



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101454315 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 200780019599.1

(22)申请日 2007.04.02

(30)优先权数据

60/787,777 2006.03.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2008.11.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/065798 2007.04.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02007/115265 EN 2007.10.11

(73)专利权人 应用生物系统有限责任公司

地址 美国特拉华州

(72)发明人 斯科特·C·本森 瑞明·N·邹

克利须那·G·优波达亚

保罗·M·肯尼

乔纳森·M·卡塞尔

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 杨淑媛 郑霞

(51)Int.Cl.

C07D 405/00(2006.01)

(56)对比文件

US 5942610 A,1999.08.24,

WO 0058406 A1,2000.10.05,

WO 2006020947 A2,2006.02.23,

Ravi Vinayak.A convenient, solid-phase coupling of rhodamine dye acids to 5' amino-oligonucleotides.《Tetrahedron Letters》.1999,第40卷(第43期),第7611-7613页.

审查员 冯伟

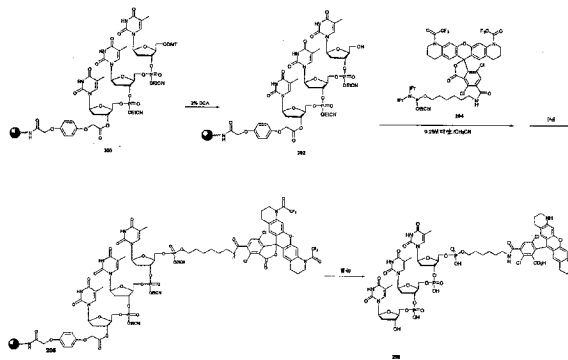
权利要求书18页 说明书46页 附图24页

(54)发明名称

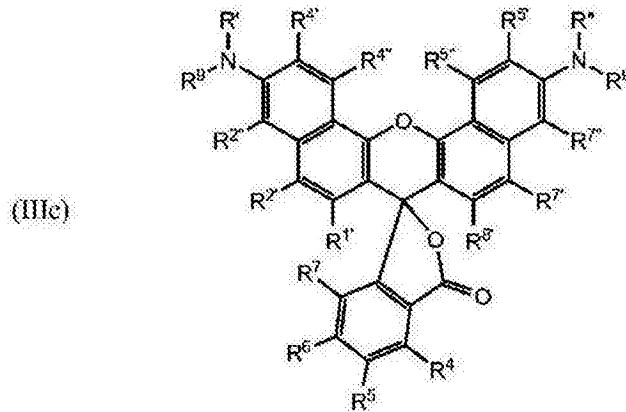
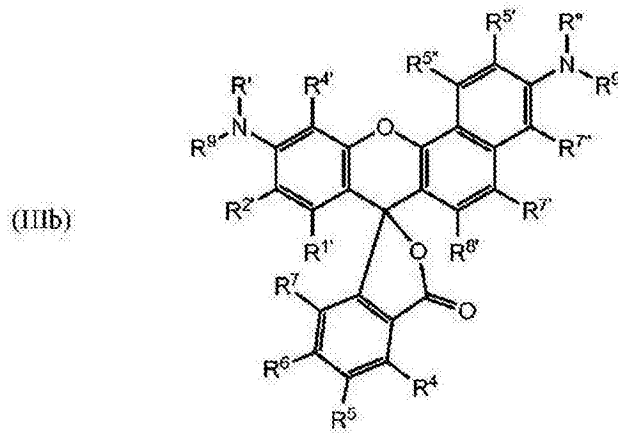
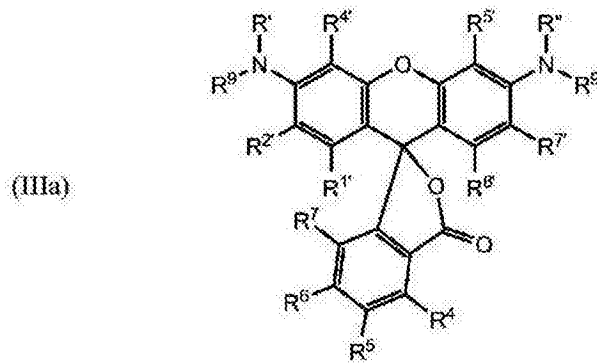
用于合成罗丹明-标记的寡核苷酸的试剂

(57)摘要

本公开提供一种试剂,其可用于以罗丹明染料或含有罗丹明染料的染料网络标记合成的寡核苷酸。



1. 一种用于标记寡核苷酸的试剂,其包括标记部分,所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分,其中所述N-保护的NH-罗丹明部分包括选自结构式(IIIa)、(IIIb)和(IIIc)的结构:



其中:

R'选自R<sup>3'</sup>和氢;

R''选自R<sup>6''</sup>和氢;

R<sup>9</sup>是酰基保护基团;

R<sup>1'</sup>、R<sup>2'</sup>、R<sup>2''</sup>、R<sup>4'</sup>、R<sup>4''</sup>、R<sup>5'</sup>、R<sup>5''</sup>、R<sup>7'</sup>、R<sup>7''</sup>、R<sup>8'</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>,当单独采用时,各自彼此独立地选自氢、低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、5-14元杂芳基、6-20元杂芳基烷基、-R<sup>b</sup>和-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-R<sup>b</sup>,其中x是范围从1到10的整数,且R<sup>b</sup>选自-X、-OH、-OR<sup>a</sup>、-SH、-SR<sup>a</sup>、-NH<sub>2</sub>、-NHR<sup>a</sup>、-NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>、-N<sup>+</sup>R<sup>c</sup>R<sup>c</sup>R<sup>c</sup>、全卤低级烷基、三卤代甲基、三氟甲基、-B(OH)<sub>3</sub>、-B(OR<sup>a</sup>)<sub>3</sub>、-B(OH)

$O^-$ 、 $-B(OR^a)_2O^-$ 、 $-B(OH)(O^-)_2$ 、 $-B(OR^a)(O^-)_2$ 、 $-P(OH)_2$ 、 $-P(OH)O^-$ 、 $-P(OR^a)_2$ 、 $-P(OR^a)O^-$ 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(OH)O^-$ 、 $-P(O)(O^-)_2$ 、 $-P(O)(OR^a)_2$ 、 $-P(O)(OR^a)O^-$ 、 $-P(O)(OH)(OR^a)$ 、 $-OP(OH)_2$ 、 $-OP(OH)O^-$ 、 $-OP(OR^a)_2$ 、 $-OP(OR^a)O^-$ 、 $-OP(O)(OH)_2$ 、 $-OP(O)(OH)O^-$ 、 $-OP(O)(O^-)_2$ 、 $-OP(O)(OR^a)_2$ 、 $-OP(O)(OR^a)O^-$ 、 $-OP(O)(OR^a)(OH)$ 、 $-S(O)_2O^-$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(S)X$ 、 $-C(O)O^-$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR^a$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-C(S)NH_2$ 、 $-C(O)NHR^a$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-C(NH)NH_2$ 、 $-C(NH)NHR^a$ 和 $-C(NH)NR^cR^c$ ，其中X是卤素，每个 $R^a$ 与其它彼此独立地选自低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、5-14元杂芳基和6-20元杂芳基烷基，且每个 $R^c$ 与其它彼此独立地为 $R^a$ ，或可选择地，两个键结到相同氮原子的 $R^c$ 可与所述氮原子一起形成5-到8-元饱和或不饱和环，所述环可任选地包括一个或多个相同或不同的通常选自O、N和S的环杂原子，

或可选择地， $R^{1'}$ 和 $R^{2'}$ 或 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 与它们所键结的碳原子一起形成任选地被取代的(C6-C14)芳基桥，和/或， $R^{4'}$ 和 $R^{4''}$ 和/或 $R^{5'}$ 和 $R^{5''}$ 与它们所键结的碳原子一起形成苯并基团；及

$R^{3'}$ 和 $R^{6'}$ ，当单独采用时，各自彼此独立地选自低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、5-14元杂芳基和6-20元杂芳基烷基，或可选择地，在结构式(IIIa)的化合物中的 $R^{3'}$ 和 $R^{2'}$ 或 $R^{4'}$ 和/或 $R^{6'}$ 和 $R^{5'}$ 或 $R^{7'}$ 、在结构式(IIIb)的化合物中的 $R^{3'}$ 和 $R^{2'}$ 或 $R^{4'}$ 和/或 $R^{6'}$ 和 $R^{5'}$ 或 $R^{7'}$ 或在结构式(IIIc)的化合物中的 $R^{3'}$ 和 $R^{2''}$ 或 $R^{4'}$ 和/或 $R^{6'}$ 和 $R^{5'}$ 或 $R^{7'}$ 与它们所键结的原子一起形成5-或6-元饱和或不饱和环，所述环任选地被一个或多个相同或不同的低级烷基、苯并基团或吡啶并基团取代，

条件是，在结构式(IIIa)的化合物中的 $R^{2'}$ 、 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^5$ 或 $R^6$ 中至少一个，在结构式(IIIb)的化合物中的 $R^{2'}$ 、 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^5$ 或 $R^6$ 中至少一个和在结构式(IIIc)的化合物中的 $R^{2''}$ 、 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^5$ 或 $R^6$ 中至少一个包括式-Y-的基团，其中Y代表官能团 $F^y$ 所贡献的键结中的一部分，其中 $F^y$ 包括表1所列的亲电基团或亲核基团，其中，所述试剂进一步包括磷酸酯前体基团；并且

所述试剂为根据结构式(VII)的化合物：

(VII) LM-L-PEP

其中LM代表所述标记部分，PEP代表所述磷酸酯前体基团，且L代表任选的将所述标记部分连接到所述磷酸酯前体基团的连接体。

2. 根据权利要求1所述的试剂，其中L选自 $-Z-(CH_2)_{3-6}-O-$ 、 $-Z-(CH_2)_a-[Ar]_b-(CH_2)_a]_c-O-$ 、 $-Z-(CH_2)_a-[C\equiv C-(CH_2)_a]_c-O-$ 、 $-Z-(CH_2)_a-[C\equiv C-(Ar)]_b]_c-(CH_2)_a-O-$ 、 $-Z-(CH_2)_d-NH-C(O)-[(CH_2)_a-(Ar)-(CH_2)_a-C(O)-NH]_c-(CH_2)_d-O-$ 和 $-Z-[CH_2(CH_2)_eO]_f-CH_2(CH_2)_eO-$ ，其中：

每个Z与其它彼此独立地代表官能团 $F^z$ 贡献的键结的一部分，其中 $F^z$ 包括表1所列的亲电基团或亲核基团；

每个a与其它彼此独立地代表范围为从0到4的整数；

每个b与其它彼此独立地代表范围为从1到2的整数；

每个c与其它彼此独立地代表范围为从1到5的整数；

每个d与其它彼此独立地代表范围为从1到10的整数；

每个e与其它彼此独立地代表范围为从1到4的整数；

每个f与其它彼此独立地代表范围为从1到10的整数；且

每个Ar与其它彼此独立地代表任选取代的单环或多环的环烃撑、环杂烃撑、芳撑或杂芳撑基团。

3. 根据权利要求2所述的试剂,其中每个Ar与其它彼此独立为环己烷、哌嗪、苯、萘、苯酚、呋喃、吡啶、哌啶、咪唑、吡咯烷或噁二唑。

4. 根据权利要求1所述的试剂,其为根据结构式(VII.1)的化合物:



其中B代表保护的核碱基,且L<sup>2</sup>代表将核碱基B连接到标记部分LM的连接体。

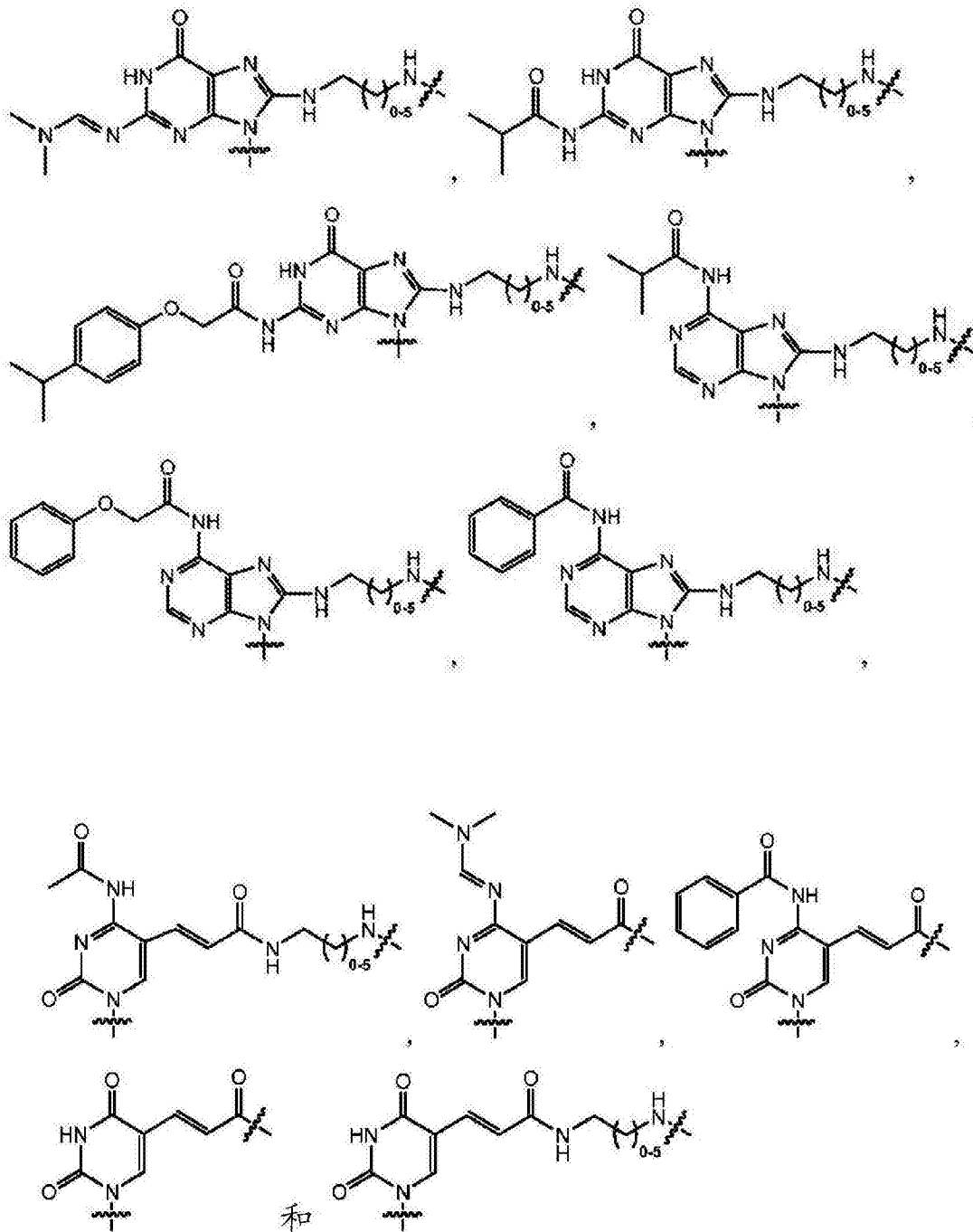
5. 根据权利要求4所述的试剂,其中所述核碱基选自腺嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,尿嘧啶,胸腺嘧啶,肌苷,黄嘌呤和次黄嘌呤。

6. 根据权利要求5所述的试剂,其中B选自A<sup>iBu</sup>、A<sup>Pac</sup>、C<sup>Ac</sup>、G<sup>iPr-Pac</sup>、T和U,

其中A<sup>iBu</sup>表示异丁酰基保护的腺嘌呤,A<sup>Pac</sup>表示苯氧乙酰基保护的腺嘌呤,C<sup>Ac</sup>表示乙酰基保护的胞嘧啶,G<sup>iPr-Pac</sup>表示4-异丙基-苯氧乙酰基保护的鸟嘌呤,T表示胸腺嘧啶且U表示尿嘧啶。

7. 根据权利要求4所述的试剂,其中L<sup>2</sup>选自-C≡C-CH<sub>2</sub>-NH-、-C≡C-C(O)-、-CH=CH-NH-、-CH=CH-C(O)-、-C≡C-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-、-CH=CH-C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-C(O)-、-C≡C-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-[O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-NH-、-C≡C-C≡C-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-[O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-NH-、-C≡C-(Ar)<sub>1-2</sub>-C≡C-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-[O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-NH-、-C≡C-(Ar)<sub>1-2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-[O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-NH-和-C≡C-(Ar)<sub>1-2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-[O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-NH-,其中Ar与其它彼此独立地代表任选取代的单环或多环的环烃撑、环杂烃撑、芳撑或杂芳撑基团。

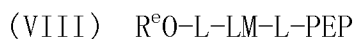
8. 根据权利要求4所述的试剂,其中-B-L<sup>2</sup>-选自:



9. 根据权利要求1所述的试剂,其进一步包括保护的合成片断,所述保护的合成片断包括在寡核苷酸合成中使用的保护基团保护的反应基团,

其中保护基团保护的反应基团选自由以下组成的组:三氟乙酰基或4-单甲氧基三苯甲基保护的氨基、4,4'-二甲氧基三苯甲基保护的羟基、三苯甲基或烃基硫羟基保护的硫羟基、乙缩醛保护基团保护的醛基以及式-OR<sup>o</sup>的保护的伯羟基,其中R<sup>o</sup>代表对酸不稳定的保护基团。

10. 根据权利要求9所述的试剂,其是根据结构式(VIII)的化合物:



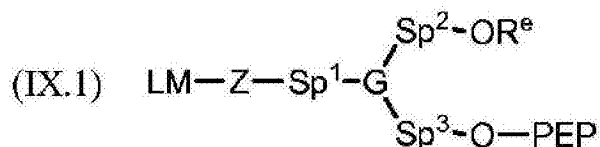
其中R<sup>o</sup>代表对酸不稳定的保护基团,每个L与其他彼此独立地代表任意的连接体,LM代表所述标记部分,且PEP代表所述磷酸酯前体基团。

11. 根据权利要求9所述的试剂,其是根据结构式(IX)的化合物:



其中LM代表所述标记部分,L代表连接体, $R^e$ 代表对酸不稳定的保护基团,且PEP代表所述磷酸酯前体基团。

12. 根据权利要求11所述的试剂,其是根据结构式(IX.1)的化合物:



其中-Z-代表官能团 $F^z$ 贡献的键结的一部分,其中 $F^z$ 包括表1所列的亲电基团或亲核基团; $\text{Sp}^1$ 、 $\text{Sp}^2$ 和 $\text{Sp}^3$ 可相同或不同,其每一个代表间隔部分,且G代表CH、N或一个基团,所述基团包括:芳撑、苯撑、杂芳撑、低级环烃撑、环己撑和/或低级环杂烃撑。

13. 根据权利要求12所述的试剂,其中 $\text{Sp}^1$ 、 $\text{Sp}^2$ 和 $\text{Sp}^3$ 各自彼此独立地选自含有1到10个碳原子的烃撑链、 $-(\text{CH}_2)_a-(\text{Ar})_b-(\text{CH}_2)_a)_c-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a-[C\equiv C-(\text{CH}_2)_a)_c-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a-[C\equiv C-(\text{Ar})_b)_c-(\text{CH}_2)_a-$ 、 $-(\text{CH}_2)_d-\text{NH}-C(\text{O})-(\text{CH}_2)_a-(\text{Ar})-(\text{CH}_2)_a-C(\text{O})-\text{NH})_c-(\text{CH}_2)_d-$ 和 $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{e0}]_f-\text{CH}_2(\text{CH}_2)-$ ,其中

每个a与其它彼此独立地代表范围为从0到4的整数;

每个b与其它彼此独立地代表范围为从1到2的整数;

每个c与其它彼此独立地代表范围为从1到5的整数;

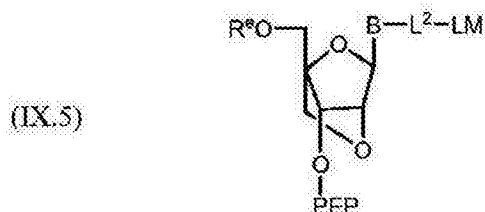
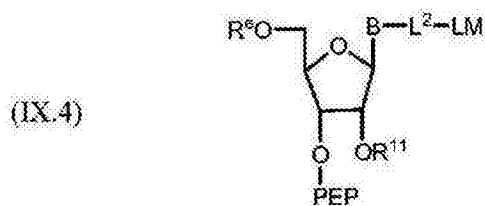
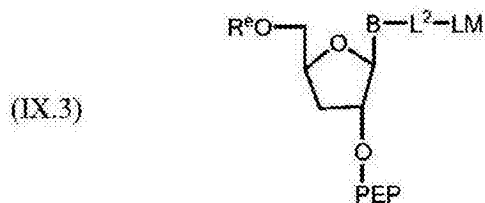
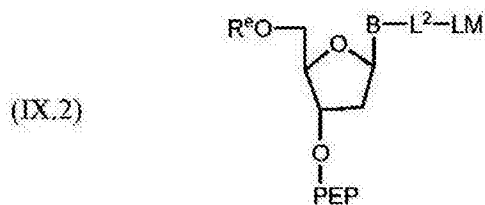
每个d与其它彼此独立地代表范围为从1到10的整数;

每个e与其它彼此独立地代表范围为从1到4的整数;

每个f与其它彼此独立地代表范围为从1到10的整数;且

每个Ar与其它彼此独立地代表任选取代的单环或多环的环烃撑、环杂烃撑、芳撑或杂芳撑基团。

14. 根据权利要求11所述的试剂,其是根据结构式(IX.2)、(IX.3)、(IX.4)或(IX.5)的化合物:



其中B代表保护的核碱基， $L^2$ 代表将标记部分LM连接到核碱基B的连接体，且在结构(IX.4)中， $R^{11}$ 代表保护基团。

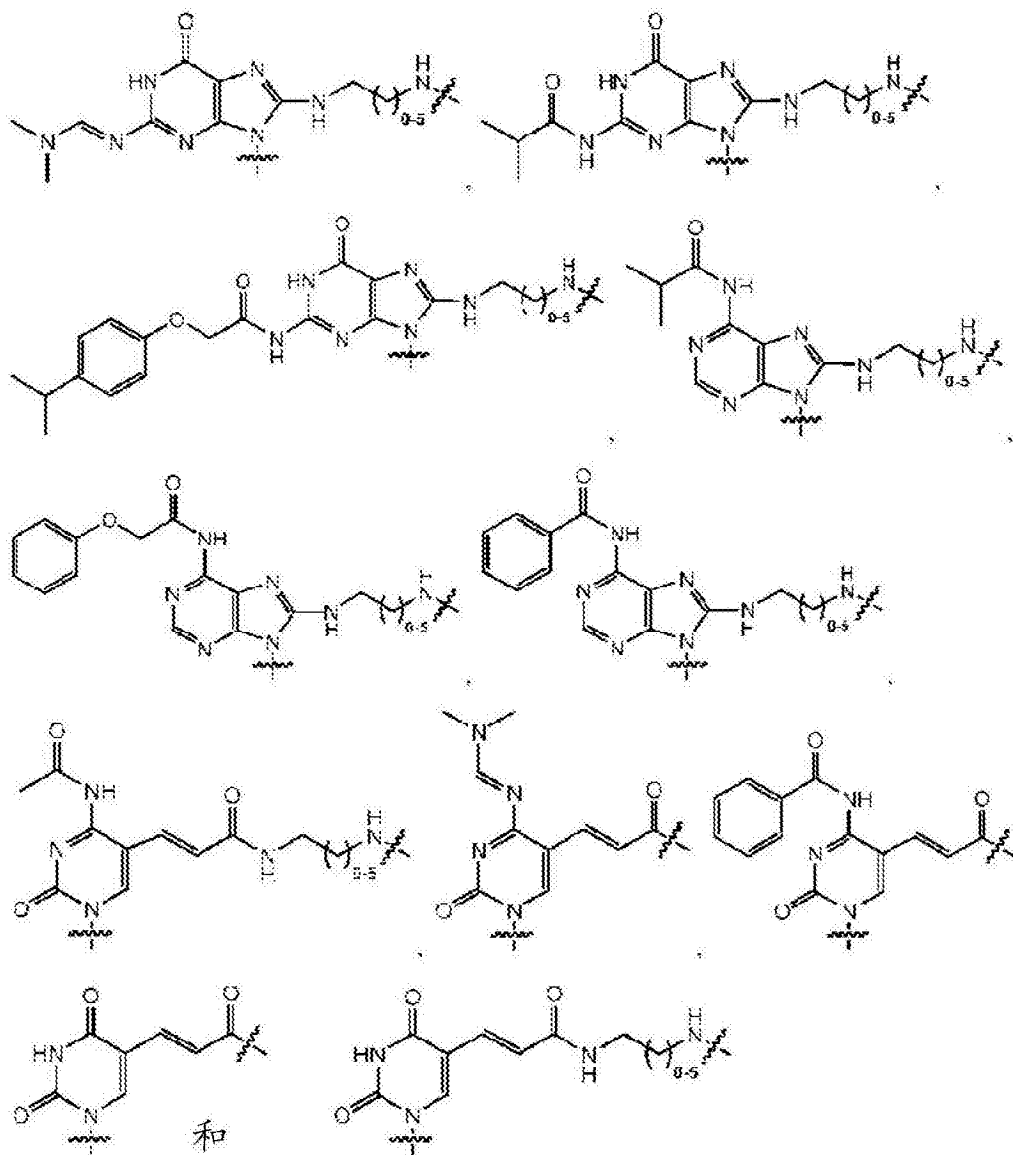
15. 根据权利要求14所述的试剂，其中所述核碱基选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、肌苷、黄嘌呤和次黄嘌呤。

16. 根据权利要求15所述的试剂，其中B选自 $A^{iBu}$ 、 $A^{Pac}$ 、 $C^{Ac}$ 、 $G^{iPr-Pac}$ 、T和U，

其中 $A^{iBu}$ 表示异丁酰基保护的腺嘌呤， $A^{Pac}$ 表示苯氧乙酰基保护的腺嘌呤， $C^{Ac}$ 表示乙酰基保护的胞嘧啶， $G^{iPr-Pac}$ 表示4-异丙基-苯氧乙酰基保护的鸟嘌呤，T表示胸腺嘧啶且U表示尿嘧啶。

17. 根据权利要求14所述的试剂，其中 $L^2$ 选自 $-C\equiv C-CH_2-NH-$ 、 $-C\equiv C-C(O)-$ 、 $-CH=CH-NH-$ 、 $-CH=CH-C(O)-$ 、 $-C\equiv C-CH_2-NH-C(O)-(CH_2)_{1-6}-NH-$ 、 $-CH=CH-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$ 、 $-C\equiv C-CH_2-O-CH_2CH_2-[O-CH_2CH_2]_{0-6}-NH-$ 、 $-C\equiv C-C\equiv C-CH_2-O-CH_2CH_2-[O-CH_2CH_2]_{0-6}-NH-$ 、 $-C\equiv C-(Ar)_{1-2}-C\equiv C-CH_2-O-CH_2CH_2-[O-CH_2CH_2]_{0-6}-NH-$ 、 $-C\equiv C-(Ar)_{1-2}-O-CH_2CH_2-[O-CH_2CH_2]_{0-6}-NH-$ 和 $-C\equiv C-(Ar)_{1-2}-O-CH_2CH_2-[O-CH_2CH_2]_{0-6}-NH-$ ，其中Ar与其它彼此独立地代表任选取代的单环或多环的环烃撑、环杂烃撑、芳撑或杂芳撑基团。

18. 根据权利要求14所述的试剂，其中 $B-L^2$ 选自：



19. 根据权利要求1-18中任一项所述的试剂,其中所述磷酸酯前体基团包括亚磷酰胺基团和H-磷酸酯基团。

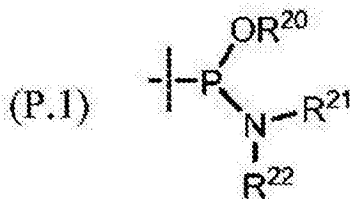
20. 根据权利要求19所述的试剂,其中R<sup>o</sup>是4,4'-二甲氧基三苯甲基。

21. 根据权利要求19所述的试剂,其中所述标记部分进一步包括所述N-保护的NH-罗丹明部分的供体和/或受体部分。

22. 根据权利要求19所述的试剂,其中所述标记部分进一步包括所述N-保护的NH-罗丹明部分的供体部分。

23. 根据权利要求22所述的试剂,其中所述供体部分包括N-保护的NH-罗丹明部分或O-保护的荧光素部分。

24. 根据权利要求19所述的试剂,其中所述磷酸酯前体基团包括式(P.1)的亚磷酰胺:



其中：

$R^{20}$ 选自直链、支链或环状的，饱和或不饱和的含有1到10个碳原子的烃基、2-氰基乙基、含有6到10个环碳原子的芳基和含有6到10个环碳原子及1到10个炔撑碳原子的芳基烃基；及

$R^{21}$ 和 $R^{22}$ 各自彼此独立地选自直链、支链或环状的，饱和或不饱和的含有1到10个碳原子的烃基、含有6到10个环碳原子的芳基和含有6到10个环碳原子和1到10个炔撑碳原子的芳基烃基，或可选择地， $R^{21}$ 和 $R^{22}$ 与它们所键结的氮原子一起形成含有5个到6个环原子的饱和或不饱和环，所述环原子中一个或两个，除了所示氮原子之外，可为选自O、N和S的杂原子。

25. 根据权利要求24所述的试剂，其中 $R^{20}$ 是 $\beta$ -氰基乙基，且 $R^{21}$ 和 $R^{22}$ 各自为异丙基。

26. 根据权利要求1所述的试剂，其进一步包括固相支持体和保护的合成片断，所述保护的合成片断包括在寡核苷酸合成中使用的保护基团保护的反应基团，

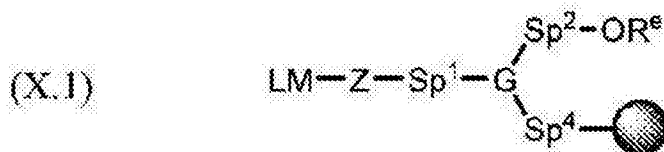
其中保护基团保护的反应基团选自由以下组成的组：三氟乙酰基或4-单甲氧基三苯甲基保护的氨基、4,4'-二甲氧基三苯甲基保护的羟基、三苯甲基或烃基硫羟基保护的硫羟基、乙缩醛保护基团保护的醛基以及式 $-OR^e$ 的保护的伯羟基，其中 $R^e$ 代表对酸不稳定的保护基团。

27. 根据权利要求19所述的试剂，其为根据结构式(X)的化合物：



其中LM代表所述标记部分，L代表任意的选择性可剪切的连接体， $R^e$ 代表对酸不稳定的保护基团，且黑球代表固相支持体。

28. 根据权利要求27所述的试剂，其为根据结构式(X.1)的化合物：



其中-Z-代表官能团 $F^z$ 贡献的键结的一部分，其中 $F^z$ 包括表1所列的亲电基团或亲核基团； $Sp^1$ 、 $Sp^2$ 可相同或不同，其每一个代表间隔部分，且G代表CH、N或一个基团，所述基团包括：芳撑、苯撑、杂芳撑、低级环炔撑、环己撑和/或低级环杂炔撑， $Sp^4$ 代表选择性可剪切的间隔部分且黑球代表固相支持体。

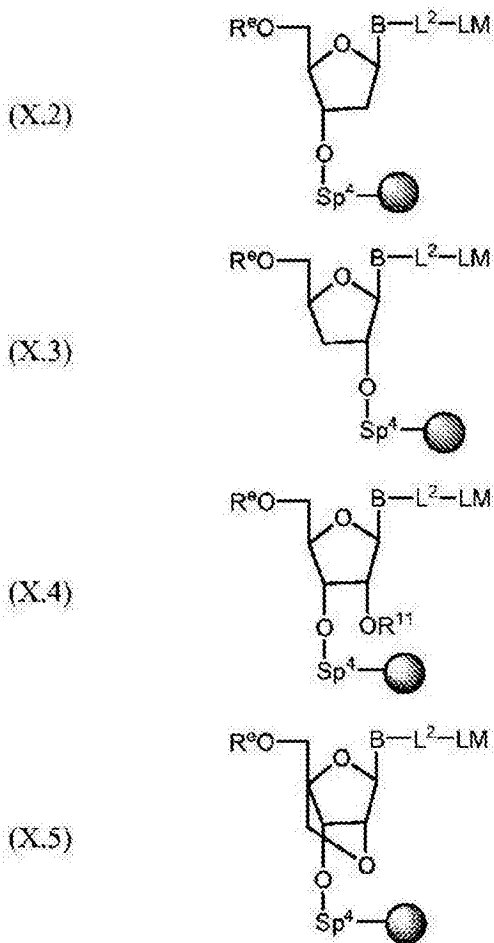
29. 根据权利要求28所述的试剂，其中 $Sp^1$ 和 $Sp^2$ 各自彼此独立地选自含有1个到10个碳原子的炔撑链、 $-(CH_2)_a-[(Ar)_b-(CH_2)_a]_c-$ 、 $-(CH_2)_a-[C\equiv C-(CH_2)_a]_c-$ 、 $-(CH_2)_a-[C\equiv C-(Ar)_b]_c-(CH_2)_a-$ 、 $-(CH_2)_d-NH-C(O)-[(CH_2)_a-(Ar)-(CH_2)_a-C(O)-NH]_c-(CH_2)_d-$ 和 $-[CH_2(CH_2)_eO]_f-CH_2(CH_2)-$ ，其中

每个a与其它彼此独立地代表范围为从0到4的整数；

每个b与其它彼此独立地代表范围为从1到2的整数；  
 每个c与其它彼此独立地代表范围为从1到5的整数；  
 每个d与其它彼此独立地代表范围为从1到10的整数；  
 每个e与其它彼此独立地代表范围为从1到4的整数；  
 每个f与其它彼此独立地代表范围为从1到10的整数；且

每个Ar与其它彼此独立地代表任选取代的单环或多环的环烷撑、环杂烷撑、芳撑或杂芳撑基团，且 $Sp^4$ 包括酯键结。

30. 根据权利要求27所述的试剂，其为根据结构式(X.2)、(X.3)、(X.4)或(X.5)的化合物：



其中B代表保护的核碱基， $L^2$ 代表将标记部分LM连接到核碱基B的连接体，且在结构(X.4)中， $R^{11}$ 代表保护基团且黑球代表固相支持体。

31. 根据权利要求30所述的试剂，其中所述核碱基选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、肌苷、黄嘌呤和次黄嘌呤。

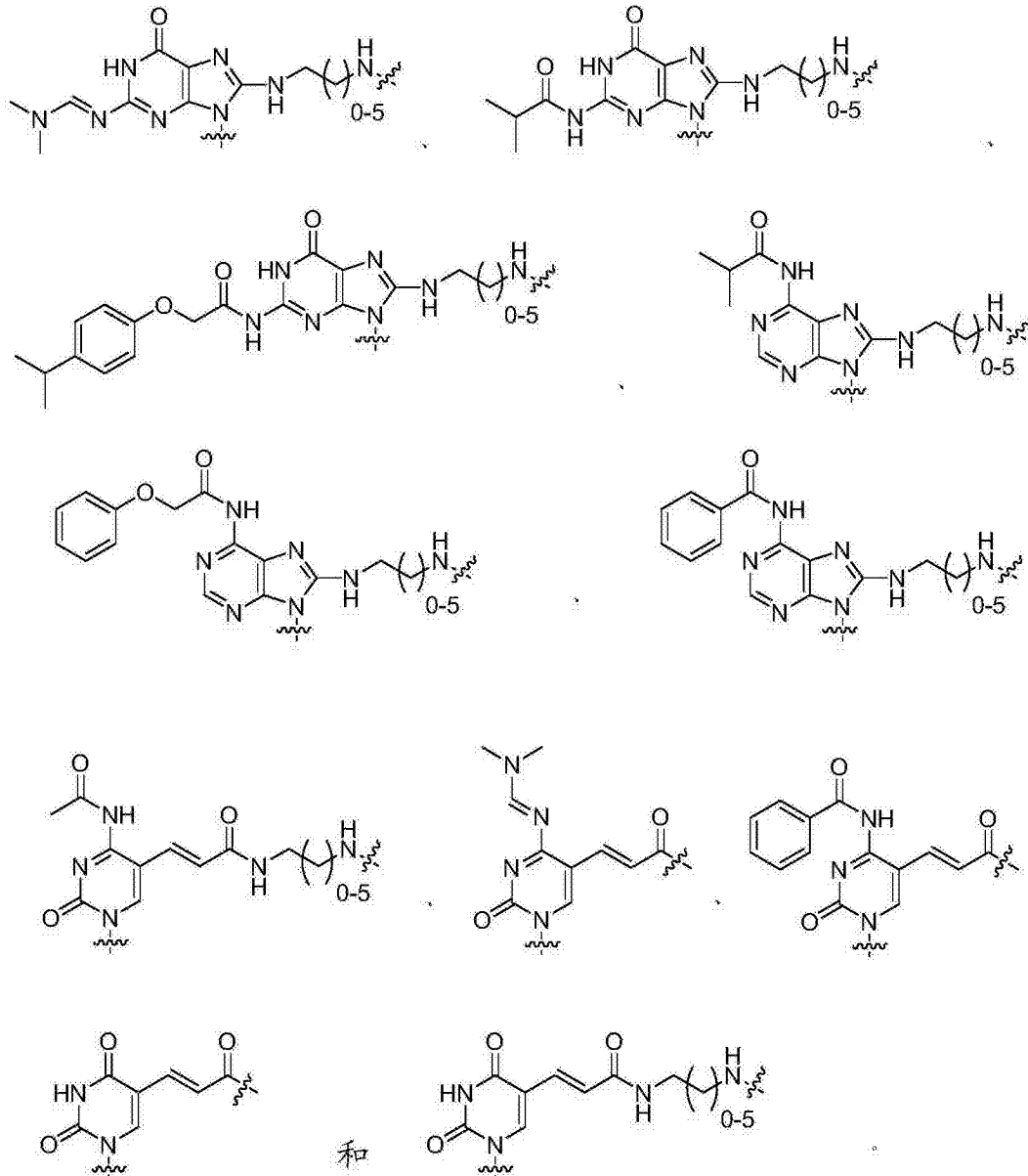
32. 根据权利要求30所述的试剂，其中B选自 $A^{iBu}$ 、 $A^{Pac}$ 、 $C^{Ac}$ 、 $G^{iPr-Pac}$ 、T和U，

其中 $A^{iBu}$ 表示异丁酰基保护的腺嘌呤， $A^{Pac}$ 表示苯氧乙酰基保护的腺嘌呤， $C^{Ac}$ 表示乙酰基保护的胞嘧啶， $G^{iPr-Pac}$ 表示4-异丙基-苯氧乙酰基保护的鸟嘌呤，T表示胸腺嘧啶且U表示尿嘧啶。

33. 根据权利要求30所述的试剂，其中 $L^2$ 选自 $-C\equiv C-CH_2-NH-$ 、 $-C\equiv C-C(O)-$ 、 $-CH=CH-NH-$ 、 $-CH=CH-C(O)-$ 、 $-C\equiv C-CH_2-NH-C(O)-(CH_2)_{1-6}-NH-$ 、 $-CH=CH-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C$

(O)-、 $-C\equiv CH-CH_2-O-CH_2CH_2-[O-CH_2CH_2]_{0-6}-NH-$ 、 $-C\equiv C-C\equiv C-CH_2-O-CH_2CH_2-[O-CH_2CH_2]_{0-6}-NH-$ 、 $-C\equiv C-(Ar)_{1-2}-C\equiv C-CH_2-O-CH_2CH_2-[O-CH_2CH_2]_{0-6}-NH-$ 、 $-C\equiv C-(Ar)_{1-2}-O-CH_2CH_2-[O-CH_2CH_2]_{0-6}-NH-$ 和 $-C\equiv C-(Ar)_{1-2}-O-CH_2CH_2-[O-CH_2CH_2]_{0-6}-NH-$ ，其中Ar与其它彼此独立地代表任选取代的单环或多环的环烃撑、环杂烃撑、芳撑或杂芳撑基团。

34. 根据权利要求30所述的试剂，其中-B-L<sup>2</sup>-选自：



35. 根据权利要求9-18和24-34中任一项所述的试剂，其中R<sup>e</sup>是4,4'-二甲氧基三苯甲基。

36. 根据权利要求35所述的试剂，其中R<sup>9</sup>是式 $-C(O)R^{10}$ 的酰基，其中R<sup>10</sup>选自氢、低级烷基、甲基、 $-CX_3$ 、 $-CHX_2$ 、 $-CH_2X$ 、 $-CH_2-OR^d$ 及苯基，其任选地被低级烷基、甲基、 $-X$ 、 $-OR^d$ 、氰基或硝基单取代，其中R<sup>d</sup>选自低级烷基、苯基和吡啶基，且每一个X是卤基团，通常为氟或氯。

37. 根据权利要求36所述的试剂，其中R<sup>10</sup>选自甲基和三氟甲基。

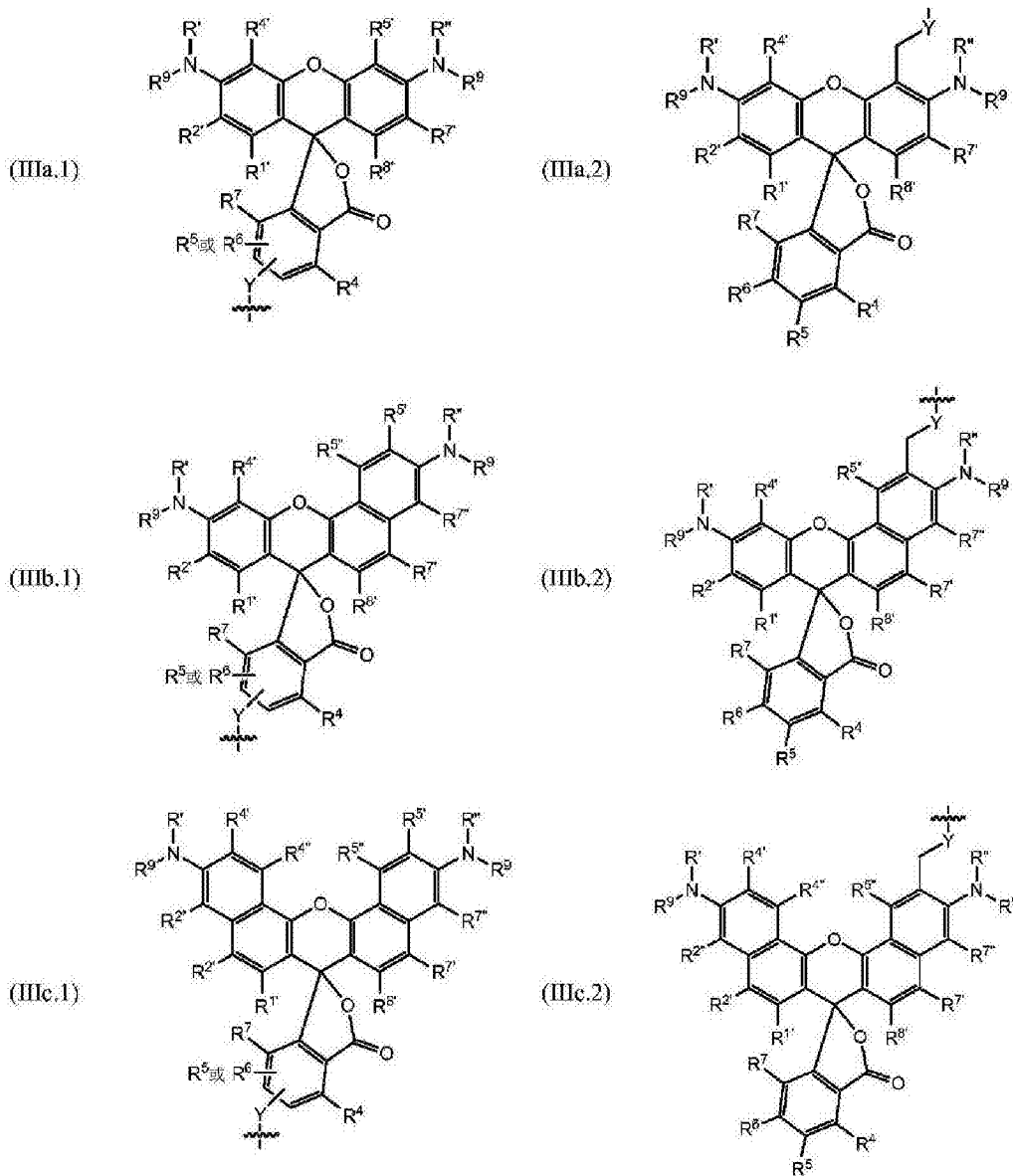
38. 根据权利要求35所述的试剂，其中所述标记部分进一步包括所述N-保护的NH-罗丹明部分的供体和/或受体部分。

39. 根据权利要求35所述的试剂,其中所述标记部分进一步包括所述N-保护的NH-罗丹明部分的供体部分。

40. 根据权利要求39所述的试剂,其中所述供体部分包括N-保护的NH-罗丹明部分或O-保护的荧光素部分。

41. 一种寡核苷酸,其包括标记部分,所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分,所述N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求35中所描述的结构。

42. 根据权利要求1所述的试剂,其中所述N-保护的NH-罗丹明部分包括选自结构式(IIIa.1)、(IIIa.2)、(IIIb.1)、(IIIb.2)、(IIIc.1)和(IIIc.2)的结构:



其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>和Y如先前在权利要求1中所定义的。

43. 根据权利要求42所述的试剂,其中所述N-保护的NH-罗丹明部分具有一个或多个选自以下的可应用特征:

- (i) Y选自-C(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-S-和-NH-;
- (ii) R<sup>4</sup>和R<sup>7</sup>各自为氯;

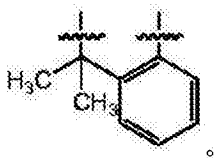
(iii)  $R^{1'}$  和  $R^{8'}$  各自为氢;

(iv)  $R^{1'}$  和  $R^{2'}$  或  $R^{7'}$  和  $R^{8'}$  一起形成苯并基团;

(v)  $R^{2'}$  和  $R^{7'}$  各自为氢或低级烷基;

(vi)  $R'$  是  $R^{3'}$  且  $R''$  是  $R^{6'}$ ; 及

(vii)  $R'$  是  $R^{3'}$ ,  $R''$  是  $R^{6'}$ , 且  $R^{3'}$  和  $R^{6'}$  与邻近碳原子上的取代基一起形成基团, 所述基团选自  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$  和



44. 根据权利要求1所述的试剂, 其中所述N-保护的NH-罗丹明部分具有一个或多个选自以下的可应用特征:

(i) Y选自  $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}-$  和  $-\text{NH}-$ ;

(ii)  $R^4$  和  $R^7$  各自为氯;

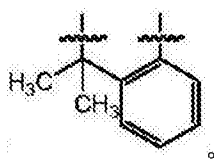
(iii)  $R^{1'}$  和  $R^{8'}$  各自为氢;

(iv)  $R^{1'}$  和  $R^{2'}$  或  $R^{7'}$  和  $R^{8'}$  一起形成苯并基团;

(v)  $R^{2'}$  和  $R^{7'}$  各自为氢或低级烷基;

(vi)  $R'$  是  $R^{3'}$  且  $R''$  是  $R^{6'}$ ; 及

(vii)  $R'$  是  $R^{3'}$ ,  $R''$  是  $R^{6'}$ , 且  $R^{3'}$  和  $R^{6'}$  与邻近碳原子上的取代基一起形成基团, 所述基团选自  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$  和



45. 根据权利要求1、20、33和34中任一项所述的试剂, 其中  $R^9$  是式  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$  的酰基, 其中  $R^{10}$  选自氢、低级烷基、甲基、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CHX}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{X}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{OR}^d$  及苯基, 其任选地被低级烷基、甲基、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OR}^d$ 、氰基或硝基单取代, 其中  $R^d$  选自低级烷基、苯基和吡啶基, 且每一个X是卤基团, 通常为氟或氯。

46. 根据权利要求45所述的试剂, 其中所述标记部分进一步包括所述N-保护的NH-罗丹明部分的供体和/或受体部分。

47. 根据权利要求45所述的试剂, 其中所述标记部分进一步包括所述N-保护的NH-罗丹明部分的供体部分。

48. 根据权利要求47所述的试剂, 其中所述供体部分包括N-保护的NH-罗丹明部分或O-保护的荧光素部分。

49. 一种寡核苷酸, 其包括标记部分, 所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分, 所述N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求45中所描述的结构。

50. 根据权利要求45所述的试剂, 其中  $R^{10}$  选自甲基和三氟甲基。

51. 根据权利要求1-18、20、24-34、36-37、42-44和50中任一项所述的试剂, 其中所述标记部分进一步包括所述N-保护的NH-罗丹明部分的供体和/或受体部分。

52. 一种寡核苷酸, 其包括标记部分, 所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分, 所述

N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求51中所描述的结构。

53. 根据权利要求1-18、20、24-34、36-37、42-44和50中任一项所述的试剂,其中所述标记部分进一步包括所述N-保护的NH-罗丹明部分的供体部分。

54. 一种寡核苷酸,其包括标记部分,所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分,所述N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求53中所描述的结构。

55. 根据权利要求53所述的试剂,其中所述供体部分包括N-保护的NH-罗丹明部分或O-保护的荧光素部分。

56. 根据权利要求23、40、48和55中任一项所述的试剂,其中所述供体部分的2'-、2''-、4'-、5'-、7'-、7''-、5-或6-位被连接到所述N-保护的NH-罗丹明部分的2'-、2''-、4'-、5'-、7'-、7''-、5-或6-位上。

57. 一种寡核苷酸,其包括标记部分,所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分,所述N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求56中所描述的结构。

58. 根据权利要求56所述的试剂,其中所述供体部分和所述N-保护的NH-罗丹明部分以头对头方位被连接。

59. 根据权利要求56所述的试剂,其中所述供体部分和所述N-保护的NH-罗丹明部分以头对尾方位被连接。

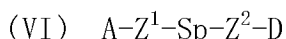
60. 根据权利要求56所述的试剂,其中所述供体部分和所述N-保护的NH-罗丹明部分以尾对尾方位被连接。

61. 根据权利要求56所述的试剂,其中所述供体部分和所述N-保护的NH-罗丹明部分以侧对侧方位被连接。

62. 根据权利要求56所述的试剂,其中所述供体部分和所述N-保护的NH-罗丹明部分以侧对头方位被连接。

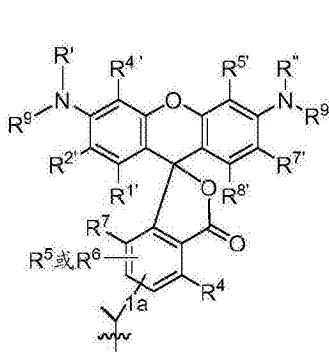
63. 根据权利要求56所述的试剂,其中所述供体部分和所述N-保护的NH-罗丹明部分以侧对尾方位被连接。

64. 根据权利要求56所述的试剂,其中所述标记部分包括结构式(VI):

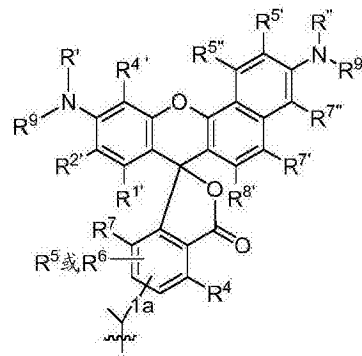


其中A代表所述N-保护的NH-罗丹明部分,D代表所述供体部分, $Z^1$ 和 $Z^2$ 可相同或不同,其代表包括官能团 $F^z$ 的连接部分所提供的键结的部分,且Sp代表间隔部分,其中 $F^z$ 包括表1所列的亲电基团或亲核基团。

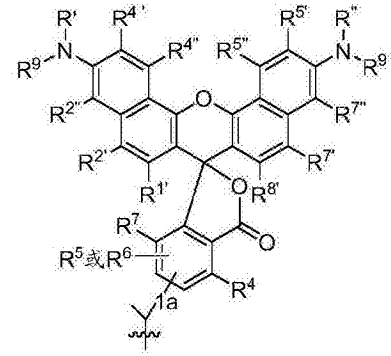
65. 根据权利要求64所述的试剂,其中A选自结构式A.1、A.2、A.3、A.4、A.5和A.6且D选自结构式D.1、D.2、D.3、D.4、D.5和D.6,或A选自结构式A.7、A.8、A.9、A.10、A.11和A.12且D选自结构式D.7、D.8、D.9、D.10、D.11和D.12:



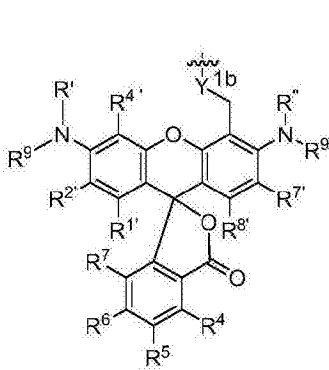
A.1



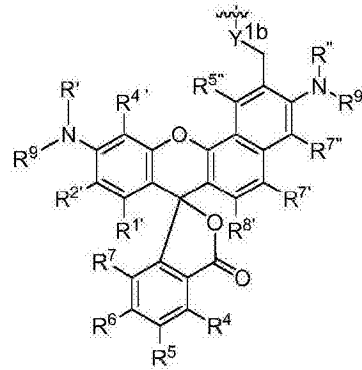
A.2



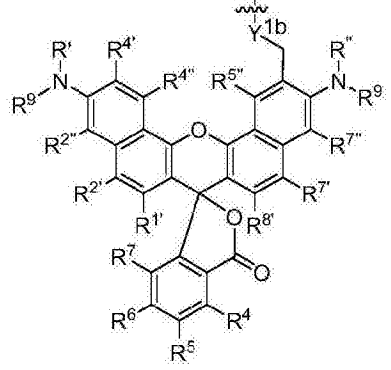
A.3



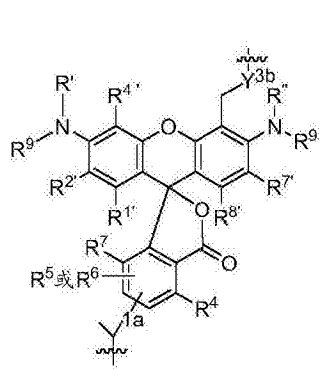
A.4



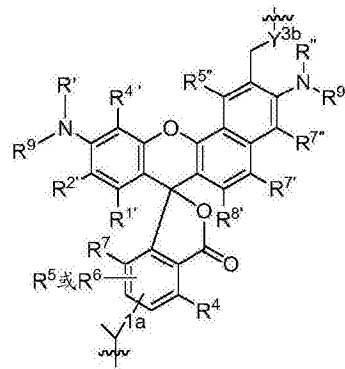
A.5



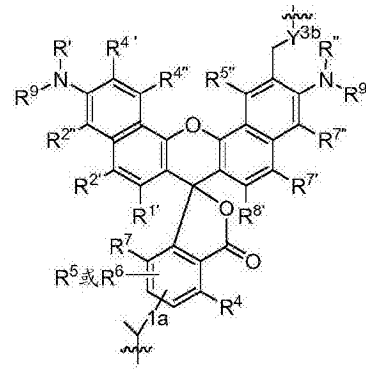
A.6



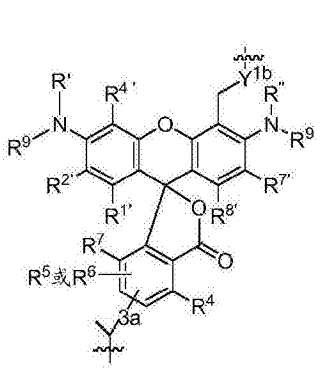
A.7



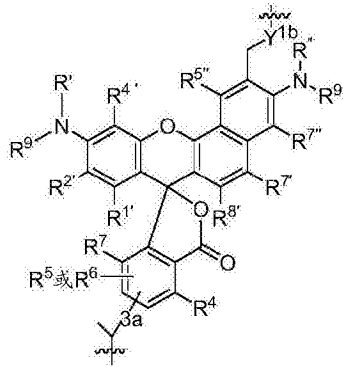
A.8



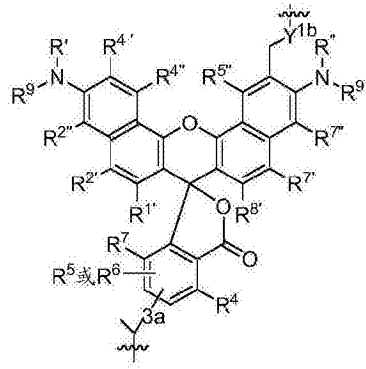
A.9



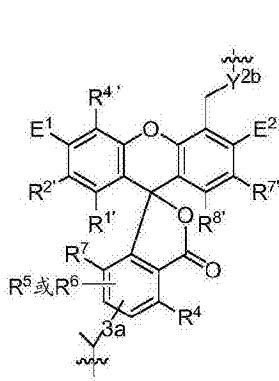
A.10



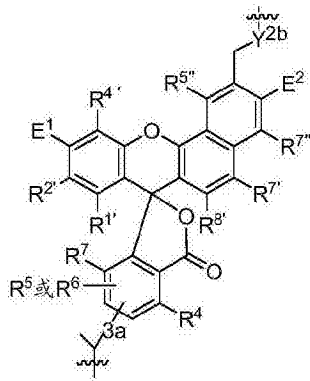
A.11



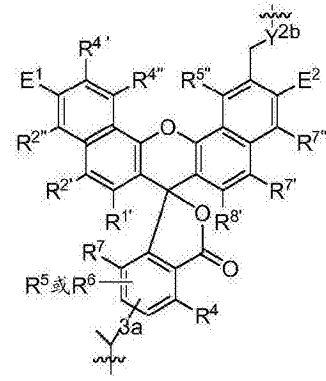
A.12



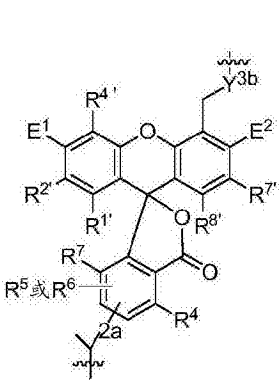
D.1



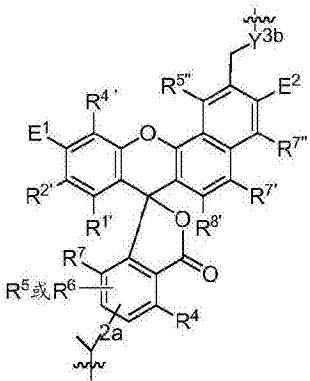
D.2



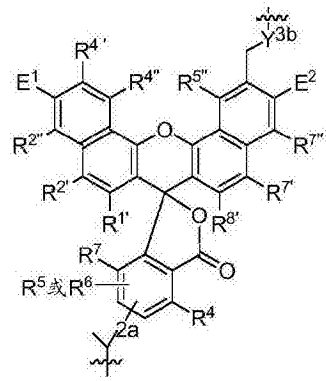
D.3



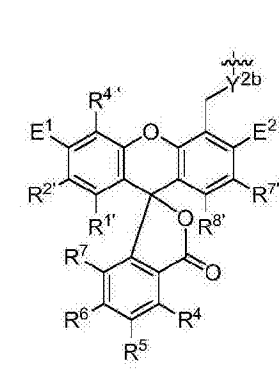
D.4



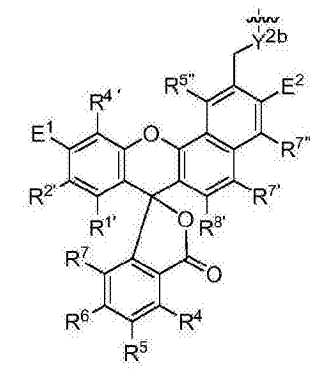
D.5



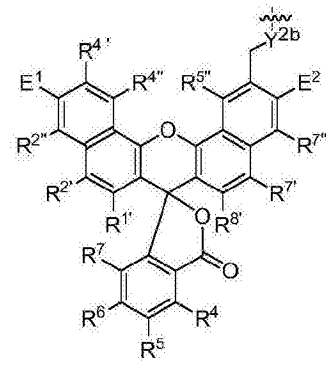
D.6



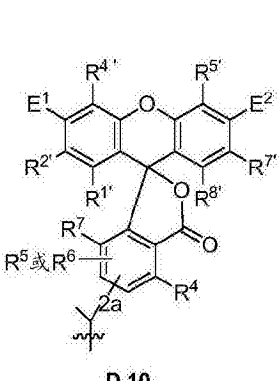
D.7



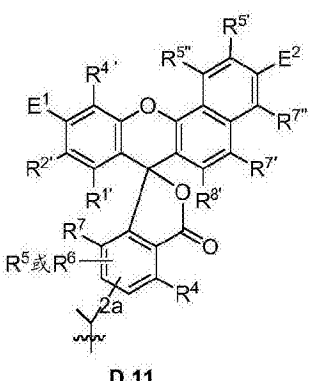
D.8



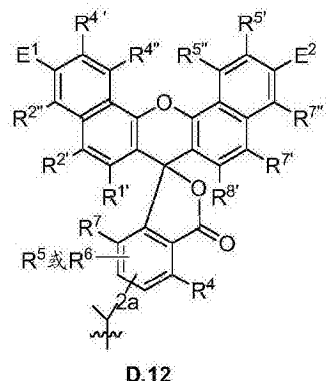
D.9



D.10



D.11



D.12

其中：

E<sup>1</sup>选自-NHR<sup>9</sup>、-NR<sup>3'</sup>R<sup>9</sup>和-OR<sup>9b</sup>；

$E^2$ 选自 $-NHR^9$ 、 $-NR^{6'}$ 、 $R^9$ 和 $-OR^{9b}$ ;

$R^{9b}$ 是 $R^9$ ;

$Y^{1a}$ 、 $Y^{1b}$ 、 $Y^{2a}$ 、 $Y^{2b}$ 、 $Y^{3a}$ 和 $Y^{3b}$ 各自彼此独立地选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-C(O-)$ 和 $-S(O)_2-$ ;且

其中:

$R'$ 选自 $R^{3'}$ 和氢;

$R''$ 选自 $R^{6'}$ 和氢;

$R^9$ 是酰基保护基团;

$R^1$ 、 $R^{2'}$ 、 $R^{2''}$ 、 $R^{4'}$ 、 $R^{4''}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{5''}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{7''}$ 、 $R^{8'}$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 和 $R^7$ ,当单独采用时,各自彼此独立地选自氢、低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、5-14元杂芳基、6-20元杂芳基烷基、 $-R^b$ 和 $-(CH_2)_x-R^b$ ,其中 $x$ 是范围从1到10的整数,且 $R^b$ 选自 $-X$ 、 $-OH$ 、 $-OR^a$ 、 $-SH$ 、 $-SR^a$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^a$ 、 $-NR^cR^c$ 、 $-N^+R^cR^cR^c$ 、全卤低级烷基、三卤代甲基、三氟甲基、 $-B(OH)_3$ 、 $-B(OR^a)_3$ 、 $-B(OH)O^-$ 、 $-B(OR^a)_2O^-$ 、 $-B(OH)(O^-)_2$ 、 $-B(OR^a)(O^-)_2$ 、 $-P(OH)_2$ 、 $-P(OH)O^-$ 、 $-P(OR^a)_2$ 、 $-P(OR^a)O^-$ 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(OH)O^-$ 、 $-P(O)(O^-)_2$ 、 $-P(O)(OR^a)_2$ 、 $-P(O)(OR^a)O^-$ 、 $-P(O)(OH)(OR^a)$ 、 $-OP(OH)_2$ 、 $-OP(OH)O^-$ 、 $-OP(OR^a)_2$ 、 $-OP(OR^a)O^-$ 、 $-OP(O)(OH)_2$ 、 $-OP(O)(OH)O^-$ 、 $-OP(O)(O^-)_2$ 、 $-OP(O)(OR^a)_2$ 、 $-OP(O)(OR^a)O^-$ 、 $-OP(O)(OR^a)(OH)$ 、 $-S(O)_2O^-$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(S)X$ 、 $-C(O)O^-$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR^a$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-C(S)NH_2$ 、 $-C(O)NHR^a$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-C(NH)NH_2$ 、 $-C(NH)NHR^a$ 和 $-C(NH)NR^cR^c$ ,其中 $X$ 是卤素,每个 $R^a$ 与其它彼此独立地选自低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、5-14元杂芳基和6-20元杂芳基烷基,且每个 $R^c$ 与其它彼此独立地为 $R^a$ ,或可选择地,两个键结到相同氮原子的 $R^c$ 可与所述氮原子一起形成5-到8-元饱和或不饱和环,所述环可任选地包括一个或多个相同或不同的通常选自O、N和S的环杂原子,

或可选择地, $R^{1'}$ 和 $R^{2'}$ 或 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 与它们所键结的碳原子一起形成任选地被取代的(C6-C14)芳基桥,和/或, $R^{4'}$ 和 $R^{4''}$ 和/或 $R^{5'}$ 和 $R^{5''}$ 与它们所键结的碳原子一起形成苯并基团;及

$R^{3'}$ 和 $R^{6'}$ ,当单独采用时,各自彼此独立地选自低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、5-14元杂芳基和6-20元杂芳基烷基,或可选择地,在结构式(IIIa)的化合物中的 $R^{3'}$ 和 $R^{2'}$ 或 $R^{4'}$ 和/或 $R^{6'}$ 和 $R^{5'}$ 或 $R^{7'}$ 、在结构式(IIIb)的化合物中的 $R^{3'}$ 和 $R^{2'}$ 或 $R^{4'}$ 和/或 $R^{6'}$ 和 $R^{5'}$ 或 $R^{7'}$ 或在结构式(IIIc)的化合物中的 $R^{3'}$ 和 $R^{2''}$ 或 $R^{4'}$ 和/或 $R^{6'}$ 和 $R^{5'}$ 或 $R^{7''}$ 与它们所键结的原子一起形成5-或6-元饱和或不饱和环,所述环任选地被一个或多个相同或不同的低级烷基、苯并基团或吡啶并基团取代,

条件是,在结构式(IIIa)的化合物中的 $R^{2'}$ 、 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^5$ 或 $R^6$ 中至少一个,在结构式(IIIb)的化合物中的 $R^{2'}$ 、 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{7''}$ 、 $R^5$ 或 $R^6$ 中至少一个和在结构式(IIIc)的化合物中的 $R^{2''}$ 、 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{7''}$ 、 $R^5$ 或 $R^6$ 中至少一个包括式 $-Y-$ 的基团,其中 $Y$ 代表官能团 $F^y$ 所贡献的键结中的一部分,其中 $F^y$ 包括表1所列的亲电基团或亲核基团,条件是当 $E^1$ 和 $E^2$ 是 $-OR^{9b}$ 时,则 $R^{1'}$ 和 $R^{2'}$ 和/或 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 可仅与它们所键结的碳原子一起形成任选取代的(C6-C14)芳基桥。

66. 根据权利要求65所述的试剂,其中结构式A.1-A.12和/或D.1-D.12具有一个或多个选自以下的可应用特征:

(i)  $Y^{1a}$ 、 $Y^{2a}$ 和 $Y^{3a}$ 各自彼此独立地选自 $-C(O)-$ 和 $-S(O)_2-$ ;

(ii)  $Y^{1b}$ 、 $Y^{2b}$ 和 $Y^{3b}$ 是 $-NH-$ ;

(iii)  $R^4$ 和 $R^7$ 各自为氯;

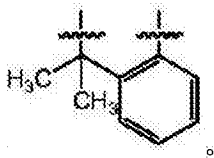
(iv)  $R^1$ 和 $R^8$ 各自为氢;

(v)  $R^{1'}$  和  $R^{2'}$  或  $R^{7'}$  和  $R^{8'}$  一起形成苯并基团；

(vi)  $R^{2'}$  和  $R^{7'}$  各自为氢或低级烷基；

(vii)  $R'$  是  $R^{3'}$  且  $R''$  是  $R^{6'}$ ；及

(viii)  $R'$  是  $R^{3'}$ ,  $R''$  是  $R^{6'}$ , 且  $R^{3'}$  和  $R^{6'}$  与邻近碳原子上的取代基一起形成基团, 所述基团选自  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$  和



67. 根据权利要求65所述的试剂, 其中  $Y^{1a}$ 、 $Y^{2a}$  和  $Y^{3a}$  是  $-\text{NH}-$ ;  $Y^{1b}$ 、 $Y^{2b}$  和  $Y^{3b}$  选自  $-\text{C}(\text{O})-$  和  $-\text{S}(\text{O})_2-$ ;  $Z^1$  选自  $-\text{C}(\text{O})-$  和  $-\text{S}(\text{O})_2-$ ;  $Z^2$  是  $-\text{NH}-$  且  $\text{Sp}$  选自  $-(\text{CH}_2)_a-[(\text{Ar})_b-(\text{CH}_2)_a]_c-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a-[\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_a]_c-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a-[\text{C}\equiv\text{C}-(\text{Ar})_b]_c-$ 、 $-(\text{CH}_2)_a-$ 、 $-(\text{CH}_2)_d-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-[(\text{CH}_2)_a-(\text{Ar})-(\text{CH}_2)_a-\text{C}(\text{O})-\text{NH}]_c-$ 、 $-(\text{CH}_2)_d-$  和  $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_e\text{O}]_f-\text{CH}_2(\text{CH}_2)-$ , 其中

每个  $a$  与其它彼此独立地代表范围为从0到4的整数；

每个  $b$  与其它彼此独立地代表范围为从1到2的整数；

每个  $c$  与其它彼此独立地代表范围为从1到5的整数；

每个  $d$  与其它彼此独立地代表范围为从1到10的整数；

每个  $e$  与其它彼此独立地代表范围为从1到4的整数；

每个  $f$  与其它彼此独立地代表范围为从1到10的整数；且

每个  $\text{Ar}$  与其它彼此独立地代表任选取代的单环或多环的环烃撑、环杂烃撑、芳撑或杂芳撑基团。

68. 根据权利要求65-67中任一项所述的试剂, 其中在结构式D.1-D.12中,  $R^{1'}$  和  $R^{2'}$  和/或  $R^{7'}$  和  $R^{8'}$  与它们所键结的碳原子一起形成苯并桥。

69. 根据权利要求68所述的试剂, 其中  $E^1$  和  $E^2$  各自为  $-\text{OR}^{9b}$ 。

70. 根据权利要求69所述的试剂, 其中  $R^{9b}$  是式  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10b}$  的芳基, 其中  $\text{R}^{10b}$  是低级烷基。

71. 一种寡核苷酸, 其包括标记部分, 所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分, 所述N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求68中所描述的结构。

72. 根据权利要求65-67中任一项所述的试剂, 其中  $E^1$  和  $E^2$  各自为  $-\text{OR}^{9b}$ 。

73. 根据权利要求72所述的试剂, 其中  $\text{R}^9$  是式  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$  的酰基, 其中  $\text{R}^{10}$  选自氢、低级烷基、甲基、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CHX}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{X}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{OR}^d$  和苯基, 其任选地被低级烷基、甲基、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OR}^d$ 、氰基或硝基单取代, 其中  $\text{R}^d$  选自低级烷基、苯基和吡啶基, 且每一个  $\text{X}$  是卤基团, 通常为氟或氯。

74. 一种寡核苷酸, 其包括标记部分, 所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分, 所述N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求72中所描述的结构。

75. 根据权利要求72所述的试剂, 其中  $\text{R}^{9b}$  是式  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10b}$  的芳基, 其中  $\text{R}^{10b}$  是低级烷基。

76. 根据权利要求75所述的试剂, 其中  $\text{R}^9$  是式  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$  的酰基, 其中  $\text{R}^{10}$  选自氢、低级烷基、甲基、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CHX}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{X}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{OR}^d$  和苯基, 其任选地被低级烷基、甲基、 $-\text{X}$ 、 $-\text{OR}^d$ 、氰基或硝基单取代, 其中  $\text{R}^d$  选自低级烷基、苯基和吡啶基, 且每一个  $\text{X}$  是卤基团, 通常为氟或氯。

77. 根据权利要求73或76所述的试剂, 其中  $\text{R}^{10}$  选自甲基和三氟甲基。

78. 一种寡核苷酸, 其包括标记部分, 所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分, 所述

N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求75中所描述的结构。

79. 根据权利要求75所述的试剂,其中R<sup>10b</sup>是叔丁基。

80. 根据权利要求65-67、69和79中任一项所述的试剂,其中R<sup>9</sup>是式-C(O)R<sup>10</sup>的酰基,其中R<sup>10</sup>选自氢、低级烷基、甲基、-CX<sub>3</sub>、-CHX<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>X、-CH<sub>2</sub>-OR<sup>d</sup>和苯基,其任选地被低级烷基、甲基、-X、-OR<sup>d</sup>、氰基或硝基单取代,其中R<sup>d</sup>选自低级烷基、苯基和吡啶基,且每一个X是卤基团,通常为氟或氯。

81. 一种寡核苷酸,其包括标记部分,所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分,所述N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求80中所描述的结构。

82. 根据权利要求80所述的试剂,其中R<sup>10</sup>选自甲基和三氟甲基。

83. 一种寡核苷酸,其包括标记部分,所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分,所述N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求82中所描述的结构。

84. 一种寡核苷酸,其包括标记部分,所述标记部分包括N-保护的NH-罗丹明部分,所述N-保护的NH-罗丹明部分包括在权利要求1中所描述的结构。

85. 根据权利要求84所述的寡核苷酸,其中所述N-保护的NH-罗丹明部分进一步包括在权利要求20-23、33-34、36-40、42-44、46-48、50、55、58-67、69-70、73、76和79中任一项所描述的结构。

86. 根据权利要求84所述的寡核苷酸,其中所述标记部分被连接到所述寡核苷酸的3'-或5'-羟基上。

87. 根据权利要求84所述的寡核苷酸,其中所述标记部分被连接到所述寡核苷酸的核碱基上。

88. 根据权利要求84所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸被连接到固相支持体上。

89. 根据权利要求84所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸进一步用所述N-保护的NH-罗丹明部分的供体和/或受体部分标记。

90. 根据权利要求84所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸进一步用猝灭剂部分标记。

91. 根据权利要求84所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸进一步用小沟结合部分标记。

## 用于合成罗丹明-标记的寡核苷酸的试剂

[0001] 1. 相关申请的交叉引用

[0002] 此申请根据35U.S.C. §119(e), 要求2006年3月31日提出申请的临时申请第60/787,777号的权利, 其公开整体内容上通过引用被合并于本文。

[0003] 2. 背景技术

[0004] 已发现荧光染料作为检测标记广泛用于分子生物学、细胞生物学和分子遗传学的用途。例如, 荧光-标记的寡核苷酸现在在多种不同试验中被使用, 所述试验包括多核苷酸测序、荧光原位杂交(FISH)、针对核酸阵列的杂交试验、荧光极化研究和核酸扩增试验, 包括用荧光探针和/或引物进行的聚合酶链式扩增试验。

[0005] 一些荧光标记可被连接到新生的(nascent)或完成的寡核苷酸链, 其使用荧光亚磷酰胺试剂原位合成。例如, 荧光素亚磷酰胺试剂是市场可购买的(参见, 如, Glen Research Corporation, Sterling, VA的2006年产品目录)。在此类试剂中, 荧光素环的3'-和6'-环外氧原子用新戊酰基保护以防止副反应。用这些基团对荧光素(fluorescein)环的修饰也使羧酸酯基团以封闭的螺环内酯形式处于3-位, 防止质子从羧酸酯贡献给亚磷酰胺基团, 所述贡献可将此亚磷酰胺基团转化为好的离去基团, 导致试剂分解。荧光素环也对用于氧化新生的寡核苷酸的条件及对以水相铵的处理稳定, 所述水相铵的处理为除去核碱基保护基团及从合成树脂中剪切合成的寡核苷酸的标准方法。

[0006] 遗憾的是, 当使用通常用于氧化和脱保护/剪切合成的寡核苷酸的试剂处理时, 许多罗丹明染料易受化学修饰, 消极影响它们的荧光性质。作为结果, 罗丹明染料通常被连接到合成、脱保护及从合成树脂中剪切之后的寡核苷酸上。这增加了额外的步骤和人力劳动, 导致在罗丹明-标记的寡核苷酸的整体合成中, 较大的成本和不便。

[0007] 由于这些及其它限制, 目前仅存在两种市场可购买的作为亚磷酰胺试剂的罗丹明染料: 四甲基罗丹明("TAMRA")和罗丹明X("ROX")。期待在固相化学合成中允许用各式各样不同罗丹明染料标记寡核苷酸的其它试剂。

[0008] 3. 发明内容

[0009] 在一方面, 本公开提供可用于以包括罗丹明染料的标记标记合成的寡核苷酸的试剂, 所述罗丹明染料当用适当波长入射光照射时发荧光。标记可包括单一罗丹明染料, 或它们可包括染料网络, 其中至少一种染料是罗丹明染料。试剂可用于在寡核苷酸的分步合成中以含有罗丹明染料的标记直接标记合成的寡核苷酸, 因此减少为得到以罗丹明染料标记的寡核苷酸的必要的操作步骤。此外, 因为标记在分步合成中被直接连接到寡核苷酸上, 不需要将未耦合标记从标记的寡核苷酸中HPLC分离, 所述分离当使用目前可得合成后罗丹明标记试剂如罗丹明NHS酯时是需要的。

[0010] 试剂可用于在它的3'-端、在它的5-端和/或在一个或多个内部位置上标记寡核苷酸。所得到的标记可被连接到寡核苷酸的端位羟基、连接到一个或多个包括寡核苷酸的核碱基上, 或它可位于两个包括寡核苷酸链的核苷酸之间。因此, 试剂可采用非核苷合成试剂形式(见, 如图3A、3B和5)、核苷合成试剂形式(见, 如图4和6)、非核苷固相支持体形式(见, 如图7)和/或核苷固相支持体形式(见, 如图8A和8B)。

[0011] 合成试剂一般包括标记部分、磷酸酯前体(“PEP”)基团和任选的将磷酸酯前体基团连接到标记部分的连接体。磷酸酯前体基团一般包括官能团,当其在寡核苷酸的分步合成中使用,在任选的脱保护和/或氧化之后,最终产生核苷酸间磷酸酯键结。适于合成核苷酸间磷酸酯键结的若干类型化学反应和官能团在本领域中已知,且包括,通过例子的方式且非限制,亚磷酸三酯化学反应,其利用亚磷酸酰胺PEP基团(见,如Letsinger等人,1969, J. Am. Chem. Soc. 91:3350-3355; Letsinger等人,1975, J. Am. Chem. Soc. 97:3278; Matteucci & Caruthers, 1981, J. Am. Chem. Soc. 103:3185; Beaucage & Caruthers, 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859)、磷酸三酯化学反应,其利用2-氯苯基-或2,5-二氯苯基-磷酸酯PEP基团(见,如Sproat & Gait, “Solid Phase synthesis of Oligonucleotides by the Phosphotriester Method”(用磷酸三酯方法固相合成寡核苷酸),在: Oligonucleotide synthesis, A Practical Approach, Gait, 编辑, 1984, IRL Press, 83-115页)和H-磷酸酯化学反应,其利用H-磷酸酯PEP基团(见,如Garegg等人,1985, Chem. Scr. 25:280-282; Garegg等人,1986, Tet. Lett. 27:4051-4054; Garegg等人,1986, Tet. Lett. 27:4055-4058; Garegg等人,1986, Chem. Scr. 26:59-62; Froehler & Matteucci, 1986, Tet. Lett. 27:469-472; Froehler等人,1986, Nucl. Acid Res. 14:5399-5407)。所有这些不同的PEP基团,及随后发现的PEP基团,可包括本文描述的合成试剂的磷酸酯前体基团。PEP基团的种类对于成功并不重要,且将取决于预期的用于合成标记的寡核苷酸的化学反应。在一些实施方式中,磷酸酯前体基团包括亚磷酸酰胺基团。

[0012] 任选的连接标记部分和磷酸酯前体基团的连接体实际上可包括对用于合成标记的寡核苷酸的合成条件稳定的原子或官能团的任何组合且在结构上可为直链、支链或环,或可包括直链、支链和/或环结构的组合。连接体可被设计为具有指定性质,如可在预期条件下被剪切的能力。

[0013] 合成试剂可任选地进一步包括一个或多个合成片断(synthesis handle),核苷或其它基团或部分可被连接到所述合成片断上。合成片断可包括保护基团,其在标记的寡核苷酸的分步合成中可被选择性地除去,允许在合成的寡核苷酸从树脂上剪切之前连接部分到合成的寡核苷酸上,或替代地,合成片断可包括保护基团,其对被用于脱保护合成的寡核苷酸(oligonucleotide)和/或从合成树脂上剪切合成的寡核苷酸(oligonucleotide)的条件稳定,允许在合成、脱保护和从合成树脂上剪切之后连接部分到合成的标记的寡核苷酸上。组成包括多于一种合成片断的合成试剂的合成片断可相同或不同。

[0014] 在一些实施方式中,合成试剂包括单一的任选的合成片断,其包括式  $-OR^e$  的被保护的羟基,其中  $R^e$  代表对酸不稳定的保护基团。

[0015] 合成片断可被连接到标记部分,或它可被包括在任选的连接标记部分和磷酸酯前体基团的连接体中。其中式  $-OR^e$  的合成片断被包括在任选的连接体中的实施方式,本质上可为非核苷或本质上为核苷,在其后者情况下,连接体包括核苷且合成片断被在核苷糖部分上的羟基所提供,所述羟基通常为核苷糖部分的5'-羟基。其中连接体包括合成片断的非核苷合成试剂的具体非限制性实施方式在图5中被阐述。其中连接体包括合成片断的核苷合成试剂的具体非限制性实施方式在图6中被阐述。

[0016] 固相支持体试剂一般包括标记部分、其中  $R^e$  如上文定义的式  $-OR^e$  的合成片断、固相支持体和将标记部分和合成片断连接到固相支持体上的连接体。合成片断提供核苷单体试

剂可被偶联到其上的基团。固相支持体试剂可任选地包括一个或多个额外的合成片断,其可为相同或不同的。

[0017] 适于在寡核苷酸的固相合成中用作为固相支持体的范围广泛的各种物质在本领域中已知,其含有适当的官能团,或其可被衍生化以含有适当的官能团,且包括,例如但不限于,可控孔玻璃(CPG)、聚苯乙烯和各种接枝共聚物。所有这些不同种类物质适于在本文描述的固相支持体试剂中用作固相支持体。

[0018] 固相支持体的形状不重要。实质上可使用任何形状。例如,固相支持体可为球形或不规则成形的珠、立方体、长方体、圆柱体、圆柱管或甚至是薄片的形式。固相支持体可有孔或无孔。在一些实施方式中,固相支持体是CPG或聚苯乙烯珠。

[0019] 将标记部分和合成片断连接到固相支持体的连接体包括本质上对通常用于固相合成寡核苷酸的合成条件稳定的原子或官能团的任何组合且在结构上可为直链、支链或环,或可包括直链、支链和/或环结构的组合。连接体可被设计为具有指定性质,如在预期条件下可被剪切的能力。在一些实施方式中,连接体包括在指定条件下可被剪切以从试剂剩余物中释放固相支持体的键结。例如,连接体可包括在寡核苷酸合成条件下稳定并对用于脱保护被合成寡核苷酸的条件(例如,在55°C或室温下,在氢氧化铵中温育)不稳定的键结。此类特定可剪切的键结在本领域中众所周知,且包括,例如但不限于,酯、碳酸酯、二异丙基硅氧基醚、改性的磷酸酯等。

[0020] 如上文对合成试剂的描述,固相支持体试剂的连接体可包括合成片断,且本质上可为核苷或非核苷。非核苷固相支持体试剂的具体非限制性实施方式在图7中被阐述。核苷固相支持体试剂的具体非限制性实施方式在图8A和8B中被阐述。

[0021] 本文描述的合成和固相支持体试剂的标记部分包括罗丹明染料。在罗丹明染料的3'-和6'-位的环外氮原子是未被取代的或被单取代的,因此它们被归为伯胺或仲胺,且进一步被保护基团取代(在它们的3'-和6'-位具有伯胺或仲胺基团的未被保护的罗丹明染料被本文称作“NH-罗丹明”,而在它们的3'-和6'-位具有保护基团的罗丹明染料被本文称作“N-保护的NH-罗丹明”)。

[0022] 保护基团实质上可为任何特定可除去的基团,其对将被用于合成标记的寡核苷酸的合成条件稳定,例如通常用于固相合成寡核苷酸的亚磷酸三酯化学反应条件。已发现用形成酰胺(如,例如羧酰胺、磺酰胺、磷酰胺等)的基团保护NH-罗丹明的3'-和6'-仲胺或伯胺,允许N-保护的NH-罗丹明以封闭的内酯形式存在,从而允许罗丹明用于寡核苷酸的分步合成中以方便地合成包括罗丹明染料的寡核苷酸而不需要合成后操作或纯化。如在工作例子中所阐述的,包括此类N-保护的NH-罗丹明的亚磷酰胺试剂在通常用于寡核苷酸分步合成中的溶剂中是可溶的,对多轮DMT脱保护、偶联、氧化和加帽的条件稳定且也对用浓氢氧化铵的处理稳定,所述浓氢氧化铵的处理是通常用于脱保护任何环外胺保护基团及从合成树脂上剪切合成的寡核苷酸的条件。

