(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112119083 B
(45)授权公告日 2024.05.24

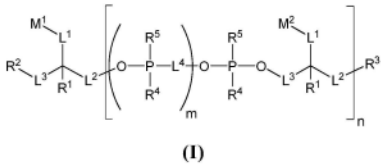
(21)申请号 201980027426.7
(22)申请日 2019.03.08
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112119083 A
(43)申请公布日 2020.12.22
(30)优先权数据
62/646,234 2018.03.21 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.10.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/021327 2019.03.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/182766 EN 2019.09.26
(73)专利权人 索尼公司
地址 日本东京都
专利权人 美国索尼公司
(72)发明人 T·马特雷 S·辛格
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 陈晰
(51)Int.Cl.
C07F 9/572(2006.01)
C07F 9/6558(2006.01)
C07F 9/6561(2006.01)
C07F 9/09(2006.01)
C09B 69/10(2006.01)
G01N 33/52(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
G01N 33/58(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017/177065 A2,2017.10.12
WO 93/09128 A1,1993.05.13
WO 2016/183185 A1,2016.11.17
Rui Zhang等.“FRET Imaging of Enzyme-Responsive HPMA Copolymer Conjugate”.《Macromol. Biosci》.2016,第17卷第1600125(1-8)页.
审查员 夏家栋
权利要求书19页 说明书68页 附图7页

(54)发明名称

具有连接体基团的聚合串联染料

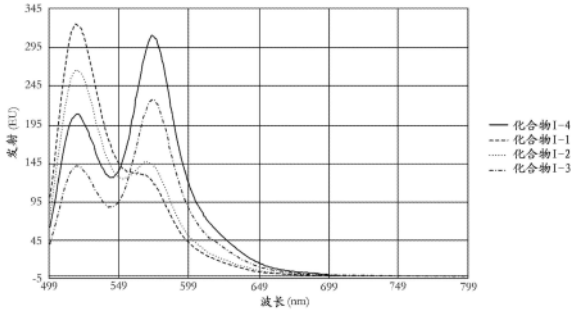
(57)摘要

公开了可用作荧光或着色染料的化合物。该化合物具有以下结构(I)：



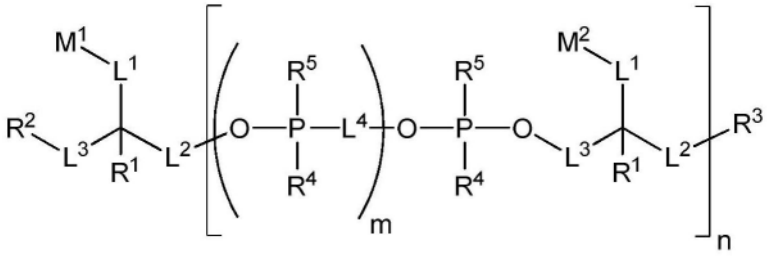
(I)

或其立体异构体、互变异构体或盐,其中R^1,R^2,R^3,R^4,R^5,L^1,L^2,L^3,L^4,M^1,M^2,m和n如本文所定义。还提供了与制备相关的方法以及这些化合物的用途。



CN 112119083 B

1.具有以下结构(I)的化合物或其盐：

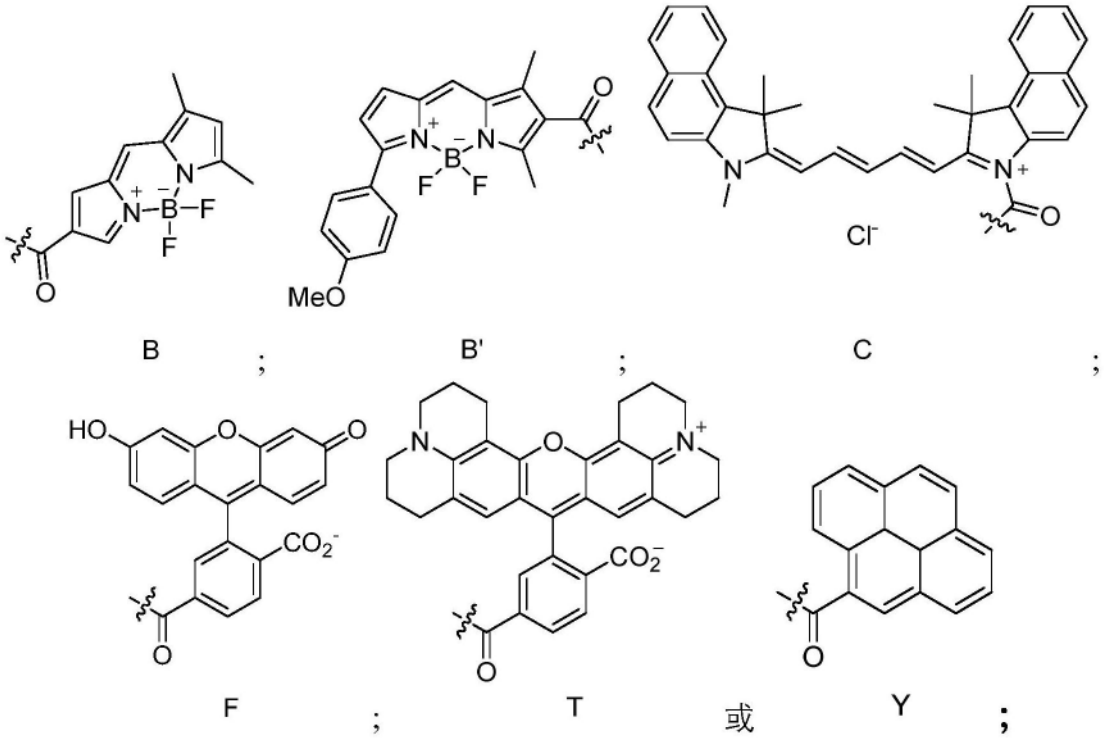


(I)

其中:

M^1和M^2在每次出现时独立地为荧光的或着色的生色团,条件是M^1和M^2的至少一个为FRET给体,和M^1和M^2的另一个为相应的FRET受体,M^1和相邻的M^2是不同的生色团,其被选择以使得M^1和M^2形成FRET对,

其中M^1和M^2在每次出现时独立地具有以下结构：



B ; B' ; C ;

F ; T 或 Y ;

L^1在每次出现时独立地为未取代的C_1-C_{12}亚烷基连接体、包含至少一个选自N和O杂原子的未取代的杂亚烷基连接体、或包含三唑基官能团的连接体;

L^2和L^3在每次出现时独立地为未取代的C_1-C_{12}亚烷基连接体、或包含至少一个选自O和P杂原子的未取代的杂亚烷基连接体;

L^4在每次出现时独立地为未取代的C_1-C_{12}亚烷基连接体、或包含至少一个O的未取代的杂亚烷基连接体;

R^1在每次出现时为H;

R^2和R^3各自独立地为-OP(=R_a)(R_b)R_c;

R^4在每次出现时独立地为OH、O^-或OR_d;

R^5在每次出现时为氧代;

R_a为O；

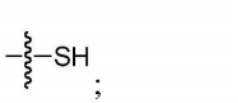
R_b为OH、O^-或OR_d；

R_c为OH或OL′；

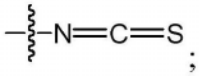
R_d为平衡离子；

L′在每次出现时独立地为包含至少一个选自O和P杂原子的未取代的杂亚烷基连接体：连接至Q、连接至靶向部分、连接至分析物分子、连接至固体载体、连接至固体载体基团或连接至核苷；

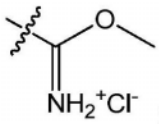
Q在每次出现时独立地为具有以下结构的部分：



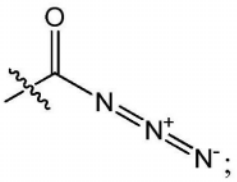
；



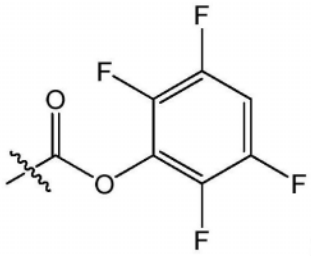
；



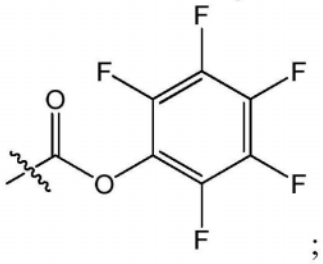
；



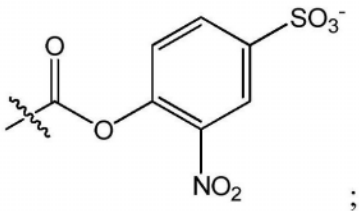
；



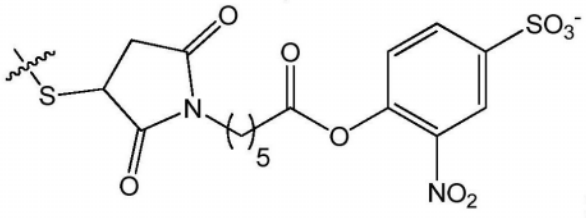
；



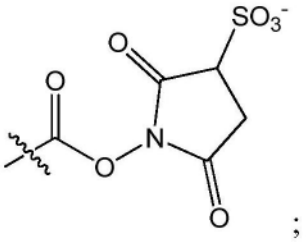
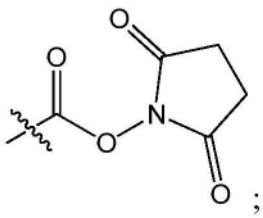
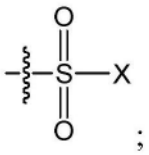
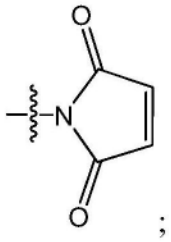
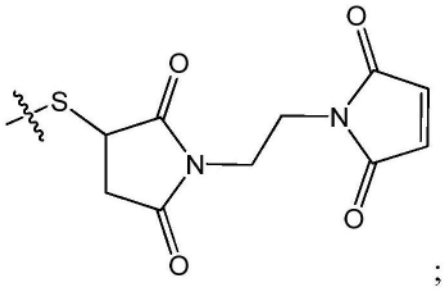
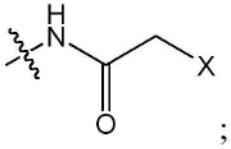
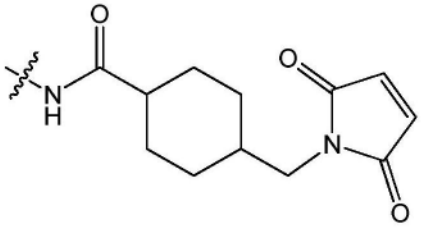
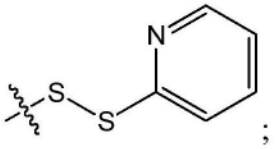
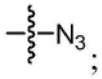
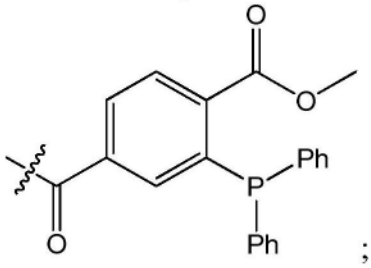
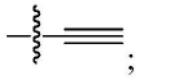
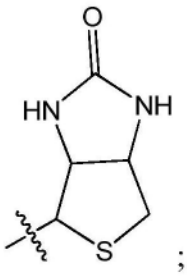
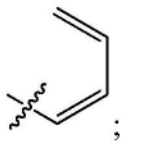
；



；



；


;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

其中各个X独立地为卤素;

m在每次出现时独立地为0或更大的整数,和

n为2或更大的整数。

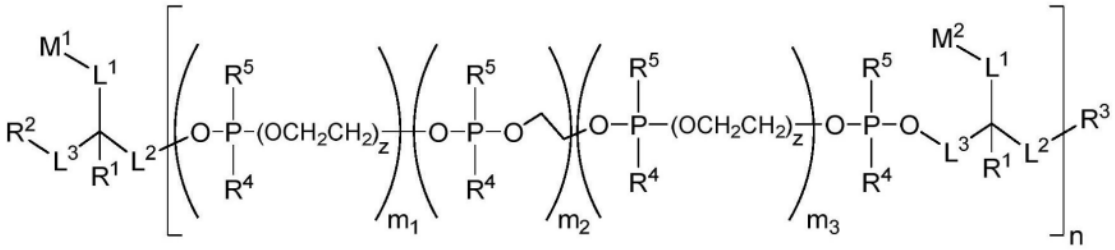
2.权利要求1的化合物,其中杂亚烷基包括环氧烷基。

3.权利要求2的化合物,其中杂亚烷基包括环氧乙基。

4.权利要求3的化合物,其中至少一个亚烷基是亚乙基。

5.权利要求1的化合物,其中亚烷基在每次出现时为亚乙基。

6.权利要求1的化合物,其中该化合物具有以下结构(IA):



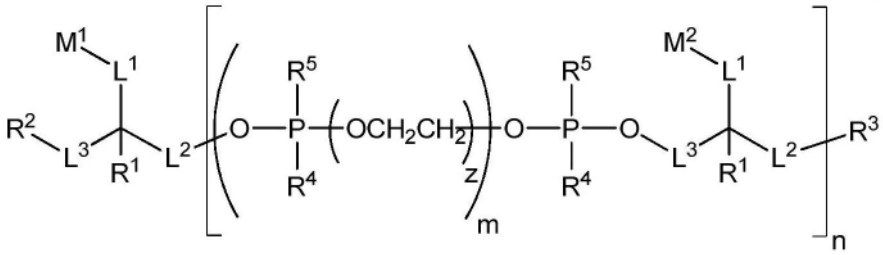
(IA)

其中:

z在每次出现时独立地为1-100的整数,和

m_1,m_2和m_3在每次出现时独立地为0-6的整数。

7.权利要求1的化合物,其中该化合物具有以下结构(IB):

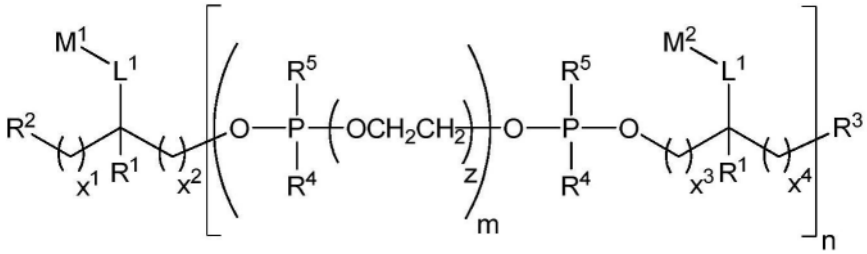


(IB)

其中:

z在每次出现时独立地为1-100的整数。

8.权利要求1的化合物,其中该化合物具有以下结构(IC):



(IC)

其中:

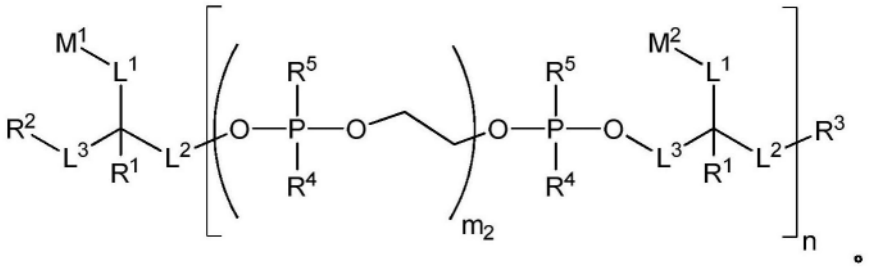
x^1,x^2,x^3和x^4在每次出现时独立地为0-6的整数。

9.权利要求6-8任一项的化合物,其中z在一次或多次出现时为3-6的整数。

10.权利要求8的化合物,其中x^1和x^3各自在每次出现时为0,和x^2和x^4各自在每次出现时为1。

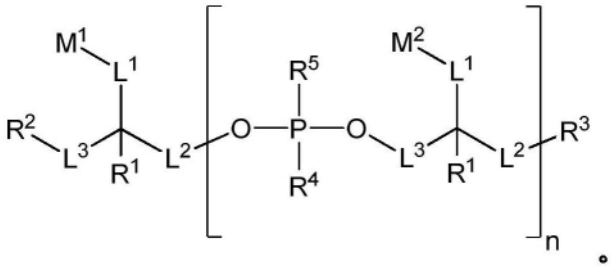
11.权利要求8的化合物,其中x^1,x^2,x^3和x^4在每次出现时各自为1。

12.权利要求6的化合物,其中该化合物具有以下结构(ID):



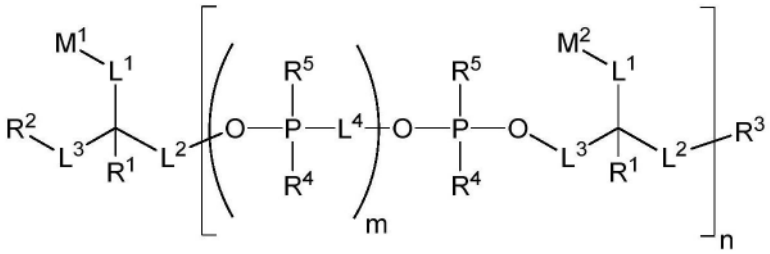
(ID)

13.权利要求1的化合物,其中该化合物具有以下结构(IE):



(IE)

14.化合物或其盐,具有以下结构(II):

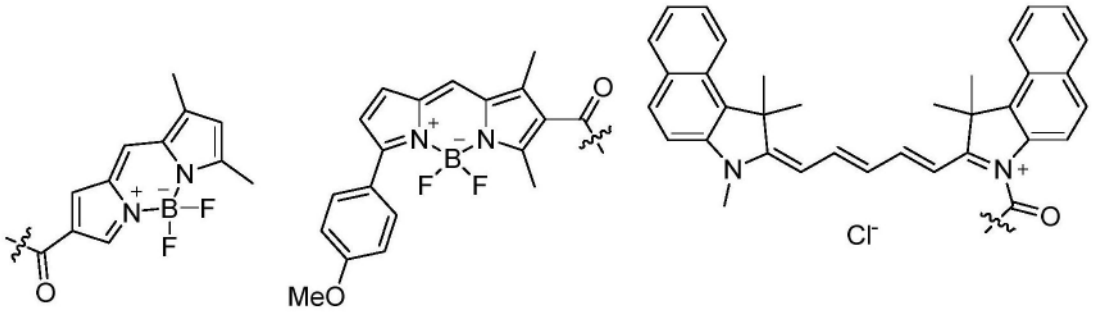


(II)

其中:

M^1和M^2在每次出现时独立地为荧光或着色的生色团,条件是M^1和M^2的至少一次出现时是不同的生色团,M^1和M^2在至少一次出现时组合以形成FRET受体-给体对,并且在FRET受体-给体对中的FRET给体生色团位于两个FRET受体生色团之间;

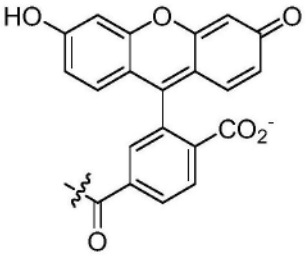
其中M^1和M^2在每次出现时独立地具有以下结构:



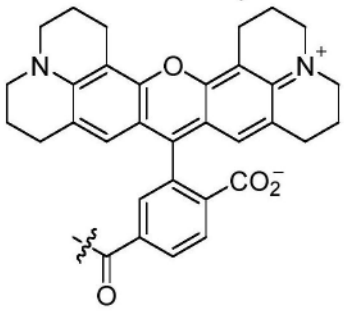
B ；

B' ；

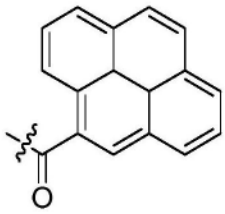
C ；



F ；



T 或



Y ；

L^1在每次出现时独立地为未取代的C_1-C_{12}亚烷基连接体、包含至少一个选自N和O杂原子的未取代的杂亚烷基连接体、或包含三唑基官能团的连接体；

L^2和L^3在每次出现时独立地为未取代的C_1-C_{12}亚烷基连接体、或包含至少一个选自O和P杂原子的未取代的杂亚烷基连接体；

L^4在每次出现时独立地为未取代的C_1-C_{12}亚烷基连接体、或包含至少一个O的未取代的杂亚烷基连接体；

R^1在每次出现时为H；

R^2和R^3各自独立地为-OP(=R_a)(R_b)R_c；

R^4在每次出现时独立地为OH、O^-或OR_d；

R^5在每次出现时为氧代；

R_a为O；

R_b为OH、O^-或OR_d；

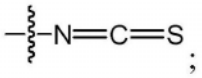
R_c为OH或OL′；

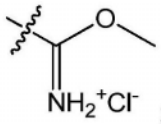
R_d为平衡离子；

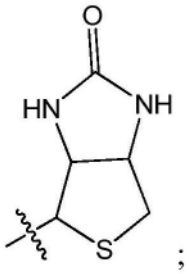
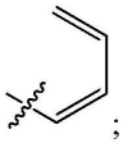
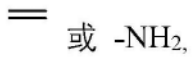
L′在每次出现时独立地为包含至少一个选自O和P杂原子的未取代的杂亚烷基连接体：连接至Q、连接至靶向部分、连接至分析物分子、连接至固体载体、连接至固体载体基团或连接至核苷；

Q在每次出现时独立地为具有以下结构的部分：

;


;


;

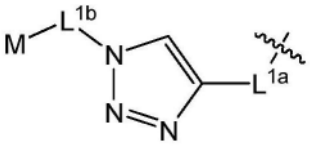
或 $-NH_2$,

其中各个X独立地为卤素;

m在每次出现时独立地为0-2或大于6的整数;和

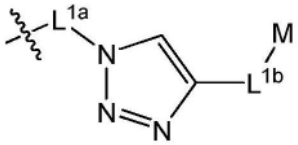
n为2或更大的整数。

15.权利要求1或14的化合物,其中对于L^1的至少一次出现,L^1-M具有以下结构:



其中L^{1a}和L^{1b}各自独立地为任选的连接体。

16.权利要求1或14的化合物,其中对于L^1的至少一次出现,L^1-M具有以下结构:



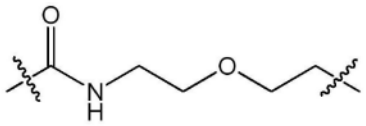
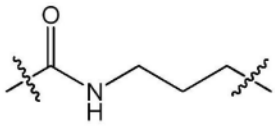
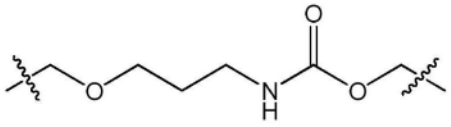
其中L^{1a}和L^{1b}各自独立地为任选的连接体。

17.权利要求15或16的化合物,其中L^{1a}或L^{1b}或二者不存在。

18.权利要求15或16的化合物,其中L^{1a}或L^{1b}或二者存在。

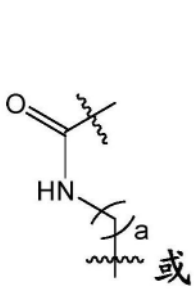
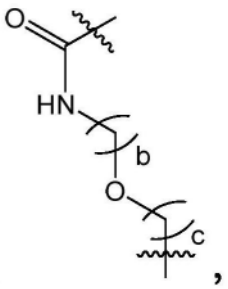
19.权利要求18的化合物,其中L^{1a}和L^{1b},当存在时,各自独立地为未取代的C_1-C_{12}亚烷基连接体、或包含至少一个选自N和O杂原子的未取代的杂亚烷基连接体。

20.权利要求18的化合物,其中L^{1a}和L^{1b},当存在时,独立地具有以下结构之一:


;

或

。

21.权利要求1或14的化合物,其中L^2和L^3在每次出现时独立地为C_1-C_6亚烷基。

22.权利要求1或14的化合物,其中L^1具有以下结构之一:


或

,

其中

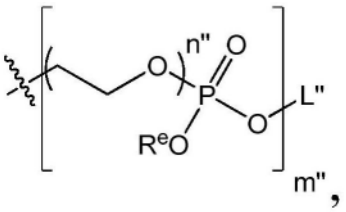
a、b和c各自独立地为1-6的整数。

23.权利要求1或14的化合物,其中R^4在每次出现时独立地为O^-。

24.权利要求1或14的化合物,其中R_c为OL′。

25.权利要求24的化合物,其中L′包括环氧烷基或磷酸二酯基团,或其组合。

26.权利要求25的化合物,其中L′具有以下结构:



其中:

m″和n″独立地为1-10的整数;

R^e为H,电子对或平衡离子;和

L″为R^e或直接键或连接至Q、靶向部分、分析物分子、固体载体、固体载体基团或核苷。

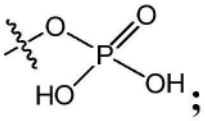
27.权利要求26的化合物,其中靶向部分为抗体或细胞表面受体拮抗剂。

28.权利要求1或14的化合物,其中分析物分子是核酸、氨基酸或其聚合物。

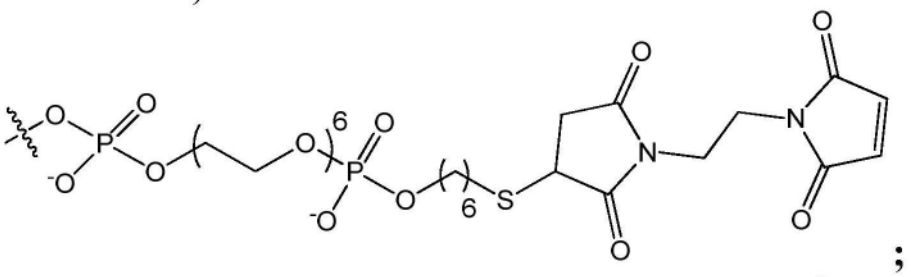
29.权利要求1或14的化合物,其中分析物分子是酶、受体、受体配体、抗体、糖蛋白、适体或病毒。

30.权利要求1或14的化合物,其中固体载体是聚合物珠或非聚合物珠。

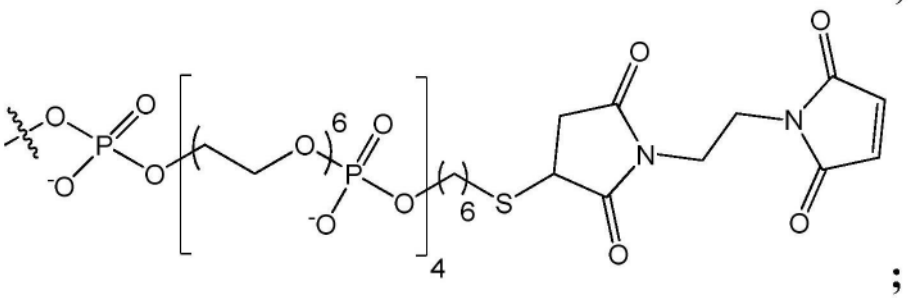
31.权利要求1或14的化合物,其中R^2或R^3具有以下结构之一:



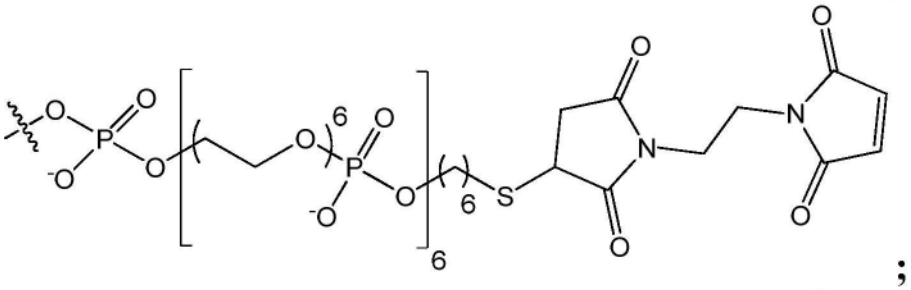
;



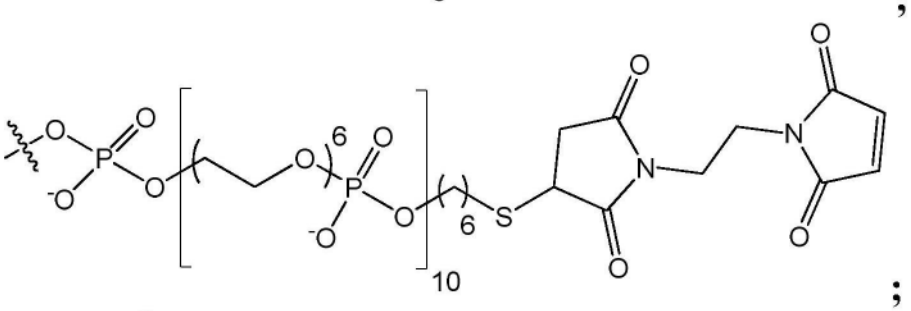
;



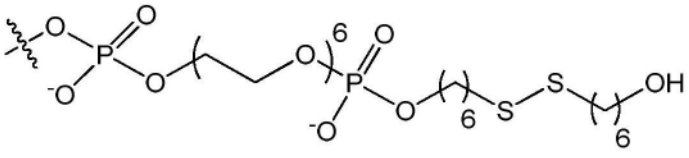
;



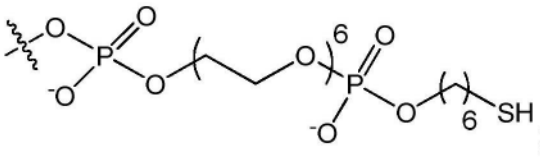
;



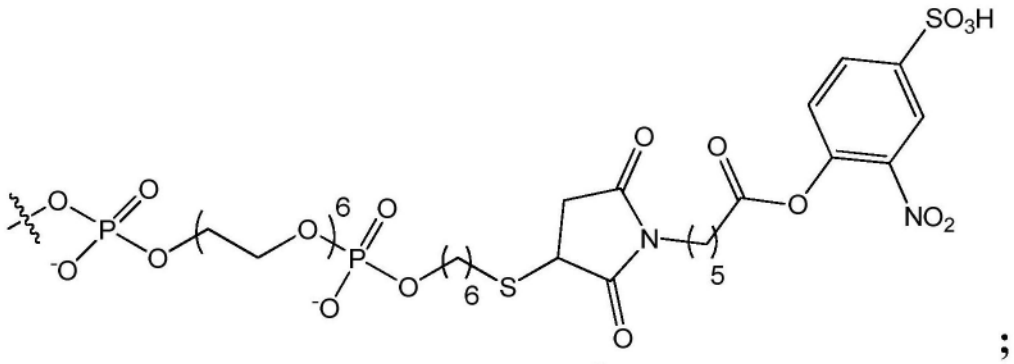
;



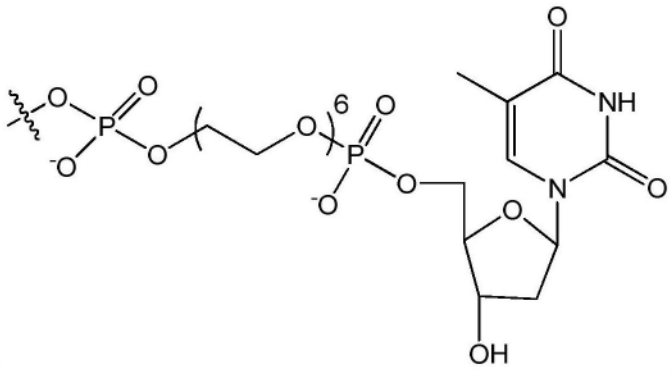
;



;



;



或 。

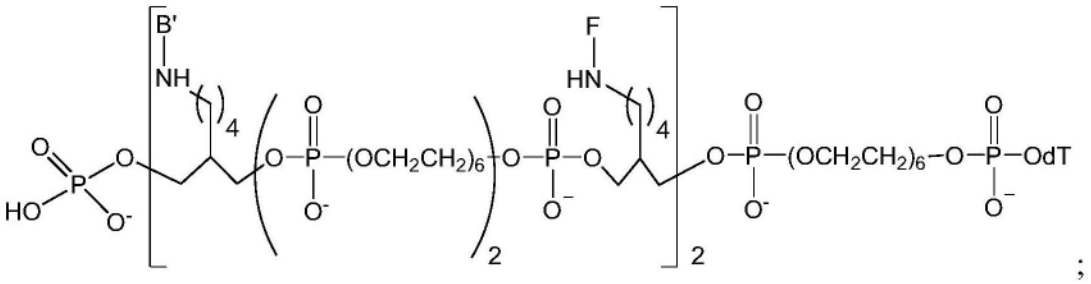
32.权利要求1的化合物,其中m在每次出现时独立地为1-10的整数。

33.权利要求1的化合物,其中m在每次出现时独立地为1-5的整数。

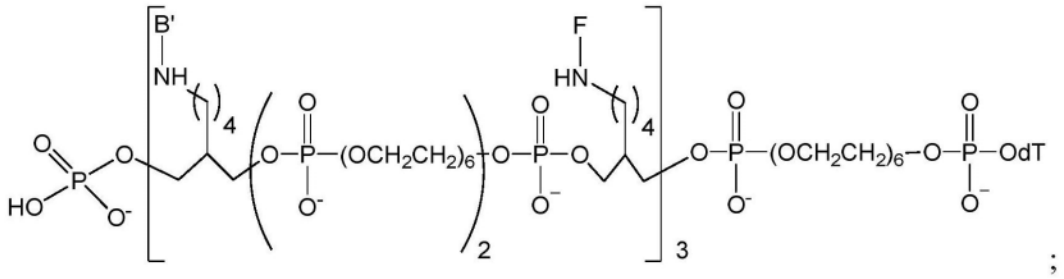
34.权利要求1或14的化合物,其中n为2-100的整数。

35.权利要求1或14的化合物,其中n为2-10的整数。

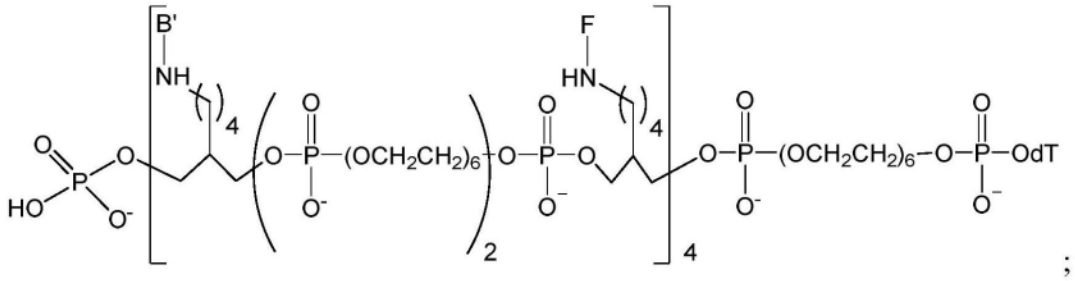
36.权利要求1的化合物,其中该化合物选自以下结构之一



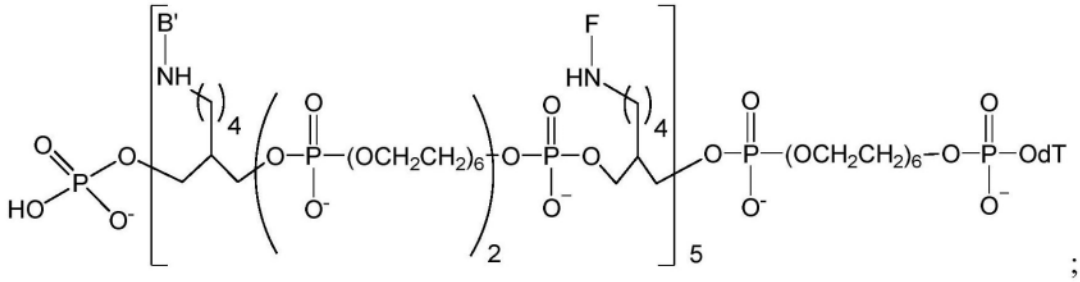
;



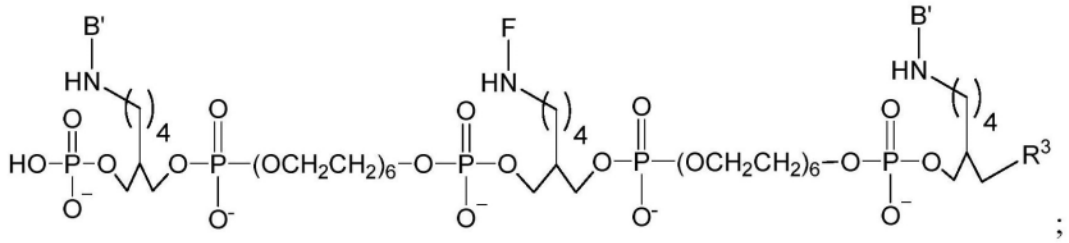
;



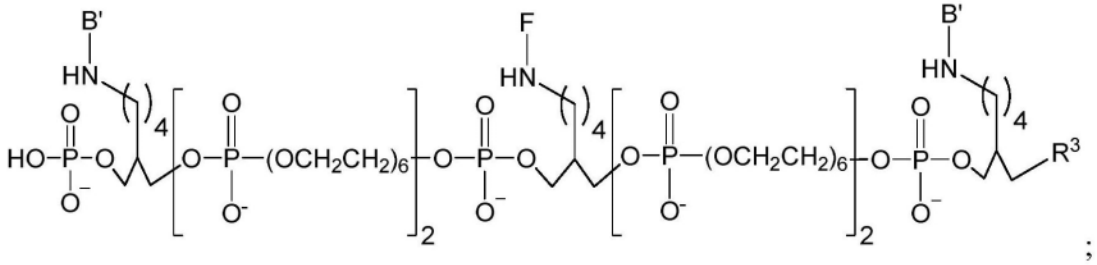
;



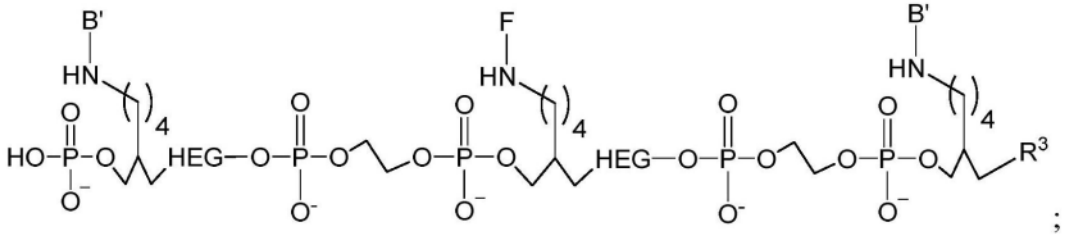
;



