

(11) Número de Publicação: **PT 1538154 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07H 21/00** (2006.01) **C07C 225/00** (2006.01)  
**C07C 225/34** (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2004.11.19</b>	(73) Titular(es): <b>EXIQON A/S</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2003.11.20 DK 200301723</b>	<b>SKELSTEDET 16 2950 VEDBAEK</b>	<b>DK</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2005.06.08</b>	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2008.12.31</b> <b>057/2009</b>	<b>CHRISTIAN LOMHOLT</b>	<b>DK</b>
	<b>HENRIK PFUNDHELLER</b>	<b>DK</b>
	<b>MICHAEL MELDGAARD</b>	<b>DK</b>
	(74) Mandatário:	
	<b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b>	
	<b>AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES DE AGENTES DE EXTINÇÃO COM PORÇÕES DE ANTRAQUINONA**

(57) Resumo:

**Resumo****“Composições de agentes de extinção com porções de antraquinona”**

A presente invenção proporciona novas composições de agentes de extinção com porções de antraquinona. As porções de antraquinona são úteis para serem utilizadas, enquanto agentes de extinção, como marcadores quando ligadas a biomoléculas tais como polinucleótidos, oligonucleótidos, nucleósidos, nucleótidos, hidratos de carbono e péptidos naturais ou modificados. Por exemplo, os polinucleótidos podem ser marcados na extremidade 3' com composições de agentes de extinção de fluorescência em suporte sólido e os polinucleótidos podem ser marcados internamente ou na extremidade 5'. As sondas detectáveis podem ter um formato como o dos faróis moleculares, sondas “scorpion”, sondas “sunrise”, sondas conformacionalmente assistidas (CAP) e sondas “TaqMan”.

## Descrição

### **"Composições de agentes de extinção com porções de antraquinona"**

#### CAMPO DE APLICAÇÃO

A presente invenção proporciona novas composições de agentes de extinção ("quenchers") com porções de antraquinona que são úteis, enquanto agentes de extinção, como marcadores quando ligadas a biomoléculas tais como polinucleótidos, nucleósidos, nucleótidos, hidratos de carbono e péptidos naturais ou modificados.

Também são fornecidos os métodos para a utilização de composições de agentes de extinção como sondas e métodos para a utilização de sondas.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A intensidade da fluorescência pode ser reduzida por uma ampla variedade de processos que são designados no seu conjunto como extinção ("quenching"). No caso de sondas com uma estrutura "stem", p. ex. faróis moleculares e sondas "scorpion" ou outros pares de sondas, p. ex. sondas "kissing" e sondas por hibridação competitiva, em que o corante repórter e o agente de extinção se encontram numa posição de proximidade entre si, o mecanismo principal de extinção é a extinção estática ou por contacto, em que a energia do corante repórter do fluoróforo é transferida para o agente de extinção que então dissipa a energia sob a forma de calor sem emissão de fluorescência (J.R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 1999, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nova Iorque). A extinção estática ocorre por meio da formação de um complexo no

estado fundamental em que o corante repórter e os grupos extintores se ligam para formar um complexo no estado fundamental - um dímero intramolecular. A transferência de energia por ressonância de Förster (FRET ou RET) é geralmente referida como o mecanismo que controla a extinção da fluorescência em sondas sem uma estrutura "stem", p. ex. sondas "TaqMan" (Marras et. al., *Nucleic Acid Res.*, 2002, 30, e122). FRET é um processo que ocorre sempre que o espectro de emissão de um fluoróforo apresenta sobreposição com o espectro de absorção da molécula aceitadora, p. ex., o agente de extinção (J.R. Lakowicz, *ibid.*). Para se obter uma extinção por FRET otimizada o componente repórter e o agente de extinção deverão ser escolhidos de modo a que exista uma sobreposição óptima entre o espectro de emissão de fluorescência e o espectro de absorção do agente de extinção. A eficiência do processo depende de  $1/r^6$  (distância de Förster) em que  $r$  é a distância entre o fluoróforo e o agente de extinção (T. Förster, *Ann. Phys.*, 1948, 2, 55). Num outro mecanismo colisional de extinção (extinção de Dexter) o estado excitado do fluoróforo é desactivado durante a troca de electrões com o agente de extinção. Tradicionalmente, as sondas com marcação dupla foram concebidas centrando-se na escolha de um par fluoróforo e agente de extinção correspondente com o objectivo de se obter uma extinção por FRET otimizada. Foi recentemente proposto que os pares fluoróforo - agente de extinção em sondas com marcação dupla sem estrutura "stem" também deveriam ser escolhidos em função de uma maior capacidade de extinção estática por meio da formação do complexo no estado fundamental - o dímero intramolecular - uma vez que se descobriu que este era um método de extinção extremamente eficaz (Johansson et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 6950-6956; Johansson e Cook, *Chem. Eur. J.*, 2003, 9, 3466-3471). Assim, pares

fluoróforo - agente de extinção com uma afinidade inerente entre si são adequados para formar um complexo no estado fundamental que resulta potencialmente num aumento da extinção. Os agentes de extinção podem ser fluorescentes, p. ex. TAMRA (tetrametilrodamina), ou não fluorescentes, p. ex. derivados de 4-(dimetilamino)azobenzeno (Dabcyl). Os agentes de extinção não fluorescentes também são designados em inglês como "dark quenchers". Os agentes de extinção fluorescentes apresentam duas limitações significativas: a presença de ruído de fundo associado à fluorescência e a impossibilidade de detecção de fluorescência do repórter na gama de emissão de fluorescência do aceitador. Assim, preferem-se os agentes de extinção não fluorescentes.

Em estudos anteriores, as 1,4-diaminoantraquinonas foram incorporadas em oligodeoxinucleótidos usando-se o método de fosforamidito. O agente de extinção não fluorescente 1,4-diaminoantraquinona LQ1 ("LQ1") foi incorporado na extremidade 5' de faróis moleculares de ADN (May et. al., Chem. Commun., 2003, 970-971) com FAM ou Cy5 como fluoróforo. O agente de extinção LQ1 tem uma gama de absorção entre os 500 e 700 nm e é por isso mais adequado para ser utilizado como um agente de extinção para corantes com comprimentos de onda longos como Cy5, em comparação com outros agentes de extinção que não são à base de antraquinona, como p. ex. dabcyl, que, pelo contrário, é mais adequado para corantes com comprimentos de onda mais curtos, como p. ex. FAM. Um agente de extinção não fluorescente de 1,4-diaminoantraquinona estruturalmente relacionado com LQ1 e denominado IOWA Black-3.1™ ("IOWA Black") encontra-se disponível na DNA Technologies ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)). IOWA Black contém um grupo  $\alpha$ -aminoarilo em comparação com o grupo  $\alpha$ -aminoalquilo presente em LQ1, possuindo por isso um coeficiente de extinção superior em comprimentos de onda mais elevados em comparação com LQ1.

Os agentes de extinção não fluorescentes com fosforamidito LQ1 e IOWA Black podem apenas ser incorporados na extremidade 5' de oligonucleótidos usando-se o método corrente de fosforamidito em sintetizadores de ADN e, portanto, não podem ser incorporados nem internamente nem na extremidade preferencial 3' de moléculas de oligonucleótidos. May et al. (Chem. Commun., 2003, 970-971) preparou a molécula LQ2, o agente de extinção não fluorescente de 1,4-diaminoantraquinona, que foi ligada a vidro com porosidade regulada (CPG) por meio de um "linker" contendo amida e um açúcar, a deoxiribose. Com esta abordagem, a molécula LQ2, o agente de extinção não fluorescente de 1,4-diaminoantraquinona, pode ser incorporada na extremidade 3', mas não pode ser incorporada internamente ou na extremidade 5' da molécula oligonucleotídica. Quando os oligonucleótidos modificados com LQ2 são desprotegidos após a síntese de oligonucleótidos usando-se condições normais de desprotecção (solução aquosa de amónia concentrada), a molécula LQ2 é clivada do oligonucleótido devido às ligações amidas lábeis no "linker". Alternativamente, os oligonucleótidos modificados com LQ2 podem ser desprotegidos usando-se misturas de água:metanol:terc-butilamina (2:1:1) ou hidróxido de amónio:solução aquosa de metilamina concentrada (1:1) em que a utilização desta última mistura resulta no produto com menos impurezas. Porém, estes procedimentos obrigam à utilização de G fosforamiditos protegidos com N-DMF ou C fosforamiditos protegidos com N-acetilo, respectivamente, p. ex. nucleósidos fosforamiditos contendo grupos protectores não padrão.

Em resumo, existe uma necessidade de agentes de extinção não fluorescentes de antraquinona substituída com  $\alpha$ -amino que possam ser facilmente sintetizados, que sejam de baixo

custo e que seja possível incorporá-los internamente assim como na extremidade 3' e 5' de moléculas oligonucleotídicas.

Além disso, seria particularmente vantajosa a existência de uma série de agentes de extinção com propriedades físicas semelhantes para, p. ex, um aumento na extinção estática por meio da formação do complexo no estado fundamental, mas que possuíssem propriedades espectrais distintas.

WO 2004/026804 A1 foi submetida antes, mas foi publicada depois, da data de prioridade do presente pedido de patente. WO 2004/026804 A1 revela vários corantes com agentes de extinção de antraquinona, a sua preparação e utilização.

#### DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona ainda composições de agentes de extinção de fórmula estrutural (III), cf. reivindicação 1.

A presente invenção também proporciona novos compostos de antraquinona substituída com  $\alpha$ -amino, em particular, compostos de antraquinona substituída com di-, tri- e tetra- $\alpha$ -amino.

Os compostos de antraquinona são úteis, enquanto agentes de extinção, como marcadores quando ligados a biomoléculas tais como polinucleótidos, nucleósidos, nucleótidos, hidratos de carbono e péptidos naturais ou modificados. Os compostos de antraquinona são úteis para marcação quando ligados a biomoléculas, em particular para serem utilizados, enquanto agentes de extinção, como marcadores.

A presente invenção proporciona ainda "microarrays", métodos para sondar um "microarray", nucleósidos e nucleótidos marcados, métodos para marcar polinucleótidos,

métodos para a extensão de primers, métodos para ligação de oligonucleótidos, métodos para a detecção de hibridação, um kit para a extensão de primers.

As biomoléculas marcadas com o agente de extinção podem ainda conter grupos repórter fluorescentes, que formam pares de transferência de energia.

Outros aspectos da invenção incluem métodos para marcar polinucleótidos e polipéptidos com as porções di, tri ou tetra- $\alpha$ -amino antraquinona do agente de extinção da invenção. Os polinucleótidos podem ser marcados internamente com um fosforamídito de agente de extinção de di, tri ou tetra- $\alpha$ -amino antraquinona.

#### DESCRIÇÃO ABREVIADA DOS DESENHOS

As Figuras 1 a 8 representam as vias sintéticas de vários agentes de extinção conforme descrito em mais pormenor na secção de Exemplos.

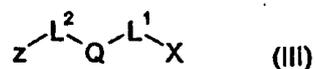
A Figura 9 representa os resultados obtidos por realização de PCR em tempo real com sondas que continham o agente de extinção **Q1 (3)** ou **Q2 (6)** juntamente com a fluoresceína como corante.

A Figura 10 representa os resultados obtidos por realização de PCR em tempo real com sondas contendo o **Q1 (3)** como um agente de extinção incorporado internamente num oligonucleótido de LNA/ADN.

As Figuras 11 a 18 representam o espectro no UV para os agentes de extinção **(1)**, **(4)**, **(7)**, **(11)**, **(15)**, **(20)**, **(23)** e **(26)**.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção refere-se também a uma composição de um agente de extinção de fórmula estrutural (III):



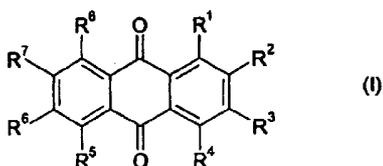
em que  $L^1$  e  $L^2$  são cada um, independentemente, uma ligação ou um "linker";

X é um polinucleótido que contém um corante fluorescente;

Z é um nucleótido ou um polinucleótido,

sendo ambos opcionalmente substituídos por um marcador ou um suporte sólido;

Q é um composto de fórmula estrutural (I)



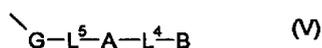
em que pelo menos um, dois, três ou quatro dos  $R^1$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  ou  $R^8$  são cada um, independentemente seleccionados a partir de amino-alquilo, amino-arilo e amino-alquilarilo substituídos ou não substituídos, e os restantes grupos  $R^1$  a  $R^8$  são cada um, independentemente, hidrogénio ou hidroxilo, amino, alquilo, arilo, arilalquilo ou alcoxi substituídos ou não substituídos; e em que Q se encontra ligado aos "linkers"  $L^1$  e  $L^2$  em duas posições diferentes, quer seja por meio de um dos grupos  $\alpha$ -amino ou por meio dos carbonos do arilo do agente de extinção.

Considerando as publicações de WO 2004/026804 A1, as composições de agentes de extinção representadas pelo conteúdo total do pedido de patente europeia N.º 20030759288 são preferencialmente sujeitas a uma exclusão

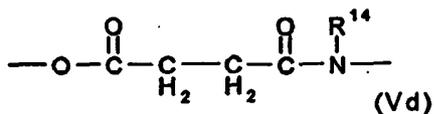
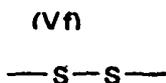
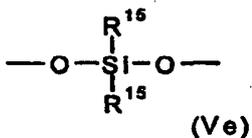
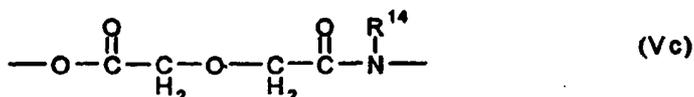
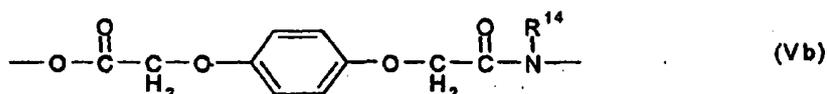
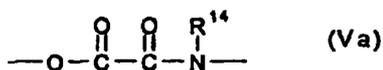
de direitos de forma explícita em relação às composições de agentes de extinção de fórmula (III).

Na composição do agente de extinção de fórmula (III),  $L^1$  e  $L^2$  são preferencialmente cada um, independentemente uma ligação ou um "linker", em que o referido "linker" é seleccionado entre alquilarilo, alquildiilo  $C_1-C_{12}$ , alcoxidiilo  $C_1-C_{12}$ , alquilaminodiilo  $C_1-C_{12}$ , alquilamidadiilo  $C_1-C_{12}$ , arildiilo e 1 a 20 unidades de etilenoxi.

Em formas de realização adicionais, a composição do agente de extinção é imobilizada num suporte sólido para que a composição do agente de composição possa ser clivada do referido suporte sólido. Nessas formas de realização, Z pode apresentar uma estrutura de fórmula (V):



onde A é um "linker" clivável seleccionado entre as estruturas (Va a Vf):



onde  $R^{14}$  é alquilo  $C_1-12$  ou alcoxi  $C_1-12$ ;  $R^{15}$  é alquilo, arilo, arilalquilo ou alcoxi;  $L^4$  e  $L^5$  são independentemente

seleccionados entre uma ligação e um "linker", sendo o referido "linker" seleccionado entre alquildiilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alcoxidiilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alquilaminodiilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alquilamidadiilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, arildiilo e 1 a 20 unidades de etilenoxi; G é um nucleótido, um nucleótido substituído, um polinucleótido, ou um polinucleótido substituído; e B é um suporte sólido.

Na forma de realização anteriormente referida, o suporte sólido é tipicamente seleccionado entre poliestireno, vidro com porosidade regulada (CPG), gel de sílica, sílica, poliacrilamida, um material magnético, poliacrilato, hidroxietilmetacrilato, poliamida, polietileno, e polietilenoxi, e seus copolímeros e enxertos.

A forma do suporte sólido é tipicamente seleccionada entre uma partícula, uma pérola (p. ex. uma pérola magnética), uma membrana, uma frita, uma fibra, um tubo, um capilar, uma lâmina, uma placa, um chip micromaquinado, uma camada de alcanotiol-ouro, uma superfície não porosa, um "array" acessível, um meio imobilizador de polinucleótidos.

Nalgumas variantes da presente invenção, o polinucleótido contém uma ou mais unidades de N-[2-(aminoetil)]-glicina possuindo uma base nucleica ligada a azoto por meio de uma ligação metileno carbonilo. Essas unidades são normalmente designadas unidades de uma molécula de PNA.

