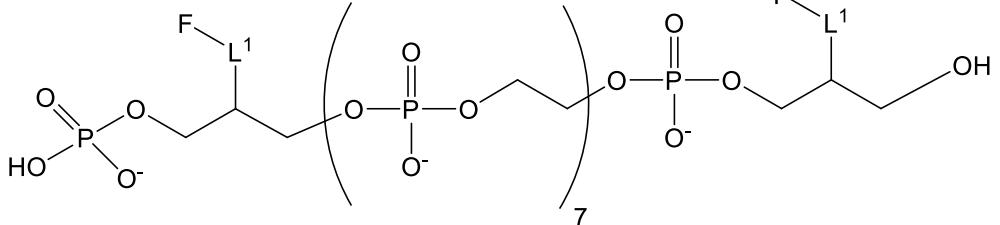
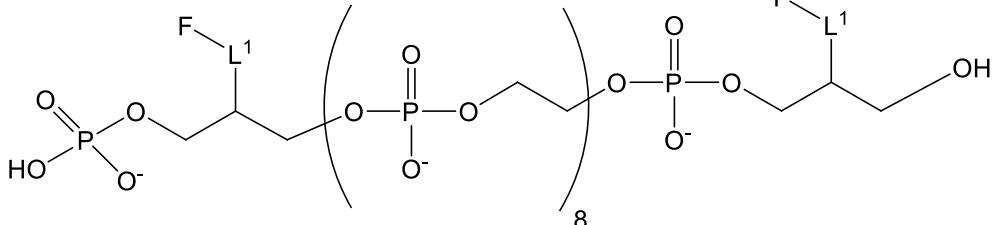
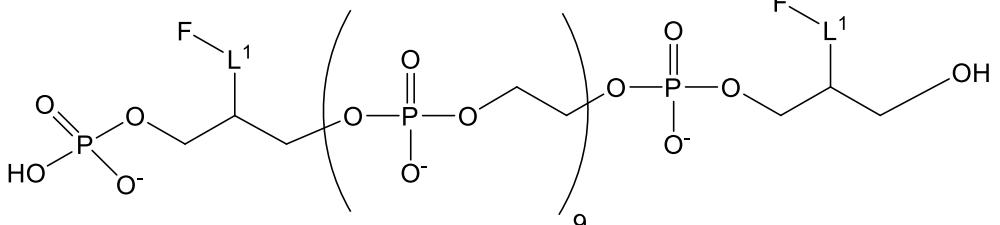
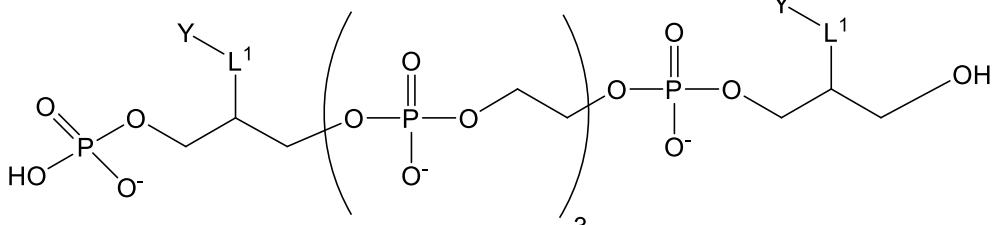
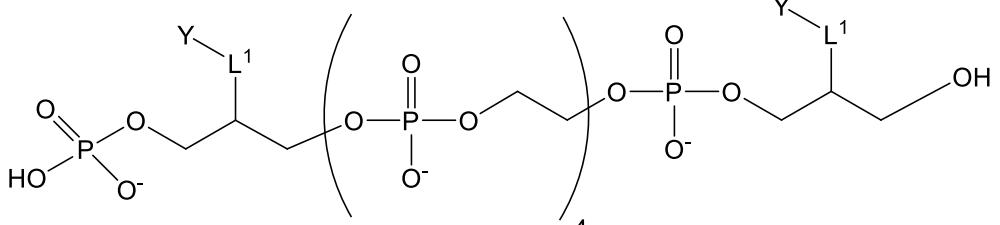
[113] Em algumas modalidades, M é pireno, perileno, perileno monoimida ou 6-FAM ou derivado seu. Em algumas modalidades diferentes, M tem uma das seguintes estruturas:

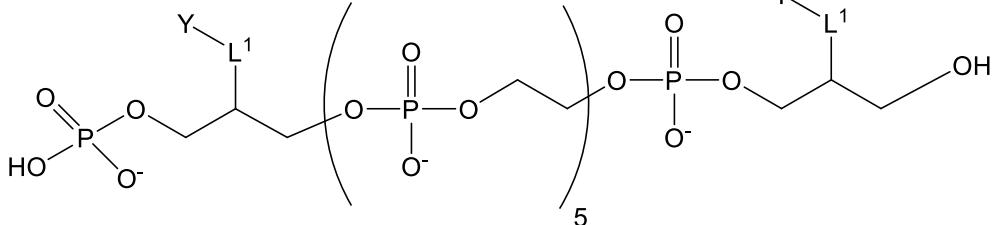
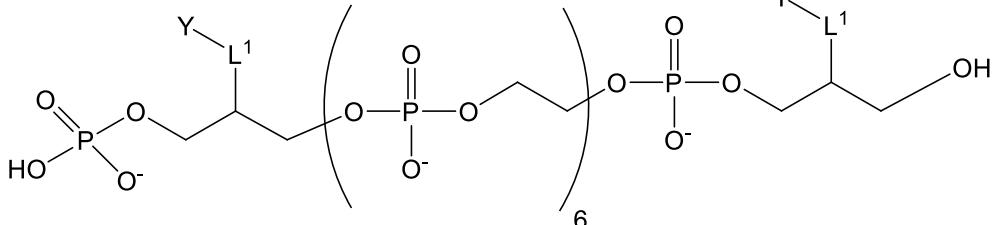
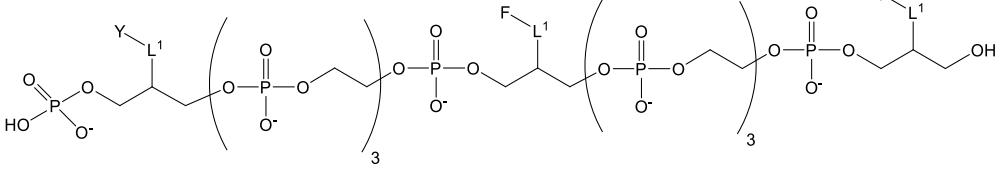
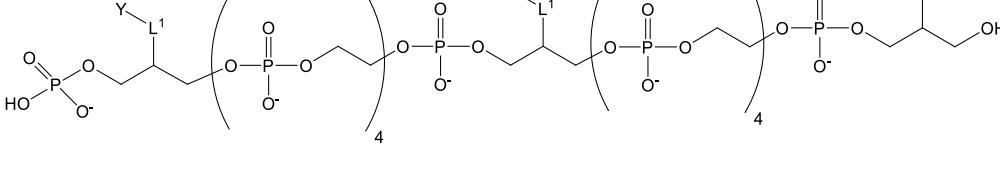
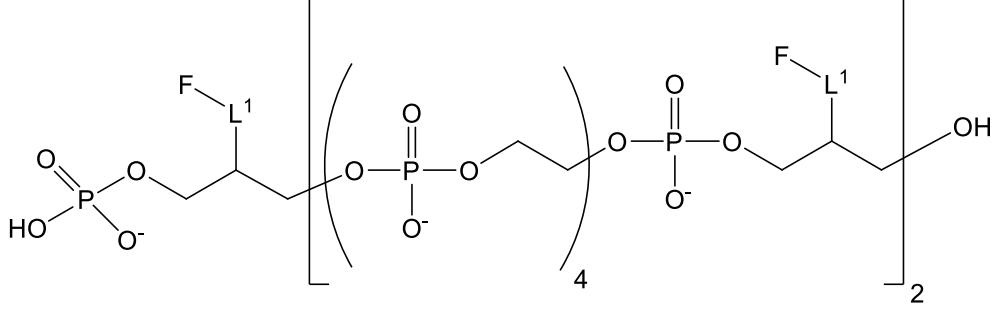


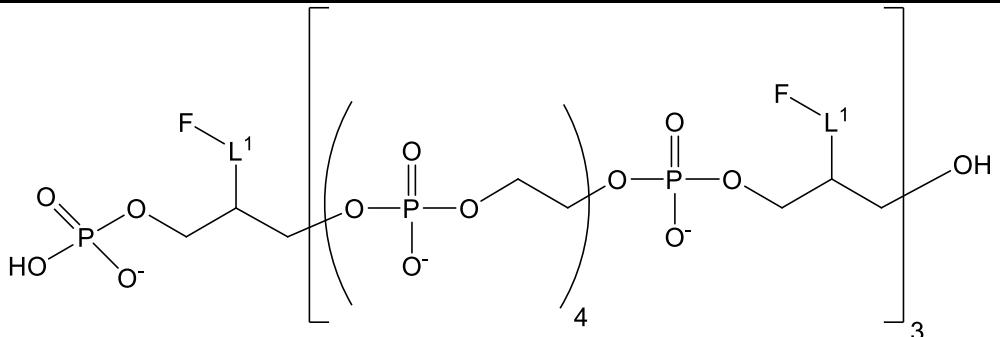
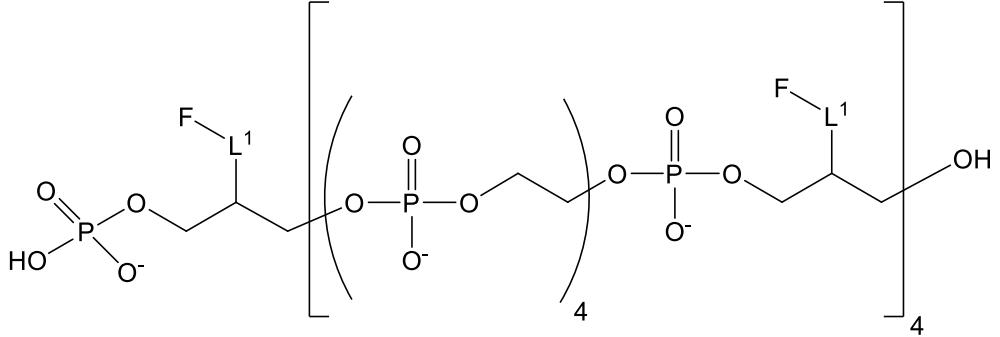
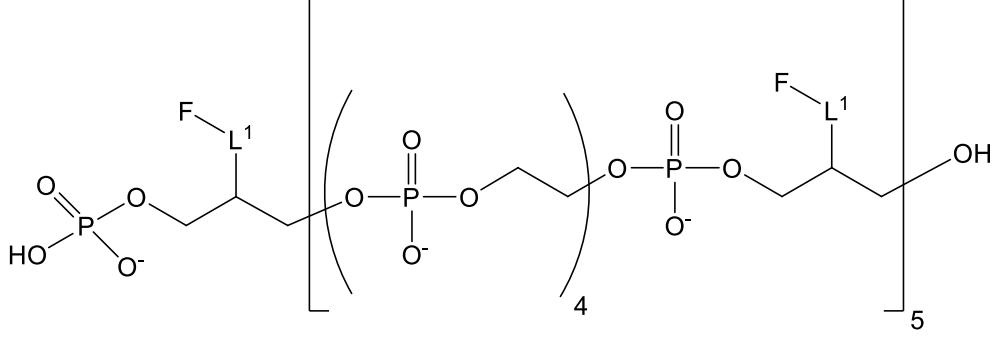
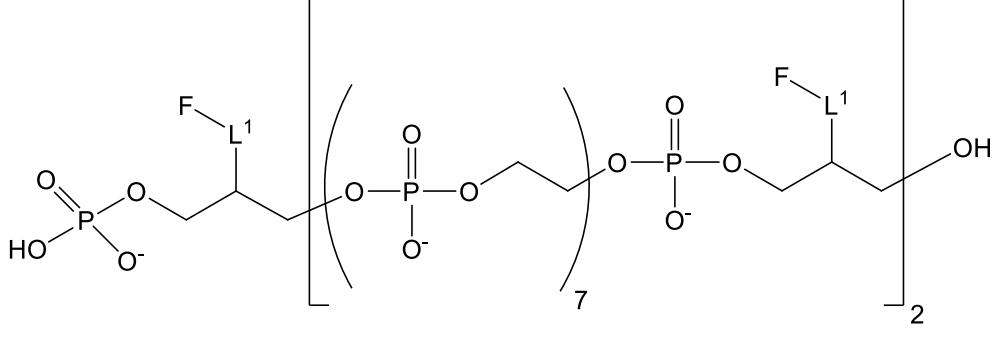
[114] Em algumas modalidades específicas, o composto de estrutura (I) é um composto selecionado da Tabela 2:

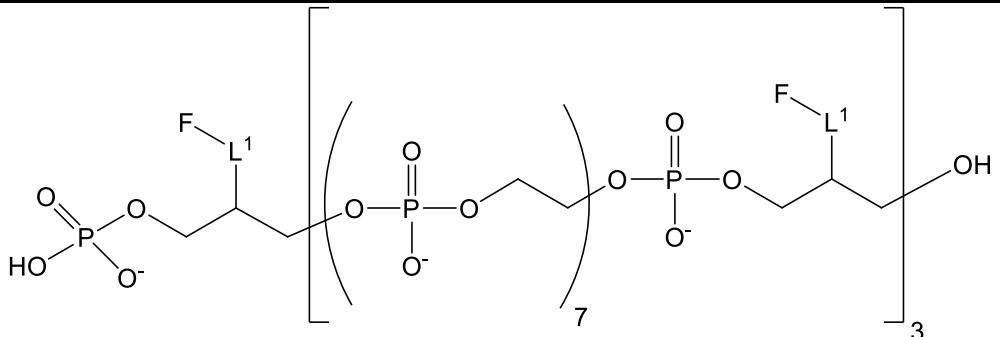
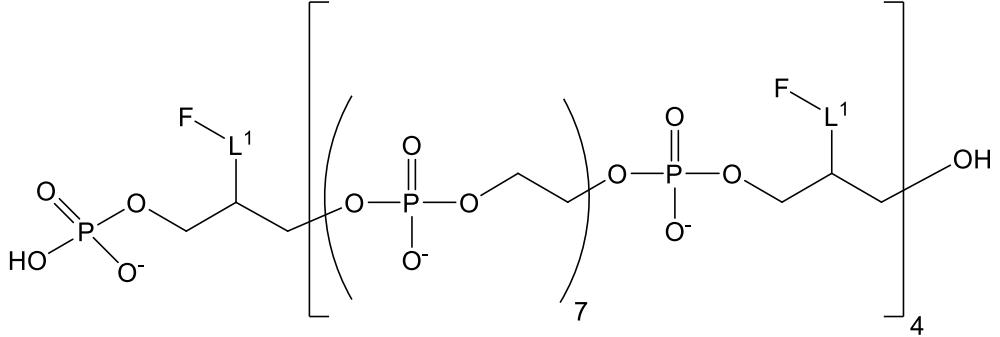
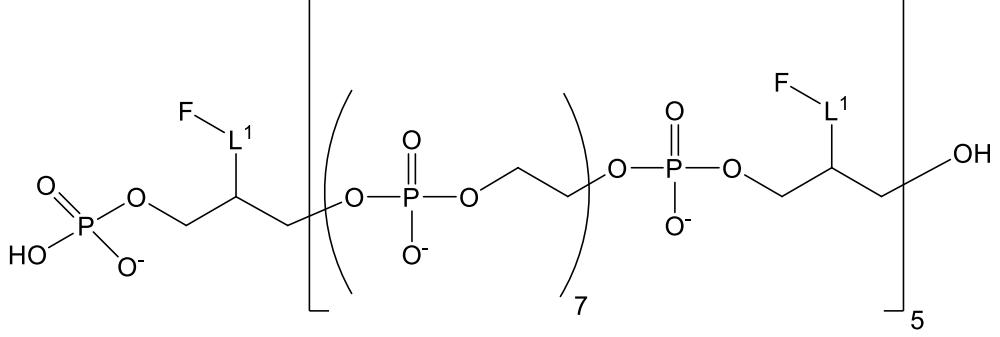
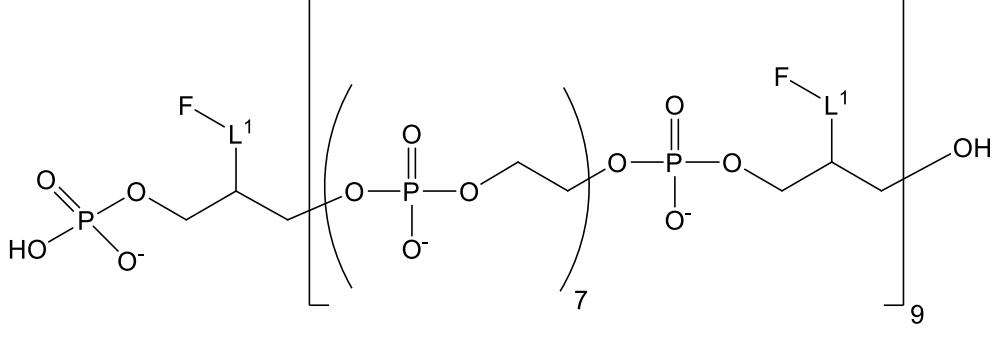
Tabela 2. Exemplos de Compostos de Estrutura I

