

[51] Int. Cl.

C09K 11/06 (2006.01)

C09B 57/02 (2006.01)

C09B 56/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680007770.2

[43] 公开日 2008 年 3 月 5 日

[11] 公开号 CN 101137735A

[22] 申请日 2006.3.9

[21] 申请号 200680007770.2

[30] 优先权

[32] 2005. 3. 9 [33] US [31] 60/661,222

[86] 国际申请 PCT/US2006/008425 2006.3.9

[87] 国际公布 WO2006/099050 英 2006.9.21

[85] 进入国家阶段日期 2007.9.10

[71] 申请人 西菲伊德公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 亚历山大·A·加尔

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 柳春琦

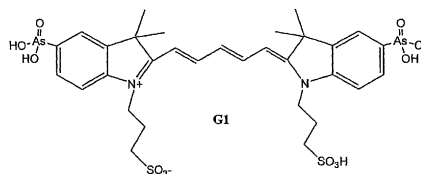
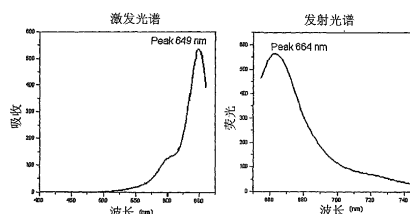
权利要求书 14 页 说明书 94 页 附图 12 页

[54] 发明名称

极性染料

[57] 摘要

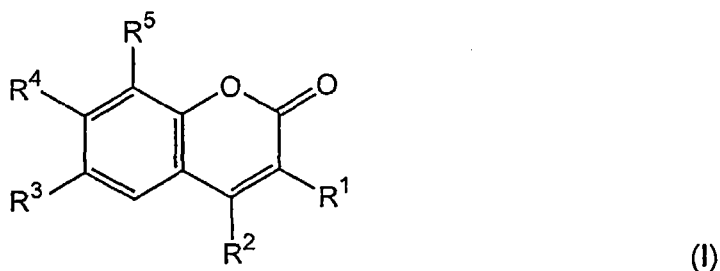
本发明涉及新型极性荧光和猝灭剂染料，以及具有增强极性的小沟结合体。本发明还涉及自动化合成条件下制备标记有极性肿酸酯染料的探针的方法和使用这些探针的方法。



肿酸羧花青染料 G1, 1.25mM,
在 pH 8.0 10mM Tris 缓冲液中的激发和发射光谱

1. 一种极性荧光染料, 其包含被一个或多个肿酸酯基取代的荧光化合物, 所述的荧光化合物具有在 340 nm 和 1100 nm 之间的激发和在 440 和 1150 nm 之间的荧光发射最大值。

2. 式(I)的化合物:



其中,

R^1 为氢, 烷基, $-CHO$, $-NO_2$, $-CH_2R^{11}$, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 或 $-L-R_x$;

R^2 为氢, $-CN$, 烷基, 芳烷基, 卤代烷基或 $-CH_2R^{11}$;

R^3 为氢, 烷基, 卤素, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

R^4 为 $-NR^{12}R^{13}$, 其中 R^{12} 和 R^{13} 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基或 R^{12} 和 R^{13} 一起形成杂环;

R^5 为氢, 卤素, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-OC(O)-$ 烷基, $-OC(O)-$ 芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-CH_2CN$, $-CH_2SO_2Me$, $-CH_2SO_2Ph$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

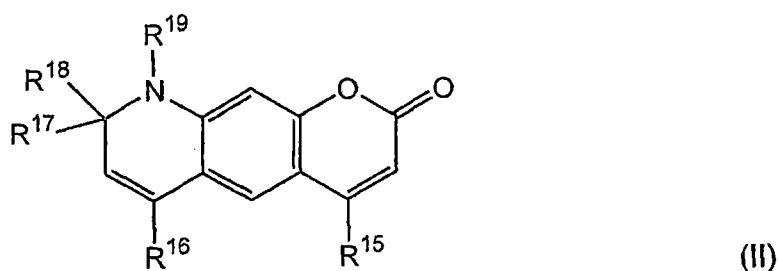
R^{11} 为 $-COOH$, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团，

条件是， R^1 ， R^3 ， R^5 和 R^{11} 中的至少一个为 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

3. 式(II)的化合物：



其中，

R^{15} 为氢，烷基，芳烷基，卤代烷基或-CN；

R^{16} 为 $-\text{CH}_2\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{CH}_2\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ ；

R^6 和 R^7 相同或不同，并且独立地为 H，烷基，芳基，或杂芳基；或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环，所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子，其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3)，其中每个 R^8 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基， $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基， $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基，烷基，芳基，烷基羰基，芳基羰基， $-\text{CH}_2\text{CN}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ ，或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基，或同一碳上的两个 R^8 形成氧代；

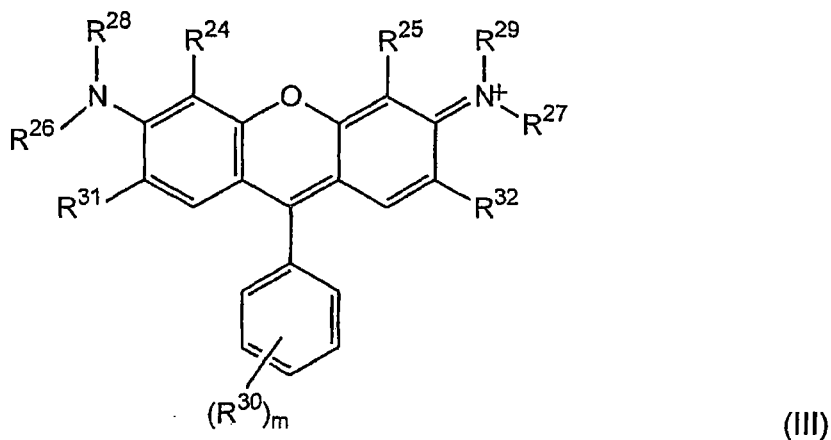
R^{17} 和 R^{18} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基或卤代烷基；

R^{19} 为氢，任选被羟基、卤素、 $-\text{COOH}$ 或 $-\text{SO}_2\text{OH}$ 取代的烷基，任选被羟基、卤素、 $-\text{COOH}$ 或 $-\text{SO}_2\text{OH}$ 取代的芳基，或 $-\text{L}-\text{R}_x$ ；

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团。

4. 式(III)的化合物:



其中,

m 为 1、2、3、4 或 5;

R^{24} 和 R^{25} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 卤素, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 和 R^{29} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基或任选被 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 取代的芳基;

R^{31} 和 R^{32} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 卤素, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

每个 R^{30} 独立地为氢, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{33}$, 卤素, 烷基, 芳烷基, 芳基, 烷硫基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{SO}_2\text{R}^{33}$, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$, $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 或 $-\text{L}-\text{R}_x$;

R^{33} 为 羟基, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{SO}_3\text{R}^{34}$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^{34})_2$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{COOR}^{34}$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{OR}^{34}$ 或 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{N}(\text{R}^{34})_2$ (j 为 2-6 之间的整数);

每个 R^{34} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 芳基或杂芳基;

R^{24} 和 R^{28} 可以任选形成 5 或 6-元杂环;

R^{25} 和 R^{29} 可以任选形成 5 或 6-元杂环;

R^{26} 和 R^{28} 可以任选形成任选被 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 取代的 5-9 元杂环;

R^{27} 和 R^{29} 可以任选形成任选被 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$

取代的 5-9 元杂环；

R^{26} 和 R^{31} 可以任选形成任选被氢，烷基， $-\text{CH}_2\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{CH}_2\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 取代的 5 或 6-元杂环；

R^{27} 和 R^{32} 可以任选形成任选被氢，烷基， $-\text{CH}_2\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{CH}_2\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 取代的 5 或 6-元杂环；

R^6 和 R^7 相同或不同，并且独立地为 H，烷基，芳基，或杂芳基；或

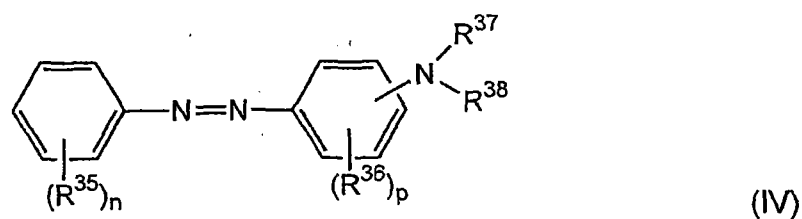
R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环，所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子，其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3)，其中每个 R^8 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基， $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基， $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基，烷基，芳基，烷基羰基，芳基羰基， $-\text{CH}_2\text{CN}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ ，或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基，或同一碳上的两个 R^8 形成氧代；以及

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团，

条件是， R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 、 R^{30} 、 R^{31} 、 R^{32} 和 R^{33} 中的至少一个为或包含 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

5. 式(IV)的化合物：



其中，

每个 R^{35} 相同或不同，并且独立地为氢，卤素， $-\text{NO}_2$ ， $-\text{CN}$ ， $-\text{SO}_3^-$ ，烷氧基，胺，二烷基胺，单烷基胺， $-\text{N}=\text{N}-\text{R}^{39}$ ， $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ ；

n 为 1、2 或 3；

p 为 1 或 2；

每个 R^{36} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{SO}_3^-$, 烷氧基, 胺, 二烷基胺, 单烷基胺, $-\text{N}=\text{N}-R^{39}$, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基, $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

R^{37} 和 R^{38} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 芳烷基, 芳基或 $-\text{L}-\text{R}_x$;

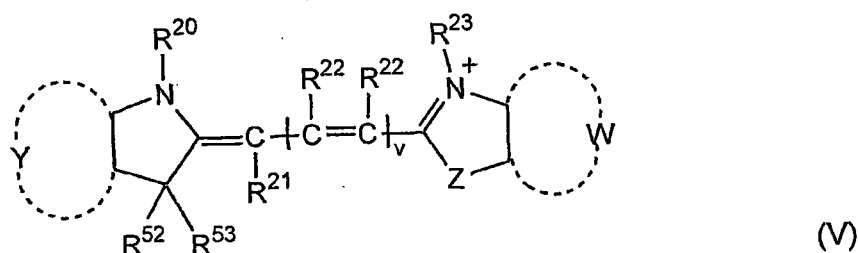
R^{39} 为任选被一个或多个 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 取代的芳基或杂芳基;

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^{35} 和 R^{36} 中的至少一个为 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

6. 式(V)的化合物:



其中,

v 为 0、1、2、3、4、5 或 6;

Y 表示形成每个环中具有 6 个原子的一个或两个稠合芳族环所需要的原子, 每个环原子相同或不同, 并且独立地为 $=\text{CR}^{46}-$, $=\text{N}^+\text{R}^{47}-$ 或 $=\text{N}-$;

W 表示形成每个环中具有 6 个原子的一个或两个稠合芳族环所需要的原子，每个环原子相同或不同，并且独立地为 $=CR^{46}-$ 、 $=N^+R^{47}-$ 或 $=N-$ ；

Z 为 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、 $-C(R^{48})_2$ 或 $-NR^{49}-$ ；

R^{20} 和 R^{23} 相同或不同，并且独立地为烷基，芳烷基或被以下基团取代的取代烷基：羟基、氰基、硝基、氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、 $-COOH$ 、烷氧基、单烷基氨基、二烷基氨基或三烷基铵，或 $L-R_x$ ；

R^{52} 和 R^{53} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，被以下基团取代的烷基：羟基、 $-COOH$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ ，或 $L-R_x$ ；

R^{21} 和每个 R^{22} 相同或不同，并且独立地为氢，卤素，烷氧基，羟基，巯基，芳氧基，杂环，亚胺离子， $L-R_x$ ，或两个相邻的 R^{21} 和 R^{22} 或任何两个相邻的 R^{22} 形成 4、5 或 6 元碳环，任选被烷基，卤素或氧代取代；或彼此相距一个碳的两个 R^{22} 与它们连接的碳一起形成 4、5 或 6 元碳环，任选被以下基团取代：烷基，卤素，烷硫基，芳硫基，烷氧基，芳氧基，氧代 ($=O$)， $=S$ 或 $=C(R^{50})_2$ ；

每个 R^{46} 和 R^{47} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，芳基，卤素，氰基，硝基，胺，烷基氨基，二烷基氨基，磺酰基，磷酰基， $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ ， $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 或 $L-R_x$ ；

每个 R^{48} 和 R^{49} 相同或不同，并且独立地为氢或任选被以下基团取代的烷基：羟基、 $-COOH$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ ，或 $L-R_x$ ；

每个 R^{50} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，氰基， $-C(O)NHR^{48}$ ；

R^6 和 R^7 相同或不同，并且独立地为 H，烷基，芳基，或杂芳基；或

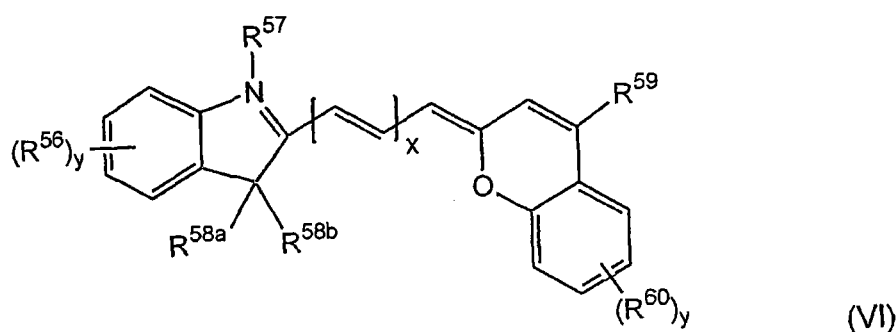
R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环，所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子，其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3)，其中每个 R^8 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基， $-OC(O)-$ 烷基， $-OC(O)-$ 芳基，烷基，芳基，烷基羰基，芳基羰基， $-CH_2CN$ ， $-CH_2SO_2Me$ ， $-CH_2SO_2Ph$ ，或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基，或同一碳上的两个 R^8 形成氧代；

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团，

条件是， R^{20} ， R^{23} ， R^{46} ， R^{47} ， R^{48} ， R^{49} ， R^{52} 和 R^{53} 中的至少一个为 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

7. 式(VI)的化合物：



其中，

y 为 1、2 或 3；

x 为 0、1、2 或 3；

每个 R^{56} 相同或不同，并且独立地为氢，卤素，羟基， $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ ；

R^6 和 R^7 相同或不同，并且独立地为 H，烷基，芳基，或杂芳基；或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环，所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子，其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $-\text{[C(R}^8)_2\text{]}_w-$ (w 为 2 或 3)，其中每个 R^8 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基， $-\text{OC(O)-}$ 烷基， $-\text{OC(O)-}$ 芳基，烷基，芳基，烷基羰基，芳基羰基， $-\text{CH}_2\text{CN}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ ，或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基，或同一碳上的两个 R^8 形成氧代；

R^{57} 为烷基，芳烷基或被以下基团取代的烷基：羟基、氰基、硝基、氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 、 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、烷

氧基、单烷基氨基、二烷基氨基或三烷基铵，或 $L-R_x$ ；

R^{58a} 和 R^{58b} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，被以下基团取代的烷基：羟基、 $-COOH$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ ，或 $L-R_x$ ；

R^{59} 为氢，烷基或芳烷基；

每个 R^{60} 相同或不同，并且独立地为氢， $-NR^{61a}R^{61b}$ ，烷基，芳基， $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ ， $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ ；

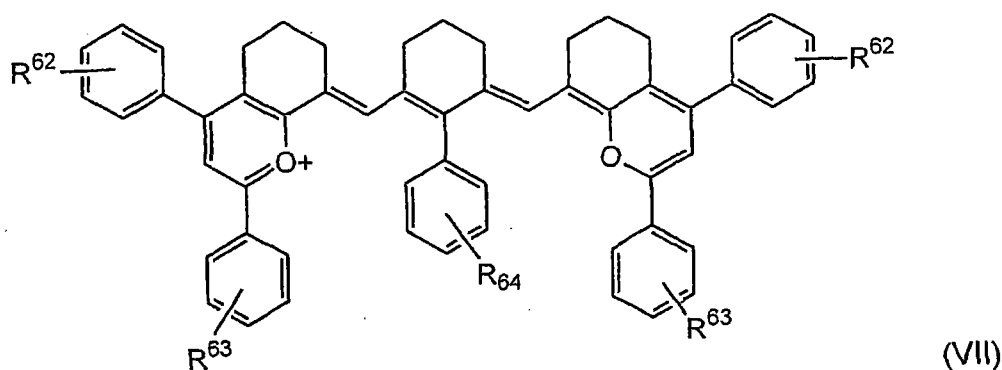
每个 R^{61a} 和 R^{61b} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，被以下基团取代的烷基：羟基、 $-COOH$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ ，或 $L-R_x$ ；

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团，

条件是， R^{56} ， R^{58a} ， R^{58b} ， R^{60} 和 R^{61a} 和 R^{61b} 中的至少一个为或包含 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 。

8. 式(VII)的化合物：



其中，

每个 R^{62} 相同或不同，并且独立地为氢，卤素，羟基， $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ ，烷基，被以下基团取代的烷基：羟基、 $-COOH$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ ，或 $L-R_x$ ；

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-OC(O)-$ 烷基, $-OC(O)-$ 芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-CH_2CN$, $-CH_2SO_2Me$, $-CH_2SO_2Ph$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

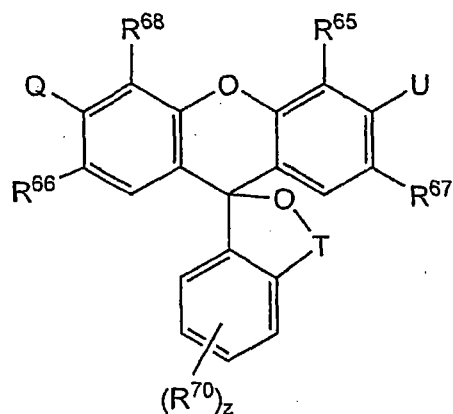
每个 R^{63} 和 R^{64} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$, 烷基, 被以下基团取代的烷基: 羟基、 $-COOH$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$, 或 $L-R_x$;

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^{62} , R^{63} 和 R^{64} 中的至少一个为或包含 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 。

9. 式(VIII)的化合物:



(VIII)

其中,

z 为 1、2 或 3;

T 为 $>C=O$ 或 $>S(=O)_2$;

Q 为 $-OR^{71}$ 或 $-NR^{72}R^{73}$;

U 为-OR⁷⁴或-NR⁷⁵R⁷⁶;

每个 R⁶⁸和 R⁶⁵相同或不同,并且独立地为氢,卤素,羟基,烷基,芳基或-CH₂As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-CH₂As(OR⁶)₂(OR⁷)₂;

每个 R⁶⁶和 R⁶⁷相同或不同,并且独立地为氢,卤素,羟基,烷基或 L-R_x;

每个 R⁷⁰相同或不同,并且独立地为氢,卤素,烷基, -As(=O)(OR⁶)(OR⁷), -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂或 L-R_x;

R⁶和 R⁷相同或不同,并且独立地为 H,烷基,芳基,或杂芳基;或

R⁶和 R⁷连接在一起形成 5 或 6-元杂环,所述的杂环包含砷和连接 R⁶和 R⁷的两个氧原子,其中-R⁶-R⁷-为-[C(R⁸)₂]_w- (w 为 2 或 3),其中每个 R⁸相同或不同,并且独立地为氢,羟基,氰基, -OC(O)-烷基, -OC(O)-芳基,烷基,芳基,烷基羰基,芳基羰基, -CH₂CN, -CH₂SO₂Me, -CH₂SO₂Ph,或相邻碳原子上的两个 R⁸与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基,或同一碳上的两个 R⁸形成氧代;

每个 R⁷¹和 R⁷⁴相同或不同,并且独立地为氢,烷基羰基或芳基羰基;

每个 R⁷², R⁷³, R⁷⁵和 R⁷⁶相同或不同,并且独立地为氢,烷基或芳基;或

R⁷¹和 R⁶⁸与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环;或

R⁷⁴和 R⁶⁵与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环;或

R⁷²和 R⁶⁸与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环;或

R⁷³和 R⁶⁶与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环;或

R⁷⁵和 R⁶⁵与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环;或

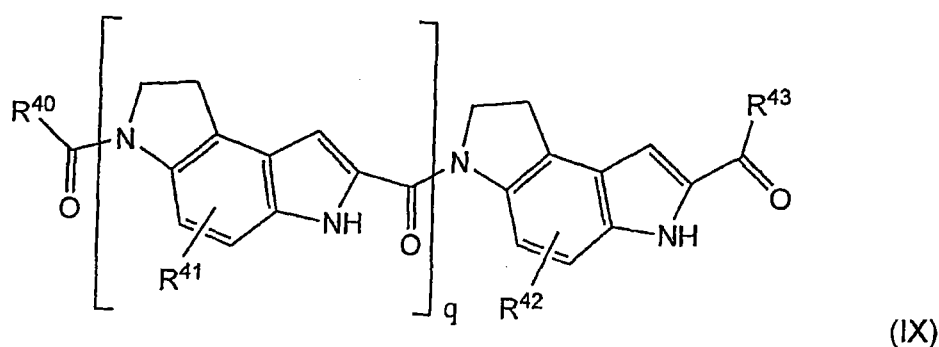
R⁷⁶和 R⁶⁷与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环;

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键,并且由以下中的任何组合组成:单、双、三或芳族碳-碳键,碳-氮键,氮-氮键,碳-氧键和碳-硫键;以及

R_x 为活性基团,

条件是, R⁶⁵, R⁶⁶, R⁶⁷, R⁶⁸和 R⁷¹中的至少一个为或包含 -As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂。

10. 式(IX)的化合物:



其中,

R^{40} 和 R^{43} 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氨基, 烷基, 芳基, 烷氧基或 $-L-R_x$, 条件是 R^{40} 和 R^{43} 中的至少一个为 $-L-R_x$;

每个 R^{41} 独立地为氢, 卤素, 羟基, 磺酰基, 磷酰基, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基, $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

q 为 0、1 或 2;

R^{42} 为氢, 卤素, 羟基, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^{41} 和 R^{42} 中的至少一个为 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

12. 一种寡核苷酸共轭物, 其包含被具有肿酸酯基的染料取代的寡核苷酸。

13. 权利要求 12 所述的寡核苷酸, 其中所述的染料为具有在 340 nm

和 1100 nm 之间的激发和在 440 和 1150 nm 之间的荧光发射最大值的荧光染料。

14. 权利要求 12 所述的寡核苷酸，其中所述的染料为非荧光猝灭剂，其适于在寡核苷酸结合到靶之前吸收由报道荧光团发射的荧光。

15. 权利要求 12 所述的寡核苷酸，其中所述的染料为权利要求 2-10 中任何一项的化合物。

16. 权利要求 12 至 15 中任何一项所述的寡核苷酸，其还包含 MGB 基团。

17. 权利要求 16 所述的寡核苷酸，其中所述的 MGB 基团被极性肿酸酯基取代。

18. 权利要求 12-17 中任何一项所述的寡核苷酸共轭物，其中所述的寡核苷酸为选自分子标志，Scorpion®探针，sunrise 探针，构象辅助的探针和 TaqMan™ 探针中的探针。

19. 一种直接检测靶核酸的方法，该方法包括：

提供染料-标记的寡核苷酸探针，该探针包括共轭到式(I-III)和(V-VIII)中的一种或多种染料化合物上的寡核苷酸，所述的寡核苷酸还任选包含任选被一个或多个极性肿酸酯基取代的 MGB，

将所述染料-标记的寡核苷酸探针加入到生物样品中，其中所述的探针对于靶核酸是互补的或基本上互补的；

在适宜的条件下和足够量的时间，使所述的探针与靶核酸杂交；和检测由所述染料发出的荧光。

20. 一种使用 R_x 为亚磷酰胺基团的式(I)-(VIII)中任何一种的染料试剂在自动化合成中制备寡核苷酸的方法，该方法包括：

使用亚磷酰胺法进行寡核苷酸的自动化合成，以提供染料-标记的寡核苷酸；

将染料-标记的寡核苷酸的-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ 脱保护，以提供具有选自-AsO₃²⁻或-AsO₃H⁻中的带负电荷的极性基团的染料-标记的寡核苷酸；以及

将所述染料-标记的寡核苷酸与反应介质分离。

21. 权利要求 20 所述的方法，该方法还包括共轭在所述寡核苷酸中的

MGB 的步骤。

22. 权利要求 21 所述的方法，其中所述 MGB 被膦酸酯基取代。

23. 一种使用 TaqMan 分析检测现实生活中的靶序列扩增的方法，该方法包括以下步骤：

提供染料-标记的寡核苷酸探针，该探针包含共轭到式(IV)的猝灭剂染料和式(I-III)和(V-VIII)中的任何一种荧光染料上的寡核苷酸，每种染料具有一个或多个极性膦酸酯基，其中所述的探针处于使荧光染料由猝灭剂染料猝灭的构象；

将所述的染料-标记的寡核苷酸探针加入到 PCR 反应介质中；

在靶存在时，运行 PCR 温度循环，以使所述的探针与所述的靶杂交，并且由 Taq 聚合酶裂开；以及

从裂开的染料实时读出荧光信号。

24. 一种使用 Molecular Beacon 分析检测现实生活中的靶序列扩增的方法，该方法包括以下步骤：

提供染料-标记的寡核苷酸探针，该探针包含共轭到式(IV)的猝灭剂染料和式(I-III)和(V-VIII)中的任何一种荧光染料上的寡核苷酸，每种染料具有一个或多个极性膦酸酯基，其中所述的探针处于使荧光染料由猝灭剂染料猝灭的构象；

将所述的染料-标记的寡核苷酸探针加入到 PCR 反应介质中；

在靶存在时，运行 PCR 温度循环，以使所述的探针与所述的靶杂交，从而分离所述的荧光染料和猝灭剂染料；以及

从未猝灭的荧光染料实时读出荧光信号。

25. 一种使用 Scorpion Probe 分析检测现实生活中的靶序列扩增的方法，该方法包括以下步骤：

提供染料-标记的寡核苷酸探针，该探针包含引物、共轭到式(IV)的猝灭剂染料和式(I-III)和(V-VIII)中的任何一种荧光染料的寡核苷酸，每种染料具有一个或多个极性膦酸酯基，其中所述的探针处于使荧光染料由猝灭剂染料猝灭的构象；

将所述的染料-标记的寡核苷酸探针加入到 PCR 反应介质中；

运行 PCR 温度循环，以使所述的引物与靶 DNA 杂交，从而扩延在靶

DNA 上的探针；

使扩延的探针热变性，这使得猝灭剂染料解离；

使扩延的探针冷却以进行内部重排，这使得荧光染料以靶特异性的方式发荧光；以及

从荧光染料实时读出荧光信号。

极性染料

发明背景

发明领域

本发明涉及新型的荧光染料，猝灭剂染料和由共轭到它们上的肿酸衍生的具有增强极性的小沟结合体。本发明还涉及在自动化合成条件下染色细胞、标记蛋白和制备与极性肿酸酯染料共轭的寡核苷酸探针的方法。

相关技术描述

多年来将染料-标记的合成寡核苷酸用作互补的 DNA 和 RNA 靶用序列-特异性探针。这些方法在法医学、分子生物学和医学诊断中具有广泛的应用，因为它们可以鉴定和定量具体的核酸靶。DNA 探针的早期应用依赖于放射性标记(典型地， ^{32}P)，而近来的方法使用包括化学发光和荧光基团的报道分子。改进的装备仪器可以使这些光谱方法的灵敏度达到或超过放射标记的方法。量子产额高的荧光染料特别适宜于需要高灵敏检测试剂的生物应用。

最近开发的检测方法采用荧光共振能量传递(FRET)处理，用于检测探针杂交，而不是直接检测荧光强度。这类分析中，在猝灭剂分子的吸收光谱与供体荧光团的发射光谱重叠并且两种分子十分靠近时，供体荧光团(报道分子)和受体分子(猝灭剂)之间发生 FRET。供体荧光团的激发态能量由共振偶极子-诱导的偶极性相互作用传递给相邻的受体，这导致供体荧光的猝灭。供体和受体分子之间的能量传递效率高度取决于分子之间的距离。还知道其它荧光猝灭机理，例如碰撞和电荷转移猝灭。

典型地，以这样的方式设计基于 FRET 的检测方法，该方式使得供体荧光团和受体分子十分靠近，从而供体荧光的猝灭是有效的。在分析的过程中，将供体和受体分子分开，从而产生荧光。在核酸杂交和酶学领域中开发了基于 FRET 的检测分析。综述了几种形式的 FRET 杂交分析

(Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, Inc., San Diego 1992, pp. 311-352)。猝灭还可以通过非-FRET 机理例如碰撞猝灭发生(参见, Wei 等, Anal. Chem. 66: 1500-1506 (1994))。

包括报道分子荧光团和猝灭剂的寡核苷酸探针典型地为非荧光的。但是, 通过发射检测性荧光, 在发生杂交之后, 这样的寡核苷酸探针能够报道靶序列的存在。因为杂交或 PCR 处理改变了寡核苷酸探针的构象或将染料从探针中经酶催化裂开, 报道分子荧光团和猝灭剂变为物理上分开, 并由此恢复荧光。使用在“实时”PCR 中发生 DNA 扩增时变成荧光的寡核苷酸探针的分析格式详细描述于 Tyagi 等, Nat. Biotech., 16: 49-53 (1998) 和 Lee 等, Nucl. Acid Res., 21: 3761-3766 (1993) 中。可以在实时 PCR 中用作 DNA 探针的荧光团-寡核苷酸-猝灭剂共轭物还详细地描述于美国专利 6,727,356、6,653,473 和 6,323,337 中。

但是, 荧光染料和猝灭剂基本上可以改变核酸探针的物理性质, 原因在于它们通常为疏水的性质。在探针具有多于一种共轭到其上的染料时, 或者当探针含有富含嘌呤的序列或其它疏水性残基如小沟结合体或嵌入剂时, 这是一个特别难的问题。

通过将含有几个极性基团, 通常是磺酸基团的染料引入到探针中, 部分地解决了此问题。磺酸基团使染料分子带负电荷, 并且由于磺酰基部分赋予的增强极性, 该电荷降低了分子形成聚集体的固有趋势[Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S. R., Lewis C.J., Waggoner A.S. (1993) Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. Bioconj. Chem. 4: 105-111]。环磺化也提高了在水性介质中的许多染料的亮度, 所述的染料如 Cy3, Cy5 [Wessendorf M.W., Brelje T.C. (1992) Which fluorophore is brightest? A comparison of staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red and Cyanine 3.18. Histochemistry 98, pp 81-85] Cascade Blue [Whitaker J. E., Haugland R.P., Moore P.L., Hewitt P.C., Resse M., Haugland R. P. (1991) Cascade Blue derivatives: water soluble, reactive, blue emission dyes evaluated as fluorescent labels and tracers. Anal. Biochem. 198, pp 119-130], 并且显著提高了若丹明染料的光稳定性[Panchuk-Voloshina N., Haugland R. P.,

Bishop-Stewart J., Bhalgat M. K., Millard P.J., Mao F., Leung W.-Y., Haugland R.P. (1999) Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J Histochem Cytochem* 47(9), pp 1179-1188]. 这些染料中的一些可以商购自 Molecular Probes, Inc., 并且已知的商标为 Alexa Fluor®染料。这些水溶性染料作为活化的琥珀酰亚胺基(succinimidyl)酯出售, 并且是蛋白和核酸用的通行标记。极性磺酰基荧光染料描述于美国专利 6,130,101、5,268,486 和 6,399,392 中。

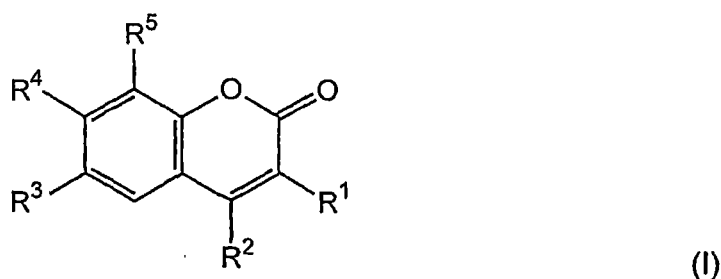
本领域中保留了以下的需要: 提供用于生物染色的极性染料、寡核苷酸探针和共轭到具有增强性质如保留高量子产额和亲水性的极性染料的蛋白, 以及由自动化合成提供这样的染料-标记的探针。

发明简述

本发明提供包含至少一个肿酸酯基的新型染料, 以及共轭到其上的寡核苷酸探针和蛋白。本发明还提供通过自动化合成制备用含肿酸酯的染料标记的寡核苷酸的方法, 以及使用肿酸酯染料标记的寡核苷酸的方法。

因此, 在一个实施方案中, 本发明提供一种极性荧光染料, 其包含被一个或多个肿酸酯基取代的荧光化合物, 所述的荧光化合物具有在 340 nm 和 1100 nm 之间的激发和在 440 和 1150 nm 之间的荧光发射最大值。

在另一个实施方案中, 本发明提供式(I)的化合物:



其中,

R¹ 为氢, 烷基, -CHO, -NO₂, -CH₂R¹¹, -As(=O)(OR⁶)(OR⁷) 或 -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ 或 -L-R_x;

R² 为氢, -CN, 烷基, 芳烷基, 卤代烷基或 -CH₂R¹¹;

R³ 为氢, 烷基, 卤素, -As(=O)(OR⁶)(OR⁷) 或 -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂;

R^4 为 $-NR^{12}R^{13}$, 其中 R^{12} 和 R^{13} 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基或 R^{12} 和 R^{13} 一起形成杂环;

R^5 为氢, 卤素, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基, $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$, 或相邻碳原子的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

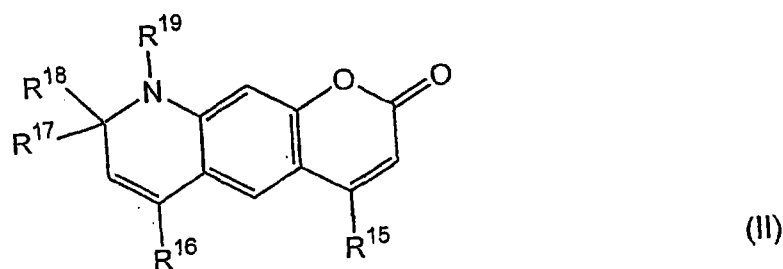
R^{11} 为 $-\text{COOH}$, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双或三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^1 , R^3 , R^5 和 R^{11} 中的至少一个为 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

在另一个实施方案中, 本发明提供式(II)的化合物:



其中,

R^{15} 为氢, 烷基, 芳烷基, 卤代烷基或 $-\text{CN}$;

R^{16} 为 $-\text{CH}_2\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{CH}_2\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6

和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-OC(O)-$ 烷基, $-OC(O)-$ 芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-CH_2CN$, $-CH_2SO_2Me$, $-CH_2SO_2Ph$, 或相邻碳原子的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

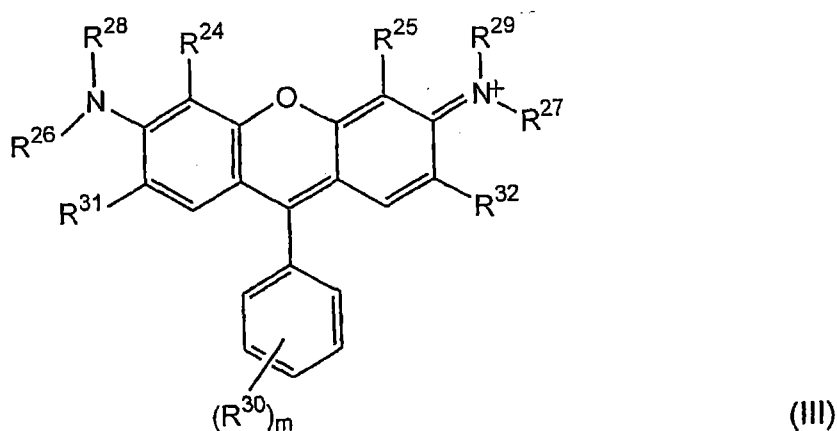
R^{17} 和 R^{18} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基或卤代烷基;

R^{19} 为氢, 任选被羟基、卤素、 $-COOH$ 或 $-SO_2OH$ 取代的烷基, 任选被羟基, 卤素, $-COOH$ 或 $-SO_2OH$ 取代的芳基, 或 $-L-R_x$;

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团。

在另一个实施方案中, 本发明提供式(III)的化合物:



其中, m 为 1、2、3、4 或 5;

R^{24} 和 R^{25} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 卤素, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 和 R^{29} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基或任选被 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 取代的芳基;

R^{31} 和 R^{32} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 卤素, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

每个 R^{30} 独立地为氢, $-C(O)R^{33}$, 卤素, 烷基, 芳烷基, 芳基, 烷硫基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-SO_2R^{33}$, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$, $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 或 $-L-R_x$;

R^{33} 为羟基, $-NH(CH_2)_jSO_3R^{34}$, $-NH(CH_2)_jAs(=O)(OR^{34})_2$, $-NH(CH_2)_jCOOR^{34}$, $-NH(CH_2)_jOR^{34}$ 或 $-NH(CH_2)_jN(R^{34})_2$ (j 为 2-6 之间的整数);

每个 R^{34} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 芳基或杂芳基;

R^{24} 和 R^{28} 可以任选形成 5 或 6-元杂环;

R^{25} 和 R^{29} 可以任选形成 5 或 6-元杂环;

R^{26} 和 R^{28} 可以任选形成任选被 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 取代的 5-9 元杂环;

R^{27} 和 R^{29} 可以任选形成任选被 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 取代的 5-9 元杂环;

R^{26} 和 R^{31} 可以任选形成任选被氢, 烷基 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 取代的 5 或 6-元杂环;

R^{27} 和 R^{32} 可以任选形成任选被氢, 烷基, $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 取代的 5 或 6-元杂环;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

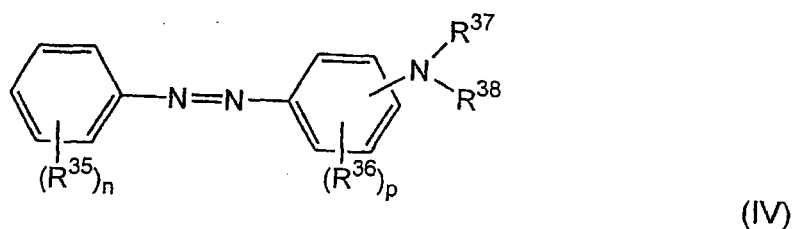
R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-OC(O)-$ 烷基, $-OC(O)-$ 芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-CH_2CN$, $-CH_2SO_2Me$, $-CH_2SO_2Ph$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代; 以及

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^{24} , R^{25} , R^{26} , R^{27} , R^{28} , R^{29} , R^{30} , R^{31} , R^{32} 和 R^{33} 中的至少一个为或包含 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 。