[0023] 保护基团可为不稳定的,且因此在用于除去合成的标记的寡核苷酸的核碱基保护基团的条件下可被除去,或可选择地,保护基团可对这些条件稳定且对其它条件不稳定。在大多数例子中,使用对用于除去合成的标记的寡核苷酸的核碱基保护基团和/或从合成树脂上剪切标记的合成的寡核苷酸(oligonucleotide)的条件不稳定的保护基团将可能为需要的。

[0024] 在一些实施方式中,保护基团是式-C(O)R<sup>10</sup>的酰基,其中R<sup>10</sup>选自低级烷基、甲基、-CX<sub>3</sub>、-CHX<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>X、-CH<sub>2</sub>-OR<sup>b</sup>和苯基,其任选地被低级烷基、甲基、X、-OR<sup>b</sup>、氰基或硝基单取代,其中R<sup>b</sup>选自低级烷基、吡啶基和苯基且每一个X是卤素基团,通常为氟、氯或溴。在具体的非限制性实施方式中,R<sup>10</sup>为叔丁基或三氟甲基。

[0025] 标记部分可进一步包括其它被保护的荧光团,以致于N-保护的NH-罗丹明染料是较大的、能量传递染料网络的成员。此类能量传递染料网络在本领域中众所周知,且包括荧光团的组合,所述荧光团的光谱性质是匹配的,或所述荧光团彼此间的相对距离适宜,以致于当用适当波长的入射照射激发时,在网络中的一个荧光团将它的激发能量传递给在网络中的另一个荧光团,其反过来将它的激发能量传递给在网络中的另外一个其它荧光团,以此类推,导致在网络中的最终受体荧光团发荧光。此类网络产生具有长的斯托克斯位移(Stokes shifts)的标记。在此类网络中,将它们的激发能量传递或贡献给网络中另一个荧光团的荧光团被称作“供体”。从另一个荧光团和相关荧光素试剂接收或接受激发能量的荧光团被称作“受体”。在仅含有两种染料的染料网络中,一个染料通常作为供体起作用且另一个作为受体。在含有三个或更多个不同染料的染料网络中,至少一种染料作为供体和受体两者起作用。

[0026] 含有两个、三个、四个或甚至更多染料能量传递染料网络在本领域中众所周知(参见,如US 2006/057565)。任何用在这些网络中的可被适合地保护以用在寡核苷酸固相合成中的染料可包括在本文描述的标记部分中。

[0027] 在本文描述的合成和固相支持体试剂的一些实施方式中,标记部分进一步包括N-保护的NH-罗丹明的适当保护的供体。当脱保护时,此类供体将它们的激发能量传递给NH-罗丹明以致于当供体被激发时NH-罗丹明发出荧光。

[0028] 在本文描述的合成和固相支持体试剂的一些实施方式中,标记部分进一步包括N-保护的NH-罗丹明的适当保护的受体。当脱保护时,此类受体从供体NH-罗丹明接受激发能量以致于当供体NH-罗丹明被激发时受体发荧光。

[0029] 供体或受体的种类(identities)将取决于组成标记部分的NH-罗丹明的种类。能够作为多种罗丹明染料的供体起作用的荧光团的例子在本领域中众所周知。此类供体的非限制性例子包括氧杂蒽染料(如,例如荧光素、罗丹明和对甲氨基酚)、芘染料、香豆素染料(例如羟基香豆素和氨基香豆素)、菁染料、酞菁染料和镧系(lanthanide)复合物。能够作为罗丹明染料受体起作用的荧光团的例子也在本领域中众所周知。此类受体的非限制性例子包括罗丹明染料和菁染料。任何这些可适当保护以在用于合成寡核苷酸的条件使用的染料,可被用作本文描述的合成和固相支持体试剂中的供体或受体,所述条件如通常用于固相合成寡核苷酸的亚磷酸三酯化学条件。

[0030] 能量从供体传递到受体所依据的机制并不重要。对于此类供体-受体对的可行所必要的是受体响应供体的激发而发荧光。

[0031] 标记部分也可包括不发荧光的受体。此类不发荧光的受体可被用于使组成标记部分的NH-罗丹明或其它荧光染料的荧光全部或部分猝灭。此类可作为罗丹明染料(如本文描述NH-罗丹明)猝灭剂起作用的不发荧光的部分的例子包括但不限于,DABCYL、在WO 01/86001中描述的各种不发荧光的猝灭剂和在美国专利US 2005/0164225中描述的各种不发荧光的猝灭剂,其公开通过引用被合并于本文。

[0032] 在一些实施方式中,标记部分进一步包括供体染料,其反过来包括如本文描述的N-保护的NH-罗丹明染料,或其中环外(exocyclic)3'-和6'-氧原子被保护基团保护的荧光素染料,所述保护基团对寡核苷酸合成条件,如通常用于固相合成寡核苷酸的亚磷酸三酯化学条件稳定,且对用于脱保护合成的寡核苷酸的条件不稳定。适合的保护基团在本领域中众所周知且包括,例如但不限于,酰基碳酸酯和氨基甲酸酯。包括在3'-和6'-环外氧原子上的保护基团的荧光素染料被本文称为“O-保护荧光素”。在具体的、非限制性实施方式中,在O-保护荧光素上的保护基团是酰基。

[0033] N-保护的NH-罗丹明或O-保护荧光素供体染料和N-保护的NH-罗丹明受体染料可以各种方位被直接或借助于连接体而彼此连接。在一些实施方式中,供体经由它的2'-、2''-、4'-、5'-、7'-、7''-、5-或6-位,任选地借助于连接体连接到N-保护的NH-罗丹明受体的2'-、2''-、4'-、5'-、7'-、7''-、5-或6-位上。在一些实施方式中,供体和受体以头对头、头对尾、尾对尾 或侧对侧方位彼此连接,如将在稍后章节中更详细地描述的。

[0034] 连接染料的任选的连接体可包括本质上对寡核苷酸合成条件,如通常用于固相合成寡核苷酸的亚磷酸三酯化学条件稳定的原子和/或官能团的任何组合。可选择原子和/或官能团的组合以按需要调整连接体的性质和/或长度。用于将在能量传递染料网络环境中的荧光素和罗丹明染料彼此连接的各种连接体在本领域中已知(参见,如US 2006/057565、美国专利第7,015,000号、美国专利第6,627,748号、美国专利第6,544,744号、美国专利第6,177,247号、美国专利第6,150,107号、美国专利第6,028,190号、美国专利第5,958,180号、美国专利第5,869,255号、美国专利第5,853,992号、美国专利第5,814,454号、美国专利第5,804,386号、美国专利第5,728,528号、美国专利第5,707,804号和美国专利第5,688,648号,其公开通过引用合并于本文。)所有这些连接体可被用于将O-保护的荧光素连接到本文描述的试剂中的N-保护的NH-罗丹明上。在一些实施方式中,连接体本质上是刚性的且长度约为  $8\text{\AA}$  到  $16\text{\AA}$ 。

[0035] 合成试剂的标记部分、磷酸酯前体基团和任选的合成片断,及固相支持体试剂的标记部分、固相支持体和合成片断可以不影响各种基团和部分展现它们各自功能的能力的任何方式或方位彼此连接。标记部分通常经由被连接到一个组成标记部分的染料的官能团上的连接体被连接到一个组成特定试剂的其它部分或基团上,或可选择地,被连接到连接两个或更多个染料网络的染料连接体上。在其中标记部分仅包括单一N-保护的NH-罗丹明荧光团的实施方式中,标记部分可经由NH-罗丹明环上的任何位置被连接到试剂上,所述位置不影响NH-罗丹明环以封闭的螺环内酯形式存在的能力。适当位置包括,但不限于,与环外(exocyclic)氮原子临近的碳原子,或在苯基部分上的原子,如,例如,罗丹明染料的2'-、2''-、4'-、5'-、7'-、7''-、5-或6-位。在一些实施方式中,标记部分经由N-保护的NH-罗丹明染料的5-或6-位被连接到试剂的基团或部分上。

[0036] 在其中标记部分包括染料网络的实施方式中,标记部分可在组成网络的任何一个染料的不影响试剂预期功能的任何位置被连接到试剂的任何基团或部分上,或被连接到连接网络的两个或更多个染料连接体上。在一些具体实施方式中,其中标记部分除N-保护的NH-罗丹明受体外,还包括O-保护的荧光素或N-保护的NH-罗丹明供体,标记部分可在供体或受体上的任何可利用的位置被连接到试剂的基团或部分上,所述位置如,例如供体或受体的2'-、2''-、4'-、5'-、7'-、7''-、5-或6-位。在一些实施方式中,标记部分经由供体或受

体的5-或6-位被连接到试剂(reagent)的基团或部分上。

[0037] 在一些实施方式中,标记部分经由连接供体和N-保护的NH-罗丹明受体的连接体被连接到试剂的基团或部分上。

[0038] 在其它方面,本公开提供了用于合成本文描述的试剂的中间体分子、制造本文描述的试剂的方法、用本文描述的试剂标记的化合物如,例如,标记的(labeled)寡核苷酸或多核苷酸,及在各种环境下使用标记的化合物的方法。本公开所有各个方面被下文更详细地描述。

[0039] 4.附图说明

[0040] 图1A和1B提供可被整合入本文描述的试剂中的母体NH-罗丹明染料的示例性实施方式;

[0041] 图1C提供了母体荧光素染料的示例性实施方式,所述母体荧光素染料可作为NH-罗丹明供体起作用且其可被整合入本文在实施方式中描述的试剂中,在所述实施方式中标记部分包括染料网络;

[0042] 图2提供了可用于将组成本文描述的试剂的各种不同部分彼此连接的示例性连接体;

[0043] 图3A和3B提供了不包括合成片断的非核苷合成试剂的示例性实施方式;

[0044] 图4提供了不包括合成片断的核苷合成试剂的示例性实施方式;

[0045] 图5提供了包括合成片断的非核苷合成试剂的示例性实施方式;

[0046] 图6提供了包括合成片断的核苷合成试剂的示例性实施方式;

[0047] 图7提供了非核苷固相支持体试剂的示例性实施方式;

[0048] 图8A和8B提供了核苷固相支持体试剂的示例性实施方式;

[0049] 图9A-9D阐述了具体实施方式的合成试剂用于合成寡核苷酸的用途,所述寡核苷酸在它的5'-羟基上用NH-罗丹明染料标记;

[0050] 图10A-10C阐述了具体实施方式的合成试剂用于合成寡核苷酸的用途,所述寡核苷酸在它的3'-羟基上用能量传递染料标记;

[0051] 图11A-11D阐述了具体实施方式的合成试剂用于原位合成寡核苷酸的用途,所述寡核苷酸在它的5'-羟基上用能量传递染料标记;及

[0052] 图12A-12C阐述了连接体亚磷酸胺和具体实施方式的合成试剂用于原位合成寡核苷酸的用途,所述寡核苷酸在它的5'-端用能量传递染料标记。

[0053] 5.发明详述

[0054] 将理解前文的概括描述和下文的详细描述皆仅为示例性及说明性,并不意为是对本文描述的组合物和方法的限制。在此公开中,除非另有说明,使用“或”指“和/或”。相似地,表达“包含(comprise)”、“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“包括(include)”、“包括(includes)”和“包括(including)”不意为限制。

[0055] 5.1定义

[0056] 如本文所使用的,以下术语和用语意为具有以下含义:

[0057] 单独的或作为其它取代基一部分的“烷基”指饱和的或不饱和的支链、直链或环的单价烷基,其具有指定数量的碳原子(即,C1-C6指一个到六个碳原子),其通过从母体烷烃、烯烃或炔烃的单独碳原子上除去一个氢原子而生成。典型的烷基包括,但不限于,甲基;乙

基如乙烷基、乙烯基、乙炔基；丙基如丙烷-1-基、丙烷-2-基、环丙烷-1-基、丙-1-烯-1-基、丙-1-烯-2-基、丙-2-烯-1-基、环丙-1-烯-1-基、环丙-2-烯-1-基、丙-1-炔-1-基、丙-2-炔-1-基等；丁基如丁烷-1-基、丁烷-2-基、2-甲基-丙烷-1-基、2-甲基-丙烷-2-基、环丁烷-1-基、丁-1-烯-1-基、丁-1-烯-2-基、2-甲基-丙-1-烯-1-基、丁-2-烯-1-基、丁-2-烯-2-基、丁-1,3-二烯-1-基、丁-1,3-二烯-2-基、环丁-1-烯-1-基、环丁-1-烯-3-基、环丁-1,3-二烯-1-基、丁-1-炔-1-基、丁-1-炔-3-基、丁-3-炔-1-基等；及类似基团。在意指特定饱和和水平的情况下，使用命名“烷基”、“烯基”和/或“炔基”，其如下文定义。被本文使用的“低级烷基”指(C1-C8)烷基。

[0058] 单独的或作为其它取代基一部分的“烷基”指饱和支链、直链或环烷基，其通过从母体烷烃的单独碳原子上除去一个氢原子而生成。典型的烷基包括，但不限于，甲基；乙烷基；丙烷基如1-丙基、2-丙基(异丙基)、环-1-丙基等；丁烷基如1-丁基、2-丁基(仲丁基)、2-甲基-1-丙基(异丁基)、2-甲基-2-丙基(叔丁基)、环-1-丁基等；及类似基团。被本文使用的“低级烷基”指(C1-C8)烷基。

[0059] 单独的或作为其它取代基一部分的“烯基”指不饱和支链、直链或环烷基，其具有至少一个碳-碳双键，其通过从母体烯烃的单独碳原子上除去一个氢原子而生成。基团针对双键可为顺式或反式构象。典型的烯基包括，但不限于，乙烯基；丙烯基如丙-1-烯-1-基、丙-1-烯-2-基、丙-2-烯-1-基、丙-2-烯-2-基、环丙-1-烯-1-基、环丙-2-烯-1-基；丁烯基如丁-1-烯-1-基、丁-1-烯-2-基、2-甲基-丙-1-烯-1-基、丁-2-烯-1-基、丁-2-烯-2-基、丁-1,3-二烯-1-基、丁-1,3-二烯-2-基、环丁-1-烯-1-基、环丁-1-烯-3-基、环丁-1,3-二烯-1-基等；及类似基团。被本文使用的“低级烯基”指(C2-C8)烯基。

[0060] 单独的或作为其它取代基一部分的“炔基”指不饱和支链、直链或环烷基，其具有至少一个碳-碳三键，其通过从母体炔烃的单独碳原子上除去一个氢原子而生成。典型的炔基包括，但不限于，乙炔基；丙炔基如丙-1-炔-1-基、丙-2-炔-1-基等；丁炔基如丁-1-炔-1-基、丁-1-炔-3-基、丁-3-炔-1-基等；及类似基团。被本文使用的“低级炔基”指(C2-C8)炔基。

[0061] 单独的或作为其它取代基一部分的“亚烷基”指饱和或不饱和，支链、直链或环的二价烃基团，其具有指定数量的碳原子(即，C1-C6指从一个到六个碳原子)，其通过从母体烷烃、烯烃或炔烃的两个不同碳原子中每一个除去一个氢原子而生成，或通过从母体烷烃、烯烃或炔烃的单独碳原子上除去两个氢原子而生成。两个单价原子团中心或二价原子团中心的每一价可与相同或不同原子形成键。典型的亚烷基包括，但不限于，亚甲基；亚乙基如1,1-亚乙烷基、1,2-亚乙烷基、1,1-亚乙烯基、1,2-亚乙烯基；亚丙基如]，1-亚丙基、1,2-亚丙基、2,2-亚丙基、1,3-亚丙基、环-1,1-亚丙基、环-1,2-亚丙基、1,1-亚丙-1-烯基、1,2-亚丙-1-烯基、1,2-亚丙-2-烯基、1,3-亚丙-1-烯基、环-1,2-亚丙-1-烯基、环-1,2-亚丙-2-烯基、环-1,1-亚丙-2-烯基、1,3-亚丙-1-炔基等；亚丁基如1,1-亚丁基、1,2-亚丁基、1,3-亚丁基、1,4-亚丁基、2,2-亚丁基、2-甲基-1,1-亚丙基、2-甲基-1,2-亚丙基、环-1,1-亚丁基；环-1,2-亚丁基、环-1,3-亚丁基、1,1-亚丁-1-烯基、1,2-亚丁-1-烯基、1,3-亚丁-1-烯基、1,4-亚丁-1-烯基、2-甲基-1,1-亚丙-1-烯基、2-甲基-1,1-亚丙基、1,3-丁二烯-1,1-亚基、1,3-丁二烯-1,2-亚基、1,3-丁二烯-1,3-亚基、1,3-丁二烯-1,4-亚基、环-1-丁烯-1,2-亚基、环-1-丁烯-1,3-亚基、环-2-丁烯-1,2-亚基、环-1,3-丁二烯-1,2-亚基、环-1,3-丁二

烯-1,3-亚基、1-丁烯-1,3-亚基、1-丁烯-1,4-亚基、1,3-丁二烯-1,4-亚基等;及类似基团。在意指特定饱和水平的情况下,使用命名亚烷基、亚烯基和/或亚炔基。在特别地已定两个价在同一碳原子上的情况下,使用命名“烃叉基”。在一些实施方式中,亚烃基是(C1-C8)亚烃基。具体实施方式包括饱和脂肪族亚烷基,其中原子团中心在端位碳上,如亚甲基(甲烷撑);1,2-亚乙烷基(乙烷撑);1,3-亚丙烷基(丙烷撑);1,4-亚丁烷基(丁烷撑);及类似基团(也被称为烃撑(alkylenos),下文定义)。被本文使用的“低级亚烃基”指(C1-C8)亚烃基。

[0062] 单独的或作为其它取代基一部分的“烃撑(alkylene)”指直链饱和或不饱和的亚烃基,其具有两个端位单价原子团中心,其通过从直链或支链母体烷烃、烯烃或炔烃的两个端碳原子的每一个上除去一个氢原子而生成,或通过从母体环烃基的两个不同环原子的每一个除去一个氢原子而生成。如果存在双键或三键的话,其在特定烃撑中的位标在方括号中指明。典型的烃撑基团包括,但不限于,甲撑(甲烷撑);乙撑如乙烷撑、乙烯撑、乙炔撑;丙撑如丙烷撑、[1]丙烯撑、[1,2]二丙烯撑、[1]丙炔撑等;丁撑如丁烷撑、[1]丁烯撑、[2]丁烯撑、[1,3]丁二烯撑、[1]丁炔撑、[2]丁炔撑、[1,3]丁二炔撑等;及类似基团。在意指特定饱和水平的情况下,使用命名烷撑、烯撑和/或炔撑。在一些实施方式中,烃撑基团是(C1-C8)或(C1-C3)烃撑。具体实施方式包括直链饱和烷撑基团,如甲烷撑、乙烷撑、丙烷撑、丁烷撑及类似基团。被本文使用的“低级烷撑”指(C1-C8)烷撑。

[0063] 单独的或作为其它取代基一部分的“杂烃基”、“杂烷基”、“杂烯基”、“杂炔基”、“杂亚烃基”和“杂烃撑”分别指烃基、烷基、烯基、炔基、亚烃基和烃撑基团,其中一个或多个碳原子各自独立地被相同或不同杂原子或杂原子基团替代。可替代碳原子的典型杂原子和/或杂原子基团包括,但不限于,-O-、-S-、-S-O-、-NR'-、-PH-、-S(O)-、-SO<sub>2</sub>-、-S(O)NR'-、-SO<sub>2</sub>NR'-及类似基团,包括其组合,其中R'是氢或取代基,如,例如,(C1-C8)烃基、(C6-C14)芳基或(C7-C20)芳基烃基。

[0064] 单独的或作为其它取代基一部分的“环烃基”和“杂环烃基”分别指“烃基”和“杂烃基”基团的环形式(version)。对于杂烃基,杂原子可占据被连接到分子剩余物的位置。典型的环烃基包括,但不限于,环丙基;环丁基如环丁烷基和环丁烯基;环戊基如环戊烷基和环戊烯基;环己基如环己烷基和环己烯基;及类似基团。典型的杂环烃基包括,但不限于,四氢呋喃基(如四氢呋喃-2-基、四氢呋喃-3-基等)、哌啶基(如哌啶-1-基、哌啶-2-基等)、吗啉基(如吗啉-3-基、吗啉-4-基等)、哌嗪基(如哌嗪-1-基、哌嗪-2-基等),及类似基团。

[0065] “母体芳香环系统”指具有共轭 $\pi$ 电子系统的不饱和的环或多环环系统。稠环系统被特别地归入“母体芳香环系统”定义中,在所述稠环系统中一个或多个环是芳香的,且一个或多个环是饱和或不饱和的,如,例如,茚、茚满、茚、非那烯(phenalene)、四氢萘等。典型的母体芳香环系统包括,但不限于,醋葱烯、茈、乙亚菲基(acephenanthrylene)、葱、萹、苯、屈、晕苯、荧葱、茚、并六苯、己芬、hexalene、引达省(indacene)、对称引达省(s-indacene)、茚满、茚、萘、octacene、octaphene、氯甲桥萘(octalene)、卵苯、并五苯、并环戊二烯、五苯、茈、非那烯、菲、脞、七曜烯、茈、吡葱、玉红省、四氢萘、三亚苯(triphenylene)、三联萘(trinaphthylene)及类似基团。

[0066] 单独的或作为其它取代基一部分的“芳基”指具有指定数量的碳原子(即,C6-C14指从6个到14个碳原子)的单价芳香烃基团,其通过从母体芳香环系统的单独碳原子上除去一个氢原子而生成。典型的芳基包括,但不限于,从以下衍生的基团:醋葱烯、茈、乙亚菲基、

蒽、萹、苯、屈、晕苯、茈萸、茈、并六苯、己芬、hexalene、不对称引达省、对称引达省、茈满、茈、萘、octacene、octaphene、氯甲桥萘、卵苯、并五苯、并环戊二烯、五苯、茈、非那烯、菲、**胆**、七曜烯、茈、吡萸、玉红省、三亚苯、三联萘及类似基团及其各种氢化异构体。具体示例性芳基包括苯基和萘基。

[0067] 单独的或作为其它取代基一部分的“芳基烷基”指脂肪族烷基，其中与碳原子成键的一个氢原子被芳基替代，在一些实施方式中，所述碳原子为端位或 $sp^3$ 碳原子。典型的芳基烷基包括，但不限于，苄基、2-苯基-1-乙烷基、2-苯基-1-乙烯基、萘甲基、2-萘基-1-乙烷基、2-萘基-1-乙烯基、萘并苄基、2-萘并苄基-1-乙烷基及类似基团。在意指具有特定饱和程度的烷基部分的情况下，使用命名芳基烷基、芳基烯基和/或芳基炔基。当指明指定数目的碳原子时，例如(C7-C20)芳基烷基，所述数目指组成芳基烷基的碳原子的总数目。

[0068] “母体杂芳香环系统”指母体芳香环系统，其中一个或多个碳原子各自独立地被相同或不同杂原子或杂原子基团替代。替代碳原子的典型的杂原子或杂原子基团包括，但不限于，N、NH、P、O、S、S(O)、SO<sub>2</sub>、Si等。稠环系统被特别地归入定义“母体杂芳香环系统”中，在所述稠环系统中一个或多个环是芳香的及一个或多个环是饱和或不饱和的，如，例如，苯并二噁烷、苯并呋喃、色烷、色烯、吡啶、吡啶啉、氧杂萸等。那些包括共同取代基的公认的环也归入定义“母体杂芳香环系统”中，如，例如，苯并吡喃酮和1-甲基-1,2,3,4-四唑。典型的母体杂芳香环系统包括，但不限于，吡啶、苯并咪唑、苯并异噁唑、苯并二噁烷、苯并二氧杂环戊烯、苯并呋喃、苯并吡喃酮、苯并噻二唑、苯并噻唑、苯并三唑、苯并噁嗪、苯并噁唑、苯并噁唑啉、咪唑、 $\beta$ -咪唑、色烷、色烯、噻啉、呋喃、咪唑、吡啶、吡啶啉、吡啶、异苯并呋喃、异色烯、异吡啶、异吡啶啉、异噻啉、异噻唑、异噁唑、萘啶、噁二唑、噁唑、伯啶、菲啶、邻二氮杂菲、吩嗪、酞嗪、蝶啶、嘌呤、吡喃、吡嗪、吡唑、哒嗪、吡啶、噻啶、吡咯、吡咯嗪、噻啶啉、噻啶、噻啶啉、四唑、噻二唑、噻唑、噻吩、三唑、氧杂萸及类似基团。

[0069] 单独的或作为其它取代基一部分的“杂芳基”指具有指定数目的环原子(如“5-14元”指从5个到14个环原子)的单价杂芳香基团，其通过从母体杂芳香环系统的单独原子中除去一个氢原子而生成。典型的杂芳基包括，但不限于，从以下衍生的基团：吡啶、苯并咪唑、苯并异噁唑、苯并二噁烷、苯并间二氧杂环戊烯(benzodioxole)、苯并呋喃、苯并吡喃酮、苯并噻二唑、苯并噻唑、苯并三唑、苯并噁嗪、苯并噁唑、苯并噁唑啉、咪唑、 $\beta$ -咪唑、色烷、色烯、噻啉、呋喃、咪唑、吡啶、吡啶啉、吡啶、异苯并呋喃、异色烯、异吡啶、异吡啶啉、异噻啉、异噻唑、异噁唑、萘啶、噁二唑、噁唑、伯啶、菲啶、邻二氮杂菲、吩嗪、酞嗪、蝶啶、嘌呤、吡喃、吡嗪、吡唑、哒嗪、吡啶、噻啶、吡咯、吡咯嗪、噻啶啉、噻啶、噻啶啉、四唑、噻二唑、噻唑、噻吩、三唑、氧杂萸，及其各种氢化异构体。

[0070] 单独的或作为其它取代基一部分的“杂芳基烷基”指脂肪族烷基，其中与碳原子上成键的一个氢原子被杂芳基替代，在一些实施方式中，所述碳原子为端位或 $sp^3$ 碳原子。在意指具有特定饱和程度的烷基部分的情况下，使用命名杂芳基烷基、杂芳基烯基和/或杂芳基炔基。当指明确定数目的原子时，例如，6-20元杂(hetero)芳基烷基，所述数目指组成芳基烷基的原子的总数目。

[0071] 单独的或作为其它取代基一部分的“卤代烷基”指烷基，其中一个或多个氢原子被卤素替代。因此，术语“卤代烷基”意欲包括单卤代烷基、双卤代烷基、三卤代烷基等直到全卤代烷基。例如，短语“(C1-C2)卤代烷基”包括氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、1-氟乙基、1,1-

二氟乙基、1,2-二氟乙基、1,1,1-三氟乙基、全氟乙基等。

[0072] 上文定义的基团可包括前缀和/或后缀,其通常在本领域中使用以产生其它公认的取代基。作为非限制性具体例子,“羟基氧基”和/或“炔氧基”指式-OR”的基团、“羟基胺”指式-NHR”的基团,且“二羟基胺”指式-NR”R”的基团,其中每一个R”是烷基。

[0073] 5.2 示例性实施方式

[0074] 本公开提供试剂,其可被用于化学合成携带包括罗丹明染料的标记部分的寡核苷酸。传统上,化学合成罗丹明-标记的寡核苷酸有难度,部分因为缺乏对含有罗丹明的合成试剂的利用率,所述合成试剂对通常用在寡核苷酸分步化学合成中的合成和/或脱保护条件稳定。现在已发现,用对碱不稳定的保护基团,如乙酰基,保护NH-罗丹明染料的环外胺基团,可提供N-保护的NH-罗丹明染料,其对通常用在寡核苷酸固相合成中的化学合成和脱保护条件稳定。作为结果,N-保护的NH-罗丹明可被整合入可用于合成以包括罗丹明染料的标记部分标记的寡核苷酸的试剂中,从此避免了合成后附加标记的需要。因为标记在合成中被附加,所产生的标记的寡核苷酸无需使用HPLC即可被纯化以使用。

[0075] 试剂利用了众所周知的可用于分步固相合成寡核苷酸的试剂和化学反应的各种特征,且可以合成试剂的形式存在,或以固相支持体试剂形式存在,所述合成试剂在分步固相合成寡核苷酸链期间被偶联到羟基上,核苷单体试剂如核苷亚磷酰胺试剂,和/或任选的其它试剂,在分步方式中被偶联到所述固相支持体试剂上以生成合成的寡核苷酸。