Nome	Estrutura
I-1	
I-2	
I-3	
I-4	

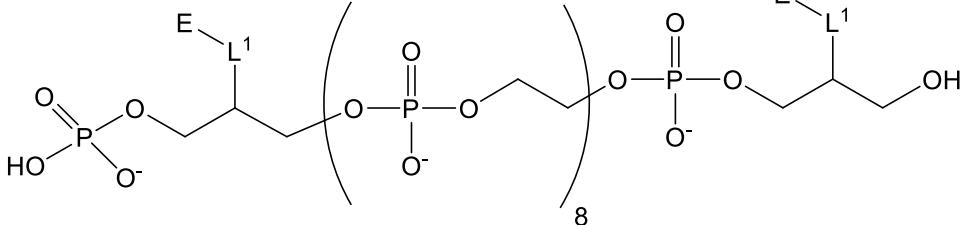
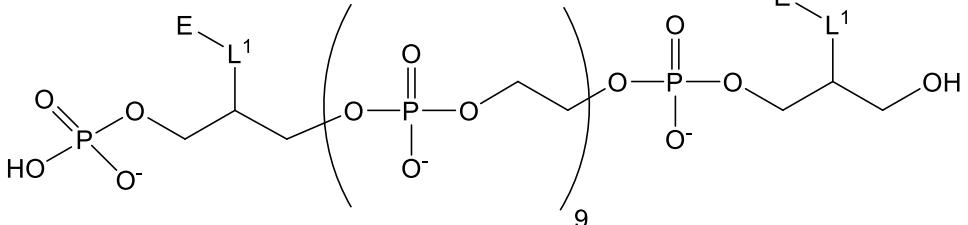
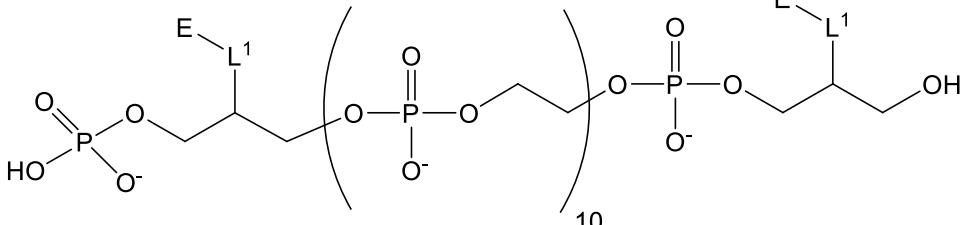
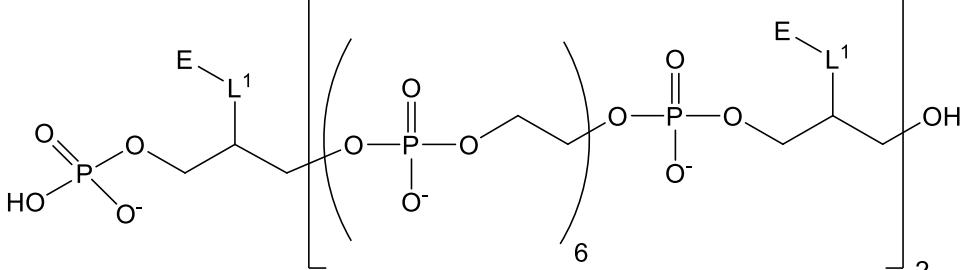
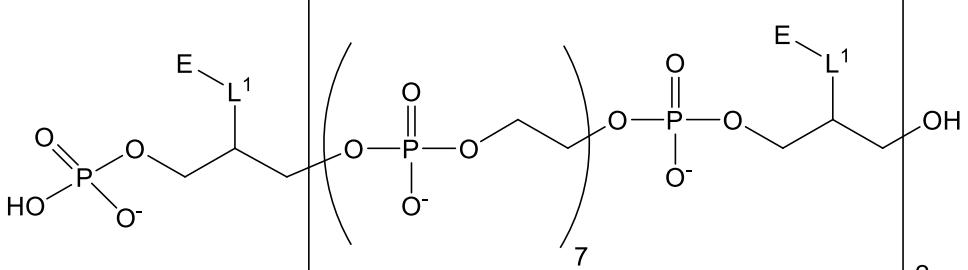
Nome	Estrutura
I-5	
I-6	
I-7	
I-8	
I-9	

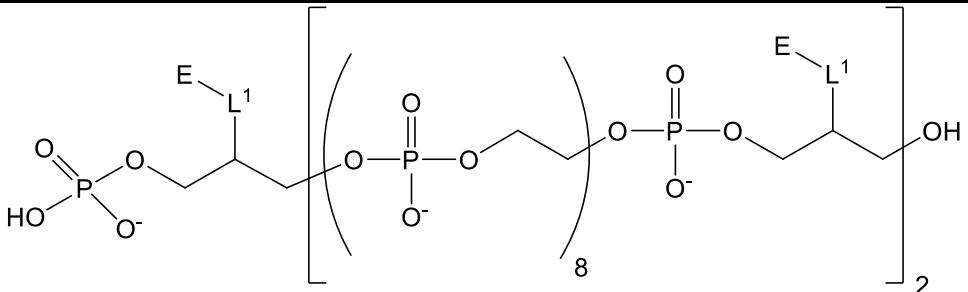
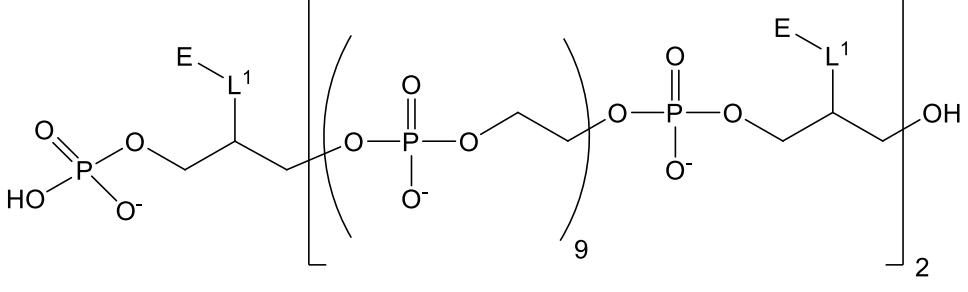
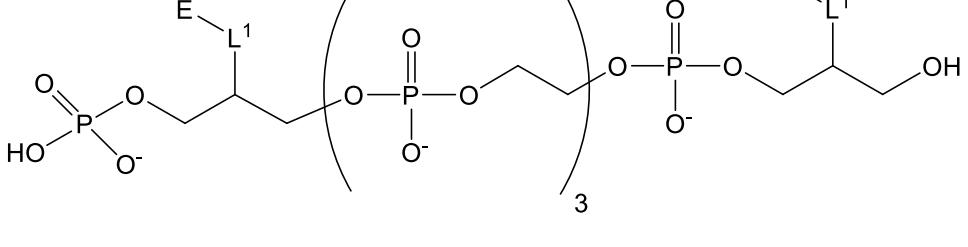
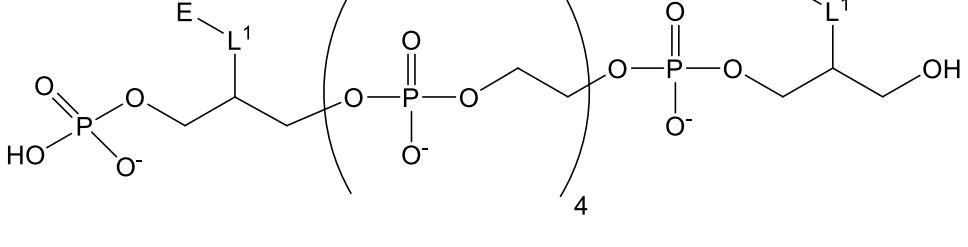
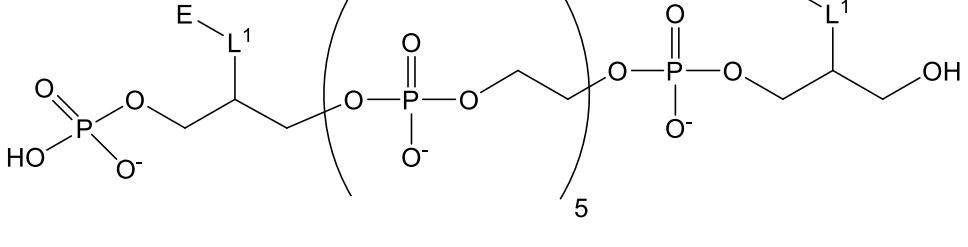
Nome	Estrutura
I-10	
I-11	
I-12	
I-13	
I-14	

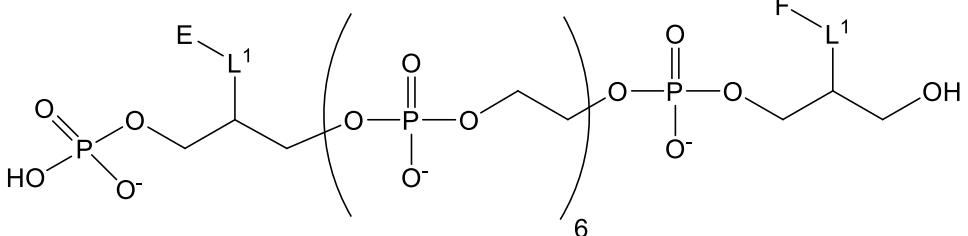
Nome	Estrutura
I-15	
I-16	
I-17	
I-18	

Nome	Estrutura
I-19	
I-20	
I-21	
I-22	

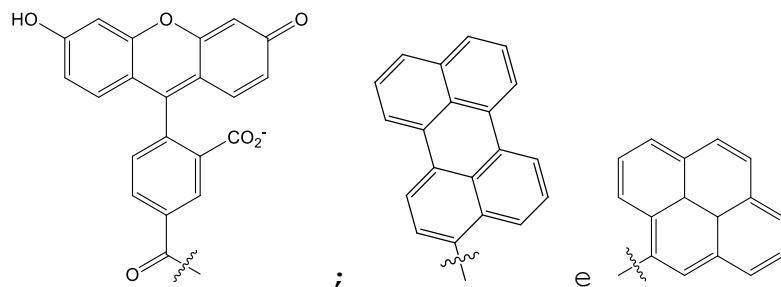
Nome	Estrutura
I-23	
I-24	
I-25	
I-26	
I-27	

Nome	Estrutura
I-28	
I-29	
I-30	
I-31	
I-32	

Nome	Estrutura
I-33	
I-34	
I-35	
I-36	
I-37	

Nome	Estrutura
I-38	

[115] Tal como usado na Tabela 2, e ao longo do pedido, F, E e Y referem-se aos grupamentos fluoresceína, perileno e pireno, respectivamente, e têm as seguintes estruturas:



[116] "F" "E" "Y"

[117] L¹ nos compostos da Tabela 2 é tal como aqui definido para qualquer composto de estrutura (I). Em algumas modalidades específicas, L¹ nos compostos da Tabela 1 é um grupamento que compreende um grupo triazolila, sendo a triazolila formado por reação de um alcino e uma azida.

[118] Os compostos corantes ora divulgados são "ajustáveis", o que significa que, através de seleção adequada das variáveis em qualquer um dos compostos anteriores, um técnico especialista na técnica pode chegar a um composto tendo uma fluorescência molar desejada e/ou

predeterminada (brilho molar). A ajustabilidade dos compostos permite que o usuário chegue facilmente a compostos com a fluorescência e/ou cor desejadas para uso em um ensaio particular ou para identificar um analito específico de interesse. Embora todas as variáveis possam ter efeito sobre a fluorescência molar dos compostos, crê-se que a seleção adequada de M , m e n desempenha um papel importante na fluorescência molar dos compostos. Por conseguinte, em uma modalidade é fornecido um método para obter um composto com uma fluorescência molar desejada, compreendendo o método a seleção de um grupamento M com uma fluorescência conhecida, preparar um composto de estrutura (I) que compreende o grupamento M e selecionar as variáveis apropriadas para m e n a fim de se chegar à fluorescência molar desejada.

[119] A fluorescência molar em certas modalidades pode ser expressa em termos de quantas vezes aumenta ou diminui em relação à emissão de fluorescência do fluoróforo primário (por exemplo, monômero). Em algumas modalidades, a fluorescência molar dos presentes compostos é 1,1x; 1,5x; 2x; 3x; 4x; 5x; 6x; 7x; 8x; 9x; 10x ou ainda maior em relação ao fluoróforo fluoróforo primário. Várias modalidades incluem a preparação de compostos com o aumento de fluorescência desejado em relação ao fluoróforo primário pela seleção adequada de m e n .

[120] Para tornar mais clara a ilustração, são representados vários compostos compreendendo grupamentos com fósforo (por exemplo, fosfato e similares) no estado aniónico (por exemplo, $-\text{OPO}(\text{OH})\text{O}^-$, $-\text{OPO}_3^{2-}$). Um técnico especialista na técnica compreenderá prontamente que a carga depende do pH e as formas não carregadas (por exemplo, protonada ou sal, tal como sódio ou outro cátion) também estão incluídas no escopo das modalidades da invenção.

[121] Composições compreendendo qualquer um dos compostos anteriores e uma ou mais moléculas de analito (por exemplo, biomoléculas) são fornecidas em várias outras modalidades. Em algumas modalidades, também é fornecido o uso de tais composições em métodos analíticos para detecção da uma ou mais moléculas de analito.

[122] Ainda em outras modalidades, os compostos são úteis em vários métodos analíticos. Por exemplo, em certas modalidades, a divulgação fornece um método para corar uma amostra, compreendendo o método a adição à dita amostra de um composto de estrutura (I), por exemplo em que um de R^2 ou R^3 é um ligante que compreende uma ligação covalente a um molécula de analito (por exemplo, biomolécula) ou micropartícula, e o outro de R^2 ou R^3 é H , OH , alquila, alcóxi, éter alquilico ou $-\text{OP}(=\text{R}_a)(\text{R}_b)\text{R}_c$, em uma quantidade suficiente para produzir uma resposta óptica quando a dita amostra é iluminada a um comprimento de onda apropriado.

[123] Em algumas modalidades dos métodos anteriores, R² é um linker que compreende uma ligação covalente a uma molécula de analito, tal como uma biomolécula. Por exemplo, um ácido nucleico, aminoácido ou um polímero seus (por exemplo, polinucleotídeo ou polipeptídeo). Em ainda mais modalidades, a molécula de analito é uma enzima, receptor, ligante de receptor, anticorpo, glicoproteína, aptâmero ou príon.

[124] Ainda em outras modalidades do métodos anterior, R² é um linker que compreende uma ligação covalente a um suporte sólido, tal como uma micropartícula. Por exemplo, em algumas modalidades, a micropartícula é uma esfera polimérica ou uma esfera não polimérica.

[125] Em ainda mais modalidades, a dita resposta óptica é uma resposta fluorescente.

[126] Em outras modalidades, a dita amostra compreende células e algumas modalidades compreendem ainda observar as ditas células por citometria de fluxo.

[127] Em ainda mais modalidades, o método compreende ainda distinguir a resposta de fluorescência daquela de um segundo fluoróforo com diferentes propriedades ópticas detectáveis .

[128] Em outras modalidades, a divulgação fornece um método para detectar visualmente uma molécula de analito, tal como uma biomolécula, compreendendo:

(a) fornecer um composto de estrutura (I), por exemplo, em que um de R^2 ou R^3 é um linker que compreende uma ligação covalente a uma molécula de analito, e o outro de R^2 ou R^3 é H, OH, alquila, alcóxi, éter alquilico ou $-OP(=R_a)(R_b)R_c$; e

(b) detectar o composto por suas propriedades visíveis.

[129] Em algumas modalidades, a molécula de analito é um ácido nucleico, aminoácido ou um polímero seus (por exemplo, polinucleotídeo ou polipeptídeo). Em ainda mais modalidades, a molécula de analito é uma enzima, receptor, ligante de receptor, anticorpo, glicoproteína, aptâmero ou príon.

[130] Em outras modalidades, é fornecido um método para detectar visualmente uma molécula de analito, tal como uma biomolécula, compreendendo o método:

(a) misturar qualquer um dos compostos anteriores com uma ou mais moléculas de analito; e

(b) detectar o composto por suas propriedades visíveis.

[131] Em outras modalidades, é fornecido um método para detectar visualmente uma molécula de analito, compreendendo o método:

(a) misturar o composto da reivindicação 1, em que R^2 ou R^3 é Q ou um linker que compreende uma ligação covalente a Q, com a molécula de analito;

- (b) formar um conjugado do composto e da molécula de analito; e
- (c) detectar o conjugado por suas propriedades visíveis.

[132] Em algumas outras modalidades diferentes, os compostos de estrutura (I) podem ser usados em vários para análise de células. Por exemplo, pelo uso de citometria de fluxo, os compostos podem ser usados para discriminar entre células vivas e mortas, avaliar a saúde das células (por exemplo, necrose vs. célula apoptótica precoce vs. apoptótica tardia vs. viva), rastrear ploidia e mitose durante o ciclo celular e determinar vários estados de proliferação celular. Embora não se pretenda estar limitado pela teoria, acredita-se que as modalidades dos compostos de estrutura (I) se liguem preferencialmente a grupamentos positivamente carregados. Por conseguinte, em algumas modalidades, os compostos podem ser usados em métodos para determinar a presença de células não intactas, por exemplo, células necrosadas. Por exemplo, a presença de células necrosadas pode ser determinada misturando-se uma amostra contendo células com um composto de estrutura (I) e analisando-se a mistura por citometria de fluxo. O composto de estrutura (I) liga-se a células necrosadas e, assim, a sua presença é detectável em condições de citometria de fluxo. Em contraste com outros reagentes de coloração que

requerem um grupo reativo amina para se ligarem a células necrosadas, modalidades dos modos de coloração de empregar compostos de estrutura (I) não requerem tampão de incubação isento de proteínas e, assim, os métodos são mais eficientes de serem realizados do que métodos conhecidos relacionados.

[133] Em várias outras modalidades, os compostos podem ser usados em métodos relacionados para determinar a presença de grupamentos positivamente carregados em células intactas ou não intactas, corpos apoptóticos, membranas despolarizadas e/ou membranas permeabilizadas.

[134] Além dos métodos acima, modalidades dos compostos de estrutura (I) encontram utilidade em várias disciplinas e métodos, incluindo [NT: compreendendo?] mas não limitados a: imagiologia em procedimentos de endoscopia para identificação de tecidos cancerosos e outros tecidos; identificação de tecido necrosado por ligação preferencial dos compostos a células mortas; métodos analíticos de célula única e/ou de molécula única, por exemplo, detecção de polinucleotídeos com pouca ou nenhuma amplificação; imagiologia de câncer, por exemplo, conjugando-se um composto de estrutura (I) com um anticorpo ou açúcar ou outro grupamento que preferencialmente liga células do câncer; imagiologia em procedimentos cirúrgicos; ligação de histonas para identificação de várias doenças; liberação de fármacos, por exemplo, substituindo-se o grupamento M em um composto

de estrutura (I) por um grupamento de fármaco ativo; e/ou agentes de contraste na prática dentária e outros procedimentos, por exemplo, por ligação preferencial do composto de estrutura (I) a várias flora e/ou organismos.

[135] Entende-se que qualquer modalidade dos compostos de estrutura (I), tal como apresentado acima, e qualquer escolha específica aqui apresentada para uma variável R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , M , m e/ou n nos compostos de estrutura (I), tal como apresentado acima, podem ser combinadas independentemente com outras modalidades e/ou variáveis dos compostos de estrutura (I) a fim de se formarem modalidades das invenções não especificamente apresentadas acima. Além disso, no caso de uma lista de opções ser listada para qualquer variável R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , M , m e/ou n particular em uma modalidade particular e/ou reivindicação, entende-se que cada escolha individual pode ser eliminada da modalidade e/ou reivindicação particular e que a lista restante de escolhas será considerada como estando dentro do escopo da invenção.

[136] Entende-se que, na presente descrição, combinações de substituintes e/ou variáveis das fórmulas representadas são permissíveis apenas se tais contribuições resultarem em compostos estáveis.

