



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

(11) PI 0610092-9 B1

(22) Data do Depósito: 28/04/2006

(45) Data de Concessão: 27/03/2018



(54) Título: MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE UM ANALITO E DE UM ÁCIDO NUCLEICO EM UMA AMOSTRA, E DE SINTETIZAÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO OU DE ANÁLOGO DE ÁCIDO NUCLEICO, KIT REAGENTE, USO DO MESMO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO OU DE ANÁLOGO DE ÁCIDO NUCLEICO E PRODUTO ASSOCIADO

(51) Int.Cl.: C07H 21/00; C07H 19/06; C07H 19/10; C07H 19/16; C07H 19/20; G01N 33/53; C12Q 1/68

(30) Prioridade Unionista: 02/05/2005 EP 05009618.9, 02/05/2005 US 60/676,785, 14/12/2005 EP 05027370.5, 14/12/2005 US 60/750,100

(73) Titular(es): BASF AKTIENGESELISCHAFT

(72) Inventor(es): THOMAS CARELL; ANJA SCHWÖGLER; GLENN ASHLEY BURLEY; JOHANNES GIERLICH; MOHAMMAD REZA MOFID

“MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE UM ANALITO E DE UM ÁCIDO NUCLEICO EM UMA AMOSTRA, E DE SINTETIZAÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO OU DE ANÁLOGO DE ÁCIDO NUCLEICO, KIT REAGENTE, USO DO MESMO, MOLÉCULA DE
5 ÁCIDO NUCLEICO OU DE ANÁLOGO DE ÁCIDO NUCLEICO E PRODUTO ASSOCIADO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos e reagentes para a detecção de analitos, e.g., ácidos nucleicos. Os novos métodos e reagentes
10 permitem uma detecção simples e sensível mesmo em amostras biológicas complexas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A análise rápida de material genético para seqüências alvo específicas, e.g., para a presença de polimorfismos de nucleotídeos únicos, para a presença de um certo gene, e.g., um gene de resistência, ou de mRNA
15 requer novas ferramentas de facilidade de uso, eficientes e confiáveis. O maior problema é a necessidade de detectar o DNA ou RNA de interesse diretamente em pequenas amostras biológicas, tais como sangue de paciente ou plantas. Estas fornecem o analito somente em quantidades diminutas. Para
20 se alcançar a sensibilidade requerida, uma etapa de amplificação é usualmente requerida, em que o analito de ácido nucleico é amplificado antes da análise ou um método de detecção é usado em que o sinal de detecção diminuto, diretamente obtido do analito de DNA/RNA, é amplificado.

Os métodos para a amplificação do analito de ácido nucleico
25 incluem PCR e outros protocolos de amplificação de ácido nucleico. A amplificação de PCR tem a maior vantagem que, dentro de um conjunto de diferentes filamentos de DNA obtidos do material biológico, somente a seqüência de DNA de interesse é amplificada. Isto é a base para a análise

confiável de genes simples em amostras biológicas complexas. A amplificação de PCR, contudo, requer etapas de processo complexas que, em alguns casos, são muito inconvenientes e caras. A amplificação do sinal de detecção pode ser alcançada pela ligação de uma enzima, tal como uma peroxidase de raiz forte ao analito, que converte um dado substrato continuamente em um produto colorido.

A metalização de DNA é outra forma de amplificar o sinal de detecção. Uma partícula metálica única ligada a DNA/RNA (o núcleo) catalisa a deposição de mais metal, que catalisa mais deposição de metal (1-9). O sinal induzido pela deposição de metal cresce, com isso, em uma maneira exponencial. A deposição de metal pode ser detectada eletricamente, se o analito for colocado dentro de dois eletrodos, ou opticamente (e.g., com o olho) porque o metal depositado faz surgir um ponto preto, e.g., no papel, no gel, ou no tubo de teste. Em princípio, a deposição de metal é o método de detecção mais sensível porque um pequeno aglomerado de metal (núcleo) é suficiente para iniciar a reação. Na prática, contudo, a sensibilidade do método é limitada por nucleação de metal não específica, e.g., através de impurezas em vizinhança espacial próxima ao analito, por exemplo, nos eletrodos, no gel, ou no papel segurando o analito. De fato, a deposição de metal não específica é a principal razão pela qual o manchamento de prata de DNA não é rotineiramente usado em analíticos de oligonucleotídeo. O manchamento de prata é também complicado pelo fato de que o DNA é incapaz de reforçar o próprio núcleo de iniciação. Ele requer modificação anterior. O método de escolha atual é a reação de DNA com glutaraldeído, que covalentemente se liga ao DNA por ligação não específica para seqüência aos grupos amina primários na nucleobase [7]. Este aduto, se tratado com um sal de prata, reduz o Ag^+ do sal para prata atômica que, enquanto ligada ao DNA, funciona como o núcleo requerido. Outro tratamento do DNA nucleado com sais de prata e agentes de redução inicia a deposição de metal

exponencial.. Outra possibilidade é trocar os contra-íons no filamento de DNA por Ag^+ , que é subsequenteemente reduzido para dar sítios de nucleação de Ag^0 . A maior desvantagem é que o glutaraldeído também reage com impurezas ou outras espécies químicas próximas ao analito, o que novamente
5 induz deposição de prata não específica.

Os aglomerados de metal, tais como, Au, partículas de Pd ou complexos de Pt ligados ao DNA também funcionam como sítios de nucleação para outra deposição de metal até a construção de fios de condução [1-9]. Aqui, os aglomerados são ligados aos grupos reativos que formam uma
10 ligação colavente com DNA ou a unidades que se intercalam ou se ligam de outra forma a DNA/RNA. Todos estes métodos rotulam todo o DNA em uma amostra biológica e, portanto, não permitem a marcação específica para seqüência e, então, análise específica para seqüência de um DNA alvo, tal como um gene único em uma amostra biológica complexa.

15 A preparação de domínios de DNA rotulados por uma incorporação mediada por telomerase de trifosfatos de nucleosídeo modificados amina em uma repetição de telômero modificado iniciada por iniciador é descrita em [8]. Os telômeros contendo amina são funcionalizados com ésteres de N-succinimidil de nanopartículas de ouro ativados para
20 produzir filamentos de DNA de nanopartículas de ouro. O aumento destes sítios de nanopartículas por outra deposição de metal ao longo do DNA produz crescimento rápido dos aglomerados de metal até a construção de nano-fios moleculares com DNA padronizado. Contudo, a eficiência da incorporação de trifosfato modificado por amina na extremidade de telômero
25 de crescimento é baixa e requer dopagem de trifosfato que resulta em uma distribuição de sítios de nucleação. Assim, o procedimento não permite a rotulagem específica para seqüência.

A rotulagem de DNA específica para um sítio também tem sido recentemente tentada através de um método litográfico complexo [4]. De

acordo com este método, uma proteção parcial de moléculas de DNA é efetuada pela ligação de RecA. As seqüências de DNA não protegidas são então tratadas com glutaraldeído, que marca estas seqüências para metalização. A redução específica para sítio de íons de prata pelas funções de aldeído ligado ao DNA resulta na formação de fio ao longo destas regiões. Uma rotulagem específica para seqüência de moléculas de ácido nucleico em uma amostra biológica complexa não é possível, contudo.

Embora estes documentos demonstrem o interesse em novas estratégias de rotulagem de DNA, os processos complicados envolvidos de forma a alcançar marcação evita que estes sistemas sejam usados para qualquer aplicação real. Em particular, estes métodos são incapazes de rotular seletivamente seqüências de DNA ou RNA de interesse diretamente em uma amostra biológica bruta.

Assim, foi um objeto da presente invenção fornecer novos métodos e reagentes que permitem uma detecção simples, eficiente e específica de analitos, particularmente de ácidos nucleicos em amostras biológicas complexas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um primeiro aspecto da presente invenção se refere aos métodos e kits reagentes para a detecção de um analito, e.g., um analito, e.g., um ácido nucleico em uma amostra, em que um produto associado do analito a ser detectado com um novo composto funcionalizado com aldeído é formado, que permite a detecção específica para seqüência pela formação de grupos marcadores, e.g., deposições de metal em torno de grupos aldeído no dito produto associado.

Mais particularmente, uma forma de realização deste aspecto se refere a um método para a detecção de um analito em uma amostra compreendendo as etapas de:

(i) fornecer uma amostra;

(ii) contatar a amostra com um composto funcionalizado compreendendo pelo menos um grupo funcional selecionado de um grupo aldeído, um grupo aldeído protegido, um grupo precursor de aldeído ou um grupo portador para introdução de um grupo aldeído, um grupo aldeído protegido, um grupo precursor de aldeído, sob condições em que o dito composto forma um produto associado com o analito a ser detectado;

(iii) se necessário, reagir o grupo portador com um parceiro de reação, compreendendo um grupo aldeído, um grupo aldeído protegido ou um grupo precursor de aldeído,

(iv) se necessário, converter os grupos aldeído protegidos e os grupos precursores de aldeído em grupos aldeído,

(v) contatar o dito produto associado tendo grupos aldeído com um reagente marcador sob condições em que os grupos marcadores são formados em torno dos grupos aldeído no dito produto associado, e

(vi) detectar os ditos grupos marcadores.

Uma outra forma de realização deste primeiro aspecto se refere a um kit reagente para a detecção de um analito em uma amostra, compreendendo:

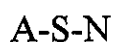
(a) um composto funcionalizado que compreende um grupo funcional selecionado de um grupo aldeído, um grupo aldeído protegido ou um grupo precursor de aldeído, ou um grupo portador para introduzir um grupo aldeído, um grupo aldeído protegido ou um grupo precursor de aldeído,

(b) opcionalmente um parceiro de reação para o grupo portador compreendendo um grupo aldeído, um grupo aldeído protegido ou um grupo precursor de aldeído,

(c) opcionalmente, um reagente de formação de aldeído capaz de converter os grupos aldeído protegidos e os grupos precursores de aldeído em grupos aldeído, e

(d) um reagente marcador.

Ainda uma outra forma de realização deste primeiro aspecto se refere a um composto da fórmula (I):



em que

A é um grupo funcional selecionado de um grupo aldeído, um grupo aldeído protegido ou um grupo precursor de aldeído,

S é um espaçador ou uma ligação, preferivelmente uma ligação covalente, e

N é um bloco de construção de ácido nucleico ou análogo a ácido nucleico, tal como um composto nucleosídico ou nucleotídico.

Em um segundo aspecto, a presente invenção se refere a métodos e a kits de reagentes para a detecção de um analito, e.g., um ácido nucleico em uma amostra envolvendo o uso de um composto funcionalizado com Click que forma um produto associado com o analito a ser detectado. A introdução específica para seqüência de grupos marcadores é efetuada pela reação do composto funcionalizado com Click com um parceiro de reação adequado compreendendo grupos marcadores ou grupos precursores de marcadores.

Uma forma de realização deste segundo aspecto se refere a um método para a detecção de um analito em uma amostra compreendendo as etapas de:

(i) fornecer uma amostra;

(ii) contatar a amostra com um composto funcionalizado compreendendo pelo menos um grupo funcional que é um primeiro parceiro de reação para uma reação de Click sob condições em que o dito composto forma um produto associado com o analito a ser detectado,

(iii) contatar o produto associado com um segundo parceiro de reação para uma reação de Click sob condições em que uma reação de Click entre os primeiro e segundo parceiros de reação ocorre, em que o segundo

parceiro de reação também compreende um grupo marcador ou um grupo precursor,

(iv) se necessário, converter os grupos precursores de marcadores em grupos marcadores, e

5 (v) detectar os ditos grupos marcadores.

Uma outra forma de realização deste segundo aspecto se refere a um kit reagente para detectar um analito em uma amostra, compreendendo:

(a) um composto funcionalizado que compreende pelo menos um grupo funcional que é um primeiro parceiro de reação para uma reação de
10 Click,

(b) um segundo parceiro de reação para uma reação de Click, em que o segundo parceiro de reação também compreende um grupo marcador ou um grupo precursor de marcador, e

(c) opcionalmente, um reagente de formação de marcador
15 capaz de converter os grupos precursores de marcador em grupos marcadores.

Ainda uma outra forma de realização deste segundo aspecto se refere a um composto da fórmula (II):



em que C é um grupo funcional que é um primeiro parceiro de reação para uma reação de Click,

20 S é um espaçador ou uma ligação, preferivelmente uma ligação covalente, e

N é um ácido nucleico ou análogo a ácido nucleico, tal como um composto nucleosídico ou nucleotídico.

Em um terceiro aspecto, a presente invenção se refere a
25 métodos e a kits de reagente para a detecção de um analito, e.g., um ácido nucleico em uma amostra que envolve o uso de um composto foto-sensibilizador que forma um produto associado com o analito a ser detectado. Preferivelmente, os grupos foto-sensibilizadores são introduzidos

especificamente em sequência em um ácido nucleico. A presença de grupos foto-sensibilizadores é detectada pela irradiação do produto associado rotulado em contato com um meio foto-sensível, em que a presença de grupos foto-sensibilizadores seletivamente provoca uma formação específica para um local de grupos marcadores no meio marcador.

Uma forma de realização deste terceiro aspecto se refere a um método para detectar um analito em uma amostra pela formação de um produto associado do analito e um composto funcionalizado compreendendo grupos foto-sensibilizadores e efetuar uma transferência de energia, particularmente uma transferência de energia de radiação dos grupos foto-sensibilizadores em um meio foto-sensível, em que a transferência de energia provoca a formação seletiva de grupos marcadores no meio foto-sensível.

Uma outra forma de realização deste terceiro aspecto se refere a um método para a detecção de um analito em uma amostra que compreende as etapas de:

(i) fornecer uma amostra;

(ii) contatar a amostra com um composto funcionalizado compreendendo pelo menos um grupo funcional selecionado de um grupo foto-sensibilizador ou um grupo portador para introduzir um grupo foto-sensibilizador sob condições em que o dito composto forme um produto associado com o analito a ser detectado;

(iii) se necessário, reagir o grupo portador com um parceiro de reação compreendendo um grupo foto-sensibilizador;

(iv) irradiar o dito produto associado em contato com um meio foto-sensibilizador sob condições em que os grupos marcadores são formados no dito meio foto-sensível na presença de grupos foto-sensibilizadores no dito produto associado, e

(v) detectar os ditos grupos marcadores.

Ainda uma outra forma de realização deste terceiro aspecto se

refere a um kit reagente para detectar um analito em uma amostra, compreendendo:

(a) um composto funcionalizado compreendendo pelo menos um grupo funcional selecionado de um grupo foto-sensibilizador ou um grupo portador para introduzir um grupo foto-sensibilizador;

(b) opcionalmente um parceiro de reação para o grupo portador compreendendo um grupo foto-sensibilizador, e;

(c) um meio foto-sensível que forma grupos marcadores na irradiação na presença de grupos foto-sensibilizadores.

A presente invenção permite uma detecção altamente sensível de um analito, e.g., ácidos nucleicos ou proteínas de ligação de ácido nucleico, em amostras biológicas, e.g., amostras clínicas, amostras ambientais ou amostras agrícolas. As aplicações preferidas incluem, mas não estão limitadas a, detecção de variabilidades genéticas, e.g., polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), resistências, tolerâncias ou intolerâncias a pesticida ou medicamento, genotipação, e.g., detecção de espécies ou cepas de organismos, a detecção de organismos ou cepas geneticamente modificados, ou a detecção de patógenos ou pestes, e o diagnóstico de doenças, e.g., doenças genéticas, doenças alérgicas, doenças autoimunes ou doenças infecciosas. Uma outra aplicação preferida é a detecção de ácidos nucleicos em amostras para proteção de marca, em que produtos, tais como produtos agrícolas, produtos alimentícios, ou bens de valor e/ou acondicionamento destes produtos são codificados com a informação específica para produto, e.g., mas não limitado a sítio de produção, produção de data, distribuidor, etc., e em que esta informação é detectada com os métodos descritos acima.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

A presente invenção fornece métodos e reagentes que permitem a rotulagem específica de analitos com grupos marcadores, e.g.,

com grupos aldeído reativos em uma amostra complexa. Em uma forma de realização preferida, a deposição de metal, e.g., deposição de prata, pode ser efetuada especificamente nos grupos aldeído associados com o ácido nucleico a ser detectado. Em uma outra forma de realização preferida, deposição de

5 metal, e.g., deposição de prata pode ser efetuada especificamente por transferência de energia dos grupos foto-sensibilizadores em um meio foto-sensível, e.g., papel fotográfico. Devido ao procedimento de rotulagem específico, o fundamento é fortemente reduzido e maiores seletividades e confiabilidades são obtidas.

10 A presente invenção compreende a detecção de um analito. A detecção pode ser uma detecção qualitativa, e.g., a determinação da presença ou ausência de um analito, e.g., uma seqüência de ácidos nucleicos específica na amostra a ser analisada. A presente invenção, contudo, também permite uma detecção quantitativa de um analito, e.g., uma seqüência de ácidos

15 nucleicos, na amostra a ser analisada. A detecção qualitativa e/ou quantitativa pode compreender a determinação de grupos de rotulagem de acordo com os métodos conhecidos na técnica.

O analito a ser detectado é preferivelmente selecionado dentre ácidos nucleicos e moléculas de ligação de nucleosídeo, nucleotídeo ou ácido

20 nucleico, e.g., proteínas de ligação de nucleosídeo, nucleotídeo ou ácido nucleico. Mais preferivelmente, o analito é um ácido nucleico, e.g., qualquer tipo de ácido nucleico que pode ser detectado de acordo com técnicas conhecidas, particularmente, técnicas de hibridização. Por exemplo, os analitos de ácido nucleico podem ser selecionados de DNA, e.g., DNA, RNA

25 ou híbridos de DNA-RNA de filamento duplo ou de filamento único. Exemplos particulares de analitos de ácido nucleico são DNA genômico, mRNA ou produtos derivados destes, e.g., cDNA.

O método da presente invenção pode ser realizado de acordo com qualquer formato de teste conhecido que é adequado para a detecção de

analitos, particularmente analitos de ácido nucleico em uma amostra. Por exemplo, o método pode envolver a detecção de analitos imobilizados em superfície sólidas, tais como membranas, e.g., em Southern ou Northern blots, chips, arranjos ou partículas, tais como contas. Além disso, a detecção pode ser realizada em géis, e.g., após separação eletroforética da amostra em géis, e.g., géis de agarose ou poliacrilamida. O método pode envolver a detecção de analitos únicos ou a detecção paralela de uma pluralidade de analitos, e.g., em um formato de chip ou micro-arranjo.

Em uma forma de realização preferida, a detecção envolve a irradiação de um meio foto-sensível na presença de uma amostra contendo um produto associado indicativo para um analito, em que o produto associado compreende grupos foto-sensibilizadores capazes de efetuar uma transferência de energia para o meio foto-sensível, em que os grupos marcadores são formados no meio.

A amostra pode ser qualquer amostra que pode conter o analito a ser detectado. Por exemplo, a amostra pode ser uma amostra biológica, tal como uma amostra agrícola, e.g., uma amostra compreendendo um material de planta e/ou material associado com o local onde as plantas crescem, os materiais de planta são armazenados ou processados. Por outro lado, a amostra pode também ser uma amostra clínica, tal como uma amostra de tecido ou uma amostra de fluido de corpo, tal como sangue, soro, plasma, etc., particularmente de origem humana. Outros tipos de amostras incluem, mas não estão limitados a, amostras ambientais, amostras de solo, amostras de amilentos, amostras forensicas ou amostras de bens valiosos que são testados para proteção de marca.

Devido à sua alta sensibilidade, o método da presente invenção é adequado para detectar analitos diretamente sem amplificação. De acordo com a presente invenção, menos quantidades diminutas de analitos, e.g., de ácidos nucleicos, e.g., 0,1 ng ou menos, preferivelmente 0,01 ng ou menos,

mais preferivelmente, 1 pg ou menos, ainda mais preferivelmente, 0,1 pg ou menos, ainda mais preferivelmente 0,01 pg ou menos e mais preferivelmente 0,001 pg ou menos podem ser determinadas mesmo sem amplificação. Uma sensibilidade especialmente alta pode ser obtida pela incorporação de

5 múltiplos nucleotídeos modificados em uma molécula de ácido nucleico pelo uso de grupos aldeído não protegidos e/ou pelo uso de técnicas de mancha otimizadas. Por exemplo, a detecção de um analito, e.g., um gene, em uma amostra biológica, pode ser realizada por uma combinação de Southern blotting e o método da presente invenção. Deve ser notado, contudo,

10 que o método da presente invenção também permite a detecção de ácidos nucleicos combinados com uma etapa de amplificação, que pode ser realizada de acordo com protocolos conhecidos, tais como PCR ou suas modificações, tais como PCR assimétrico, PCR em tempo real, PCR de transcrição reversa, etc., ou outros protocolos de amplificação, tais como LCR.

15 Em uma forma de realização preferida da presente invenção, uma detecção específica para sequência do analito é realizada, em que, por exemplo, um ácido nucleico tendo uma sequência específica é distinguido de outras sequências de ácidos nucleicos na amostra ou um polipeptídeo capaz de se ligar a uma sequência de ácidos nucleicos específica é distinguida de

20 outros polipeptídeos na amostra. Tal detecção específica para sequência preferivelmente compreende uma reação de hibridização específica para sequência pela qual a sequência de ácidos nucleicos a ser detectada está associada com um composto que carrega um grupo marcador ou um grupo precursor marcador. Deve ser notado, contudo, que a presente invenção

25 também permite uma detecção não específica para sequência de ácidos nucleicos, e.g., detecção de quaisquer ácidos nucleicos presentes em uma amostra.

Para identificar o analito a ser detectado, a amostra pode ser contatada com um composto funcionalizado por aldeído, funcionalizado por

Click ou funcionalizado por foto-sensibilizador, sob condições em que um produto associado com o analito, e.g., um ácido nucleico é formado. Um composto funcionalizado por aldeído compreende um grupo funcional que pode ser um grupo aldeído, um grupo aldeído protegido, um grupo precursor de aldeído, i.e., um grupo que pode ser convertido em um grupo aldeído sem um efeito prejudicial significativo no procedimento de detecção ou um grupo portador para introdução de um grupo aldeído, um grupo aldeído protegido ou um grupos precursor de aldeído.

■ 10 O composto funcionalizado pode compreender um grupo funcional único ou uma pluralidade de grupos funcionais. Por exemplo, um composto funcionalizado pode ser acoplado a uma parte dendrímica compreendendo uma pluralidade, e.g., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais grupos funcionais, como indicado acima. As partes dendrímicas podem ser sintetizadas por técnicas conhecidas. Preferivelmente, as partes dendrímicas são sintetizadas através de reações de Click, e.g., como descrito no Exemplo 5.

10 O grupo funcional é ligado a um composto que é capaz de formar um produto associado com o analito. O composto pode ser um composto nucleosídico ou nucleotídico, e.g., um nucleosídeo ou análogo de nucleosídeo ou nucleotídeo ou um análogo de nucleotídeo ou um oligômero ou polímero compreendendo pelo menos um composto funcionalizado, e.g., um ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico. Um composto nucleosídico ou nucleotídico é um nucleosídeo ou análogo de nucleosídeo ou nucleotídeo ou um análogo de nucleotídeo capaz de ser incorporado em ácidos nucleicos ou análogos de ácido nucleico, e.g., por métodos químicos ou enzimáticos. O ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico resultante deve ser capaz de formar produtos de associação, e.g., híbridos de ácido nucleico, com o analito. Preferivelmente, o composto compreende uma parte de base, e.g., um nucleobase ou outra parte de base heterocíclica capaz de formar pares de base

25

com um nucleobase, e uma parte de cadeia, e.g., compreendendo uma parte de açúcar e opcionalmente uma parte fosfato em nucleosídeos ou nucleotídeos ou uma parte de cadeia diferente em análogos de nucleosídeo ou nucleotídeo.

Exemplos preferidos de compostos nucleosídicos funcionais, em que a nucleobase é 7-dN-G, C, 7-dN-A ou T, e R é um grupo funcional são mostrados na Figura 1.

Preferivelmente, o grupo funcional é ligado a uma parte de base, e.g., a um nucleobase. O grupo funcional, contudo, pode também ser ligado a uma parte de cadeia, e.g., um grupo açúcar, um grupo fosfato ou, no caso de análogos de nucleosídeo ou nucleotídeo, um grupo açúcar modificado, um grupo fosfato modificado ou uma parte de cadeia de peptídeos, etc. Preferivelmente, o grupo funcional é covalentemente ligado ao composto através de uma ligação direta ou através de um espaçador. Se a ligação for efetuada através de um espaçador, o grupo funcional pode ser ligado a um grupo alifático ou cicloalifático, a um grupo aromático ou heteroaromático, a um grupo alqueno e/ou a um grupo alquino. Mais preferivelmente, o grupo funcional pode ser ligado a grupos aromáticos ou heteroaromáticos ou a grupos alquino. Grupos aldeído especialmente preferidos incluem grupos aldeído aromáticos e alifáticos, tais como benzaldeído, ou grupos aldeído em aldoses, tais como trioses, tetroses, pentoses ou hexoses, tais como glicose ou manose.