Noutras variantes da presente invenção, que são particularmente preferidas, o polinucleótido contém uma ou mais modificações no açúcar bicíclico nos carbonos 2'-4' ou 3'-4'. Essas moléculas com o açúcar modificado são normalmente designadas LNA.

Numa forma de realização preferida da invenção, os compostos de antraquinona substituída com  $\alpha$ -amino da fórmula (I) são substituídos com di- $\alpha$ -amino.

Em relação ao composto do agente de extinção, em particular, ao composto Q, pensa-se que os seleccionados entre 1,4-bis-(3-hidroxipropilamino)-antraquinona (**1**), 1,5-

bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona **(4)**, 1,4-bis-(4-(2-hidroxi-etil)fenilamino)-antraquinona **(7)**, e 1,8-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona são particularmente úteis para as composições de agentes de extinção de fórmula (II), e que os seleccionados entre 1,5-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona **(4)** e 1,8-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona, são particularmente úteis para as composições de agentes de extinção de fórmula (III).

Como alternativas, pensa-se que os compostos de agente de extinção, Q, seleccionados entre 1,4-bis(3-hidroxi-propilamino)-6-metil-antraquinona **(11)**, 1,4-bis(4-(2-hidroxi-etil)fenilamino)-6-metil-antraquinona **(15)**, 1,4-bis(4-metil-fenilamino)-6-(N-(6,7-dihidroxi-4-oxo-heptano-1-il))-carboxamido-antraquinona, 1,4-bis(4-metil-fenilamino)-6-(N-(7-dimetoxi-tritiloxi-6-hidroxi-4-oxo-heptano-1-il))-carboxamido-antraquinona **(18)**, 1,4-bis(propilamino)-6-(N-(6,7-dihidroxi-4-oxo-heptano-1-il))carboxamido-antraquinona, 1,5-bis(4-(2-hidroxi-etil)fenilamino)-antraquinona **(20)**, 1,8-bis(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona **(23)**, e 1,8-bis(4-(2-hidroxi-etil)fenilamino)-antraquinona **(26)** são úteis para as composições de agentes de extinção de fórmula (III).

Deverá ficar claro que embora os compostos de agentes de extinção, Q, sejam mencionados como moléculas discretas, Q encontra-se ligado ao(s) "linker"(s) L<sup>1</sup> (e L<sup>2</sup>) em uma ou duas posições diferentes, quer por meio dos grupos  $\alpha$ -amino ou por meio dos carbonos do anelo da porção do agente de extinção. Preferencialmente, porém, Q encontra-se ligado a(os) "linker"(s) L<sup>1</sup> (e L<sup>2</sup>) por meio do átomo de O dos grupos hidroxi.

Pensa-se que alguns dos compostos de agentes de extinção são novos e, por isso, deverá ficar claro que a presente invenção também se refere a compostos de agentes de extinção seleccionados entre 1-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-4-(3-hidroxi-propilamino)-

antraquinona **(2)**, 1-(3-(2-cianoetoxi (diisopropilamino)-fosfinoxi)propilamino)-4-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)-propilamino)-antraquinona **(3)**, 1,5-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona **(4)**, 1-(3-hidroxi-propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona **(5)**, 1-(3-(cianoetoxi (diisopropilamino) fosfinoxi)propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona **(6)**, e 1,8-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona; ou em alternativa seleccionados entre 6-metil-quinizarina **(10)**, 1,4-bis(3-hidroxi-propilamino)-6-metil-antraquinona **(11)**, 1-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-4-(3-hidroxi-propilamino)-6(7)-metil-antraquinona **(12)**, 1-(3-(2-cianoetoxi (diisopropilamino)-fosfinoxi)propilamino)-4-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-6(7)-metilantraquinona **(13)**, 1,4-bis(4-(2-hidroetil) fenilamino)-6-metil-antraquinona **(15)**, 1,4-bis (propilamino)-6-carboxi-antraquinona, 1,4-bis (propilamino)-6-(N-(6,7-dihidroxi-4-oxo-heptano-1-il)) carboxamidoantraquinona, 1,4-bis (propilamino)-6-(N-(7-dimetoxi-tritiloxi-6-hidroxi-4-oxo-heptano-1-il)) carboxamido-antraquinona, 1,5-bis(4-(2-hidroetil)-fenilamino)-antraquinona **(20)**, 1-(4-(2-hidroetil) fenilamino)-5-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)-etil) fenilamino)-antraquinona **(21)**, 1-(4-(2-(cianoetoxi (diisopropilamino) fosfinoxi)etil) fenilamino)-5-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil) fenilamino)-antraquinona **(22)**, 1,8-bis(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona **(23)**, 1-(3-hidroxi-propilamino)-8-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)-propilamino)-antraquinona **(24)**, 1-(3-(cianoetoxi (diisopropilamino) fosfinoxi)propilamino)-8-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona **(25)**, 1,8-bis(4-(2-hidroetil) fenilamino)-antraquinona **(26)**, e 1-(4-(2-hidroetil) fenilamino)-8-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)-etil) fenilamino)-antraquinona **(27)**.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a uma sonda polinucleotídica que contém pelo menos uma composição de agente de extinção conforme acima descrito. Para além da porção do agente de extinção, a sonda contém ainda preferencialmente pelo menos um marcador passível de extinção. Tipicamente, o marcador passível de extinção encontra-se separado do agente de extinção por meio de um local susceptível à acção da nuclease. Nesse caso, a sonda polinucleotídica é tipicamente bloqueada para a extensão por polimerase na extremidade 3'.

A sonda anteriormente descrita pode tipicamente adoptar pelo menos 1 conformação quando não está ligada ao alvo e nessa conformação ocorre a extinção da fluorescência do marcador pelo agente de extinção, e pelo menos uma outra conformação quando a sonda está ligada ao alvo e nessa conformação não ocorre, pelo menos parcialmente, a extinção da fluorescência do marcador pelo agente de extinção. Numa variante, uma parte 3' e uma parte 5' do polinucleótido são perfeitamente complementares o que faz com que formem uma estrutura em gancho ("hairpin") quando não estão ligados aos alvo.

Mais genericamente, prefere-se que a sonda polinucleotídica contenha pelo menos uma região de reconhecimento do alvo complementar a um gene alvo.

A sonda polinucleotídica, incluindo as variantes acima descritas, possui tipicamente um comprimento de 5 a 50 nucleótidos.

Um aspecto adicional da invenção refere-se a um método para a extensão de primers que compreende:

a hibridação ("annealing") de um primer polinucleotídico com um polinucleótido alvo; e extensão do primer por meio da incorporação mediada pela polimerase de um nucleótido 5'-trifosfato; em que o

primer ou o nucleótido 5'-trifosfato é ligado a uma porção do agente de extinção da fórmula (I) (preferencialmente tal como foi definido para a composição de agente de extinção (III)); formando-se assim um polinucleótido marcado. Tipicamente, o método inclui ainda a etapa de amplificação do polinucleótido alvo com nucleótidos 5'-trifosfatos, uma polimerase, e dois ou mais primers (tipicamente por meio da reacção em cadeia da polimerase ou outro método de amplificação de ácidos nucleicos);

em que os primers são complementares à sequência do polinucleótido alvo e em que pelo menos um primer é ligado a uma porção do agente de extinção de fórmula (I).

Existe ainda um outro aspecto da invenção que se refere a um método de amplificação de um polinucleótido alvo compreendendo nucleótidos 5'-trifosfatos, uma polimerase, dois ou mais primers; em que os primers são complementares à sequência do polinucleótido alvo, e uma sonda marcada de forma detectável; em que pelo menos uma parte da sonda marcada detectável é complementar ao polinucleótido alvo e contém pelo menos um corante fluorescente e uma porção do agente de extinção de fórmula (I) (preferencialmente tal como foi definido para a composição do agente de extinção (III)). O método compreende ainda, preferencialmente, a detecção de um sinal emitido pelo corante fluorescente da referida sonda detectável. Tipicamente, o sinal é detectado em cada ciclo de temperatura durante a amplificação.

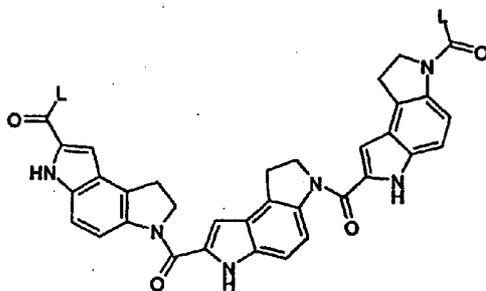
Em mais uma variante do método, a polimerase cliva a sonda detectável durante a amplificação; dessa forma o corante fluorescente e a porção do agente de extinção são separados. Tal como anteriormente referido, o método compreende ainda, preferencialmente, a detecção de um sinal emitido pelo corante fluorescente da referida sonda

detectável clivada. Tipicamente, o sinal é detectado em cada ciclo de temperatura durante a amplificação.

A hibridação com o polinucleótido alvo pode ser monitorizada por FRET e utilizada para detectar a sequência alvo. A sonda pode ser clivada por meio da actividade de nuclease de uma enzima durante a amplificação dos ácidos nucleicos. A clivagem pode produzir um sinal detectável e que é utilizado para monitorizar e detectar a hibridação e amplificação de ácidos nucleicos. Os primers e as sondas podem ser ainda marcados com porções estabilizadoras da hibridação, tal como ligantes do sulco menor.

Ainda numa outra variante do método, o corante fluorescente é ligado ao terminal 5' ou ao terminal 3' da sonda detectável. Adicionalmente, a porção do agente de ligação é ligada internamente na sonda detectável.

Numa variante particular do método, a sonda detectável é ainda marcada com uma porção estabilizadora da hibridação, p. ex., uma porção estabilizadora da hibridação contendo a estrutura:



em que L é um local de ligação à sonda detectável.

Noutras variantes do método, a sonda detectável tem um formato seleccionado entre faróis moleculares, sondas "scorpion", sondas "sunrise", sondas CAP (do inglês "conformationally assisted probes", ou seja, sondas com conformação assistida) e sondas "TaqMan".

Ainda noutras variantes do método, a sonda detectável contém uma ou mais unidades de N-[2-(aminoetil)]glicina que possuem uma base nucleica ligada ao azoto por meio de uma ligação metileno carbonilo, ou a sonda detectável contém um ou mais modificações no carbono 2'-4' ou 3'-4' dos açúcares bicíclicos.

Ainda um outro aspecto da invenção refere-se a um método de detecção de hibridação que consiste na hibridação de uma sonda com uma sequência polinucleotídica alvo, em que a sonda se encontra ligada covalentemente a um corante fluorescente e a uma porção de agente de extinção de fórmula (I) (preferencialmente conforme definido para a composição de agente de extinção (III)); e na detecção de um sinal emitido pelo corante fluorescente.

A invenção inclui ainda kits ou reagentes para a realização dos métodos e utilizações aqui descritas pormenorizadamente. Os kits poderão conter as composições do agente de extinção de fluorescência, biomoléculas marcadas com as porções de agentes de extinção e/ou outros reagentes.

Ainda um outro aspecto da invenção refere-se a um kit para a amplificação de ácidos nucleicos contendo dois ou mais primers, e uma sonda com um marcador detectável e uma porção de agente de ligação de fórmula (I) (preferencialmente tal como definido para a composição de agente de extinção (III)).

Outro aspecto da invenção refere-se a um kit para a extensão de primers compreendendo um ou mais nucleótidos 5'-trifosfatos e um ou mais primers em que pelo menos um primer é ligado covalentemente por uma ligação a um carbono num anelo de uma porção de agente de extinção de fórmula (I) (preferencialmente tal como definido para a composição de agente de extinção (III)).

Ainda mais um aspecto da invenção refere-se a um "microarray" que contém uma porção de agente de extinção de fórmula (I) (preferencialmente tal como definido para a composição de agente de extinção (III)), sendo o referido agente de extinção conjugado directamente a um suporte sólido ou a uma molécula de um veículo ligada ao referido suporte sólido.

Ainda um outro aspecto da invenção refere-se a um método para sondar um "microarray" para a presença de um composto, sendo que o referido método compreende: (a) colocar em contacto o referido "microarray" com uma sonda que interage com o referido composto, sendo que a referida sonda contém uma porção do agente de extinção de fórmula (I) (preferencialmente tal como definido para a composição de agente de extinção (III)); (b) detectar uma diferença na propriedade de fluorescência de um membro seleccionado entre a referida sonda, o referido composto e suas combinações, determinando dessa forma a presença do referido composto.

Ainda um outro aspecto adicional da invenção refere-se a sistemas de detecção, por exemplo

(A) um sistema de detecção que compreende: (a) uma entidade que se liga ao alvo, (b) um marcador detectável passível de extinção e (c) uma composição de agente de extinção de fórmula (III), em que o marcador passível de extinção e o agente de extinção se encontram posicionados na entidade que se liga ao alvo e /ou no alvo de modo a que ocorra a extinção da fluorescência do marcador pelo agente de extinção quando a entidade que se liga ao alvo não está ligada ao alvo, e de modo que a ligação da entidade que se liga ao alvo com o seu alvo provoque a remoção do agente de extinção do marcador para que a

fluorescência do marcador não seja sujeita, pelo menos parcialmente, a extinção; e

(B) um sistema de detecção que compreende: (a) uma entidade que se liga ao alvo, (b) um marcador detectável passível de extinção e (c) uma composição de agente de extinção de fórmula (III), em que o marcador passível de extinção e o agente de extinção se encontram posicionados na entidade que se liga ao alvo e /ou no alvo de modo a que quando a entidade que se liga ao alvo não está ligada ao seu alvo a fluorescência do marcador não seja sujeita, pelo menos parcialmente, a extinção pelo agente de extinção, e de modo a que a ligação da entidade que se liga ao alvo com o seu alvo colocará o agente de extinção na proximidade do marcador de modo a que a fluorescência do marcador seja sujeita, pelo menos parcialmente, a extinção.

Nesses sistemas de detecção, a entidade que se liga ao alvo compreende preferencialmente um polinucleótido, um anticorpo, um aptâmero, ou um ligando.

### *Definições*

Excepto quando definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem genericamente o mesmo significado com o qual são normalmente utilizados pelo especialistas da área a que pertence esta invenção. De um modo geral, a nomenclatura aqui utilizada e os procedimentos laboratoriais de cultura de células, genética molecular, química orgânica e química e hibridação de ácidos nucleicos abaixo descritos são bem conhecidos e normalmente utilizados na área. Para a síntese de péptidos e ácidos nucleicos utilizam-se as técnicas padrão. De um modo geral, as reacções enzimáticas e as

etapas de purificação são realizadas de acordo com as instruções do fabricante. As técnicas e os procedimentos são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais na área e descritos em várias referências de carácter geral (veja-se para uma referência geral, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, que é aqui incorporado por referência), que são fornecidas ao longo deste documento. A nomenclatura aqui utilizada e os procedimentos laboratoriais de química analítica e síntese orgânica abaixo descritos são bem conhecidos e utilizados normalmente na área. Para a síntese química e análise química utilizam-se técnicas padrão ou suas modificações.

Nas fórmulas estruturais referidas anteriormente e ao longo do presente fascículo da patente, os seguintes termos têm o significado indicado:

O termo "alquilo" aqui utilizado refere-se a um radical hidrocarboneto monovalente ramificado ou não ramificado, saturado ou insaturado, que possui geralmente entre cerca de 1 a 30 carbonos e preferencialmente entre 1 a 6 carbonos. Radicais alquilo adequados incluem, por exemplo, estruturas contendo um ou mais grupos metileno, metino e/ou metino. As estruturas ramificadas possuem um motivo de ramificação semelhante ao iso-propilo, t-butilo, i-butilo, 2-etilpropilo, etc. Conforme é aqui utilizado, o termo abrange "alquilos substituídos" e "alquilos cíclicos". A expressão "alquilos substituídos" refere-se a alquilo de acordo com o que foi descrito neste parágrafo incluindo um ou mais substituintes tal como, por exemplo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, acilo, átomos de halogéneo (i.e. alquilos halogenados, p. ex., CF<sub>3</sub>), hidroxil, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, tioamido, aciloxi, ariloxi, ariloxialquilo, mercapto, tia, aza, oxo, hidrocarbonetos

cíclicos saturados e insaturados, heterociclos e afins. Estes grupos podem estar ligados a qualquer carbono ou substituinte da porção alquilo. Adicionalmente, estes grupos podem ocupar uma posição pendente em relação à cadeia de alquilo ou integrada nesta.

O termo "alquilarilo" significa um radical obtido por combinação de um grupo alquilo com um grupo arilo. Tipicamente os grupos alquilarilos incluem fenetilo, etil fenilo e afins.