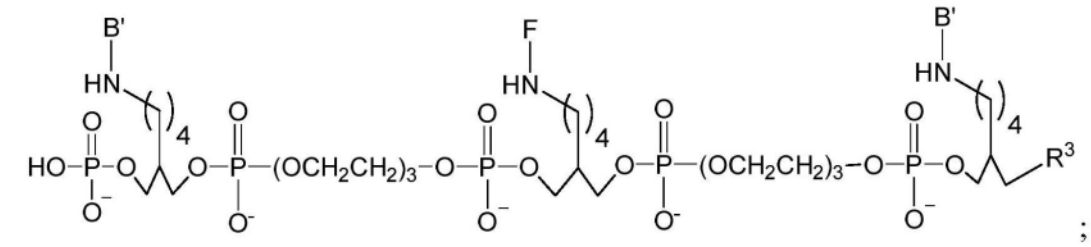
;



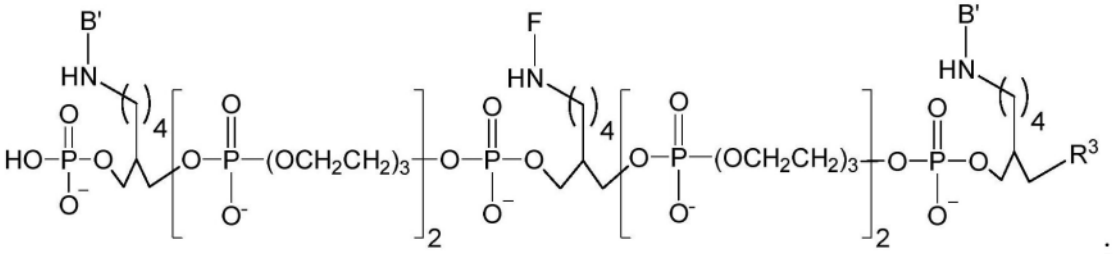
;



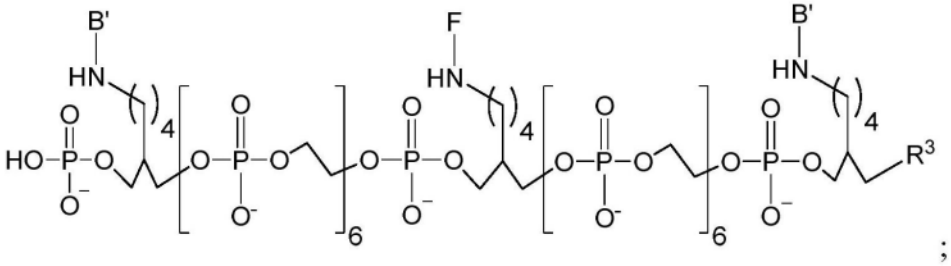
;



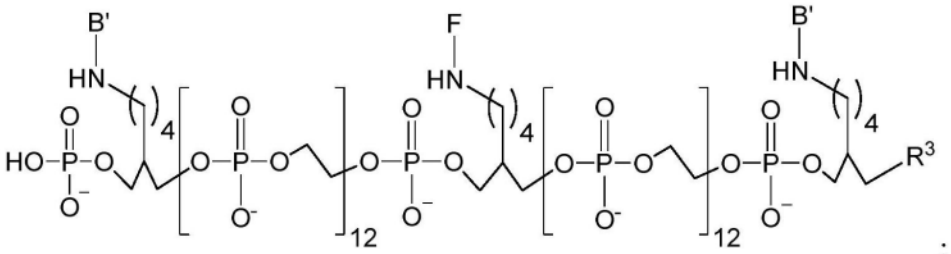
;



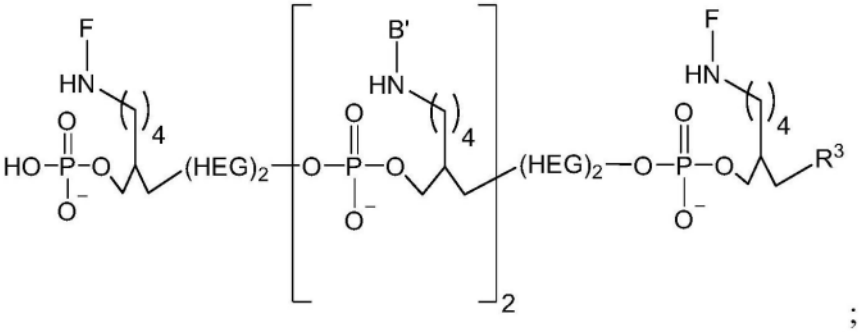
;



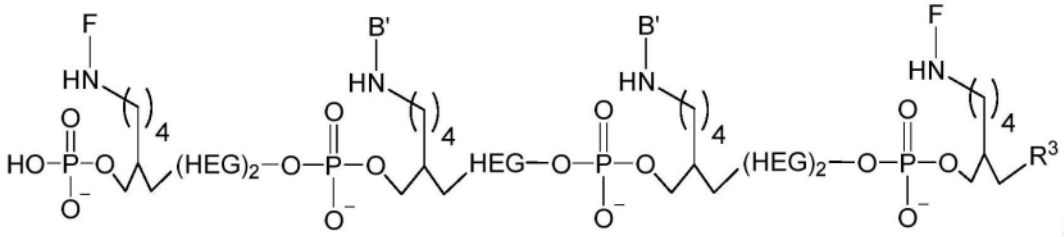
;



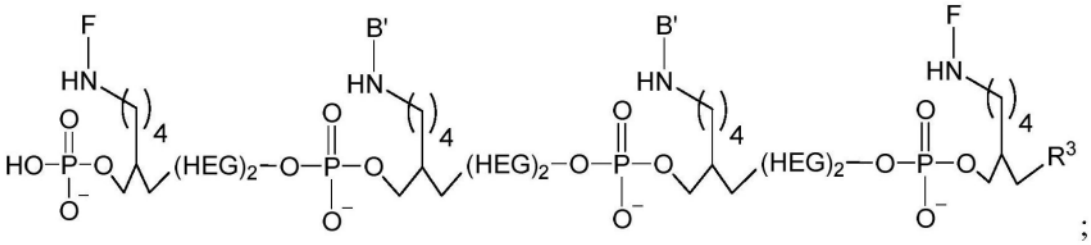
;



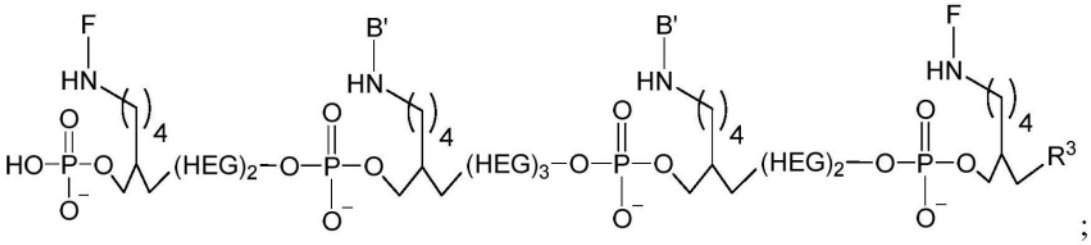
;



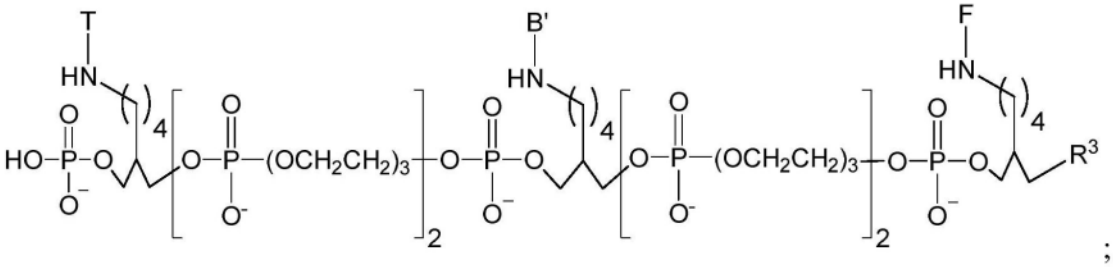
;



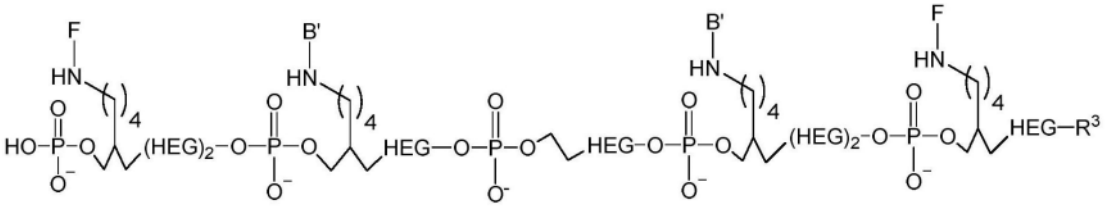
;



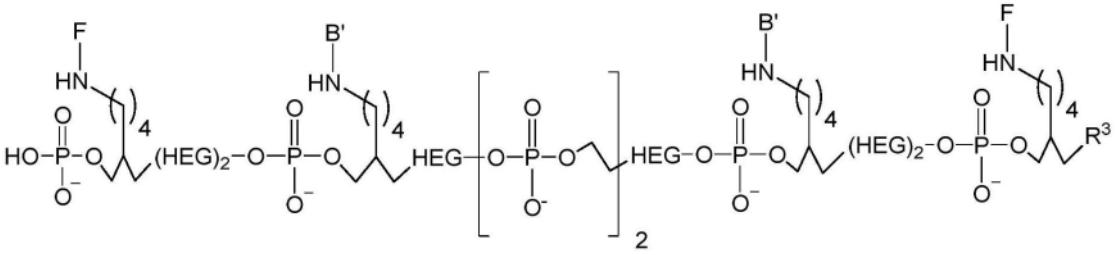
;



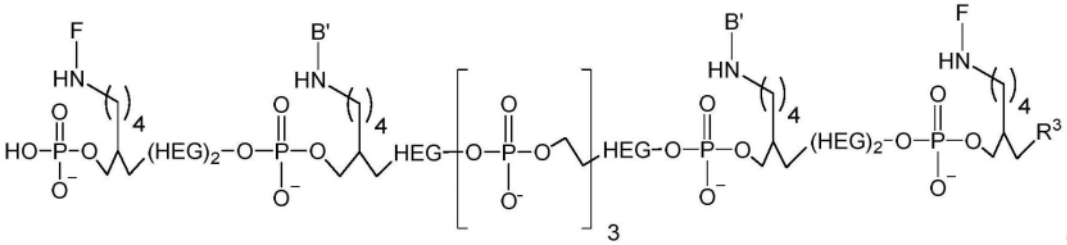
;



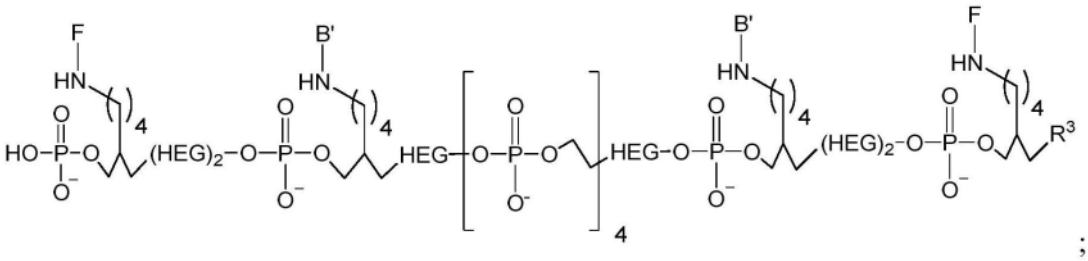
;



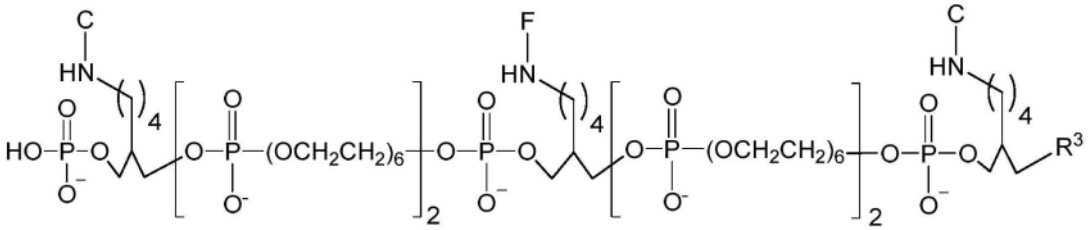
;



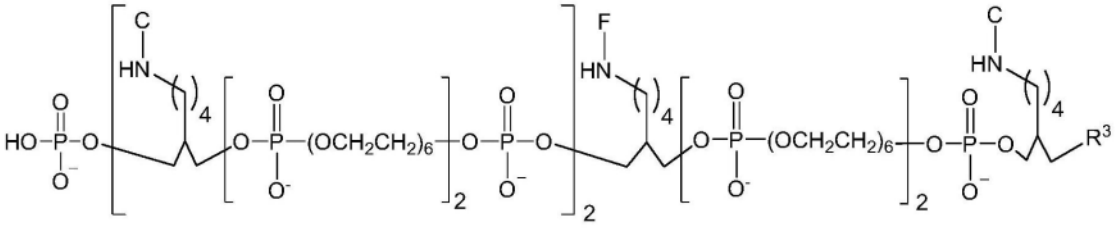
;



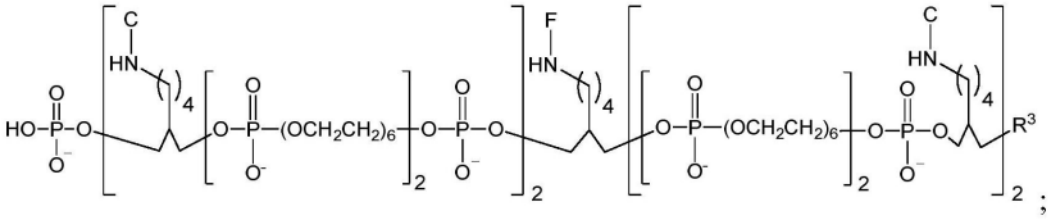
;



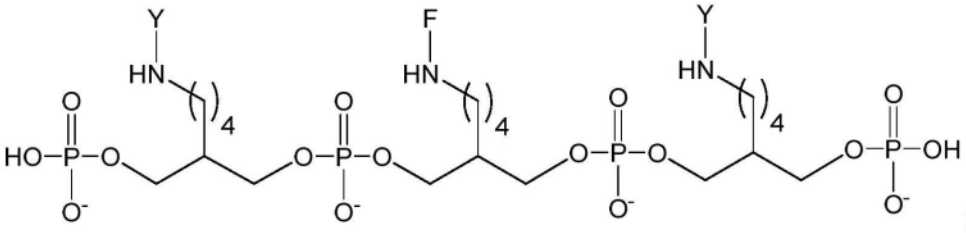
;



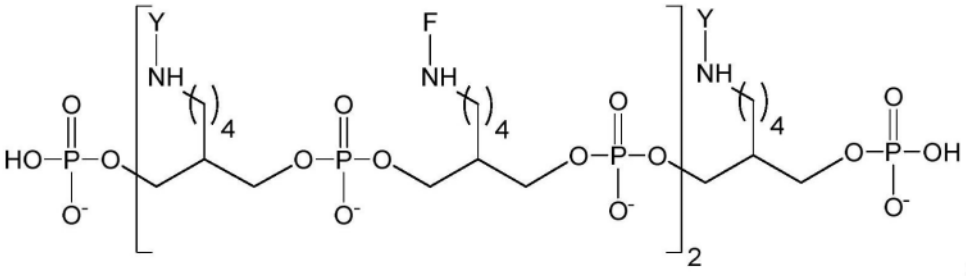
;



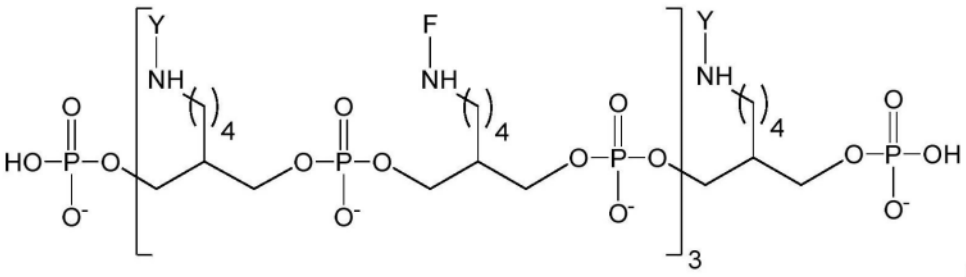
;



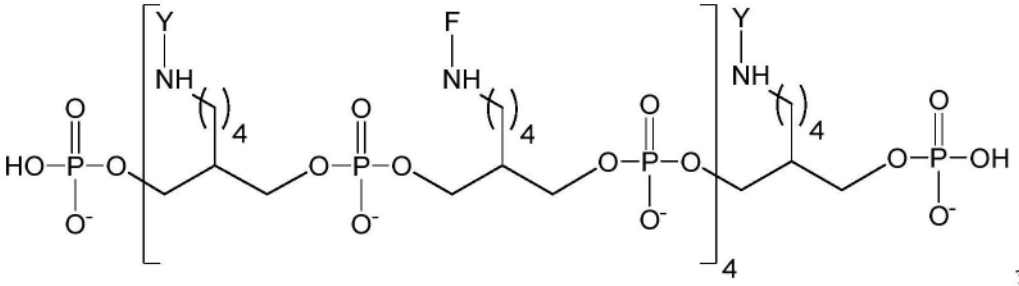
;



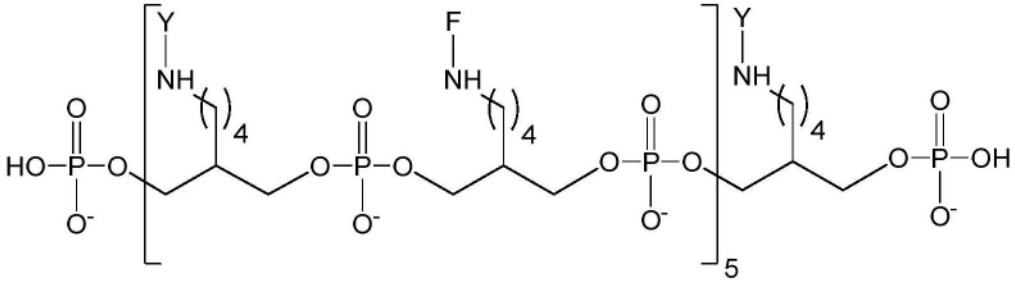
;



;

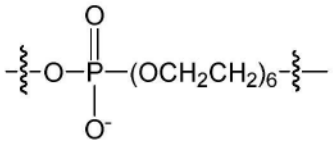


或

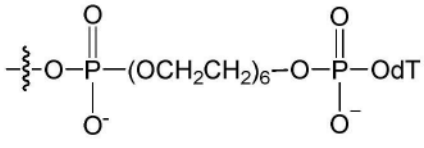


，

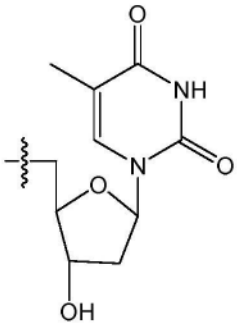
其中HEG,R^3,dT,B,B’,C,F,T和Y分别具有以下结构:



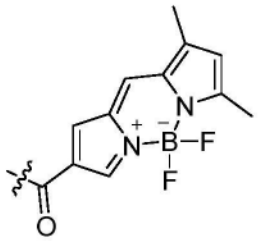
HEG ；



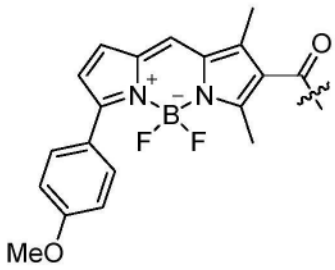
；



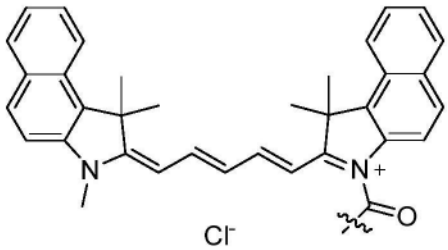
dT ；



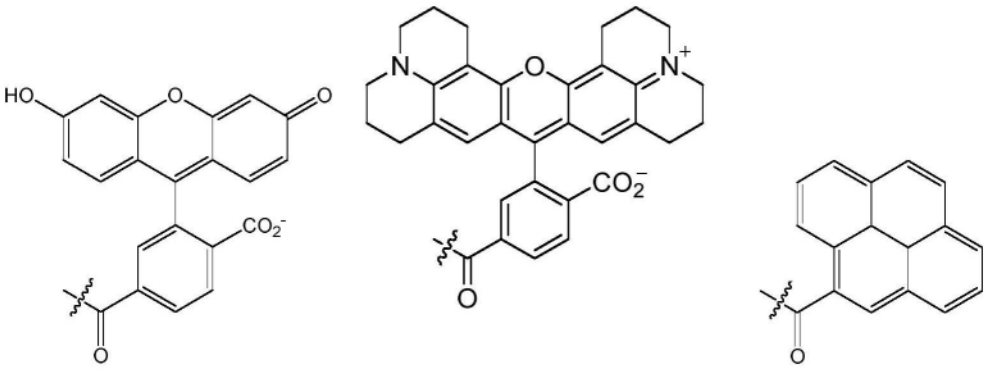
B ；



B' ；

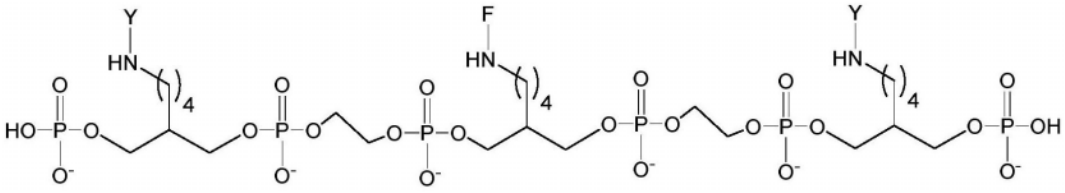


C ；

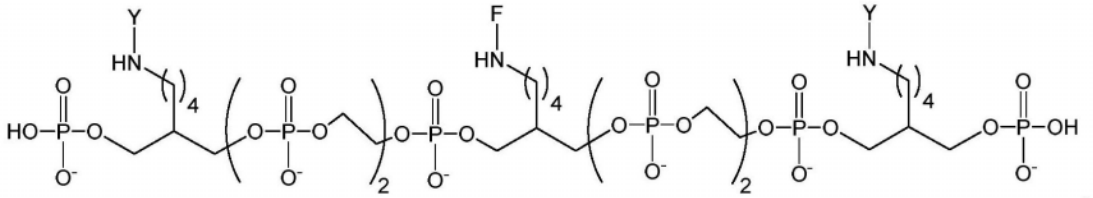


F ; T 和 Y 。

37.权利要求14的化合物,其中该化合物具有以下结构之一:

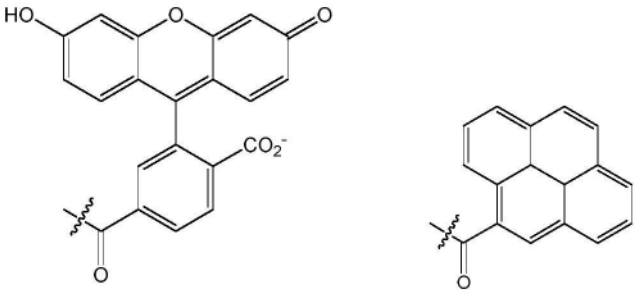


或



,

其中F和Y分别具有以下结构:



F 和 Y 。

38.权利要求1-37中任一项的化合物在制备用于样品染色的试剂盒中的用途,其中构造所述试剂盒以包含所述化合物,其量足以在以适当波长照射所述样品时产生光学响应。

39.权利要求38的用途,其中所述光学响应是荧光响应。

40.权利要求38或39的用途,其中所述样品包括细胞。

41.权利要求39的用途,其中构造所述试剂盒以将所述荧光响应与具有可检测的不同光学性质的第二荧光团的荧光响应区分开。

42.权利要求1-37中任一项的化合物在制备用于视觉检测分析物分子的方法的试剂盒中的用途,该方法包括:

(a)提供权利要求1-37任一项的化合物,其中该化合物包含连接至分析物分子的共价

键;和

(b)通过其可见特性检测化合物。

43.权利要求1-37中任一项的化合物在制备用于视觉检测分析物分子的方法的试剂盒中的用途,该方法包括:

(a)将权利要求1-37中任一项的化合物与分析物分子混合,其中该化合物包含连接至Q的共价键;

(b)形成化合物和分析物分子的生物缀合物;和

(c)通过其可见特性检测生物缀合物。

44.组合物,其包含权利要求1-37任一项的化合物和一种或多种分析物分子。

45.权利要求44的组合物在制备用于检测一种或多种分析物分子的分析方法的试剂盒中的用途。

具有连接体基团的聚合串联染料

[0001] 背景

[0002] 领域

[0003] 本发明通常涉及具有间隔基团的二聚和聚合发色团化合物(例如,包含荧光染料部分的聚合物化合物),以及它们的制备方法和在各种分析方法中的用途。

[0004] 相关技术的描述

[0005] 已知荧光和/或着色染料特别适用于需要高灵敏度检测试剂的应用。能够优先标记样品中特定成分或组分的染料使研究人员能够检测该特定成分或组分的存在、数量和/或位置。另外,可以针对特定体系在各种环境中的空间和时间分布进行监视。

[0006] 荧光和比色法在化学和生物学中极为广泛。这些方法提供了有关生物分子的存在、结构、距离、方向、复合和/或位置的有用信息。另外,时间分辨方法越来越多地用于动力学和运动学的测量中。结果,已经开发了许多用于生物分子例如核酸和蛋白质的荧光或颜色标记的策略。由于对生物分子的分析通常发生在水性环境中,因此重点一直放在开发和使用与水性体系相容的染料上,这些染料可以阐明所需的空间信息和生物分子的相互作用。

[0007] 因此,已经开发出涉及共振能量转移的技术来揭示这种结构信息。具体而言,**Förster**共振能量转移("FRET"-有时也与荧光共振能量转移互换使用)技术产生可靠地测量变化的生物分子距离和相互作用的信息。共振能量转移技术相对便宜,并且可以快速获得测量结果;然而,由于游离的荧光团和不希望的pH敏感性,FRET受到与发色团的取向和定位以及能量转移掩蔽有关的若干限制。

[0008] 因此,在本领域中需要具有增加的摩尔亮度和/或增加的FRET发射信号的水溶性染料,尤其是共振能量转移染料。理想地,此类染料和生物标记应为深色或荧光色,并应具有多种颜色和荧光波长。本发明满足了这种需求并提供了进一步的相关优点。

[0009] 发明概述

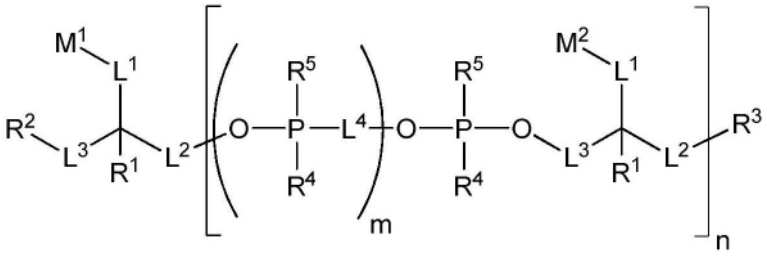
[0010] 简而言之,本发明的实施方案通常涉及可用作水溶性,荧光和/或着色染料和/或探针的化合物,其使得在视觉上检测分析物分子例如生物分子以及用于制备它们的试剂成为可能。特别地,在一些实施方案中,本发明的化合物是有用的,因为它们使与之相关的FRET荧光发射成为可能。还描述了使用染料在视觉上检测分析物分子的方法。

[0011] 本发明的染料的实施方案包括通过连接体("L^4")共价连接的两个或更多个荧光和/或着色部分(即生色团)。与先前关于二聚和/或聚合染料的报道相反,本发明的染料比相应的单体染料化合物明显更亮,并且由于分子内相互作用而使得FRET能够吸收和发射。尽管不希望受到理论的束缚,但据信特定的连接体在荧光部分和/或着色部分之间提供了足够的接近性,从而优化了分子内FRET。

[0012] 本发明实施方案的水溶性、荧光或着色染料是深着色的,能够进行FRET过程(例如,吸收、发射、斯托克斯位移)和/或发荧光,并且可以通过目视检查或其它方式容易地观察到。在一些实施方案中,可以在没有事先照明或化学或酶促活化的情况下观察到化合物。如本文所述,通过适当地选择染料,可以获得各种颜色的视觉可检测的分析物分子以及关

于靶分子的有价值的空间信息。

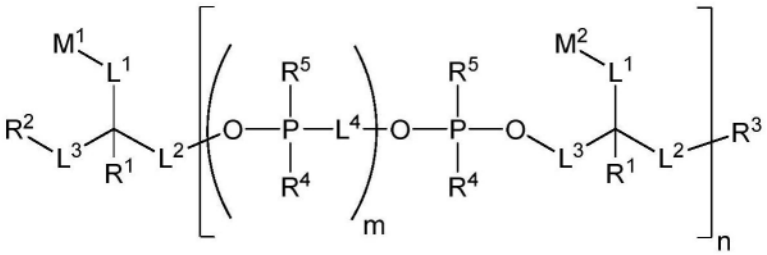
[0013] 在一个实施方案中,提供了具有以下结构(I)的化合物:

[0014] 

(I)

[0015] 或其立体异构体、互变异构体或盐,其中R^1,R^2,R^3,R^4,R^5,L^1,L^2,L^3,L^4,M^1,M^2,m和n如本文所定义。

[0016] 另一个实施方案提供了具有以下结构(II)的化合物:

[0017] 

(II)

[0018] 或其立体异构体,盐或互变异构体,其中R^1,R^2,R^3,R^4,R^5,L^1,L^2,L^3,L^4,M^1,M^2,m和n如本文所定义。

[0019] 另一个实施方案提供了一种聚合物化合物,其包含具有受体跃迁偶极矩并与聚合物主链共价连接的受体生色团,和具有给体跃迁偶极矩并与聚合物主链共价连接的给体生色团,其中该聚合物化合物在生理条件下在溶液中通过确认,其中受体生色团与给体生色团之间的有效距离小于约50.0nm,并且受体跃迁偶极和给体跃迁偶极基本平行。

[0020] 前述实施方案描述了在许多应用中有用的化合物,包括在各种分析方法中用作FRET染料、荧光和/或着色染料。

[0021] 在另一个实施方案中,提供了一种将样品染色的方法,该方法包括向所述样品中添加上述化合物中的一种,其量足以在以适当的波长照射所述样品时产生光学响应。

[0022] 在其它实施方案中,本发明内容提供了一种视觉上检测分析物分子的方法,包括:

[0023] (a)提供前述化合物的一种(例如结构(I)或结构(II)的化合物);和

[0024] (b)通过其可见特性检测化合物。

[0025] 其它公开的方法包括用于视觉检测生物分子的方法,该方法包括:

[0026] (a)将前述化合物的一种(例如结构(I)或结构(II)的化合物)与一种或多种生物分子混合;和

[0027] (b)通过其可见特性检测化合物。

[0028] 其它实施方案涉及包含至少一种前述化合物(例如,结构(I)或结构(II)的化合物)和一种或多种生物分子的组合物。还提供了这种组合物在用于检测一种或多种分析物(例如,生物分子)的分析方法中的用途。

[0029] 参考以下详细描述,本发明的这些和其它方面将变得显而易见。

[0030] 附图简要说明

[0031] 在附图中,相同的附图标记表示相似的元件。附图中元件的尺寸和相对位置不一定按比例绘制,并且一些元件被放大并定位以改善附图的可读性。此外,所绘出的元件的特定形状并不旨在传达关于特定元件的实际形状的任何信息,并且仅是为了易于在图中识别而选择。

[0032] 图1显示了化合物I-1至I-4的发射光谱,每种化合物在侧基硼二吡咯甲川("BODIPY")与基于荧光素的生色团之间具有不同的间隔基长度。

[0033] 图2阐明了化合物I-5至I-8的发射光谱,每种化合物在侧基得克萨斯红与基于荧光素的生色团之间具有不同的间隔基长度。

[0034] 图3描绘了化合物I-9至I-12的发射光谱,以比较代表性聚合物染料化合物的给体发射。

[0035] 图4显示了化合物I-13至I-19的发射光谱,以比较聚合物化合物的变化如何影响发射。

[0036] 图5显示了化合物I-20至I-23的发射光谱以及间隔基长度对其的影响。

[0037] 图6描绘了化合物I-24的吸收光谱,在该化合物的聚合物主链上侧挂有3个不同的染料部分。

[0038] 图7显示了pH值为7.0和9.0的化合物I-24的发射光谱。

[0039] 发明详述

[0040] 在以下描述中,阐述某些特定细节以提供对本发明各种实施方案的透彻理解。然而,本领域技术人员将理解本发明可以不用这些细节来实施。

[0041] 除非上下文另有需要,在整个说明书和权利要求中,词语"包括"及其变型比如"包含"和"含有"以开放内含意义解释,也即"包括,但不限于"。

[0042] 在本说明书通篇提及"一种实施方案"或"一个实施方案"意指的是,在实施方案中描述的特定性质、结构或特征包括在至少一个本发明的实施方案中。从而,短语"在一种实施方案中"或"在一个实施方案中"在本说明书通篇各种位置出现不一定全部是指同一个的实施方案。此外,特定的性质、结构或特征可以在一个或多个实施方案中以任何适宜方式组合。

[0043] "氨基"是指-NH_2基团。

[0044] "羧基"是指-CO_2H基团。

[0045] "氰基"是指-CN基团。

[0046] "甲酰基"是指-C(=O)H基团。

[0047] "羟基"或"羟基"是指-OH基团。

[0048] "亚氨基"是指=NH基团。

[0049] "硝基"是指-NO_2基团。

[0050] "氧代"是指=O取代基。

[0051] "氢硫基"是指-SH基团。

[0052] "硫代"是指=S基团。

[0053] "烷基"是指仅由碳和氢原子组成的直链或支链的烃链基团,不含不饱和度,具有

一至十二个碳原子(C_1-C_{12}烷基)、一至八个碳原子(C_1-C_8烷基)或一至六个碳原子(C_1-C_6烷基),并且其通过单键连接至分子其余部分,例如甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)、3-甲基己基、2-甲基己基等。除非特别在说明书中另有说明,烷基是任选取代的。

[0054] "亚烷基"或"亚烷基链"是指将分子其余部分连接至基团的直链或支链的二价烃链,仅由碳和氢组成,不含不饱和度,并且具有一至十二个碳原子,例如亚甲基、亚乙基、亚丙基、正亚丁基、亚乙烯基、亚丙烯基、正亚丁烯基、亚丙炔基、正亚丁炔基等。亚烷基链通过单键连接至分子其余部分并且通过单键连接至基团。亚烷基链与分子其余部分的连接点和与基团的连接点能够通过链中的一个碳或任何两个碳。除非说明书中特别另有说明,亚烷基是任选取代的。

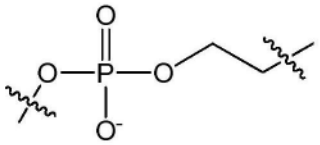
[0055] "亚烯基"或"亚烯基链"是指将分子其余部分连接至基团的直链或支链的二价烃链,仅由碳和氢组成,含有至少一个碳-碳双键和具有二至十二个碳原子,例如亚乙烯基、亚丙烯基、正亚丁烯基等。亚烯基链通过单键连接至分子其余部分和通过双键或单键连接至基团。亚烯基链与分子其余部分的连接点和与基团的连接点能够通过链中的一个碳或任何两个碳。除非说明书中特别另有说明,亚烯基是任选取代的。

[0056] "亚炔基"或"亚炔基链"是指将分子其余部分连接至基团的直链或支链的二价烃链,仅由碳和氢组成,含有至少一个碳-碳三键和具有二至十二个碳原子,例如亚乙炔基,亚丙炔基,正亚丁炔基等。亚炔基链通过单键连接至分子其余部分和通过双键或单键连接至基团。亚炔基链与分子其余部分的连接点和与基团的连接点能够通过链中的一个碳或任何两个碳。除非说明书中特别另有说明,亚炔基是任选取代的。

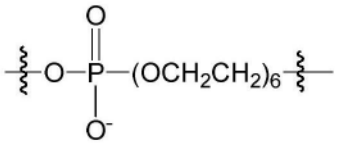
[0057] "烷基醚"是指如前文所定义的任何烷基,其中至少一个碳-碳键用碳-氧键替换。碳-氧键可以在末端(如烷氧基)或碳氧键可以在内部(也即C-O-C)。烷基醚包括至少一个碳氧键,但是可以包括多于一个。例如,聚乙二醇(PEG)包括烷基醚的含义当中。除非说明书中特别另有说明,烷基醚基团是任选取代的。例如,在一些实施方案中,烷基醚用醇或-OP(=R_a)(R_b)R_c取代,其中R_a、R_b和R_c各自如对结构(I)化合物所定义。

[0058] "烷氧基"是指式-OR_a基团,其中R_a是如前文所定义的含有一至十二个碳原子的烷基。除非说明书中特别另有说明,烷氧基是任选取代的。

[0059] "杂亚烷基"是指如前文所定义的亚烷基,在亚烷基链内或在亚烷基链末端包含至少一个杂原子(例如N、O、P或S)。在一些实施方案中,杂原子在亚烷基链内(也即杂亚烷基包含至少一个碳-[杂原子]-碳键,其中x为1、2或3)。在其它实施方案中,杂原子在亚烷基末端和从而将亚烷基与分子其余部分连接(例如M1-H-A-M2,其中M1和M2是分子的一部分,H是杂原子而A是亚烷基)。除非说明书中特别另有说明,杂亚烷基是任选取代的。示例性杂亚烷基的基团如下包括环氧乙基(例如,聚氧化乙烯)和"C,""HEG,""TEG,""PEG 1K"和其变体,连接基团如下阐明:

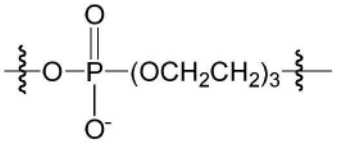


“C 连接体”

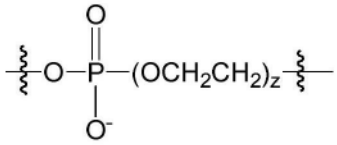


“HEG 连接体”

[0060]

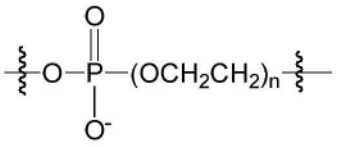


“TEG 连接体”



z > 0; e.g., z = 3-10

“EG 连接体”



n = 22-26

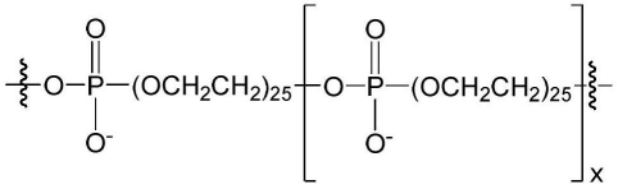
“PEG 1K 连接体”

[0061] 以上C-连接体、HEG连接体和/或PEG 1K连接体的多聚体包括在杂亚烷基连接体的多个实施方案中。

[0062] 在一些实施方案中，

[0063] 在PEG 1K连接体的一些实施方案中，n为25。多聚体可以例如包括以下结构：

[0064]



[0065] 其中x为0或大于0的整数，例如x为0-100(例如1,2,3,4,5,6,7,8,9或10)。

[0066] "杂亚烯基"是如前文所定义的杂亚烷基，包含至少一个碳-碳双键。除非说明书中特别另有说明，杂亚烯基是任选取代的。

[0067] "杂亚炔基"是包含至少一个碳-碳三键的杂亚烷基。除非说明书中特别另有说明，杂亚炔基是任选取代的。

[0068] 在提及"杂原子连接体"时"杂原子"是指由一个或多个杂原子组成的连接体基团。示例性杂原子连接体包括单个原子，其选自O、N、P和S，和多个杂原子例如具有式-P(O^-)(=O)O-或-OP(O^-)(=O)O-的连接体及其多聚体和其组合。

[0069] "磷酸根/酯基"是指-OP(=O)(R_a)R_b基团，其中R_a是OH、O^-或OR_c；而R_b是OH，O^-，OR_c，硫代磷酸根/酯基的基团或其它磷酸根/酯基的基团，其中R_c是平衡离子(例如Na^+等)。

[0070] "磷酸烷基"是指-OP(=O)(R_a)R_b基团，其中R_a是OH、O^-或OR_c；而R_b是-O烷基，其中R_c是平衡离子(例如Na^+等)。除非说明书中特别另有说明，磷酸烷基是任选取代的。例如，在某些实施方案中，磷酸烷基中的-O烷基部分任选用一个或多个下述取代：羟基、氨基、氢硫基、磷酸根/酯基、硫代磷酸根/酯基、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚或硫代磷酸烷基醚。

[0071] "磷酸烷基醚"是指-OP(=O)(R_a)R_b基团，其中R_a是OH、O^-或OR_c；而R_b是-O烷基醚，其

中R_c是平衡离子(例如Na^+等)。除非说明书中特别另有说明,磷酸烷基醚基团是任选取代的。例如,在某些实施方案中,磷酸烷基醚基团中的-O烷基醚部分任选用一个或多个下述取代:羟基,氨基,氢硫基,磷酸根/酯基,硫代磷酸根/酯基,磷酸烷基,硫代磷酸烷基,磷酸烷基醚或硫代磷酸烷基醚。

[0072] "硫代磷酸根/酯基"是指-OP(=R_a)(R_b)R_c基团,其中R_a是O或S,R_b是OH、O^-、S^-、OR_d或SR_d;而R_c是OH,SH,O^-,S^-,OR_d,SR_d,磷酸根/酯基的基团或其它硫代磷酸根/酯基的基团,其中R_d是平衡离子(例如Na^+等)且条件是:i)R_a是S;ii)R_b是S^-或SR_d;iii)R_c是SH,S^-或SR_d;或iv)i),ii)和/或iii)的组合。

[0073] "硫代磷酸烷基"是指-OP(=R_a)(R_b)R_c基团,其中R_a是O或S,R_b是OH,O^-,S^-,OR_d或SR_d;而R_c是-O烷基,其中R_d是平衡离子(例如Na^+等)且条件是:i)R_a是S;ii)R_b是S^-或SR_d;或iii)R_a是S而R_b是S^-或SR_d。除非说明书中特别另有说明,硫代磷酸烷基是任选取代的。例如,在某些实施方案中,硫代磷酸烷基中的-O烷基部分任选用一个或多个下述取代:羟基,氨基,氢硫基,磷酸根/酯基,硫代磷酸根/酯基,磷酸烷基,硫代磷酸烷基,磷酸烷基醚,或硫代磷酸烷基醚。

[0074] "硫代磷酸烷基醚"是指-OP(=R_a)(R_b)R_c基团,其中R_a是O或S,R_b是OH、O^-、S^-、OR_d或SR_d;而R_c是-O烷基醚,其中R_d是平衡离子(例如Na^+等)且条件是:i)R_a是S;ii)R_b是S^-或SR_d;或iii)R_a是S而R_b是S^-或SR_d。除非说明书中特别另有说明,硫代磷酸烷基醚基团是任选取代的。例如,在某些实施方案中,硫代磷酸烷基中的-O烷基醚部分任选用一个或多个下述取代:羟基,氨基,氢硫基,磷酸根/酯基,硫代磷酸根/酯基,磷酸烷基,硫代磷酸烷基,磷酸烷基醚或硫代磷酸烷基醚。

[0075] "碳环"是指稳定的3-至18-元芳族或非芳族环,其包含3至18个碳原子。除非说明书中特别另有说明,碳环可以是单环、双环、三环或四环的环体系,其可以包括稠合的或桥连的环体系,和可以是部分或完全饱和的。非芳族碳环基基团包括环烷基,而芳族碳环基基团包括芳基。除非说明书中特别另有说明,碳环基团是任选取代的。

[0076] "环烷基"是指稳定的非芳族单环或多环碳环,其可以包括稠合的或桥连的环体系,具有三至十五个碳原子,优选具有三至十个碳原子,并且其是饱和的或不饱和的和通过单键连接至分子其余部分。单环环烷基包括例如环丙基,环丁基,环戊基,环己基,环庚基和环辛基。多环环烷基包括例如金刚烷基,降莰烷基,十氢萘基,7,7-二甲基-二环-[2.2.1]庚烷基等。除非说明书中特别另有说明,环烷基是任选取代的。

[0077] "芳基"是指环体系包含至少一个碳环芳族环。在一些实施方案中,芳基包含6至18个碳原子。芳基环可以是单环、双环、三环或四环的环体系,其可以包括稠合的或桥连的环体系。芳基包括但不限于衍生自下述的芳基:醋蒽烯,苊烯,醋菲烯,蒽,萼,苯,䓛(chrysene),荧蒽,芴,不对称引达省,对称引达省,茚满,茚,萘,非那烯,菲,七曜烯,芘和三亚苯。除非说明书中特别另有说明,芳基是任选取代的。

[0078] "杂环"是指稳定的3-至18-元芳族或非芳族环,包含一至十二个碳原子和一至六个选自氮、氧和硫的杂原子。除非说明书中特别另有说明,杂环可以是单环、双环、三环或四环的环体系,其可以包括稠合的或桥连的环体系;和杂环中的氮、碳或硫原子可以任选被氧化;氮原子可以任选被季铵化;和杂环可以是部分或完全饱和的。芳族杂环的实例是在下文中列于杂芳基的定义中(也即杂芳基是杂环的子集)。非芳族杂环的实例包括但不限于二氧

杂环戊烷基,噻吩基[1,3]二噻烷基,十氢异喹啉基,咪唑啉基,咪唑烷基,异噻唑烷基,异噁唑烷基,吗啉基,八氢吲哚基,八氢异吲哚基,2-氧代哌嗪基,2-氧代哌啶基,2-氧代吡咯烷基,噁唑烷基,哌啶基,哌嗪基,4-哌啶酮基,吡咯烷基,吡唑烷基,吡唑并嘧啶基,奎宁环基,噻唑烷基,四氢呋喃基,三噁烷基,三硫杂烷基,三嗪烷基,四氢吡喃基,硫吗啉基,硫杂吗啉基,1-氧代-硫吗啉基和1,1-二氧代-硫吗啉基。除非说明书中特别另有说明,杂环基团是任选取代的。

[0079] "杂芳基"是指5-至14-元环体系包含一至十三个碳原子,一至六个选自氮、氧和硫的杂原子,和至少一个芳族环。出于本发明的某些实施方案的意图,杂芳基基团可以是单环、双环、三环或四环的环体系,其可以包括稠合的或桥连的环体系;和杂芳基基团中的氮、碳或硫原子可以任选被氧化;氮原子可以任选被季铵化。实例包括但不限于氮杂䓬基,吖啶基,苯并咪唑基,苯并噻唑基,苯并吲哚基,苯并二氧杂环戊二烯基,苯并呋喃基,苯并噁唑基,苯并噻唑基,苯并噻二唑基,苯并[b][1,4]二氧杂䓬基,1,4-苯并二噁烷基,苯并萘并呋喃基,苯并噁唑基,苯并二氧杂环戊二烯基,苯并二氧杂环己二烯基,苯并吡喃基,苯并吡喃酮基,苯并呋喃基,苯并呋喃酮基,苯并噻吩基(苯并噻吩基),苯并三唑基,苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基,苯并噁唑啉酮基,苯并咪唑亚硫酰基,咔唑基,噌啉基,二苯并呋喃基,二苯并噻吩基,呋喃基,呋喃酮基,异噻唑基,咪唑基,吲唑基,吲哚基,吲唑基,异吲哚基,吲哚啉基,异吲哚啉基,异喹啉基,吲嗪基,异噁唑基,萘啶基,噁二唑基,2-氧代氮杂䓬基,噁唑基,氧化乙烯基,1-氧化吡啶基,1-氧化嘧啶基,1-氧化吡嗪基,1-氧化哒嗪基,1-苯基-1H-吡咯基,吩嗪基,吩噻嗪基,吩噁嗪基,酞嗪基,蝶啶基,蝶啶酮基,嘌呤基,吡咯基,吡唑基,吡啶基,吡啶酮基,吡嗪基,嘧啶基,嘧啶酮基,哒嗪基,吡咯基,吡啶并[2,3-d]嘧啶酮基,喹唑啉基,喹唑啉酮基,喹喔啉基,喹喔啉酮基,喹啉基,异喹啉基,四氢喹啉基,噻唑基,噻二唑基,噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-酮基,噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-酮基,三唑基,四唑基,三嗪基,和噻吩基(也即噻吩基)。除非说明书中特别另有说明,杂芳基是任选取代的。

[0080] 后缀"-烯"是指通过单键连接至分子其余部分并通过单键连接至基团的特定结构特征(例如,烷基、芳基、杂烷基)。换句话说,后缀"-烯"是指具有本文给出的描述的特定结构特征,其是分子与基团之间的连接体。"-烯"链与分子其余部分和与基团的连接点可以通过链中的一个或任何两个原子。例如,亚烷基杂亚烷基是指包含亚烷基部分和杂亚烷基部分的连接体。

[0081] "稠合的"是指包含至少两个环的环体系,其中所述两个环共享至少一个共同的环原子例如两个共享的环原子。在稠环是杂环基环或杂芳基环的情况下,共享的环原子可以是碳或氮。稠环包括双环,三环,四环等。

[0082] "共轭"指一个p轨道与两一个p轨道横跨居间的σ键重叠。共轭可以出现在环状或非环状化合物中。"共轭度"是指至少一个p轨道与另一个p轨道横跨居间的σ键重叠。例如,1,3-丁二烯具有一个共轭度,而苯和其它芳族化合物通常具有多个共轭度。荧光和着色化合物通常包含至少一个共轭度。

[0083] "荧光分子"是指能够吸收特定频率的光和发出不同频率的光的分子。荧光是本领域普通技术人员熟知的。

[0084] "着色分子"是指吸收着色光谱范围内的光(也即红、黄、蓝色等)的分子。

[0085] “FRET”是指Förster共振能量转移,其是指一种物理相互作用,由此来自一个部分(例如,第一生色团或“给体”)激发的能量被转移到相邻的部分(例如,第二生色团或“受体”)。有时也将“FRET”与荧光共振能量转移互换使用(即,当每个生色团是荧光部分时)。通常,FRET要求(1)受体生色团的激发或吸收光谱与给体生色团的发射光谱重叠;(2)受体和给体生色团的跃迁偶极矩基本平行(即大约0°或180°);和(3)受体和给体生色团共享一个空间上的接近度(即彼此靠近)。能量从给体到受体的传递是通过非辐射偶极-偶极耦合发生的,给体生色团和受体生色团之间的距离通常比光的波长小得多。

[0086] “给体”或“给体生色团”是指一种生色团(例如,荧光团),其被激发或可以被激发成电子态,并且可以将其激发能传递给附近的受体生色团,通过长距离偶极-偶极相互作用的非辐射方式。不希望受理论的束缚,认为发生能量转移是因为各个生色团的振荡偶极具有相似的共振频率。具有这些相似共振频率的给体和受体称为“给体-受体对”,其与“FRET部分”或“FRET染料”可互换使用。

[0087] “受体”或“受体生色团”是指生色团(例如,荧光团),给体生色团的激发能通过长距离偶极-偶极相互作用通过非辐射传递而传递给该受体。

[0088] “斯托克频移”是指电子跃迁(例如,从激发态到非激发态,反之亦然)的吸收光谱和发射光谱的谱带最大值的位置(例如,波长)之间的差。在一些实施方案中,所述化合物具有大于25nm,大于30nm,大于35nm,大于40nm,大于45nm,大于50nm,大于55nm,大于60nm,大于65nm,大于70nm,大于75nm,大于80nm,大于85nm,大于90nm,大于95nm,大于100nm,大于110nm,大于120nm,大于130nm,大于140nm,大于150nm,大于160nm,大于170nm,大于180nm,大于190nm或大于200nm的斯托克频移。

[0089] "连接体"是指至少一个原子比如碳、氧、氮、硫、磷及其组合的连续链,其将分子的一部分与同一分子的又一部分连接或者与不同分子、部分或固体载体(例如微粒)连接。连接体可以经由共价键或其它手段比如离子键或氢键相互作用连接分子。

[0090] “生理条件”是指温度为约20至40℃,大气压为约1atm(101kPa或14.7psi),pH为约6至8,葡萄糖浓度为约1至20mM,大气中的氧气浓度和/或地球重力的溶液或介质。“生理条件”包括具有这些性质的子集的溶液或介质(例如,具有20至40℃的温度和约6至8的pH)。这样的条件还可以包括缓冲液成分或体系,包括但不限于磷酸盐,碳酸氢盐,血红蛋白和/或蛋白质。

[0091] 术语"生物分子"是指任何各种生物学物质,包括核酸,碳水化合物,氨基酸,多肽,糖蛋白,激素类,适体及其混合物。更特别地,该术语期望包括但不限于RNA,DNA,寡核苷酸,修饰的或衍生化的核苷酸,酶,受体,朊病毒,受体配体(包括激素类),抗体,抗原和毒素,以及细菌,病毒,血液细胞和组织细胞。本发明的视觉可检测的生物分子(例如具有与其连接的生物分子的结构(I)或(II)的化合物)制备如下:将生物分子与化合物接触,所述化合物具有反应性基团使得生物分子可以经由生物分子上任何可获得的原子或官能团比如氨基、羟基、羧基或氢硫基连接至化合物,如本文进一步描述。

[0092] "反应性基团"是能够与第二反应性基团(例如"互补反应性基团")反应形成一个或多个共价键的部分,例如通过取代、氧化、还原、加成或环加成反应。示例性反应性基团提供于表1并且包括例如亲核物质,亲电试剂,双烯基,亲二烯基,醛,肟,腙,炔,胺,叠氮基,酰基叠氮基,酰卤基,腈,硝酮,氢硫基,二硫基,磺酰卤基,异硫氰酸酯基,亚氨酸酯基,活化酯

基,酮,α,β-不饱和羰基,烯烃,马来酰亚胺,α-卤代酰亚胺,环氧烷基,氮丙啶,四嗪,四唑,膦,生物素,硫杂环丙基等。

[0093] “生物缀合”或“生物缀合物”和相关变体是指用于在两个分子之间形成稳定的共价键的化学反应策略。当分子中的一个是生物分子(例如抗体)时,通常使用术语“生物缀合”,但是可以用来描述与非生物分子(例如聚合物树脂)形成共价键。由这种反应策略得到的产物或化合物是“缀合物”,“生物缀合物”或语法等效物。

[0094] 术语“可见的”和“视觉上可检测的”在本文中用于是指在不事先照明或化学或酶促活化的情况下通过视觉检查可观察到的物质。这种视觉上可检测的物质吸收和发射在约300至约900nm的光谱范围内的光。优选地,这些物质是强烈着色的,优选具有至少约40,000的摩尔消光系数,更优选至少约50,000,还更优选至少约60,000,还更优选至少约70,000,并且最优选至少约80,000$M^{-1}cm^{-1}$。本发明的化合物的实施方案可以通过裸眼观察或借助于基于光学的检测装置来检测,所述光学装置包括但不限于吸收分光光度计,透射光显微镜,数码相机和扫描仪。视觉上可检测的物质不限于发射和/或吸收可见光谱的光的物质。在紫外线(UV)区域(约10nm至约400nm),红外线(IR)区域(约700nm至约1mm)发射和/或吸收光的物质,以及在电磁波谱的其它区域发射和/或吸收光的物质也包括在“视觉可检测的”物质范围内。

[0095] 为了本发明的实施方案的目的,术语“光稳定的可见染料”是指如上文所定义在视觉上可检测的并且在暴露于光下不会显著改变或分解的化学部分。优选地,光稳定的可见染料在暴露至少一小时后不表现出明显的漂白或分解。更优选地,可见染料在暴露于光至少12小时之后,还更优选至少24小时,还更优选至少一周,和最优选至少一个月是稳定的。适用于本发明的化合物和方法的光稳定的可见染料的非限制性实例包括偶氮染料、硫靛染料、喹吖啶酮颜料、二噁嗪、酞菁、佩宁酮、二酮吡咯并吡咯、喹啉黄和truarycarbonium。

[0096] 如本文所用的,术语“芘衍生物”旨在包括在视觉上可检测的任何取代的芘。但是,该术语并不意图包括芘本身。类似地使用术语“蒽衍生物”、“萘衍生物”和“芘衍生物”。在一些优选的实施方案中,衍生物(例如芘、芘、蒽或萘衍生物)是芘、蒽、萘或芘的酰亚胺、双酰亚胺或胼酰亚胺的衍生物。

[0097] 本发明的各种实施方案的聚合物化合物可用于多种分析应用,例如生化和生物医学应用,其中需要确定特定分析物(例如,生物分子)的存在、位置、空间相互作用或数量。因此,在另一方面,本发明提供了一种用于视觉检测生物分子的方法,其包括:(a)提供一种具有视觉可检测生物分子的生物体系,所述生物体系包含本文公开的实施方案的化合物(例如,结构(I)或结构(II)))与生物分子相连;和(b)通过其可见特性检测生物分子。为了本发明的目的,短语“通过其可见特性检测生物分子”是指用肉眼或借助基于光学检测装置观察到在没有照明,化学或酶促活化情况下的生物分子,所述基于光学检测装置包括但不限于吸收分光光度计、透射光显微镜、数码相机和扫描仪。可以使用密度计来量化存在的视觉上可检测的生物分子的量。例如,可以通过测量相对光密度来确定两个样品中生物分子的相对量。如果每生物分子的染料分子的化学计量是已知的,并且染料分子的消光系数是已知的,那么该生物分子的绝对浓度也可以通过光密度的测量来确定。如本文所用的,术语“生物体系”用于指除了视觉上可检测的生物分子之外还包含一种或多种生物分子的任何溶液或混合物。此类生物体系的非限制性实例包括细胞、细胞提取物、组织样品、电泳凝胶、测定

混合物和杂交反应混合物。

[0098] "固体载体"或"固体载体基团"是指本领域对于分子固相载体已知的任何固体基材,例如"微粒"是指用于连接至本发明化合物的任何各种小颗粒,包括但不限于玻璃珠、磁珠、聚合物珠、非聚合物珠等。在某些实施方案中,微粒包含聚苯乙烯珠。

[0099] "碱基配对部分"是指能够通过氢键与互补杂环部分杂交的杂环部分(例如,Watson-Crick碱基配对)。碱基配对部分包括天然和非天然碱基。碱基配对部分的非限制性实例是RNA和DNA碱基,例如腺苷、鸟苷、胸苷、胞嘧啶和尿苷及其类似物。

[0100] 本文公开的发明的实施方案也意在涵盖同位素标记的全部结构(I)或(II)的化合物,其中一个或多个原子用具有不同的原子质量或质量数的原子替换。能够掺入公开化合物的同位素的实例包括氢,碳,氮,氧,磷,氟,氯和碘的同位素,分别例如^{2}H,^{3}H,^{11}C,^{13}C,^{14}C,^{13}N,^{15}N,^{15}O,^{17}O,^{18}O,^{31}P,^{32}P,^{35}S,^{18}F,^{36}Cl,^{123}I和^{125}I。

[0101] 同位素标记的结构(I)或(II)的化合物能够一般地通过本领域技术人员已知的常规技术或通过与下文和下述实例描述的那些类似的过程用适当同位素标记的试剂代替原先使用的非标记试剂来制备。

[0102] "稳定化合物"和"稳定结构"意指化合物,其是足够稳健的,使得能够经历从反应混合物分离为有用程度的纯度并配制为有效的治疗剂。

[0103] "任选的"或"任选地"意指随后描述的事件或环境可以或可以不发生,并且该描述包括其中所述事件或环境发生的情况和其并不发生的情况。例如,"任选取代的烷基"意指烷基可以或可以不被取代并且该描述包括取代的烷基和不具有取代的烷基。

[0104] "盐"包括酸和碱加成盐。

[0105] "酸加成盐"是指与无机酸形成的那些盐,所述无机酸是例如但不限于氢氯酸,氢溴酸,硫酸,硝酸,磷酸等,和与有机酸形成的那些盐,所述有机酸是例如但不限于乙酸,2,2-二氯乙酸,己二酸,藻酸,抗坏血酸,天冬氨酸,苯磺酸,苯甲酸,4-乙酰氨基苯甲酸,樟脑酸,樟脑-10-磺酸,癸酸,己酸,辛酸,碳酸,肉桂酸,柠檬酸,环拉酸,十二烷基硫酸,乙烷-1,2-二磺酸,乙磺酸,2-羟基乙磺酸,甲酸,富马酸,半乳糖酸,龙胆酸,葡庚糖酸,葡萄糖酸,葡萄糖醛酸,谷氨酸,戊二酸,2-氧代-戊二酸,甘油磷酸,乙醇酸,马尿酸,异丁酸,乳酸,乳糖酸,月桂酸,马来酸,苹果酸,丙二酸,扁桃酸,甲磺酸,粘酸,萘-1,5-二磺酸,萘-2-磺酸,1-羟基-2-萘甲酸,烟酸,油酸,乳清酸,草酸,棕榈酸,扑酸,丙酸,焦谷氨酸,丙酮酸,水杨酸,4-氨基水杨酸,癸二酸,硬脂酸,丁二酸,酒石酸,硫氰酸,对甲苯磺酸,三氟乙酸,十一碳烯酸等。

[0106] "碱加成盐"是指将无机碱或有机碱加至游离酸制备的那些盐。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠,钾,锂,铵,钙,镁,铁,锌,铜,锰,铝盐等。衍生自有机碱的盐包括但不限于下述的盐:伯、仲和叔胺,取代的胺包括天然取代的胺,环状胺和碱性离子交换树脂,比如氨,异丙胺,三甲胺,二乙胺,三乙胺,三丙胺,二乙醇胺,乙醇胺,地阿诺,2-二甲基氨基乙醇,2-二乙基氨基乙醇,二环己基胺,赖氨酸,精氨酸,组氨酸,咖啡因,普鲁卡因,海巴明(hydrabamine),胆碱,甜菜碱、苯那明,苄星,乙二胺,葡糖胺,甲基葡糖胺,可可碱,三乙醇胺,三甲胺,嘌呤,哌嗪,哌啶,N-乙基哌啶,多胺树脂等。特别优选的有机碱是异丙胺,二乙胺,乙醇胺,三甲胺,二环己基胺,胆碱和咖啡因。

[0107] 结晶可以产生本文描述的化合物的溶剂化物。本发明的实施方案包括所描述化合

物的全部溶剂化物。如本文所用,术语"溶剂化物"是指聚集体,其包含一种或多种本发明化合物分子与一种或多种溶剂分子。溶剂可以是水,在该情况下溶剂化物可以是水合物。另选地,溶剂可以是有机溶剂。从而,本发明化合物可以作为水合物存在,包括一水合物,二水合物,半水合物,倍半水合物,三水合物,四水合物等,以及相应的溶剂化形式。本发明化合物可以是真正的溶剂化物,而在另外的情况下本发明化合物可以仅保留外来水或其它溶剂或者是水和一些外来溶剂的混合物。

[0108] 本发明化合物(例如结构I或II的化合物)或它们的盐、互变异构体或溶剂化物的实施方案可以含有一个或多个立构中心和可以从而产生对映体、非对映体和其它立体异构形式,其在绝对立体化学方面可以定义为(R)-或(S)-或者对于氨基酸的(D)-或(L)-。本发明的实施方案意在包括全部所述可能异构体,以及它们的外消旋和光学纯形式。光学活性的(+)和(-)、(R)-和(S)-或(D)-和(L)-异构体可以用手性合成子或手性试剂制备,或用常规技术例如色谱法和分步结晶拆分。用来制备/分离单独对映体的常规技术包括从适宜的光学纯前体手性合成或者用例如手性高压液体色谱法(HPLC)拆分外消旋体(或盐或衍生物的外消旋体)。在本文描述的化合物含有烯式双键或其它几何不对称中心的情况下,并且除非另有指定,期望的是化合物包括E和Z几何异构体。类似地,也期望包括全部互变异构体形式。

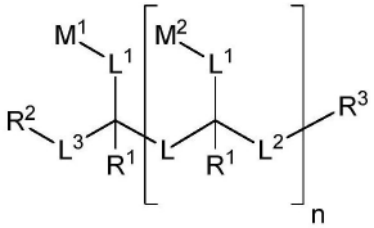
[0109] "立体异构体"是指由通过相同键键合的相同原子构成的化合物,但是具有不可互换的不同三维结构。本发明预期各种立体异构体及其混合物和包括"对映体",其是指两个立体异构体,其分子是彼此不可重叠的镜像。

[0110] "互变异构体"是指质子从分子的一个原子转移到相同分子的又一个原子。本发明包括任何所述化合物的互变异构体。化合物的各种互变异构体形式可通过本领域普通技术人员容易地衍生。

[0111] 本文使用的化学命名方案和结构图解是I.U.P.A.C.命名系统的变体形式,采用ACD/Name版本9.0 7软件程序和/或ChemDraw Ultra版本1 1.0软件命名程序(CambridgeSoft)。也使用本领域普通技术人员熟悉的通用名。

[0112] 如上所述,在本发明的一个实施方案中,提供了在各种分析方法中用作FRET、荧光和/或着色染料的化合物。在其它实施方案中,提供了可用作制备可用作FRET、荧光和/或着色染料的化合物的合成中间体的化合物。一般而言,本发明的实施方案涉及FRET、荧光和/或着色部分的二聚体和高级聚合物。FRET、荧光和/或着色部分通过连接部分连接。不希望受理论的束缚,据信连接体有助于在给体-受体对之间维持足够的空间距离/邻近度,从而减少或消除分子内猝灭,同时保持足够的亲近性以促进能量的非辐射传递。

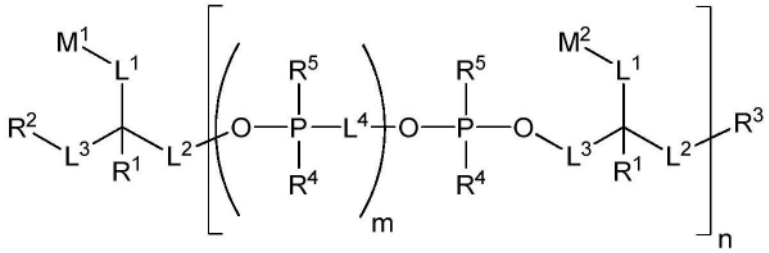
[0113] 因此,在一些实施方案中,该化合物具有以下结构(A):

[0114] 

(A)

[0115] 其中L为具有足够维持一个或多个(例如每个)M基团空间上分离的连接体,使得降低或消除分子内相互作用,和R^1,R^2,R^3,L^1,L^2,L^3和n如对于结构(I)或结构(II)所定义。

[0116] 在其它实施方案中,提供了一种具有以下结构(I)的化合物

[0117] 

(I)

[0118] 或其立体异构体,盐或互变异构体,其中:

[0119] M^1和M^2在每次出现时独立地为生色团,条件是M^1和M^2的至少一次出现时结合以形成FRET给体-受体对,

[0120] L^1在每次出现时为任选的连接体;

[0121] L^2和L^3在每次出现时独立地为任选的亚烷基,亚烯基,亚炔基,杂亚烷基,杂亚烯基,杂亚炔基或杂原子连接体;

[0122] L^4在每次出现时独立地为亚烷基或杂亚烷基连接体;

[0123] R^1在每次出现时独立地为H、烷基或烷氧基;

[0124] R^2和R^3各自独立地为H、OH、SH、烷基、烷氧基、烷基醚、杂烷基、-OP(=R_a)(R_b)R_c、Q或其受保护的形式,或L′;

[0125] R^4在每次出现时独立地为OH、SH、O^-、S^-、OR_d或SR_d;

[0126] R^5在每次出现时独立地为氧代、硫代或不存在;

[0127] R_a为O或S;

[0128] R_b为OH、SH、O^-、S^-、OR_d或SR_d;

[0129] R_c为OH、SH、O^-、S^-、OR_d、OL′、SR_d、烷基、烷氧基、杂烷基、杂烷氧基、烷基醚、烷氧基烷基醚、磷酸根/酯基,硫代磷酸根/酯基,磷酸烷基,硫代磷酸烷基,磷酸烷基醚或硫代磷酸烷基醚;

[0130] R_d是平衡离子;

[0131] Q在每次出现时独立地为包含反应性基团的部分,或其受保护的形式,其能够与分析物分子、靶向部分、固体载体或互补反应性基团Q′形成共价键;

[0132] L'在每次出现时独立地为包含与Q共价连接的连接体,包含与靶向部分共价连接的连接体,包含与分析物分子共价连接的连接体,包含与固体载体共价连接的连接体,包含与固体载体基团共价连接的连接体,包含与核苷共价连接的连接体或包含与结构(I)的其它化合物共价连接的连接体;

[0133] m在每次出现时独立地为0或更大的整数;和

[0134] n为1或更大的整数。

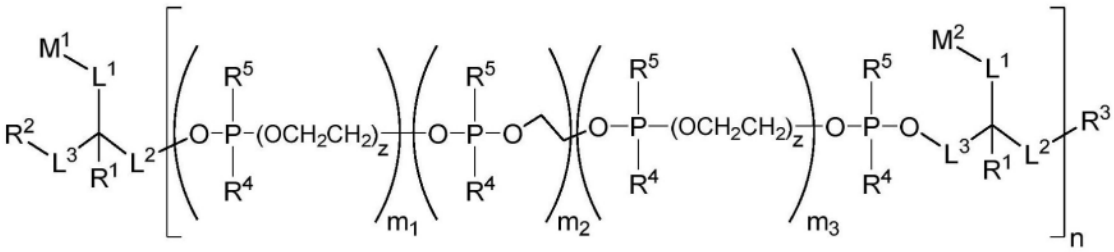
[0135] 在一些实施方案中,L^4的至少一次出现时为杂亚烷基。在更具体的实施方案中,杂亚烷基包含环氧烷基。在一些相关的实施方案中,杂亚烷基包含环氧乙烷基。

[0136] 在实施方案中,L^4的至少一次出现时为亚烷基。在一些更具体的实施方案中,至少

一个亚烷基为亚乙基。在一些实施方案中,亚烷基在每次出现时为亚乙基。

[0137] 在一些实施方案中,L^1在每次出现时独立地为任选的亚烷基,亚烯基,亚炔基,杂亚烷基,杂亚烯基,杂亚炔基或杂原子连接体。在一些实施方案中,L^1为包含能够通过两个互补的反应性基团(例如叠氮化物和炔)的反应形成的官能团的连接体。在一些实施方案中,L^1在每次出现时独立地为任选的亚烷基、亚烯基、亚炔基、杂亚烷基、杂亚烯基、杂亚炔基、亚烷基杂亚芳基亚烷基、亚烷基杂亚环基亚烷基、亚烷基亚碳环基亚烷基、杂亚烷基杂亚芳基亚烷基、杂亚烷基杂亚环基亚烷基、杂亚烷基亚碳环基亚烷基、杂亚烷基杂亚芳基杂亚烷基、杂亚烷基杂亚环基杂亚烷基、杂亚烷基亚碳环基杂亚烷基、亚烷基杂亚芳基杂亚烷基、亚烷基杂亚环基杂亚烷基、亚烷基亚碳环基杂亚烷基、杂亚芳基、杂亚环基、亚碳环基、亚烷基杂亚芳基、亚烷基杂亚环基、杂亚芳基亚烷基、亚烷基亚碳环基、亚碳环基亚烷基、杂亚烷基杂亚芳基、杂亚烷基杂亚环基、杂亚芳基杂亚烷基、杂亚烷基亚碳环基、亚碳环基杂亚烷基或杂原子连接体。在一些实施方案中,L^1是任选取代的。

[0138] 在一些实施方案中,该化合物具有以下结构(IA):

[0139] 

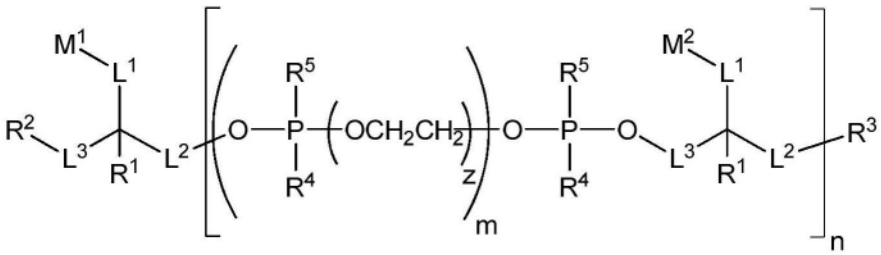
(IA)

[0140] 其中:

[0141] z在每次出现时独立地为1-100的整数;和

[0142] m_1、m_2和m_3在每次出现时独立地为0-6的整数。

[0143] 在一些其它实施方案中,该化合物具有以下结构(IB):

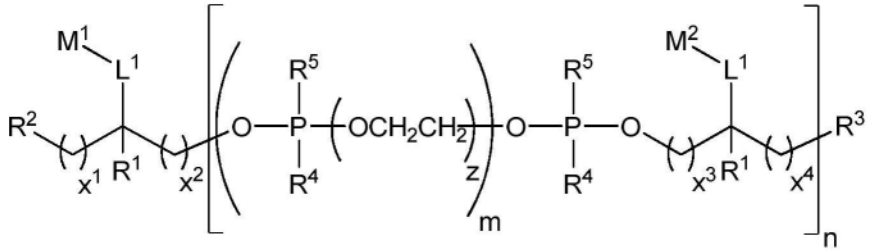
[0144] 

(IB)

[0145] 其中:

[0146] z在每次出现时独立地为1-100的整数。

[0147] 在不同的实施方案中,该化合物具有以下结构(IC):

[0148] 

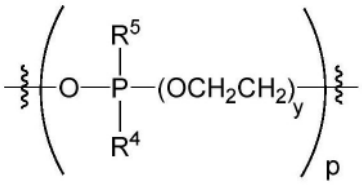
(IC)

[0149] 其中:

[0150] z在每次出现时独立地为1-100的整数,和

[0151] x^1,x^2,x^3和x^4在每次出现时独立地为0-6的整数。

[0152] 在某些相关的实施方案中,z在一次或多次出现时为3-6的整数。在一些特定的实施方案中,x^1和x^3在每次出现时各自为0,和x^2和x^4在每次出现时各自为1。在一些实施方案中,x^1,x^2,x^3和x^4在每次出现时各自为1。在一个特定的实施方案中,L^4具有以下结构:

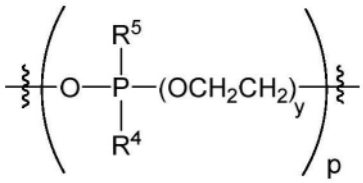


[0153] 其中:

[0154] p在每次出现时独立地为0-6的整数;和

[0155] y在每次出现时独立地为1-100的整数。

[0156] 在一些实施方案中,R^3包含以下结构:

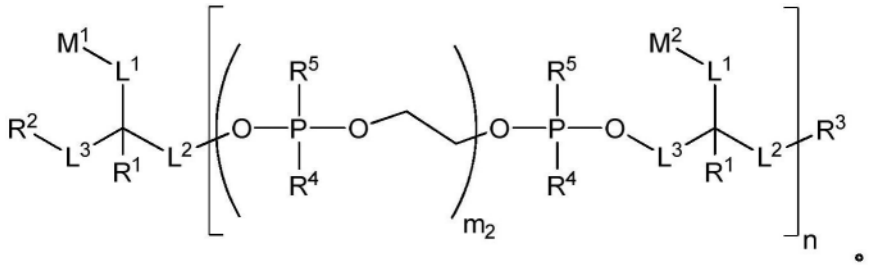
[0157] 

[0158] 其中:

[0159] p在每次出现时独立地为0-6的整数;和

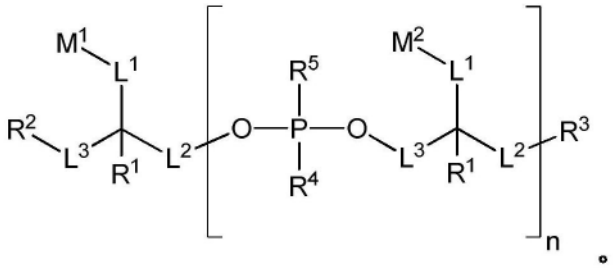
[0160] y在每次出现时独立地为1-100的整数。

[0161] 在某些实施方案中,该化合物具有以下结构(ID):

[0162] 

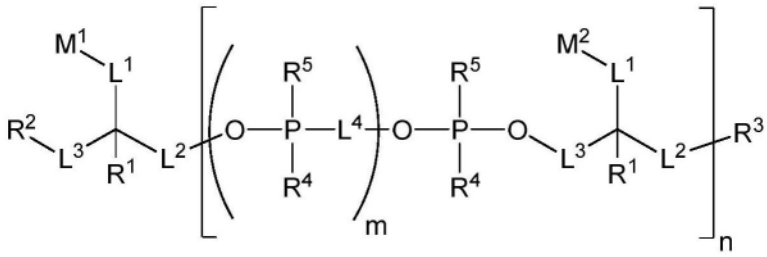
(ID)

[0163] 在一些相关的实施方案中,该化合物具有以下结构(IE):

[0164] 

(IE)

[0165] 另一个实施方案提供了具有以下结构(II)的化合物，

[0166] 

(II)

[0167] 或其立体异构体、盐或互变异构体，其中：

[0168] M^1和M^2在每次出现时独立地为生色团，条件是M^1和M^2至少一次出现时结合以形成FRET受体-给体对；

[0169] L^1在每次出现时为任选的连接体；

[0170] L^2和L^3在每次出现时独立地为任选的亚烷基、亚烯基、亚炔基、杂亚烷基、杂亚烯基、杂亚炔基或杂原子连接体；

[0171] L^4在每次出现时独立地为亚烷基或杂亚烷基连接体；

[0172] R^1在每次出现时独立地为H、烷基或烷氧基；

[0173] R^2和R^3各自独立地为H、OH、SH、烷基、烷氧基、烷基醚、杂烷基、-OP(=R_a)(R_b)R_c、Q或其受保护的形式，或L′；

[0174] R^4在每次出现时独立地为OH、SH、O^-、S^-、OR_d或SR_d；

[0175] R^5在每次出现时独立地为氧代、硫代或不存在；

[0176] R_a为O或S；

[0177] R_b为OH、SH、O^-、S^-、OR_d或SR_d；

[0178] R_c为OH、SH、O^-、S^-、OR_d、OL′、SR_d、烷基、烷氧基、杂烷基、杂烷氧基、烷基醚、烷氧基烷基醚、磷酸根/酯基、硫代磷酸根/酯基、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚或硫代磷酸烷基醚；

[0179] R_d为平衡离子；

[0180] Q在每次出现时独立地为包含反应性基团的部分或其受保护的形式，其能够与分析物分子、靶向部分、固体载体或互补反应性基团Q′形成共价键；

[0181] L′在每次出现时独立地为包含与Q共价连接的连接体，包含与靶向部分共价连接的连接体，包含与分析物分子共价连接的连接体，包含与固体载体共价连接的连接体，包含与固体载体基团共价连接的连接体，包含与核苷共价连接的连接体或包含与结构(II)的其

它化合物共价连接的连接体；

[0182] m在每次出现时独立地为0-2或大于6的整数；和

[0183] n为1或更大的整数。

[0184] 结构(I)和(II)化合物中的各种连接体和取代基(例如M^1,M^2,Q,R^1,R^2,R^3,R^c L^1,L^2,L^3和L^4)任选用一个或多个取代基取代。例如,在一些实施方案中选择可选取代基来优化结构(I)或(II)化合物的水溶解度或其它特性。在某些实施方案中,在结构(I)和(II)化合物中的各烷基、烷氧基、烷基醚、烷氧基烷基醚、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚和硫代磷酸烷基醚任选用一个或多个取代基取代,所述取代基选自羟基,烷氧基,烷基醚,烷氧基烷基醚,氢硫基,氨基,烷基氨基,羧基,磷酸根/酯基,硫代磷酸根/酯基,磷酸烷基,硫代磷酸烷基,磷酸烷基醚和硫代磷酸烷基醚。

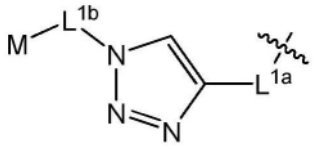
[0185] 任选的连接体L^1可以用作M^1和M^2部分与化合物其余部分的连接点。例如,在一些实施方案中,制备结构(I)或结构(II)化合物的合成前体,和用任何数量的本领域已知的易行方法例如称为"点击化学"的方法将M^1和/或M^2部分连接至合成前体。出于该意图,快速和基本上不可逆的任何反应可以用来将M^1或M^2或二者连接至合成前体以形成结构(I)或结构(II)的化合物。示例性反应包括叠氮化物和炔形成三唑的铜催化反应(Huisgen 1,3-偶极环加成),二烯和亲二烯体的反应(Diels-Alder),张力促进的炔-硝酮环加成,张力烯烃与叠氮化物、四嗪或四唑的反应,烯烃和叠氮化物[3+2]环加成,烯烃和四嗪逆需求Diels-Alder,烯烃和四唑光反应以及各种置换反应,比如离去基团被亲电原子上的亲核进攻置换。在一些实施方案中,形成L^1的反应可以在含水环境中进行。

[0186] 因此,在一些实施方案中,L^1在每次出现时为包含官能团的连接体,所述官能团能够通过两个互补反应性基团的反应形成,例如前述"点击"反应之一的产物的官能团。在各种实施方案中,对于L^1的至少一次出现,所述官能团可以通过醛、肟、腙、炔、胺、叠氮化物、酰基叠氮化物、酰卤、腈、硝酮、氢硫基、二硫基、磺酰卤、异硫氰酸酯基、亚氨酸酯、活化酯基、酮、α,β-不饱和羰基、烯烃、马来酰亚胺、α-卤代酰亚胺、环氧化物、氮丙啶、四嗪、四唑、膦、生物素或硫杂环丙烷官能团与互补反应性基团的反应形成。

[0187] 在其它实施方案中,对于L^1的至少一次出现时,官能团可以通过炔和叠氮化合物的反应形成。

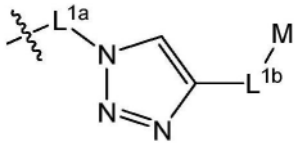
[0188] 在更多的实施方案中,对于L^1的至少一次出现时,官能团包含烯烃,酯,酰胺,硫代酯,二硫基,碳环,杂环或杂芳基。在一些更具体的实施方案中,对于L^1的至少一次出现时,L^1为包含三唑基官能团的连接体。

[0189] 在仍然其它实施方案中,对于L^1的至少一次出现,L^1-M具有以下结构：

[0190] 

[0191] 其中L^{1a}和L^{1b}各自独立地为任选的连接体。

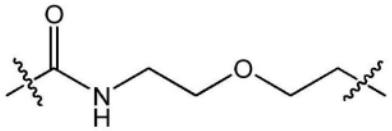
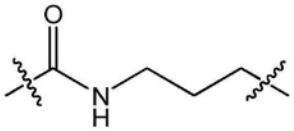
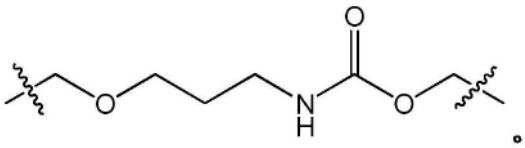
[0192] 在不同的实施方案中,对于L^1的至少一次出现时,L^1-M具有以下结构：

[0193] 

[0194] 其中L^{1a}和L^{1b}各自独立地为任选的连接体。

[0195] 在前述各种实施方案中，L^{1a}或L^{1b}或二者不存在。在其它实施方案中，L^{1a}或L^{1b}或二者存在。

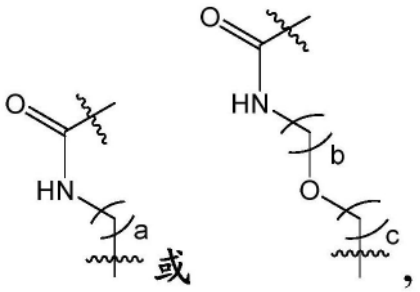
[0196] 在一些实施方案中，L^{1a}和L^{1b}，当存在时，各自独立地为亚烷基或杂亚烷基。例如，在一些实施方案中L^{1a}和L^{1b}，当存在时，独立地具有以下结构之一：

[0197]  ；  或  。

[0198] 在仍然其它不同的实施方案中，L^{1}在每次出现时独立地为任选的亚烷基或杂亚烷基连接体。

[0199] 在更多的实施方案中，L^{2}和L^{3}在每次出现时独立地为C_1-C_6亚烷基，C_2-C_6亚烯基或C_2-C_6亚炔基。

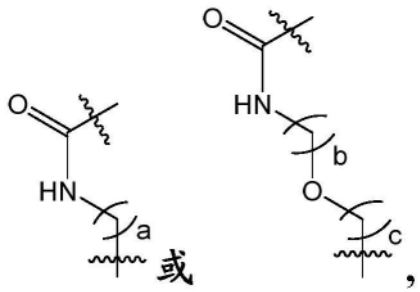
[0200] 在一些实施方案中，L^{1}至少一次出现时具有以下结构之一：

[0201]  ，

[0202] 其中

[0203] a，b和c各自独立地为1-6的整数。

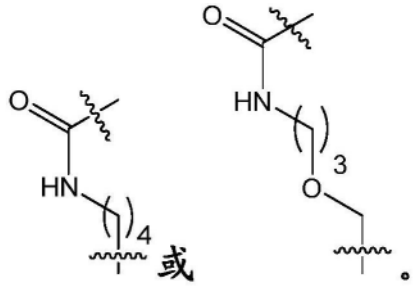
[0204] 在一些实施方案中，L^{1}每次出现时具有以下结构之一：

[0205]  ，

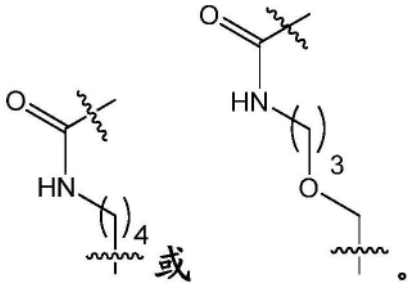
[0206] 其中

[0207] a，b和c各自独立地为1-6的整数。

[0208] 在一些实施方案中，L^{1}至少一次出现时具有以下结构之一：

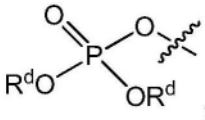
[0209] 

[0210] 在一些实施方案中,L^1每次出现时具有以下结构之一:

[0211] 

[0212] 在仍然其它实施方案中,

[0213] R^4在每次出现时独立地为OH、O^-或OR_d。应当理解"OR_d"和"SR_d"旨在是指与阳离子结合的O^-和S^-。例如磷酸根/酯基的基团的二钠盐可以表示为:

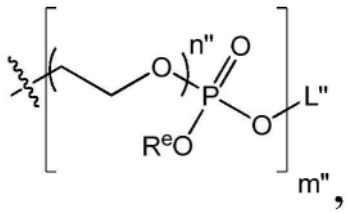
[0214] 

[0215] 其中R_a为钠(Na^+)。

[0216] 在其它实施方案中,R^5在每次出现时为氧代。

[0217] 在任何前述化合物的一些不同的实施方案中,R^1为H。

[0218] 在其它多个实施方案中,R^2和R^3各自独立地为OH或-OP(=R_a)(R_b)R_c。在某些不同的实施方案中,R^2或R^3为OH或-OP(=R_a)(R_b)R_c,和R^2或R^3的另一个为Q或包含连接至Q的共价键的连接体。在一些实施方案中,R^2和R^3各自独立地为-OP(=R_a)(R_b)R_c。在一些特定的实施方案中,R_c为OL′。在那些实施方案的一些中,L′为连接至Q、靶向部分、分析物分子、固体载体、固体载体基团、核苷或结构(I)的其它化合物或结构(II)的其它化合物的杂亚烷基连接体。在一些实施方案中,L′包含环氧烷或磷酸二酯部分,或其组合。在某些实施方案中,L′具有以下结构:

[0219] 

[0220] 其中:

[0221] m″和n″独立地为1-10的整数;

[0222] R^e为H、电子对或平衡离子;

[0223] L″为R^e或连接至Q、靶向部分、分析物分子、固体载体、固体载体基团、核苷或结构(I)的其它化合物或结构(II)的其它化合物的直接键或键接。

[0224] 在仍然其它实施方案中,Q在每次出现时独立地为包含反应性基团的部分,所述反应性基团能够与分析物分子或固体载体形成共价键。在其它实施方案中,Q在每次出现时独立地为包含反应性基团的部分,所述反应性基团能够与互补反应性基团Q′形成共价键。例如,在一些实施方案中,Q′存在于结构(I)或结构(II)的其它化合物上(例如在R^2或R^3位置),和Q和Q′包含互补反应性基团使得结构(I)或结构(II)化合物与结构(I)或结构(II)的其它化合物反应产生结构(I)或结构(II)的化合物的共价连接二聚体。结构(I)或结构(II)的多聚体化合物还可以以类似的方式制备并且包括在本发明的实施方案的范围内。

[0225] Q基团的类型和Q基团与结构(I)或结构(II)化合物其余部分的连接性是不受特别限制的,条件是Q包含具有适当反应性的部分以形成所希望的键。

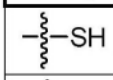
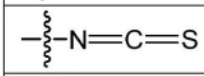
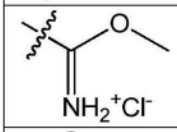
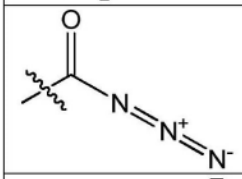
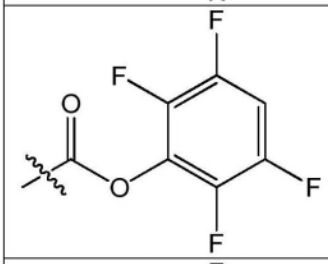
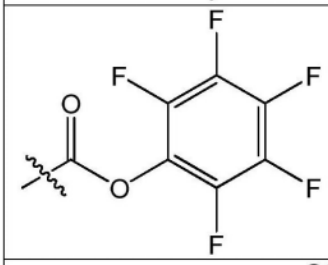
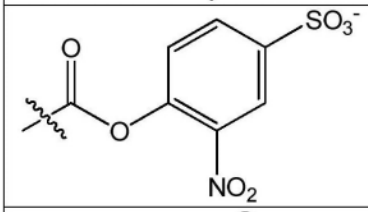
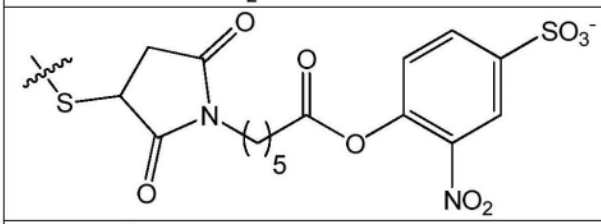
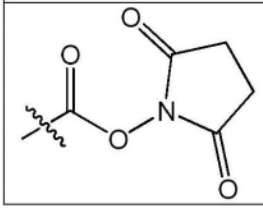
[0226] 在某些实施方案中,Q是在含水条件下不易水解的部分,但具有充足反应性以与分析物分子或固体载体上的相应基团成键(例如胺,叠氮化物或炔)。

[0227] 结构(I)和/或结构(II)化合物的某些实施方案包含一般用于生物共轭领域的Q基团。例如在某些实施方案中,Q包含亲核反应性基团,亲电反应性基团或环加成反应性基团。在某些更具体的实施方案中,Q包含氢硫基,二硫基,活化酯基,异硫氰酸酯基,叠氮基,炔基,烯基,二烯基,亲二烯基,酰卤基,磺酰卤基,膦基,α-卤代酰胺基,生物素,氨基或马来酰亚胺基的官能团。在一些实施方案中,活化酯基是N-琥珀酰亚胺酯基,亚氨酸酯基或多氟苯基酯基。在其它实施方案中,炔基是烷基叠氮基或酰基叠氮基。在一些实施方案中,Q包含马来酰亚胺基的官能团。

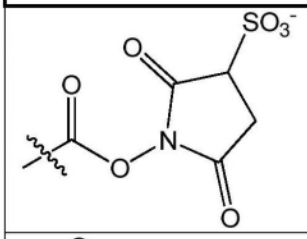
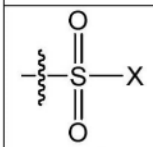
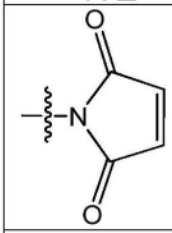
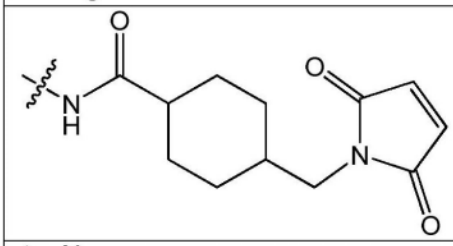
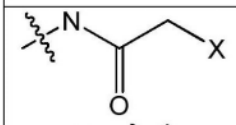
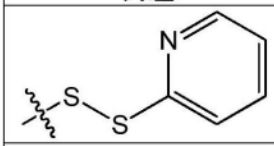
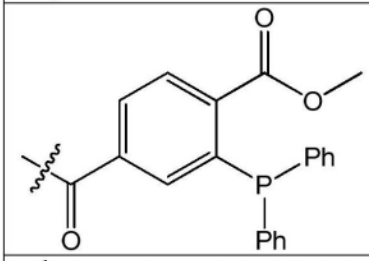
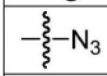
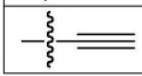
[0228] 示例性Q部分在以下表1中提供。

[0229] 表1.示例性Q部分

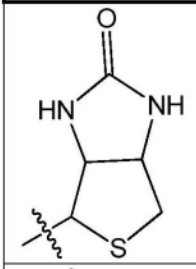
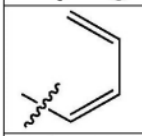
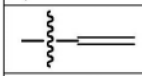
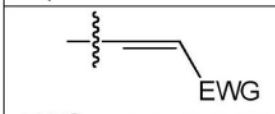
[0230]

结构	种类
	氢硫基
	异硫氰酸酯基
	酰亚胺酯基
	酰基叠氮基
	活化酯基
	活化酯基
	活化酯基
	活化酯基
	活化酯基

[0231]

结构	种类
	活化酯基
 X = 卤基	磺酰卤基
	马来酰亚胺基
	马来酰亚胺基
 X = 卤基	α-卤代酰亚胺基
	二硫基
	膦基
	叠氮基
	炔基

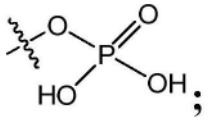
[0232]

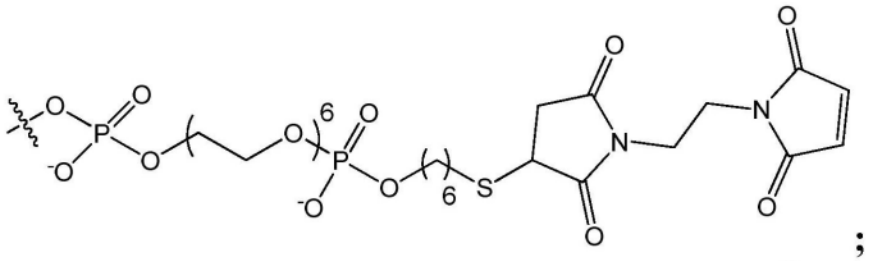
结构	种类
	生物素
	二烯基
	烯烃基/亲二烯基
 EWG = 吸电子基团	烯烃基/亲二烯基
$-NH_2$	氨基

[0233] 应注意在Q是SH的一些实施方案中,所述SH部分将倾向于与结构(I)或结构(II)的另一化合物的另一氢硫基形成二硫键。相应地,某些实施方案包括结构(I)化合物,其呈二硫化物二聚体形式,所述二硫键衍生自SH Q基团。其它实施方案包括结构(II)的化合物,其以二硫化物二聚体的形式,二硫键衍生自SHQ基团。

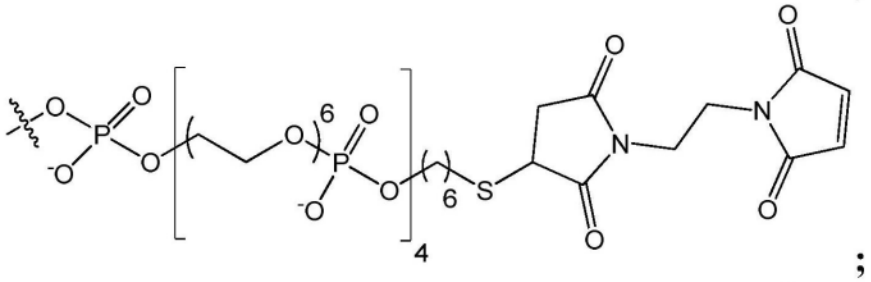
[0234] 在某些其它实施方案中,R^2或R^3之一为OH或-OP(=R_a)(R_b)R_c,和R^2或R^3的另一个为包含连接至分析物分子的共价键的连接体或包含连接至固体载体的共价键的连接体。例如,在一些实施方案中,分析物分子为核酸、氨基酸或其聚合物。在其它实施方案中,分析物分子是酶、受体、受体配体、抗体、糖蛋白、适体或病毒。在仍然不同的实施方案中,固体载体是聚合物珠或非聚合物珠。在一些实施方案中,靶向部分为抗体或细胞表面受体拮抗剂。

[0235] 在某些特定的实施方案中,R^2或R^3具有下述结构之一:

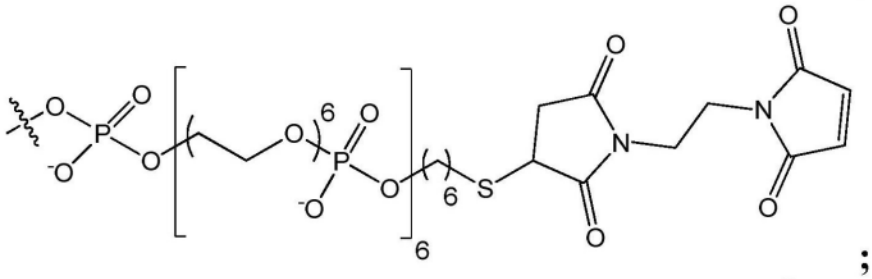
[0236] ;



;

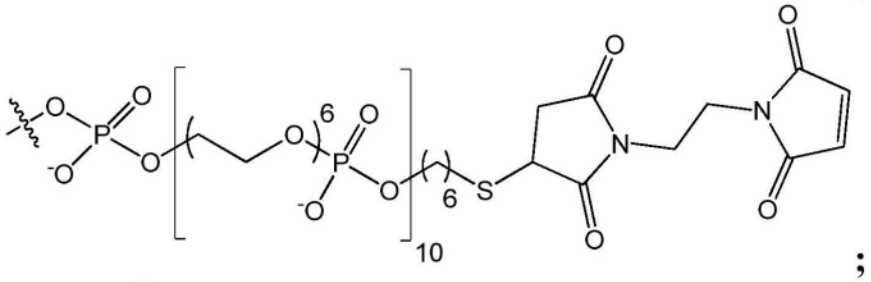


;

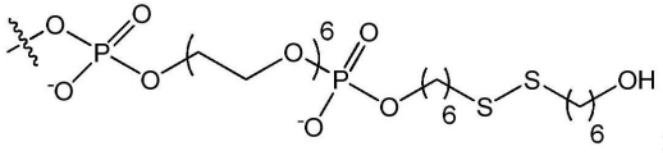


;

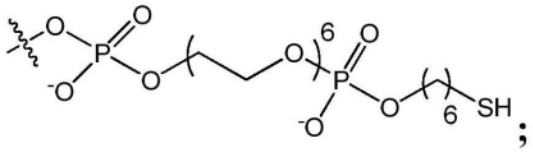
[0237]



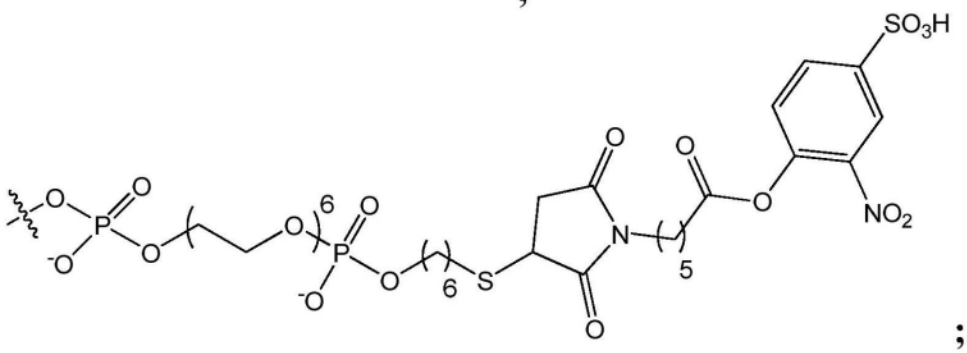
;



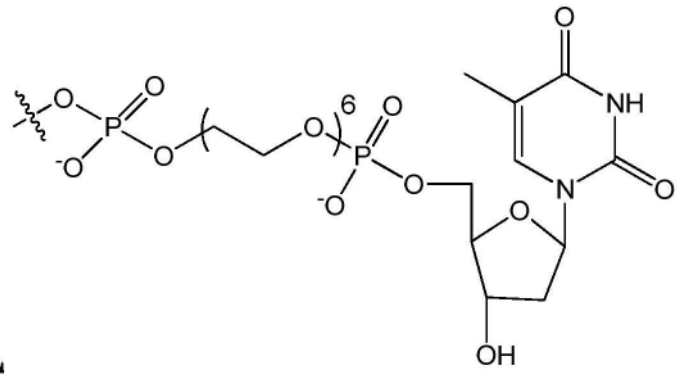
;



;



;

[0238] 

或 。

[0239] m的值是可以基于生色团之间的所需距离、荧光和/或颜色强度选择的另一个变量。在一些实施方案中,m在每次出现时独立地为1-10的整数。在其它实施方案中,m在每次出现时独立地为1-5的整数,例如1,2,3,4或5。

[0240] 荧光强度也可以通过选择不同的n值来调节。在某些实施方案中,n是1至100的整数。在其它实施方案中,n是1至10的整数。

[0241] 基于所需的光学特性,例如基于所需的斯托克频移、吸收/发射重叠,特定的颜色和/或荧光发射波长选择M^1和M^2。在一些实施方案中,M^1(或替代地M^2)在每次出现时相同,然而,重要的是注意M^1或M^2在每次出现时不需要分别是相同的M^1或M^2。某些实施方案包括其中M^1在每次出现时不相同的化合物。某些实施方案包括其中M^2在每次出现时不相同的化合物。

[0242] 在一些实施方案中,选择M^1和M^2具有吸收和/或发射特性以用于FRET方法。例如,在这样的实施方案中,选择不同的M^1和M^2部分,使得M^1具有在一个波长处的辐射吸收,其通过FRET机制引起由M^2在不同波长处的辐射发射。示例性的M^1和M^2部分可以由本领域普通技术人员基于所需的最终用途适当地选择。

[0243] 各个M^1和M^2可以从M^1或M^2上的任何位置(也即原子)连接至分子其余部分。本领域技术人员将认识到将M^1或M^2连接至分子其余部分的手段。示例性方法包括本文描述的"点击"反应。

[0244] 在一些实施方案中,M^1或M^2为FRET、荧光或着色部分。可以使用任何荧光的和/或着色的部分以形成FRET给体-受体对,例如可以使用本领域已知的那些和在比色、UV和/或荧光测试中一般使用的那些。在一些实施方案中,M^1或M^2或二者在每次出现时独立地为荧光的或着色的。在本发明各种实施方案中有用的M^1或M^2部分的实例包括但不限于:呫吨衍生物(例如荧光素,罗丹明,Oregon绿,曙红或Texas红);菁蓝衍生物(例如菁蓝,靛青,氧杂羰花青,硫杂羰花青或部花青);方酸(squaraine)衍生物和环取代的方酸,包括Seta、SeTau和方形染料;萘衍生物(例如丹磺酰和prodan衍生物);香豆素衍生物;噁二唑衍生物(例如吡啶基噁唑,硝基苯并噁二唑或苯并噁二唑);蒽衍生物(例如蒽醌,包括DRAQ5、DRAQ7和CyTRAK橙);芘衍生物比如级联蓝;噁嗪衍生物(例如Nile红,Nile蓝,甲酚基紫,噁嗪170);吖啶衍生物(例如原黄素,吖啶橙,吖啶黄);芳基次甲基衍生物:金胺,晶紫,孔雀绿;和四吡咯衍生物(例如卟吩,酞菁或胆红素)。其它示例性M部分包括:菁类染料,黄原酸根/酯基染料(例如Hex,Vic,Nedd,Joe或Tet);Yakima黄;Redmond红;tamra;texas红和alexa **fluor®**染料。

[0245] 在任何前述的其它实施方案中,M^1或M^2或二者在每次出现时独立地包含三个或更多个芳基或杂芳基环或其组合,例如四个或更多个芳基或杂芳基环或其组合,或甚至五个或更多个芳基环或杂芳基环或其组合。在一些实施方案中,M^1或M^2或二者在每次出现时独立

地包含六个芳基或杂芳基环或其组合。在其它实施方案中,环是稠合的。例如在一些实施方案中,M^1或M^2或二者在每次出现时独立地包含三个或更多个稠环,四个或更多个稠环,五个或更多个稠环,或甚至六个或更多个稠环。

[0246] 在一些实施方案中,M^1或M^2或二者是环状的。例如,在一些实施方案中,M^1或M^2或二者是碳环。在其它实施方案中,M^1或M^2或二者是杂环。在前述的其它实施方案中,M^1或M^2或二者在每次出现时独立地包含芳基部分。在这些实施方案的某些中,芳基部分是多环的。在其它更具体的实例中,芳基部分是稠合多环芳基部分,例如其可以包含至少3个、至少4个或甚至大于4个芳基环。

[0247] 在任何前述结构(I)、(II)、(IA)、(IB)、(IC)、(ID)或(IE)的化合物的其它实施方案中,M^1或M^2或二者在每次出现时独立地包含至少一个杂原子。例如,在一些实施方案中,杂原子是氮、氧或硫。

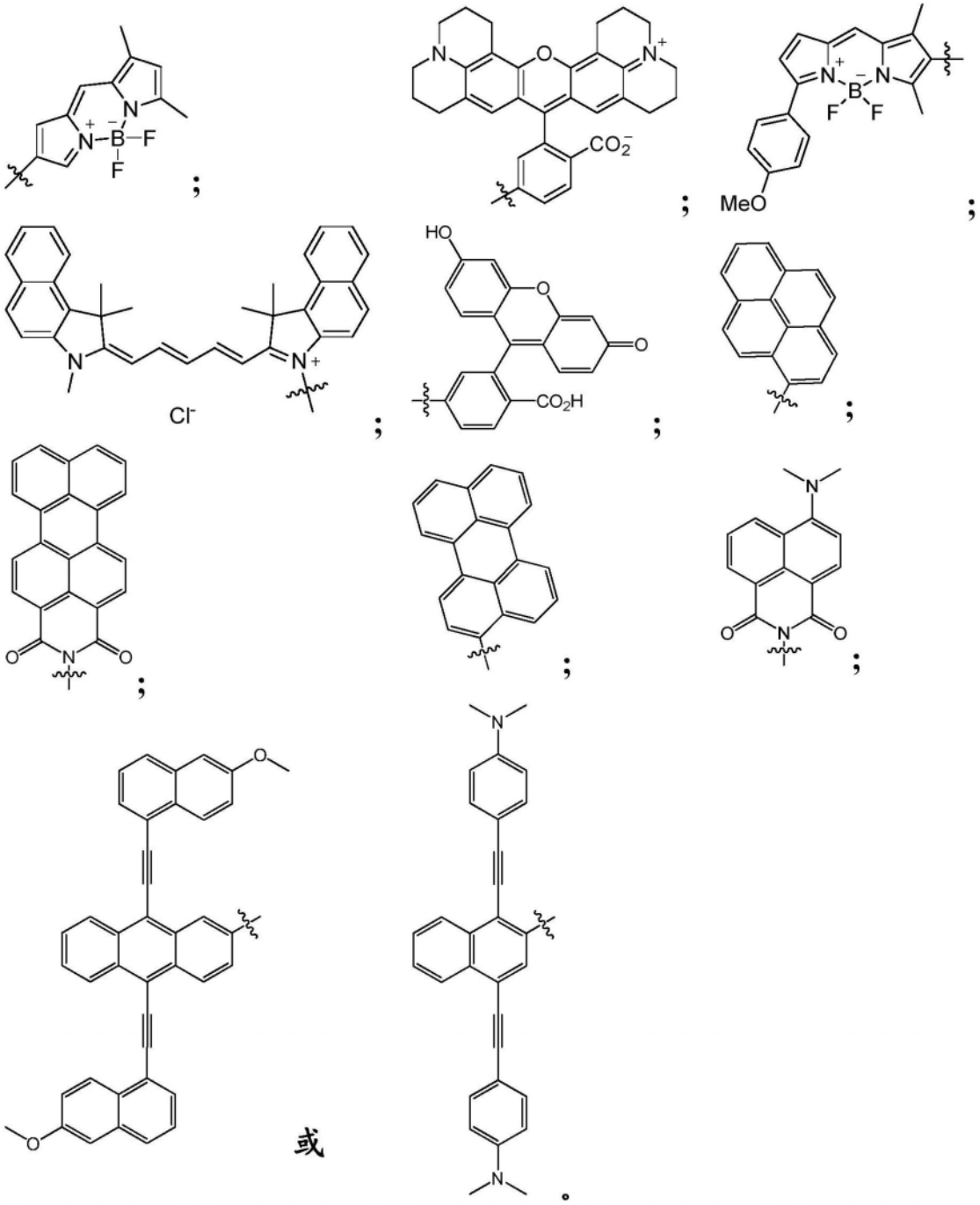
[0248] 在任何前述的更多实施方案中,M^1或M^2或二者在每次出现时独立地包含至少一个取代基。例如,在某些实施方案中所述取代基是氟基,氯基,溴基,碘基,氨基,烷基氨基,芳基氨基,羟基,氢硫基,烷氧基,芳氧基,苯基,芳基,甲基,乙基,丙基,丁基,异丙基,叔丁基,羧基,磺酸根/酯基的基,酰胺基,或甲酰基。

[0249] 在前述的某些甚至更具体的实施方案中,M^1或M^2或二者在每次出现时独立地为二甲基氨基芘,喹吖啶酮,氟苯基-二甲基-BODIPY,his-氟苯基-BODIPY,吖啶,骈三萘(terrylene),联六苯,卟啉,苯并芘,(氟苯基-二甲基-二氟硼杂-二氮杂-引达省)苯基,(双-氟苯基-二氟硼杂-二氮杂-引达省)苯基,四联苯,二联苯并噻唑,三联苯并噻唑,联萘,联蒽,方酸,方酸鎓,9,10-乙炔基蒽或三联萘的基团。在其它实施方案中,M^1或M^2或二者是对三联苯,芘,偶氮苯,吩嗪,菲咯啉,吖啶,噻吨,、红荧烯,蒀,菁蓝,芘酰亚胺,或芘酰胺或其衍生物。在还更多实施方案中,M^1或M^2或二者在每次出现时独立地为香豆素染料,试卤灵染料,二吡咯甲烯硼二氟化物染料,钌联吡啶染料,能量转移染料,噻唑橙染料,聚甲炔染料或N-芳基-1,8-萘二甲酰亚胺染料。在某些实施方案中,M^1和M^2在每次出现时独立地为硼-二吡咯亚甲基、若丹明、花青、芘、芘、芘单酰亚胺或6-FAM或其衍生物。

[0250] 在任何前述仍然更多实施方案中,M^1在每次出现时相同。在其它实施方案中,各个M^1不同。在仍然更多实施方案中,一个或多个M^1相同和一个或多个M^1不同。

[0251] 在任何前述仍然更多实施方案中,M^2在每次出现时相同。在其它实施方案中,各个M^2不同。在仍然更多实施方案中,一个或多个M^2相同和一个或多个M^2不同。