O grupo funcional pode ser um grupo aldeído livre. O grupo funcional pode também ser um grupo aldeído protegido, i.e., um grupo que pode ser convertido sob as condições de ensaio em um grupo aldeído. Um grupo aldeído protegido preferido é um grupo acetal ou hemiacetal que pode ser convertido em um grupo aldeído livre pelo tratamento com ácidos, e.g., ácidos orgânicos ou inorgânicos. Exemplos preferidos de grupos acetal ou hemiacetal são grupos acetal formados com um polialcool, tal como propano diol ou etileno glicol, ou grupos hemiacetal em um açúcar ou em um

composto relacionado com açúcar, tal como um açúcar de aldose, e.g., glicose ou galactose. Outros exemplos de grupos aldeído protegidos são grupos imino (e.g., grupos $=NH$), que dão grupos aldeído no tratamento com grupos ácidos, tioacetal ou ditioacetal (e.g., grupos $C(CR)_2$, em que R pode ser um radical alquil) que dão grupos aldeído no tratamento com sais de mercúrio, grupos oxima (e.g., grupos $=NOH$), que dão grupos aldeído no tratamento com ácidos, grupos hidrazona (e.g., grupos $=N-NHR$, em que R pode ser um radical alquil) que dão grupos aldeído no tratamento com ácidos e grupos imidazolona ou imidazolidina ou grupos benzotiazol ou diidrobenzotiazol, que dão aldeídos na hidrólise, e.g., com ácido. Exemplos específicos de compostos funcionalizados compreendendo grupos aldeído livres ou protegidos e métodos para a preparação de tais compostos são mostrados nas Figuras 2, 3a, 3c, 7, 8, 9d e 9e.

O grupo funcional pode também ser um grupo precursor de aldeído, i.e., um grupo que pode ser convertido em um grupo aldeído sem um efeito prejudicial significativo no procedimento de detecção de ácido nucleico. Os grupos precursores de aldeído preferidos podem ser selecionados dentre ácidos carboxílicos e derivados de ácido carboxílico incluindo nitrilas que dão aldeídos na redução e álcoois primários que dão aldeídos na oxidação.

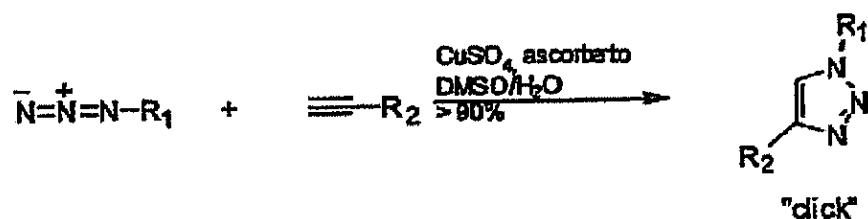
Em uma forma de realização diferente, o grupo funcional pode ser um grupo foto-sensibilizador, i.e., um grupo que é capaz de efetuar uma transferência de energia, e.g., uma transferência de energia de luz, para um meio foto-sensível, i.e., um meio fotográfico, tal como um papel fotográfico. Os grupos foto-sensibilizadores podem ser selecionados dentre grupos de rotulagem fluorescentes e/ou de corante conhecidos, tais como grupos indolina à base de cianina, grupos quinolina, por exemplo, grupos fluorescentes comercialmente disponibilizados, tais como Cy5 ou Cy5.5. Exemplos específicos de grupos foto-sensibilizadores são mostrados na

Figura 22.

O grupo funcional pode também ser um grupo portador, i.e., um grupo para introduzir um grupo aldeído, um grupo aldeído protegido ou um grupos precursor de aldeído ou para introduzir um grupo foto-sensibilizador pela reação com um parceiro de reação adequado, i.e., um composto compreendendo um dos grupos acima. Em uma forma de realização preferida, os grupos portadores são selecionados de grupos funcionalizados com Click, i.e., grupos que podem reagir com um parceiro de reação adequado em uma reação de cicloadição, onde uma ligação cíclica, e.g. heterocíclica, entre o grupo funcional de Click e o parceiro de reação é formada, e em que o parceiro de reação compreende um aldeído ou um grupo aldeído protegido ou um grupo foto-sensibilizador. Um exemplo especialmente preferido de tal reação de Click é uma cicloadição (3+2) entre os grupos azida e alquino, que resulta na formação de anéis 1,2,3-triazol. Assim, grupos aldeído podem ser gerados pela realização de uma reação de Click de um grupo portador de azida ou alquino e um parceiro de reação correspondente, i.e., um parceiro de reação que compreende o grupo alquino ou azida complementar e adicionalmente um aldeído, um grupo aldeído protegido ou um precursor de aldeído. Em uma outra forma de realização da presente invenção, o parceiro de reação da funcionalização de Click, contudo, pode também conter um marcador diferente ou grupos precursores de marcador, tais como grupos marcadores de fluorescência ou grupos foto-sensibilizadores.

Uma forma de realização especialmente preferida da reação de Click compreende uma cicloadição catalisada por cobre (3+2) entre uma azida e um grupo alquino. A formação irreversível de 1,2,3-triazóis como um resultado da cicloadição de azida/alquino é ortogonal, os grupos químicos requeridos são pequenos (incorporação com rompimento mínimo do ambiente das biomoléculas) e seletivos devido à perda de azidas e alquinos verificados

na natureza.



em que R₁ e R₂ são radicais orgânicos.

Exemplos específicos de compostos funcionalizados com Click e métodos para a preparação de tais compostos são mostrados nas Figuras 3b, 9a-c e 10. Exemplos específicos de parceiros de reação para compostos funcionalizados com Click são mostrados nas Figuras 11 e 12.

O grupo funcional, e.g., um grupo funcionalizado com aldeído ou um grupo funcionalizado de Click ou um grupo funcionalizado com foto-sensibilizador é preferivelmente ligado a uma nucleobase que pode ser selecionada de bases de purina e pirimidina de ocorrência natural ou de ocorrência não-natural. Preferivelmente, as nucleobases são selecionadas de citidina, uracil, timina, adenina, guanina, 7-dezaadenina, 7-deazaguanina, inosina e xantina. O grupo funcional é preferivelmente ligado na posição 5 ou 6, mais preferivelmente, na posição 5, de um nucleobase de pirimidina ou na posição 7 ou 8, mais preferivelmente, na posição 7 de uma nucleobase de purina, particularmente se uma incorporação enzimática em um ácido nucleico for desejada.

O grupo funcional pode ser covalentemente ligado ao composto, e.g., através de uma ligação direta ou um espaçador, e.g., um espaçador tendo um comprimento de cadeia de até 20 átomos. O espaçador pode ser um espaçador flexível, e.g., um espaçador baseado em alquilenos, opcionalmente contendo heteroátomos, tais como O, S, e/ou N ou um espaçador pelo menos parcialmente rígido, e.g., um espaçador que compreende pelo menos um grupo rígido selecionado de grupos alqueno, grupos alquino, grupos cíclicos, particularmente grupos aromáticos ou heteroaromáticos, mas também grupos cicloalifáticos e combinações destes.

Se o composto de funcionalização compreender um grupo de funcionalização de Click, que é o primeiro parceiro de reação para uma reação de Click e subsequentemente reagido com um segundo parceiro de reação para uma reação de Click, uma ligação do grupo funcional através de uma ligação direta, um espaçador flexível ou um espaçador parcialmente rígido é preferido, em que o espaçador flexível pode, por exemplo, ter um comprimento de cadeia com até 6 átomos, mais particularmente até 4 átomos, e em que um espaçador parcialmente rígido preferivelmente tem um comprimento de cadeia de até 20 átomos de carbono, e.g., até 10 átomos de carbono e compreende pelo menos um grupo rígido como definido acima, particularmente um grupo alquino, e pelo menos um grupo flexível, e.g., um grupo alquilenos. Se, por outro lado, o grupo funcional for um grupo aldeído ou uma ligação de grupo precursor de aldeído através de ou um espaçador parcialmente rígido como definido acima ou um espaçador pelo menos parcialmente rígido tendo um comprimento de cadeia de 2 a 10 átomos é preferido. A estrutura de um espaçador contendo grupo rígido, e.g., um espaçador parcialmente rígido, é preferivelmente tal que o grupo rígido seja diretamente ligado ao nucleobase. Um exemplo preferido de um espaçador parcialmente rígido é mostrado nas Fig. 15a e b.

O composto funcionalizado é capaz de formar um produto associado com o analito a ser detectado. Por um lado, o composto funcionalizado pode ser selecionado dentre compostos que podem ser incorporados em ácidos nucleicos ou análogos de ácidos nucleicos, i.e., blocos de construção de ácido nucleico ou de análogo de ácido nucleico. Exemplos preferidos para tais compostos são nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo, e.g., nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo funcionalizados com aldeído, nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo funcionalizados com Click ou nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo funcionalizados foto-sensibilizador. Por outro lado, o composto funcionalizado pode ser

selecionado dentre ácidos nucleicos ou análogos de ácido nucleico, e.g., nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo funcionalizados com aldeído, nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo funcionalizados com Click ou nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo funcionalizados foto-sensibilizador.

5 O termo "nucleotídeo" de acordo com a presente invenção particularmente se refere a ribonucleotídeos, 2'-desoxiribonucleotídeos ou 2', 3'-didesoxirribonucleotídeos. Os análogos de nucleotídeos podem ser selecionados dentre nucleotídeos modificados com açúcar ou na cadeia, particularmente de análogos de nucleotídeos que podem ser enzimaticamente
10 incorporados em ácidos nucleicos. Em nucleotídeos modificados com açúcar preferidos, o grupo 2'-OH ou grupo H do açúcar de ribose é substituído por um grupo selecionado dentre OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ ou CN, em que R é C₁-C₆ alquil, alquenil ou alquinil, e halo é F, Cl, Br ou I. A ribose, sozinha, pode ser substituída por outros grupos com 5 ou 6 membros
15 carbocíclicos ou heterocíclicos, tais como um grupo ciclopentano ou cicloexeno. Em nucleotídeos modificados na cadeia preferidos, o grupo fosfo(tri)éster pode ser substituído por um grupo modificado, e.g., por um grupo fosforotioato ou um grupo H-fosfonato. Outros análogos de nucleotídeo preferidos incluem blocos de construção para a síntese de análogos de ácido
20 nucleico, tais como ácidos nucleicos de morfolino, ácidos nucleicos de peptídeo ou ácidos nucleicos travados.

Os ácidos nucleicos funcionalizados com aldeído, Click ou foto-sensibilizador podem ser oligonucleotídeos, e.g., ácidos nucleicos tendo um comprimento de blocos de construção com até 30 nucleotídeos (ou
25 análogos de nucleotídeo) ou polinucleotídeos tendo um comprimento de blocos de construção com até 30 nucleotídeos (ou análogos de nucleotídeo). Preferivelmente, os ácidos nucleicos ou análogos nucleicos são capazes de ligação específica ao analito, e.g., capazes de hibridizar com um analito de ácido nucleico sob condições de ensaio. O comprimento mínimo é

preferivelmente 12 ou mais, preferivelmente, 14 nucleotídeos (ou análogos de nucleotídeo), nos blocos de construção.

Os blocos de construção funcionalizados com ácido nucleico ou com análogo de ácido nucleico podem ser incorporados em ácidos nucleicos por técnicas padrão para síntese química e/ou incorporação enzimática. A síntese química, por exemplo, pode ser realizada por química de fosforamidita padrão usando fosforamiditas de nucleosídeo como blocos de construção em protocolos de síntese padrão. Outros tipos de blocos de construção preferidos para a síntese química incluem nucleosídeos modificados com H-fosfonato ou fosforotriéster.

Por outro lado, os nucleotídeos modificados podem ser incorporados em ácidos nucleicos por métodos enzimáticos. Surpreendentemente, foi verificado que trifosfatos de nucleosídeos funcionalizados com Click ou aldeído são aceitos como substratos de enzima por enzimas sintetizando ácido nucleico, tais como DNA polimerases, RNA polimerases, transcriptases ou telomerasas reversas. Por exemplo, foi verificado que os trifosfatos de nucleosídeo modificados são aceitos por DNA polimerases comumente usadas para protocolos de extensão e amplificação de iniciador, e.g., DNA polimerases termo-estáveis, tais como Taq polimerase, Vent polimerase, Pfx polimerase, Pwo polimerase, ou Terminator polimerase, como descrito no Exemplo 7. Enzimas aceitam trifosfatos modificados sem perda de fidelidade e permitem uma incorporação baseada em padrão em ácidos nucleicos, tais como DNA e RNA.

O método da presente invenção fornece várias formas de realização de detecção do analito. Por exemplo, blocos de construção ácido de nucleico funcionalizado, e.g., nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos, juntamente com enzimas apropriadas, podem ser fornecidos, os quais são enzimaticamente incorporados em uma molécula de ácido nucleico que forma o produto associado com o analito. Na presente invenção, um tipo simples de

nucleotídeo funcionalizado ou uma pluralidade de tipos diferentes de nucleotídeos funcionalizados podem ser empregados. Alternativamente ou adicionalmente, um ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico funcionalizado pode já estar presente, que foi fabricado, e.g., pela síntese química ou enzimática, e que especificamente se liga, e.g., por hibridização ao analito a ser detectado.

Em uma forma de realização preferida, o método compreende uma reação de extensão de iniciador opcionalmente em combinação com etapas de amplificação de ácido nucleico subseqüentes, tais como PCR. Por exemplo, pelo menos uma molécula iniciadora pode ser fornecida, a qual hibridiza sob condições de ensaio com um analito de ácido nucleico a ser detectado ou o seu complemento. O iniciador ligado é então estendido em que um produto de extensão detectável é obtido, o qual é indicativo para a presença e/ou quantidade do analito de ácido nucleico a ser detectado. de acordo com esta forma de realização, os iniciadores funcionalizados e/ou nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo funcionalizados para incorporação no produto de extensão podem ser usados.

Alternativamente e/ou adicionalmente, o método da presente invenção pode compreender o uso de sondas de hibridização funcionalizadas que hibridizam sob as condições de ensaio com o analito de ácido nucleico a ser detectado ou o seu complemento, em que a formação de um produto de hibridização é indicativa para a presença e/ou quantidade do analito de ácido nucleico a ser detectado.

O método de detecção da presente invenção pode ser realizado por quaisquer protocolos de detecção de ácido nucleico conhecidos, e.g., envolvendo o uso de suporte sólidos. Por exemplo, um suporte sólido, e.g., um chip ou arranjo ou um material particulado, tal como uma conta, pode ser fornecido ao qual uma sonda de captura é ligada capaz de hibridizar para o analito a ser detectado. O analito de ácido nucleico ligado em fase sólida pode

ser detectado pelo uso de sondas de hibridização funcionalizadas que hibridizam com o analito de ácido nucleico em uma parte de sequência diferente como a sonda de captura faz, e detecção subsequente da sonda de hibridização ligada, e.g., com um reagente de metalização. Este método é particularmente adequado para as aplicações diagnósticas no campo agrícola e clínico, e.g., para a detecção de DNA e/ou mRNA de plantas, e.g., plantas geneticamente modificadas, DNA de patógenos ou pestes de planta, etc.

Em uma forma de realização específica, a detecção pode envolver o contato do produto associado do analito e um composto funcionalizado compreendendo um grupo foto-sensibilizador com um meio foto-sensível, e.g., pela transferência de uma amostra ou alíquota de amostra na qual um produto associado pode estar presente no meio foto-sensível, e.g., por manchamento, pipetamento, etc. Na irradiação, uma transferência de energia do grupo foto-sensibilizador ao meio foto-sensível é efetuada de tal forma que os grupos marcadores, tais como metal, e.g., prata, núcleos são formados no meio foto-sensível na presença, mas não na ausência, de grupos foto-sensibilizadores. Se necessário, os grupos marcadores podem ser submetidos a um procedimento de desenvolvimento, e.g., um procedimento de desenvolvimento químico ou foto-químico de acordo com técnicas fotográficas. O meio foto-sensível pode ser qualquer suporte sólido ou qualquer material suportado capaz de formar grupos marcadores, e.g., núcleos metálicos. Preferivelmente, o meio foto-sensível é um meio sensível à luz, tal como papel sensível à luz ou uma emulsão sensível à luz ou gel em um material de suporte. Mais preferivelmente, o meio foto-sensível é um meio fotográfico, tal como papel fotográfico. Irradiação é realizada sob condições, e.g., de comprimentos de onda e/ou intensidade de luz de irradiação, sob a qual a formação do grupo marcador seletiva ocorre na presença de grupos foto-sensibilizadores. Preferivelmente, irradiação ocorre com luz

infravermelha e/ou com luz visível em onda longa, dependendo da sensibilidade do meio. O comprimento de onda de irradiação pode ser, e.g., 500 nm ou maior, 520 nm ou maior, 540 nm ou maior, 560 nm ou maior, 580 nm ou maior para luz visível ou 700 nm a 10 μ m, para luz infravermelha.

5 Um aspecto importante da presente invenção é a detecção de variabilidades genéticas, e.g., polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). O genoma de, por exemplo humanos, contém variações de seqüências de nucleotídeos em uma freqüência média de até 0,1%. Portanto, estas variabilidade fornecem excelentes marcadores para a identificação de fatores
10 genéticos que contribuem para suscetibilidade de doença complexa [16, 17]. Embora haja uma grande faixa de técnicas disponíveis para a detecção de SNPs, a maior parte destes métodos é vagarosa, requerem instrumentação grande e amplificação de PCR [18]. O presente método, contudo, é barato e flexível o bastante para acomodar necessidades de triagem baixas, moderadas
15 e de alta produtividade com alta velocidade, sensibilidade e eficiência. Várias possibilidades existem para rotular seletivamente os filamentos de coincidência total ou aqueles não coincidentes que permitem o uso do método da presente invenção para a detecção de SNPs.

20 Por exemplo, a detecção de coincidência ou diferença de ácido nucleico, e.g., em SNPs, pode compreender o uso de sondas de hibridização funcionalizada que hibridizam sob as condições de ensaio com o analito de ácido nucleico a ser detectado para o seu complemento e submeter o produto de hibridização a um procedimento de tratamento em que um produto de hibridização contendo pelo menos uma diferença é dissolvido e em que a
25 presença de um produto de hibridização não dissolvido é indicativa para a presença e/ou quantidade de um ácido nucleico que tem uma seqüência completamente complementar (i.e., nenhuma diferença) com a sonda de hibridização.

O tratamento para a dissolução de produtos de hibridização

contendo diferença, i.e., o uso de enzimas de detecção de diferença que clivam o produto de hibridização, dependendo da presença de uma diferença. Enzimas adequadas para tal tratamento de digestão de diferença incluem glicosilases diferentes, tais como codificado pelos genes hMSH2 e hMLH1 e Mut S, Mut L e Mut H. As proteínas adicionais são MutY e Mig.Mthl. Mig.Mthl corta T dentre uma diferença de TG, MutY corta A em uma diferença de AG e a enzima TDG corta T em uma diferença de TG.

Alternativamente ou adicionalmente, os produtos de hibridização contendo diferenças podem ser dissolvidos por um tratamento de hibridização diferencial envolvendo o ajuste de condições de hibridização, e.g., na visão de temperatura, concentração de sal e/ou lavagem com cloreto de dimetil amônio, em que um produto de hibridização contendo diferenças é dissolvido e o produto de hibridização completamente complementar permanece estável.

Em ainda outra forma de realização, diferenças, e.g., SNPs, podem ser determinadas por alongamento de iniciador seletivo catalisado por enzima. Para este propósito, um iniciador é fornecido, em que a extremidade 3' do iniciador é diretamente localizada a montante de um sítio de diferença potencial no analito padrão. Uma extensão de iniciador é somente possível quando um nucleotídeo que é complementar à próxima base no padrão estiver presente. Pela seleção de um tipo único de nucleotídeo funcionalizado e determinação se ele é incorporado no iniciador ou não, a base no sítio de diferença potencial pode ser determinada.

O método da presente invenção compreende a detecção de grupos marcadores que são incorporados em um produto associado do analito com um composto funcionalizado. Os grupos marcadores são preferivelmente selecionados de grupos de formação de deposição de metal, e.g., grupos funcionalizados com aldeído, de grupos de formação de fluorescência ou fluorescentes ou de grupos ativos redox.

A formação de deposições de metal requer o tratamento de grupos de tratamento com um reagente de metalização, e.g., um reagente compreendendo átomos de metal e/ou íons selecionados dentre Ag, Au, Bi, Cu, Pd ou Pt, que podem ser seletivamente depositados em torno de grupos aldeído, e.g., por redução. Preferivelmente, o reagente de metalização compreende um sal de Ag^+ , tal como um complexo de Ag-amônio, i.e., o reagente de Tollens. Outros exemplos preferidos de reagentes de metalização são $\text{Cu}(\text{NO}_3)/\text{I}_2$, complexos de platina terpiridina, tais como $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ou KAuCl_4 .

Além disso, os grupos funcionalizados podem também funcionar como um portador para ligar outros grupos marcadores, tais como grupos marcadores fluorescentes. Por exemplo, os compostos marcadores com grupos amino podem ser acoplados a grupos aldeído por aminação redutiva na presença de um agente de redução, tal como cianoboroidreto de sódio. Alternativamente, a formação de hidrazona ou oxima pode ser usada para fornecer grupos marcadores.

A detecção dos grupos marcadores pode ser realizada de acordo com métodos conhecidos. Por exemplo, as deposições de metal podem ser determinadas qualitativamente e/ou quantitativamente por métodos ópticos e/ou métodos elétricos. Em uma forma de realização preferida, as deposições de metal em uma superfície sólida podem ser determinadas pela medição de parâmetros elétricos, e.g., condutividade, grupos marcadores fluorescentes podem ser determinados qualitativamente e/ou quantitativamente por métodos de medição fluorescentes, e.g., excitação através de uma fonte de luz adequada tal como um laser e detecção da luz fluorescente emitida.

Em uma outra forma de realização, a presente invenção compreende a detecção de grupos marcadores que são formados especificamente em um local formado em um meio foto-sensível na presença

de grupos foto-sensibilizadores em um produto associado do analito com um composto funcionalizado. Os grupos foto-sensibilizadores são preferivelmente selecionados dentre grupos fluorescentes ou luminescentes. Os grupos foto-sensibilizadores podem ser incorporados diretamente no produto associado ou através de um portador, e.g., através de uma reação de Click, como explicado acima em detalhes. O meio foto-sensível compreende grupos que, quando irradiados na presença de grupos foto-sensibilizadores, formam grupos marcadores detectáveis, tais como núcleos de metal que podem ser desenvolvidos de acordo com técnicas fotográficas padrão, e.g., por técnicas de desenvolvimento químicas e foto-químicas.

A presente invenção também se refere a kits reagentes para detectar analitos, e.g., analitos de ácido nucleico em uma amostra que compreendem um composto funcionalizado tendo ligado pelo menos um grupo funcional, como descrito acima. Geralmente, o kit pode compreender um composto da fórmula (III)

F-S-N

em que F é qualquer grupo funcional como descrito acima, e.g., um grupo A como definido na fórmula (I), um grupo C como definido na fórmula (II) e/ou um grupo foto-sensibilizador;

S é um espaçador ou uma ligação, preferivelmente uma ligação covalente, e

N é um bloco de construção de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico, tal como um composto nucleosídico ou nucleotídico.

O kit reagente pode opcionalmente conter um reagente de formação de aldeído ou um segundo parceiro para a reação de Click e um marcador ou reagentes formadores de marcador ou um meio foto-sensível. Os kits são preferivelmente usados em um método como indicado acima.

Além disso, a presente invenção se refere a um composto funcionalizado com aldeído da fórmula (I) ou um composto funcionalizado

com Click da fórmula (II) como indicado acima. Os compostos funcionalizados podem ser blocos de construção para a síntese química ou enzimática de ácidos nucleicos ou análogos de ácido nucleico ou seus precursores. Preferivelmente, os compostos são trifosfatos de nucleosídeos, particularmente, ribose, 2'-desoxirribose ou trifosfatos de 2', 3'-didesoxirribose nucleosídeo ou seus análogos que podem ser enzimaticamente incorporados em ácidos nucleicos.