[0076] 合成试剂和固相支持体试剂本质上可为核苷,因为它们可包括核苷部分,或它们本质上可为非核苷。

[0077] 本文描述的所有试剂包括标记部分,其包括N-保护的NH-罗丹明染料或部分。N-保护的NH-罗丹明染料可仅为组成标记部分的染料或可选择地,它可为两个或更多个组成较大染料网络的染料中的一个。固相支持体试剂另外包括固相支持体和一个或多个合成片断,其它基团可被偶联到所述合成片断上。合成试剂另外包括用于将试剂偶联到伯羟基上的磷酸酯前体基团,且可任选地包括一个或多个合成片断。组成试剂的各种部分和基团可以允许它们展现它们各自功能的任何方式和/或方位被连接在一起。它们可通过包括在部分上的连接基团被彼此连接,或它们可借助于连接体彼此连接。

[0078] 组成本文描述的包括试剂的各种部分、基团和连接体在下文更详细地描述。

[0079] 5.3 连接体和连接基团

[0080] 组成本文描述的试剂的各种基团和部分通常使用连接体彼此连接。任何特定连接体的种类将部分取决于被彼此连接的部分的种类。一般说来,连接体包括间隔部分,其实质上可包括对用于合成标记的寡核苷酸的合成条件稳定的原子或官能团的任何组合,所述合成条件如通常用于使用亚磷酸三酯方法合成寡核苷酸的条件,且其在结构上可为直链、支链、或环,或可包括直链、支链和/或环结构的组合。间隔部分本质上可为单体,或它可以是本质上为聚合物的区域或包括本质上为聚合物的区域。间隔部分可被设计为具有指定性质,如在指定条件下可被剪切的能力,或指定程度的刚性、柔韧性、疏水性和/或亲水性。

[0081] 如将在下文中更详细描述,本文描述的试剂的许多实施方式通过以指定方式将合成子彼此缩合以产生预期试剂的方式被合成。每个合成子通常包括一个或多个适于形成预期键结的连接基团。一般地,连接基团包括官能团F<sup>Y</sup>,其能够与另一个官能团F<sup>Z</sup>反应,或其能够被活化以致于可以与另一个官能团F<sup>Z</sup>反应,以产生共价键结Y-Z,其中Y代表F<sup>Y</sup>贡献的键

结部分,而Z代表F<sup>2</sup>贡献的部分。此类基团F<sup>1</sup>和F<sup>2</sup>被本文称作“互补官能团”。

[0082] 能够彼此形成共价键结的互补官能团对在本领域中众所周知。在一些实施方式中,F<sup>1</sup>或F<sup>2</sup>中一个包括亲核基团,而F<sup>1</sup>或F<sup>2</sup>中另一个包括亲电基团。用于形成对各种合成和其它条件稳定的键结的互补的亲核和亲电基团(或其可形成键结或可被适当活化以致于形成键结的前体)在本领域中众所周知。可用于实现在各种本文描述的试剂中的键结的适合的互补的亲核和亲电基团的例子,及其所产生的形成的键结在下文表1中提供:

[0083]

亲电基团	亲核基团	产生的共价键结
活化的酯*	胺/苯胺	羧酰胺
酰基叠氮化物**	胺/苯胺	羧酰胺
酰卤	胺/苯胺	羧酰胺
酰卤	醇/苯酚	酯
酰基腈	醇/苯酚	酯
酰基腈	胺/苯胺	羧酰胺
醛	胺/苯胺	亚胺
醛或酮	肼	脎
醛或酮	羟胺	肟

[0084]

烃基卤	胺/苯胺	烃基胺
烃基卤	羧酸	酯
烃基卤	硫醇	硫醚
烃基卤	醇/苯酚	酯
烃基磺酸酯	硫醇	硫醚
烃基磺酸酯	羧酸	酯
烃基磺酸酯	醇/苯酚	酯
酞	醇/苯酚	酯
酞	胺/苯胺	羧酰胺
芳基卤	硫醇	苯硫酚
芳基卤	胺	芳基胺
吡丙啶	硫醇	硫醚
硼酸酯	乙二醇	硼酸酯
羧酸	胺/苯胺	羧酰胺
羧酸	醇	酯
羧酸	肼	酰肼
碳二亚胺	羧酸	N-酰基脲或酞
重氮烷	羧酸	酯
环氧化物	硫醇	硫醚
卤代乙酰胺	硫醇	硫醚
卤代三嗪	胺/苯胺	氨基三嗪
卤代三嗪	醇/苯酚	三嗪醚
酰亚胺酯	胺/苯胺	脘
异氰酸酯	胺/苯胺	脲
异氰酸酯	醇/苯酚	尿烷
异硫氰酸酯	胺/苯胺	硫脲
马来酰亚胺	硫醇	硫醚
亚磷酰胺	醇	磷酸酯
卤代硅	醇	硅醚
磺酸酯	胺/苯胺	烃基胺
磺酸酯	硫醇	硫醚
磺酸酯	羧酸	酯
磺酸酯	醇	酯
磺酰卤	胺/苯胺	磺酰胺
磺酰卤	苯酚/醇	磺酰酯
重氮盐	芳基	偶氮

[0085] \*活化的酯,如在本领域中被理解的,一般具有式-C(O)Ω,其中Ω是好的离去基团(如氧基琥珀酰亚胺基、氧基磺基琥珀酰亚胺基,1-氧基苯并三唑基等)。

[0086] \*\*酰基叠氮化物可重排为异氰酸酯。

[0087] 因此,连接体合成子一般可被式LG-Sp-LG描述,其中每一个LG与另一个彼此独立地代表连接基团,而Sp代表间隔部分。在一些实施方式中,连接体合成子可被式F<sup>z</sup>-Sp-F<sup>z</sup>描述,其中每一个F<sup>z</sup>与另一个彼此独立地代表如上文描述的互补的亲核或亲电官能团对的一个成员。在具体的实施方式中,每一个F<sup>z</sup>与另一个彼此独立地选自上文表1中列举的基团。

此类型连接体合成子形成式-Z-Sp-Z-的连接体部分,其中每一个Z与另一个彼此独立地代表如上文描述的键结的一部分。

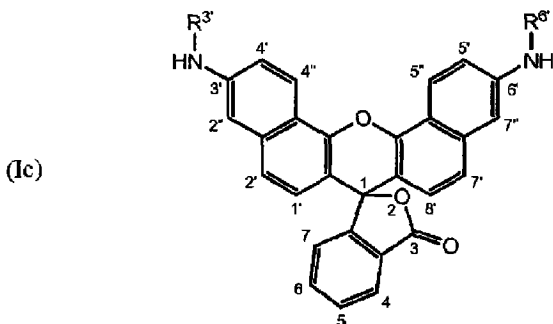
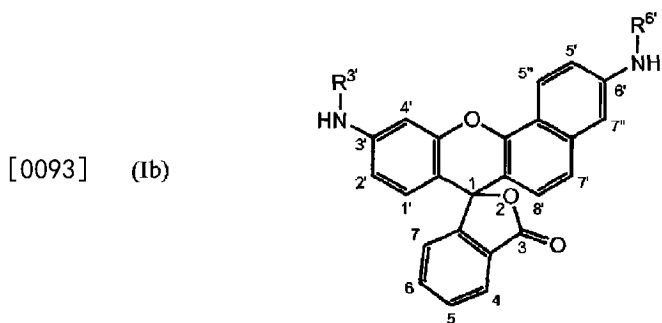
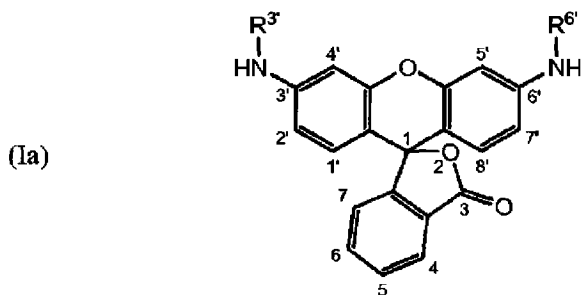
[0088] 适于将本文描述的试剂中的特定基团和部分彼此连接的特定连接体将结合试剂的示例性实施方式被更详细地讨论。连接体的非限制性示例性实施方式在图2中被阐述,所述连接体可用于将组成本文描述的试剂的各种基团和部分彼此连接。在图中2,  $Z^1$ 和 $Z^2$ 与另一个彼此独立地各自代表官能团 $F^z$ 贡献的键结的一部分, $F^z$ 如先前描述,及K选自-CH-和-N-。在图2中阐述的连接体的一些具体实施方式中, $Z^1$ 或 $Z^2$ 中一个是-NH-,而另一个选自-O-、-C(O)-和-S(O)<sub>2</sub>-。

[0089] 5.4标记部分

[0090] 本文描述的所有试剂包括标记部分,其包括在环外胺基团上被具有特定性质的保护基团保护的NH-罗丹明染料。一般地,罗丹明染料以四个主要特性为特征:(1)母体氧杂蒽环;(2)环外胺取代基;(3)环外亚胺取代基;及(4)在邻位上被羧基取代的苯基。环外胺和/或亚胺基团通常位于母体氧杂蒽环的C3和C6碳原子上,虽然也已知“扩展的”罗丹明,其中母体氧杂蒽环包括稠合到C3和C4碳和/或C5和C6碳上的苯并基团。在这些扩展的罗丹明中,特征性的环外胺和亚胺基团位于扩展的氧杂蒽环的对应位置上。

[0091] 被羧酸取代的苯基被连接到母体氧杂蒽环的C9碳上。作为邻位羧酸取代的结果,罗丹明染料可以两种不同形式存在:(1)开放的酸形式;及(2)封闭的内酯形式。虽然不打算被任何操作理论所束缚,因为本文描述的示例性N-保护的NH-罗丹明染料的NMR光谱与封闭的螺环内酯形式的染料一致,相信组成本文描述的试剂的标记部分的N-保护的NH-罗丹明染料是以封闭的、螺环内酯形式存在。因此,本文以它们封闭的螺环内酯形式阐述各种罗丹明及它们未被保护的对应物。然而,应注意到这仅是为了方便而不意为将本文描述的各种试剂限制为内酯形式的染料。

[0092] 在封闭的螺环内酯形式中,母体氧杂蒽环的A环和C环是芳香的,且C3'和C6'取代基两者皆为胺。包括在本文描述的标记部分中的罗丹明染料的环外胺基团是未被取代的或是单取代的以致于这些胺基团是伯胺或仲胺。此类罗丹明染料被本文称作“NH-罗丹明”。因此,被本文使用的“NH-罗丹明”一般包括一种以下的母体NH-罗丹明环结构:



[0094] 在上文描述的母体NH-罗丹明环中,使用从通常用于封闭的螺环内酯形式的罗丹明染料中的标号惯例中选用的任意标号惯例为各种碳原子标号。使用此类标号系统仅为了方便,且不意为以任何方式限制。

[0095] 在结构式(Ia)、(Ib)和(Ic)的母体NH-罗丹明环中, $R^{3'}$ 和 $R^{6'}$ 代表氢或取代环外胺的取代基。 $R^{3'}$ 和/或 $R^{6'}$ 取代基可为相同的或不同的,且可包括基团如被取代的或未被取代的烷基、芳基或芳基烷基。可选择地, $R^{3'}$ 和/或 $R^{6'}$ 基团可包括被桥连到邻近碳原子上的取代基,以致于图示的氮原子被包括在含有5-或6-环原子的环中。环可为饱和的或不饱和的,且一个或多个环原子可被取代。当环原子被取代时,取代基通常彼此独立地选自低级烷基、C6-C10芳基和C7-C16芳基烷基。可选择地,两个临近环原子可包括在芳基桥中,如苯并或萘并基团。包括根据结构式(Ia)的母体NH-罗丹明环的罗丹明染料的非限制性示例性实施方式在图1A中被阐述,在结构式(Ia)中 $R^{3'}$ 和/或 $R^{6'}$ 基团是氢或低级烷基或与临近碳原子一起被包括在任选地被取代的环中。包括根据结构式(Ic)的母体NH-罗丹明环的罗丹明染料的非限制性示例性实施方式在图1B中被阐述,在结构式(Ic)中 $R^{3'}$ 和 $R^{6'}$ 基团是氢或低级烷基或与临近碳原子一起被包括在任选地被取代的环中。

[0096] 在根据结构式(Ia)、(Ib)和(Ic)的母体NH-罗丹明环的C1'、C2'、C2''、C4'、C4''、C5'、C5''、C7'、C7''和C8'位上的一个或多个碳原子可以彼此独立地被取代基取代。用于在这些位置上取代罗丹明染料的基团在本领域中众所周知,且例如在美国专利第4,622,400号、

美国专利第5,750,409号、美国专利第5,847,162号、美国专利第6,017,712号、美国专利第6,080,852号、美国专利第6,184,379号和美国专利第6,248,884号中被描述,其公开通过引用合并入本文。所有这些取代基可被用于取代本文描述的母体NH-罗丹明环。

[0097] 在一些实施方式中,取代基彼此独立地选自低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、5-14元杂芳基、6-20元杂芳基烷基、 $-R^b$ 和 $-(CH_2)_x-R^b$ ,其中x是范围从1到10的整数且 $R^b$ 选自 $-X$ 、 $-OH$ 、 $-OR^a$ 、 $-SH$ 、 $-SR^a$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^a$ 、 $-NR^cR^c$ 、 $-N^+R^cR^cR^c$ 、全卤低级烷基、三卤甲基、三氟甲基、 $-B(OH)_3$ 、 $-B(OR^a)_3$ 、 $-B(OH)O^-$ 、 $-B(OR^a)_2O^-$ 、 $-B(OH)(O^-)_2$ 、 $-B(OR^a)(O^-)_2$ 、 $-P(OH)_2$ 、 $-P(OH)O^-$ 、 $-P(OR^a)_2$ 、 $-P(OR^a)O^-$ 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(OH)O^-$ 、 $-P(O)(O^-)_2$ 、 $-P(O)(OR^a)_2$ 、 $-P(O)(OR^a)O^-$ 、 $-P(O)(OH)(OR^a)$ 、 $-OP(OH)_2$ 、 $-OP(OH)O^-$ 、 $-OP(OR^a)_2$ 、 $-OP(OR^a)O^-$ 、 $-OP(O)(OH)_2$ 、 $-OP(O)(OH)O^-$ 、 $-OP(O)(O^-)_2$ 、 $-OP(O)(OR^a)_2$ 、 $-OP(O)(OR^a)O^-$ 、 $-OP(O)(OR^a)(OH)$ 、 $-S(O)_2O^-$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(S)X$ 、 $-C(O)O^-$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)^a$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-C(S)NH_2$ 、 $-C(O)N^a$ 、 $-C(O)NR^cR^c$ 、 $-C(NH)NH_2$ 、 $-C(NH)NHR^a$ 和 $-C(NH)NR^cR^c$ ,其中X是卤素(优选地氟或氯),每一个 $R^a$ 是,与其它彼此独立地,选自低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、5-14元杂芳基和6-20元杂芳基烷基,且每一个 $R^c$ 与另一个彼此独立地为 $R^a$ ,或可选择地,与相同氮原子成键的两个 $R^c$ 可被采用与氮原子一起形成5-到8-元饱和或不饱和环,其可任选地包括一个或多个相同的或不同的环杂原子,其通常选自O、N和S。

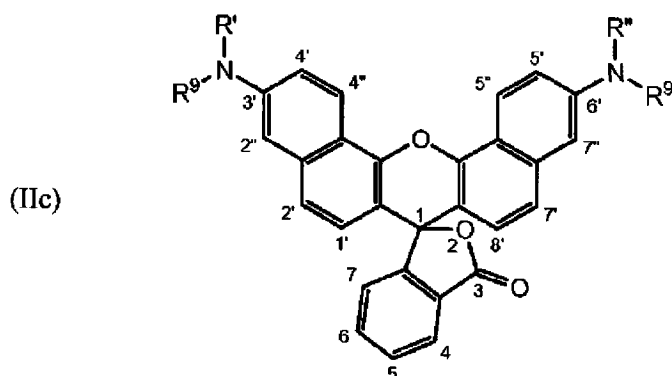
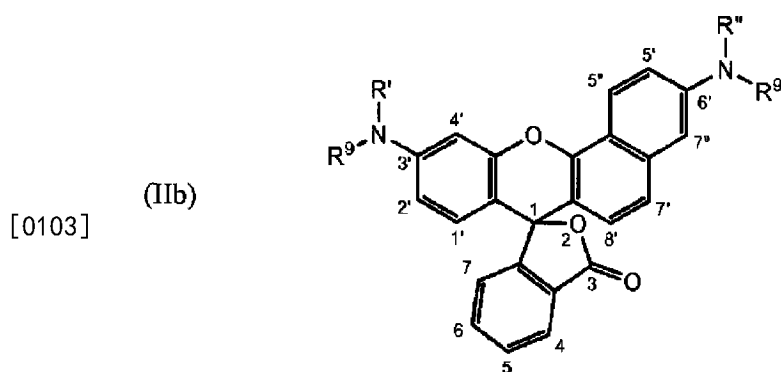
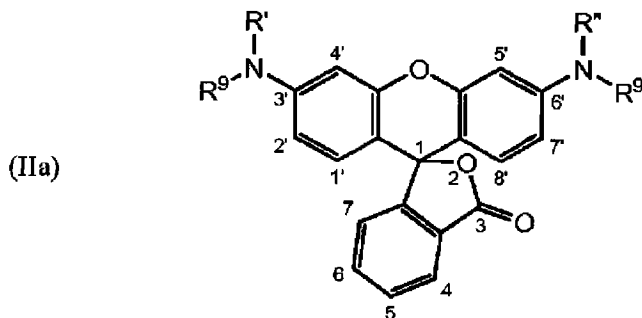
[0098] 可选择地,C1'和C2'取代基、C7'和C8'取代基、C5'和C5''取代基和/或C4'和C4''取代基可一起被采用以形成被取代的或未被取代的芳基桥,如苯并桥,条件为C1'和C2'取代基,及C7'和C8'取代基不同时包括在芳基桥中。

[0099] 一般地,被用于取代C1'、C2'、C2''、C4'、C4''、C5'、C5''、C7'、C7''和C8'碳的基团不应该促进罗丹明染料猝灭,虽然在一些实施方式中,猝灭取代基是预期的。倾向于猝灭罗丹明染料的取代基包括羰基、羧酸酯、重金属、硝基、溴和碘。位于 $R^{3'}$ 和/或 $R^{6'}$ 的苯基也倾向于导致猝灭。

[0100] 在结构式(Ia)、(Ib)和(Ic)的母体NH-罗丹明环的C4、C5、C6和C7位上的碳原子也可以彼此独立地包括任选的取代基。这些取代基可选自上文描述的各种取代基。在一些实施方式中,C4和C7位上的碳原子被氯基团取代以致于母体NH-罗丹明染料是NH-4,7-二氯罗丹明染料。

[0101] 包括根据结构式(Ia)、(Ib)和(Ic)的母体NH-罗丹明环的、可包括在本文描述的试剂的标记部分中的大量数目的罗丹明染料在本领域中已知且被描述,例如,在美国专利第6,248,884号;美国专利第6,111,116号;美国专利第6,080,852号;美国专利第6,051,719号;美国专利第6,025,505号;美国专利第6,017,712号;美国专利第5,936,087号;美国专利第5,847,162号;美国专利第5,840,999号;美国专利第5,750,409号;美国专利第5,366,860号;美国专利第5,231,191号;美国专利第5,227,487号;W097/36960;W0 99/27020;Lee等人,1992,Nucl.Acids Res.20:2471-2483;Arden-Jacob,"Neue Lanwellige Xanthen-Farbstoffe für Fluoreszenzsonden und Farbstoff Lauer, Springer-Verlag, Germany, 1993;Sauer等人,1995, Fluorescence 5:247-261;Lee等人,1997,Nucl.Acids Res.25:2816-2822;及Rosenblum等人,1997,Nucl.Acids Res.25:4500-4504中,其公开通过引用被合并于本文。在这些文献中描述的其中环外胺为如本文描述的伯胺或仲胺的任何染料或此类NH-罗丹明染料的4,7-二氯类似物可被包括在本文描述的试剂的标记部分中。

[0102] 当包括在标记部分中时,母体NH-罗丹明环的环外胺被具有特定性质的保护基团保护。此类被保护的NH-罗丹明作为“N-保护的NH-罗丹明”被本文提及。对应结构式(Ia)、(Ib)和(Ic)的母体NH-罗丹明环的“N-保护的NH-罗丹明”被下文阐述为结构式(IIa)、(IIb)和(IIc):



[0104] 在结构式(IIa)、(IIb)和(IIc)中, $R'$  是氢或 $R^{3'}$  及 $R''$  是氢或 $R^{6'}$ , 其中 $R^{3'}$  和 $R^{6'}$  如上文为结构式(Ia)、(Ib)和(Ic)所定义,及 $R^9$ 代表保护基团。N-保护的NH-罗丹明可包括在C1'、C2'、C2''、C4'、C4''、C5'、C5''、C7'、C7''、C8'、C4、C5、C6和C7中一个或多个位置上的取代基,如先前与根据结构式(Ia)、(Ib)和(Ic)的母体NH-罗丹明环的相关描述。

[0105] 既然本文描述的试剂将用于化学合成标记的寡核苷酸,应使用对用于合成寡核苷酸的有机合成条件稳定的保护基团 $R^9$ 。如上文所提到,以酰胺形式(例如羧酰胺、磺酰胺或磷酰胺)保护胺的保护基团 $R^9$ 应该被选择,因为相信以此方式保护环外胺“锁住”被保护的酯形式的NH-罗丹明,对本文描述的试剂的稳定性有贡献。虽然不强加要求,但使用保护基团 $R^9$ 很方便,其在用于除去保护合成的寡核苷酸的核碱基的环外胺的基团的条件下不稳定,以致于所有保护基团可在单一步骤中被除去。

[0106] 用于合成及脱保护合成的寡核苷酸的条件在本领域中众所周知且被描述,例如,

在Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Vol. I, Beancage等人编辑, John Wiley & Sons, 2002, 其公开通过引用被合并于本文。简要地说, 使用亚磷酰胺试剂的合成方法涉及多轮:(i) DMT脱保护以显露游离羟基, 其可通过用2.5%或3%的二-或三-氯乙酸的二氯甲烷溶液处理而实现;(ii) 核苷或其它亚磷酰胺试剂与游离羟基偶联, 其可在含有0.45M或0.5M四唑的乙腈中完成;(iii) 氧化, 其可通过用I<sub>2</sub>/2,6-卢剔啶/H<sub>2</sub>O处理而被完成; 及加帽, 其可通过用6.5%乙酸酐的四氢呋喃(THF)溶液处理, 随后通过用10%1-甲基咪唑(NMI)的THF溶液处理而完成。

[0107] 用于在合成中完成各种步骤的其它条件也已知并被使用。例如, 亚磷酰胺偶联可在含有0.25M5-乙硫基-1H-四唑、0.25M4,5-二氰基咪唑(DCI)或0.25M5-苄硫基-1H-四唑(BTT)的乙腈中被完成。氧化可在0.1M、0.05M或0.02M I<sub>2</sub>的THF/H<sub>2</sub>O/吡啶(7:2:1)溶液中完成。加帽可通过用THF/卢剔啶/乙酸酐处理, 随后用16%NMI的THF溶液处理而完成; 通过用6.5%DMAP的THF溶液处理, 随后用10%MeIm的THF溶液处理而完成; 或通过用10%MeIm的THF溶液处理, 随后用16%MeIm的THF溶液处理而完成。

[0108] 任何保护基团的除去及从合成试剂中的剪切通常可在60°C下通过用浓缩的氢氧化铵处理1-12小时而实现, 虽然也已知并使用以可在较温和条件下除去的基团保护的核苷亚磷酰胺试剂, 所述条件如在室温下用浓缩的氢氧化铵处理4-17个小时或用0.05M碳酸钾的甲醇溶液处理或用25%叔丁基胺的H<sub>2</sub>O/EtOH溶液处理。

[0109] 本领域技术人员将容易地能够选择具有适于在特定合成和脱保护和/或剪切条件下使用的性质的保护基团。广泛种类的胺保护基团被教导, 例如在, Greene & Wuts, "Protective groups In Organic Chemistry", 第三版, John Wiley & Sons, 1999(下文"Green & Wuts")在例如, 309-405页中。本领域技术人员可容易地从那些在Green & Wuts中教导的保护基团中选择具有合适性质的保护基团R<sup>9</sup>。

[0110] 在一些实施方式中, 保护基团R<sup>9</sup>是式-C(O)R<sup>10</sup>的酰基, 其中R<sup>10</sup>选自氢、低级烷基、甲基、-CX<sub>3</sub>、-CHX<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>X、-CH<sub>2</sub>-OR<sup>d</sup>和苯基, 其任选地被低级烷基、甲基、-X、-OR<sup>d</sup>、氰基或硝基单取代, 其中R<sup>d</sup>选自低级烷基、苯基和吡啶基, 且每一个X是卤基团, 通常为氟或氯。在一些实施方式中, R<sup>10</sup>是甲基。在一些实施方式中, R<sup>10</sup>是三氟甲基。

[0111] 酰基保护基团如那些被-C(O)R<sup>10</sup>定义的基团可在各种碱性条件下被除去, 所述碱性条件包括用于从以"对碱不稳定的"亚磷酰胺试剂合成的寡核苷酸中除去保护基团的温和条件, 如在本领域中众所周知的。可被使用的示例性条件在上文中被详细说明。

[0112] 如将在后面章节中被更详细地描述的, 组成标记部分的N-保护的NH-罗丹明部分可被连接到其它基团或部分上。例如, N-保护的NH-罗丹明可被连接到另一个组成标记部分的染料上、连接到磷酸酯前体基团上、连接到连接体上、连接到合成片断上、连接到猝灭部分上、连接到起稳定化碱基配对相互作用的功能的部分(如, 例如插入染料或小沟结合分子)上或连接到其它部分上。此类键结通常经由连接基团LG被实现(上文关于连接体的描述), 所述LG被连接到用于合成试剂的N-保护的NH-罗丹明合成子上。

[0113] 连接基团LG可连接到N-保护的NH-罗丹明合成子的任何可利用碳原子上, 或连接到被连接到这些碳原子中一个的取代基上。连接基团的位置部分取决于基团或部分, N-保护的NH-罗丹明合成子(synthon)将被连接到所述基团或部分上。在一些实施方式中, 连接基团被连接在N-保护的NH-罗丹明合成子的C2'、C2''、C4'、C5'、C7'、C7''、C5或C6位上。在一

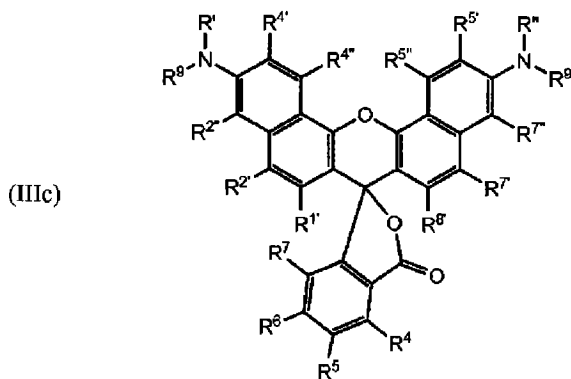
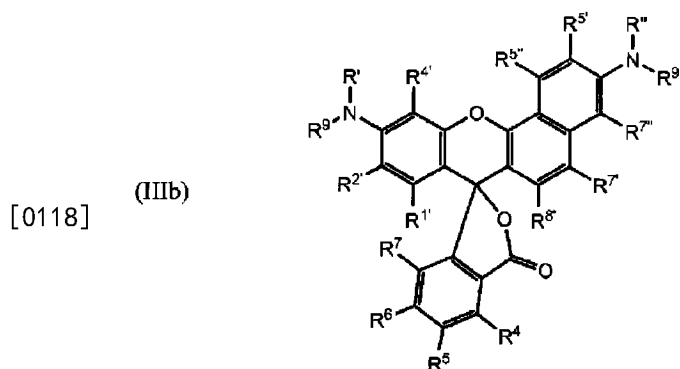
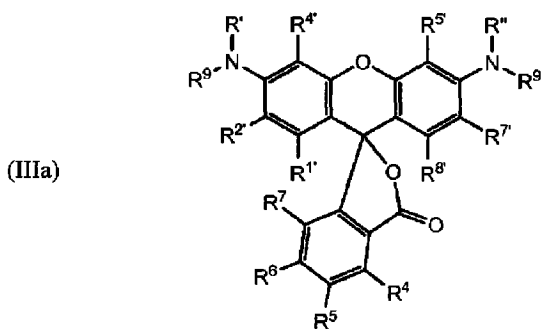
个具体实施方式中,连接基团被连接在C4'、C5'、C5或C6位。

