

E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

"Processo e sistema para a sequenciação de ADN"

ÂMBITO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve a sequenciação de ADN utilizando ADN marcado por um informador e, mais particularmente, um sistema baseado na fluorescência para detecção da presença de energia radiante de diferentes espécies a seguir à separação no tempo e/ou no espaço, e os corantes fluorescentes associados ao processo. Estes corantes formam uma família de corantes fluorescentes intimamente relacionados e distinguíveis. Descrevem-se os processos para proteger, activar e ligar estes corantes. Utiliza-se um conjunto de terminantes de cadeia de ADN marcados por fluorescência, preparados de acordo com a presente metodologia, para gerar fragmentos de sequência ADN marcados por fluorescência. Descreve-se também um sistema de detecção fotométrica susceptível de detectar estes fragmentos durante a separação electroforética e de identificar o informador fluorescente associado.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A sequenciação ADN é uma das técnicas analíticas fundamentais da moderna biologia molecular. O desenvolvimento de métodos seguros para a sequenciação conduziu a grandes avanços no conhecimento da organização da informação genética e tornou possível a manipulação de material genético (isto é, a engenharia genética).

Existem dois processos gerais correntes para a sequenciação de ADN: o processo de degradação química de Maxam-Gilbert (A. M. Maxam e outros; "Meth. in Enzym."; 65; 1980; p. 499-559) e o processo de terminação de cadeia de dideoxi de Sanger (F. Sanger e outros; Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 74; 1977 p. 5463-5467). O aspecto comum a estas duas técnicas é a geração de um conjunto de fragmentos de ADN que se analisam por electroforese. As técnicas diferem nos processos utilizados para a preparação desses fragmentos.

Com a técnica de Maxam-Gilbert, os fragmentos de ADN preparam-se por meio da clivagem química de base específica da porção de ADN que se pretende sequenciar. A porção de ADN que se pretende sequenciar é marcada primeiro no terminal 5' com ^{32}P e depois divide-se em quatro porções. Cada porção é submetida a um conjunto diferente de tratamentos químicos destinados a clivar o ADN em posições adjacentes a uma dada base (ou bases). Como resultado, todos os fragmentos marcados terão a mesma terminação 5' da porção de ADN original e possuirão terminações 3' definidas pelas posições de clivagem. Este tratamento efectua-se sob condições que geram fragmentos de ADN de comprimentos convenientes para a separação por electroforese de gel.

Com a técnica de Sanger, os fragmentos de ADN são produzidos por meio de cópia enzimática parcial (isto é, síntese) da porção de ADN que se pretende sequenciar. Na versão mais comum insere-se a porção de ADN que se pretende sequenciar, utilizando técnicas normalizadas, numa porção de ADN grande, circular, de cadeia simples tal como o bacteriófago M13. Este

proporciona o modelo para o processo de cópia. Associa-se uma pequena porção de ADN com a sua sequência complementar à região do modelo imediatamente a montante da inserção para servir de têmpera ao modelo constituindo um sistema escorvador para a síntese. Na presença dos quatro trifosfatos de desoxirribonucleosidos naturais (TFdN's), uma polimerase de ADN aumentará o sistema escorvador a partir de terminal 3' para proporcionar uma cópia complementar do modelo na região de inserção. Para proporcionar um conjunto completo de fragmentos de sequenciação efectua-se quatro reacções em paralelo, contendo cada uma os quatro TFdN's em conjunto com um terminante de trifosfato de didesoxirribonucleosido simples (TFddN), sendo um para cada base (adiciona-se TFdN marcado com ^{32}P para proporcionar fragmentos marcados). Se se incorpora TFdN com a polimerase a extensão da cadeia pode continuar. Se se escolhe o correspondente TFddN termina a cadeia. Ajusta-se a proporção entre TFddN e TFdN's para gerar fragmentos de ADN de comprimentos apropriados. Deste modo, cada uma das quatro misturas reaccionais conterá uma distribuição de fragmentos com o mesmo radical de didesoxinucleosido no terminal 3' e um terminal 5' definido pelo sistema escorvador.

Em ambos os processos, a informação da sequência de base que geralmente não se pode determinar por métodos físicos, converte-se em informação sobre o comprimento da cadeia que se pode determinar. Esta determinação pode efectuar-se através da separação electroforética. Em condições extraordinárias (temperatura elevada, presença de ureia, etc.) os pequenos fragmentos de ADN migram como bastonetes rígidos. Se se utilizar

uma matriz de gel para a electroforese, os fragmentos de ADN, são separados de acordo com a sua dimensão. A resolução de base simples necessária para a sequenciação pode obter-se normalmente a partir de fragmentos de ADN que contenham até diversas centenas de bases.

Para se determinar uma sequência completa, submetem-se os quatro conjuntos de fragmentos produzidos de acordo com a metodologia de Maxam-Gilbert ou de Sanger, a uma electroforese em quatro quelhas paralelas. Isto origina a resolução espacial dos fragmentos ao longo do comprimento do gel. O modelo de fragmentos marcados transfere-se tipicamente para uma película por auto-radiografia (isto é, produz-se uma fotografia intercalando o gel e a película durante um certo período de tempo). A película revelada apresenta uma continuidade de bandas distribuídas entre as quatro quelhas, referida frequentemente como uma escada de sequenciação. A escada interpreta-se observando visualmente a película (começando com os fragmentos pequenos de movimento mais rápido) e determinando a que lha em que ocorre a banda seguinte para cada degrau da escada. Uma vez que cada quelha está associada com uma dada base (ou combinação de bases no caso do processo Maxam-Gilbert), a progressão linear das funções das quelhas traduz-se, directamente, na sequência base.

Os processos de Sanger e Maxam-Gilbert para a sequenciação de ADN são conceptualmente elegantes e eficazes mas são operacionalmente difíceis e prolongados no tempo. A análise destas técnicas mostra que muitos destes problemas têm origem na utilização de um único radioisótopo informador.

A utilização de radioisótopos de curto período de vida, tal como o ^{32}P , com actividade específica elevada é problemática quer sob o ponto de vista logístico quer sob o ponto de vista da saúde e da segurança. O semi-período de vida curta do ^{32}P , implica que as condições essenciais do reagente sejam antecipadas diversos dias e que o reagente seja utilizado imediatamente. Uma vez gerados, os fragmentos de sequenciação de ADN marcados, são propensos à auto-destruição, devendo submeter-se imediatamente à análise electroforética. As grandes quantidades de gel de electroforese necessárias para conseguir uma separação de base simples originam grandes volumes de tanto contaminado que devem ser eliminados correctamente. A auto-radiografia necessária para visualizar posteriormente os fragmentos de ADN marcados colocados no gel é um processo lento (são frequentes as fotografias nocturnas) e vem adicionar um tempo considerável à operação global. Finalmente, existem possíveis riscos de saúde associados à utilização de tais radioisótopos potentes.

A utilização de apenas um único informador para analisar a posição de quatro bases implica uma considerável complexidade operacional a todo o processo. Os passos químicos/ /enzimáticos devem processar-se em recipientes separados e a análise electroforética deve efectuar-se em quatro quelhas paralelas. As distorções de mobilidade induzidas termicamente, originam imagens enviezadas dos fragmentos de ADN marcados (por exemplo, o efeito de aspecto favorável) as quais, por sua vez originam dificuldades de comparação das quatro quelhas. Estas distorções limitam frequentemente o número de bases que se po-

dem interpretar num único gel.

Os tempos prolongados necessários para a obtenção de imagem auto-radiográfica associados à necessidade de se utilizarem quatro quelhas paralelas obriga a um modo de visualização "instantâneo". Uma vez que é necessária a resolução espacial simultânea de um grande número de bandas torna-se forçosa a utilização de grandes quantidades de gel que têm normalmente 40 cm ou mais de comprimento. Isto implica problemas adicionais: as grandes quantidades de gel são difíceis de manusear e o processamento é lento adicionando mais tempo ao processo global.

Finalmente, existe um problema de interpretação manual. A conversão de uma escada de sequenciação numa sequência de base é um processo propenso a erros e moroso, que exige a total atenção de um cientista altamente especializado. Têm sido feitas numerosas tentativas para automatizar a interpretação e na realidade existem diversos auxiliares mecânicos, mas o processo para interpretar uma sequência em gel é ainda meticuloso e lento.

Para contornar estes problemas pode pensar-se na substituição da auto-radiografia com ^{32}P , com algum sistema de detecção alternativo de um informador não radioisotópico. Um tal sistema de detecção deverá ser excepcionalmente sensível para alcançar uma sensibilidade comparável à do ^{32}P ; cada banda no gel de sequenciação contem na ordem de 10^{-16} mole de ADN. Um dos métodos de detecção que é susceptível de alcançar este nível de sensibilidade baseia-se na fluorescência. Os fragmentos de ADN podem ser marcados com um ou vários corantes fluo-

rescentes. A excitação com uma fonte de luz apropriada originará uma emissão característica do corante identificando desse modo a banda.

A utilização de um corante fluorescente, por oposição à marcação radioisotópica, permitirá a compreensão fácil do sistema de detecção para esta aplicação particular. Por exemplo, a utilização de quatro corantes fluorescentes diferentes distinguíveis com base em alguma característica de emissão (por exemplo, o espectro, o período de vida, a polarização) permitirá ligar simplesmente uma dada etiqueta com os fragmentos de sequenciação associados com uma dada base. Com esta ligação estabelecida, os fragmentos poderão combinar-se e resolver-se numa única quelha e a identificação da base poderá fazer-se directamente tendo em consideração a característica de emissão escolhida.

A natureza de "tempo real" da detecção por fluorescência permitirá uma observação rápida de um gel que contenha bandas resolvidas espacialmente (resolução no espaço) ou o posicionamento num ponto único do gel e detecção das bandas à medida que elas vão passando sequencialmente através da zona de detecção (resolução no tempo). Não serão necessárias grandes preparações de gel. Além disso, um modo de detecção de quelha única em "tempo real" será bastante sensível para transferência de dados e identificação de base completamente automatizados.

Estão descritas diversas tentativas para desenvolver um sistema de sequenciação de ADN baseado na fluorescência. Um sistema desenvolvido por um grupo do California Institute

of Technology foi descrito por L. M. Smith, West German Pat. Appl. #DE 3446635 A1 (1984); L. E. Hood e outros, West German Pat. Appl. #DE 3501306 A1 (1985); e L. M. Smith e outros, Nucleic Acids Research, 13 2399-2412 (1985). Conceptualmente este sistema supera os problemas descritos na secção anterior, mas parece que os pormenores específicos da implementação tornam esta abordagem apenas parcialmente bem sucedida.

O sistema "Cal Tech" utiliza quatro conjuntos de fragmentos de sequenciação de ADN, estando cada um marcado com um de quatro corantes fluorescentes. Descrevem-se dois conjuntos representativos dos corantes fluorescentes. Cada conjunto é constituído por corantes de, pelo menos, duas classes estruturais diferentes.

Os máximos de emissão estão espalhados por um grande intervalo (aproximadamente 100 nm) para facilitar a discriminação entre os quatro, mas infelizmente os máximos de absorção (excitação) também estão comparavelmente afastados. Isto torna muito difícil a excitação eficaz dos quatro corantes com uma única fonte monocromática e a detecção adequada das emissões resultantes.

Em contrapartida, a utilização de corantes com picos de absorção muito próximos (e picos de emissão correspondentes), para facilitar a eficiência de excitação, provoca outras dificuldades. Um sistema de detecção para a sequenciação ADN deve ser capaz de distinguir entre quatro espectros diferentes de emissão dos corantes no sentido de identificar individualmente os fragmentos marcados. Estas emissões são normalmente de intensidade muito baixa. Por conseguinte, o sistema de detecção

deve possuir um elevado grau de sensibilidade (melhor do que 10^{-16} mole de ADN por banda) e de selectividade, em conjunto com meios para minimizar a luz desviada e o ruído de fundo no sentido de se conseguirem as desejáveis características de rendimento. O sistema também deve ser capaz de controlar frequentemente a área de detecção no sentido de evitar a perda de quaisquer fragmentos que migrem através do gel sem passar a janela de detecção. Um tal sistema de detecção deverá ser relativamente barato para permitir múltiplos dispositivos de detecção num único instrumento sem afectar prejudicialmente o preço. Conhecem-se muitos dispositivos de detecção que utilizam a fluorescência no esquema de detecção. Um desses dispositivos está descrito em "Quantitative Fluorescence Analysis of Different Conformational Forms of DNA Bound to the Dye....and Separated by Electrophoresis" by Naimski et al., Anal. Biochem., 106,471-475, 1980. Neste sistema de detecção por electroforese enche-se um tubo de vidro com gel de agarose para se separarem os fragmentos de ADN relativamente grandes. Seguidamente utiliza-se um equipamento monocromático de observação como sistema de detecção para a definição de cada um dos fragmentos grandes. Sabe-se que os equipamentos monocromáticos de observação podem medir com precisão uma vasta gama de características espectrais; contudo, perde-se muita luz devido à limitada capacidade do equipamento monocromático e do seu sistema óptico associado, para recolher e dispersar a luz emitida. Estas técnicas de detecção limitam a fracção de luz que pode ser detectada e medida. Em consequência fica limitada a sua sensibilidade para aplicações de luz fraca. Além disso, a luz recolhida sequencialmente é nor

malmente ineficiente.

O aparelho de detecção descrito por Smith e outros (ver referências anteriores) utiliza uma série de filtros de interferência de banda estreita no sentido de seleccionar os comprimentos de onda que incidem sobre os fotodetectores simples ou múltiplos. Este tipo de sistema tem a vantagem de ser bastante simples e barato; contudo, apresenta deficiências substanciais. O sistema específico descrito utiliza um fotómetro de filtro que pode utilizar múltiplos filtros permutáveis com um fotodetector ou múltiplos filtros estacionários com os detectores correspondentes. O primeiro destes dispositivos, um filtro rotativo com um detector único (ver Fig. 3 de Smith e outros), apresenta a desvantagem de limitar o período de tempo durante o qual se pode medir cada uma das regiões filtradas. O tempo para o detector deve ser partilhado com os diversos filtros no sentido de distinguir entre os diferentes espectros de emissão. O sistema de Smith e outros tem dificuldades ópticas adicionais que não referiremos aqui.

Surgem ainda problemas mais sérios com a utilização de corantes que possuem diferentes cargas livres. O gel de sequenciação convencional descrito no estudo de Smith e outros "Nucleic Acids Research" ilustra as quelhas-T produzidas pelos sistemas escorvadores marcados com cada um dos quatro corantes. É evidente que existem perturbações diferenciais significativas nas mobilidades electroforéticas. Um conjunto completo de fragmentos de sequenciação que suporte os quatro corantes apresentará, quando combinado, considerável sobreposição e talvez mesmo desordem quando submetido a electroforese numa quelha simples.

Este efeito, combinado com o já referido grande intervalo de variação dinâmica na intensidade do sinal, torna difícil conseguir uma sequenciação de quelha simples, com este conjunto de corantes.

Finalmente, a metodologia utilizada para preparar os fragmentos de sequenciação marcados pela fluorescência cria condições de sequenciação difíceis. Para a sequenciação de Maxam-Gilbert, os oligonucleótidos marcados na posição 5' estão ligados a fragmentos de ADN de cadeia dupla, "de terminação aderente", produzidos por clivagem de restrição. Isto limita a sequenciação de fragmentos produzidos deste modo. Para a sequenciação de Sanger, utilizam-se como sistemas escorvadores oligonucleótidos marcados na posição 5'. São necessários quatro sistemas escorvadores especiais. Para utilizar o novo sistema de vectores é necessário passar pelo processo complexo de síntese e de purificação de quatro novos sistemas escorvadores marcados com corante.

Uma segunda abordagem à automação da sequenciação de ADN não marcado radioactivamente foi descrita por Ansorge. W., e outros, "J. Biochem. Biophys. Methods", 13; 1986; p. 315-323;, na qual uma marca fluorescente simples se liga covalentemente ao terminal 5' de um sistema escorvador oligonucleótico de base 17. Faz-se reagir o sistema escorvador em quatro recipientes com o processo químico de sequenciação do dideoxinucleótido normalizado que se modificou para omitir o nucleótido identificado radioactivamente, para produzir conjuntos de fragmentos de ADN, de comprimento variável copiados enzimaticamente. Cada um dos quatro recipientes continha um terminante de cadeia de dide

oxinucleótido correspondente a uma das quatro bases do ADN que permitiram a identificação de base terminal por separação electroforética convencional em quatro quelhas de gel. Cada fragmento transportou uma marca fluorescente de 5'-tetrametil-rodamina que foi excitada por um laser de iões de argon passando através de toda a largura do gel. As emissões fluorescentes das bandas de ADN resolvidas passado algum tempo, captaram-se a partir das quatro quelhas com meios estacionários separados para cada quelha, constituídos por um sistema óptico de imagem, aberturas de campo, guias de luz, agrupamentos de filtros e fotomultiplicadores em série.

Uma vantagem reivindicada para esta abordagem é a necessidade de menos partes em movimento no aparelho devido aos detectores estacionários que permitem o controlo contínuo das quelhas de gel. Este método de controlo, embora seja mais complexo do que o utilizado com uma quelha, oferece a vantagem de determinar a presença de uma banda marcada para identificação da base em relação à ausência de bandas nas três quelhas restantes, melhorando a confiança na identificação. De facto, a utilização de uma única marca exige a utilização de quatro quelhas para identificação da base e o sistema tal como foi apresentado não é susceptível de uma maior simplificação para melhorar a capacidade ou sensibilidade do instrumento. O sistema também está limitado na precisão potencial pela necessidade de uma exacta disposição relativa das quelhas para uma única análise de sequência.

As complexidades operacionais, tais como os gradientes térmicos e as impurezas do gel, podem falsear esta exac-

tidão posicional originando distorsões locais do gel, as quais afectam as mobilidades da banda, o que, por sua vez, compromete as identificações da sequência de base.

A utilização de sistemas escorvadores marcados por Ansorge e outros e Smith e outros, também é inferior noutros aspectos. Continua a ser necessário efectuar as reacções de polimerização em recipientes separados. Todos os fragmentos de ADN têm de ser marcados quer sejam fragmentos de terminação genuína ou fragmentos estranhos. Isto é semelhante ao sistema existente em que efectivamente são marcados todos os fragmentos que contêm nucleótidos de adenosina incorporados. Deste modo, o modelo de sequenciação resultante manterá a maior parte dos produtos artificiais (por exemplo bandas falsas ou fantasmas, acumulações) encontrados nos métodos correntes.

Finalmente, Brumbaugh, J. A. e outros, no pedido de Patente Europeia nº. 85103155-9, publicada em 9 de Outubro de 1985, descreve um sistema e um processo para a marcação posterior de cadeias de ADN que contêm, eventualmente nucleosídeos previamente marcados. A marcação prévia pode ser conseguida por ligação covalente de biotina a um desejado nucleótido de terminação de cadeia, antes de o nucleótido ser utilizado numa modificação do método do Sanger de terminação de cadeia de ADN. Contudo, o nucleótido marcado previamente não é detectável no sistema descrito. As cadeias de ADN marcadas previamente e preparadas em recipientes separados correspondentes às bases de ADN A,T,C, e G separaram-se por electroforese e depois expuseram-se a material de ligação complementar, normalmente a avidina, a qual possuía um fluoroforo tal como a fluoresceína

covalentemente a ela ligada. O fluoroforo foi detectado e a presença do sinal foi relacionada com o recipiente particular ou gel/quelha correspondente a A, T, C, ou G originalmente preparados. Este processo de marcação à posteriori exige a preparação e subsequente separação electroforética de cadeias de ADN marcadas em vasos e geles/quelhas separados, respectivamente. Não existe nenhuma descrição de qualquer processo ou sistema susceptível de marcar diferencialmente cadeias de ADN no mesmo recipiente simultaneamente durante as reacções de um processo de terminação de cadeia, ou de diferenciar as marcas durante uma detecção de cadeia num único gel/quelha de um sistema de detecção adequado.

RESUMO DA INVENÇÃO

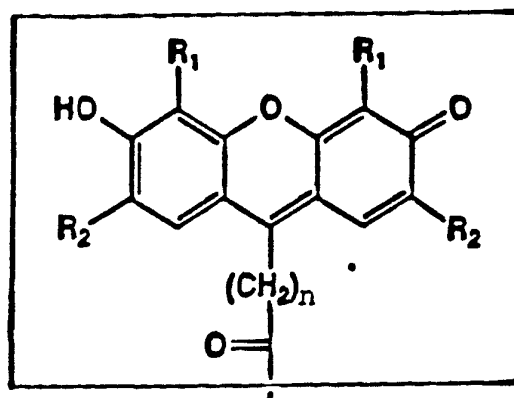
A presente invenção pretende superar muitas das desvantagens da técnica anterior. Ela engloba um sistema de sequenciação de ADN que possui muitas das características de qualidade desejadas sem apresentar grande parte das deficiências anteriormente apontadas. A presente invenção consiste num sistema para detectar a presença de energia radiante de diferentes espécies, normalmente de ADN marcado com um informador, a seguir à separação no tempo e/ou no espaço, e a identificação das espécies. O sistema engloba meios que reagem aos espectros das espécies para gerar um primeiro sinal que varia em amplitude, num primeiro sentido, em função da natureza das espécies, meios que reagem aos espectros das espécies para gerar um segundo sinal que varia em amplitude, num segundo sentido diferente do primeiro em função da natureza das espécies, e meios que reagem

aos primeiro e segundo sinais para se obter um terceiro sinal correspondente à relação entre as funções do primeiro e do segundo sinais, sendo a amplitude do terceiro sinal indicativa da identidade das espécies.

Os meios para gerar o primeiro e o segundo sinais podem incluir um filtro dicroico, com uma característica de transmissão/reflexão que varia em função do comprimento de onda, meios para orientar as emissões para o filtro, primeiro e segundo detectores posicionados, respectivamente, para receber as emissões transmitida e reflectida e para gerar o primeiro e o segundo sinais correspondentes às intensidades de cada uma. De preferência, o filtro dicroico possui uma característica de transição relativamente rápida da transmissão para a reflexão, a qual ocorre próximo do centro do espectro de emissão das espécies. Com o ponto de transição localizado próximo do centro, a variação de amplitude do terceiro sinal distribui-se mais uniformemente na gama dos espectros.

Normalmente, as espécies que se pretendem analisar são fragmentos de ADN ou outras moléculas covalentemente marcadas com materiais fluorescentes que possuem espectros muito pouco separados. Estas moléculas estão normalmente contidas no gel da electroforese adaptado para as separar por dimensão, carga, ou segundo outras propriedades físicas. O sistema engloba um laser ou outra fonte de energia radiante com um sinal de saída compreendido na região de excitação do material fluorescente.

A porção emissora das espécies marcadas que se pretende detectar, por exemplo um fragmento de ADN, pode ter a estrutura seguinte:

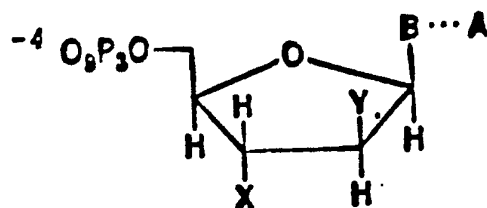


na qual n pode ser 2 ou 3 e R_1 e R_2 representam um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo alquilo inferior, alcoxi inferior ou ciano.

Também se descreve um processo para a detecção da presença de energia radiante emitida por espécies diferentes, a seguir à separação no tempo e/ou no espaço, e determinação da identidade de cada uma de tais espécies emissoras, caracterizado pelos passos de obtenção das funções da energia emitida, a qual varia em sentidos diferentes, segundo os comprimentos de onda dos espectros pouco separados, e depois faz-se a divisão de tais funções sendo o cociente um índice indicativo da identidade das espécies. A função da energia emitida pode obter-se fazendo passar a energia radiante através de um filtro dicróico com uma característica de transmissão/reflexão que varia em função do comprimento de onda.

Descreve-se um processo para a análise da sequência de ADN de acordo com uma modificação do método de Sanger de terminação de cadeia em que o terminante de cadeia suporta

um informador. De preferência, o terminante de cadeia suporta um informador corado, preferencialmente um informador fluorescente. O terminante de cadeia pode ter qualquer uma das estruturas seguintes

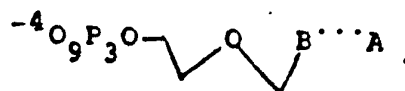


na qual (a) X representa um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo NH_2 e

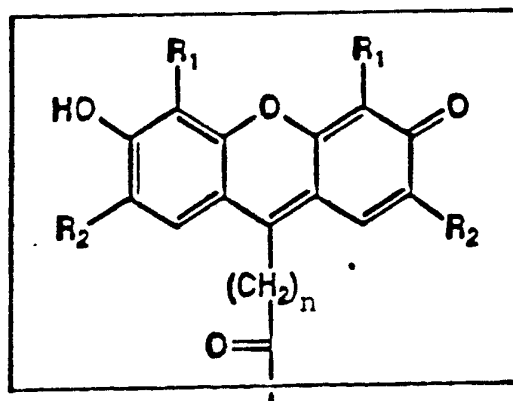
Y representa um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo NH_2 ou OH , ou

(b) X e Y representam um grupo CH

ou



na qual A pode representar um informador fluorescente que possua a estrutura:



na qual n representa 2 ou 3, e R_1 e R_2 representam um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo alquilo inferior, alcoxi inferior, ou ciano, B representa uma base heterocíclica tal como uracilo, citosina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-guanina, ou 7-deaza-hipoxantina em que as pirimidinas estão ligadas à parte açúcar através da posição N_1 e as deazapurinas estão ligadas à parte açúcar através da posição N_9 (numeração purina) e a linha pontuada representa, um ligante e eventualmente um espaçador (grupo de átomos) que unem a parte fluorescente (A), de preferência através de uma ligação amida, e a base heterocíclica (B) com a condição de, no caso de B representar uma pirimidina, o ligante está associado à posição 5 dessa pirimidina e se B representar uma deazapurina, o ligante está associado à posição 7 (numeração da purina) dessa deazapurina.

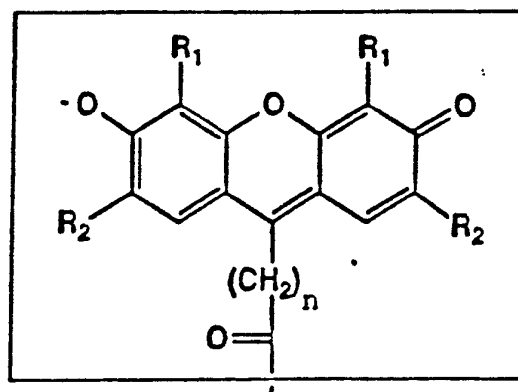
De acordo com outro aspecto da presente invenção proporciona-se um processo de análise de sequência de ADN, de acordo com o método de Sanger de terminação de cadeia, modificado pela presente invenção, em que cada um dos quatro terminantes de cadeia correspondentes às quatro bases suporta um identificador diferente que se pode distinguir. Deste modo, as quatro reacções de terminação de cadeia podem efectuar-se em recipientes separados e combinar-se antes da análise electroforética ou efectuar-se num único recipiente.

Os fragmentos de sequenciação de ADN combinados

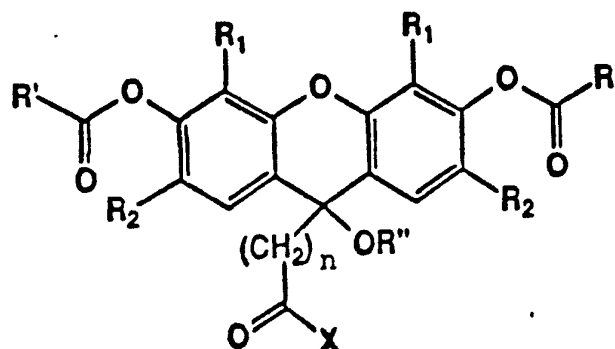
produzidos deste modo, podem submeter-se a separação electroforética simultânea numa única quelha. A excitação dos fragmentos que suportam os seus respectivos informadores, por uma única fonte de energia, origina a sua emissão característica, permitindo por isso a sua detecção e identificação.

Escolhe-se o conjunto de quatro informadores de modo que todos sejam excitados eficazmente por uma fonte única e possuam espectros de emissão que sejam semelhantes mas que se possam distinguir. As perturbações diferenciais na mobilidade electroforética dos fragmentos de ADN ligados são pequenas. Este requisito pode satisfazer-se facilmente se os quatro informadores possuírem pesos moleculares, formas e cargas semelhantes.

Estes critérios podem conseguir-se com informadores que possuam partes fluorescentes com a estrutura:



na qual n é igual a 2 ou 3 e R_1 e R_2 representam, cada um, um átomo de hidrogénio ou de halogénio ou um grupo alquilo inferior, alcoxi inferior, ou ciano. Tais informadores podem ser introduzidos através de intermediários protegidos e activados de estrutura:



na qual n é igual a 2 ou 3, R_1 e R_2 representam, cada um, um átomo de hidrogênio ou de halogêneo ou um grupo alquilo inferior, alcoxi inferior, e alcoxi. R'' representa um grupo alquilo, R' representa um grupo alquilo ou arilo, e X representa um grupo facilmente eliminável.

O sistema e o processo da presente invenção tem a capacidade de distinguir, em tempo real, as diferenças de comprimento de onda, relativamente pequenas, nos espectros de emissão, ao mesmo tempo que mantêm um grau de sensibilidade relativamente elevado. O sistema fornece aos detectores fotométricos uma porção elevada de luz utilizável. Finalmente, o sistema de detecção proporciona um controlo contínuo do gel que contém as espécies fluorescentes. Este aspecto reduz a possibilidade de originar dados incompletos que estão normalmente inerentes aos sistemas de detecção de tipo intermitente. Todos os aspectos atrás referidos estão incluídos neste sistema único, por

um preço relativamente baixo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A invenção pode compreender-se melhor com a descrição pormenorizada seguinte em associação com os gráficos e desenhos anexos que fazem parte desta memória descritiva, nos quais:

A Figura 1 é um diagrama de blocos parcial de um sistema construído de acordo com a presente invenção, para a detecção da presença de energia radiante proveniente de fontes diferentes em que cada uma emite energia com comprimentos de onda diferentes mas muito próximos;

A Figura 2 é uma representação gráfica de um único gel de electroforese susceptível de ser utilizado no sistema da Figura 1;

A Figura 3 apresenta a afinidade da radiação de emissão do corante e das características de transmissão/reflexão do filtro dicroico utilizado no sistema da Figura 1;

A Figura 4 é um fluxograma dos diferentes passos de tratamento de dados utilizados para calcular o valor dos picos de emissão detectados;

A Figura 5 apresenta os sinais típicos do detector obtidos em função do tempo para as bases marcadas T, G, A e C;

A Figura 6 é um diagrama de blocos de um terminante de cadeia marcado por fluorescência; e

A Figura 7 apresenta a afinidade da radiação de emissão do corante e das bandas passantes dos dois filtros utilizados para substituir o filtro dicroico.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Pode detectar-se a radiação de bandas de emissão muito próximas utilizando o sistema da presente invenção. Estas emissões muito próximas são produzidas por espécies de informadores pré-seleccionados que estão irreversivelmente ligadas aos materiais que se pretendem analisar no sistema. Os informadores aceitáveis são geralmente uma ou várias espécies escolhidas pela sua capacidade de emitir radiação num intervalo estreito de comprimentos de onda, normalmente num intervalo compreendido entre 50 e 100 nm, de preferência num intervalo entre 20 e 50 nm. De preferência, os máximos dos picos devem estar afastados mais do que 2 nm.

Uma espécie de informador pode emitir energia em mais do que um intervalo de comprimentos de onda, dependendo do modo de ligação aos materiais de interesse e das condições de análise no sistema. Contudo, os informadores individuais com características de emissão única no sistema escolhem-se por serem mais apropriados para emitir radiação no intervalo de comprimentos de onda que se pretende detectar. Seguidamente descrevem-se as espécies de informadores preferenciais.

Embora o sistema da presente invenção tenha ampla aplicabilidade, descrever-se-á apenas a aplicação particular da sequenciação de ADN.

Nesta forma preferencial da presente invenção, os fragmentos de sequenciação de ADN marcados com informador, produzem-se num único recipiente. O conteúdo desse recipiente, cadeias de ADN de comprimentos variáveis marcadas com informador, passam por um aparelho de electroforese para separação.

Para conseguir este objectivo, conforme se ilustra na figura 2, pode efectuar-se a electroforese com uma disposição adequada da placa 10 para electroforese, a qual possui uma espessura entre 0,2 mm e 0,4 mm e entre 25 a 40 cm de comprimento. Quando apropriado podem utilizar-se outras dimensões. Esta placa 10 possui um gel 11 adequado, normalmente 6 a 8% de poliacrilamida intercalado entre suportes 12 de vidro ou de plástico. As placas (geles) preparam-se por um processo convencional.

Normalmente coloca-se a placa 10 num suporte em posição vertical com a extremidade superior da placa 10 prolongando-se para o interior de um recipiente 16 superior que contém uma solução tampão 24, prolongando-se a parte inferior para um segundo recipiente 14 que também contém uma solução tampão 18. A solução tampão é qualquer tampão adequado: normalmente pode utilizar-se tris-borato-EDTA 0,1 M com pH 8,3. Deste modo, o tampão contacta o gel em ambas as extremidades da placa no sentido de proporcionar o contacto eléctrico. Com esta disposição, podem colocar-se uma amostra de fragmentos de ADN marcados com informador com uma pipeta numa cavidade (não apresentada) que se cria na parte superior do gel. Depois completa-se um circuito eléctrico através dos terminais 20 nos recipientes 14 e 16. É necessário um potencial adequado para se obter a separação para os geles com esta espessura e comprimento particulares. O eléctrodo positivo fica localizado no extremo inferior da placa para provocar a migração descendente dos fragmentos de ADN. Nestas condições, uma vez que os fragmentos migram através do gel, separam-se espacialmente em bandas. A zona de detecção localiza-se próximo da parte inferior da placa. Nesta zona,

irradiam-se os fragmentos com um feixe de laser 31 e ocorre a excitação/emissão, à medida que os fragmentos se movem através da zona.