Além disso, os compostos podem ser blocos de construção para a síntese química de ácidos nucleicos, tais como ácidos peptídeo nucleicos, ácidos nucleicos de morfolino ou ácidos nucleicos travados. Para este fim, fosforamiditas de nucleosídeo, H-fosfonates, fosfotriésteres ou Fmoc e/ou aminoácidos de nucleobase protegidos com Boc são adequados.

A presente invenção também se refere a uma molécula de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico tendo incorporado nela pelo menos um composto da fórmula (I) e/ou fórmula (II). A molécula pode ser um ácido nucleico selecionado dentre DNA e RNA ou um análogo de ácido nucleico, e.g., selecionado de ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos de morfolino ou ácidos nucleicos travados, como descrito em detalhe acima.

Além disso, a presente invenção se refere a um método de sintetização de uma molécula de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico que compreende a incorporação de pelo menos um bloco de construção de nucleotídeo ou análogo de nucleotídeo compreendendo um composto (I) e/ou (II) em uma molécula de ácido nucleico e/ou análogo de ácido nucleico. O método pode compreender uma síntese química e/ou uma síntese enzimática.

Além disso, a presente invenção se refere a um produto de metalização da molécula de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico como indicada acima que é obtível pelo tratamento de um composto funcionalizado com aldeído contendo ácido nucleico com um reagente de metalização como indicado em detalhes acima.

Além disso, a presente invenção se refere a um produto associado da molécula de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico como indicado acima com um analito como descrito acima. Preferivelmente, o produto associado é um produto de hibridização com um ácido nucleico complementar.

Em uma forma de realização preferida, os métodos e os kits reagentes da presente invenção são usados para aplicações agrícolas. Por exemplo, a presente invenção é adequada para a detecção de ácidos nucleicos a partir de plantas, patógenos de planta ou pestes de planta, tais como vírus, bactérias, fungos ou insetos. Além disso, a presente invenção é adequada para detectar variabilidades genéticas, e.g., SNPs em plantas ou partes de planta, patógenos de planta ou pestes de planta, tais como insetos.

Uma outra aplicação é uma detecção ou monitoramento de resistências, tolerâncias ou intolerâncias a herbicida, fungicida ou pesticida, e.g., resistências, tolerâncias ou intolerâncias em fungos, insetos ou plantas em organismos ou populações de organismos. A presente invenção é também adequada para genotipação rápida, e.g., para a detecção e/ou diferenciação rápida de espécies ou cepas de fungos, insetos, ou plantas. Além disso, detecção e/ou diferenciação de organismos geneticamente modificados para cepas, e.g., organismos ou cepas de fungos, insetos ou plantas é possível.

Devido à alta sensibilidade da presente invenção, um diagnóstico precoce de patógenos é possível, i.e., diagnósticos antes dos primeiros sintomas da presença de patógenos é visível. Isto é particularmente importante para o diagnóstico de ferrugem de soja (*Phakospora pachyrizi*) ou outros patógenos, e.g., *Blumeria graminis*, *Septoria tritici* ou *Oomicetos* ou outros patógenos para os quais controle é somente possível se a sua presença for detectada antes de ser visualmente reconhecida.

Além disso, a presente invenção é adequada para aplicações médicas, diagnósticas e forensicas, e.g., em medicina humana ou veterinária,

e.g., para a detecção de ácidos nucleicos de patógenos, e.g., patógenos humanos ou patógenos de animais de estimação ou de criação.

Outras aplicações preferidas incluem a detecção de variabilidades genéticas, e.g., SNPs em humanos ou a detecção de resistência, tolerâncias ou intolerâncias ou alergias a medicamentos. Além disso, a presente invenção é adequada para a genotipação, particularmente genotipação de humanos de forma a determinar mutações associadas com a predisposição ou risco aumentado de distúrbios, alergias e intolerâncias. A presente invenção pode também ser usada para a detecção de organismos ou cepas geneticamente modificadas, organismos ou cepas de bactérias ou vírus, mas também animais de criação geneticamente modificados, etc. A presente invenção é particularmente adequada para o diagnóstico de doenças, e.g., doenças genéticas, doenças alérgicas, doenças autoimunes ou doenças infecciosas.

Além disso, a presente invenção é adequada para a detecção da função e/ou expressão de genes, e.g., para propósitos de pesquisa.

Ainda uma outra forma de realização é o uso do método para proteção de marca, e.g., para detecção de informação específica codificada em produtos, tais como bens valiosos como produtos de proteção de planta, compostos farmacêuticos, cosméticos e produtos químicos finos (e.g., vitaminas e aminoácidos) e produtos de beber, produtos de combustível, e.g., gasolina e diesel, aparelhos eletrônicos para consumidor podem ser comercializados. Além disso, o acondicionamento destes e outros produtos podem ser comercializados. A informação é codificada por ácidos nucleicos ou análogos de ácido nucleico que têm sido incorporados no produto e/ou no acondicionamento de um produto. A informação pode se relacionar com a identidade do fabricante, com sítios de produção, com a data de produção e/ou distribuidor. Por meio da presente invenção, detecção rápida de dados específicos para o produto pode ser realizada. Uma amostra pode ser

preparada a partir de uma alíquota do produto que é então contatado com uma ou mais sondas de hibridização funcionalizadas específicas para sequência capazes de detectar a presença de informação codificada por ácido nucleico na amostra.

5 A presente invenção é também adequada para o campo de nutrientes. Por exemplo, na área de alimentação, nutrientes animais, e.g., milho, são suplementados com uma maior quantidade de conservantes, tais como ácido propiônico. Pela aplicação do método da presente invenção, a adição de conservantes pode ser reduzida. Além disso, a análise genômica
10 com o método da presente invenção permite a previsão da capacidade de um indivíduo para utilizar nutrientes específicos (nutrigenômicos).

Ainda uma outra forma de realização preferida se refere ao campo de epigenéticos. Esta forma de realização se refere particularmente a uma análise de DNA, e.g., DNA genômico com relação à metilação de bases
15 de citosina. Nesta forma de realização, o DNA pode ser tratado com um reagente específico para citosina, e.g., hidrazina e/ou hidroxilamina. Por meio do tratamento, uma reação seletiva de resíduos de citosina ou metilcitosina ocorre. Por exemplo, tratamento com hidroxilamina leva a uma modificação seletiva de resíduos de citosina. Preferivelmente, o reagente é adicionado em
20 uma quantidade sub-estequiométrica de forma a obter a modificação parcial de, e.g., resíduos de citosina. Subseqüentemente, o DNA tratado é analisado, e.g., por uma reação de extensão de iniciador usando pelo menos um bloco de construção ácido nucleico modificado, como indicado acima, e.g., uma base dU e/ou dC. Preferivelmente, uma base modificada de Click, e.g., uma base
25 modificada com alquino é usada. A reação de extensão de iniciador dá uma escada de seqüenciação característica resultante de interrupções da reação nas bases dC ou 5-metil-dC modificadas (cf. Fig. 26).

Uma outra forma de realização preferida se refere à aplicação de moléculas de ácido nucleico repórteres a um meio foto-sensível, e.g., um

papel fotográfico ou qualquer outro meio sensível a luz. Preferivelmente, as moléculas repórteres carregam um grupo foto-sensibilizador e um grupo extintor. Na ausência do analito, o grupo foto-sensibilizador é extinto. Por exemplo, a molécula repórter pode ter uma estrutura de grampo com o foto-sensibilizador e o grupo extintor em ou próximo do terminal da molécula em uma relação espacial próxima. Quando a molécula repórter estiver presente como uma estrutura de grampo, o grupo foto-sensibilizador é extinguido (de acordo com a técnica de balizamento molecular conhecida). Assim, uma molécula repórter com uma estrutura de grampo não pode efetuar uma sensibilização quando irradia luz ao meio foto-sensível. Na presença de um analito, a estrutura de grampo é quebrada. O analito pode ser um filamento de ácido nucleico complementar ou uma enzima que cliva a estrutura de grampo ou uma proteína que se liga ao grampo e assim quebra a estrutura. O grupo foto-sensibilizador é separado do grupo extintor e é assim capaz de foto-sensibilização. Neste caso, irradiação de luz leva a uma sensibilização do meio fotográfico e assim à detecção de analito (cf. Fig. 27).

Nesta forma de realização, a presente invenção se refere a um método para a detecção de um analito em uma amostra compreendendo as etapas de:

10

(i) fornecer uma amostra,

(ii) fornecer uma molécula repórter compreendendo um grupo foto-sensibilizador ou um grupo portador para a introdução de um grupo foto-sensibilizador e um grupo extintor em que o grupo foto-sensibilizador é extinguido na ausência do analito a ser detectado,

25

(iii) contatar a amostra com a molécula repórter sob condições em que a extinção do grupo foto-sensibilizador é pelo menos parcialmente reduzido ou terminado na presença do analito.

(iv) se necessário, reagir o grupo portador com um parceiro de reação compreendendo um grupo foto-sensibilizador,

(v) irradiar a dita molécula repórter em contato com um meio foto-sensível sob condições em que os grupos marcadores são formados no dito meio foto-sensível na presença de grupos foto-sensibilizadores não extinguidos na dita molécula repórter, e

5 (vi) detectar os ditos grupos marcadores

Além disso, esta forma de realização se refere a um kit reagente para detectar um analito em uma amostra compreendendo:

10 a) uma molécula repórter compreendendo um grupo foto-sensibilizador ou um grupo portador para introduzir um grupo foto-sensibilizador e um grupo extintor, em que o grupo foto-sensibilizador é extinguido na ausência do analito a ser detectado,

b) opcionalmente, um parceiro de reação para o grupo portador compreendendo um grupo foto-sensibilizador, e

15 c) um meio foto-sensível que forma grupos marcadores na irradiação de grupos foto-sensibilizadores não extinguidos.

Os aspectos preferidos do método, dos kits reagentes e aplicações preferidas são descritos acima.

A presente invenção é também explicada pelas seguintes Figuras e Exemplos.

20 **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

Figura 1: Sítios de ligação preferidos de grupos funcionais (R), e.g., grupos funcionalizados com aldeído em diferentes nucleobases 7-dN-G, C, 7-dN-A e T para a incorporação enzimática de grupos marcadores em oligonucleotídeos.

25 Figura 2: Representação esquemática da síntese de blocos de construção de nucleosídeo funcionalizados com aldeído para a síntese de fase sólida de ácidos nucleicos.

Figura 3a: Representação esquemática da síntese de um trifosfato de nucleosídeo funcionalizado com acetal (aldeído protegido) para a

síntese enzimática de ácidos nucleicos.

Figura 3b: Um exemplo de um trifosfato de nucleosídeo funcionalizado com alquino para química de Click eficiente em DNA, em que n é preferivelmente 0 - 4.

5 Figura 3c: Um exemplo de um trifosfato funcionalizado com aldeído protegido.

Os compostos mostrados na Figura 3 são adequados para incorporação de PCR eficiente em DNA.

Figura 4: Os resultados de uma reação de metalização pelo
10 contato de reagente de Tollens com uma base modificada com aldeído: (1) solução de açúcar como referência, (2) DNA com um grupo modificado com aldeído, (3) DNA com dois grupos aldeído e (4) DNA não modificado.

Figura 5: (I) produtos de extensão de iniciador manchados com Ag (a) ou usando um corante de fluorescência padrão (b): I.1a: TTP
15 modificado por aldeído em extensão de iniciador. I.1b: TTP modificado por acetal em extensão de iniciador. I.3a: DNA não modificado. Manchamento com prata somente positivo nas Faixas 1 e 2. I.bb-3b mesmo gel, mas manchado não especificamente com um corante de fluorescência. (II) Produto PCR com 2142 bp manchado com um corante fluorescente (a) ou com Ag (b):
20 II2a: TTP modificado com acetal em PCR. M: marcador, II1b: TTP modificado com aldeído em PCR, 2: TTP modificado com acetal em PCR, II3b: DNA não modificado.

Figura 6: Os resultados de uma série de diluição com uma
25 molécula de DNA sintética contendo um grupo funcional de aldeído simples. Detecção por manchamento com Ag.

Figura 7: Exemplos de nucleosídeos com diferentes nucleobases carregando funções de acetal (aldeído protegido), que podem ser convertidos nas fosforamiditas, H-fosfonatos ou triésteres correspondentes para síntese química de ácidos nucleicos ou em 5'-trifosfatos para

incorporação enzimática de ácidos nucleicos.

Figura 8: Derivatização de DNA ou PNA modificado com aldeído com um rótulo de fluorescência como uma alternativa para a metalização através de aminação reductiva.

5 Figura 9: monômeros de nucleosídeo e nucleotídeo modificados por alquino (a,b), modificados por azida (c) e modificados por aldeído protegido (d,e), em que n é preferivelmente 0-4.

Figura 10: Representação esquemática da síntese de nucleosídeos funcionalizados com alquino e trifosfatos de nucleotídeo.

10 Figura 11: Representação esquemática da síntese de dendrímeros funcionalizados com azida compreendendo grupos aldeído protegido.

Figura 12: Exemplos de azida e derivados de alquino azida com marcador ou precursor de marcador para a reação de Click com
15 nucleosídeos ou ácidos nucleicos modificados com alquino e azida.

Figura 13: No topo: Análise MALDI-TOF da reação de Click com oligonucleotídeos contendo a base modificada 2 (Figura 9b) e azidas de fluoresceína como o parceiro de "clicking" (m: 495). Abaixo: Eletroforese de reações de Click de DNA modificado com monômero 2 e azida de fluoresceína. A1: imagem de fluorescência, Faixa 1: material inicial antes da
20 reação de Click; 2,3: mistura de reação bruta; 4: Azida sob condições de Click; A2: mesmo gel manchado com SYBR Green. B1: Faixa 1,2: mistura de reação bruta; 3: material inicial; B2 mesmo gel, mas manchado com SYBR Green.

25 Figura 14: Reação de Click para introdução de azida de coumarina em resultados de DNA em um produto fluorescente (tubo de reação direito).

Figura 15: Fosforamidita modificado com alquino (a), um nucleosídeo modificado com alquino (b) e galactose modificada com azida

(c).

Figura 16: Ensaio PCR usando 200 μ M de 8, dATP, dCTP e dGTP, 0,05 μ g de DNA genômico de *S. cerevisiae* 499, 10x de tampão de polimerase com magnésio, 0,3 mM cada de iniciadores e 1,25 U polimerases. Faixa 1) Vent, 2) Vent (exo), 3) Pwo, 4) Taq (exo⁻) from Roche, 5) Terminator, 6) Taq é da Promega e 7) marcador.

Figura 17: Amplificação de PCR de DNA com 2142 com trifosfato modificado 1 ou 8 (Figura 10) substituindo dTTP. Agarose Gel (2%) foi usado e manchado com Brometo de Etídio. Um total de 35 ciclos de PCR foram corridos, com 45 seg usados para cada incubação. A Faixa 1) escada de DNA 2-log NEV (0,1-10,0 kb), Faixa 2) controle negativo (menos dTTP), Faixa 3) com substrato (1) substituindo dTTP, 4) com substrato (8) substituindo dTTP e 5) controle positivo (usando dTTP).

Figura 18: Cromatograma HPLC de (a) a digestão enzimática de fragmentos de PCR (318 mer) incorporando trifosfato 8 (Figura 10); (b) a digestão enzimática de fragmentos de PCR incorporando dTTP; (c) nucleosídeo (Fig. 10).

Figura 19: Série de diluição de fragmentos de PCR com 318 bp incorporando trifosfatos 1 e 2 seguido por clicking "no gel" e manchar com prata. (a) Série de diluição de fragmento de PCR incorporando 1 (Faixa 1 7,0 ng, Faixa 2 3,5 ng, Faixa 3 1,3 ng, Faixa 4 0,7 ng) and 2 (Faixa 5 7,0 ng, Faixa 6 3,5 ng, Faixa 7 1,3 ng, Faixa 8 0,7 ng) corrida em um gel de PAAG TBE-uréia. O gel foi submetido ao clicking "no gel" com azida 3 e subsequente manchar com prata. (b) Detecção comparativa de uma série de diluição de um fragmento de PCR incorporando 2 através de (i) o método de manchar com prata seletivo (como por (a)) e através de (ii) SYBR green II (Faixa 1 7 ng, Faixa 2 3,5 ng, Faixa 3 1,3 ng, Faixa 4 0,9 ng, Faixa 5 0,5 ng, Faixa 6 0,3 ng). (c) Série de diluição de fragmentos de PCR incorporando 2 (Faixa 1 7 ng, Faixa 2 3,5 ng, Faixa 3 1,3

ng, Faixa 4 0,9 ng, Faixa 5 0,5 ng, Faixa 6 0,3 ng) e 2 Faixa 1 7,0 ng, Faixa 2 3,5 ng, Faixa 3 1,3 ng, Faixa 4 0,7 ng) corrido em gel PAAG TBE-uréia. O gel foi então submetido ao clicking "no gel" com azida modificada por aldeído 4 e manchamento com prata subsequente. (d) Série de diluição de fragmentos de PCR incorporando 2 (Faixa 1 7 ng, Faixa 2 3,5 ng, Faixa 3 1,3 ng, Faixa 4 0,9 ng, Faixa 5 0,5 ng, Faixa 6 0,3 ng) corrido em gel de PAAG TBE-uréia. O gel foi então submetido a clicking "no gel" com azida modificada por aldeído 5 e subsequente manchamento com prata.

Figura 20: Fotografia de AFM de DNA natural (a) e DNA modificado com aldeído (b) após a exposição às condições de manchamento com Ag, e DNA modificado com aldeído após manchamento com Ag sem desenvolvimento (c), após 2 min de desenvolvimento (d) e após duas vezes de 2 min de desenvolvimento (e).

Figura 21: Um esquema de um analito, e.g., método de detecção de analito de DNA usando os princípios de fotografia preto e branco. Replicação inicial do analito de DNA na presença de um iniciador seletivo para sequência produz uma sequência alvo rotulada com um sensibilizador (S). Após a irradiação e desenvolvimento fotográfico subsequente, o analito pode ser detectado em um meio foto-sensível, e.g., papel fotográfico.

Figura 22: Esquema de corantes de cianina (1), (2) e (3). Série de diluição de corantes de cianina irradiados por 10 segundos usando uma lâmpada de projetor suspensa com um filtro de faixa de 530 nm usando (a) 1; (b) 2 e (c) 3 ou irradiação por 5 minutos com uma lâmpada com infravermelho usando (d) 1, (e) 2 e f (3). Os experimentos de ponto correspondem às seguintes diluições: Ponto 1: 1×10^{-11} , Ponto 2: 1×10^{-12} mol., Ponto 3: 3×10^{-13} mol, Ponto 4: 1×10^{-13} mol, Ponto 5: 3×10^{-14} mol, Ponto 6: 1×10^{-14} mol, Ponto 7: 3×10^{-14} mol, Ponto 8: 1×10^{-15} mol, Ponto 9: 3×10^{-16} mol, Ponto 10: 1×10^{-16} mol.

Figura 23: Testes de ponto de oligodesoxirribonucleotídeos

ODN-1 [5'-GCG ATT CGT TCG TCG C-3'], ODN-2 [5'-CGC GAA TGA ACA GCG C-3'] e ODN-3 [5'-GCG ACC GAT TCG C-3'], todos em 50 nmol usando (a) irradiação de alta energia e um filtro de faixa (520 nm); e (b) irradiação de baixa energia através de exposição prolongada (5 minutos) usando uma lâmpada com infravermelho.

Figura 24: Esquema de corantes de cianina Cy5 e Cy5.5. Série de diluição de corantes de cianina presos a ODNs irradiados por 10 segundos usando uma lâmpada projetora suspensa equipada com um filtro de fração de 520 nm usando (a) ODN-4 [5'-Cy5-GCG CTG TTC ATT CGC G-3']; (b) ODN-5 [5'-Cy5.5-GCG CTG TTC ATT CGC G-3']; ou irradiação por 5 minutos com uma lâmpada de infravermelho (c) ODN-4; (d) ODN-5. Os experimentos de pontos correspondem às seguintes diluições: Ponto 1: 1×10^{-11} mol., Ponto 2: 3×10^{-12} mol., Ponto 3: 1×10^{-12} mol, Ponto 4: 3×10^{-13} mol, Ponto 5: 1×10^{-13} mol, Ponto 6: 3×10^{-14} mol, Ponto 7: 1×10^{-14} mol, Ponto 8: 3×10^{-15} mol.

Figura 25: Esquema do processo da metodologia de "Click e fotografia". Uma seqüência, e.g., gene, de interesse é especificamente selecionada e amplificada através de PCR com trifosfatos modificados com alquino (dU*TP) e iniciadores seletivos para gene. Estas funções alquino podem ser rotuladas através de química de click com um foto-sensibilizador apropriado (S) produzindo híbridos de DNA foto-sensibilizados. Irradiação da amostra no papel de foto e desenvolvimento subsequente vão fornecer um novo método para a detecção de genes sensível e específica.

Figura 26: Esquema de um método para identificar padrões de metilação em DNA por modificações químicas específicas para citosina. Um analito de DNA é reagido com um agente de modificação específico para citosina (ou metilcitosina), e.g., hidroxilamina, preferivelmente em uma quantidade sub-estequiométrica de forma a dar resíduos de citosina parcialmente modificados (C*). Uma reação de extensão de iniciador com

uma base modificada por alquinila é realizada. Esta reação termina em resíduos de citosina modificados resultando em uma "escada" de produtos de extensão tendo um comprimento característico. Após a separação dos produtos de extensão iniciadores, e.g., em um gel, uma reação de Click com um grupo marcador modificado com azida, e.g., um açúcar modificado e uma detecção subsequente do grupo marcador (e.g., através de manchar de prata) é realizada. O padrão de metilação da amostra de DNA pode ser determinado pela comparação dos produtos de extensão de uma amostra de DNA metilada com os produtos de extensão de uma amostra de DNA não metilada que tenha sido submetida ao mesmo tratamento.

Figura 27: Esquema de um método de detecção de balizamento molecular em um meio foto-sensível. Uma molécula repórter tendo um grupo de fluorescência (F) e um grupo de extinção (Q) é fornecida. Na ausência de analito, a molécula repórter tem uma estrutura de grampo e a fluorescência é extinguida. Na presença de analito, o grupo de extinção é removido do grupo de fluorescência que se torna não extinguido (F*). A amostra é irradiada na presença de um meio fotográfico, tal como papel fotográfico ou outro material sensível à luz e revelada.

Exemplos

Exemplo 1

Síntese de nucleosídeos e nucleotídeos modificados por aldeído

Trifosfatos de nucleotídeos e nucleosídeos com nucleobase modificadas por aldeído foram sintetizados de nucleosídeos apropriadamente modificados que carregam um grupo de saída, tal como I, preferivelmente na posição 5 das bases de pirimidina, e.g., T, U e C ou na posição 7 de bases de purina, e.g., 7-desaza G, 7-desaza A, G e A, como mostrado na Figura 1. Todas as modificações nestas porções emanam da maior ranhura do DNA.

A síntese de uma fosforamidita de nucleosídeo T (U) modificada com aldeído primeiro através de alquinilação mediada de

Sonogashira [20] seguida pela reação com grupos funcionais apropriados foi realizada como mostrado na Figura 2. A função aldeído foi mantida protegida como um grupo acetal. O grupo de proteção acetal pode ser removido por tratamento com ácido. A fosforamidita de nucleosídeo modificada pode ser incorporada em ácidos nucleicos por síntese química.

A síntese de um trifosfato de nucleosídeo modificado por acetal foi realizada como mostrado na Figura 3a. Outros trifosfatos de nucleosídeo modificados por alquino (para reação de Click), acetal e hemiacetal são mostrados na Figura 3b. Os trifosfatos de nucleosídeos modificados podem ser incorporados em ácidos nucleicos por síntese enzimática.

O uso de reações de formação de C-C baseadas em Pd, tais como por Sonogashira/Suzuki [20] fornece uma abordagem sintética geral para a síntese de nucleotídeos e nucleosídeos modificados por aldeído com diferentes grupos aldeído com diferentes nucleobase modificadas. Além disso, grupos aldeído com características estéricas, eletrônicas e funcionais podem ser sintetizados.

Exemplo 2

Incorporação de nucleosídeos e nucleotídeos modificados por aldeído em oligonucleotídeos

2.1 Incorporação por síntese química

Incorporação da fosforamidita de nucleosídeo modificada por acetal/aldeído foi alcançada por síntese em fase sólida convencional [21]. Vários oligonucleotídeos de DNA contendo uma ou mais nucleobase modificadas por acetal/aldeído foram preparados como mostrado na Tabela 1. A desproteção dos grupos acetal forneceram o oligonucleotídeo de DNA modificado por aldeído.