O termo "amino-alquilo" significa amino substituído com alquilo. Noutra forma de realização preferida, o grupo amino encontra-se ligado à estrutura de antraquinona.

O termo "amino-alquilarilo" significa amino substituído com alquilarilo. Noutra forma de realização preferida, o grupo amino encontra-se ligado à estrutura de antraquinona.

O termo "amino-arilo" significa amino substituído com arilo. Noutra forma de realização preferida, o grupo amino encontra-se ligado à estrutura de antraquinona.

Os termos "annealing" e "hibridação" são utilizados como sinónimos e significam a interacção de emparelhamento entre um ácido nucleico e outro ácido nucleico que resulta numa estrutura em cadeia dupla ou uma outra estrutura de nível superior. A interacção principal é específica da base, i.e. A/T e G/C, e envolve ligações de hidrogénio do tipo Watson/Crick e Hoogsteen.

O termo "arilo" significa um radical hidrocarboneto monovalente aromático com 5 a 14 átomos de carbono, derivado por meio da remoção de um átomo de hidrogénio de um único átomo de carbono de um sistema de anéis aromáticos parental. Tipicamente, os grupos arilo incluem, mas sem que isso constitua uma limitação, radicais derivados do benzeno, benzeno substituído, naftaleno, antraceno, bifenilo, e afins, incluindo grupos arilo substituídos. "Arilo substituído" refere-se a arilo conforme

anteriormente descrito neste parágrafo incluindo um ou mais substituintes tal como, por exemplo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, acilo, átomos de halogéneo (i.e. alquilos halogenados, p ex., CF<sub>3</sub>), hidroxí, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, tioamido, aciloxi, ariloxi, ariloxialquilo, mercapto, tia, aza, oxo, hidrocarbonetos cíclicos saturados e insaturados, heterociclos e afins. Estes grupos podem estar ligados a qualquer carbono ou substituinte da porção arilo.

O termo "arildiilo" significa um radical hidrocarboneto insaturado cíclico ou policíclico com 5 a 14 átomos de carbono que possui um sistema conjugado de ressonância de electrões e pelo menos dois centros radicais monovalentes derivados por meio da remoção de dois átomos de hidrogénio de dois átomos diferentes de carbono de um composto de arilo parental, incluindo grupos arildiilo substituídos.

O termo "biomolécula" abrange um aminoácido, um polipéptido, um nucleósido, um nucleótido, um polinucleótido, um hidrato de carbono, uma vitamina, uma hormona, e qualquer outro composto produzido por um organismo.

O termo "alcoxidiilo" como em "alcoxidiilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>" significa um grupo alcoxi com dois centros radicais monovalentes derivados por meio da remoção de um átomo de hidrogénio do oxigénio e um segundo radical derivado por meio da remoção de um átomo de hidrogénio de um átomo de carbono. Os radicais alcoxidiilo típicos incluem, mas sem que isso constitua uma limitação, metoxidiilo (-OCH<sub>2</sub>-) e 1,2-etoxidiilo ou etilenoxi (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

O termo "alquilamidadiilo" como em "alquilamidadiilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>" significa um grupo alquilamida com dois centros radicais monovalentes derivados por meio da remoção de um átomo de hidrogénio do azoto e um segundo radical derivado por meio da remoção de um átomo de hidrogénio de um átomo de carbono. Os radicais alquilamidadiilo típicos incluem,

mas sem que isso constitua uma limitação,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , e  $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ .

O termo "alquilaminodiilo" como em "alquilaminodiilo  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$ " significa um grupo alquilamino com dois centros radicais monovalentes derivados por meio da remoção de um átomo de hidrogénio do átomo de azoto e um segundo radical derivado por meio da remoção de um átomo de hidrogénio de um átomo de carbono. Os radicais alquilaminodiilo típicos incluem, mas sem que isso constitua uma limitação,  $-\text{NHCH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$  e  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ .

O termo "alquildiilo" como em "alquildiilo  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$ " significa um radical hidrocarboneto saturado ou insaturado, ramificado, de cadeia linear, cíclico ou substituído, de 1 a 12 átomos de carbono que possui dois centros radicais monovalentes derivados por meio da remoção de dois átomos de hidrogénio do mesmo ou de dois átomos diferentes de carbono de um alcano, alceno ou alcino parental. Os radicais alquildiilo típicos incluem, mas sem que isso constitua uma limitação, 1,2-etildiilo ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1,3-propildiilo ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1,4-butildiilo ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) e afins.

O termo "linker clivável" refere-se a um "linker" que possui uma ou mais ligações covalentes que podem ser quebradas em resultado de uma reacção ou condição. Por exemplo, um éster numa molécula é um "linker" que pode ser clivado por um reagente, p. ex. hidróxido de sódio, produzindo-se um fragmento contendo carboxilato e um produto contendo hidroxilo.

O termo "análise do produto final" refere-se a um método em que a recolha dos dados ocorre apenas quando a reacção está substancialmente completa.

O termo "marcador" refere-se a qualquer porção que possa ser ligada a uma molécula e: (i) emita um sinal detectável; (ii) interaja com um segundo marcador para modificar o

sinal detectável emitido pelo segundo marcador, p. ex. FRET; (iii) estabiliza a hibridação, i.e. formação de cadeia dupla; ou (iv) proporciona um componente de captura, i.e. formação de complexos por afinidade, complexos anticorpo/antígeno, complexos iônicos. A marcação pode ser realizada usando-se qualquer uma de um vasto número de técnicas conhecidas que utilizam marcadores, grupos de ligação, ligações, reagentes, condições de reacção e métodos de análise e purificação conhecidos. Os marcadores incluem compostos que emitem ou absorvem luz, que produzem ou provocam a extinção de um sinal detectável de fluorescência, quimioluminescência ou bioluminescência (Kricka, L. in *Nonisotopic DNA Probe Techniques* (1992), Academic Press, São Diego, pp. 3-28). Os corantes fluorescentes repórteres úteis para marcar biomoléculas incluem fluoresceínas (Pat. US 5 188 934; US 6 008 379; US 6 020 481), rodaminas (Pat. US 5 366 860; US 5 847 162; US 5 936 087; US 6 051 719; US 6 191 278), benzofenoxazinas (Pat. US 6 140 500), par de corantes doador-aceitante com transferência de energia (Pat. US 5 863 727; 5 800 996; 5 945 526), e cianinas (Kubista, WO 97/45539), assim como qualquer outro marcador fluorescente capaz de produzir um sinal detectável. Exemplos de corantes de fluoresceína incluem 6-carboxifluoresceína; 2',4',1,4,-tetraclorofluoresceína; e 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína. Veja-se o Exemplo 50 e Menchen, Pat. US 5 118 934. Outra classe de marcadores são as porções estabilizadoras de hibridação que servem para aumentar, estabilizar ou influenciar a hibridação de cadeias duplas, p. ex. intercaladores, ligantes do sulco menor, e grupos funcionais que promovem ligações cruzadas (Blackburn, G. e Gait, M. Eds. "DNA and RNA structure" in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2<sup>a</sup> Ed., (1996) Oxford University Press, pp. 15-81). Ainda uma outra classe de marcadores

("ligandos de afinidade") provoca a separação ou imobilização de uma molécula por captura específica ou não específica, por exemplo biotina, digoxigenina, e outros haptenos (Andrus, A. "Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers" (1995) in PCR 2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp. 39-54). Os métodos, técnicas e reagentes usados na utilização de marcadores não radioactivos são revistos em: Non-Radioactive Labelling, A Practical Introduction, Garman, A. J. (1997) Academic Press, São Diego.

O termo "base nucleica" significa qualquer porção heterocíclica contendo azoto capaz de formar ligações de hidrogénio Watson-Crick ao emparelharem com uma base nucleica complementar ou um análogo de uma base nucleica, p. ex. uma purina, uma 7-deazapurina ou uma pirimidina. As bases nucleicas típicas incluem as bases nucleicas que ocorrem naturalmente, isto é, adenina, guanina, citosina, uracilo, timina, e análogos das bases nucleicas que ocorrem naturalmente, p. ex. 7-deazaadenina, 7-deazaguanina, 7-deaza-8-azaguanina, 7-deaza-8-azaadenina, inosina, nebularina, nitropirrolo, nitroindolo, 2-amino-purina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina, pseudouridina, pseudocitosina, pseudoisocitosina, 5-propinilcitosina, isocitosina, isoguanina, 7-deazaguanina, 2-tiopirimidina, 6-tioguanina, 4-tiotimina, 4-tiouracilo, O-metilguanina, N-metiladenina, O-metiltimina, 5,6-dihidrotimina, 5,6-dihidrouracilo, 4-metilindolo, pirazolo[3,4-D]pirimidinas (Pat. US 6 143 877 e US 6 127 121; WO 01/38584), e etenoadenina (Fasman (1989) in Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla.).

O termo "nucleósido" refere-se a um composto que consiste numa base nucleica ligada ao carbono C-1' de um açúcar tal como ribose, arabinose, xilose, e piranose. O açúcar pode

ser substituído ou não substituído. Os açúcares de ribose substituídos incluem, mas sem que isso constitua uma limitação, as riboses em que um ou mais dos átomos de carbono, por exemplo o átomo de carbono 2, é substituído por um ou por mais iguais ou diferentes de entre Cl, F, -R, -OR, -NR<sub>2</sub> ou grupos de halogéneo, em que cada R é independentemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ou arilo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>. Exemplos de ribose incluem 2'-deoxiribose, 2',3'-dideoxiribose, 2'-haloribose, 2'-fluororibose, 2'-clororibose, e 2'-alquilribose, p. ex., 2'-O-metil, nucleótidos 4'-[alfa]-anoméricos, nucleótidos 1'-[alfa]-anoméricos, modificações de açúcares bicíclicos "bloqueados" ou "LNA" e em que ocorrem ligações 2'-4'- e 3'-4' (WO 98/22489; WO 98/39352; WO 99/14226). As modificações ao nível da posição 2'- ou 3'- da ribose incluem hidrogénio, metoxi, etoxi, aliloxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, metoxietilo, alcoxi, fenoxi, azido, amino, alquilamino, flúor, cloro e bromo. Nucleósidos e nucleótidos incluem as formas naturais do isómero óptico D, assim como do isómero óptico L (Garbesi (1993) Nucl. Acids Res. 21:4159-65; Fujimori (1990) J. Amer. Chem. Soc. 112:7435; Urata, (1993) Nucleic Acids Symposium Ser. U.S. 29:69-70). Quando a base nucleica é a purina, p. ex., A ou G, o açúcar ribose encontra-se ligado na posição N da base nucleica. Quando a base nucleica é a pirimidina, p. ex., C, T ou U, a pentose, ou seja o açúcar, encontra-se ligado na posição N da base nucleica (Komberg e Baker, (1992) DNA Replication, 2Ed., Freeman, São Francisco, Calif.).

O termo "nucleótido" refere-se a um éster de fosfato de um nucleósido, sob a forma de uma unidade monomérica ou integrado num ácido nucleico. "Nucleótido 5'-trifosfato" refere-se a um nucleótido com um grupo éster de trifosfato na posição 5' e são por vezes designados como "NTP" ou "dNTP" e "dNTP" para realçar em particular as

características estruturais do açúcar ribose. O grupo éster de trifosfato pode incluir substituições com enxofre para os vários oxigénios, p. ex. [alfa]-tio-nucleótidos 5'-trifosfatos. Para uma publicação de revisão sobre a química dos ácidos nucleicos, veja-se: Shabarova, Z. e Bogdanov, A. *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, VCH, Nova Iorque, 1994.

Conforme são aqui utilizados, os termos "polinucleótido" e "oligonucleótidos" são usados como sinónimos e significam polímeros de cadeia simples e de cadeia dupla de monómeros nucleotídicos, incluindo 2'-deoxiribonucleótidos (ADN) e ribonucleótidos (ARN) ligados por ligações fosfodiéster entre os nucleótidos, ou entre análogos de nucleótidos, e contra-íões associados, p. ex., H,  $\text{NH}_4^+$ , trietilamónio,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$  e afins. Um polinucleótido pode ser composto inteiramente de deoxiribonucleótidos, inteiramente de ribonucleótidos, ou suas misturas quiméricas. Os polinucleótidos podem conter análogos de bases nucleicas e açúcares. O tamanho dos polinucleótidos está tipicamente compreendido entre um número reduzido de unidades monoméricas, p. ex. 5 a 40, e neste caso costumam ser frequentemente designados, na área, como oligonucleótidos, e vários milhares de unidades monoméricas nucleotídicas. Excepto quando indicado em contrário, sempre que uma sequência polinucleotídica é representada, deverá ter-se em conta que os nucleótidos estão na ordem 5' para 3' da esquerda para a direita e que "A" indica deoxiadenosina, "C" indica deoxicitidina, "G" indica deoxiguanosina, e "T" indica timidina, excepto quando indicado em contrário. Os polinucleótidos ou oligonucleótidos não se limitam aos nucleótidos que ocorrem naturalmente e podem conter na sequência um ou mais análogos de nucleótidos. Os polinucleótidos podem ser substituídos conforme revelado em "Current Protocols In Nucleic Acid Chemistry", editado por

S. L. Beaucage et. al., John Wiley Sons, Inc. 1999, Capítulo 4.

O termo "polipéptido" refere-se a um polímero incluindo proteínas, péptidos sintéticos, anticorpos, análogos de péptidos, e modificações miméticas de péptidos em que os monómeros são aminoácidos e estão ligados por ligações amida. Quando os aminoácidos são [alfa]-aminoácidos, tanto o isómero óptico L como o isómero óptico D podem ser usados. Adicionalmente, os aminoácidos não naturais, por exemplo, valanina, fenilglicina e homoarginina são também incluídos. Aminoácidos de ocorrência comuns que não são codificados por genes também podem ser utilizados na presente invenção. Todos os aminoácidos usados na presente invenção podem ser isómeros ópticos L ou D. Além disso, outras modificações miméticas de péptidos também são úteis na presente invenção. Para uma referência geral de revisão, veja-se Spatola, A. F., in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nova Iorque, p. 267 (1983). O termo "aminoácido" refere-se a aminoácidos que ocorrem naturalmente e a aminoácidos sintéticos, assim como a análogos de aminoácidos e modificações miméticas de aminoácidos que funcionam de um modo escolhas podem ser encontradas em muitas publicações de referência na área.

A expressão "enzimaticamente extensíveis" no contexto da "extensão de primers" refere-se a um nucleótido que: (i) pode ser enzimaticamente incorporado na zona terminal de uma cadeia polinucleotídica por meio da acção de uma enzima polimerase, e que (ii) pode ser submetido posteriormente a extensão de primers. Nucleótidos enzimaticamente extensíveis incluem os nucleótidos 5'-trifosfatos, i.e. dNTP e NTP.

O termo "sonda" significa um polinucleótido que consegue formar uma estrutura de cadeia dupla por emparelhamento

complementar das bases com uma sequência de um ácido nucleico alvo. Por exemplo, as sondas podem ser marcadas, p. ex. com uma porção de um agente de extinção, ou um par de transferência de energia composto por um repórter fluorescente e por um agente de extinção.

Um "grupo protector" é uma funcionalidade que é removida por meio de uma interacção química ou física, formando-se assim um novo grupo funcional. Um "grupo protector lábil a ácidos" é uma funcionalidade que é removida quando submetida a condições ácidas. Grupos protectores lábeis a ácidos adequados incluem tritil(trifenilmetilo), MMT (4-momometoxitritilo), DMT (4,4'-dimetoxitritilo), tritilo substituído e pixil(9-fenil-xanteno-9-ilo). Um "grupo protector lábil a bases" é uma funcionalidade que é removida quando submetida a condições básicas. Grupos protectores lábeis a bases adequados incluem acetilo, benzoílo, 2-cianoetilo, 4-ciano-2-butenilo, 4-oxo-pentilo e 3-(N-terc-butilcarboxamido)-1-propilo. Um "grupo protector fotoclivável" é uma funcionalidade que é removida quando irradiada com luz de um comprimento de onda específico.

O termo "extinção" refere-se a uma diminuição na fluorescência de uma porção ran de um repórter fluorescente causada por uma porção de agente de extinção por meio de transferência de energia, independentemente do mecanismo. Deste modo, a iluminação do repórter fluorescente na presença do agente de extinção resulta num sinal de emissão que é menos intenso do que o esperado, ou mesmo completamente inexistente.