[0114] N-保护的NH-罗丹明合成子(synthon)可包括单一连接基团LG,或它可包括超过一种的连接基团LG。在使用超过一种的连接基团的实施方式中,连接基团可为相同的,或它们可以是不同的。包括多种彼此不同的连接基团LG的N-保护的NH-罗丹明合成子可具有运用正化学连接到母体NH-罗丹明环不同位置上的不同基团或部分。

[0115] 连接基团的种类,在某些例子中,取决于它在母体NH-罗丹明环上的位置。在一些实施方式中,其中连接基团LG被连接在母体NH-罗丹明环的C4'-或C5'-位,连接基团LG是式 $-(CH_2)_n-F^y$ 的基团,其中n是范围为0到10的整数及 $F^y$ 如上文所描述。在一个具体实施方式中,n是1及 $F^y$ 是 $-NH_2$ 。

[0116] 在一些实施方式中,其中连接基团LG被连接在母体NH-罗丹明环的5-或6-位上,连接基团LG是式 $-(CH_2)_n-C(O)OR^f$ 的基团,其中 $R^f$ 选自氢和好的离去基团且n如先前所定义。在一些具体实施方式中,连接基团LG包括NHS酯。在一些具体实施方式中,n是0且 $R^f$ 是NHS。

[0117] 在一些实施方式中,组成本文描述的各种试剂的标记部分的N-保护的NH-罗丹明被结构式(IIIa)、(IIIb)或(IIIc)描述;如下:



[0119] 其中:

[0120] R' 选自R<sup>3'</sup>和氢;

[0121] R'' 选自R<sup>6'</sup>和氢;

[0122] R<sup>9</sup>是酰基保护基团,任选为式-C(O)R<sup>10</sup>的酰基保护基,其中R<sup>10</sup>如先前所定义;

[0123] R<sup>1'</sup>、R<sup>2'</sup>、R<sup>2''</sup>、R<sup>4'</sup>、R<sup>4''</sup>、R<sup>5'</sup>、R<sup>5''</sup>、R<sup>7'</sup>、R<sup>7''</sup>和R<sup>8'</sup>,当单独采用时,每一个彼此独立地选自氢、低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、5-14元杂芳基、6-20元杂芳基烷基、-R<sup>b</sup>和-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-R<sup>b</sup>,其中x和R<sup>b</sup>如先前所定义,或可选择地,R<sup>1'</sup>和R<sup>2'</sup>或R<sup>7'</sup>和R<sup>8'</sup>与它们所键结的碳原子一起用于形成苯并基团,和/或,R<sup>4'</sup>和R<sup>4''</sup>和/或R<sup>5'</sup>和R<sup>5''</sup>与它们所键结的碳原子一起用于形成苯并基团;

[0124] R<sup>3'</sup>和R<sup>6'</sup>,当单独采用时,各自彼此独立地选自低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、5-14元杂芳基和6-20元杂芳基烷基,或可选择地,在结构式(IIIa)的化合物中的R<sup>3'</sup>和R<sup>2'</sup>或R<sup>4'</sup>和/或R<sup>6'</sup>和R<sup>5'</sup>或R<sup>7'</sup>、在结构式(IIIb)的化合物中的R<sup>3'</sup>和R<sup>2'</sup>或R<sup>4'</sup>和/或R<sup>6'</sup>和R<sup>5'</sup>或R<sup>7''</sup>、或在结构式(IIIc)的化合物中的R<sup>3'</sup>和R<sup>2''</sup>或R<sup>4'</sup>和/或R<sup>6'</sup>和R<sup>5'</sup>或R<sup>7''</sup>与它们所键结的原子一起用于形成5-或6-元饱和或不饱和环,其可任选地包括从1个到4个的其它杂原子(通常选自O、N和S)且其任选地被一个或多个相同的或不同的低级烷基、苯并或吡啶并基团取代;

[0125] 及R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、和R<sup>7</sup>各自彼此独立地选自氢、低级烷基、(C6-C14)芳基、(C7-C20)芳基烷基、6-14元杂芳基、7-20元杂芳基烷基、-R<sup>b</sup>和-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-R<sup>b</sup>,其中x和R<sup>b</sup>如先前所定义,

[0126] 条件为至少一个在结构式(IIIa)的化合物中的R<sup>2'</sup>、R<sup>4'</sup>、R<sup>5'</sup>、R<sup>7'</sup>、R<sup>5</sup>或R<sup>6</sup>、至少一个在结构式(IIIb)化合物中的R<sup>2''</sup>、R<sup>4'</sup>、R<sup>5'</sup>、R<sup>7''</sup>、R<sup>5</sup>或R<sup>6</sup>、至少一个在结构式(IIIc)化合物中的R<sup>2''</sup>、R<sup>4'</sup>、R<sup>5'</sup>、R<sup>7''</sup>、R<sup>5</sup>或R<sup>6</sup>,包括式-Y-的基团,其中Y代表包括如上文描述的官能团F<sup>y</sup>的连接基团贡献的键结的一部分。

[0127] 在一些实施方式中,组成本文描述的各种试剂的标记部分的N-保护的NH-罗丹明不包括4,7-二氯R6G(5-和/或6-异构体)和/或被结构式(IIIa)描述的罗丹明,其中:

[0128] R'和R''各自为乙基;

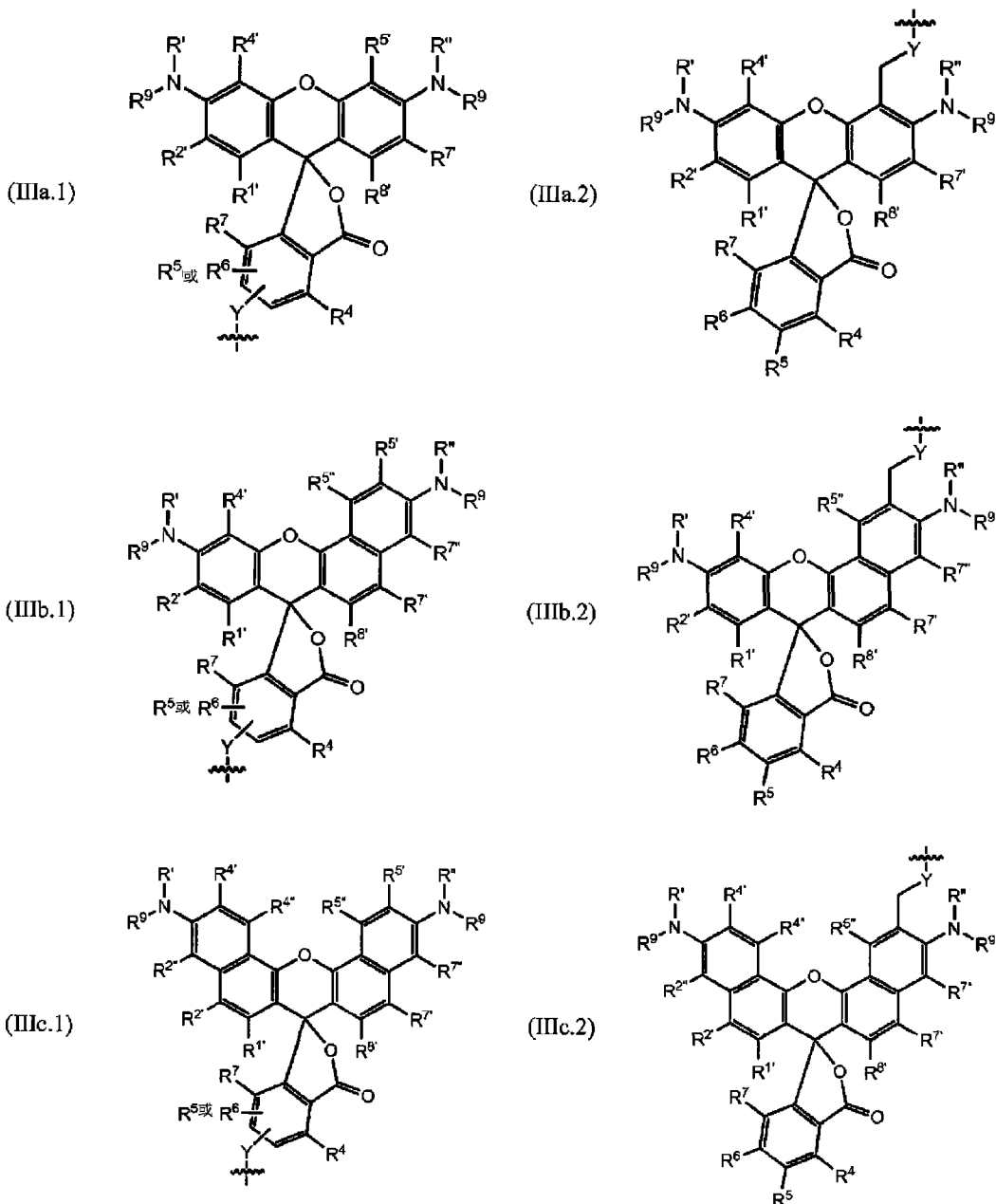
[0129] R<sup>1'</sup>、R<sup>4'</sup>、R<sup>5'</sup>和R<sup>6'</sup>各自为氢;

[0130] R<sup>2'</sup>和R<sup>7'</sup>各自为甲基;

[0131] R<sup>4</sup>和R<sup>7</sup>各自为氯;且

[0132] R<sup>5</sup>或R<sup>6</sup>中一个是氢且另一个是-C(O)-。

[0133] 在一些实施方式中,根据结构式(IIIa)、(IIIb)和(IIIc)的N-保护的NH-罗丹明的部分分别选自被结构式(IIIa.1)、(IIIa.2)、(IIIb.1)、(IIIb.2)、(IIIc.1)和(IIIc.2)定义的部分,如下:



[0135] 其中 $R'$ 、 $R''$ 、 $R^{1'}$ 、 $R^{2'}$ 、 $R^{2''}$ 、 $R^{3'}$ 、 $R^{4'}$ 、 $R^{4''}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{5''}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{7''}$ 、 $R^{8'}$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^9$ 和 $Y$ 如先前对结构式(IIIa)、(IIIb)和(IIIc)所定义。

[0136] 被结构式(IIIa)、(IIIa.1)、(IIIa.2)、(IIIb)、(IIIb.1)、(IIIb.2)、(IIIc)、(IIIc.1)和(IIIc.2)定义的部分的具体示例性实施方式包括具有一个或多个可应用特征的结构,所述特征选自:

[0137] (i) $Y$ 选自 $-C(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-$ 和 $-NH-$ ;

[0138] (ii) $R^4$ 和 $R^7$ 各自为氯;

[0139] (iii) $R^{1'}$ 和 $R^{8'}$ 各自为氢;

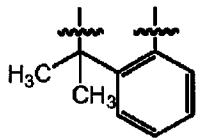
[0140] (iv) $R^{1'}$ 和 $R^{2'}$ 或 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 被采用以一同形成苯并基团;

[0141] (v) $R^{2'}$ 和 $R^{7'}$ 各自为氢或低级烷基;

[0142] (vi) $R''$ 是 $R^{3'}$ 且 $R''$ 是 $R^{6'}$ ;

[0143] (vii) $R'$ 是 $R^3$ 、 $R''$ 是 $R^6$ 且 $R^3$ 和 $R^6$ 与在邻近碳原子上的取代基一起用于形成选自以

下的基团： $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 和



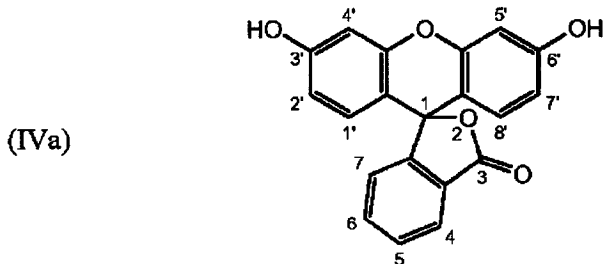
[0144] 如先前所讨论,标记部分可包括一个或多个额外的染料以致于N-保护的NH-罗丹明一旦脱保护,是较大的能量传递染料网络中的一个成员。此类能量传递染料网络在本领域中众所周知,且包括荧光染料的组合,所述荧光染料的光谱性质是匹配的,和/或其到彼此的相对距离适合,以致于网络中的一个荧光染料,当被适当波长的入射照射激发时,将它的激发能量传递到在网络中的另外一个荧光染料中,其随后将它的激发能量传递到在网络中的另外一个荧光染料中,以此类推,导致在网络中的最终受体染料发荧光。染料网络提供具有长斯托克斯位移的标记部分。在此类网络中,将它们的激发能量传递或捐献给在网络中的另一个荧光团(fluorophore)的荧光团被称作“供体”。从另一个荧光团接收或接受激发能量的荧光团被称作“受体”。在仅含有两个荧光染料的染料网络中,一个起供体作用及另一个起受体作用。在含有三个或更多个荧光染料的染料网络中,至少一个染料起供体或受体两者的作用。染料网络如何工作的原则,及选择和连接适于产生此类网络的独立染料的标准被众所周知且被描述,例如,在Hung等人,1997,Anal.Biochem.252:78-88中。

[0145] 在本文描述的包括染料网络的标记部分中,N-保护的NH-罗丹明染料一旦脱保护,可作为供体或受体起作用,或作为供体和受体两者起作用,取决于组成染料网络的其它染料的类别及预期的入射和荧光波长。大量数目的适于用作NH-罗丹明染料的供体和/或受体的染料在本领域中已知,且包括,例如但不限于,氧杂蒽染料(如,例如荧光素、罗丹明和对甲氨基酚染料)、芘染料、香豆素染料(例如羟基香豆素和氨基香豆素)、菁染料、酞菁染料和镧系(lanthanide)复合物。在能量传递染料网络环境中的这些染料的具体非限制性例子被描述,在Hung等人,1996,Anal.Biochem.238:165-170;Medintz等人,2004,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 101(26):9612-9617;美国专利第5,800,996号;Sudhaker等人,2003,Nucleosides,Nucleotides & Nucleic Acids 22:1443-1445;美国专利第6,358,684号;Majumdar等人,2005,J.Mol.Biol.351:1123-1145;Dietrich等人,2002,Reviews Mol.Biotechnology 82(3):211-231;Tsuji等人,2001,Biophysical J.81(1):501-515;Dickson等人,1995,J.Photochemistry & Photobiology27(1):3-19;和Kumar等人,2004,Developments in Nucl.Acids Res.1:251-274中,其公开通过引用被合并于本文。任何可根据本文描述的原则被适当保护的这些染料可被用作在包括染料网络的标记部分中的供体和受体染料。在一些实施方式中,组成网络的一种或多种供体和/或受体染料可为如本文所描述的N-保护的NH-罗丹明染料。用于将供体和/或受体染料连接到罗丹明染料上以形成染料网络的具体位置,及用于连接此类染料的具体键结和连接体在本领域中众所周知。具体的例子被描述,例如,在美国专利第6,811,979号;美国专利第6,008,379号;美国专利第5,945,526号;美国专利第5,863,727号;和美国专利第5,800,996号中,其公开通过引用被合并于本文。

[0146] 在一些实施方式中,连接供体和受体染料的连接体是阴离子连接体,如在美国专利第6,811,979号中所描述,其公开通过引用被合并于本文(参见,如,在17段25行到18段37

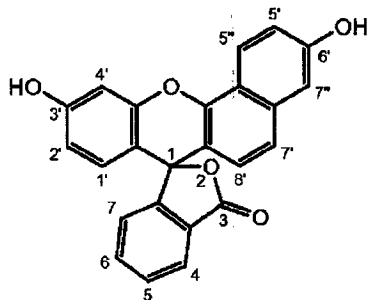
行的公开和图1-17)。

[0147] 在本文描述的试剂的一些实施方式中,标记部分包括NH-罗丹明染料的供体染料。在一些实施方式中,供体染料是荧光素或罗丹明染料,如,例如,本文描述的NH-罗丹明染料中的一个。在具体实施方式中,供体染料是荧光素染料。荧光素染料在结构上与罗丹明染料类似,不同的是母体氧杂蒽环的3-和6-位(对应结构式(Ia)、(Ib)和(Ic)的NH-罗丹明环的3'-和6'-位)被羟基取代。与罗丹明类似,荧光素也可具有扩展的环结构,其中在母体氧杂蒽环的C3和C4和/或C5和C6位的碳原子被包括在芳基桥如苯并基团中。因此,荧光素一般包括根据结构式(IVa)、(IVb)和(IVc)的化合物,如下:

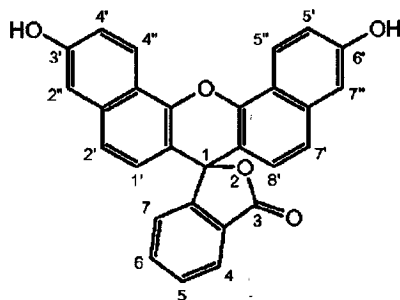


[0148]

(IVb)



(IVc)

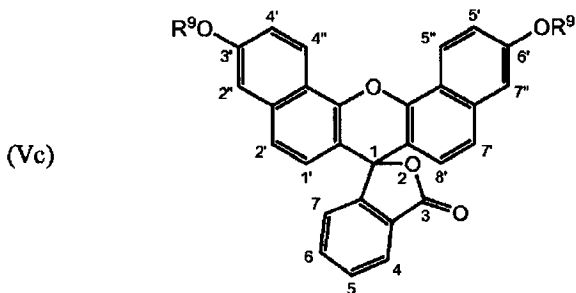
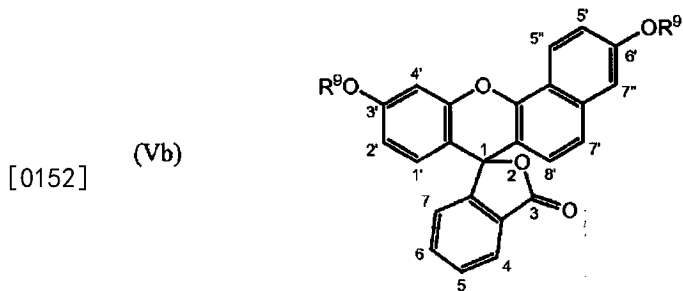
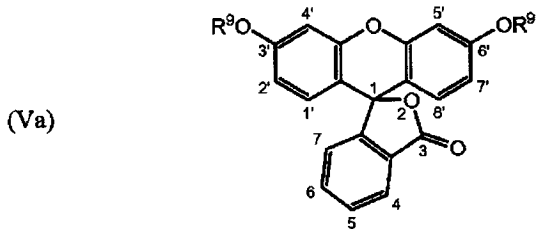


[0149] 与NH-罗丹明类似,在结构式(IVa)、(IVb)和(IVc)的荧光素(fluorescein)环的C1'、C2'、C2''、C4'、C4''、C5'、C5''、C7'、C7''、C8'、C4、C5、C6和C7位上的碳可被各种不同取代基取代,如那些先前对NH-罗丹明描述的取代基。

[0150] 当被包括在本文描述的标记部分中时,在C3'和C6'位上的羟基可以被保护基团保护,所述保护基团具有与上文讨论的保护NH-罗丹明的环外胺的基团相同的一般特性。因此,在具体的实施方式中,保护基团对用于合成寡核苷酸的条件稳定,所述条件如用于经由亚磷酸三酯方法合成及氧化寡核苷酸的条件,且在通常用于从合成树脂中脱保护和/或剪切合成的寡核苷酸的条件不稳定性,所述条件如,例如,在室温下或在55°C下,在浓氢氧化铵中培养。

[0151] 具有适合性质的广泛种类的保护基团在本领域中已知,且包括,例如但不限于,上文描述的与N-保护的NH-罗丹明染料相关的酰基。在具体实施方式中,保护基团为式-C(O)-

$R^{10}$ , 其中 $R^{10}$ 为如先前所定义。在一些实施方式中, $R^{10}$ 是叔丁基。其中 $C2'$ 和 $C6'$ 环外羟基包括保护基团的荧光素被本文称为“O-保护荧光素”。分别对应结构式(IVa)、(IVb)和(IVc)的荧光素的“O-保护荧光素”如结构式(Va)、(Vb)和(Vc)所阐述,如下:



[0153] 其中 $R^9$ 代表保护基团。

[0154] 在本领域中已知大量的各种不同荧光素染料,其可被适当地保护并被整合入标记部分中,用作NH-罗丹明部分的供体。具体的示例性荧光素染料被描述,例如,在美国专利第6,221,604号;美国专利第6,008,379号;美国专利第5,840,999号;美国专利第5,750,409号;美国专利第5,654,441号;美国专利第5,188,934号;美国专利第5,066,580号;美国专利第4,481,136号;美国专利第4,439,356号;WO 99/16832;和EP 0050684中,其公开通过引用被合并于本文。本领域技术人员将能够选择适于用作特定的NH-罗丹明供体的具有光谱性质的荧光素。可被整合入本文描述的试剂的标记部分中的母体荧光素(fluorescein)染料的具体实施方式在图1C中被阐述。

[0155] 供体和N-保护的NH-罗丹明受体可以多种方位直接地或借助于连接体彼此连接。在一些实施方式中,其中供体是O-保护荧光素或N-保护的NH-罗丹明,供体经由它的 $2'$ -、 $2''$ -、 $4'$ -、 $5'$ -、 $7'$ -、 $7''$ -、 $5$ -或 $6$ -位被连接到N-保护的NH-罗丹明受体的 $2'$ -、 $2''$ -、 $4'$ -、 $5'$ -、 $7'$ -、 $7''$ -、 $5$ -或 $6$ -位。

[0156] 具体的示例性键结方位在表2中被提供,如下:

[0157]

供体/受体	受体/供体	绰号
4'-或 5'-	4'-或 5'-	头对头
4'-或 5'-	5-或 6-	头对尾
5-或 6'	5-或 6-	尾对尾
2'-、2''-、7'-或 7''-	2'-、2''-、7'-或 7''-	侧对侧
2'-、2''-、7'-或 7''-	4'-或 5'-	侧对头
2'-、2''-、7'-或 7''-	5-或 6-	侧对尾

[0158] 包括染料网络的标记部分,如表2的供体-受体染料网络,可在任何可利用的位置上被连接到试剂的剩余物上。在一些实施方式中,包括头对头连接的受体/供体对的标记部分经由供体或受体部分的5-或6-位被连接到试剂的剩余物上。在一些实施方式中,包括头对尾连接的受体/供体对的标记部分经由供体或受体部分的可利用的4'-、5'-、5-或6-位被连接到试剂的剩余物上。在一些实施方式中,包括尾对尾连接的受体/供体对的标记部分经由供体或受体的4'-或5'-位被连接到试剂的剩余物上。在一些实施方式中,包括侧对侧连接的受体/供体对的标记部分经由供体或受体的4'-、5'-、5-或6-位被连接到试剂的剩余物上。在一些实施方式中,包括侧对头连接的受体/供体对的标记部分经由供体或受体的可利用的4'-、5'-、5-或6-位被连接到试剂的剩余物上。在一些实施方式中,包括侧对尾连接的受体/供体对的标记部分经由供体或受体的4'-、5'-、5-或6-位被连接到试剂的剩余物上。

[0159] 不论它们的方位,0-保护荧光素或N-保护的NH-罗丹明供体和N-保护的NH-罗丹明受体通常经由连接体彼此连接。先前已发现经由连接体连接此类供体和受体染料可能有利,所述连接体本质上是刚性的和/或其相对长,例如,长度在近近似于12-20 Å的范围内(被本文所使用的连接体的“长度”指被连接部分之间的距离,所述距离通过计算在部分之间界定最短连续路径的化学键长度和而确定)。不打算被任何操作理论所束缚,相信连接体产生适合的有效能量传递,所述连接体倾向于使供体和受体彼此保持紧密临近,而不允许它们的生色团彼此接触。从这点看,连接体的刚性和长度是有联系参数。一般地,较短的连接体(例如具有长度为约5到12 Å的连接体)应该具有较大程度的刚性。较长的连接体(例如具有范围为约15到30 Å长度的连接体)可具有较小程度的刚性,或甚至没有刚性。应该避免短的、无刚性的(软的)连接体。

[0160] 刚性可以通过使用基团来实现,所述基团关于它们的键具有被限制的旋转角度,例如通过使用芳撑或杂芳撑部分,和/或包括双键和/或三键的烃撑部分。各种用于将在能量传递染料环境中的罗丹明和荧光素染料彼此连接的连接体在本领域中已知且被描述,例如,在美国专利第5,800,996号中,其公开通过引用被合并于本文。用于将0-保护荧光素或N-保护的NH-罗丹明供体连接到在本文描述的标记部分中的N-保护的NH-罗丹明受体上的连接体的具体例子包括,例如但不限于,下式的基团:

[0161] (L.1)-Z-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-[(Ar)<sub>b</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>]<sub>c</sub>-Z-;

[0162] (L.2)-Z-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-[C≡C-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>]<sub>c</sub>-Z-;

[0163] (L.3)-Z-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-[C≡C-(Ar)<sub>b</sub>]<sub>c</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-Z-;

[0164] (L.4)-Z-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-NH-C(O)-[(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-(Ar)-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-C(O)-NH]<sub>c</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-Z-;和

[0165] (L.5)-Z-[CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>O]<sub>f</sub>-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>O-

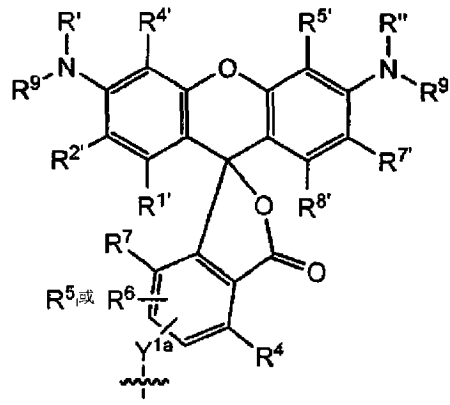
[0166] 其中每一个Z与其它彼此独立地代表被连接基团F<sup>z</sup>贡献的键结的一部分, F<sup>z</sup>如先前所描述, 每一个a与其它彼此独立地代表范围为从0到4的整数; 每一个b与其它彼此独立地代表范围为从1到2的整数; 每一个c与其它彼此独立地代表范围为从1到5的整数; 每一个d与其它彼此独立地代表范围为从1到10的整数; 每一个e与其它彼此独立地代表范围为从1到4的整数; 每一个f与其它彼此独立地代表范围为从1到10的整数; 且每一个Ar与其它彼此独立地代表任选地被取代的单环或多环环烷撑、环杂烷撑(cycloheteroalkylene)、芳撑或杂芳撑基团。Ar的非限制性示例性实施方式包括衍生自先前所描述的低级环烷烃、低级环杂烷烃、母体芳香环系统和母体杂芳香环系统的基团。Ar的具体的非限制性示例性实施方式包括环己烷、哌嗪、苯、萘(naphthalene)、苯酚、呋喃、吡啶、哌啶、咪唑、吡咯烷和噁二唑。连接体具体的非限制性示例性实施方式在图2中被阐述。在图2中, Z<sup>1</sup>和Z<sup>2</sup>各自彼此独立地代表被官能团F<sup>z</sup>所贡献的键结的一部分, F<sup>z</sup>如先前所描述, 且K选自-CH-和-N-。在图2中阐述的连接体的一些具体实施方式中, Z<sup>1</sup>或Z<sup>2</sup>中一个是-NH-且另一个选自-O-、-C(O)-和-S(O)<sub>2</sub>-。

[0167] 在一些实施方式中, 连接供体和受体染料的连接体是阴离子连接体, 如在美国专利第6,811,979号中所描述, 其公开通过引用被合并于本文(参见, 如, 在17段25行到18段37行的公开和图1-17)。适合的阴离子连接体的具体的非限制性示例性实施方式包括上文的式(L.1)到(L.4)的连接体, 其中一个或多个Ar基团被一个或多个取代基所取代, 所述取代基在如, 例如在约pH 7到约pH 9的范围内的pH下使用的条件下具有负电荷。适合的取代基的具体的非限制性例子包括磷酸酯、硫酸酯、磺酸酯和羧酸酯基团。