Os oligonucleotídeos foram testados quanto à sua capacidade para formar pares de base com filamentos de DNA complementares de forma

a obter moléculas de DNA com filamento duplo. Foi verificado que a redução de estabilidade duplex devida à presença do grupo aldeído é baixa. O ponto de fusão de filamentos duplos é diminuído por cerca de somente 2°C por modificação. Esta quantidade de desestabilização é, contudo, completamente aceitável para aplicações pretendidas.

Tabela 1: Oligodesoxinucleotídeos sintetizados por síntese em fase sólida

		T_m [°C]	
1	TTTTTXXTTTT		
2	TTTTTXXTTTT		
3	GCCGAXGCGC	53,8	(56,5 controle não modificado)
4	GCGXATAXATXTCGC	48,4	(53,7 controle não modificado)
5	TTXTTXXTTXTTX		

2.2 Incorporação por métodos enzimáticos

Os monômeros de trifosfato modificados por acetal foram preparados de acordo com a Figura 3. O método mais seletivo de síntese de trifosfatos é o procedimento seguindo Ludwig e Eckstein [11, 12]. Este procedimento é levemente ácido de forma a obter uma mistura de aldeído e acetal-TTP que pode ser separada por HPLC, se desejado [13].

Estudos foram realizados com os trifosfatos de acetal e aldeído e uma variedade de diferentes polimerases de DNA. Eles mostraram que todas as polimerases aceitam o trifosfato modificado como substrato e eles seletivamente incorporam a base modificada. Também, múltiplas incorporações não são mais problemáticas. As seguintes polimerases foram testadas em estudos de extensão de iniciador e PCR. Os experimentos foram realizados com a timidina protegida por acetal e também com a timidina funcionalizada por aldeído desprotegida.

Extensão de Iniciador	PCR
Therminator (NEB)	Pfx (A)
Vent	Taq (A)
Vent (exo ⁻)	Vent (B)

Taq

Foram também realizados estudos de PCR com TPP substituído pelos trifosfatos sintéticos (acetal e aldeído). O experimento PCR mostrou que a base modificada pode ser incorporada em 2400 pares de base em gene integral, estabelecendo que podem ser criados genes especificamente rotulados com centenas de sítios de nucleação derivados de aldeído.

Exemplo 3

Detecção dos oligonucleotídeos e genes rotulados

Um método preferido para a deposição de metal em aldeídos é baseado no teste de Tollens [14].



Nesta reação, um complexo de prata-amônio é reduzido pelo aldeído. Se a concentração do aldeído for alta, alguém pode ver um filme de prata sólida no interior do tubo de reação.

O nucleosídeo contendo aldeído e os ácidos nucleicos modificados por aldeído quimicamente sintetizados podem ser detectados em um teste de manchamento com prata indicativo de funções aldeído (Fig. 4). Um filamento de DNA não rotulado deu em contraste um resultado claramente negativo sob as mesmas condições, mostrando que o aldeído seletivamente introduzido nas seqüências de DNA específicas permite a detecção seletiva destas seqüências modificadas.

A detecção de ácidos nucleicos modificados por aldeído por manchamento de prata foi também realizada em géis. Os grupos aldeído no DNA foram suficientes para reduzir os íons de prata dentro de um gel. As sementes formadas pelo processo no DNA podem ser desenvolvidas até que uma banda preta clara composta de prata depositada possa vista no gel.

Isto foi demonstrado por manchamento de ácidos nucleicos modificados por aldeído das reações de extensão de iniciador e de PCR (Figura 5 (i) e (ii), respectivamente).

Como mostrado na Fig. 5, o DNA contendo o nucleosídeo modificado é exclusivamente manchado por Ag enquanto que DNA não modificado fica não manchado. Isto é verdadeiro para o iniciador estendido e para o produto de PCR. O procedimento de manchar é baseado no kit SilverXPress (Invitrogen), mas com solução de Tollens mais forte. O manchar seguindo outros procedimentos é também possível.

Exemplo 4

Determinação de Sensibilidade

De forma a determinar a sensibilidade do método de detecção, experimentos de diluição foram realizados (Figura 6). Foi verificado que o manchar de DNA funcionalizado com aldeído com um kit de manchar de Ag padrão foi pelo menos cinco vezes mais sensível do que manchar com brometo de etídio (~0,5 ng de DNA com um comprimento de 50 bp).

Esta sensibilidade muito impressionante é obtida ainda com detecção visual grossa.

Exemplo 5

Síntese de nucleosídeos e nucleotídeos modificados com azida e alquino

Nucleosídeos e Trifosfato de nucleosídeo com azida e bases modificadas com alquino foram sintetizados substancialmente como descrito no Exemplo 1.

5.1 Síntese de nucleotídeos modificados com alquino

Um esquema de reação detalhado para a síntese de trifosfato de nucleosídeo modificado por alquino é mostrado na Figura 10.

A preparação de nucleosídeo (1) e seu trifosfato correspondente (2) foi realizada como previamente [23, 24]. A uma solução completamente desgaseificada de 3 (1,00 g, 1,72 mmol), ^{13}C Pd(PPh₃)₄ (0,198 g, 0,172 mmol.) e CuI (0,065 g, 0,344 mmol.) em DMF (3 mL) foi adicionada N,N-diisopropil etil amina desgaseificada (1,5 mL, 8,59 mmol) e a mistura de

reação agitada à temperatura ambiente por 10 minutos. Uma solução desgasificada de 4-pentin-1-ol (320 µl, 3,44 mmol.) em DMF (1 mL) foi adicionada em gotas à mistura de reação durante 1 hora. Após adição completa, a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante a

5 noite. Após a concentração *in vacuo*, a mistura bruta foi diluída com acetato de etila (200 ml) e a camada orgânica foi lavada com salmoura (3 x 50 ml) seguida por água (50 ml). A camada orgânica foi seca (MgSO₄), filtrada e concentrada *in vacuo*. Cromatografia em coluna de vaporização (SiO₂) eluindo com um gradiente acetato de etila : isoexano (1:1) seguido por acetato

10 de etila : isoexano (2:1) forneceu 4 (0,790 g, 86%) como uma espuma amarela pálida. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 0,01 (s, 3 H, OSiCH₃), 0,00 (s, 3 H, OSiCH₃), 0,05 (s, 3 H, OSiCH₃), 0,07 (s, 3 H, OSiCH₃), 0,81 (s, 6 H, OSi(CH₃)₃), 0,85 (s, 6 H, OSi(CH₃)₃), 1,74 (m, 2 H, CH₂-CH₂CH₂-OH), 1,95 (m, 1 H, H²R), 2,20 (m, 1 H, H-2a), 2,42 (t, 2 H, J = 6,0 Hz, C≡C-CH₂CH₂-),

15 3,67 (dd, 1 H, J = 11,4, 2,1 (CDCl₃, 75,5 MHz): δ 5,4 (SiCH₃), -5,3 (SiCH₃), -4,8 (SiCH₃), -4,6 (SiCH₃), 16,7 (C≡C-CH₂CH₂), 18,0 (SiC(CH₃)₃), 18,5 (SiC(CH₃)₃), 26,1 (SiC(CH₃)₃), 26,4 (SiC(CH₃)₃), 31,5 (CH₂-CH₂-CH₂-OH), 42,3 (C-2'), 61,9 (CH₂ CH₂CH₂-OH), 63,3 (C-5'), 72,4 (C=C), 72,7 (C-3'), 86,0 (C-1'), 88,7 (C-4'), 95,0 (C=C), 100,9 (C-5), 101,0 (C=C), 141,9 (C-6),

20 149,6 (C-2), 162,4 (C-4), HRMS (ESI, +ve) calc. para C₂₆H₄₆N₂NaO₆Si₂ 561,2792 [M+Na]⁺ verificado 561,2803.

A uma solução agitada de 4 (0,300 g, 0,56 mmol) em diclorometano (5 ml) foi adicionada uma solução de periodinano de Dess-Martin (0,378 g, 0,89 mmol) em diclorometano (5 ml) em gotas durante 5

25 minutos à temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio. A mistura de reação foi agitada por 2 horas seguida por resfriamento com solução de tiosulfato de sódio saturada (10 ml). A mistura bruta foi então diluída com diclorometano (200 ml) e a camada orgânica lavada com salmoura (2 x 30 ml) e água (2 x 30 ml). A camada orgânica foi então seca (MgSO₄), filtrada e

concentrada *in vacuo*. Cromatografia em coluna (sílica flash) eluindo com 35% de acetato de etila em isoexano produziu **5** (0,193 g, 65%) como uma espuma amarela pálida.

^1H RMN (CDCl_3 , 600 MHz): δ 0,07 (s, 3 H, OSiCH_3), 0,00 (s, 3 H, OSiCH_3), 0,05 (s, 3 H, OSiCH_3), 0,06 (s, 3 H, OSiCH_3), 0,81 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 0,85 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 1,95 (m, 1 H, H-2R), 2,21 (m, 1 H, H-2a), 2,61 (t, 2 H, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,67 (t, 2 H, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 3,68 d(d, 1 H, $J = 11,4, 2,4$ Hz, H-5'), 3,81 (dd, 1 H, $J = 11,4, 2,4$ Hz, H-5'), 3,89 (m, 1 H, H-4'), 4,32 (m, 1 H, H-3'), 6,20 (dd, 1 H, $J = 7,2, 6$ Hz, H-1'), 7,84 (s, 1 H, H-6), 8,99 (bs, 1 H, N-H), 9,72 (s, 1 H, CHO), ^{13}C RMN (CDCl_3 , 150,8 MHz): 53,8 (SiCH_3), -3,7 (SiCH_3), -3,1 (SiCH_3), -2,9 (SiCH_3), 14,4 ($\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2$), 19,7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 20,1 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 27,4 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 27,7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 43,7 (C-2'), 44,1 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CHO}$), 64,6 (C-5'), 74,0 (C-3' e $\text{C}=\text{C}$), 87,5 (C-1'), 90,0 (C-4'), 94,3 ($\text{C}=\text{C}$), 101,9 (C-5), 143,8 (C-6), 150,9 (C-2), 163,7 (C-4), 201,6 (CHO), HRMS (ESI, +ve) calc.. para $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{Si}_2$ 559,2635 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ verificado 559,2634.

A uma solução de **5** (0,530 g, 1,00 mmol) e K_2CO_3 (0,269 g, 1,98 mmol) em metanol seco (20 ml) foi adicionada uma solução de dimetil éster do ácido 1-diazo-2-oxo-propil-fosfônico (0,261 g, 1,19 mmol) em metanol seco (5 ml) à temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite, filtrada e concentrada *in vacuo*. A mistura bruta foi dissolvida em acetato de etila (200 ml) e a camada orgânica foi lavada com salmoura (2 x 30 ml) e água (2 x 30 ml), seca (MgSO_4) e concentrada *in vacuo*. Cromatografia em coluna (sílica flash) eluindo com 20% de acetato de etila em isoexano produziu **6** (0,290 g, 55%) como uma espuma incolor.

^1H RMN (CDCl_3 , 600 Mhz): δ 0,00 (s, 3 H, OSiCH_3), 0,01 (s, 3 H, OSiCH_3), 0,06 (s, 3 H, OSiCH_3), 0,07 (s, 3 H, OSiCH_3), 0,82 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 0,86 (s, 6H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 1,93 (m, 1H, H-2 β), 1,95 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{C}$ -

H), 2,22 (m, 1 H, H-2 α), 2,39 (dt, 2 H, J = 8,4, 2,4 Hz, -CH₂CH₂-), 2,55 (t, 2 H, J = 8,4 Hz, -CH₂CH₂-), 3,68 (dd, 1 H, J = 11,4, 2,4 Hz, H-5'), 3,81 (d, 1 H, J = 11,4, 2,4 Hz, H-5'), 3,89 (m, 1 H, H-4'), 4,33 (m, 1 H, H-3'), 6,20 (dd, 1 H, J = 7,8, 6 Hz, H-1'), 7,85 (s, 1 H, H-6), 8,33 (bs, 1 H, N-H), ¹³C RMN (CDC1₃, 150,8 MHz): 57,0 (SiCH₃), -6,9 (SiCH₃), -6,4 (SiCH₃), -6,2 (SiCH₃), 16,5 (C=C-CH₂CH₂), 16,9 (C=C-CH₂CH₂), 17,0 (SiC(CH₃)₃), 18,2 (SiC(CH₃)₃), 24,2 (SiC(CH₃)₃), 24,5 (SiC(CH₃)₃), 40,4 (C-2'), 61,4 (C-5'), 67,9 (C=C-H), 70,8 (C-3'), 70,9 (C=C), 80,9 (C=C), 84,1 (C-1'), 86,8 (C-4'), 91,2 (C=C), 98,7 (C-5), 140,6 (C-6), 147,5 (C-2), 159,9 (C-4), HRMS (FAB, +ve) calc., para C₂₇H₄₃N₂O₅Si₂ + H 533,28670 [M+H]⁺ verificado 533,26009.

A uma solução resfriada (0°C) de **6** (0,270, 0,51 mmol) em THF (5 ml) foi adicionado TDAF (1,0 M, 1,52 ml, 1,52 mmol) sob uma atmosfera de nitrogênio. A mistura de reação foi agitada por 3 horas, extinta com ácido acético glacial (1,0 ml) e concentrada *in vacuo*. Cromatografia em coluna (sílica flash) eluindo com 10% de metanol em acetato de etila produziu **7** (0,127 g, 82%) como um óleo incolor.

¹H RMN (d₆-DMSO, 400 MHz): 51,88 (s, 1 H, C=C-H), 2,07 (m, 2 H, H-2'), 2,36 (dt, 2 H, J = 7,2, 2,4 Hz, -CH₂CH₂-), 2,54 (t, 2 H, J = 6,8 Hz, -CH₂CH₂-), 3,53 (dd, 1 H, J = 12,0, 4,0 Hz, H-5'), 3,58 (dd, 1 H, J = 12,0, 4,0 Hz, H-5'), 3,76 (m, 1 H, H-4'), 4,19 (m, 1 H, H-3'), 5,07 (bs, 1 H, 0 H), 5,23 (bs, 1 H, O-H), 6,08 (t, 1 H, J = 6,4 Hz, H-1'), 8,11 (s, 1 H, H-6), 11,55 (bs, 1 H, N-H), ¹³C RMN (CDC1₃, 150,8 MHz): δ 17,6 (C'-C-CH₂CH₂), 18,9 (C=C-CH₂CH₂), 39,5 (C-2'), 60,7 (C-5'), 70,0 (C-3'), 73,7 (C=C-H), 75,1 (C=C), 84,6 (C-1'), 87,3 (C-4'), 89,1 (C=C), 93,0 (C=C), 100,2 (C-5), 144,7 (C-6), 151,0 (C-2), 163,2 (C-4), HRMS (FAB, +ve) calc., para C₁₅H₁₆N₂O₅ + Na [M+Na]⁺ 327,28771 verificado 327,09635, HRMS (FT-ICR MS -) calc., para C₁₅H₁₆N₂O₅ + AcO⁻ [M+AcO]⁻ 363,1198 verificado 363,1221, MS-MS calc., para C₁₅H₁₆N₂O₅ [M]⁻ 303,1 verificado 303,1.

A uma solução resfriada (0°C) de **7** (0,060 g, 0,197 mmol) e

1,8-bis(dimetilamino)naftaleno (esponja de prótons, 0,068 g, 0,316 mmol),
 fosfato de trimetil (2 ml) foi adicionado oxiclreto fosforoso (22 μ l, 0,237
 mmol) em goras durante 5 min., sob uma atmosfera de nitrogênio. A mistura
 de reação foi agitada por 3 horas a 0°C. Uma solução de pirofosfato de
 5 tributilamônio (0,080 g, 0,237 mmol) em DMF seco (2,0 ml) foi adicionada à
 mistura de reação e agitada por 1 min. seguida por extinção com bicarbonato
 de trietilamônio (1,0 M, 20 mL, pH = 8,5). A mistura de reação foi agitada
 por 2 h e hidrolisada durante a noite. Purificação de RP-HPLC (0-50% acetato de
 10 trietilamônio 0,1M $\rightarrow$ 20:80 H₂O : MeCN com gradiente de acetato de
 trietilamônio 0,1M durante 45 min em uma vazão de 5 ml.min⁻¹) produziu **8**
 (17,7 min) como o sal de trietilamônio. ³¹P RMN (D₂O, 81 MHz): δ 22,4 (t, 1
 P, J = 19,8 Hz, P- β), -10,5 (d, 1 P, J = 20,3 Hz, P- α), -9,7 (d, 1 P, J = 19,8 Hz,
 P- γ), MALDI-TOF (matriz ATT, modo negativo): 271 [M + 2 H]²⁺, 542 [M +
 2 H]⁺.

15 **5.2 Síntese de parceiros de reação de Click funcionalizados com azida dendriméricos**

Um esquema de reação detalhado para a síntese de dendrímeros funcionalizados com azida contendo uma pluralidade de grupos hemiacetal (grupos aldeído protegidos) é mostrado na Figura 11.

20 **Procedimento geral para a reação de ligação de triazol catalisada por Cu(I)**

A uma solução de **9** (7,31 g, 0,0256 mol.), **10** (3,00 g, 0,0128 mol.) em THF : H₂O (3 : 1, 40 mL) foi adicionada uma solução de CuSO₄ (0,103 g, 0,641 mmol.) em H₂O (3 mL) seguida por ascorbato de sódio sólido
 25 (0,253 g, 1,28 mmol.). A mistura de reação foi agitada durante a noite à temperatura ambiente. A suspensão foi diluída com H₂O (50 ml), resfriada até 0°C e tratada com NH₄OH concentrado (5 ml) por 10 minutos. A mistura de reação foi diluída com diclorometano (500 ml) e a camada orgânica lavada com salmoura (2 x 50 ml), seguida por H₂O (2 x 50 ml). A camada orgânica

foi retida, seca (MgSO_4) e concentrada *in vacuo*. Cromatografia em coluna (sílica flash) eluindo com 1 : 1 acetato de etila : álcool de petróleo produziu **9** (2,76 g), produto mono-Click (**11**, 3,94 g) como uma espuma incolor, seguida por **12** (4,92 g, 48%). O produto mono-Click (**11**) foi então reagido com um equivalente de **9** para produzir **12** quantitativamente após a elaboração e sem outra purificação requerida.

^1H RMN (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1,29 (s, 6 H, C- CH_3), 1,35 (s, 6 H, C- CH_3), 1,38 (s, 6 H, C- CH_3), 1,49 (s, 6 H, C- CH_3), 4,19 (m, 4 H, $\text{H4'}/\text{H5'}$), 4,32 (dd, 2 H, $J = 4,8, 2,4$ Hz, H 2'), 4,46 (dd, 2 H, $J = 14,4, 8,4$ Hz, H6''), 4,50 (s, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 4,62 (m, 2 H, H 3'), 4,64 (m, 2 H, H 6'), 5,18 (s, 4 H, $-\text{CH}_2-$), 5,51 (d, 2H, $J=4,8\text{Hz},\text{H1'}$), 6,59 (t, 1H, $J=1,8\text{Hz},\text{Ar-H}$), 6,64 (d, 2H; $J=1,8\text{Hz}, \text{Ar-H}$), 7,79 (s, 2 H, C= CH-). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 150,8 Mhz): δ 24,4 (C- CH_3), 24,7 (C- CH_3), 25,9 (C- CH_3), 26,0 (C- CH_3), 46,1 (CH_2-), 50,6 ($-\text{CH6'}/\text{H6''}$), 62,2 (Ar- CH_2-), 67,0 (CH4'), 70,1 (CH_2'), 70,5 (CH_3'), 70,9 (CH5'), 96,0 (CH1'), 102,0 (Ar-CH), 107,9, 109,1, 110,0, 124,0 (C= CH), 139,6, 143,4, 160,0, ESI-MS m/z 806 [$M + \text{H}$] $^+$,

A reação de **13** (1,53 g, 1,88 mmol,) e **10** (0,220 g, 0,94 mmol,) na presença de CuSO_4 (0,008 g, 0,047 mmol,) e ascorbato de sódio (0,019 g, 0,094 mmol,) produziu **14** (1,65 g, 95 %) como uma espuma incolor após cromatografia em coluna (SiO_2 flash; acetato de etila : metanol 9 : 1), ^1H RMN (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1,26 (s, 12 H, C- CH_3), 1,27 (s, 6 H, C- CH_3), 1,34 (s, 12 H, C- CH_3), 1,35 (s, 12 H, C- CH_3), 1,48 (s, 6 H, C- CH_3), 4,19 (m, 8 H, $\text{H4'}/\text{H5'}$), 4,32 (m, 4 H, H 2'), 4,46 (m, 4 H, H6''), 4,47 (s, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 4,62 (m, 4 H, H 3'), 4,64 (m, 4 H, H 6'), 5,12 (s, 8 H, $-\text{CH}_2-$), 5,15 (s, 4 H, $-\text{CH}_2-$), 5,40 (s, 4 H, $-\text{CH}_2-$), 5,49 (bd, 4 H, $J = 4,8$ Hz, H 1'), 6,50 (m, 4 H, Ar-H), 6,55 (m, 2 H, ArH), 6,58 (m, 1 H, Ar-H), 6,61 (m, 2 H, Ar-H), 7,59 (s, 2 H, C= CH-), 7,78 (s, 4 H, C= CH-). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 150,8 MHz): δ 24,4 (C- CH_3), 24,9 (C- CH_3), 25,9 (C- CH_3), 26,0 (C- CH_3), 45,9 (CH_2-), 50,4 ($-\text{CH6'}/\text{H6''}$), 53,9 (Ar- CH_2-), 61,8 (Ar- CH_2-), 61,9 (Ar- CH_2-), 67,0 (CH4'),

70,1 (CH₂'), 70,5 (CH₃'), 71,1 (CH₅'), 96,1 (CH₁'), 101,6, 101,7, 107,2, 108,0, 109,0, 109,9, 122,9, 124,2, 136,7, 140,0, 143,2, 144,1, 159,5, 160,0, MALDI-TOF (ATT, modo positivo): m/z 1859 [M + H]⁺.

Procedimento geral para a conversão de cloretos dendríticos em azidas

5 A uma solução de **12** (4,84 g, 6,01 mmol,) em acetona : água (4 : 1, 100 mL) foi adicionado NaN₃ (0,586 g, 9,01 mmol) e aquecidos até o refluxo sob uma atmosfera de nitrogênio por 3 horas. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila (600 ml) e a camada orgânica lavada com salmoura (2 x 50 ml) seguida por água (2 x 50 ml). A camada orgânica foi
10 retida, seca (MgSO₄) e concentrada *in vacuo* para produzir **13** (4,72 g, 97%) como um sólido amorfo branco.

¹H RMN (d6-acetona, 400 MHz): δ 1,28 (s, 6 H, C-CH₃), 1,35 (s, 6 H, C-CH₃), 1,36 (s, 6 H, C-CH₃), 1,44 (s, 6 H, C-CH₃), 4,30 (dd, 2 H, J = 3,6, 2,0 Hz, H 6'/6"), 4,32 (dd, 2 H, J = 3,2, 1,6 Hz, H 5'), 4,36 (dd, 2 H, J =
15 7,6, 1,6 Hz, H 4'), 4,39 (dd, 2 H, J = 4,8, 2,4 Hz, H 2'), 4,61 (d, 2 H, J = 3,6 Hz, H 6'/6"), 4,64 (s, 2 H, -CH₂-), 4,70 (dd, 2 H, J = 7,6, 2,4 Hz, H 3'), 5,20 (s, 4 H, -CH₂-), 5,47 (d, 2 H, J = 4,8 Hz, H 1'), 6,73 (m, 3 H, Ar-H), 8,07 (s, 2 H, C=C-H). ¹³C RMN (d6-acetona, 150,8 MHz): δ 25,7 (C-CH₃), 26,1 (C-CH₃), 27,2 (CCH₃), 27,4 (C-CH₃), 47,6 (CH₂-), 52,0 (-CH₆'iH₆"'), 63,4 (Ar-CH₂-),
20 68,8 (CH₄'), 72,0 (CH₂'), 72,5 (CH₃'), 72,9 (CH₅'), 98,2 (CH₁'), 103,3 (Ar-CH), 109,9 (Ar-CH), 110,4, 111,2, 126,3 (C=CH), 141,9, 144,8, 161,8, HRMS (ESI, +ve) calc. para C₃₇H₄₉N₉O₁₂Na 834,3398 [M+Na]⁺ verificado 834,3404.