O termo "grupo de ligação reactivo" refere-se a um substituinte ou porção reactiva, p. ex. um nucleófilo ou electrófilo, numa molécula que consegue reagir com outra molécula para formar uma ligação covalente. Os grupos de ligação reactivos incluem ésteres activos, que são geralmente usados no acoplamento de grupos amina. Por

exemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) possuem selectividade para aminas alifáticas, formando-se produtos de amidas alifáticas que são muito estáveis. A sua taxa de reacção com aminas aromáticas, álcoois, fenóis (tirosina), e histidina é relativamente baixa. A reacção dos ésteres de NHS com aminas em condições não aquosas ocorre com facilidade, por isso são úteis na derivatização de péptidos pequenos e outras biomoléculas de baixo peso molecular. Praticamente todas as moléculas que contenham um ácido carboxílico ou que possam ser modificadas quimicamente para conterem um ácido carboxílico podem ser convertidas nos seus ésteres de NHS. Encontram-se disponíveis ésteres de NHS com grupos sulfonato que possuem uma melhor solubilidade em água. Os grupos de ligação reactivos também incluem compostos de fósforo activos normalmente designados fosforamiditos conforme descrito em S.L. Beaucage e M.H. Caruthers, Chapter 3.3 in "Current Protocols In Nucleic Acid Chemistry", editado por S. L. Beaucage et. al., John Wiley Sons, Inc. 1999.

O termo "análise em tempo real" refere-se à monitorização periódica durante o PCR. Certos sistemas tais como Sistemas de Detecção de Sequências ABI 7700 e 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) realizam a monitorização durante cada ciclo de temperatura num momento predeterminado ou definido pelo utilizador. A análise por PCR em tempo real com sondas FRET mede alterações no sinal emitido pelo corante fluorescente de ciclo para ciclo, preferencialmente subtraindo-se os valores de controlos internos do sinal.

O termo "suporte sólido" refere-se a um qualquer material na fase sólida no qual é sintetizado, ligado ou imobilizado um ácido nucleico ou um polipéptido. Suporte sólido abrange termos como "resina", "fase sólida", e "suporte". Um suporte sólido pode ser composto de polímeros orgânicos

tais como poliestireno, polietileno, polipropileno, polifluoroetileno, polietilenoxi e poliacrilamida, assim como copolímeros e seus enxertos. Um suporte sólido pode também ser inorgânico, tal como vidro, sílica, vidro com porosidade controlada (CPG), ou sílica de fase reversa. A configuração de um suporte sólido pode ser sob a forma de pérolas, esferas, partículas, grânulos ou de uma superfície. As superfícies podem ser planares, substancialmente planares, ou não planares. Os suportes sólidos podem ser porosos ou não porosos e podem apresentar características de inchamento ou não inchamento. Um suporte sólido pode ser configurado sob a forma de um poço, depressão ou um outro recipiente. Uma pluralidade de suportes sólidos pode ser configurada num "array", acessível a um sistema robótico de distribuição de reagentes, ou a meios de detecção incluindo varrimento por iluminação laser e recolha de luz confocal ou por deflexão.

#### EXEMPLOS

Os processos para a preparação de compostos que se destinam a ser utilizados nas novas composições de agentes de extinção são ilustrados mais pormenorizadamente nos exemplos seguintes, que porém não devem ser considerados como limitando a presente invenção.

As estruturas dos compostos são confirmadas por análise de elementos (MA), ressonância magnética nuclear (NMR) ou espectrometria de massa (MS). Desvios químicos de NMR ( $\delta$ ) são apresentados em partes por milhão (ppm) e apenas se apresentam picos seleccionados. "mp" é o ponto de fusão e é apresentado em °C. A cromatografia em coluna foi realizada usando-se a técnica descrita por W.C. Still et al, J. Org. Chem. 1978, 43, 2923-2925 em gel de sílica 60 da Merck (Art 9385). Os compostos utilizados como materiais de partida

são compostos conhecidos ou compostos que podem ser facilmente preparados por métodos conhecidos *per se*. Os espectros UV (Figuras 11 a 18) foram obtidos com um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601(PC) numa concentração de  $\sim 10^{-6}$  M de agente de extinção dissolvido em metanol. As vias sintéticas encontram-se representadas nas Figuras 1 a 8.

*Exemplo 1: Preparação de 1-(3-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-propilamino)-4-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (3)*

1,4-Bis(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona (1)

Mistura-se leucoquinizarina (9,9 g; 0,04 mol) com 3-amino-1-propanol (10 mL) e etanol (200 mL) e aquece-se à temperatura de refluxo durante 6 horas. A mistura é arrefecida até à temperatura ambiente e mantida sob agitação durante a noite em condições atmosféricas. Deita-se a mistura em água (500 mL) e o precipitado é obtido por filtração, lavado com água (200 mL) e seco. O sólido é fervido em etilacetato (300 mL), arrefecido até à temperatura ambiente e obtêm-se o sólido por filtração. Rendimento: 8,2 g (56%).

1-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-4-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona (2)

1,4-Bis(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona (7,08 g; 0,02 mol) é dissolvida numa mistura de N,N-dimetilformamida seca (150 mL) e piridina seca (50 mL). Adiciona-se cloreto de dimetoxitritilo (3,4 g; 0,01 mol) e a mistura é agitada durante 2 horas. Adiciona-se mais cloreto de dimetoxitritilo (3,4 g; 0,01 mol) e a mistura é agitada

durante 3 horas. A mistura é concentrada sob vácuo e o resíduo é redissolvido em diclorometano (400 mL), lavado com água (2 x 200 ml) e seco ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). A solução é filtrada através de uma placa de gel de sílica ( $\varnothing 10$  cm; h 10 cm) e eluída com diclorometano até o produto mono-DMT-antraquinona começar a eluir, após o qual o solvente é então mudado para 2% de metanol em diclorometano. As fracções purificadas são combinadas e concentradas, obtendo-se um composto com o aspecto de uma espuma azul. Rendimento: 7,1 g (54%).  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 10,8 (2H, 2xt,  $J = 5,3$  Hz, NH), 8,31 (2H, m, AqH), 7,67 (2H, dt,  $J = 3,8$  e 9,4, AqH), 7,4-7,1 (9H, m, ArH + AqH), 6,76 (4H, m, ArH) 3,86 (2H, q,  $J = 5,5$ Hz,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3,71 (6H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3,54 (4H, m,  $\text{NCH}_2$ ), 3,26 (2H, t,  $J = 5,7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{ODMT}$ ), 2,05 (4H, m,  $\text{CCH}_2\text{C}$ ), 1,74 (1H, t,  $J = 5$  Hz, OH).

1-(3-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-4-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (3)

1-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-4-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona (0,66 g; 1,0 mmol) é dissolvida em diclorometano seco (100 mL) e adicionam-se crivos moleculares de 3Å. A mistura é agitada durante 3 horas e adiciona-se a seguir 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito (335 mg; 1,1 mmol) e 4,5-dicianoimidazol (105 mg; 0,9 mmol). A mistura é agitada durante 5 horas e a seguir adiciona-se uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) e agita-se durante 10 minutos. Separam-se as fases e a fase orgânica é lavada com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL), salmoura (50 mL) e seca ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Após concentração, obtém-se o fosforamidito com o aspecto de uma espuma azul e é utilizado, sem nenhuma purificação adicional, na síntese de oligonucleótidos. Rendimento: 705 mg (82 %).  $^{31}\text{P-NMR}$

(CDCl<sub>3</sub>): 150,0. <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 10,8 (2H, 2xt, J = 5,3 Hz, NH), 8,32 (2H, m, AqH), 7,67 (2H, m, AqH), 7,5-7,1 (9H, m, ArH + AqH), 6,77 (4H, m, ArH) 3,9-3,75 (4H, m), 3,71 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,64-3,52 (3,54 (6H, m), 3,26 (2H, t, J = 5,8 Hz, CH<sub>2</sub>ODMT), 2,63 (2H, t, J = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>CN) 2,05 (4H, m, CCH<sub>2</sub>C), 1,18 (12H, dd, J = 3,1 Hz, CCH<sub>3</sub>).

*Exemplo 2.: Preparação de 1-(3-(cianoetoxi-(diisopropil-amino)fosfinoxi)propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)-propilamino)-antraquinona (6)*

1,5-Bis(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona (4)

1,5-Dicloroantraquinona (2,8 g; 10 mmol) é misturada com 3-amino-1-propanol (10 mL) em DMSO (50 mL) e aquecido a 130°C durante 4 horas. A mistura é arrefecida até ~80 °C e adiciona-se água (150 mL). Quando a mistura atingiu a temperatura ambiente, o precipitado que se formou é isolado por filtração, lavado com água (2 x 50 mL), fervido em tolueno (200 mL) e o produto não dissolvido é isolado por filtração e seco. Rendimento: 3,2 g (90%).

1-(3-hidroxi-propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)-propilamino)-antraquinona (5)

1,5-Bis(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona (1,4 g; 4 mmol) é co-evaporado com piridina (50 mL) e a seguir é ressuspenso em piridina (50 mL), adiciona-se cloreto de dimetoxitritilo (1,4 g; 4,1 mmol) e mantém-se sob agitação durante a noite. A mistura é concentrada e o resíduo é redissolvido em diclorometano (150 mL), lavado com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 mL), salmoura (50 mL), seco (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concentrado. Purifica-se em coluna de gel de sílica (MeOH/diclorometano 2/98). Após concentração das

fracções apropriadas, obtém-se o composto mono-DMT com o aspecto de uma espuma vermelha. Rendimento: 0,9g (34%).  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 9,7 (2H, 2xt, NH), 7,6-6,7 (19H, m, ArH), 3,86 (2H, q,  $J = 5,5\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3,74 (6H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3,48 (4H, m,  $\text{NCH}_2$ ), 3,26 (2H, t,  $J = 5,9\text{ Hz}$ ), 2,05 (4H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1,45 (1H, t,  $J = 5\text{ Hz}$ ).

1-(3-(cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (6)

1-(3-hidroxi-propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)-propilamino)-antraquinona (0,4 g; 0,61 mmol) é dissolvido em diclorometano seco (50 mL) e adiciona-se crivos moleculares de 3Å. A mistura é agitada durante 3 horas e depois adiciona-se 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetra-isopropilfosfordiamidito (200 mg; 0,66 mmol) e 4,5-dicianoimidazol (71 mg; 0,6 mmol). A mistura é agitada durante 2 horas e adiciona-se uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) e agita-se durante 10 minutos. Separam-se as fases e a fase orgânica é lavada com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL), salmoura (50 mL) e seca ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Após concentração, obtém-se fosforamidito com o aspecto de uma espuma vermelha e é utilizado, sem nenhuma purificação adicional, na síntese de oligonucleótidos. Rendimento: 490 mg (93%).  $^{31}\text{P-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 148,3.

*Exemplo 3.: Preparação de 1-(4-(2-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)etil)fenilamino)-4-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona (9)*

1,4-Bis(4-(2-hidroetil)fenilamino)-antraquinona (7)

Mistura-se leucoquinizarina (2,5 g; 0,01 mol) com ácido bórico (1,9 g; 0,03 mol) e etanol (100 mL) e aquece-se à

temperatura de refluxo durante 1 hora. A mistura é arrefecida até à temperatura ambiente e adiciona-se álcool 4-aminofenetílico (4,1 g; 0,03 mol) após o qual a mistura é aquecida à temperatura de refluxo durante 3 dias. A mistura concentrada é redissolvida em diclorometano (300 mL), lavada com água (3 x 100 mL), seca ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e concentrada. O resíduo é purificado numa coluna de gel de sílica com MeOH/diclorometano (1/19). Após concentração das fracções apropriadas obtém-se o composto com o aspecto de um sólido azul. Rendimento: 1,5 g (31%).  $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}d_6)$ : 12,2 (2H, s, NH), 8,31 (2H, dd,  $J = 3,1$  e  $6,0$  Hz, AqH), 7,88 (2H, dd,  $J = 3,1$  e  $6,0$  Hz, AqH), 7,59 (2H, s, AqH), 7,27 (2H, d,  $J = 2,7$  Hz, ArH), 4,67 (2H, t,  $J = 5,2$  Hz, OH), 3,63 (4H, dt,  $J = 5,2$  e  $7,1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2,74 (4H, t,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{ArCH}_2$ ).

1-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-4-(4-hidroetil)fenilamino)-antraquinona (8)

1,4-Bis(4-(2-hidroetil)fenilamino)-antraquinona (0,950 g; 2 mmol) é dissolvida numa mistura de N,N-dimetilformamida seca (25 mL) e piridina seca (5 mL). Adiciona-se cloreto de dimetoxitritilo (0,34g; 1 mmol) e agita-se a mistura durante 2 horas. Adiciona-se mais cloreto de dimetoxitritilo (0,34g; 1 mmol) e agita-se a mistura durante 4 horas. A mistura é concentrada sob vácuo e o resíduo é redissolvido em diclorometano (200 mL), lavado com água (2 x 100 ml) e seco ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). A solução é filtrada através de uma placa de gel de sílica ( $\varnothing 10$  cm; h 10 cm) e eluída com diclorometano até ao produto mono-DMT-antraquinona começar a eluir, após o qual o solvente é então mudado para 1% de metanol em diclorometano. As fracções purificadas são combinadas e concentradas, obtendo-se um composto com o aspecto de um sólido azul. Rendimento: 0,81 g (52%).  $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 12,2 (2H, s, NH),

8,38 (2H, dd,  $J = 3,4$  e  $6,0$  Hz, AqH), 7,75 (2H, dd,  $J = 3,4$  e  $6,0$  Hz, AqH), 7,46 (2H, s, AqH), 7,4-7,1 (17H, m, ArH), 6,8 (4H, m, ArH), 3,63 (2H, dt,  $J = 5,8$  e  $6,6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3,75 (2H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3,33 (2H, t,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{ODMT}$ ), 2,88 (4H, t,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{ArCH}_2$ ), 1,42 (1H, t,  $J = 5,8$  Hz, OH).

1-(4-(2-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)etil)-fenilamino)-4-(4-(2-(4,4'-dimetoxo-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona (9)

1-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-4-(4-(2-hidroetil)fenilamino)-antraquinona (0,50 g; 0,64 mmol) é dissolvida em diclorometano seco (50 mL) e adiciona-se crivos moleculares de 3Å. Agita-se a mistura durante 3 horas e a seguir adiciona-se 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito (215 mg; 0,72 mmol) e 4,5-dicianoimidazol (64 mg; 0,55 mmol). Agita-se a mistura durante 4 horas e a seguir adiciona-se uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (25 mL) e agita-se durante 10 minutos. Separam-se as fases e a fase orgânica é lavada com  $\text{NaHCO}_3$  (25 mL), salmoura (25 mL) e seca ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Após concentração obtém-se o fosforamidito com o aspecto de uma espuma azul e utiliza-se, sem nenhuma purificação adicional, na síntese de oligonucleótidos. Rendimento: 0,59g (94%).

*Exemplo 4: Preparação de 1-(3-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-propilamino)-4-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-6(7)-metil-antraquinona (13)*

6-metil-Quinizarina (10)

Anidrido 4-metil-ftálico (10 g, 62 mmol), *p*-clorofenol (3,6 g, 28 mmol) e ácido bórico (1,6 g) foram dissolvidos

em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (34 ml) e a mistura foi agitada a 200°C durante 6 horas num frasco tapado com uma placa de vidro. Após a reacção concluída, deixou-se a mistura arrefecer e a seguir verteu-se a mistura em água (160 ml) e obteve-se o precipitado por filtração. O sólido foi suspenso em água a ferver (320 ml) e deixou-se ferver durante 5 min, após o qual se obteve o sólido por filtração. Após secagem, obteve-se o produto com o aspecto de um sólido vermelho escuro (5 g, 19,7 mmol). MALDI-MS: m/z 255,7 (M+H).

1,4-Bis(3-hidroxi-propilamino)-6-metilantraquinona (11)

Dissolveu-se 6-metil-quinizarina em etanol (35 ml) e adicionou-se 3-aminopropanol (15 ml) e a mistura foi aquecida à temperatura de refluxo durante 6 horas. Após conclusão dessa etapa, a mistura de reacção foi arrefecida até à temperatura ambiente e verteu-se em água (300 ml) e procedeu-se à extracção com diclorometano. A fase orgânica foi evaporada até à secura e subseqüentemente purifica-se por cromatografia em coluna, obtendo-se diol com o aspecto de um óleo azul (~1 g, ~2,7 mmol) R<sub>f</sub>: 0,12 (5% MeOH/DCM) MALDI-MS: 369,5 (M+H).