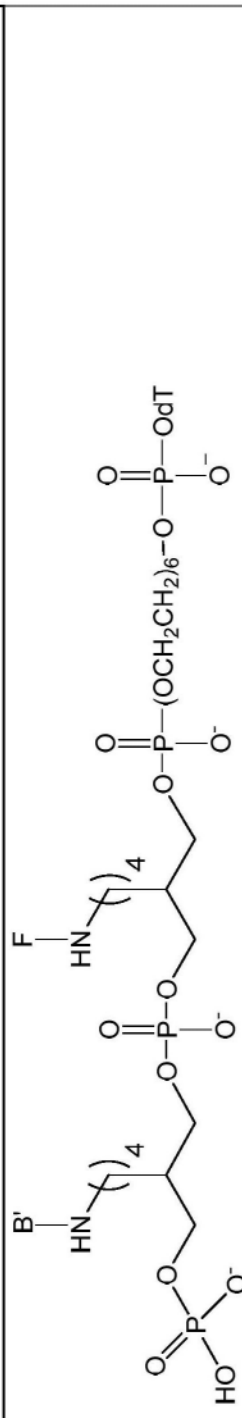
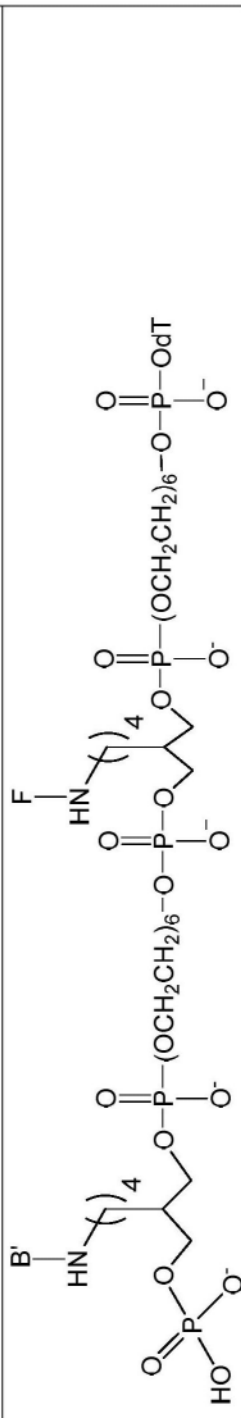
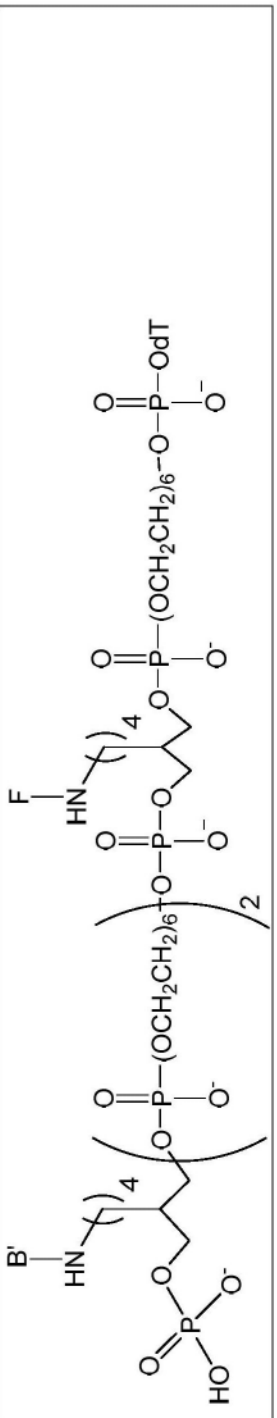
[0252] 在一些实施方案中,M^1或M^2或二者在每次出现时独立地为硼-二吡咯亚甲基、若丹明、花青、芘、芘、芘单酰亚胺或6-FAM或其衍生物。在一些其它实施方案中,M^1和M^2在每次出现时独立地具有以下结构之一:

[0253] 

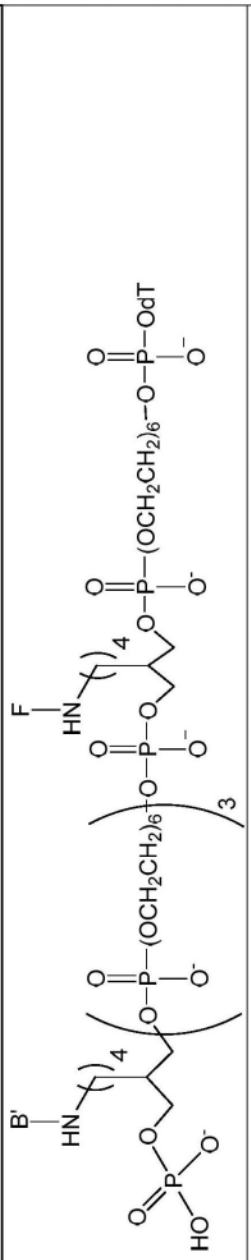
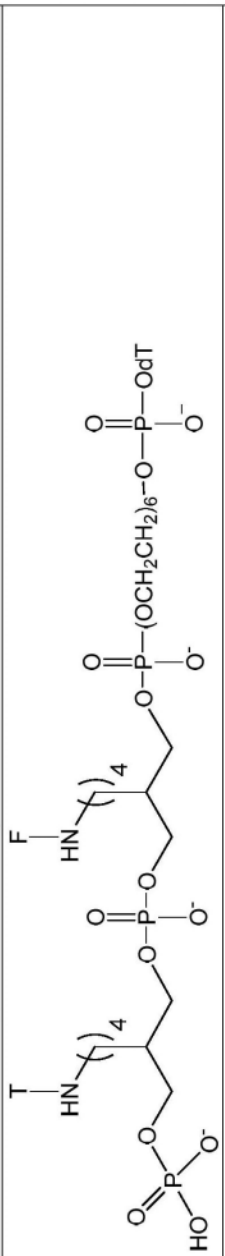
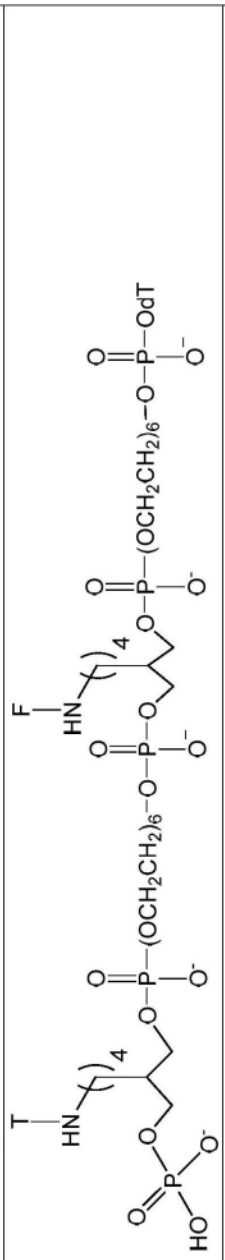
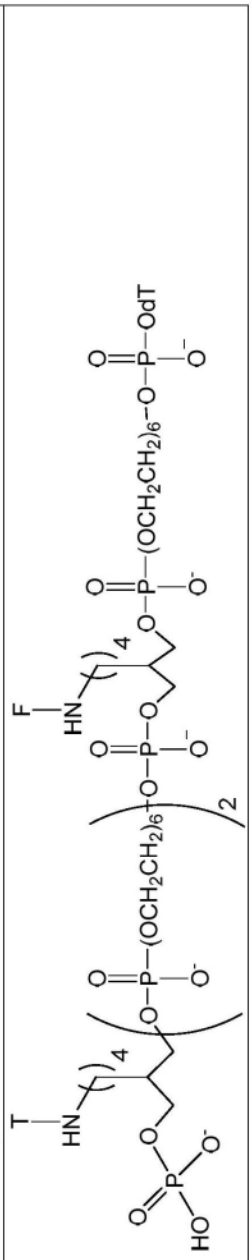
[0254] 在某些特定的实施方案中,该化合物为选自表2的化合物。在其它特定的实施方案,该化合物为选自表3的化合物。表2和3中的化合物根据实施例中列举的步骤制备并且它们的身份通过质谱法得以确认。

[0255]

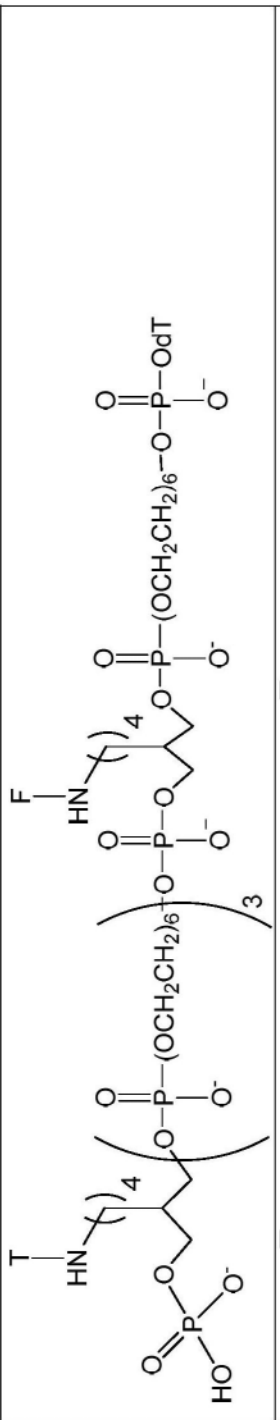
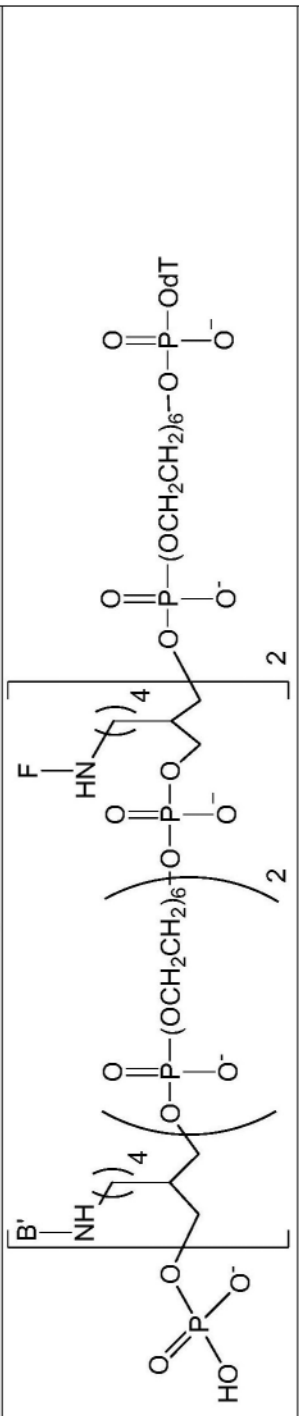
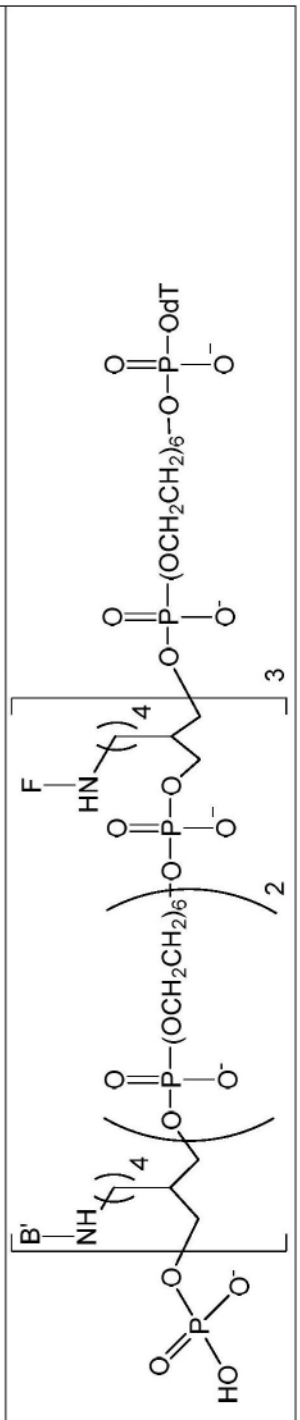
表 2.结构 I 的示例性化合物

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-1	2049.9 2049.3	
I-2	2394.1 2393.6	
I-3	2738.3 2737.9	

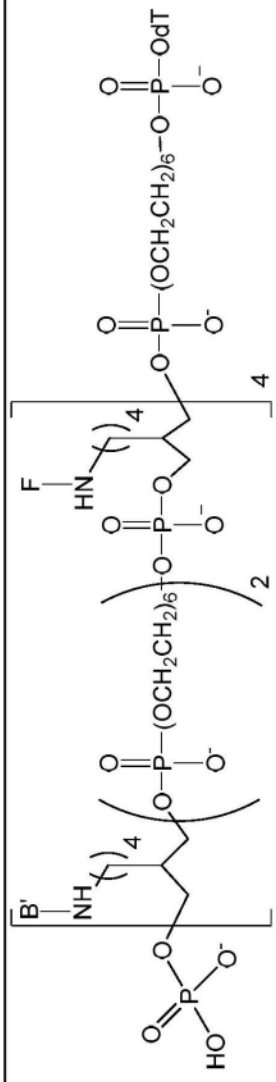
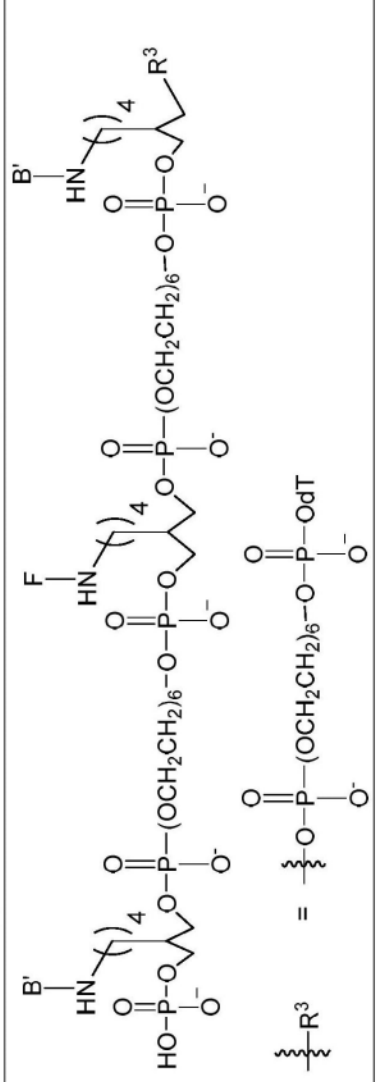
[0256]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-4	3082.4 3084.0	
I-5	2258.3 2260.2	
I-6	2602.7 2604.5	
I-7	2947.3 2948.8	

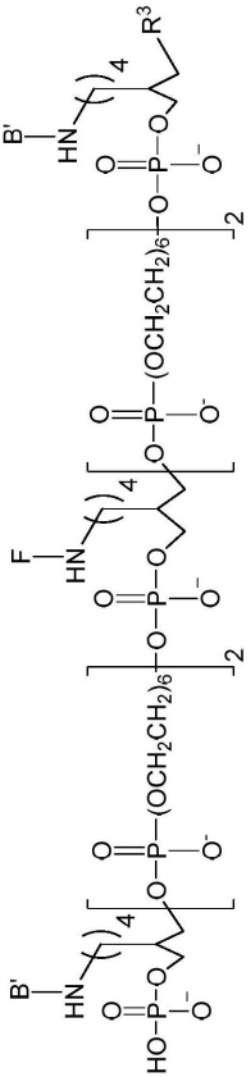
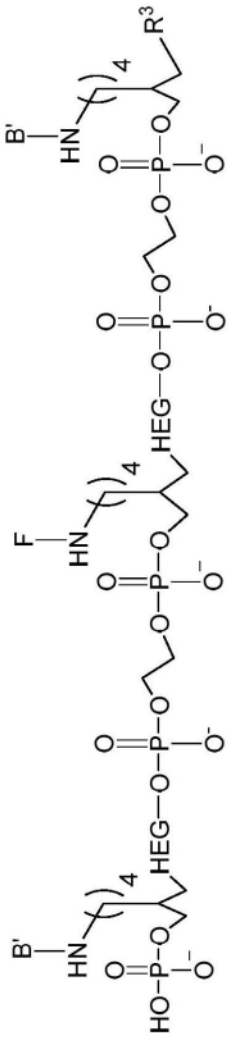
[0257]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-8	3291.7 3293.1	
I-9	5578.9 5578.5	
I-10	8420.7 8418.9	

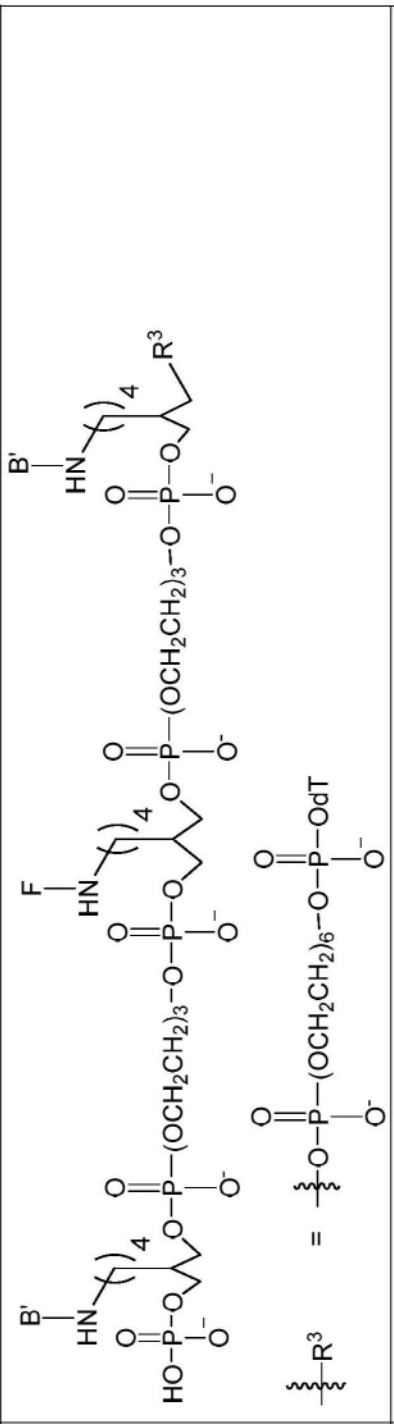
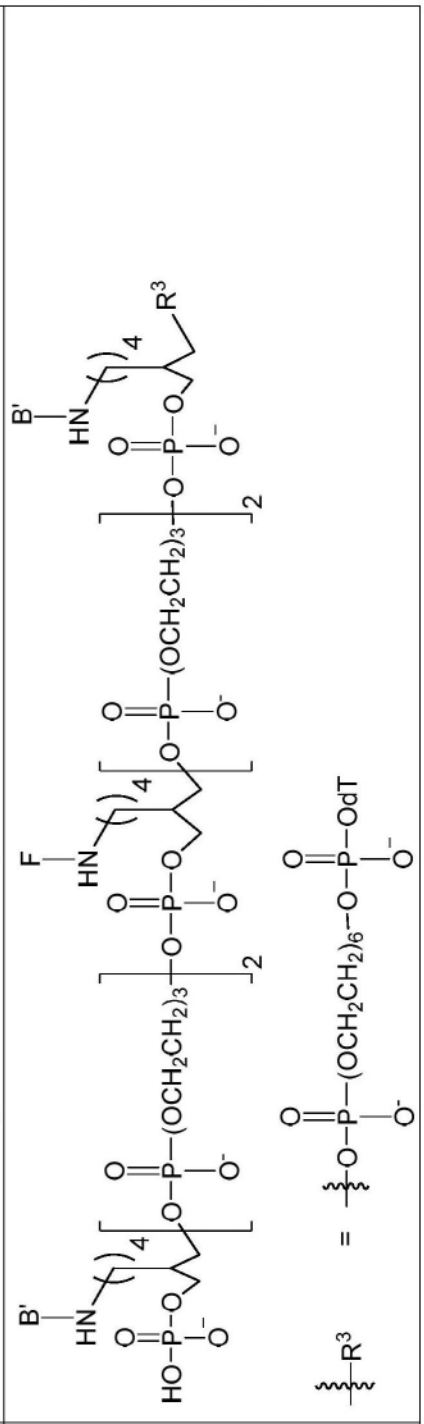
[0258]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-11	11260.4 11259.2	
I-12	14102.4 14009.5	
I-13	3634.2 3633.8	

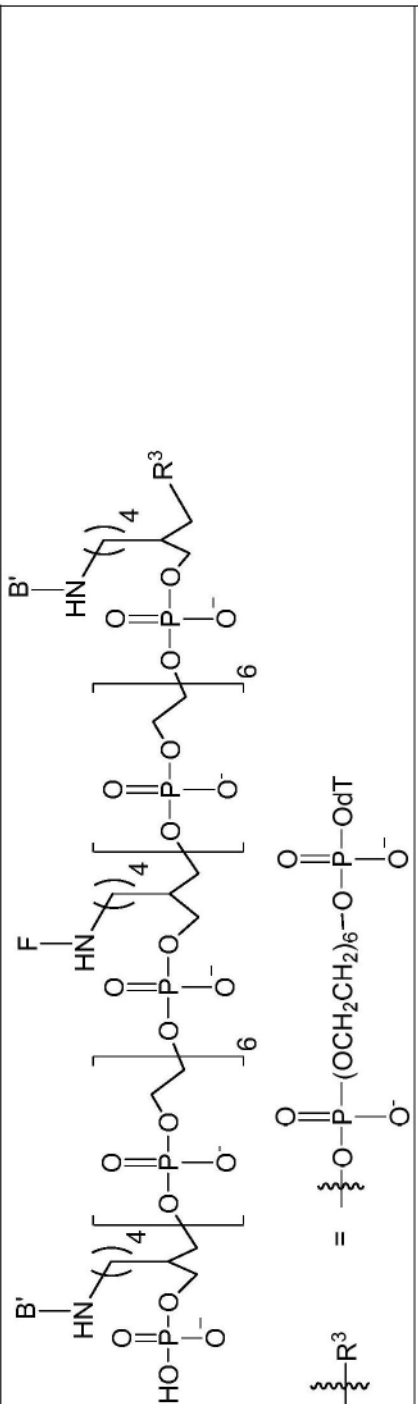
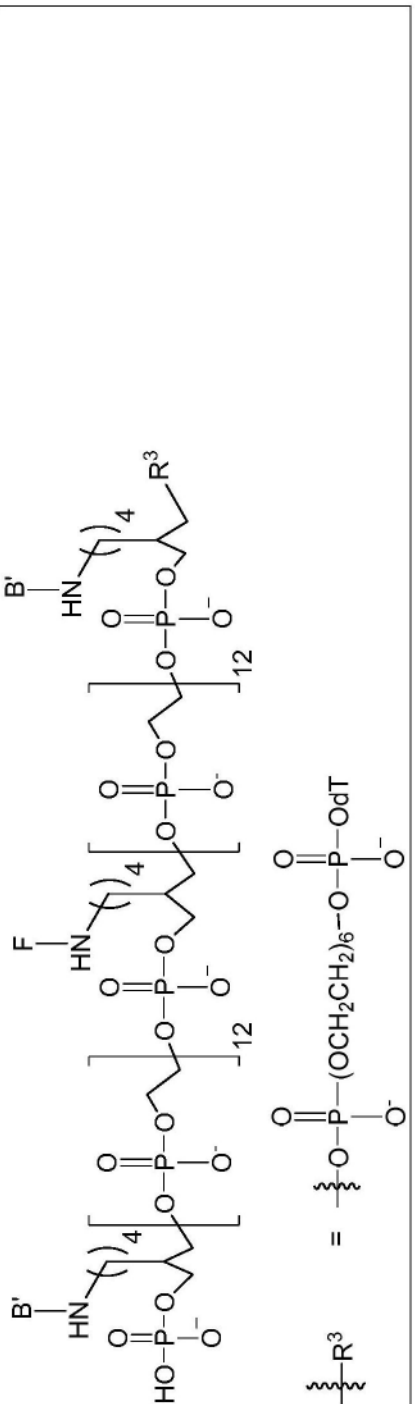
[0259]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-14	4322.7 4322.4	
I-15	3882.3 3881.9	

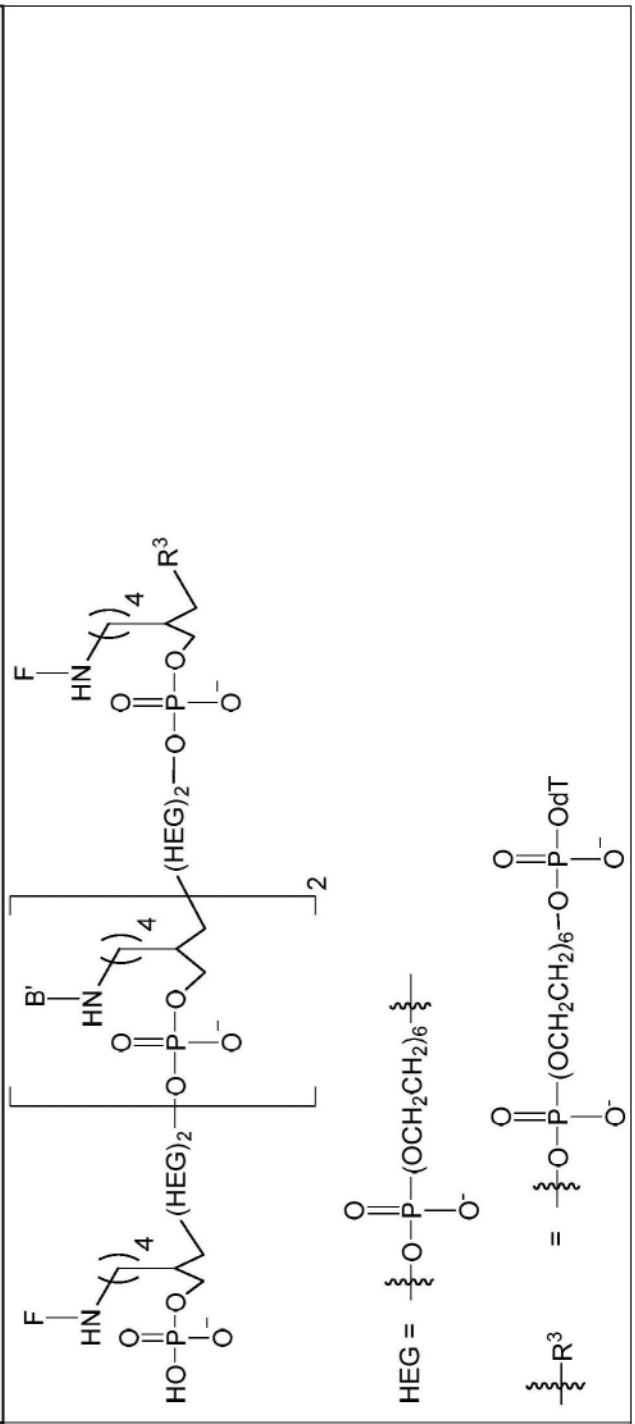
[0260]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-16	3369.6 3369.5	
I-17	3794.2 3793.8	

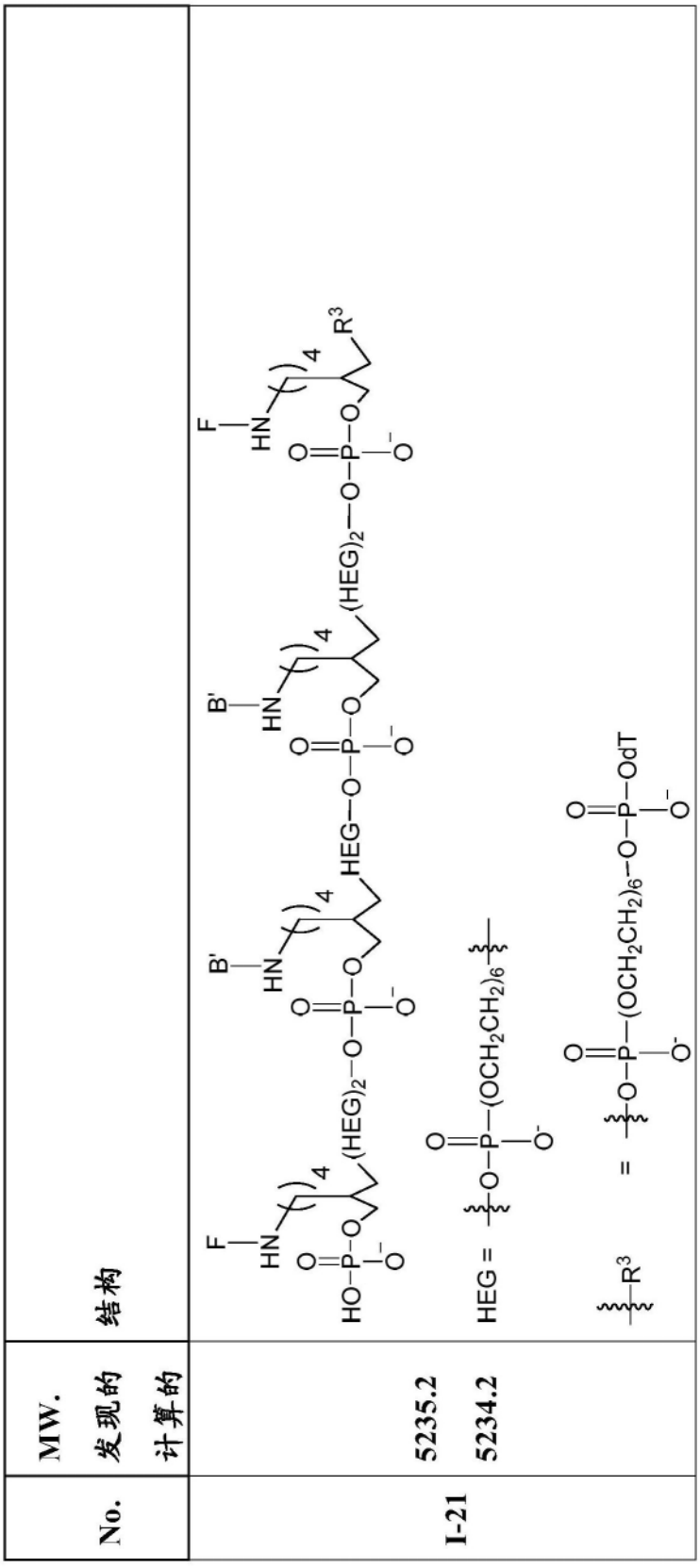
[0261]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-18	3305.9 3305.5	
I-19	3666.4 3665.8	

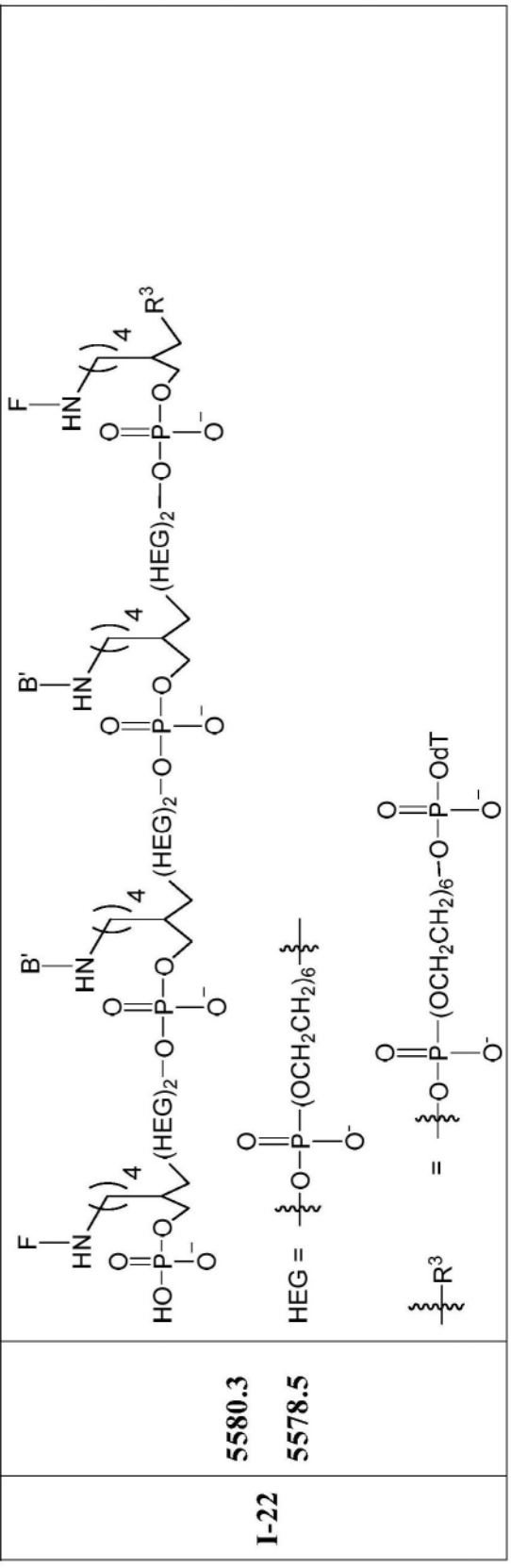
[0262]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-20	4891.3 4889.9	

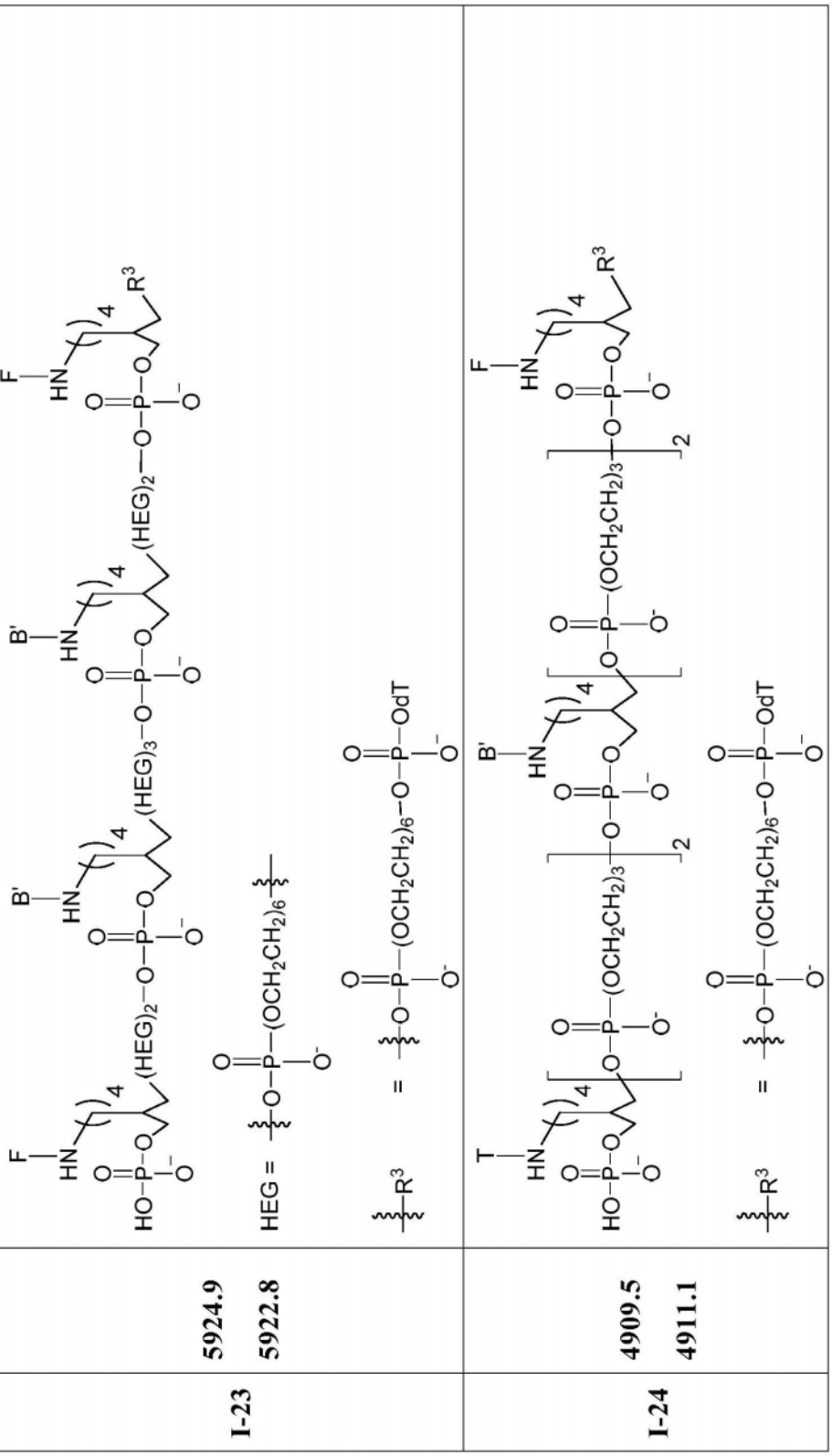
[0263]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-21	5235.2 5234.2	

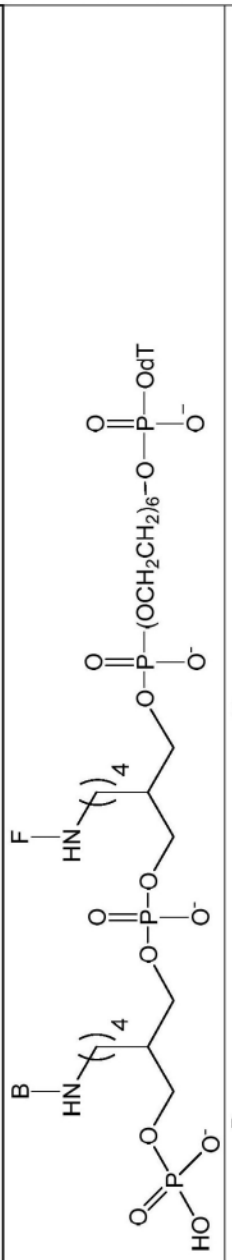
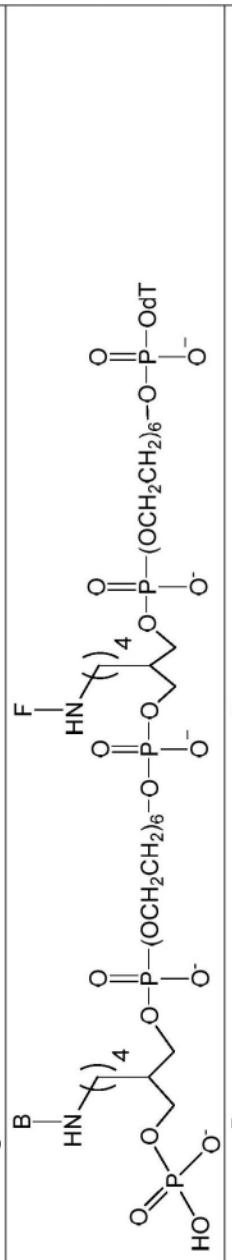
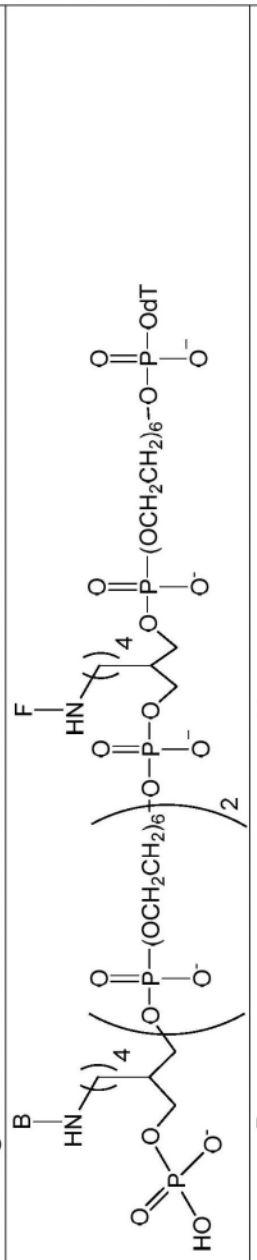
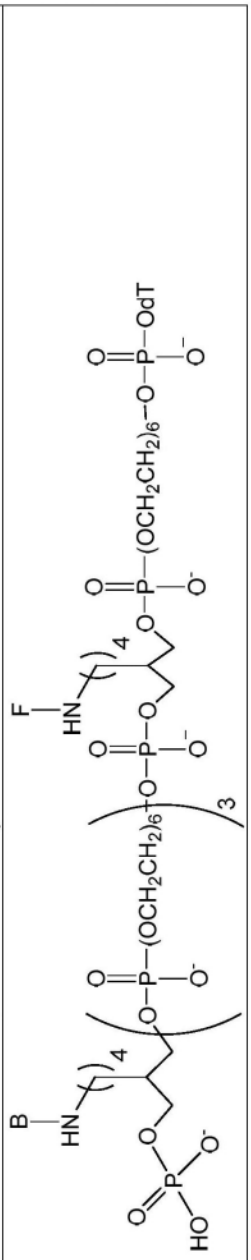
[0264]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-22	5580.3 5578.5	