A reação de **14** (1,51 g, 0,81 mmol,) e NaN₃ (0,079 g, 1,22
25 mmol,) produziu **15** (1,45 g, 96 %) como um sólido amorfo branco, ¹H RMN (CDCl₃, 600 MHz): δ 1,27 (s, 12 H, C-CH₃), 1,34 (s, 12 H, C-CH₃), 1,37 (s, 12 H, C-CH₃), 1,48 (s, 12 H, C-CH₃), 4,19 (m, 8 H, H₄'iH₅'), 4,24 (s, 2 H, -CH₂-), 4,32 (m, 4 H, H 2'), 4,46 (dd, 4 H, J = 13,8, 8,4 Hz, H₆"'), 4,62 (m, 4 H, H 3'), 4,64 (m, 4 H, H 6'), 5,12 (s, 4 H, -CH₂-), 5,18 (s, 8 H, -CH₂-), 5,43

(s, 4 H, -CH₂-), 5,49 (bd, 4 H, J = 4,8 Hz, H 1'), 6,50 (m, 2 H, Ar-H), 6,55 (m, 4 H, Ar-H), 6,58 (m, 1 H, Ar-H), 6,60 (m, 2 H, Ar-H), 7,78 (s, 2 H, C=CH-), 7,79 (s, 4 H, C=CH-). ¹³C RMN (CDCl₃, 150,8 MHz): δ 24,4 (C-CH₃), 24,8 (C-CH₃), 25,8(C-CH₃), 25,9 (C-CH₃), 45,9 (CH₂-), 50,4 (-CH₆'/H₆"'), 54,6 (Ar-CH₂-), 62,0 (Ar-CH₂-), 62,1 (Ar-CH₂-), 67,1 (CH₄''), 70,3 (CH₂''), 70,7 (CH₃''), 71,1 (CH₅''), 96,2 (CH₁''), 101,7, 101,8, 107,4, 107,7, 109,0, 109,9, 124,0, 124,2, 137,8, 143,1, 143,4, 144,1, 159,7, 159,9, HRMS (ESI, +ve) calc. para C₈₇H₁₁₀N₂₁O₂₆Na 1886,7829 [M+Na+H]⁺ encontrado 1887,7862.

Procedimento geral para a desproteção de isopropilideno dendrítico

10 A uma mistura de TFA : água (1 : 1; 10 mL) foi adicionado **13** (0,020 g, 24,7 μmol) sob uma atmosfera de nitrogênio. A mistura de reação foi aquecida a 50°C por 4 horas, seguida pela concentração *in vacuo*. Água (20 ml) foi adicionada à mistura e a camada aquosa foi lavada várias vezes com DCM (3 x 20 ml), retida e liofilizada durante a noite para produzir **16**
15 (0,015 g, 63 %) como uma espuma amarela pálida, MALDI-TOF (ATT, modo positivo): m/z 652 [M + H]⁺.

A reação de **15** (1,40 g, 0,75 mmol,) com TFA : água (1 : 1; 20 mL) produziu **17** (1,05 g, 90 %) como um sólido amorfo amarelo pálido, MALDI-TOF (ATT, modo positivo): m/z 1545 [M + H]⁺.

20 Exemplo 6

Incorporação de nucleosídeos e nucleotídeos modificados por alquino em ácidos nucleicos

Os nucleotídeos e nucleosídeos modificados por azida e alquino são eficientemente incorporados em ácidos nucleicos por síntese
25 química ou enzimática substancialmente como descrito no Exemplo 2. Os ácidos nucleicos modificados resultantes podem ser especificamente rotulados de acordo com a aplicação desejada, e.g., por rotulagem fluorescente ou deposição em metal.

Esta estratégia de rotulagem rápida e representa um método

extremamente sensível para a detecção de ácidos nucleicos, seqüências de ácidos nucleicos e genes mesmo sem a necessidade de amplificação de PCR.

Em um primeiro experimento, para investigar a performance da reação de Click dentro de uma arquitetura de DNA, os nucleosídeos **1** e **2** (Figura 9a e b) foram preparados e incorporados em oligonucleotídeos através de protocolos sintéticos em fase sólida padrão. A eficiência da reação de Click foi investigada usando benzil azida, CuSO₄, redutor (ascorbato ou TCEP) e um ligando de estabilização de cobre (I). Os resultados destes são sumarizados na Tabela 2. Os oligonucleotídeos compreendendo a base rígida **1** consistentemente produziram menores rendimentos do produto de Click quando comparado com o alquino flexível **2**. A temperatura (10 a 40°C) não afetou os rendimentos das reações de Click.

A eficiência da reação de Click foi então avaliada como uma função tipo azida exibindo propriedades adequadas para detecção (Figura 12). As azidas de fluoresceína são marcadores fluorescentes extremamente sensíveis (rendimento de quantum fluorescente quase uma unidade), enquanto que a azida de coumarina fornece uma prova de marcador de Click quando fluorescência for comutada na formação de triazol [19].

TABELA 2: Sumário de reações de Click usando azida de benzil, CuSO₄ e TCEP

seqüência ODN	X = 1			X = 2		
	Rendimento (%)					
	Material inicial	Produto desejado	Outros produtos	Material inicial	Produto desejado	Outros produtos
3'-GCG CTT ACX TGT CGC G-5'	3	97	-	-	100	Redução de azida
3'-GCG CTT ACX XGT CGC G-5'		84	16 (monoclick)	-	100	Redução de azida
3'-GCG CTT ACX TGX CGC G-5'		94	6 (monoclick)	-	100	Redução de azida
3'-GCG CTX ACX TGX CGC G-5'		84	16 (bisclick)	NA	NA	NA

Consistente com os experimentos envolvendo o uso de azida de benzil, nucleotídeos de oligodeoxi compreendendo o alquino rígido produziram menores rendimentos de conversão de Click. Os

oligonucleotídeos contendo alquino funcionais forneceram, em contraste, conversão quase quantitativa de acordo com HPLC e MALDI-TOF. A rotulagem de DNA foi novamente possível diretamente no gel. O DNA contendo o nucleobase modificado foi separado de outros filamentos de DNA por eletroforese de gel e o gel foi tratado com a azida de fluoresceína e Cu(I) para realizar o Click. A lavagem do gel removeu fluoresceína em excesso, deixando para trás o DNA manchado no gel (Figura 13).

Destes experimentos pode ser claramente deduzido que DNA contendo as bases de alquino modificadas podem ser rotuladas seletivamente com fluoresceína. CYBR verde colore DNA não especificamente e, portanto, mascara também DNA não modificado com a reação de click como nas faixas 1 de A2 e 3 de B2 (Figura 13).

Fluoresceína é uma molécula que fluoresce fortemente como um monômero e após clicking ao DNA. Após a reação de click com fluoresceína, o gel tem que ser lavado de forma a remover fluoresceína em excesso, que deixou para trás o DNA manchado.

Coumarina é uma molécula fluorescente alternativa, que é, contudo, não fluorescente como um monômero. Ela inicia a emitir fluorescência somente após a reação de Click, quando a azida é convertida no triazol. A fluorescência da coumarina comuta afetivamente após o click, como visto no experimento abaixo em tubos de reação (Figura 14). Um experimento similar pode ser feito no gel.

Em um outro experimento, a eficiência da reação de Click foi investigada com oligodesoxinucleotídeos (ODN) incorporando o nucleosídeo 2 (Figura 15). Este nucleosídeo foi incorporado em oligonucleotídeos através de protocolos sintéticos em fase sólida padrão usando a fosforamidita correspondente 1 (Figura 15). Os oligonucleotídeos compreendendo um ou vários grupos repórteres de alquino são mostrados na Tabela 3.

TABELA 3

Sequências ODN	X = 19
----------------	--------

	Massa	
	Material inicial	Produto
3'-GCG CTT ACX TGT CGC G-5'	ODN1	ODN1-P
	4952 (calc)	5157 (calc)
	4955 (obs)	5157 (obs)
3'-GCG CTT ACX XGT CGC G-5'	ODN2	ODN2-P
	5042 (calc)	5452 (calc)
	5042 (obs)	5455 (obs)
3'-GCG CTT XXX XXX CGC G-5'	ODN6	ODN6-P
	5407 (calc)	6637 (calc)
	5413 (obs)	6646 (obs)

O procedimento de Click envolvia a adição sequencial de soluções de azida **3** (Figura 15) (solução DMSO, 10 mM, 50 eq), complexo CuSO₄ / ligando [29] (solução DMSO, 0,05 M, 20 eq) e TCEP (solução aquosa, 0,1 M, 40 eq.) a uma solução 0,2 mM do ODN correspondente. A mistura de reação foi chacoalhada à temperatura ambiente durante a noite. As amostras foram então dessalinizadas por membrana e sua massa determinada por MALDI-TOF (matriz HPA).

Exemplo 7

Amplificação de PCR de padrões de DNA com dNTPs modificados

10 7.1 Amplificação de PCR de pol η de levedura

Padrão e iniciadores empregados para experimentos de PCR:

Iniciador para frente 5'-GATTTGGGCCGGATTTGTTTC

Iniciador reverso 3'-TTTTATGCTATCTCTGATACCCTTG

Padrão: seqüência de 318 bp (nt483-800 de Rad30) de levedura:

GGGCCGGATTTGTTTCAATATGCTAATGTTTGATAATGAGTACGAG
 CTTACAGGCGACTTGAAACTGAAAGATGCATTAAGCAATATTCGT
 GAGGCTTTTATAGGGGGCAACTATGATATAAATTCCCATCTACCTC
 TTATACCCGAAAAGATAAAGTCTCTGAAGTTTGAAGGCGATGTTTT
 CAATCCAGAGGGCAGAGATCTGATCACAGATTGGGACGATGTAAT
 ACTTGCACTAGGATCTCAGGTATGCAAGGGTATCAGAGATAGCAT
 AAAAGATATTCTCGGTTATACTACTTCGTGTGGTTTGTCTAGCAC

15 O padrão de 318 bp contém 59,75% [A+T] e 40,25% [C+G].

Uma série de polimerases termoestáveis comercialmente

disponibilizadas foram avaliadas quanto à capacidade de incorporar os trifosfatos de deoxiuridina modificados **2 e 8** (Figura 10) usando a reação PCR. As polimerases de DNA usadas foram:

Pwo and Taq (exo⁻) DNA polimerase (Roche)

5 Vent, Vent (exo), therminator polimerase (da New England Biolabs) Taq (promega).

Uma reação PCR típica continha 0,05 µg de S genômico, cerevisiae YPH 499 ou 0,5 µg de padrão DNA (pDest17-Poleta yeast[1-1889]), 0,3 mM cada dos iniciadores para frente e para trás, 1,25 U polimerase e 10x tampão de polimerase com magnésio, 200 µM de cada dNTPs não modificados (dATP, dCTP e dGTP; NEB) e 200 µM de dUTP modificado. Para o controle eram trifosfatos naturais (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) usados. As reações foram feitas em um volume total de 50 µl. Os experimentos PCR foram realizados em um Eppendorf Mastercycler Personal.

15 Para amplificação "hotstart" (2 min a 94°C) foi usado, seguido por 10 ciclos de amplificação (15 s a 94°C, 30 s a 53°C, 45 s a 72°C), 25 ciclos (15 s a 94°C, 30 s, 45 s a 72°C) e uma incubação final por 2 min a 72°C. Os produtos PCR foram analisados em um gel de agarose 2% pelo manchamento com brometo de etídio (Figura 16). Os produtos PCR foram purificados em um kit de purificação PCR ClAquick (Qiagen), e usado para manchamento com prata, seqüenciamento ou digestão. Os produtos de reação PCR foram separados por eletroforese de 2% de gel de agarose contendo brometo de etídio. Os produtos foram gravados com uma câmera Ultra-Violet Products CCD.

25 **7.2 Amplificação de PCR de polH de humano**

Uma reação PCR típica continha 0,5 µg de padrão de DNA (pDest17-plH humano [1-2142], 0,3 mM cada dos iniciadores para frente e reverso, 1,25 U Pwo polimerase e tampão de polimerase 10x com magnésio, 200 µM de cada dNTPs não modificados (dATP, dCTP e dGTP; NEB) e 200

μM de dUTP modificado. Para o controle, trifosfatos naturais (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) foram usados. As reações foram feitas em um volume total de 50 μl . Experimentos PCR foram realizados em um Eppendorf Mastercycler Personal.

5 Para amplificação "hotstart" (2 min a 94°C) foi usado, seguido por 10 ciclos de amplificação (15 s a 94°C, 30 s a 53°C, 45 s a 72°C), 30 ciclos (15 s a 94°C, 30 s a 56°C, 210 s a 72°C) e uma incubação final por 7 min a 72°C. Os produtos PCR foram analisados em um gel de agarose 1% pelo manchamento com brometo de etídio. Os produtos PCR foram
10 purificados em um kit de purificação PCR ClAquick (Qiagen), e usados para sequenciamento ou digestão.

Os produtos de reação PCR foram separados por eletroforese de 1% de gel de agarose contendo brometo de etídio. Os produtos foram gravados com uma câmera Ultra-Violet Products CCD. Os resultados são
15 mostrados na Fig. 17.

Para elaboração, 6 μl de HCl 0,1M foram adicionados e as sondas centrifugadas (6000 rpm, 5 min). O digerido foi analisado por HPLC (coluna interchim Interchrom Uptisphere 3 HDO (150 x 2,1 mm), Tampão A: 2 mM TEA/HOAc em H_2O ; Tampão B: 2 mM TEA/HOAc H_2O :MeCN 1:4; 0
20 → 30 min; 0 % → 30 % B; 30 → 32 min; 30 % → 100 % 13; 32 → 36 min; 100 % 13; 36 → 38 min; 100 % B; 38 → 60 min; 0% B; fluxo 0,2 ml/min) (Figura 18). Os picos diferentes foram avaliados por co-injeção, UV e FT-ICR-HPLC-MS-MS usando as mesmas condições.

25 **7.3 Digestão enzimática de fragmentos de PCR (318 mer) incorporando um nucleotídeo mediado por alquino**

Para a digestão enzimática do padrão de DNA com 318 bp contendo o nucleotídeo modificado 8 (Figura 10) (ca. 10 μg em 100 μl de água) foi incubado em 10 μl de Tampão A (300 mM de acetato de amônio, 100 mM de CaCl_2 , 1 mM de ZnSO_4 , pH 5,7), 22 unidades de Nuclease P1

(*Penicilium citrium*) e 0,05 unidades de Fosfodiesterase II de baço de bezerro. A amostra foi chacoalhada a 37°C por 3 h. A digestão estava completa pela adição de 10 µl de Tampão B (500 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), 10 unidades de fosfatase alcalina (CIP) e 0,1 unidade de Fosfodiesterase I de veneno de cobra (veneno *Crocalus adamanteus*). A amostra foi chacoalhada por outras 3 h a 37°C.

7.4 Procedimento Geral para a reação de ligação de triazol catalisada por Cu(I) de azidas de açúcar com ds DNA modificados em géis de poliacrilamida

Todos os experimentos de click foram corridos em fragmentos de PCR de 318 bp compreendendo 2 ou 8 (Figura 10) em lugar de dTTP. Os fragmentos de PCR modificados foram separados em géis de poliacrilamida 5%, então cada gel foi colocado em um banho compreendendo 1 : 1 MeOH : H₂O (25 mL). Uma solução de azida de açúcar (0,1 M, 3 ml) foi adicionada ao banho, seguida por uma solução de CuSO₄ (0,1 M, 600 µl) e finalmente TCEP (0,1 M, 1,2 ml). Estas soluções foram agitadas gentilmente à temperatura ambiente durante a noite.

7.5 Procedimento Geral para o manchamento com prata de azidas de açúcar ligadas ao DNA de filamento duplo

A solução de click foi decantada e cada gel foi lavado com 1 : 1 MeOH H₂O (3 x 50 mL, 10 min, cada lavagem), seguida por H₂O (3 x 50 mL, 10 min, cada lavagem). Cada gel foi então incubado com o reagente de Tollens (40 ml) por 30 min. Após lavagem subsequente com H₂O (3 x 50 mL, 10 min, cada lavagem), os géis foram desenvolvidos com uma solução de desenvolvimento compreendendo 100 ml de H₂O, ácido cítrico (1%, 250 µl) e formaldeído (35%, 80-200 µl). Dependendo da concentração de formaldeído, o processo de desenvolvimento pode variar de 2 min a 20 min.

Conclusão

A presente invenção proposta envolve um novo método para a

rotulagem específica para um local de ácidos nucleicos através da incorporação eficiente de trifosfatos modificados. Estes trifosfatos modificados compreendem grupos que podem ser também funcionalizados, marcados ou manchados de acordo com a necessidade do usuário. É

5 previsível que a rotulagem de RNA pode ser alcançada através destes métodos, bem como usando RNA polimerases e transcriptase reversa, respectivamente. Portanto, uma detecção precoce e eficiente de genomas virais dentro de um hospedeiro pode ser efetuada. O novo protocolo de rotulagem com ácido nucleico relatado é simples, sensível, eficiente e

10 altamente seletivo.

Exemplo 8

Deteção de ácidos nucleicos usando processos fotográficos

O processo fotográfico em preto e branco é um dos métodos químicos mais sensíveis conhecidos. Os fótons capturados em papel

15 fotográfico iniciam a formação de pequenos núcleos de Ag que catalisam outra deposição de prata durante um processo de desenvolvimento subsequente [22]. Isto faz surgir fatores de amplificação de sinal entre 10^5 para redução química de Ag^+ e 10^{11} para redução fotoquímica de Ag^+ que são similares àqueles obtidos usando o PCR.

—20 Foi desenvolvido um método sensível que utiliza corantes foto-sensibilizadores presos a ácidos nucleicos, que possibilita que alguém detecte um gene particular em sensibilidade subfemtomolar (Figura 21). Este novo método é simples (pode usar materiais fotográficos convencionais), rápido (deteção em minutos), eficiente (somente uma molécula foto-

25 sensibilizadora é requerida por biomolécula) e sensível (níveis de sensibilidade não otimizados correntes são 10^{-14} - 10^{-15} mol). O acoplamento desta metodologia com ferramentas bioquímicas específicas para genes, tais como extensão de iniciador e tecnologias de PCR fornece um novo e poderoso método para a detecção de ácidos nucleicos e outros analitos.

Vários derivados de cianina indolina fluorescente (1 e 2) e de corante de quinolina (3) foram investigados quanto à sua capacidade de agir como foto-sensibilizadores em um processo fotográfico (Figura 22). As máximas absorções visíveis para 1-3 são, respectivamente, 546 nm, 646 nm e 607 nm, respectivamente.

O corante de indolina (1) foi prontamente detectado até 3×10^{-14} mol. (30 fmol), enquanto que o limite de detecção de (2) foi aproximadamente 1-3 fmol (Figuras 22a e 22b). A detecção do corante de quinolina cianina (3) foi verificado ser mais sensível (limite de detecção ~0,3 fmol) do que os corantes de indolina (Figura 22c). A névoa de base pode ocorrer na irradiação com luz intensa, contudo, névoa pode ser suprimida usando-se uma fonte de luz infravermelha de baixa intensidade, embora sensibilidade seja de alguma forma menor (Figura 22d-f).

Os experimentos de controle (Figura 23) usando oligodeoxiribonucleotídeos não modificados (ODN-1, ODN-2, ODN-3) produziram uma pequena resposta fotográfica negativa da base na irradiação de alta energia em níveis de 50 nmol (i.e., diferença de três ordens de grandeza). Os níveis de base negativos podem ser suprimidos completamente se irradiação for conduzida com uma lâmpada de infravermelho por 5 minutos (Figura 23b). Em suma, DNA não modificado não fornece manchamento.

Uma série de diluição de ODNs presos a corantes comercialmente disponibilizados Cy5 ($\lambda_{\max} = 646$ nm, ODN-4) e Cy5,5 ($\lambda_{\max} = 646$ nm, ODN-5) foram testados (Figura 16). O limite de detecção de ODN-4 foi verificado ser 100 fmol, enquanto que a sensibilidade de detecção de Cy5.5 ODN-5 foi um fator de dez maior (limite de detecção 10 fmol). Portanto, embora uma leve diminuição na sensibilidade fosse observada com ODNs conjugados com corante de cianina quando comparados com seus controle não-presos (Figura 24), os resultados claramente demonstram que a fotografia de biomoléculas conjugadas com o foto-sensibilizador, tais como

ODNs, podem ser usados em uma ferramenta analítica altamente sensível.

Os corantes foto-sensíveis, e.g., compostos 4 ou 5, também podem ser introduzidos em ácidos nucleicos através de química de Click (Figura 25).

5 Conclusão

Uma metodologia fotográfica pode ser acoplada com ácidos nucleicos de corante foto-sensíveis para criar um método rápido, eficiente, simples e sensível para detecção de analito, e.g., ácido nucleico.

Exemplos adequados de grupos foto-sensibilizadores são corantes de cianina baseados em quinolina (e.g., 3) ou corantes de indolina (e.g., 1 ou 2), como mostrado na Figura 22, que oferecem sensibilidades de pelo menos 10 fmol (1), 1 fmol (2) ou 0,1 fmol (3).

Os corantes baseados em indolina, tais como Cy5 e Cy5.5 presos a oligodesoxirribonucleotídeos, podem ser detectados em níveis de 100 fmol e 10 fmol, respectivamente.

Literatura

[1] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, Nature 1998, 391, 775.

[2] M. Mertig, L. C. Ciacchi, R. Seidel, W. Pompe, A. De Vita, Nano Letters 2002, 2, 841.

[3] J. Richter, Physica E 2003, 16, 157.

[4] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, Science 2002, 297, 72.

[5] F. Patolsky, Y. Weizmann, O. Lioubashevski, I. Willner, Angew Chem. Int. Ed. 2002, 41, 2323.

[6] E. Katz, I. Willner, Angewandte Chemie-International Edition 2004. 43. 6042.

[7] K. Keren, R. S. Berman, E. Braun, Nano Letters 2004, 4, 323.

- [8] Y. Weizman, F. Patolsky, I. Popov, I. Willner, *Nano Letters* 2004, 4, 787.
- [9] C. F. Monson, A. T. Woolley, *Nano Letters* 2003, 3, 359.
- [10] S. Brakmann, S. Lobermann, *Angewandte Chemie-
International Edição* 2001, 40, 1427.
- [11] K. Burgess, D. Cook, *Chemical Reviews* 2000, 100, 2047.
- [12] J. Ludwig, F. Eckstein, *Journal of Organic Chemistry* 1991, 56, 1777.
- [13] A. Roychowdhury, H. Illangkoon, C. L. Hendrickson, S. A. Benner, *Organic Letters* 2004, 6, 489.
- [14] B. Tollens, *Chem. Ber.* 1882, 15, 1635.
- [15] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2004.
- [16] B. W. Kirk, M. Feinsod, R. Favis, R. M. Kliman, F. Barany, *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, 3295.
- [17] X.-b. Zhong, R. Reynolds, J. R. Kidd, K. K. Kidd, R. Jenison, R. A. Marlar, D. C. Ward, *PNAS* 2003, 100, 11559.
- [18] A. C. Syvanen, *Nat. Rev. Genet.* 2001. 2. 930.
- [19] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Organic Letters* 2004, 6, 4603.
- [20] J. D. Kahi, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 598-604.
- [21] R. Micura, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002. 41 813), 2265-2269.
- [22] T. H. James, in *Advances in Photochemistry* Vol. 13 (Eds. D. H. Volman, K. Gollnick, G. Hammond). John Wiley & Sons New York. 1986, p, 329ff.
- [23] P. J. Barr, A. S. Jones, P. Serafinowski, R. T. Walker, *J. Chem. Soc., Perk. Trans. 1*, 1978, 10, 1263.

[24] L. Otvos, J. Szecsi, J. Sagi, T. Kovacs, Nucleic Acids Symp. Ser. 1987, 18, 125.

[25] K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Takahashi, I. Salto, J. Am. Chem. Soc. **2000**, 122, 5646.

5 [26] F. MorisVaras, X. H. Qian, C. H. Wong, J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 7647.

[27] D. C. M. Kong, M. von Itzstein, Carbohydrate Research 1997, 305, 323.

10 [28] D. Graham, J. A. Parkinson, T. Brown, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1998, 1131-1138.