在另一个实施方案中，本发明提供式(IV)的化合物



其中，

每个 R^{35} 相同或不同，并且独立地为氢，卤素， $-\text{NO}_2$ ， $-\text{CN}$ ， $-\text{SO}_3^-$ ，烷氧基，胺，二烷基胺，单烷基胺， $-\text{N}=\text{N}-R^{39}$ ， $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ ；

n 为 1、2 或 3；

p 为 1 或 2；

每个 R^{36} 相同或不同，并且独立地为氢，卤素， $-\text{NO}_2$ ， $-\text{CN}$ ， $-\text{SO}_3^-$ ，烷氧基，胺，二烷基胺，单烷基胺， $-\text{N}=\text{N}-R^{39}$ ， $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ ；

R^6 和 R^7 相同或不同，并且独立地为 H，烷基，芳基，或杂芳基；或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环，所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子，其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3)，其中每个 R^8 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基， $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基， $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基，烷基，芳基，烷基羰基，芳基羰基， $-\text{CH}_2\text{CN}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ ，或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基，或同一碳上的两个 R^8 形成氧代；

R^{37} 和 R^{38} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，芳烷基，芳基或 $-\text{L}-\text{R}_x$ ；

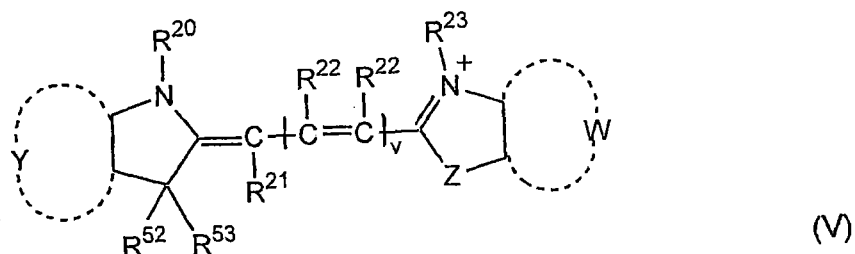
R^{39} 为任选被一个或多个 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 取代的芳基或杂芳基；

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团，

条件是, R^{35} 和 R^{36} 中的至少一个为 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

在另一个实施方案中, 本发明提供式(V)的化合物:



其中,

v 为 0、1、2、3、4、5 或 6;

Y 表示形成每个环中具有 6 个原子的一个或两个稠合芳族环所需要的原子, 每个环原子相同或不同, 并且独立地为 $=\text{CR}^{46}-$, $=\text{N}^+\text{R}^{47}-$ 或 $=\text{N}-$;

W 表示形成每个环中具有 6 个原子的一个或两个稠合芳族环所需要的原子, 每个环原子相同或不同, 并且独立地为 $=\text{CR}^{46}-$, $=\text{N}^+\text{R}^{47}-$ 或 $=\text{N}-$;

Z 为 $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{Se}-$, $-\text{C}(\text{R}^{48})_2$ 或 $-\text{NR}^{49}-$;

R^{20} 和 R^{23} 相同或不同, 并且独立地为烷基, 芳烷基或被以下基团取代的取代烷基: 羟基、氰基、硝基、氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 、 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、烷氧基、单烷基氨基、二烷基氨基或三烷基铵, 或 $\text{L}-\text{R}_x$;

R^{52} 和 R^{53} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 被以下基团取代的烷基: 羟基、 $-\text{COOH}$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 或 $\text{L}-\text{R}_x$;

R^{21} 和每个 R^{22} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 烷氧基, 羟基, 巯基, 芳氧基, 杂环, 亚胺离子, $\text{L}-\text{R}_x$, 或两个相邻的 R^{21} 和 R^{22} 或任何两个相邻的 R^{22} 形成 4、5 或 6 元碳环, 任选被烷基, 卤素或氧代取代; 或彼此相距一个碳的两个 R^{22} 与它们连接的碳一起形成 4、5 或 6 元碳环, 任选被以下基团取代: 烷基, 卤素, 烷硫基, 芳硫基, 烷氧基, 芳氧基, 氧代 ($=\text{O}$), $=\text{S}$ 或 $=\text{C}(\text{R}^{50})_2$;

每个 R^{46} 和 R^{47} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，芳基，卤素，氰基，硝基，胺，烷基氨基，二烷基氨基，磺酰基，磷酰基， $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ ， $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 或 L-R_x ；

每个 R^{48} 和 R^{49} 相同或不同，并且独立地为氢或任选被以下基团取代的烷基：羟基、 $-\text{COOH}$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ ，或 L-R_x ；

每个 R^{50} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，氰基， $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}^{48}$ ；

R^6 和 R^7 相同或不同，并且独立地为 H，烷基，芳基，或杂芳基；或

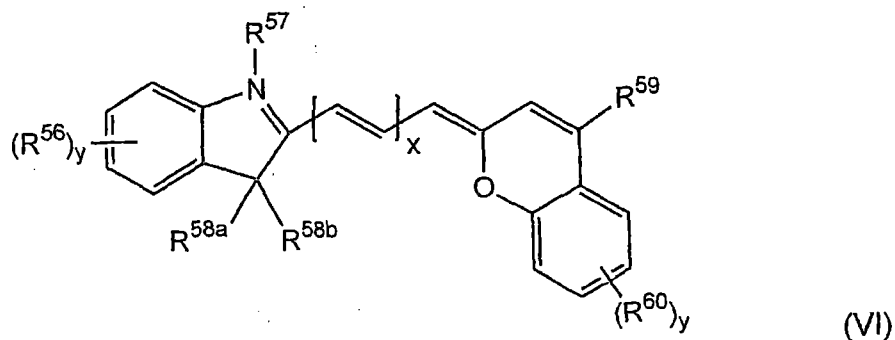
R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环，所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子，其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3)，其中每个 R^8 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基， $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基， $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基，烷基，芳基，烷基羰基，芳基羰基， $-\text{CH}_2\text{CN}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ ，或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基，或同一碳上的两个 R^8 形成氧代；

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团，

条件是， R^{20} ， R^{23} ， R^{46} ， R^{47} ， R^{48} ， R^{49} ， R^{52} 和 R^{53} 中的至少一个为 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

在另一个实施方案中，本发明提供式(VI)的化合物：



其中，

y 为 1、2 或 3;

x 为 0、1、2 或 3;

每个 R^{56} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基, $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

R^{57} 为烷基, 芳烷基或被以下基团取代的烷基: 羟基、氰基、硝基、氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 、 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、烷氧基、单烷基氨基、二烷基氨基或三烷基铵, 或 L-R_x ;

R^{58a} 和 R^{58b} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 被以下基团取代的烷基: 羟基、 $-\text{COOH}$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 或 L-R_x ;

R^{59} 为氢, 烷基或芳烷基;

每个 R^{60} 相同或不同, 并且独立地为氢, $-\text{NR}^{61a}\text{R}^{61b}$, 烷基, 芳基, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$, $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

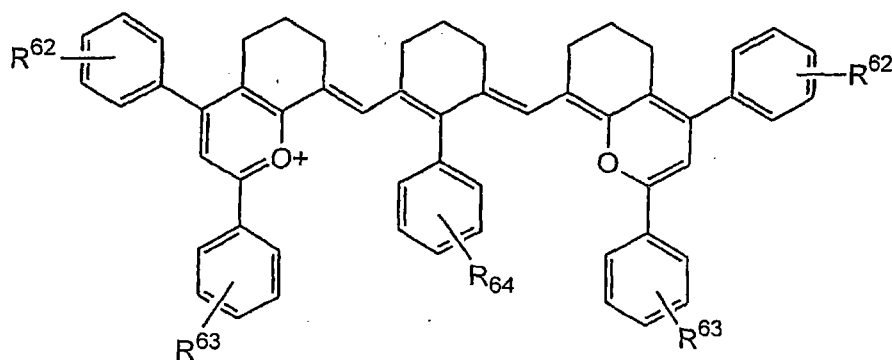
每个 R^{61a} 和 R^{61b} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 被以下基团取代的烷基: 羟基、 $-\text{COOH}$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 或 L-R_x ;

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^{56} , R^{58a} , R^{58b} , R^{60} 和 R^{61a} 和 R^{61b} 中的至少一个为或包含 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

在另一个实施方案中, 本发明提供式(VII)的化合物:



(VII)

其中,

每个 R^{62} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 烷基, 被以下基团取代的烷基: 羟基、 $-\text{COOH}$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 或 L-R_x ;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基, $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

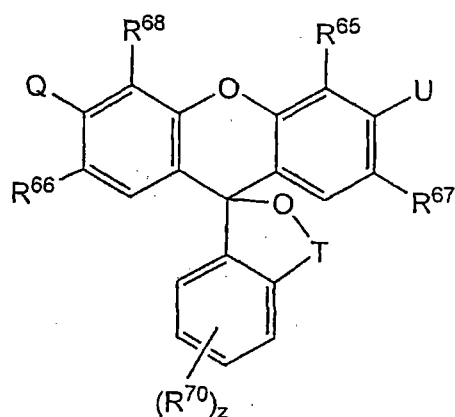
每个 R^{63} 和 R^{64} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 烷基, 被以下基团取代的烷基: 羟基、 $-\text{COOH}$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 或 L-R_x ;

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^{62} , R^{63} 和 R^{64} 中的至少一个为或包含 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

在另一个实施方案中, 本发明提供式(VIII)的化合物:



(VIII)

其中,

z 为 1、2 或 3;

T 为 $>C=O$ 或 $>S(=O)_2$;

Q 为 $-OR^{71}$ 或 $-NR^{72}R^{73}$;

U 为 $-OR^{74}$ 或 $-NR^{75}R^{76}$;

每个 R^{68} 和 R^{65} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, 烷基, 芳基或 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

每个 R^{66} 和 R^{67} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, 烷基或 $L-R_x$;

每个 R^{70} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 烷基, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$, $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 或 $L-R_x$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-OC(O)$ -烷基, $-OC(O)$ -芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-CH_2CN$, $-CH_2SO_2Me$, $-CH_2SO_2Ph$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

每个 R^{71} 和 R^{74} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基羰基或芳基羰基;

每个 R^{72} , R^{73} , R^{75} 和 R^{76} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基或芳基;

或

R^{71} 和 R^{68} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环; 或

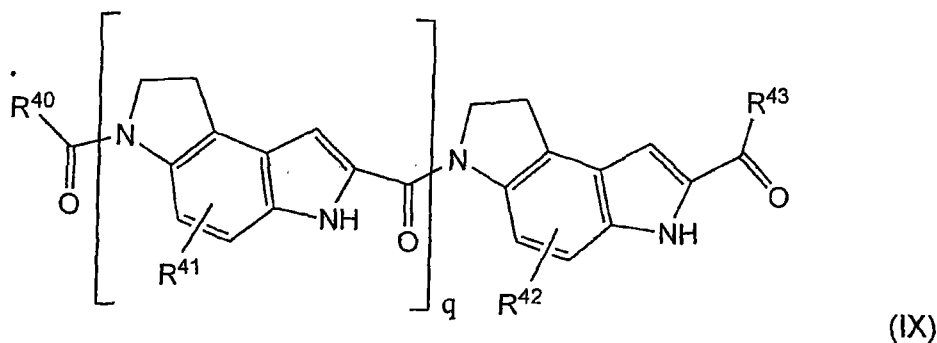
R^{74} 和 R^{65} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环；或
 R^{72} 和 R^{68} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环；或
 R^{73} 和 R^{66} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环；或
 R^{75} 和 R^{65} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环；或
 R^{76} 和 R^{67} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环；

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团，

条件是， R^{65} ， R^{65} ， R^{67} ， R^{68} 和 R^{71} 中的至少一个为或包含 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

在另一个实施方案中，本发明提供式(IX)的化合物：



其中，

R^{40} 和 R^{43} 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氨基，烷基，芳基，烷氧基或 $-\text{L}-\text{R}_x$ ，条件是 R^{40} 和 R^{43} 中的至少一个为 $-\text{L}-\text{R}_x$ ；

每个 R^{41} 独立地为氢，卤素，羟基，磺酰基，磷酰基， $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ ；

R^6 和 R^7 相同或不同，并且独立地为 H，烷基，芳基，或杂芳基；或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环，所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子，其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $-\text{C}(\text{R}^8)_w-$ (w 为 2 或 3)，其中每个 R^8 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基， $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基， $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基，烷基，芳基，烷基羰基，芳基羰基， $-\text{CH}_2\text{CN}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ ， $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ ，或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基，

或同一碳上的两个 R^8 形成氧代；

q 为 0、1 或 2；

R^{42} 为氢，卤素，羟基， $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ ；

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团，

条件是， R^{41} 和 R^{42} 中的至少一个为 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

在一个方面，本发明提供一种寡核苷酸共轭物，其包含被具有肿酸酯基的染料取代的寡核苷酸。

具体地，该染料为具有在 340 nm 和 1100 nm 之间的激发和在 440 和 1150 nm 之间的荧光发射最大值的荧光染料，或该染料为非荧光猝灭剂，其适于在寡核苷酸结合到靶之前吸收由报道荧光团发射的荧光。典型地，该染料由式(I-VIII)中的任何一个表示。在一个实施方案中，该寡核苷酸还可以包含 MGB 基团。典型地，所述的 MGB 基团被极性肿酸酯基取代。

在再一个实施方案中，本发明提供一种寡核苷酸共轭物，其中所述的寡核苷酸为选自分子标志，Scorpion®探针，sunrise 探针，构象辅助的探针和 TaqMan™ 探针中的探针。

在另一个方面，本发明提供一种直接检测靶核酸的方法，该方法包括：提供染料-标记的寡核苷酸探针，该探针包括共轭到式(I-III)和(V-VIII)中的一种或多种染料化合物的寡核苷酸，所述的寡核苷酸还任选包含任选被一个或多个极性肿酸酯基取代的 MGB；将所述染料-标记的寡核苷酸探针加入到生物样品中，其中所述的探针对于靶核酸是互补的或基本上互补的；在适宜的条件下和足够量的时间，使所述的探针与靶核酸杂交；和检测由所述染料发出的荧光。

在另一个方面，本发明提供一种使用 R_x 为亚磷酰胺基团的式(I)-(VIII)中任何一种的染料试剂在自动化合成中制备寡核苷酸的方法，该方法包括：使用亚磷酰胺法进行寡核苷酸的自动化合成，以提供染料-标记的寡核苷酸；将染料-标记的寡核苷酸的 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 脱

保护, 以提供具有选自 $-\text{AsO}_3^{2-}$ 或 $-\text{AsO}_3\text{H}^-$ 中的带负电荷的极性基团的染料-标记的寡核苷酸; 以及将所述染料-标记的寡核苷酸与反应介质分离。

在再一个方面, 本发明提供一种使用 TaqMan 分析检测现实生活中的靶序列扩增的方法, 该方法包括: 提供染料-标记的寡核苷酸探针, 该探针包含共轭到式(IV)的猝灭剂染料和式(I-III)和(V-VIII)中的任何一种的荧光染料的寡核苷酸, 每种染料具有一个或多个极性磷酸酯基, 其中所述的探针处于使荧光染料由猝灭剂染料猝灭的构象; 将所述的染料-标记的寡核苷酸探针加入到 PCR 反应介质中; 在靶存在时, 运行 PCR 温度循环, 以使所述的探针与所述的靶杂交, 并且由 Taq 聚合酶裂开; 以及从裂开的染料实时读出荧光信号。

在又一个方面, 本发明提供一种使用 Molecular Beacon 分析检测现实生活中的靶序列扩增的方法, 该方法包括以下步骤: 提供染料-标记的寡核苷酸探针, 该探针包含共轭到式(IV)的猝灭剂染料和式(I-III)和(V-VIII)中的任何一种的荧光染料的寡核苷酸, 每种染料具有一个或多个极性磷酸酯基, 其中所述的探针处于使荧光染料由猝灭剂染料猝灭的构象; 将所述的染料-标记的寡核苷酸探针加入到 PCR 反应介质中; 在靶存在时, 运行 PCR 温度循环, 以使所述的探针与所述的靶杂交, 从而分离所述的荧光染料和猝灭剂染料; 以及从未猝灭的荧光染料实时读出荧光信号。

在再又一个方面, 本发明提供一种使用 Scorpion Probe 分析检测现实生活中的靶序列扩增的方法, 该方法包括: 提供染料-标记的寡核苷酸探针, 该探针包含引物、共轭到式(IV)的猝灭剂染料和式(I-III)和(V-VIII)中的任何一种荧光染料的寡核苷酸, 每种染料具有一个或多个极性磷酸酯基, 其中所述的探针处于使荧光染料由猝灭剂染料猝灭的构象; 将所述的染料-标记的寡核苷酸探针加入到 PCR 反应介质中; 运行 PCR 温度循环, 以使所述的引物与靶 DNA 杂交, 从而扩延在靶 DNA 上的探针; 使扩延的探针热变性, 这使得猝灭剂染料解离; 使扩延的探针冷却以进行内部重排, 这使得荧光染料以靶特异性的方式发荧光; 以及从荧光染料实时读出荧光信号。

附图简述

图 1 和图 2 表示大量可商购的含磺酰基染料。

图 3 所示为将染料磺酸类保护成为含磺酸酯基的染料和脱保护生成的酯的机理。

图 4 所示为使用自动化合成，用于将磺酸酯染料结合入寡核苷酸中的式(III)的亚磷酰胺试剂的合成途径。

图 5 所示为一种含有受保护的磺酸酯基的式(VI)的小沟结合体中间体用的合成途径，该基团用于附着到固体载体、染料和/或寡核苷酸上。

图 6 所示为另一种含有受保护的磺酸酯基的式(VI)的小沟结合体中间体用的合成途径，该基团用于附着到固体载体、染料和/或寡核苷酸上。

图 7 所示为极性荧光猝灭磺酸若丹明染料，活化酯试剂。

图 8 所示为适宜于自动化合成的酯保护的磺酸咕吨染料亚磷酰胺。

图 9 所示为用于通过自动化合成引入到寡核苷酸中的酯保护的磺酸咕吨荧光染料，和结合有胺、硫代和二烯的溶液。

图 10 所示为在用于寡核苷酸自动化合成的固体载体上的极性荧光猝灭磺酸酯偶氮染料。

图 11 所示为磺酸羰花青染料 G1 (1.25mM，在 pH 8.0 10mM Tris 缓冲液中)的激发和发射光谱。

图 12 所示为用 25%的氨水在 20°脱保护模型双频哪醇保护的偶氮染料的动力学。

发明详述

如上所述，本发明涉及新型的荧光染料、猝灭剂和具有增强极性的小沟结合体。本发明还涉及在自动化合成条件下制备标记有极性磺酸酯染料的寡核苷酸探针的方法。

1. 定义

如本文所用的，下列术语具有如下含义：

"烷基"是指直链或支链、非环状或环状、不饱和或饱和的含有 1 至 10 个碳原子的脂族烃基，而术语"低级烷基"具有与烷基相同的含义，但是含有 1 至 6 个碳原子。代表性的饱和直链烷基包括甲基，乙基，正丙基，正

丁基, 正戊基, 正己基等; 而饱和支链烷基包括异丙基, 仲丁基, 异丁基, 叔丁基, 异戊基等。代表性的饱和环状烷基包括环丙基, 环丁基, 环戊基, 环己基, $-\text{CH}_2$ -环己基等; 而不饱和环状烷基包括环戊烯基, 环己烯基, $-\text{CH}_2$ -环己烯基等。环状烷基在本文中也可称作“环烷基”。不饱和烷基在相邻的碳原子之间含有至少一个双键或三键(分别称作“链烯基”或“炔基”)。代表性的直链和支链链烯基包括乙烯基, 丙烯基, 1-丁烯基, 2-丁烯基, 异丁烯基, 1-戊烯基, 2-戊烯基, 3-甲基-1-丁烯基, 2-甲基-2-丁烯基, 2,3-二甲基-2-丁烯基等; 而代表性的直链和支链炔基包括乙炔基, 丙炔基, 1-丁炔基, 2-丁炔基, 1-戊炔基, 2-戊炔基, 3-甲基-1-丁炔基等。除非另外指出, 本发明的烷基可以任选被任何一个或多个如本文定义的“取代基”取代。

“芳烷基”是指被芳基取代的烷基。烷基和芳基如本文所定义。除非另外指出, 本发明的芳烷基可以任选被任何一个或多个如本文定义的“取代基”取代。

“烷氧基”是指式-O-烷基的基团。实例包括甲氧基, 乙氧基, 丙氧基, 异丙氧基, 环丙氧基, 环己氧基等。低级-烷氧基是指含有 1 至 5 个碳的基团。

“酰基”是指式-C(=O)-R 的基团, 其中 R 为烷基, 芳基, 烷氧基, 芳氧基, 杂环或杂芳基, 而烷基, 芳基, 烷氧基, 芳氧基, 杂环和杂芳基如本文所定义。代表性的酰基包括乙酰基, 苯甲酰基, 丙酰基, 异丁酰基, 叔丁氧羰基等。

“芳基”是指任选取代的苯基或萘基。芳基的示例取代基包括下列基团中的一个或多个: 卤素, 羟基, 烷氧基, 芳氧基, 杂芳氧基, 氨基, 烷基氨基, 二烷基氨基, 烷基磺酰基, 巯基, 烷硫基, 芳硫基, 杂芳硫基, 氰基, 羧基, 烷氧基部分含有 1 至 15 个碳的烷氧基羰基, 芳氧基部分含有 6 至 20 个碳的芳氧基羰基, 或杂芳基部分含有 3 至 15 个碳的杂芳基羰基。除非另外指出, 本发明的芳基可以任选被任何一个或多个如本文定义的“取代基”取代。

“芳氧基”是指式-O-芳基的基团。芳氧基的一个实例为苯氧基。

“烷基羰基”是指式-C(O)-烷基的基团。实例包括甲基羰基, 乙基羰基等。

"芳基羰基"是指式-C(O)-芳基的基团。实例包括苯基羰基和萘基羰基。

"氨基烷基"是指烷基的子集，其中一个或多个氢被氨基置换。氨基的氢可以进一步被一个或多个烷基，芳基，环烷基，杂环或杂芳基取代。

"单烷基氨基"和"二烷基氨基"是指氨基，其中一个或两个氢分别被烷基取代。

"三烷基铵"是指式-N⁺(烷基)₃的阳离子。

"烷硫基"是指式-S-烷基的基团。烷基如本文中所定义。

"芳硫基"是指式-S-芳基的基团。芳基如本文中所定义。

"2-氰基烷基"是指烷基的子集，其中一个或多个氢被氰基置换。2-氰基烷基的实例为氰基乙基。

"碳环"是指只含有碳环原子的 3-7 元单环或 7-至 14-元双环或三环的环，其是饱和的，部分饱和的(未饱和的)或芳族的。碳环可以进一步被 1 至 5 个如本文定义的取代基取代。芳族碳环在本文中也称作"芳基"。碳环的实例是碳环基团，包括但不限于环己烷，环己烯，降冰片烷，降冰片烯，双环[2.2.2]辛烷，苯基，萘基，2,3-二氢化茚基，茚基，甘菊环基，茱基，蒽基等。除非另外指出，本发明的碳环可以任选被任何一个或多个如本文定义的"取代基"取代。

"吸电子基团"是指缺少电子或带正电荷的部分。实例包括 CN，NO₂，-S(O)₂-烷基和-N⁺(烷基)₃。

"卤代烷基"是指烷基的子集，其中一个或多个氢被卤素置换。卤代烷基的一个实例为三氟甲基。

"卤素"是指氟、氯、溴或碘。

"杂环"是指 5-至 7-元单环，或 7-至 10-元双环的杂环，其是饱和的、不饱和的或芳族的，并且其含有 1 至 4 个独立地选自氮，氧，硫和砷中的杂原子，并且其中的氮和硫杂原子可以任选被氧化，并且氮杂原子可以任选被季铵化，包括其中上述的任何杂环稠合到苯环上的双环。杂环可以任选被 1-5 个取代基取代。杂环可以通过任何杂原子或碳原子连接。芳族杂环也称作"杂芳基"。代表性杂芳基有：呋喃基，苯并呋喃基，噻吩基，苯并噻吩基，吡咯基，吲哚基，异吲哚基，氮杂吲哚基，吡啶基，喹啉基，异喹啉基，噁唑基，异噁唑基，苯并噁唑基，吡唑基，咪唑基，苯并咪唑

基, 噻唑基, 苯并噻唑基, 异噻唑基, 哒嗪基, 嘧啶基, 吡嗪基, 三嗪基, 噌啉基, 2,3-二氮杂萘基, 三唑基, 四唑基, 噁二唑基, 苯并噁二唑基, 噻二唑基, 吲唑基和喹唑啉基。除了上面所列出的杂芳基之外, 杂环还包括吗啉基, 吡咯烷酮基(pyrrolidinonyl), 吡咯烷基, 哌啶基, 哌嗪基, 乙内酰脲基, 戊内酰胺基, 环氧乙烷基(oxiranyl), 氧杂环丁烷基, 四氢呋喃基, 四氢吡喃基, 四氢吡啶基, 四氢嘧啶基(tetrahydroprimidinyl), 四氢噻吩基, 四氢噻喃基, 四氢嘧啶基, 四氢噻吩基, 四氢噻喃基等。除非另外指出, 本发明的杂环可以任选被任何一个或多个如本文定义的“取代基”取代。

"氧代"是指=O。

"磺酰基"是指式-SO₃R 的基团, 其中 R 为氢, 烷基, 芳基, 杂芳基或生物学上相容的阳离子。"烷基磺酰基"是指式-SO₃-烷基的基团, 烷基如本文中所定义。

"磷酰基"是指式-P(=O)(OR')(OR'')的基团, 其中 R'和 R''中的每一个相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 芳基, 杂芳基或生物学上相容的阳离子。

如本文所用的术语"取代的"是指任何上述的基团(例如, 烷基, 烷氧基, 芳基, 杂芳基和杂环), 其中至少一个氢原子被取代基所置换。相关的术语"取代基"是指卤素, 羟基, 烷基, 芳基, 烷氧基, 芳氧基, 酰基, 烷基磺酰基, 巯基, 氰基, 硝基, -COOH, 烷硫基, 芳硫基, 杂芳硫基, 杂芳基, 杂环, -NR_aR_b, -NR_aC(=O)R_b, -NR_cC(=O)NR_aR_b, -NR_aC(=O)OR_b, -NR_aSO₂R_b, -C(=O)NR_aR_b, -OC(=O)R_a, -OC(=O)OR_a, -OC(=O)NR_aR_b, -NR_aSO₂R_b 或式-J-G-R_a的基团, 其中 J 为链烷二基, 取代的链烷二基或直接键, 链烷二基是指从相同或不同的碳原子中取走两个氢原子的二价烷基, G 为-O-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)₂-, -N(R_b)-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -N(R_b)C(=O)-, -C(=O)N(R_b)-或直接键, 其中 R_a, R_b 和 R_c 相同或不同, 并且独立地为氢, 氨基, 烷基, 取代的烷基(包括卤代烷基), 芳基, 取代的芳基, 杂芳基, 取代的杂芳基, 杂环或取代的杂环, 或其中 R_a 和 R_b 与它们连接的氮原子一起形成杂环或取代的杂环。

"荧光团"是指在约 400 和 1150 nm 之间具有荧光发射最大值的化合物。

典型地, 荧光团是具有扩延共轭体系的化合物, 其中可以将电子离开原位。这些化合物包括, 在括号中的为以 nm 表示的发射最大值, Cy2TM (506), GFP (红移的) (507), YO-PROTM-1 (509), YOYTM-1 (509), 钙黄绿素(517), FITC (518), FluorXTM (519), AlexaTM (520), 若丹明 110 (520), 5-FAM (522), Oregon GreenTM 500 (522), Oregon GreenTM 488 (524), RiboGreenTM (525), Rhodamine GreenTM (527), 若丹明 123 (529), Magnesium GreenTM (531), Calcium GreenTM (533), TO-PROTM-1 (533), TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPY® 530/550 (550), Dil (565), BODIPY® (568), BODIPY® 558/568 (568), BODIPY® 564/570 (570), Cy3TM (570), AlexaTM 546 (570), TRITC (572), Magnesium OrangeTM (575), 藻红素 R&B (575), 若丹明毒伞素(575), Calcium OrangeTM (576), 焦宁 Y (580), 若丹明 B (580), TAMRA (582), Rhodamine RedTM (590), Cy3.5TM (596), ROX (608), Calcium CrimsonTM (615), AlexaTM 594 (615), Texas Red® (615), 尼罗红(628), YO-PROTM-3 (631), YOYOTM-3 (631), R-藻青素(642), C-藻青素(648), TO-PROTM-3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5TM (670), 噻二羰菁 (671), Cy5.5 (694)。对于本发明, 可以用一个或多个带负电荷的基团如荧光团肿酸酯基修饰荧光团。如上所述, 即使已经共轭到生物物质如寡核苷酸上之后, 这些修饰荧光团增强的极性也倾向于保留它们的高量子产额。

"寡核苷酸"是指约 3-100 个核苷酸单元的低聚物。核苷酸单元包括在核酸中天然发现的全部主要杂环碱基(尿嘧啶, 胞嘧啶, 胸腺嘧啶, 腺嘌呤和鸟嘌呤)以及这些碱基的天然出现和合成的变体和同类物如次黄嘌呤, 2-氨基腺嘌呤, 2-硫尿嘧啶, 2-硫胸腺嘧啶, 5-N⁴ 乙烯胞嘧啶, 4-氨基吡唑并[3,4-d]嘧啶和 6-氨基-4-羟基[3,4,d]嘧啶。"糖"或寡核苷酸的糖苷部分可以包含脱氧核糖, 核糖, 2-氟核糖, 2-O 烷基或链烯基核糖, 其中烷基可以含有 1 至 6 个碳并且链烯基可以含有 2 至 6 个碳。在天然出现的核苷酸中和在本文中描述的变体和同类物中, 脱氧核糖或核糖部分形成呋喃糖环, 糖基连接键为β构型, 并且嘌呤碱基通过 9 位连接到糖部分上, 通过 1 位连接到嘧啶上, 并且通过 1 位连接到吡唑并嘧啶上。目前, 根据本发明优选寡脱氧核糖核苷酸(ODN), 因此优选的糖是 2-脱氧核糖。如本领域周知的, ODN 的核苷酸单元由"磷酸"骨架互相连接。"寡核苷酸共轭物"

通常是指共价结合到另一种有机部分如染料化合物的寡核苷酸。

如本文广泛使用的术语"染料"是指可检测的染料化合物，典型地共轭到生物物质如寡核苷酸或小沟结合体上。染料-共轭的生物物质在本文中也称作"染料-标记的"生物物质。对于本发明，染料可以是荧光染料，猝灭剂染料或 IR 染料。

在生物物质中还存在猝灭剂时，荧光染料对包括报道分子荧光团的荧光团组分具有它们高灵敏的可检测性。术语"荧光团"如上所定义。典型地，荧光染料具有在 340 nm 和 1100 nm 之间的激发和在 440 和 1150 nm 之间的荧光发射最大值。

猝灭剂染料或"猝灭剂"，是指非荧光发色团，其被配置成从激发的报道分子荧光团抽出能量电势(energy potential)的形式，从而报道分子荧光团不发射。在本发明中，典型地将猝灭剂偶合至寡核苷酸或具有小沟结合体(MGB)的寡核苷酸上。

本发明的 IR 染料在 UV-Vis 区域吸收，并且在近 IR 区域(780-1150 nm)发射。典型地，IR 辐照被称作"热射线"，因为该染料在近 IR 区域看不见地"照耀"，并且在可见区如同非常热的金属。因此，如同用于生物标记的常规光学染料，IR 染料标记在不可见区发光，并且可以由现代光学电子仪器检测到。

"接头"是指将荧光团连接到被共轭的物质的共价键的各种基团。共价键可以是稳定化学键的组合，所述的化学键任选包括单、双、三或芳族碳-碳键，以及碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键，碳-硫键，磷-氧键和磷-氮键。接头典型地至少为双官能的，即它包含两个官能团，其中一个用于结合荧光团，另一个用于结合活性基团。结合典型地导致羧酸酯，酰胺，醚，硫醚，磺酰胺，脲，氨基甲酸酯或亚磷酰胺部分的形成。例如，许多荧光团具有羧酸或磺酸基，使得它们容易通过羧酸酯，羧酸酰胺或磺酰胺部分的形成而偶合到接头上。类似地，接头可以偶合到活性基团上，而活性基团又将共轭到感兴趣的物质上。

典型地，接头具有 1-30 个选自 C, N, O, P 和 S 中的非氢原子；并且由以下键的任何组合组成：醚，硫醚，胺，酯，羧酰胺，磺酰胺，酰肼键和芳族或杂芳族键。共价键可以是线性或环状的，或它们的组合。线性

连接键的实例包括聚亚甲基，聚乙二醇，烷基磺酰基，烷基硫基，氨基醇和二醇。"氨基醇"是指式-NH-Y-O-的二基，其中 Y 为链烷二基或取代的链烷二基；链烷二基是指从不同的碳原子取走两个氢原子的二价烷基。"二醇"是指式-O-Y-O-的二基，其中 Y 如上所定义。具有环状基团的接头典型地包含核苷或修饰的核苷。这些接头典型地可用于寡核苷酸的自动化合成，因为它们可以与亚磷酰胺活性基团缔合，而该活性基团又容易偶合到寡核苷酸扩延的骨架上。在接头中的核苷的核糖基团的 5'-末端羟基能够通过反应序列中与下一个碱基偶合而继续扩延寡核苷酸链。接头中的 5'-末端羟基典型地由 4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMTTr)保护。此外，在核苷接头碱基上的其它基团在自动化合成过程中可以要求保护。找出被保护的位置和所采用的保护试剂在本领域技术人员知识范围之内。典型地将保护基团排除在给定接头中的 1-30 个非氢原子之外，并且不计入到其中。

"活性基团"或" R_x "是指能够反应性地将染料共轭到感兴趣物质上的官能团。典型地，该物质为拥有用于染料共价连接的适宜官能团的"生物物质"或"生物分子"。特别用于共轭到本发明的染料上的适宜"生物物质"或"生物分子"包括，尤其是，抗原，类固醇，维生素，药物，半抗原，代谢物，毒素，环境污染物，氨基酸，肽，蛋白，核酸，核酸聚合物，碳水化合物，脂质，离子络合部分以及非生物聚合物。备选地，生物物质包括细胞，细胞体系，细胞碎片或亚细胞粒子。实例包括，尤其是，病毒粒子，细菌粒子，病毒成分，生物细胞(如动物细胞，植物细胞，细菌，酵母或原生生物)，或细胞成分。优选生物物质为寡核苷酸，氨基酸，肽，蛋白，酪胺，多糖，离子络合部分，核苷酸，核酸聚合物，半抗原，药物，激素，脂质，脂质集群，聚合物，聚合微粒，生物细胞或病毒。在一个实施方案中，生物聚合物如肽，蛋白，寡核苷酸，核酸聚合物的共轭物也标记有第二荧光或猝灭剂染料，包括本发明的额外染料，以形成能量传递对。

更典型地，生物物质为自动化合成中的寡核苷酸或寡核苷酸生长链。该物质还可以包括在寡核苷酸自动化合成中典型采用的固体载体，如 CPG 或聚苯乙烯。用来将染料附着到被共轭的物质的活性基团的选择典型地取决于被共轭的物质上的活性位和期望的共价接头的类型或长度。如上所述，在物质上典型存在的官能团的类型包括但不限于：胺，硫醇，醇，酚，

醛，酮，磷酸酯，咪唑类，二取代的胺，肿酸酯，嘌呤类，嘧啶类，羧酸，或这些基团的组合。可以将寡核苷酸共轭到多于一种的染料上，所述的染料可以相同或不同。例如，可以将猝灭剂染料和报道分子荧光团共轭到同一寡核苷酸上。尽管通过仔细的控制反应条件可以得到一些选择性，但是通过选择具有适宜活性基团的染料，最佳地得到标记的选择性。

典型地， R_x 将与胺，硫醇，醇，醛或酮反应。在一个实施方案中， R_x 为丙烯酰胺，活化的羧酸酯，酰基叠氮化物，酰基腈，醛，烷基卤，胺，酸酐，苯胺，芳基卤，氮丙啶，硼酸酯，羧酸，重氮烷，卤代乙酰胺，卤代三嗪，肼(包括酰肼)，亚氨基酯，异氰酸酯，异硫氰酸酯，马来酰亚胺，亚磷酰胺，磺酰卤，或硫醇基。优选 R_x 为羧酸，琥珀酰亚胺基酯，五氟苯基酯，亚磷酰胺，胺，卤代乙酰胺，肼，异硫氰酸酯，马来酰亚胺基或叠氮基全氟苯甲酰氨基。

在一些实施方案中， R_x ，为羧酸的琥珀酰亚胺基酯或五氟苯基酯，可以特别用于制备染料-寡核苷酸共轭物。这些活化形式的羧酸官能团可以通过寡核苷酸或固体载体上的活性位如胺基而共轭到其上。

在其它的实施方案中， R_x ，为亚磷酰胺，可以特别用于寡核苷酸的自动化合成。亚磷酰胺在温和酸性条件下对于羟基是活性的，并且在自动化寡核苷酸合成中将容易地与寡核苷酸生长链的 5'-末端羟基偶合。代表性亚磷酰胺为氰基乙基亚磷酰胺。

"染料试剂"是指通过接头偶合到活性基团上的染料。染料试剂为可以结合到寡核苷酸序列中的通用位置中的结构单元(building block)。取决于特定的需要，染料试剂可以直接与固体载体的活性位反应，并且引发碱基合成序列的增加。染料试剂还可以与寡核苷酸的生长链反应，并且通过在染料不同部分上的保护羟基而继续扩延该序列。最后，染料试剂还可以用来终止寡核苷酸在 5'-末端处的扩延。如上所述，其中染料被偶合到亚磷酰胺基上的"亚磷酰胺试剂"，可以特别用于自动化寡核苷酸合成。

"极性基团"是指作为整体具有更大的电负性并且具有吸引它与邻近的原子或原子团共享的电子的趋势的原子团。极性基团典型地但不是必须地带负电荷。极性基团的实例包括磺酸($-\text{SO}_3\text{H}$)，膦酸 ($-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$)，肿酸 ($-\text{As}(=\text{O})(\text{OH})_2$)，以及它们的酯和盐。

术语"肿酸酯"通常是指被游离的肿酸($-\text{As}(=\text{O})(\text{OH})_2$)和/或肿酸酯取代的有机部分。术语"肿酸酯"是指游离肿酸的两种保护形式的任何一种。具体而言,肿酸酯可以是由式 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR})_2$ 表示的肿酸二酯,或由式 $-\text{As}(\text{OR})_4$ 表示的原肿酸酯。肿酸二酯可以有利地进行与缩酮形成类似的转变,并且提供由式 $-\text{As}(\text{OR})_4$ 表示的原肿酸酯。