1-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-4-(3-hidroxi-propilamino)-6(7)-metilantraquinona (12)

Adicionou-se cloreto de 4,4'-dimetoxitritilo (500 mg, 1,48 mmol) a uma solução de 1,4-Bis(3-hidroxi-propilamino)-6-metilantraquinona (0,5 g, 1,36 mmol) em piridina anidra (30 ml) e agitou-se a mistura de reacção em atmosfera inerte durante 30 min, após o qual a reacção foi interrompida por meio da adição de NaHCO<sub>3</sub> (30 ml) e a mistura diluída com diclorometano (100 ml). As fases foram

separadas e a fase orgânica foi lavada com salmoura (30 ml), seca ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e evaporada até à secura. O resíduo foi co-evaporado com tolueno para remover a piridina. A antraquinona protegida com mono-DMT foi purificada por cromatografia em coluna (0 a 1% MeOH/diclorometano contendo 0,1% de trietilamina), obtendo-se o composto com o aspecto de um sólido azul (100 mg, 0,15 mmol). MALDI-MS: 670 ( $\text{M}^+$ )

1-(3-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propil-amino)-4-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-6(7)-metil)-antraquinona (13)

O composto protegido com mono-DMT (100 mg, 0,15mmol) foi dissolvido em diclorometano anidro (30 ml), adicionou-se crivos moleculares de 3Å e agitou-se a mistura durante a noite em atmosfera inerte. 4,5-Dicianoimidazol (38 mg, 32 mmol) foi suspenso em diclorometano anidro (6 ml) e adicionou-se 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropil-fosforamidito (11 mg, 0,36 mmol) e agitou-se a mistura durante 10 min à temperatura ambiente. A seguir, esta mistura foi transferida para um frasco contendo o derivado de antraquinona e a mistura ficou sob agitação durante 30 min à temperatura ambiente. Após a reacção concluída, adicionou-se  $\text{NaHCO}_3$  (solução saturada, 50 ml) e as fases foram separadas. A fase orgânica foi subsequentemente lavada com  $\text{NaHCO}_3$  (50 ml) e salmoura (50 ml). A fase orgânica foi seca ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), evaporada até à secura e por fim co-evaporada com acetonitrilo anidro, obtendo-se o amidito com o aspecto de um óleo azul (80 mg, 0,09mmol), que foi utilizado, sem nenhuma purificação adicional, para a síntese de oligonucleótidos. MALDI-MS: m/z = 869 ( $\text{M}^+$ ).

*Exemplo 5: Preparação de 1,4-Bis(4-(2-hidroetil)-fenilamino)-6-metil-antraquinona (15)*

6-Metil-quinizarina (1 g, mmol) foi misturada com pó de Zn (2 g) em ácido acético (150 ml) e agitada durante 2½h a 90°C, após o qual a mistura de reacção foi filtrada através de uma camada fina de celite. O produto foi precipitado adicionando-se água, e foi subseqüentemente obtido por filtração e lavado com água (300 ml). O derivado de antraquinona reduzido foi subseqüentemente dissolvido em *n*-pentanol (50 ml). Adicionou-se ácido bórico (2 g), fenetilamina (2 g) e Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (2 g) e a mistura foi agitada a 120°C durante 4 dias, após o qual a mistura foi vertida em água e a mistura foi extraída com diclorometano (100 ml). A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e evaporada até à secura. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (0 a 2% MeOH/diclorometano), obtendo-se o derivado de antraquinona substituída com 1,4-amino com o aspecto de um sólido azul/verde (0,1 g). MALDI-MS: 493,4 (M+H)

*Exemplo 6: Preparação de 1-(4-(2-(cianoetoxi(diisopropil-amino)fosfinoxi)etil)-fenilamino)-5-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona (22)*

1.5-Bis(4-(2-hidroetil)fenilamino)-antraquinona (20)

1,5-Dinitroantraquinona (3,0 g; 10 mmol) é misturada com álcool 4-aminofenetílico (6 g) em DMSO (50 mL) e aquecida a 130°C durante 4 horas. A mistura é arrefecida e adiciona-se água (150 mL). O precipitado é isolado por filtração, lavado com água (2 x 50 mL), seco e purificado numa coluna de gel de sílica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0 a 10% de MeOH). Rendimento: 1,2 g (25 %). MALDI-MS: m/z 479,4 (M+H).

1-(4-(2-hidroetil)fenilamino)-5-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona (21)

1,5-Bis(4-(2-hidroetil)fenilamino)-antraquinona (960 mg; 2 mmol) é co-evaporada com piridina (25 mL) e a seguir é ressuspendida em piridina (25 mL), adiciona-se cloreto de dimetoxitritilo (680 mg; 2 mmol) e mantém-se em agitação durante a noite. A mistura é concentrada e o resíduo é redissolvido em diclorometano (150 mL), lavado com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 mL), salmoura (50 mL), seco (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concentrado. Purifica-se numa coluna de gel de sílica (MeOH/diclorometano 2/98). Rendimento: 395 mg (24%) MALDI-MS: m/z 780,9 (M+H)

1-(4-(2-(cianoetoxi(diisopropilamino)fosinfoxi)etil)-fenilamino)-5-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona (22)

1-(4-(2-hidroetil)fenilamino)-5-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona (0,350 mg; 0,44 mmol) é dissolvida em diclorometano seco (15 mL) e adiciona-se crivos moleculares de 3Å. A mistura é agitada durante 3 horas e a seguir adiciona-se 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito (150 mg; 0,5 mmol) e 4,5-dicianolimidazol (50 mg; 0,4 mmol). A mistura é agitada durante 3 horas e a seguir adiciona-se uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (25 mL) e agita-se durante 10 minutos. Separam-se as fases e a fase orgânica é lavada com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (25 mL), salmoura (25 mL) e seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Após concentração, obtém-se o fosforamidito com o aspecto de uma espuma vermelha escura e utiliza-se, sem nenhuma purificação adicional, na síntese de oligonucleótidos. Rendimento: 410 mg.

*Exemplo 7: Preparação de 1-(3-(cianoetoxi(diisopropil-amino)fosfinoxi)propilamino)-8-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (25)*

1,8-Bis(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona (23)

1,8-Dinitrocloroantraquinona (3 g; 10 mmol) é misturada com 3-amino-1-propanol (10 mL) em DMSO (50 mL) e aquecida a 130°C durante 4 horas. A mistura é arrefecida e adiciona-se água (150 mL), o precipitado formado é isolado por filtração, lavado com água (2 x 50 mL), seco e purificado numa coluna de gel de sílica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0 a 10% MeOH). Rendimento: 2,8 g (78 %) de um sólido roxo. MALDI-MS: m/z 355,4 (M+H).

1-(3-hidroxi-propilamino)-8-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)-propilamino)-antraquinona (24)

1,8-Bis(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona (1,4 g; 4 mmol) é co-evaporada com piridina (50 mL) e a seguir ressuspensa em piridina (50 mL), adiciona-se cloreto de dimetoxitritilo (1,4 g; 4 mmol) e mantém-se sob agitação durante a noite. A mistura é concentrada e o resíduo é redissolvido em diclorometano (100 mL), lavado com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 mL), salmoura (50 mL), seco (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concentrado.

Purifica-se em coluna de gel de sílica (MeOH/diclorometano 2/98). Após a concentração das fracções apropriadas, obtém-se o composto mono-DMT com o aspecto de uma espuma roxa. Rendimento: 1,1 (42%) MALDI-MS: m/z 657 (M+H).

1-(3-(cianoetoxi (diisopropilamino) fosfinoxi)propilamino)-8-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona  
**(25)**

Dissolve-se 1-(3-hidroxi-propilamino)-8-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona (0,4 g; 0,61 mmol) em diclorometano seco (50 mL) e adiciona-se crivos moleculares de 3Å. Agita-se a mistura durante 3 horas e a seguir adiciona-se 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropil-fosfordiamidito (200 mg; 0,66 mmol) e 4,5-dicianoimidazol (70 mg; 0,6 mmol). A mistura é agitada durante 2 horas e adiciona-se uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) e agita-se durante 10 minutos. Separam-se as fases e a fase orgânica é lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL), salmoura (50 mL) e seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Após concentração, obtém-se o fosforamidito com o aspecto de uma espuma azul e utiliza-se, sem nenhuma purificação adicional, na síntese de oligonucleótidos. Rendimento: 440 mg (85%).

*Exemplo 8: Preparação de 1-(4-(2-(cianoetoxi (diisopropilamino) fosfinoxi)etil)-fenilamino)-8-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona*  
**(28)**

1,8-Bis(4-(2-hidroetil)fenilamino)-antraquinona **(26)**

Mistura-se 1,8-dinitroantraquinona (3,0 g; 10 mmol) com álcool 4-aminofenetílico (6 g) em DMSO (50 mL) e aquece-se a 130°C durante 4 horas. A mistura é arrefecida e adiciona-se água (150 mL). O precipitado é isolado por filtração, lavado com água (2 x 50 mL), seco e purificado numa coluna de gel de sílica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0 a 10% de MeOH). Rendimento: 1,2 g (20 %). MALDIMS: m/z 479,2 (M+H).

1-(4-(2-hidroetil)fenilamino)-8-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona (27)

1,8-Bis(4-(2-hidroetil)fenilamino)-antraquinona (480 mg; 1 mmol) é co-evaporada com piridina (25 mL) e a seguir ressuspende-se em piridina (25 mL) e adiciona-se cloreto de dimetoxitritilo (340 mg; 1 mmol) e mantém-se sob agitação durante a noite. A mistura é concentrada e o resíduo é redissolvido em diclorometano (150 mL), lavado com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 mL), salmoura (50 mL), seco (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concentrado. Purifica-se em coluna de gel de sílica (MeOH/diclorometano 2/98). Rendimento: 220 mg (28%) de uma espuma roxa escura. MALDI-MS: m/z 780,7 (M+H).

1-(4-(2-(cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)etil)-fenilamino)-8-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona (28)

1-(4-(2-hidroetil)fenilamino)-8-(4-(2-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)etil)fenilamino)-antraquinona (0,200 mg; 0,25 mmol) é dissolvida em diclorometano seco (10 mL) e adiciona-se crivos moleculares de 3Å. A mistura é agitada durante 3 horas e a seguir adiciona-se 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidito (90 mg; 0,3 mmol) e 4,5-dicianoimidazol (25 mg; 0,2 mmol). A mistura é agitada durante 3 horas e a seguir adiciona-se uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (25 mL) e agita-se durante 10 minutos. Separam-se as fases e a fase orgânica é lavada com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (25 mL), salmoura (25 mL) e seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Após concentração, obtém-se o fosforamidito com o aspecto de uma espuma vermelha escura/roxa e, utiliza-se, sem nenhuma purificação adicional, na síntese de oligonucleótidos. Rendimento: 220 mg.

*Exemplo 9: Síntese, desprotecção e purificação de oligonucleótidos com marcação dupla*

Os oligonucleótidos com marcação dupla foram preparados num sintetizador automático de ADN (Expedite 8909 DNA synthesizer, PerSeptive Biosystems, escala de síntese 0,2  $\mu$ mol) usando-se o método do fosforamidito (Beaucage e Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862, 1981) com LNA e ADN fosforamiditos protegidos com 2-cianoetilo, (Sinha, et al., *Tetrahedron Lett.* 24: 5843-5846, 1983), suportes sólidos de CPG-Fosfato e 5'-fluoresceína fosforamidito (GLEN Research, Sterling, Virgínia, EUA). O ciclo de síntese foi modificado para os LNA fosforamiditos e para os agentes de extinção fosforamiditos (250 s de tempo de acoplamento) em comparação com os ADN fosforamiditos. 1H-tetrazol ou 4,5-dicianoimidazol (Proligo, Hamburgo, Alemanha) foi usado como activador na etapa de acoplamento.

Os oligonucleótidos foram desprotegidos usando-se amónia aquosa a 32% (1 h à temperatura ambiente, e a seguir 2 horas a 60°C) e purificou-se por HPLC (modelo da série Shimadzu-SpectraChrom; coluna Xterra™ RP18, 10  $\mu$ m 7,8 x 150 mm (Waters). Tampões: A: acetado de trietilamónio 0,05 M, pH 7,4. B. 50% de acetonitrilo em água. Eluente: 0 a 25 min: 10 a 80% de B; 25 a 30 min: 80% de B). A composição e pureza dos oligonucleótidos foram verificadas por análise de MALDI-MS (PerSeptive Biosystem, Voyager DE-PRO).

*Exemplo 10: PCR em tempo real com sondas sintetizadas com os agentes de extinção preparados conforme descrito no Exemplo 1 (Composto **(3)**, **Q1**) ou Exemplo 2 (Composto **(6)**, **Q2**)*

Os reagentes utilizados nos PCRs em tempo real de sondas com marcação dupla foram misturados de acordo com o seguinte esquema (Quadro 1):

**Quadro 1** - Configuração da PCR

Reagentes	Concentração Final
H <sub>2</sub> O	
Tampão II de PCR GeneAmp 10x	1x
Mg <sup>2+</sup>	3,5 mM
dNTP	0,2 mM
Sondas com marcação dupla	0,1 µM
Molde	1 µL*
Primer directo ("forward")	0,2 µM
Primer reverso ("reverse")	0,2 µM
AmpliTaQ Gold	2,5 U
Total	50 µL

\* Nestas experiências adicionaram-se 2 x 10<sup>7</sup> cópias do cADN de SSA4 como molde.

Os seguintes primers e sondas foram incluídos na configuração de PCR acima mencionada (Quadro 2).

**Quadro 2** - Sondas e primers

	Nome	Sequência
Primer Directo (SEQ ID N° 1)	14012 SSA4-469-F	Cgcggtttactttgaaaaattctg
Primer Reverso (SEQ ID N° 2)	14013 SSA4-469-R	Gcttccaatttctctggcatc
Sonda com Dupla Marcação Q1 (SEQ ID N° 3)	14570 Q1 quench	Fitc-tcaaggagaaggtgggtgaagagg- <b>Q1</b> -P
Sonda com Dupla Marcação Q2 (SEQ ID N° 3)	14584 Q2 quench	Fitc-tcaaggagaaggtgggtgaagagg- <b>Q2</b> -P

Fitc é fluoresceína (FITC (Glenn Research, N.º de Id. do Prod. 10-1964)). Os caracteres em minúsculas (a, t, c, g) designam nucleósidos naturais. P designa um grupo fosfato. **Q1** designa o agente de extinção (3) preparado conforme descrito no Exemplo 1. **Q2** designa o agente de extinção (6) preparado conforme descrito no Exemplo 2.

Os ensaios foram realizados num DNA Engine Opticon® (MJ Research) usando-se o seguinte protocolo para os ciclos de PCR (veja-se o Quadro 3).

**Quadro 3** - Protocolo de ciclos de temperatura de PCR

	95°C durante 7 minutos
40 ciclos de:	94°C durante 20 segundos
	60°C durante 1 minuto
	Deteccção de fluorescência

Os resultados dos dois PCRs em Tempo Real são apresentados na Figura 9, que mostra que as sondas com marcação dupla com qualquer um dos dois agentes de extinção **Q1 (3)** e **Q2 (6)** são completamente funcionais como sondas para PCR em tempo real.

#### Produção de cADN de SSA4 para deteção com sondas com dupla marcação

A funcionalidade das sondas construídas foi analisada em ensaios de PCR em que se testou a capacidade das sondas para detectarem diferentes amplicons de SSAR produzidos por PCR. O molde utilizado para a reacção de PCR foi cADN obtido pela transcrição reversa de cARN produzido a partir da transcrição *in vitro* no vector de expressão pTRIamp18 (Amblon) de uma região do gene SSA4 localizada a jusante. A região a jusante do gene SSA4 foi clonada da seguinte forma:

#### Amplificação por PCR

A amplificação do gene parcial da levedura foi realizada por PCR normal usando-se ADN genómico de levedura como molde. O ADN genómico foi preparado a partir de uma estirpe laboratorial padrão de *Saccharomyces cerevisiae* do tipo

selvagem usando-se o kit de extracção de ADN Nucleon MiY (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Na primeira etapa da amplificação por PCR, utilizaram-se um primer directo contendo um local de uma enzima de restrição e um primer reverso contendo uma sequência "linker" universal. Nesta etapa, adicionaram-se 20 pb à extremidade 3' do amplicon, junto do codão de terminação. Numa segunda etapa de amplificação, o primer reverso foi trocado por um primer "nested" contendo uma cauda poli-T20 e um local de uma enzima de restrição. O amplicon de SSA4 contém 729 pb da ORF (grelha de leitura aberta, do inglês "open reading frame") de SSA4 e uma sequência "linker" universal de 20 pb e uma cauda poli-A20.