[29] Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, M.G. Finn, J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 3192-3193.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a detecção de um analito selecionado de ácidos nucleicos em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 (i) fornecer uma amostra;

(ii) contatar a amostra com um composto funcionalizado compreendendo pelo menos um grupo funcional selecionado de grupos alquino e azida, que é um primeiro parceiro de reação para uma reação Click, dita reação Click sendo uma reação de cicloadição (3+2) entre grupos azida e alquino formando um anel 1,2,3-triazol, e em que o grupo funcional é ligado a um nucleobase de um composto nucleosídico ou nucleotídico, ou um oligômero ou polímero do mesmo, sob condições em que dito composto forma um produto associado com o analito a ser detectado ou o complemento do mesmo;

15 (iii) contatar o produto associado com um segundo parceiro de reação para dita reação Click compreendendo o grupo azida ou alquino complementar sob condições em que uma reação Click entre o primeiro e segundo parceiros de reação ocorre, em que o segundo parceiro de reação ainda compreende um grupo marcador ou um grupo precursor de marcador,

20 (iv) se necessário, converter os grupos precursores de marcadores em grupos marcadores, e

(v) detectar os ditos grupos marcadores.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma detecção qualitativa.

25 3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende uma detecção quantitativa.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o analito a ser detectado é um ácido nucleico selecionado a partir de DNA e RNA.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra biológica.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra agrícola ou nutricional.

5 7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra clínica.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a detecção é realizada diretamente sem amplificação.

10 9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a detecção é realizada em combinação com uma etapa de amplificação.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que uma detecção específica para sequência de um analito de ácido nucleico é realizada.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a formação do dito produto associado compreende uma reação de hibridização específica para sequência.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a nucleobase é selecionada a partir de bases purina e pirimidina de ocorrência natural ou de ocorrência não-natural.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o grupo funcional é ligado nas posições 5 e 6, preferencialmente na posição 5, de uma nucleobase de pirimidina ou nas posições 7 e 8, preferencialmente na posição 7, de uma nucleobase de purina.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o grupo funcional é ligado ao composto através de uma ligação direta ou espaçador.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado

pelo fato de que o dito espaçador é um espaçador flexível ou um espaçador pelo menos parcialmente rígido.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o espaçador compreende pelo menos um grupo selecionado
5 dentre grupos alqueno, grupos alquino, grupos cíclicos, particularmente grupos aromáticos e heteroaromáticos, e combinações destes.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o dito composto funcionalizado é selecionado de:

10 (i) um bloco de construção de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico funcionalizado e/ou

(ii) um ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico funcionalizado.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado
15 pelo fato de que a formação do dito produto associado compreende a incorporação do dito bloco de construção funcionalizado em uma molécula de ácido nucleico ou de análogo de ácido nucleico.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado
20 pelo fato de que o dito nucleotídeo funcionalizado ou análogo de nucleotídeo é enzimaticamente incorporado em uma molécula de ácido nucleico.

20. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a formação do dito produto associado compreende a ligação do dito ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico funcionalizado ao analito a ser detectado.

25 21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a ligação compreende a hibridização em um analito de ácido nucleico.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 21, caracterizado pelo fato de que compreende uma reação de extensão de

iniciador opcionalmente em combinação com uma reação de amplificação de ácido nucleico.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 5 fornecer pelo menos uma molécula iniciadora que hibridiza sob as condições de ensaio com o analito de ácido nucleico a ser detectado ou seu complemento, e
- estender o dito iniciador,
- em que pelo menos um nucleotídeo ou análogo de nucleotídeo
- 10 funcionalizado é incorporado no produto de extensão.

24. Método de acordo com a reivindicação 22 ou 23, caracterizado pelo fato de que compreende:

- fornecer pelo menos uma molécula iniciadora funcionalizada que hibridiza sob as condições de ensaio com o analito de ácido nucleico a ser
- 15 detectado ou seu complemento,
- estender a dita molécula iniciadora,
- em que uma molécula iniciadora estendida é formada.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 20 fornecer uma sonda de hibridização funcionalizada que hibridiza sob as condições de ensaio com o analito de ácido nucleico a ser detectado ou seu complemento,
- em que um produto de hibridização é formado.

26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19

25 a 25, caracterizado pelo fato de que compreende:

- fornecer uma sonda de hibridização funcionalizada que hibridiza sob as condições de ensaio com o analito de ácido nucleico a ser detectado ou o seu complemento, e
- submeter o produto de hibridização a um tratamento em que

um produto de hibridização contendo pelo menos uma diferença é dissolvido, em que a presença de um produto de hibridização não dissolvido é indicativa da presença e/ou quantidade de um ácido nucleico que tem uma sequência completamente complementar à sonda de hibridização.

5 27. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um tratamento de digestão de diferença.

 28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o tratamento de digestão de diferença compreende contatar o
10 produto de hibridização com uma glicosilase de diferença.

 29. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende um tratamento de hibridização diferencial.

 30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1
15 a 29, caracterizado pelo fato de que a detecção é realizada por meios ópticos.

 31. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizado pelo fato de que a detecção é realizada por meios elétricos.

 32. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, caracterizado pelo fato de que compreende uma detecção paralela de
20 uma pluralidade de ácidos nucleicos.

 33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que a detecção é realizada em uma superfície sólida, por exemplo, em um chip de microarranjo.

 34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1
25 a 33, caracterizado pelo fato de que o segundo parceiro de reação compreende um grupo marcador selecionado dentre grupos marcadores opticamente detectáveis, particularmente grupos marcadores de fluorescência ou de grupos marcadores ativos redox.

 35. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1

a 34, caracterizado pelo fato de que o segundo parceiro de reação compreende um grupo precursor de marcador selecionado dentre grupos aldeído e grupos aldeído protegidos e grupos precursores de aldeído.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado
5 pelo fato de que converter os grupos precursores de marcador em grupos marcadores compreende a formação de deposições de metal em torno de grupos aldeído.

37. Kit reagente para a detecção de um analito em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

10 (a) um composto funcionalizado compreendendo

(a.1) pelo menos um grupo funcional Click selecionado a partir de grupos alcino e azida que é um primeiro parceiro de reação para uma reação Click, dita reação Click sendo uma reação de cicloadição (3+2) entre grupos azida e alcino formando um anel 1,2,3-triazol, e

15 (a.2) um bloco de construção de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico, em que o grupo funcional é ligado a uma nucleobase,

(b) um segundo parceiro de reação para dita reação Click compreendendo o grupo azida ou alquino complementar, em que o segundo parceiro de reação compreende ainda um grupo marcador ou um grupo
20 precursor de marcador, e

(c) opcionalmente um reagente de formação de marcador capaz de converter os grupos precursores de marcador em grupos marcadores.

38. Kit reagente de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de ser para aplicações agrícolas.

25 39. Kit reagente acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de ser para a detecção de ácidos nucleicos de plantas, patógenos de planta ou pestes de planta, tais como insetos.

40. Kit reagente de acordo com a reivindicação 38 ou 39, caracterizado pelo fato de ser para a detecção de variabilidades genéticas, por

exemplo, SNPs em plantas, patógenos de planta ou pestes de planta.

41. Kit reagente de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 40, caracterizado pelo fato de ser para detectar ou monitorar resistências, tolerâncias ou intolerâncias a herbicida, fungicida ou pesticida, por exemplo, resistências, tolerâncias ou intolerâncias a pesticida em fungos, insetos ou plantas.

42. Kit reagente de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 41, caracterizado pelo fato de ser para a genotipação, por exemplo, para a detecção e/ou diferenciação de espécies ou cepas de fungos, insetos ou plantas.

43. Kit reagente de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 42, caracterizado pelo fato de ser para a detecção e/ou diferenciação de organismos ou cepas geneticamente modificadas, por exemplo, organismos ou cepas de fungos, insetos ou plantas.

44. Kit reagente de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de ser para aplicações diagnósticas ou forenses.

45. Kit reagente de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de ser para detectar variabilidades genéticas, por exemplo, SNPs em humanos.

46. Kit reagente de acordo com a reivindicação 44 ou 45, caracterizado pelo fato de ser para detectar resistências, tolerâncias ou intolerâncias, ou alergias a medicamentos.

47. Kit reagente de acordo com a reivindicação 44 ou 45, caracterizado pelo fato de ser para genotipação.

48. Kit reagente de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 47, caracterizado pelo fato de ser para a detecção de organismos ou cepas geneticamente modificadas, por exemplo, organismos ou cepas de bactérias ou vírus.

49. Kit reagente de acordo com qualquer uma das

reivindicações 44 a 48, caracterizado pelo fato de ser para diagnosticar doenças, por exemplo, doenças genéticas, doenças de alergia, doenças autoimunes ou doenças infecciosas.

50. Kit de reagente de acordo com a reivindicação 37,
5 caracterizado pelo fato de ser para a detecção de função e/ou expressão de genes.

51. Kit reagente de acordo com a reivindicação 37,
caracterizado pelo fato de ser para proteção de marca.

52. Kit reagente de acordo com a reivindicação 51,
10 caracterizado pelo fato de ser para a detecção de informação específica codificada em produtos.

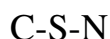
53. Kit reagente de acordo com a reivindicação 37,
caracterizado pelo fato de ser para aplicações nutricionais, particularmente na área alimentícia.

15 54. Kit reagente de acordo com a reivindicação 37,
caracterizado pelo fato de ser para análise epigenéticas.

55. Kit reagente de acordo com a reivindicação 54,
caracterizado pelo fato de ser para a análise de um padrão de metilação de DNA.

20 56. Uso do kit reagente como definido na reivindicação 37,
caracterizado pelo fato de ser em um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 36.

57. Molécula de ácido nucleico ou de análogo de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de ter incorporada nela pelo menos um
25 composto da fórmula (II):



em que C é um grupo funcional Click selecionado a partir de grupos alquino e azida, que é um primeiro parceiro de reação para uma reação Click, dita reação Click sendo uma reação de cicloadição (3+2) entre grupos

azida e alquino formando um anel 1,2,3-triazol,

S é um espaçador, e

N é um bloco de construção de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico, tal como um composto nucleosídico ou nucleotídico,

5 em que o grupo funcional é um grupo alquino ligado às posições 5 e 6, preferivelmente na posição 5, de uma nucleobase de pirimidina ou nas posições 7 e 8, preferivelmente na posição 7, de uma nucleobase de purina, e em que a molécula de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico é capaz de hibridizar com um ácido nucleico complementar.

10 58. Molécula de ácido nucleico ou de análogo de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de que é um ácido nucleico selecionado de DNA e RNA, ou uma molécula de análogo de ácido nucleico selecionada de ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos de morfolino ou ácidos nucleicos travados.

15 59. Método de sintetização de uma molécula de ácido nucleico ou de análogo de ácido nucleico que é capaz de hibridizar com um ácido nucleico complementar como definido na reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que compreende a incorporação de um bloco de construção de nucleotídeo ou análogo de nucleotídeo compreendendo um composto (II):

C-S-N

20 em que C é um grupo funcional Click selecionado a partir de grupos alquino e azida, que é um primeiro parceiro de reação para uma reação Click, dita reação Click sendo uma reação de cicloadição (3+2) entre grupos azida e alquino formando um anel 1,2,3-triazol,

S é um espaçador, e

25 N é um bloco de construção de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico, tal como um composto nucleosídico ou nucleotídico,

em que o grupo funcional é um grupo alquino ligado às posições 5 e 6, preferivelmente na posição 5, de uma nucleobase de

pirimidina ou nas posições 7 e 8, preferivelmente na posição 7, de uma nucleobase de purina em uma molécula de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico.

5 60. Método de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que compreende uma síntese química e/ou uma síntese enzimática.

61. Método de acordo com a reivindicação 59 ou 60, caracterizado pelo fato de que ainda compreende contatar a molécula de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico com um segundo parceiro de reação do
10 composto (II) e realizar uma reação Click entre o primeiro e segundo parceiros de reação, dita reação Click sendo uma reação de cicloadição (3+2) entre grupos azida e alquino formando um anel 1,2,3-triazol.

62. Produto associado, caracterizado pelo fato de ser da molécula de ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico como definido na
15 reivindicação 57 ou 58 com um analito.

63. Produto de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que é um produto de hibridização com um ácido nucleico complementar.

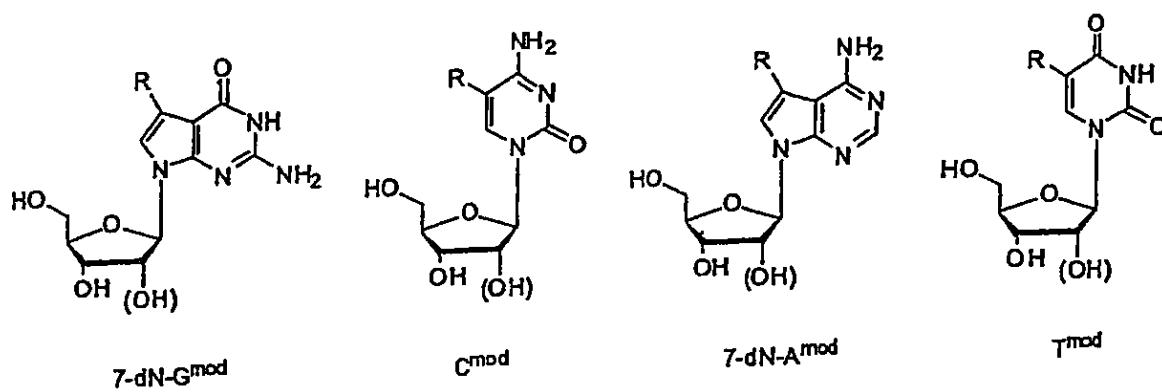
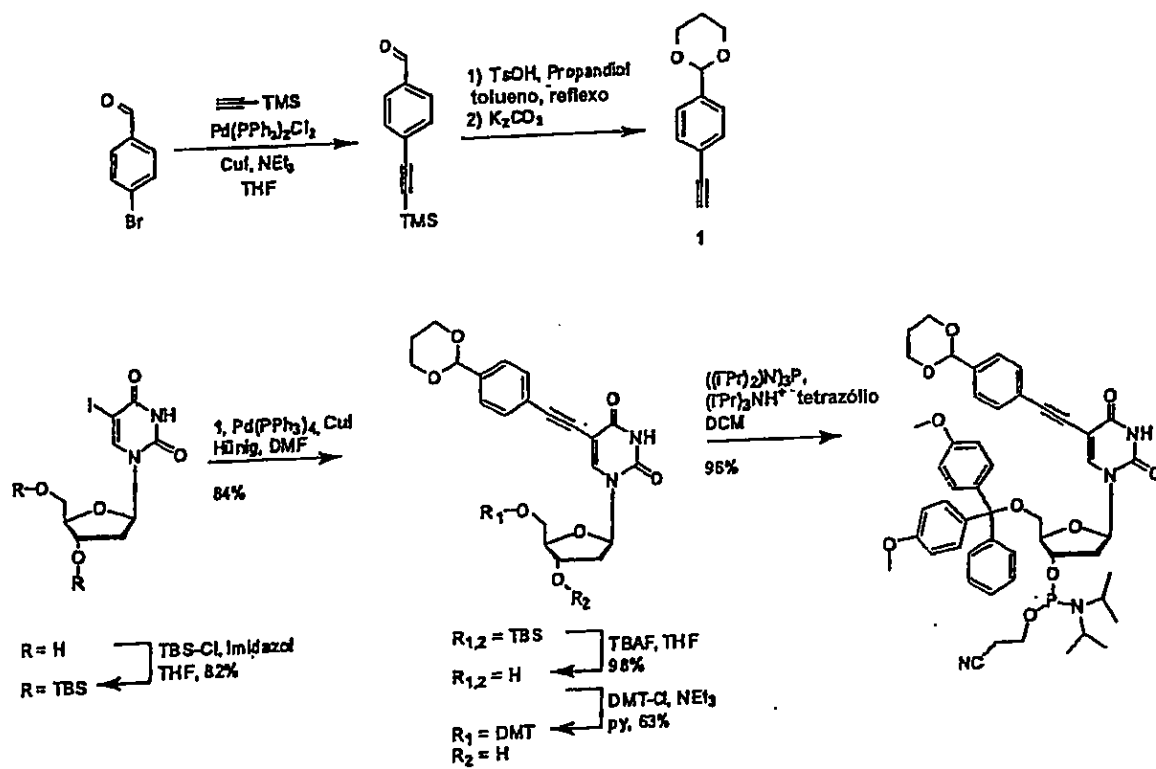
Figura 1

Figura 2



1) DMF dioxano,
2) (n-Bu)₄N pirofosfato 15 min
3) 1% I₂ py/H₂O 88:2 15 min
4) NaHSO₃ 30 min
5) NH₃ 1h

R₁ = TBDPS
R₂ = H
R₁ = TBDPS
R₂ = Ac
R₁ = H
R₂ = Ac

AcCl, DMAP
TBAF

O=P([O-])([O-])OP(=O)([O-])[O-]OP(=O)([O-])[O-]OC[C@H]1O[C@@H](C#CC#CCCC#CC)[C@H](c2nc(=O)[nH]c2=O)[C@H](O)[C@H]1OCC1(C)C(C(C(C1O)COP(=O)([O-])OP(=O)([O-])OP(=O)([O-])O)C2=NC(=O)C#CC3C(C(C(C(C3O)COP(=O)([O-])OP(=O)([O-])OP(=O)([O-])O)C4=CC=CC=C4)C5=CC=CC=C5)C6=CC=CC=C6)C7=CC=CC=C7)C8=CC=CC=C8)C9=CC=CC=C9)C10=CC=CC=C10)C11=CC=CC=C11)C12=CC=CC=C12)C13=CC=CC=C13)C14=CC=CC=C14)C15=CC=CC=C15)C16=CC=CC=C16)C17=CC=CC=C17)C18=CC=CC=C18)C19=CC=CC=C19)C20=CC=CC=C20)C21=CC=CC=C21)C22=CC=CC=C22)C23=CC=CC=C23)C24=CC=CC=C24)C25=CC=CC=C25)C26=CC=CC=C26)C27=CC=CC=C27)C28=CC=CC=C28)C29=CC=CC=C29)C30=CC=CC=C30)C31=CC=CC=C31)C32=CC=CC=C32)C33=CC=CC=C33)C34=CC=CC=C34)C35=CC=CC=C35)C36=CC=CC=C36)C37=CC=CC=C37)C38=CC=CC=C38)C39=CC=CC=C39)C40=CC=CC=C40)C41=CC=CC=C41)C42=CC=CC=C42)C43=CC=CC=C43)C44=CC=CC=C44)C45=CC=CC=C45)C46=CC=CC=C46)C47=CC=CC=C47)C48=CC=CC=C48)C49=CC=CC=C49)C50=CC=CC=C50)C51=CC=CC=C51)C52=CC=CC=C52)C53=CC=CC=C53)C54=CC=CC=C54)C55=CC=CC=C55)C56=CC=CC=C56)C57=CC=CC=C57)C58=CC=CC=C58)C59=CC=CC=C59)C60=CC=CC=C60)C61=CC=CC=C61)C62=CC=CC=C62)C63=CC=CC=C63)C64=CC=CC=C64)C65=CC=CC=C65)C66=CC=CC=C66)C67=CC=CC=C67)C68=CC=CC=C68)C69=CC=CC=C69)C70=CC=CC=C70)C71=CC=CC=C71)C72=CC=CC=C72)C73=CC=CC=C73)C74=CC=CC=C74)C75=CC=CC=C75)C76=CC=CC=C76)C77=CC=CC=C77)C78=CC=CC=C78)C79=CC=CC=C79)C80=CC=CC=C80)C81=CC=CC=C81)C82=CC=CC=C82)C83=CC=CC=C83)C84=CC=CC=C84)C85=CC=CC=C85)C86=CC=CC=C86)C87=CC=CC=C87)C88=CC=CC=C88)C89=CC=CC=C89)C90=CC=CC=C90)C91=CC=CC=C91)C92=CC=CC=C92)C93=CC=CC=C93)C94=CC=CC=C94)C95=CC=CC=C95)C96=CC=CC=C96)C97=CC=CC=C97)C98=CC=CC=C98)C99=CC=CC=C99)C100=CC=CC=C100)C101=CC=CC=C101)C102=CC=CC=C102)C103=CC=CC=C103)C104=CC=CC=C104)C105=CC=CC=C105)C106=CC=CC=C106)C107=CC=CC=C107)C108=CC=CC=C108)C109=CC=CC=C109)C110=CC=CC=C110)C111=CC=CC=C111)C112=CC=CC=C112)C113=CC=CC=C113)C114=CC=CC=C114)C115=CC=CC=C115)C116=CC=CC=C116)C117=CC=CC=C117)C118=CC=CC=C118)C119=CC=CC=C119)C120=CC=CC=C120)C121=CC=CC=C121)C122=CC=CC=C122)C123=CC=CC=C123)C124=CC=CC=C124)C125=CC=CC=C125)C126=CC=CC=C126)C127=CC=CC=C127)C128=CC=CC=C128)C129=CC=CC=C129)C130=CC=CC=C130)C131=CC=CC=C131)C132=CC=CC=C132)C133=CC=CC=C133)C134=CC=CC=C134)C135=CC=CC=C135)C136=CC=CC=C136)C137=CC=CC=C137)C138=CC=CC=C138)C139=CC=CC=C139)C140=CC=CC=C140)C141=CC=CC=C141)C142=CC=CC=C142)C143=CC=CC=C143)C144=CC=CC=C144)C145=CC=CC=C145)C146=CC=CC=C146)C147=CC=CC=C147)C148=CC=CC=C148)C149=CC=CC=C149)C150=CC=CC=C150)C151=CC=CC=C151)C152=CC=CC=C152)C153=CC=CC=C153)C154=CC=CC=C154)C155=CC=CC=C155)C156=CC=CC=C156)C157=CC=CC=C157)C158=CC=CC=C158)C159=CC=CC=C159)C160=CC=CC=C160)C161=CC=CC=C161)C162=CC=CC=C162)C163=CC=CC=C163)C164=CC=CC=C164)C165=CC=CC=C165)C166=CC=CC=C166)C167=CC=CC=C167)C168=CC=CC=C168)C169=CC=CC=C169)C170=CC=CC=C170)C171=CC=CC=C171)C172=CC=CC=C172)C173=CC=CC=C173)C174=CC=CC=C174)C175=CC=CC=C175)C176=CC=CC=C176)C177=CC=CC=C177)C178=CC=CC=C178)C179=CC=CC=C179)C180=CC=CC=C180)C181=CC=CC=C181)C182=CC=CC=C182)C183=CC=CC=C183)C184=CC=CC=C184)C185=CC=CC=C185)C186=CC=CC=C186)C187=CC=CC=C187)C188=CC=CC=C188)C189=CC=CC=C189)C190=CC=CC=C190)C191=CC=CC=C191)C192=CC=CC=C192)C193=CC=CC=C193)C194=CC=CC=C194)C195=CC=CC=C195)C196=CC=CC=C196)C197=CC=CC=C197)C198=CC=CC=C198)C199=CC=CC=C199)C200=CC=CC=C200)C201=CC=CC=C201)C202=CC=CC=C202)C203=CC=CC=C203)C204=CC=CC=C204)C205=CC=CC=C205)C206=CC=CC=C206)C207=CC=CC=C207)C208=CC=CC=C208)C209=CC=CC=C209)C210=CC=CC=C210)C211=CC=CC=C211)C212=CC=CC=C212)C213=CC=CC=C213)C214=CC=CC=C214)C215=CC=CC=C215)C216=CC=CC=C216)C217=CC=CC=C217)C218=CC=CC=C218)C219=CC=CC=C219)C220=CC=CC=C220)C221=CC=CC=C221)C222=CC=CC=C222)C223=CC=CC=C223)C224=CC=CC=C224)C225=CC=CC=C225)C226=CC=CC=C226)C227=CC=CC=C227)C228=CC=CC=C228)C229=CC=CC=C229)C230=CC=CC=C230)C231=CC=CC=C231)C232=CC=CC=C232)C233=CC=CC=C233)C234=CC=CC=C234)C235=CC=CC=C235)C236=CC=CC=C236)C237=CC=CC=C237)C238=CC=CC=C238)C239=CC=CC=C239)C240=CC=CC=C240)C241=CC=CC=C241)C242=CC=CC=C242)C243=CC=CC=C243)C244=CC=CC=C244)C245=CC=CC=C245)C246=CC=CC=C246)C247=CC=CC=C247)C248=CC=CC=C248)C249=CC=CC=C249)C250=CC=CC=C250)C251=CC=CC=C251)C252=CC=CC=C252)C253=CC=CC=C253)C254=CC=CC=C254)C255=CC=CC=C255)C256=CC=CC=C256)C257=CC=CC=C257)C258=CC=CC=C258)C259=CC=CC=C259)C260=CC=CC=C260)C261=CC=CC=C261)C262=CC=CC=C262)C263=CC=CC=C263)C264=CC=CC=C264)C265=CC=CC=C265)C266=CC=CC=C266)C267=CC=CC=C267)C268=CC=CC=C268)C269=CC=CC=C269)C270=CC=CC=C270)C271=CC=CC=C271)C272=CC=CC=C272)C273=CC=CC=C273)C274=CC=CC=C274)C275=CC=CC=C275)C276=CC=CC=C276)C277=CC=CC=C277)C278=CC=CC=C278)C279=CC=CC=C279)C280=CC=CC=C280)C281=CC=CC=C281)C282=CC=CC=C282)C283=CC=CC=C283)C284=CC=CC=C284)C285=CC=CC=C285)C286=CC=CC=C286)C287=CC=CC=C287)C288=CC=CC=C288)C289=CC=CC=C289)C290=CC=CC=C290)C291=CC=CC=C291)C292=CC=CC=C292)C293=CC=CC=C293)C294=CC=CC=C294)C295=CC=CC=C295)C296=CC=CC=C296)C297=CC=CC=C297)C298=CC=CC=C298)C299=CC=CC=C299)C300=CC=CC=C300)C301=CC=CC=C301)C302=CC=CC=C302)C303=CC=CC=C303)C304=CC=CC=C304)C305=CC=CC=C305)C306=CC=CC=C306)C307=CC=CC=C307)C308=CC=CC=C308)C309=CC=CC=C309)C310=CC=CC=C310)C311=CC=CC=C311)C312=CC=CC=C312)C313=CC=CC=C313)C314=CC=CC=C314)C315=CC=CC=C315)C316=CC=CC=C316)C317=CC=CC=C317)C318=CC=CC=C318)C319=CC=CC=C319)C320=CC=CC=C320)C321=CC=CC=C321)C322=CC=CC=C322)C323=CC=CC=C323)C324=CC=CC=C324)C325=CC=CC=C325)C326=CC=CC=C326)C327=CC=