每个R相同或不同,并且独立地为烷基,芳基或杂芳基,并且典型地为烷基-OH,芳基-OH和杂芳基-OH的反应残基。更典型地,肿酸酯的任何两个R基可以连接在一起提供螯合形式。换言之,通过与具有由两个或三个碳原子分开的两个氧原子的螯合剂反应,染料化合物的肿酸取代基可以将转化成其螯合酯形式。这样的螯合剂可以包括乙二醇类,乙醇醛类,乙二醛类,羟基乙酸类,乙醛酸类,丙二醇类,频哪醇(2,3-二甲基-2,3-丁二醇),3-羟基丙醛类,3-羟基丙酸类,丙醛类(malonaldehydes)和焦儿茶酚类。

R基团在肿酸二酯和原肿酸酯中的存在中和了肿酸的电荷,从而提高了标记的染料试剂在自动化寡核苷酸合成中的相容性。如本文将论述的,R基团是容易去除性的,以提供带负电荷的肿酸极性基团。

"烷基肿酸酯"是指被一个或多个肿酸酯基取代的烷基。"芳基肿酸酯"是指被一个或多个肿酸酯基取代的芳基。"杂芳基肿酸酯"是指被一个或多个肿酸酯基取代的杂芳基。

"固体载体"是指与寡核苷酸合成相容的任何载体,包括例如,玻璃,可控孔玻璃(CPG),聚合材料,聚苯乙烯,涂布玻璃等。"固体载体"可以由上面所列的材料制成的珠粒、华夫饼、阵列或芯片的形式使用。

"生物上相容的阳离子"是指生物上相容的、带正电荷的离子,它对于生物分子不具有有害的作用。适宜的阳离子包括,尤其是, Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , Ca^{2+} 和 Mg^{2+} , 铵,烷基铵或烷氧基铵盐,或吡啶鎓盐。

"小沟结合体"(MGB)是指分子量为约150至约2000道尔顿的分子的基团,其以非插入的方式结合入双链的DNA, RNA或它们的杂种中的小沟中,其中缔合常数大于约 10^3M^{-1} 。尽管对于所有已知的小沟结合化合物不能提供通用的化学式,原因在于这样的化合物具有广泛变化的化学结构,但是一般而言,能够结合在DNA小沟中的化合物具有新月形的三维

结构。典型地，MGB 具有通过肽键耦合在一起的几个单元稠合杂环的化学结构。

现有技术的大多数小沟结合化合物对于 B 型双链 DNA 的富 A-T (腺嘌呤和胸腺嘌呤)区具有强烈的偏好。美国专利 5,801,155 公开了，具有共价附着的小沟结合体(MGB)的寡核苷酸比未修饰的寡核苷酸对于它们互补的靶更有序列特异性。此外，MGB-寡核苷酸共轭物，在与未修饰的寡核苷酸相比时，显示出与互补的 DNA 靶链在杂种稳定性方面的实质上提高，从而可以与更短的寡核苷酸杂交。

2. 新型染料和染料试剂

如上所述，具有增强极性的染料主要由于它们高的水溶解度和生物相容性而提供大量有用的应用。具有磺酸极性基团的染料广泛用于标记核酸和蛋白，以及用于染色生物材料。可商购染料的一些实例列于图 1 和 2 中。

从 19 世纪就已知肿酸 $\text{HAs}(=\text{O})(\text{OH})_2$ 的有机衍生物对偶氮染料提供水溶解性。由著名的化学家如 Paul Ehrlich 在寻找新染料和药物中合成出大量的这类化合物。在高极性是基本染料性质时，更低毒性的磺酸酯在下一世纪对于大多数应用成为更普遍的。今天使用相对少量的肿酸染料，主要用于在催化化学和生物医学研究中的应用。周知和广泛使用的试剂 Arsenazo III (2,7-双[(2-肿羧基苯基)偶氮]-1,8-二羟基-3,6-萘二磺酸)，用于测定 Th, U, Zr [Anal. Chim. Acta 71, 375, 1974]和 Cd, Zn [Anal. Chim. Acta 1974, 68, 73]是由 Savvin S. B.于 1959 年合成的[对于综述，参见 Basargin, N. N., Ivanov, V. M., Kuznetsov V. V.和 Mikhailova A. V. "40 Years since the Discovery of the Arsenazo III Reagent" J. Anal. Chem. 55, No. 3, 2000]。已经证明肿酸染料对于蛋白具有具体的亲合力，因此可以用于选择性染色或标记生物材料。肿羧基苯基偶氮蛋白，由肿羧基苯基重氮盐与蛋白反应得到的偶氮染料已经报道具有抗凝剂和抗淋巴瘤性质 [Broome J. D. and Kidd J. G. "The Anticoagulant and Antilymphoma Properties of Arsenic Azoproteins: I. Anticoagulant Effects of Arsenic Azoproteins in Vivo and in Vitro: Comparison of Arsenicals as Anticoagulants and as Antilymphoma Agents: Molecular Structure in Relation to Anticoagulant and Antilymphoma

Properties" J. Exp. Med., 120: 449 -466, 1964]。已经表明偶氮苯基肿酸染料与枯草杆菌蛋白酶形成复合物[Glazer A.N. "The Time-Dependent Specific Interaction of 4-(4'-aminophenylazo)phenylarsonic Acid with Subtilisins" Proc. Nat. Acad. Sci., Biochemistry, 59, 996-1002, 1968]。

上述肿酸染料没有一个是荧光性的。荧光肿酸染料，由于它们的极性和可高度检测的荧光信号，从而在诸如细胞染色和蛋白与核酸标记的技术中提供新的益处。由于它们高度灵敏的荧光信号，这些荧光染料通常在对环境没有或极其微小的影响下以极其低的浓度使用。

已经将三价砷或 As(III)-基的荧光染料用作生物标记，原因在于它们对硫醇的高亲合力(参见例如，美国专利 6,933,384, 6,686,458, 6,451,569, 6,054,271, 6,008,378 和 5,932,474)。但是，对于砷(III)化合物毒性的关注对于它们的应用设置了重大的限制。

五价砷化合物，也称作 As(V)比 As(III)的毒性低许多。因此，本发明提供用一个或多个肿酸或肿酸酯基取代的新型荧光和猝灭剂染料。在染料中存在的每个酯基在脱保护时能够提供负电荷，从而改善了标记有这种染料的寡核苷酸探针的性质。

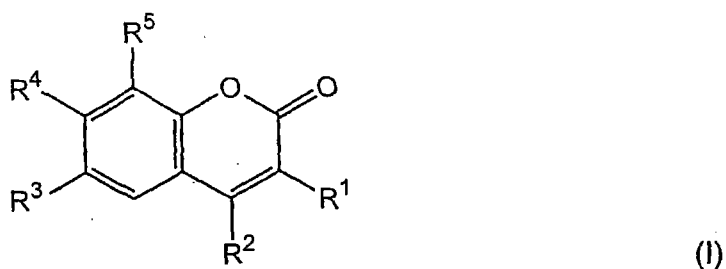
肿酸基可以与大量已知的染料相容。当肿酸基不引起在给定的染料分光光谱性质如激发和发射波长、量子产额或荧光寿命方面的可测量的变化时，肿酸与染料是相容的。可以用肿酸基修饰的染料的实例包括但不限于下列发色团和它们的组合：若丹明类，咕吨类，羰花青类，酞菁类，卟啉类 (porphirins)，三苯基甲烷类，方酸菁 (squaraines)，硫代方酸菁 (thiosquaraines)，克酮鎓(croconium)染料，四唑鎓(tetrazolium)染料，靛蓝，偶氮染料，醌类，吩嗪类和藏红类，吩噻嗪类，香豆素素，菲啉类，吡啶类和吡啶酮类，茚类和茚酮类，4-硼杂-3a,4a-二氮杂-s-indacenes, 1,8-萘二甲酰亚胺类。为了提高极性，其它的取代基可以包括磺酸酯和磷酸酯。具有肿酸基的氟化染料可以显示出增强的极性和亮度，以及增强的光稳定性和荧光的更高量子产额。可以将氟原子引入到杂环中和引入到羰花青桥中。

此外，本发明提供染料试剂，其包含本发明的染料、接头和活性基团。可以将染料试剂反应性地共轭到寡核苷酸，小沟结合体或固体载体上。更

具体而言, 本发明提供修饰的极性荧光和猝灭剂染料试剂, 其中极性肿酸取代基以它们的酯形式被掩蔽。含有肿酸酯的染料可以溶于与寡核苷酸合成的亚磷酰胺方法相容的有机溶剂中。染料负电荷的去除可以使它们结合入自动化寡核苷酸合成中。在合成后恢复负电荷提供标记有带有一个或多个极性基团的染料的寡核苷酸。因此, 可以以将这些亚磷酰胺试剂用于将肿酸酯染料引入到合成寡核苷酸的 5'-端, 内部位置或在使用 5'-亚磷酰胺试剂的相反合成中至 3'-端。在寡核苷酸合成完成之后, 可以将肿酸酯脱保护, 并且负电荷将得到恢复。

因此, 在一个实施方案中, 本发明提供一种具有肿酸酯极性基团的荧光染料, 以及一种包含这样的荧光染料的染料试剂。该荧光染料具有在 340 nm 和 1100 nm 之间激发和在 440 和 1150 nm 之间的荧光发射最大值。

具体地, 在一个实施方案中, 本发明的化合物是被一个或多个肿酸酯基取代的 7-aminocouramine 衍生物。本发明的 7-aminocouramine 染料由下面的通式(I)表示:



其中, R^1 为氢, 烷基, $-CHO$, $-NO_2$, $-CH_2R^{11}$, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 或 $-L-R_x$;

R^2 为氢, $-CN$, 烷基, 芳烷基, 卤代烷基或 $-CH_2R^{11}$;

R^3 为氢, 烷基, 卤素, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

R^4 为 $-NR^{12}R^{13}$, 其中 R^{12} 和 R^{13} 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基或 R^{12} 和 R^{13} 一起形成杂环;

R^5 为氢, 卤素, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$; R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8

相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基，-OC(O)-烷基，-OC(O)-芳基，烷基，芳基，烷基羰基，芳基碳基，-CH₂CN，-CH₂SO₂Me，-CH₂SO₂Ph，或相邻碳原子上的两个 R⁸ 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基，或同一碳上的两个 R⁸ 形成氧代；

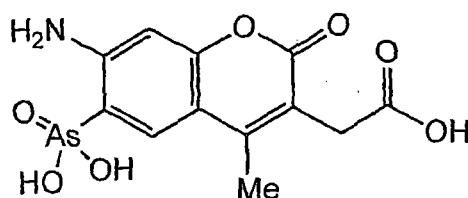
R¹¹ 为-COOH，-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂；

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团，

条件是，R¹，R³，R⁵ 和 R¹¹ 中的至少一个为-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂。

当 R¹ 和 R² 中的至少一个包含-L-R_x 时，式(I)表示可以附着于寡核苷酸，MGB 或固体载体上的肿酸酯染料试剂。典型地，R¹¹ 提供偶合到-L-R_x 部分的活性位。例如，当 R¹¹ 为-COOH 时，可以容易地将该染料偶合到具有-NH₂ 的-L-R_x 部分上，以提供肿酸酯染料试剂。肿酸染料的这种羧酸衍生物的一个实例示于下面：

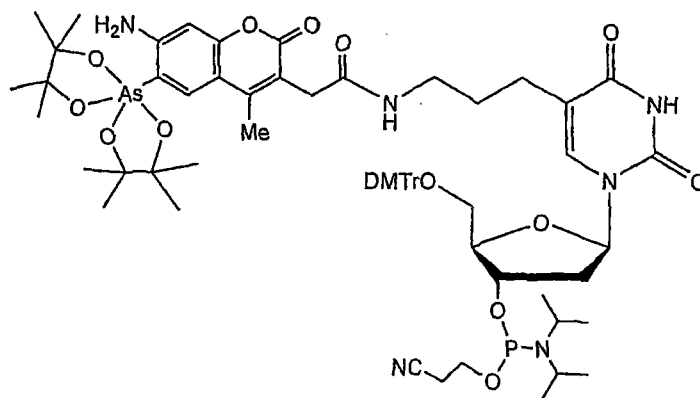


接头为典型地但不是必须地为线性原子团，如亚烷基链。除了具有-NH₂ 基外，接头典型地还具有另一个活性位，以进一步偶合到活性基团 R_x 上。

为了结合到固体载体上，R_x 可以是胺-活性基团，因为大多数商业固体载体如 CPG 具有胺基。胺活性基团的实例包括羧酸和活化羧酸，如琥珀酰亚胺基或五氟苯基羧酸酯。为了结合到寡核苷酸上，特别是在自动化合成过程中，R_x 为亚磷酰胺基。此外，对于自动化寡核苷酸合成，在这类染料试剂中的极性肿酸基典型地以它们的酯形式被掩蔽，具体而言，以它

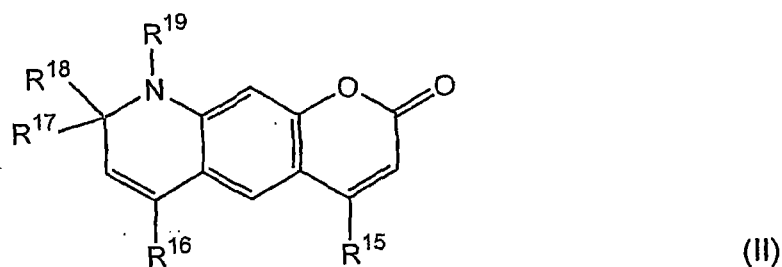
们原肿酸酯形式被掩蔽。

式(I) 染料试剂的一个具体实例具有下面的结构：



在此实例中，7-aminocouramine 被原肿酸酯取代。此外，接头部分包含 5-羟基保护的核苷(例如，2-脱氧尿苷)。活性基团为亚磷酰胺，其在自动化合成过程中可以容易地与寡核苷酸偶合。DMTr 保护的 5-羟基，在脱保护之后，可以继续碱基链的增加，以完成染料标记的寡核苷酸的合成。不同于带负电荷的肿酸基，肿酸酯基与自动化合成中的反应条件相容。

在另一个实施方案中，本发明的化合物由通式(II)表示：



其中，

R^{15} 为氢，烷基，芳烷基，卤代烷基或-CN；

R^{16} 为 $-\text{CH}_2\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{CH}_2\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ ；

R^6 和 R^7 相同或不同，并且独立地为 H，烷基，芳基，或杂芳基；或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环，所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子，其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $-\text{[C(R}^8\text{)]}_w-$ (w 为 2 或 3)，其中每个 R^8 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基， $-\text{OC(O)}-$ 烷基， $-\text{OC(O)}-$ 芳基，

烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

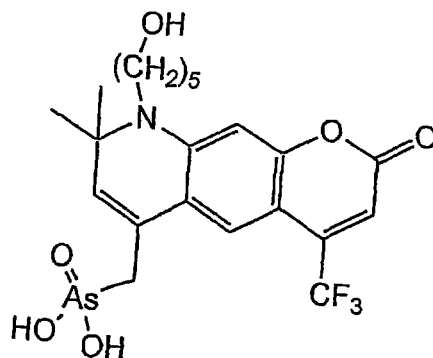
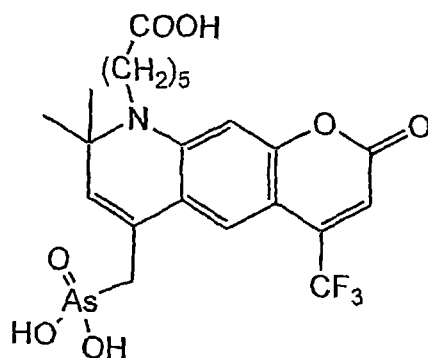
R^{17} 和 R^{18} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基或卤代烷基;

R^{19} 为氢, 任选被羟基、卤素、 $-\text{COOH}$ 或 $-\text{SO}_2\text{OH}$ 取代的烷基, 任选被羟基、卤素、 $-\text{COOH}$ 或 $-\text{SO}_2\text{OH}$ 取代的芳基, 或 $-\text{L-R}_x$;

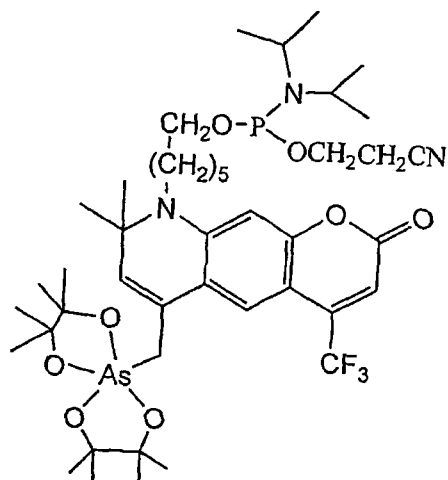
L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团。

典型地, R^{19} 提供偶合到 $-\text{L-R}_x$ 部分的活性位。例如, 当 R^{19} 包含 $-\text{COOH}$ 时, 可以容易地将该染料偶合到具有 $-\text{NH}_2$ 基的 $-\text{L-R}_x$ 部分上, 以提供肿酸酯染料试剂。备选地, R^{19} 可以包含 $-\text{OH}$ 基, 其可以直接偶合到亚磷酰胺基上。下面的实例表示可以容易地转化为染料试剂的染料:

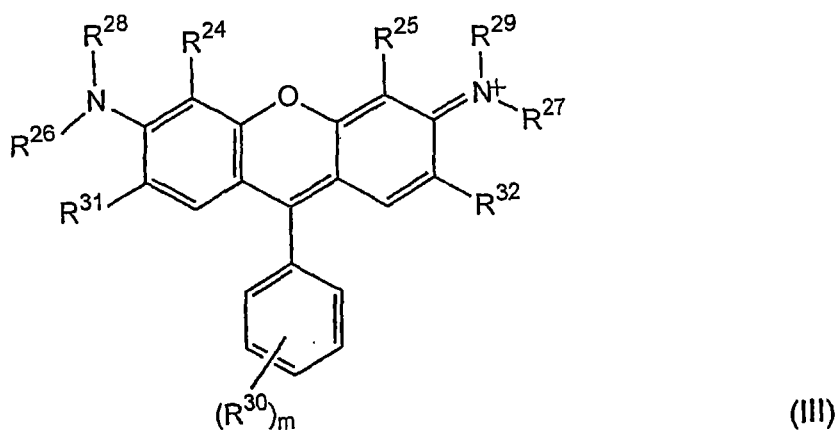


式(II) 染料试剂的一个实例由下面的结构表示:



在此实例中, 接头为亚烷基链, 并且活性基团为亚磷酰胺基。肿酸极性基团以原酯的形式被掩蔽。在自动化寡核苷酸合成中, 它可以用作预定寡核苷酸探针序列中的最后结构单元。

在另一个实施方案中, 本发明的化合物是由一个或多个肿酸酯基取代的若丹明类。这些化合物由下面的通式(III)表示:



其中, m 为 1、2、3、4 或 5;

R^{24} 和 R^{25} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 卤素, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 和 R^{29} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基或任选被

-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂取代的芳基;

R³¹和R³²相同或不同,并且独立地为氢,烷基,卤素,-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂;

每个R³⁰独立地为氢,-C(O)R³³,卤素,烷基,芳烷基,芳基,烷硫基,烷基羰基,芳基羰基,-SO₂R³³, -As(=O)(OR⁶)(OR⁷), -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂或-L-R_x;

R³³为羟基, -NH(CH₂)_jSO₃R³⁴, -NH(CH₂)_jAs(=O)(OR³⁴)₂, -NH(CH₂)_jCOOR³⁴, -NH(CH₂)_jOR³⁴或-NH(CH₂)_jN(R³⁴)₂ (j为2-6之间的整数);

每个R³⁴相同或不同,并且独立地为氢,烷基,芳基或杂芳基;

R²⁴和R²⁸可以任选形成5或6-元杂环;

R²⁵和R²⁹可以任选形成5或6-元杂环;

R²⁶和R²⁸可以任选形成任选被-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂取代的5-9元杂环;

R²⁷和R²⁹可以任选形成任选被-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂取代的5-9元杂环;

R²⁶和R³¹可以任选形成任选被氢,烷基,-CH₂As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-CH₂As(OR⁶)₂(OR⁷)₂取代的5或6-元杂环;

R²⁷和R³²可以任选形成任选被氢,烷基,-CH₂As(=O)(OR⁶)(OR⁷)或-CH₂As(OR⁶)₂(OR⁷)₂取代的5或6-元杂环;

R⁶和R⁷相同或不同,并且独立地为H,烷基,芳基,或杂芳基;或

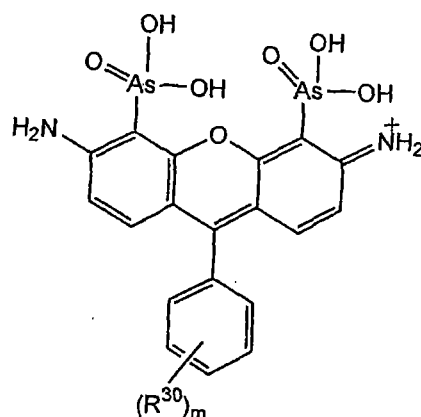
R⁶和R⁷连接在一起形成5或6-元杂环,所述的杂环包含砷和连接R⁶和R⁷的两个氧原子,其中-R⁶-R⁷-为-[C(R⁸)₂]_w- (w为2或3),其中每个R⁸相同或不同,并且独立地为氢,羟基,氰基,-OC(O)-烷基,-OC(O)-芳基,烷基,芳基,烷基羰基,芳基羰基,-CH₂CN, -CH₂SO₂Me, -CH₂SO₂Ph,或相邻碳原子上的两个R⁸与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基,或同一碳上的两个R⁸形成氧代;以及

L为单共价键或具有1-30个选自C、N、O和S中的非氢原子的共价键,并且由以下中的任何组合组成:单、双、三或芳族碳-碳键,碳-氮键,氮-氮键,碳-氧键和碳-硫键;以及

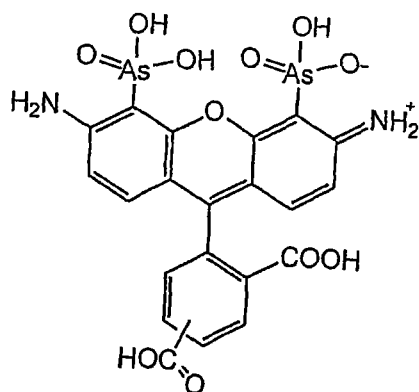
R_x 为活性基团,

条件是, R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 、 R^{30} 、 R^{31} 、 R^{32} 和 R^{33} 中的至少一个为或包含 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

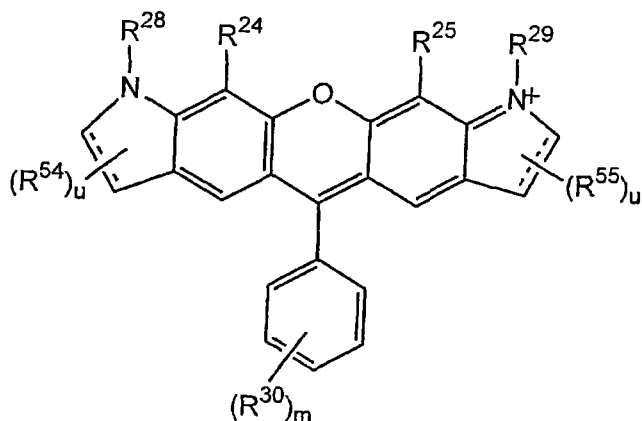
在一个实施方案中, R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 和 R^{29} 各自为氢。 R^{24} 和 R^{25} 各自为肿酸。因此, 式(III)的染料具有下面的结构:



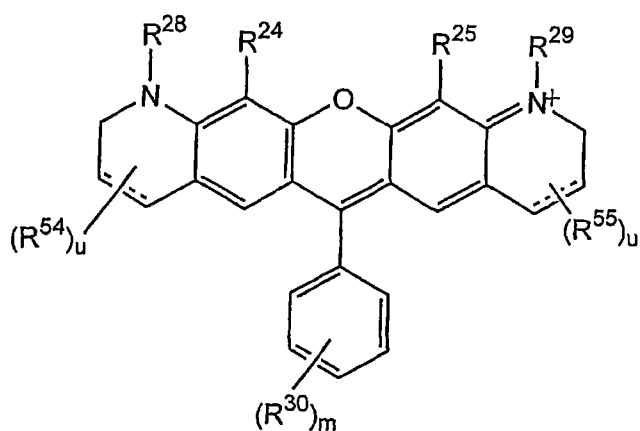
典型地, R^{30} 提供偶合到 $-\text{L}-R_x$ 部分的活性位。例如, 当 R^{30} 为 $-\text{COOH}$ 时, 可以容易地将该染料偶合到具有 $-\text{NH}_2$ 基的 $-\text{L}-R_x$ 部分上, 以提供肿酸酯染料试剂。肿酸染料的这种羧酸衍生物的一个实例示于下面:



在另一个实施方案中, R^{26} 和 R^{31} 可以任选形成 5 或 6-元杂环, 并且 R^{27} 和 R^{32} 可以任选形成 5 或 6-元杂环。示例性的化合物具有根据式(IIIA)和(IIIB)的下列分子框架, 其中 5 或 6-元环中的每一个任选分别被 R^{54} 和 R^{55} 取代。每个 R^{54} 和 R^{55} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, $-\text{CH}_2\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{CH}_2\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。虚线键表示在含 N 杂环中不同不饱和度的可能性。



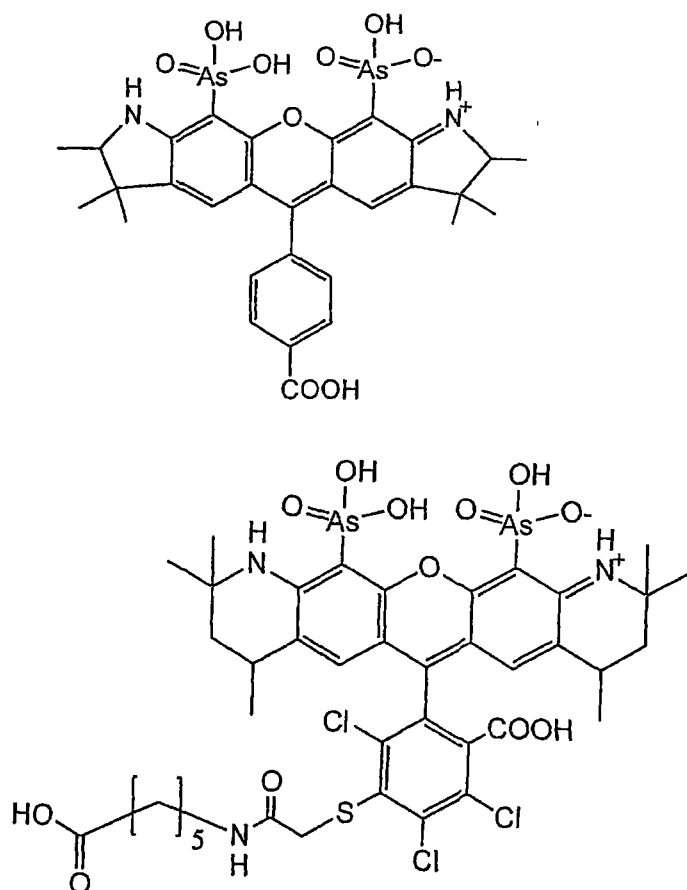
(IIIA)



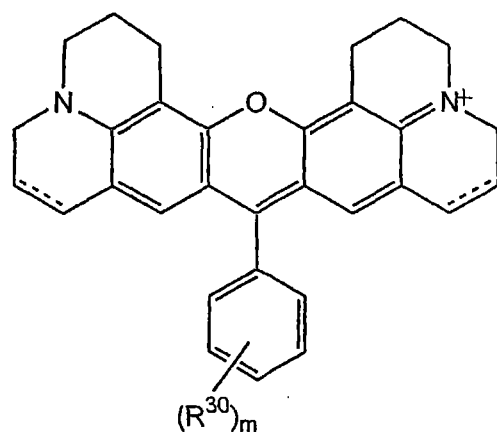
(IIIB)

典型地，式(IIIA)和(IIIB)的含 N 杂环进一步被一个或多个取代基 R^{54} 和 R^{55} 取代。每个 R^{54} 和 R^{55} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，或被极性肿酸基取代的烷基。例如， R^{54} 和 R^{55} 各自为 $-\text{CH}_2\text{As}(=\text{O})(\text{OH})_2$ 。

此外，苯基被一个或多个 R^{30} 基团取代。典型地， R^{30} 提供相应染料试剂的 $-\text{L}-\text{R}_x$ 部分。例如， $-\text{L}-\text{R}_x$ 部分如 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{SO}_3\text{R}^{34}$ ， $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^{34})_2$ ， $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{COOR}^{34}$ ， $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{OR}^{34}$ 或 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{N}(\text{R}^{34})_2$ ，(j 为 2-6 之间的整数)，可以偶合到苯基的 $-\text{SO}_3\text{H}$ 或 $-\text{COOH}$ 取代基上。 R^{34} 典型地为活性基团(R_x)，并且可以是烷基，芳基，杂芳基。例如， R^{34} 为五氟苯基或马来酰亚胺。式(IIIA)和(IIIB)染料的羧酸衍生物的实例示于下面。一些相应的染料试剂示于表 I 中。



在再一个实施方案中，式(IIB)的 R^{24} 和 R^{28} 可以任选形成 5 或 6-元杂环，并且 R^{25} 和 R^{29} 可以任选形成 5 或 6-元杂环。示例性的化合物具有根据式(IIC)的下面分子框架：



(IIC)

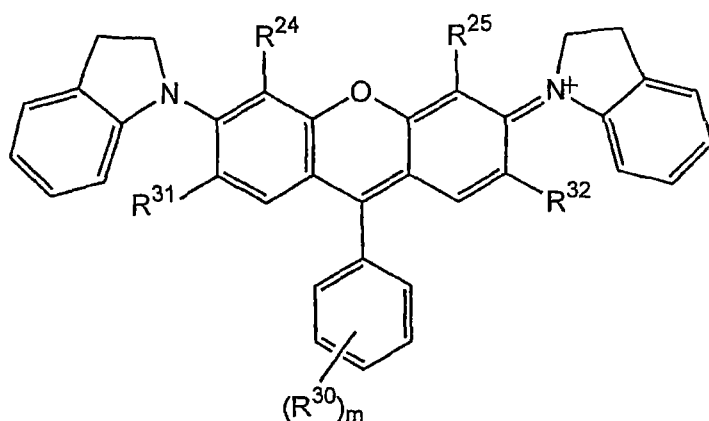
虚线键表示在含 N 杂环中不同不饱和度的可能性。每个含 N 杂环可以任选被 $-\text{CH}_2\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{CH}_2\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 取代；

典型地， R^{30} 提供额外的极性基团。例如， R^{30} 为 $-\text{SO}_2\text{OH}$ ， $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{SO}_3\text{H}$ ， $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{As}(=\text{O})(\text{OH})_2$ ， $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{COOH}$ 或

-SO₂NH(CH₂)_jOH (j 为 2-6 之间的整数。)

备选地, R³⁰ 提供相应染料试剂的 -L-R_x 部分。例如, -L-R_x 部分如 -NH(CH₂)_jSO₃R³⁴, -NH(CH₂)_jAs(=O)(OR³⁴)₂, -NH(CH₂)_jCOOR³⁴, -NH(CH₂)_jOR³⁴ 或 -NH(CH₂)_jN(R³⁴)₂, (j 为 2-6 之间的整数), 可以偶合到苯基的 -SO₃H 或 -COOH 取代基上。R³⁴ 典型地为活性基团(R_x), 并且可以是烷基, 芳基, 杂芳基。例如, R³⁴ 为五氟苯基或马来酰亚胺。这类式(IIIC)的染料试剂的实例示于表 I 中。

在再一个实施方案中, R²⁷ 和 R²⁹ 可以任选形成 5-9 元杂环, 并且 R²⁶ 和 R²⁸ 可以任选形成 5-9 元杂环, 每个杂环可以任选被 -As(=O)(OR⁶)(OR⁷) 或 -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ 取代。在一个实施方案中, 每个含 N 杂环为 5 或 6-元环。在另一个实施方案中, 每个含 N 杂环为 9-元双环。示例性分子框架式(IIID)示于下面:



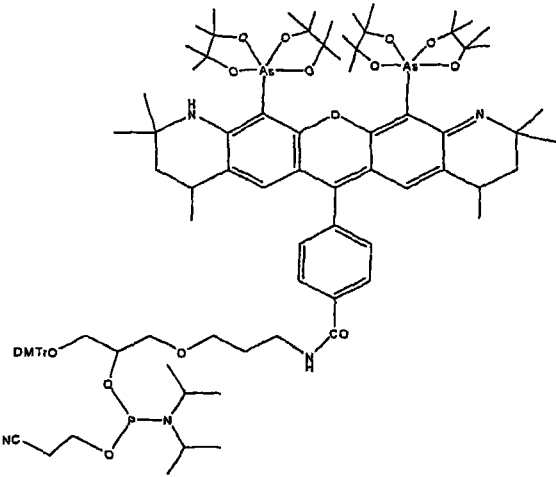
(IIID)

应当注意，不是全部式(III)的化合物都是荧光的。当氮可以自由旋转时，换言之，当其未被锁入具有苯环的稠环时，该化合物能够将光能扩散成热量。如本文所定义的，可以将这样的化合物用作猝灭剂。例如，式(IIIA)-(IIIC)表示的化合物是荧光的；由式(IIID)表示的化合物是猝灭剂。

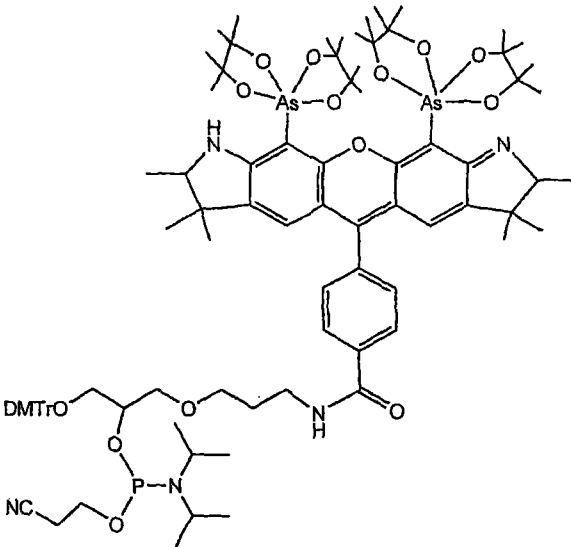
如上所述，在 R^{30} 基团中的一个为 $-L-R_x$ 时，式(III)的化合物为染料试剂。具体而言，对于自动化寡核苷酸合成，染料试剂中的极性基团典型地以它们的肿酸酯形式被掩蔽。式(III)的荧光若丹明染料试剂和若丹明猝灭剂染料试剂的具体实例示于表 1 中。额外若丹明猝灭剂染料以它们的活化酯形式图示于图 7 中。

表 1

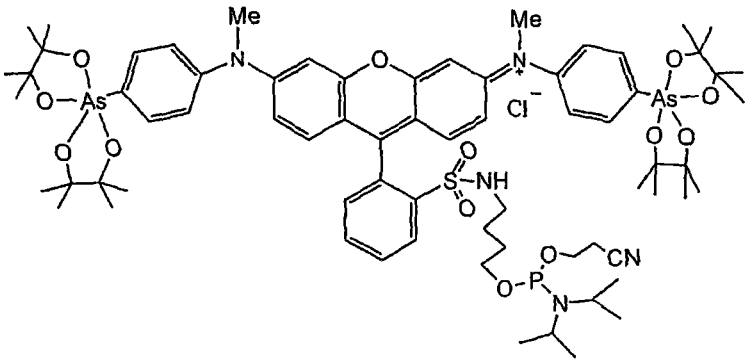
IIIa

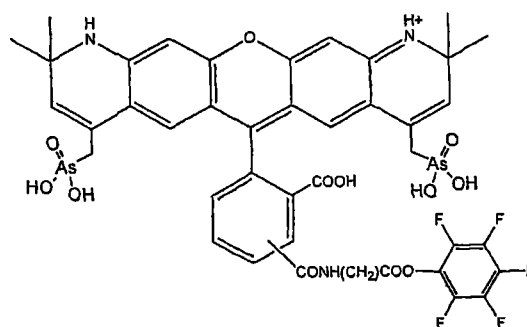
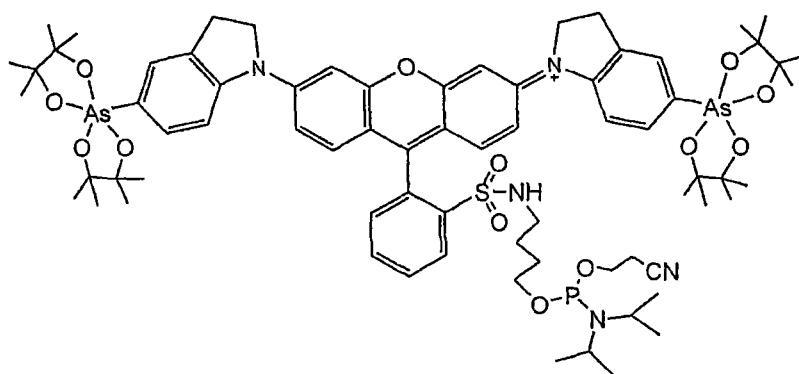
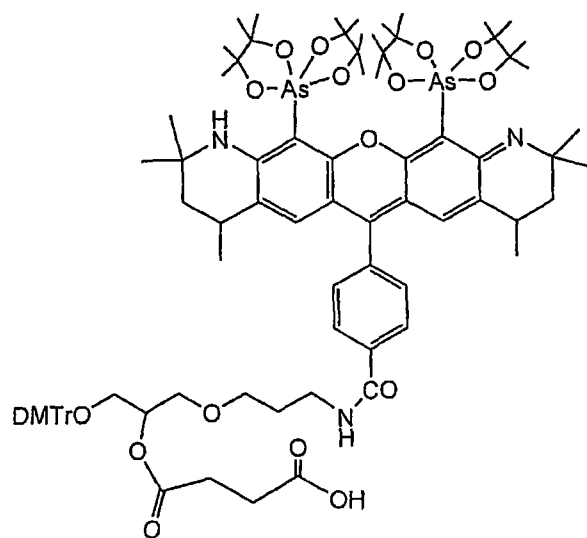