Os primers de PCR utilizados foram:

YER103W-For-SacI:        acgtgagctcattgaaactgcaggtggtattatga  
(SEQ ID N° 4)

YER103W-Rev-Unl:  
gatccccgggaattgccatgctaatacaacctcttcaaccggttg (SEQ ID N° 5)

Uni-polyT-BamHI:  
acgtggatcctttttttttttttttttttttttttttttgatccccgggaattgccatg (SEQ ID N° 6)

Construções de ADN plasmídico

O amplicon obtido por PCR foi cortado com as enzimas de restrição EcoRI + BamHI. O fragmento de ADN foi ligado no vector pTRIamp18 (Ambion) usando-se o kit Quick Ligation (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante e foi transformado em E. coli DH-5 usando-se os métodos normais.

Sequenciação de ADN

Para se verificar a clonagem do amplicon produzido por PCR, o ADN plasmídico foi sequenciado usando-se os primers directo M13 e reverso M13 e analisado num ABI 377.

#### Transcrição *in vitro*

cARN de SSA4 foi obtido realizando-se a transcrição *in vitro* com o kit Megascript T7 (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante.

#### Transcrição reversa

A transcrição reversa foi realizada com 1 µg de cARN e 0,2 U da transcriptase reversa Superscript II RT (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, excepto que se adicionou 20 U de Superase-In (Inibidor da RNase - Ambion). O cADN produzido foi purificado numa coluna de purificação QiaQuick PCR (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante usando-se o tampão EB fornecido para a eluição. A concentração de ADN do cADN eluído foi medida e diluída até se atingir uma concentração de cópias de cADN do SSA4 correspondendo a  $2 \times 10^7$  cópias por µL.

*Exemplo 11: PCR em Tempo Real com sondas contendo o agente de extinção (Composto **(3)**, **Q1**) como um agente de extinção incorporado numa posição interna num oligonucleótido de LNA/ADN.*

As experiências foram realizadas essencialmente como no Exemplo 10.

**Quadro 4** - Sondas e primers

	Nome	Sequência
Primer Directo (SEQ ID N° 7)	EQ15910	gtggtcgaaagcaatggact
Primer Reverso (SEQ ID N° 8)	EQ15911	gggattcgaacccttggtat
Sonda com marcação dupla Q1 (SEQ ID N° 9)	EQ16234	Fitc-cTGCCTCT <b>Q1</b> ttcctctg-P
Alvo (SEQ ID N° 10)	Gtggtcgaaagcaatggacttgaggaggagcagaggaaagaggcagaag gagaagcccataccaagggttcgaatccc	

Fitc é fluoresceína (FITC (Glenn Research, N° de Id. do Prod. 10-1964)). Os caracteres em maiúscula (A, T, G, C) designam oxi-LNA, i.e. nucleótidos com uma ligação entre os carbonos 2' e 4' contendo um "linker" de 2',4'-oximetileno. Os caracteres em minúsculas (a, t, c, g) designam nucleósidos naturais. P designa um grupo fosfato. **Q1** designa o agente de extinção (3) preparado conforme descrito no Exemplo 1.

**Quadro 5** - Configuração do PCR

Reagentes	Concentração Final
Primer Directo EQ-15910	0,9 µM
Primer Reverso EQ-15911	0,9 µM
Sonda (EQ-16234)	0,2 µM
Taq Qiagen	0,05 U/µL
MgCl <sub>2</sub> (adicional)	1,5 mM
dUTP	200 µM
ROX (Invitrogen)	0,1 X
Tampão PCR (Qiagen, incl. 1,5 mM Mg <sup>++</sup> )	1 X
Molde	4 pM
H <sub>2</sub> O	
Volume Final (incl. Molde)	350 µL

**Quadro 6** - Protocolo de ciclos de temperatura de PCR

	95°C durante 10 minutos
40 ciclos de:	94°C durante 20 segundos
	60°C durante 1 minuto
	Detecção de fluorescência

Os resultados são apresentados na Figura 10.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Exiqon A/S

<120> Composições de agentes de extinção com porções de antraquinona

<130> 15997EP00

<160> 10

<170> Patent In versão 3.3

<210> 1

<211> 23

<212>ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> Sonda sintética

<400> 1

cgcgtttact ttgaaaaatt ctg 23

<210> 2

<211> 20

<212>ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> Sonda sintética

<400> 2

gcttccaatt tcctggcatc 20

<210> 3

<211> 24

<212>ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> Sonda sintética

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> Derivatizado com fluoresceína em 5'

<220>

<221> misc\_feature

<222> (24)..(24)

<223> Derivatizado com antraquinona em 3'

<400> 3

tcaaggagaa ggtgggtgaa gagg 24

<210> 4

<211> 35

<212>ADN

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 4

acgtgagctc attgaaactg caggtggtat tatga 35

<210> 5

<211> 44

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5

gatccccggg aattgccatg ctaatcaacc tcttcaaccg ttgg 44

<210> 6

<211> 50

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> Sonda sintética

<400> 6

acgtggatcc tttttttttt tttttttttt gatccccggg aattgccatg  
50

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> Sonda sintética

<400> 7

gtggtcgaaa gcaatggact 20

<210> 8  
<211> 20  
<212>ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<223> Sonda sintética

<400> 8  
gggattcgaa cccttggtat 20

<210> 9  
<211> 17  
<212>ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<223> Sonda sintética

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)..(9)  
<223> N é um agente de extinção de antraquinona

<900> 9  
ctgcctctnt tcctctg 17

<210> 10  
<211> 79  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>

<223> Sonda sintética

<400> 10

**gtggtcgaaa gcaatggact tgcaggagga gcagaggaaa gaggcagaag gagaagccca . 60**

**taccaagggt tcgaatccc . 79**

**DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

A lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor, não sendo parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

**Documentos de patente referidos na descrição**

- WO 2004026804 A1
- EP 20030759288 A
- US 5188934 A
- US 6008379 A
- US 6020481 A
- US 5366860 A
- US 5847162 A
- US 5936087 A
- US 6051719 A
- US 6191278 A
- US 6140500 A
- US 5863727 A
- US 5800996 A
- US 5945526 A
- WO 9745539 A
- US 5118934 A
- US 6143877 A
- US 6127121 A
- WO 0138584 A
- WO 9822489 A
- WO 9839352 A
- WO 9914226 A

**Literatura não relacionada com patentes referida na descrição**

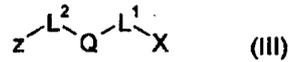
- **J.R. LAKOWICZ.** Principles of fluorescence spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999
- **MARRAS.** *Nucleic Acid Res.*, 2002, vol. 30, e122
- **T. FÖRSTER.** *Ann. Phys.*, 1948, vol. 2, 55
- **JOHANSSON et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, vol. 124, 6950-6956
- **JOHANSSON; COOK.** *Chem. Eur. J.*, 2003, vol. 9, 3466-3471
- **MAY.** *Chem. Commun.*, 2003, 970-971
- **MAY et al.** *Chem. Commun.*, 2003, 970-971
- MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. **SAMBROOK et al.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, 1989
- **KRICKA, L.** Nonisotopic DNA Probe Techniques. Academic Press, 1992, 3-28
- DNA and RNA structure. Nucleic Acids in Chemistry and Biology. Oxford University Press, 1996, 15-81
- Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers. **ANDRUS, A.** PCR 2: A Practical Approach. Oxford University Press, 1995, 39-54
- **GARMAN, A. J.** Non-Radioactive Labelling, A Practical Introduction. Academic Press, 1997
- **FASMAN.** Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. CRC Press, 1989, 385-394
- **GARBESI.** *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 4159-650067]
- **FUJIMORI.** *J. Amer. Chem. Soc.*, 1990, vol. 112, 7435
- **URATA.** *Nucleic Acids Symposium Ser. No. 29*, 1993, 69-70
- **KOMBERG; BAKER.** DNA Replication. Freeman, 1992
- **SHABAROVA, Z.; BOGDANOV, A.** Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids. VCH, 1994
- **S. L. BEAUCAGE.** Current Protocols In Nucleic Acid Chemistry. John Wiley Sons, Inc, 1999

- **SPATOLA, A. F.** Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins. Marcel Dekker, 1983, 267
- **S.L. BEAUCAGE; M.H. CARUTHERS.** Current Protocols In Nucleic Acid Chemistry. John Wiley Sons, Inc, 1999
- **W.C. STILL et al.** *J. Org. Chem.*, 1978, vol. 43, 2923-2925
- **BEAUCAGE; CARUTHERS.** *Tetrahedron Lett.*, 1981, vol. 22, 1859-1862
- **SINHA et al.** *Tetrahedron Lett.*, 1983, vol. 24, 5843-5846

Lisboa, 13/03/2009

## Reivindicações

1. Uma composição de agentes de extinção de fórmula estrutural (III):

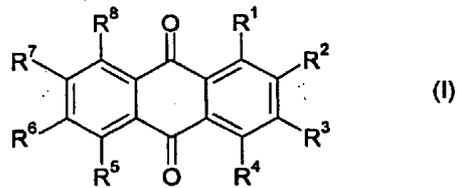


em que  $L^1$  e  $L^2$  são cada um, independentemente uma ligação ou um "linker";

X é um polinucleótido que contém um corante fluorescente;

Z é um nucleótido ou um polinucleótido sendo que ambos são facultativamente substituídos com um marcador ou um suporte sólido;

Q é um composto de fórmula estrutural (I)



em que pelo menos um, dois, três ou quatro de  $R^1$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  ou  $R^8$  são cada um, independentemente seleccionados entre amino-alquilo, amino-arilo e amino-alquilarilo substituídos ou não substituídos, e os restantes grupos  $R^1$  a  $R^8$  são cada um, independentemente, hidrogénio ou hidroxilo, amino, alquilo, arilo, arilalquilo ou alcoxi substituídos ou não substituídos; e em que Q se encontra ligado aos "linkers"  $L^1$  e  $L^2$  em duas posições diferentes, quer seja por meio de um dos grupos  $\alpha$ -amino ou por meio dos carbonos do arilo da porção do agente de extinção.

2. A composição de agente de extinção de acordo com a reivindicação 1, em que Q é seleccionado entre 1,4-bis-(3-

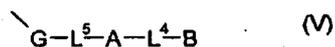
hidroxi-propilamino)-antraquinona **(1)**, 1,5-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona **(4)**, 1,4-bis-(4-(2-hidroxi-2-etil)fenilamino)-antraquinona **(7)**, e 1,8-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona.

**3.** A composição de agente de extinção de acordo com a reivindicação 2, em que Q é seleccionado entre 1,8-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona e 1,5-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona **(4)**.

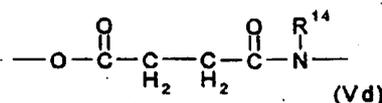
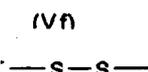
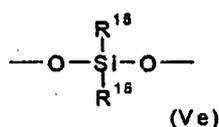
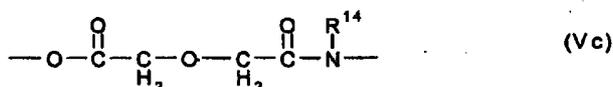
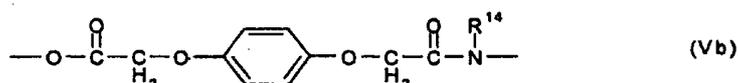
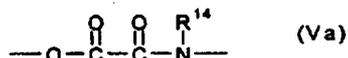
**4.** A composição de agente de extinção de acordo com a reivindicação 1, em que Q é seleccionado entre 1,4-bis(3-hidroxi-propilamino)-6-metil-antraquinona **(11)**, 1,4-bis(4-(2-hidroxi-2-etil)fenilamino)-6-metil-antraquinona **(15)**, 1,4-bis(4-metil-fenilamino)-6-(N-(6,7-dihidroxi-4-oxo-heptano-1-il))carboxamido-antraquinona, 1,4-bis(4-metil-fenilamino)-6-(N-(7-dimetoxitritiloxi-6-hidroxi-4-oxo-heptano-1-il))carboxamido-antraquinona **(18)**, 1,4-bis(propilamino)-6-(N-(6,7-dihidroxi-4-oxo-heptano-1-il))carboxamido-antraquinona, 1,5-bis(4-(2-hidroxi-2-etil)fenilamino)-antraquinona **(20)**, 1,8-bis(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona **(23)**, e 1,8-bis(4-(2-hidroxi-2-etil)fenilamino)-antraquinona **(26)**.

**5.** Uma composição de agente de extinção de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 e 4, em que X é um polinucleótido que contém um corante fluorescente, em que o polinucleótido contém uma ou mais modificações no açúcar bicíclico nos carbonos 2'-4' ou 3'-4'.

**6.** Uma composição de agente de extinção de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, em que Z é uma estrutura de fórmula (V):



onde A é um "linker" clivável seleccionado entre as estruturas (Va a Vf):



em que  $R^{14}$  é alquilo  $C_{1-12}$  ou alcoxi  $C_{1-12}$ ;  $R^{15}$  é alquilo, arilo, arilalquilo ou alcoxi;

$L^4$  e  $L^5$  são independentemente seleccionados entre uma ligação e um "linker", sendo o referido "linker" seleccionado entre alquildiilo  $C_1-C_{12}$ , alcoxi-diilo  $C_1-C_{12}$ , alquilaminodiilo  $C_1-C_{12}$ , alquiamidadiilo  $C_1-C_{12}$ , arildiilo e 1 a 20 unidades de etilenoxi;

G é um nucleótido, um nucleótido substituído, um polinucleótido, ou um polinucleótido substituído; e B é um suporte sólido.

7. Um composto seleccionado entre o grupo que consiste de 1-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-4-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona **(2)**, 1-(3-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-4-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona **(3)**, 1,5-bis-(3-hidroxi-propilamino)-antraquinona **(4)**, 1-(3-

idroxiopropilamino)-5-(3-(4,4'-dimetossi-tritilossi)propil-  
 amino)-antraquinona **(5)**, 1-(3-(cianoetossi(diisopropil-  
 amino)fosfinossi)propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetossi-  
 tritilossi)propilamino)-antraquinona **(6)**, 1,8-bis-(3-  
 idrossi-propilamino)-antraquinona, 6-metil-quinizarina  
**(10)**, 1,4-bis(3-idrossi-propilamino)-6-metil-antraquinona  
**(11)**, 1-(3-(4,4'-dimetossi-tritilossi)propilamino)-4-(3-  
 idrossi-propilamino)-6(7)-metil-antraquinona **(12)**, 1-(3-(2-  
 cianoetossi(diisopropilamino)fosfinossi)propilamino)-4-(3-  
 (4,4'-dimetossi-tritilossi)propilamino)-6(7)-metil-  
 antraquinona **(13)**, 1,4-bis(4-(2-idrossietil)-fenilamino)-6-  
 metil-antraquinona **(15)**, 1,4-bis(propilamino)-6-carbossi-  
 antraquinona, 1,4-bis(propilamino)-6-(N-(6,7-didrossi-4-  
 osso-heptano-1-il))carbossamido-antraquinona, 1,4-bis(propil-  
 amino)-6-(N-(7-dimetossi-tritilossi-6-idrossi-4-oss-heptano-1-  
 il))-carbossamido-antraquinona, 1,5-bis(4-(2-idrossietil)-  
 fenilamino)-antraquinona **(20)**, 1-(4-(2-idrossietil)fenil-  
 amino)-5-(4-(2-(4,4'-dimetossi-tritilossi)etil)fenilamino)-  
 antraquinona **(21)**, 1-(4-(2-(cianoetossi(diisopropilamino)-  
 fosfinossi)etil)fenilamino)-5-(4-(2-(4,4'-dimetossi-  
 tritilossi)etil)fenilamino)-antraquinona **(22)**, 1,8-bis(3-  
 idrossi-propilamino)-antraquinona **(23)**, 1-(3-  
 idrossi-propilamino)-8-(3-(4,4'-dimetossi-tritilossi)propil-  
 amino)-antraquinona **(24)**, 1-(3-(cianoetossi(diisopropil-  
 amino)fosfinossi)propilamino)-8-(3-(4,4'-dimetossi-  
 tritilossi)propilamino)-antraquinona **(25)**, 1,8-bis(4-(2-  
 idrossietil)fenilamino)-antraquinona **(26)**, 1-(4-(2-  
 idrossietil)fenilamino)-8-(4-(2-(4,4'-dimetossi-tritilossi)-  
 etil)fenilamino)-antraquinona **(27)**, e 1-(4-(2-  
 (cianoetossi(diisopropilamino)fosfinossi)etil)fenilamino)-8-  
 (4-(2-(4,4'-dimetossi-tritilossi)etil)fenilamino)-  
 antraquinona **(28)**.