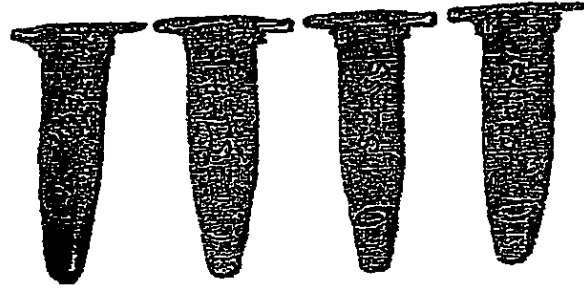
Figura 4

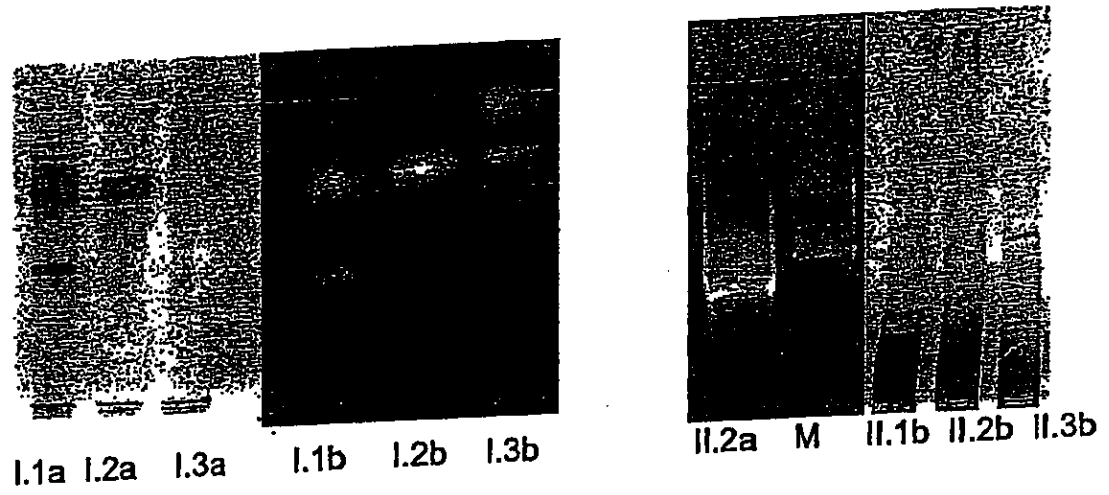
Figura 5

Figura 6

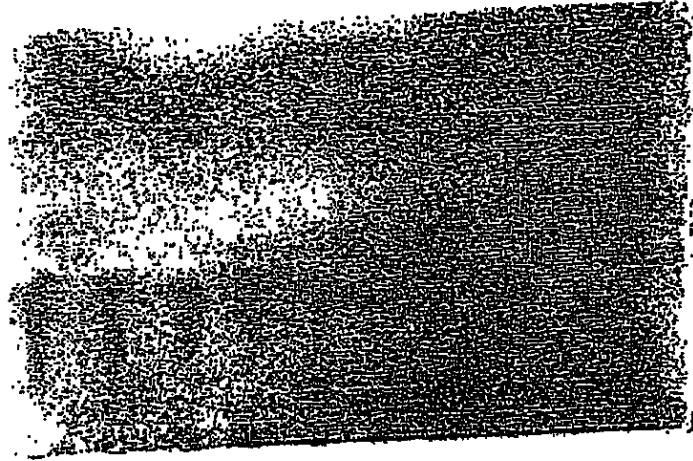


Figura 7

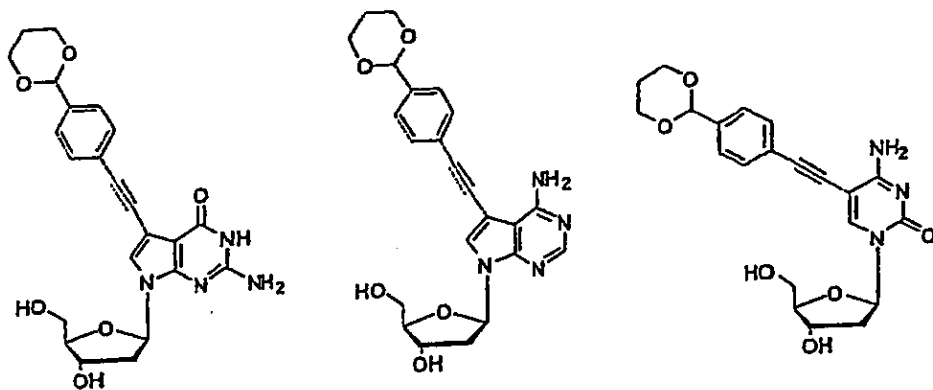
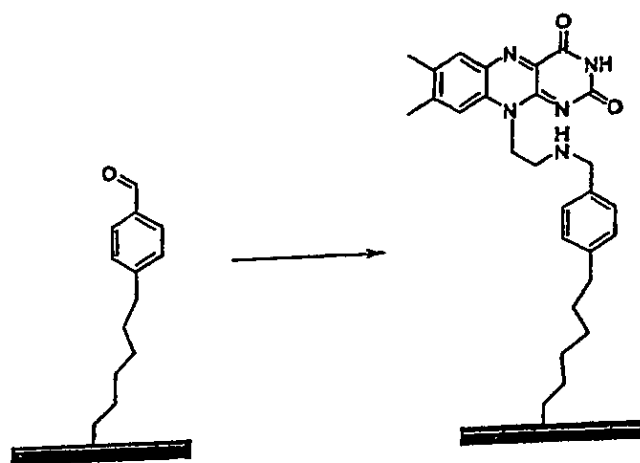


Figura 8

Chemical structures of various nucleoside analogs are shown, labeled a through e.

a shows a nucleoside with a pyrimidine base (2,4-dioxo-5-ethynyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-6-yl) attached to a ribose sugar via a C-glycosidic bond. The sugar has hydroxyl groups at the 2' and 3' positions.

b shows a nucleoside with a pyrimidine base (2,4-dioxo-5-(6-ethynylhexyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-6-yl) attached to a ribose sugar via a C-glycosidic bond. The sugar has hydroxyl groups at the 2' and 3' positions.

c shows a nucleoside with a pyrimidine base (2,4-dioxo-5-(6-azido-1-hexenyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-6-yl) attached to a ribose sugar via a C-glycosidic bond. The sugar has hydroxyl groups at the 2' and 3' positions.

d shows a nucleoside with a pyrimidine base (2,4-dioxo-5-(6-(2-(6-oxo-1,3-dioxane-5-yl)ethyl)hex-1-ynyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-6-yl) attached to a ribose sugar via a C-glycosidic bond. The sugar has a hydroxyl group at the 3' position. A triphosphate group is attached to the 5' position of the ribose sugar.

e shows a nucleoside with a pyrimidine base (2,4-dioxo-5-(6-(2-(2,3,4,5-tetrahydroxybutyl)ethyl)hex-1-ynyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-6-yl) attached to a ribose sugar via a C-glycosidic bond. The sugar has a hydroxyl group at the 3' position. A triphosphate group is attached to the 5' position of the ribose sugar.

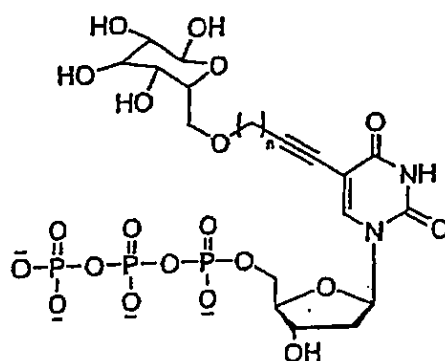
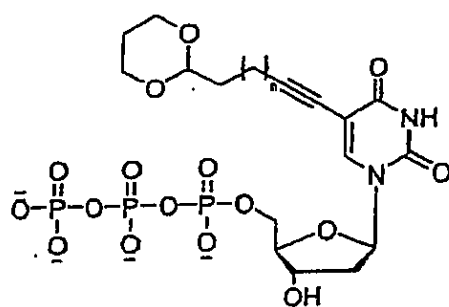
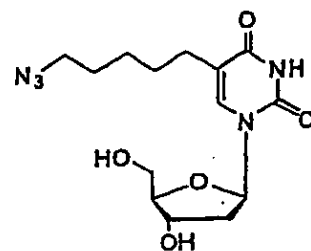
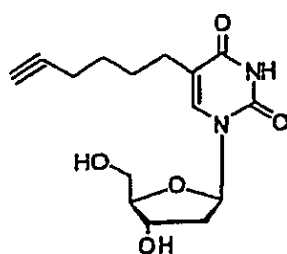
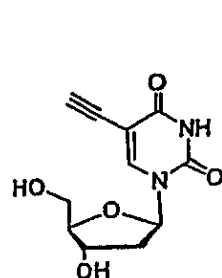
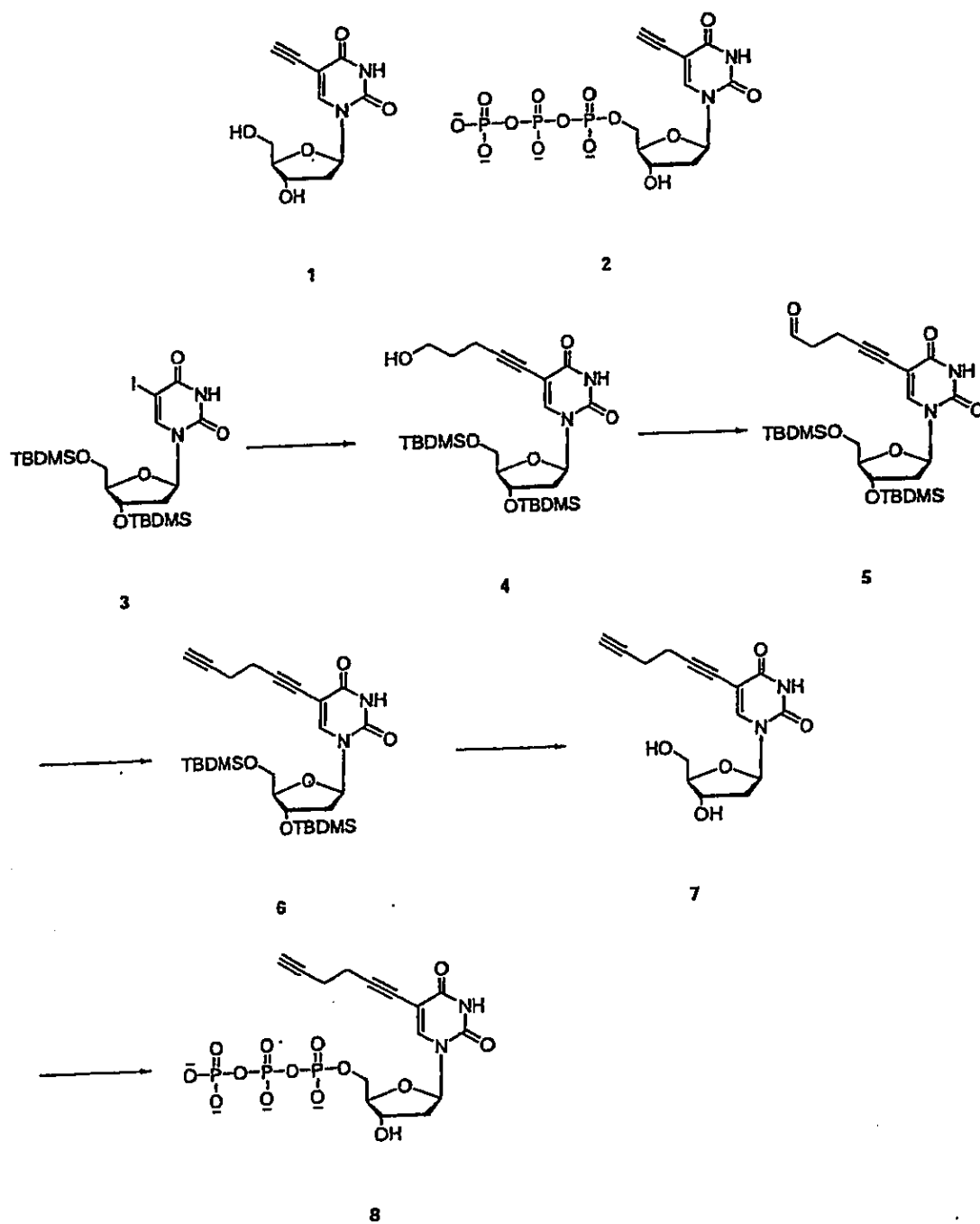


Figura 10



Esquema 1

Figura 11

Síntese de dendrímero

A preparação de 9 [26] e o açúcar desprotegido [27] foram relatados previamente.

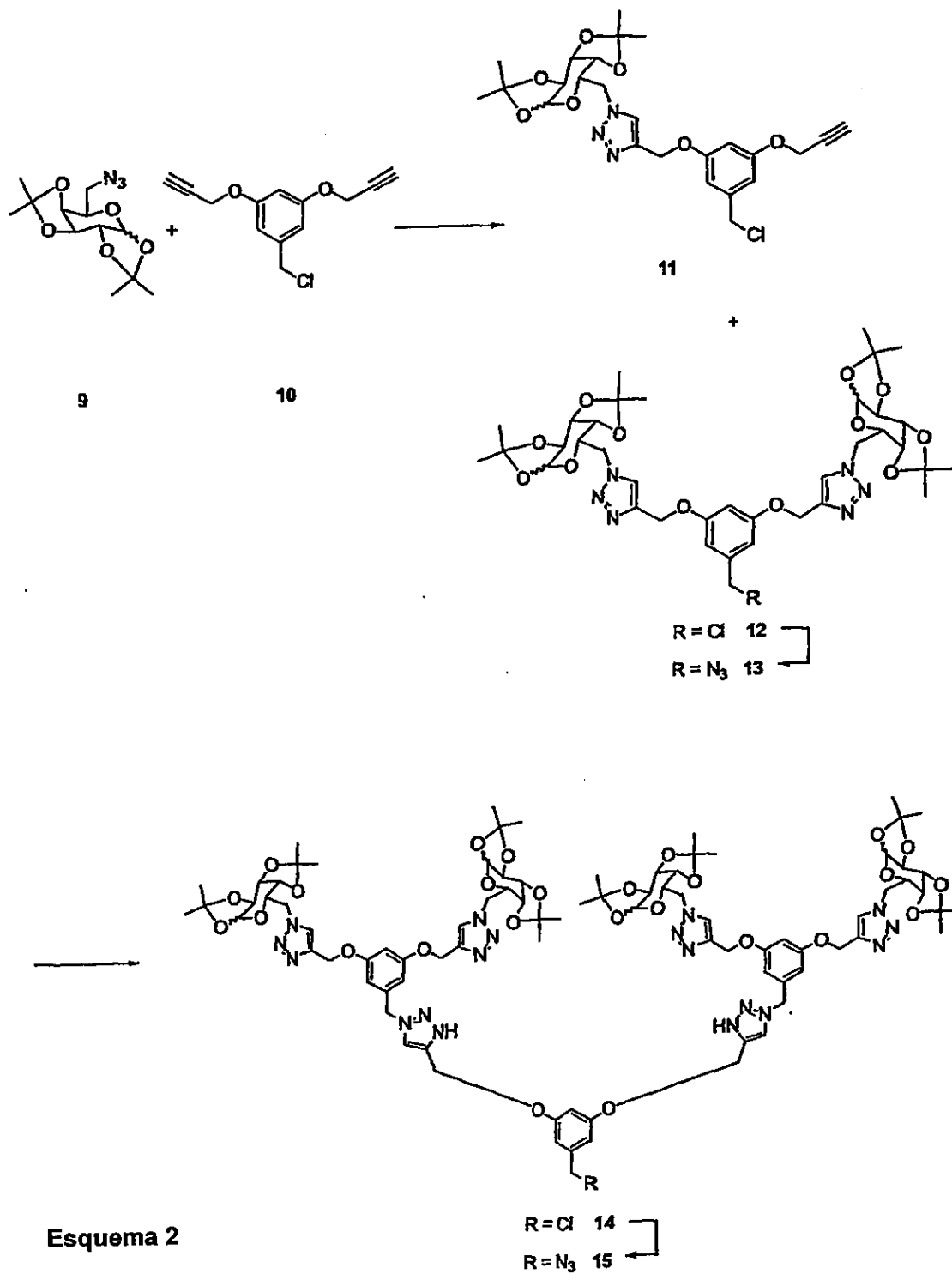
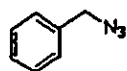
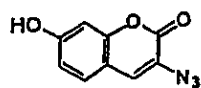


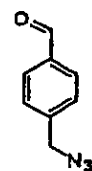
Figura 12



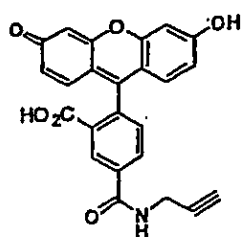
azida de benzil



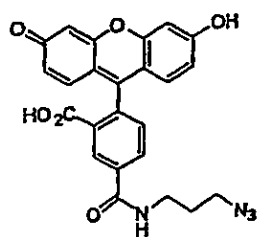
azida de coumarina



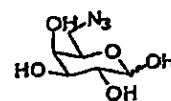
azida de aldeído



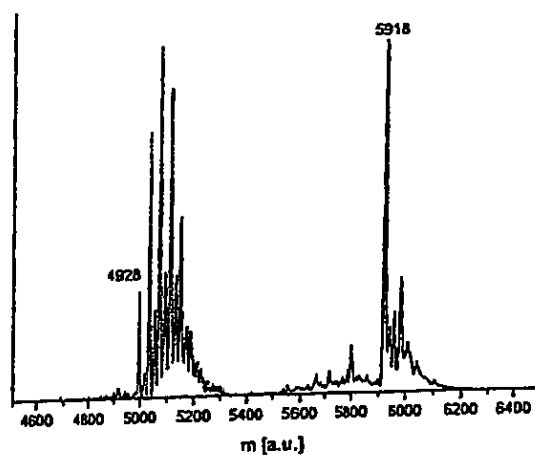
alquino de fluorescina



azida de fluorescina



azida de galactose

Figura 13

Click de
fluoresceína

A1



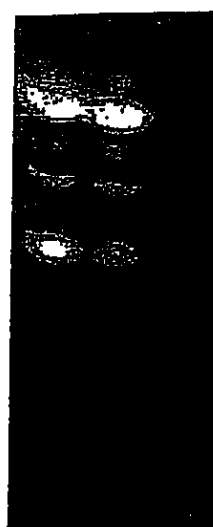
Manchamento geral
com CYBR

A2



Click de
fluoresceína

B1



manchamento geral
com CYBR

B2



Figura 14

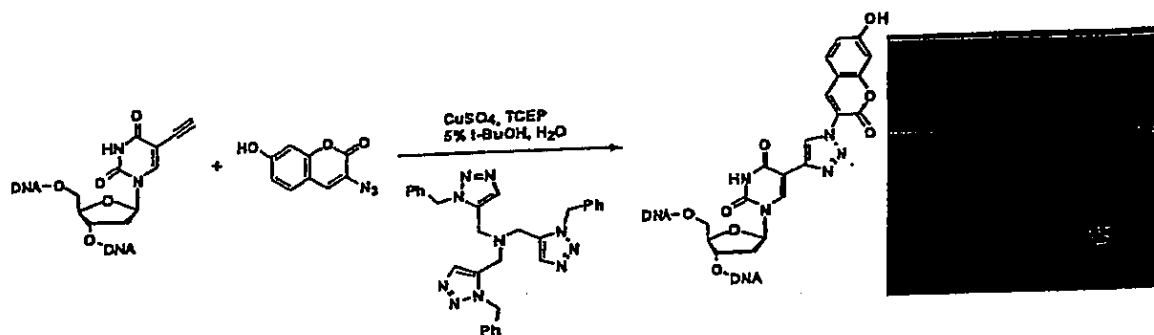


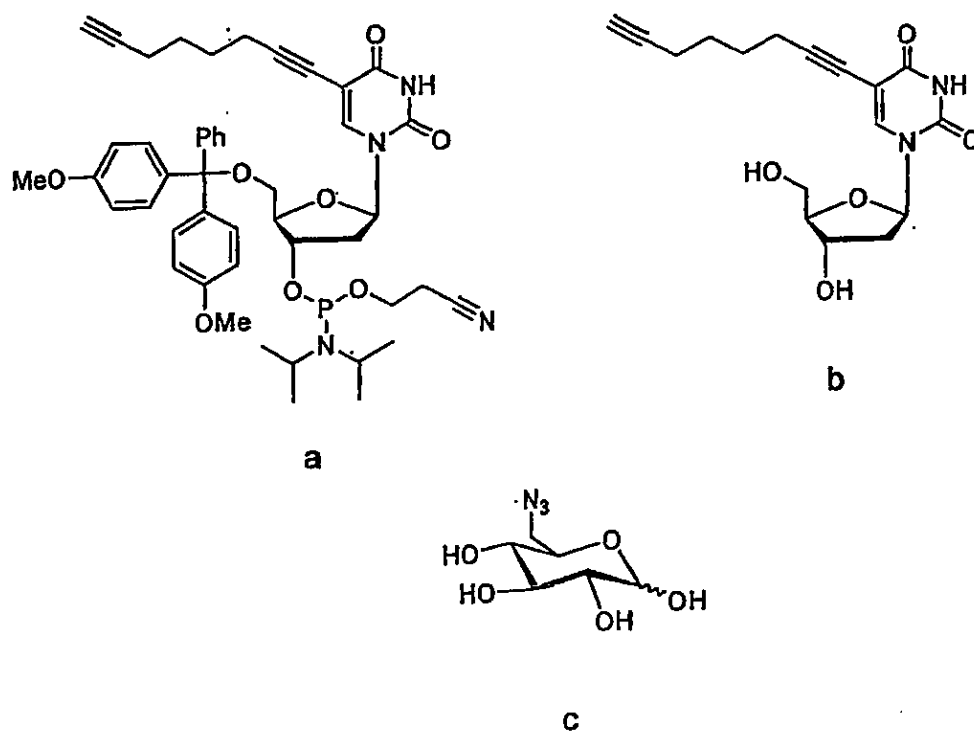
Figura 15

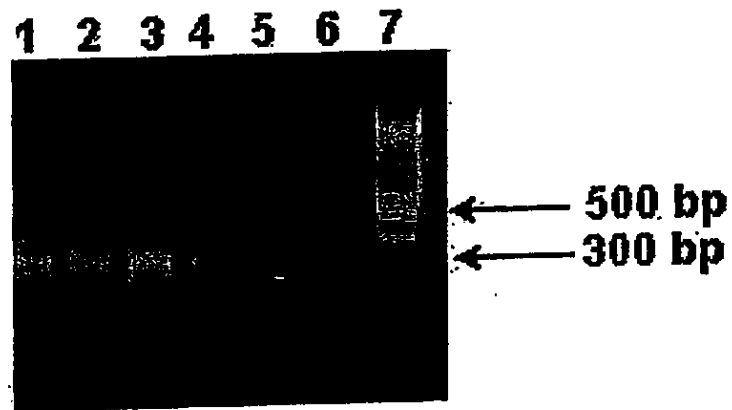
Figura 16

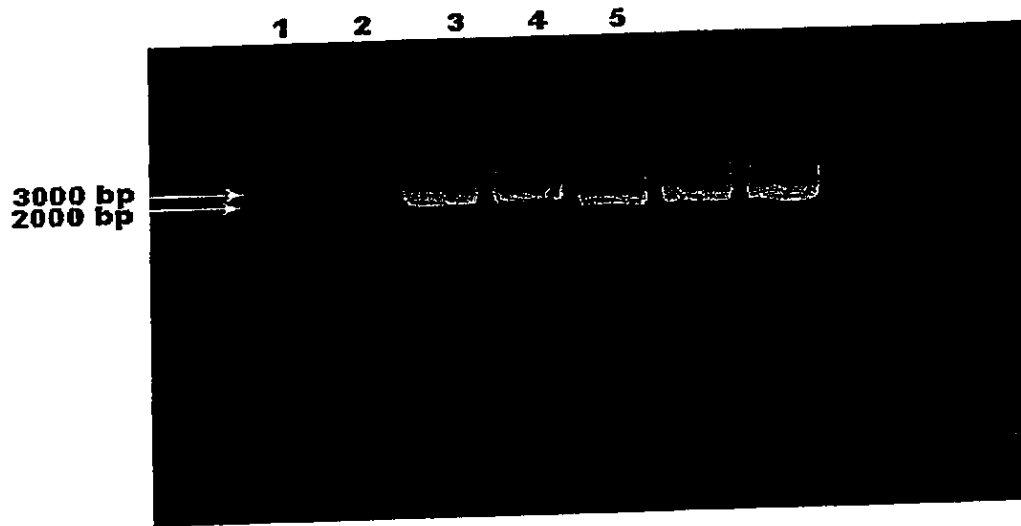
Figura 17

Figura 18

HPLC

Avaliações de pico:

9.5 min citidina
13.1 min inosina (como um produto lateral de veneno de cobra)
13.6 min cobra
14.6 min timidina
16.7 min adenosina
26.3 min. 7

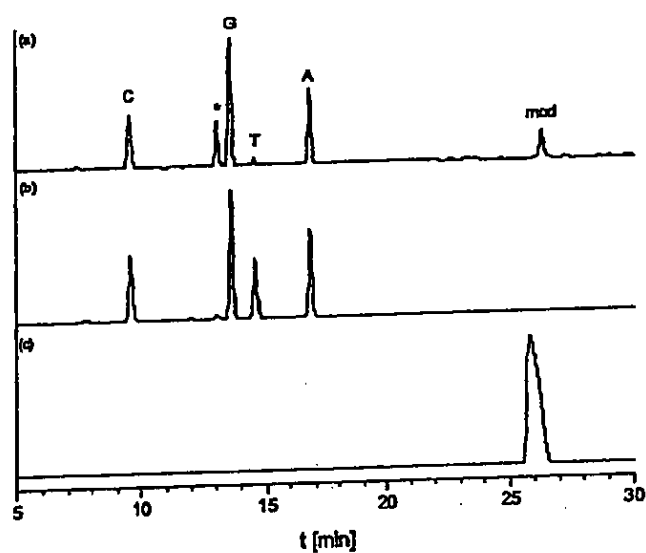


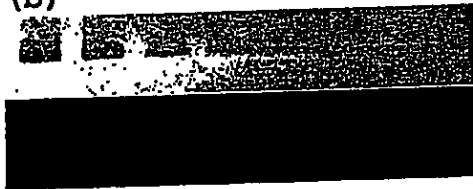
Figura 19

Série de diluição

(a)



(b)



(c)



(d)

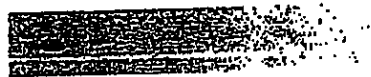
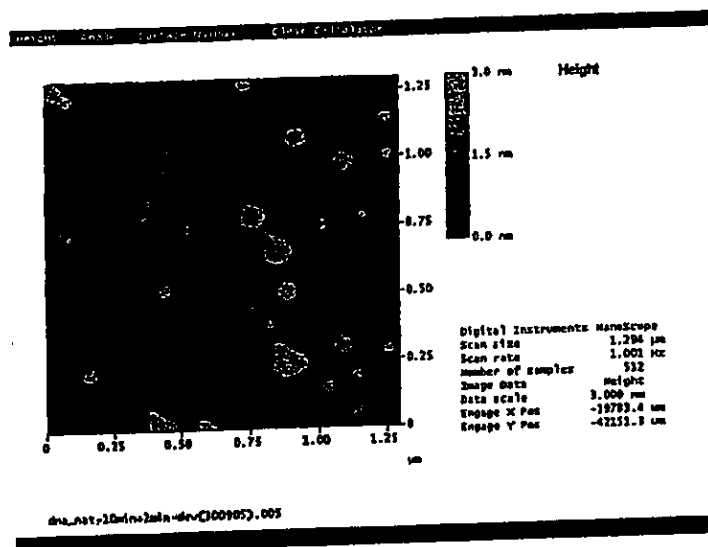
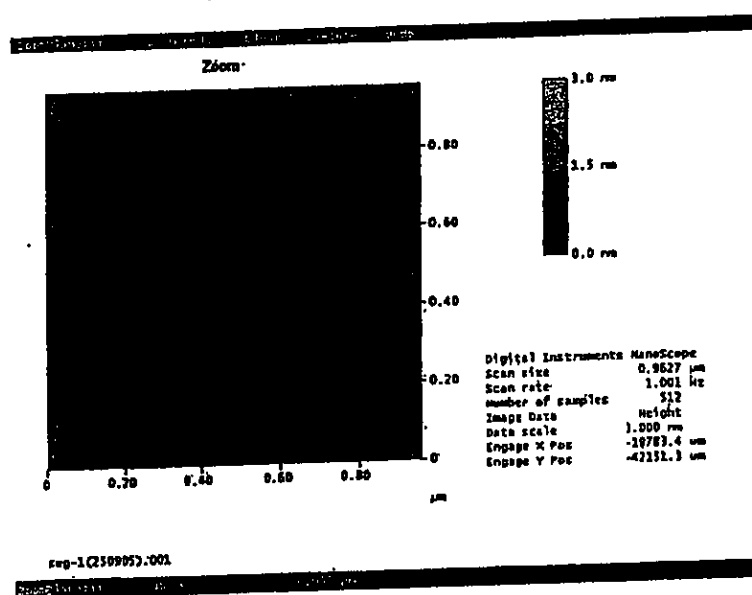


Figura 20a



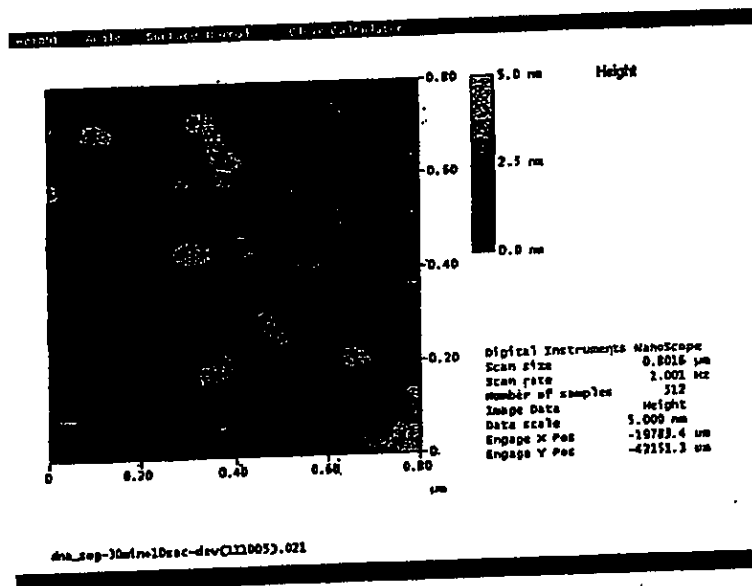
DNA natural após a exposição do DNA às condições de manchamento com Ag

Figura 20b



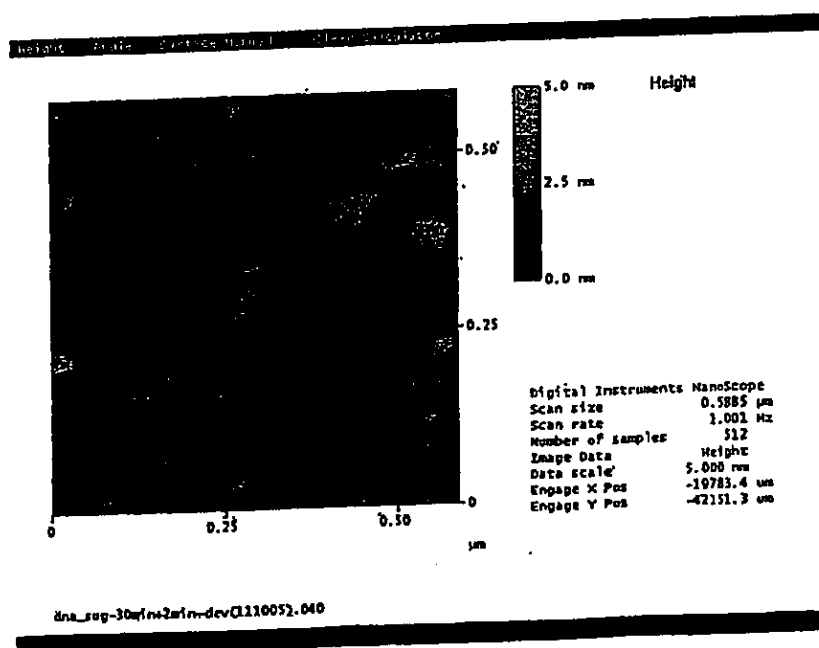
DNA modificado por açúcar

Figura 20c



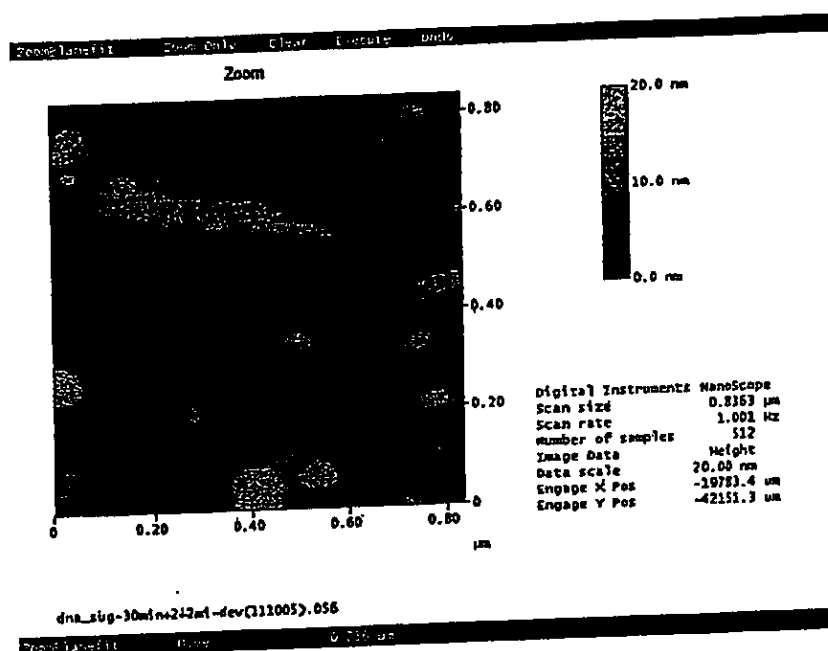
DNA modificado por açúcar após manchamento
com Ag sem revelação

Figura 20d



DNA modificado por açúcar após manchamento com Ag
e com 2 min de revelação

Figura 20e



DNA modificado por açúcar após manchamento com Ag e com duas vezes de 2 min de revelação

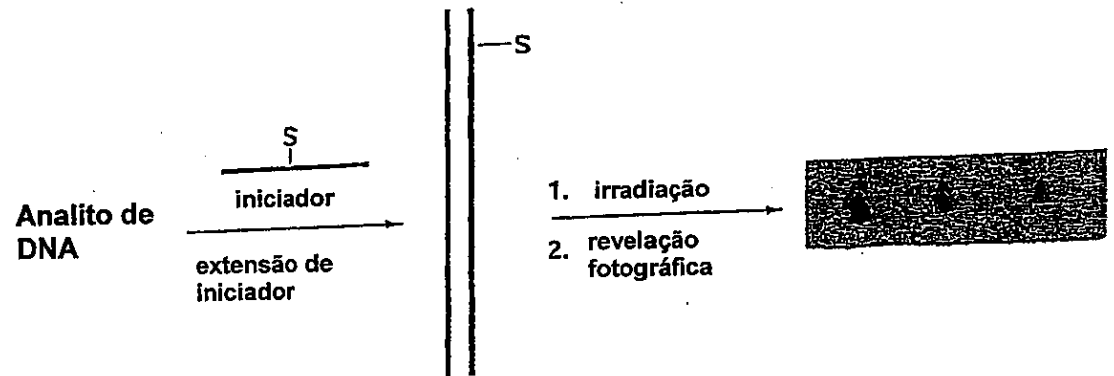
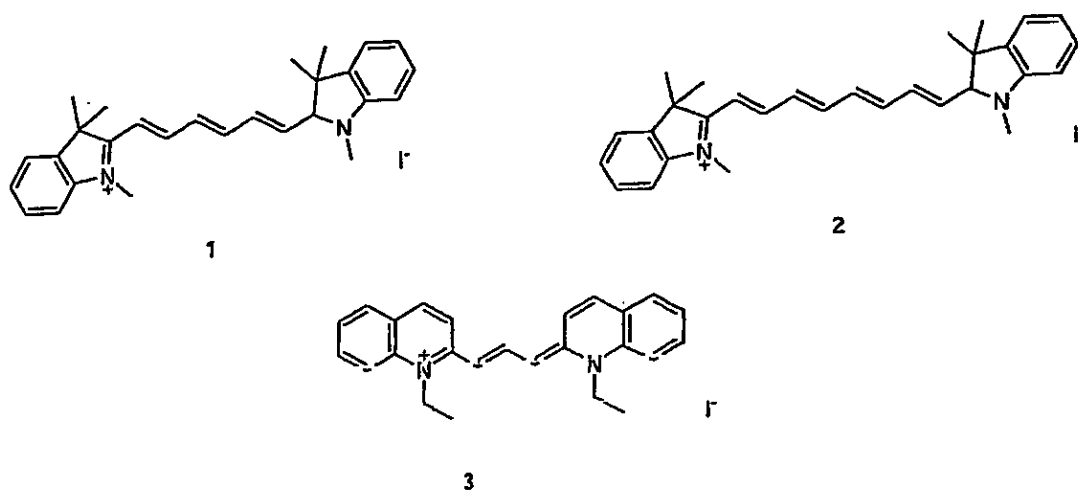
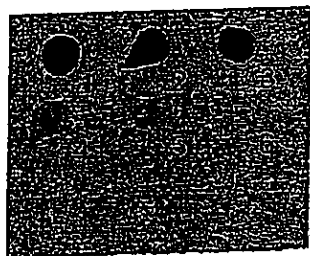
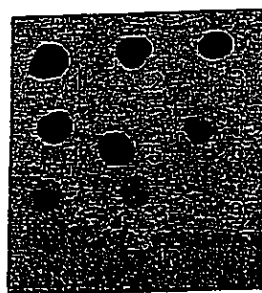
Figura 21

Figura 22

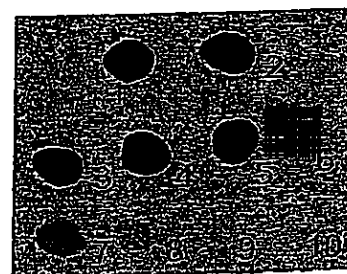
(a)



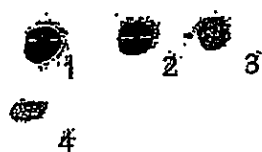
(b)



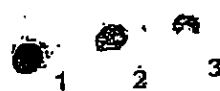
(c)



(d)



(e)



(f)

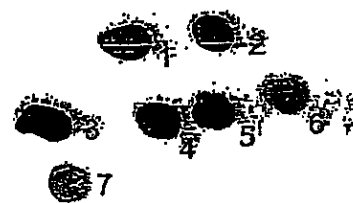
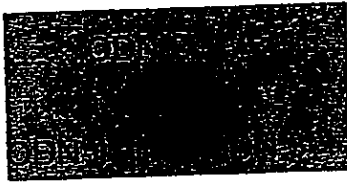


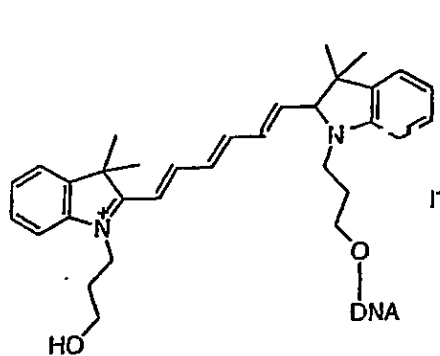
Figura 23

(a)

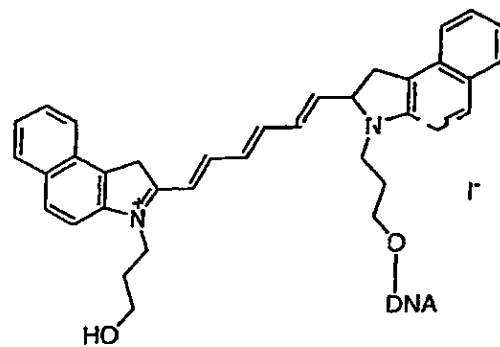


(b)



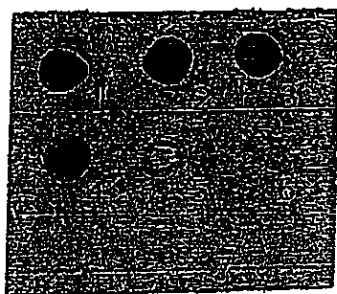
Figura 24

ODN-4

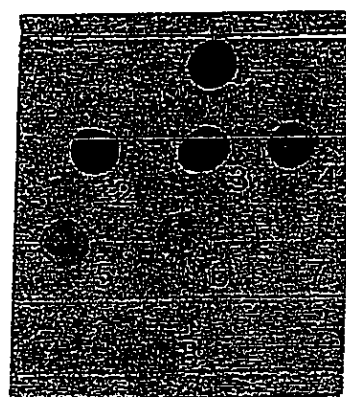


ODN-5

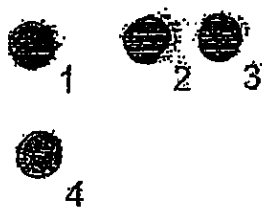
(a)



(b)



(c)



(d)

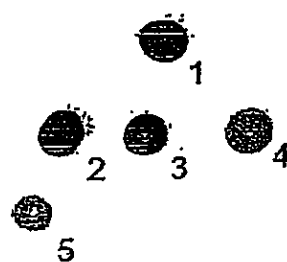


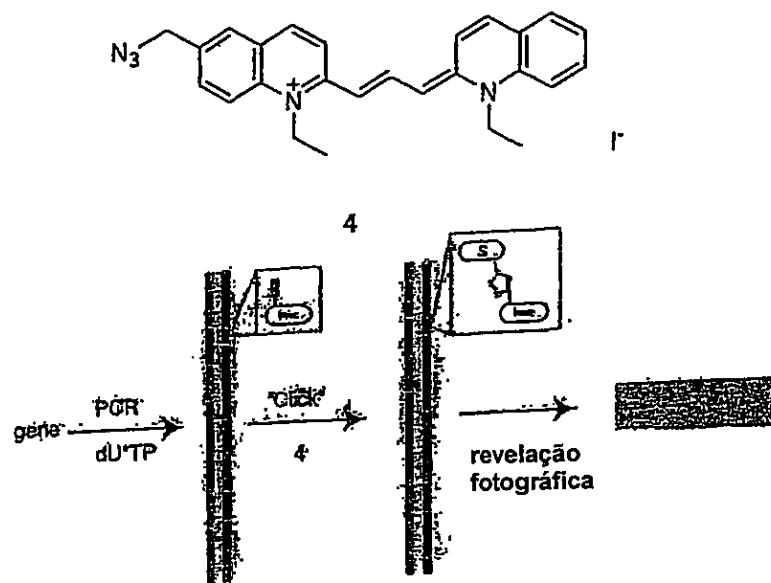
Figura 25

Figura 26

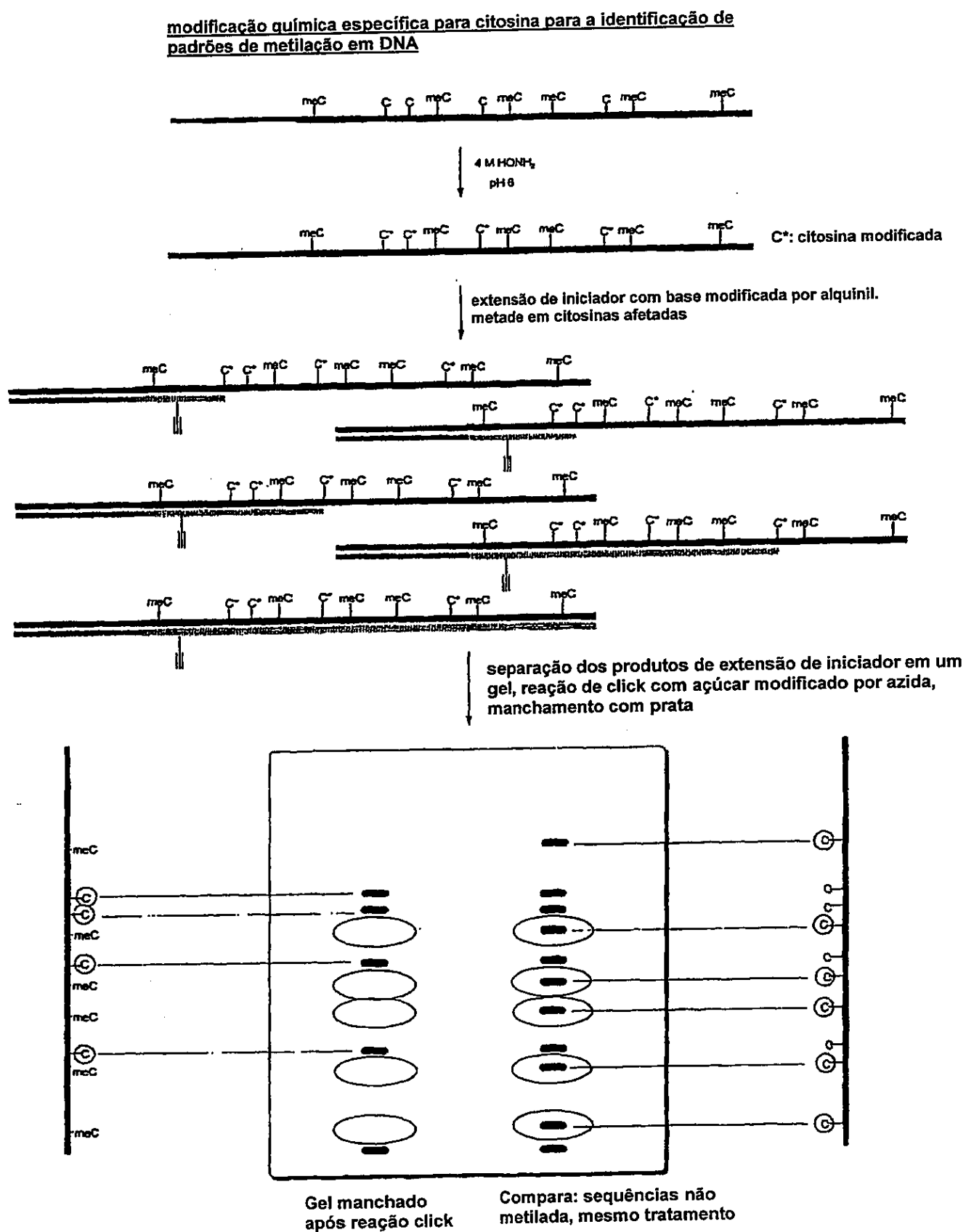


Figura 27