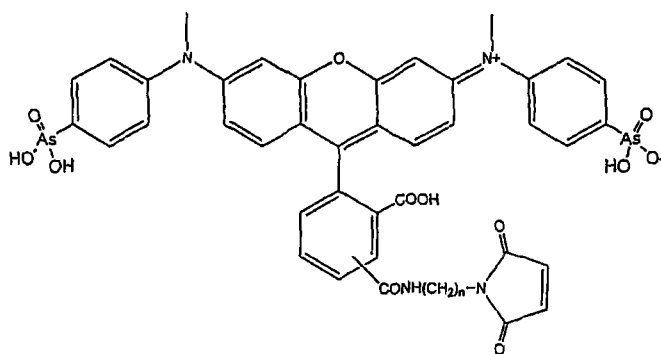
IIIb



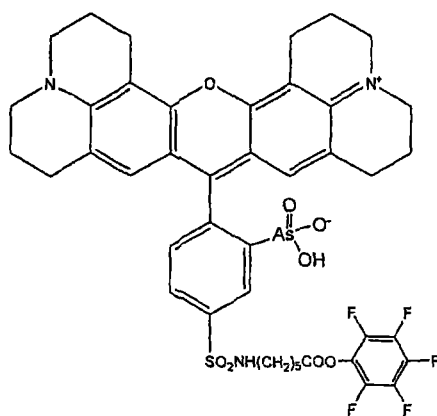
IIIc^a





IIIg^a

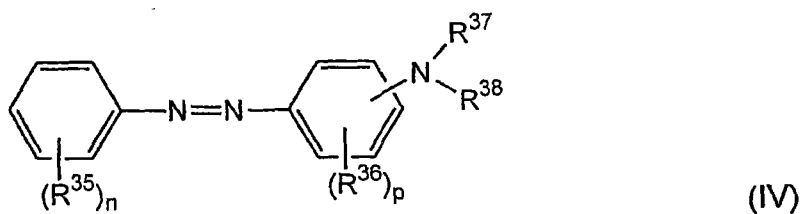
IIIh



^a. 猝灭剂染料

^b. 活性羧基偶合到 CPG 载体的-NH₂ 基团上。

在另一个实施方案中，本发明提供具有增强极性的荧光猝灭剂染料，以及它们用于自动化合成的相应染料试剂。猝灭剂染料和它们的试剂可以由下列的通式(IV)表示：



其中，

每个 R³⁵ 相同或不同，并且独立地为氢，卤素，-NO₂，-CN，-SO₃⁻，烷氧基，胺，二烷基胺，单烷基胺，-N=N-R³⁹，-As(=O)(OR⁶)(OR⁷) 或 -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂；

n 为 1、2 或 3;

p 为 1 或 2;

每个 R^{36} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{SO}_3^-$, 烷氧基, 胺, 二烷基胺, 单烷基胺, $-\text{N}=\text{N}-R^{39}$, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $-\text{[C(R}^8\text{)]}_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基, $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

R^{37} 和 R^{38} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 芳烷基, 芳基或 $-\text{L}-\text{R}_x$;

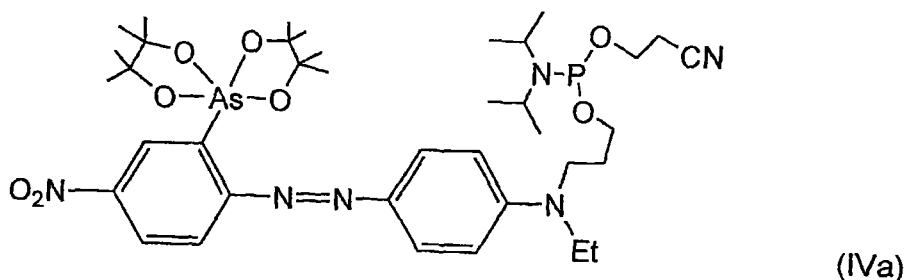
R^{39} 为任选被一个或多个 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 取代的芳基或杂芳基;

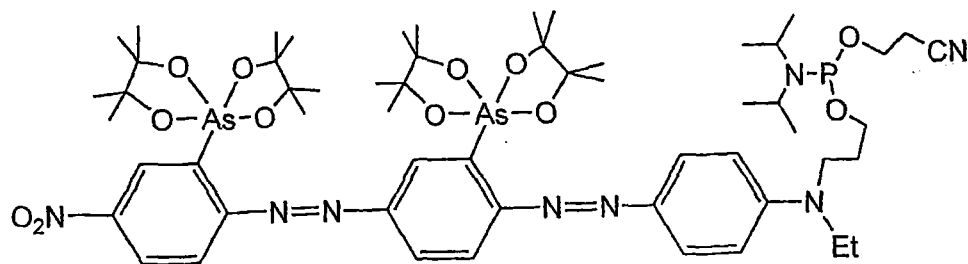
L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^{35} 和 R^{36} 中的至少一个为 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

当 R^{37} 和 R^{38} 中的至少一个为 $-\text{L}-\text{R}_x$ 时, 本发明提供适宜于自动化寡核苷酸合成的染料试剂。具有肿酸酯基的荧光猝灭剂染料试剂的实例示于下面:

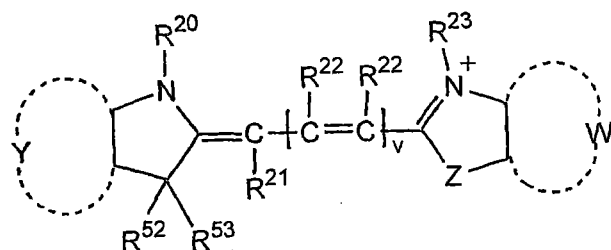




(IVb)

其它的代表性接头和活性基团可以是如美国专利 6,653,473 和 6,727,356 中描述的那些。极性猝灭剂染料试剂的额外实例图示于图 10 中。

在另一个实施方案中,本发明提供具有下面通式(V)的荧光羰花青染料衍生物和染料试剂:



(V)

其中,

v 为 0、1、2、3、4、5 或 6;

Y 表示形成每个环中具有 6 个原子的一个或两个稠合芳族环所需要的原子,每个环原子相同或不同,并且独立地为 $=CR^{46}-$, $=N^+R^{47}-$ 或 $=N-$;

W 表示形成每个环中具有 6 个原子的一个或两个稠合芳族环所需要的原子,每个环原子相同或不同,并且独立地为 $=CR^{46}-$, $=N^+R^{47}-$ 或 $=N-$;

Z 为 $-O-$, $-S-$, $-Se-$, $-C(R^{48})_2$ 或 $-NR^{49}-$;

R^{20} 和 R^{23} 相同或不同,并且独立地为烷基,芳烷基或被以下基团取代的取代烷基:羟基、氰基、硝基、氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、 $-COOH$ 、烷氧基、单烷基氨基、二烷基氨基或三烷基铵,或 $L-R_x$;

R^{52} 和 R^{53} 相同或不同,并且独立地为氢,烷基,被以下基团取代的烷基:羟基、 $-COOH$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$, 或 $L-R_x$;

R^{21} 和每个 R^{22} 相同或不同,并且独立地为氢,卤素,烷氧基,羟基,巯基,芳氧基,杂环,亚胺离子, $L-R_x$, 或两个相邻的 R^{21} 和 R^{22} 或任何两个相邻的 R^{22} 形成 4、5 或 6 元碳环,任选被以下基团取代:烷基,卤素

或氧代；或彼此相距一个碳的两个 R^{22} 与它们连接的碳一起形成 4、5 或 6 元碳环，任选被以下基团取代：烷基，卤素，烷硫基，芳硫基，烷氧基，芳氧基，氧代 ($=O$)， $=S$ 或 $=C(R^{50})_2$ ；

每个 R^{46} 和 R^{47} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，芳基，卤素，氰基，硝基，胺，烷基氨基，二烷基氨基，磺酰基，磷酰基， $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ ， $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 或 $L-R_x$ ；

每个 R^{48} 和 R^{49} 相同或不同，并且独立地为氢或任选被以下基团取代的烷基：羟基、 $-COOH$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ ，或 $L-R_x$ ；

每个 R^{50} 相同或不同，并且独立地为氢，烷基，氰基， $-C(O)NHR^{48}$ ；

R^6 和 R^7 相同或不同，并且独立地为 H，烷基，芳基，或杂芳基；或

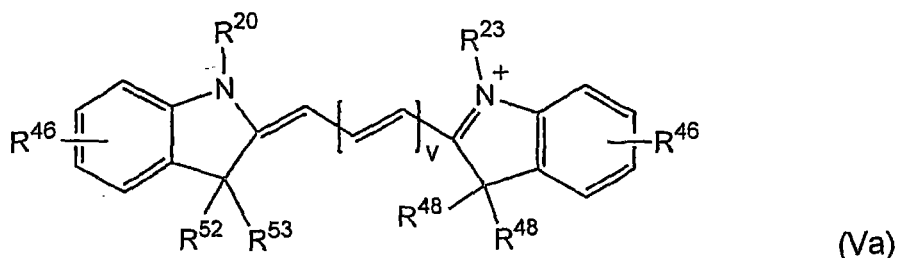
R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环，所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子，其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3)，其中每个 R^8 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基， $-OC(O)-$ 烷基， $-OC(O)-$ 芳基，烷基，芳基，烷基羰基，芳基羰基， $-CH_2CN$ ， $-CH_2SO_2Me$ ， $-CH_2SO_2Ph$ ，或相邻碳原子的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基，或同一碳的两个 R^8 形成氧代；

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键，并且由以下中的任何组合组成：单、双、三或芳族碳-碳键，碳-氮键，氮-氮键，碳-氧键和碳-硫键；以及

R_x 为活性基团，

条件是， R^{20} ， R^{23} ， R^{46} ， R^{47} ， R^{48} ， R^{49} ， R^{52} 和 R^{53} 中的至少一个为 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 。

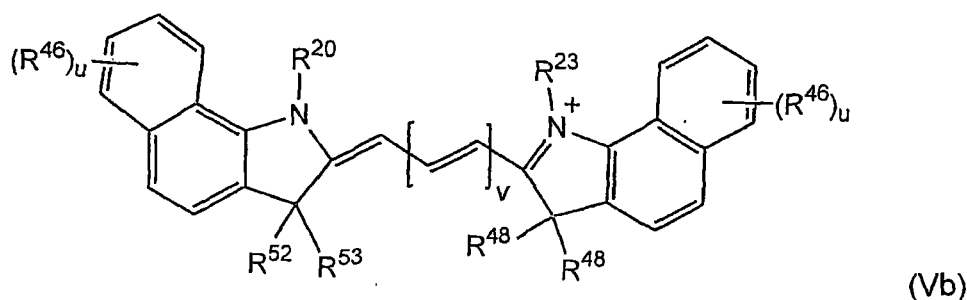
具体地，在一个实施方案中，式(V)为由式(Va)表示的 Cy5 花青染料衍生物：



其中， R^{20} ， R^{23} ， R^{48} ， R^{46} ， R^{52} 和 R^{53} 如前面所定义。

在一个更具体的实施方案中, 每个 R^{48} , R^{52} 和 R^{53} 为甲基, 每个 R^{20} 和 R^{23} 相同或不同, 并且独立地为 $-(CH_2)_tSO_3H$, $-(CH_2)_tAsO_3H_2$, $-(CH_2)_tCOOH$ 或 $-(CH_2)_tOH$ (t 为 1-6 之间的整数), 并且每个 R^{46} 为 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 。

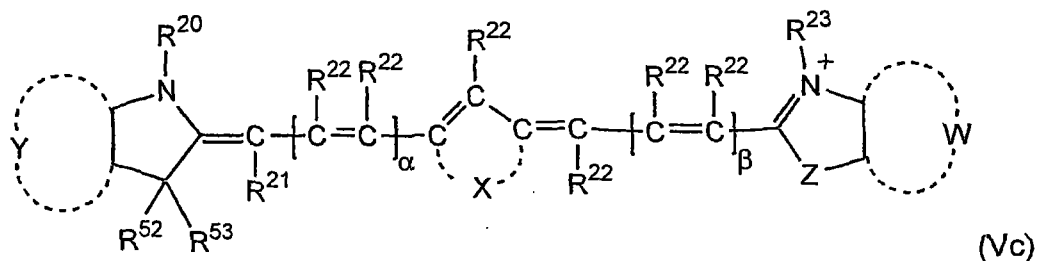
在再一个实施方案中, 式(V)为由式(Vb)表示的另一种类型的 Cy5 花青染料衍生物:



其中, R^{20} , R^{23} , R^{48} , R^{46} , R^{52} 和 R^{53} 如上面所定义, u 为 1 或 2。

在一个更具体的实施方案中, 每个 R^{52} , R^{53} 和 R^{48} 为甲基, 每个 R^{20} 和 R^{23} 相同或不同, 并且独立地为 $-(CH_2)_tSO_3H$, $-(CH_2)_tAsO_3H_2$, $-(CH_2)_tCOOH$ 或 $-(CH_2)_tOH$ (t 为 1-6 之间的整数), 并且每个 R^{46} 为 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 。

在另一个实施方案中, 彼此相距一个碳的两个 R^{22} 与它们连接的碳一起形成 4、5 或 6 元碳环。这些化合物可以由下面的式(Vc)更具体地表示:



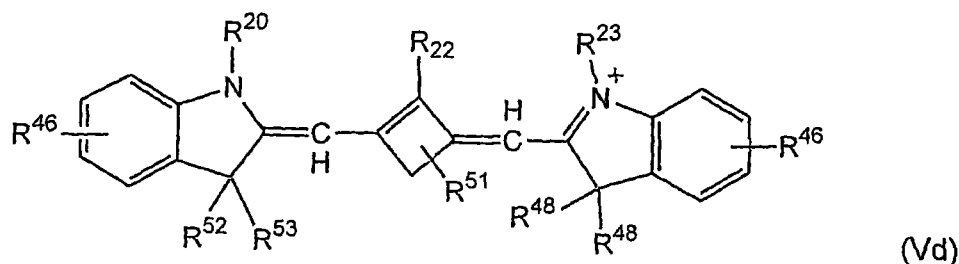
其中,

X 表示形成一个 4-、5-或 6-元碳环所需的原子, 所述碳环任选被以下

基团取代：烷基，卤素，烷硫基，芳硫基，烷氧基，芳氧基，氧代(=O)，=S 或=C(R⁵⁰)₂；以及

$\alpha + \beta = v - 2$ ，而所有的其它 R 基团，Y 和 W 如上面所定义。

具体地，在一个实施方案中，碳环为环丁烯，并且 α 和 β 各自为 0，Y 和 W 各自是稠合的苯。这些染料通常称作方酸菁和硫代方酸菁染料，并且可以由下面的式(Vd)表示：



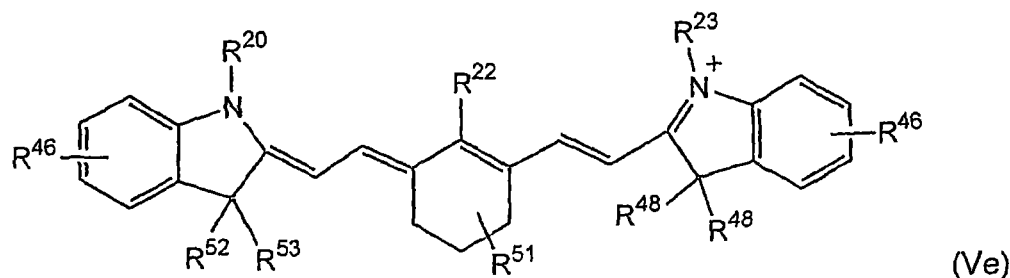
其中，R⁵¹ 为烷基，卤素，烷硫基，芳硫基，烷氧基，芳氧基，氧代(=O)，=S 或=C(R⁵⁰)₂，并且全部的其它 R 基团如前面所定义。

更具体地，每个 R⁴⁸，R⁵² 和 R⁵³ 为甲基，每个 R²⁰ 和 R²³ 相同或不同，并且独立地为 -(CH₂)_tSO₃H，-(CH₂)_tAsO₃H₂，-(CH₂)_tCOOH 或 -(CH₂)_tOH (t 为 1-6 之间的整数)，每个 R⁴⁶ 为 -As(=O)(OR⁶)(OR⁷) 或 As(OR⁶)₂(OR⁷)₂，并且 R²² 为羟基，巯基或取代的烷基。

具有胍酸基的方酸菁和硫代方酸菁染料呈现出此类染料的高水溶解度和独特的光谱性质的实际上有用的组合。这些染料可以特别用于生物共轭和染色，因为它们的光谱性质极大地取决于环境[美国专利公布 2003/0235846]。方酸菁-基的生物标记显示出高的斯托克斯转移(Stokes' shift)，作为在水溶液中的游离染料而具有的更低量子产额($\phi=0.15$)，并且当结合到生物分子上时具有非常高的量子产额($\phi=0.6-0.7$) [Oswald B., Patsenker L., Duschl J., Szmackinski H., Wolfbeis O. S., Terpetschnig E. "Synthesis, spectral properties, and detection limits of reactive squaraine dyes, a new class of diode laser compatible fluorescent protein labels" Bioconjug Chem. Nov-Dec,10(6), pp 925-31, 1999]。

在另一个具体的实施方案中，碳环为环己烯， α 和 β 各自为 1，Y 和 W 各自为稠合的苯，式(V)的化合物是荧光 IR 染料。它们可以根据下面的式

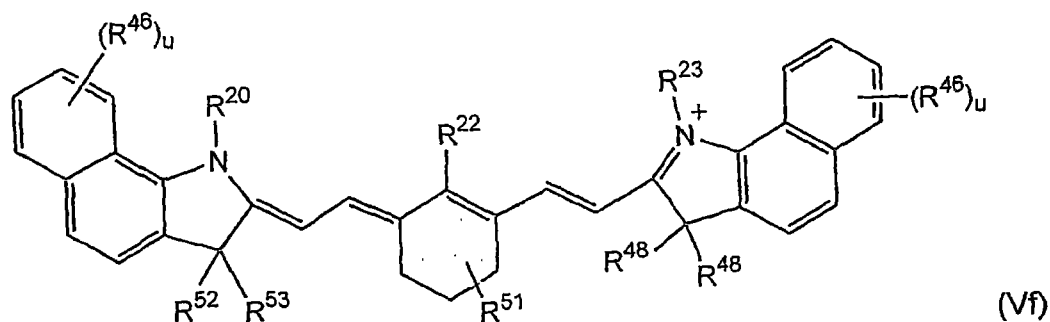
(Ve)表示:



其中, R^{51} 为烷基, 卤素, 烷硫基, 芳硫基, 烷氧基, 芳氧基, 氧代(=O), =S 或 $=C(R^{50})_2$, 并且全部的其它 R 基团如上面所定义。

更具体地, 每个 R^{48} , R^{52} 和 R^{53} 为甲基, 每个 R^{20} 和 R^{23} 相同或不同, 并且独立地为 $-(CH_2)_tSO_3H$, $-(CH_2)_tAsO_3H_2$, $-(CH_2)_tCOOH$ 或 $-(CH_2)_tOH$ (t 为 1-6 之间的整数), 每个 R^{46} 为 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$, 并且 R^{22} 为羟基, 巯基或取代的烷基。

在另一个具体的实施方案中, 碳环为环己烯, α 和 β 各自为 1, Y 和 W 各自为稠合的萘, 式(V)的化合物是荧光 IR 染料。它们可以根据下面的式 (Vf) 表示:

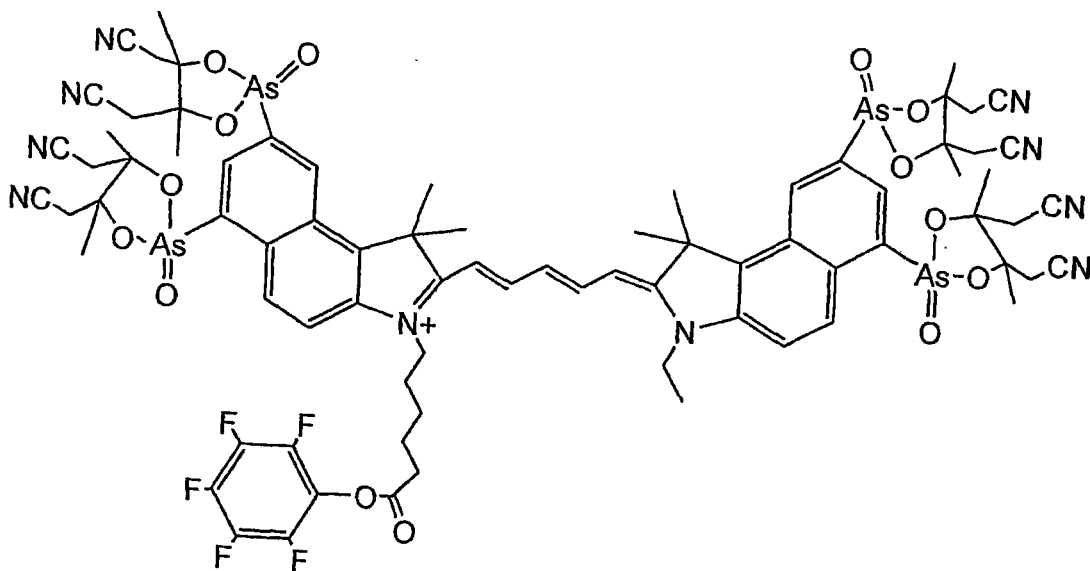
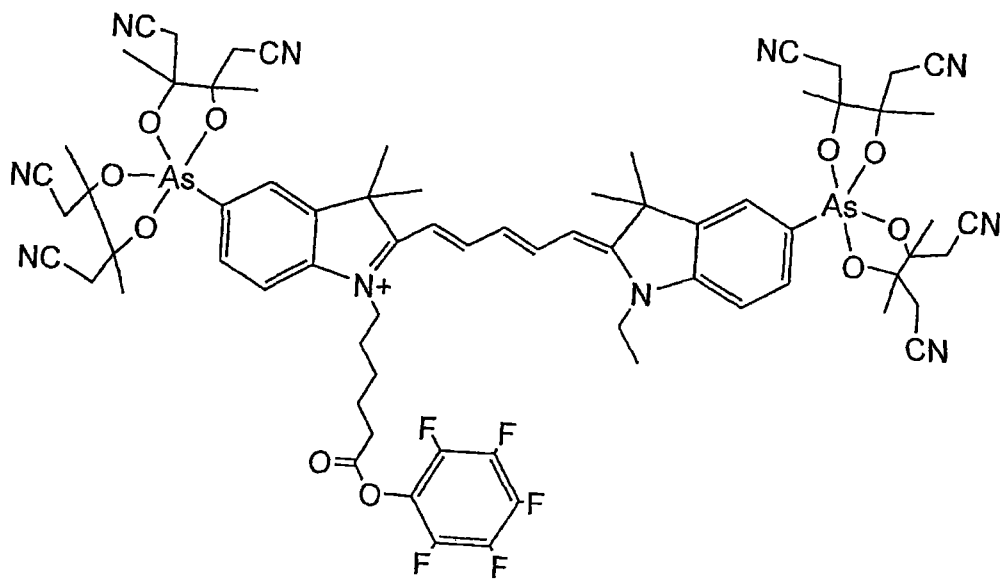


其中, R^{51} 为烷基, 卤素, 烷硫基, 芳硫基, 烷氧基, 芳氧基, 氧代(=O), =S 或 $=C(R^{50})_2$, u 为 1 或 2, 并且全部的其它 R 基团如前面所定义。

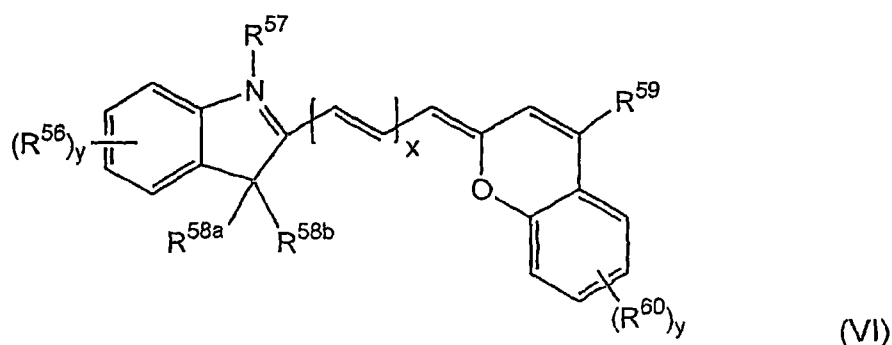
更具体地, 每个 R^{48} , R^{52} 和 R^{53} 为甲基, 每个 R^{20} 和 R^{23} 相同或不同, 并且独立地为 $-(CH_2)_tSO_3H$, $-(CH_2)_tAsO_3H_2$, $-(CH_2)_tCOOH$ 或 $-(CH_2)_tOH$ (t 为 1-6 之间的整数), 每个 R^{46} 为 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$, 并且 R^{22} 为羟基, 巯基或取代的烷基。

当 R^{20} , R^{23} , R^{46} , R^{47} , R^{48} , R^{49} , R^{52} 和 R^{53} 中的至少一个为 $-L-R_x$ 时, 本发明提供适宜于自动化寡核苷酸合成的染料试剂。

在一个实施方案中, R_x 为其五氟苯基酯形式的活化羧酸。该基团特别是胺-活性的, 并且能够附着于具有胺官能团的 MGB, 固体载体, 染料或寡核苷酸上。具体实例示于下面:



在再一个实施方案中, 本发明提供一种具有增强的极性和稳定性的修饰荧光 IR 染料, 其具有下面的通式(VI):



其中,

y 为 1、2 或 3;

x 为 0、1、2 或 3;

每个 R^{56} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-OC(O)-$ 烷基, $-OC(O)-$ 芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-CH_2CN$, $-CH_2SO_2Me$, $-CH_2SO_2Ph$, 或相邻碳原子的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳的两个 R^8 形成氧代;

R^{57} 为烷基, 芳烷基或被以下基团取代的烷基: 羟基、氰基、硝基、氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、 $-COOH$ 、烷氧基、单烷基氨基、二烷基氨基或三烷基铵, 或 $L-R_x$;

R^{58a} 和 R^{58b} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 被以下基团取代的烷基: 羟基、 $-COOH$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$, 或 $L-R_x$;

R^{59} 为氢, 烷基或芳烷基;

每个 R^{60} 相同或不同, 并且独立地为氢, $-NR^{61a}R^{61b}$, 烷基, 芳基, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$, $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

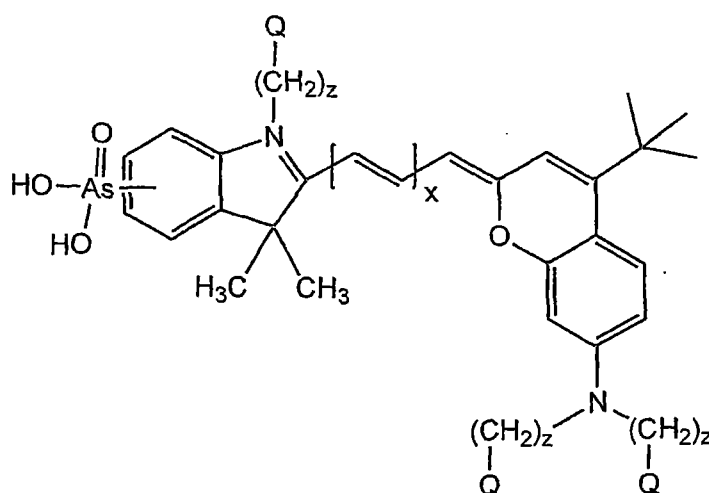
每个 R^{61a} 和 R^{61b} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基, 被以下基团取代的烷基: 羟基、 $-\text{COOH}$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 或 $\text{L}-\text{R}_x$:

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^{56} , R^{58a} , R^{58b} , R^{60} 和 R^{61a} 和 R^{61b} 中的至少一个为或包含 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

式(VI)化合物的典型实例可以进一步由式(VIa)表示, 其中, R^{60} 为肿酸基, R^{57} 为烷基或亚烷基链, 其被极性基团如 $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{AsO}_3\text{H}_2$, $-\text{COOH}$ 和 $-\text{OH}$ 封端, R^{59} 为叔丁基, 并且 R^{60} 为二烷基氨基。

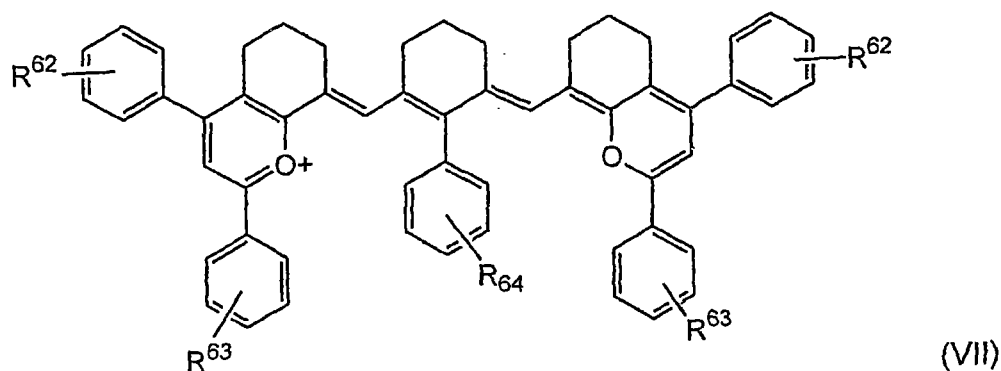


每个 Q 独立地为 H , $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{AsO}_3\text{H}_2$, $-\text{COOH}$ 或 $-\text{OH}$

z 为 1-6

(VIa)

在再一个实施方案中, 本发明提供另一种具有增强的极性和稳定性的修饰荧光 IR 染料, 其具有下面的通式(VII):



其中, 每个 R^{62} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 烷基, 被以下基团取代的烷基: 羟基、 $-\text{COOH}$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 或 $\text{L}-\text{R}_x$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基, $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

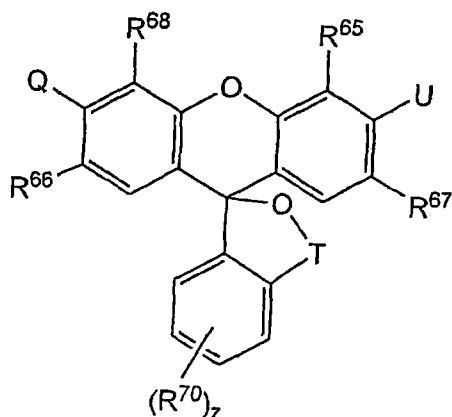
每个 R^{63} 和 R^{64} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 烷基, 被以下基团取代的烷基: 羟基、 $-\text{COOH}$ 、卤素、氰基、硝基、胺、烷基氨基、二烷基氨基、磺酰基、磷酰基、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 或 $\text{L}-\text{R}_x$;

L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^{62} , R^{63} 和 R^{64} 中的至少一个为或包含 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

在再一个实施方案中, 本发明提供一种被一个或多个肿酸酯取代的荧光咕吨衍生物。这些化合物可以由下面的通式(VIII)表示:



(VIII)

其中,

z 为 1、2 或 3;

T 为 $>C=O$ 或 $>S(=O)_2$;

Q 为 $-OR^{71}$ 或 $-NR^{72}R^{73}$;

U 为 $-OR^{74}$ 或 $-NR^{75}R^{76}$;

每个 R^{68} 和 R^{65} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, 烷基, 芳基或 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

每个 R^{66} 和 R^{67} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 羟基, 烷基或 $L-R_x$;

每个 R^{70} 相同或不同, 并且独立地为氢, 卤素, 烷基, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$, $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 或 $L-R_x$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-OC(O)-$ 烷基, $-OC(O)-$ 芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-CH_2CN$, $-CH_2SO_2Me$, $-CH_2SO_2Ph$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

每个 R^{71} 和 R^{74} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基羰基或芳基羰基;

每个 R^{72} , R^{73} , R^{75} 和 R^{76} 相同或不同, 并且独立地为氢, 烷基或芳基;
或

R^{71} 和 R^{68} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环; 或
 R^{74} 和 R^{65} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环; 或
 R^{72} 和 R^{68} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环; 或
 R^{73} 和 R^{66} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环; 或
 R^{75} 和 R^{65} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环; 或
 R^{76} 和 R^{67} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环;

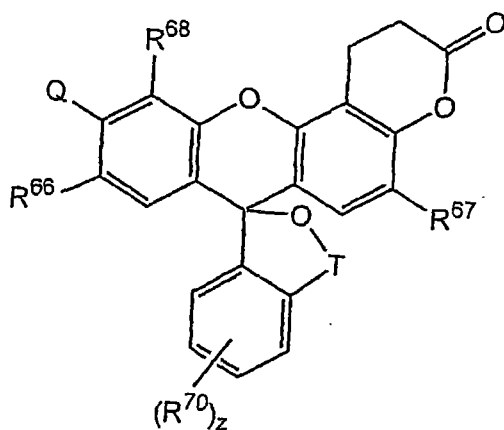
L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

条件是, R^{65} , R^{66} , R^{67} , R^{68} 和 R^{71} 中的至少一个为或包含
 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 。

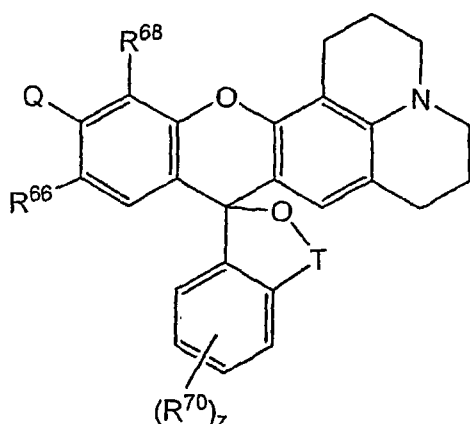
典型地, R^{71} 和 R^{74} 各自为烷基羰基, 更典型地, 为叔丁基羰基。

当 R^{74} 和 R^{65} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环时, 式(VIII)的化合物可以由下面的式(VIIIa)更具体地表示:



(VIIIa)

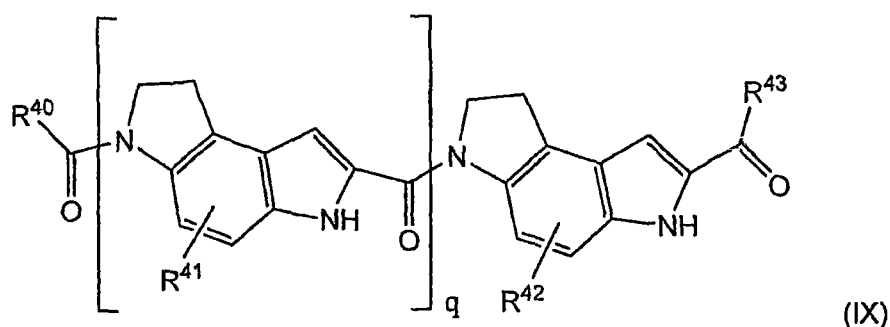
当 R^{75} 和 R^{65} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环并且 R^{76} 和 R^{67} 与它们连接的碳一起形成 5 或 6 元杂环时, 式(VIII)的化合物可以由下面的式(VIIIb)更具体地表示:



当 R^{66} ; R^{67} 和 R^{70} 中的至少一个为 $-L-R_x$, 本发明提供适宜于自动化寡核苷酸合成的咕吨染料试剂。

在一个实施方案中, R_x 为用于自动化寡核苷酸合成的亚磷酰胺基。在另一个实施方案中, R_x 为羧酸, 异硫氰酸酯, 或马来酰亚胺基, 其五氟苯基酯形式的活化羧酸。具体的咕吨染料试剂图示于图 8 和 9 中。

在再一个实施方案中, 本发明提供具有增强极性和亲水性的修饰 MGB, 其具有下面的通式(IX):



其中,

R^{40} 和 R^{43} 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氨基, 烷基, 芳基, 烷氧基或 $-L-R_x$, 条件是 R^{40} 和 R^{43} 中的至少一个为 $-L-R_x$;

每个 R^{41} 独立地为氢, 卤素, 羟基, 磺酰基, 磷酰基, $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$;

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-R^6-R^7-$ 为 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-OC(O)-$ 烷基, $-OC(O)-$ 芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-CH_2CN$, $-CH_2SO_2Me$, $-CH_2SO_2Ph$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

q 为 0、1 或 2;

R^{42} 为氢, 卤素, 羟基, $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$;

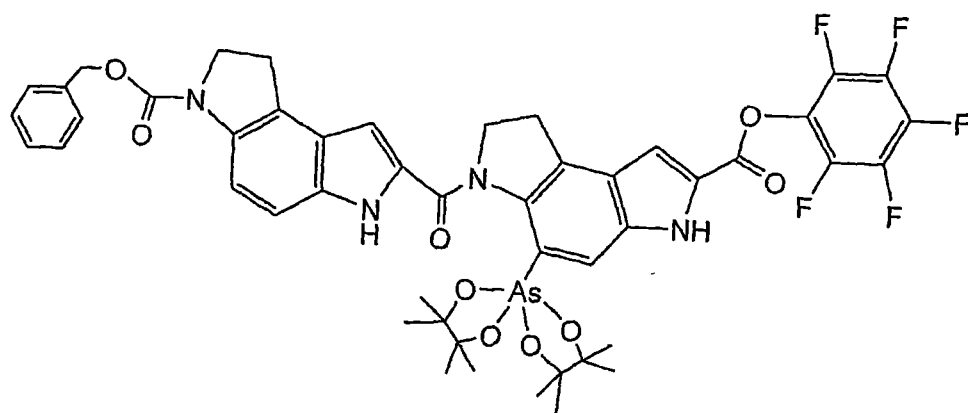
L 为单共价键或具有 1-30 个选自 C、N、O 和 S 中的非氢原子的共价键, 并且由以下中的任何组合组成: 单、双、三或芳族碳-碳键, 碳-氮键, 氮-氮键, 碳-氧键和碳-硫键; 以及

R_x 为活性基团,

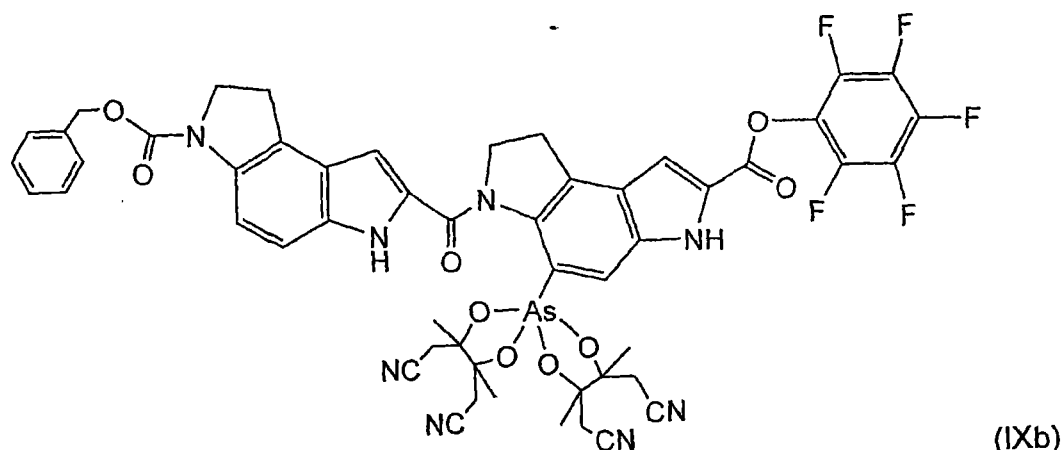
条件是, R^{41} 和 R^{42} 中的至少一个为 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 。