Na Figura 1 apresenta-se uma disposição óptica para a irradiação da placa 10 de electroforese. O sistema da Figura 1 pode utilizar-se com qualquer sistema fluorescente ou de outro tipo informador para distinguir entre a medida de intensidade de bandas de radiação de emissão muito próximas. Contudo, conforme atrás referido, no aspecto preferencial desta Patente para detectar as emissões de fragmentos de ADN marcados com informador, far-se-á a descrição das espécies informadoras que são compostos fluorescentes. Isso inclui laser 30 que se selecciona para proporcionar um comprimento de onda específico determinado em função dos comprimentos de onda de excitação das espécies informadoras excitáveis preferenciais utilizadas. Por exemplo, a fonte específica utilizada para os informadores fluorescentes aqui descritos é um laser de iões de argon com um comprimento de onda de 488 nm e com um diâmetro de 0,8 mm para o feixe de luz operado entre 25 e 40 mW aproximadamente. O feixe do laser passa através de um filtro de excitação 32 e das lentes de focagem 33 que concentram o feixe num diâmetro de aproximadamente 0,2 mm na zona de detecção da placa de electroforese 10.

O filtro 32 selecciona-se de modo a evitar a passagem dos comprimentos de onda de excitação indesejáveis que poderiam eventualmente interferir com o processo de detecção. Se a luz do laser for muito pura, pode omitir-se este filtro. O feixe de luz que atinge a placa excita o material marcado com

informador, no caso corrente fragmentos de ADN marcados por fluorescência, à medida que migram através da zona de detecção provocando-lhes fluorescência em comprimentos de onda desviados do comprimento de onda de excitação. Embora os comprimentos de onda das emissões de pico característicos dos corantes particulares adiante descritos, quando em solução livre, sejam 505, 512, 519 e 526 nm, deve notar-se que o sistema de detecção é capaz de discriminar comprimentos de onda associados com outros conjuntos de informadores com bandas de emissão muito próximas. Além disso, apesar de ser preferível uma fonte de laser, uma vez que permite que apenas o mínimo de luz parasita colida com a amostra, com um sistema óptico e filtração adequados, podem utilizar-se outras fontes de luz não coerente tais como a lâmpada de arco de xenon.

A luz emitida pelas espécies fluorescentes capta-se com lentes de colimação 34 adequadamente colocadas, as quais produzem um feixe de luz colimada para transmissão a um filtro dicroico 38 através de um filtro de emissão 36 para eliminar fundamentalmente toda a luz excepto a dos comprimentos de onda específicos característicos da fluorescência. Utilizando este filtro, fica substancialmente filtrada toda a luz abaixo de 500 nm e acima de 560 nm, sendo transmitida a luz entre estes limites com uma eficiência superior a 50%.

De acordo com a presente invenção, o filtro de interferência dicroico 38 permite a este sistema distinguir entre espectros de emissão muito próximos. Este filtro orienta-se normalmente a 45° relativamente ao feixe incidente. A luz que colide com este filtro ou será reflectida ou transmitida

através do filtro. Para os máximos de emissão dos informadores fluorescentes, quando ligados aos fragmentos de ADN adiante descritos, nomeadamente de 515, 524, 530 e 536 nm, escolhe-se o filtro 38 de modo a que possuam uma característica de reflexão/transmissão apresentada na Figura 3. Pretende-se que o filtro dicroico 38 possua uma transição abrupta de transmissão/reflexão 39 que esteja aproximadamente no centro das bandas de fluorescência que são características destes quatro informadores. À medida que o espectro de fluorescência se desloca dos comprimentos de onda inferiores para os superiores, a proporção de luz transmitida em relação à reflectida diminui de modo contínuo. Uma vez que este filtro particular se escolheu para adaptar os informadores seleccionados para esta patente, um conjunto diferente de informadores necessitará de características de filtração diferentes.

A luz (reflectida ou transmitida) do filtro dicroico 38 passa através das respectivas lentes de focagem 40 para os respectivos detectores 42. De preferência, os detectores 42 são tubos fotomultiplicadores. São conhecidos por possuírem um elevado grau de sensibilidade nas bandas espectrais com interesse. Em alternativa podem utilizar-se fotodíodos de silício ou outros detectores semelhantes. No caso vertente em que os detectores 42 estão colocados a uma distância pré-determinada próxima da zona de incidência, pode omitir-se a lente 34 de colimação. Quando se omite esta lente, pode definir-se a zona de incidência pela abertura que corresponde à área sensora desejada do detector 42, ou pode definir-se uma abertura por meios alternativos tais como uma fibra óptica de superfície facetada.

De modo semelhante, podem omitir-se as lentes de focagem 40 se a área sensora do detector fôr suficientemente grande para captar directamente a luz disponível.

É evidente que a função do filtro dicroico 38 pode, preferencialmente, ser desempenhada por dois filtros separados de aberturas apropriadas colocados no percurso da luz emitida pela fonte para os detectores 42, em que cada filtro possui, em termos de transmissão, duas características de transmissão diferentes, isto é, qualquer uma das características de reflexão ou de transmissão do filtro dicroico. Deste modo, os dois detectores 42 são também dedicados às características de transmissão e reflexão proporcionadas pelo filtro dicroico da descrição anterior. As bandas passantes destes dois filtros veem-se mais claramente na Figura 7 e identificam-se por filtro 1 e filtro 2. Verifica-se que as bandas passantes destes dois filtros se sobrepõem aproximadamente no centro das bandas de fluorescência características dos quatro terminantes marcados com informador aqui utilizados a 515, 524, 530 e 536 nm.

Descreve-se um sistema deste tipo utilizando dois filtros no pedido de patente pendente de Robertson e outros cujo teor se incorpora aqui como referência. Conforme descrito por Robertson e outros, coloca-se um par de módulos por cima e por baixo de um plano no qual o feixe de luz de excitação do informador faz o varrimento de diversas quelhas de um gel de electroforese. Cada canal possui fragmentos de ADN marcados com informador. Cada módulo de detecção é constituído por um tubo fotomultiplicador que possui uma área de entrada larga e um filtro selectivo de comprimento de onda separado colocado entre os

seus PMT e as espécies fluorescentes no gel. Estes filtros são filtros de interferência que possuem uma característica de banda de transmissão complementar que estimula a acção do filtro dicróico. Os filtros permitem que os PMT gerem sinais que variam em amplitude em sentidos diferentes em função da natureza das espécies. Um dos filtros deixa passar facilmente os comprimentos de onda inferiores da emissão e rejeita os comprimentos de onda superiores da emissão, enquanto o outro filtro faz precisamente o contrário. Podem utilizar-se filtros de transmissão com cada filtro de interferência para rejeitar a luz que incida segundo ângulos em relação ao eixo superiores a um ângulo pré-determinado. Grosso modo, os filtros de onda possuem características de transmissão/comprimento de onda complementares na região de emissão dos quatro corantes, observando-se os comprimentos de onda de transição próximo do centro dos espectros de energia radiante das espécies.

Os sinais eléctricos dos detectores 42 passam depois pelos respectivos pré-amplificadores 46 para os conversores analógico-digitais (A/D) 48 e daí para o sistema controlador 52. As funções do sistema controlador 52 podem ser desempenhadas por um pequeno computador tal como um IBM PC. Uma das funções do sistema controlador 52, que se descreve com o fluxograma da Fig. 4, consiste em calcular o cociente das duas funções do sinal. O filtro dicróico 38 modula a intensidade dos sinais em cada uma das diferentes bandas de acordo com o comprimento de onda, isto é, para o detector de luz reflectida as emissões de comprimento de onda mais curto possuirão um valor inferior para a amplitude do sinal e as emissões de

comprimento de onda superior possuirão uma amplitude superior. Deste modo, à medida que uma espécie de informador particular, isto é, um fragmento de ADN marcado por fluorescência, no aspecto preferencial da presente invenção, passa através da zona de detecção permitindo a separação no espaço no gel 10, as suas emissões variam em amplitude em função dos seus comprimentos de onda e também do tempo (devido ao movimento através do gel 10). Os sinais de luz de amplitude modulada convertem-se em sinais eléctricos e digitalizam-se para o processamento conforme descrito. Após a conversão, calcula-se o cociente entre os sinais digitais da luz fluorescente reflectida e transmitida. Estes sinais digitais são os que representam um pico no sinal de luz correspondente a um conjunto de fragmentos de ADN. Calcula-se o cociente entre os sinais correspondentes quer à altura do pico quer à área do pico. A amplitude do cociente entre os sinais é um indicador da identidade das espécies. A função W define-se como a relação entre a intensidade do pico num detector e a intensidade do pico noutra detector, por exemplo, a intensidade do pico no detector de luz transmitida dividida pela intensidade do pico no detector de luz reflectida. A amplitude da razão entre os sinais para cada informador tende a distribuir-se em grupos ou aglomerados que são simplesmente indicadores de cada informador conforme se pode observar no Exemplo 10 ilustrativo que se segue.

Este procedimento de modulação de amplitude e de cálculo do cociente, quer se efectue com um filtro dicróico ou com filtros separados para gerarem dois sinais em que cada um varia em sentido diferente em resposta aos mesmos espectros

das mesmas espécies ensaiadas, pode-se descrever matematicamente. Deste modo, o sinal eléctrico total (correspondente ao sinal de luz detectado) presente durante uma emissão de pico de um informador, é constituído pelos componentes devido à luz desviada e dispersa, e também do sinal devido à própria fluorescência de cada um dos diferentes informadores. Durante a electroforese o sinal de fluorescência do informador pode distinguir-se de outros componentes de fundo porque os sinais de fluorescência variam no tempo e no espaço de um modo previsível. Isto em contraste com o sinal de ruído de fundo que contribui com um sinal relativamente constante, particularmente quando não existe movimento relativo entre o detector e o gel. Numa configuração estacionária do detector e do gel, os sinais de fluorescência variam no tempo devido ao movimento do informador através do gel. Em alternativa, o gel pode permanecer estacionário depois da electroforese, e o sistema de detecção pode mover-se relativamente ao gel ou vice-versa. Ainda noutra alternativa, o sistema de detecção pode mover-se enquanto ocorre a migração no gel.

Pode ver-se na Figura 5 uma representação do modo como os dois sinais de saída dos detectores variam em função do tempo. Cada par de picos na figura corresponde a um conjunto diferente de fragmentos de ADN, o qual corresponde à sequência de bases que ocorrem na porção de ADN ensaiada. As porções entre cada par de picos ficam limitadas a quatro grupos correspondendo cada um a uma base de ADN particular. São estes grupos de proporções que identificam a base particular T, C, A, ou G.

No sentido de melhorar a selectividade entre os informadores (determinada pelos valores de W), deve optimizar-se a variação de W em todas as combinações das diversas emissões do informador fluorescente. Isto pode conseguir-se escolhendo um filtro dicróico ou os seus equivalentes, conforme atrás referido, com características de transmissão/reflexão que variam substancialmente nos diversos espectros de emissão do informador. Todavia, para um grupo de informadores mais próximos, é preferível dispôr de um filtro de transição relativamente brusca a qual ocorra próximo do centro das emissões do informador, no sentido de distribuir uniformemente a variação de W para os diferentes espectros de emissão (Figura 3).

Essencialmente, este sistema proporciona uma sensibilidade de medida e uma selectividade invulgares. Com este sistema único dirige-se a luz eficientemente sobre os dois detectores intimamente ligados; e são possíveis elevados níveis de sensibilidade e de selectividade num sistema fácil de utilizar, compacto, e barato.

FLUXOGRAMA

O órgão de controle do sistema 52 converte os sinais digitais recebidos dos conversores A/D 48 em informação da sequência ADN. Na maioria dos casos, isto será feito por um computador executando programas em tempo real. Isto significa que se tratam os dados e se determina a informação da sequência concomitantemente com a aquisição dos dados sequenciais a partir dos detectores.

Conceptualmente a operação órgão de controle do

sistema pode decompôr-se em três processos interactivos: obtenção dos dados ou entrada, análise dos dados, e saída. O processo é interactivo por partilha dos dados e por partilha da informação temporal mantendo-os "intervalados" e evitando que interfiram entre si. Os pormenores do modo como estas interacções se efectuam dependem da linguagem e do equipamento informático escolhido e não assumem aqui qualquer aspecto fundamental.

A obtenção de dados e o seu tratamento efectuados deste modo podem compreender-se tomando como referência os fluxogramas da Figura 4. Esta figura representa o método geral pelo qual a sequência de dados dos detectores sequenciais de ADN pode converter-se em sinais de saída, isto é, a sequência de ADN da amostra. A Figura 5 representa curvas hipotéticas da saída do detector sequencial em função do tempo e ilustra algumas das variáveis utilizadas na descrição que se segue. Nesta discussão definem-se os termos seguintes:

1. i é o índice do dado pontual de corrente que se está a obter. Este ponto obtém-se no tempo $t(i)$ min.
2. k é o índice de dado pontual de corrente que está a ser processado. Este ponto corresponde ao dado obtido em $t(k)$ min. Num esquema geral de tratamento de dados, k não precisa de ser igual a i , isto é, o tratamento de dados pode estar desfasado da obtenção de dados.
3. $t(i)$ é uma ordenação de pontos temporais nos

quais se obtiveram os dados. Exemplo: $t(5)=6,2$ min significará que o quinto dado pontual se obteve 6,2 minutos após o início da experiência.

4. $R(i)$ é a ordenação dos dados do detector de reflexão.
5. $T(i)$ é a ordenação dos dados do detector de transmissão.
6. J é uma contagem dos picos detectados.
7. N é o número de dados pontuais sob um dado pico.
8. m é um índice dos pontos sob um pico definido quer em $R(i)$ ou $T(i)$. $m=1$ no início de um pico; $m=N$ no fim de um pico.
9. W é a função definida na secção anterior.

Obtenção de Dados

Apresenta-se um processo geral de obtenção de dados no fluxograma na parte esquerda da Figura 4. Inicia-se a afectação do índice i que indica o dado corrente obtido. O programa aceita uma entrada que determina quanto tempo a experiência irá durar, isto é, o número total de dados pontuais I_{total} . Depois de se iniciar a ordenação da sequência de dados R e T o processo entra no ciclo de obtenção de dados conforme indicado na Figura 4. Os dados são obtidos pelos detectores, digitalizados e ordenados nas sequências $R(i)$ e $T(i)$ respectivamente para os sinais reflectidos e transmitidos, obtido, respectivamente, no tempo $t(i)$. (Para efeitos da presente discussão as duas leituras são simultâneas). Nesta altura, o índice

i é incrementado e comparado com I_{total} . Se i é menor do que I_{total} repete-se o ciclo de obtenção. Se i é igual a I_{total} pára-se a experiência. Num esquema mais elaborado o programa pode determinar o fim automático da experiência medindo diversos parâmetros funcionais (tais como a relação sinal/ruído, resolução de pico, ou incerteza em identificar as bases) em cada pico da experiência. Se uma combinação de tais factores não fôr compatível com os critérios pré-estabelecidos o computador terminará a experiência. Os primeiros dados de entrada são os da sequência de dados dos detectores e armazena-se a saída nas sequências de dados $R(i)$ e $T(i)$ que são partilhadas entre os processos de obtenção e de análise de dados. Este método está representado esquematicamente na Figura 4. Embora os dois programas corram independente e simultaneamente, deve transitar entre eles alguma informação de controlo no sentido de manter um ritmo apropriado. Por exemplo, não se pode permitir que um programa de processamento ultrapasse os espaços de obtenção de dados porque iria então processar dados não existentes.

Processamento de Dados

O algoritmo de processamento de dados representado na parte direita da Figura 4 é um exemplo de um esquema geral para detectar e identificar as espécies marcadas com informador. Não se pretende englobar tudo. Em vez disso, ilustra os aspectos primários que são necessários ao desenvolvimento de um programa de analisador real.

Depois de se iniciar a afectação do índice k (dis-

tinto do índice i de obtenção de dados), o programa entra num ciclo simples que lê os dados $R(k)$ e $T(k)$ a partir das sequências de dados ordenados proporcionados pelo processo de obtenção. O programa pergunta então se o ponto de corrente está sobre um pico. Existem diversos algoritmos que podem determinar esta condição; os pormenores não são necessários aqui. O termo "pico" é considerado em sentido geral. Um pico em R será geralmente acompanhado por um pico em T . Contudo, consoante a identidade do informador, os picos, nestes dois canais, podem diferir consideravelmente em intensidade. Todavia deverão coincidir no tempo. Por isso, para definir um "pico" no tempo pode utilizar-se uma média ponderada dos dois sinais, o mais forte dos dois sinais, ou qualquer outra combinação de $R(k)$ e $T(k)$.

Se o ponto processado em curso não está num pico, o índice k é incrementado e comparado com o índice i de aquisição. Se k for igual a I_{total} , a experiência está acabada e pára o programa. Se k for menor do que i os dados pontuais seguintes são trazidos das sequências R e T e executa-se novamente o ciclo. Se k fôr igual a i significa que o processamento de dados alcançou a obtenção de dados. Nesta situação, o programa de processamentos espera durante um curto período de tempo (normalmente um segundo) e ensaia novamente os valores de k e de i para que se possa retomar o processamento.

Se o ponto processado em curso estiver sobre um pico, o índice m é incrementado. O índice m conta o número de pontos sob o pico em curso. Os valores $R(k)$ e $T(k)$ colocam-se em ordenações temporárias designadas $R_{pico}(m)$ e $T_{pico}(m)$ res-

pectivamente. Depois o programa verifica se o ponto em curso é o último ponto do pico (repetindo, existem algoritmos conhecidos para esta determinação). Se não fôr o último ponto do pico, o controle do programa regressa ao ciclo superior que incrementa k , compara o seu valor com o de i , e lê o par seguinte de dados das ordenações R e T .

Se o ponto em curso fôr o último ponto do pico, o contador de picos J é incrementado e o programa desenvolve-se no sentido de determinar a identidade do pico. O resultado é a identidade da base seguinte na sequência de ADN. O programa calcula a função W para os picos em curso, conforme atrás descrito, utilizando as ordenações $R_{pico}(m)$ e $T_{pico}(m)$ como dados de entrada. Cada base de nucleótido terá associada a ela um par de picos que proporciona uma característica W . Deste modo, baseado no valor de W para este pico o programa faculta, como saída, a identidade A, T, C, G da base de ADN. O índice m do ponto do pico e as ordenações R_{pico} e T_{pico} são colocadas a zero, e o programa regressa novamente ao ciclo superior de obtenção de dados indicado na Figura 1.

Métodos de Marcação na Sequenciação de ADN

A estratégia utilizada para ligar informadores a fragmentos de sequenciação de ADN no modelo de bases específica é um aspecto crítico de qualquer sistema de sequenciação de ADN. Existem diversas abordagens possíveis possuindo cada uma vantagens e desvantagens inerentes.

Marcação do Sistema Escorvador

A abordagem anterior da marcação do sistema escor-

vador referido por Smith e outros tem a vantagem de se poder colocar o corante longe do ponto de origem, na extremidade 5' do sistema escorvador utilizando intermediários gerados num sintetizador automático de oligonucleótido. É de se esperar muito fraca interferência com a extensão enzimática da cadeia a partir da posição 3'. Contudo, esta abordagem tem diversas desvantagens. São necessários quatro diferentes sistemas escorvadores de oligonucleótido marcado com corante e a produção de fragmentos de sequenciação deve efectuar-se em quatro reacções separadas, complicando assim qualquer tentativa para automatizar o processo global. A necessidade de sistemas escorvadores especiais reduz a flexibilidade relativamente à escolha do vector (modelo). Por exemplo, a utilização de sistemas escorvadores marcados torna difícil tirar as vantagens completas das estratégias para a sequenciação rápida de grandes quantidades de ADN contínuo (por exemplo, técnicas de "percurso sobre o gene"). Há uma desvantagem maior na área do rendimento. A abordagem de marcação do sistema escorvador origina que todos os fragmentos sejam marcados - tanto os fragmentos de sequenciação genuínos como diversos fragmentos artificiais englobarão a marca. Deste modo, manter-se-ão muitos dos inconvenientes encontrados na sequenciação convencional (bandas esbatidas, acumulações, etc.).

Marcação Posterior dos Fragmentos

Outra abordagem possível é um esquema de marcação posterior. Neste esquema a marcação do corante efectuar-se-á depois de se gerar a mistura de fragmentos de sequenciação.

Neste caso a vantagem consiste em poderem utilizar-se os protocolos normalizados (de Maxam-Gilbert ou de Sanger) até ao ponto de marcação dos fragmentos. A maior desvantagem consiste no facto de a marcação dever ser excepcionalmente selectiva. Uma vez que se pode esperar que a ligação do informador tenha um efeito incremental mensurável sobre a mobilidade electroforética de um fragmento de sequenciação de ADN, é essencial que este efeito seja constante para todos os fragmentos. A marcação múltipla destruiria a relação entre o comprimento da cadeia e a mobilidade electroforética e seria desastrosa.

Marcação do Terminante da Cadeia

De acordo com a presente invenção é preferível uma terceira abordagem, isto é, a marcação do terminante da cadeia de acordo com uma modificação do processo de Sanger de sequenciação de ADN. O método clássico de Sanger utiliza um sistema escorvador, um modelo de ADN, polimerase I de ADN (fragmento de Klenow), três desoxinucleótidos não marcados e um desoxinucleótido marcado radioactivamente, em quatro recipientes de reacção cada um dos quais contendo um de entre quatro 2', 3'-didesoxinucleótidos, os quais correspondem às quatro bases de ADN (A,C,T,G). Criam-se condições de reacção apropriadas que permitam à polimerase copiar o modelo por adição de nucleótidos à terminação 3' do sistema escorvador. Ocorrem simultaneamente muitas reacções em muitas cópias do sistema escorvador para produzir fragmentos de ADN de comprimento variável contendo todas a marca radioactiva nos nucleótidos apropriados de cada fragmento, e que também terminam, irreversi-

velmente, num dos quatro didesoxinucleótidos. Este conjunto de fragmentos separa-se normalmente em quatro quelhas de gel de electroforese numa placa de poliacrilamida, correspondendo uma quelha a cada uma das quatro misturas reaccionais dos didesoxinucleótidos. Depois de se terem separado os fragmentos, coloca-se sobre o gel uma película foto-sensível, expõe-se, em condições apropriadas, e conclui-se sobre a sequência de ADN a partir da leitura do diagrama de bandas da película, conforme a ordem em que aparecem nas quatro quelhas a partir do fundo do gel.

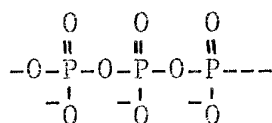
As modificações ao método de Sanger, de acordo com a invenção, englobam a omissão do nucleótido marcado radioactivamente e a substituição dos 2', 3'-didesoxinucleótidos não marcados por terminantes de cadeia marcados com informador. As misturas reaccionais conterão então fragmentos que estão irreversivelmente marcados nos seus terminais 3' com um informador apropriado, correspondente a cada uma das quatro bases de ADN. Combinam-se as misturas reaccionais e separam-se por electroforese. A sequência deduz-se pela ordem de aparecimento de informadores distintos associados com cada fragmento, de acordo com os métodos da presente invenção.

Para delinear o âmbito estrutural e racional dos terminantes de cadeia marcados com identificador, aqui utilizados, é útil decompor a estrutura em cinco componentes ilustrados esquematicamente na Figura 6. Por exemplo, um terminante de cadeia marcado por fluorescência contém (i) uma parte de trifosfato (ii) uma parte de "açúcar", (iii) uma parte de base heterocíclica, (iv) uma parte de ligante, e (v) uma

parte de informador, em que o informador é um composto fluorescente.

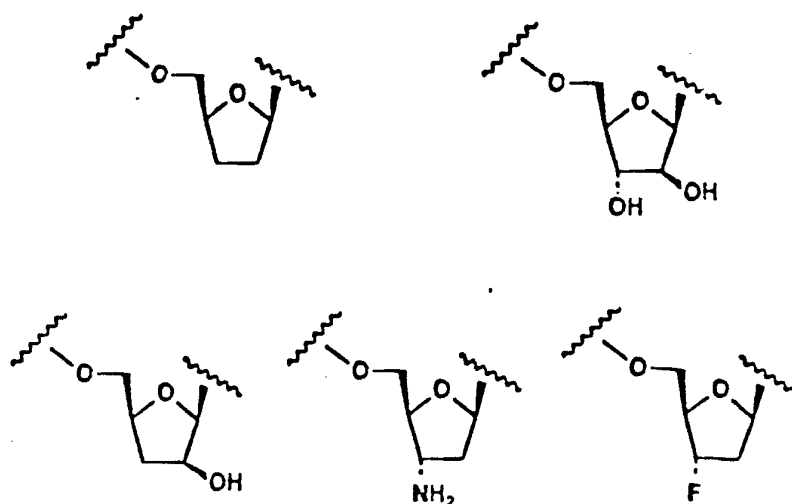
Depois da descrição anterior é evidente que o termo "terminante de cadeia" é genérico no processo de sequencição de ADN com a metodologia de Sanger. O processo melhorado da presente invenção utiliza variedades mais especializadas de terminantes de cadeia que também têm vantajosamente ligados a eles um informador. Estes novos compostos podem diferenciar-se dos terminantes de cadeia genéricos na medida em que estes últimos compostos contêm normalmente apenas as partes trifosfato (i), "açúcar" (ii) e base heterocíclica (iii) atrás referidas. Os terminantes de cadeia da presente invenção serão designados por "terminantes de cadeia marcados com informador" e conterão, normalmente, as cinco partes atrás descritas.

Parte de Trifosfato



A parte de trifosfato ou de um composto análogo semelhante (por exemplo, alfa-tiotrifosfato) é uma funcionalidade obrigatória para qualquer substrato de enzima, de terminação de cadeia ou equivalente. Esta funcionalidade proporciona a maior parte da energia de ligação para o substrato e é o sítio actual da reacção enzima-substrato.

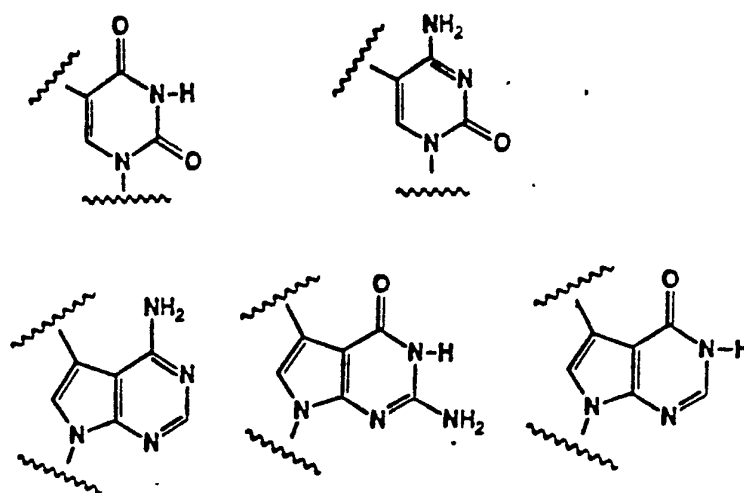
Parte de Açúcar



A parte "açúcar" corresponde ao fragmento estrutural de 2'-desoxiribofuranose nos substratos de enzima natural. Esta porção da molécula contribui para a identificação do enzima e é essencial para manter as relações espaciais adequadas entre a parte trifosfato e a porção de base heterocíclica. Uma exigência do terminante de cadeia quando a parte "açúcar" é uma ribofuranose, consiste em a posição 3' não poder ter um grupo hidroxil susceptível de ser subsequentemente utilizado pela polimerase de ADN. O grupo hidroxil deve estar ausente, substituído por outro grupo, ou ser inutilizado de qualquer outro modo. Em alternativa, pode utilizar-se um análogo de ribofuranose, tal como a arabinose, para a parte "açúcar". A técnica existente mostra que diversos fragmentos de furanose modificada podem servir para esta função incluindo: 2', 3'-didesoxi-β-D-ribofuranosilo, β-D-arabinofuranosilo, 3'-desoxi-β-D-arabinofuranosilo, 3'-amino-2', 3'-didesoxi-β-D-ribofuranosilo, e

2', 3'-didesoxi-3'-fluoro- β -D-ribofuranosilo [F. Sanger e outros Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467 (1977); Z. G. Chidgeavadze e outros, Nuc. Acids Res., 12, 1671-1686 (1984); e Z. G. Chidgeavadze e outros, FEBS Lett., 183, 275-278 (1985)]⁷.

Parte da Base Heterocíclica



A parte de base heterocíclica funciona como elemento crítico de identificação nos ácidos nucleicos que actuam como aceitadores e dadores de uma ligação hidrogénio numa orientação espacial particular. Estes elementos de base são essenciais para a incorporação do nucleótido apropriado orientado pelo modelo com a fidelidade necessária para a sequência exacta. Esta parte estrutural também suporta o informador. A técnica actual mostra que a posição 5 das pirimidinas e a posição 7 das purinas podem suportar mesmo um substituinte relativamente volumoso sem interferência significativa com a ligação ou identificação global [R. M. K. Dale e outros

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2238-2242 (1973)⁷. Deste modo, as partes de base heterocíclica preferenciais englobam: uracilo, citosina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-guanina, e 7-deaza-hipoxantina. As 7-deaza-purinas não naturais utilizam-se de modo que o informador se possa ligar sem adicionar uma carga livre à porção de base ou desestabilizar a ligação glicosídica. Por isso, as purinas naturais não servem como partes de base heterocíclicas adequadas porque adquirem carga livre e degradam-se rapidamente após as reações de alquilação normalmente utilizadas para preparar terminantes de cadeia marcada com informador. Além disso, podem utilizar-se outras bases heterocíclicas que possuam grupos funcionais semelhantes.

Parte Ligante

O ligante pode ser simplesmente apenas um grupo amino ou uma cadeia com uma estrutura principal contendo átomos tais como carbono, azoto, oxigênio ou enxofre.

De preferência o ligante é um grupo alcinil-amino em que uma extremidade da ligação tripla está ligada a uma amina através de uma parte de di-radical substituído ou insubstituído, representado pelo símbolo R_1 , de 1 a 20 átomos; a outra extremidade da ligação tripla está ligada covalentemente à base heterocíclica na posição 5 para as pirimidinas ou na posição 7 (numeração purina) para as 7-deaza-purinas. O átomo de azoto da amina do grupo alcinil-amino está ligado a um grupo funcional reactivo (por exemplo, carbonil) na marca fluorescente. O ligante não deve interferir significativamente com a ligação ou incorporação pela polimerase do ADN. A parte di-

-radical pode ser alquilenos (C_1-C_{20}), de cadeia linear, contendo eventualmente na cadeia ligações duplas, ligações triplas, grupos arilo ou hetero-átomos tais como azoto, oxigénio ou enxofre. Os hetero-átomos podem fazer parte dos grupos funcionais tais como os éteres, tio-éteres, ésteres, aminas ou amidas. Os substituintes da parte di-radical podem englobar átomos de cloro ou grupos alquilo (C_1-C_{16}), arilo, éster, éter, amina, amida. De preferência, a parte di-radical é um grupo alquilenos (C_1-C_{10}) de cadeia linear; mais preferencialmente o di-radical é um grupo $-CH_2-$. Uma descrição mais pormenorizada dos ligantes mais apropriados para serem utilizados nos terminantes de cadeia marcados com informador da presente invenção, pode encontrar-se no pedido de patente pendente de Hobbs e outros.

Parte Informador

A descrição anterior realça a utilidade de um meio de detecção que esteja particularmente adaptado para medir espectros muito próximos, preferencialmente de um conjunto de informadores fluorescentes usados como espécies emissoras. Todavia, também se podem utilizar outras espécies que emitam radiação com espectros próximos, para marcar os fragmentos de ADN. Podem identificar-se diversos critérios para a selecção de espécies de informadores apropriadas para realizar os processos da presente invenção. Estes critérios englobam:

- * excitação eficiente por uma fonte monocromática e uma resposta de emissão forte e perceptível;
- * presença de um grupo funcional quimicamente reactivo,

susceptível de ligação covalente, directa ou indirectamente, com terminantes de cadeia de nucleótidos ou dos seus análogos;

- * massas relativamente pequenas para minimizar a perturbação das relações espaciais nos fragmentos de oligonucleótidos;
- * características de carga e dimensão semelhantes às de outros membros de um grupo ou conjunto escolhido de informadores seleccionados para diferenciação de terminantes de cadeia;
- * estabilidade num intervalo diversificado de preparações de amostras, condições de pH para reacção e separação de fragmentos, resistência iónica e temperatura, relativamente às características de detecção e propriedades físicas;
- * propriedades que possuam um efeito nocivo mínimo na produção ou na separação de fragmentos de sequência de ADN.