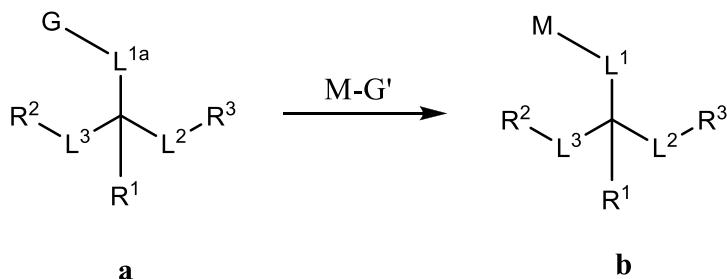
[137] Também será entendido pelos técnicos especialistas na técnica que, no processo aqui descrito, os

grupos funcionais de compostos intermediários podem necessitar ser protegidos por grupos protetores adequados. Tais grupos funcionais incluem hidróxi, amino, mercapto e ácido carboxílico. Grupos protetores adequados para hidróxi incluem trialquilsilila ou diarilalquilsilila (por exemplo, *t*-butildimetilsilila, *t*-butildifenilsilila ou trimetilsilila), tetra-hidropiranila, benzila e semelhantes. Grupos protectores adequados para amino, amidino e guanidino incluem *t*-butoxicarbonilo, benziloxicarbonilo e semelhantes. Grupos de proteção adequados para mercapto incluem $-\text{C}(\text{O})-\text{R}''$ (onde R'' é alquila, arila ou arilalquila), *p*-metoxibenzila, tritila e semelhantes. Grupos protetores adequados para ácido carboxílico incluem ésteres de alquila, arila ou arilalquila. Grupos protetores podem ser adicionados ou removidos de acordo com técnicas padrão, as quais são conhecidas pelos técnicos especialistas na técnica e tais como aqui descrita. O uso de grupos protetores é descrito em detalhes em Green, TW e PGM. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 3a Ed., Wiley. Como um técnico especialista na técnica entenderia, o grupo protetor também pode ser uma resina polimérica, tal como uma resina de Wang, uma resina de Rink ou uma resina de cloreto de 2-clorotritila.

[138] Além disso, todos os compostos da invenção que existem na forma de base ou ácido livres podem ser

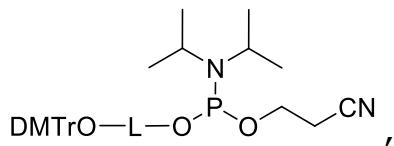
convertidos nos seus sais por tratamento com a base ou ácido inorgânicos ou orgânicos apropriados por métodos conhecidos pelos técnicos especialistas na técnica. Os sais dos compostos da invenção podem ser convertidos na sua forma de base ou ácido livres por técnicas padrão.

[139] Os Esquemas Reacionais que se seguem ilustram exemplos de métodos para fazer compostos desta invenção. Entende-se que um técnico especialista na técnica pode ser capaz de fazer estes compostos por métodos similares ou combinando outros métodos conhecidos por um técnico especialista na técnica. Entende-se, também, que um técnico especialista na técnica seria capaz de fazer, de uma maneira similar à descrita abaixo, outros compostos de estrutura (I) não especificamente ilustrados abaixo usando os componentes de partida apropriados e modificando os parâmetros da síntese conforme necessário. Em geral, os componentes iniciais podem ser obtidos a partir de fontes tais como Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI e Fluorochem USA etc. ou sintetizados de acordo com fontes conhecidas dos técnicos especialistas na técnica (vide, para exemplo, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5a edição (Wiley, dezembro de 2000)) ou preparados tal como descrito nesta invenção.

Esquema Reacional I

[140] O Esquema Reacional I ilustra um exemplo de método para a preparação de intermediários úteis para a preparação de compostos de estrutura (I). Com referência ao Esquema Reacional I, em que R^1 , L^1 , L^2 , L^3 , G e M são tais como definidos acima, e R^2 e R^3 são tais como definidos acima ou são variantes protegidas suas, faz-se reagir um composto de estrutura **a**, que pode ser comprado ou preparado por técnicas bem conhecidas, com $M-G'$ para produzir compostos de estrutura **b**. Aqui, G e G' representam grupos funcionais com reatividade complementar (isto é, grupos funcionais que reagem para formarem uma ligação covalente). G' pode ser "pendurado" a M ou a uma parte do "esqueleto" ("backbone") estrutural de M . G pode ser qualquer número de grupos funcionais aqui descritos, tal como alcino, e G' pode ser qualquer um de diversos grupos funcionais, por exemplo azida.

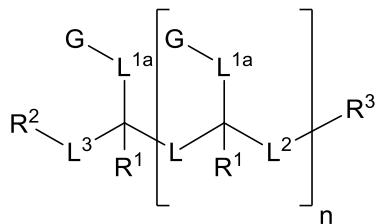
[141] O composto de estrutura (I) pode ser preparado a partir da estrutura **b** por reação em condições de síntese de DNA automatizada bem conhecidas com um composto de fosforamidito que tem a seguinte estrutura (**c**):



(c)

em que L é independentemente um linker opcional, seguido de reação com um outro composto de estrutura **b**. Compostos multiméricos de estrutura (I) são preparados fazendo-se reagir o número desejado de compostos de estrutura **b** sequencialmente com o reagente fosforamidito apropriado em condições de síntese de DNA.

[142] Alternativamente, os compostos de estrutura (I) são preparados sintetizando-se primeiro um composto *simérico* ou oligomérico com a seguinte estrutura d em condições de síntese de DNA típicas.



(d)

em que G, L^{1a}, L², L³, R¹, R², R³ e n são tais como aqui definidos para compostos de estrutura (II), e, então, fazendo-se reagir o composto de estrutura **d** com M-L^{1b}-G', em que M, L^{1b} e G' são aqui definidos para compostos de estrutura (II) e métodos relacionados.

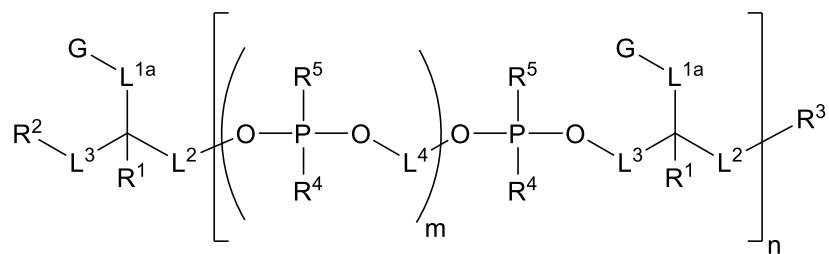
[143] Métodos de síntese de DNA são bem conhecidos na técnica. Resumidamente, dois grupos álcool, por exemplo, R^2 e R^3 em intermediários b ou d acima, são funcionalizados com um grupo dimetoxitritila (DMT) e um grupo 2-cianoetil-N, N-diisopropilamino fosforamidito, respectivamente. O grupo fosforamidito é acoplado a um grupo álcool, tipicamente na presença de um ativador tal como tetrazol, seguido de oxidação do átomo de fósforo com iodo. O grupo dimetoxitritila pode ser removido com ácido (por exemplo, ácido cloroacético) para expor o álcool livre, o qual se pode fazer reagir com um grupo fosforamidito. O grupo 2-cianoetila pode ser removido após oligomerização por tratamento com amônia aquosa.

[144] A preparação dos fosforamiditos usados nos métodos de oligomerização também é bem conhecida na técnica. Por exemplo, um álcool primário (por exemplo, R^3) pode ser protegido como um grupo DMT por reação com DMT-Cl. Um álcool secundário (por exemplo, R^2) é, então, funcionalizado como um fosforamidito por reação com um reagente apropriado, tal como 2-cianoetil-N, N-diisopropilclorofosforamidito. Os métodos para a preparação de fosforamiditos e a sua oligomerização são bem conhecidos na técnica e descritos em maior detalhe nos exemplos.

[145] Os compostos de estrutura (I) são preparados por oligomerização do intermediário b de acordo com a bem

conhecida química de fosforamiditos descrita acima. O número desejado de m e n unidades de repetição é incorporado na molécula repetindo-se o acoplamento de fosforamidito o número de vezes desejado. Entender-se-á que os compostos de estrutura (II), tal como descritos abaixo, podem ser preparados por métodos análogos.

[146] Em várias outras modalidades, são fornecidos compostos úteis para a preparação do composto de estrutura (I). Os compostos podem ser preparados acima em forma monomérica, dimérica e/ou oligomérica e, então, o grupamento M ligado covalentemente ao composto através de qualquer número de metodologias sintéticas (por exemplo, das reações "click" descritas acima) para se formar um composto de estrutura (I). Por conseguinte, em várias modalidades, é fornecido um composto com a seguinte estrutura (II):



(II)

ou um estereoisômero, sal ou tautômero seus, em que:

G é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com um grupo reativo complementar;

L^{1a} , L^2 e L^3 são, em cada ocorrência, independentemente, um linker opcional alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, heteroalqueníleno, heteroalquiníleno ou heteroatômico;

L^4 é, em cada ocorrência, independentemente, um linker alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, heteroalqueníleno ou heteroalquiníleno;

R^1 é, em cada ocorrência, independentemente, H, alquila ou alcóxi;

R^2 e R^3 são cada um, independentemente, H, OH, SH, alquila, alcóxi, éter alquílico, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, um linker que compreende uma ligação covalente a Q, um linker que compreende uma ligação covalente a uma molécula de analito, um linker que compreende uma ligação covalente a um suporte sólido ou um linker que compreende uma ligação covalente a um outro composto de estrutura (II), em que: R_a é O ou S; R_b é OH, SH, O^- , S^- , OR_d ou SR_d ; R_c é OH, SH, O^- , S^- , OR_d , SR_d , alquila, alcóxi, éter alquílico, éter alcóxi-alquílico, fosfato, tiofosfato, fosfoalquila, tiofosfoalquila, éter fosfoalquílico ou éter tiofosfoalquílico; e R_d é um contra-íon;

R^4 é, em cada ocorrência, independentemente, OH, SH, O^- , S^- , OR_d ou SR_d ;

R^5 é, em cada ocorrência, independentemente, oxo, tioxo ou está ausente;

Q é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito, um suporte sólido ou um grupo reativo complementar Q' ;

m é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro igual a zero ou maior; e

n é um número inteiro igual a um ou maior.

[147] Em algumas modalidades, pelo menos uma ocorrência de m é um número inteiro igual a um ou maior. Em outras modalidades, pelo menos uma ocorrência de m é um número inteiro igual a dois ou maior. Ainda em modalidades diferentes, pelo menos uma ocorrência de m é um número inteiro igual a três ou maior.

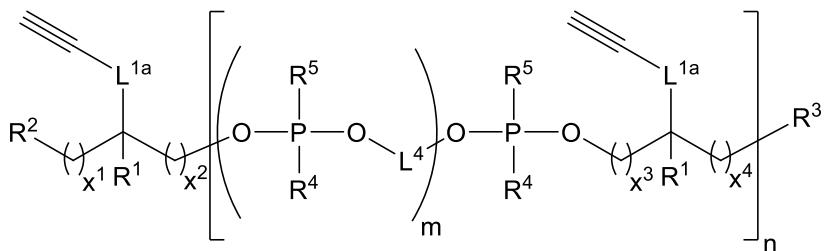
[148] O grupamento G no composto de estrutura (II) pode ser selecionado a partir de qualquer grupamento compreendendo um grupo que tenha o grupo reativo apropriado para formar uma ligação covalente com um grupo complementar em um grupamento M . Em exemplos de modalidades, o grupamento G pode ser selecionado a partir de qualquer um dos grupamentos Q aqui descritos, incluindo-se os exemplos específicos fornecidos na Tabela 1. Em algumas modalidades, G compreende, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento apropriado para reações que incluem a reação catalisada por cobre de uma azida e um alcino para se formar um triazol (cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen), reação de

um dieno e um dienófilo (Diels-Alder), cicloadição de alcino-nitrona promovida por tensão, reação de uma alceno tensionado com uma azida, tetrazina ou tetrazol, cicloadição de alceno e azida [3+2], Diels-Alder de demanda inversa entre alceno e tetrazina, fotorreação de alceno e tetrazol e várias reações de deslocamento, tais como deslocamento de um grupo de saída por ataque nucleofílico em um átomo eletrofílico.

[149] Em algumas modalidades, G é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo funcional aldeído, oxima, hidrazona, alcino, amina, azida, acilazida, haleto de acila, nitrila, nitrona, sulfidrila, dissulfeto, haleto de sulfonila, isotiocianato, imidoéster, éster ativado, cetona, carbonila α,β -insaturada, alceno, maleimida, α -haloimida, epóxido, aziridina, tetrazina, tetrazol, fosfina, biotina ou tiirano.

[150] Em outras modalidades, G compreende, em cada ocorrência, independentemente, um grupo alcino ou azida. Em diferentes modalidades, G compreende, em cada ocorrência, independentemente, um grupo reativo capaz de formar um grupo funcional compreendendo um grupo alceno, éster, amida, tioéster, dissulfeto, carbocíclico, heterocíclico ou heteroarila, após reação com o grupo reativo complementar. Por exemplo, em algumas modalidades, a heteroalila é triazolila.

[151] Em algumas modalidades, o composto tem a seguinte estrutura (IIA):

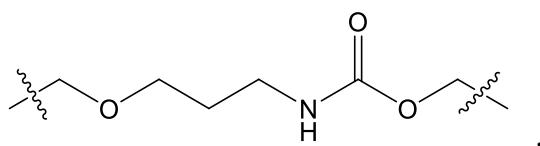


(IIA)

em que:

L^{1a} e L^{1b} são, em cada ocorrência, linkers independentemente opcionais; e x^1 , x^2 , x^3 e x^4 são, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 0 a 6.

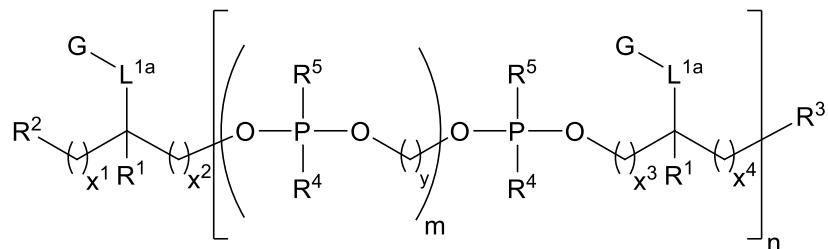
[152] Em algumas modalidades específicas de (II) e (IIa), cada L^{1a} está ausente. Em outras modalidades cada L^{1a} está presente. Por exemplo, em algumas modalidades, L^{1a} é, em cada ocorrência, independentemente, heteroalquíleno. Em outras modalidades, L^{1a} tem a seguinte estrutura:



[153] Em várias outras modalidades do composto de estrutura (II), L^2 , L^3 , L^4 são, em cada ocorrência, independentemente, alquíleno C1-C6, alqueníleno C2-C6 ou alquiníleno C2-C6. Em algumas outras modalidades, L^4 é, em

cada ocorrência, independentemente, alquíleno C₁-C₆, alqueníleno C₂-C₆ ou alquiníleno C₂-C₆.

[154] Em outras modalidades, o composto tem a seguinte estrutura (IIB) :



(IIB)

em que:

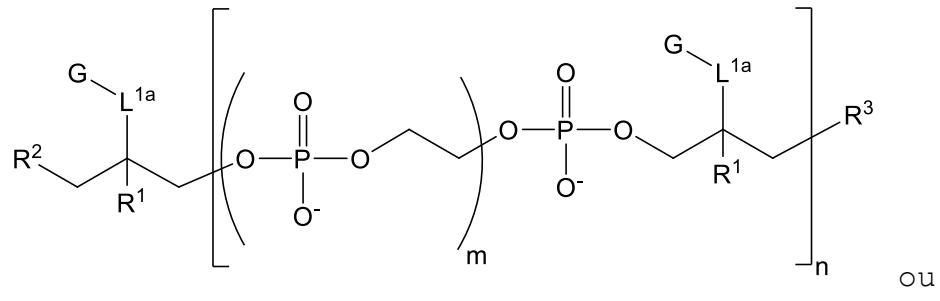
x¹, x², x³ e x⁴ são, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 0 a 6; e y é um número inteiro de 1 a 6.

[155] Em outra de qualquer uma das modalidades anteriores do composto (II), G é, em cada ocorrência, independentemente $\text{---}\equiv$ ou $\text{---}\text{N}_3$.

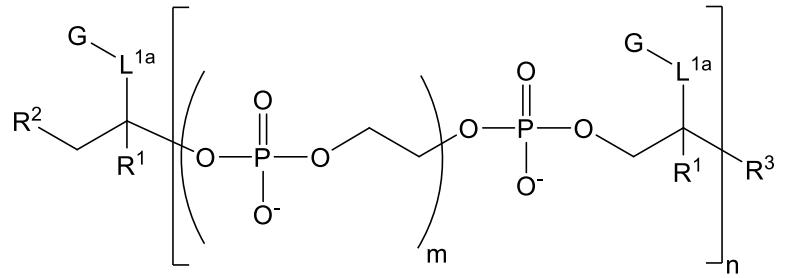
[156] Em várias modalidades do composto de estrutura (IIa), x³ e x⁴ são ambos 2 em cada ocorrência. Em outras modalidades, x¹, x², x⁵ e x⁶ são, cada, 1 em cada ocorrência. Em outras modalidades, y é 2 para cada valor inteiro de m.

[157] Em outras modalidades, R⁴ é, em cada ocorrência, independentemente, OH, O⁻ ou OR_d, e em diferentes modalidades, R⁵ é, em cada ocorrência, oxo.

[158] Em algumas modalidades diferentes, o composto tem uma das seguintes estruturas (IID) ou (IIE) :



(IID)



(IIE)

[159] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores de estrutura (II), G é, em cada

ocorrência, independentemente, $\text{---}\equiv\text{---}$ ou $\text{---}\equiv\text{---N}_3$.

[160] Em algumas modalidades diferentes de qualquer um dos compostos anteriores de estrutura (II), R¹ é H.

[161] Em outras várias modalidades dos compostos de estrutura (II), R² e R³ são cada um, independentemente, OH ou $\text{---OP(=R}_a\text{)(R}_b\text{)R}_c$. Em algumas modalidades diferentes, R² ou R³ é OH ou $\text{---OP(=R}_a\text{)(R}_b\text{)R}_c$, e o outro de R² ou R³ é Q ou um linker que compreende uma ligação covalente a Q.

[162] Ainda em outras modalidades de compostos de estrutura (II), Q é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito ou com um suporte sólido. Em outras modalidades, Q é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com um grupo reativo complementar Q'. Por exemplo, em algumas modalidades, Q' está presente em um outro composto de estrutura (II) (por exemplo, na posição R² ou R³), e Q e Q' compreendem grupos reativos complementares de tal modo que a reação do composto de estrutura (II) e o outro composto de estrutura (II) resulta em um dímero ligado covalentemente do composto de estrutura (II). Compostos multiméricos de estrutura (II) também podem ser preparados de uma maneira análoga e estão incluídos dentro do escopo de modalidades da invenção.

[163] O tipo de grupo Q e conectividade do grupo Q ao restante do composto de estrutura (II) não é limitado, desde que Q compreenda um grupamento com reatividade apropriada para se formar a ligação desejada.

[164] Em certas modalidades de compostos de estrutura (II), o Q é um grupamento que não é suscetível a hidrólise em condições aquosas, mas é suficientemente reativo para formar uma ligação com um grupo correspondente

em uma molécula de analito ou do suporte sólido (por exemplo, uma amina, azida ou alcino).