在一个实施方案中, 本发明提供一种式(IX)的 MGB, 其中 R^{41} 和 R^{42} 中的至少一个为 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 。

本发明的 MGB 可以通过活性基团反应性地附着到寡核苷酸, 染料和固体载体上。此外, 对于自动化寡核苷酸合成, 染料试剂中的极性基团典型地以它们的肿酸酯形式被掩蔽。下面是具有极性基团的 MGB 的两种具体实例:



(IXa)



在这些实例中，活性基团为它们五氟苯基酯形式的活化羧酸。该基团特别是胺-活性的，并且能够附着到具有胺官能团的 MGB，固体载体，染料或寡核苷酸上。

3. 使用极性染料的应用和方法：

在一个方面，本发明提供一种通过将具有一个或多个羧酸酯基 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 或 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 的式(I)-(VIII)的染料化合物与生物样品以足以在期望条件下得到可检测光学响应的浓度合并，而在染色生物样品中使用具有一个或多个极性羧酸基团的染料化合物的方法。

在本发明的一个方面，将本发明的染料化合物直接用来染色或标记样品，从而可以识别或定量样品。例如，这样的染料可以作为用于生物靶分析物的分析的一部分，作为生物或非生物流体中的可检测示踪元件加入；或作为光力学治疗肿瘤的目的而加入，其中辐照染色的样品，以选择性地破坏肿瘤细胞和组织；或加入到光消融的动脉血小板(arterial plaque)或细胞中，通常通过单重态氧的光敏化生产而加入。在一个优选的实施方案中，将染料共轭物用来染色包含配体的样品，由此共轭的物质是特异性结合对的互补成员。

典型地，样品从液体源直接得到，或作为来自固体材料(有机或无机)的洗出液得到，或作为为了培养将细胞引入其中的生长介质得到，或作为为了评估而将细胞放置其中的缓冲溶液得到。在样品包含细胞的情况下，

该细胞任选为包括微生物的单细胞，或以二维或三维层的形式与其它细胞缔合的多细胞，包括多细胞生物、胚胎、组织、活组织检查、丝体、生物膜等。

备选地，样品为固体，任选为涂片或刮除物或通过过滤从液体或蒸气除去的保留物。在本发明的一个方面，样品获自生物流体，包括分离或未过滤的生物流体如尿液、脑脊髓液、血液、淋巴液、组织匀浆、间质液、细胞抽提物、粘液、唾液、痰液、粪便、生理分泌物或其它类似的流体。备选地，样品获自环境源如土壤、水或空气；或获自工业源如取自废物流、水源、供应管线或生产批次的工业源。

在再一个实施方案中，样品存在于固体或半固体基质之上或之中。在本发明的一个方面，基质为膜。在另一个方面，基质为电泳凝胶，如被用于分离和表征核酸或蛋白，或是通过从电泳凝胶转移至膜上而制备的污渍。在另一个方面，基质为硅芯片或载玻片，并且已经将感兴趣的分析物以阵列形式固定在芯片或载玻片上(例如，样品包含微阵列中的蛋白或核酸聚合物)。再一方面，基质为微孔板或微流体芯片，并且样品由自动化方法分析，典型地由各种高生产率筛分方法如药物筛分方法分析。

本发明的染料化合物通常是通过将如上所述的本发明的染料化合物与感兴趣的化合物在所选择的条件下混合以得到可检测的光学响应而利用的。如本文所用的术语"染料化合物"是指所要求保护的染料的所有方面，同时包括活性染料和共轭到生物物质或生物分子上的染料。染料化合物典型地与样品的元件形成共价或非共价的缔合物或配合物，或者简单地存在于样品的边界(bounds)或部分样品中。然后，将样品在所选择的波长下照明，以引起所述的光学响应。典型地，通过进一步将该光学响应与标准或预期的响应比较，将染色样品用来确定样品的特定特性。

可检测的光学响应是指通过观察或在仪器上可检测的光学信号的改变或出现。典型地，可检测的响应为荧光的改变，如荧光的强度、激发或发射波长分布、荧光寿命、荧光极化或它们的组合的改变。与标准或预期的响应相比，染色的程度和/或位置表明样品是否拥有给定的特性或拥有多大程度的给定特性。本发明的一些染料可以显示出较小的荧光发射，但是仍然可以用作发色染料。这样的发色团在 FRET 应用中可以用作能量受体，

或简单地将所需要的颜色赋予样品或部分样品。

对于生物应用，典型地将本发明的染料化合物以在根据本领域中通常已知的方法制备的水溶液、基本上为水性的溶液或水混溶性溶液中使用。染料化合物的实际浓度取决于实验条件和所需要的结果，但是典型地范围为约 1 毫微摩尔浓度至 1 毫摩尔浓度或更高。最佳浓度由系统变量确定，直到实现具有最小背景荧光的满意结果。

最有利地将染料化合物用于染色具有生物成分的样品。样品可以包含成分(包括完整的细胞，细胞抽提物，细菌，病毒，细胞器及它们的混合物)的非均相混合物、或单一成分或同组的多种成分(例如，天然或合成氨基酸，核酸或碳水化合物聚合物，或脂类膜配合物)。这些染料在使用的浓度范围内通常对于活细胞或其它生物成分是无毒的。

将染料化合物以有利于染料化合物和感兴趣的样品成分之间的接触的任何方式混合。典型地，简单地将染料化合物或含有染料化合物的溶液加入到样品中。本发明的一些染料，特别是被一个或多个磺酸或膦酸部分取代的染料，倾向于对于生物细胞的膜是不可渗透的，并且一旦在内部，活细胞典型地得到很好的保留。可以将渗透质膜的处理如电穿孔、电击处理或高胞外 ATP 用来将所选择的染料化合物引入到细胞中。备选地，可以将所选择的染料化合物通过压力微注射、刮载(scrape loading)、膜片箝法或噬菌作用而物理地插入到细胞中。

处于它们的天然酯形式的膦酸酯染料可以粘附到或穿透生物膜。任选地，酯形式可以在微环境中水解，从而在膜的任一侧或细胞内部提供极性形式的染料，因而提供研究或诊断工具。

可以将结合有脂族胺或膦残基的染料微注射入细胞内，在此它们由醛固定剂如甲醛或戊二醛固定就位。此固定性使得这样的染料可以用于胞内应用如神经元示踪。

拥有亲脂性取代基的染料化合物，如磷脂，将非共价性地结合入脂质组件中，例如用作膜结构用的探针；或用于结合在脂质体、脂蛋白、膜、塑料、亲脂性微球体或类似的材料中，或用于示踪。亲脂性染料可以用作膜结构的荧光探针。

化学活性的染料化合物将共价连接到在各种各样的材料上的相应官

能团上，从而形成如上所述的染料共轭物。将染料化合物用来标记细胞表面上、细胞膜中或胞内室如细胞器中或细胞的细胞质中的活性位，可以确定它们在样品中的存在或量、可达性或它们的空间和暂时分布。可以将光活性染料类似地用来光标记生物细胞外膜的成分，或用作细胞的光固定性极性示踪剂。

可以用于本发明方法的优选化合物包括 R_x 为羧酸，羧酸的活化酯，胺，叠氮化物，胍，卤代乙酰胺，烷基卤，异硫氰酸酯或马来酰亚胺基的那些化合物；以及生物物质为抗体，肽，凝集素，多糖，核苷酸，核苷，寡核苷酸，核酸聚合物，离子络合部分，脂质或非生物有机聚合物或聚合微粒的那些化合物，所述的生物物质任选地结合到一个或多个相同或不同的额外荧光团上。

任选地，将样品在染色后洗涤，以除去残余的、过量的或未结合的染料化合物。任选将样品在染色的过程中与一种或多种其它的溶液混合，所述溶液包括洗涤溶液、渗透和/或固定溶液，和含有额外检测试剂的溶液。根据本领域中通常已知的方法，额外检测试剂典型地由于特定细胞成分、胞内物质或细胞状况的存在而产生可检测的响应。在额外检测试剂具有或产生与主题染料化合物的光谱性质不同的光谱性质的产物的情况下，可以得到多色应用。在额外检测试剂是具有与染色染料的光谱性质可检测性地区别的光谱性质的染料或本发明染料-共轭物的情况下，这特别有用。

作为染料共轭物的本发明化合物根据本领域中广泛已知的方法使用；例如将抗体共轭物用于显微和免疫荧光分析中，以及将核苷酸或寡核苷酸共轭物用于核酸杂交分析和核酸测序中(例如，Prober 等的美国专利 5,332,666 (1994)；Smith 等的美国专利 5,171,534 (1992)；Hobbs 等的美国专利 4,997,928(1991)；以及 Menchen 等的 WO 申请 94/05688；它们都通过引用而结合)。本发明多种单独染料的染料共轭物拥有多色应用的效用。

在染色之后或染色过程的任何时间，将样品用所选择光的波长照明，得到可检测的光学响应，并且用检测该光学响应的装置观察。可以用于照明本发明染料化合物的设备包括但不限于：手持式紫外灯、汞弧灯、氙灯、激光器和激光二极管。这些照明源可以任选集成到激光扫描器、荧光微板读出器、标准或小型荧光计或色谱检测器中。本发明的优选实施方案是在

633-636 nm、647 nm、660 nm、680 nm 和超过 700 nm 的波长或附近可激发的染料，因为这些区域与相对便宜的激发源的输出紧密地匹配。

该光学响应任选由视觉检查检测，或通过使用下列装置中的任何一种检测：CCD 照相机，摄影机，摄影胶片，激光扫描装置，荧光计，光电二极管，量子计数器，表面荧光(epifluorescence)显微镜，扫描显微镜，流动血细胞计数器，荧光微板读出器，或依靠放大信号如光电倍增管来检测。在使用流动血细胞计数器检验样品的情况下，样品的检验任选包括将样品部分根据它们的荧光响应分类。

在另一个方面，本发明提供在自动化寡核苷酸合成中使用式(I)-(VIII)的染料试剂的方法，在式(I)-(VIII)中 R_x 为亚磷酰胺基，该方法包括：

使用亚磷酰胺方法进行寡核苷酸的自动化合成，以提供染料-标记的寡核苷酸，其中染料试剂被共轭到固体载体或寡核苷酸的扩延链上；

将染料-标记的寡核苷酸与反应介质分离；以及

脱保护染料-标记的寡核苷酸的极性基团，以提供具有带负电的极性基团的染料-标记的寡核苷酸。

由亚磷酸-三酯、磷酸三酯和 H-磷酰基化学固相合成寡核苷酸的程序的详述是可以广泛获得的。参见，例如，Itakura，美国专利 4,401,796；Caruthers 等，美国专利 4,458,066 和 4,500,707；Beaucage 等，Tetrahedron Lett., 22: 1859-1862 (1981)；Matteucci 等，J. Am. Chem. Soc, 103: 3185-3191 (1981)；Caruthers 等，Genetic Engineering, 4: 1-17 (1982)；Jones, chapter 2, Atkinson 等, chapter 3 和 Sproat 等, chapter 4, in Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Gait (ed.), IRL Press, Washington D.C. (1984)；Froehler 等，Tetrahedron Lett., 27: 469-472 (1986)；Froehler 等，Nucleic Acids Res., 14: 5399-5407 (1986)；Sinha 等 Tetrahedron Lett., 24: 5843-5846 (1983)；以及 Sinha 等，Nucl. Acids Res., 12: 4539-4557 (1984)，它们通过引用将它们的全部内容结合在此。

通常，在偶合循环中利用的单体核苷酸的输送时机和浓度将与典型用于在商业 DNA 合成装置中使用的商业亚磷酰胺的流程相同。在这些情况下，人们可以仅仅将含有单体的溶液加入到在为商业合成装置上的额外亚磷酰胺提供的开口上的容器中(例如 380B 型，Applied Biosystems, Foster

City, Calif., U.S.A.)。但是,在特定单体的偶合效率基本上低于其它亚磷酸酰胺时,可能必须改变试剂的输送时机或浓度,以优化该合成。优化寡核苷酸合成流程以校正低偶合效率的装置对于本领域的技术人员是周知的。通常,人们可以仅提高试剂的浓度或输送的试剂的量,以达到更高的偶合效率。确定偶合效率的方法也是周知的。例如,在 5'-羟基保护基团是二甲氧基三苯甲基(DMT_r)的情况下,可以通过测量在酸性除去 DMT_r 基团的过程中的 DMT_r 阳离子浓度,来确定偶合效率。DMT_r 阳离子浓度通常是通过光谱-光度监测酸洗涤液而确定的。酸/DMT_r 溶液为亮橙色。备选地,由于封端防止了偶合失败情况下的寡核苷酸的进一步扩延,可以通过利用例如毛细电泳或 HPLC,比较截断相对于全长寡核苷酸的比率来估计偶合效率。

固相寡核苷酸合成可以使用大量的固体载体来进行。适宜的载体是提供用于连接保护的单体的官能团的载体,所述的官能团在合成的寡核苷酸中将成为 3'末端碱基。载体必须对于在特定的合成化学中使用的试剂是惰性的。适宜的载体对于本领域的技术人员是周知的。固体载体材料包括但不限于聚丙烯酰基吗啉,二氧化硅,受控孔玻璃 (CPG),聚苯乙烯,聚苯乙烯/胶乳,和羧基-官能化的 Teflon®。优选的载体有氨基-官能化的受控孔玻璃和聚苯乙烯。

固相寡核苷酸合成需要作为起点的,偶合到固体载体上的完全保护的单体(例如,保护的核苷)。此偶合典型地通过 3'-羟基。典型地,接头基团一端共价结合到 3'-羟基上,并且另一端共价结合到固体载体上。然后,第一合成循环将核苷酸单体通过其 3'-磷酸酯经过缩合反应偶合到结合的核苷的 5'-羟基上,形成 3'-5'磷酸二酯连接键。随后的合成循环将包括 P_i-修饰单体的核苷酸单体添加到最后结合的核苷酸的 5'-羟基上。如此,在 3'至 5'方向上合成寡核苷酸,从而制备"生长的"寡核苷酸,其中它的 3'末端连接到固体载体上。

将核苷单体连接到固体载体上的大量装置对于本领域的技术人员是已知的。典型地,通常使用通过琥珀酸酯或半琥珀酸酯共价连接到受控孔玻璃上的单体。通过半琥珀酸酯偶合到受控孔玻璃上的常规的保护核苷商购自大量的来源(例如, Glen Research, Sterling, Vermont, U.S.A.; Applied

Biosystemis, Foster City, Calif., U.S.A.; 以及 Pharmacia LKB, Piscataway, N.J., U.S.A.)。

一旦合成出全长寡核苷酸, 就将寡核苷酸在使用前脱保护并且从固体载体上解离。解离和脱保护可以同时发生或以任何次序相继发生。两种程序可以交替地进行, 以将一些保护基团在其从固体载体中解离掉之前从寡核苷酸中除去, 并且将其它的基团在溶液中从解离的寡核苷酸中脱保护。活动的序列取决于存在的特定封闭基团、连接到固体载体上的特定连接链和进行合成的个体的选择。在脱保护在解离之前的情况下, 可以将保护基团从保持结合在固体载体上的寡核苷酸中洗掉。相反, 在脱保护在解离之后的情况下, 去除的保护基团将保留在具有寡核苷酸的溶液中。通常, 寡核苷酸在使用之前需要从这些保护基团中分离。

在一个优选的实施方案和大多数商业 DNA 合成中, 将在 5'-羟基上的保护基团在合成的最后阶段除去。然后, 将寡核苷酸与固体载体解离掉, 并且在溶液中发生余下的脱保护。5'-羟基保护基团的去除典型地需要用整个合成中利用的相同试剂处理, 以在偶合到下一个核苷酸单体之前去除末端 5'-羟基保护基团。在 5'-羟基保护基团为二甲氧基三甲苯基的情况下, 可以通过用乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸或三氟乙酸的处理来完成脱保护。

在寡核苷酸为核糖核苷酸并且 2'-羟基被叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBDMS) 部分封闭的情况下, 后一基团可以使用在四氢呋喃中的氟化四丁铵在合成结束时除去。参见 Wu 等, J. Org. Chem. 55: 4717-4724 (1990)。苯氧基乙酰基保护基团可以用在醇中的无水氨除去(在这些条件下, TBDMS 基团是稳定的, 并且寡核苷酸未被解离)。胞苷的苯甲酰基保护基团也用在醇中的无水氨除去。

解离和完全脱保护的寡核苷酸可以直接使用(在冻干或蒸发以除去脱保护试剂之后)或它们可以在纯化之后使用。合成寡核苷酸的纯化通常是需要的, 以将全长寡核苷酸与在脱保护步骤中除去的保护基团分离, 并且更重要的是, 与在合成过程中封端未能与下一个核苷酸单体偶合的寡核苷酸时形成的截断寡核苷酸分离。

寡核苷酸纯化技术对于本领域技术人员是周知的。方法包括但不限于, 二氧化硅板上的薄层色谱(TLC), 凝胶电泳, 大小分极(例如使用

Sephadex 柱), 反相高性能液相色谱(HPLC)和阴离子交换色谱 (例如使用单-Q 柱, Pharmacia-LKB, Piscataway, N. J., U.S.A.). 对于寡核苷酸纯化的论述, 参见 McLaughlin 等, chapter 5 和 Wu 等, chapter 6 in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Gait (ed.), IRL, Press, Washington, D.C., (1984)。

4. 染料-标记的寡核苷酸探针

本发明还提供染料-标记的寡核苷酸探针或染料-寡核苷酸共轭物, 它们可以用于检测互补的 DNA 或 RNA 靶。

本发明的寡核苷酸是单链的, 天然或合成 DNA 或 RNA、PNA(肽核酸)和 LNA(锁定核酸), 它们结合式(I)-(VIII)中的至少一个的染料标记。将染料标记通过共价结合而结合在寡核苷酸序列上。如此, 提供有活性基团的染料试剂偶合到固体载体或寡核苷酸上, 从而在预定的位置引入到寡核苷酸序列中。

如上所述, 本发明的染料试剂特别适宜于但不限于使用亚磷酰胺方法的寡核苷酸自动化合成中。这样的染料试剂的活性基团是亚磷酰胺, 例如, 氰基乙基保护的亚磷酰胺。在染料试剂中的极性基团以它们的酯形式掩蔽, 使得染料试剂不带任何负电荷。因此, 掩蔽的染料试剂与在自动化合成中需要的无水和轻度酸性条件相容。在完成寡核苷酸合成之后, 除去酯保护基团, 并且再生带负电荷的极性基团如 $-\text{AsO}_3^{2-}$ 或 $-\text{AsO}_3\text{H}^-$ 。

因此, 在另一个实施方案中, 本发明提供一种用具有一个或多个 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)_2$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 的荧光和/或猝灭剂染料标记的寡核苷酸, 其中,

R^6 和 R^7 相同或不同, 并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环, 所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子, 其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同, 并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基, $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代。

在再一个实施方案中,染料-标记的寡核苷酸还包含一种或多种用于改善结合效率和杂交稳定性的小沟结合体(MGB)。可以任选修饰 MGB 本身,以包含一个或多个用于提高极性和亲水性的极性基团,以与杂交条件更相容。更具体而言,可以将本发明的寡核苷酸任选共轭到式(VI)的 MGB 上。

在一个实施方案中,染料-标记的寡核苷酸是在后合成共轭过程中通过将染料引入在固体载体上的或溶液中的寡核苷酸中而制备的。

在另一个实施方案中,本发明的寡核苷酸是通过包含下列步骤的自动化合成制备的:

通过酯化保护所有带负电的极性基团,使得染料不再带负电荷,所述的染料还包含能够共轭到寡核苷酸上的活性基团;

进行使用亚磷酰胺方法的寡核苷酸的自动化合成,以提供染料-标记的寡核苷酸;

将染料-标记的寡核苷酸与反应介质分离; 以及

脱保护染料-标记的寡核苷酸的极性基团,以提供带负电荷的极性基团。

更具体而言,本发明的寡核苷酸是通过包含下列步骤的自动化合成制备的:

提供具有一个或多个 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 的式(I)-(VIII)染料试剂,其中,

R^6 和 R^7 相同或不同,并且独立地为 H, 烷基, 芳基, 或杂芳基; 或

R^6 和 R^7 连接在一起形成 5 或 6-元杂环,所述的杂环包含砷和连接 R^6 和 R^7 的两个氧原子,其中 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ 为 $[\text{C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (w 为 2 或 3), 其中每个 R^8 相同或不同,并且独立地为氢, 羟基, 氰基, $-\text{OC}(\text{O})$ -烷基, $-\text{OC}(\text{O})$ -芳基, 烷基, 芳基, 烷基羰基, 芳基羰基, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$, $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$, 或相邻碳原子上的两个 R^8 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基, 或同一碳上的两个 R^8 形成氧代;

进行使用亚磷酰胺方法的寡核苷酸的自动化合成,以提供染料-标记的寡核苷酸;

脱保护染料-标记的寡核苷酸的 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 或 $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$, 以提供具有带负电荷的极性基团的染料-标记的寡核苷酸,所述的极性基团

选自 $-\text{AsO}_3^{2-}$ 或 $-\text{AsO}_3\text{H}^-$, 以及

将染料-标记的寡核苷酸与反应介质分离。

本发明的染料-标记的寡核苷酸可以用作探针, 用于在各种 DNA 扩增/定量方法中检测生物样品中的核酸互补链, 所述的方法包括例如, 5'-核酸酶分析, 链置换扩增(SDA), 基于核酸序列的扩增(NASBA), 滚环扩增(RCA), 以及用于在溶液相或固相(例如阵列)分析中直接检测靶。

此外, 本发明的染料-标记的寡核苷酸可以基本上以任何格式用作探针, 如 TaqMan™ 探针, 分子标志, Scorpion® 探针/引物, Sunrise probes™, 构象辅助的探针, 点火探针和 Invader Detection 探针。WO01/86001 描述了在核酸的扩增、检测和定量中具有暗色猝灭剂的核酸探针, 该申请以其全部内容结合在此。

因此, 本发明提供一种使用共轭到一种或多种式(I-III)和(V-VIII)的染料化合物的寡核苷酸的方法, 以检测具有与寡核苷酸互补的序列的靶, 该寡核苷酸还任选包含任选被一个或多个磷酸极性基团取代的 MGB, 该方法包括以下步骤:

将染料-标记的寡核苷酸探针加入到生物样品中, 其中探针对于靶核酸是互补或基本上互补的;

使探针与靶核酸在适宜的条件下并且以足够量的时间杂交; 以及
检测从染料中发射的荧光。

具有含至少一个极性磷酸基团的染料中的一种或两种, 同时带有猝灭剂染料和荧光报道分子染料的寡核苷酸可以特别用作在实时聚合酶链反应(PCR)中的探针。PCR 技术扩增特定的 DNA 序列, 从而可以由单一 DNA 靶拷贝进行 DNA 探针分析。PCR 技术的"实时"改变可以检测 PCR 的进展, 因为它通过使用光谱荧光温度周期计发生。三种通行的分析格式使用 DNA 探针, 其随着 PCR 的进展变成荧光, 包括 TaqMan™, 分子标志和 Scorpion® 引物, 它们都是探针的杂交物, 该探针依赖于定量用的荧光共振能量传递(FRET)。

TaqMan™ 探针是寡核苷酸, 其含有典型地在 5'碱基上的荧光染料和典型地位于 3'碱基上的猝灭染料。在辐照时, 激发的荧光染料将能量传递给附近的猝灭染料分子而不是发荧光, 导致非荧光底物。将 TaqMan™ 探针

设计成杂交至 PCR 产物的内部区域的形式。在 PCR 过程中，在聚合酶复制其上结合有 TaqMan™ 探针的模板时，聚合酶的 5'外切核酸酶活性解离探针。这将荧光和猝灭染料分离，并且 FRET 不再发生。荧光在每个循环与探针解离的比率成比例地增大。

分子标志也含有荧光和猝灭染料，但是只有当猝灭染料与荧光染料直接相邻时，FRET 才发生。将分子标志设计成采用发夹结构而在溶液中是自由的形式，从而使荧光染料和猝灭剂十分接近。在分子标志杂交到靶时，荧光染料和猝灭剂分离，FRET 不发生，并且荧光染料通过辐照而发光。不同于 TaqMan™ 探针，将分子标志设计为在扩增反应过程中保持完整的，并且在用于信号测量的每个循环中必须重新结合到靶上。

Scorpion®探针和引物是 DxS Ltd 的专有技术。Scorpion®引物是双官能团分子，其中引物共价连接到探针上。该分子还含有荧光团(报道分子)和猝灭剂。在没有靶的情况下，猝灭剂就近吸收由荧光团发射的荧光。在 PCR 反应的过程中，在靶存在下，荧光团和猝灭剂变得彼此隔开，这导致发射的荧光增加。可以在反应管中检测并且测量荧光。

Scorpion®引物典型地在 5'末端携带有探针元件。探针为在一个末端具有荧光团而在另一个末端具有猝灭剂的自补茎序列。引物序列在 5'-末端处被修饰。它在发夹环的开始处含有 PCR 阻断剂(通常将 HEG 单体作为阻断试剂加入)。在最初的 PCR 循环中，引物杂交到靶上，并且由于聚合酶的作用而发生扩延。通过使用多个探针，可以将 Scorpion®引物用来检测和识别点突变。每个探针可以用不同的荧光团标记，以产生不同的颜色。

在 Scorpion®引物中，探针物理地偶合到引物上，这表明导致信号产生的反应为单分子反应。这与由其它技术如 TaqMan™ 或分子标志要求的双分子碰撞相反。

在 PCR 扩延的一个循环完成后，新合成的靶区域将附着到与探针相同的链上。在变性和退火的第二循环之后，探针和靶杂交。发夹环的变性需要比生成的新 DNA 双链体更少的能量。因而，发夹序列杂交到部分新生成的 PCR 产物上。这导致荧光团与猝灭剂分离，并且引起发射。

TaqMan™ 探针、分子标志和 Scorpion®引物可以在相同的样品中测量多个 DNA 物种(多重 PCR)，因为可以将具有不同发射光谱的荧光染料附

着到不同的探针上。多重 PCR 允许内部控制，以共扩增，并且可以在单管、均相分析中进行等位基因辨别。这些杂交探针将仅杂交到 PCR 中的真实靶上，并且不杂交到引物-二聚体或其它假产物上。

因此，在一个方面，本发明的寡核苷酸包含构象的本发明荧光和猝灭剂染料，使得荧光染料被猝灭剂染料猝灭，其中两种染料中的一种或两种包含一个或多个磷酸极性基团。该寡核苷酸在实时 PCR 中可以用作“分子标志”。

在一个实施方案中，本发明提供一种使用 TaqMan™ 分析检测现实生活中的靶序列扩增的方法，该方法包括以下步骤：

提供染料-标记的寡核苷酸探针，该探针包含共轭到式(IV)的猝灭剂染料和式(I-III)和(V-VIII)中的任何一种荧光染料的寡核苷酸，每种染料具有一个或多个极性磷酸酯基，其中所述的探针处于使荧光染料由猝灭剂染料猝灭的构象；

将所述的染料-标记的寡核苷酸探针加入到 PCR 反应介质中；

在靶存在时，运行 PCR 温度循环，以使所述的探针与所述的靶杂交，并且由 Taq 聚合酶裂开；以及

从裂开的染料实时读出荧光信号。

在另一个实施方案中，本发明提供一种使用 Molecular Beacon 分析检测现实生活中的靶序列扩增的方法，该方法包括以下步骤：

提供染料-标记的寡核苷酸探针，该探针包含共轭到式(IV)的猝灭剂染料和式(I-III)和(V-VIII)中的任何一种荧光染料上的寡核苷酸，每种染料具有一个或多个极性磷酸酯基，其中所述的探针处于使荧光染料由猝灭剂染料猝灭的构象；

将所述的染料-标记的寡核苷酸探针加入到 PCR 反应介质中；

在靶存在时，运行 PCR 温度循环，以使所述的探针与所述的靶杂交，从而分离所述的荧光染料和猝灭剂染料；以及

从未猝灭的荧光染料实时读出荧光信号。

在再一个实施方案中，本发明提供一种使用 Scorpion Probe 分析检测现实生活中的靶序列扩增的方法，该方法包括以下步骤：

提供染料-标记的寡核苷酸探针，该探针包含引物、共轭到式(IV)的猝

灭剂染料和式(I-III)和(V-VIII)中的任何一种荧光染料的寡核苷酸, 每种染料具有一个或多个极性肿酸酯基, 其中所述的探针处于使荧光染料由猝灭剂染料猝灭的构象;

将所述的染料-标记的寡核苷酸探针加入到 PCR 反应介质中;

运行 PCR 温度循环, 以使所述的引物与靶 DNA 杂交, 从而扩延在靶 DNA 上的探针;

使扩延的探针热变性, 这使得猝灭剂染料解离;

使扩延的探针冷却以进行内部重排, 这使得荧光染料以靶特异性的方式发荧光; 以及

从荧光染料实时读出荧光信号。

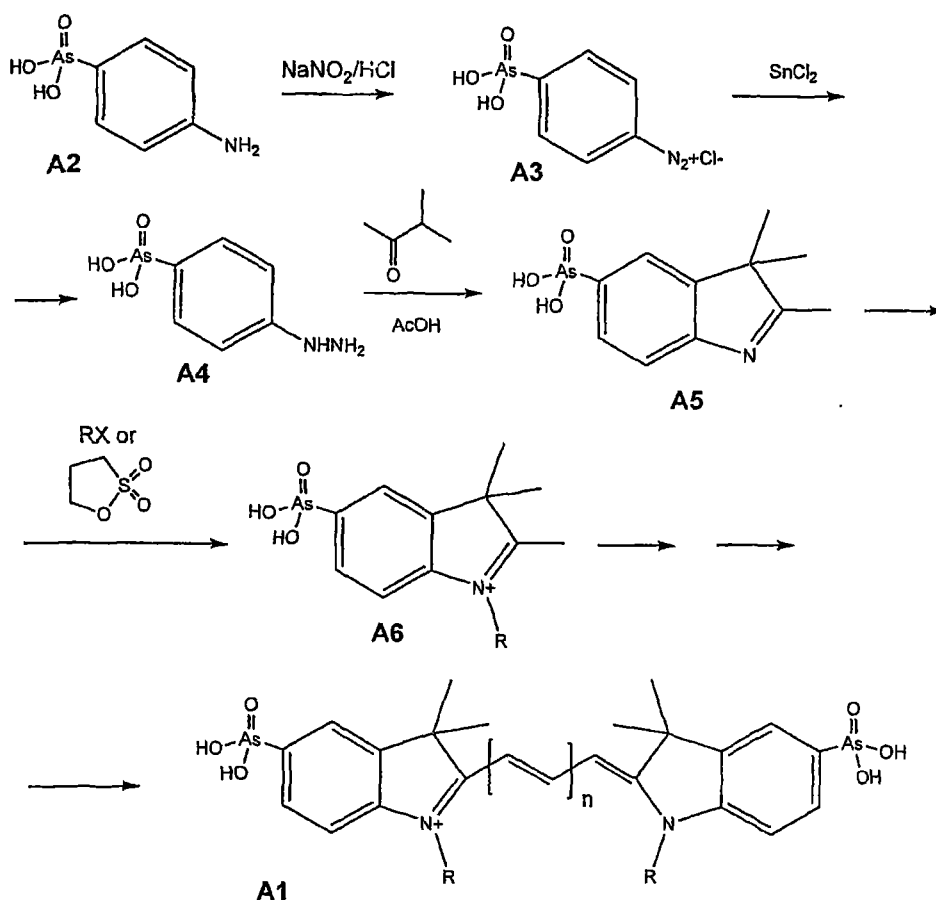
5. 合成

a. 结合肿酸酯基的通用方案

肿酸酯染料可以由可商购的芳基肿酸开始制备, 其随后可以组装到染料化合物上。此途径可以由根据方案 1 的合成肿酸羰花青染料示例。

具体而言, 根据已知的文献方法[Bart Justus Liebig's Ann. Chem. 429, 100, 1922], 可以将对氨基苯基肿酸(A2)通过用在盐酸中的亚硝酸钠处理而转化为相应的重氮盐(A3)。通过与已知程序类似的程序[Zhang, Peng; Meng, Jiben; Li, Xiaoliu; Matsuura, Teruo; Wang, Yongmei J. Heterocycl. Chem. 39, 1, pp 179-184, 2002], 可以将重氮盐通过使用氯化锡(II)而还原为相应的肼(A4)。类似于对于合成类似的磺酰基吲哚类化合物而报道的方法[Mujumdar R. B., Ernst L. A., Mujumdar S. R., Lewis C. J.和 Waggoner A. S. Bioconjugate Chem., 4(2), pp 105-111, 1993], 肼 A4 的 Fisher 环化提供相应的吲哚(A5)和二氢吲哚鎓(indolinium)盐(A6)。这些出版物还描述了由磺酰基吲哚类化合物制备磺酰基羰花青染料的方法, 可以将这些方法用来组装本发明的肿酸酯羰花青染料。同样, 可以将在这些出版物中对于制备不同 N-取代所述的方法相同地用来制备具有不同 N-取代基的肿酸酯染料(A1)。典型地, N-取代基提供具有用于将染料引入核酸、蛋白和其它生物分子的活性基团(-L-R_x 部分)的接头。

方案 1



$\text{R} = \text{烷基}, -(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}, -(\text{CH}_2)_m\text{AsO}_3\text{H}_2, -(\text{CH}_2)_m\text{COOH}, -(\text{CH}_2)_m\text{OH}$

$m = 0-3$

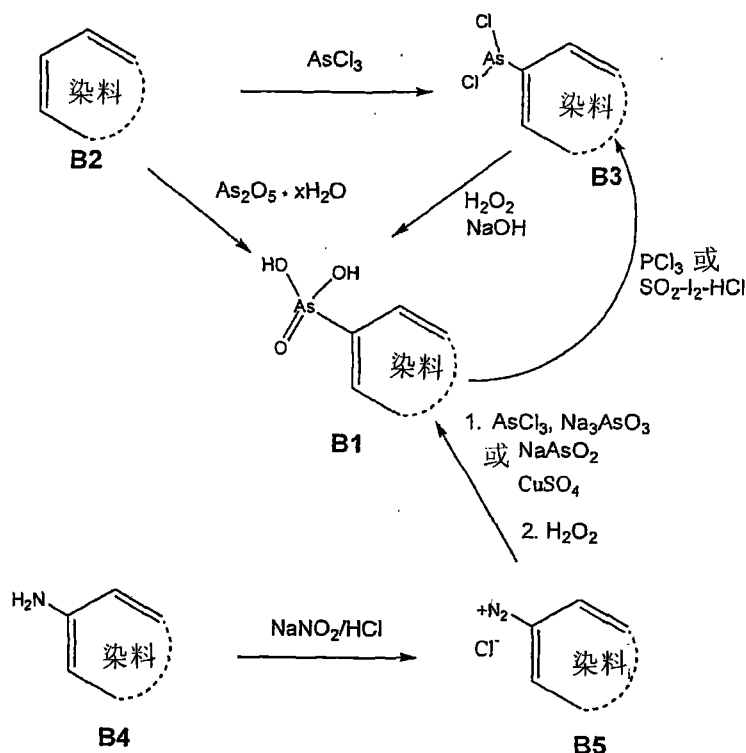
备选地，芳基肿酸酯染料可以根据在方案 2 中示例的两条途径中的任何一条，通过将肿酸基直接引入到染料分子中来制备。

在一条途径中，将肿酸酯基通过亲电子取代，使染料与砷亲电子试剂如砷酸反应[Ehrlich, Bertheim Chem Ber., 40, p.3293, 1907; Benda, Kahn Chem. Ber., 41, pp 1674-1676, 1908]或与三氯化砷反应[Varma, Raman, J. Indian Chem Soc, 16, pp 515-516, 1939]以提供亚砷酸酯中间体 B3 而直接引入到染料分子(B2)的芳族成分中。随后的氧化将亚砷酸酯中间体 B3 转化为肿酸酯 B1 [Gough, King J. Chem. Soc, pp 669-683, 1930]。可以将

肿酸酯 B1 通过用 PCl_3 处理 [Ehrlich, Bertheim, Chem. Ber., 43, p 918, 1910; Chem. Ber., 44, p 1264, 1911]或用 $\text{SO}_2\text{-I}_2\text{-HCl}$ 试剂处理[Gavrilov V. I., Khusnutdinova F. M., Gornova N. N J.Gen.Chem.USSR (Engl. Transl.), 57, pp 300-303, 1987; Zh. Obshch. Khim., 57, 2, pp 350-354, 1987]而转变回二氯亚砷酸酯 B3。

在第二条途径中,可以将肿酸酯基通过置换氨基染料 B4 的氨基而引入到染料分子中。具体地,首先将氨基转化为重氮盐 B5,其进行亚砷酸酯的铜催化置换(Bart 反应),接着氧化成肿酸取代基,得到 B1 [Bardos, T.J.等, J. Med. Chem., 9, pp 221-227, 1966]。

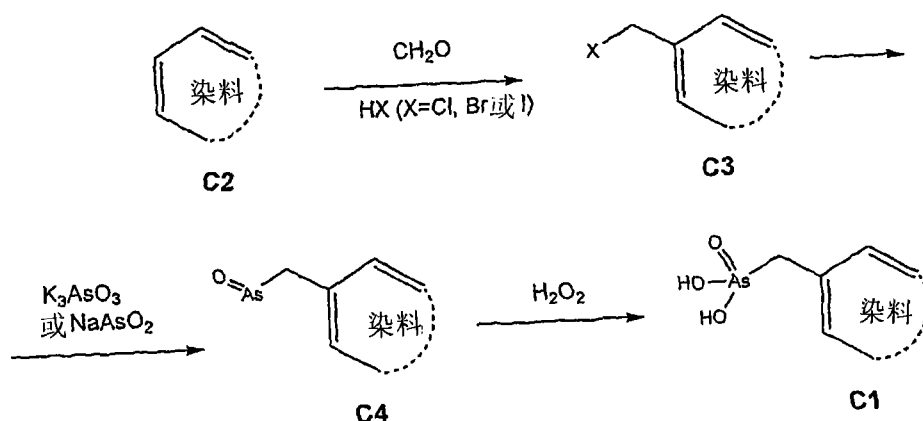
方案 2



可以根据方案 3 得到脂族肿酸酯(C1)。在此途径中,首先将染料(C2)中的芳族成分烷基化。烷基化包括但不限于氯甲基化[Dacka, Stanislaw Pol. J. Chem., 57, 10-12, pp1345-1352, 1983],溴甲基化[Gibson.S.等, Tetrahedron, 25, pp 5047-5057, 1969]或碘甲基化[Sandin, Fieser J. Am. Chem.