Podem encontrar-se espécies de informadores adequadas em diversas categorias de materiais que podem funcionar com as propriedades atrás referidas. Dentre aqueles distinguem-se os cromóforos, fluoróforos, substâncias químio-luminescentes, marcas de rotação rápida, e materiais densos em electrões. A detecção de cada uma destas espécies de materiais também pode ser feita por meios diversificados. Por exemplo, as emissões das espécies fluorescentes podem detectar-se, conforme atrás referido, por um processo que faça a diferenciação das

distribuições espectrais. Nos sistemas de detecção fluorescentes alternativos, pode recorrer-se às propriedades das espécies tais como a polarização e resolução temporal diferencial para identificar com exactidão fragmentos que possuam terminantes de cadeia de ADN marcados, correspondentes a cada base. Os meios de detecção escolhidos podem optimizar-se por métodos conhecidos para maximizar a relação sinal/ruído e para conseguir uma sensibilidade aceitável, minimizando os sinais parasitas ou ruído de fundo. As propriedades e vantagens, únicas da presente invenção, obtêm-se por associação dos meios de detecção apropriados com o terminante de cadeia identificada por informador, na sequenciação de ADN.

De modo semelhante, pode utilizar-se a fotometria convencional para detectar cromóforos consentâneos com as exigências dos informadores nos métodos da presente invenção. Podem seleccionar-se apenas quatro cromóforos, os quais também possuem propriedades fluorescentes, para serem incorporados nos terminantes de cadeia no sentido de introduzir informadores detectáveis por meios diversos, incluindo a espectrofotometria de contagem de fotões e de absorção. Um exemplo típico dos cromóforos que podem ser úteis é o 2,4-dinitro-fenol e os seus derivados.

Podem ocorrer substituições apropriadas em diferentes características de emissão perante um dado conjunto de condições que sejam semelhantes, tornando possível a sua detecção com o equipamento anteriormente descrito, apenas com ligeiras modificações.

Os informadores luminescentes diferenciam-se dos

informadores fluorescentes pelo período de tempo necessário para reemitirem a radiação incidente. Os indicadores fluorescentes reemitem a energia incidente absorvida geralmente ao fim de um tempo compreendido entre 10^{-8} e 10^{-3} segundos. Com frequência também se utiliza o termo "fosforescente" para se fazer referência a compostos que são luminescentes e, de um modo geral, os termos são permutáveis. Estes compostos demoram mais tempo a reemitir a energia incidente absorvida do que os compostos fluorescentes. Os indicadores luminescentes típicos são derivados do ácido 2,2'-di-hidroxi-bifenil-5,5'-di-acético, por exemplo o ácido 2,2'-di-hidroxi-3,3'-dimetoxi-bifenil-5,5'-diacético, 2,2'-di-hidroxi-bifenil-5,5'-dialanina, 2,2'-di-hidroxi-bifenil-5,5'-dietil-amina, etc.

Outras espécies de indicadores podem ligar-se covalentemente aos terminantes de cadeia para servirem de reagentes densos em electrões, tais como as partículas de ouro coloidal. Estes materiais podem utilizar-se num sistema de formação de imagem susceptível de detectar pequenas variações nas propriedades de transmissão da luz incidente sobre uma quelha de gel de electroforese. As marcas de rotação rápida também se podem utilizar com detectores apropriados para de modo individual marcar cada terminante de cadeia proporcionando identificação da base. A complexidade dos meios de detecção nestas situações pode exigir a simplificação de se manterem amostras separadas para cada terminante de cadeia identificado com indicador, em vez de as combinar numa única anotação antes de a(s) submeter aos meios de separação.

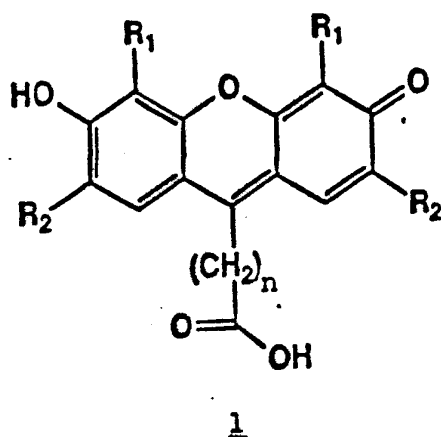
Para um especialista na matéria é evidente que se

podem conceber meios apropriados para detectar uma combinação dos informadores atrás referidos para diferenciar os quatro terminantes de cadeia de nucleótido marcado com informador, num dado sistema. Isto aplica-se especialmente aos compostos ligados covalentemente aos terminantes de cadeia que possuam simultaneamente fortes propriedades de absorção e de fluorescência. Todavia, pode utilizar-se qualquer combinação dos informadores anteriores que tenham sido escolhidos para serem utilizados de acordo com as propriedades desejáveis já descritas, em sistemas que possuam uma ordenação complementar de meios de detecção.

No caso mais específico do aspecto preferencial da presente invenção, a parte fluorescente proporciona radiação emitida detectável após a excitação por absorção de energia de uma fonte apropriada tal como um laser de iões de argon. É desejável possuir um único informador fluorescente para cada base de ADN encontrada nas aplicações de sequenciação e, de um modo geral, é adequado um conjunto de quatro informadores fluorescentes distinguíveis.

Concebeu-se uma família de informadores úteis nos métodos de sequenciação de ADN da presente invenção especialmente com este objectivo, com base no corante 9-carboxi-etil-6-hidroxi-3-oxo-3H-xanteno já conhecido. Conhecem-se outros corantes derivados deste composto. S. Biggs e outros, "J.Chem Soc."; 123, (1923) p. 2934-2943 descrevem a preparação de diversos derivados de succinil-fluoresceína que se presume possuírem como substituintes átomos de bromo em duas ou quatro posições (succinileosina) na estrutura do núcleo de resorci-

nol. Também se prepararam outros derivados tendo como substituintes grupos dinitro e tetranitro na succinil-fluoresceína. Estes corantes prepararam-se, aparentemente, por processos mais simples e mais eficientes do que os processos anteriores. Contudo, não se descobriu nenhuma relação entre estes corantes e não se efectuou nenhuma caracterização significativa das suas propriedades físicas incluindo os seus espectros de emissão. Esta família de informadores fluorescentes úteis para a sequenciação de ADN pelos processos da presente invenção possui a estrutura geral

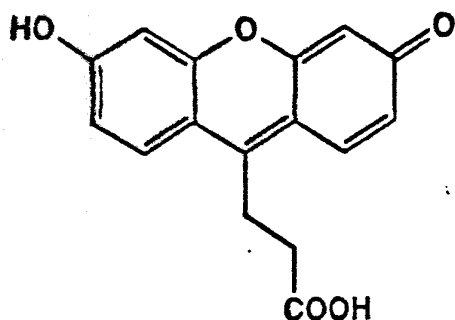


na qual n é 2 ou 3 e R_1 e R_2 representam átomos de hidrogénio ou de halogénio ou grupos alquilo inferior, alcoxí inferior, ou ciano. Estes materiais preparam-se facilmente por condensação do anidrido succínico ou do anidrido glutárico com o resorcinol adequadamente substituído no ácido metano-sulfónico. Isto constitui uma modificação do procedimento descrito por Biggs e outros para a preparação do composto associado.

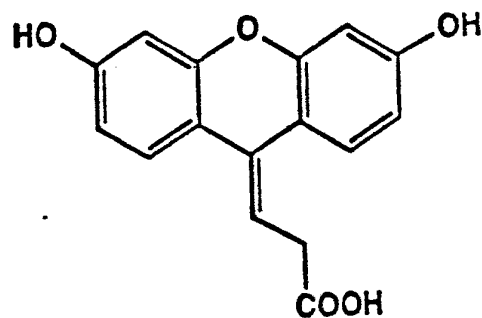
4.

P. Khanna e outros [Patente de invenção americana na nº 4 481 136 (1984)] descreveram uma classe de compostos que engloba a estrutura 1 quando o símbolo R_2 representa um grupo alquilo e o símbolo R_1 representa um átomo de hidrogênio, e a sua utilização na preparação de conjugados de antígenos fluorescentes. Apesar de se demonstrar a sua utilização individual em experiências imunológicas fluorescentes, não há indicação de uma utilização que exija uma família de tais corantes ou de qualquer aplicação para a sequenciação de ADN.

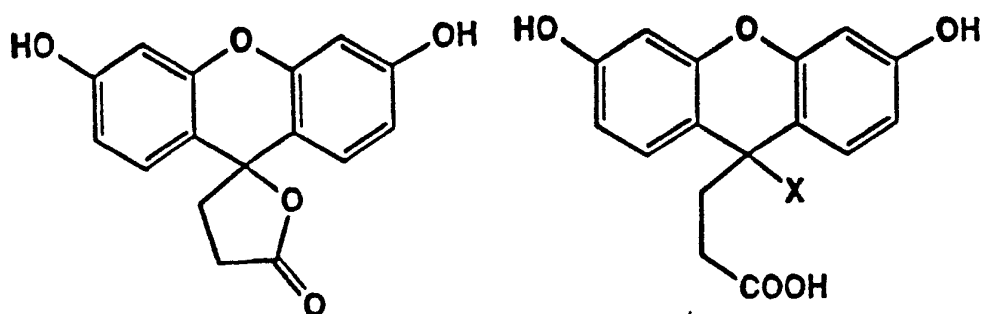
Subentende-se que os corantes de xanteno são susceptíveis de existirem em diversas formas diferentes, geralmente formas moleculares convertíveis umas nas outras. Estas formas, a seguir referenciadas pela sua origem (1, $n = 2$, $R_1 = R_2 = H$) designam-se por formas quino-, delta-, espiro-, e leuco-. A forma observada numa dada situação determinar-se-á pela natureza dos símbolos n , R_1 , e R_2 , e por condições tais como a temperatura, poder solvente, pH, e forma de cristal. Por clareza e conveniência apenas se utilizará a forma quino- para designar e esboçar estruturas.



QUINO-



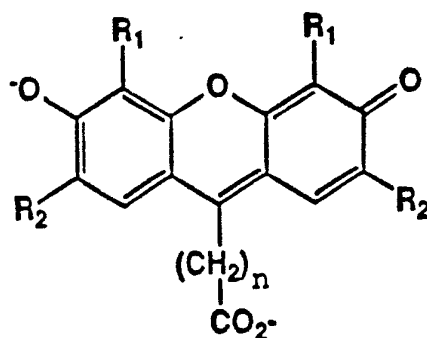
DELTA-



SPIRO-

LEUCO-

As espécies fluorescentes efectivas são o di-anião 2, que deriva formalmente da forma quino-. Geralmente estas espécies predominam em soluções aquosas com pH superior a 7. O di-anião derivado do corante original ($n = 2$, $R_1 = R_2 = H$) está muito bem adaptado para ser excitado por um laser de iões de argon que opera a 486 nm. Para um pH de 8,2 esta espécie apresenta um máximo de absorção a 487 nm com um coeficiente de absorção de 72 600 aproximadamente. A espécie emite a 505 nm com uma eficiência comparável à da fluoresceína (rendimento quântico de 0,9 aproximadamente).



Pode gerar-se um conjunto de quatro corantes fluorescentes distintos por dução de pequenas variações no máximo de emissão do cromóforo original através de variações na natureza dos substituintes representados pelos símbolos R_1 e R_2 . As pequenas diferenças correspondentes nos espectros de absorção mantêm a excitação eficaz com um laser de iões de argon que opera a 486 nm. Limitando a escolha de R_1 e R_2 a substituintes relativamente pequenos que não transportem carga livre, é possível garantir que os efeitos diferenciais na mobilidade electroforética também sejam pequenos quando os corantes estiverem ligados aos fragmentos de ADN.

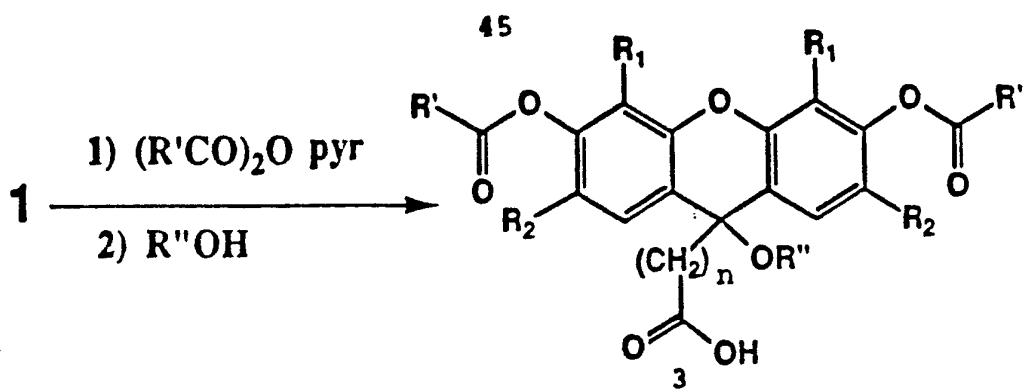
Um conjunto preferencial de tais corantes adequados para a sequenciação de ADN é: (estrutura 1, $n=2;1$) $R_1 = R_2 = H$, absorção a 486 nm, emissão a 505 nm; 2) $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$, absorção a 494 nm, emissão a 512 nm; 3) $R_1 = CH_3$, $R_2 = H$, absorção a 500 nm, emissão a 519 nm; 4) $R_1 = R_2 = CH_3$, absorção a 509 nm, emissão a 526 nm. O corante com o comprimento de onda de absorção máximo apresenta uma eficiência de excitação de cerca de 50%. Estes quatro corantes detectam-se e distinguem-se facilmente em concentrações adequadas para a sequenciação de ADN.

Ligação do Corante aos Terminantes de Cadeia

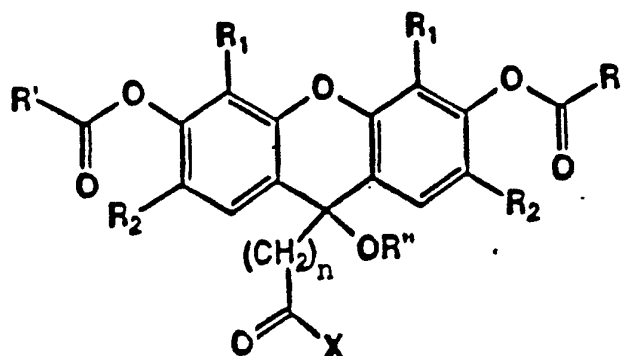
A ligação covalente dos corantes de xanteno faz-se pelo grupo funcional ácido carboxílico através de uma ligação amida com um grupo amina ligante. É útil a introdução de grupos de protecção química para bloquear os corantes numa forma adequada e para minimizar as reacções secundárias duran

te o acoplamento.

A reação de um corante (1) com um anidrido de ácido alquílico ou arílico (R') em piridina, seguida do tratamento com um álcool alquílico (R'') em excesso proporciona um novo composto, o corante protegido (3) que suporta grupos aciloxi nas posições 3 e 6 e um grupo alcoxi (derivado do álcool) na posição 9. Os compostos em que o grupo acilo é um acetilo e o grupo alcoxi é um grupo etoxi preparam-se facilmente e apresentam boa estabilidade, cristalinidade e solubilidade orgânica. O tratamento rápido com amônia aquosa concentrada regenera o corante livre.



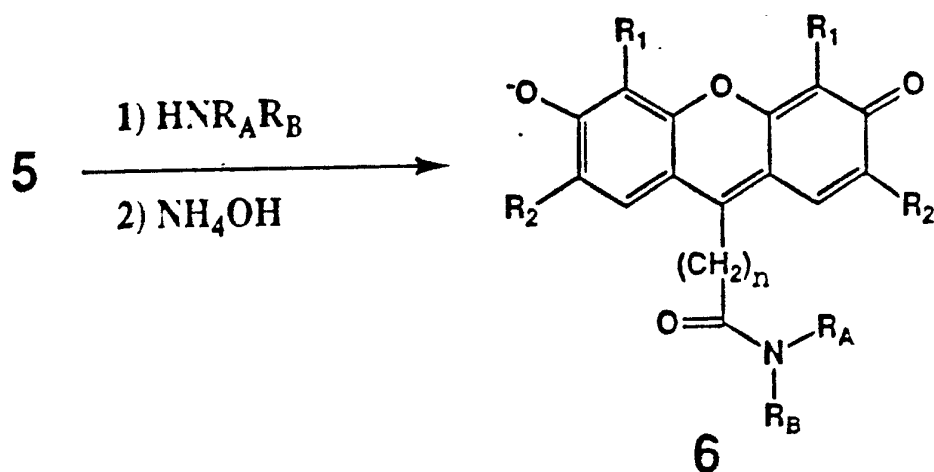
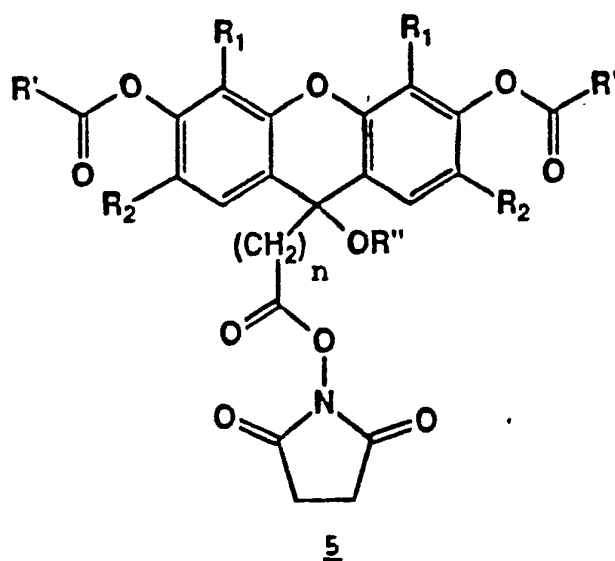
Os corantes protegidos (3) podem acoplar-se às aminas através do grupo carboxilo utilizando qualquer dos procedimentos normalizados. As ligações amida são preferenciais por serem estáveis, fáceis de formar, e compatíveis com os sistemas aquosos. As espécies activas nestes procedimentos são geralmente, um intermediário de estrutura 4 em que o símbolo -X representa um grupo facilmente eliminável.



4

Estas espécies activas geram-se e ligam-se normalmente in situ, mas, em alguns casos, é possível isolar e purificar os produtos intermédios. Uma classe particularmente útil de intermediários activados isoláveis é a dos ésteres NHS 5. Os compostos preparam-se facilmente tratando os corantes protegidos 3 com uma carbo-di-imida apropriada, tal como N,N-diciclo-hexil-carbo-di-imida, ou preferencialmente cloridrato de 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-carbo-di-imida, na presença de N-hidroxi-succinimida. São compostos estáveis, altamente cristalinos que reagem facilmente com amina primária e secundárias numa diversidade de dissolventes. O material com interesse que se pretende analisar no sistema da presente invenção contribui para as amina primárias e secundárias. Normalmente estes materiais são de deoxinucleótidos ou os seus análogos que contêm as bases de pirimidina e deazapurina desejadas, úteis no protocolo de extensão de cadeia de ADN de Sanger modificado.

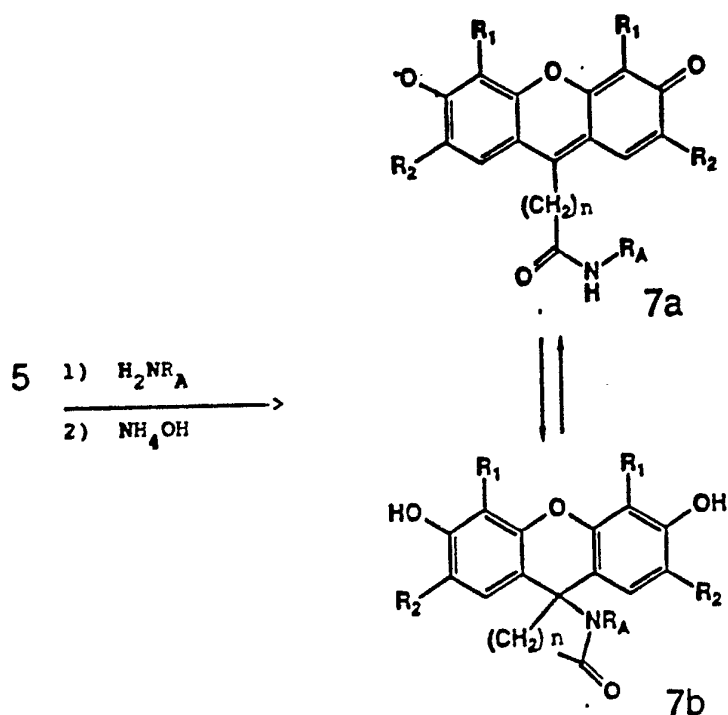
Os ésteres NHS 5 podem utilizar-se directamente para ligação a uma ampla variedade de amins secundárias. A desprotecção do produto, com amónia aquosa, proporciona um derivado 6 de amina marcada com corante que apresenta uma intensidade de fluorescência completa.



O acoplamento de um éster NHS 5 às amins primárias é rápida e fácil mas a desprotecção origina geralmente uma

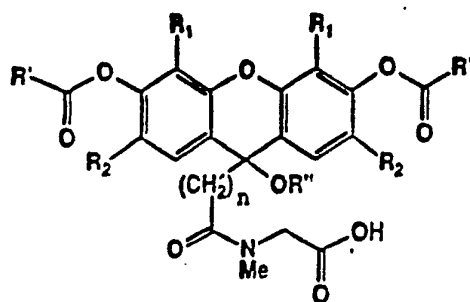
amina marcada que apresenta uma intensidade de fluorescência reduzida. Isto pode ser atribuído a um equilíbrio parcial entre o produto fluorescente 7a e a forma de espiro-lactama não fluorescente 7b. O grau de equilíbrio está dependente do dissolvente, pH, e da amina. Este problema pode minorar-se inserindo um espaçador entre o corante e a amina. O espaçador pode ser seleccionado entre diaminas, diácidos, ou a partir de moléculas que suportam aminas secundárias e ácidos carboxílicos. Os espaçadores preferenciais contêm aminas reactivas que podem formar ligações amida com os grupos carboxílicos do corante. O espaçador está associado principalmente com os informadores, particularmente com os corantes fluorescentes, e a sua função consiste em remover a amina reactiva do corante no sentido de evitar a ciclização que proporciona a espiro-lactama. Também é consistente com a observação o facto de o espaçador afastar o corante ainda mais do sítio activo da polimerase de ADN. Este afastamento pode melhorar a incorporação de terminantes de cadeia marcados com informador nos fragmentos de ADN.

Em contrapartida, a ligação de um éster NHS 5 a uma amina secundária preferencial proporciona uma espécie que não apresenta ciclização apreciável para proporcionar a forma de espiro-lactama, mas que suporta um ácido carboxílico para activação e ligação da amina que interessa.

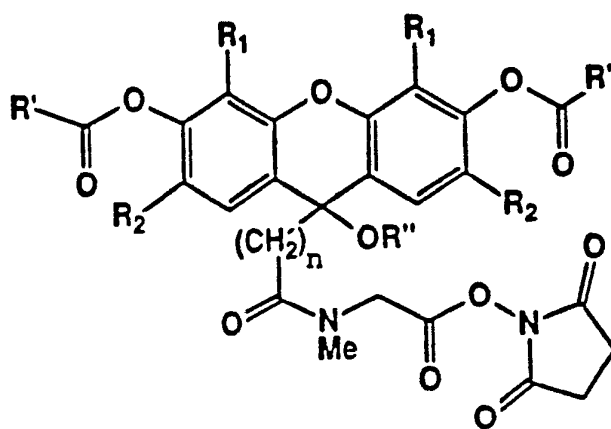


Por exemplo, pode construir-se um espaçador simples e eficaz a partir do aminoácido sarcosina. O acoplamento de um éster NHS (5) ao éster benzílico de sarcosina, seguida da eliminação do éster benzílico origina um ácido carboxílico da estrutura 8. Tal como sucede com os próprios corantes protegidos (3), também estes ácidos carboxílicos (8) se podem acoplar às aminas utilizando qualquer um dos diversos métodos normalizados. Repetindo, os ésteres NHS da estrutura 9 podem ser isolados e são particularmente úteis neste contexto.

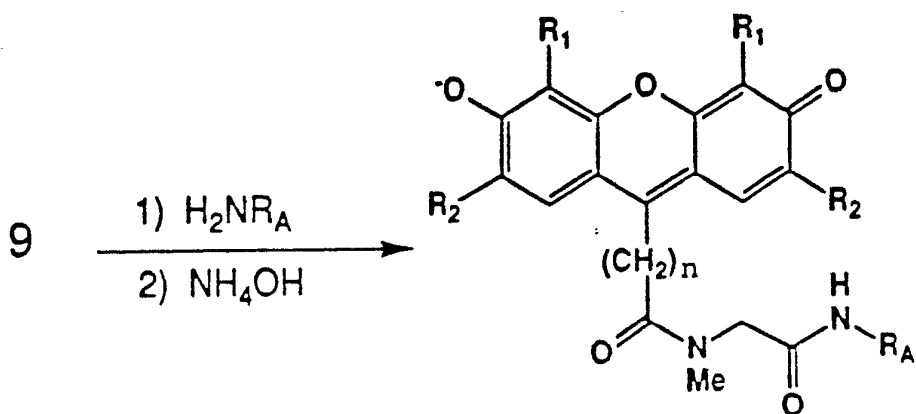
O acoplamento dos ésteres NHS 9 às aminas seguida de uma desprotecção no seio de amónia aquosa origina derivados de amina marcados com corante com a estrutura geral 10 os quais são totalmente fluorescentes.



8



9

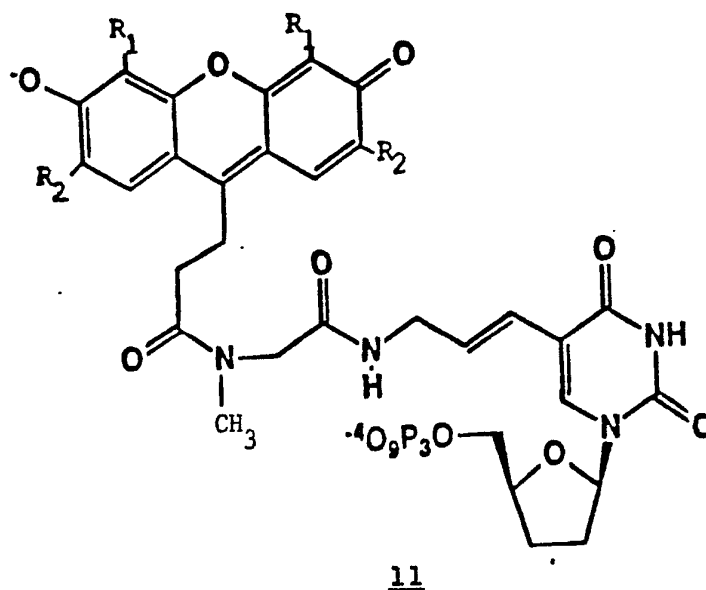


10

Como regra geral, seria preferível conceber ou obter um material com interesse que contivesse uma amina primária

ria, o qual poderia ser conseguido com um espaçador apropriado. Pensa-se que a inserção de um espaçador evita as reações de ciclização. Podem utilizar-se aminas secundárias mas estas não reagem tão rapidamente nem tão eficazmente como as aminas primárias.

A estrutura 11 é representativa de um terminante de cadeia marcado por fluorescência. Este material pode preparar-se por uma via convergente. Prepara-se 2', 3'-didesoxiuridina a partir de 2'-desoxiuridina comercialmente disponível, em 5 passos [K. E. Pfitzner e outros, J. Org. Chem., 29, 1508-1511 (1964)]. Prepara-se o 5'-trifosfato directamente por adaptação do procedimento em recipiente único de J. L. Ruth e outros, Mol. Pharmacol., 20, 415-422 (1981). Fixa-se um ligante 3-amino-1-propenil-1 à posição 5 da base heterocíclica através de uma adaptação da sequência de reacções descritas por P. Langer e outros, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78,6633 (1981) e Patente Europeia 82301804.9 (1982). A reacção de 5-(3-amino-1-propenil-1)-2', 3'-didesoxiuridina-5'-trifosfato com o éster NHS 9 ($N = 2$, $R_1 = R_2 = H$) seguida pela desprotecção por um tratamento rápido com amónia aquosa origina o novo terminante de cadeia 11 marcado por fluorescência.

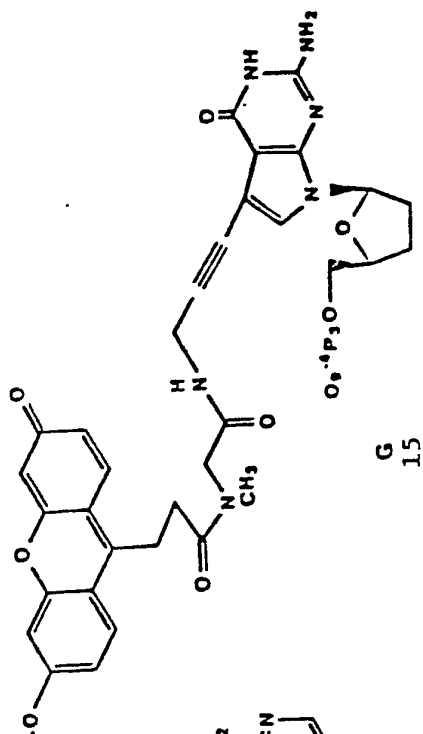
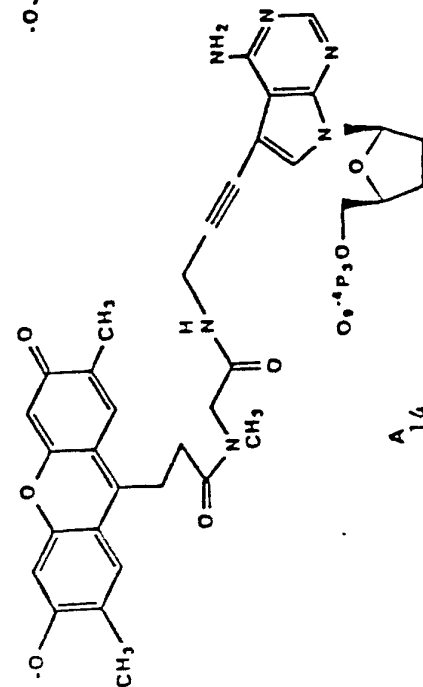
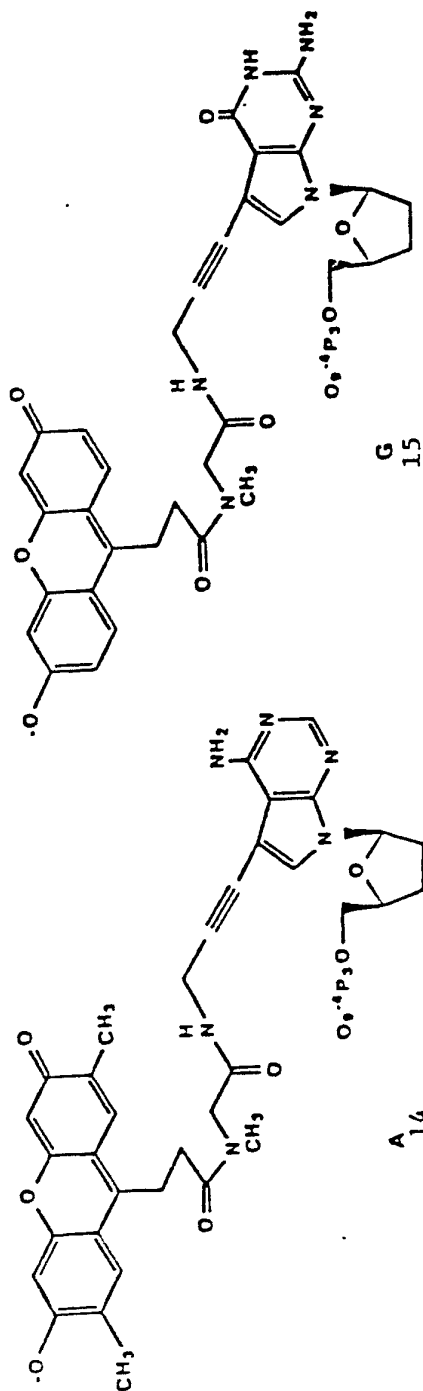
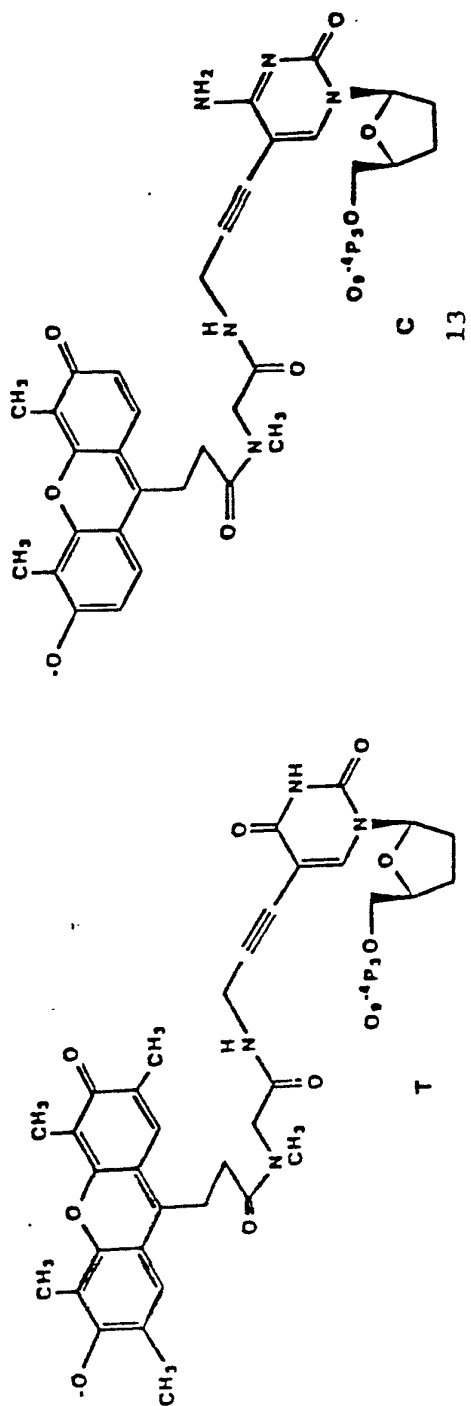


O composto 11 pode substituir o ddTTF no protocolo de Sanger modificado. Um conjunto completo de quatro terminantes de cadeia pode ser constituído por 11 e por três análogos com diferentes partes fluorescentes e base heterocíclica. A preparação de três análogos para substituir os terminantes de cadeia restantes não marcados do protocolo de Sanger modificado implica a substituição da parte de base heterocíclica de 11 (uracil) por citosina (em vez de ddCTF), 7-deaza-adenina (em vez de ddATF), e 7-deaza-guanina (em vez de ddGTF). A parte fluorescente pode alterar-se mudando os substituintes aromáticos R_1 e R_2 que representam ambos átomos de hidrogénio (em 11) respectivamente para, CH_3 e átomo de hidrogénio, átomo de hidrogénio e CH_3 , ou dois grupos CH_3 . Os compostos preparam-se por vias semelhantes às descritas para 11.