[165] Certas modalidades de compostos de estrutura (II) compreendem grupos Q comumente empregados na área de bioconjugação. Por exemplo, em algumas modalidades, Q compreende um grupo reativo nucleofílico, um grupo reativo eletrofílico ou um grupo reativo de cicloadição. Em algumas modalidades mais específicas, Q compreende um grupo funcional sulfidrila, dissulfeto, éter ativado, isotiocianato, azida, alcino, alceno, dieno, dienófilo, haleto de ácido, haleto de sulfonila, fosfina, α -haloamida, biotina, amino ou maleimida. Em algumas modalidades, o éster ativado é um éster de N-succinimida, imidoéster ou éster de polifluorofenila. Em outras modalidades, o alcino é uma alquilazida ou acilazida.

[166] São fornecidos exemplos de grupamentos Q para compostos de estrutura (II) na Tabela I acima.

[167] Assim como com compostos de estrutura (I), em algumas modalidades de compostos de estrutura (II), em que Q é SH, o grupamento SH tenderá a formar ligações dissulfeto com um outro grupo sulfidrila em um outro composto de estrutura (II). Por conseguinte, algumas modalidades incluem compostos de estrutura (II), que estão na forma de dímeros dissulfeto, sendo a ligação dissulfeto derivada de grupos SH Q.

[168] Em algumas outras modalidades de compostos de estrutura (II), um de R^2 ou R^3 é OH ou $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, e o outro de R^2 ou R^3 é um linker que compreende uma ligação covalente a um suporte sólido. Por exemplo, em algumas modalidades, a molécula de analito é um ácido nucleico, um aminoácido ou um polímero seus. Em outras modalidades, a molécula de analito é uma enzima, receptor, ligante de receptor, anticorpo, glicoproteína, aptâmero ou príon. Ainda em modalidades diferentes, o suporte sólido é uma esfera polimérica ou uma esfera não polimérica.

[169] Em algumas modalidades de compostos de estrutura (II), m é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 1 a 10, de 3 a 10 ou de 7 a 9. Em outras modalidades, m é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 1 a 5. Em outras modalidades, cada ocorrência de m é um número inteiro igual a um ou maior. Por exemplo, em algumas modalidades, cada ocorrência de m é um número inteiro igual a dois ou maior ou igual a três ou maior.

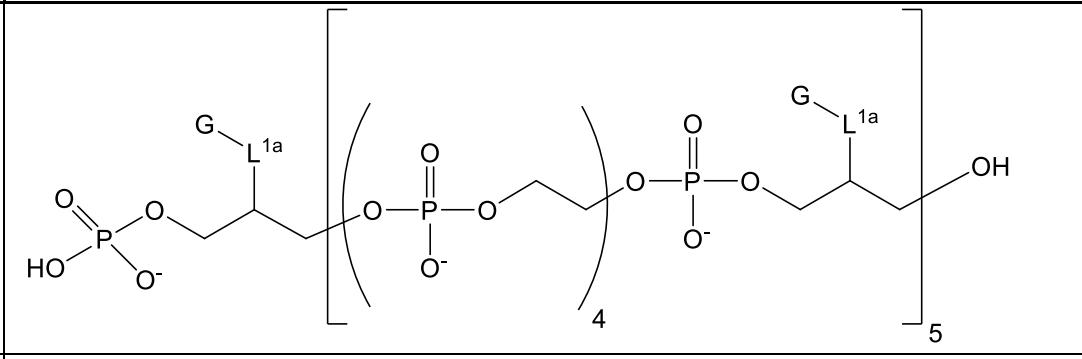
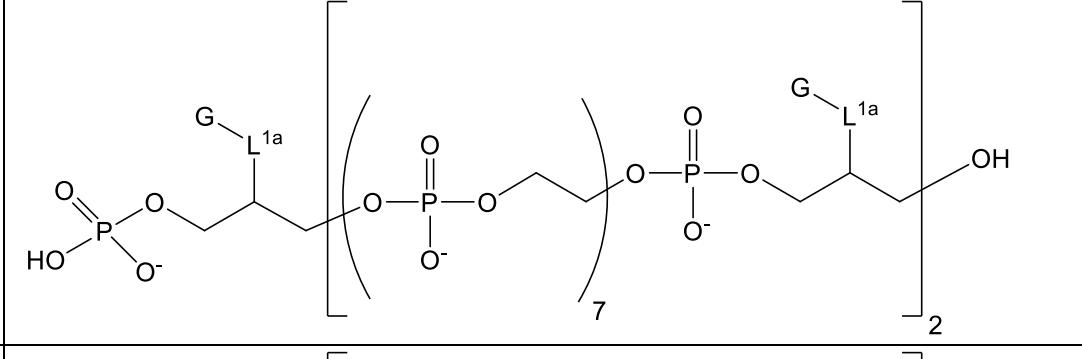
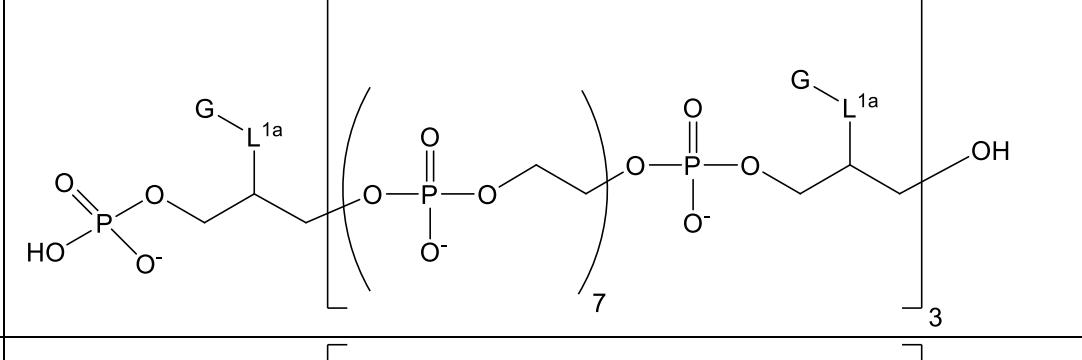
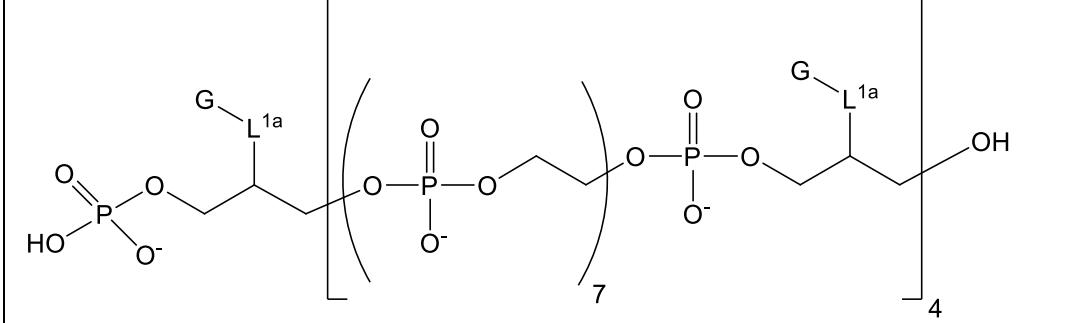
[170] Ainda em diferentes modalidades de compostos de estrutura (II), n é um número inteiro de 1 a 100. Por exemplo, em algumas modalidades, n é um número inteiro de 1 a 10.

[171] Em outras modalidades diferentes, o composto de estrutura (II) é selecionado da Tabela 3:

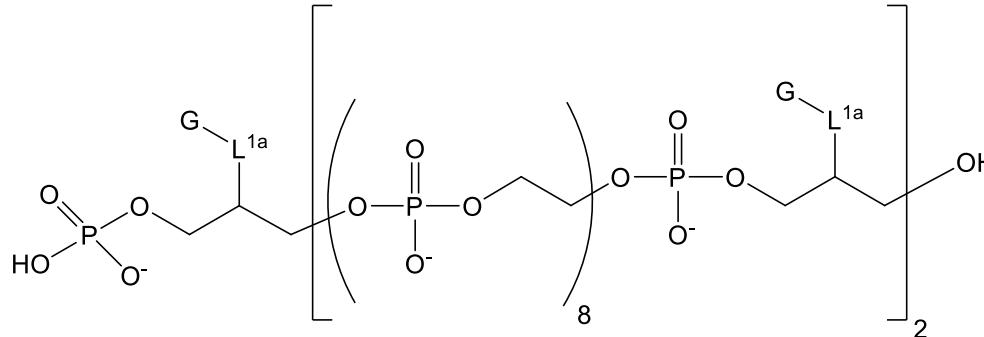
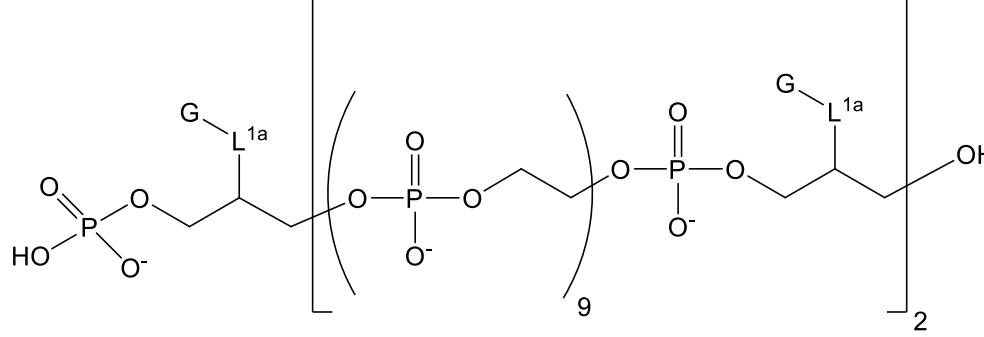
Tabela 3. Exemplos de Compostos de Estrutura (II)

Nome	Estrutura
III-1	
III-2	
III-3	
III-4	
III-5	
III-6	

Nome	Estrutura
III-7	
III-8	
III-9	
III-10	
III-11	
III-12	

Nome	Estrutura
III-13	
III-14	
III-15	
III-16	

Nome	Estrutura
III-17	
III-18	
III-19	
III-20	

Nome	Estrutura
III-21	
III-22	

[172] Os compostos de estrutura (II) podem ser usados em vários métodos, por exemplo em modalidades é fornecido um método para marcar uma molécula de analito, compreendendo o método:

(a) misturar qualquer um dos compostos descritos de estrutura (1), em que R^2 ou R^3 é Q ou um linker que compreende uma ligação covalente a Q, com a molécula de analito;

(b) formar um conjugado do composto e da molécula de analito; e

(c) fazer reagir o conjugado com um composto de fórmula $M-L^{1b}-G'$, formando-se assim pelo menos uma ligação covalente por reação de pelo menos um G e pelo menos um G' , em que:

M é um grupamento que compreende duas ou mais ligações duplas carbono-carbono e pelo menos um grau de conjugação;

L^{1b} é um linker alquíleno, heteroalquíleno ou heteroatômico opcional; e

G' é um grupo reativo complementar a G.

[173] Uma modalidade diferente é um método para marcar uma molécula de analito, compreendendo o método:

(a) misturar qualquer um dos compostos de estrutura (II) aqui divulgados, em que R^2 ou R^3 é Q ou um linker que compreende uma ligação covalente a Q, com um composto de fórmula $M-L^{1b}-G'$, formando-se, desse modo, pelo menos uma ligação covalente por reação de G e G' ; e

(b) fazer reagir o produto da etapa (A) com a molécula de analito, formando-se, assim, um conjugado do produto da etapa (A) e a molécula de analito,

em que:

M é um grupamento que compreende duas ou mais ligações duplas carbono-carbono e pelo menos um grau de conjugação;

L^{1b} é um ligante linker alquíleno, heteroalquíleno ou heteroatômico opcional; e

G' é um grupo reativo complementar a G.

[174] Além disso, como notado acima, os compostos de estrutura (II) são úteis para a preparação de compostos de estrutura (I). Por conseguinte, em uma modalidade é fornecido um método para preparar um composto de estrutura

(I), compreendendo o método misturar um composto de estrutura (II) com um composto de fórmula $M-L^{1b}-G'$, formando-se, desse modo, pelo menos uma ligação covalente por reação de G e G' , em que:

M é um grupamento que compreende duas ou mais ligações duplas carbono-carbono e pelo menos um grau de conjugação;

L^{1b} é um ligante linker alquíleno, heteroalquíleno ou heteroatômico opcional; e

G' é um grupo reativo complementar a G .

Os exemplos a seguir são fornecidos para fins de ilustração, não de limitação.

EXEMPLOS

[175] Métodos Gerais

[176] Os espectros de 1H RMN foram obtidos em um espectrômetro JEOL 400 MHz. Os espectros de 1H foram referenciados contra TMS. A análise por HPLC de fase reversa foi realizada usando-se um Sistema Waters Acquity UHPLC com uma coluna Acquity BEH-C18 de 2,1 mm x 50 mm mantida a 45 °C. Análise de espectro de massas foi realizada em um sistema Waters/Micromass Quattro micro MS/MS (no modo MS somente) usando-se o software de aquisição MassLynx 4.1. A fase móvel usada para LC/MS foi 1,1,1,3,3,3- hexafluoro-2-propanol (HFIP) 100 mM, trietilamina (TEA) 8,6 mM, pH 8. Fosforamiditos e moléculas precursoras foram também analisados usando-se um sistema Waters Acquity UHPLC com uma

coluna Acquity BEH-C18 de 2,1 mm x 50 mm mantida a 45 °C, empregando-se um gradiente de fase móvel de acetonitrila/água. Os pesos moleculares para os intermediários monoméricos foram obtidos usando-se ionização realçada por infusão de cátions tropílio em um sistema micro MS/MS Waters/Micromass Quattro (no modo MS somente). A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi realizada com uma coluna analítica Superdex 200 Increase 5/150 GL. Eluição isocrática com tampão PBS e uma taxa de fluxo de 0,25 mL/min com um tempo total de corrida de 17,5 min. Detecção em 494, 405, 280 e 260 nm. As frações de produtos foram coletadas manualmente, reunidas em corridas sucessivas. Liofilizadas e reconstituídas em 100 µL de água. As medições de absorbância foram conduzidas em um espectrofotômetro Thermo Scientific Nanodrop 2000. As medições de fluorescência foram conduzidas em um Fluorospectrômetro Thermo Scientific Nanodrop 3300.

[177] Todas as reações foram realizadas em material de vidro seco em estufa sob uma atmosfera de nitrogênio, salvo indicação em contrário. Os reagentes para síntese de DNA comercialmente disponíveis foram adquiridos da Glen Research (Sterling, VA). Piridina anidra, tolueno, diclorometano, diisopropiletilamina, trietilamina, ácido acético, piridina e THF foram adquiridos da Aldrich. Todos

os outros produtos químicos foram adquiridos da Aldrich ou da TCI e foram usados sem qualquer purificação adicional.

[178] **Síntese de Fase Sólida**

[179] Todos os compostos de estrutura (I) foram sintetizados em um sintetizador de DNA ABI 394 usando-se protocolos padrão para a abordagem de acoplamento baseada em fosforamidito. O ciclo de montagem da cadeia para a síntese de fosforamidatos de oligonucleotídeos foi o seguinte: (i) destitilação, ácido tricloroacético a 3% em diclorometano, 1 min; (ii) acoplamento, fosforamidito 0,1 M e tetrazol 0,45 M em acetonitrila, 10 min; (iii) proteção ("capping"), 0,5 M anidrido acético em THF/lutidina, 1/1, v/v, 15 s; (iv) oxidação, iodo 0,1 M em THF/piridina/água, 10/10/1, v/v/v, 30 s.

[180] As etapas químicas no ciclo foram seguidas de lavagem com acetonitrila e secagem com argônio seco durante 0,2-0,4 min. A clivagem do suporte e remoção dos grupos protetores de bases e fosforamidatos foi conseguida por tratamento com amônia durante 1 hora à temperatura ambiente. Os compostos foram então analisados por HPLC de fase reversa, tal como descrito acima.

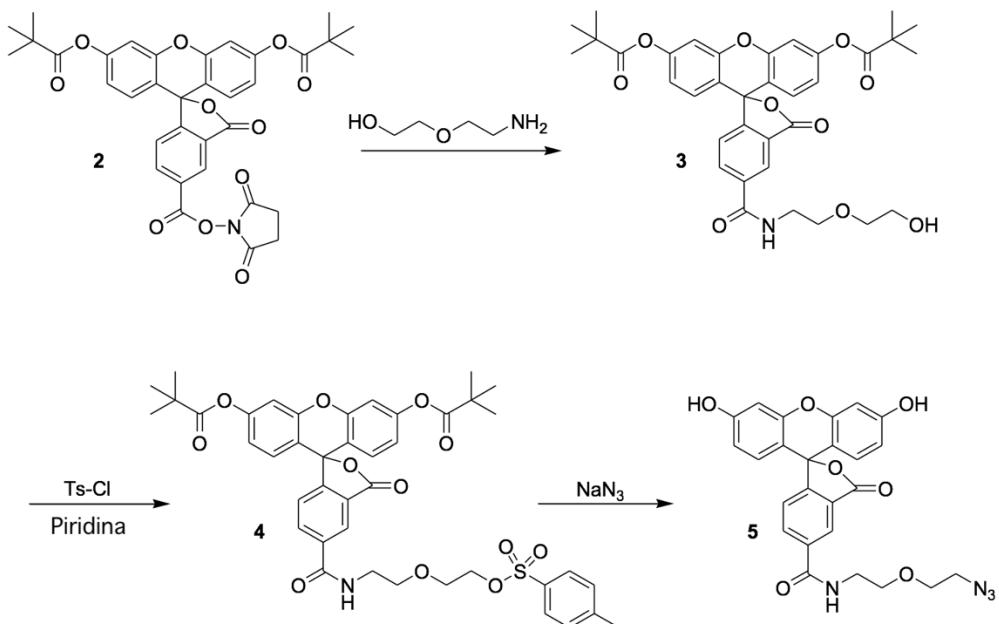
[181] Os compostos foram sintetizados em um sintetizador de DNA/RNA Applied Biosystems 394 ou em um GE AKTÄ 10 OligoPilot em escalas de ou 1 µol ou 10 µol e possuíam

um grupo 3'-fosfato. Os compostos foram sintetizados diretamente sobre esferas de CPG ou em suporte sólido de poliestireno. Os compostos foram sintetizados na direção 3' a 5' por métodos padrão de DNA em fase sólida. Os métodos de acoplamento empregaram condições padrão da química de β -cianoetilfosforamidito padrão. Todos os monômeros de fosforamidito foram dissolvidos em acetonitrila/ diclorometano (soluções a 0,1 M) e foram adicionados em ordem sucessiva usando-se os seguintes ciclos de síntese: 1) remoção do grupo protetor 5'-dimetoxitritila com ácido dicloroacético em tolueno, 2) acoplamento do fosforamidito seguinte com reagente ativador em acetonitrila, 3) oxidação com iodo/piridina/água, e 4) proteção ("capping") com anidrido acético/1-metilimidizol/acetonitrila. Dissolveu-se fosforamidito (100mg) extensível de alcino (composto 9 ou Glen Research 10-1992) em acetonitrila seca (700uL) e diclorometano (300uL). Algumas peneiras foram adicionadas ao frasco, que foi coberto com argônio. O sequenciador foi utilizado como descrito acima. O ciclo de síntese foi repetido até que o 5' Oligofluorosídeo estivesse montado. No final da montagem da cadeia, o grupo monometoxitritil (MMT) ou a grupo dimetoxitritila (DMT) foi removido com ácido dicloroacético em diclorometano ou ácido dicloroacético em tolueno. Os compostos foram clivados do suporte sólido usando-se hidróxido de amônio aquoso concentrado à

temperatura ambiente durante 2-4 horas. O produto foi concentrado a vácuo e colunas Sephadex G-25 foram usadas para isolar o produto principal. A análise foi feita com um método de RP-HPLC acoplado a um espectrômetro de massas para determinação do peso molecular.