Soc. 62, pp 3098-3103, 1940]。然后, 将烷基化染料(C3)转化为无机砷酸盐(C4), 接着进行氧化步骤以提供 C1[Quick; Adams J. Am. Chem. Soc. 44, p 811, 1922; Chernokal'skii, B. D 等, J.Gen.Chem.USSR (Engl.Transl.), 36, pp 1674-1675, 1966; Zh. Obshch. Khim. 36, 1677-1679, 1966; Dehn, Mc Grath J. Am. Chem. Soc. 28, p 352, 1906]。

方案 3



b. 砷酸酯染料保护和脱保护

极性砷酸染料, 染料- $\text{As}(=\text{O})(\text{OH})_2$, 可以根据已知的技术转变成为合宜的非-极性形式, 如砷酸二酯, 染料- $\text{As}(=\text{O})(\text{OR})_2$ 。如上所论述的, 这样的保护形式可以与自动化寡核苷酸合成相容, 并且可以在当高染料极性对于共轭或染色目的不适宜时的应用中使用。

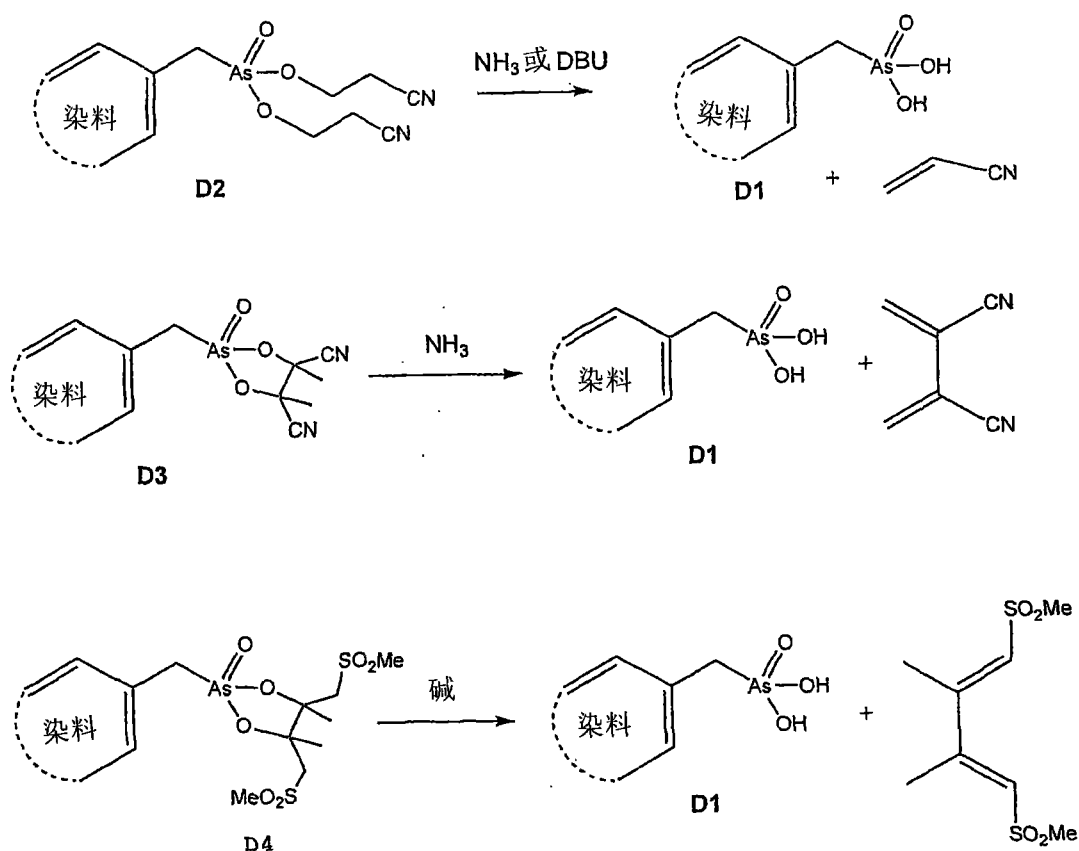
砷酸二酯染料可以通过在 CaC_2 或 CuSO_4 存在下, 用醇处理砷酸而得到 [Chernokal'skii B.D 等, J.Gen.Chem.USSR (Engl.Transl.), 36, pp 1670-1673, 1966; Zh. Obshch. Khim., 36, pp 1673-1676, 1966]。用于制备砷酸二酯的备选方法基于使亚砷酸盐二氯化物与醇反应, 随后氧化为砷酸二酯 [Werbel 等, J. Org. Chem., 22, p 452, 1957]。典型地保护基团是 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ 和 $-\text{CMe}_2-\text{CMe}_2-$ (频哪醇)。这些基团可以与寡核苷酸合成条件相容, 并且通过采用如方案 4 中示例的脱保护方法而可以容易地除去。

氰基乙基酯通常用于保护寡核苷酸自动化合成中的磷酸酯 [Atkinson, T.和 Smith, Oligonucleotide Synthesis: a practical approach, Gait, M.J. (编

辑), IRL Press Limited, Oxford, 1984]。此基团可以在氨或 DBU 存在下除去, 并且相信机理涉及 β -消去。因此, 在一条途径中, 可以以类似的方式脱保护肿酸氰基乙基酯(D2), 以提供肿酸染料(D1)。

备选地, 开始可以将肿酸以与普通非环状氰基乙基保护基团类似的方式, 通过与 2,3-二羟基-2,3-二甲基-琥珀腈(succininitrile)反应而转化为原酸酯(D3) (Bailey 等, J. Org. Chem., 28, 1963, p. 828-831)。这些酯在氨存在下进行 β -消去, 以将肿酸二酯返回到其游离酸形式(D1)。类似地, 可以由已知的程序[Farkas, F.等, Helv. Chim Acta 74(7), 1991, p. 1511-1519]制备用于保护染料肿酸(D4)的 2,3-二甲基-1,4-双(苯基磺基二氧代)丁烷-2,3-二醇试剂。该二酯可以在酸存在下进行 β -消去, 以将肿酸二酯返回到其游离酸形式(D1)。

方案 4



由于以下原因螯合保护对于肿酸是优选的：保护条件的简单性、由螯合物提供的在水性条件下提高的稳定性，和所选择衍生物脱保护的容易性。如上所述，还可以将染料的肿酸通过肿酸与醇和酚(ROH)的直接反应而掩蔽成其原酸酯形式：染料-As(OR)₄。螯合形式的原酸酯是特别有利的，其中两个 R 基团连接在一起形成环酯：染料-As(O₂W)₂。典型地，螯合的原酸酯可以通过与包括焦儿茶酚在内的二醇在脱水条件如水与苯的共沸消除下直接反应而得到 [Casey J. P., Mislow K. J. Chem. Soc. D, pp 1410-1411, 1970]。酯化的程度(二酯相对于原酸酯)极大地取决于螯合试剂的性质和反应和分离的条件。这些反应的一些实例示于图 3 中。

更具体而言，可以将染料化合物的肿酸取代基通过与具有由两个或三个碳原子分开的活性氧的螯合试剂反应而转化成其螯合原酸酯形式。典型地，二醇-基螯合试剂可以由通式 W(OH)₂ 表示，其中 W 为-[C(R⁸)₂]_w- (w 为 2 或 3)，每个 R⁸ 相同或不同，并且独立地为氢，羟基，氰基，-OC(O)-烷基，-OC(O)-芳基，烷基，芳基，烷基羰基，芳基羰基，-CH₂CN，-CH₂SO₂Me，-CH₂SO₂Ph，或相邻碳原子上的两个 R⁸ 与它们连接的碳原子一起形成芳基或杂芳基，或同一碳上的两个 R⁸ 形成氧代。

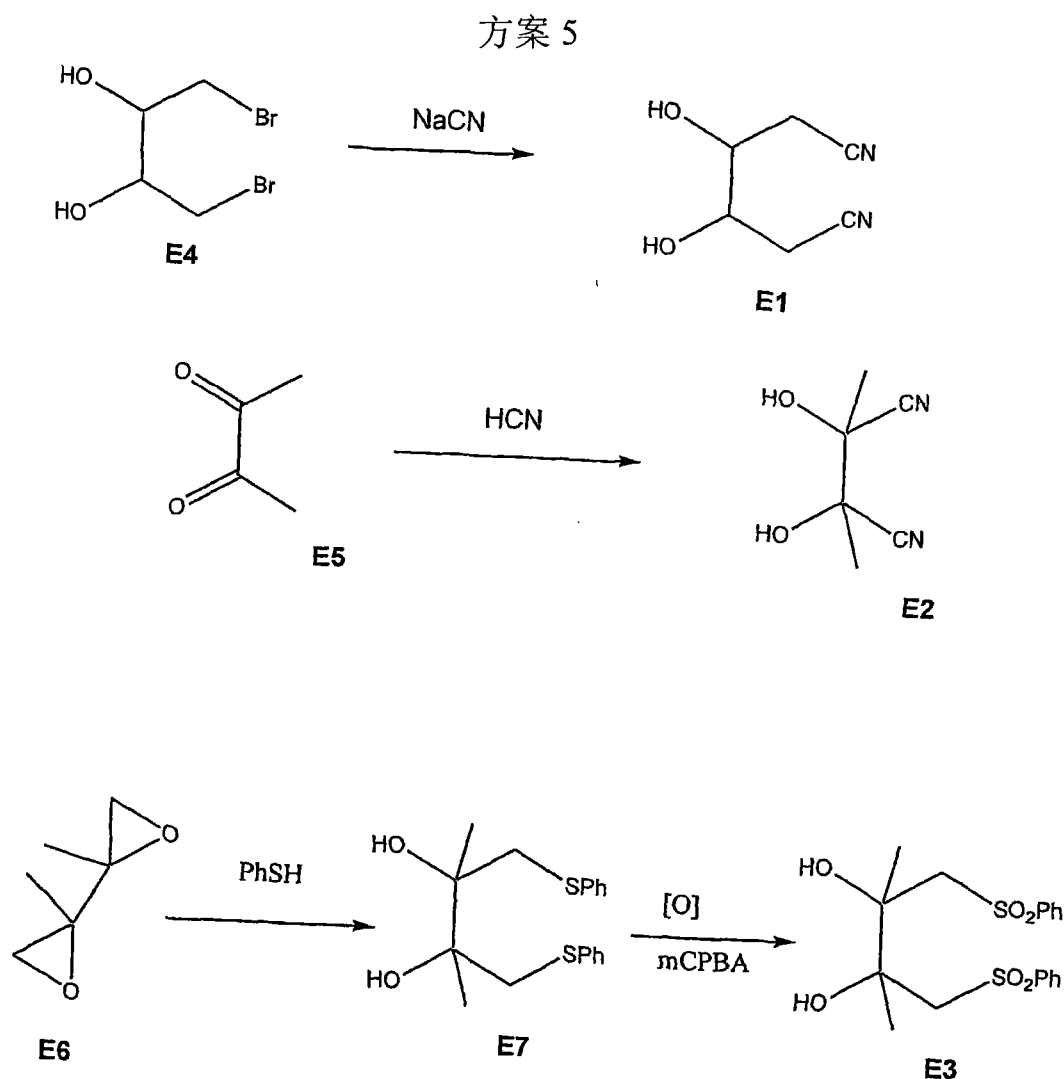
适宜的螯合试剂的实例包括但不限于：乙二醇类，乙醇醛类，乙二醛类，乙醇酸类，乙醛酸类，丙二醇类，3-羟基丙酸醛类，3-羟基丙酸类，丙醛类和焦儿茶酚类。

用这些试剂螯合保护肿酸可以在脱水试剂如乙酸酐存在下，在 [Salmi, Merivuori, Laaksonen *Suom. Kemistil.* B; 19; 1946; 102, 107] 中所述的条件下实现。而且，可以设计这些螯合(保护)基团，以在标准的氨脱保护条件下消去。为此，应该优化保护基团以提供在 pH 1-8 的通常水性条件下的基本稳定性，并且在氨水条件下消去。氨可以用作亲核体、用作碱或用作亲核体和碱。在寡核苷酸合成中对于碱基和磷酸酯的脱保护很好地建立了氨脱保护的这些机理 [Atkinson, T. 和 Smith, 1984]。

特别有用的保护试剂是频哪醇(2,3-二甲基-2,3-丁二醇)、2,4-二甲基-2,4-戊二醇和 2-羟基异丁酸。如实施例 11 中所示，频哪醇和肿酸染料形成稳定的双-频哪醇合原酸酯螯合物，该螯合剂可以用氨水在室温水解。2,4-二甲基-2,4-戊二醇形成稳定的二酯螯合物，该螯合物也可以用氨降解。

2-羟基异丁酸形成(1:1)螯合物,该螯合物在水性条件下不稳定但是在有机溶液中稳定。

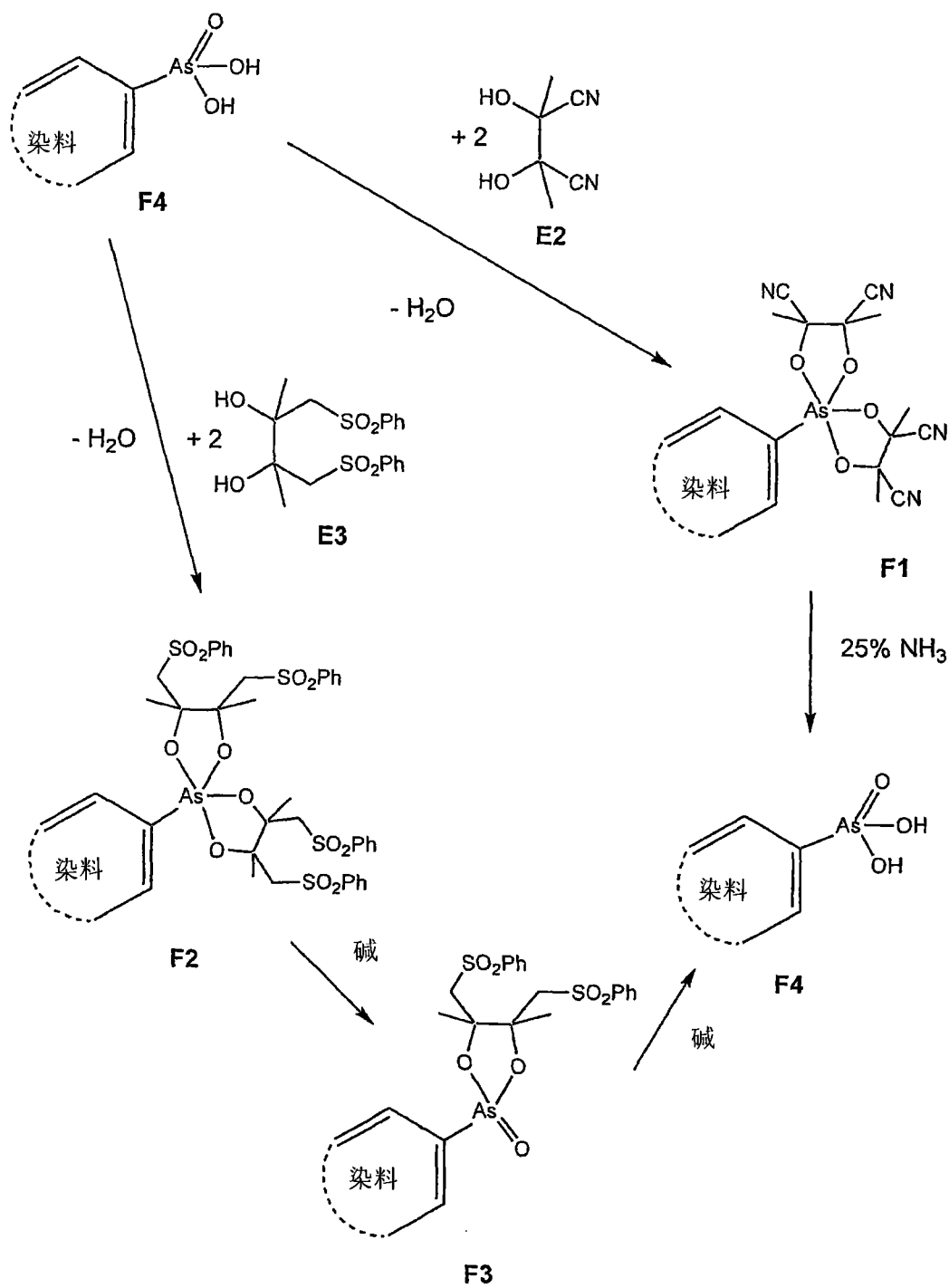
特别设计的二醇可以具有双重目的:同时保护肼酸和提供有利于保护基团消去的化学部分。为此,方案5示例了具有附属部分如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{C}(\text{Me})\text{CN}$ 和 $-\text{C}(\text{Me})\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ 的二醇(E1、E2和E3),所述的附属部分可以根据上面在方案4中所示的机理进行 β 消去。



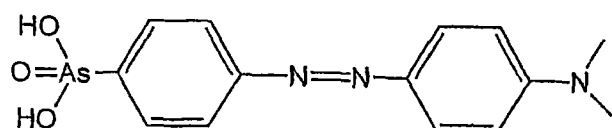
具体而言,根据已知的程序[Przybytek Chem. Ber., 17, p 1095, 1884]合成二醇 E1。Bailey 等, 1963, 二酮 E5 与 HCN 反应生成二醇 E2。按照 Farkas, F.等, 1991 的程序, 1,2:3,4-二环氧-2,3-二甲基丁烷与苯硫酚反应, 制备二醇 E7, 二醇 E7 被间氯过苯甲酸(mCPBA)氧化成保护试剂 E3。二醇 E1-E3 可以在脱水条件[Salmi, Merivuori, Laaksonen, 1946]下与肼酸

染料反应，以提供相应的原膦酸酯螯合物 3a (图 3)、F1 和 F2 (方案 6)。

方案 6

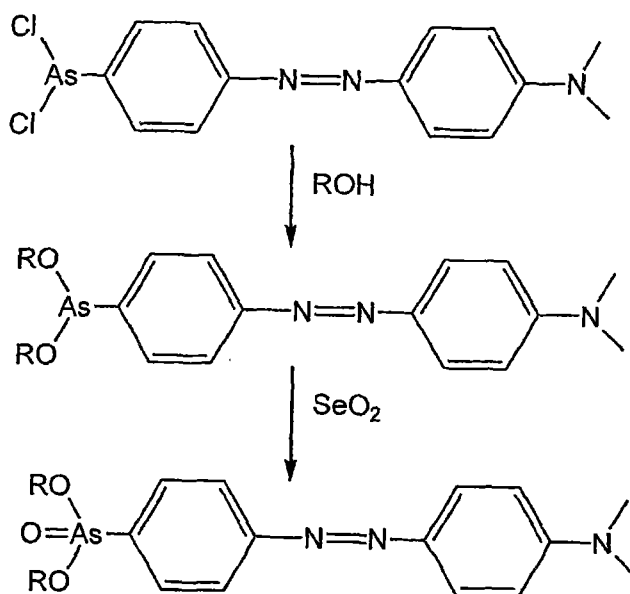


螯合物 3a (图 3)和 F1 的脱保护是通过对于 3a 的 β -消去或对于 F1 的 γ -环化辅助的氨处理而实现的。F2 的脱保护需要强碱如 DBU, 以生成中间体 F3, 该中间体 F3 在碱性条件下随后进一步进行脱保护。可以将[4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯基]肿酸[Barrowcliff, Pyman, Remfry J. Chem. Soc, 93, p 1900, 1908]用作简单的模型化合物, 用来证明如何优选染料中肿酸基的保护和脱保护条件。



如方案 7 中示例的, 将上述化合物通过用 PCl_3 处理[Ehrlich, Bertheim, 1910 -1911]或用 $\text{SO}_2\text{-I}_2\text{-HCl}$ 试剂处理[Gavrilov V. I., Khusnutdinova F. M., Gornova N. N. 1987]而还原为二氯肿基衍生物。二氯肿基染料衍生物用醇处理, 接着进行随后的氧化, 以提供相应的肿酸二酯[Werbel 等, 1957]。

方案 7



6. 实验和实施例

通用

所有的化学品和溶剂, 包括无水溶剂, 都购自 Sigma-Aldrich、TCI、Lancaster 或其它化学品供应商。受控孔玻璃(CPGs)可以购自 CPG, Inc. 或其它商业来源。蒸发是指使用旋转蒸发器和隔膜泵在减压条件下除去溶剂。合成染料的结构是使用 NMR 仪器如 Varian 或 Bruker 和在 Finnigan 或 Waters 仪器上的质谱建立的。反应混合物是通过使用在 Varian、Waters 或 Agilent 仪器上的 HPLC 或 LC-MS 色谱, 或通过使用 EM 硅胶 TLC 板的 TLC 而进行分析的。UV-VIS 光谱是在大量的可商购分光计如 Perkin-Elmer 上得到的。自动化寡核苷酸合成器购自 Applied Biosystem。

Real-time PCR 是使用 Cepheid SmartCycler®进行的。

磺酰基染料(如 Alexa 532)可获自 Molecular Probes, Inc. CyTM 染料可获自 Amersham Biosciences UK Limited。

焦儿茶酚(儿茶酚)、乙醛酸、乙二醛、乙二醇、1,4-二溴-2,3-丁二醇、对-和邻-氨基苯基膦酸购自 Sigma-Aldrich。

1-乙酰基-2,3-二氢-吡啶-5-基胺是由二氢吡啶, 由程序[Prasad G. K. B., Burchat A., Weeratunga G., Watts I., Dmitrienko G. I., Tetrahedron Lett, 32(38), pp 5035-5038, 1991]而得到的。

1-乙酰基-2,3-二氢-吡啶-5-基胺-6-膦酸是通过将相等量的 1-乙酰基-2,3-二氢-吡啶-5-基胺和 H₃AsO₄ 混合, 干燥, 并且将得到的盐在癸烷中回流 20 hr 而得到的。

6-乙酰基-3,6,7,8-四氢苯并[1,2-b:4,3-b']联吡咯-2-乙氧羰基-5-膦酸, MGB 结构单元, 是由 1-乙酰基-2,3-二氢-吡啶-5-基胺-6-膦酸, 按照用于非-膦酸酯化的化合物的 Fisher 环化程序[Samsoniya Sh. A., Kadzhrishvili D. O., Gordeev E. N., Zhigachev V. E., Kurkovskaya L. N., Suvorov N. N. Chem.Heterocycl.Comp. (Engl.Transl.), 18(4), pp 382-385, 1982; Khim. Geterotsikl. Soedin., 18(4), pp 504-507, 1982]而得到的。

如图 5 中所示的含有膦酸基的 MGB 试剂是由 6-乙酰基-3,6,7,8-四氢苯并[1,2-b:4,3-b']联吡咯-2-乙氧羰基-5-膦酸, 通过使用用于非酸类似物的公布程序[Boger D. L., Coleman R. S., Invergo B. J., Sakya S. M., Ishizaki T.

等 J. Am. Chem. Soc, 112, 12, pp 4623-4632, 1990], 随后由下面所述的方法保护肿酸基而制备的。

3,4-二羟基己二腈 (E1)是根据公布的程序[Przybytek Chem. Ber., 17, p 1095, 1884]而得到的。

2,3-二羟基-2,3-二甲基-琥珀腈是如 Bailey 等, J. Org. Chem., 28, 1963, p. 828-831 所述得到的。

2,3-二甲基-1,4-双(苯基硫代)丁烷-2,3-二醇是根据已知程序[Farkas, F. 等, Helv. Chim Acta 74(7), 1991, p. 1511-1519]制备的, 并且使用间氯过苯甲酸氧化成 2,3-二甲基-1,4-双(苯基硫代二氧代)丁烷-2,3-二醇。

4-肼基苯基肿酸(A4)是类似于 4-肼基苯甲酸, 使用在[Zhang, Peng; Meng, Jiben; Li, Xiaoliu; Matsuura, Teruo; Wang, Yongmei J. Heterocycl. Chem. 39, 1, pp 179-184, 2002]中所述的方法得到的。

[4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯基]肿酸是根据由[Barrowcliff, Pyman, Remfry J. Chem. Soc, 93, p 1900, 1908]所述的方法得到的。

方法 A

方法 A 提供用于 DMTr-保护在接头和核苷中的伯醇基团的典型程序。一般而言, 将具有伯醇的化合物(10 mmol)溶解于无水吡啶(100 mL)中, 并且在氩气下、于室温搅拌。将 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (DMTrCl, 3.5 g, 10.3 mmol)以一份加入, 并且搅拌 5 hr。将混合物蒸发并且放入到二氯甲烷(500 mL)中, 用饱和 NaHCO₃ 和饱和 NaCl 溶液(各 200 mL)洗涤, 并且用 Na₂SO₄ 干燥。将萃取物蒸发, 并且剩余物由使用乙酸乙酯、二氯甲烷和甲醇的混合物的硅胶快速色谱纯化, 制备 DMTr-保护的醇。

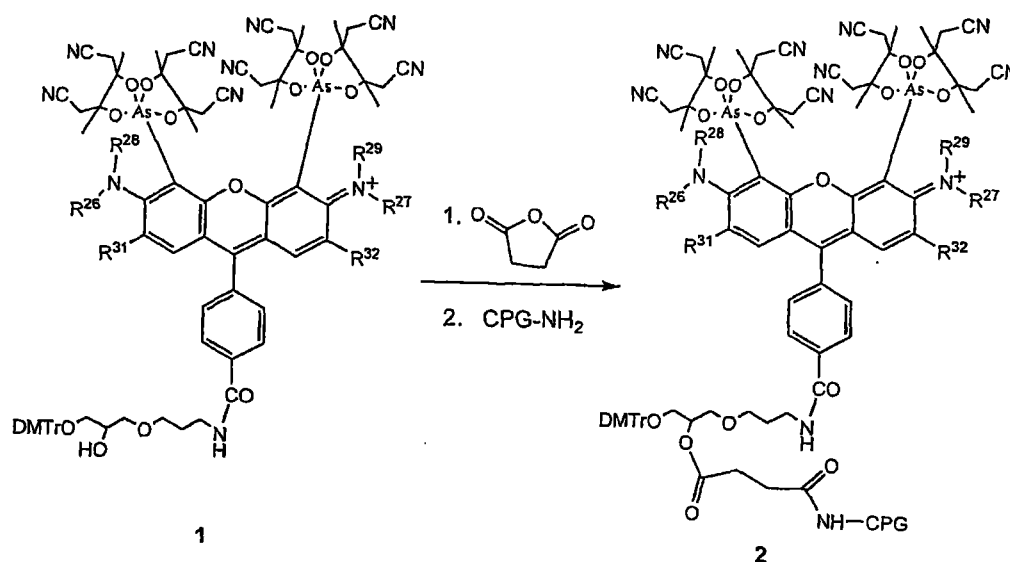
方法 B

方法 B 提供在 CPG 上固定的通用方法(还参见, Atkinson, T.和 Smith, Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Gait, M.J. (editor), IRL Press Limited, Oxford, 1984)。方案 8 示例了具有肿酸酯基, 接头基团的式(III)的咕吨染料, 其中伯醇由 DMTr 保护。接头基团通过与琥珀酸酐反应而修饰, 以提供活性基团-COOH, 该活性基团-COOH 又耦合到 CPG 上的氨基

上。

一般而言, 向化合物 1 (1.0 mmol) 在无水 DMF (10 mL) 中的溶液中, 加入琥珀酸酐 (0.15 g, 1.5 mmol), 三乙胺 (0.25 mL) 和作为催化剂的 4-二甲基氨基吡啶 (DMAP, 0.01 g), 并且将反应混合物于室温搅拌过夜, 并且通过用 1 mL 水处理 1 hr 以将未反应的酸酐水解而猝灭。将混合物蒸发并且放入二氯甲烷 (50 mL) 中, 用饱和 2 M NaHSO₄ 和饱和 NaCl 溶液 (各 20 mL) 洗涤, 并且用 Na₂SO₄ 干燥。将萃取物蒸发, 并且使用乙酸乙酯, 二氯甲烷和甲醇的混合物快速通过硅胶柱。纯化的材料应当没有琥珀酸。将琥珀酸酯中间体再溶解于无水 DMF (10 mL) 中, 用氨基-CPG (1 g) 和二环己基碳二亚胺 (DCC, 0.31 g, 1.5 mmol) 处理, 并且在氩气下搅拌过夜。将修饰的 CPG E 通过过滤收集, 并且通过用水彻底洗涤而纯化。负载量通过用酸对修饰的 CPG 去三苯甲基化并且通过光学密度测量释放的 DMTr 基团而定量。将此修饰的 CPG 2 直接用于将肿酸酯染料引入到寡核苷酸探针的 3'-末端。

方案 8

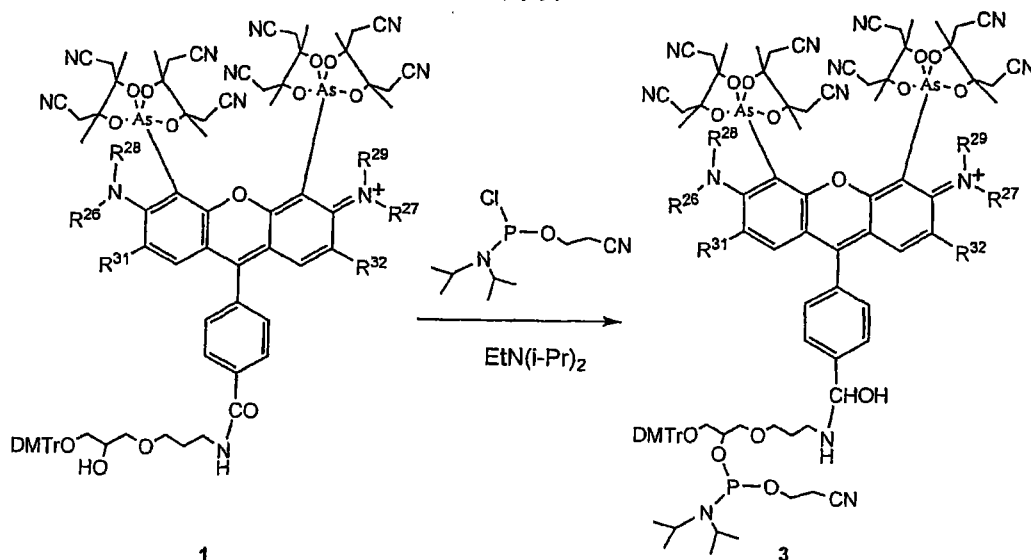


方法 C

方法 C 提供制备亚磷酰胺的通用方法(还参见: Atkinson, T., and Smith, Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Gait, M.J. (editor), IRL Press Limited, Oxford, 1984)。下面的方案 9 示例了式(III)的咕吨染料 1 经历标

准合成以提供亚磷酰胺化合物 3。

方案 9

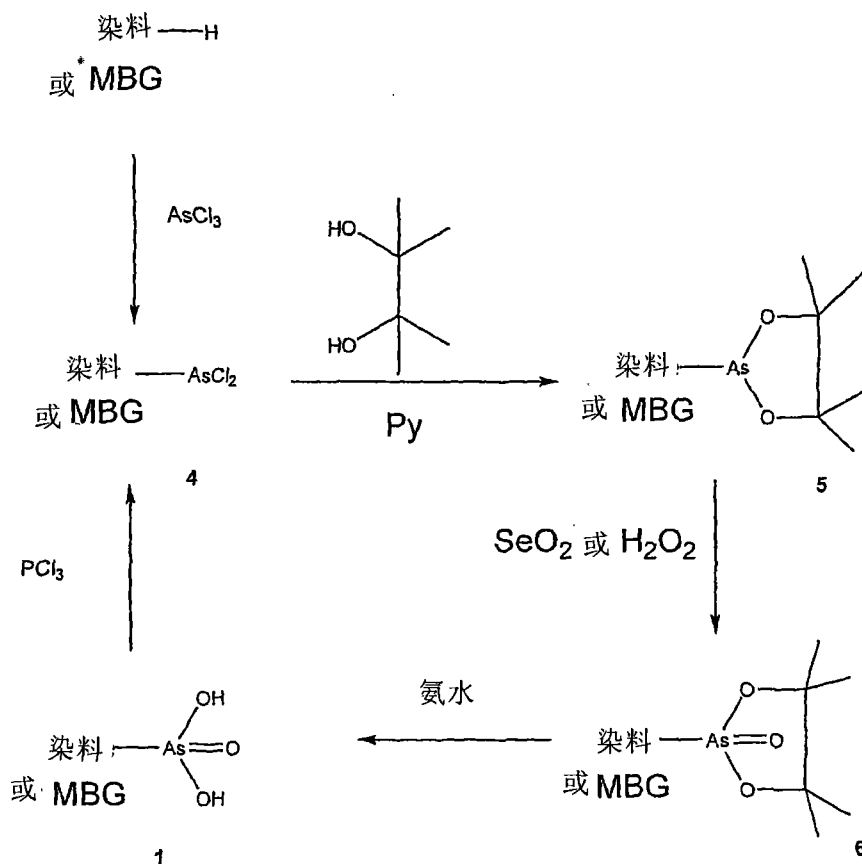


一般而言，向化合物 1 (1.0 mmol) 在无水二氯甲烷(20 ml)中的溶液中，加入 N-乙基-N,N-二异丙胺 (0.2 g, 1.55 mmol)，在氩气下于室温搅拌，并且通过滴加氯亚磷酸酯(2.5 g, 1.06 mmol)处理。将反应混合物搅拌 1 hr，并且用饱和 NaHCO_3 和饱和 NaCl 溶液(各 20 ml)洗涤，且用 Na_2SO_4 干燥。将萃取物蒸发，再溶解于最低量的醚中，并且沉淀入搅拌的己烷中。将固体 3 通过过滤收集，真空下干燥，并且直接用于将肿酸酯染料引入到内部位置，至寡核苷酸探针的 3'-或 5'-末端。

方法 D

方法 D 提供用于制备肿酸二酯的通用方法。肿酸二酯染料和含有肿酸酯基的 MGB 是通过用醇处理亚砷酸盐二氯化物，接着进行氧化步骤而得到的[Werbel 等, J. Org. Chem., 22, p 452, 1957]。适宜的醇的实例包括但不限于： $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ， $\text{HOCMe}_2\text{-CMe}_2\text{OH}$ (频哪醇)。方案 10 示例了具有亚砷酸盐二氯化物($-\text{AsCl}_2$)基的染料或 MGB(4)在频哪醇存在下进行酯化以提供中间体亚砷酸酯 5。5 随后由 SeO_2 或 H_2O_2 氧化生成染料(或 MGB)氰基乙基肿酸二酯 6。

方案 10



具体而言，具有亚砷酸盐二氯化物的染料或 MGBs 4 是由相应的肿酸 1 通过 PCl₃ 处理[Ehrlich, Bertheim, 1910 -1911]或通过用 AsCl₃ 直接亲电子取代染料或 MGBs [Varma 等, 1939]而得到的。

一般而言，将肿酸染料或 MGB 1 (1.0 mmol)在三氯化磷(20 ml) 中的悬浮液在氩气下缓慢地加热至 60°。将混合物搅拌 15 min，并且由 rotavap 蒸发，以形成亚砷酸盐二氯化物 4。不需要进一步的纯化，因为化合物 4 为湿气敏感的。备选地，将未取代的染料或 MGB (1.0 mmol)在三氯化砷(10 ml)中的悬浮液在氩气下于搅拌的情况下缓慢地加热至 100°。将混合物搅拌 30 min，并且倾倒入无水醚或己烷中，以沉淀亚砷酸盐二氯化物 4。此二氯亚砷酸盐 4 通过用二甲苯蒸发而干燥，并且直接用于下一酯化步骤。向二氯亚砷酸盐 4(1.0 mmol)在无水吡啶(10 mL)中的溶液中，在氩气下加入频哪醇(0.13 g, 1.1 mmol)，并且将混合物在室温搅拌 3 hr。将混合物蒸发，并且将剩余物由使用乙酸乙酯、二氯甲烷和甲醇的混合物的硅胶快速

色谱纯化,以制备化合物 5。在 1,4-二噁烷、丙酮或 DMF 中的 1M 溶液中,通过用当量量的 SeO_2 处理,在 60° 搅拌 3 hr,使红色 Se 沉淀物过滤通过硅藻土并且使用 rotavap 蒸发,将亚砷酸二酯 5 氧化成砷酸二酯 6。痕量的 DMF 通过与二甲苯共蒸发而除去,之后沉积在硅胶柱上。将混合物由使用乙酸乙酯、二氯甲烷和甲醇混合物的快速色谱纯化,从而制备出砷酸二酯 6。

使用如上所述的方法 A-C,将保护的砷酸酯染料或 MGB 6 固定在 CPG 上或转化为亚磷酰胺试剂。

使用自动化寡核苷酸合成的标准规程 [Atkinson, T. 和 Smith, Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Gait, MJ. (编辑), IRL Press Limited, Oxford, 1984], 进行使用所述的亚磷酰胺和 CPGs 合成寡核苷酸。在如方案 10 中所示例的条件下,进行随后砷酸酯在氨中的脱保护。

方法 E

方法 E 提供螯合保护砷酸染料的通用方法。该方法可以同时提供二酯和原酸酯-保护的砷酸酯。反应的结果极大地取决于螯合剂的性质/结构、反应条件和分离过程中的处理。氨-不稳定性的螯合保护基团的选择实例示于图 3 中。

砷酸染料衍生物(0.1 mmol)在乙酸(5 mL)中的溶液是通过简单地溶解酸形式或通过将 H_2SO_4 (当量量)加入到在乙酸 (5 mL)中的相应量的砷酸酯染料的钠、钾或三烷基铵盐中而制备的。将得到的溶液用相对于每个砷酸基为 1.5-倍过量的螯合剂、二醇或焦儿茶酚处理: 对于具有一个砷酸基的染料为 0.3 mmol, 并且对于具有两个砷酸基的染料为 0.6 mmol。可以与本文中所述的类似方法使用其它螯合剂如乙醇醛类、乙二醛类、乙醇酸类、乙醛酸类、3-羟基丙酸醛类、3-羟基丙酸类、丙醛类。

在乙酸酐(0.2 mL, 2.1 mmol)存在下,在室温,进行螯合反应 1 hr,或通过用等体积的二甲苯多次真空蒸发以除去水副产物,进行螯合反应。加入等份的新鲜二甲苯和乙酸,之后进行每次蒸发。需要将蒸发重复至少两次。蒸发的实际次数或反应时间和温度极大地取决于所使用的保护的螯合剂、二醇或焦儿茶酚,并且需要通过使用 TCL 监测反应进展而优化。典

型地，在溶剂体系 2-丁酮：甲酸：MeOH：水(12：1：1：1)中进行在硅胶板上的 TLC。通过硅胶快速色谱，使用 EtOAc：AcOH：MeOH 混合物或通过 RP HPLC 分离产物(染料-As(O₂W)₂)。更具体而言，O₂W(即，-O-W-O-)为二醇(包括焦儿茶酚)残基，并且 W 如本文中所定义。