Verificou-se que a substituição do ligante 3-amino-1-propenil-1 por um ligante 3-amino-1-propinil-1 proporciona

terminantes de cadeia marcados com informador funcionalmente equivalentes que se podem preparar mais facilmente. A utilização de um ligante propinilo permite a preparação de terminantes de cadeia marcados com informador mais estáveis e com rendimentos superiores aos preparados com o ligante propenilo. Outra vantagem consiste no facto de o ligante propinilo estar ligado mais selectivamente à região das bases nucleót_ido do que o ligante propenilo.

Por conseguinte, os terminantes de cadeia marcados com informador preferenciais para utilização no método de ampliação da cadeia de Sanger modificado pela presente invenção são 12, 13, 14, e 15.



Além disso, é de esperar que o corante fluorescente uma vez ligado covalentemente a uma base de deazapurina ou de pirimidina através de um ligante e eventualmente de um espaçador, o seu máximo de emissão nominal desviar-se-á no sentido de um comprimento de onda superior. De certo modo este efeito depende da natureza da base e das condições de medida do pH, resistência iônica, solvente, meio de separação, etc. Em alternativa, um factor que parece não influenciar as características de emissão dos fluoroforos é a natureza dos nucleosidos adjacentes nos fragmentos do ADN que contêm o terminante de cadeia marcado por fluorescência. Pensa-se que as emissões de um dado fluoroforo permanecem constantes quando o seu terminante de cadeia está enzimaticamente acoplado a qualquer das pirimidinas e purinas próximas. Por exemplo, os terminantes de cadeia marcados com informador atrás descritos possuem fluoroforos que emitem nos máximos a 515 nm (12), 524 nm (14), 530 nm (13), e 536 nm (15) após uma excitação a 488 nm. Sob condições semelhantes de medida, estes fluoroforos em solução, no estado livre não ligados, apresentavam um máximo de emissão nominal de 505 nm, 512 nm, 519 nm e 526 nm respectivamente. Estes desvios nos máximos de emissão medem-se facilmente e determinam-se na experimentação de rotina. Por sua vez, a caracterizacão desta distribuição dos máximos de emissão permite seleccionar a característica de reflexão/transmissão pretendida do filtro dicróico ou do seu equivalente no sistema da presente invenção.

A escolha do enzima de sintetização de ADN determinar-se-á normalmente pela estrutura específica do terminante

te de cadeia. Por exemplo, o composto 11 é insuficiente para proporcionar terminações específicas de sequência com o fragmento Klenow do enzima I de polimerase de ADN, mas com a transcriptase inversa VMA ou com a polimerase do bacteriófago T7, obtêm-se terminações virtualmente idênticas às que se observam com ddTTF (conforme verificado utilizando a marcação convencional com ^{32}P) em concentrações comparáveis.

As reacções de terminação/extensão de cadeia podem efectuar-se em recipientes separados ou num recipiente único conforme as circunstâncias (por exemplo, gama de terminações pretendido, grau de automatização associado). O terminante de cadeia marcada com fluorescência e as concentrações de dNTF ajustam-se para proporcionar uma distribuição adequada de fragmentos de sequenciação. Os fragmentos de sequenciação de ADN marcados com fluorescência apresentam uma estabilidade superior à dos seus equivalentes marcados com ^{32}P e pode fazer-se a sua análise por meio de electroforese imediatamente a seguir ou mais tarde, ao contrário dos fragmentos marcados com ^{32}P os quais se decompõem com o tempo.

Como contributo para ultrapassar muitas das desvantagens inerentes à técnica anterior, a abordagem de marcação de terminantes de cadeia da presente invenção também é significativa na medida em que proporciona diversas vantagens operacionais. Acima de tudo, a marcação de terminante liga firmemente o informador associado ao resultado de terminação específica de base. Apenas os fragmentos de sequenciação de ADN resultantes de produtos finais de terminação genuína suportarão um informador. Isto elimina muitos dos inconvenientes

observados na sequenciação convencional. Isto proporciona completa flexibilidade na escolha do vector de sequenciação visto que não estão implicados sistemas escorvadores especiais. A automatização fica facilitada pelo facto de os informadores serem suportados pelos quatro terminantes de cadeia de baixo peso molecular da presente invenção, e de poderem ser introduzidos selectivamente numa reacção única. Não há desvantagens operacionais inerentes: com esta abordagem os problemas aparecem ao nível da concepção. Em geral, as polimerases de ADN são de substrato altamente selectivo. Os quatro reagentes de terminação de cadeia marcados com informador devem ser conseguidos cuidadosamente de modo a que os grupos de informadores associados não interfiram excessivamente com o grau de fidelidade de incorporação.

O potencial de elevado rendimento e diversas vantagens operacionais fazem da abordagem do terminante de cadeia marcado com informador um método superior para a preparação de fragmentos de sequenciação de ADN marcados com informador, através da metodologia de Sanger modificada.

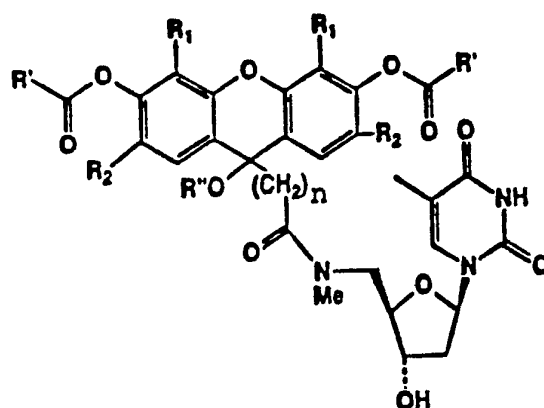
Marcação do Sistema Escorvador

Apesar de os corantes descritos se utilizarem com maior vantagem para a preparação de terminantes de cadeia marcados por fluorescência, também se podem utilizar na abordagem da marcação do sistema escorvador. O rendimento superior destes materiais relativamente à detecção, discriminação e mobilidade electroforética fazem deste pedido de patente uma melhoria substancial do sistema de Smith e outros.

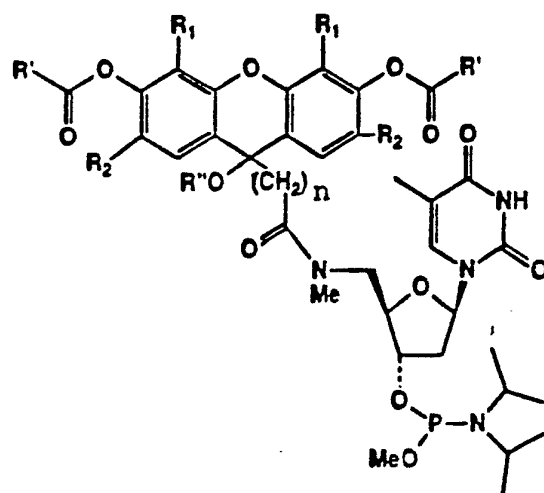
Na abordagem de Smith e outros, utilizou-se uma fosforamidite de nucleosido derivado de amina protegido, para preparar um 5'-amino-5'-desoxi-oligo-nucleótido utilizando um sintetizador automático. Purificou-se este material e depois ligou-se em reacções separadas não automáticas a quatro corantes diferentes. Purificaram-se os quatro oligo-nucleótidos marcados com corante e utilizaram-se como sistemas escorvadores no protocolo de Sanger no qual se omitiu o usual desoxinucleótido marcado radioactivamente.

A disponibilidade dos derivados protegidos dos corantes descritos nesta memória descritiva (por exemplo, 3) permite conceber fosforamidites de nucleosidos que são marcadas com os corantes protegidos. Quando utilizado num sintetizador automático, tal reagente permite a introdução simultânea final do informador fluorescente e do radical em 5'. Esta vantagem permite eliminar a necessidade de efectuar uma ligação manual e uma purificação adicional.

Prepara-se um reagente de fosforamidite de nucleosido marcado com corante protegido típico do modo seguinte. Gera-se um éster NHS (5) in situ e faz-se reagir com 5'-desoxi-5'-(metil-amino)-timidina para se obter um derivado 16 de nucleosido marcado com corante e protegido. A fosfitilação na posição 3' utilizando técnicas normalizadas ["Oligonucleotide Synthesis", Ed., M. J. Gait, IRL Press, Washington, D.C. (1984)]⁷ proporcionou a correspondente fosforamidite 17.



16



17

Para preparar um oligo-nucleótido marcado com corante na posição 5' que sirva como sistema escorvador escolhe-se um radical T no terminal 5'. A síntese automática efectua-se pela forma normal com a excepção de se utilizar 17 como reagente da fosforamidite final. [Uma vez que não está presente qualquer grupo de protecção dimetoxi-tritilo (DMT) pode eliminar-se o tratamento final com ácido)]. O tratamento com amônia aquosa que liberta o oligo-nucleótido do suporte sólido

também serve para desproteger o corante. A desprotecção fica completa depois do tratamento prolongado com amónia utilizado para desproteger as bases do nucleótido. A electroforese normalizada em gel preliminar origina o oligo-nucleótido marcado com corante.

Esta abordagem não evita os problemas inerentes a uma abordagem de marcação do sistema escorvador mas apresentará um rendimento superior ao dos sistemas escorvadores utilizados no sistema de Smith e outros. Os desvios diferenciais na mobilidade electroforética serão minimizados e a detecção/discriminação é bastante melhorada, conforme descrito.

Outras Utilidades dos Corantes

Para além de serem úteis na marcação de terminantes de cadeia de ADN ou como sistemas escorvadores, estes corantes também são geralmente úteis como informadores fluorescentes. Podem utilizar-se para marcar proteínas, haptenos, ácidos ribonucleicos ou outras moléculas com interesse biológico para utilização em ensaios imunológicos, ensaios de ligação específica, coloração histoquímica ou em quaisquer outras utilizações que exijam a marcação fluorescente. A marcação destas substâncias consegue-se utilizando procedimentos conhecidos análogos aos anteriormente descritos para a marcação de amins. Estas composições são particularmente úteis quando é necessário mais do que um informador fluorescente numa dada aplicação, visto que se podem excitar eficientemente com uma única fonte de luz monocromática e detectar-se como informadores distintos devido aos máximos de emissão desviados. Estas são as mesmas

propriedades fluorescentes que fazem com que estes corantes sejam úteis como informadores na sequenciação de ADN. Estes corantes têm a vantagem adicional de se poderem ligar uns aos outros utilizando a mesma funcionalidade química, em vez das diversas funções geralmente necessárias com as fluorescências conhecidas.

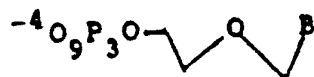
Derivados de Nucleosido Acíclico

Embora os trifosfatos de 2', 3'-didesoxi-nucleosido (ddNTP's) se utilizem virtual e exclusivamente como terminantes de cadeia na sequenciação convencional com ^{32}P , também se podem utilizar outros derivados de açúcar modificado conforme atrás referido. Estes materiais têm a desvantagem (de alguma forma partilhada pelos ddNTP) de serem de preparação relativamente difícil. Um conjunto eficaz de terminantes de cadeia que possuíssem um "açúcar" menos complexo e de introdução mais fácil, seriam úteis simultaneamente na sequenciação convencional de ADN com ^{32}P e na sequenciação baseada na fluorescência (com um informador fluorescente ligado à base heterocíclica).

No fármaco antivírico "Aciclovir" (aciclo-guanosina) substituiu-se o grupo 2'-desoxi-ribofuranosilo por um grupo 2-hidroxi-etoxi-metilo. O Aciclovir é metabolizado para proporcionar in situ o trifosfato correspondente (AcyGTP). O AcyGTP está referenciado como sendo simultaneamente um inibidor competitivo e não competitivo de diversas polimerases. Também é considerado, correntemente, como um substrato alternativo para terminação de cadeia para essas enzimas [P. V. McGuirt e outros, Antimicrob. Agents and Chemother. 25, 507 (1984)] mas o

seu componente inibidor possui uma análise complicada do comportamento do seu substrato. Uma vez que a actividade antivírica do Aciclovir se pode explicar pela sua capacidade para inibir selectivamente as polimerases dos vírus, nunca se caracterizou completamente a relação de processamento e os produtos derivados do AcyGTP. (Os correspondentes trifosfatos acíclicos de timidina, adenosina, e citidina foram referenciados mas as suas interacções com as polimerases estão ainda deficientemente caracterizadas). Em parte alguma da técnica conhecida se demonstra ou sugere que os trifosfatos de aciclo-nucleosido (AcyNTP) podem terminar a cadeia de polimerização de ADN com uma eficácia e fidelidade idêntica à de compostos tais como os ddNTP. Em particular, nunca se referiu que algum AcyNTP proporcionasse uma escada de sequenciação quando utilizado como potencial terminante de cadeia em experiências de sequenciação de ADN.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, demonstrou-se que os trifosfatos de aciclo-nucleosido (AcyNTP) são úteis como terminantes de cadeia na sequenciação de ADN pela metodologia de Sanger.



Isto demonstrou-se efectuando a sequenciação convencional de Sanger (^{32}P como informador de nucleotido) substituindo os ddNTP pelos AcyNTP. As escadas de sequenciação resultantes foram virtualmente idênticas, com a excepção de ser

necessária uma concentração superior de AcyNTP (grosso modo 10 x) para se obter uma distribuição semelhante de fragmentos de ADN. Os AcyNTP foram eficazes simultaneamente com a polimerase I de ADN (fragmento de Klenow) e com a transcriptase inversa de AMV.

Os AcyNTP possuem a vantagem de se sintetizarem mais facilmente do que os ddNTP. Isto não é um problema fundamental na sequenciação convencional mas é significativo quando se preparam terminantes de cadeia marcados com informador, estruturalmente complexos. A utilização do grupo 2-oxi-etoxi-metilo como uma parte "açúcar" (conforme anteriormente definido) simplifica amplamente a síntese do reagente ao mesmo tempo que mantém um rendimento aceitável.

PARTE EXPERIMENTAL

Os exemplos seguintes apresentam-se como ilustração e não como uma limitação.

Todas as temperaturas estão em graus Celsius. (25° significa a temperatura local ou ambiente). Todas as partes e percentagens não estritamente especificadas são em peso, excepto para as misturas de líquidos para as quais são em volume. Utilizam-se as abreviaturas seguintes: DMF - dimetil-formamida; DMSO - dimetil-sulfóxido; NHTFA - grupo trifluoro-acetamido; BTEA - bicarbonato de trietil-amónio; Tris - tris-(hidroximetil)-amino-metano; SF - succinil-fluoresceína; RMN - espectro de ressonância magnética nuclear; IV - espectro de infra vermelhos; UV - detecção ou espectro ultravioletas; CCF - cromato

grafia de camada fina em gel de sílica; CLPE - cromatografia líquida de pressão elevada; CG - cromatografia em fase gasosa; pf - ponto de fusão; pf d - ponto de fusão com decomposição; pe - ponto de ebulição. Ao fazer-se referência aos dados sobre RMN, apresentam-se os desvios químicos em ppm e as constantes de acoplamento (J) apresentam-se em Hertz. Os pontos de fusão não foram corrigidos. As resinas de permuta de iões lavaram-se com solventes orgânicos e aquosos apropriados antes de se utilizarem. A identidade de todos os compostos aqui descritos determinou-se por técnicas analíticas e de espectroscopia apropriadas, salvo quando especificado de outra forma, a purificação por cromatografia em gel de sílica efectuou-se conforme descrito por Still e outros, "J. Org. Chem.", 43 (1978) p. 2923-2926.

EXEMPLO I

Preparação de um intermediário de éster activado por espaçador marcado por fluorescência a 505 nm.

A. Preparação de 9-(carboxi-etilideno)-3,6-di-hidroxi-9H-xanteno (SF-505)

Colocou-se resorcinol (33,0 g; 0,300 mole) e anidrido succínico (30,0 g; 0,300 mole) num frasco de fundo redondo e purificou-se com azoto. Adicionou-se ácido metano-sulfónico (150 ml) e agitou-se a solução a 65°C durante duas horas numa atmosfera de azoto. Adicionou-se, gota a gota, a mistura reaccional a água gelada (1 litro) agitada rapidamente, com adição simultânea de hidróxido de sódio aquoso a 50% para man

ter o pH a $2,5 \pm 0,5$. O produto que se obteve, sob a forma de um precipitado granulado, recolheu-se por filtração e lavou-se com água (3 x 100 ml) e depois com acetona (3 x 100 ml). Secou-se o produto ao ar e depois em vácuo (estufa de vácuo) a 110°C durante 18 horas para se obter um pó vermelho escuro (37,7 g; 88%).

Preparou-se uma amostra analítica dissolvendo 1,0 g de produto em 25 ml de HCl 0,3 N quente. O precipitado que se formou ao arrefecer removeu-se por filtração e eliminou-se. Adicionou-se hidróxido de sódio aquoso diluído para elevar o pH para 1,25. O precipitado resultante recolheu-se por filtração, lavou-se com água, secou-se ao ar, e depois secou-se em vácuo sobre P_2O_5 a 140°C durante 36 horas.

Análise: Calculado. $[\text{C}(16)\text{H}(12)\text{O}(5)]$ C 67,60, H 4,26.

Encontrado: C 67,37, H 4,34, 0,52% de água (K-F). RMN ($\text{DMSO}-d_6$): (principalmente na forma de espirolactona) δ 2,690 (t, $J=8,6$ hz, 2H); 3,070 (t, $J=8,6$ hz, 2H), 6,530 (d, $J=1,8$ hz, 2H); 6,676 (dd, $J=8,7$, 1,8 hz, 2H), 7,432 (d, $J=8,7$, 1,8 hz, 2H), 7,432 (d, $J=8,7$ hz, 2H), e 9,964 (s, 2H). Vis. abs. (pH 8,2; 50 mM aq Tris/HCl): max 486 nm (72,600).

B. Preparação de 9-(2-carboxi-etil)-3,6-di-acetoxi-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-505)

Adicionou-se SF-505 (29,3 g; 103mmole) a anidrido acético arrefecido com gelo (500 ml) seguindo-se depois a adição de piridina (100 ml). Agitou-se a mistura em gelo, durante 20 minutos, e depois adicionou-se durante 20 minutos a água gelada agitada rapidamente (7 litros). Depois de se agitar du-

rante mais 30 minutos filtrou-se o produto intermediário, fez-se nova suspensão em água (4 litros) e agitou-se durante mais 30 minutos. Recolheu-se o sólido por filtração, dissolveu-se em etanol absoluto (1 litro) e fez-se o refluxo durante 45 minutos. Concentrou-se a solução num evaporador rotativo até se obter 200 ml que originaram a cristalização. Recolheu-se o produto por filtração, secou-se ao ar, e depois secou-se em vácuo para se obter microcristais côm de laranja clara (21,9 g ; 51%).

A recristalização no seio de cloreto de metileno/ciclohexano originou microcristais incolores. pf: 142-143°C. Análise: Calculado. $[C(22)H(22)O(8)]$ C 6,63.76, H 5,35. Encontrado: C 63,58, H 5,39. RMN (DMSO- d_6): δ 1,035 (t, J=6,9 hz, 3H), 1,667 (m, 2H), 2,232 (m, 2H), 2,294 (s, 6H), 2,888 (q, J=6,9 hz, 2H), 7,0-7,1 (m, 4H), e 7,575 (d, J=9.1 hz, 2H).

C. Preparação de 9-(2-(N-succinimidil-oxi-carbonil)-etil)-3,6-di-acetoxi-9-etoxi-9H-xanteno.

(Ac2EtSF-505-NHS)

Misturou-se Ac2EtSF-505 (10,4 g; 25,1 mmole) com cloreto de metileno (300 ml) e adicionou-se cloridrato de 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-carbo-di-imida (9,70 g; 50,6 mmole) e N-hidroxi-succinimida (4,32 g; 37,5 mmole). Agitou-se a mistura durante uma hora e depois lavou-se com água (5 x 50 ml). As camadas aquosas combinadas extraíram-se com cloreto de metileno (50 ml) e as camadas orgânicas combinadas secaram-se sobre sulfato de sódio e removeram-se. A trituração no seio de etanol (75 ml) seguida de filtração e secagem no ar proporcionou o produto bruto na forma de um sólido amarelo claro (c. 10 g).

Dissolveu-se este material em cloreto de metileno (50 ml) e adicionou-se ciclo-hexano (50 ml). Adicionou-se uma colher de chá de carvão vegetal, filtrou-se a mistura e diluiu-se o produto com uma porção adicional de ciclo-hexano (100 ml). Recolheu-se por filtração, secou-se no ar e depois no vácuo para proporcionar cristais incolores, (6,94 g; 54%).

Uma segunda cristalização no seio de etanol proporcionou uma amostra analítica. p.f.: 162-163°C. Análise: Calculado.

$[C(26)H(25)N(1)O(10)]$ C 61,05, H, 4,93, N 2,74. Encontrado: C 60,78, H 5,01, N 2,65. RMN (DMSO- d_6): δ 1,056 (t, J=7,0 hz, 3H), 2,4-2,1 (m, 4H), 2,293 (s, 6H), 2,757 (s, 4H), 2,922 (q, J=7,0 hz, 2H), 7,069 (m, 4H), e 7,617 (pd, J=9,1 hz, 2H).

D. Preparação de 9-(2-(N-metil-N-(benzil-oxi-carbonil-metil)carboximido)etil)-3,6-di-acetoxi-9-etoxi-9H-xanteno
(Ac2EtSF-505-Sar-OBn)

A uma solução de éster* benzílico de sarcosina (1,13 g; 6,31 mmole) em cloreto de metileno (50 ml) adicionou-se Ac2EtSF-505-NHS (2,58 g; 5,05 mmole) e uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5% (30 ml). Agitou-se a mistura de duas fases rapidamente durante 20 horas. Separaram-se as camadas e lavou-se a camada orgânica com 3 x 15 ml de água, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se até se obter 25 ml. Diluiu-se a solução com ciclohexano, até se obter um volume de 150 ml, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se para 75 ml sob uma corrente de azoto, proporcionando a precipitação do produto.

Decantou-se a parte sobrenadante e evaporou-se o resíduo em conjunto com o cloreto de metileno para se obter uma espuma in

color (1,70 g; 58%).

A secagem prolongada no vácuo proporcionou uma amostra analítica. Análise: Calculado. $[C(32)H(33)N(1)O(9)]$ C 66,77, H 5,78, N 2,43. Encontrado: C 66,66, H 5,89, N 2,25.

RMN (DMSO- d_6): (Apresenta uma mistura 5:2 de rotâmeros de ligação amida) δ (maior e menor) 1,040 e 1,018 (t, $J=6,7$ Hz, 3H), 1,789 e 1,670 (m, 2H), 2,211 (m, 2H), 2,290 e 2,276 (s, 6H), 2,713 e 2,695 (s, 3H), 2,893 (q, $J=6,7$ Hz, 2H), 3,963 (s, 2H), 5,075 e 5,039 (s, 2H), 7,044 (m, 4H), 7,324 (m, 5H), e 7,573 e 7,516 (p d, $J=9,2$ Hz, 2H).

* O sal p-tosilato do éster benzílico de sarcosina (Adams Chemical Co.) extraíu-se com cloreto de metileno e lavou-se repetidamente com bicarbonato de sódio aquoso a 5%, depois lavou-se com água, secou-se sobre sulfato de sódio e removeu-se.

E. Preparação de 9-(2-(N-metil-N-(N'-succinimidil-oxi-carbonil-metil)carboxamido)etil)-3,6-di-acetoxi-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-505-Sar-NHS)

A uma solução de Ac2EtSF-505-Sar-OBn (1,55 g; 2,69 mmole) em etanol absoluto (60 ml) adicionou-se paládio em carvão a 10% (0,15 g). Agitou-se a mistura num balão de vidro sob pressão de hidrogénio durante 30 minutos. Removeu-se o catalisador por filtração e eliminou-se o etanol para se obter um resíduo xaroposo.

Dissolveu-se o resíduo em cloreto de metileno (85 ml) e adicionou-se N-hidroxi-succinimida (0,495 g; 4,30 mmole) e cloridrato de 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-carbo-di-imid

da (1,12 g; 5,84 mmole) (4 x 25 ml). Concentrou-se a solução até 25 ml, diluíu-se até 175 ml com ciclo-hexano, tratou-se com carvão vegetal, e reduziu-se o volume para 75 ml sob uma corrente de azoto. O produto sólido recolheu-se por filtração, secou-se ao ar, e secou-se no vácuo para se obter um pó incolor (0,97 g; 62%).

A evaporação em conjunto com cloreto de metileno, seguida de secagem prolongada no vácuo a 40°C removeu os vestígios de ciclo-hexano e originou uma amostra analítica de um sólido amorfo. Análise: Calculado $[C(29)H(30)N(2)O(11)]$ C 59,79 H 5,19, N 4,81. Encontrado: C 59,37, H 4,62, N 4,62, 0,93% de água (K-F). RMN (DMSO- d_6): (Apresenta uma mistura 4:1 de rotameros de ligação amida) δ (maior e menor) 1,034 (t, J=6,9 hz, 3H), 1,827 e 1,935 (m, 2H), 2,223 (m, 2H), 2,289 (s, 6H), 2,758 (s, 4H), 2,779 e 2,824 (s, 3H), 2,888 (q, J=6,8 hz, 2H), 4,333 e 4,473 (s, 2H), 7,043 (m, 4H), e 7,587 (por d, J=9,1 hz, 2H).

EXEMPLO 2

Preparação de um intermediário de éster activado por espaçador marcado por fluorescência a 512 nm

A. Preparação de 4-metil-resorcinol

Dissolveu-se 2,4-di-hidroxi-benzaldeído (33,97 g; 0,246 mole) (recristalizado no seio de tolueno) em 2-propanol (3 litros) de qualidade adequada para espectroscopia, num frasco de fundo redondo equipado com uma entrada de gás e uma saída para o gás libertado. Adicionou-se paládio em carvão a 10% (1,35 g) e depois adicionou-se ácido fosfórico (3 ml) e pulverizou-se a mistura com azoto. A corrente de azoto foi substitu

ída por hidrogênio e agitou-se a mistura rapidamente com arrefecimento em gelo. Decorridas 3 horas cessou a libertação de hidrogênio e removeu-se o catalisador por filtração. Separou-se o filtrado até 200 ml e adicionaram-se 200 ml de acetato de etilo. Lavou-se a solução com 4 x 200 ml de água e os extractos combinados e extraíram-se com acetato de etilo. Estes extractos orgânicos lavaram-se com água e as camadas orgânicas combinadas secaram-se sobre sulfato de sódio e separaram-se para se obter o produto na forma de um sólido cristalino incolor (29,95 g; 98%). p.f.: 106°C (Lit. 106-107°C [J. C. Bell, W. Bridge, e A. Robertson, J. Chem. Soc., 1542-45 (1937)]). RMN (DMSO-d₆): δ 1,961 (s, Me), 6,076 (dd, H-6, J[5,6] = 8 hz, J[2,6] = 2 hz), 6,231 (d, H-2), 6,760 (d, H-5) 8,867 (s, OH), e 9,008 (s, OH).

B. Preparação de 9-carboxi-etilideno-3,6-di-hidroxi-2,7-dimetil-9H-xanteno (SF-512)

Colocou-se 4-metil-resorcinol (25,8 g; 0,208 mole) e anidrido succínico (20,8 g; 0,208 mole) num frasco de fundo redondo e purificou-se o frasco com azoto. Adicionou-se ácido metano-sulfônico (150 ml) e aqueceu-se a solução a 65°C, numa atmosfera de azoto, durante duas horas. Adicionou-se, gota a gota, esta solução a 1 litro de água gelada fortemente agitada com a adição simultânea de hidróxido de sódio aquoso a 50 %, para manter o pH a $2,25 \pm 0,25$. Recolheu-se o produto por centrifugação e lavou-se com água (3 x) e acetona (2 x). Secou-se o sólido ao ar, depois secou-se em vácuo a 110°C para se obter um pó côr de tijolo (24,1 g; 74%).

A purificação efectuou-se deixando que o acetato de etilo se dispersasse lentamente numa solução do produto em dimetil-sulfóxido. Recolheu-se o precipitado por filtração, secou-se ao ar, e depois secou-se em vácuo. RMN (DMSO-d₆): (Apresenta uma forma delta pura em conjunto com uma mole de água e de dimetil-sulfóxido). δ 2,124 (s, 6H), 3,421 (d, J=7,2 hz, 2H), 5,769 (t, J=7,2 hz, 1H); 6,512 (s, 1H), 6,573 (s, 1H); 7,295 (s, 2H), 9,681 (s, 1H), 9,825 (s, 1H), e 12,346 (bs, 1H). Vis. abs. (pH 8,2 aq Tris): max 493,5 nm.

C. Preparação de 9-carboxi-etil-3,6-di-acetoxi-2,7-dimetil-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-512)

Adicionou-se uma amostra de SF-512 (20,0 g; 64,0 mmole) a anidrido acético (350 ml), adicionando-se em seguida, piridina (80 ml). Agitou-se a solução durante uma hora e depois filtrou-se para eliminar os vestígios do corante que não tinha reagido. Verteu-se o filtrado em 3,5 litros de água agitada rapidamente. O sólido intermediário recolheu-se por filtração, fez-se nova suspensão em 2 litros de água fria, agitou-se durante 15 minutos, depois recolheu-se e secou-se ao ar para se obter o produto intermédio de espirolactona (20,8 g). Dissolveu-se este produto em etanol absoluto (600 ml) e fez-se o refluxo durante 45 minutos. Tratou-se a solução com carvão vegetal e concentrou-se até 300 ml. Recolheu-se o produto por filtração, lavou-se com etanol frio (2 x 50 ml), secou-se ao ar, e depois secou-se em vácuo para se obter microcristais incolores (14,9 g; 53%). p.f.: 143°C. Análise: Calculado. [C(24)H(26)O(8)] C 65,15, H 5,92. Encontrado: C 65,31, H 5,97. RMN

(DMSO- d_6): δ 1,027 (t, J=6,9 Hz, 3H), 1,628 (m, 2H), 2,136 (s, 6H), 2,207 (m, 2H), 2,303 (s, 6H), 2,884 (q, 6,9 Hz, 2H), 6,939 (s, 2H), e 7,417 (s, 2H).

D. Preparação de 9-(2-(N-succinimidil-oxi-carbonil)-etil)-3,6-di-acetoxi-2,7-dimetil-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-512-NHS)

A uma solução de Ac2EtSF-512 (9,42 g; 21,3 mmole) em cloreto de metileno (175 ml) adicionou-se N-hidroxi-succinimida (3,62 g; 31,5 mmole), adicionando-se imediatamente a seguir cloridrato de 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-carbo-di-imida (8,05 g; 42,0 mmole). Agitou-se a solução à temperatura ambiente durante 2 horas. Lavou-se a mistura com água (4 x 100 ml), e extraíram-se os produtos aquosos da lavagem com cloreto de metileno (2 x 50 ml). Secaram-se as camadas orgânicas combinadas sobre sulfato de sódio e removeram-se para se obter um óleo. Adicionou-se etanol absoluto e induziu-se a cristalização por nucleação. Recolheu-se o produto por filtração, secou-se ao ar, depois secou-se no vácuo para se obter microcristais cor de laranja clara (9,80 g; 85%).

Preparou-se uma amostra analítica dissolvendo um grama em cloreto de metileno (10 ml) e adicionando ciclo-hexano (40 ml). O tratamento com carvão vegetal seguido de arrefecimento e nucleação induziu a cristalização, originando um sólido cristalino incolor. p.f.: 159°C. Análise: Calculado. $[C_{28}H_{29}N(1)O(10)]$ C 62,33, H 5,42, N 2,60. Encontrado: C 62,06, H 5,71, N 2,39. RMN (DMSO- d_6): δ 1,053 (t, J=6,9 Hz, 3H), 2,149 (s, 6H), 2,304 (s, 6H), 2,1-2,4 (m, 4H), 2,747 (s, 4H),

2,920 (q, J=6,9 Hz, 2H), 6,975 (s, 2H), e 7,464 (s, 2H).

E. Preparação de 9 - (2-(N-metil-N-(benzil-oxi-carbonil - metil) carboxamido)etil)-3,6-di-acetoxi-2,7-dimetil-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-512-Sar-OBn)

A uma solução de éster benzílico de sarcosina (0,72 g; 4,02 mmole) em cloreto de metileno (25 ml) adicionou-se Ac₂EtSF-512-NHS (1,73 g; 3,21 mmole) e uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5% (20 ml). Agitou-se rapidamente a mistura de duas fases durante 20 minutos. Separaram-se as camadas e lavou-se a camada orgânica com 3 x 15 ml de água, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se até 10 ml. Diluiu-se a solução até 60 ml com ciclohexano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se para 25 ml sob uma corrente de azoto originando-se a precipitação do produto. Decantou-se a parte sobrenadante e secou-se em vácuo o sólido incolor (1,44 g; 74%).