EXEMPLO 1

[182] PREPARAÇÃO DE UM COMPOSTO AZIDA DE FLUORESCEÍNA (FAM)



[183] Em um balão de fundo redondo de 250 mL com barra de agitação magnética e funil de adição, foi colocado o éster 2 de FAM-NHS (2,24 g). Adicionou-se diclorometano (35 mL) ao balão, iniciou-se a agitação, colocou-se o balão sob nitrogênio e procedeu-se ao seu resfriamento em gelo. Em um bêquer separado, 2-(2-aminoetóxi)etanol (420 µL) foi dissolvido em diclorometano (35 mL), metanol (7 mL) e trietilamina (1,5 mL) e a solução resultante foi carregada

no funil de adição. A solução de amina foi adicionada gota a gota ao éster de NHS durante 30 minutos. A solução final foi agitada durante 1h a 0 °C, o balão foi removido do banho de gelo e agitado à temperatura ambiente durante 2 h. A mistura reacional foi concentrada e o produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel. As frações de produto foram examinadas por TLC e LC/MS e reunidas para darem um rendimento de 1,6 g (72%).

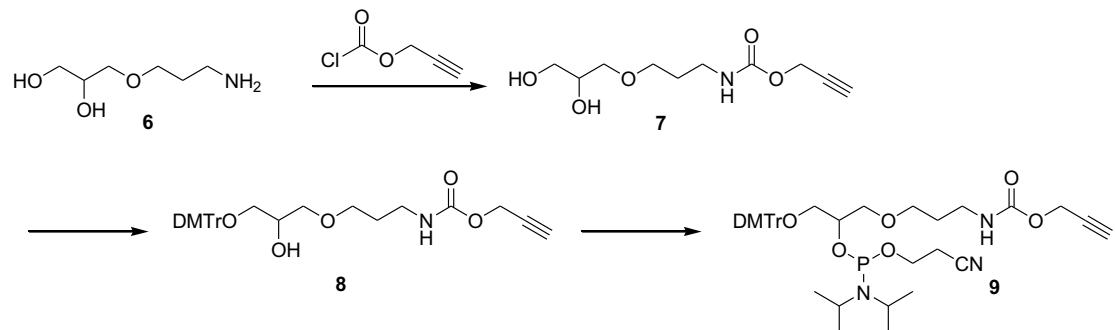
[184] Em um balão de fundo redondo de 250 mL com barra de agitação magnética, foram colocados o álcool FAM 3 (1,5 g) e o clorofórmio (25 mL). A esta solução, adicionaram-se piridina (470 µL) e cloreto de p-toluenossulfonila (691 mg). A mistura foi agitada durante 24 h, após o que a TLC indicou que a reação estava incompleta, foram adicionados cloreto de p-toluenossulfonila (1,4 g) e piridina (1,5 mL) adicionais e a mistura foi agitada durante mais 24 h. A TLC da reação após 48 h indicou que a reação estava completa. A mistura foi vertida sobre bicarbonato de sódio saturado (200 mL) e diclorometano (100 mL) em um funil de extração e particionada. A camada orgânica foi retida e a camada aquosa foi extraída com diclorometano (100 mL) mais duas vezes. As camadas orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio, filtradas e concentradas. O produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel. As frações

do produto foram identificadas por TLC e reunidas, dando o rendimento do tosilato 4 (1,8 g) desejado.

[185] Em um balão de fundo redondo de 200 mL com agitador magnético foi colocado o tosilato 4-FAM (1,8 g) e adicionou-se DMF (15 mL); a mistura foi agitada para se proceder à dissolução. A isto, adicionou-se azida sódica (830 mg) e a mistura foi aquecida a 50 °C e agitada durante a noite. A mistura foi vertida sobre ácido cítrico 100 mM (150 mL) e acetato de etila (150 mL) em um funil de extração. As camadas foram particionadas e a camada orgânica, retida. A camada aquosa foi extraída com acetato de etila mais duas vezes. As camadas orgânicas foram combinadas e secas sobre sulfato de sódio. A solução foi filtrada e concentrada por roto-evaporação. O óleo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel, as frações de produto foram identificadas por TLC e reunidas. O produto foi concentrado sob vácuo, rendendo a desejada FAM-azida 5 na forma de um sólido laranja (0,82 g). LCMS foi consistente com o produto desejado.

EXEMPLO 2

[186] SÍNTESE DE FOSFORAMIDITO ALCINO



[187] Em um balão de fundo redondo de 500 mL equipado com um funil de adição e agitador magnético, foi colocado cloroformato de propargila (1,3 mL) em diclorometano (75 mL). O frasco foi purgado com nitrogênio. Em um bêquer separado, foi colocado aminoálcool 6 (2,0 g) em diclorometano (60 mL), metanol (10 mL) e trietilamina (1,4 mL). O funil de adição foi carregado com a solução de aminoálcool que foi adicionada gota a gota durante 30 minutos. O balão foi agitado durante 2 horas, após o que a TLC indicou que a reação estava completa. A reação foi concentrada no roto-evaporador e posteriormente seca sob alto vácuo e usada diretamente na etapa seguinte.

[188] Em um balão de fundo redondo de 500 mL com agitador magnético foi colocado carbamato 7 (~ 3,1 g). Adicionou-se piridina ao frasco (270 mL) e iniciou-se a agitação. Uma vez que o carbamato tivesse sido dissolvido, a solução foi colocada sobre gelo e agitada durante 15 min sob nitrogênio. Cloreto de dimetoxitritila (5,9 g) foi

adicionado ao balão por um funil para pó em uma única porção. O frasco foi repurgado com nitrogênio e agitado a 0 °C durante 1 h. O balão foi removido do gelo e agitado à temperatura ambiente durante a noite. Adicionou-se metanol (10 mL) e a mistura foi agitada durante 10 min. A mistura foi concentrada no roto-evaporador e purificada por cromatografia em sílica gel. As frações do produto foram determinadas por TLC, reunidas e concentradas até um óleo final rendendo o diol 8 mono-protectido (3,3 g).

[189] Em um balão de fundo redondo de 100 mL com barra de agitação magnética, foram colocados o álcool FAM 8 (500mg) e o clorofórmio (5 mL). A mistura foi agitada até que o material de partida tivesse sido dissolvido. Diisopropiletilamina (600 mg) e 2-cianoetil-N,N-diisopropilclorofosforamidito (440 mg) foram adicionados gota a gota, simultaneamente em seringas separadas. A mistura foi agitada durante 1 hora, após o que a TLC indicou que a reação estava completa. O material foi vertido em solução de bicarbonato de sódio e extraído com diclorometano. A camada orgânica foi seca com sulfato de sódio, filtrada e concentrada até um óleo. A purificação adicional foi realizada por cromatografia em sílica gel, Diclorometano com 5% de trietilamina. As frações do produto foram identificadas por TLC, reunidas e concentradas. O produto final foi isolado como um óleo claro (670 mg).

EXEMPLO 3

[190] PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CORANTES OLIGOMÉRICOS

[191] Os oligômeros 3-, 5- e 10-méricos de polialcino foram preparados a partir da fosforamidito do Exemplo 2. Um corante 3-mérico representativo foi preparado como se segue:

[192] Em um tubo de microcentrífuga de 500 μ L foi colocada uma solução de tampão fosfato (31,5 μ L, 150 mM, pH = 7,4). A isto, foi adicionada uma solução de cumarina azida (22,5 μ L, 10mM em DMSO) e uma solução do polialcino (7,5 μ L, 1mM em água). Em um tubo separado de microcentrífuga de 200 μ L foram colocadas uma solução de sulfato de cobre (3,0 μ L, 50mM), uma solução de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA, 3.0 μ L, 100mM) e uma solução de ascorbato de sódio (7,5 μ L, 100mM). A solução de cobre foi misturada e todo o conteúdo foi adicionado ao tubo de cumarina azida/polialcino. A reação foi misturada e incubada durante a noite à temperatura ambiente. A mistura foi diluída com água (75 μ L) e purificada por cromatografia de exclusão de tamanho (Superdex 200 Increase 5/150 GL, eluição isocrática com PBS, 0,25 mL/min, detecção a 405 nM e 260 nM).

[193] Os corantes 3-, 5- e 10-méricos, quer com um grupamento cumarina, quer com um grupamento fluoresceína, foram preparados de uma maneira análoga.

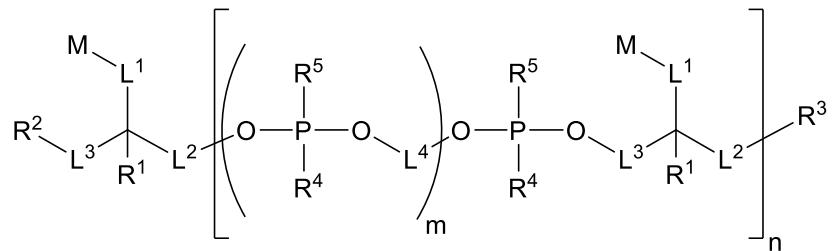
[194] Os espectros de fluorescência de compostos contendo cumarina e fluoresceína foram determinados e são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Os dados mostram um aumento na fluorescência com um número crescente de sítios reativos de alcino, indicando que a azida se acopla ao alcino para formar um composto de estrutura (I).

[195] Todas as patentes dos EUA, publicações de pedidos de patentes dos EUA, pedidos de patentes dos EUA, patentes estrangeiras, pedidos de patentes estrangeiras e publicações não patenteadas referidas nesta especificação são aqui incorporadas por referência, na sua totalidade, até ao ponto não inconsistente com a presente descrição.

[196] Do que antecede, entender-se-á que, embora tenham sido aqui descritas modalidades específicas da invenção para fins de ilustração, podem ser feitas várias modificações sem se desviar do espírito e escopo da invenção. Por conseguinte, a invenção não está limitada, exceto conforme as reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto com a seguinte estrutura (I):



(I)

ou um estereoisômero, sal ou tautômero do mesmo, **caracterizado** pelo fato de que

M é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento fluorescente ou colorido que compreende duas ou mais ligações duplas carbono-carbono e pelo menos um grau de conjugação;

L¹ é, em cada ocorrência, independentemente, um ligante que compreende um grupo funcional capaz de se formar pela reação de dois grupos reativos complementares;

L² and L³ são, em cada ocorrência, independentemente, ausentes, um ligante alquíleno, alquenileno, alquinileno, heteroalquíleno, heteroalquenileno, heteroalquinileno ou heteroatômico;

L⁴ é, em cada ocorrência, independentemente, um ligante alquíleno, alquenileno, alquinileno, heteroalquíleno compreendendo pelo menos uma ligação carbono-heteroátomo-carbono, heteroalquenileno ou heteroalquinileno;

R^1 é, em cada ocorrência, independentemente, H, alquila ou alcóxi;

R^2 e R^3 são cada um, independentemente, H, OH, SH, alquila, alcóxi, éter alquílico, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, um ligante que compreende uma ligação covalente a Q, um ligante que compreende uma ligação covalente a uma molécula de analito, um ligante que compreende uma ligação covalente a um suporte sólido ou um ligante que compreende uma ligação covalente a um outro composto de estrutura (I), em que R_a é O ou S; R_b é OH, SH, O^- , S^- , OR_d ou SR_d ; R_c é OH, SH, O^- , S^- , OR_d , SR_d , alquila, alcóxi, éter alquílico, éter alcóxi-alquílico, fosfato, tiofosfato, fosfoalquila, tiofosfoalquila, éter de fosfoalquila ou éter de tiofosfoalquila; e R_d é um contra-íon;

R^4 é, em cada ocorrência, independentemente, OH, SH, O^- , S^- , OR_d ou SR_d ;

R^5 é, em cada ocorrência, independentemente, oxo, tioxo ou está ausente;

Q é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito, um suporte sólido ou um grupo reativo complementar Q';

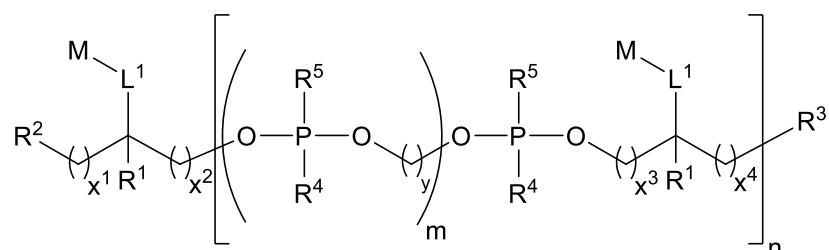
m é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro igual a zero ou maior e pelo menos uma ocorrência de m é um número inteiro igual ou maior que 2; e

n é um número inteiro igual a um ou maior.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, para pelo menos uma ocorrência de L¹, o grupo funcional pode ser formado por reação de um grupo funcional aldeído, oxima, hidrazona, alcino, amina, azida, acilazida, haleto de acila, nitrila, nitrona, sulfidrila, dissulfeto, haleto de sulfonila, isotiocianato, imidoéster, éster ativado, cetona, carbonila α, β -insaturada, alceno, maleimida, α -haloimida, epóxido, aziridina, tetrazina, tetrazol, fosfina, biotina ou tiirano com um grupo reativo complementar.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, para pelo menos uma ocorrência de L¹, o grupo funcional compreende um grupo alceno, éster, amida, tioéster, dissulfeto, carbocíclico, heterocíclico ou heteroarila.

4. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o composto tem a seguinte estrutura (IC):

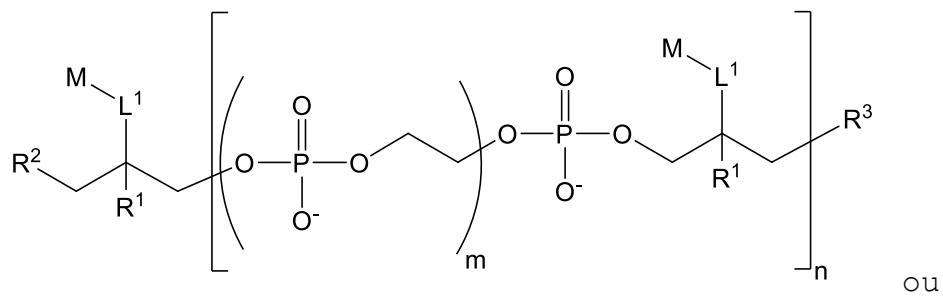


(IC)

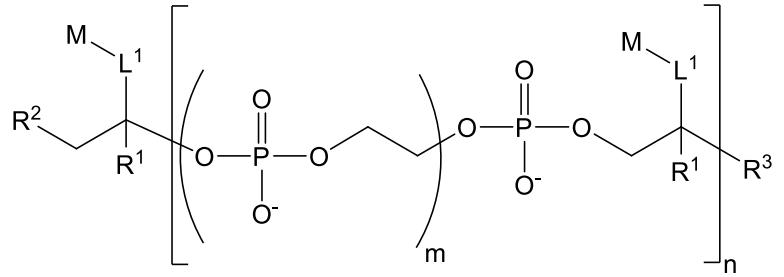
em que

x^1 , x^2 , x^3 e x^4 são, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 0 a 6; e y é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 1 a 6.

5. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o composto tem uma das seguintes estruturas (ID) ou (IE):



(ID)



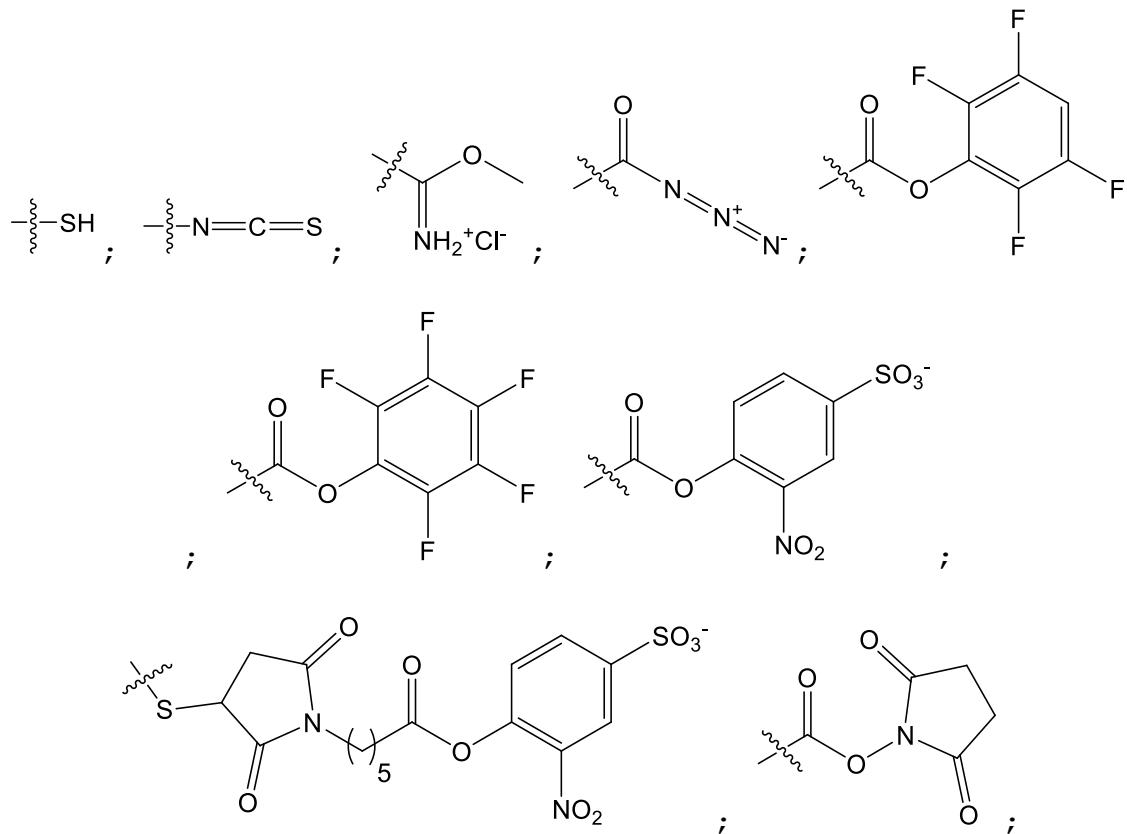
(IE)