方法 F

方法 F 提供制备肿酸染料的羧酸衍生物的活化酯的通用方法。

在氩气下，向染料-羧酸共轭物在无水三乙胺(3.1 mL)和二氯甲烷(40 mL)中的 0.56M 溶液中，加入三氟乙酸五氟苯酯(3.84 mL)，并且将混合物于室温搅拌 1 hr。加入己烷(40 mL)，以沉淀染料的肿酸三乙基铵的五氟苯基酯产物。将此活化酯由 RP HPLC 硅胶色谱在中性或酸性条件下纯化。如果需要，将该试剂离子交换成钠或钾盐形式，或使用标准规程将其直接用于与胺的生物共轭[Invitrogen, The Handbook -A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Chapter 1 -Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives]。

方法 G

测量肿酸酯-保护的染料的降解/脱保护率。

将保护的染料(1 mg)和甲基红染料 (0.5 mg, 内标, $\lambda_{\max}$ 482 nm)溶解于 MeOH (5 mL)中，并且与缓冲液或 25%氨水(45 mL)混合。将样品(1 mL)经历降解的时期。将样品迅速放置在真空中，以除去氨，并且再溶解于 MeOH 中，或在 pH 1.6 (0.1%三氟乙酸) -7.5 (0.1 M 乙酸三乙基铵)范围内的缓冲液中直接用于 HPLC 分析。在 Phenomenex Gemini 5um C18 110A 柱 (250×4.6 mm)上，使用 0-100%梯度的在 0.1 M 乙酸三乙基铵(pH 7.5) 缓冲液中的 MeCN 进行 HPLC 分析。使用 Varian ProStar PDA 检测器，在 200-600 nm 范围内检测色谱。基于在 520 nm 的峰面积，进行相对浓度的计算。内标在 8.6 min 产生峰值($\lambda_{\max}$ 482 nm)。

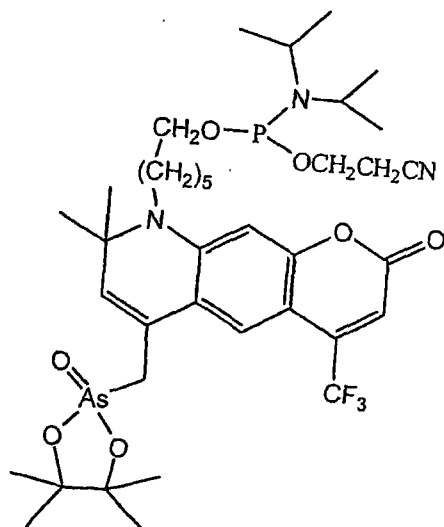
图 12 示例了与双-频哪醇保护的偶氮染料的碱-诱导脱保护相对应的典型动力学曲线的实例。

实施例

下面的实施例示例了本发明的特定染料试剂及它们的制备。根据方法 A-F 的任何适宜组合，得到详细的实验程序。

实施例 1

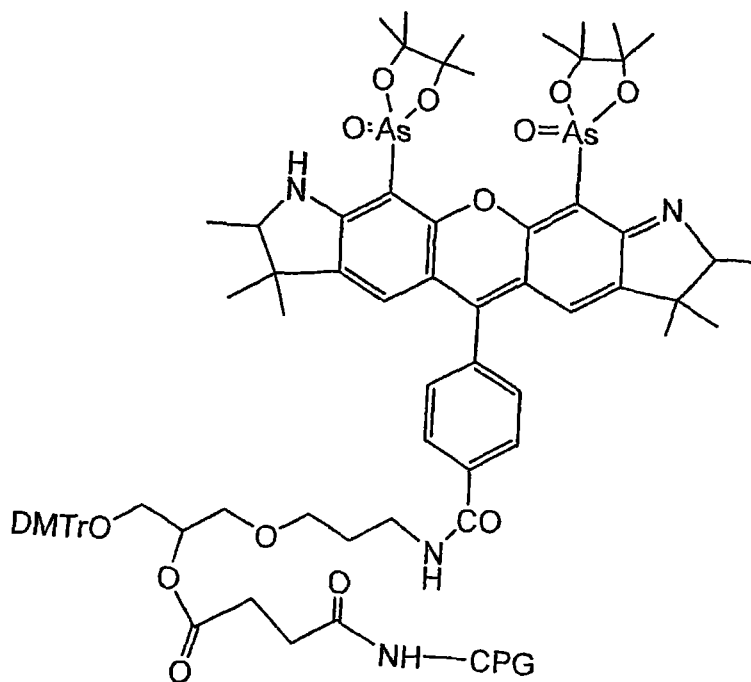
实施例 1 为具有肿酸酯的式(II)的亚磷酰胺染料试剂。该染料试剂适宜于使用亚磷酰胺方法的自动化寡核苷酸合成。



根据方法 C 和 D 制备该染料试剂。

实施例 2

实施例 2 示出了具有两个原肿酸酯的式(III)的羧酸染料试剂。该染料试剂适宜于附着到固体载体如 CPG 上以引发寡核苷酸合成。

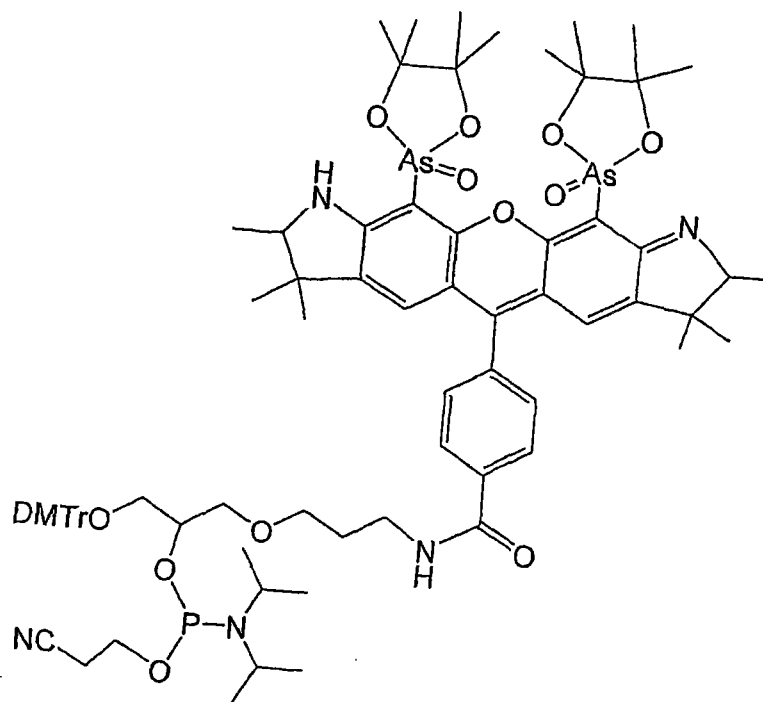


根据方法 B 和 D 制备该染料试剂。

实施例 3

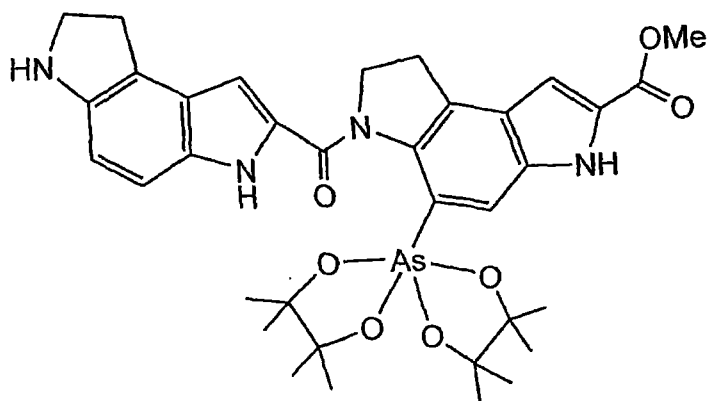
实施例 3 示出了采用频哪醇作为保护螯合剂的、具有两个膦酸二酯的式(III)的亚磷酰胺染料试剂。该染料试剂适宜于使用亚磷酰胺方法的自动化寡核苷酸合成。

根据方法 A、C、D 和 E 制备该染料试剂。更详细描述的合成路径进一步示例于图 4 中。



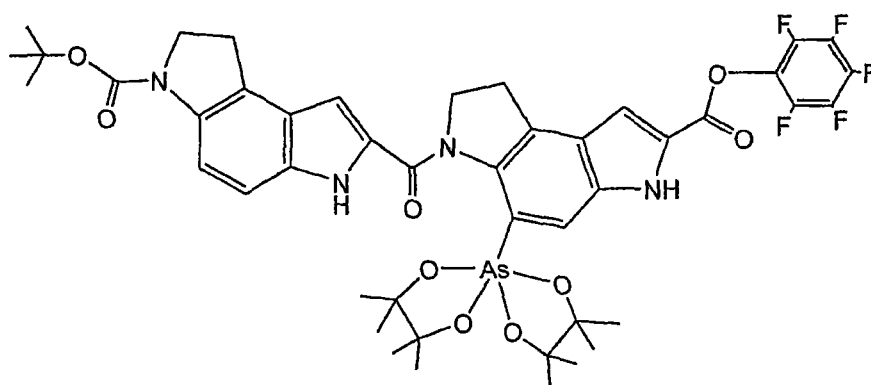
实施例 4

实施例 4 示出了具有螯合肿酸酯的式(IX)的 MGB 中间体。如图 5 中所示例制备 MGB。使用方法 E 得到该活化酯。



实施例 5

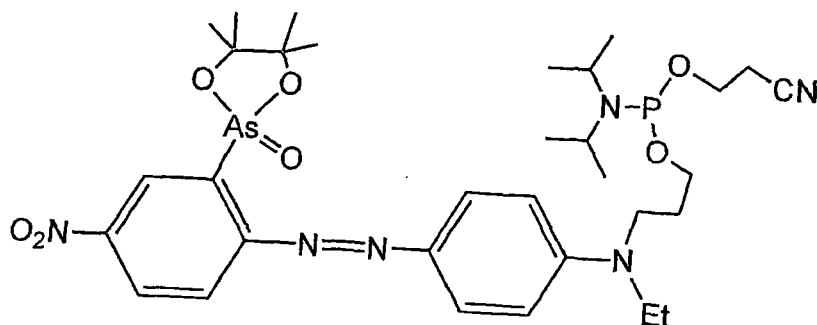
实施例 5 示出了具有肿酸酯和活化活性基团的式(VI)的 MGB(-COOH 的五氟苯基酯)。



使用 N-保护的吡咯并吡啶子集并且根据使用频哪醇作为二醇的方法 E，制备具有螯合肿酸酯的 MGB。根据如上面在图 5 中示例的合成路径，进行两个吡咯并吡啶子集的连接。随后的保护和脱保护进一步示例于图 6 中。使用方法 F 得到活化酯(五氟苯基酯)。将活化酯用于生物共轭或用于将第三 MGB 子集引入到试剂中。

实施例 6

实施例 6 示出了具有肿酸酯和亚磷酰胺活性基团的式(IV)的荧光猝灭剂染料试剂。该染料试剂适宜于使用亚磷酰胺方法的自动化寡核苷酸合成。

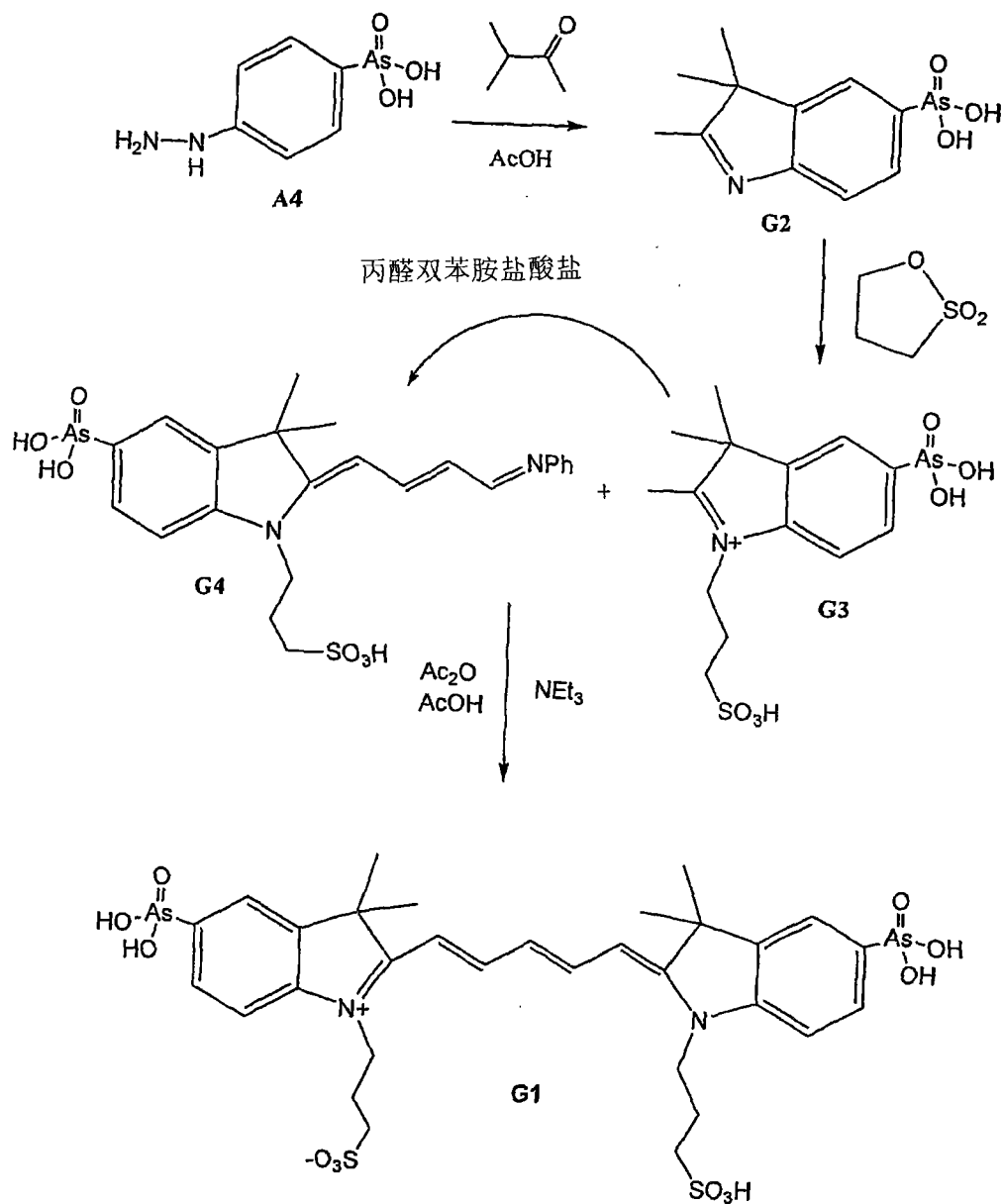


根据方法 C 制备荧光猝灭剂染料试剂。

实施例 7

式(Va)的极性羰花青染料 G1 的合成示例于方案 11 中。染料化合物 G1 是由 4-肼基苯基肿酸(A4)通过中间体 G2-G4 而制备的。

方案 11



具体而言, 以与 Fisher 环化磺基苯基肼以提供 2,3,3-三甲基假吲哚鎓-5-磺酰基 [Mujumdar R. B., Ernst L. A., Mujumdar S. R., Lewis C. J. 和 Waggoner A. S. Bioconjugate Chem., 4(2), pp 105-111, 1993] 类似的方式, 获得中间体 2,3,3-三甲基假吲哚鎓-5-磺酸 (G2)。

1-(γ-磺酸丙基)-2,3,3-三甲基假吲哚鎓-5-磺酸(G3)是按照由 Mujumdar

R. B.等, 1993 所述的相同通用程序, 通过用 1,3-丙烷磺内酯处理化合物 G2 而得到的。

中间体 G4 是改进由 Mujumdar R. B., 1993 所述的方法而得到的。在 Ar 下, 将 N-取代的假吲哚 G3 (0.14 g, 0.31 mmol)和丙醛双丙胺二盐酸盐 (0.09 g, 0.35 mmol)在乙酸 (2 mL)和三乙胺 (0.05 mL)混合物中的溶液在回流下搅拌 30 min。通过 HPLC, 由原料假吲哚 G3 的消失和混合物 UV 光谱的改变, 监测反应。由醚处理反应混合物。将化合物 G4 分离成不稳定的固体沉淀物, 并且将其在没有进一步纯化下用于制备对称或不对称染料的下一步骤。

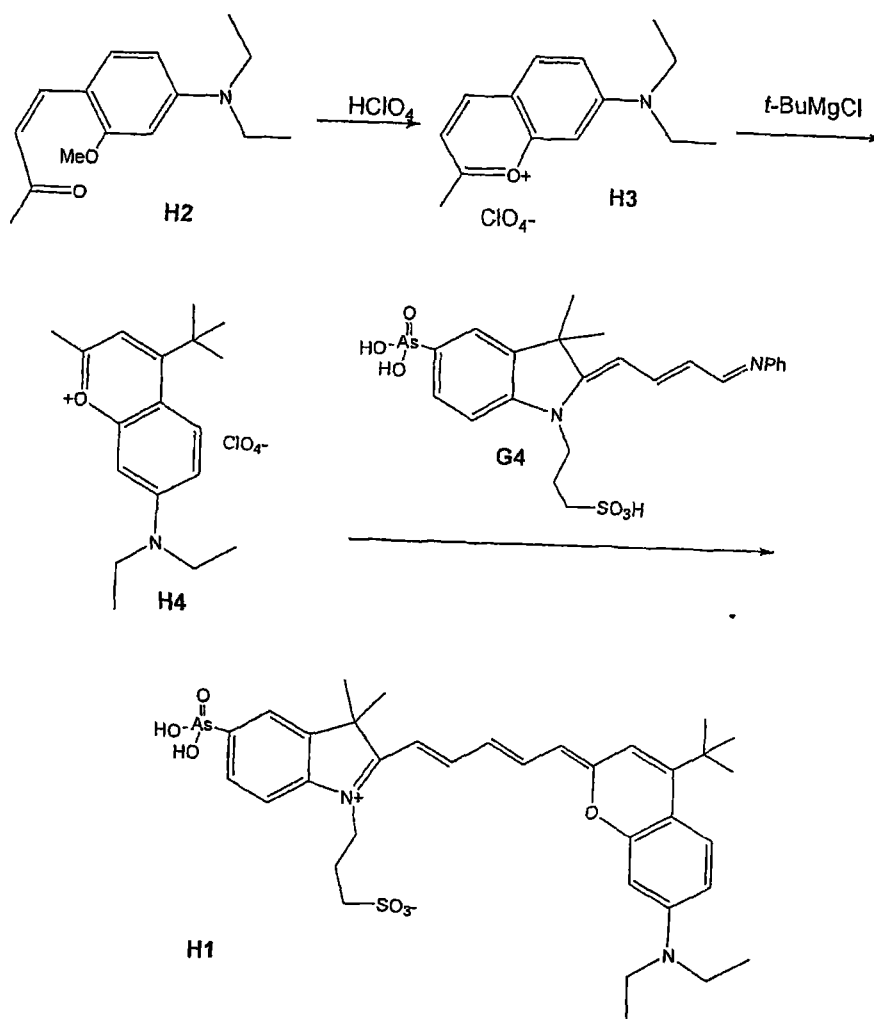
染料, 2-{5-[3',3'-二甲基-1'-(3-磺基丙基)-1',3'-亚二氢吲哚基-5'-膦酸酯]-戊-1,3-二烯基}-3,3-二甲基-1-(3-磺基丙基)-3H-吲哚鎓-5-膦酸(G1)是使用在磺基花青染料用文献[Briggs, M. S., Burns, D. D., Cooper, M. E., Gregory, S. J. Chem. Commun., 23, 2000, pp 2323 -2324]中所公布的通用程序获得的。G1 的激发和发射光谱示于图 11 中。

实施例 8

IR 染料 H1 的合成

式(VIa)的代表性 IR 染料 H1 的合成示于方案 12 中。在此实例中, x 为 2, R^{57} 为 $-(CH_2)_3SO_3H$, R^{61a} 和 R^{61b} 各自为乙基, 并且 R^{58a} 和 R^{58b} 各自为甲基。

方案 12

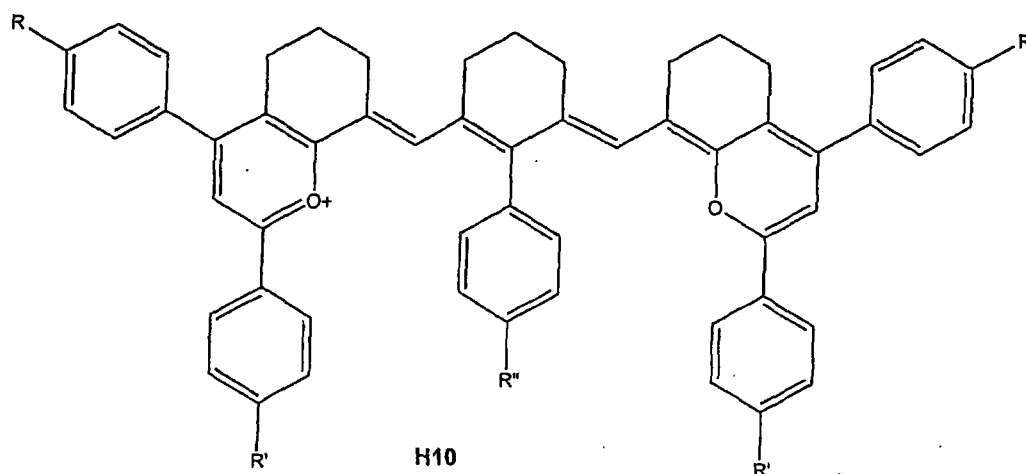


H2 是根据[Ducki S., Hadfield J. A., Hepworth L. A., Lawrence N. J., Liu C-Y., McGown A. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 7(24), pp 3091-3094, 1997]得到的。

中间体 H3 是酸-催化环化 H2 而得到的。随后与 $t\text{-BuMgCl}$ 反应生成 2-甲基-4-叔丁基-7-(N,N-二乙基氨基)苯并吡喃鎓高氯酸盐 H4[Doddi G., Ercolani G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, pp 271-276, 1986]。

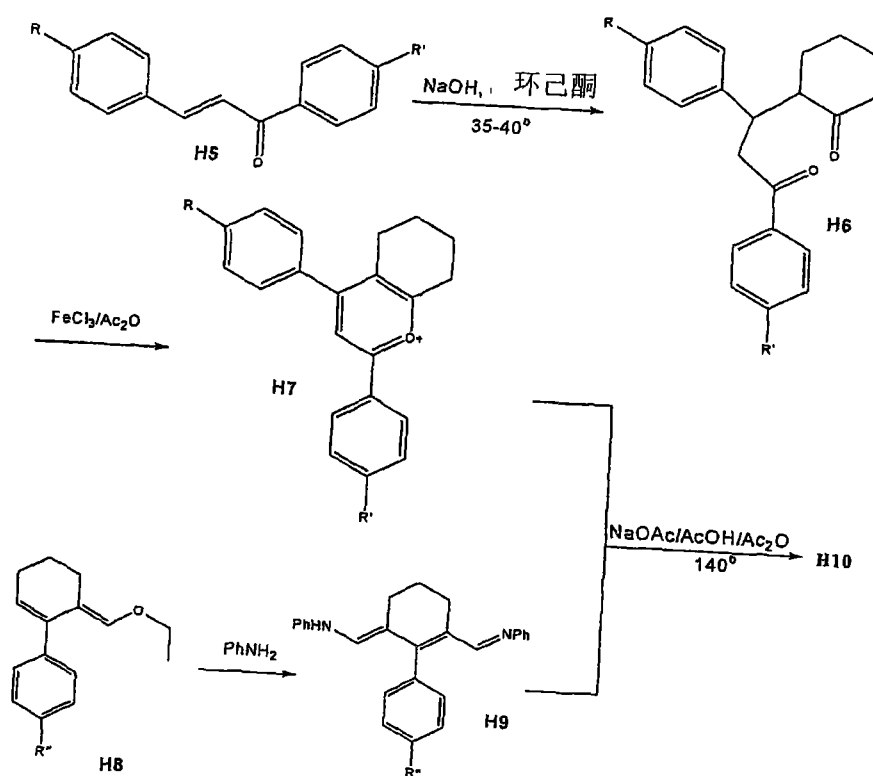
染料 1-(γ-磺酸丙基)-3,3-二甲基-2-[3-(4-叔丁基苯并吡喃-2-亚基)丙烯-1-基]-3H-吡啶鎓-5-膦酸(H1)是通过缩合上面所述的中间体 G4 和苯并吡喃鎓(chromelinium)高氯酸盐 H4, 通过在磺基花青染料用文献中公布的通用程序[Briggs, M. S.等, 2000]而得到的。

实施例 9 合成 IR 染料 H10



式(VII)的 IR 染料系列 H10 是根据在用于非取代的 IR 染料的公布程序[Ishchenko A. A., Kudinova M.A., Slominskii Yu. L., Tolmachev A. I. J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.), pp 150-157, 1986; Zh. Org. Khim., 22(1), pp 170-179, 1986]而合成的。合成染料 H10 的一个实例示例于方案 13 中。

方案 13



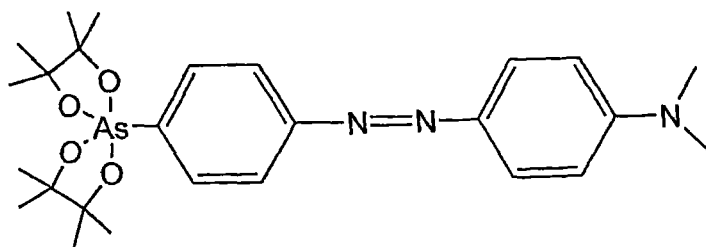
具体而言, R,R'-取代的中间体 H7 是通过在碱性条件下缩合肿酸酯取代的 H5 与环己酮, 接着在 FeCl_3 存在下, 氧化环化得到的 H6 而得到的 [Allen, Sallans Can. J. Res., 9, pp 574-579, 1933]。中间体 H9 是由 R"-取代的 H8 [Makin S. M., Pomogaev A. I., Boiko T. N., Nikiforova A. P. J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.), 17(11), pp 2033-2036, 1981; Zh. Org. Khim., 17(11), pp 2277-2281, 1981; Makin S. M., Pomogaev A. I. J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.), 18(10), 1982, pp 1918-1920; Zh. Org. Khim., 18(10), pp 2176-2179, 1982]而得到。然后, 将 H9 耦合至两当量的 H7, 以提供荧光 IR 染料 H10。

实施例 10

式(Vd)的具有肿酸基的方酸菁和硫代方酸菁染料是由 2,3,3-三甲基假吲哚鎓-5-肿酸(G2)及其衍生物如 1-(γ -磺酸丙基)-2,3,3-三甲基假吲哚鎓-5-肿酸(G3), 如在美国专利公布 US 2003/0235846 中所述得到的。

实施例 11

[4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯基]肿酸双-频哪醇合物



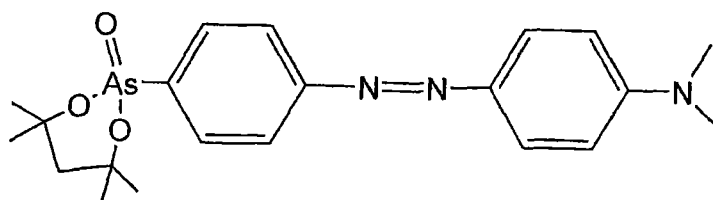
上述化合物是由方法 E 中列出的程序, 使用频哪醇作为二醇螯合试剂而得到的。通过用二甲苯的两次蒸发, 完成水的去除。由硅胶快速色谱并且使用 EtOAc:MeOH (10: 1)作为移动相, 分离粗产物。产物从 MeOH 中结晶, 形成橙-黄色固体, m.p. 239-242°。在硅胶板上发现单一的橙点, R_f = 0.5 (CHCl_3 -MeOH 10: 1)。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ , ppm: 1.0 (s, 12H, Me), 1.22 (s, 12H, Me), 3.08 (s, 6H, NMe_2), 6.83 (d, 2H, Ar), 7.83 (dd, 4H, Ar), 8.10 (d, 2H, Ar)。

该化合物在 pH 1.6-7.5 范围内、在水性缓冲液中是稳定的, 但是在 25%

氨水中降解,从而原酸酯水解。根据方法 G 测量在氨中的降解。在室温的降解率($\tau_{1/2}$)为约 3 hr。脱保护的全动力学示于图 12 中。双-频哪醇-保护的染料(峰在 13.3 min, $\lambda_{\max}$ 430 nm)和明显的单-频哪醇-保护的中间体(峰在 9.50 min, $\lambda_{\max}$ 440nm)在同一区域具有吸收。完全脱保护的染料(峰在 6.0 min)在 $\lambda_{\max}$ 480 nm 具有最大吸收。

实施例 12

[4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯基]肿酸 2,4-二甲基-2,4-戊二醇螯合物

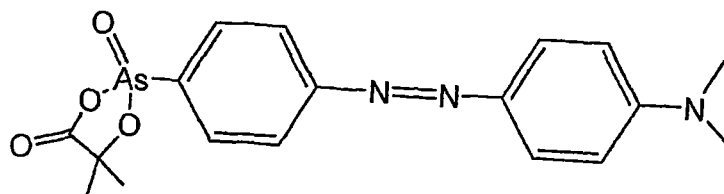


上述化合物是由方法 E 中列出的程序,使用 2,4-二甲基-2,4-戊二醇 (Aldrich)作为二醇螯合试剂而得到的。通过用二甲苯的两次蒸发,完成水的去除。由硅胶快速色谱并且使用 EtOAc:MeOH (10: 1)作为移动相,分离粗产物。产物从 MeOH 中结晶,形成橙-黄色固体, m.p. 234-238°。在硅胶板上发现单一的橙点, $R_f = 0.5$ (CHCl₃-MeOH 10: 1))。¹H NMR (DMSO-d₆) δ , ppm: 1.50 (s, 6H, Me), 1.60 (s, 6H, Me), 2.25 (q, 2H, CH₂), 3.08 (s, 6H, NMe₂), 6.90 (d, 2H, Ar), 7.80-8.05 (m, 6H, Ar)。

该化合物在 pH 1.6-7.5 范围内、在水性缓冲液中是相对稳定的,但是在 25%氨水中迅速降解。根据方法 G 测量在氨中的降解。在室温的完全降解率($\tau_{1/2}$)为约 15 min。在 HPLC 上观察 2,4-二甲基-2,4-戊二醇-保护的染料,峰在 8.9 min($\lambda_{\max}$ 449 nm)。脱保护的染料(峰在 6.0 min)在 $\lambda_{\max}$ 480 nm 具有最大吸收。4 hr 之后观察到实际上完全的脱保护。

实施例 13

[4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯基]肿酸, 与 2-羟基-异丁酸的螯合物

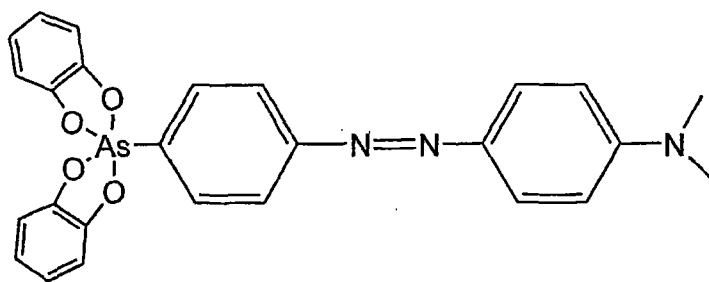


上述化合物是由方法 E 中列出的程序, 使用 2-羟基-异丁酸作为螯合试剂而得到的。通过用二甲苯的两次蒸发, 完成水的去除。由硅胶快速色谱并且使用 EtOAc 作为移动相, 分离粗产物。产物从 MeOH 中结晶, 形成橙-黄色固体, m.p. 233-235°。¹H NMR (DMSO-d₆) δ, ppm: 1.45 (s, 3H, Me), 1.60 (s, 3H, Me), 3.12 (s, 6H, NMe₂), 6.90 (d, 2H, Ar), 7.70-8.20 (m, 6H, Ar)。

该化合物在 pH 1.6-7.5 范围内、在水性缓冲液中是很不稳定的, 它在酸性条件下立即降解, 并且在 pH 7.5 于数分钟内降解。根据方法 G 测量在缓冲液中的降解。在室温和 pH 7.5 的完全降解率($\tau_{1/2}$)为约 10 min。2 hr 之后观察到实际上完全的脱保护。

实施例 14

[4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯基]肿酸双-儿茶酚螯合物



此化合物是根据方法 E 中列出的程序, 使用 1,2-二羟基苯(焦儿茶酚)作为螯合试剂得到的。得到的水通过用二甲苯的两次蒸发除去。该化合物从反应混合物中结晶, 并且在过滤器上收集, 用 MeOH 洗涤, 提供褐色固体, m.p. 220°(分解)。

该化合物在 pH 1.6-7.5 范围内、在水性缓冲液中是很稳定的; 并且它

在 25%氨水中、在室温很稳定。在 3 天的期限内未观察到化合物的降解。HPLC 显示峰在 8.0 min, $\lambda_{\max}$ 425 nm)。

实施例 15

实时 PCR 分析

在下面的实时(RT)-PCR 分析中试验制备的寡核苷酸探针(Cepheid Probes),所制备的寡核苷酸探针具有附着到 3'-末端的 BHQ-1 和 BHQ-2 猝灭剂染料(Black Hole Quenchers, 来自 Biosearch Technologies, Inc.)和共轭到 5'-末端的本发明荧光染料。

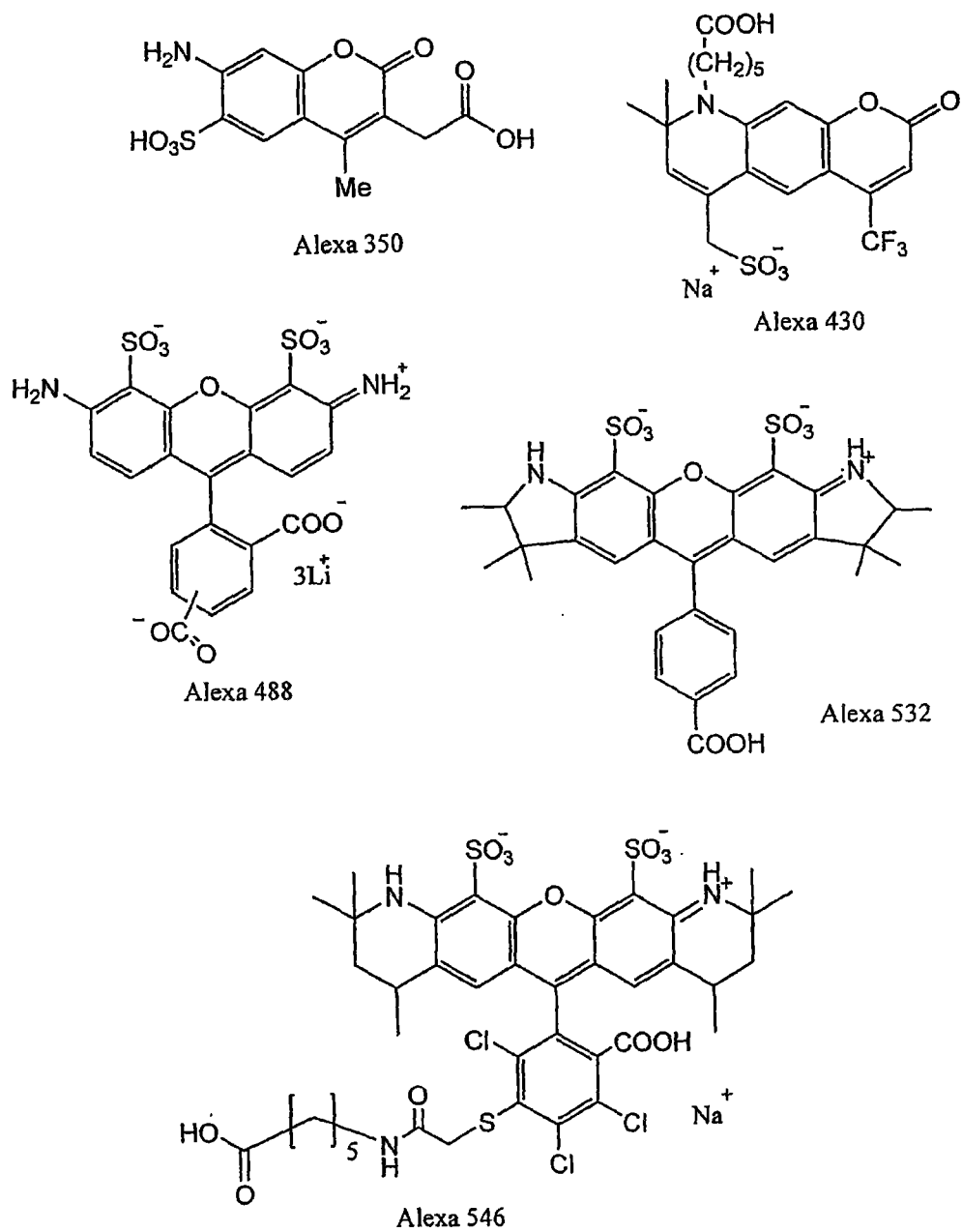
在 Cepheid SmartCycler®中进行荧光监测。每个反应含有 1×PCR Buffer (Invitrogen 10×PCR 缓冲贮备液), 每种 dNTP 400 μ M, 每种引物 250 nM, 200 nM Cepheid 探针, 20 单位/25 μ l SuperAse-In Inhibitor, 3 单位/25 μ l Platinum Taq 聚合酶, 1 单位/25 μ l Sensiscript RT 聚合酶, 1 ng/25 μ l K562 RNA 作为模板。循环程序是在 42°C 15 分钟 (1 个循环), 在 95°C 15 秒的 45 个循环, 然后在 60°C 30 秒。

采用 250 nM 的正向引物(5' CAT TCG GGC CGA GAT GTC 3')和 250 nM 的反向引物 r (5' CTC CAG GCC AGA AAG AGA GAG TAG 3'), 进行在 K562 RNA 中的 RT-PCR 检测。

通过荧光信号的指数增长, 证实靶的扩增。荧光信号在平均 25 个循环通过规定的阈值。

在此说明书中参考的和/或在申请信息表中列出的上述美国专利、美国专利申请公布、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物都通过引用而以它们的全部内容结合在此。

从上面所述, 应当理解的是, 尽管为了示例的目的, 本文已经描述了本发明的具体实施方案, 但是可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下, 进行各种改变。因此, 除了由后附权利要求限制外, 本发明不受限制。