A recristalização no seio de cloreto de metileno/ciclo-hexano com tratamento com carvão vegetal, originou uma amostra analítica. p.f.: 150-152°C. Análise: Calculado. $\left[\begin{matrix} C(34) \\ H(37)N(1)O(9) \end{matrix} \right]$ C 67,65 H 6,18 N 2,32. Encontrado: C 67,42 H 6,08 N 2,33. RMN (DMSO-d₆): (Apresenta uma mistura 5:2 de rotâmeros de ligação amida) δ (maior e menor) 1,049 e 1,008 (t, J=6,8 Hz, 3H), 1,747 e 1,66 (m, 2H), 2,144 e 2,115 (s, 6H), 2,18 (m, 2H), 2,314 e 2,303 (s, 6H), 2,694 (s, 3H), 2,907 e 2,884 (q, J=6,8 Hz, 2H), 3,961 (s, 2H), 5,075 e 5,016 (s, 2H), 6,960 e 6,917 (s, 2H), 7,430 e 7,396 (s, 2H), e 7,30 (m, 5H).

F. Preparação de 9-(2-(N-metil-N-(N'-succinimidil-oxi-carbonil-metil)carboxamido)etil)-3,6-di-acetoxi-9-etoxi-2,4,5,7-tetra-metil-9H-xanteno (Ac2EtSF-512-Sar-NHS)

A uma suspensão de Ac2EtSF-512-Sar-OBn (0,45 g; 0,745 mole) em etanol absoluto (20 ml), adicionou-se paládio em carvão a 10% (0,05 g). Agitou-se a mistura num balão de vidro sob pressão de hidrogênio durante 30 minutos. Eliminou-se o catalisador por filtração e eliminou-se o etanol para se obter um resíduo xaroposo.

Dissolveu-se este resíduo em cloreto de metileno (25 ml) e adicionou-se N-hidroxi-succinimida (0,129 g; 1,12 mmole) e cloridrato de 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-carbox-di-imida (0,292 g; 1,52 mmole). Agitou-se a mistura durante 30 minutos e depois lavou-se com água (3 x 15 ml). Secou-se a solução sobre sulfato de sódio, concentrou-se até 10 ml, diluiu-se até 40 ml com ciclohexano, tratou-se com carvão vegetal, e reduziu-se o volume até 20 ml sob uma corrente de azoto. Decantou-se a parte sobrenadante e submeteu-se o resíduo a uma segunda precipitação no seio, de cloreto de metileno, para se obter um pó incolor (0,27 g; 59%). Análise: Calculado. $[C(31)H(34)N(2)O(11)]$ C 60,98, H 5,61, N 4,59. Encontrado: C 60,28, H 5,71, N 4,40, 1,08% água (K-F). RMN (DMSO- d_6): (Apresenta uma mistura 5:1 de rotâmeros próximo da ligação amida) δ (maior e menor) 1,043 (t, J=7,0 hz, 3H), 1,793 e 1,933 (m, 2H), 2,145 e 2,133 (s, 6H), 2,198 (m, 2H), 2,314 (s, 6H) 2,740 (s, 4H), 2,778 e 2,821 (s, 3H), 2,900 (q, J=7,0 hz, 2H), 4,334 e 4,469 (s, 2H), 6,960 e 6,925 (s, 2H), e 7,441 (s, 2H).

EXEMPLO 3

Preparação de um éster intermediário activado com espaçador marcado por fluorescência a 519 nm.

A. Preparação de 9-(2-carboxi-etilideno)-3,6-di-hidro- xi-4,5-dimetil-9H-xanteno (SF-519)

Colocou-se 2-metil-resorcinol (37,2 g; 0,300 mole) e anidrido succínico (30,0 g; 0,300 mole) num frasco de fundo redondo e purificou-se com azoto. Adicionou-se ácido metano-sulfônico (150 ml) e agitou-se a solução a 65°C durante 4 horas numa atmosfera de azoto. Adicionou-se a mistura reaccional, gota a gota, a água gelada (1 litro) agitada vigorosamente, com adição simultânea de hidróxido de sódio aquoso a 50%, para manter o pH a $6,0 \pm 0,5$. O sólido finamente dividido recolheu-se por centrifugação e lavou-se com água (4 x 250 ml), fazendo de cada vez nova suspensão, agitando e eliminando a parte sobrenadante. Fez-se uma suspensão do produto bruto em água (1 litro) e adicionou-se hidróxido de sódio aquoso (a 50%), suficiente para elevar o pH para 10,2. Filtrou-se a solução e ajustou-se o pH do filtrado para 1,2 com ácido clorídrico concentrado. Recolheu-se o produto por centrifugação e lavou-se com água (3 x 350 ml) e acetona (3 x 250 ml) conforme atrás descrito. Fez-se uma mistura azeotrópica do sólido resultante com tolueno, recolheu-se por filtração, secou-se em vácuo a 110°C para se obter um pó cõr de tijolo (24,6 g; 53%). Análise: Calculado. $[C(18)H(16)O(5)]$ C 69,22 H 5,16. Encontrado: C 68,95 H 5,30, 0,80% de água (K-F). RMN (DMSO-d₆) (principalmente a forma delta): δ 2,164 (s, 3H), 2,177 (s, 3H), 3,376 (d, J=7,1 hz,

2H), 5,749 (t, J=7,2 Hz, 1H), 6,642 (d, J=8,8 Hz, 1H), 6,672 (d, J=8,8 Hz, 1H), 7,216 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,227 (d, J=8,5 Hz, 1H), 9,602 (bs, 1H), e 9,758 (bs, 1H). Vis. abs. (pH 8,2; 50 mM aq Tris/HCl) max 500 nm (69.800).

B. Preparação de 9-(2-carboxi-etil)-3,6-di-acetoxi-4,5-dimetil-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-519)

Adicionou-se SF-519 (15,0 g; 48,0 mmole) a anidrido acético (250 ml) e pulverizou-se o sólido. (O tratamento com ultrasons é útil para dispersar o SF-519 altamente insolúvel). Arrefeceu-se a suspensão com gelo, adicionou-se piridina (50 ml) e agitou-se a mistura durante 20 minutos. Filtrou-se a solução e adicionou-se em corrente lenta mas estável a água gelada agitada rapidamente (4 litros). Depois de se agitar durante mais 20 minutos filtrou-se o produto intermédio, fez-se nova suspensão em água (3 litros) e agitou-se durante mais 25 minutos. Recolheu-se o sólido por filtração e secou-se ao ar. O produto intermédio seco dissolveu-se em etanol absoluto (600 ml) e fez-se o refluxo durante 1 hora. Concentrou-se a solução num evaporador rotativo, até se obterem 200 ml que originaram a cristalização. Recolheu-se o produto por filtração, secou-se ao ar, depois secou-se em vácuo, para se obterem microcristais incolores (12,13 g; 57%).

Preparou-se uma amostra analítica por precipitação no seio de uma solução de cloreto de metileno com ciclohexano. RMN (DMSO-d₆): δ 1,033 (t, J=6,9 Hz, 3H), 1,674 (m, 2H), 2,189 (s, 6H), 2,19 (m, 2H), 2,348 (s, 6H), 2,878 (q, J=6,9 Hz, 2H), 7,006 (d, J=8,6 Hz, 2H), e 7,399 (d, J=8,6 Hz, 2H).

C. Preparação de 9-(2-(N-succinimidil-oxi-carbonil)-etil-3,6-di-acetoxi-4,5-dimetil-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-519-NHS)

Misturou-se Ac2EtSF-519 (7,80 g; 17,6 mmole) com cloreto de metileno (175 ml) e adicionou-se N-hidroxi-succinimida (2,75 g; 23,9 mmole) e cloridrato de 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-carbo-di-imida (7,00 g; 36,5 mmole). Agitou-se a mistura durante 90 minutos e depois lavou-se com água (5 x 100 ml). Extraíram-se as camadas aquosas combinadas, com cloreto de metileno (2 x 50 ml) e secaram-se as camadas orgânicas combinadas sobre sulfato de sódio e eliminaram-se. A trituração com etanol (100 ml) seguida de filtração e secagem ao ar, originaram o produto sob a forma de um sólido amarelo claro (7,45 g; 78%).

Duas recristalizações no seio de ciclohexano/cloreto de metileno com tratamento com carvão vegetal originaram uma amostra analítica. pf.: 164-165°C. Análise: Calculado. $\left[\begin{array}{l} \text{C} \\ (28)\text{H}(29)\text{N}(1)\text{O}(10) \end{array} \right]$ C 62,33, H 5,42, N 2,60. Encontrado: C 62,17, H 5,47, N 2,48. RMN (DMSO-d₆): δ 1,051 (t, J=7,0 Hz, 3H), 2,4-2,1 (m, 4H), 2,191 (s, 6H), 2,337 (s, 6H), 2,715 (s, 4H), 2,912 (q, J=7,0 Hz, 2H), 7,015 (d, J=8,6 Hz, 2H), e 7,429 (d, J=8,6 Hz, 2H).

D. Preparação de 9-(2-(N-metil-N-(benziloxi-carbonil-metil)carboxamido)etil)-3,6-di-acetoxi-4,5-dimetil-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-519-Sar-OBn)

A uma solução de éster benzílico de sarcosina (0,557 g; 3,11 mmole) em cloreto de metileno (19 ml), adicionou-se Ac2EtSF-519-NHS (1,30 g; 2,41 mmole) e uma solução aquosa de

bicarbonato de sódio a 5% (15 ml). Agitou-se com rapidez a mistura de duas fases durante 18 horas. Separaram-se as camadas e lavou-se a camada orgânica com 3 x 10 ml de água, secou-se sobre sulfato de sódio, e concentrou-se até 10 ml. Diluiu-se a solução até 40 ml com ciclohexano, tratou-se com carvão vegetal, e reduziu-se para 20 ml sob uma corrente de azoto que originou a precipitação do produto na forma de um sólido viscoso. Decantou-se a parte sobrenadante e evaporou-se o resíduo com cloreto de metileno para se obter uma espuma incolor (0,97 g; 67%).

A secagem prolongada em vácuo originou uma amostra analítica. Análise: Calculado. $[C(34)H(37)N(1)O(9)]$ C 67,65 H 6,18 N 2,32. Encontrado: C 67,43 H 6,37 N 2,32. RMN (DMSO- d_6) (Apresenta uma mistura 5:2 de rotâmeros de ligação amida): δ (maior e menor) 1,044 e 1,020 (t, $J=7,0$ hz, 3H), 1,824 e 1,714 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 2,195 e 2,169 (s, 6H), 2,346 e 2,337 (s, 6H), 2,720 e 2,691 (s, 3H), 2,889 (q, $J=7,0$ hz, 2H), 3,959 e 3,988 (s, 2H), 5,073 e 5,048 (s, 2H), 7,000 e 6,954 (d, $J=8,6$ hz, 2H), e 7,45-7,25 (m, 7H).

E. Preparação de 9-(2-(N-metil-N-(N'-succinimidil-oxi-carbonil-metil)carboxamido)etil)-3,6-di-acetoxi-4,5-dimetil-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-519-Sar-NHS)

A uma solução de Ac2EtSF-519-Sar-OBn (1,35 g; 2,24 mmole) em etanol absoluto (50 ml) adicionou-se paládio em carvão a 10% (0,13 g). Agitou-se a mistura num balão de vidro sob pressão de hidrogénio durante 20 minutos. Eliminou-se o catalisador por filtração e eliminou-se o etanol para se obter um

resíduo xaroposo.

Dissolveu-se este resíduo em cloreto de metileno (50 ml) e adicionou-se N-hidroxi-succinimida (0,39 g; 3,39 mmole) e cloridrato de 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-carbo-di-imida (1,57 g; 8,19 mmole). Agitou-se a mistura durante 75 minutos e depois lavou-se com água (4 x 15 ml). Secou-se a solução sobre sulfato de sódio, concentrou-se até 25 ml, diluiu-se para 125 ml com ciclohexano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se o volume para 50 ml sob uma corrente de azoto. Decantou-se a parte sobrenadante e extraíu-se o óleo remanescente com cloreto de metileno (5 ml) e adicionou-se, gota a gota, a ciclohexano agitado vigorosamente (75 ml) para se obter um pó incolor (0,587 g; 43%).

Para se obter uma amostra analítica extraíu-se uma porção do produto com cloreto de metileno, secou-se sobre peneiras moleculares, evaporou-se sob uma corrente de azoto e finalmente secou-se com uma pistola de secagem a 48°C sobre pentóxido de fósforo, durante 20 horas. Análise: Calculado. $[C(31)H(34)N(2)O(11)]$; C 60,98, H 5,61, N 4,59. Encontrado: C 60,15, H 5,71, N 4,51, água (K-F) 1,51%. RMN (DMSO-d₆) (Apresenta uma mistura 4:1 de rotâmeros de ligação amida): δ (maior e menor) 1,039 (t, J=6,9 hz, 3H), 1,841 e 1,945 (m, 2H), 2,19 (m, 2H), 2,194 (s, 6H), 2,345 (s, 6H), 2,767 e 2,744 (s, 4H), 2,778 e 2,825 (s, 3H), 2,888 (q, J=6,9 hz, 2H), 4,328 e 4,461 (s, 2H), 7,000 (d, J=8,6 hz, 2H), e 7,410 (d, J=8,6 hz, 2H).

EXEMPLO 4Preparação de um éster intermédio activado com
espaçador marcado por fluorescência a 526 nmA. Preparação de 2,4-di-hidroxi-3-metil-benzaldeído

Adicionou-se oxi-cloreto de fósforo (80 ml; 0,86 mole) a uma mistura agitada de N-metil-formanilida (102 ml; 0,82 mole) em éter (250 ml). Agitou-se a mistura durante 1 hora à temperatura ambiente e depois arrefeceu-se com gelo. Adicionou-se 2-metil-resorcinol (Aldrich, 100 g; 0,81 mole) e deixou-se a mistura aquecer até à temperatura ambiente enquanto se agitou durante a noite. O produto intermédio precipitado recolheu-se por filtração e lavou-se com éter (3x). Fez-se a hidrólise do produto intermédio por dissolução numa mistura de acetona (250 ml) e água (250 ml) e agitou-se durante 30 minutos. Adicionou-se água (2 litros), levou-se a mistura até à ebulição e depois deixou-se arrefecer tendo-se depositado um produto cristalino. Recristalizou-se este produto uma segunda vez no seio de água (4 litros), para se obter o produto puro (70 g; 57%). p.f. 150°C (Lit. 152°-153°C [W. Baker e outros, "J. Chem. Soc.", 1949; p. 2834-5] RMN (DMSO-d₆): δ 1,973 (s, 3H), 6,551 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,428 (d, J=8,5 Hz, 1H), 9,703 (s, 1H), 10,745 (s, 1H), e 11,592 (s, 1H).

B. Preparação de 2,4-dimetil-resorcinol

Arrefeceu-se com gelo uma solução de 2,4-di-hidroxi-3-metil-benzaldeído (30,0 g; 197 mmole) com isopropanol (3 litros), num frasco de três bocas de 5 litros, adaptado com

um agitador magnético. Adicionou-se ácido fosfórico (4 ml) e paládio em carvão a 10% e tratou-se a solução com azoto e depois com hidrogênio. Quando a libertação de gás ficou completa (ao fim de 1,5 horas), tratou-se a solução novamente com azoto e depois filtrou-se através de uma almofada de Celite[®]. Eliminou-se o dissolvente, extraíu-se o resíduo com acetato de etilo, e lavou-se a solução resultante com água (4 x 100 ml). Os produtos de lavagem com água extraíram-se com acetato de etilo e as camadas orgânicas combinadas secaram-se sobre sulfato de sódio e eliminaram-se. A sublimação $\angle 95^{\circ}$, (0,05 torr), 101325/760 x 0,05 N m⁻² originou um sólido incolor (19,6 g; 72%). p.f. 107^o-108^oC (Lit. 108^o-109^oC $\angle$ W. Baker e outros, "J. Chem. Soc.", 1949; p. 2834-5]. RMN (DMSO-d₆): δ 1,969 (s, 3H), 2,037 (s, 3H), 6,220 (d, J=8,1 hz, 1H), 6,637 (d, J=8,1 hz, 1H), 7,929 (s, 1H), e 8,785 (s, 1H).

C. Preparação de 9-(2-carboxi-etilideno)-3,6-di-hidroxi-2,4,5,7-tetra-metil-9H-xanteno (SF-526)

Colocou-se 2,4-dimetil-resorcinol (28,4 g; 0,205 mole) e anidrido succínico (20,0 g; 0,200 mole) num frasco de fundo redondo e purificou-se com azoto. Adicionou-se ácido metano-sulfônico (231 ml) e agitou-se a solução a 70^oC durante 20 horas numa atmosfera de azoto. Adicionou-se a mistura reacional gota a gota, a uma mistura de hidróxido de sódio aquoso (95 g em 150 ml de água) e de gelo (3 litros) agitada vigorosamente. Adicionou-se ácido metano-sulfônico suficiente para ajustar o valor final do pH de 4,7 para 1,5. O sólido resultante recolheu-se por centrifugação e lavou-se fazendo a suspen-

são, agitando e decantando a partir da água (5 x 1,2 litros). A suspensão final recolheu-se por filtração, secou-se ao ar, depois secou-se numa estufa a 110°C durante 6 horas, para se obter um sólido côm de tijolo (30,6 g; 44%).

Uma segunda precipitação no seio de uma solução alcalina, seguida de centrifugação e lavagem com água, originou uma amostra analítica. Análise: Calculado: $[C(16)H(12)O(5)]$ C 70,57, H 5,92. Encontrado: C 70,39, H 6,00, 0,21% de água (K-F). RMN (DMSO- d_6) (principalmente na forma de espirolactona): δ 2,172 (s, 12H), 2,508 (m, 2H), 3,342 (m, 2H), e 7,604 (s, 2H). Vis. abs. (pH 8,2; 50 mM aq Tris/HCl): 509 nm (71.300).

D. Preparação de 9-(2-carboxi-etil)-3,6-di-acetoxi-9-etoxi-2,4,5,7-tetra-metil-9H-xanteno (Ac2EtSF-526)

Adicionou-se SF-526 (25,2 g; 74 mmole) a anidrido acético arrefecido com gelo (450 ml), adicionando-se em seguida piridina (100 ml) e agitou-se a mistura com arrefecimento com gelo durante 150 minutos. Filtrou-se a mistura reaccional e depois adicionou-se, em corrente lenta e estável, a água gelada agitada rapidamente (7 litros). Depois de se agitar, durante mais 30 minutos, filtrou-se o produto intermédio, lavou-se com água, fez-se nova suspensão em água (4 litros) e agitou-se durante mais 30 minutos. Recolheu-se o sólido por filtração e secou-se ao ar para se obter um produto intermédio de espirolactona (28,9 g). Dissolveu-se uma porção deste produto intermédio (18,6 g) em etanol absoluto (1 litro) e fez-se o refluxo durante 90 minutos. Concentrou-se a solução num evaporador rotativo até 300 ml, o que originou a cristalização. Re-

colheu-se o produto por filtração, lavou-se com etanol, secou-se ao ar e depois secou-se em vácuo, para se obter microcristais incolores (11,6 g; 52%) com base na quantidade de produto intermédio utilizado.

A recristalização no seio de cloreto de metileno/ciclo-hexano e o tratamento com carvão vegetal originaram microcristais incolores. pf: 154°-155°C. Duas evaporações no seio de cloreto de metileno eliminaram os vestígios de ciclohexano para a análise. Análise: Calculado: $[C(20)H(20)O(5)]$ C 70,57, H 5,92. Encontrado: C 70,39, H 6,00, 0,21% de água (K-F). RMN (DMSO-d₆) (principalmente na forma de espirolactona): δ 2,172 (s, 12H), 2,508 (m, 2H), 3,342 (m, 2H), e 7,604 (s, 2H). Vis. abs. (pH 8,2; 50 mM aq Tris/HCl): 509 nm (71.300).

E. Preparação de 9-(2-(N-succinimidil-oxi-carbonil)-etil)-3,6-di-acetoxi-9-etoxi-2,4,5,7-tetra-metil-9H-xanteno (Ac2EtSF-526-NHS)

Misturou-se Ac2EtSF-526 (4,70 g; 9,99 mmole) com cloreto de metileno (75 ml) e adicionou-se cloridrato de 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-carbo-di-imida (3,10 g; 16,2 mmole) e N-hidroxi-succinimida (1,50 g; 13,0 mmole). Agitou-se a mistura durante 90 minutos e depois lavou-se com água (4 x 50 ml). As camadas aquosas combinadas extraíram-se com cloreto de metileno (50 ml) e as camadas orgânicas combinadas secaram-se sobre sulfato de sódio e removeram-se. A trituração no seio de etanol (75 ml), seguida por filtração e secagem ao ar, originaram o produto bruto na forma de um sólido amarelo claro (c. 4,7 g). Dissolveu-se este material em cloreto de metileno (50

ml) e adicionou-se ciclo-hexano (50 ml). Adicionou-se uma colher de chá de carvão vegetal, filtrou-se a mistura, e tratou-se o produto com uma porção adicional de ciclohexano (25 ml). Recolheu-se por filtração, secou-se ao ar, e secou-se em vácuo para se obterem cristais incolores (3,14 g; 55%).

Uma segunda precipitação, no seio de cloreto de metileno com ciclo-hexano, originou uma amostra analítica.

Análise: Calculado: $[C(30)H(33)N(1)O(10)]$; C 63,48, H 5,86, N 2,47. Encontrado: C 63,08, H 6,00, N 2,37. RMN (DMSO- d_6): δ 1,058 (t, J=6,9 Hz, 3H), 2,136 (s, 6H), 2,155 (s, 6H), 2,228 (m, 4H), 2,371 (s, 6H), 2,748 (s, 4H), 2,918 (q, J=6,9 Hz, 2H), e 7,300 (s, 2H).

F. Preparação de 9-(2-(N-metil-N-(benziloxi-carbonil-metil)-carboxamido)etil)-3,6-di-acetoxi-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-505-Sar-OBn)

A uma solução de éster benzílico de sarcosina (0,72 g; 4,02 mmole) em cloreto de metileno (40 ml) adicionou-se Ac2EtSF-526-NHS (1,82 g; 3,21 mmole) e uma solução de bicarbonato de sódio aquoso a 5% (30 ml). Agitou-se vigorosamente a mistura de duas fases durante 20 horas. Separaram-se as camadas e lavou-se a camada orgânica com 4 x 15 ml de água, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se até 15 ml. Diluiu-se a solução até 100 ml com ciclohexano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se para 50 ml sob uma corrente de azoto que originou a precipitação do produto. A filtração seguida pela secagem ao ar, originou um sólido incolor (0,96g; 47%).

A evaporação conjunta com o cloreto de metileno

seguida de secagem prolongada em vácuo originou uma amostra analítica. Análise: Calculado: para $[C(36)H(41)N(1)O(9)]$ C 68,45, H 6,54, N 2,22. Encontrado: C 68,29, H 6,70, N 2,07. RMN ($DMSO-d_6$) (Apresenta uma mistura 5:2 de rotâmeros de ligação amida): δ (maior e menor) 1,049 e 1,027 (t, $J=6,8$ Hz, 3H), 1,783 e 1,700 (m, 2H), 2,129 e 2,099 (s, 6H), 2,159 e 2,129 (s, 6H), 2,14 (m, 2H), 2,379 e 2,371 (s, 6H), 2,699 e 2,690 (s, 3H), 2,873 (q, $J=6,8$ Hz, 2H), 3,958 e 3,976 (s, 2H), 5,075 e 5,019 (s, 2H), 7,266 e 7,233 (s, 2H), e 7,25-7,40 (m, 5H).

G. Preparação de 9-(2-(N-metil-N-(N'-succinimidil-oxi-carbonil-metil)carboxamido)etil)-3,6-di-acetoxi-9-etoxi-2,4,5,7-tetra-metil-9H-xanteno (Ac2EtSF-526-Sar-NHS)

A uma solução de Ac2EtSF-526-Sar-OBn (0,96 g; 1,52 mmole) em etanol absoluto (40 ml) adicionou-se paládio em carvão a 10% (0,10 g). Agitou-se a mistura num balão de vidro sob uma pressão de hidrogénio durante 30 minutos. Removeu-se o catalisador por filtração e eliminou-se o etanol para se obter um resíduo xaroposo.

Dissolveu-se este resíduo em cloreto de metileno (40 ml) e adicionou-se N-hidroxi-succinimida (0,26 g; 2,26 mmole) e cloridrato de 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-carbo-di-imida (0,59 g; 3,08 mmole). Agitou-se a mistura durante 30 minutos e depois lavou-se com água (4 x 15 ml). Secou-se a solução sobre sulfato de sódio, concentrou-se até 15 ml, diluiu-se para 100ml com ciclo-hexano, tratou-se com carvão vegetal, e reduziu-se o volume até 50 ml sob uma corrente de azoto. Recolheu-se o produto por filtração, secou-se ao ar, e secou-se em

vácuo, para se obter microcristais incolores (0,573 g; 59%).

A evaporação conjunta com cloreto de metileno, seguida por secagem prolongada no vácuo a 40°C eliminou os vestígios de ciclo-hexano e originou uma amostra analítica sob a forma de um sólido amorfo. RMN (DMSO-d₆): δ 1,043 (t, J=6,7 Hz, 3H), 1,82 (m, 2H), 2,130 (s, 6H), 2,157 (s, 6H), 2,15 (m, 2H), 2,378 (s, 6H), 2,748 (s, 4H), 2,778 (s, 3H), 2,891 (q, J=6,7 Hz, 2H), 4,327 (s, 2H), e 7,275 (s, 2H).

EXEMPLO 5

PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 5-(3-AMINO-1-PROPIL)-2',3'-DIDESOXI-CITIDINA (5-AP3-ddCTP)

A. PREPARAÇÃO DE N-PROPARGIL-TRIFLUORO-ACETAMIDA (18)

Durante 1 hora adicionou-se, gota a gota, propargil-amina (24,79 g; 0,450 mole; Aldrich, 99%) a trifluoro-acetato de metilo (69,19 g; 0,540 mole; 1,2 equivalentes Aldrich), a 0°C. Depois de se agitar durante mais 1 hora a 0°C, destilou-se numa coluna de Vigreux de 15cm, para se obter 62,12 g (91%) de trifluoro-acetamida 18 sob a forma de um líquido incolor [pe 68,5°-69,5°C a (11 x 10¹³25/760 Nm⁻²), 11 torr]. Verificou-se que este material era homogêneo por RMN e por CG e que era permutável com material idêntico sob o ponto de vista da espectroscopia, preparado por acilação da propargil-amina com anidrido do ácido trifluoro-acético.

¹H-RMN (CDCl₃): 6,85 (largo s, 1H, NHTFA), 4,17 (dd, J=5,6 e 2,5, 2H, CH₂), 2,35 (t, J=2,5, 1H, CH). IV (puro; cm⁻¹): 3300 (N-H), 3095 e 2935 (C-H), 2130 (acetileno), 1720

(C=O), 1550 (N-H), 1430, 1365, 1160, 1040, 998, 918, 857, 829, 772, e 725.

B. PREPARAÇÃO DE 5-iodo-2',3'-didesoxi-citidina (19)

Durante 19 horas fez-se o refluxo de uma solução de 2', 3'-didesoxi-citidina (2,11 g; 10 mmole Raylo) e de acetato de mercúrio (3,35 g; 10,5 mmole, Fisher) em 50 ml de metanol. A suspensão branca resultante diluiu-se com metanol (50 ml) e com dicloro-metano (100 ml). Adicionou-se iodo (3,05 g; 12 mmole) e agitou-se a suspensão a 25°C. Decorridas 4 horas adicionou-se a forma de base livre da resina AG3 X4A (20 ml, 38 meq, Bio-Rad) e fez-se borbulhar ácido sulfídrico na mistura reaccional durante 15 minutos. Verificou-se a precipitação completa de mercúrio (II) por CCF. Filtrou-se a mistura reaccional através de um filtro que se lavou com uma mistura de metanol/dicloro-metano 1:1. Evaporou-se o filtrado sobre gel de sílica (10 g) e assim carregado colocou-se na parte superior de uma coluna de gel de sílica de 150g. A eluição com 5%, 10% e 20% de metanol em dicloro-metano originou 2,79 g (83%) de iodeto 19 sob a forma de um sólido cristalino incolor. Duas recristalizações no seio de água em ebulição, originaram após secagem no vácuo a 50°, prismas grandes, analiticamente puros (pf: d 178°C).

¹H-RMN (DMSO-d₆): 8,50 (s, 1H, H6), 7,73 (largo s, 1H, -NH₂a), 6,53 (largo s, 1H, -NH₂b), 5,86 (dd, J=6,5 e 2,1, 1H H1'), 5,19 (t, 1H, 5'OH), 4,04 (m, 1H, H4'), 3,75 (ddd, J=12,1, 5,2, e 2,9, 1H, H5'a), 3,53 (dt, J=12,1 e 3,8, 1H, H5'b), e 2,3-1,7 (m, 4H, H2' e H3'). Calculado para C₉H₁₂N₃O₃I: C 32,07%,

H 3,59%, N 12,46%. Encontrado: C 32,05%, H 3,80%, N 12,46%.

C. PREPARAÇÃO DE 5-(3-TRIFLUORO-ACETAMIDO-1-PROPINIL)-2',
3'-DIDESOXI-CITIDINA (20):

PROCEDIMENTO GERAL PARA O ACOPLAMENTO DE AMINO-ALCINOS A
IODO-NUCLEOSIDOS

Carregou-se um frasco de três bocas de 50 ml com iodo-citidina 19 (770 mg; 2,00 mmole) e iodeto de cobre (76,2 mg; 0,400 mmole; 0,20 equivalente; Aldrich, Gold Label). Depois de se limpar o frasco com argon, adicionou-se dimetil-formamida seca (10 ml, Aldrich) para se obter uma solução de iodo-citidina 0,2 M que continha iodeto de cobre em suspensão. Com uma seringa adicionou-se N-propargil-trifluoro-acetamida (0,70 ml; 6,00 mmole; 3,0 equivalentes) e trietil-amina (0,56 ml; 4,00 mmole; 2,0 equivalentes, depositada sobre peneiros moleculares). Colocou-se tetraquis-(trifenil-fosfina)-paládio (0) (231 mg; 0,20 mmole; 0,10 equivalentes) dentro de um frasco numa caixa seca e adicionou-se à mistura reaccional. O iodeto de cobre dissolveu-se para se obter uma solução amarela que escureceu gradualmente ao fim de algumas horas. Permitiu-se que a reacção prosseguisse até que a CCF indicou que o material de partida estava completamente consumido. Decorridas 4 horas diluiu-se a mistura reaccional com 20 ml de metanol/dicloro-metano 1:1 e adicionou-se resina de permuta de aniões fortemente alcalina sob a forma de bicarbonato (Bio-Rad AG1 X8, 2,0 g; ca. 6 equivalentes). Depois de se agitar durante 15 minutos, aproximadamente cessou a libertação de gás. Decorridos 30 minutos, filtrou-se a mistura reaccional e lavou-se a resina com

dicloro-metano/metanol 1:1. Os filtrados combinados concentra-ram-se rapidamente com um evaporador rotativo. (A eliminação da dimetil-formamida exigiu cerca de 10 minutos a 45°C e à pressão de 2 torr ($2 \times 101325/760 \text{ N m}^{-2}$). Purificou-se imediatamente o resíduo por cromatografia em 150 g de gel de sílica, utilizando metanol em diclorometano a 10%, 15% e 20%. A eliminação do dissolvente das fracções apropriadas, originou 651 mg (90%) de alcinil-amina 20 sob a forma de uma espuma cristalina amarelo claro que se verificou ser homogênea por CCF e RMN. Verificou-se por análise elementar que o produto de uma preparação semelhante era um hemi-hidrato.

^1H -RMN (DMSO-d_6): 9,96 (largo s, 1H, NHTFA), 8,32 (s, 1H, H6), 7,76 (largo s, 1H, NH_2a), 6,78 (largo s, 1H, NH_2b), 5,88 (dd, $J=6,5$ e $2,5$, 1H, $\text{H1}'$), 5,13 (t, $J=5,1$, 1H, $5'\text{OH}$), 4,28 (d, $J=5,0$, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4,04 (m, 1H, $\text{H4}'$), 3,73 (ddd, $J=12,0$, $5,0$ e $3,1$, 1H, $\text{H5}'\text{a}$), 3,53 (dt, $J=12,1$ e $4,0$, 1H, $\text{H5}'\text{b}$), 2,3-1,7 (m, 4H, $\text{H2}'$ e $\text{H3}'$). ^{19}F -RMN (DMSO-d_6): -74,0 (s). UV (MeOH): máximos a 238,5 (17.100) e 295,5 (9.300). Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_4\text{F}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C 45,53, H 4,37, N 15,17. Encontrado: C 45,56, H 4,52, N 15,26.