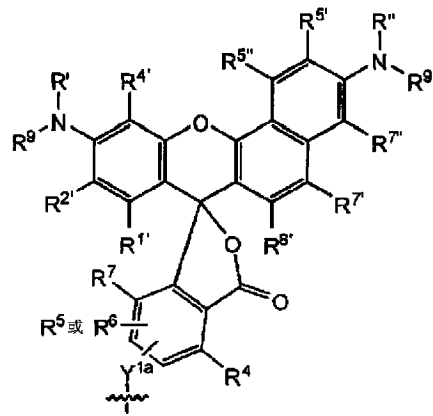
[0168] 在一些实施方式中, 标记部分为式(VI):

[0169] (VI)A-Z<sup>1</sup>-Sp-Z<sup>2</sup>-D

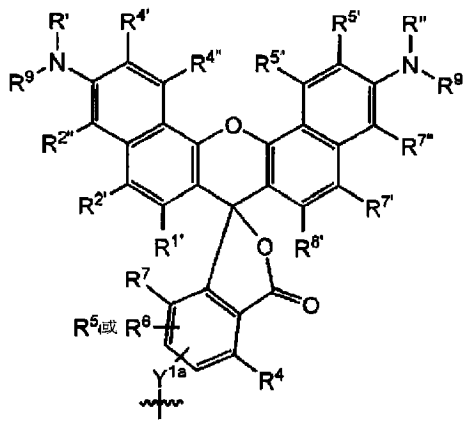
[0170] 其中A代表N-保护的NH-罗丹明受体, D代表供体, 例如, N-保护的NH-罗丹明或O-保护荧光素供体, Z<sup>1</sup>和Z<sup>2</sup>代表被包括官能团F<sup>z</sup>的连接部分提供的键结的一部分, F<sup>z</sup>如先前所描述, 及Sp代表间隔部分, 如先前所描述。在一些具体实施方式中, A选自结构式A.1、A.2、A.3、A.4、A.5和A.6及D选自结构式D.1、D.2、D.3、D.4、D.5和D.6, 其在下文中被阐述。在一些具体实施方式中, A选自结构式A.7、A.8、A.9、A.10、A.11和A.12及D选自结构式D.7、D.8、D.9、D.10、D.11和D.12, 其在下文中被阐述。



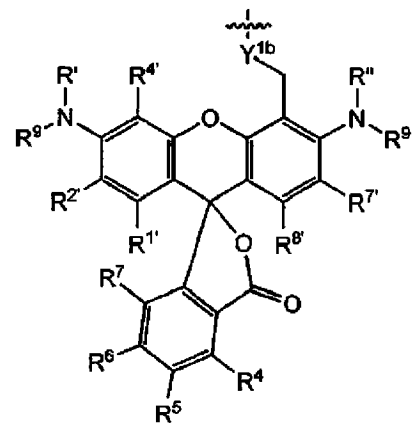
A.1



A.2

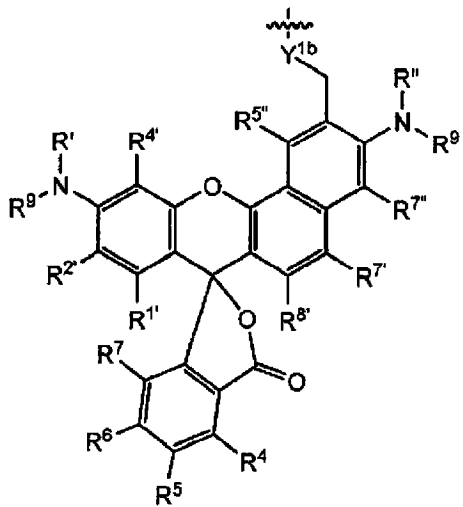


A.3

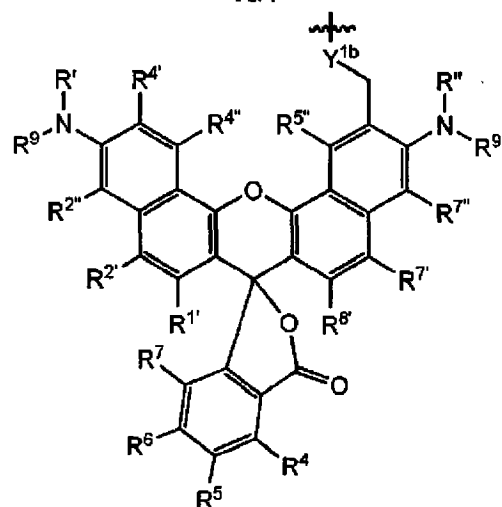


A.4

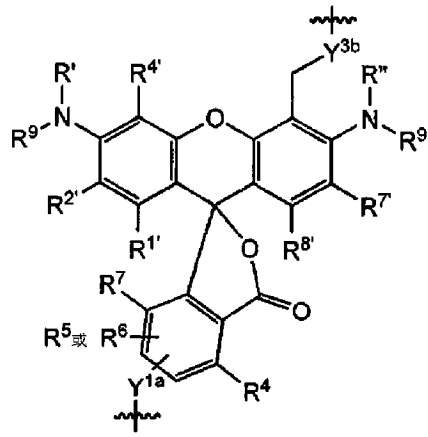
[0171]



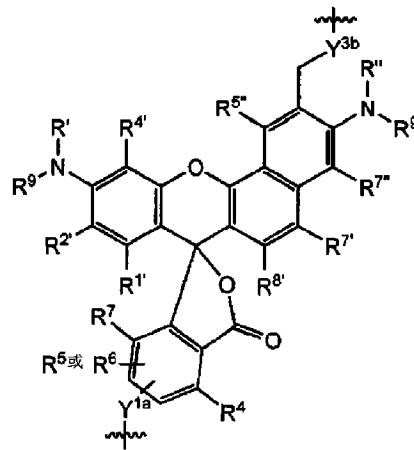
A.5



A.6

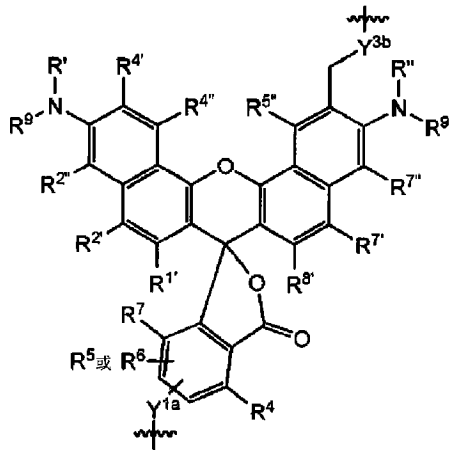


A.7

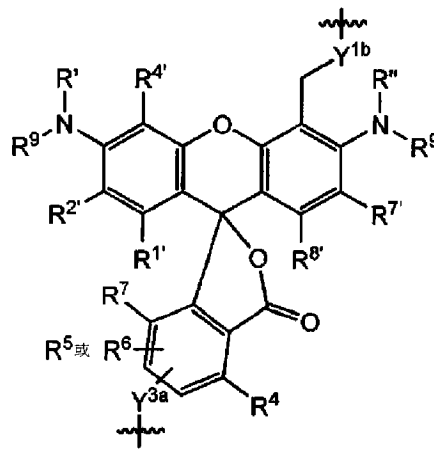


A.8

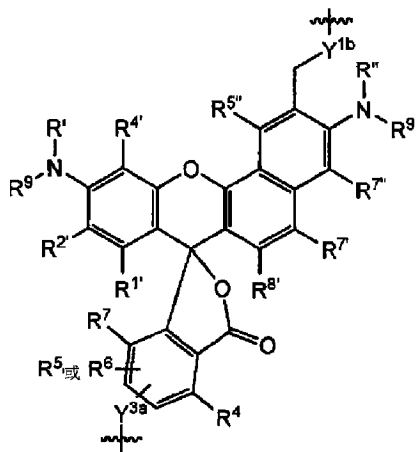
[0172]



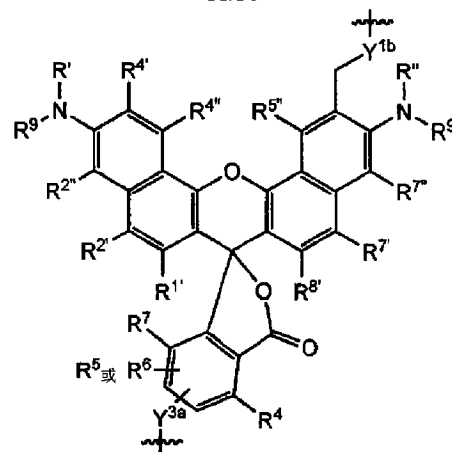
A.9



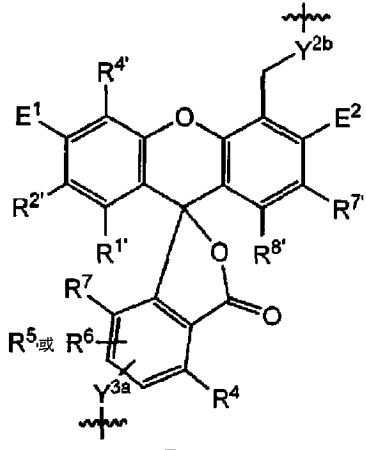
A.10



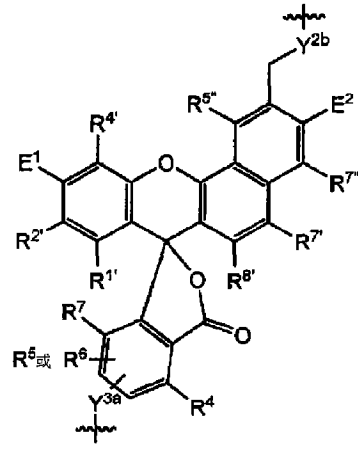
A.11



A.12

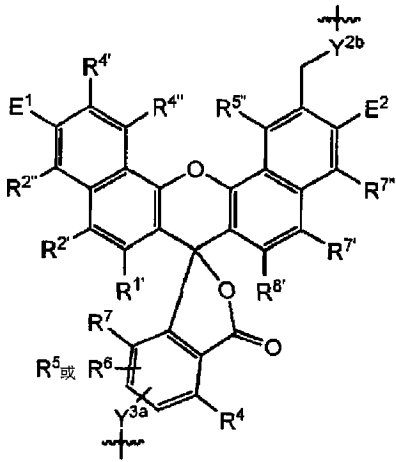


D.1

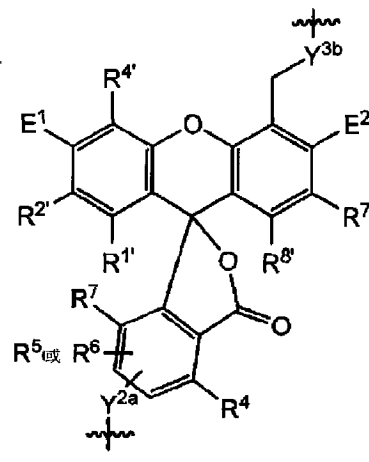


D.2

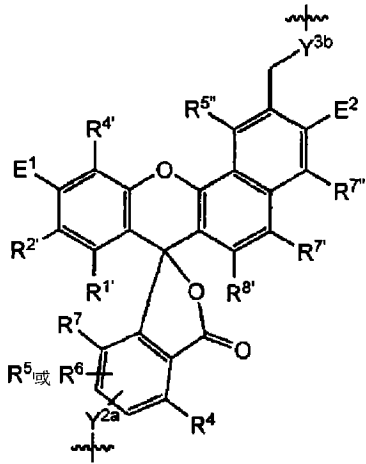
[0173]



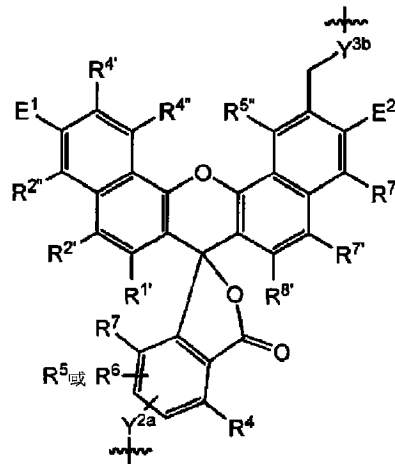
D.3



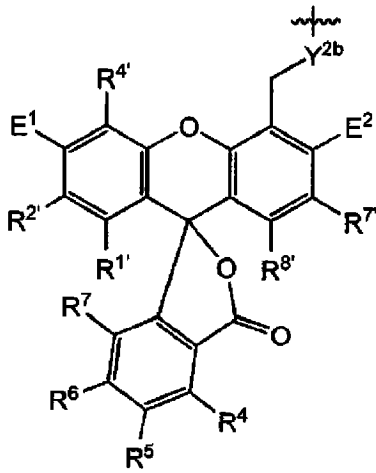
D.4



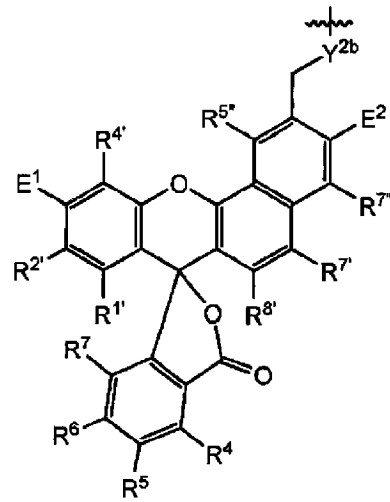
D.5



D.6

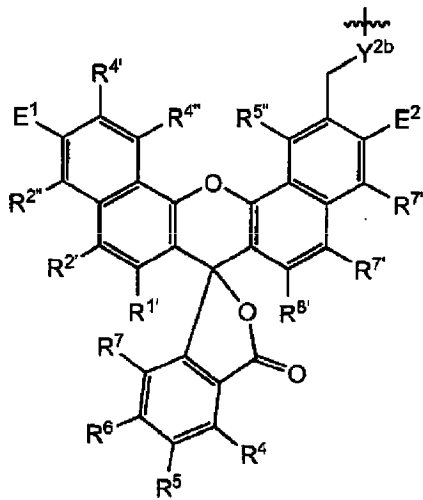


D.7

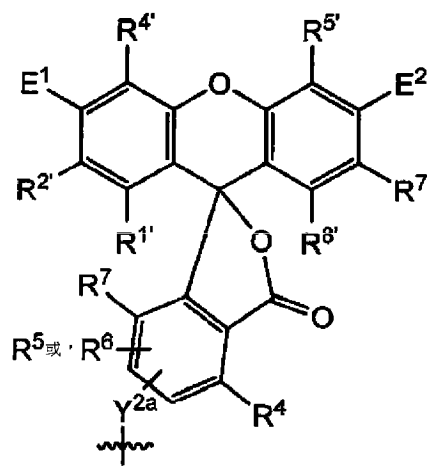


D.8

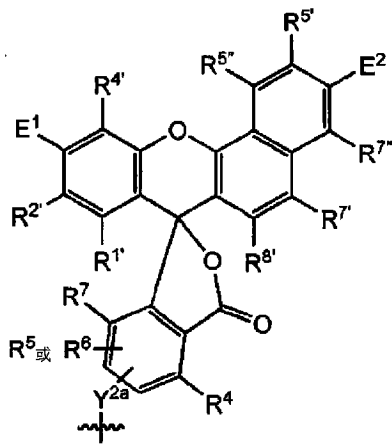
[0174]



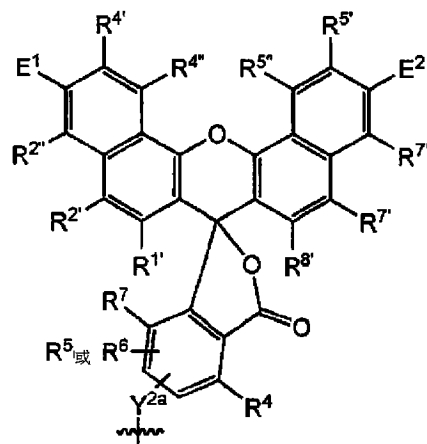
D.9



D.10



D.11



D.12

[0175] 在结构式A.1-A.12和D.1-D.12中：

[0176] E<sup>1</sup>选自-NHR<sup>9</sup>、-NR<sup>3'</sup>R<sup>9</sup>和-OR<sup>9b</sup>；

[0177] E<sup>2</sup>选自-NHR<sup>9</sup>、-NR<sup>6'</sup>R<sup>9</sup>和-OR<sup>9b</sup>；

[0178] R<sup>9b</sup>是R<sup>9</sup>；

[0179] Y<sup>1a</sup>、Y<sup>1b</sup>、Y<sup>2a</sup>、Y<sup>2b</sup>、Y<sup>3a</sup>和Y<sup>3b</sup>各自彼此独立地选自-O-、-S-、-NH-、-C(O-)和-S(O)<sub>2</sub>-；及

[0180] R'、R''、R<sup>1'</sup>、R<sup>2'</sup>、R<sup>2''</sup>、R<sup>3'</sup>、R<sup>4'</sup>、R<sup>4''</sup>、R<sup>5'</sup>、R<sup>5''</sup>、R<sup>6'</sup>、R<sup>7'</sup>、R<sup>7''</sup>、R<sup>8'</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>如先前为结构

式(IIIa)、(IIIb)和(IIIc)所定义,条件为当 $E^1$ 和 $E^2$ 是 $-OR^{9b}$ ,则 $R^{1'}$ 和 $R^{2'}$ 和 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 可同时包括苯并和/或吡啶并基团两者。

[0181] 在根据结构式(VI)的标记部分的一些具体实施方式中, $Y^{1a}$ 、 $Y^{2a}$ 和 $Y^{3a}$ 是 $-NH-$ ;  $Y^{1b}$ 、 $Y^{2b}$ 和 $Y^{3b}$ 选自 $-C(O)-$ 和 $-S(O)_2-$ ;  $Z^1$ 选自 $-C(O)-$ 和 $-S(O)_2-$ ;  $Z^2$ 是 $-NH-$ 及 $Sp$ 是选自以下的基团:

[0182] (Sp.1)  $-(CH_2)_a-[(Ar)_b-(CH_2)_a]_c-$ ;

[0183] (Sp.2)  $-(CH_2)_a-[C\equiv C-(CH_2)_a]_c-$ ;

[0184] (Sp.3)  $-(CH_2)_a-[C\equiv C-(Ar)_b]_c-(CH_2)_a-$ ;

[0185] (Sp.4)  $-(CH_2)_a-NH-C(O)-[(CH_2)_a-(Ar)-(CH_2)_a-C(O)-NH]_c-(CH_2)_a-$ ; 和

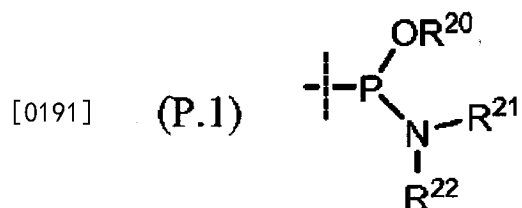
[0186] (Sp.5)  $-[CH_2(CH_2)_eO]_f-CH_2(CH_2)-$ , 其中 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$ 、 $e$ 、 $f$ 和 $Ar$ 如先前所定义。

[0187] 在根据结构式(VI)的标记部分的一些具体实施方式中, $R^9$ 选自 $-C(O)CH_3$ 和 $C(O)CF_3$ 及 $R^{9a}$ 是 $-C(O)C(CH_3)_3$ 。

[0188] 5.5 磷酸酯前体基团

[0189] 本文描述的试剂的许多实施方式包括磷酸酯前体基团("PEP")。当用在分步合成中以合成标记的寡核苷酸时,PEP基团被偶联到任何可利用的羟基上,其可为新生的合成的寡核苷酸的5'-羟基,所述寡核苷酸在任何所需的氧化和/或脱保护步骤后,最终贡献将标记部分连接到合成的寡核苷酸上的键结。形成的键结可为磷酸酯键结或在本领域中已知(know)的被修饰的磷酸酯键结。

[0190] 适于将试剂偶联到伯羟基上以产生磷酸酯或修饰的磷酸酯键结的各种不同基团在本领域中众所周知。具体的例子包括,例如但不限于,亚磷酰胺基团(见,如Letsinger等人,1969,J. Am. Chem. Soc. 91:3350-3355; Letsinger等人,1975,J. Am. Chem. Soc. 97:3278; Matteucci & Caruthers,1981,J. Am. Chem. Soc. 103:3185; Beaucage & Caruthers,1981, Tetrahedron Lett. 22:1859; 其公开通过引用被合并于本文)、2-氯苯基-或2,5-二氯苯基-磷酸酯基团(参见,如Sproat & Gait,"Solid Phase Synthesis of Oligonucleotide by the Phosphotriester Method,"(通过磷酸三酯方法的寡核苷酸的固相合成)在: Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach, Gait, 编辑,1984, IRL Press, 83-115页),其公开通过引用被合并于本文)和H-磷酸酯基团(参见,如Garegg等人,1985, Chem. Scr. 25:280-282; Garegg等人,1986, Tet. Lett. 27:4051-4054; Garegg等人,1986, Tet. Lett. 27:4055-4058; Garegg等人,1986, Chem. Scr. 26:59-62; Froehler & Matteucci, 1986, Tet. Lett. 27:469-472; Froehler等人,1986, Nucl. Acid Res. 14:5399-5407, 其公开通过引用被合并于本文)。在具体实施方式中,PEP基团是式(P.1)的亚磷酰胺基团:



[0192] 其中:

[0193]  $R^{20}$ 选自直链、支链或环,饱和或不饱和的含有从1个到10个碳原子的烷基、2-氰基乙基、含有从6个到10个环碳原子的芳基和含有从6个到10个环碳原子和从1个到10个炔撑碳原子的芳基烷基;及

[0194]  $R^{21}$ 和 $R^{22}$ 各自彼此独立地选自直链、支链或环,饱和或不饱和的含有从1个到10个碳原子的烃基、含有从6个到10个环碳原子的芳基和含有从6个到10个环碳原子和从1个到10个烃撑(alkylene)碳原子的芳基烷基,或可选择地, $R^{21}$ 和 $R^{22}$ 被采用与它们所键结的氮原子一起形成含有从5到6个环原子的饱和或不饱和环,所述环原子中的一个或两个,除了被阐述的氮原子,可为选自O、N和S的杂原子。

[0195] 在具体实施方式中, $R^{20}$ 是2-氰基乙基及 $R^{21}$ 和 $R^{22}$ 各自为异丙基。

[0196] 5.6合成片断

[0197] 本文描述的试剂的许多实施方式包括一个或多个合成片断,其在适当地脱保护后,如果必要,提供可用于其它基团或部分向合成的标记的寡核苷酸的连接的位点。基团可在标记的寡核苷酸的合成过程中被连接到合成片断上,或可选择地,合成片断可在合成后脱保护以显露官能团,其它基团或部分可被连接到所述官能团上。例如,合成片断可包括用保护基团保护的伯胺基团,所述保护基团对被用于完成标记的寡核苷酸合成的条件稳定。与除去在合成的寡核苷酸上的各种其它保护基团同时地,或分别进行的合成后除保护基团,可提供伯氨基,其它基团和/或部分可被连接到所述伯氨基上。

[0198] 以适于在寡核苷酸合成中使用的保护基团保护的各种不同类型的反应基团在本领域中已知,且包括,例如但不限于,氨基(以,例如,三氟乙酰基或4-单甲氧基三苯甲基保护)、羟基(以,例如,4,4'-二甲氧基三苯甲基保护)、硫羟基(以,例如,三苯甲基或烷基硫烷基保护)和醛基(以,例如,乙缩醛保护基团保护)。所有这些被保护的反应基团可组成本文描述的试剂的合成片断。

[0199] 在一些实施方式中,合成片断包括式-OR<sup>o</sup>的保护的伯羟基,其中R<sup>o</sup>代表对酸不稳定的保护基团,其在合成寡核苷酸期间可被选择性除去。适于在寡核苷酸合成环境下保护伯羟基的对酸不稳定的保护基团在本领域中已知且包括,例如但不限于,三苯基甲基(三苯甲基)、4-单甲氧基三苯甲基、4,4'-二甲氧基三苯甲基、4,4',4''-三甲氧基三苯甲基、双(对甲氧基苄基)苯甲基、萘基二苯基甲基、对-(对'-溴苯酰氧基)苯基二苯基甲基、9-蒎基、9-(9-苄基)咕吨基和9-(9-苄基-10-氧代)蒎基。所有这些基团可经使用温和的酸处理而被除去,如通过用2.5%或3%双-或三氯酸且在二氯甲烷中处理。上文列举的用对酸不稳定的保护基团保护伯羟基的方法被众所周知。

[0200] 5.7固相支持体

[0201] 本文描述的试剂的许多实施方式包括固相支持体,其它部分和/或基团被连接到所述固相支持体上。通常,使用官能团如氨基或羟基活化固相支持体,携带适于连接到其它部分的连接基团的连接体被连接到所述官能团上。

[0202] 各种可用适于连接到各种部分和连接体的官能团活化的物质,与将物质活化以包括官能团的方法在本领域中已知且包括,但不限于,控制的小孔玻璃、聚苯乙烯和接枝共聚物。任何这类物质被用作在本文描述的试剂中的固相支持体。

[0203] 5.8用于端位羟基标记的合成试剂(Reagents)

[0204] 本文描述的一些实施方式被结构(structure)式(VII)描述:

[0205] (VII)LM-L-PEP

[0206] 其中LM代表如本文所描述的标记部分,L代表如本文所描述的任意的连接体,且PEP代表如本文所描述的磷酸酯前体基团。试剂可包括其它基团或部分,如合成片断。在一

些实施方式中,合成试剂包括标记部分和PEP基团,且不包括其它部分或基团。此类合成试剂可在寡核苷酸的分步合成中被偶联到羟基上,且可用于,在其它用途之中,将标记部分连接到合成的寡核苷酸的端位羟基上,所述端位羟基通常为5'-羟基。

[0207] PEP基团可被直接连接到标记部分,或它可以借助于连接体被连接到标记部分。因PEP基团一般通过将合适的试剂偶联到伯羟基上而被连接到分子上,在PEP基团被直接连接到标记部分上的实施方式中,标记部分应该包括伯羟基的取代基团。在PEP基团借助于连接体被连接到标记部分的实施方式中,连接体合成子应该包括连接基团,其适于与在标记部分合成子上的连接基团和适于连接PEP基团的伯羟基形成键结。适合的连接体合成子包括,但不限于,式 $F^z-Sp-OH$ 的合成子,其中 $F^z$ 是与在标记部分合成子上的官能团互补的官能团且 $Sp$ 代表间隔部分。间隔部分可以包括原子和/或官能团的任何组合,所述原子和/或官能团对将用于合成及脱保护标记的合成寡核苷酸的条件稳定。非限制性示例性连接体在图2中被 阐述,其中 $Z^2$ 是O。在一些实施方式中, $Sp$ 是任选地被取代的烃撑链,其含有从1个到10个链原子。在具体实施方式中, $Sp$ 是未被取代的含有从1个到9个碳链原子的烃撑链。

[0208] 在一些实施方式中,合成试剂是根据结构式(formula)(VII)的化合物,其中:

[0209] LM是上文中具体示例的标记部分的一个实施方式;

[0210] L选自 $-Z-(CH_2)_{3-6}-O-$ 、 $-Z-(CH_2)_a-[(Ar)_b-(CH_2)_a]_c-O-$ 、 $-Z-(CH_2)_a-[C\equiv C-(CH_2)_a]_c-O-$ 、 $-Z-(CH_2)_a-[C\equiv C-(Ar)_b]_c-(CH_2)_a-O-$ 、 $-Z-(CH_2)_d-NH-C(O)-[(CH_2)_a-(Ar)-(CH_2)_a-C(O)-NH]_c-(CH_2)_d-O-$ 、 $-Z-[CH_2(CH_2)_eO]_f-CH_2(CH_2)_eO-$ 和在图2中阐述的连接体中的一个,其中 $Z^2$ 是O;及