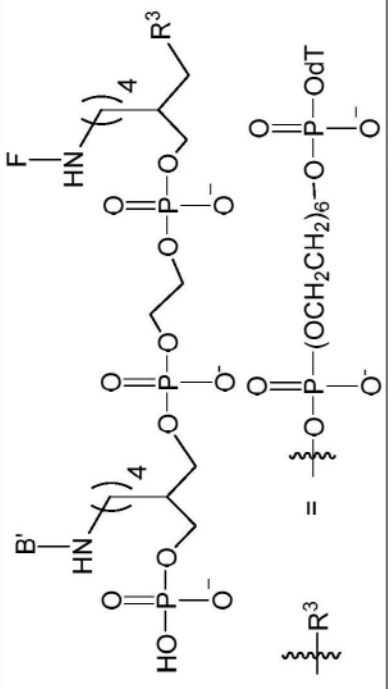
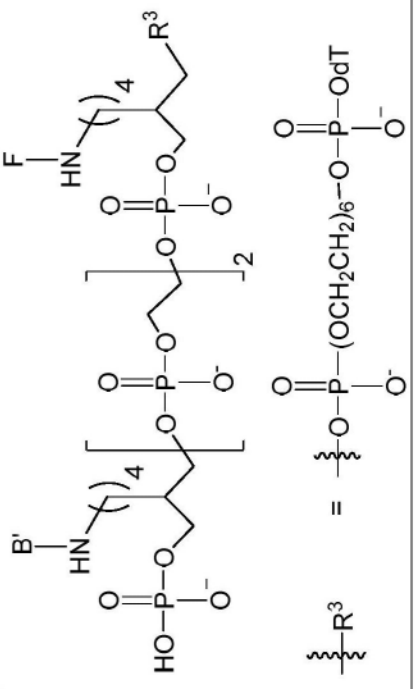
[0265]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-23	5924.9 5922.8	
I-24	4909.5 4911.1	

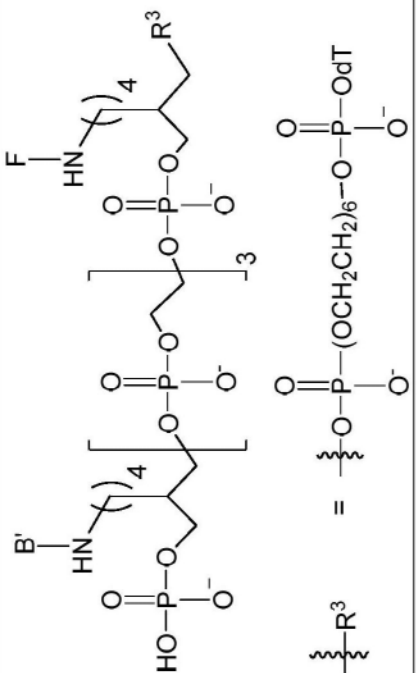
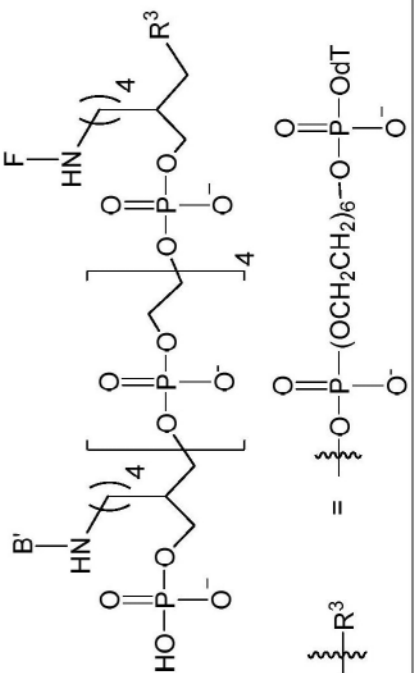
[0266]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-25	1858.2 1858.5	
I-26	2202.8 2202.8	
I-27	2546.7 2547.1	
I-28	2891.8 2891.4	

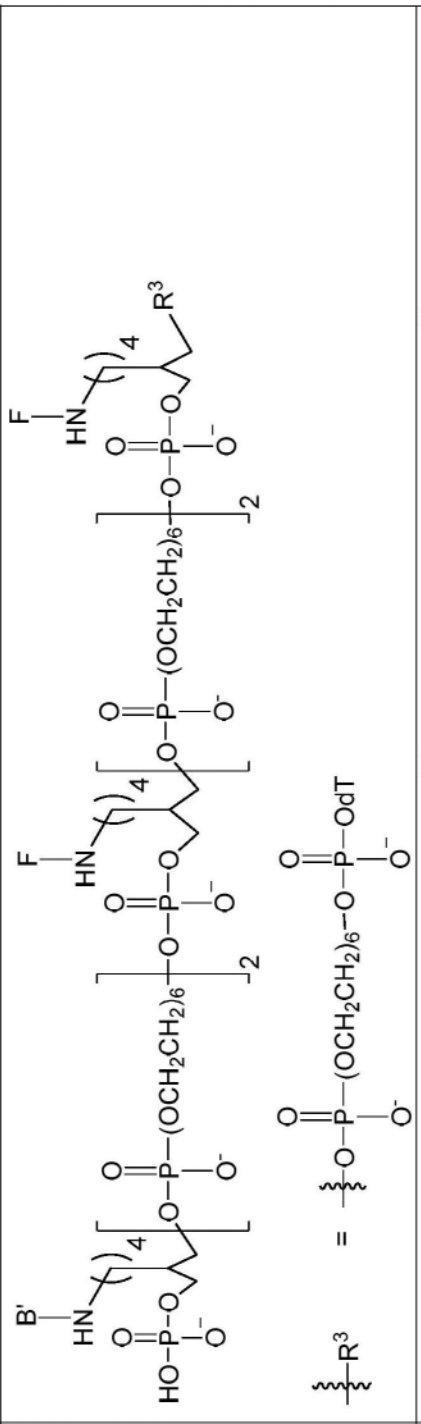
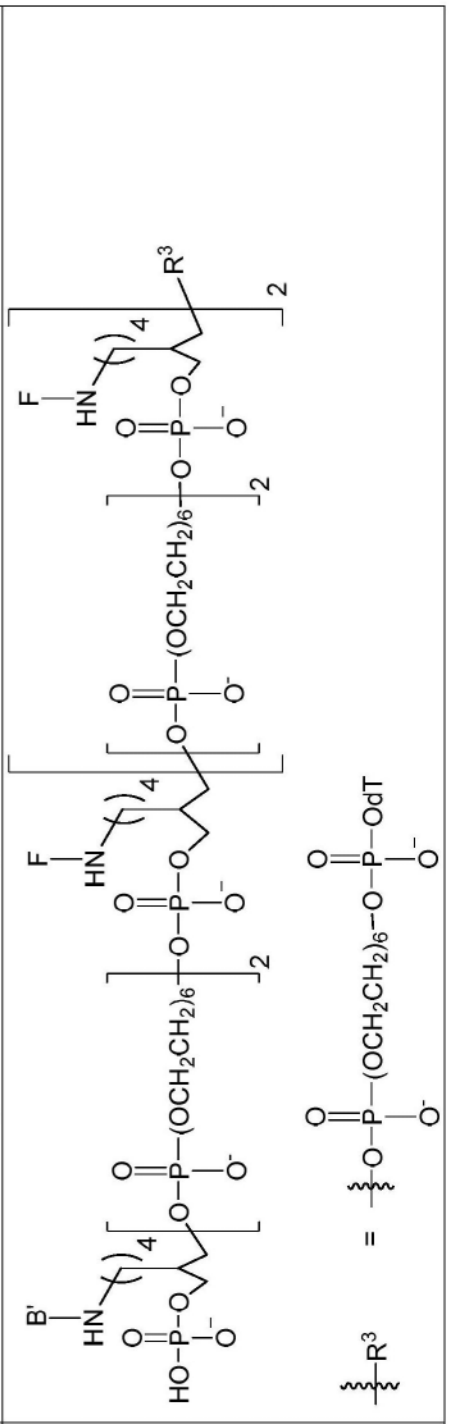
[0267]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-29	2173.8 2173.4	
I-30	2297.7 2297.4	

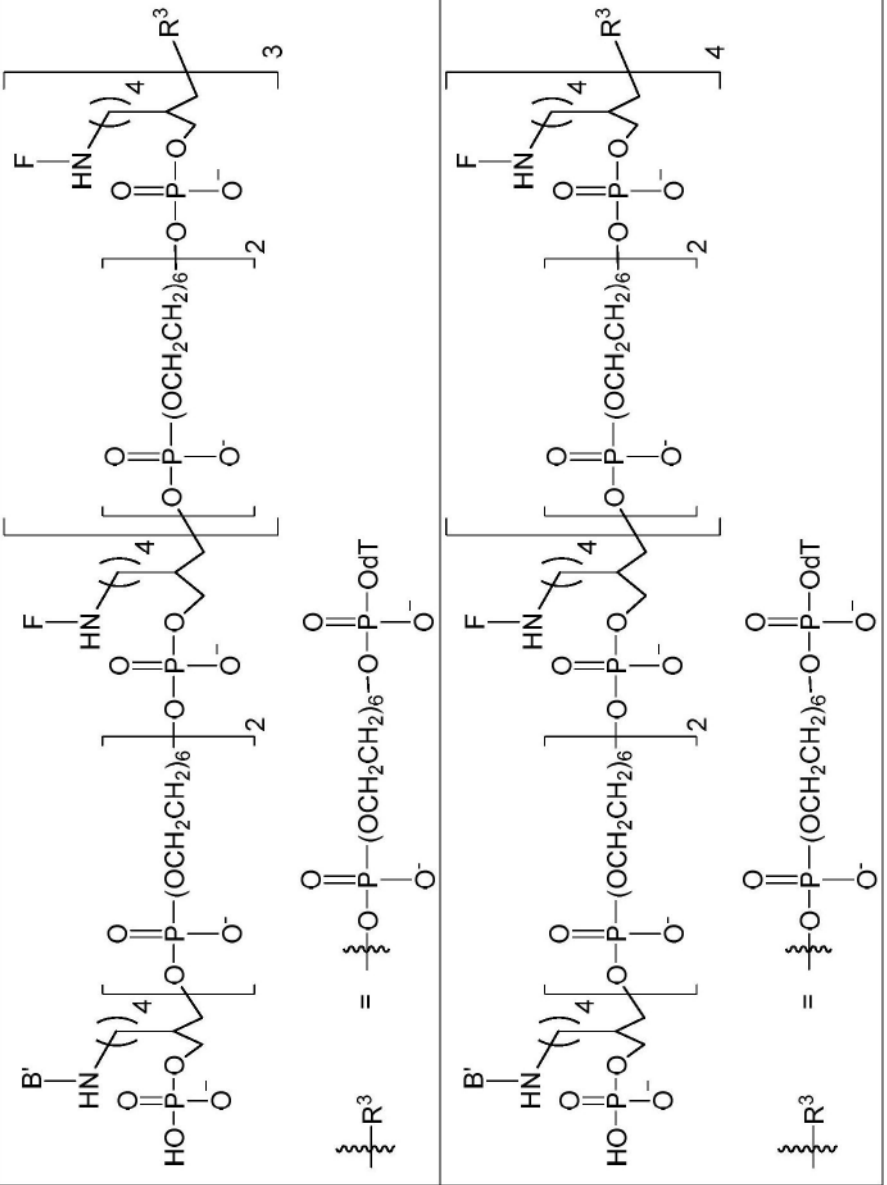
[0268]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-31	2421.6 2421.5	
I-32	2546.0 2545.5	

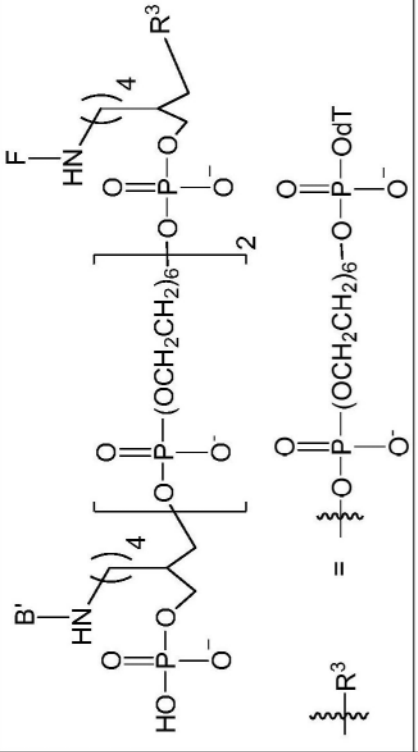
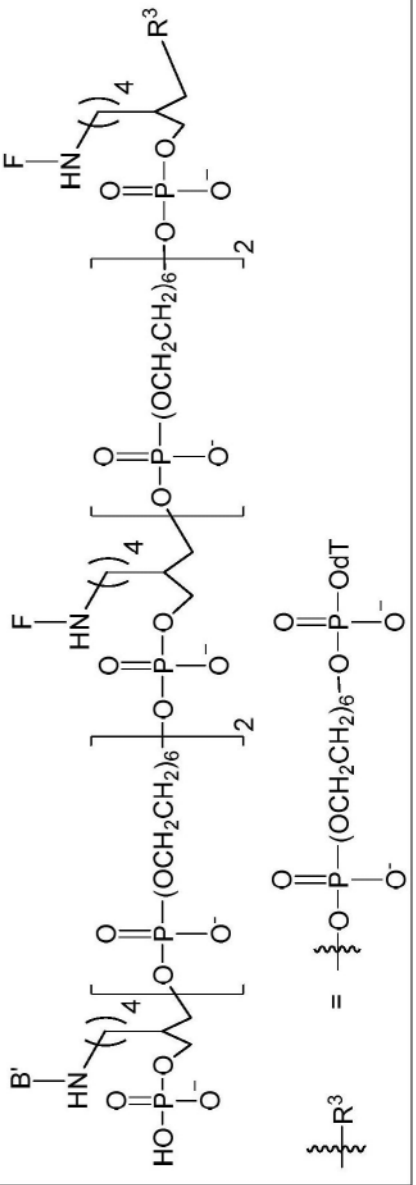
[0269]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-33	3994.9 3994.0	
I-34	5251.3 5250.1	

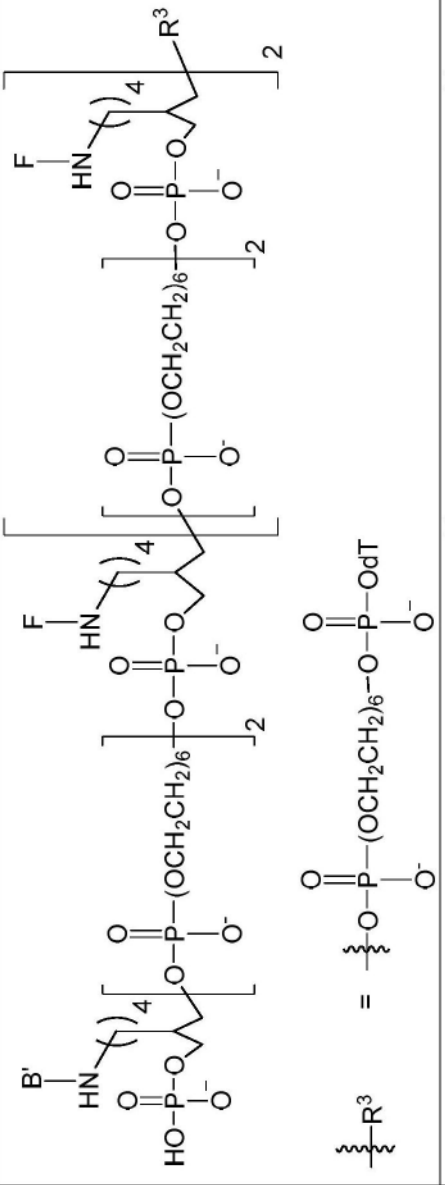
[0270]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-35	6508.2 6506.2	
I-36	7764.2 7762.3	

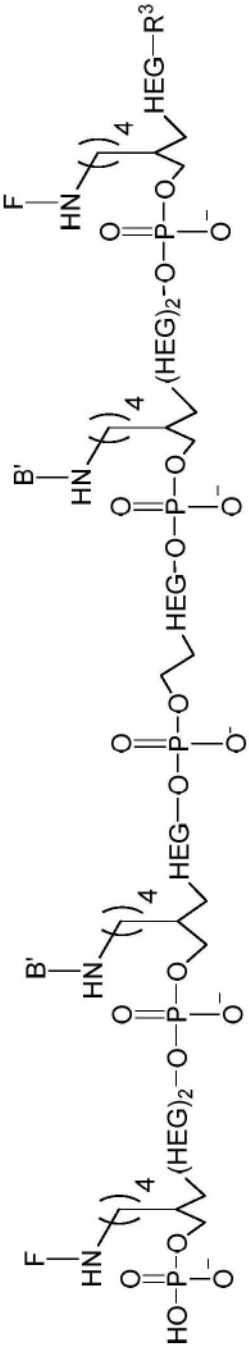
[0271]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-37	2489.3 2489.0	
I-38	3745.3 3745.1	

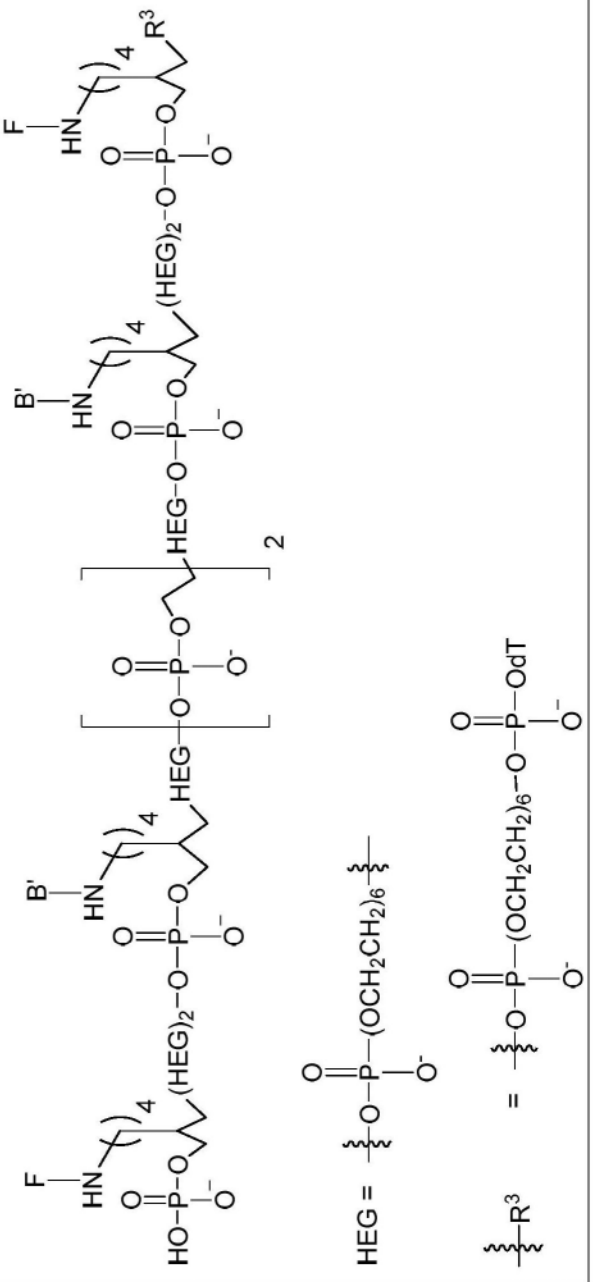
[0272]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-39	5002.3 5001.2	
I-40	6257.8 6257.3	

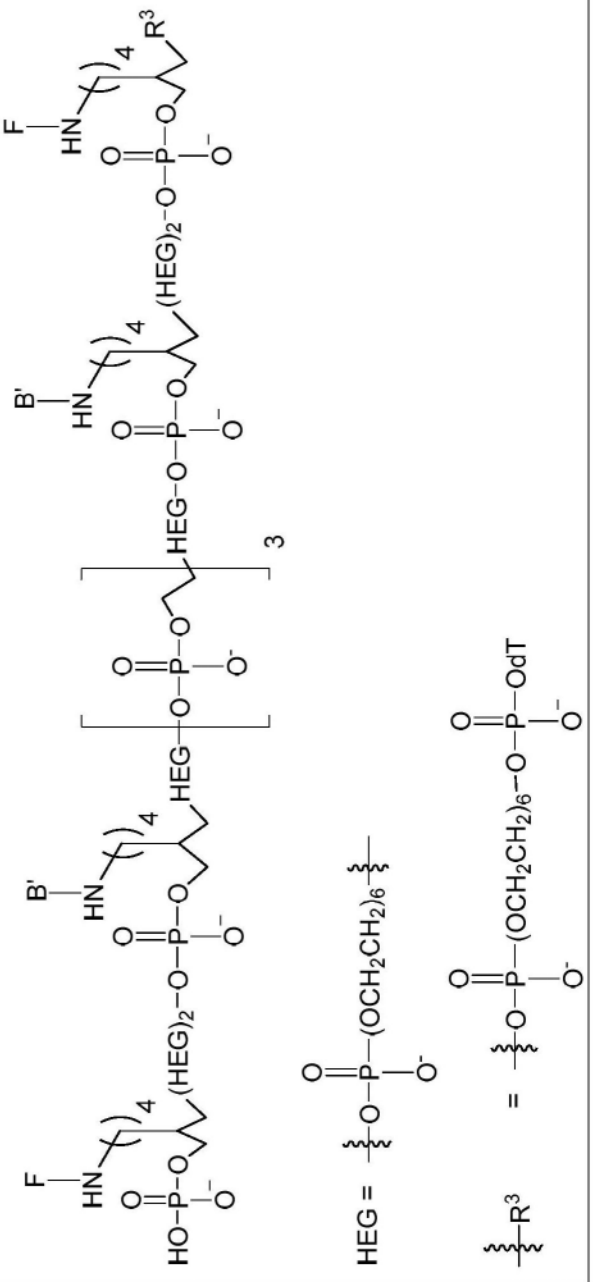
[0273]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-41	6048.1 6046.9	

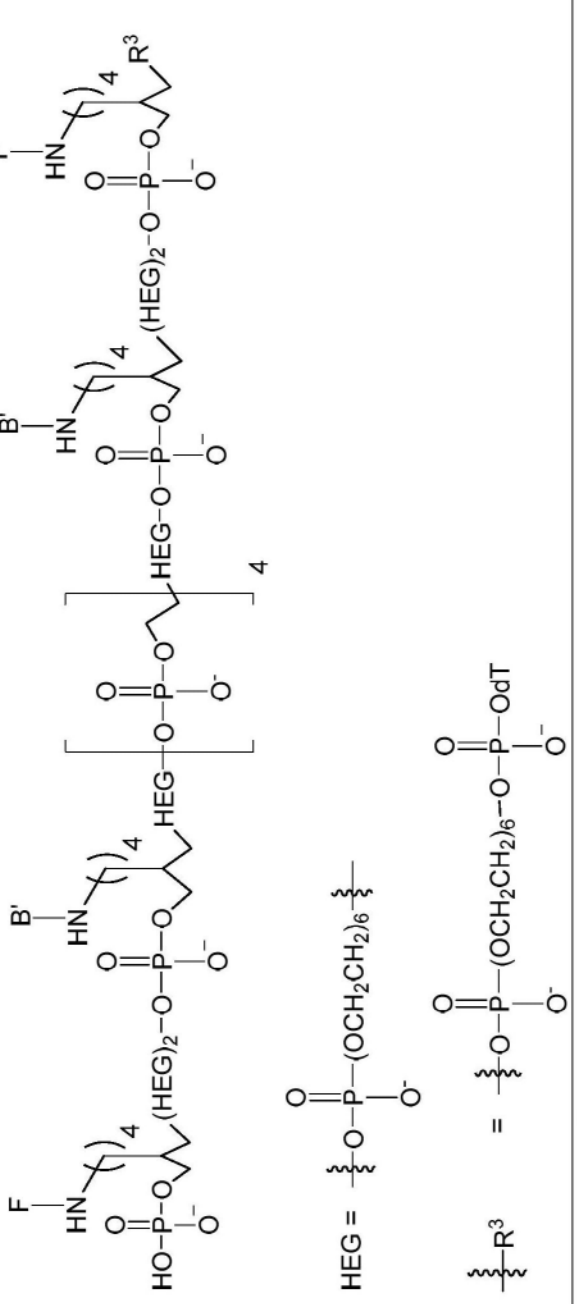
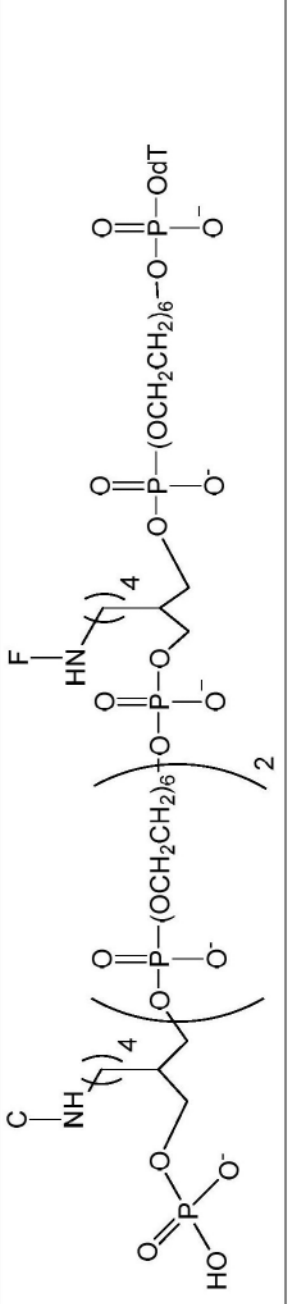
[0274]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-42	5827.6 5826.6	

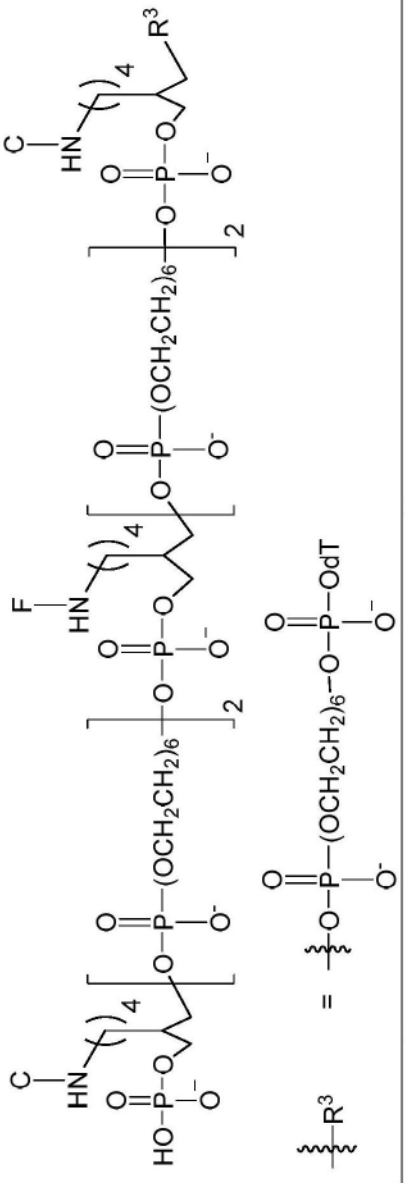
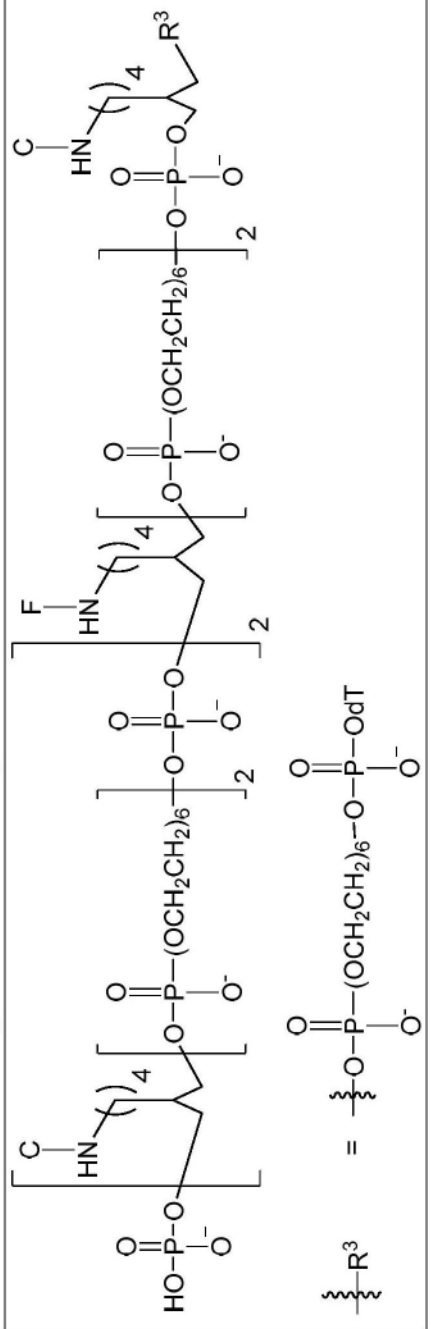
[0275]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-43	5952.2 5950.7	

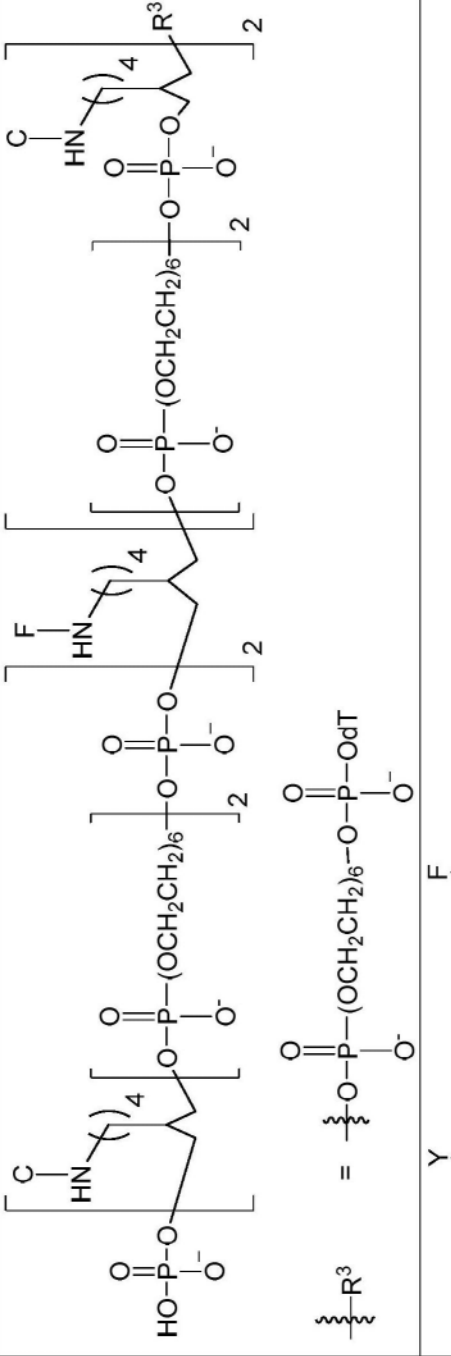
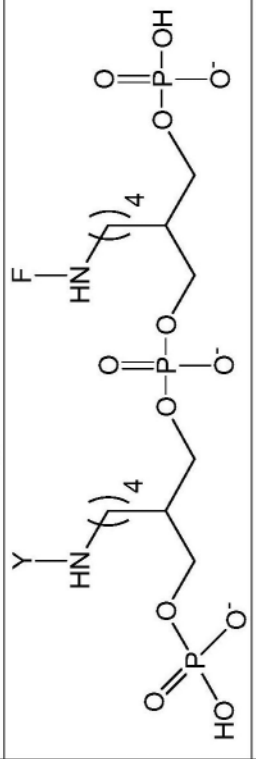
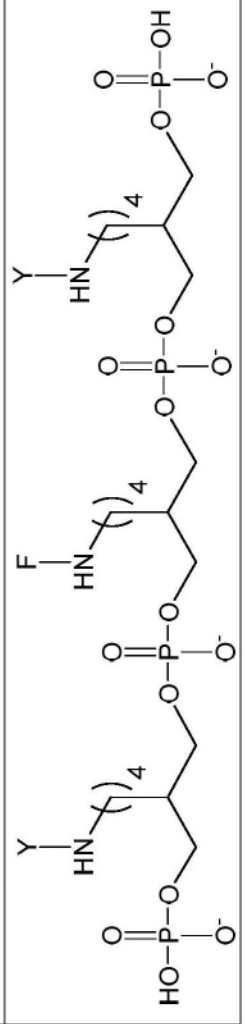
[0276]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-44	6075.4 6074.7	
I-45	2809.4 2812.7	

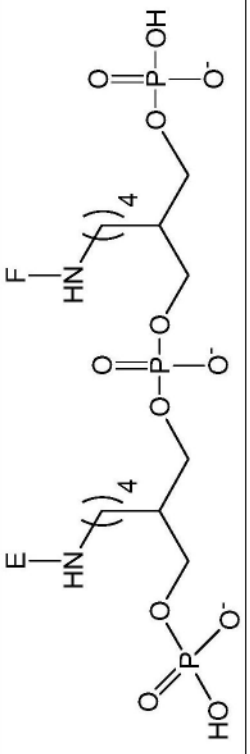
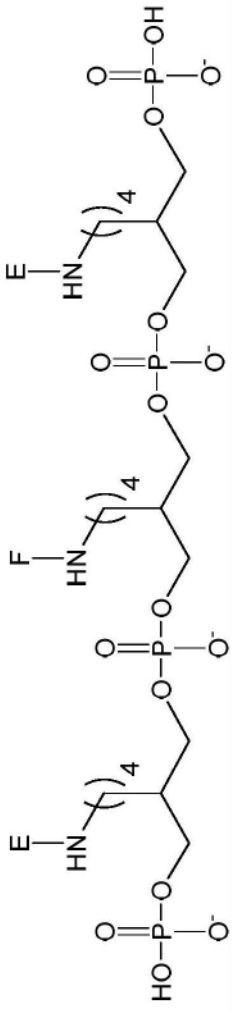
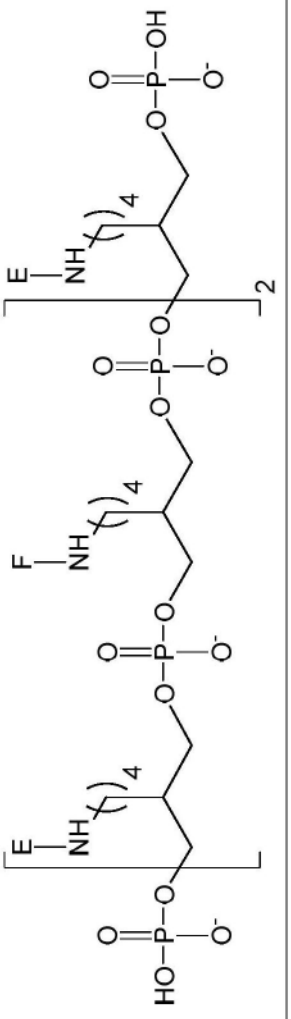
[0277]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-46	4465.5 4471.4	
I-47	- 6130.2	

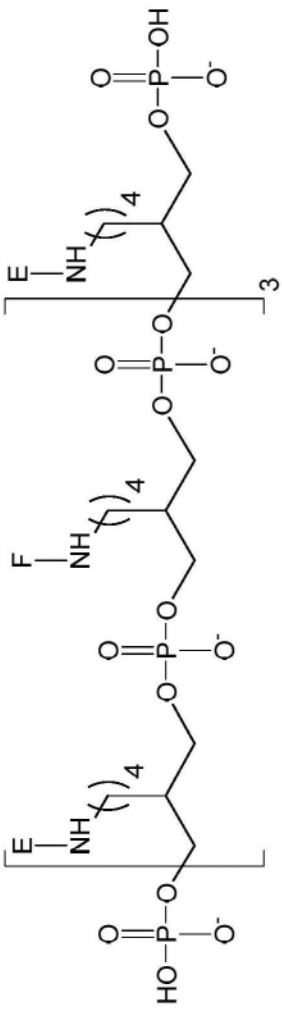
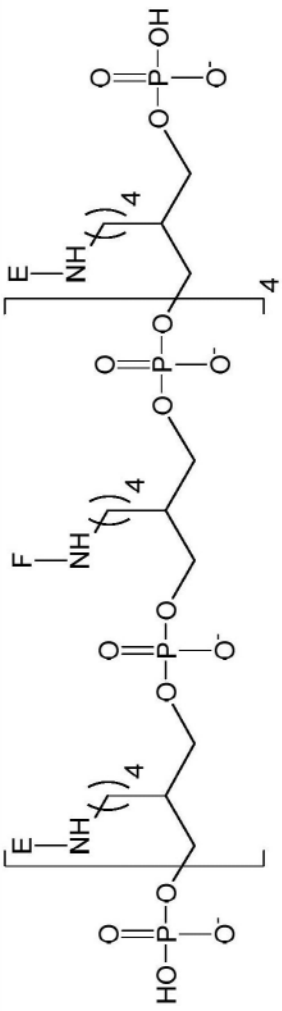
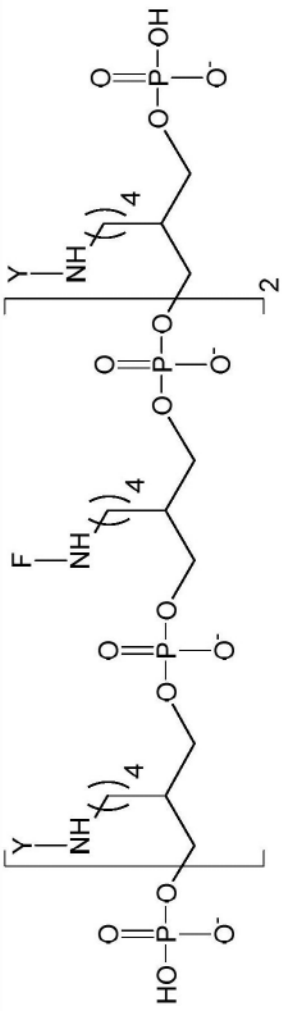
[0278]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-48	- 7788.9	
I-49	937.4 937.8	
I-50	1289.7 1290.2	