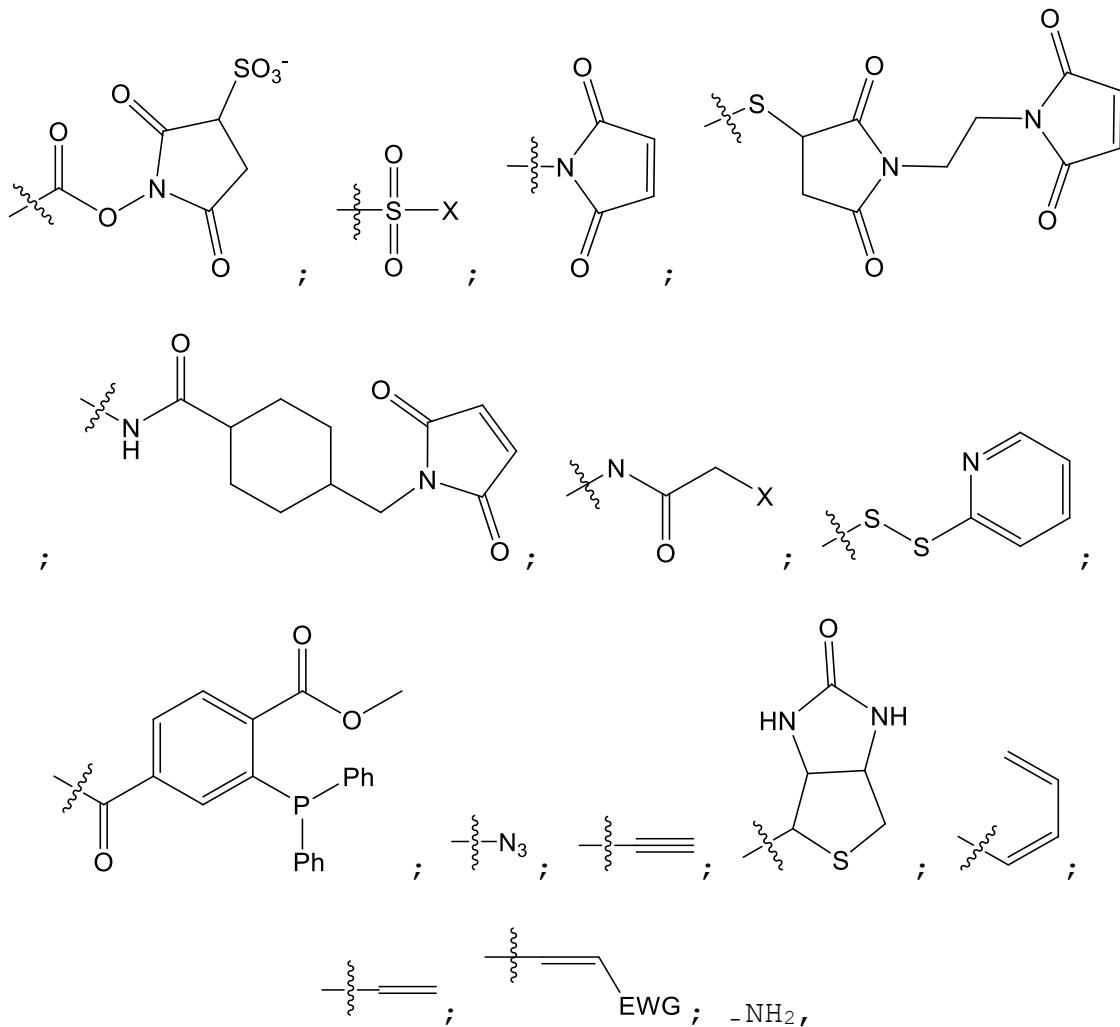
6. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que R^2 e R^3 são cada um, independentemente, OH ou $-OP(=R_a)(R_b)R_c$.

7. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que R^2 ou R^3 é OH ou $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, e o outro de R^2 ou R^3 é Q ou um ligante que compreende uma ligação covalente a Q.

8. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que Q compreende um grupo funcional sulfidrila, dissulfeto, éster ativado, isotiocianato, azida, alcino, alceno, dieno, dienófilo, haleto de ácido, haleto de sulfonila, fosfina, α -haloamida, biotina, amino ou maleimida.

9. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, 7 ou 8, **caracterizado** pelo fato de que Q é um grupamento tendo uma das seguintes estruturas:





em que:

X é halo; e

EWG é um grupo de retirada de elétrons.

10. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que um de R² ou R³ é OH ou OP(=R_a)(R_b)R_c, e o outro de R² ou R³ é um ligante que compreende uma ligação covalente a uma molécula de analito ou um ligante que compreende uma ligação covalente a um suporte sólido.

11. Composto, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de analito é uma enzima, receptor, ligante de receptor, anticorpo, glicoproteína, aptâmero ou prôn.

12. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que m é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 3 a 10.

13. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que m é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 7 a 9.

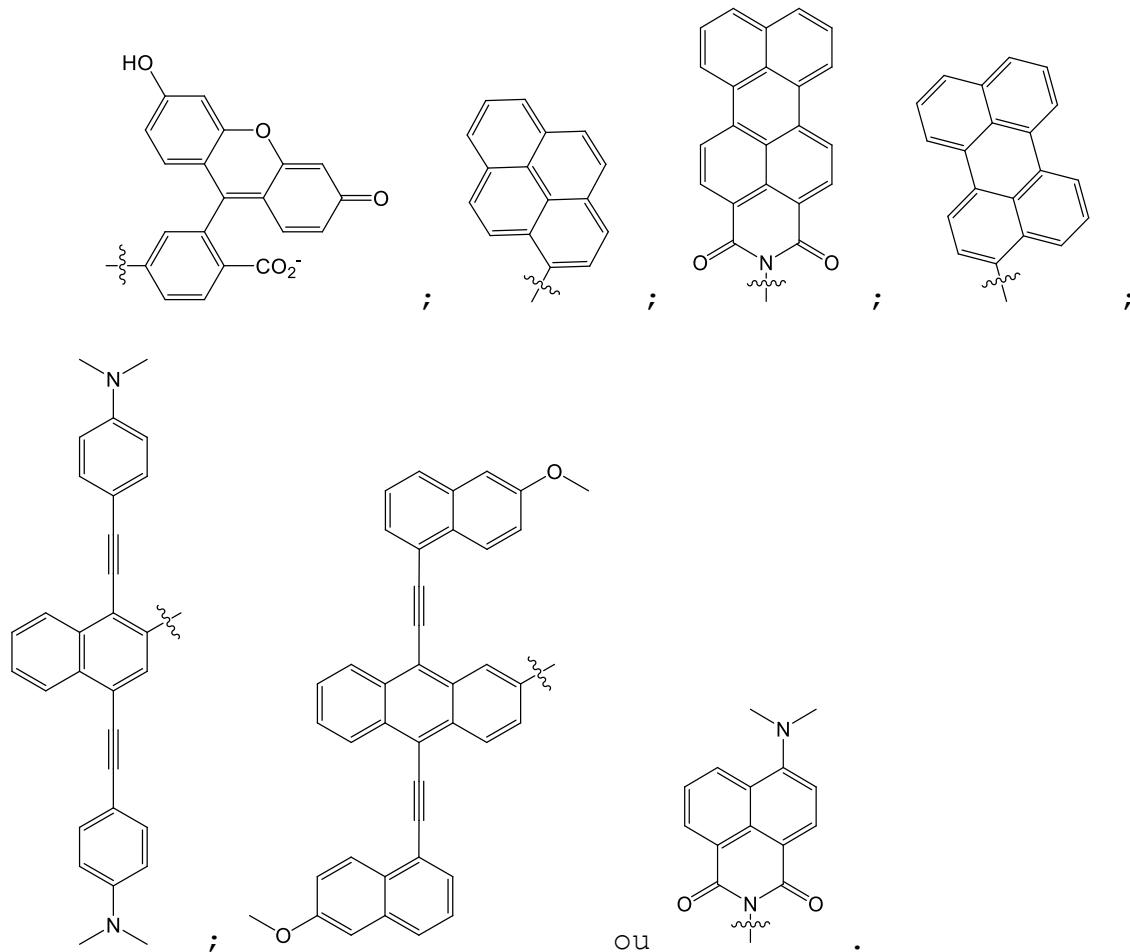
14. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** pelo fato de que M é, em cada ocorrência, independentemente, fluorescente ou colorido.

15. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pelo fato de que M é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento dimetilaminostilbeno, quinacridona, fluorofenil-dimetil-BODIPY, his-fluorofenil-BODIPY, acridina, terrileno, sexifenila, porfirina, benzopireno, (fluorofenil-dimetil-difluorobora-diaza-indaceno)fenila, (bis-fluorofenil-difluorobora-diaza-indaceno)fenila, quaterfenila, bi-benzotiazol, ter-benzotiazol, bi-naftila, bi-antracila,

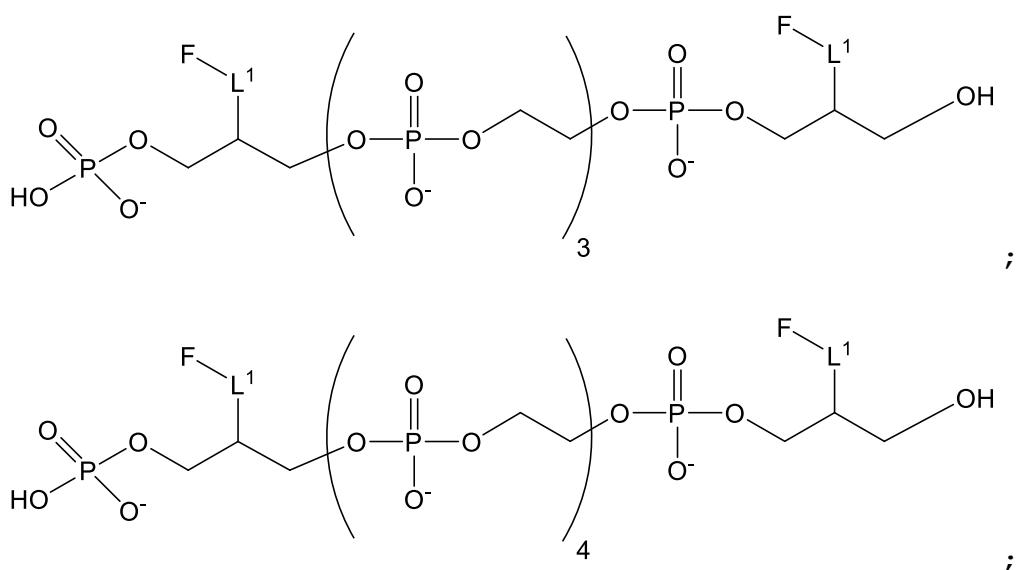
esquaraina, esquarílio, 9,10-etinilantraceno, ter-naftila, p-terfenil, perileno, azobenzeno, fenazina, fenantrolina, acridina, tioxantireno, criseno, rubreno, coroneno, cianina, imida de perileno ou perileno amida, corante de cumarina, corante de resorufina, corante de difluoreto de dipirrometileno-boro, corante de difluoreto de dipirrometileno-boro, corante bipiridílico de rutênio, corante de transferência de energia, corante laranja tiazol, corante de polimetina ou de N-aryl-1,8-naftalimida.

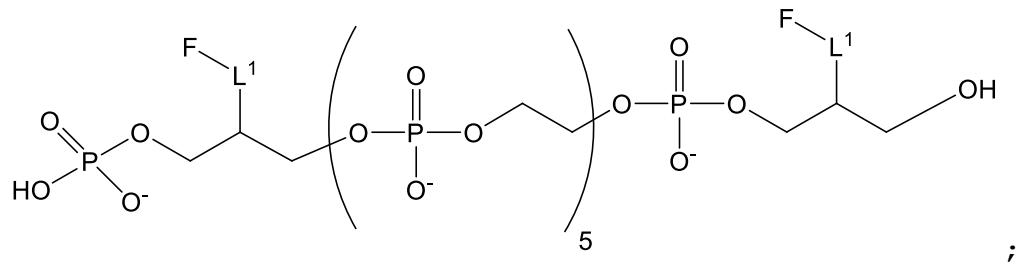
16. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pelo fato de que M é, em cada ocorrência, independentemente, pireno, perileno, perileno monoimida ou 6-FAM ou derivados seus.

17. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pelo fato de que M, em cada ocorrência, independentemente, tem uma das seguintes estruturas:

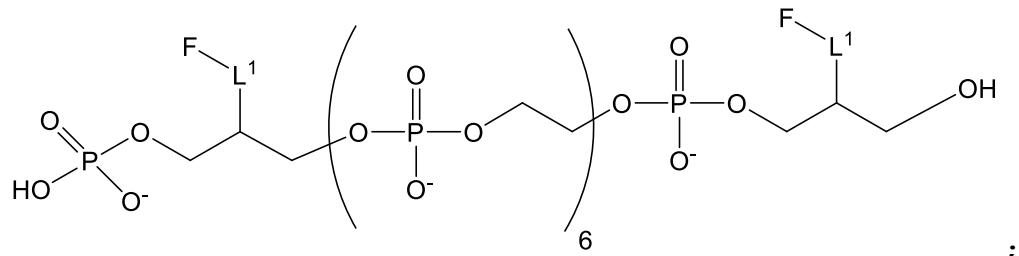


18. Composto **caracterizado** pelo fato de que tem uma das seguintes estruturas:

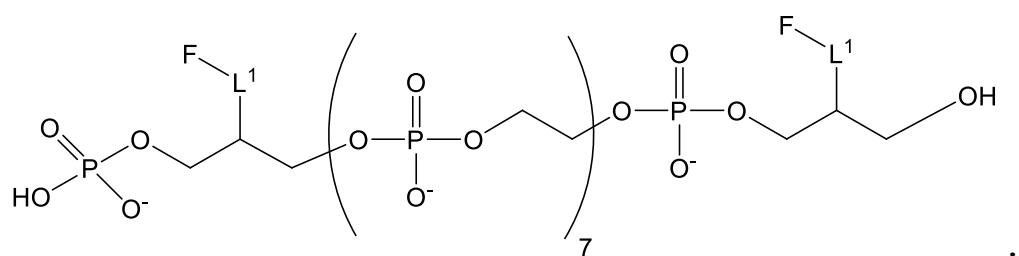




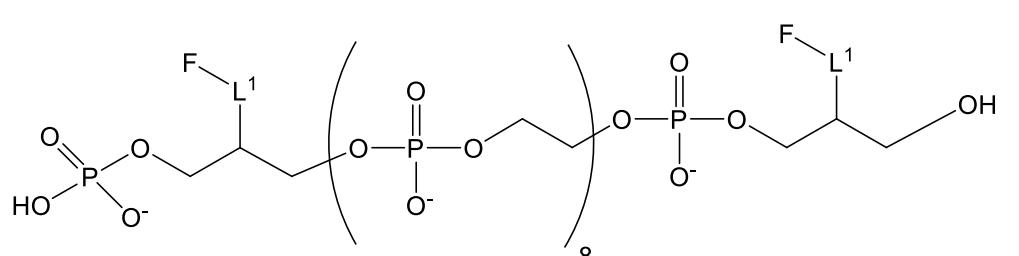
;



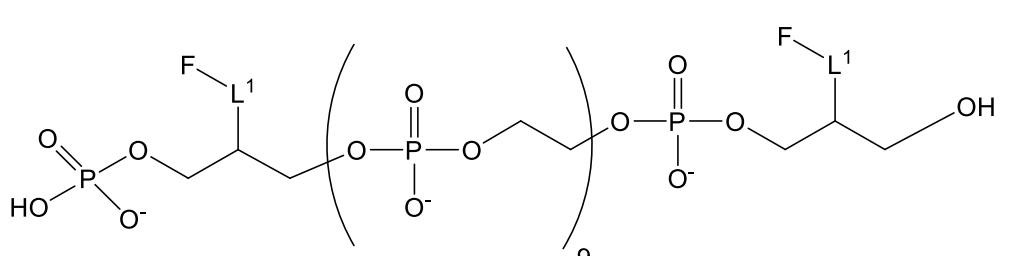
;



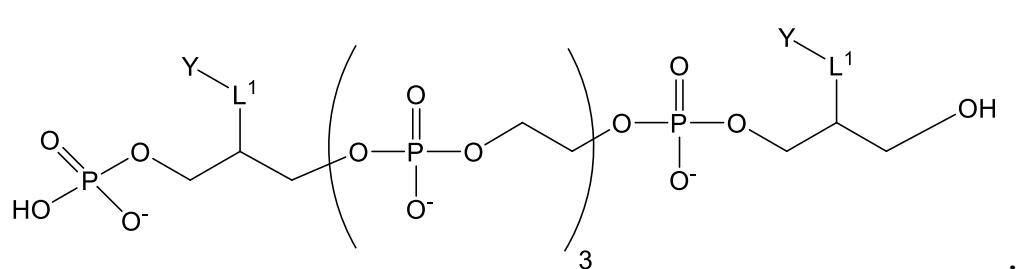
;