D. PREPARAÇÃO DE PIROFOSFATO DE TRIS-(TRI-N-BUTIL-AMÔNIO)

Dissolveu-se deca-hidrato de pirofosfato de tetra-sódio (4,46 g; 10 mmole) numa quantidade mínima de água (aproximadamente 50 ml) e fez-se passar através de uma coluna de resina AG50W X8 (malha de 100-200 mesh, leito de 4 x 10 cm) vertida em água. Eluiu-se a coluna com água e recolheu-se o eluente num frasco arrefecido com gelo até que o pH do eluente

se aproximasse da neutralidade. Adicionou-se tri-n-butil-amina (Aldrich Gold Label, 7,1 ml; 30 mmole) ao eluente e agitou-se vigorosamente as duas fases até que a amina se dissolveu. Liofilizou-se a solução resultante. Evaporou-se o resíduo duas vezes em conjunto com piridina seca e uma vez com dimetil-formamida seca. Dissolveu-se o resíduo em dimetil-formamida seca (10 ml) e armazenou-se a solução 1,0 M resultante (durante um mês) a 0°C, numa atmosfera de argon, até voltar a utilizar-se.

E. PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 5-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXI-CITIDINA (5-AP3-ddCTP).

PROCEDIMENTO GERAL PARA CONVERTER NUCLEOSIDOS DE ALCINIL-AMINO PROTEGIDOS NOS CORRESPONDENTES 5'-TRIFOSFATOS E PARA ELIMINAR O GRUPO DE PROTECÇÃO DE TRIFLUORO-ACETILO.

Dissolveu-se o nucleosido alcinil-amino 20 (361 mg; 1,00 mmole) em fosfato de trimetilo (2,0 ml; Aldrich Gold Label) enquanto se agitava, numa atmosfera de argon, num frasco seco em estufa. Arrefeceu-se a solução até -10°C e adicionou-se, com uma seringa, oxicloreto de fósforo (0,093 ml; 1,00 mmole, Aldrich Gold Label). Depois de se agitar a mistura reaccional a -10°C durante 30 minutos, adicionou-se uma segunda aliquota de oxicloreto de fósforo (0,093 ml; 1,00 mmole) e deixou-se a solução aquecer lentamente até 25°C com agitação. Adicionou-se hidróxido aquoso 1N às aliquotas da mistura reaccional e fez-se a análise por CLPE. Quando a conversão, no correspondente mono-fosfato de nucleotido, estava no máximo (no caso presente 100 minutos após a segunda adição de oxicloreto de fósforo), adicionou-se, gota a gota, a mistura reaccional a uma

solução previamente arrefecida (-10°C) de pirofosfato de tris-(tri-n-butil-amônio) (6,0 ml da anterior solução 1,0 M em di-metil-formamida seca). Deixou-se a solução aquecer lentamente até 25°C enquanto se agitava numa atmosfera de argon. Decorridos 100 minutos adicionou-se lentamente a solução de reacção a uma solução previamente arrefecida (0°C) de trietil-amina (1,4 ml) em água (20 ml). Agitou-se a solução durante 15 minutos com arrefecimento em gelo e depois deixou-se em repouso durante a noite à temperatura aproximada de 2°C .

Eliminaram-se os produtos voláteis por evaporação no vácuo a 25°C e a 0,5 torr ($0,5 \times 101325/760 \text{ Nm}^{-2}$). Dissolveu-se novamente o resíduo em água (75 ml) e aplicou-se a uma coluna de DEAE-Sephadex A-25-120 (leito de 2,6 x 65 cm) que havia sido equilibrado com: 1) pH 7,6; TEAB aquoso 1,0M (300 ml), 2) bicarbonato de potássio aquoso 1,0 M (300 ml), e 3) pH 7,6; BTEA aquoso 0,1 M (300 ml). Eluiu-se a coluna com uma solução aquosa de BTEA de pH 7,6 de gradiente linear desde 0,1 M (1 litro) até 1,0 M (1 litro). A coluna foi accionada a 100 ml/h enquanto se recolhiam fracções de 12 em 12 minutos. Controlou-se a eluição por absorvência a 270 nm (40 AUFS). O material pretendido surgiu com nitidez numa banda principal próximo do terminal do gradiente (Fracções 73-80). Combinaram-se as fracções que continham o produto, concentrou-se (temperatura inferior a 30°C), e evaporou-se, duas vezes, em conjunto com etanol absoluto. Extraíu-se o resíduo com água (20,4 ml) e liofilizou-se.

Extraíu-se o produto intermédio com água (12,5 ml) e adicionou-se hidróxido de amónia concentrado (12,5 ml). Após

agitação durante 3,5 horas, agitou-se a solução num aspirador de vácuo durante 2 horas para se eliminar o excesso de gás de amoníaco e depois liofilizou-se. Extraíu-se o resíduo com BTEA aquoso 0,1 M com pH 7,6 (10 ml) e aplicou-se a uma coluna de DEAE-Sephadex A-25-120 (leito de 1,6 x 55 cm) preparado conforme descrito anteriormente. Eluíu-se a coluna enquanto se recolhiam fracções de 6 ml com o gradiente linear do BTEA desde 0,1 M (280 ml) até 1,0 M (280 ml). A eluição do produto apresentou um pico principal único. Combinaram-se as fracções que mais provavelmente continham o produto puro (# 39-45), concentraram-se (a uma temperatura inferior a 30°C), evaporaram-se em conjunto com etanol absoluto (2x) e extraíu-se com água (9,8 ml). Fez-se a análise da solução por absorção de UV e por CLPE e depois liofilizou-se.

Uma solução diluída do produto apresentou máximos de absorção a 240 e a 293,5 nm em um Tris-tampão aquoso 50 mM com pH 8,2. Presumindo que o coeficiente de absorção do produto é igual ao do material de partida (9 300), a produção de 5-AP3-ddCTP, baseada na absorção a 293,5 nm, foi de 0,32 mmole (32%). A CLPE (Zorbax SAX, fosfato de potássio aquoso 0,2 M com pH 6,5, controlado a 270 nm) do produto final apresentou fundamentalmente um pico único (>99%).

^1H -RMN (D_2O): 8,57 (s, 1H, H6), 6,03 (dd, $J=6,4$ e 1,6, 1H, H1'), 4,42 (m, 2H, H4' e H5'a), 4,18 (ddd, $J=12$, 5,5 e 3, 1H, H5'b), 4,036 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2,5-1,9 (m, 4H, H2' e H3'), mais os picos dos iões contrários (trietyl-amónio)

^{31}P -RMN (D_2O): -9,02 (d, $J=20$, 1P), -9,74 (d, $J=20$, 1P), -21,37 (t, $J=20$, 1P). UV (pH 8,2 Tris aq): máximos a 240 e 293,5 nm.

EXEMPLO 6

PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 5-(3-AMINO-1- -PROPINIL)-2',3'-DIDESOXI-URIDINA (5-AP3-ddUTP)

A. PREPARAÇÃO DE 5-iodo-2',3'-DIDESOXI-URIDINA (21)

Dissolveu-se didesoxi-uridina (2,122 g; 10,0 mmole) em 30 ml de metanol quente e, após arrefecimento até 25°C, adicionou-se mono-cloreto de iodo (4,06 g; 25mmole; 2,5 equivalentes Fisher) em metanol (20 ml), durante 5 minutos. Aqueceu-se a mistura reaccional de cor púrpura escura num banho a 50°C, numa atmosfera de azoto, durante 20 minutos e depois arrefeceu-se imediatamente num banho de gelo e água. Depois de se deixar em repouso sem agitação, durante 165 minutos, recolheu-se por filtração o precipitado resultante e lavou-se com metanol frio (2 x 10 ml). A secagem em vácuo durante a noite, originou 2,232 g (66%) de iodeto 21 sob a forma de microcristais branco sujo. Utilizou-se este material, sem purificação, na reacção seguinte, mas purificaram-se outras preparações por cromatografia ou por recristalização no seio de metanol em ebulição (30 ml/g) para se obter agulhas brancas (pf com decomposição 160°-164°C). O espectro RMN indicou que o precipitado bruto era homogéneo mas também que o protão 5'-hidroxilo era de pico bastante largo devido à permuta catalisada por vestígios de impurezas. Os materiais cromatografados ou recristalizados originaram espectros em que este protão era, conforme usual, um triplete estreito.

¹H-RMN (DMSO-d₆): 11,60 (largo s, 1H, H3), 8,57 (s, 1H, H6), 5,90 (dd, J=2,0 e, 6,6, 1H, H1'), 5,2 (largo s, 1H,

5'OH), 4,06 (m, 1H, H4'), 3,75, e 3,53 (m, 1H, H5'), 2,26, 2,02 e 1,84 (m, 4H, H2' e H3').

B. PREPARAÇÃO DE 5-(3-TRIFLUORO-ACETAMIDO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXI-URIDINA (22)

Durante 3 horas fez-se o acoplamento de iodo-uridina 21 a N-propargil-trifluoro-acetamida seguindo o método geral apresentado no Exemplo 5C. A cromatografia com um gradiente de 0-5% de metanol em dicloro-metano originou material que se verificou ser homogêneo por CCF, mas que era de difícil secagem. Depois de se evaporar o produto cromatografado diversas vezes em conjunto com clorofórmio e após secagem no vácuo, obtiveram-se 536,5 mg de nucleosido alcinil-amino 22 sob a forma de uma espuma branca. Verificou-se por CCF que este material era homogêneo e por RMN que era puro, com exceção de uma pequena quantidade de clorofórmio (39 mole; 66% de rendimento corrigido).

¹H-RMN (DMSO-d₆): 11,61 (s, 1H, H3), 10,07 (t distorcido, 1H, NHTFA), 8,35 (s, 1H, H6), 7,26 (s, 0,39H, CHCl₃), 5,89 (dd, J=6,6 e 3,2, 1H, H1'), 5,15 (t, J=5,2, 1H, 5'OH), 4,22 (d largo, 2H, -CH₂N-), 4,04 (hept-aparente, J=3,5, 1H, H4'), 3,73, e 3,53 (m, 1H, H5'), 2,26, 2,03 e 1,84 (m, 4H, H2' e H3'). CCF (dicloro-metano/metanol 95:5; duas eluições, UV): Iodeto de partida 21, R_f=0,37; produto 22, 0,28; catalisadores, 0,95 e 0,80 mais riscas ligeiras.

C. PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 5-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXI-URIDINA (5-AP3-ddUTP, 23)

Converteu-se o nucleosido de alcinil-amino 22

(0,30 mmole) no correspondente trifosfato e eliminou-se o seu grupo trifluoro-acetilo seguindo o procedimento geral apresentado no Exemplo 5E. Após a adição da segunda aliquota de oxícloreto de fósforo, deixou-se a fosforilação evoluir durante 210 minutos. Presumindo que o coeficiente de absorção do produto era igual ao do material de partida (13 000), o rendimento de trifosfato 23, baseado na sua absorção de UV a 291,5 nm foi de 18%.

EXEMPLO 7

PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 7-(3-AMINO-1-PROPINIL)- -2',3'-DIDESOXI-GUANOSINA (7-AP3-ddc7GTP)

A. PREPARAÇÃO DE 6-METOXI-2-METIL-TIO-9-(3,5-DI-O-p-TOLUOIL)- -2-DESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (24)

Secou-se, azeotropicamente, 6-metoxi-2-metil-tio-7-deazapurina (9,2 g; preparada de acordo com o processo de F. Seela e R. Richter; "Chem. Ber."; 111; 1978; p. 2925) por dissolução em 150 ml de piridina seca e por evaporação até à secagem a 30°-35°C. Fez-se uma suspensão deste material em 450 ml de acetonitrilo seco à temperatura ambiente, numa atmosfera de azoto, e adicionou-se hidreto de sódio (2,16 g de uma suspensão a 60% em óleo), com agitação. Decorridos 45 minutos, adicionou-se 1-cloro-2-desoxi-3,5-di-O-p-toluoil- α -D-ribofuranose (18,6 g, preparado de acordo com o processo de M.Hoffer; "Chem. Ber."; 93; 1960; p. 2777), em três porções iguais, durante um período de 20 minutos. Depois de se agitar a mistura reaccional durante mais 45 minutos, à temperatura ambiente, adi

cionou-se ácido acético (1 ml) e dicloro-metano (300 ml). Filtrou-se a mistura por sucção através de uma almofada de filtração e evaporou-se o filtrado até à secagem. Dissolveu-se o resíduo em benzeno e lavou-se esta solução com água (2x) e com uma solução salina (1x). Após a secagem da camada orgânica sobre sulfato de sódio e após a evaporação, dissolveu-se o resíduo em metanol (400 ml) e deixou-se cristalizar, para se obter 19,24 g (73,8%) do produto ribossilado 24 sob a forma de cristais incolores (p.f. 106°-107°C).

¹H-RMN (CDCl₃, 360 MHz): 2,42 (s, 3H, toluoil-CH₃), 2,44 (s, 3H, toluoil-CH₃), 2,64 (s, 3H, SCH₃), 2,70 e 2,89 (m, 2H, H2'), 4,08 (s, 3H, OCH₃), 4,56, (m, 1H, H3'), 4,65 (m, 2H, H5'), 5,74 (m, 1H, H4'), 6,44 (d, J=4, 1H, H7), 6,77 (dd, J=8 e 6, 1H, H1'), 7,05 (d, J=4, 1H, H8) e 7,25 e 7,95 (m, 8H, toluoil-H).

A recristalização de uma amostra do material anterior, no seio de metanol contendo uma pequena quantidade de dicloro-metano, originou cristais com p.f. 109°-110°C.

B. PREPARAÇÃO DE 6-METOXI-2-METIL-TIO-9-(2-DESOXI-β-D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (25)

Fez-se o refluxo de uma suspensão de éster 24 (19 g) e de resina de permuta de aniões fortemente alcalina, sob a forma de hidróxido (38 g de Rexyn 201) em 600 ml de metanol, durante 1,5 horas numa atmosfera de azoto. Filtrou-se por sucção a suspensão quente, para se eliminar a resina e evaporou-se o filtrado até à secagem. Dissolveu-se o resíduo sólido em éter (450 ml) e, decorridos 10 minutos, filtrou-se a solução

através de uma almofada de filtração, para eliminar uma pequena quantidade de uma impureza corada. Fez-se a nucleação da solução com cristais do produto desejado, obtidos numa reacção anterior, e deixou-se em repouso durante a noite a 25°C. O diol cristalino 25 recolheu-se por filtração e concentrou-se o licor mãe, para se obter uma segunda colheita. Cada colheita foi cuidadosamente lavada com éter e secou-se, para se obter um total de 8,43 g (78,0%) de diol 25, sob a forma de cristais incolores (p.f. 129°-130°C).

¹H-RMN (DMSO-d₆, 360 MHz): 2,21 e 2,55 (m, 2H, H2'), 2,56 (s, 3H, SCH₃), 3,53 (m, 2H, H5'), 3,82 (m, 1H, H3'), 4,02 (s, 3H, OCH₃), 4,36 (m, 1H, H4'), 4,90 (t, J=5,5, 1H, 5'OH), 5,30 (d, J=5,5, 1H, 3'OH), 6,48 (d, J=4, 1H, H7), 6,55 (dd, J=8 e 6, 1H, H1'), 7,48 (d, J=4, 1H, H8).

A recristalização de uma amostra deste material, no seio de dicloro-metano contendo uma pequena quantidade de metanol, originou cristais com p.f. 130°-131°C.

C. PREPARAÇÃO DE 6-METOXI-2-METIL-TIO-9-(5-O-TRIFENIL-METIL-2-DESOXI-β-D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (26)

Secou-se azeotropicamente o diol 25 (7,2 g) fazendo a sua dissolução em piridina seca e evaporando a solução até à secagem a 35°C. Dissolveu-se o resíduo em piridina seca (100 ml) e adicionou-se cloreto de trifenil-metilo (8,0 g), trietil-amina (4,0 ml), e 4-(dimetil-amino)-piridina (300 mg). Depois de se aquecer a mistura reaccional a 65°C, numa atmosfera de azoto, durante 30 minutos, efectuou-se uma segunda adição de cloreto de trifenil-metilo (1,0 g) e manteve-se o aque-

cimento durante 16,5 horas. Depois de arrefecer, concentrou-se a mistura reaccional e repartiu-se o resíduo entre diclorometano e água. Extraíu-se a camada aquosa com diclorometano e lavaram-se as camadas orgânicas combinadas com ácido clorídrico 0,3 N, com bicarbonato de sódio aquoso e com uma solução salina. Após a secagem, sobre sulfato de sódio e a concentração, purificou-se o produto bruto por cromatografia em gel de sílica com 0%, 1%, 1,5% e 2% de metanol em diclorometano, para se obter 12,1 g (94,5%) de éter mono-tritílico 26 sob a forma de um produto vidrado incolor.

^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz): 2,58 (s, 3H, SCH_3), 2,42 e 2,62 (m, 2H, H_2'), 3,37 (m, 2H, H_5'), 4,04 (m, 1H, H_3'), 4,08 (s, 3H, OCH_3), 4,60 (m, 1H, H_4'), 6,40 (d, $J=4$, 1H, H_7), 6,68 (t aparente, $J=7$, 1H, H_1'), 7,00 (d, $J=4$, 1H, H_8), 7,27 e 7,43 (m, 15H, trietil-H).

Estes dados obtiveram-se a partir de uma porção diferente do produto 26, preparada conforme atrás descrito.

D. PREPARAÇÃO DE 6-METOXI-2-METIL-TIO-9-(5-O-TRIFENIL-METIL-2,3-DIDESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (27)

Agitou-se, a 25°C , uma solução de éter tritílico 26 (12,1 g), 4-dimetil-amino-piridina (9,2 g) e cloro-tiono-carbonato de fenilo (7,5 ml, Aldrich) em diclorometano seco (220 ml), durante 2 horas, numa atmosfera de azoto. Uma vez que a análise por CCF indicou que a reacção estava incompleta, adicionou-se cloro-tiono-carbonato de fenilo (4,0 ml) e agitou-se a mistura reaccional durante mais 1 hora. Diluiu-se a solução com

diclorometano (280 ml) e lavou-se, sequencialmente, com ácido clorídrico 0,5 N (500 ml), com hidróxido de sódio 0,5 N (500 ml), e com uma solução salina. Secou-se a camada orgânica sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem.

Dissolveu-se o tionocarbonato bruto resultante, em tolueno seco (350 ml) e adicionou-se azo-iso-bis-buti-ro-ni-trilo (350 mg) e hidreto de tri-n-butil-estanho (10 ml). Aqueceu-se a solução resultante a 100°-105°C durante 10 minutos. Depois de arrefecer diluiu-se a solução com um pouco de éter e agitou-se com fluoreto de potássio aquoso a 10% (350 ml). Filtraram-se as duas camadas através de uma almofada de filtração (para se eliminar um sedimento escuro) e fez-se a separação. Lavou-se a camada orgânica com hidróxido de potássio 0,75 N e com uma solução salina, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se. A cromatografia do óleo resultante em gel de sílica com dicloro-metano/éter 1:1 e depois com dicloro-metano, originou 9,93 g (84,5%) de didesoxi-nucleosido 27 sob a forma de um sólido incolor (p.f. 122°-124°C).

¹H-RMN (CDCl₃, 360 MHz): 2,10, 2,33, e 2,43 (m, 4H, H2' e H3'), 2,60 (s, 3H, SCH₃), 3,30 (m, 2H, H5'), 4,08 (s, 3H, OCH₃), 4,29 (m, 1H, H4'), 6,36 (d, J=3,7, 1H, H7), 6,53 (dd, J=7 e 4, 1H, H1'), 7,09 (d, J=3,7, 1H, H8), 7,25 e 7,45 (m, 15H, tritil-H).

E. PREPARAÇÃO DE 7-iodo-6-metoxi-2-metil-tio-9-(5-0-
-TRIFENIL-METIL-2,3-DIDESOXI-β-D-RIBOFURANOSIL)-
-7-DEAZAPURINA (28)

Adicionou-se N-iodo-succinimida (10,0 g) a uma so

lução da deazapurina 27 (9,9 g) em dimetil-formamida seca (550 ml). Depois de se agitar, no escuro, numa atmosfera de azoto, durante 16 horas, adicionou-se bicarbonato de sódio aquoso a 10% (2,5 ml) e concentrou-se a mistura reaccional no vácuo a 50°C, para se obter um volume de 100 ml. Repartiu-se esta solução entre água e acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com hidro-sulfito de sódio aquoso a 5% e com uma solução salina, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se. A cromatografia do produto ligeiramente impuro em gel de sílica com dicloro-metano, originou 11,68 g (95,6%) do iodeto 28, sob a forma de um produto sólido vidrado incolor.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): 2,06, 2,24, e 2,41 (m, 4H, H2' e H3'), 2,58 (s, 3H, SCH₃), 3,30 (m, 2H, H5'), 4,10 (s, 3H, OCH₃), 4,29 (m, 1H, H4'), 6,47 (dd, J=6 e 4, 1H, H1'), 7,19 (s, 1H, H8), 7,30 e 7,46 (m, 15H, tritil-H).

Estes dados obtiveram-se a partir de uma porção diferente de 28, preparado conforme anteriormente descrito.

F. PREPARAÇÃO DE 7-iodo-2-metil-tio-9-(5-O-trifenil-metil-2,3-didesoxi-β-D-ribofuranosil)-7-deazapuri-4-ona (29)

Preparou-se tio-cresolato de sódio adicionando metóxido de sódio (1 equivalente) a uma solução de tio-cresol em metanol e evaporando depois até à secagem. Fez-se o refluxo de uma mistura de éter metílico 28 (4,0 g) tio-cresolato de sódio (4,0 g) e hexa-metil-fosforamida (10 ml) em tolueno seco (150 ml), numa atmosfera de azoto, durante 4,5 horas. Depois de arrefecer repartiu-se a mistura entre acetato de etilo e água. Lavou-se a camada orgânica com água e com uma solução sa

lina, secou-se sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem. A cromatografia do produto bruto resultante em gel de sílica com metanol em dicloro-metano a 0% e 2% , originou 3,80 g (97,0%) de deazapurinona 29, sob a forma de um sólido vidrado incolor.

^1H -RMN (CDCl_3 , 360 MHz): 2,05, 2,25, e 2,42 (m, 4H, H2' e H3'), 2,60 (s, 3H, SCH_3), 3,30 (m, 2H, H5'), 4,28 (m, 1H, H4'), 6,40 (dd, J=7 e 4, 1H, H1'), 7,05 (s, 1H, H8), 7,30 e 7,46 (m, 15H, tritil-H), 10,00 (s largo, 1H, H1).

G. PREPARAÇÃO DE 7-iodo-5'-O-trifenil-metil-2',3'-didesoxi-7-deazaguanosina (30)

Adicionou-se ácido meta-cloro-peroxi-benzóico (1,23 g; 85%; Aldrich) a uma solução agitada de éter tiometílico 29 (3,6 g) em diclorometano seco (150 ml), a 0°C numa atmosfera de azoto. Decorridos 15 minutos, removeu-se o banho de arrefecimento e manteve-se a agitação a 25°C durante 40 minutos. Lavou-se esta solução em bicarbonato de sódio aquoso e com uma solução salina e secou-se sobre sulfato de sódio. Adicionou-se metanol (dois por cento em volume) e fez-se passar a solução resultante através de uma estreita almofada de gel de sílica, para remover as impurezas polares. Dissolveu-se o sulfóxido bruto resultante (3,07 g) em dioxano (40 ml) e colocou-se numa bomba revestida com vidro. Adicionou-se amónia (10,0 g) e aqueceu-se a mistura a 100°C, durante 2 horas, numa autoclave. Evaporou-se a solução resultante até à secagem. Dissolveu-se o resíduo em dicloro-metano (20 ml) e filtrou-se através de uma almofada de filtração. Adicionou-se metanol (40 ml) à solução e, ao arrefecer, cristalizaram 1,57 g de um produto incolor.

Evaporou-se o licor-mãe e purificou-se por cromatografia líquida de pressão média em gel de sílica com metanol em dicloro-metano a 5% para se obter mais 328 mg de produto, sob a forma de cristais incolores. A produção total de deazaguanosina 30 foi de 1,90 g (55,4%).

^1H -RMN, (CDCl_3 , 300 MHz): 2,05, 2,23, e 2,35 (m, 4H, H2' e H3'), 3,29 (m, 2H, H5'), 4,26 (m, 1H, H4'), 5,90, (s largo, 1H, NH_2), 6,24 (dd, $J=7$ e 4, 1H, H1'), 6,90 (s, 1H, H8), 7,30 e 7,46 (m, 15H, tritil-H) 10,90 (s largo, 1H, H1). A recristalização de uma amostra deste material no seio de metanol/dicloro-metano, originou cristais de p.f. $201^\circ\text{--}203^\circ\text{C}$.

H. PREPARAÇÃO DE 2',3'-DIDESOXI-7-iodo-7-DEAZAGUANOSINA (31)

Agitou-se uma solução de éter tritílico 30 (1,7 g) em ácido fórmico (12 ml), à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Depois evaporou-se rapidamente a suspensão amarela resultante, até à secagem no vácuo a 30°C . A cromatografia do resíduo em gel de sílica com metanol em dicloro-metano a 5%, 7% e 10%, originou 940 mg de um sólido incolor. A trituração deste sólido no seio de éter contendo um pouco de dicloro-metano, originou 838 mg (81,0%) de nucleosido 31, sob a forma de cristais incolores.

^1H -RMN (DMSO-d_6 , 360 MHz): 1,95, 2,09, e 2,26 (m, 4H, H2', e H3'), 3,48 e 3,54 (m, 2H, H5'), 3,98 (m, 1H, H4'), 4,90 (t largo, $J=5$, 1H, 5'OH), 6,08 (m, 1H, H1'), 6,32 (s largo, 2H, NH_2), 7,12 (s, 1H, H8), 10,46 (s largo, 1H, H1).

I. PREPARAÇÃO DE 7-(3-TRIFLUORO-ACETAMIDO-1-PROPINIL)-2',
3'-DIDESOXI-7-DEAZAGUANOSINA (32)

Durante 2,25 horas fez-se o acoplamento de iodeto 31 (376 mg; 1,00 mmole) a N-propargil-trifluoro-acetamida, pelo método geral apresentado no Exemplo 5C. O produto e o material de partida não se distinguiram por CCF, pelo que se fez o controlo da reacção por HPLC de fase inversa (10 cm ODS, 1 ml/minuto, gradiente variando desde 100% de água até 100% de metanol durante 5 minutos, depois 100% de metanol, com detecção UV a 280 nm; iodeto de partida 31, 5,49 minutos; produto 32, 5,75 minutos; produto intermédio 6,58 minutos). O produto bruto era fracamente solúvel em dicloro-metano, pelo que se concentrou, no seio de uma solução de dicloro-metano/metanol sobre 5 g de gel de sílica, antes de se carregar a coluna de cromatografia. A eluição com metanol em diclorometano a 2%, 5%, 7% e 10%, originou 300 mg (78%) de nucleosido de alcinil-amino 32, sob a forma de um sólido amarelo.

^1H -RMN (DMSO- d_6 , 360 MHz): 1,96, 2,08, e 2,28 (m, 4H, H2' e H3'), 3,47 e 3,55 (m, 2H, H5'), 3,99 (m, 1H, H4'), 4,22 (s largo, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4,90 (t, J=5, 1H, 5'OH), 6,09 (dd, J=6 e 4, 1H, H1'), 6,33 (s largo, 2H, NH_2), 7,30 (s, 1H, H8), 10,05 (s largo, 1H, NHTFA), 10,50 (s largo, 1H, H1).

^1H -desligado ^{13}C -RMN (DMSO- d_6): 155,5 (q, J=36,5, trifluoro-acetil-carbonilo), 157,8, 153,1 e 149,9 (C2, C4 e C6), 122,6 (C8), 115,9 (q, J=288, CF_3), 99,4 e 97,5 (C7 e C5), 84,2 e 77,4 (acetilénico), 83,2 e 81,0 (C1' e C4'), 62,9 (C5'), 29,7 (propargílico), 31,8 e 25,8 (C2' e C3'). Estes dados ^{13}C -RMN obtiveram-se a partir de uma porção diferente de

32, preparado conforme anteriormente descrito.

J. PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 7-(3-AMINO-1-PROPINIL)-
-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZAGUANOSINA
(7-AP3-ddc7GTP)

Converteu-se o nucleosido de alcinil-amino 32 (0,90 mmole) no correspondente 5'-trifosfato e, posteriormente, eliminou-se o grupo protector trifluoro-acetilo, seguindo o procedimento geral apresentado no Exemplo 5F. Após a segunda adição do oxicloreto de fósforo, agitou-se a mistura reaccional durante mais 165 minutos. Admitindo um coeficiente de absorção para o produto igual ao do material de partida (11 900), o rendimento de 7-AP3-ddc7GTP, baseado na sua absorção a 272,5 nm, foi de 18%.

EXEMPLO 8

PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 7-(3-AMINO-1-PROPI-
NIL)-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (7-AP3-
-ddc7ATP)

A. PREPARAÇÃO DE 2'-ACETOXI-3'-BROMO-5'-(2-ACETOXIISOBUTIRIL)-ADENOSINA (33)

Durante 15 minutos, adicionou-se brometo de 2-acetoxi-isobutirilo (19,5 ml; 150 mmole; 5 equivalentes, preparado de acordo com o processo de Russell e outros; "J. Am. Chem. Soc."; 95; 1973; p. 4016-4030), a uma suspensão de tubercidina (7-deaza-adenosina, 6,66 g, 25,0 mmol, Sigma) em acetonitrilo seco (250 ml Aldrich). O sólido em suspensão dissolveu-se em

cerca de 5 minutos e agitou-se a mistura reaccional numa atmosfera de azoto, durante 22 horas, a 25°C. Adicionou-se a mistura reaccional a uma solução de hidrogeno-fosfato de dipotássio (43,55 g; 300 mmole, 6 equivalentes) em água (400 ml). Depois de se agitar durante 30 minutos, extraíu-se a mistura reaccional com acetato de etilo (1 x 400 ml e 2 x 200 ml). Secaram-se as camadas orgânicas combinadas sobre sulfato de magnésio e evaporaram-se até à secagem, para se obter 14,73 g (11,8%) de uma espuma branca. Este material era de pureza superior a 95% e uma mancha ligeiramente alargada por CCF (com detecção UV), mas o espectro RMN mostrou que estavam presentes um produto principal e pelo menos um produto secundário. O espectro RMN era consistente com o facto de o produto principal ser bromo-acetato 33.

¹H-RMN (DMSO-d₆) para o componente principal 33:
 8,08 (s, 1H, H2), 7,34 (d, J=3,7, 1H, H8), 7,12 (s largo, 2H, NH₂), 6,70 (d, J=3,7, 1H, H7), 6,32 (d, J=3,8, 1H, H1'), 5,61 (dd, J=2,4 e 3,8, 1H, H2'), 4,89 (dd, J=2,4 e 4,5, 1H, H3'), 4,43 (m, 1H, H4'), 4,35 (dd, J=12 e 4, 1H, H5'a), 4,29 (dd, J=12 e 7, 1H, H5'b), 2,08 (s, 3H, OAc), 2,00 (s, 3H, OAc), e 1,49 (s, 6H, 2CH₃).

B. PREPARAÇÃO DE 2',3'-DIDESOXI-2',3'-DIDE-HIDRO-7-DEAZA-ADENOSINA (34)

Preparou-se o par zinco-cobre lavando rapidamente (tempo total decorrido de cerca de 10 minutos) pó de zinco (20 g, Mallinkrodt) com ácido clorídrico 1 N (3 x 50 ml), água (2 x 50 ml), sulfato de cobre a 2% (2 x 50 ml), água (4 x 50 ml),

etanol (3 x 50 ml) e éter (2 x 50 ml). Durante cada lavagem agitou-se o pó de zinco num funil vidrado até ficar em suspensão e removeu-se o produto da lavagem por sucção, enquanto se minimizava a exposição do zinco ao ar. Secou-se o par em vácuo, durante 30 minutos. Dissolveu-se o anterior bromo-acetato bruto (14,63 g) em dimetilformamida seca (150 ml, Aldrich) e eliminou-se cerca de 25 ml de dissolvente com um evaporador rotativo $[45^{\circ}\text{C}; a\ 2\ \text{torr}\ 2 \times 10^{13}25/760\ \text{N m}^{-2}]$. Adicionou-se o par zinco-cobre recentemente preparado (14,63 g, aproximadamente 9 equivalentes) e agitou-se a suspensão resultante, numa atmosfera de azoto a 25°C . Conforme a qualidade do par zinco-cobre, esta reacção pode apresentar um período de indução e/ou uma taxa variável, pelo que se deixou a reacção evoluir até que a CCF (diclorometano/metanol/hidróxido de amónia concentrado 90:9:1; material de partida $R_f=0,45$ e para os produtos $R_f=0,39$ e $0,36$) indicou que o material de partida tinha sido completamente consumido. No caso corrente a reacção completou-se em menos de 15 minutos. Decorridos 100 minutos, adicionou-se, à mistura reaccional cuidadosamente, bicarbonato de sódio aquoso saturado (75 ml), durante 10 minutos. Filtrou-se a mistura reaccional através de um filtro que se lavou com metanol (2 x 50 ml). Evaporaram-se os filtrados combinados até à secagem e repartiu-se o resíduo entre água (150 ml) e acetato de etilo (150 ml). Extraíu-se a camada aquosa com acetato de etilo (2 x 100 ml) e secaram-se os extratos orgânicos combinados sobre sulfato de magnésio, concentraram-se, e secaram-se no vácuo durante 1 hora.