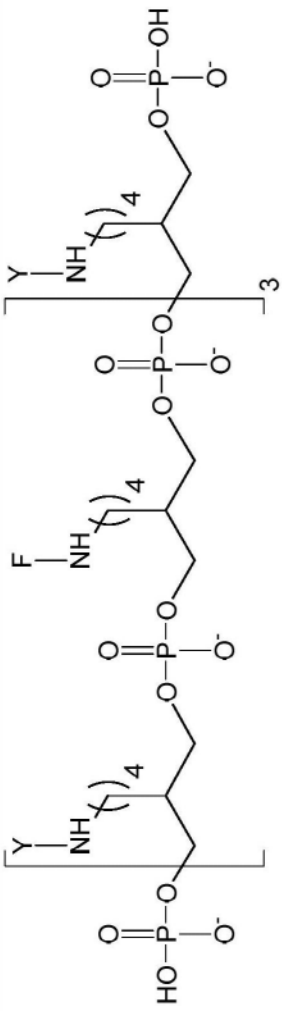
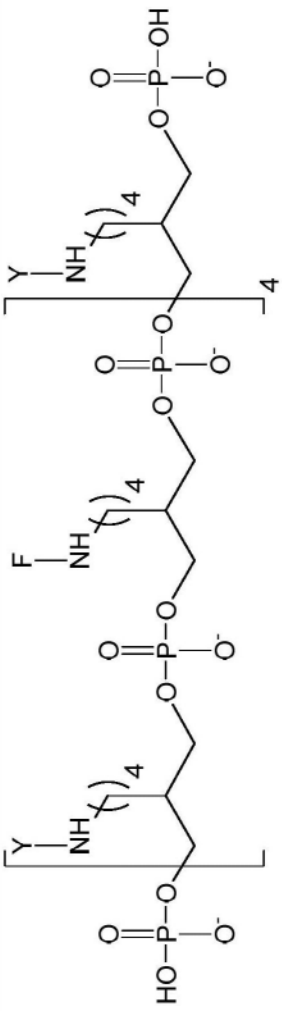
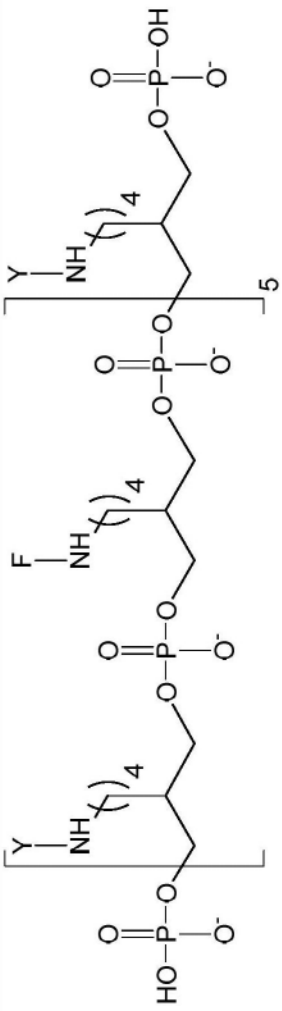
[0279]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-51	987.3 987.9	
I-52	1389.8 1390.3	
I-53	2359.6 2360.2	

[0280]

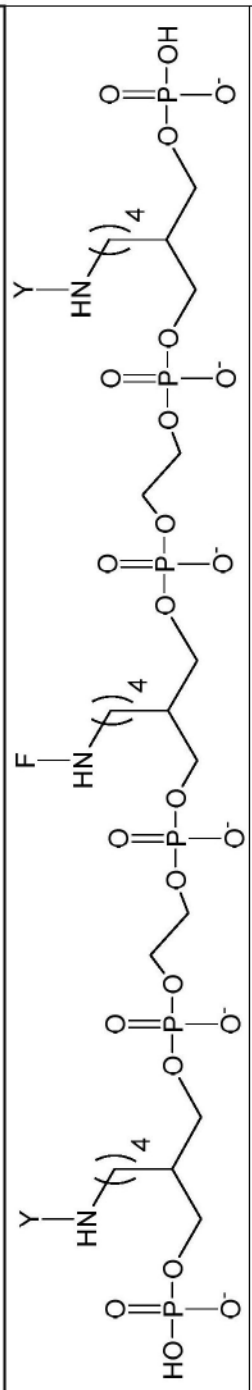
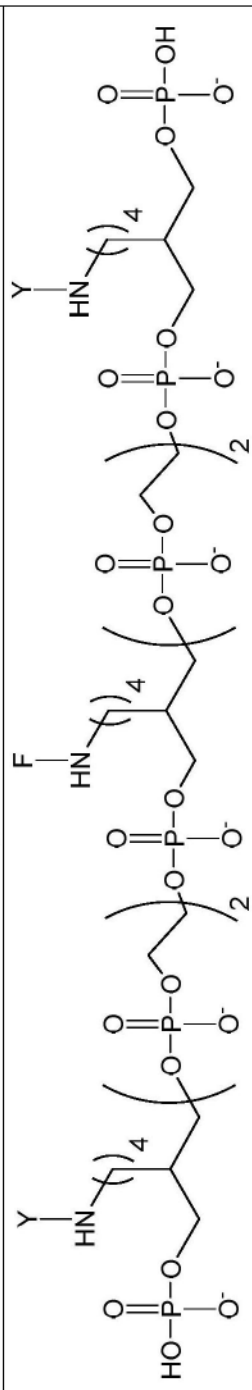
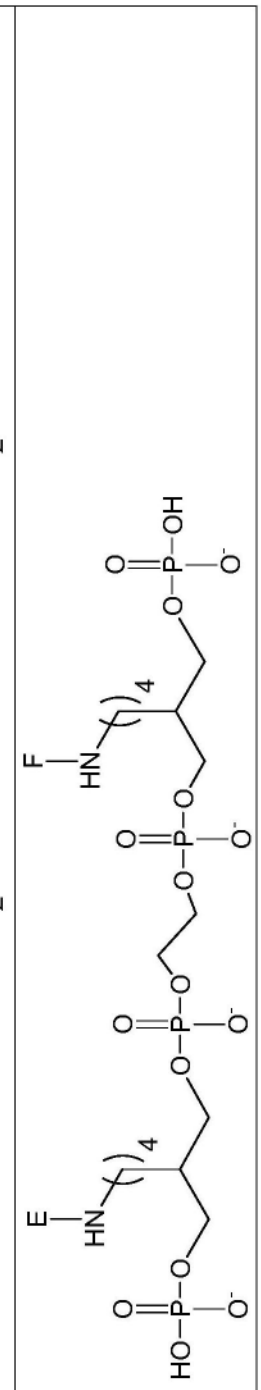
No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-54	3329.7 3330.1	
I-55	4300.8 4300.0	
I-56	2209.6 2210.0	

[0281]

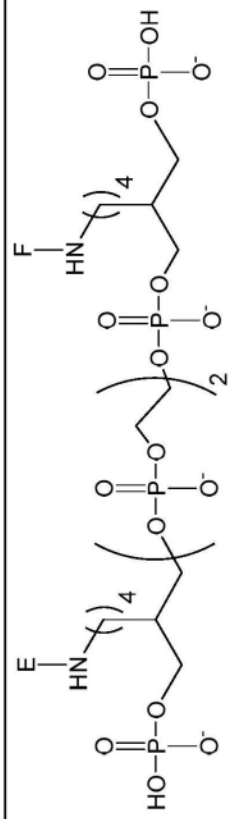
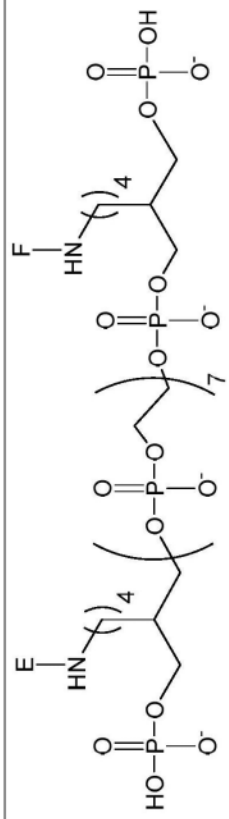
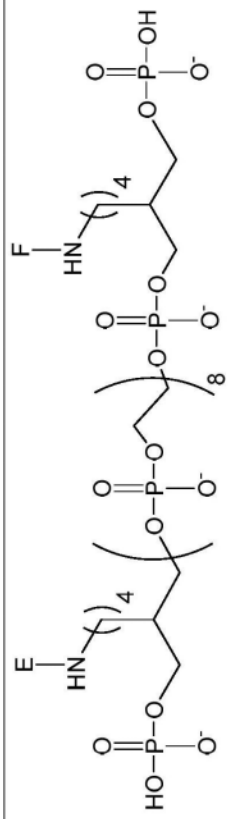
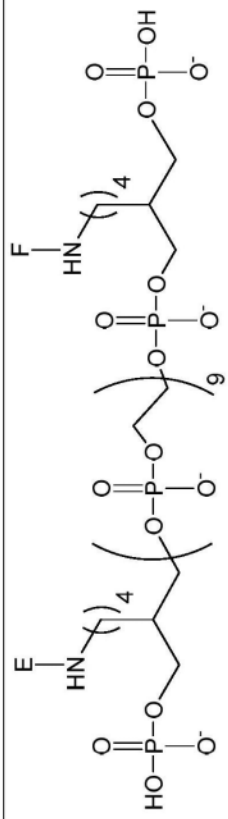
No.	MW. 发现的 计算的	结构
I-57	3129.3 3129.9	
I-58	4049.2 4049.7	
I-59	4969.2 4969.5	

[0282]

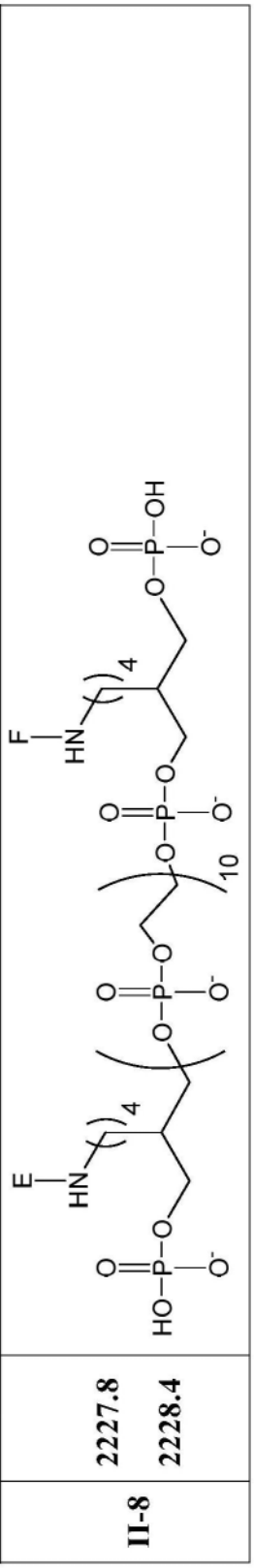
表 3.结构 II 的示例性化合物

No.	MW. 发现的 计算的	结构
II-1	1538.6 1538.3	
II-2	1786.0 1785.8	
II-3	1111.3 1112.0	

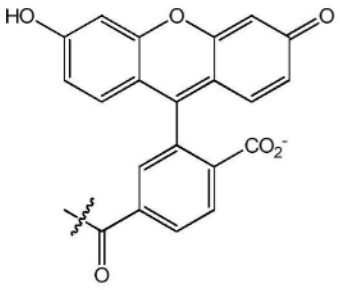
[0283]

No.	MW. 发现的 计算的	结构
II-4	1235.4 1236.0	
II-5	1856.0 1856.3	
II-6	1979.8 1980.3	
II-7	2104.0 2104.4	

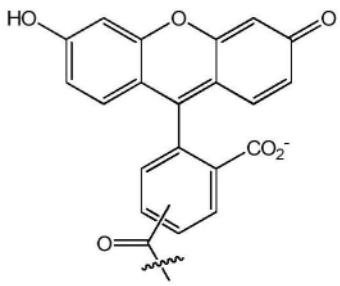
[0284]

No.	MW. 发现的 / 计算的	结构
II-8	2227.8 / 2228.4	

[0285] 如以上表2和3和整个申请公开中所用的,F和F′是指分别具有以下结构的荧光素部分:

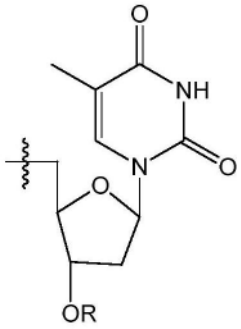
[0286] 

F



F′

[0287] 如以上表2和3和整个申请公开中所用的,dT是指以下结构:

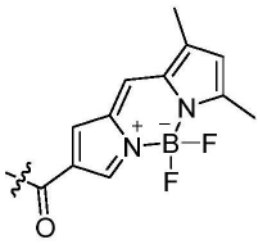
[0288] 

dT

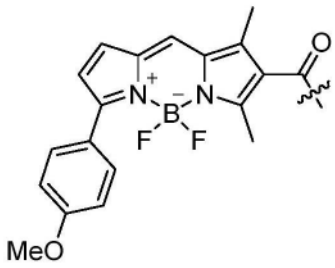
[0289] 其中:

[0290] R为H或直接键。

[0291] 如以上表2和3和整个申请公开中所使用的,B和B′分别是指以下结构:

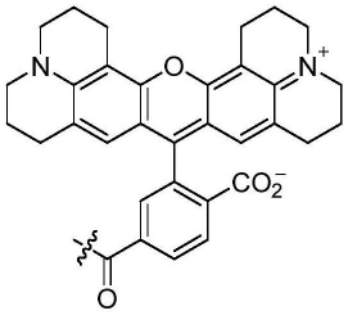
[0292] 

B



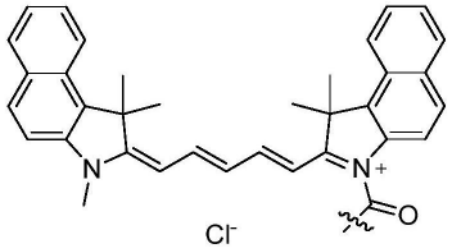
B′

[0293] 如以上表2和3和整个申请公开中所使用的,T是指以下结构:

[0294] 

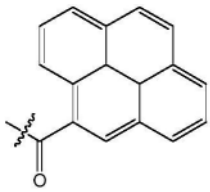
T

[0295] 如以上表2和3和整个申请公开中所使用的,C是指以下结构:

[0296] 

C

[0297] 如以上表2和3和整个申请公开中所使用的,Y是指以下结构:

[0298] 

Y

[0299] 可替代地,对于本文公开的F,F′,B,B′,C和Y的任何实施方案,氧代部分可以用与分子的剩余部分的直接键代替。在某些前述实施方案中,L^1为亚烷基,例如亚甲基或亚乙基。

[0300] 当前公开的染料组合是“可调的”,这意味着通过适当选择任何前述化合物中的变量,本领域技术人员可以得到具有所需和/或预定的FRET特性(例如荧光发射信号,斯托克频移)的化合物。化合物的“可调性”使用户可以轻松得到具有所需斯托克频移、荧光信号和/或颜色的化合物,以用于特定测定或鉴定特定的目标分析物。尽管所有变量都可能影响化合物的FRET特性,但据信适当选择M^1,M^2,L^4,m和n在化合物的摩尔荧光中起着重要作用。因此,在一个实施方案中,提供了一种用于获得具有期望的FRET荧光性质的化合物的方法,该方法包括选择具有已知相互作用性质的M^1和M^2部分,制备包含M^1和M^2部分的结构(I)或(II)的化合物,并为L^4,m和n选择合适的变量以达到所需的FRET特性(例如,斯托克频移、给体发射信号的减小)。

[0301] 在某些实施方案中,FRET荧光发射信号可以相对于母体荧光团(例如,单体)的FRET荧光发射信号的倍数增加或减少来表达。在一些实施方案中,本发明化合物的FRET荧光发射信号相对于母体生色团/荧光团为1.1×,1.5×,2×,3×,4×,5×,6×,7×,8×,9×,10×或10×以上。各种实施方案包括通过适当选择L^4,m和n来制备相对于母体荧光团具有所需荧光倍数增加的化合物。

[0302] 为了便于说明,以阴离子状态(例如,$-OPO(OH)O^-$,$-OPO_3^{2-}$)描述了包含磷部分的各种化合物(例如,磷酸盐等)。本领域技术人员将容易理解,电荷取决于pH,并且不带电的形式(例如,质子化的或盐,例如钠或其它阳离子)也包括在本发明的实施方案的范围内。

[0303] 在各种其它实施方案中提供了包含任何前述化合物和一种或多种分析物分子(例如,生物分子)的组合物。在一些实施方案中,还提供了这种组合物在分析方法中用于检测一种或多种分析物分子的用途。

[0304] 在其它实施方案中,化合物可用于各种分析方法。例如,在某些实施方案中,本发

明内容提供了一种染色样品的方法,该方法包括向所述样品中添加前述实施方案中任一个的化合物(例如,结构(I)或(II)的化合物),其以足够的量当以适当的波长照射所述样品时产生光学响应。

[0305] 在前述方法的一些实施方案中,R^2是包含与分析物分子例如生物分子的共价连接的连接体。例如核酸、氨基酸或其聚合物(例如,多核苷酸或多肽)。在更多实施方案中,生物分子是酶、受体、受体配体、抗体、糖蛋白、适体或病毒(prion)。

[0306] 在前述方法的其它实施方案中,R^2是包含与固体载体例如微颗粒共价连接的连接体。例如,在一些实施方案中,微颗粒是聚合物珠或非聚合物珠。

[0307] 在甚至更多的实施方案中,光学响应是荧光响应。

[0308] 在其它实施方案中,所述样品包含细胞,和某些实施方案进一步包含通过流式细胞术观察所述细胞。

[0309] 在更多的实施方案中,该方法进一步包含将该荧光响应与具有可检测的不同光学性质的第二荧光团的荧光响应区分开。

[0310] 在其它实施方案中,本发明提供了用于视觉检测分析物分子例如生物分子的方法,包括:

[0311] (a)提供根据前述实施方案的聚合物化合物(例如结构(I)或结构(II)),其中该聚合物化合物包含连接至分析物分子的共价键(例如R^2或R^3之一为包含连接至分析物分子的共价键的连接体,和R^2或R^3的另一个为H、OH、烷基、烷氧基、烷基醚或-OP(=R_a)(R_b)R_c));和

[0312] (b)通过其可见特性检测化合物。

[0313] 在一些实施方案中,分析物分子是核酸、氨基酸或其聚合物(例如多核苷酸或多肽)。在更多实施方案中,分析物分子是酶、受体、受体配体、抗体、糖蛋白、适体或病毒。

[0314] 在其它实施方案中,提供了用于视觉上检测分析物分子例如生物分子的方法,该方法包括:

[0315] (a)将任何前述聚合物化合物与该分析物分子混合,其中该化合物包含与选自表1的Q的共价键,和

[0316] (b)形成聚合物化合物和分析物分子的生物缀合物;和

[0317] (c)通过其可见特性检测生物缀合物。

[0318] 一些实施方案提供了该组合物在用于检测一种或多种分析物分子的分析方法中的用途。

[0319] 除上述方法外,结构(I)和结构(II)的化合物的实施方案还可用于各种学科和方法,包括但不限于:内窥镜检查过程中成像以鉴定癌和其它组织;单细胞和/或单分子分析方法,例如检测很少或没有扩增的多核苷酸;癌症成像,例如通过将结构(I)和结构(II)的化合物与优先结合癌细胞的抗体或糖或其它部分缀合;在外科手术步骤中成像:结合组蛋白鉴定各种疾病;药物递送,例如通过用活性药物部分替代结构(I)和结构(II)的化合物中的M^1和/或M^2部分;和/或在牙科工作和其它步骤中的造影剂,例如使结构(I)和结构(II)的化合物与各种菌群和/或生物优先结合。

[0320] 应当理解的是,如上所述的结构(I)和结构(II)的化合物的任何实施方案以及本文针对如上所述结构(I)或(II)的化合物中R^1,R^2,R^3,R^4,R^5,L^1,L^2,L^3,L^4,M^1,M^2,m和/或n变量的任何特定选择,可以独立地与其它实施方案和/或结构(I)或(II)的化合物的变量组合以

形成上面没有具体阐述的本发明的实施方案。此外,如果针对在特定实施方案和/或权利要求中的任何特定R^1,R^2,R^3,R^4,R^5,L^1,L^2,L^3,L^4,M^1,M^2,m和/或n变量列出选择的清单,应当理解,可以从特定实施方案和/或权利要求中删除每个单独的选择,并且其余的选择清单将被认为在本发明的范围内。

[0321] 应该理解的是,在本说明书中,仅当这样的贡献导致稳定的化合物时,所描述的式的取代基和/或变量的组合才是允许的。

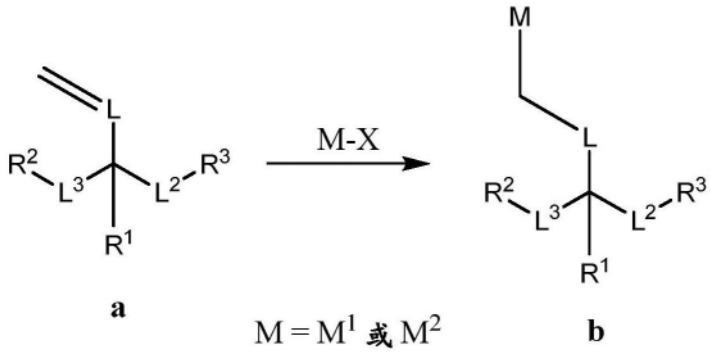
[0322] 本领域技术人员还应理解,在本文所述的方法中,中间体化合物的官能团可能需要被合适的保护基保护。这样的官能团包括羟基、氨基、巯基和羧酸。合适的羟基保护基包括三烷基甲硅烷基或二芳基烷基甲硅烷基(例如,叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基或三甲基甲硅烷基)、四氢吡喃基,苄基等。合适的氨基、脒基和胍基的保护基包括叔丁氧羰基、苄氧羰基等。合适的巯基的保护基包括-C(O)-R″(其中R″是烷基、芳基或芳基烷基)、对甲氧基苄基、三苯甲基等。合适的羧酸的保护基包括烷基、芳基或芳基烷基酯。可以根据本领域技术人员已知并且如本文所述的标准技术添加或去除保护基。保护性基团的使用详细描述于Green,T.W.and P.G.M.Wutz,Protective Groups in Organic Synthesis(1999),3rd Ed.,Wiley中。如本领域技术人员将理解的,保护性基团也可以是聚合物树脂,例如Wang树脂,Rink树脂或2-氯三苯甲基氯化物树脂。

[0323] 此外,可以通过本领域技术人员已知的方法,用适当的无机或有机碱或酸处理,以游离碱或酸形式存在的本发明的所有化合物转化为其盐。可以通过标准技术将本发明化合物的盐转化为其游离碱或酸形式。

[0324] 以下反应方案阐明了制备本发明化合物的示例性方法。应当理解,本领域技术人员可以通过相似的方法或通过组合本领域技术人员已知的其它方法来制备这些化合物。还应理解,本领域技术人员将能够通过使用合适的起始组分和按需改变合成参数以如以下描述的相似方式制备以下未具体阐明的结构(I)或(II)的其它化合物。通常,起始组分可以由来源例如Sigma Aldrich,Lancaster Synthesis,Inc.,Maybridge,Matrix Scientific,TCI,和Fluorochem USA等获得,或根据本领域技术人员已知的来源合成(参见,例如Advanced Organic Chemistry:Reactions,Mechanisms,and Structure,5th edition(Wiley,December 2000))或如在本发明中描述的制备。

[0325] 特别地,制备化合物的实施方案的方法在本文公开(例如,结构(I)和(II)可以例如发现在PCT Pub.Nos.WO 2015/027176,WO 2016/138461,WO 2016/183185,WO 2017/173348,WO 2017/173355,WO 2017/177065,WO 2017/196954,WO 2017/214165和WO 2018/022925,其各自通过引用以其整体并入本文)。

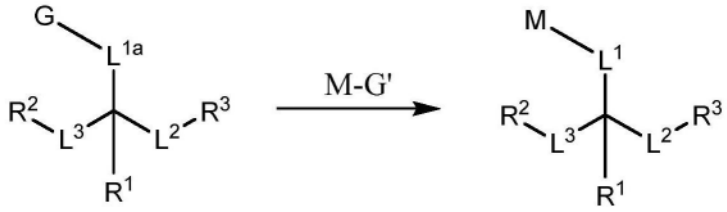
[0326] 反应方案I

[0327] 

a M = M1 或 M2 b

[0328] 反应方案I阐明了用于制备可用于制备结构(I)或(II)的化合物的中间体的示例性方法,其中R^1,L^2和L^3如上所定义,R^2和R^3如上所定义或为其保护的变体和L为任选的连接体。参照反应方案1,可以购买或通过本领域普通技术人员众所周知的方法制备结构a的化合物。在本领域已知的Suzuki偶联条件下,a与M-X的反应,其中X是卤素例如溴,产生结构b的化合物。结构b的化合物可用于制备如下所述的结构(I)或(II)的化合物。

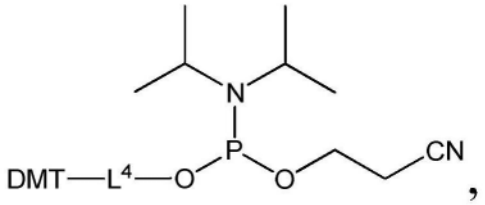
[0329] 反应方案II

[0330] 

c M = M1 或 M2 d

[0331] 反应方案Ⅱ阐明了另一种制备中间体的方法,该中间体可用于制备结构(I)和(Ⅱ)的化合物。参照反应方案II,其中R^1、L^1、L^2、L^3和G如上所定义,和R^2和R^3如上所定义或为其受保护的变体,结构c的化合物,其可以购买或通过众所周知的技术制备,与MG'反应以产生结构d的化合物。此处,G和G'表示具有互补反应性的官能团(即,反应形成共价键的官能团)。G'可以是M的侧基或M的结构主链的一部分。G可以是本文描述的任何数量的官能团,例如炔或胺。

[0332] 结构(I)和(II)的化合物可以由结构b或d中的一种通过在众所周知的自动DNA合成条件下与具有以下结构(e)的亚磷酰胺化合物反应来制备:

[0333] 

(e)

[0334] 其中各个L^4独立地为任选的连接体。

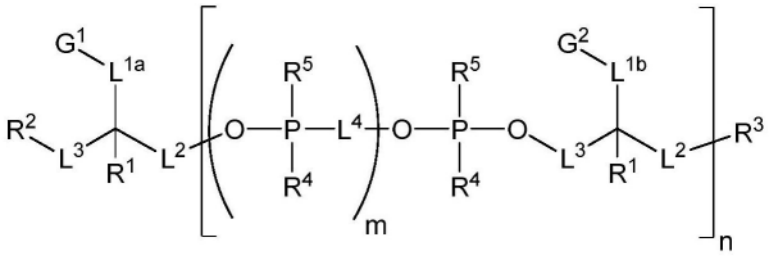
[0335] DNA合成方法是本领域众所周知的。简而言之,上述两个中间体b或d中的两个醇基,例如R^2和R^3分别被二甲氧基三苯甲基(DMT)基团和2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基亚磷酰胺基团官能化。亚磷酰胺基团通常在活化剂如四唑的存在下与醇基团偶联,然后用碘将磷原子氧化。可以用酸(例如氯乙酸)除去二甲氧基三苯甲基,以暴露出游离醇,该游离醇可

以与亚磷酰胺基团反应。低聚反应后,可用氨水处理除去2-氰基乙基。

[0336] 在低聚方法中使用的亚磷酰胺的制备也是本领域众所周知的。例如,伯醇(例如,R^3)可以通过与DMT-Cl反应而被保护为DMT基团。然后通过与适当的试剂如2-氰基乙基N,N-二异丙基氯代亚磷酰胺反应,将仲醇(例如R^2)官能化为亚磷酰胺。制备亚磷酰胺及其低聚的方法是本领域众所周知的,并在实施例中有更详细的描述。

[0337] 结构(I)或(II)的化合物通过中间体b或d和e的低聚反应,根据上述众所周知的亚磷酰胺化学来制备。通过重复偶联所需次数的亚磷酰胺,将所需数量的m和n个重复单元掺入分子中。应当理解,如下所述的结构(III)的化合物可以通过类似的方法制备。

[0338] 在各种其它实施方案中,提供了可用于制备结构(I)或(II)的化合物的化合物。可以如上所述以单体、二聚体和/或低聚形式制备化合物,然后通过任何数量的合成方法(例如,上述"点击"反应)将M^1和/或M^2部分共价连接于化合物以形成结构(I)或(II)的化合物。因此,在各种实施方案中,提供具有以下结构(III)的化合物:

[0339] 

(III)

[0340] 或其立体异构体、盐或互变异构体,其中:

[0341] G^1和G^2在每次出现时独立地为包含能够与互补反应性基团形成共价键的反应性基团的部分;

[0342] L^{1a}和L^{1b}在每次出现时为任选的连接体;

[0343] L^2和L^3在每次出现时独立地为任选的亚烷基、亚烯基、亚炔基、杂亚烷基、杂亚烯基、杂亚炔基或杂原子连接体;

[0344] L^4在每次出现时独立地为亚烷基或杂亚烷基连接体;

[0345] R^1在每次出现时独立地为H、烷基或烷氧基;

[0346] R^2和R^3各自独立地H、OH、SH、烷基、烷氧基、烷基醚、-OP(=R_a)(R_b)R_c、Q、包含连接至Q的共价键的连接体、包含连接至分析物分子的共价键的连接体、包含连接至固体载体的共价键的连接体或包含连接至结构(II)的其它化合物的共价键的连接体,其中R_a为O或S;R_b为OH、SH、O^-、S^-、OR_d或SR_d;R_c为OH、SH、O^-、S^-、OR_d、SR_d、烷基、烷氧基、烷基醚、烷氧基烷基醚、磷酸根/酯基、硫代磷酸根/酯基、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚或硫代磷酸烷基醚和R_d为平衡离子;

[0347] R^4在每次出现时独立地为OH、SH、O^-、S^-、OR_d或SR_d;

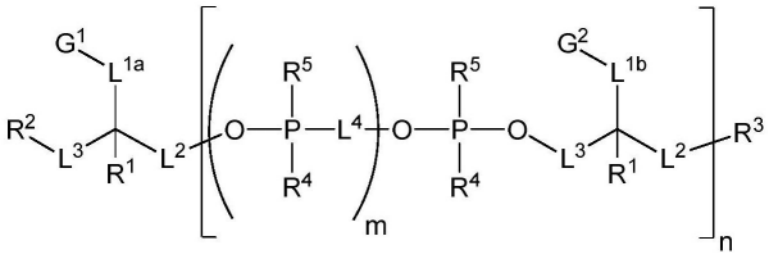
[0348] R^5在每次出现时独立地为氧代、硫代或不存在;

[0349] Q在每次出现时独立地为包含能够与分析物分子、固体载体或互补反应性基团Q′形成共价键的反应性基团的部分;

[0350] m在每次出现时独立地为0或更大的整数,条件是m的至少一次出现时为1或更大的整数;和

[0351] n为1或更大的整数。

[0352] 在各种实施方案中,提供了具有以下结构(IV)的化合物:

[0353] 

(IV)

[0354] 或其立体异构体、盐或互变异构体,其中:

[0355] G^1和G^2在每次出现时独立地为包含能够与互补反应性基团形成共价键的反应性基团的部分;

[0356] L^{1a}和L^{1b}在每次出现时独立地为任选的连接体;

[0357] L^2和L^3在每次出现时独立地为任选的亚烷基、亚烯基、亚炔基、杂亚烷基、杂亚烯基、杂亚炔基或杂原子连接体;

[0358] L^4在每次出现时独立地为亚烷基或杂亚烷基连接体;

[0359] R^1在每次出现时独立地H、烷基或烷氧基;

[0360] R^2和R^3各自独立地为H、OH、SH、烷基、烷氧基、烷基醚、-OP(=R_a)(R_b)R_c、Q、包含连接至Q的共价键的连接体,包含连接至分析物分子的共价键的连接体,包含连接至固体载体的共价键的连接体,或包含连接至结构(II)的其它化合物的共价键的连接体,其中:R_a为O或S;R_b为OH、SH、O^-、S^-、OR_d或SR_d;R_c为OH、SH、O^-、S^-、OR_d、SR_d、烷基、烷氧基、烷基醚、烷氧基烷基醚、磷酸根/酯基、硫代磷酸根/酯基、磷酸烷基、硫代磷酸烷基、磷酸烷基醚或硫代磷酸烷基醚;和R_d为平衡离子;

[0361] R^4在每次出现时独立地为OH、SH、O^-、S^-、OR_d或SR_d;

[0362] R^5在每次出现时独立地为氧代、硫代或不存在;

[0363] Q在每次出现时独立地为包含能够与分析物分子、固体载体或互补反应性基团Q′形成共价键的反应性基团的部分;

[0364] m在每次出现时独立地为0或更大的整数,条件是m至少一次出现时为1或更大的整数;和

[0365] n为1或更大的整数。

[0366] 结构(III)和(IV)的化合物中的G^1和G^2部分可以选自包含具有适当的反应性基团的基团的任何部分,用于与M^1或M^2部分的互补基团形成共价键。在示例性实施方案中,G^1和G^2部分可选自本文所述的Q部分中的任何一个,包括表1中提供的那些具体实例。在一些实施方案中,G^1或G^2或两者在每次出现时独立地适用于反应的部分,该反应包括:叠氮化物与炔烃的铜催化反应形成三唑(Huisgen 1,3-偶极环加成反应),二烯和亲二烯体的反应(Diels-Alder),应变促进的炔-硝酮环加成反应,应变烯烃与叠氮化物、四嗪或四唑、烯烃和叠氮化物[3+2]的环加成反应,烯烃和四嗪反需求Diels-Alder,烯烃和四唑的光反应以及各种置换反应,例如通过亲核攻击亲电原子使离去基团置换。

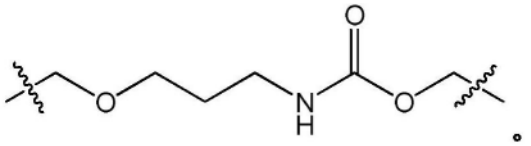
[0367] 在一些实施方案中,G^1或G^2或二者在每次出现时独立地为包含醛、肟、腙、炔、胺、叠

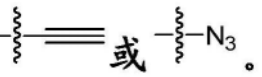
氮基、酰基叠氮基、酰卤、腈、硝酮、氢硫基、二硫化物、磺酰卤、异硫氰酸酯基、亚氨酸酯、活化酯基、酮、α,β-不饱和羰基、烯烃、马来酰亚胺、α-卤代酰亚胺、环氧烷基、氮丙啶、四嗪、四唑、膦、生物素或硫杂环丙烷官能团的部分。

[0368] 在其它实施方案中,G^1或G^2或二者在每次出现时独立地包含炔或叠氮基的基团。在不同的实施方案中,G^1或G^2或二者在每次出现时独立地包含能够在与互补性反应性基团的反应时形成包含烯烃、酯、酰胺、硫代酯、二硫基、碳环、杂环或杂芳基的官能团的反应性基团。例如在一些实施方案中,杂芳基为三唑基。

[0369] 在结构(III)和(IV)的化合物的各种其它实施方案中,L^2和L^3在每次出现时独立地为C_1-C_6亚烷基、C_2-C_6亚烯基或C_2-C_6亚炔基。

[0370] 在结构(III)和(IV)的其它实施方案中,各个L^{1a}不存在。在其它实施方案中,各个L^{1a}存在,例如L^{1a}在每次出现时独立地为杂亚烷基。在某些实施方案中,L^{1a}具有以下结构:

[0371] 。

[0372] 在其它任何前述结构(III)和(IV)的实施方案中,G^1或G^2或二者在每次出现时独立地为或。

[0373] 在各种实施方案中,G^1在每次出现时为炔基,例如乙炔基和G^2为-NH_2。在其它实施方案中,G^1在每次出现时为叠氮基和G^2在每次出现时为-NH_2。

[0374] 在各种实施方案中,G^2在每次出现时为炔基,例如乙炔基和G^1为-NH_2。在其它实施方案中,G^2在每次出现时为叠氮基和G^1在每次出现时为-NH_2。

[0375] FRET过程的效率部分取决于生色团的特性。具体地,高效的FRET需要在给体生色团的吸收光谱与受体生色团的发射光谱之间有很大的重叠。另外,生色团的距离和取向也起重要作用。FRET效率与生色团之间的距离的六次方成反比,跃迁偶极矩的角度应基本对齐以平行(即,接近0°或180°)。因此,在某些实施方案中,选择第一和第二生色团与聚合物主链的共价连接,从而使第一和第二生色团之间的距离最小,并且跃迁偶极矩基本对准。FRET的效率可以根据以下公式表示:

[0376] $$E_{FRET=}\frac{Ro^6}{Ro^6+R^6}$$

[0377] 其中E_{FRET}为FRET效率,R为生色团之间的距离,和Ro根据以下等式表示:

[0378] $$Ro=\left(8.8\times10^{23}JK^2Q_on^{-4}\right)^{1/6}$$

[0379] 其中J是受体吸收光谱与给体发射光谱的光谱重叠,Q_o是给体量子效率,n^{-4}是给体与受体之间的介质指数(常数),并且K^2是偶极子方向匹配。

[0380] 因此,一个实施方案提供了一种聚合物化合物,其包含具有受体跃迁偶极矩并与聚合物主链共价连接的受体生色团,和具有给体跃迁偶极矩并与聚合物主链共价连接的给体生色团,其中该聚合物化合物在生理条件下在溶液中采用确认,其中受体生色团与给体生色团之间的有效距离小于约50.0nm,受体跃迁偶极与给体跃迁偶极基本平行。