8. Um composto de acordo com a reivindicação 7 que é 1-(3-(cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)propilamino)-5-(3-(4,4'-dimetoxi-tritiloxi)propilamino)-antraquinona **(6)**.

9. Um método de extensão de primers que compreende: a hibridação de um primer com um polinucleotídico alvo; e a extensão do primer por meio da incorporação mediada pela polimerase de um nucleótido 5'-trifosfato; por meio do qual é formado um polinucleótido marcado; em que o primer é uma composição de agente de extinção de acordo com o definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

10. Um método de amplificação de um polinucleótido alvo compreendendo nucleótidos 5'-trifosfatos, uma polimerase, dois ou mais primers; em que os primers são complementares à sequência do polinucleótido alvo, e uma sonda marcada de forma detectável; em que pelo menos uma parte da sonda marcada de forma detectável é complementar ao polinucleótido alvo e contém pelo menos um corante fluorescente e uma porção do agente de extinção de fórmula (I); em que a referida sonda é uma composição de agente de extinção de acordo com o definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

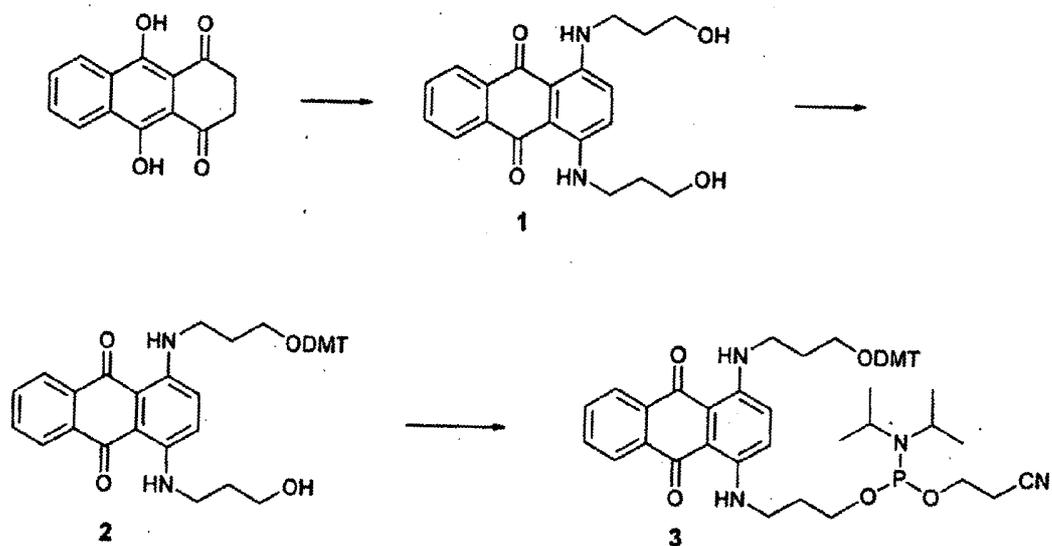


FIGURA 1

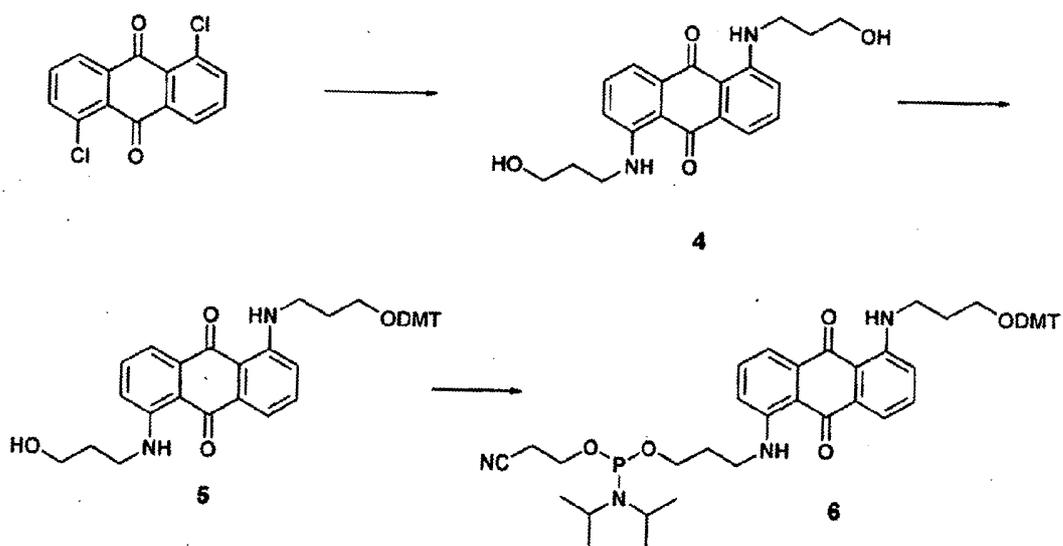


FIGURA 2

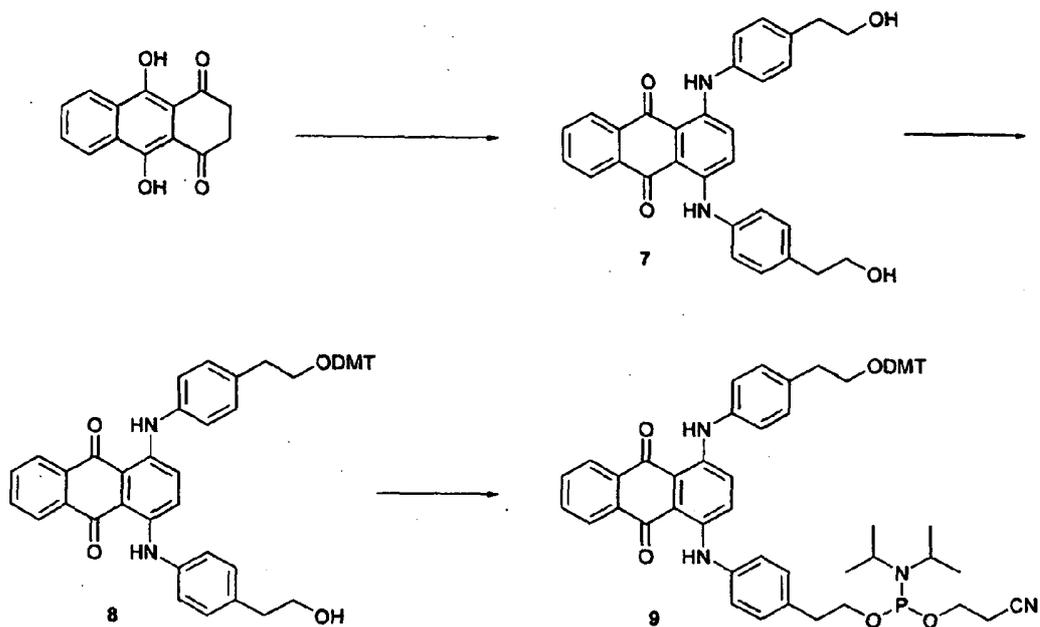


FIGURA 3

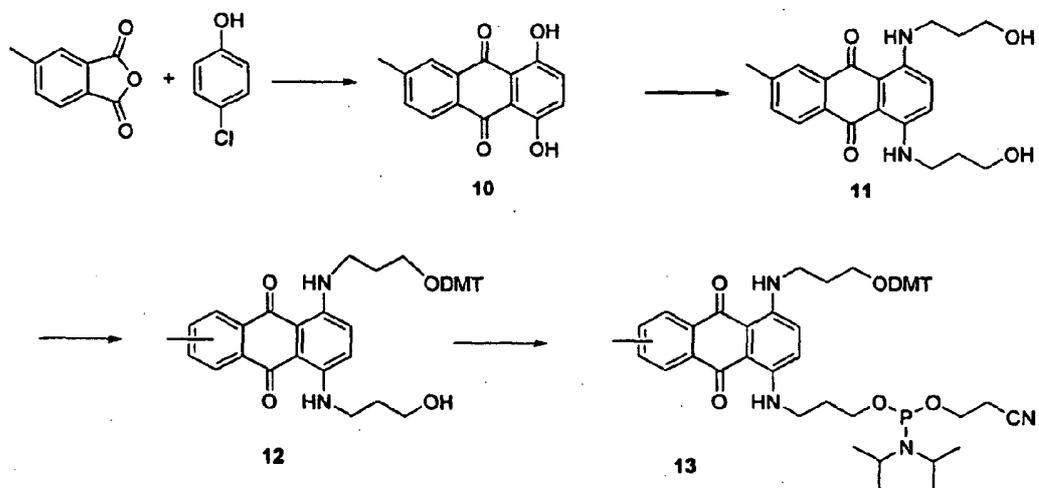


FIGURA 4

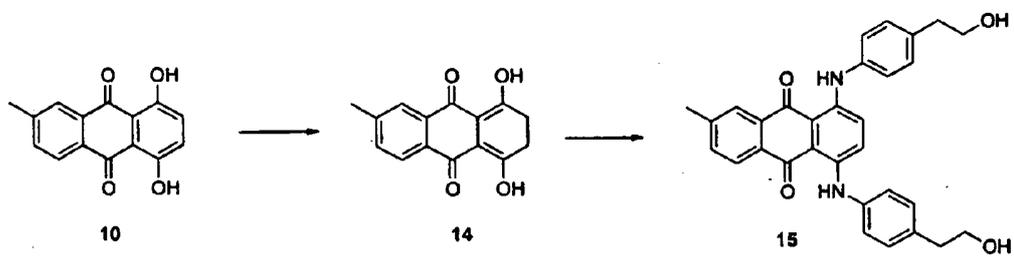


FIGURA 5

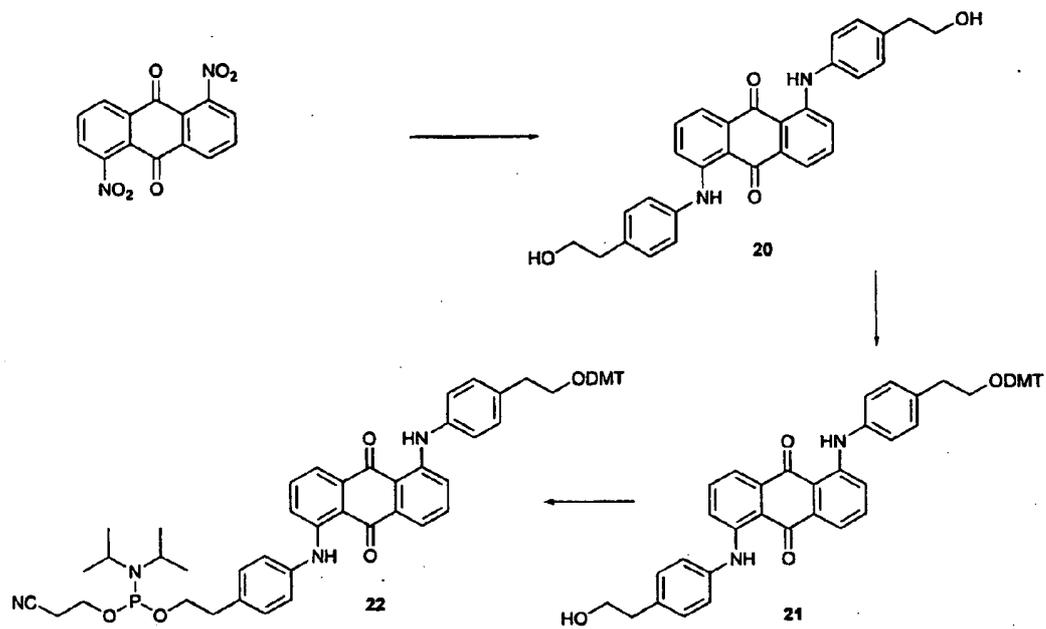


FIGURA 6

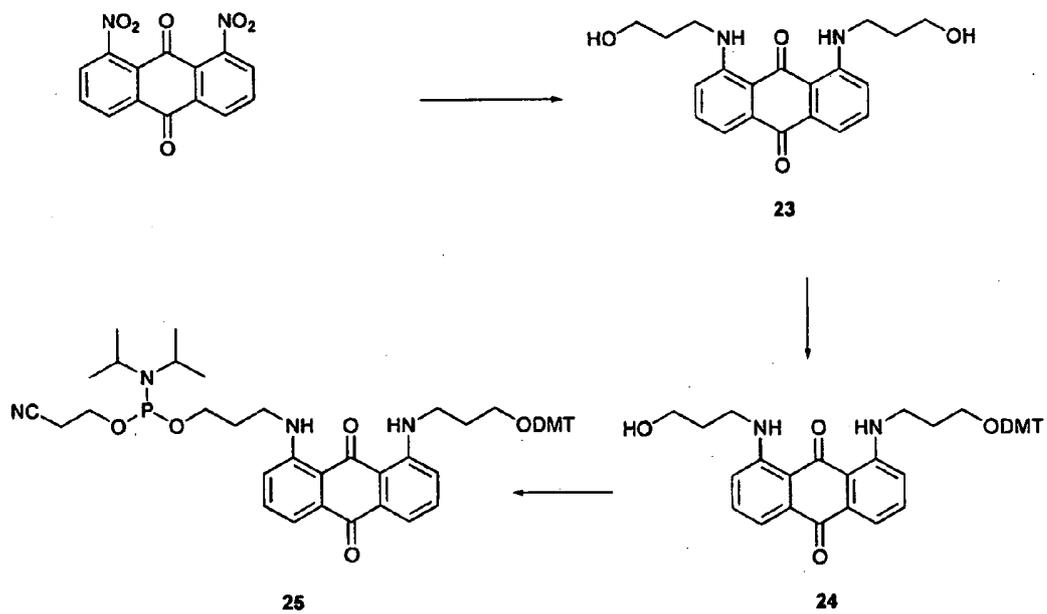


FIGURA 7

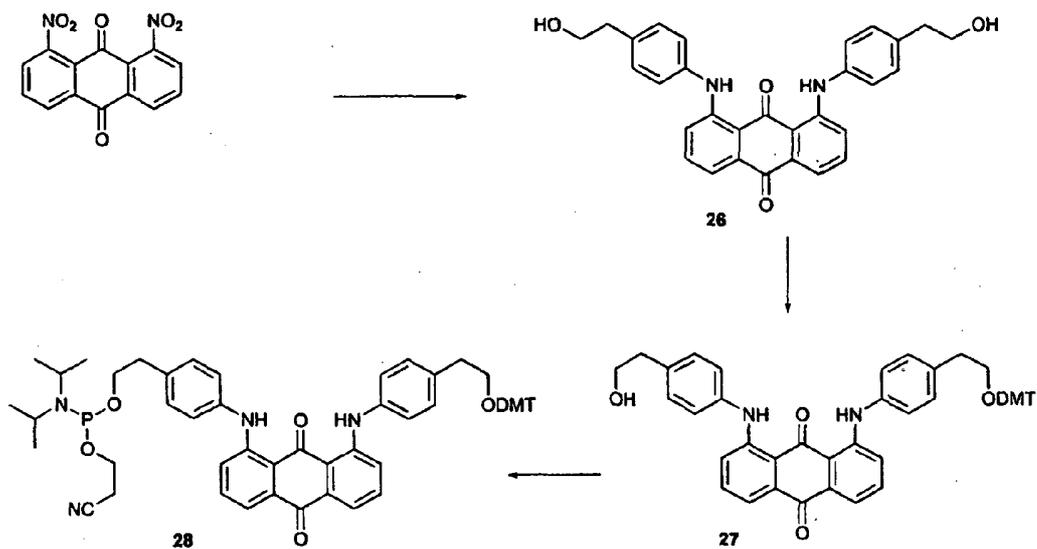


FIGURA 8

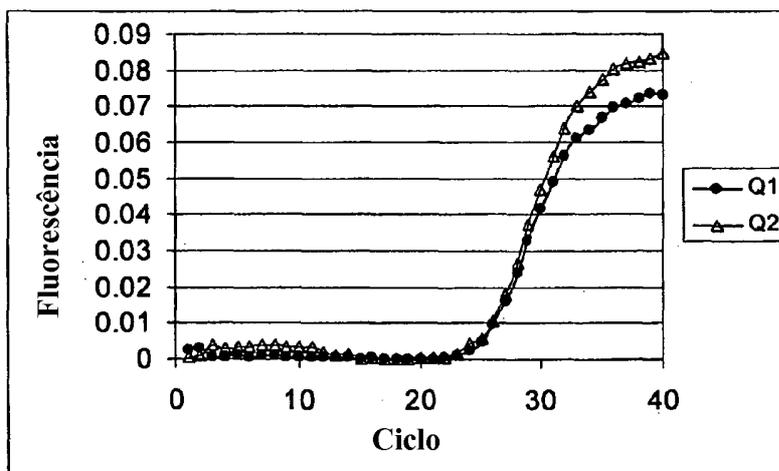


FIGURA 9

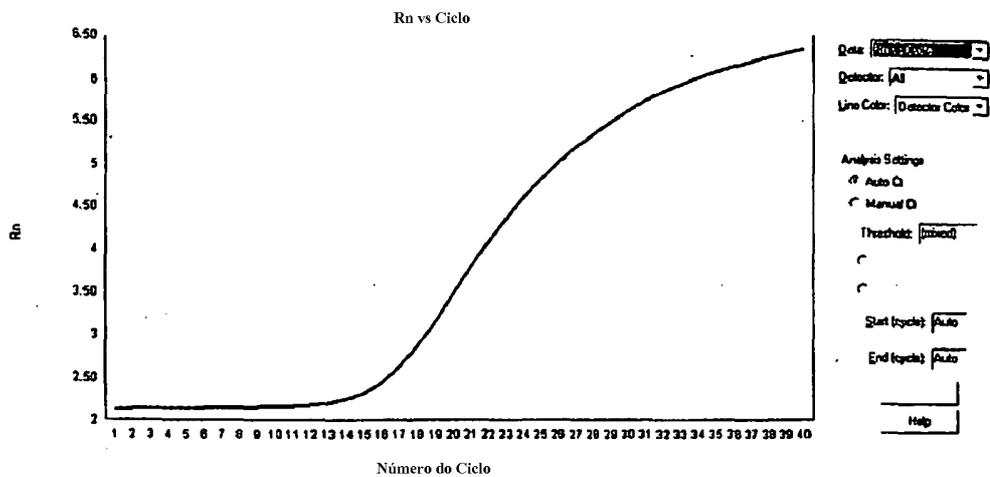


FIGURA 10

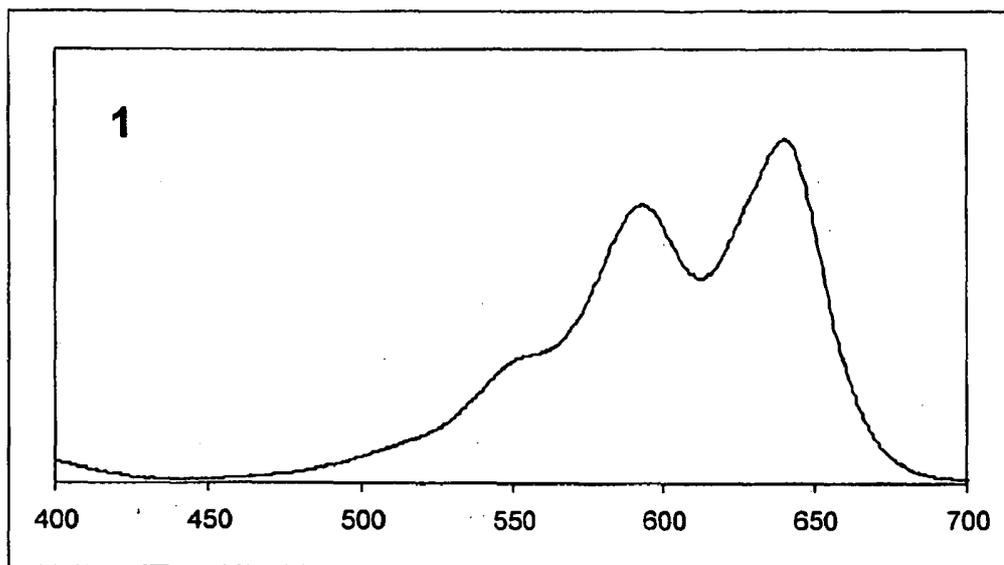


FIGURA 11

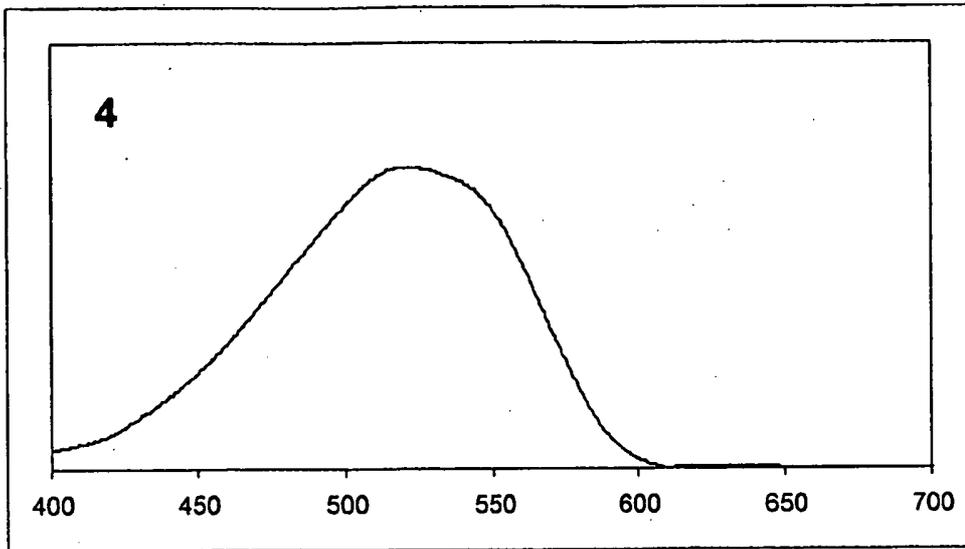


FIGURA 12

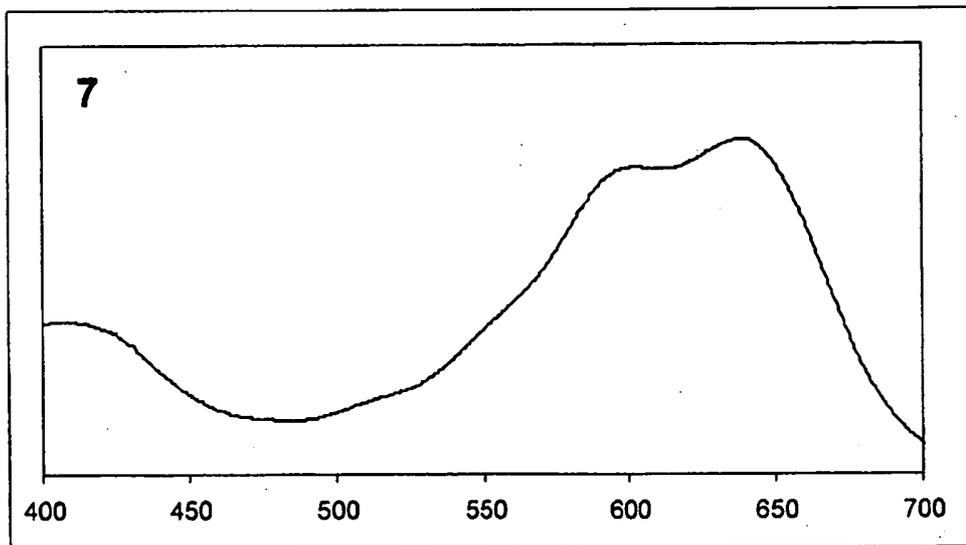


FIGURA 13

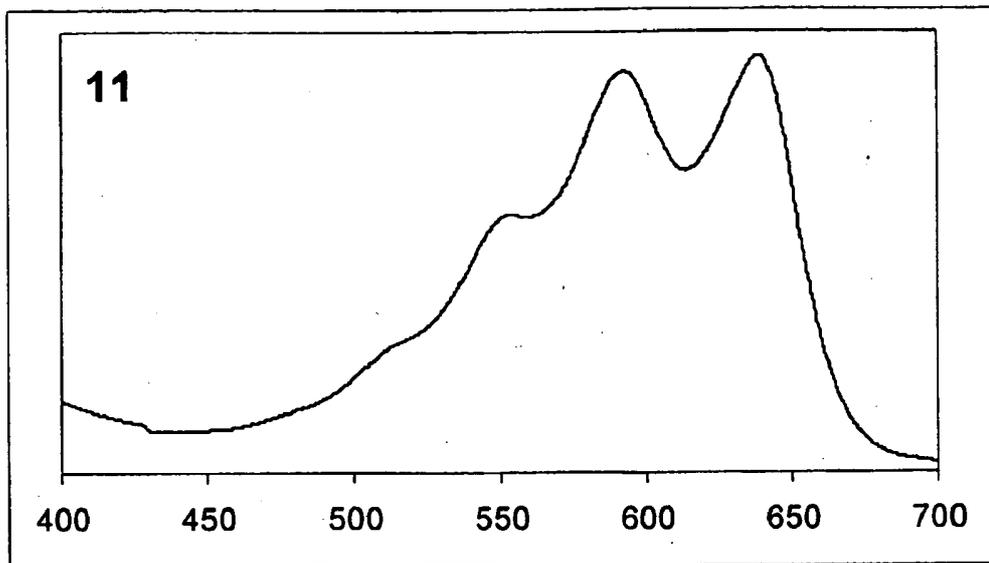


FIGURA 14

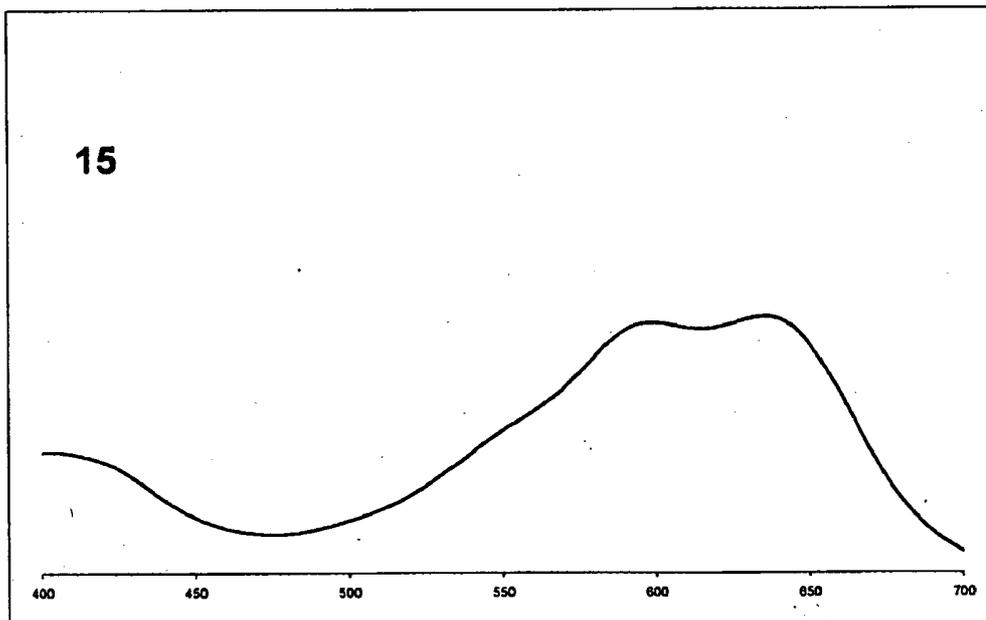


FIGURA 15

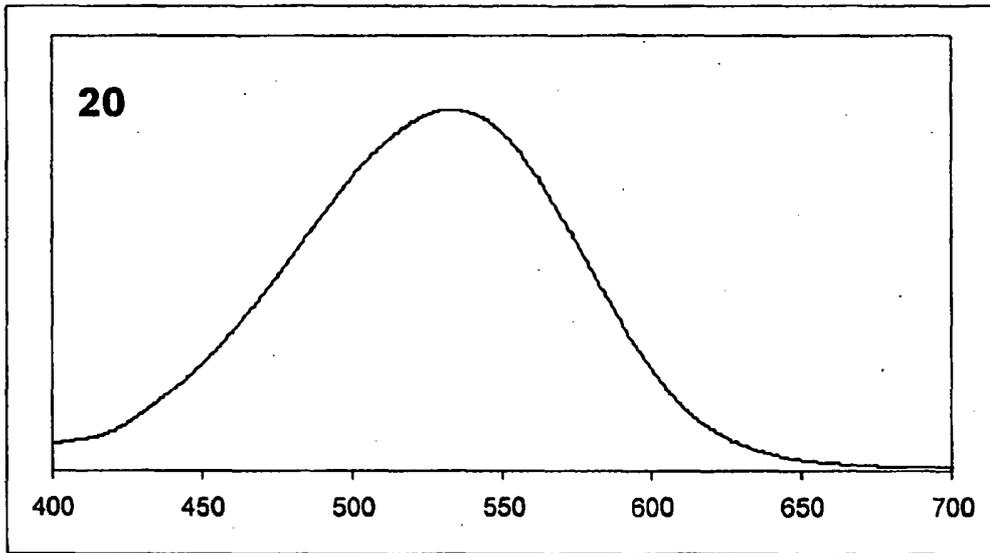


FIGURA 16

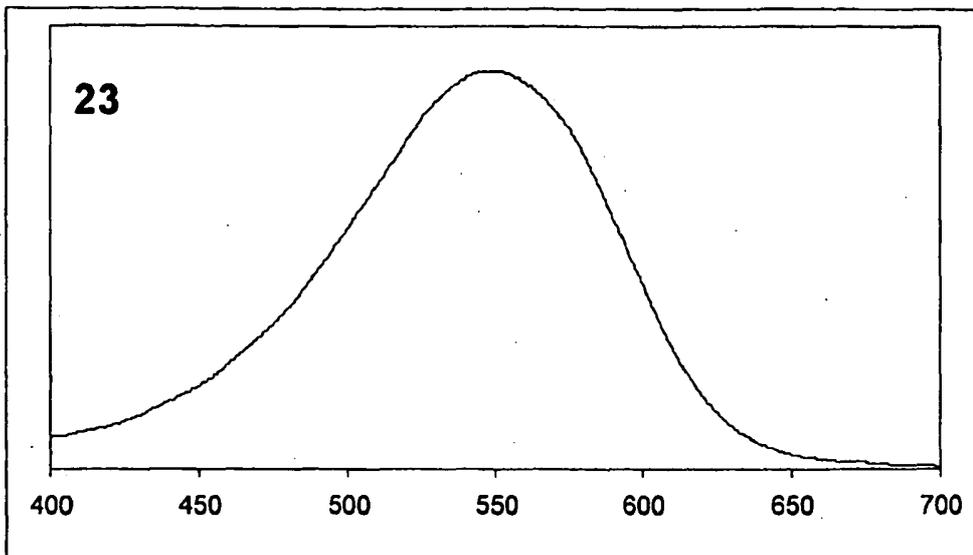


FIGURA 17

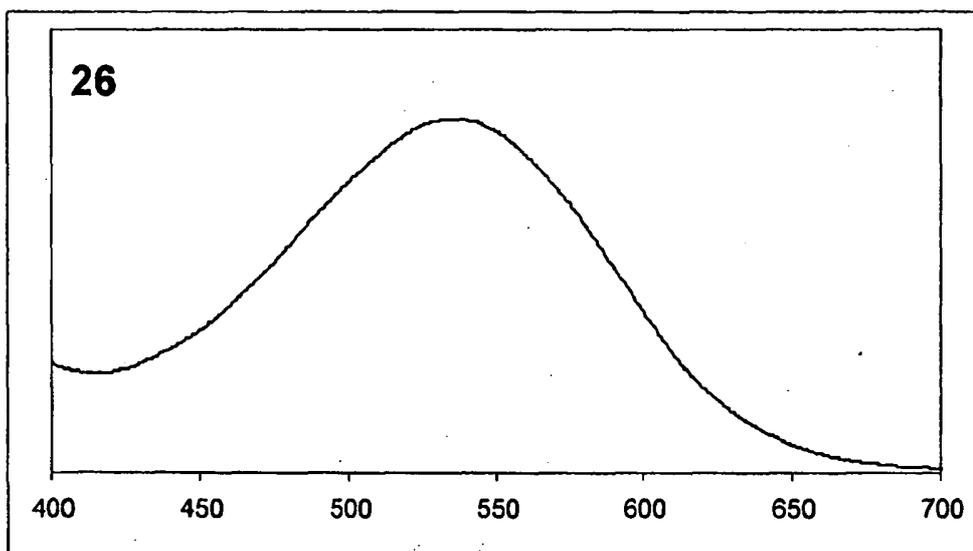


FIGURA 18