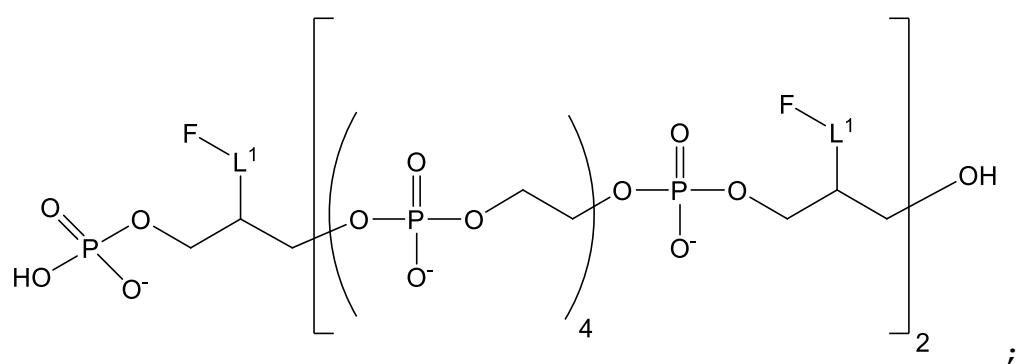
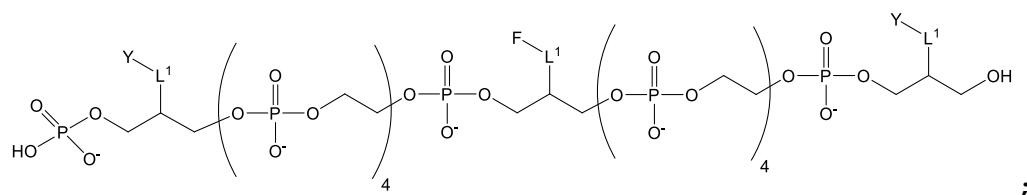
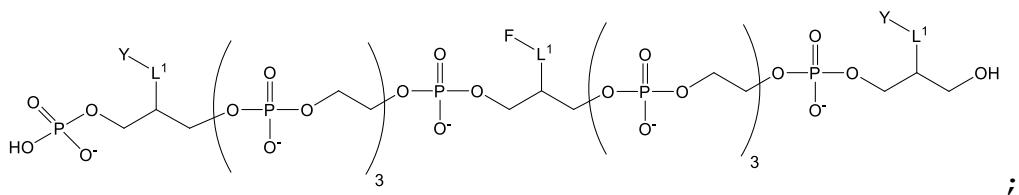
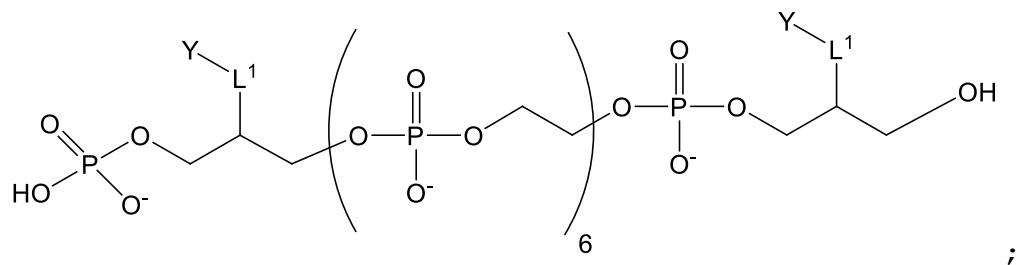
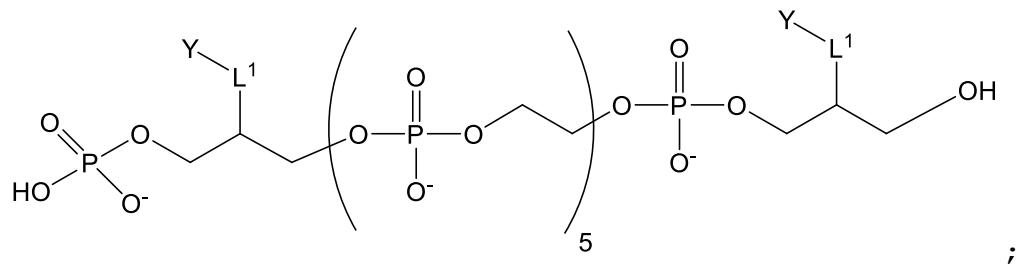
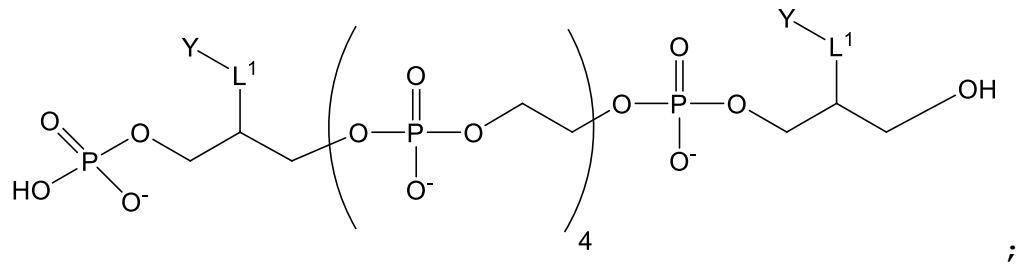
;

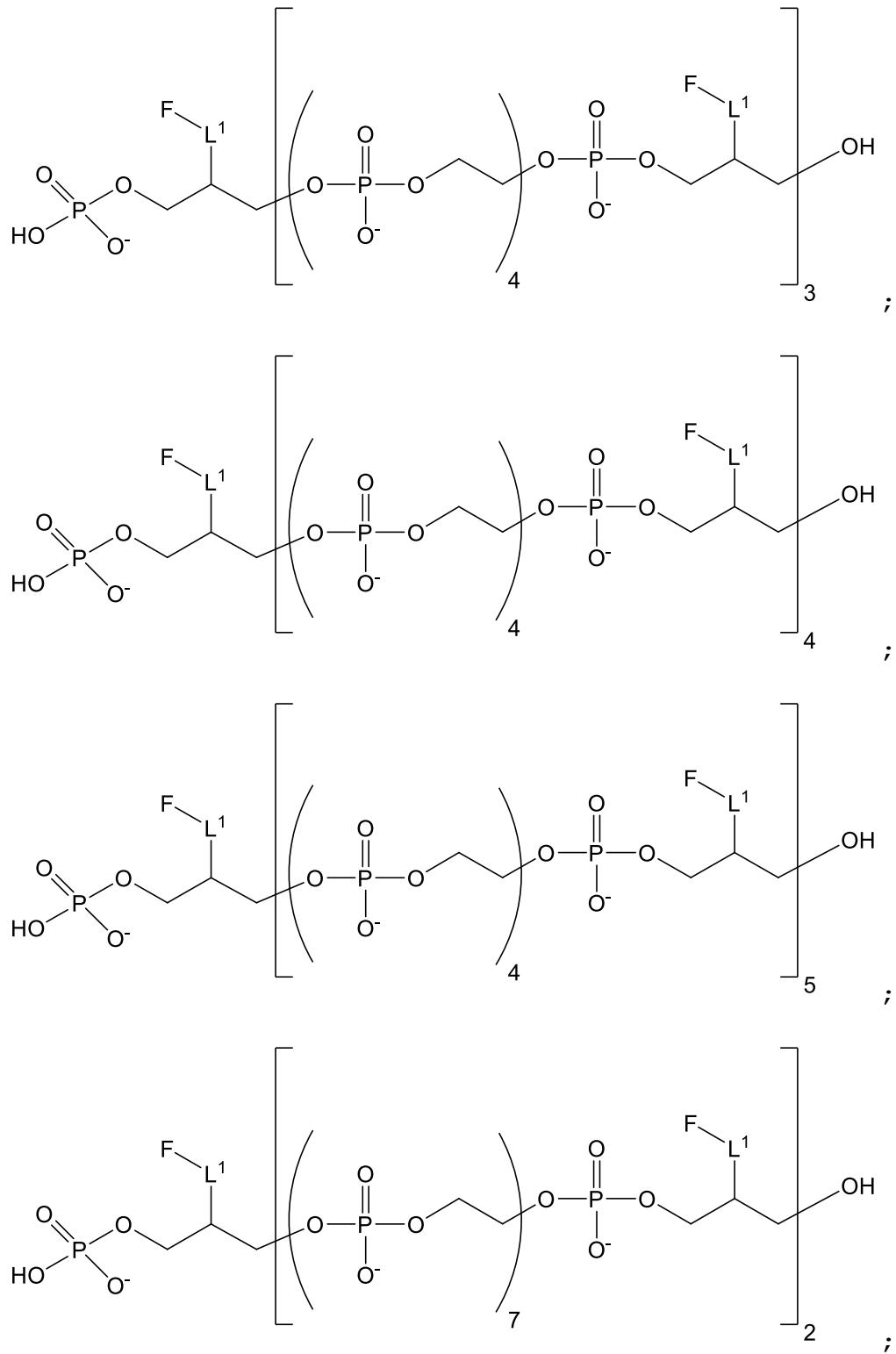


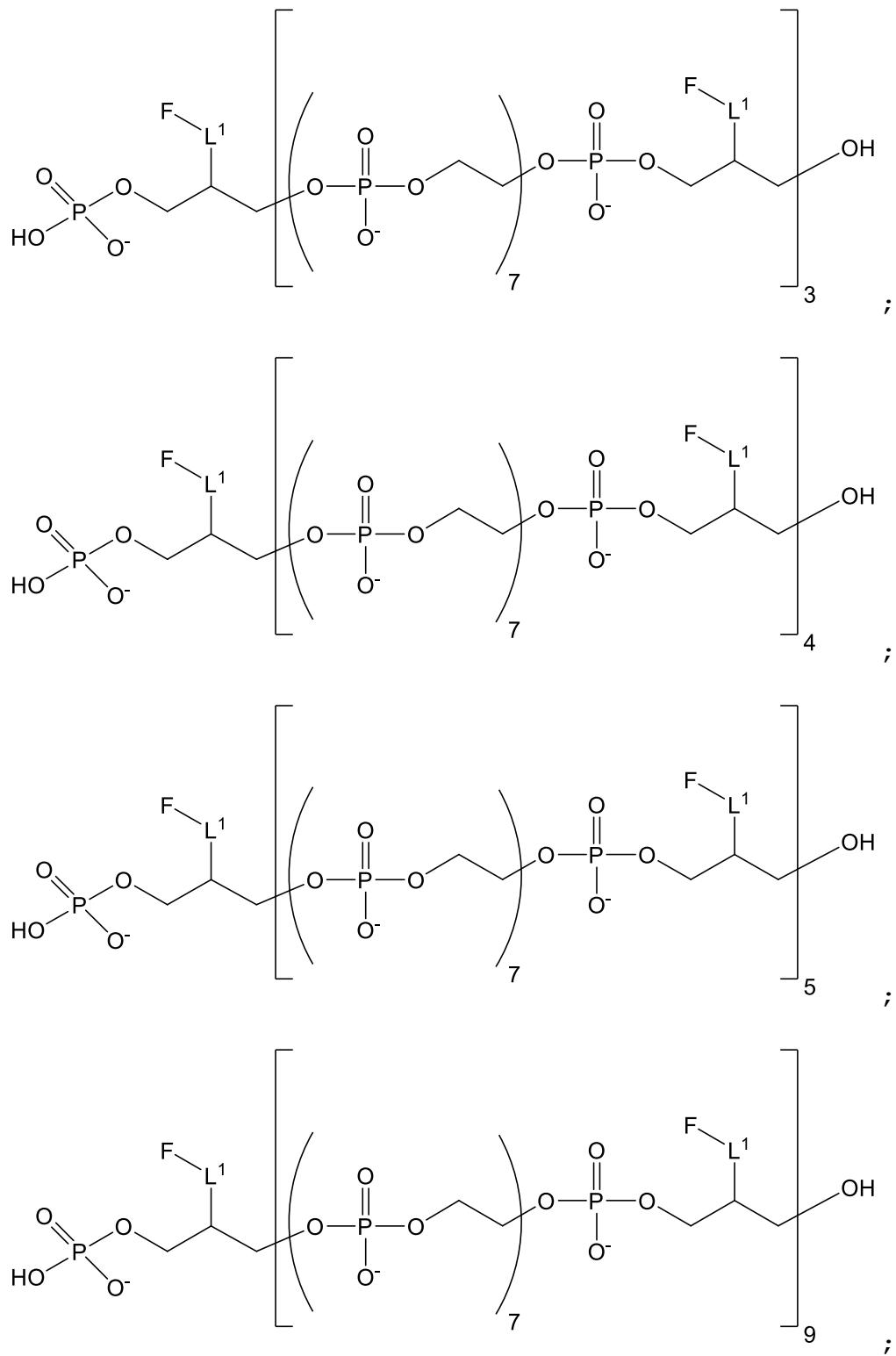
;

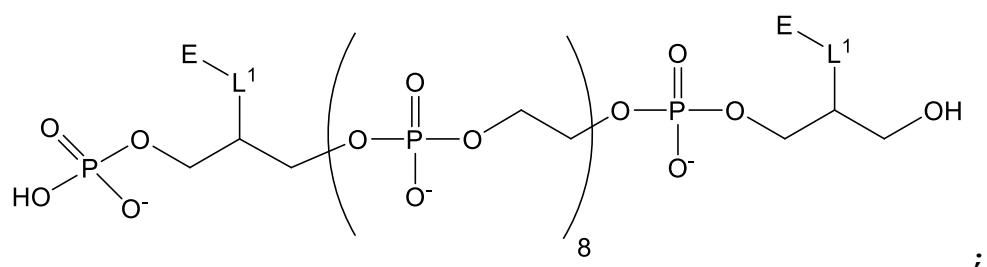
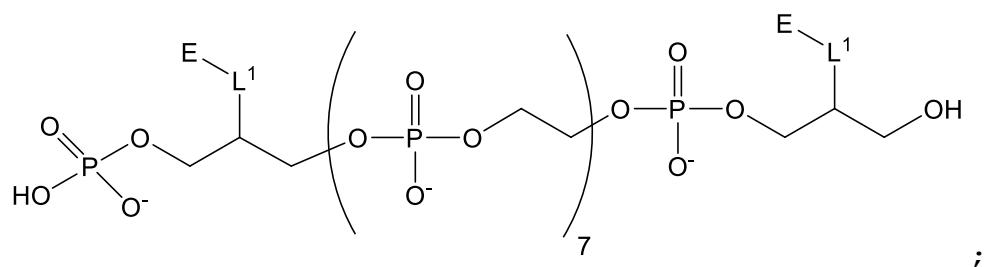
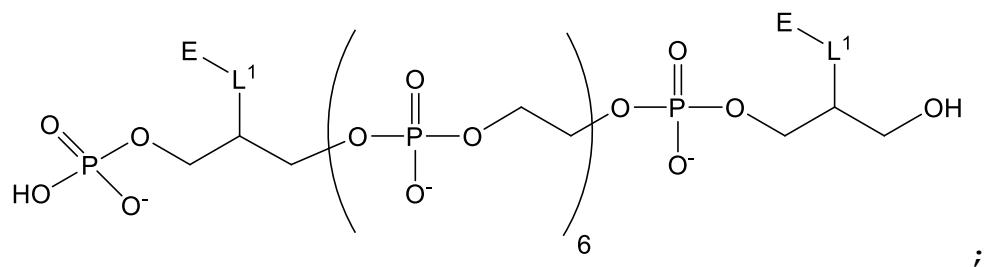
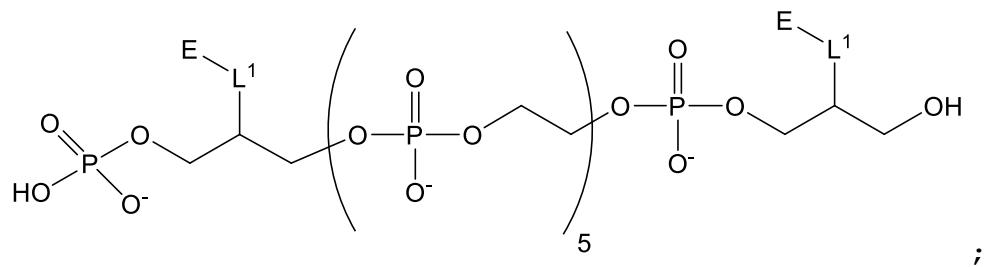
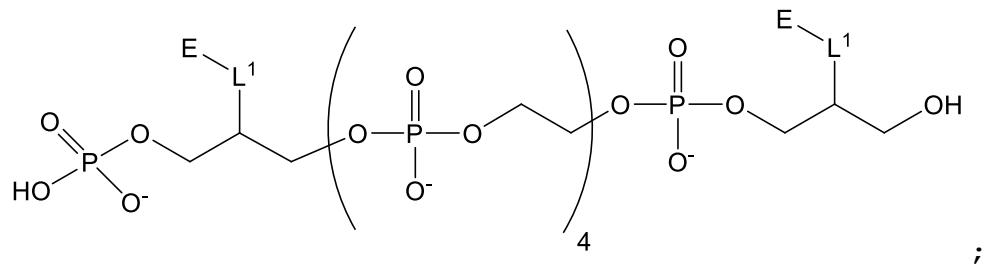
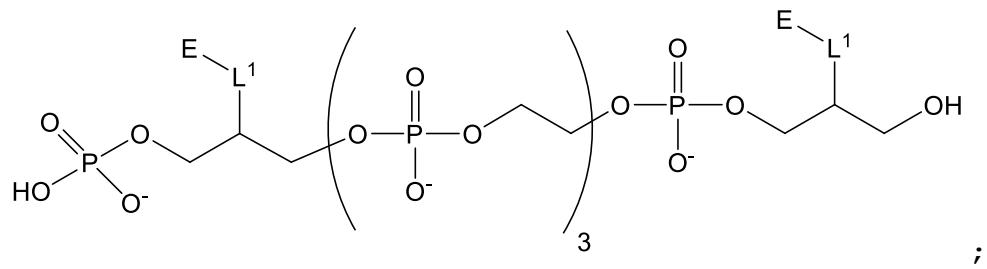


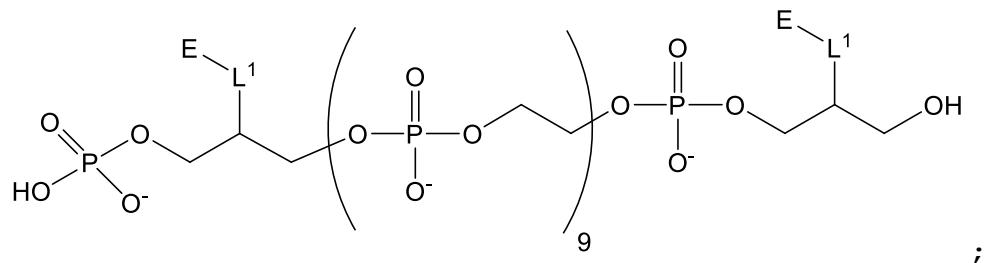
;