[0381] 在一些实施方案中,受体生色团与给体生色团之间的有效距离小于约25.0nm。在

一些实施方案中,受体生色团与给体生色团之间的有效距离小于约10.0nm。在一些实施方案中,受体生色团与给体生色团之间的有效距离小于约30.0nm,小于约27.0nm,小于约22.0nm,小于约20.0nm,小于约17.0nm,小于约15.0nm,小于约12.0nm,小于约11.0nm,小于约9.0nm,小于约8.0nm,小于约7.0nm,小于约6.0nm,小于约5.0nm,小于约4.0nm,小于约3.0nm,小于约2.0nm或小于约1.0nm。

[0382] 在一些实施方案中,受体生色团为荧光染料部分。在某些实施方案中,给体生色团为荧光染料部分。在某些相关的实施方案中,受体生色团和给体生色团均为荧光染料部分。

[0383] 在一些实施方案中,受体跃迁偶极矩与给体跃迁偶极矩之间的角度为120°至180°。例如,在一些实施方案中,受体跃迁偶极矩与给体跃迁偶极矩之间的角度为125°至180°,130°至180°,140°至180°,150°至180°,160°至180°,170°至180°,172°至180°,175°至180°或177°至180°。

[0384] 在某些实施方案中,受体跃迁偶极矩与给体跃迁偶极矩之间的角度为0°至60°。例如,在一些实施方案中,受体跃迁偶极矩与给体跃迁偶极矩之间的角度为0°至50°,0°至40°,0°至30°,0°至20°,0°至10°,0°至8°,0°至5°,0°至3°,或0°至2°。

[0385] 在一些更具体的实施方案中,该聚合物化合物进一步包含第一受体生色团,其在聚合物主链的近端共价连接,第二受体生色团在聚合物主链的远端共价连接,和给体生色团在聚合物主链的近端和远端之间共价连接。

[0386] 在某些实施方案中,聚合物主链包含磷酸根/酯基连接体。在一些实施方案中,聚合物主链包含多个磷酸根/酯基连接体。

[0387] 在一些相关的实施方案中,聚合物主链包含环氧烷基连接体。在一些更具体的实施方案中,环氧烷基为环氧乙基。在一些具体的实施方案中,聚合物主链包含HEG连接体、C连接体或其组合。

[0388] 在一些实施方案中,该聚合物化合物具有小于20000g/mol的分子量。在一些实施方案中,该聚合物化合物具有小于19,000g/mol,18,500g/mol,18,000g/mol,17,500g/mol,17,000g/mol,16,500g/mol,16,000g/mol,15,500g/mol,15,000g/mol,14,500g/mol,14,000g/mol,13,500g/mol,13,000g/mol,12,500g/mol,11,500g/mol,11,000g/mol,10,500g/mol,10,000g/mol,9,500g/mol,9,000g/mol,8,500g/mol,8,000g/mol,7,500g/mol,7,000g/mol,6,500g/mol,6,000g/mol,5,500g/mol,5,000g/mol,4,500g/mol,4,000g/mol,3,500g/mol,3,000g/mol,2,500g/mol,2,000g/mol,1,500g/mol或1,000g/mol的分子量。

[0389] 在一些实施方案中,聚合物化合物不是肽或蛋白质。在一些其它实施方案中,聚合物主链不具有酰胺键。

[0390] 提供以下实施例用于阐明的目的,而不是限制。

实施例

[0391] 一般方法

[0392] 使用MassLynx 4.1采集软件在Waters/MicromassQuattro微型MS/MS系统(仅MS模式)上进行质谱分析。用于染料LC/MS的流动相是100mM的1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP),8.6mM的三乙胺(TEA),pH 8。亚磷酰胺和前体分子也采用Waters Acquity UHPLC系统进行分析,该系统具有2.1mm×50mm Acquity BEH-C_{18}色谱柱,保持在45℃,采用乙腈/水

流动相梯度洗脱。单体中间体的分子量是在Waters/Micromass Quattro微型MS/MS系统(仅MS模式)上使用草绵阳离子注入增强电离获得。激发和发射曲线实验记录在Cary Eclipse光谱光度计上。

[0393] 全部反应在炉干的玻璃仪器中在氮气氛下进行,除非另有说明。可商购的DNA合成试剂购自Glen Research(Sterling,VA)。无水吡啶,甲苯,二氯甲烷,二异丙基乙胺,三乙胺,乙酸,吡啶和THF购自Aldrich。所有其它化学药品均购自Aldrich或TCI,无需进一步纯化即可直接使用。

[0394] 实施例1

[0395] 聚合物主链和衍生物的合成

[0396] 代表性胺/炔聚合物化合物的合成

[0397] 使用AppliedBiosystems 394DNA/RNA合成仪以0.5-1μmol的比例合成聚合物。聚合物化合物直接在CPG珠或聚苯乙烯固体载体上合成。使用标准固相DNA合成方法(即,β-氰基乙基亚磷酰胺偶联化学)在3'至5'方向上进行合成。将单体试剂(例如,氟代亚磷酰胺、C_2烷基亚磷酰胺、六甘醇亚磷酰胺、氨基亚磷酰胺和炔基亚磷酰胺)溶于乙腈和二氯甲烷中,制成0.1M原液。使用以下合成循环以连续顺序添加单体试剂:

[0398] 1)在二氯甲烷或甲苯中用二氯乙酸除去5'-二甲氧基三苯甲基保护基;

[0399] 2)将下一个亚磷酰胺单体试剂与活化剂(0.2M ETT)在乙腈中偶联;

[0400] 3)用碘/吡啶/水将磷酸盐(III)氧化形成稳定的磷酸盐(V);和

[0401] 4)用乙酸酐/1-甲基咪唑/乙腈封端未反应的5'-羟基。

[0402] 重复合成循环直到组装了所需的聚合物化合物。完成后,使用二氯甲烷或甲苯中的二氯乙酸除去末端的单甲氧基三苯甲基(MMT)基团或二甲氧基三苯甲基(DMT)基团。合成后,将载体用在乙腈中的20%二乙胺处理15分钟。

[0403] 然后使用浓氢氧化铵水溶液在55℃下从固体载体上裂解代表性的胺聚合物2小时。通过ESI-MS表征构建体以确认质量和纯度。通过UV确定浓度。

[0404] 偶联至胺/炔聚合物化合物的生色团

[0405] 合成了代表性的聚合物构建体以具有正交的反应性基团(例如,胺和炔),因此可以添加不同的染料部分。例如,点击化学被用于将第一荧光团附着到聚合物的炔上。

[0406] 制备了100mM抗坏血酸钠溶液和500mM磷酸盐缓冲液pH 7.6。将包含叠氮基官能团的第一所需染料部分以100mM的浓度溶解在二甲基亚砜中("染料溶液")。

[0407] 通过添加等体积的THTPA和硫酸铜并允许混合物静置5-10分钟,随后加入抗坏血酸钠来制备100mM抗坏血酸钠溶液(即,100mM抗坏血酸钠/100mM THTPA/50mM硫酸铜的2.5:1:1混合物)。

[0408] 将磷酸盐缓冲液、染料溶液、聚合物化合物和多余的DMSO混合在一起,然后再加入抗坏血酸钠溶液。制备的反应物的最终聚合物浓度为0.5mM,磷酸盐缓冲液浓度为100mM,50-60%DMSO和5-10倍过量的染料。将反应在黑暗中在旋转器或涡旋上放置过夜。样品用水稀释并用G-25Sephadex树脂脱盐。收集样品并通过ESI-MS进行表征,以确认质量和纯度。样品分析后,将聚合物化合物冻干。

[0409] 使用NHS-酯/胺偶联化学,将第二所需的染料部分(例如,荧光团或其它标记)加至代表性的聚合物化合物中。初始制备pH为9的四硼酸钠缓冲液原液("硼酸盐缓冲液")。包含

NHS酯的第二染料部分以100-200mM的浓度溶于DMSO中。准备的反应以使聚合物浓度为1-2mM,硼酸盐缓冲液浓度为100mM,DMSO为30-75％,染料过量5-10倍。将反应在黑暗中在旋转器或涡旋上放置过夜。样品用水稀释并用G-25Sephadex树脂脱盐。收集样品并通过ESI-MS进行表征,以确认质量和纯度。另外,通过紫外和荧光光谱的表征用于确定FRET性质。

[0410] 实施例2

[0411] 生色团之间聚合物主链长度的优化-测试1

[0412] 比较侧链生色团之间聚合物主链长度的变化,以确定最佳的间隔基长度(即,六甘醇数或“HEG”单元)。

[0413] 对于化合物I-1、I-2、I-3和I-4,以100mM的浓度制备溶液。使用494nm的激发波长检测每个样品的发射光谱。实验结果表明,该组合(即,BODIPY-TMR和6-FAM)的最佳间隔是两个六甘醇单元的间隔基。图1所示的实验结果表明,给体发射信号最小化,并且受体发射信号相对较高。除了化合物I-1的反式形式之外,分子模型计算与实验数据基本一致。

[0414] 实施例3

[0415] 生色团之间聚合物主链的优化-测试2

[0416] 测试了代表性的高分子化合物,每种化合物都具有FAM生色团(FRET给体)和Texas红生色团(FRET受体)。比较了代表性的聚合物化合物,以确定最佳的间隔长度。

[0417] 对于化合物I-5、I-6、I-7和I-8和pH为7.0以200nM的浓度制备溶液。使用488nm的激发波长(在620nm处检测到的发射)检测每个样品的发射光谱。结果如图2所示。数据表明:各个生色团之间的间隔长度不一定显示较高的FRET效率。对于这种组合(即FAM和Texas红),分子建模计算与实验结果基本一致。

[0418] 实施例4

[0419] 给体发射表征

[0420] 制备聚合物化合物以确定相对位置对代表性化合物发射光谱亮度的影响。在溶液中,以100nM的浓度和pH 7.0制备代表性的样品聚合物(即化合物I-9,I-10,I-11和I-12)。使用494nm的激发波长对样品进行测试,结果光谱如图3所示。如数据所示,给体发射信号与为每个相应样品检测到的受体发射信号基本相似。

[0421] 不希望受理论的束缚,本申请人试图优化给体生色团与受体生色团之间的间隔,并且还沿着聚合物主链在受体生色团之间定位给体生色团。该策略用于减少给体发射信号,同时保持受体生色团的信号强度。在pH 7下以500nM的浓度制备具有各种间隔物长度以及受体生色团和给体生色团的相对位置的样品并进行测试(即化合物I-13、I-14、I-15、I-16、I-17、I-18和I-19),其结果如图4所示。申请人意外地发现,将受体生色团之间的给体生色团定位在聚合物主链上会导致给体发射信号显著降低。另外,发现最佳间隔长度为化合物I-14中所示的两个六甘醇或“HEG”单元。

[0422] 为了进一步阐明生色团间距与相对发射信号强度之间的关系,制备并测试了具有可变数量的HEG单元的样品。具体而言,分别在pH7.2下以5μM的浓度在溶液中制备了化合物I-20、I-21、I-22和I-23。每种化合物的发射光谱如图5所示。

[0423] 实施例5

[0424] 三价聚合物化合物的合成

[0425] 合成具有三个不同的生色团的代表性聚合物。根据实施例1,通过添加经由NHS/胺

偶联的FAM生色团,经由叠氮化物/炔烃偶联的BODIPY-TMR生色团(即“点击”反应)和经由NHS/胺偶联的Texas Red生色团合成聚合物化合物。通过ESI-MS[M+H]$^{+}$=4909.5确认所需产物(即化合物I-24)。

[0426] 将所需产物在pH 7下以5μM的浓度吸收在溶液中,并获得吸收光谱。在大约510nm,540nm和595nm处分别观察到FAM,BODIPY-TMR和Texas红的吸收峰(图6)。使用pH 7和pH 9的溶液确定化合物I-24的发射光谱(图7),显示FAM,BODIPY-TMR和Texas红的三价聚合物化合物的FRET发射信号分别在大约515nm,575nm和610nm。

[0427] 本说明书中提及和/或在应用数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物,包括2018年3月21日提交的美国临时专利申请No.62/646,234,在不与本说明书相抵触的范围内通过引用整体并入本文。

[0428] 从前述内容可以理解,尽管这里出于说明的目的已经描述了本发明的特定实施例,但是可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下进行各种修改。因此,本发明不受限制,除非被附带的权利要求限制。

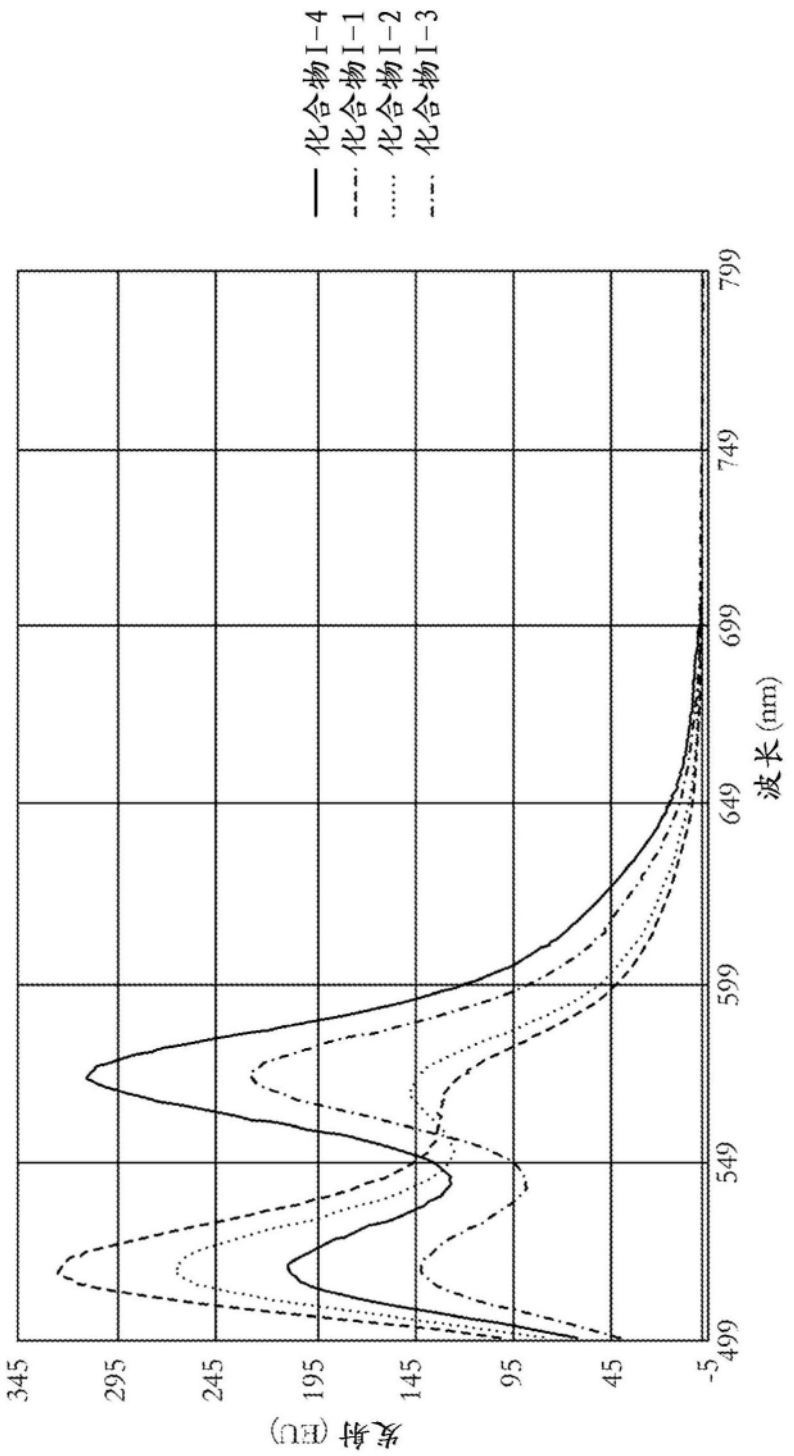

化合物I-4
化合物I-1
化合物I-2
化合物I-3
发射 (EU)
345
295
245
195
145
95
45
-5
499
549
599
649
699
749
799
波长 (nm)

图1

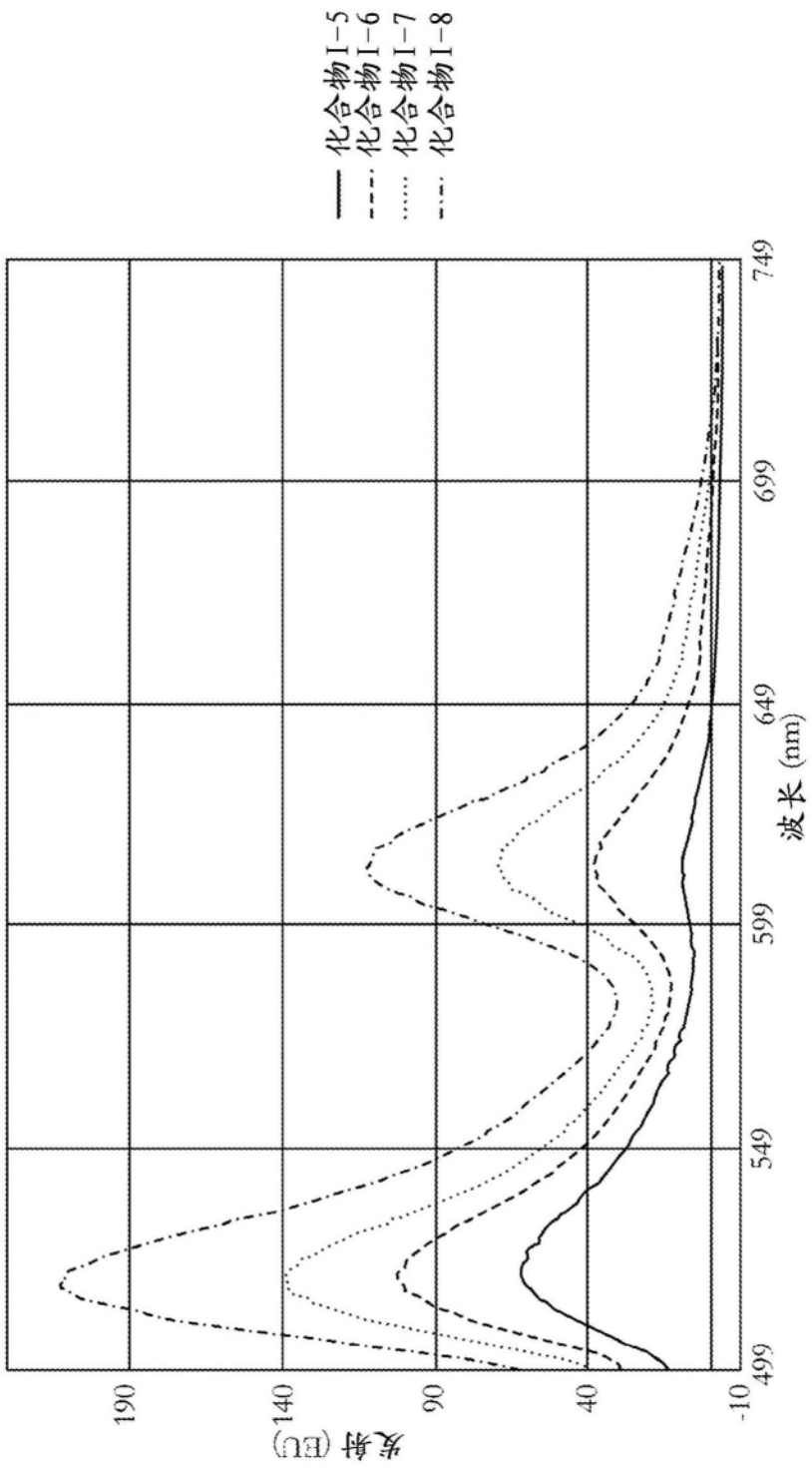

化合物I-5
化合物I-6
化合物I-7
化合物I-8
发射 (EU)
190
140
90
40
-10
499
549
599
649
699
749
波长 (nm)

图2

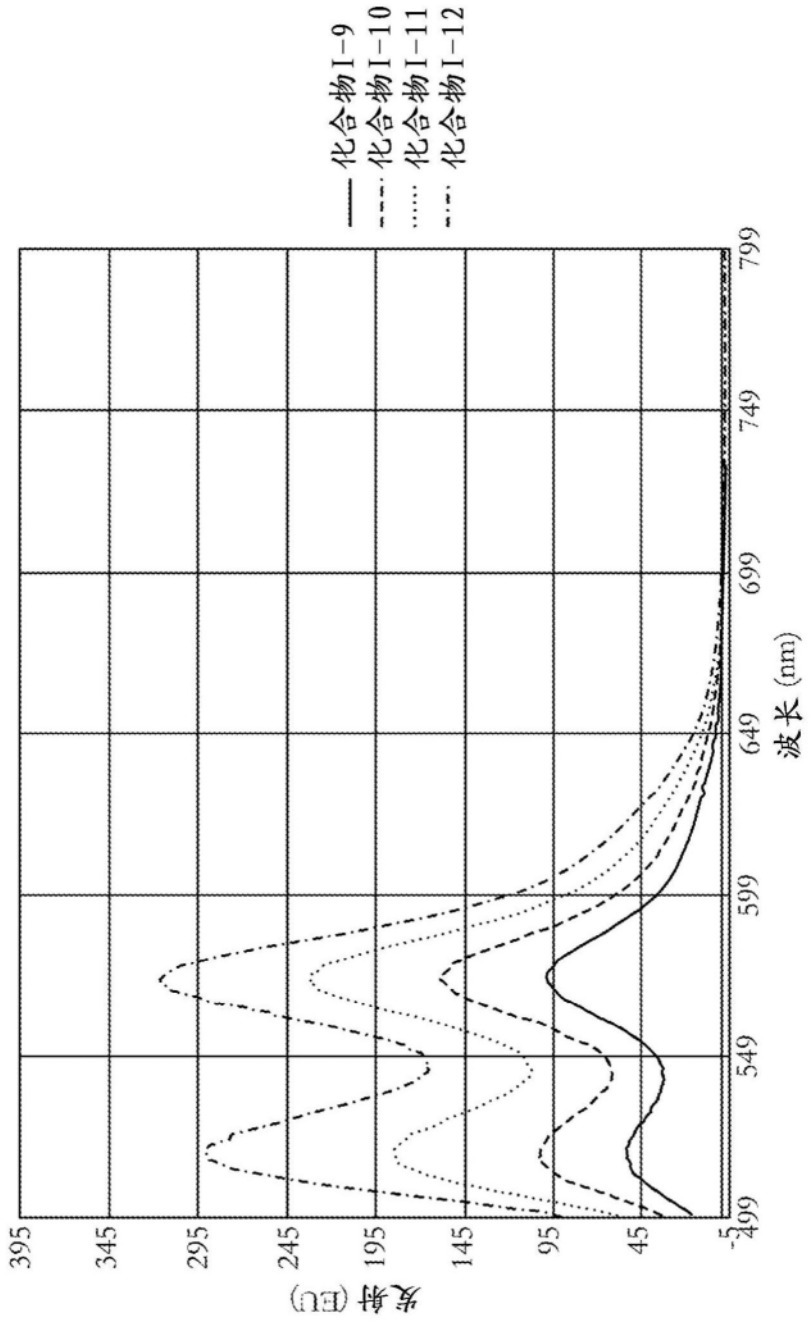

化合物I-9
化合物I-10
化合物I-11
化合物I-12
发射 (EU)
395
345
295
245
195
145
95
45
-5
499
549
599
649
699
749
799
波长 (nm)

图3

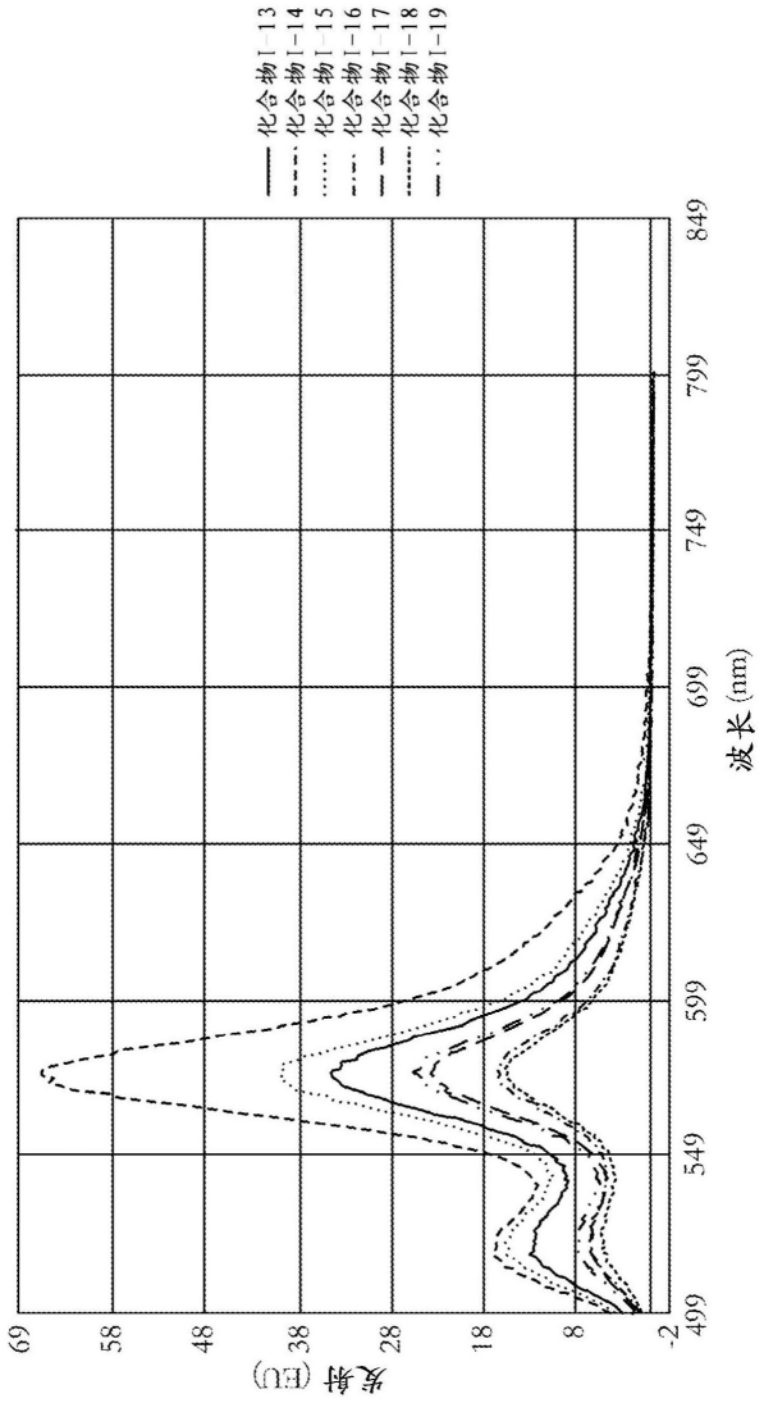

化合物I-13
化合物I-14
化合物I-15
化合物I-16
化合物I-17
化合物I-18
化合物I-19
发射 (EU)
69
58
48
38
28
18
8
-2
499
549
599
649
699
749
799
849
波长 (nm)

图4

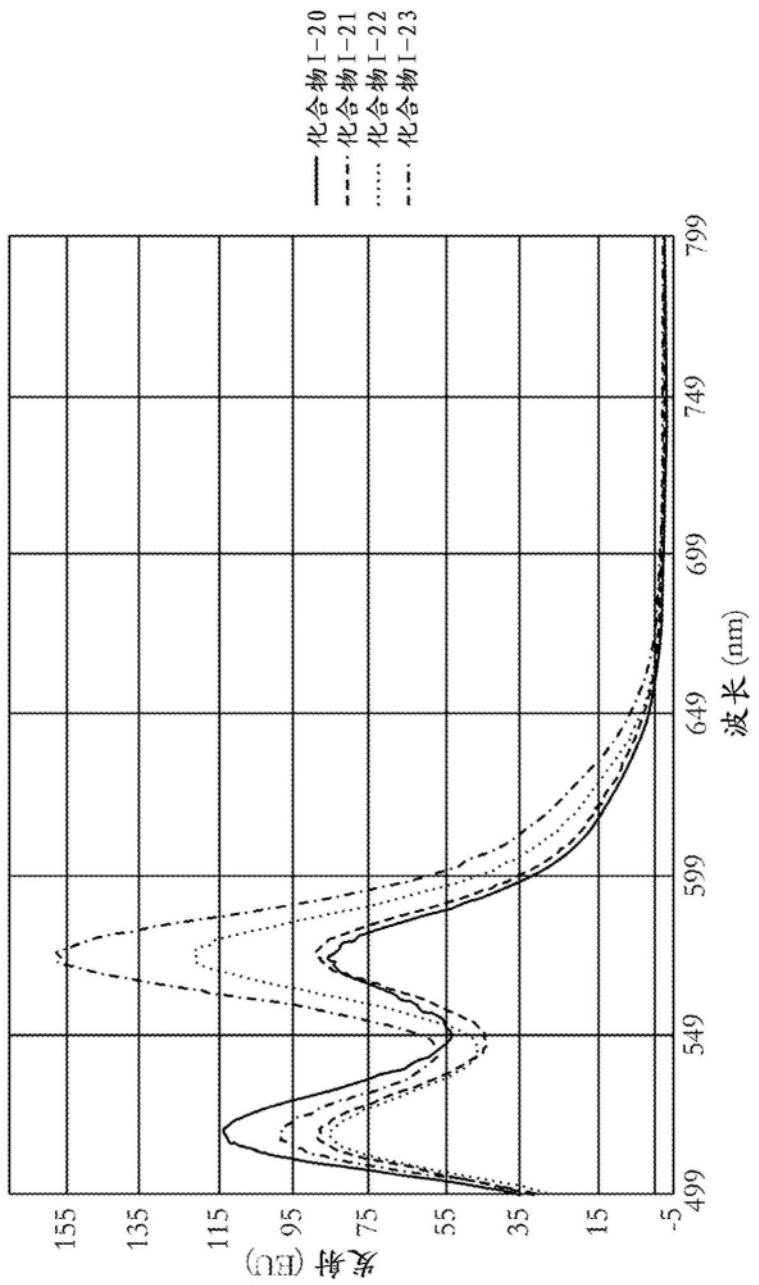

化合物I-20
化合物I-21
化合物I-22
化合物I-23
发射 (EU)
155
135
115
95
75
55
35
15
-5
499
549
599
649
699
749
799
波长 (nm)

图5

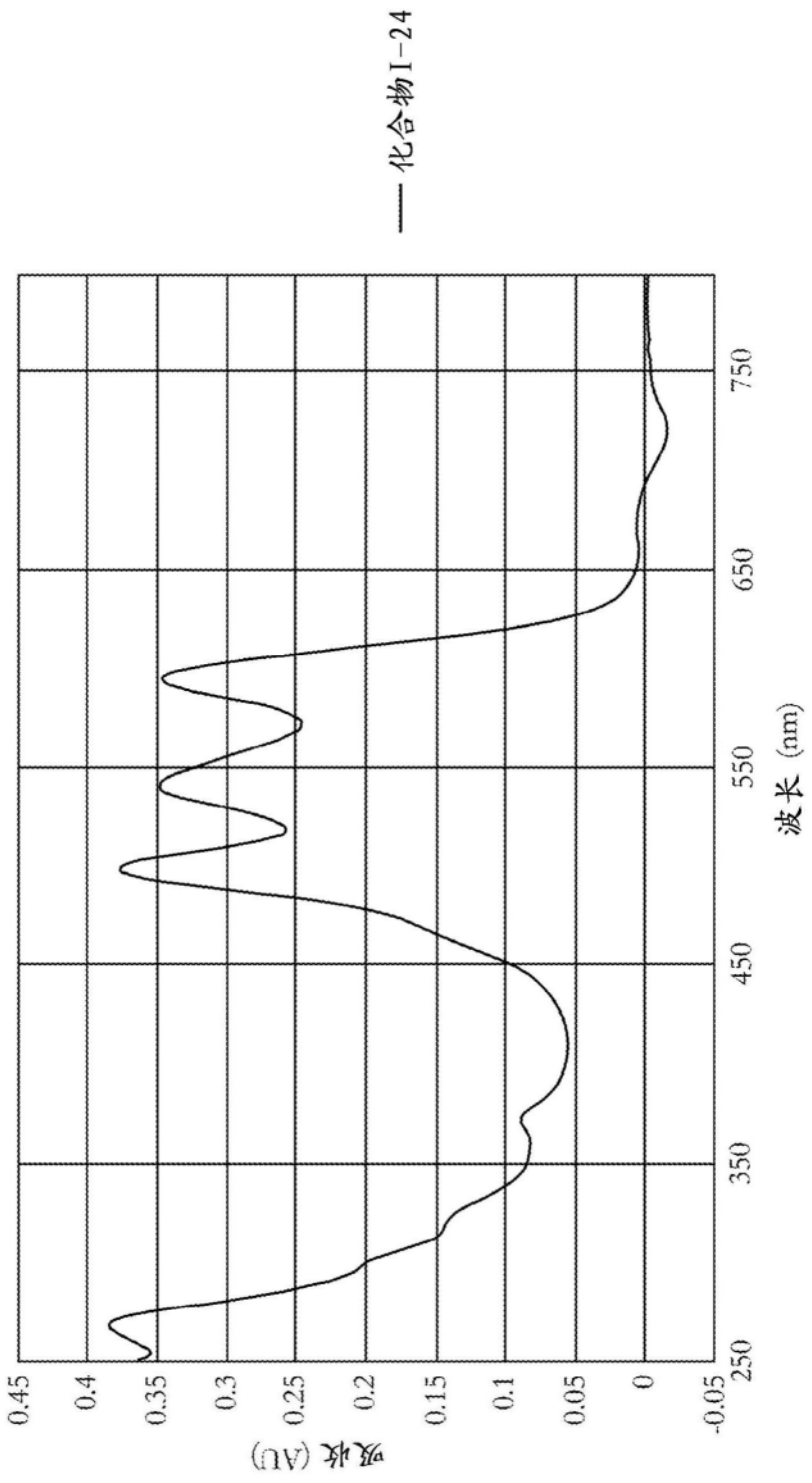

化合物I-24
吸收 (AU)
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
250
350
450
550
650
750
波长 (nm)

图6

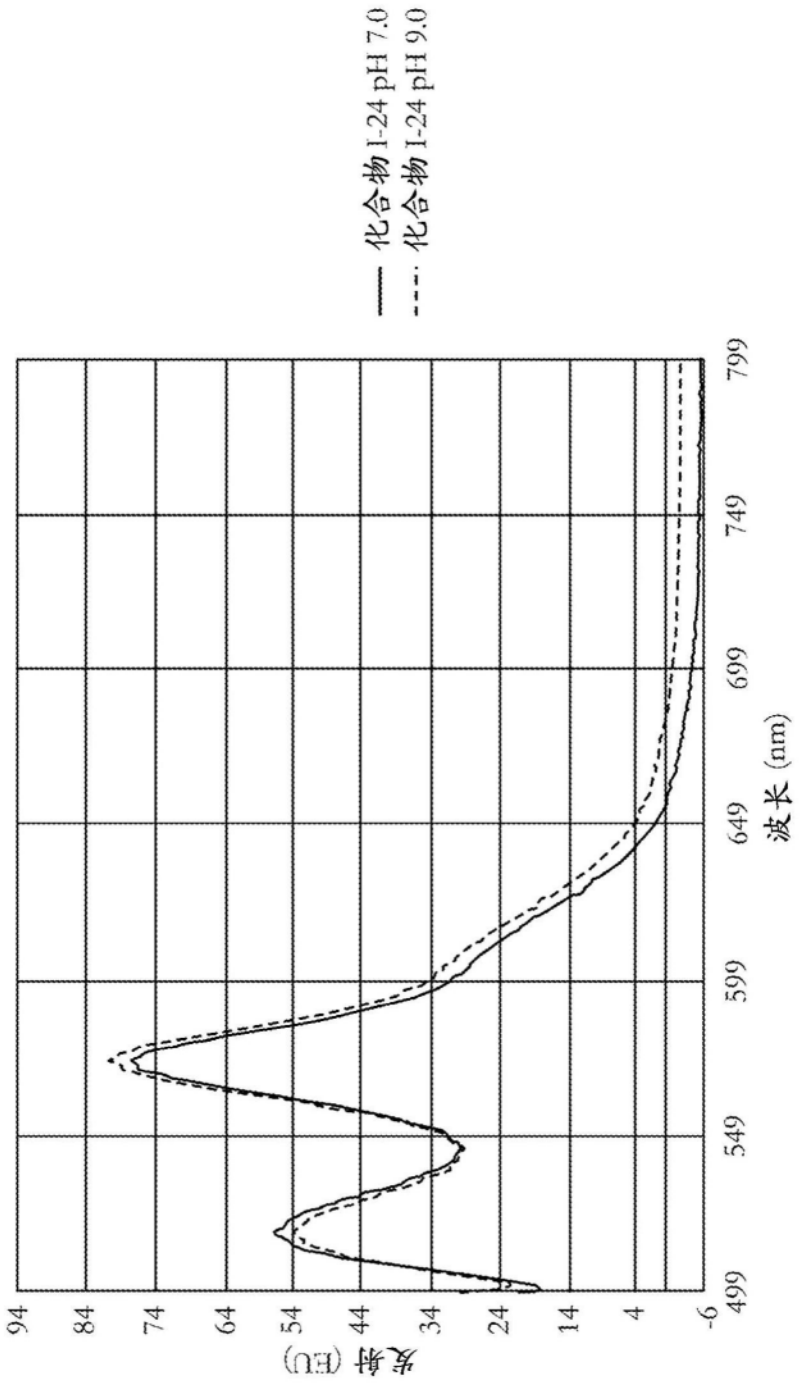

化合物 I-24 pH 7.0
化合物 I-24 pH 9.0
发射 (ECU)
94
84
74
64
54
44
34
24
14
4
-6
499
549
599
649
699
749
799
波长 (nm)

图7