Dissolveu-se em metanol (100 ml) o produto semi-

-sólido laranja escuro resultante e depois adicionou-se água (25 ml) e resina "Rexyn 201" (29 g; 4,3 meq/g; 5 equivalentes, na forma de hidróxido). Fez-se o refluxo da mistura reaccional durante 210 minutos. O controlo por CCF (diclorometano/metanol/hidróxido de amônia concentrado 85:13:2: éster intermediário, $R_f=0,49$; produto final 34, 0,24) indicou que a reacção tinha cessado rapidamente após 70% de conversão, isto é, decorridos 165 minutos, e adicionou-se mais 29 g de resina. Sem arrefecer eliminou-se a resina por filtração e lavou-se com diclorometano/metanol 1:1 (2 x 75 ml). Evaporaram-se os filtrados combinados até à secagem e recristalizou-se o sólido púrpura resultante no seio de isopropanol em ebulição (150 ml) para se obter 3,778 g de olefina 34 sob a forma de agulhas branco sujo (p.f. 205°-206°C). Obteve-se uma segunda colheita de 0,631 g (agulhas púrpura tênue, p.f. 202°-203°C) por concentração dos licores mãe até 25 ml. Verificou-se que ambas as colheitas (total de 4,409 g; 76%) eram homogêneas por CCF e puras por RMN com excepção de um ligeiro vestígio de isopropanol.

^1H -RMN (DMSO- d_6): 8,07 (s, 1H, H2), 7,15 (d, J=3,6, 1H, H8), 7,12 (s largo, 1H, H1'), 7,01 (s largo, 2H, NH_2), 6,57 (d, J=3,6, 1H, H7), 6,43 e 6,02 (d largo, J=6,0, 1H cada, H2' e H3'), 4,95 (t, J=6,5, 1H, 5'OH), 4,79 (m, 1H, H4'), e 3,52 (m, 2H, H5').

C. PREPARAÇÃO DE 2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (35)

Encheu-se uma garrafa de Parr de 450 ml com olefina 34 (3,80 g), etanol (76 ml), paládio em carvão a 10% (380 mg, Aldrich) e hidrogénio a 40 psi ($40 \times 6,89 \times 10^3$ Pascal).

Depois de se agitar durante 4,67 horas a 25°C tinham sido absorvidas 14,5 psi ($14,5 \times 6,89 \times 10^3$ Pascal) de hidrogênio e cessara a libertação deste gás. A cromatografia em camada fina (duas eluições com diclorometano/metanol/hidróxido de amônio concentrado 85:13:2 ; material de partida 34, 0,45; produto 35, 0,48) indicou a conversão completa num novo produto único activo sob ultra-violetas. Removeu-se o catalisador por filtração num filtro e lavou-se com etanol. A eliminação do dissolvente do filtrado e a secagem no vácuo durante a noite originaram 3,98 g (104%) de didesoxi-nucleosido 35 sob a forma de uma espuma branca. O espectro RMN indicou que o produto era homogêneo com excepção da presença de 8% em peso de etanol (rendimento corrigido de 96%). Porções semelhantes deste material resistiram à cristalização e tornaram-se extremamente higroscópicas na secagem azeotrópica com dissolventes anidros. Por isso armazenou-se este material em vácuo durante aproximadamente uma semana e utilizou-se quando o espectro RMN indicou que o material continha 5% em peso de etanol. A falta de cristalinidade e as características espectrais observadas para este produto estão de acordo com as descritas anteriormente por Robins e outros; "Can. J. Chem."; 55, 1977; p. 1259.

^1H -RMN (DMSO- d_6): 8,04 (s, 1H, H2), 7,33 (d, J=3,6, 1H, H8), 6,97 (s largo, 2H, NH₂), 6,56 (d, J=3,6, 1H, H7), 6,34 (dd, J=5,2 e 6,4, 1H, H1'), 4,96 (t, J=5,6, 1H, 5'OH) 4,33 (t, J=5,1, 0,43H, etanol OH), 4,04 (m, 1H, H4'), 3,4-3,6 (m, 2,86H, H5' e etanol CH₂), 2,33, 2,21 e 2,02 (m, 4H, H2' e H3'), e 1,06 (t, J=7,0, 1,3H, etanol CH₃).

D. PREPARAÇÃO DE 7-iodo-2',3'-didesoxi-7-deaza-adenosina (36)

Aqueceu-se uma solução, agitada mecânicamente, de didesoxi-nucleosido 35, 95% puro (2,95 g; 11,96 mmole), acetato de sódio anidro (4,13 g; 50,3 mmole, 4 equivalentes) e acetato de mercúrio (3,81 g; 11,95 mmole; 1,00 equivalentes; Fisher, 99,9%) em água (190 ml), numa atmosfera de azoto a 65°C, durante 2 horas. Depois de se arrefecer para 25°C a suspensão branca de mercúrio resultante, adicionou-se iodo (4,79 g; 18,9 mmole; 1,6 equivalentes) e acetato de etilo (190 ml). Decorrida 1 hora tinha sido consumido o produto mercurial em suspensão e permanecia uma solução púrpura límpida. Decorridas 2 horas adicionou-se sulfito de sódio (6,35 g) e desapareceu a cor púrpura. Depois de se agitar durante 30 minutos fez-se borbulhar suavemente ácido sulfídrico na mistura reaccional durante 15 minutos. Precipitou-se o sulfureto de mercúrio (um coloide preto) e o iodeto 36 (um pó branco). A precipitação completa do mercúrio (II) verificou-se por CCF controlando o desaparecimento de uma das duas principais manchas activas sob a acção de ultra-violetas. Filtrou-se a mistura reaccional através de um filtro e separou-se em duas camadas. Lavou-se o filtro com acetato de etilo em ebulição (9 x 100 ml) até que a CCF indicou que já não se extraía mais produto. Lavou-se cada extracto de acetato de etilo com a camada aquosa. As camadas de acetato de etilo combinadas secaram-se sobre sulfato de magnésio e evaporou-se até à secagem. O sólido bruto resultante tornou-se vermelho por exposição ao ar. Dissolveu-se este material em diclorometano/metanol 3:1 (100 ml) e adicionou-se a forma de base livre de uma resina de permuta de aniões fracamente alcalina

(5,0 g; BioRad AG3 X4A, 2,9 meq/g seca). Fez-se borbulhar ácido sulfídrico na solução vermelha durante 10 minutos e eliminou-se a cor vermelha. Eliminou-se uma turvação ligeira aquecendo rapidamente e filtrou-se imediatamente a solução através de uma almofada de 2 cm (15 g) de gel de sílica. Eluiu-se o gel de sílica com mais diclorometano/metanol 3:1 (100 ml). Adicionou-se gel de sílica (50 g) ao filtrado e fez-se borbulhar ácido sulfídrico durante 10 minutos. Removeu-se o dissolvente desta mistura com um evaporador rotativo e "secou-se" o gel de sílica por evaporação conjunta com clorofórmio (200 ml). Com este gel de sílica carregou-se rapidamente uma coluna de gel de sílica (500 g) a qual havia sido desgaseificada com uma corrente de azoto. A eluição, numa atmosfera de azoto, com metanol em dicloro-metano a 5% (6 litros) e 10% (4 litros), originou 2,92 g (64%) de iodeto 36 sob a forma de um pó branco e 456 mg (7,5%) de 7,8-di-iodo-2',3'-didesoxi-7-deaza-adenosina de polaridade inferior. A recristalização do produto principal no seio de acetato de etilo em ebulição (200 ml), originou 2,626 g de agulhas brancas (p.f. 158°-160°C). A concentração dos líquidos mãe para 10 ml, originou uma segunda colheita de 0,391 g de agulhas vermelho claro (p.f. 156°-158°C). Ambas as colheitas se apresentaram homogêneas de acordo com o espectro RMN e com a CCF e em conjunto apresentaram um rendimento global de 64% a partir da olefina 34.

^1H -RMN (DMSO- d_6): 8,09 (s, 1H, H2), 7,67 (s, 1H, H8), 6,65, (s largo, 2H, NH_2), 6,34 (dd, $J=4,4$ e 6,8, 1H, H1'), 4,95 (t, $J=5,5$, 1H, 5'OH), 4,04 (hept aparente, $J=3,5$, 1H, H4'), 3,59 e 3,49 (m, 1H, H5'), 2,30, 2,28 e 2,00 (m, 4H, H2' e H3').

E. PREPARAÇÃO DE 7-(3-TRIFLUORO-ACETAMIDO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (37)

Durante 90 minutos fez-se o acoplamento de iodeto 36 (720,3mg ; 2,00 mmole) com N-propargil-trifluoro-acetamida, seguindo o processo normalizado apresentado no Exemplo 5C. A cromatografia com metanol em dicloro-metano a 7%, originou 705,8 mg (92%) de produto 37 na forma de um pó branco sujo que se verificou ser homogêneo, de acordo com o espectro RMN e por CCF. A recristalização no seio de acetato de etilo em ebulição (10 ml), originou 372 mg de microcristais brancos (p.f. 169^o-171^oC).

¹H-RMN (DMSO-d₆): 10,1 (t distorcido, 1H, NHTFA), 8,10 (s, 1H, H₂), 7,78 (s, 1H, H₈), 6,0-7,5 (s muito largo, NH₂), 6,34 (dd, J=4,5 e 7,0, 1H, H1'), 4,98 (t, J=5, 1H, 5'OH), 4,31 (s ligeiramente alargado, 2H, -CH₂N-), 4,10 (hept aparente, J=3,5, 1H, H4'), 3,60, e 3,40 (m, 1H, H5'), 2,37, 2,18 e 2,00 (m, 4H, H2' e H3'). CCF (diclorometano/metanol/hidróxido de amônia concentrado 90:9:1 ; UV): iodeto de partida 36, R_f=0,36; produto 37, R_f=0,26).

F. PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 7-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (7-AP3-ddc7ATP)

Converteu-se o nucleosido alcinil-amino 37 (1,00 mmole) no correspondente 5'-trifosfato e eliminou-se o grupo trifluoro-acetilo, de acordo com o processo geral descrito no Exemplo 5E. Após a adição da segunda aliquota de oxi-cloreto de fósforo, agitou-se a solução durante 120 minutos. Presumindo um coeficiente de absorção para o produto igual ao do mate-

rial de partida (12 700), o rendimento em 7-AP3-ddc7ATP, baseado na absorção a 279,5 nm, foi de 40%.

^1H -RMN (D_2O): 7,97 (s, 1H, H2), 7,80 (s, 1H, H8), 6,33 (m, 1H, H1'), 4,44 (m, 1H, H4'), 4,27 (m, 1H, H5'a), 4,14 (m, 1H, H5'b), 4,11 (s largo, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2,6-2,0 (m, 4H, H2' e H3'), mais os picos (triethyl-amônio) do ião contrário. ^{31}P -RMN (D_2O): -8,59 (d largo, $J=20$, 1P), -9,56 (d, $J=20$, 1P), e -21,38 (m, 1P). UV (pH 8,2 Tris aq): máximos a 238 e 279,5 nm.

EXEMPLO 9

Processo Geral de Acoplamento para a Preparação de um Terminante de Cadeia Marcado por Fluorescência

Preparação de um Terminante T: 5-(SF-505-Sar-AP3)ddUTP

Extraíu-se a amina 5-(AP3)ddUTP (60 micromole) do Exemplo 6C com água (0,300 ml) e diluiu-se com DMF (0,600 ml). Adicionou-se uma solução de reagente de corante de marcação Ac2EtSF-505-Sar-NHS (72 mg; 126 micromole) do Exemplo 1E, em DMF (0,600 ml), e agitou-se a mistura a 50°C durante 4 horas. Adicionou-se amônia aquosa concentrada (1,5 ml), tapou-se o frasco hermeticamente, e manteve-se o aquecimento a 50°C durante 20 minutos. Diluiu-se a solução vermelha resultante até 60 ml com água e aplicou-se a uma coluna de DEAE-Sephadex A-25-120 (leito de 1 x 35 cm) que tinha sido equilibrada com TEAB aquoso 2,0 M de pH 7,7 (50 ml) e depois com TEAB aquoso 0,2 M de pH 7,7 (50 ml). Eluiu-se a coluna com TEAB aquoso de pH 7,7

de gradiente linear: desde 0,2 M (150 ml) até 2,0 M (150 ml). O processamento da coluna efectuou-se a 100 ml/hora, recolhendo-se as fracções de 3 em 3 minutos. Fez-se o controlo do eluente por absorção a 510 nm (40 AUFS). Fez-se primeiro a eluição das bandas de dois sub-produtos inferiores seguindo-se a banda do produto mais forte com resolução próximo da linha de base. Combinaram-se as fracções que se admitiu conterem produto puro e extraíram-se ($T < 30^{\circ}\text{C}$), fez-se a evaporação conjunta com etanol absoluto (3x), e depois extraíram-se com um pequeno volume de água (5,2 ml). Analisou-se a solução por absorção na zona do visível (pH 8,2 tris-tampão aquoso 50 mM) e liofilizou-se. Uma solução diluída do produto apresentou o máximo de absorção a 491 nm. A produção, calculada admitindo o coeficiente de absorção do corante livre (72 600), foi de 31 micromoles (51%). Prepararam-se também compostos de terminante de cadeia marcada por fluorescência, de acordo com o procedimento geral descrito. A nomenclatura da Tabela 1 representa o espaçador marcado por fluorescência (por exemplo SF-512-Sar) e os materiais ligantes de didesoxi-nucleotido (AP3-ddNTP) que se prepararam nos exemplos anteriores e se combinaram de acordo com o procedimento geral, para preparar novas composições úteis para a sequenciação de ADN.

Tabela 1

Resumo de Dados para a Preparação de Outros
Terminantes de Cadeia marcados por Fluorescência

<u>Composto</u>	<u>Escala</u>	<u>Gradiente de Coluna</u>	<u>Rendimento</u>	<u>AbsMax</u>
5-(SF512-Sar-AP3)ddCTP	40 umole	0,4 - 0,7 M	47%	501
5-(SF519-Sar-AP3)ddCTP	10 umole	0,4 - 0,7 M	27%	508
7-(SF512-Sar-AP3)ddc7ATP	10 umole	0,4 - 0,7 M	58%	505,5
7-(SF526-Sar-AP3)ddc7GTP	50 umole	0,4 - 0,7 M	53%	519,5
5-(SF505-Sar-AP3)ddCTP	10 umole	0,4 - 0,7 M	33%	492
7-(SF505-Sar-AP3)ddc7GTP	10 umole	0,4 - 0,7 M	42%	497,5
5-(SF526-Sar-AP3)ddUTP	7,5 umole	0,4 - 0,7 M	60%	516,5
7-(SF512-Sar-AP3)ddc7GTP	10 umole	0,4 - 0,7 M	60%	505
5-(SF512-Sar-AP3)AcyCTP (acilo)	10 umole	0,4 - 0,7 M	54%	500,5

EXEMPLO 10

Sequência parcial de Base ADN do Bacteriófago
M13, Utilizando um Protocolo de Elongação de
Cadeia de Sanger Modificado, com Terminantes
de Cadeia Marcados por Fluorescência

A. Reacções de Elongação de Cadeia de ADN Modificado.

Em cada um de quatro tubos de plástico Eppendorf de 1,5 ml colocou-se uma quantidade de 3 microgramas do modelo de bacteriófago M13 mp 18 ADN (New England Biolabs; 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e 60 μg (-40) de sistema escorvador (New England Biolabs; 7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Depois aqueceu-se cada tubo, durante 2 minutos, num banho de água em ebulição e arrefeceu-se imediatamente sobre gelo húmido, durante 5 minutos. Após 1 impulso de rotação de 1 segundo num micro-centrifugador, à temperatura ambiente, adicionou-se a cada tubo e misturou-se 8 μl de 1 tampão de 5x a reacção (tris-HCl 0,3 M, pH 8,3; NaCl 0,375 M; MgCl_2 37,5 mM; ditio-treitol 2,5 mM), 10 μl de H_2O da pureza do reagente, 1 μl de uma solução contendo os trifosfatos de adenosina, timidina, citosina, e guanosina a 25 μM cada (Pharmacia), e 1 μl de transcriptase inversa (vírus da mieloblastose das aves: New England Nuclear; 15 unidades/ μl). Incubaram-se os tubos a 37°C durante 10 minutos. Adicionaram-se aos quatro tubos 4 μl de soluções 200 μM dos terminantes de cadeia marcados por fluorescência do Exemplo 9; um tubo recebeu 7-(SF505-Sar-AP3)ddc7GTP, outro recebeu 7-(SF512-Sar-AP3)ddc7ATP, outro recebeu 5-(SF519-Sar-AP3)ddCTP, e o quarto recebeu

5-(SF526-Sar-AP3)ddTTP. Incubaram-se os tubos a 42°C durante 30 minutos. Preparou-se uma mistura de 22 µl a partir de cada um dos quatro tubos e fez-se passar através de uma coluna de rotação 5-25 Select-D (Superior 5 → Superior 3; Philadelphia), a qual tinha sido lavada previamente com H₂O da qualidade do reagente, para se separar os terminantes de cadeia marcados por fluorescência não incorporada nas cadeias de ADN alongadas marcadas por fluorescência, na mistura reaccional. Recolheu-se o efluente da coluna e secou-se em vácuo. Adicionou-se uma quantidade de 0,5 ml de etanol a 70% e fez-se rodar o tubo durante 5 segundos. Depois centrifugou-se o tubo durante 5 minutos num micro-centrifugador, secou-se em vácuo a massa de ADN, e fez-se nova suspensão com 10 µl de formamida a 95%/25 mM de EDTA. Aqueceu-se o tubo a 65°C durante 7 minutos num banho de água e, com uma micro-pipeta, colocaram-se 10 µl da amostra de ADN sobre uma poli-acrilamida a 8% pré-condicionada: bis (19:1) gel (15 cm x 40 cm x 0,35 mm) contendo ureia 8,3M e tampão 1x TEAB. Fez-se a electroforese da amostra a 27 watts conforme a seguir descrito em B.

B. Electroforese da Cadeia de ADN Marcada por Fluorescência

O pré-condicionamento do gel consistiu na exposição do gel a uma corrente contínua de 27 watts (aproximadamente 2 000 volts) durante cerca de 30 minutos antes da amostra ali ser colocada. Durante este período, a temperatura da superfície do gel estabilizou a 49°C.

Durante a electroforese o gel vertical foi irradiado por um laser de iões de argon (Modelo Omnicrome 532)

numa região 28 cm abaixo da origem da carga da amostra. Fez-se passar os raios laser através de um filtro de riscas de 488 nm (Barr Associates) o que impediu que outros comprimentos de onda atingissem o gel. A corrente final do laser sobre a superfície do gel foi de 35 mW com um diâmetro aproximado de 1 mm.

A detecção das emissões fluorescentes a partir das cadeias de ADN marcadas por fluorescência conseguiu-se com dois tubos fotomultiplicadores (TFM; Hamamatsu R1612) com uma tensão de -950 V cada. Os filtros selectivos dos comprimentos de onda (Barr Associates) colocaram-se entre as emissões fluorescentes e os dois TFM, de modo que um filtro associado a um TFM permitiu a passagem de emissões no intervalo compreendido entre 496 e 528 nm, enquanto o outro filtro, associado com o segundo TFM permitia a passagem de emissões compreendidas no intervalo 522 e 553 nm. Além disso, colocou-se uma abertura de recepção de fibra óptica (Incom) no percurso da luz entre as emissões fluorescentes e os filtros selectivos dos comprimentos de onda, para limitar o meio ângulo de detecção para um valor inferior a 22° aproximadamente. Os sinais de cada TFM foram digitalizados separadamente após a pré-amplificação e obtiveram-se dados de ambos os TFM simultaneamente, de 5 em 5 segundos. Armazenaram-se os dados digitalizados num ficheiro sequencial, por meio do equipamento de controlo do sistema (Hewlett-Packard 9000, Modelo 20).

C. Sequência Parcial do Bacteriófago M13

Os dados derivados das emissões fluorescentes, du

rante a electroforese das cadeias de ADN M13 mp 18 marcado por fluorescência, analisaram-se de acordo com métodos conhecidos. Como ilustração apresenta-se, na Tabela 2, uma sequência parcial de nucleosido.

Tabela 2

Sequência Parcial do Nucleosido de M13 mp 18

Número		Proporção
<u>Base</u>	<u>Nucleosido</u>	<u>(em peso)</u>
3	T	0,14
4	G	0,90
5	T	0,19
6	A	0,78
7	A	0,75
8	A	0,80
9	A	0,75
10	C	0,35
11	G	1,88
12	A	0,89
13	C	0,32
14	G	1,88
15	G	1,92
16	C	0,33
17	C	0,36
18	A	0,81
19	G	1,89
20	T	0,16

Os dados mostram claramente que se deduz um intervalo de proporções distinto e estreito correspondente a cada um dos quatro nucleosídeos no ADN de M13 mp 18.

EXEMPLO 11

A. Preparação de 1-(2-hidroxi-etoxi-metil)-5-iodocitosina (5-IAcyC)

Fez-se o refluxo de uma mistura de 1-(2-hidroxi-etoxi-metil)-citosina (AcyC) (1,85 g; 10,0 mmole) e acetato de mercúrio (3,35 g; 10,5 mmole) em metanol (50 ml) e cloreto de metileno (100 ml). Adicionou-se iodo (3,05 g; 12,0 mmole) e agitou-se a mistura durante 1 hora. Adicionou-se a forma de base livre da resina AG3x4 (38 meq) e fez-se borbulhar ácido sulfídrico na solução durante 15 minutos. Eliminaram-se os sólidos por filtração e colocou-se o filtrado sobre gel de sílica (10 g). Com a sílica carregou-se uma coluna de gel de sílica (4 x 25 cm) e eluiu-se com cloreto de metileno/metanol num gradiente por passos (20:1 → 10:1 → 5:1). A evaporação, seguida de secagem em vácuo, originou um sólido incolor (1,73 g; 56%).

A recristalização no seio de etanol a 95% originou material analiticamente puro. p.f. 172°C. Análise: Calculado: $[C(7)H(10)N(3)O(3)I(1)]$ C 27,03, H 3,24, N 13,51. Encontrado: C 27,08, H 3,41, N 13,51. UV (MeOH): max 292,5 (5.300). RMN (DMSO- d_6): delta 3,481 (m, 4H), 4,659 (t, J=5 hz, 1H), 5,070 (s, 2H), 6,665 (s largo, 1H), 7,869 (s largo, 1H), e 8,107 (s, 1H).

B. Preparação de 1-(2-hidroxi-etoxi-metil)-5-(3-trifluoro-acetamido-1-propinil)-citosina (5-(TFA-AP3) AcyC)

Submeteu-se 1-(2-hidroxi-etoxi-metil)-5-iodocitosina (311 mg; 1,00 mmole) ao procedimento geral de acoplamento descrito no Exemplo 9. A cromatografia intermitente em gel de sílica (3 x 20 cm), eluindo com cloreto de metileno/metanol num gradiente por passos (20:1 → 10:1 → 5:1), originou o produto sob a forma de uma espuma amarelo tênue (77,4 mg, 23%).
¹H-RMN (DMSO-d₆): 3,472 (s largo, 4H), 4,276 (d, J=5,0 hz, 2H), 4,653 (t largo, J=4,5 hz, 1H), 5,091 (s, 2H), 6,925 (s largo, 1H), 7,861 (s largo, 1H), 8,037 (s, 1H), e 9,964 (s largo, 1H).

C. Preparação de 1-(2-hidroxi-etoxi-metil)-5-(3-amino-1-propinil)-citosina

Converteu-se em trifosfato o grupo hidroxilo da parte açúcar do nucleosido alcinil-amino (5-(TFA-AP3) AcyC) (0,167 mmole) e removeu-se o grupo trifluoro-acetilo, seguindo o procedimento geral apresentado no Exemplo 5E. Após a adição da segunda aliquota de oxicloreto de fósforo, deixou-se a fosforilação evoluir durante 75 minutos. Admitindo um coeficiente de absorção para o produto igual ao do material de partida (7 790), o rendimento em trifosfato, baseado na sua absorção de UV a 291 nm, foi de 21%.

EXEMPLO 12

Preparação de um Derivado de Timidina Marcado com um Corante Protegido (R₁=R₂=H)

A. Preparação de 5'-desoxi-5'-(metil-amino)-timidina

Colocou-se 5'-O-(p-tolueno-sulfonil)-timidina (19,8 g; 50 mmole) numa caldeira, na qual se condensou a mono-metil-amina (250 g). Vedou-se o recipiente e deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 3 dias. Arrefeceu-se o recipiente, abriu-se e deixou-se evaporar a mono-metil-amina. O conteúdo remanescente do vaso removeu-se por lavagem com água. Fez-se passar a solução aquosa por uma coluna (6,5 x 20 cm) de resina de permuta de iões AG50Wx8 (forma H^+). Lavou-se a coluna com água até os produtos de lavagem ficarem neutros. Depois fez-se a eluição do produto com hidróxido de amônia aquoso 1N. Eliminou-se o eluente e fez-se a cromatografia do sólido resultante numa coluna (6,5 x 20 cm) de gel de sílica com cloreto de metileno/metanol/hidróxido de amônia aquoso concentrado (85:13:2) como dissolvente de eluição. Verteram-se as fracções que continham o produto, depois extraiu-se com água e liofilizou-se. O produto era um sólido amorfo amarelo claro (8,81 g; 69%). (Não foi possível obter uma análise de combustão satisfatória para este material). $[\alpha]_D^{25}$ (c=1,0 em água): +25,9 graus IV (KBr): cm^{-1} 1693, 1472, 1273, 1076. RMN (DMSO- d_6): δ 1,790 (s, 3H), 2,051 (ddd, 13,4, 6,3, 3,5 hz, 1H), 2,142 (dt, 13,4, 6,9 hz, 1H), 2,314 (s, 3H), 2,658 (d, 5,5 hz, 2H), 3,775 (td, 5,3, 3,2 hz, 1H), 4,171 (dt, 6,3, 3,2 hz, 1H), 6,134 (t, 6,9 hz, 1H) e 7,639 (s, 1H).

B. Acoplamento

Agitou-se o produto do Exemplo 1B (4,14 g; 10,0 mmole), N-hidroxi-succinimida (1,21 g; 10,5 mmole) e N,N'-diciclo-hexil-carbo-di-imida (3,09 g; 15,0 mmole) em cloreto de metileno se-

co (100 ml) à temperatura ambiente durante 1 hora. Arrefeceu-se a mistura com gelo e removeu-se o precipitado resultante por filtração. Lavou-se o resíduo com 50 ml de cloreto de metileno gelado. Os filtrados combinados adicionaram-se a uma suspensão do produto de (A) (2,68 g; 10,5 mmole) em etanol absoluto (300 ml). Depois de se agitar à temperatura ambiente durante 90 minutos, verteu-se a mistura reaccional, extraíu-se com 100 ml de cloreto de metileno e extraíu-se com 2 x 100 ml de água. Secou-se a camada orgânica sobre sulfato de sódio e verteu-se. Com o resíduo carregou-se uma coluna (6,5 x 30 cm) de gel de sílica em solução de cloreto de metileno e fez-se a eluição da coluna com cloreto de metileno/etanol 20:1. Controlou-se a eluição por cromatografia de camada fina em gel de sílica com cloreto de metileno/metanol 10:1. Retiveram-se as fracções que continham o produto puro enquanto se fazia nova cromatografia das fracções mistas. Recolheram-se as soluções combinadas de produto puro e removeram-se os vestígios de dissolvente por secagem intensa em vácuo para se obter o produto na forma de uma espuma espessa amarelo claro (3,97 g; 61%). (Não foi possível obter uma análise de combustão satisfatória para este sólido amorfo). $[\alpha]_D^{25}$ (c=0,96 em etanol): +50,8°. IV (KBr): cm^{-1} 1768, 1691, 1610, 1490, 1420, 1205, e 1150. FAB-MS (matriz de tio-glicerol) m/e 606 (M-CH₃CH₂O). RMN (DMSO-d₆): (Apresentou uma mistura 3:1 de isómeros rotativos próximo da ligação da amida terciária recentemente formada). δ (principal e secundário) 1,038 (m, 3H), 1,780 e 1,800 (m, 2H), 1,78 (m, 2H), 2,04 (m, 2H), 2,23 (m, 2H), 2,291 (s, 6H), 2,683 e 2,711 (s, 3H), 2,895 e 2,859 (q, 6 hz, 2H), 3,5-

-3,2 (m, 2H), 3,805 e 3,57 (m, 1H), 4,032 e 3,98 (m, 1H), 5,249 e 5,295 (d, 3,6 Hz, 1H), 6,116 e 6,012 (t, 6,9 Hz, 1H), 7,1-6,9 (m, 4H), 7,467 e 7,185 (s, 1H), 7,6-7,5 (m, 2H) e 11,275 e 11,332 (s, 1H).

EXEMPLO 13

Preparação de uma Fosforamidite de Nucleosido

Marcado com Corante Protegido ($R_1=R_2=H$)

Extraíu-se com benzeno o produto do Exemplo 11 (2,61 g; 4,00 mmole), congelou-se e liofilizou-se. Adicionou-se cloreto de metileno seco (32 ml), di-isopropil-etil-amina seca (2,8 ml; 16 mmole) e cloreto de N,N-di-isopropil-metil-fosfonamida (1,15 ml; 5,9 mmole) pela ordem apresentada e agitou-se a mistura resultante, numa atmosfera de argon, durante 15 minutos. Adicionou-se a mistura reaccional a uma mistura previamente agitada de acetato de etilo (160 ml) e bicarbonato de sódio aquoso saturado (80 ml), agitou-se e separaram-se as camadas. Lavou-se a camada orgânica com 2 x 80 ml de cloreto de sódio aquoso saturado, secou-se sobre sulfato de sódio, e verteu-se. Fez-se a cromatografia do resíduo numa coluna (4 x 20 cm) de gel de sílica com cloreto de metileno/acetato de etilo/trietil-amina 45:45:10 como dissolvente de eluição. Fez-se o controlo do eluente por cromatografia de camada fina em gel de sílica com o mesmo solvente. Recolheram-se as fracções que continham o produto e eliminaram-se os vestígios de dissolvente por secagem intensa no vácuo, para se obter o produto sob a forma de uma espuma viscosa amarelo claro, (2,89 g).

O espectro RMN ^{31}P do produto apresentou uma mistura de quatro produtos resultantes do isomerismo rotativo próximo da ligação da amida terciária (6:1) e do diasteromerismo próximo do fósforo trivalente (1:1). (O espectro também revelou uma contaminação de 13% em peso pelo ácido N,N-di-isopropil-metil-fosfonamídico. Este material não interferiu com a utilização do produto para a síntese de oligonucleotídeos). Rendimento corrigido: 77%. ^{31}P RMN (CDCl_3): δ 147,81 e 146,99 (s, principal) e 148,18 e 147,75 (s, secundário).

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

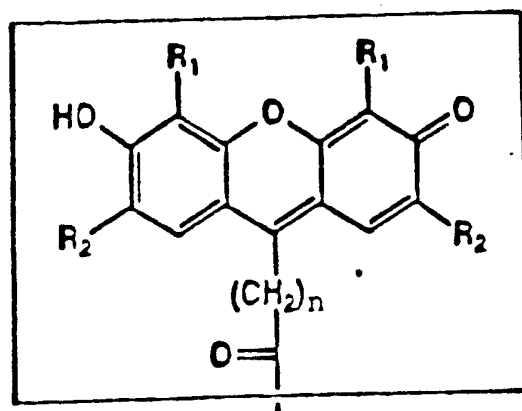
1.- Sistema para a detecção da presença de energia radiante emitida a partir de diferentes espécies a seguir à separação no tempo e/ou no espaço e determinar a identidade de tais espécies, caracterizado por incluir:

meios responsivos aos espectros das espécies para gerar um primeiro sinal que varia em amplitude, num primeiro sentido, como uma função da natureza das espécies,

meios responsivos aos espectros das espécies para gerar um segundo sinal que varia em amplitude, num segundo sentido diferente do primeiro, como uma função da natureza das espécies, e meios responsivos aos primeiro e segundo sinais para se obter um terceiro sinal que corresponde à relação das funções do primeiro e segundo sinais, sendo a amplitude do terceiro sinal indicativa da identidade de cada espécie.

2.- Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as espécies serem fragmentos de ADN covalentemente marcados com informadores susceptíveis de emitir energia radiante e que incluem meios adaptados à separação de fragmentos de ADN.

3.- Sistema de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por os informadores terem a estrutura



na qual $n=2$ ou 3 e R_1 e R_2 representam, cada um, um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo alquilo inferior, alcoxí inferior ou ciano.

4.- Sistema de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por os fragmentos de ADN terem informadores com ligações covalentes aos seus radicais terminais 3' que foram introduzidos como resultado de terminação da cadeia.

5.- Sistema de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por também se incluir um "laser" que tem um comprimento de onda compreendido na região de excitação dos diferentes informadores.

6.- Sistema de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por os fragmentos de ADN terem informadores com ligações covalentes aos seus radicais terminais 3' que foram introduzidos como resultado de terminação da cadeia.

7.- Sistema de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os meios para gerar o primeiro e o segundo sinais in-

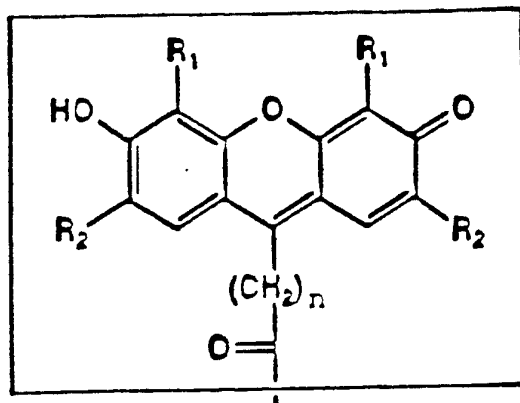
cluirem: meios que têm características de primeira e segunda transmissão, as quais variam como uma função do comprimento de onda, para transmissão dos espectros, sendo os meios de transmissão e as espécies relativamente posicionáveis para dirigir tais emissões aos meios de transmissão, primeiro e segundo detectores posicionáveis para receber respectivamente a primeira e a segunda emissões transmitidas e que geram o primeiro e o segundo sinais que correspondem às intensidades de cada e indicam a sua presença.