Alexa Fluor® 350, 430, 488, 532 和 546 染料 (现有技术)

图 1

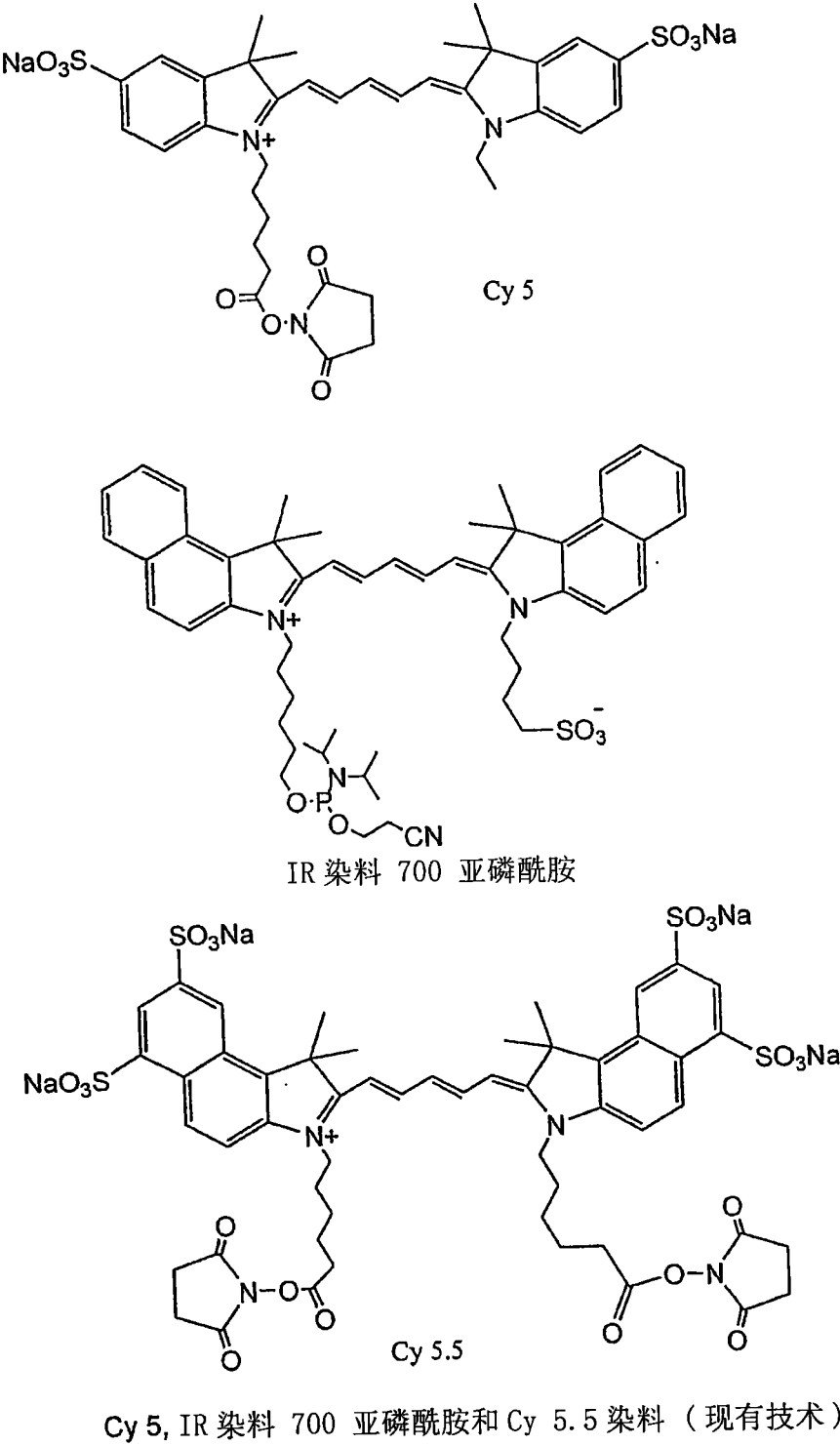
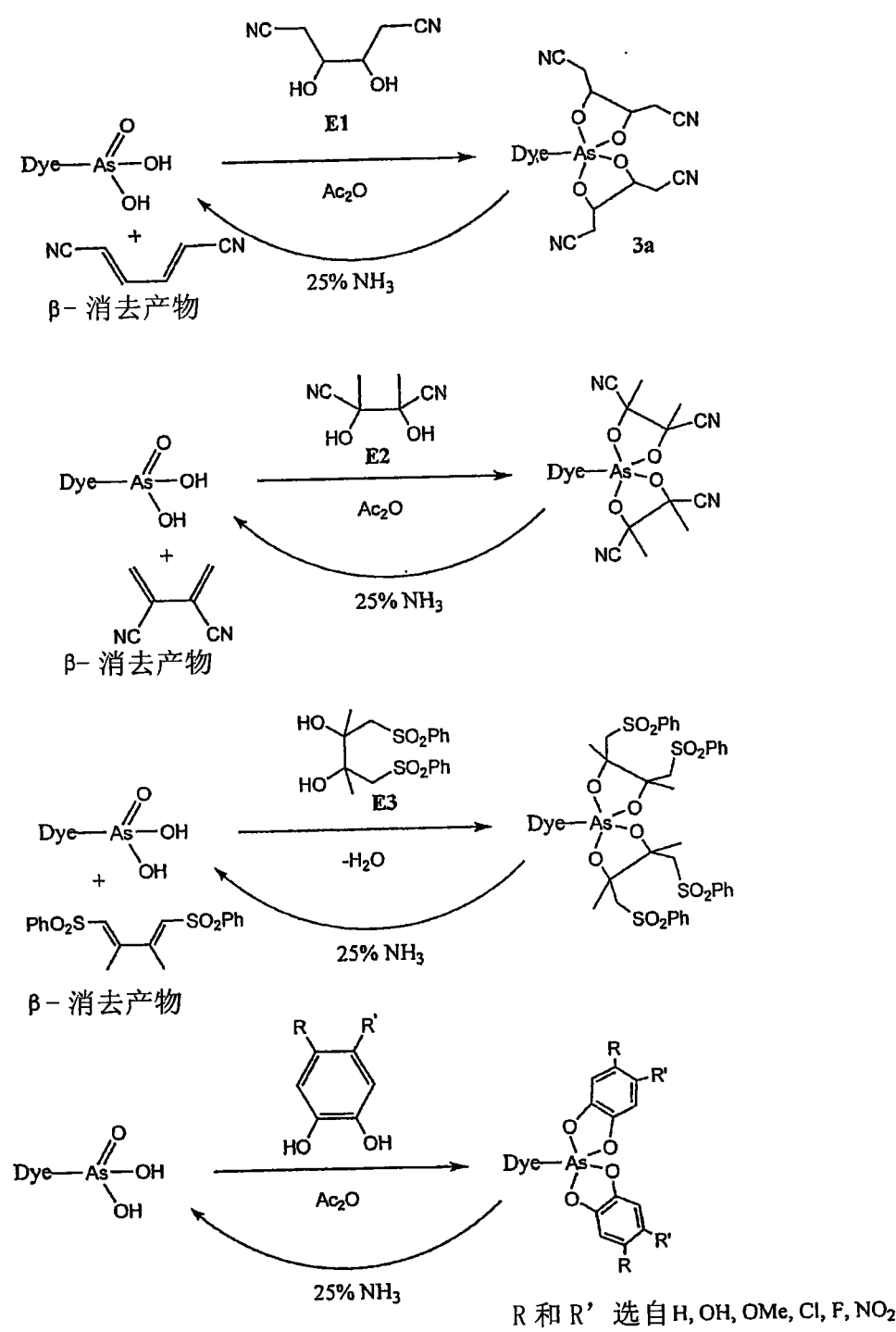
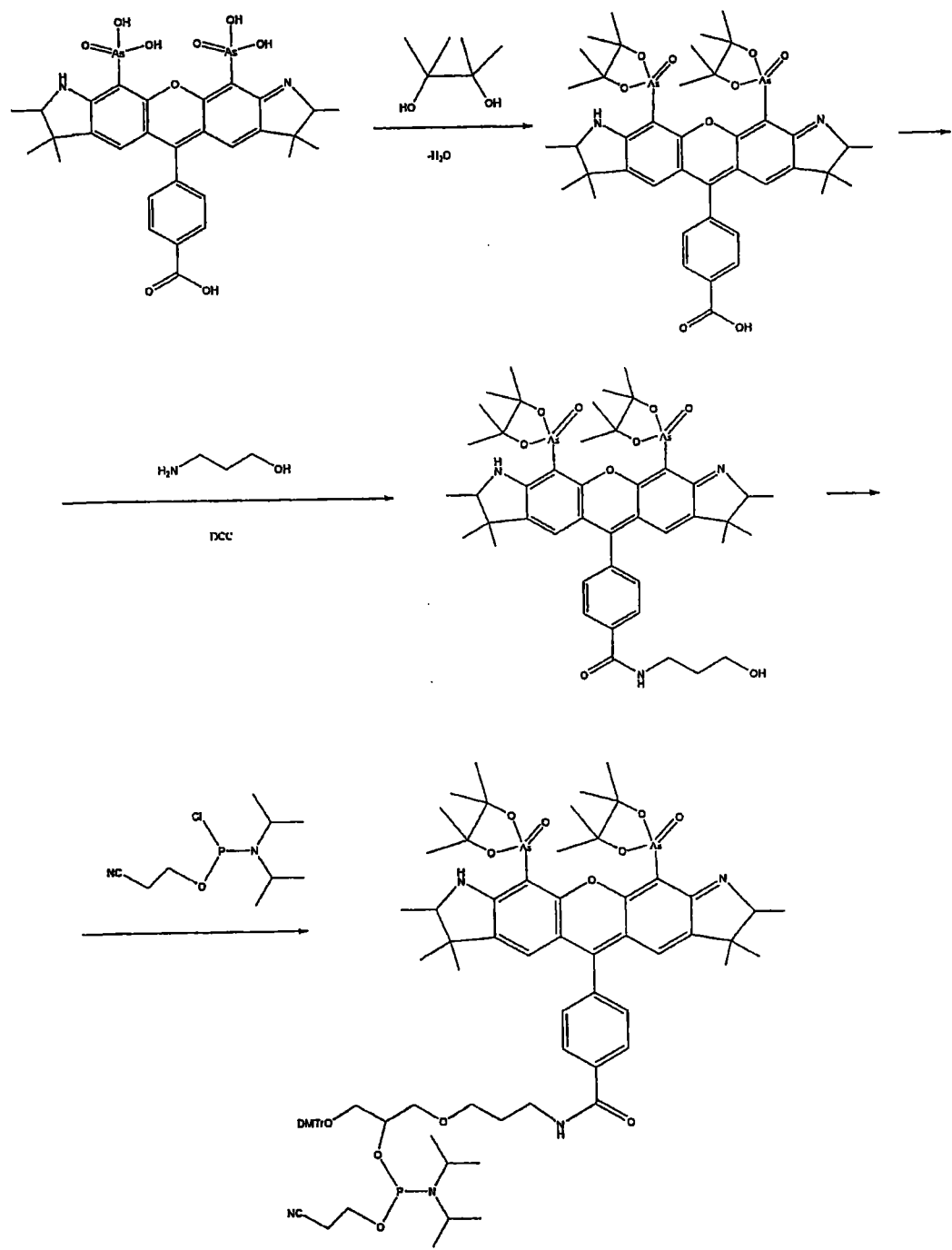


图 2



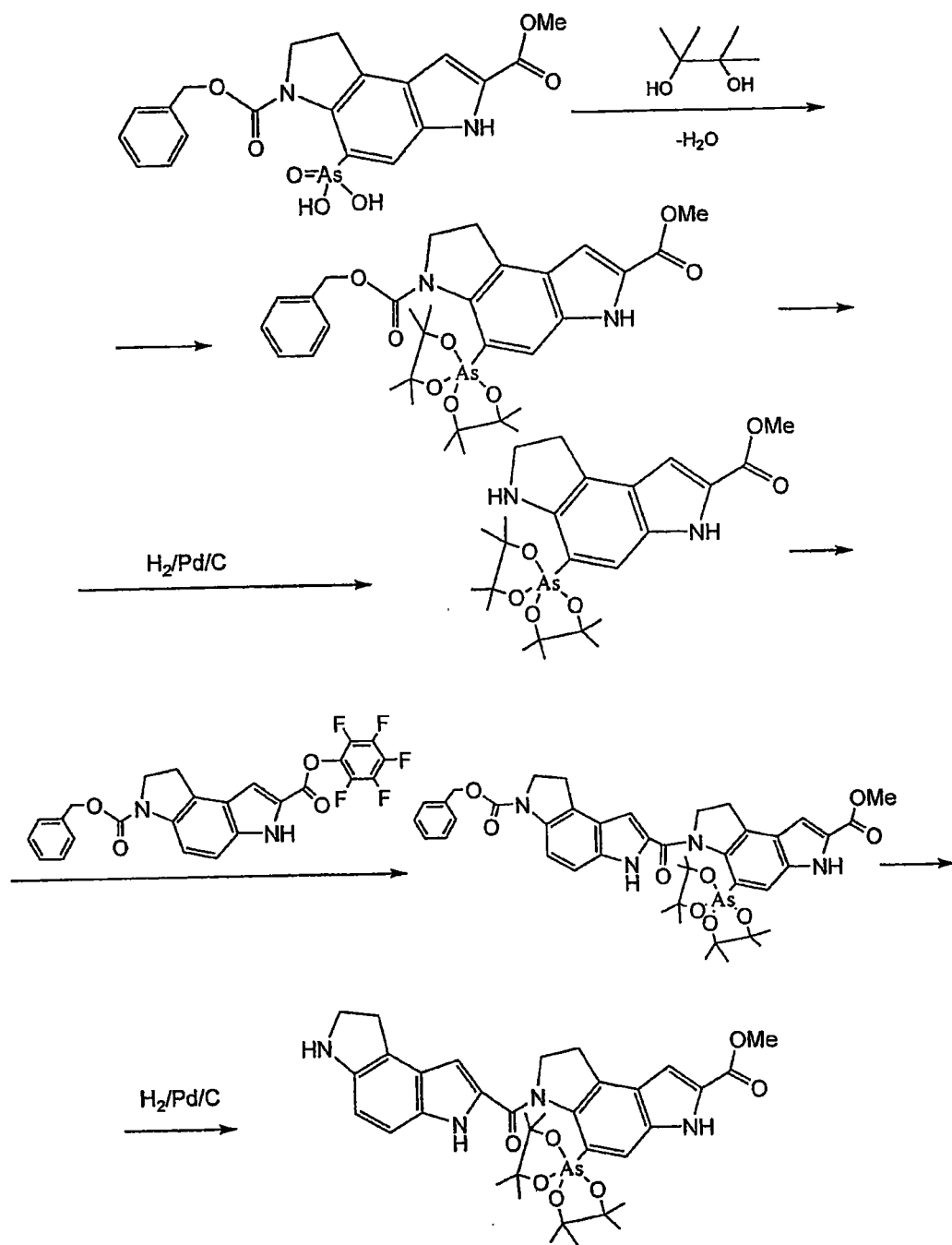
用氨 - 不稳定性螯合基团保护染料胂酸

图 3



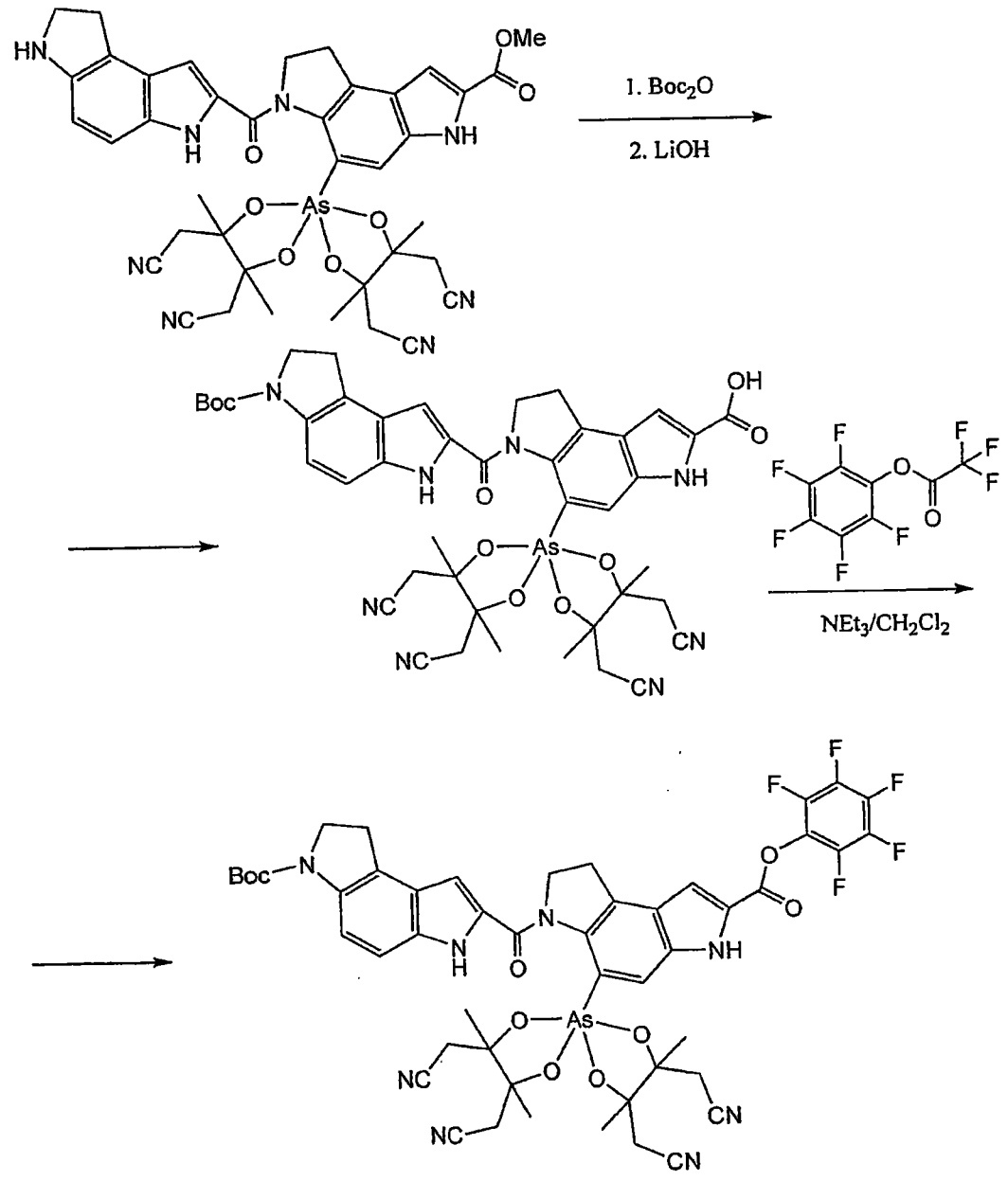
使用自动化合成，用于将肿酸酯染料结合入寡核苷酸中的亚磷酰胺试剂的合成

图 4



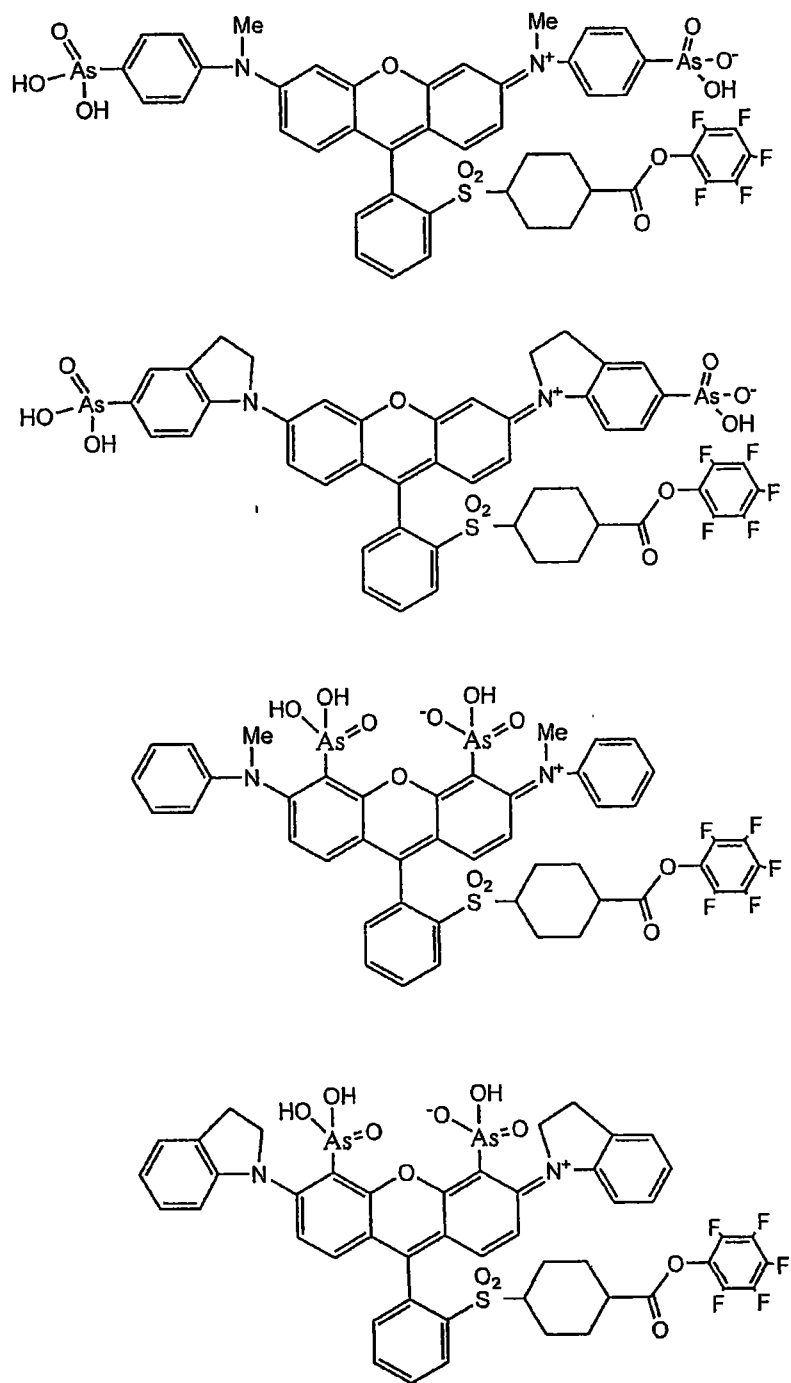
含有受保护的肿酸酯基的小沟结合体中间体的合成，
所述基团用于附着到固体载体、染料和 / 或寡核苷酸上

图 5



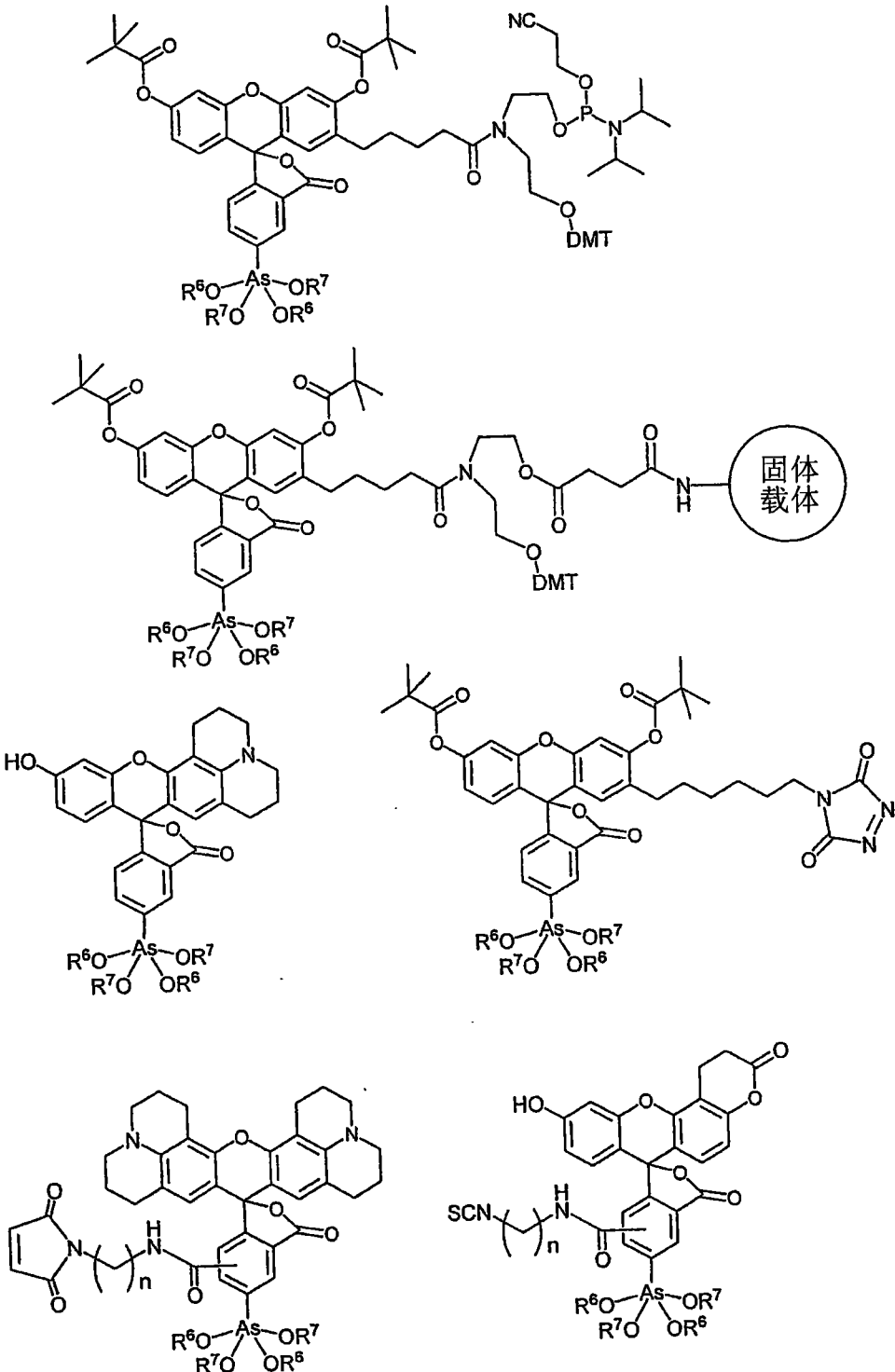
含有受保护的肿酸酯基的小沟结合体中间体的合成，
所述基团用于附着到固体载体、染料和 / 或寡核苷酸上

图 6



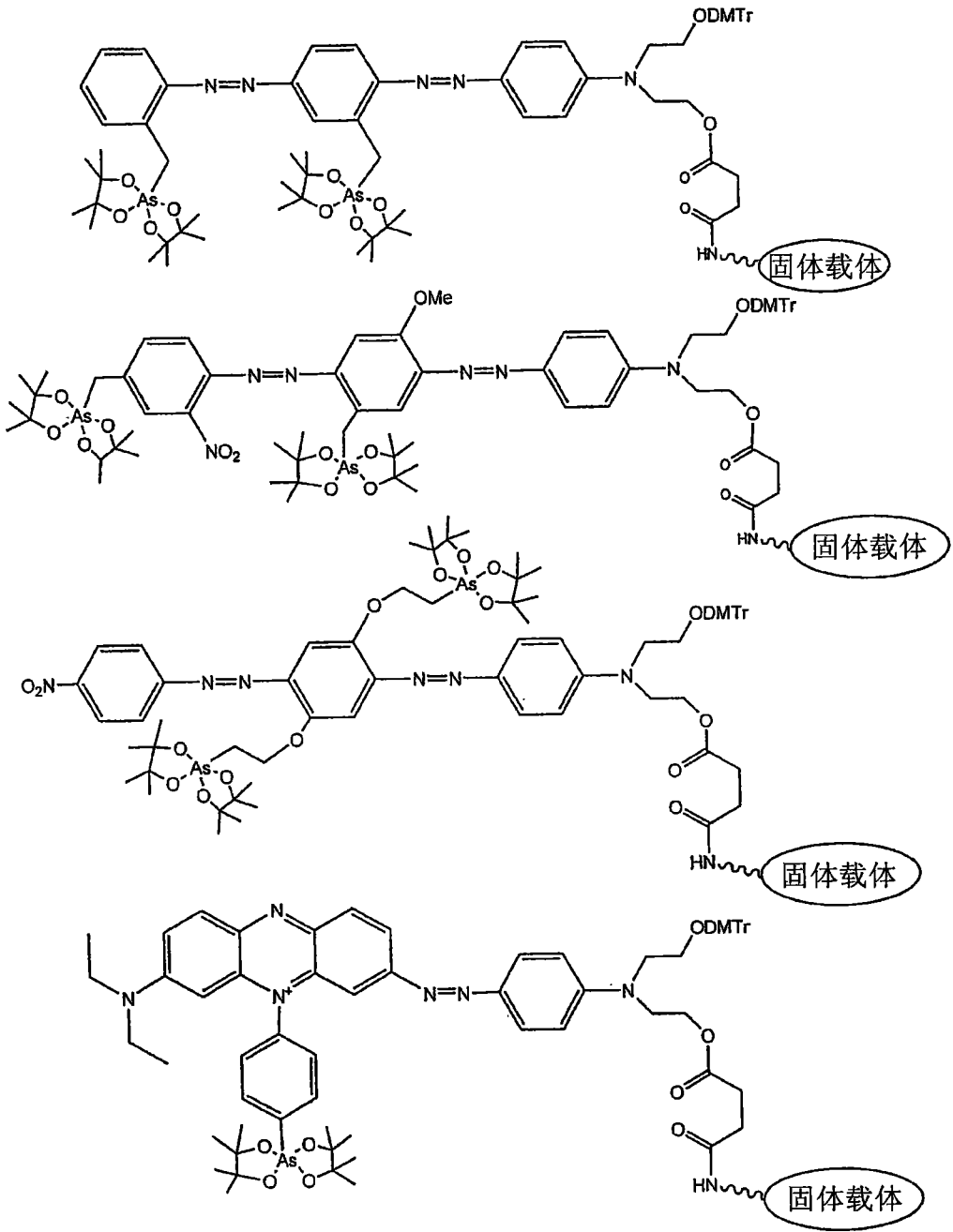
极性荧光猝灭肿酸若丹明染料，活化酯试剂

图 7



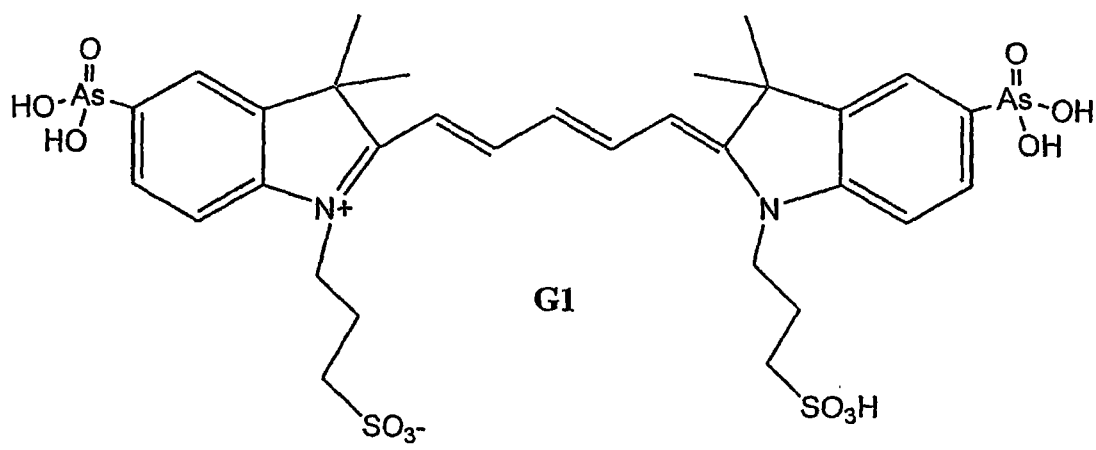
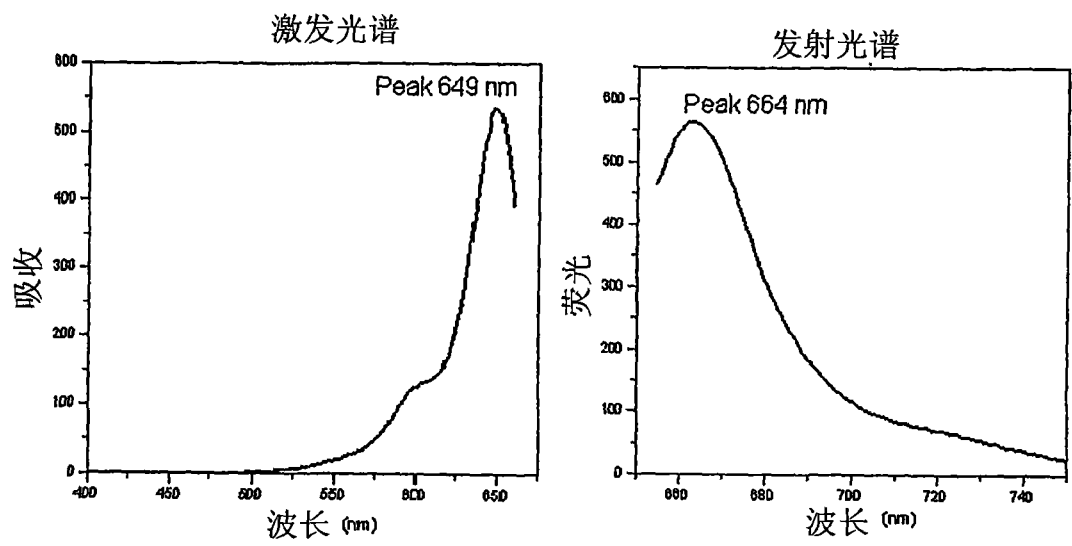
用于通过自动化合成和溶液共轭引导入寡核苷酸的酯保护的肿酸咕吨荧光染料

图 9



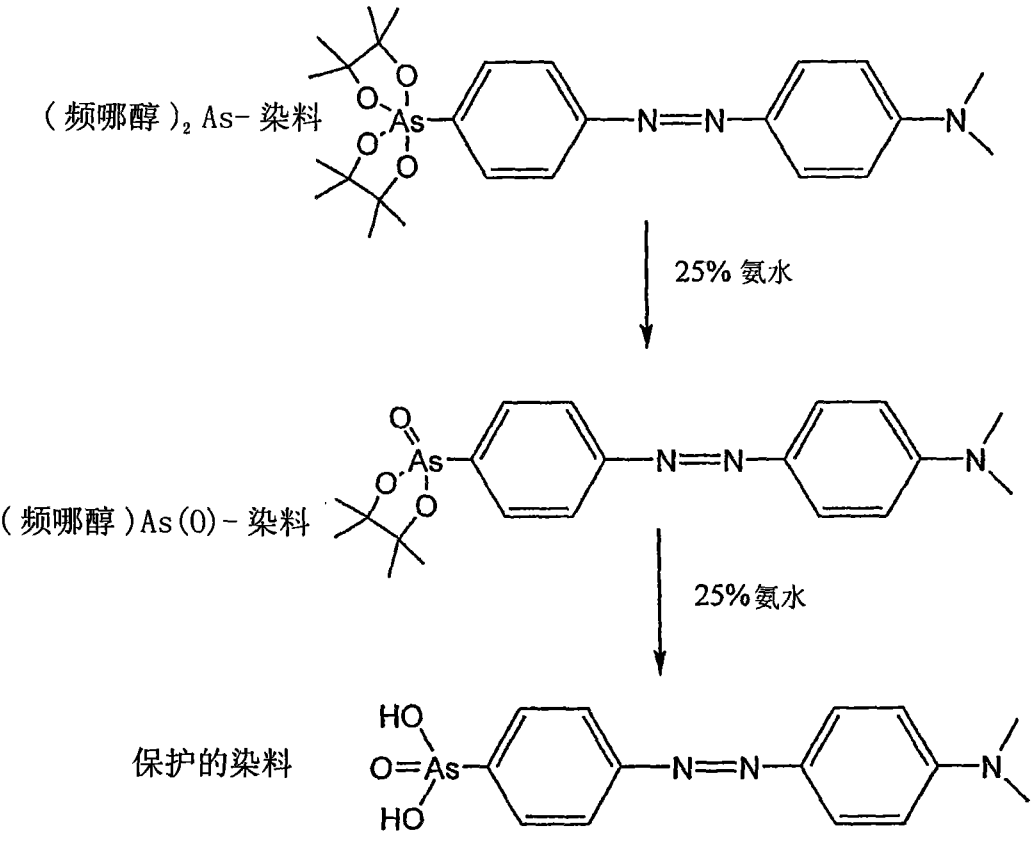
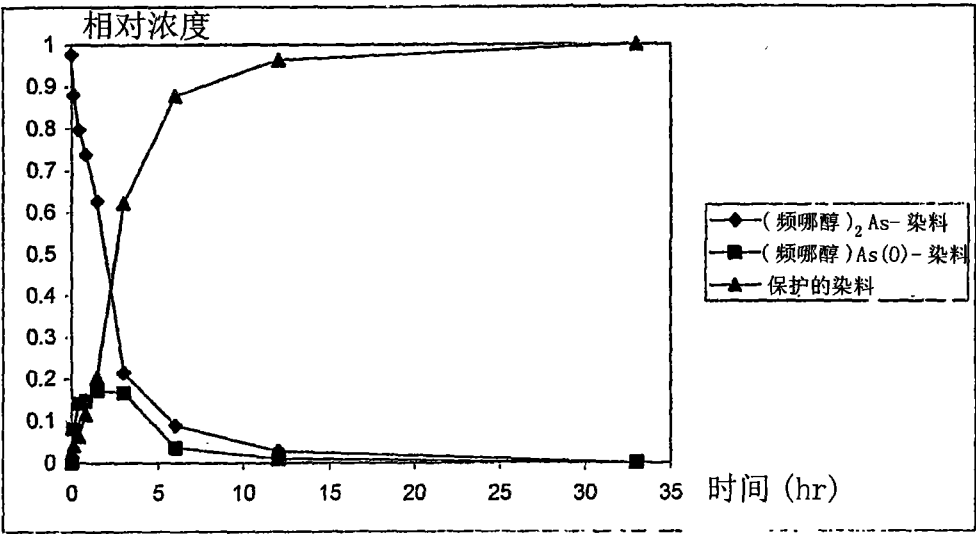
在用于寡核苷酸自动化合成的固体载体上的极性荧光猝灭磷酸酯偶氮染料

图 10



肿酸羧花青染料 G1, 1.25mM,
在 pH 8.0 10mM Tris 缓冲液中的激发和发射光谱

图 11



用 25% 的氨水在 20°脱保护模型双频哪醇保护的偶氮染料的动力学

图 12