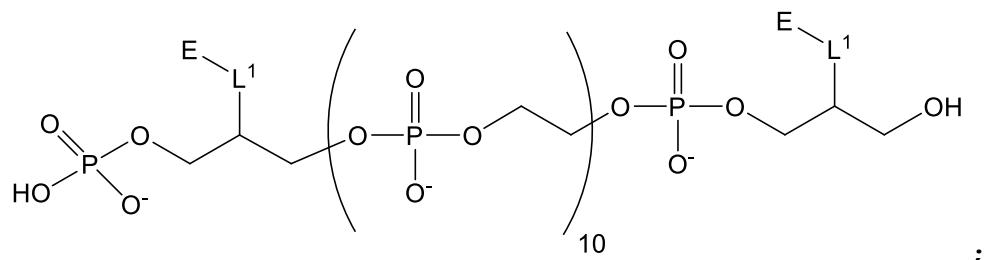




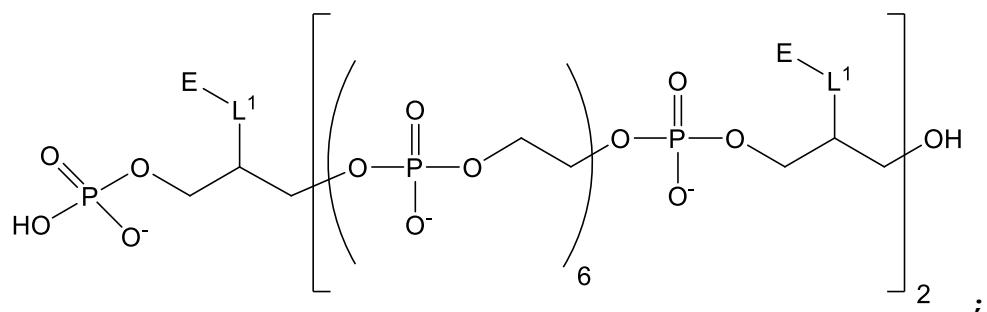




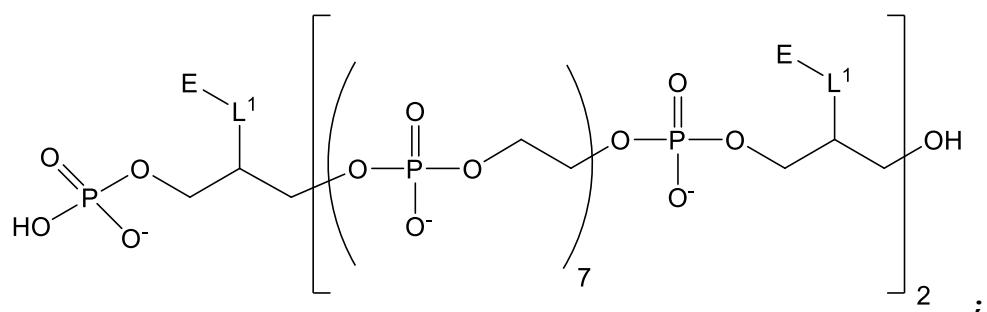
ii



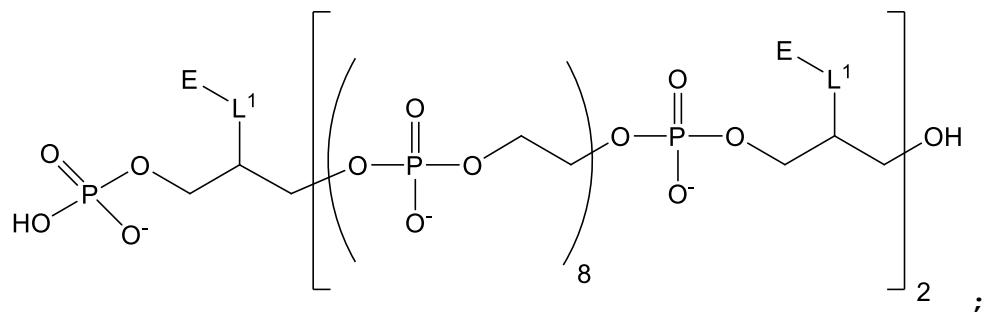
5



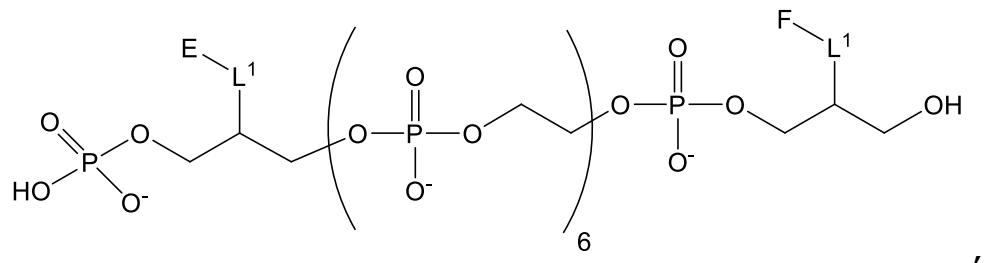
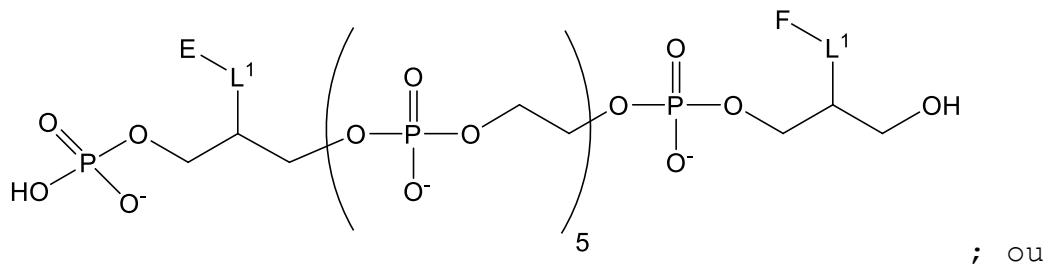
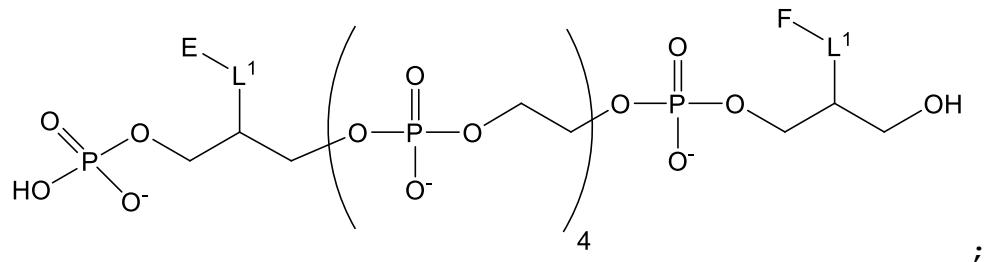
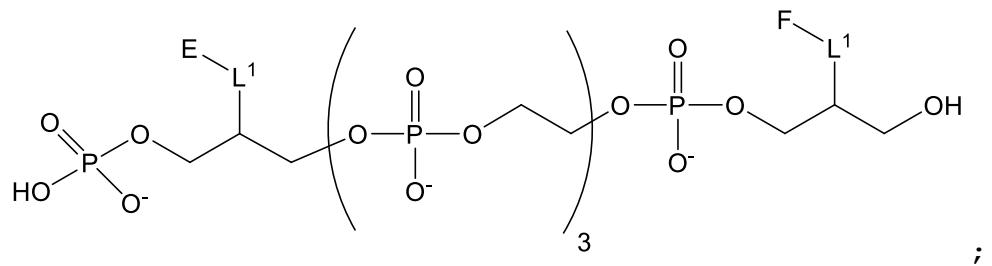
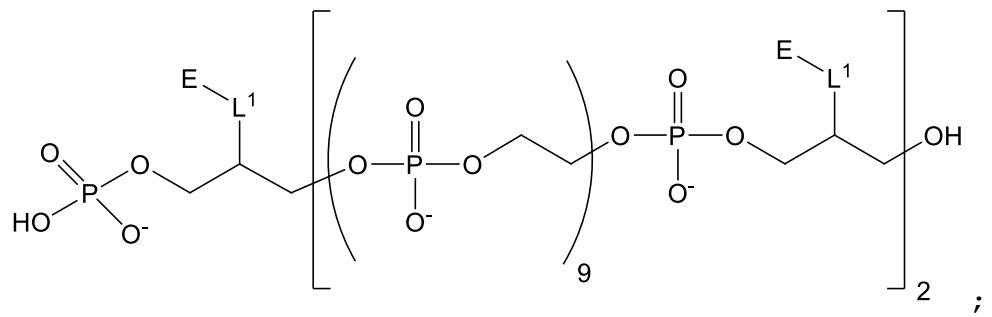
ii



ii

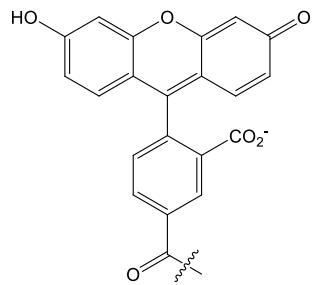


1

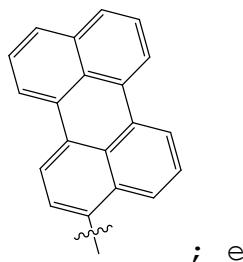


em que:

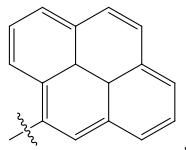
F tem a seguinte estrutura:



E tem a seguinte estrutura:



Y tem a seguinte estrutura:



19. Método de coloração de uma amostra **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionar à dita amostra o composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 18 em uma quantidade suficiente para produzir uma resposta óptica quando a dita amostra é iluminada a um comprimento de onda apropriado.

20. Método para detectar visualmente uma molécula de analito, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- (a) fornecer o composto conforme definido na reivindicação 1, em que R^2 ou R^3 é um ligante que compreende uma ligação covalente à molécula de analito; e
- (b) detectar o composto por suas propriedades visíveis.

21. Método para detectar visualmente uma molécula de analito, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) misturar o composto conforme definido na reivindicação 1, em que R^2 ou R^3 é Q ou um ligante que compreende uma ligação covalente a Q, com a molécula de analito;

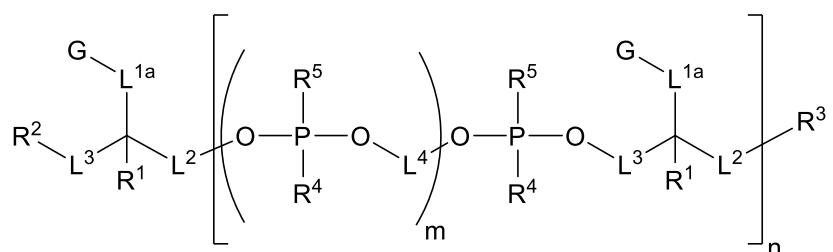
(b) formar um conjugado do composto e da molécula de analito; e

(c) detectar o conjugado por suas propriedades visíveis.

22. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende o composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 18, e uma ou mais moléculas de analito.

23. Uso da composição, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, **caracterizado** pelo fato de que é em um método analítico para detecção da uma ou mais moléculas.

24. Composto **caracterizado** pelo fato de que tem a seguinte estrutura (II):



(II)

ou um estereoisômero, sal ou tautômero seus, em que

G é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com um grupo reativo complementar;

L^{1a}, L² e L³ são, em cada ocorrência, independentemente, ausente, um ligante opcional alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, heteroalqueníleno compreendendo pelo menos uma ligação carbono-heteroátomo-carbono, heteroalquiníleno ou heteroatômico;

L⁴ é, em cada ocorrência, independentemente, um ligante alquíleno, alqueníleno, alquiníleno, heteroalquíleno, heteroalqueníleno ou heteroalquiníleno;

R¹ é, em cada ocorrência, independentemente, H, alquila ou alcóxi;

R² e R³ são cada um, independentemente, H, OH, SH, alquila, alcóxi, éter de alquila, -OP(=R_a)(R_b)R_c, Q, um ligante que compreende uma ligação covalente a Q, um ligante que compreende uma ligação covalente a uma molécula de analito, um ligante que compreende uma ligação covalente a um suporte sólido ou um ligante que compreende uma ligação covalente a um outro composto de estrutura (II), em que R_a é O ou S; R_b é OH, SH, O⁻, S⁻, OR_d ou SR_d; R_c é OH, SH, O⁻, S⁻, OR_d, SR_d, alquila, alcóxi, éter alquílico, éter alcóxi-alquílico, fosfato, tiofosfato, fosfoalquila, tiofosfoalquila, éter fosfoalquílico ou éter tiofosfoalquílico; e R_d é um contra-íon;

R^4 é, em cada ocorrência, independentemente, OH, SH, O⁻, S⁻, OR_d ou SR_d;

R^5 é, em cada ocorrência, independentemente, oxo, tioxo ou está ausente;

Q é, em cada ocorrência, independentemente, um grupamento que compreende um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito, um suporte sólido ou um grupo reativo complementar Q' ;

m é, em cada ocorrência, independentemente um inteiro igual a zero ou maior, desde que pelo menos uma ocorrência de m seja um número inteiro igual a dois ou maior; e

n é um número inteiro igual a um ou maior.

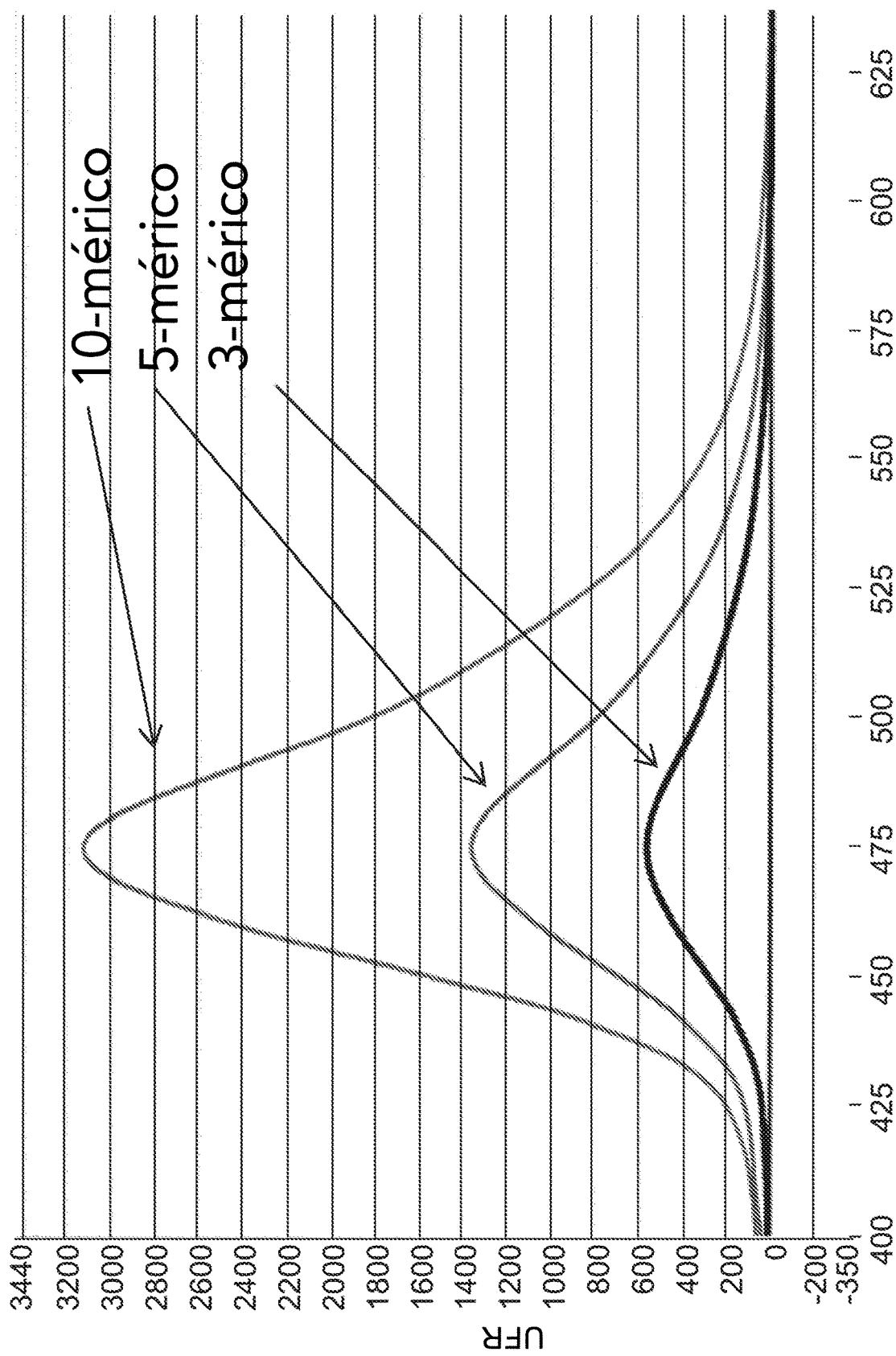


FIG. 1

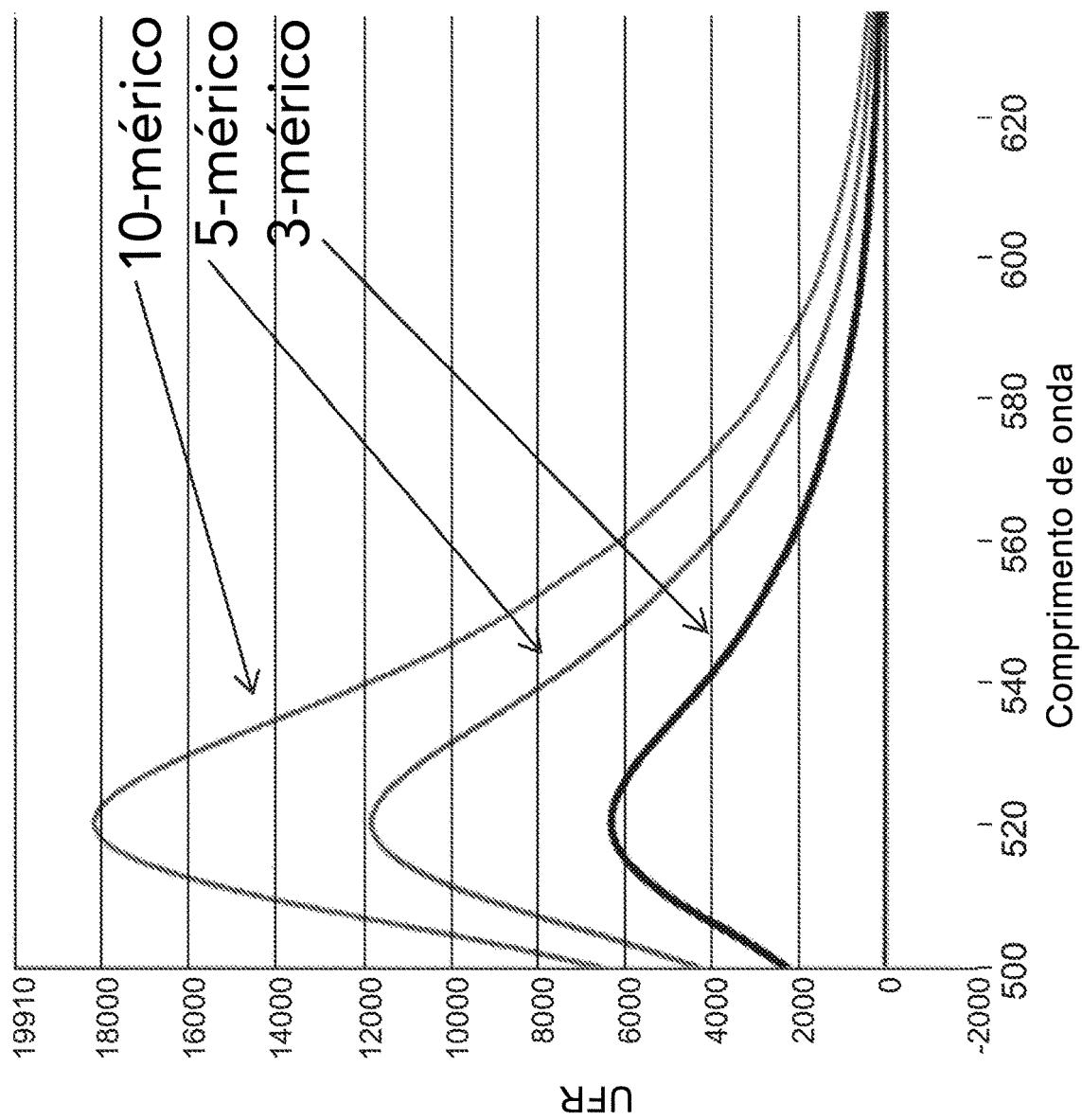


FIG. 2