8.- Sistema de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por a característica do dispositivo ter uma transição da primeira para a segunda características de transmissão a qual é centrada aproximadamente a meio dos espectros de emissão dos informadores.

9.- Sistema de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por os meios de transmissão serem um filtro dicróico.

10.- Sistema de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por incluir meios adaptados à separação de fragmentos de ADN ou outras moléculas covalentemente marcadas com informadores.

11.- Sistema de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por os informadores terem uma parte de emissão com estrutura



na qual $n=2$ ou 3 , e R_1 e R_2 representam, cada um, um átomo de hidrogénio ou de halogéneo ou um grupo alquilo inferior, alcoxi inferior ou ciano.

12.- Método para detectar a presença de energia radiante emitido por diferentes espécies, a seguir à separação no tempo e/ou no espaço e determinar a identidade de cada espécie que emite espectros, caracterizado pelo facto de se obter funções da energia emitida que varia em diferentes sentidos de acordo com a natureza das espécies e relacionar tais funções, sendo a relação indicativa da identidade das espécies.

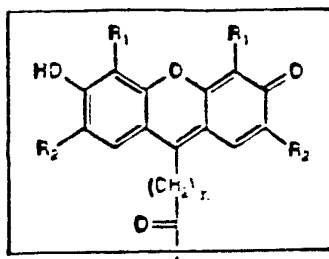
13.- Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por os diferentes sentidos consistirem em amplitudes de emissão maiores ou menores.

14.- Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de se obter as funções fazendo passar a energia radiante emitida através de um dispositivo com uma carac-

terística de transmissão/reflexão que varia em função do comprimento de onda e por o dispositivo ser um filtro dicróico.

15.- Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por as espécies serem fragmentos de ADN covalentemente marcados com informadores.

16.- Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por os informadores terem a estrutura



na qual $n=2$ ou 3 e R_1 e R_2 representam, cada um, um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo alquilo inferior, alcoxí inferior ou ciano.

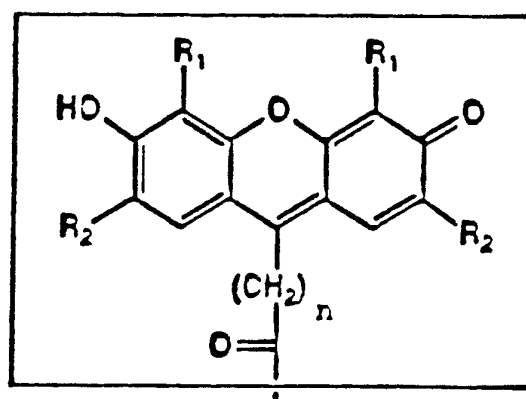
17.- Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por os fragmentos de ADN terem informadores ligados aos seus radicais terminais 3' que foram introduzidos como resultado de terminação da cadeia.

18.- Processo para a análise da sequência de ADN por alongação da cadeia, caracterizado por se fazer reagir um modelo templatado de ADN contido num vector de sequenciação adequado, um corante (iniciador), uma polimerase, uma primeira mistura de nucleotídeos de ADN ou dos seus análogos e uma segunda mistura de terminantes de cadeia marcados por informadores que correspondem a nucleotídeos de ADN ou os seus análogos para produzir fragmentos de ADN que têm informadores com ligações

covalentes aos seus radicais terminais 3' introduzidos como resultado de terminação da cadeia, e analisar os fragmentos assim produzidos relativamente à presença de informadores, identificando por este meio a sequência de ADN.

19.- Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por os informadores serem seleccionados no grupo que consiste em cromóforos, fluoróforos, materiais luminescentes, marcadores por rotação de electrões e materiais densos em electrões.

20.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por os fluoróforos terem a estrutura



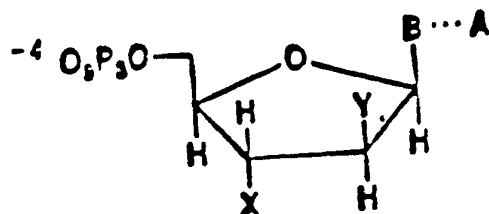
na qual $n=2$ ou 3 e R_1 e R_2 representam, cada um, um átomo de hidrogénio ou de halogéneo ou um grupo alquilo inferior, alcoxi inferior ou ciano.

21.- Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por a ligação dos informadores aos terminantes de cadeia se realizar por meio de uma ligação de amida.

22.- Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por o terminante de cadeia marcada por informador incluir uma base heterocíclica e por a ligação do informador ao terminante de cadeia se realizar através da base heterocíclica.

23.- Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por se interpor um ligante e um espaçador opcional entre o informador e a base heterocíclica.

24.- Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o terminante de cadeia marcada por informador ser um composto com a estrutura

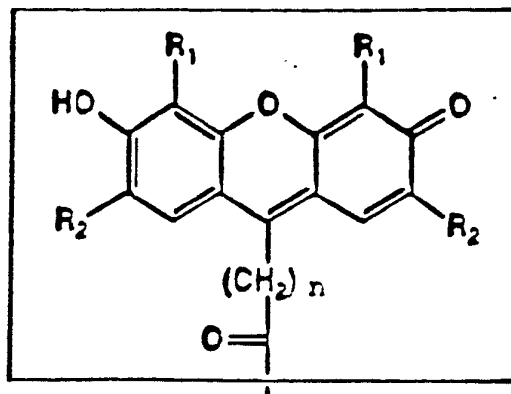


na qual X representa um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo amino e

Y representa um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo OH ou NH₂, ou X=Y=OH ;

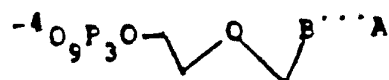
B representa uracilo, citosina, 7-deaza-ademina, 7-deaza-guanina ou 7-deaza-hipo-xantina em que as pirimidinas estão ligadas à parte açúcar através da posição N₁, as purinas e as deazapurinas estão ligadas à parte açúcar através da posição N₉ (numeração de purina das deazapurinas); e

A representa um fluoróforo com a estrutura



na qual $n=2$ ou 3 e R_1 e R_2 representam, cada um, um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo alquilo inferior, alcoxi inferior ou ciano; e a linha tracejada representa um ligante e um espaçador opcional ou um grupo unindo B e A com a condição de se B representar uma pirimidina a ligação se encontrar na posição 5 da pirimidina e se B representar uma deaza purina a ligação se encontrar na posição 7 daquela deazapurina (numeração de purina).

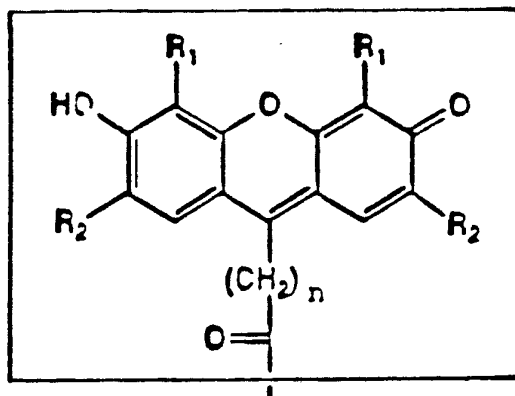
25.- Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por o terminante de cadeia marcada por informador ser um composto com a estrutura



na qual B representa uracilo, citosina, 7-deaza-ademina,

7-deaza-guanina ou 7-deaza-hipo-xantina em que as pirimidinas estão ligadas na posição N_1 e as purinas se encontram ligadas à parte açúcar através da posição N_1 , as pirimidinas e as deazapurinas estão ligadas à parte açúcar através da posição N_9 (numeração de purina das deazapurinas)

e A representa um fluoróforo que tem a estrutura



na qual $n=2$ ou 3 e R_1 e R_2 representam, cada um, um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo alquilo inferior, alcoxi inferior ou ciano;

e a linha tracejada representa um ligante e um espaçador opcional unindo B e A com a condição de se B representar uma pirimidina a ligação se encontrar na posição 5 daquela pirimidina e se B representar uma deazapurina, a ligação se encontrar na posição 7 daquela deazapurina (numeração de purina).

26.- Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por a segunda mistura conter quatro terminantes de cadeia marcada por informadores, suportando cada um deles um informador distinguível diferente, para produzir fragmentos de

ADN marcados.

27.- Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por os informadores distinguíveis serem fluoróforos.

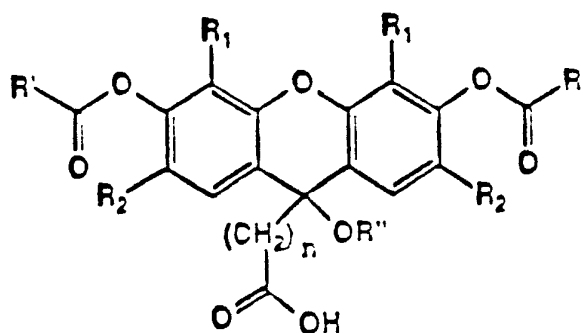
28.- Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por se separar simultaneamente os fragmentos de ADN marcados.

29.- Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por se combinarem os fragmentos de ADN marcados antes da separação.

30.- Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por todas as quatro reacções de terminação da cadeia ocorrerem num recipiente único.

31.- Processo para a determinação de uma sequência de base de ADN, caracterizado pelo facto:
de se ligar um informador diferente a um terminante de cadeia para cada base,
de se preparar fragmentos de ADN marcados por um método de terminação de cadeia modificada,
de se separar os fragmentos de ADN de acordo com o tamanho e de se detectar o informador para cada fragmento de ADN, identificando-se assim a base terminal 3'.

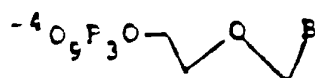
32.- Processo para a preparação de compostos de fórmu
la geral



na qual $n=2$ ou 3 e R_1 e R_2 representam, cada um, um átomo de hidrogênio ou de halogéneo ou um grupo alquilo inferior, alcoxi inferior ou ciano, R' representa um grupo alquilo ou arilo e R'' representa um grupo alquilo,

caracterizado pelo facto de se tratar 3-hidroxi-6-oxo-9-carboxi-alkil-6H-xantenos com um anidrido de ácido carboxílico no seio de piridina e, em seguida, de se tratar com um álcool.

33.- Método de análise de sequência de ADN de acordo com o método de terminante de cadeia que utiliza nucleotidos de dideoxi de terminação de cadeia, caracterizado por se incluir o passo da substituição de um composto que tem a estrutura



4.

na qual B representa 1-uracilo, 1-citosina, 1-timina, 9-adenina, 9-guanina ou 9-hipoxantina para os nucleotidos de dideoxi de terminação de cadeia.

Lisboa, 2 de Julho de 1987
O Agente Oficial da Polícia Judiciária

Sophorini

R e s u m o

"Processo e sistema para a sequenciação de ADN"

A presente invenção refere-se a um sistema para a sequenciação de ADN e a um método para detectar a presença de energia radiante emitida por diferentes espécies marcadas por tonalidades de corante de informadores excitados (fragmentos de ADN), a seguir à separação no tempo e/ou no espaço, e identificar as espécies que emitem energia radiante em comprimentos de onda pouco espaçados.

Obtêm-se funções da energia emitida que varia com os comprimentos de onda dos espectros pouco espaçados em diferentes sentidos e a relação das funções, pelo que a relação é indicativa da identidade dos fragmentos de ADN.

A porção emissora do fragmento de ADN marcado pelo informador é de preferência seleccionada entre uma família de corantes fluorescentes baseados em 9-carboxi-etil-6-hidroxi-3-oxo-3H-xanteno. Estes corantes de xanteno estão ligados covalentemente aos fragmentos de ADN através de funcionalidade de ácido carboxílico, de preferência por meio de uma ligação amida.

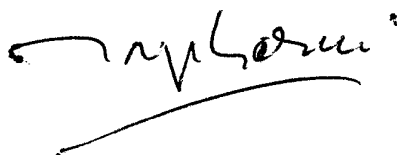
Podem proteger-se os corantes por inclusão de um grupo alcoxi na posição 9. Pode-se inserir um espaçador entre o corante e a amina. Liga-se de preferência o corante fluorescente aos terminantes de cadeia de ADN que proporciona muitas vantagens. Assim, só os fragmentos de sequenciação de ADN resultantes de fenómenos de terminação genuína suportarão um infor-

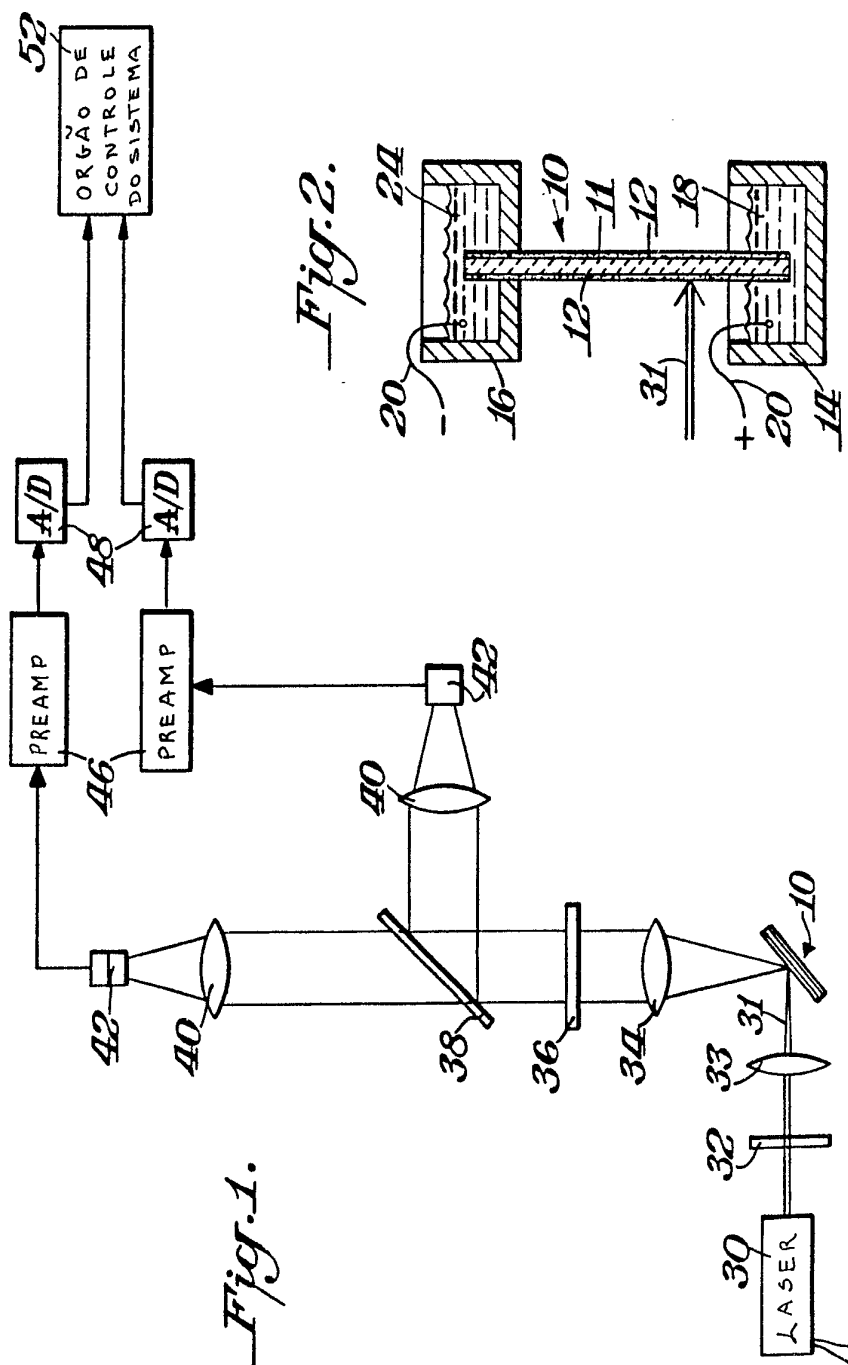
mador.

Também se pode marcar a sequenciação de ADN utilizando os corantes de xanteno que têm utilidade em geral como marcadores fluorescentes. Também se descrevem trifosfatos de aciclonucleosido como sendo úteis como terminantes de cadeia na sequenciação de ADN utilizando uma modificação do método de Sanger.

Lisboa, 2 de Julho de 1987

O Agente Oficial da Propriedade Industrial





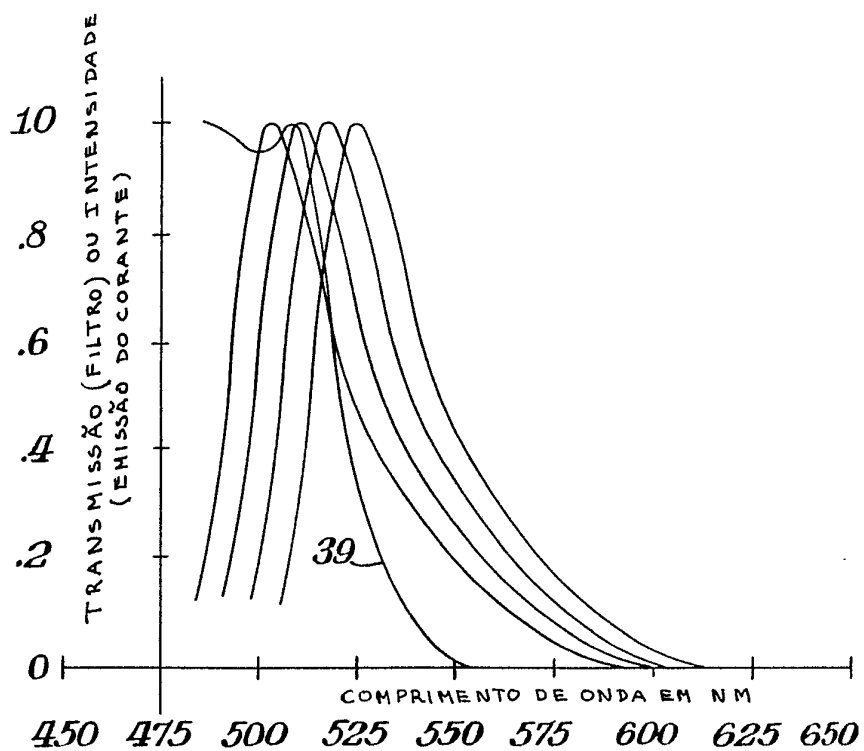


Fig. 3.

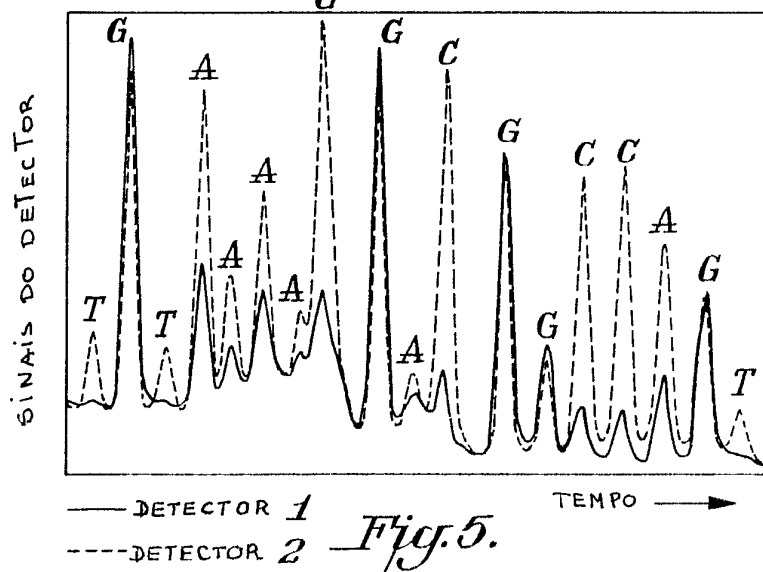


Fig. 5.

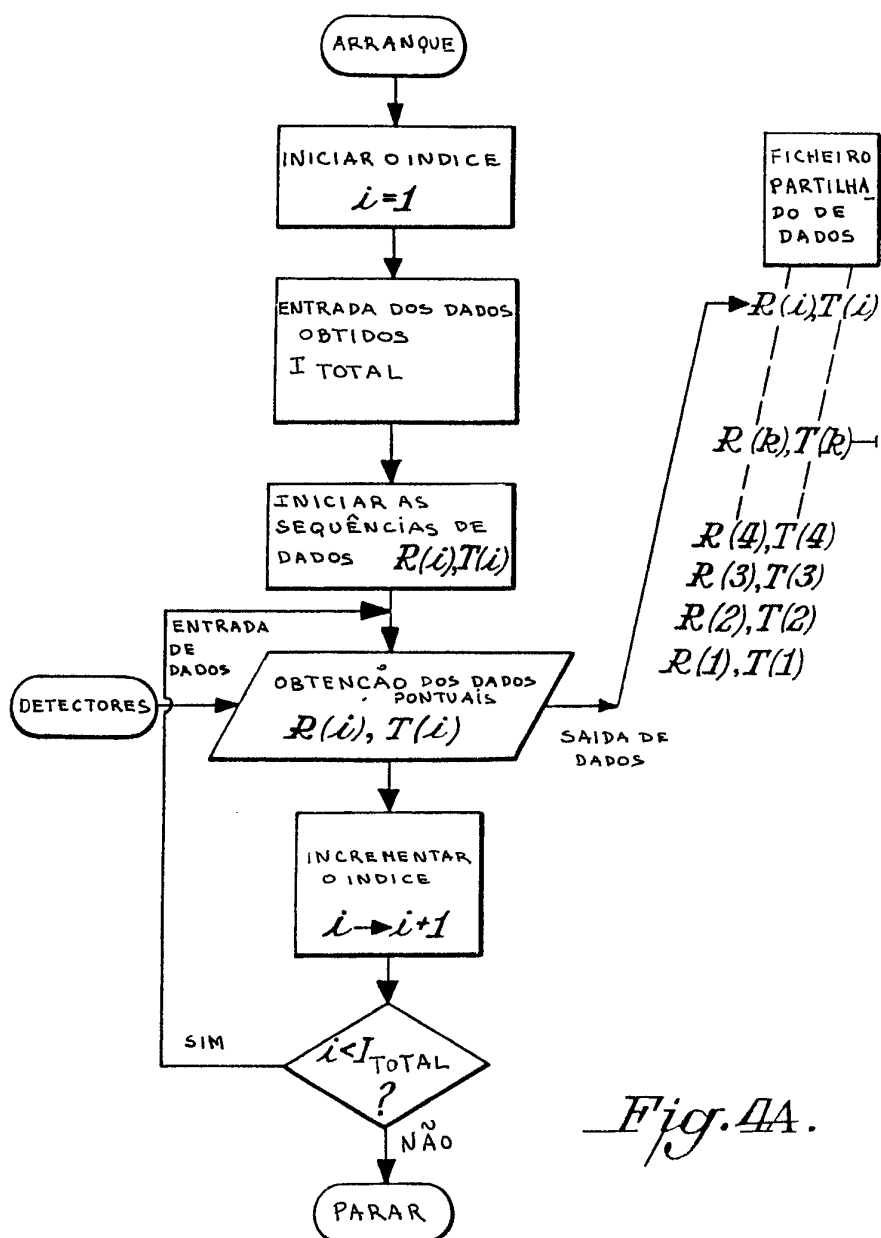


Fig. 4A.

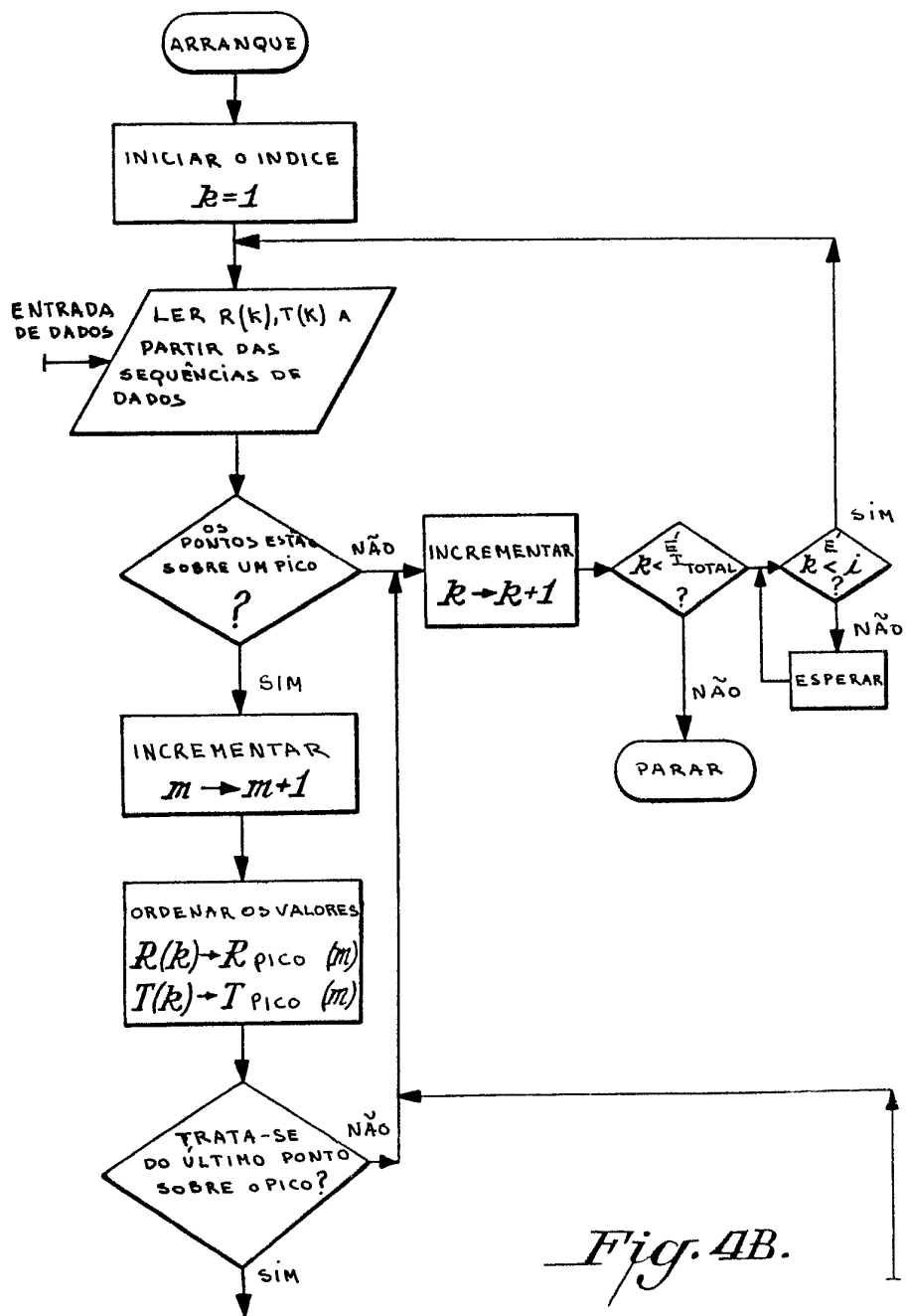


Fig. 4B.

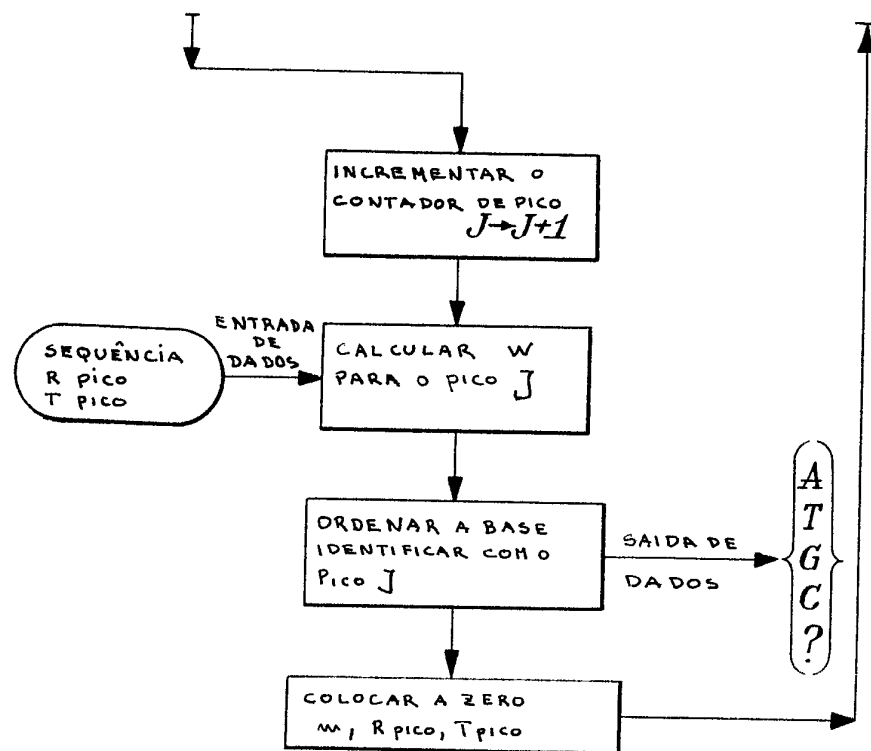


Fig. 4C.

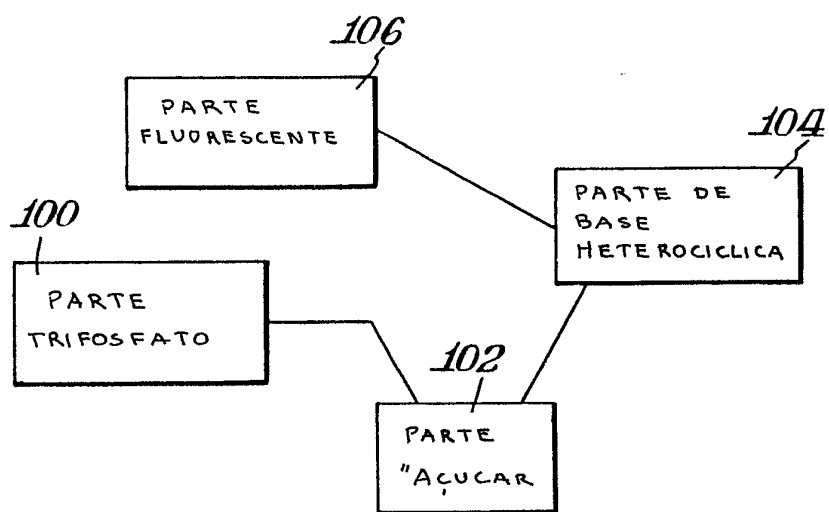


Fig. 6.

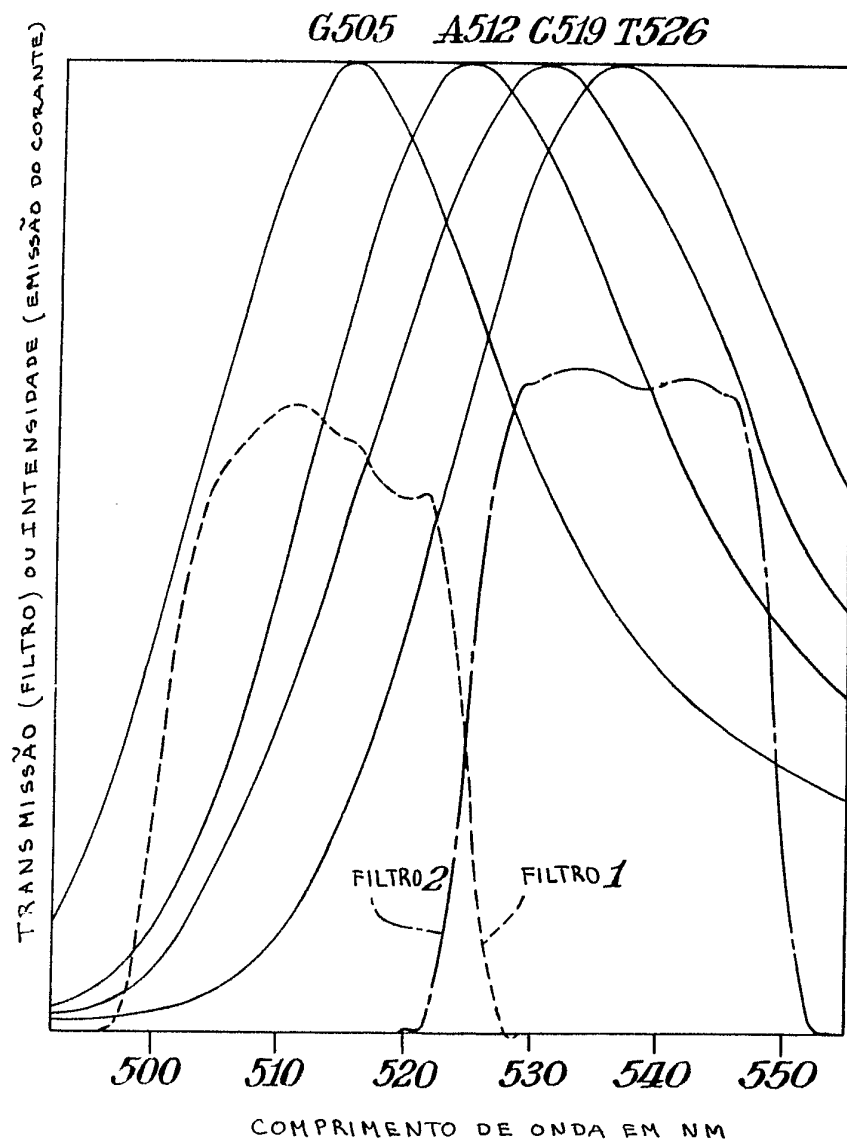


Fig. 7.