[0211] PEP是亚磷酰胺基团,如,例如上文所描述的结构式P.1的亚磷酰胺基团。在一些具体实施方式中,在连接体L中的Z是 $-NH-$ 。

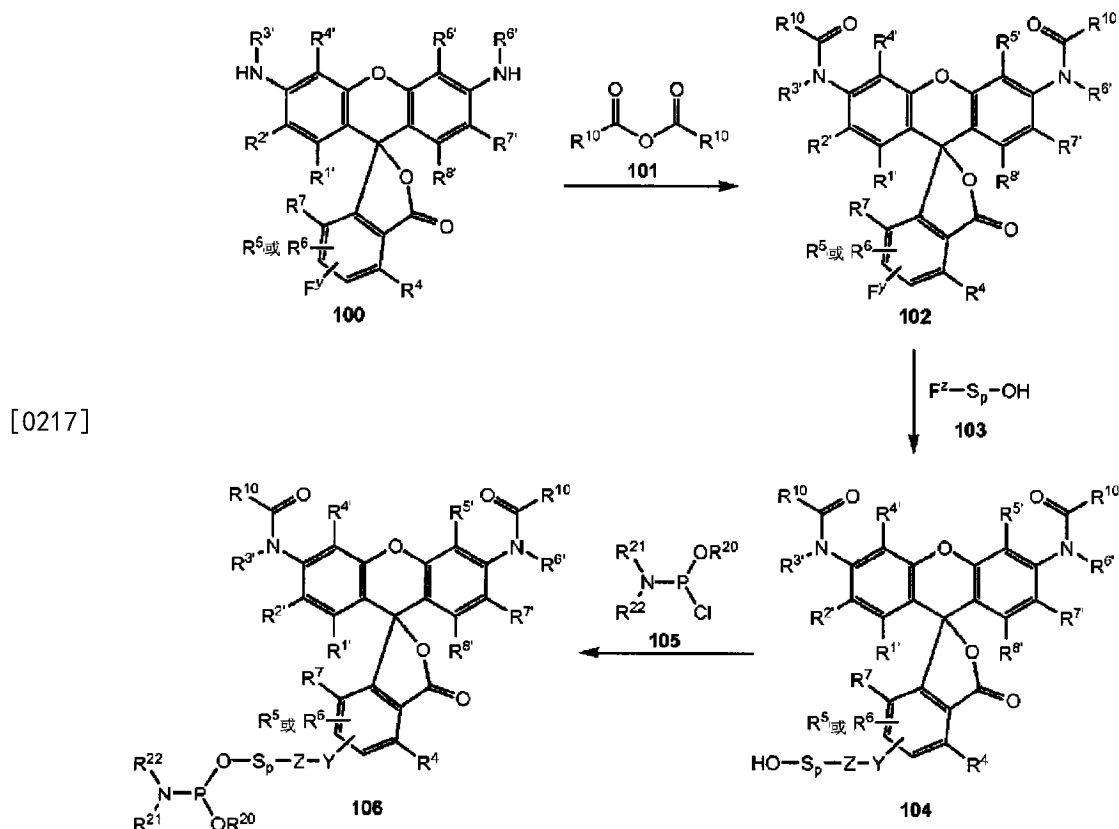
[0212] 在一些实施方式中,在根据结构式(VII)的合成试剂中的连接体包括核苷,以致于合成试剂是核苷。在一些实施方式中,核苷合成试剂是根据结构式(VII.1)的化合物:



[0214] 其中PEP代表磷酸酯前体基团,B代表核碱基,LM代表标记部分及 $L^2$ 代表将核碱基B连接到标记部分LM的连接体。核碱基B和连接体 $L^2$ 的特征和性质在下文更详细地描述。根据结构式(VII.1)的非限制性示例性核苷合成试剂在图4中被阐述。

[0215] 合成试剂的合成实施方式的示例性合成图在下文合成图(I)中被提供,在所述合成试剂中PEP基团经由任选的连接体被连接到标记部分上,在合成图中各种R、 $F^y$ 、 $F^z$ 、Y、Z和 $S_p$ 基团如先前所定义:

[0216] 合成图(I)



[0218] 在合成图(I)中包括包括官能团 $F^y$ 的连接基团的母体NH-罗丹明合成子100,以酞101乙酰化以生成N-乙酰基保护的NH-罗丹明合成子102。合成子102随后被偶联到连接体合成子103上以生成化合物104。合成子102可能需要在偶联前活化,取决于 $F^y$ 的种类(identity)。例如,如果 $F^y$ 是羧基,它可在偶联前被活化为酯,如NHS酯。在化合物104中,-Y-Z-代表通过互补官能团 $F^y$ 和 $F^z$ 形成的键结,其中Y代表被 $F^y$ 贡献的部分且Z代表被 $F^z$ 贡献的部分,如先前所描述。化合物104随后与PEP合成子105反应以生成亚磷酰胺合成试剂106,105在阐述的具体实施方式中为磷化氢。

[0219] 5.9 用于内部或3'-末端标记的合成试剂

[0220] 本文描述的合成试剂可任选地包括一个或多个用于连接其它基团和/或部分的合成片断。包括式-OR<sup>e</sup>的合成片断的合成试剂提供伯羟基,其中R<sup>e</sup>代表如先前描述的对酸不稳定的保护基团,其它核苷可被连接到所述伯羟基上。作为结果,包括此合成片断的合成试剂可用于在5'-羟基、3'-羟基上或在一个或多个内部位置上标记合成的寡核苷酸。它们也可彼此偶联,或偶联到其它亚磷酰胺标记试剂上,以允许含有多个标记部分的寡核苷酸的合成。

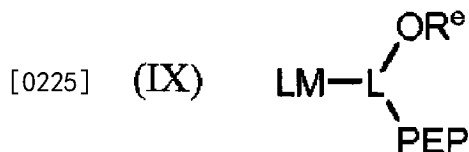
[0221] 组成合成试剂的标记部分、PEP基团和合成片断-OR<sup>e</sup>可以任何允许它们表现它们各自功能的方式和/或方位连接在一起。作为一个具体的例子,PEP基团和合成片断各自可任选地经由连接体连接到标记部分上。在一些实施方式中,此类合成试剂为根据结构式(VIII)的化合物:

[0222] (VIII)R<sup>e</sup>O-L-LM-L-PEP

[0223] 其中每个L与其他彼此独立地代表任选的连接体,LM代表标记部分及PEP代表磷酸酯前体基团。适合的保护基团R<sup>e</sup>、连接体L、标记部分LM和磷酸酯前体基团的非限制性例子

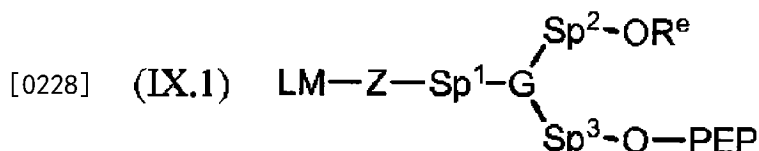
包括那些上文具体示例的例子。

[0224] 作为另一个具体例子,PEP基团和合成片断-OR<sup>e</sup>可连接到支链连接体上,所述支链连接体被连接到标记部分上。在一些实施方式中,此合成试剂是根据结构式(IX)的化合物:



[0226] 其中L代表连接体,LM代表标记部分及PEP代表磷酸酯前体基团。

[0227] 在具体实施方式中,根据结构式(IX)的合成试剂为根据结构式(IX.1)的化合物:

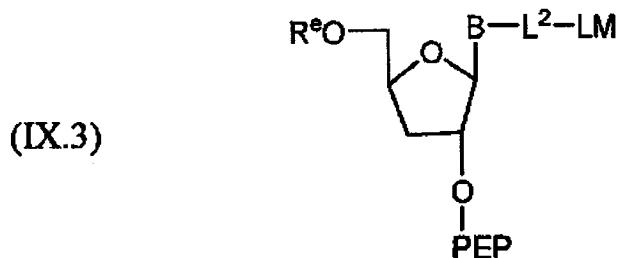
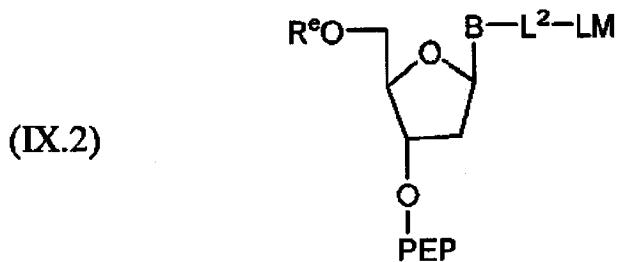


[0229] 其中LM代表标记部分,-Z-代表被功能F<sup>Z</sup>贡献的连接的一部分,Sp<sup>1</sup>、Sp<sup>2</sup>和Sp<sup>3</sup>可相同或不同,其每一个代表间隔部分,G代表CH、N,或一个基团,所述基团包括和(and)芳撑、苯撑、杂芳撑、低级环烷撑、环己撑,和/或低级环杂烷撑,及PEP代表磷酸酯前体基团。在一些实施方式中,LM是上文具体示例的标记部分的一个实施方式,Sp<sup>1</sup>、Sp<sup>2</sup>和Sp<sup>3</sup>每一个彼此独立地选自含有从1个到9个碳原子的烷撑链、Sp.1、Sp.2、Sp.3、Sp.4和Sp.5(上文所定义),和/或PEP是根据前文的结构式P.1的亚磷酰胺。根据结构式(IX.1)示例性合成试剂的非限制性具体实施方式在图3A、图3B和图4中被阐述。

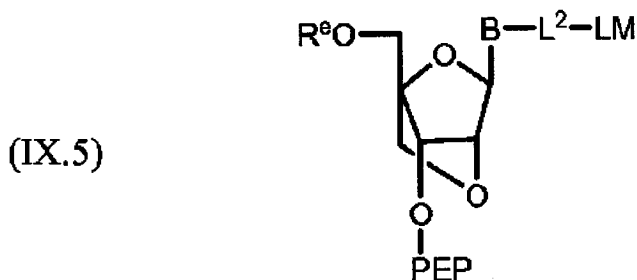
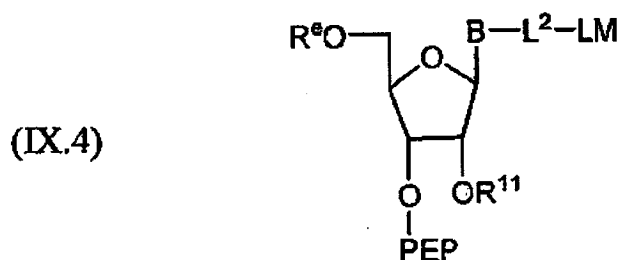
[0230] 在一些实施方式中,合成片断-OR<sup>e</sup>被核苷提供,以致于合成试剂是核苷。在此类核苷合成试剂中,标记部分通常借助于连接体被连接到核苷的核碱基上,且在核碱基上的任何环外官能团,如,例如环外胺,是被保护的,所述核碱基在用于合成标记的寡核苷酸的条件下是可反应的。

[0231] 核苷可为可被适当保护以用在寡核苷酸的合成中的任何核苷,且可包括2'-脱氧核糖的糖部分、3'-脱氧核糖的糖部分(用于合成包括2'-5'内部核苷酸键结的标记的寡核苷酸)、适当保护的核糖部分、任何这些核糖部分的被取代形式,或甚至非核糖的糖部分。

[0232] 在一些实施方式中,此类核苷合成试剂是根据结构式(IX.2)、(IX.3)、(IX.4)和(IX.5)的化合物:



[0233]



[0234] 其中LM代表标记部分,B代表适当保护的核碱基, $L^2$ 代表将标记部分连接到核碱基的连接体, $R^e$ 代表对酸不稳定的保护基团,PEP代表磷酸酯前体基团,O是氧原子及,在结构式(IX.4)中, $R^{11}$ 代表2'-羟基保护基团。

[0235] 在根据结构式(VII.1)、(IX.2)、(IX.3)、(IX.4)和(IX.5)的合成试剂中,核碱基B实质上可为用于整合入寡核苷酸中的任何杂环。例如,核碱基可为一个遗传编码嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤)、一个遗传编码嘧啶(胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶)、遗传编码嘌呤和/或嘧啶的类似物和/或衍生物(如,7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、5-甲基胞嘧啶)、非遗传编码嘌呤和/或嘧啶(如,肌昔、氧杂蒽和次黄嘌呤(hypoxanthine))或其它类型杂环。广泛的用于整合入寡核苷酸的各种杂环在本领域中已知且被描述,例如,在Practical Handbook of Biochemistry and molecular Biology,Fasman编辑,1989,CRC Press(参见,如385-393页和本文引用的文献),其公开通过引用被合并于本文。所有这些各种杂环,及那些随后被发现的杂环,可被本文描述的核苷合成试剂所包括。

[0236] 当B是在根据结构式(VII.1)、(IX.2)、(IX.3)、(IX.4)和(IX.5)的合成试剂中的嘌呤时,被阐述的糖部分通常连接到嘌呤的N9位上,且当B是嘧啶时,被阐述的糖部分通常连

接到嘧啶的N1位上。其它核碱基的连接位点对于本领域技术人员将是明显的。

[0237] 在核碱基上的任何环外胺或其它反应性基团被保护基团保护,所述保护基团对用于合成标记的寡核苷酸的合成条件稳定。各种适于在寡核苷酸合成环境下保护核苷核碱基的环外胺基团的保护基团制备此类被保护的核苷的方法在本领域中众所周知。

[0238] 例如,已被用于保护腺嘌呤环外胺的基团包括苯甲酰基(benzoyl)(Bz)、苯氧乙酰基(Pac)和异丁酰基(iBu)。已被用于保护胞嘧啶(cytosine)环外胺的基团包括乙酰基(Ac)和Bz。已用于保护鸟嘌呤环外胺的基团包括iBu、二甲基甲酰胺(Dmf)和4-异丙基-苯氧乙酰基(iPr-Pac)。所有这些保护基团可在55-65°C下通过用氢氧化铵处理2-3个小时而被除去。然而,这些保护基团中某些可在较温和条件下除去。例如,从A<sup>iBu</sup>、A<sup>Pac</sup>、C<sup>Ac</sup>和G<sup>iPr-Pac</sup>剪切保护基团可在室温下使用氢氧化铵在4-17小时内实现或用0.05M碳酸钾的甲醇溶液实现,或用25%叔丁基胺的H<sub>2</sub>O/EtOH溶液处理而实现。因为组成本文描述的试剂的某些NH-罗丹明和/或其它染料可能对其它保护基团所需的较苛刻脱保护条件不稳定,优选使用了可在较温和脱保护条件下被除去的保护基团的核苷试剂。

[0239] 将标记部分LM连接到核碱基B上的连接体L<sup>2</sup>可被连接到核碱基的任何位置上。在一些实施方式中,当B是嘌呤时,连接体被连接到嘌呤的8-位上,当B是7-脱氮嘌呤时,连接体被连接到7-脱氮嘌呤的7-位上,及当B是嘧啶时,连接体被连接到嘧啶的5-位上。

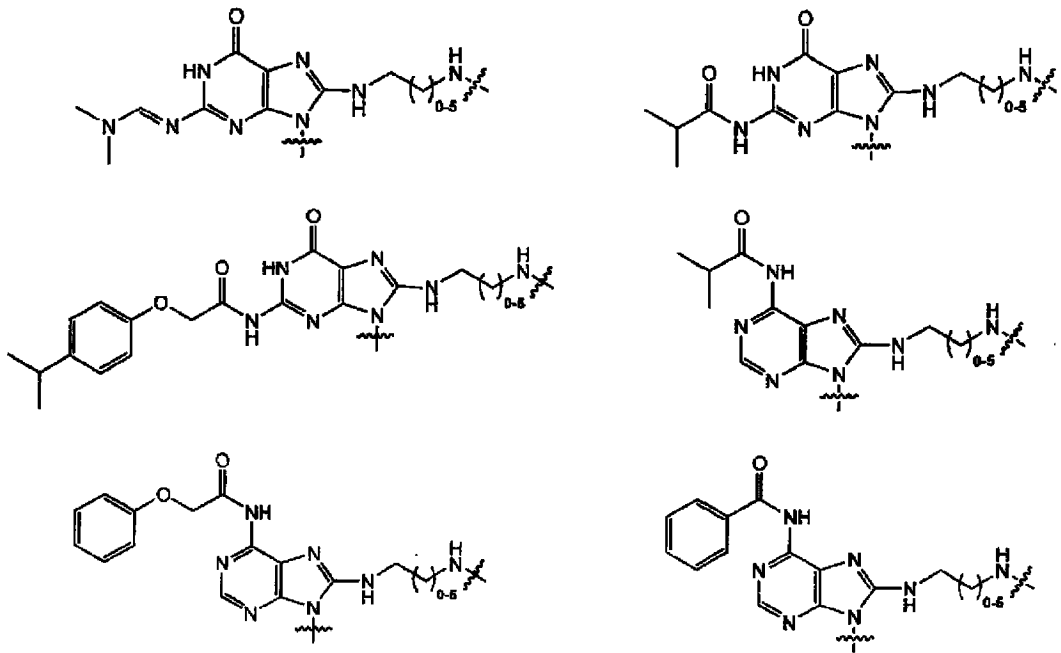
[0240] 在一些实施方式中,用于将LM连接到核碱基上的连接体L<sup>2</sup>包括乙炔基或烯基氨基键结,如,例如,选自以下的键结:-C≡C-CH<sub>2</sub>-NH-、-C≡C(O)-、-CH=CH-NH-、-CH=CH-C(O)-、-C≡C-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-及-CH=CH-C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-C(O)-、炔丙基-1-乙氧基氨基键结,如,例如,具有式-C≡CH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-[O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-NH-的键结或刚性键结,如,例如,选自以下的键结:-C≡C-C≡C-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-[O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-NH-、-C≡C-(Ar)<sub>1-2</sub>-C≡C-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-[O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-NH-、-C≡C-(Ar)<sub>1-2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-[O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-NH-和-C≡C-(Ar)<sub>1-2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-[O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>0-6</sub>-NH-,其中Ar如先前所定义。

[0241] 在一些实施方式中,用于将LM连接到嘌呤核碱基上的连接体L<sup>2</sup>包括烃基胺,如,例如,式-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NH-的键结。

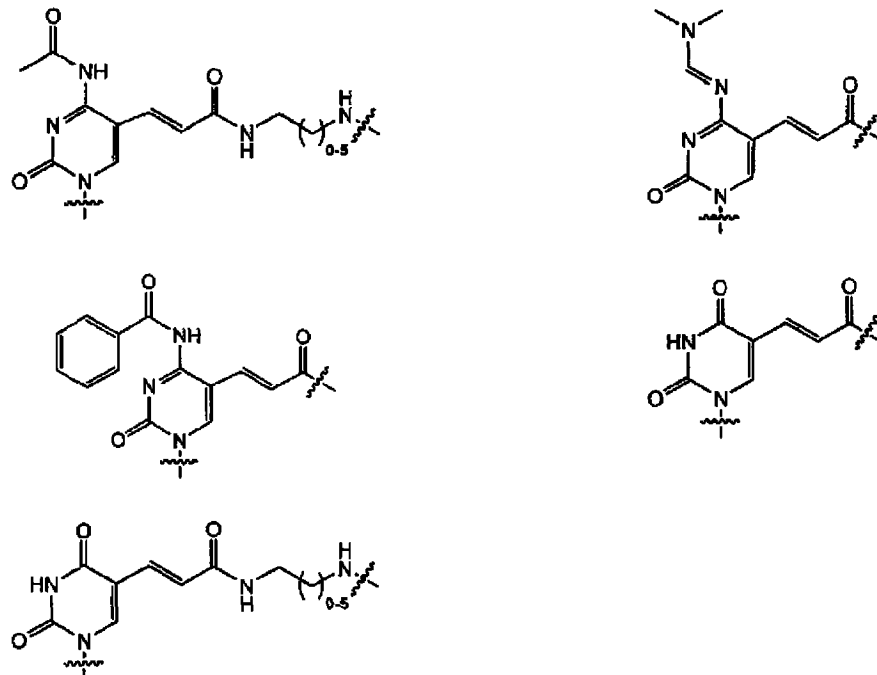
[0242] 在一些实施方式中,用于将LM连接到嘌呤或嘧啶核碱基(nucleobase)上的连接体L<sup>2</sup>是阴离子连接体,其如在美国专利第6,811,979号中所描述的,其公开通过引用被合并于本文(见,如在17段25行到18段37行的公开和图1-17)。

[0243] 合成以连接体如那些前文描述的适于整合入本文描述的试剂中的连接体衍生化的核苷的方法被描述,例如,在Hobbs等人,1989,J.Org.Chem.54:3420;Hobbs等人的美国专利第5,151,507号,Khan等人的美国专利第5,948,648号;和Khan等人的美国专利第5,821,356号,其公开通过引用被合并于本文。衍生化的核苷可用作合成核苷试剂的合成子,其将在下文中被更加详细地描述。

[0244] 连接体-衍生化的核碱基的具体示例性实施方式在下文被阐述,所述核碱基组成本文描述的核苷试剂:

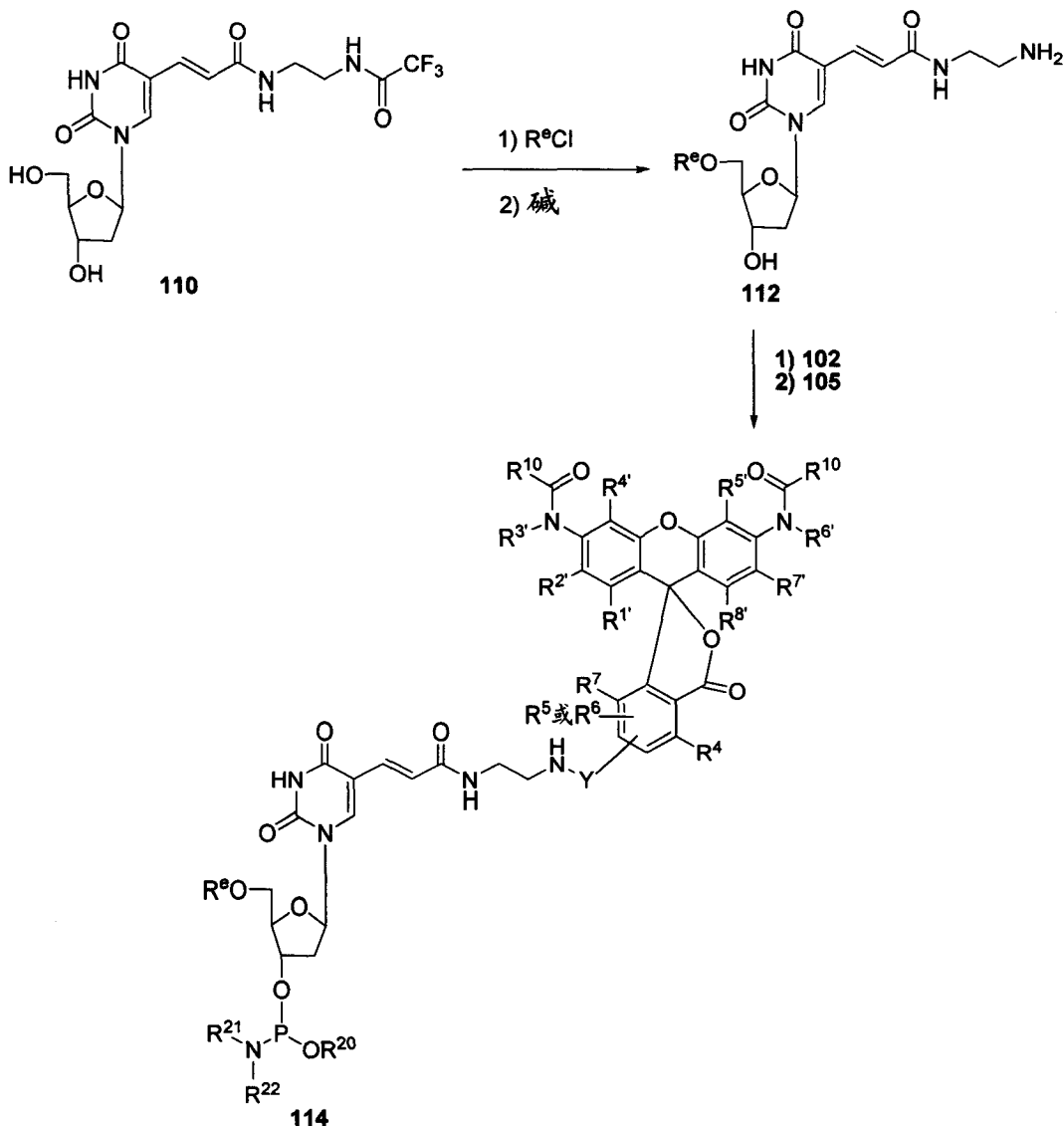


[0245]



[0246] 核苷合成试剂可从连接体-衍生化的核苷合成子制备,如下文合成图(II)中所阐述:

[0247] 合成图(II)



[0248]

[0249] 在合成图(II)中,连接体衍生化的核苷合成子110在5'-羟基上以对酸不稳定的保护基团保护,所述保护基团在合成图中用示例性氯化物试剂 $R^eCl$ 阐述,其中 $R^e$ 如先前所定义。用碱处理以除去三氟乙酰基保护基团产生合成子112。合成子112与标记部分合成子102反应(见前文的合成图(I)),随后通过用PEP合成子105处理以产生核苷合成试剂114,所述合成子105在此阐述的具体例子中是磷化氢(见前文合成图(I))。上文阐述的完成各种合成步骤的特定条件众所周知。包括合成片断,如式 $-OR^e$ 的合成片断的非核苷合成试剂可通过调整合成图(II)的路线而制备。

[0250] 5.10固相支持体试剂

[0251] 本文描述的试剂的许多实施方式包括固相支持体。此类试剂一般包括固相支持体、本文描述的标记部分和合成片断,且可包括其它基团或部分,如其它标记部分、猝灭部分、合成片断和/或用于稳定化寡核苷二倍体等的基团,如,例如,在核碱基对间插入的剂(插入剂)和结合二倍体小沟的剂(小沟结合剂或MGB剂)。固相支持体、标记部分、合成片断和任何任选的其它部分可以以允许它们表现它们各自功能的任何方式或方位彼此连接。

[0252] 在一些实施方式中,固相支持体经由连接体被连接到试剂剩余物上。将固相支持体连接到试剂剩余物上的连接体通常包括键结,所述键结在特定条件下被选择性剪切以致

于合成后,被合成的标记的寡核苷酸可从固相支持体中释放。在一些实施方式中,键结对用于脱保护合成的标记的寡核苷酸的条件不稳定,以致于寡核苷酸在单一步骤中被脱保护且从固相支持体中被剪切。此类连接体通常包括酯键结,但可包括其它键结,如,例如,碳酸酯、二异丙基硅氧醚、修饰的磷酸酯等。

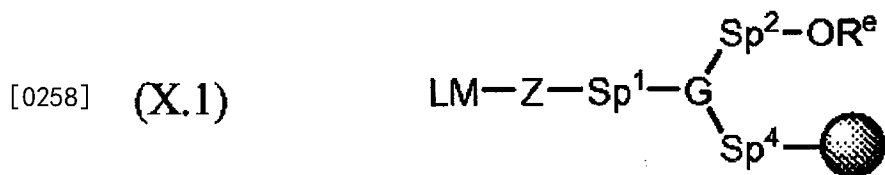
[0253] 各式各样在寡核苷酸合成环境下使用的可被选择性剪切的连接体及用此类连接体衍生化固相支持体的方法在本领域中已知。所有这些各种连接体可被调整以用于本文描述的固相支持体试剂中。包括示例性连接体的固相支持体试剂的非限制性例子在图7中被阐述,所述连接体在用于脱保护合成的寡核苷酸的碱性条件下可被剪切。

[0254] 与合成试剂类似,固相支持体试剂本质上可为非核苷或核苷。非核苷固相支持体试剂的示例性实施方式包括根据结构式(X)的试剂:



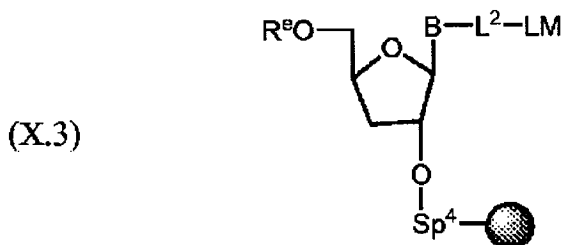
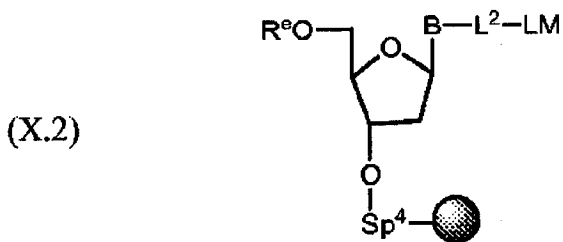
[0256] 其中LM代表标记部分,L代表任意的可被选择性剪切的连接体及-OR<sup>e</sup>代表合成片断,其中R<sup>e</sup>是如先前所描述的对酸不稳定的保护基团。

[0257] 在一些实施方式中,结构式(X)的固相支持体合成试剂是根据结构式(X.1)的非核苷试剂:

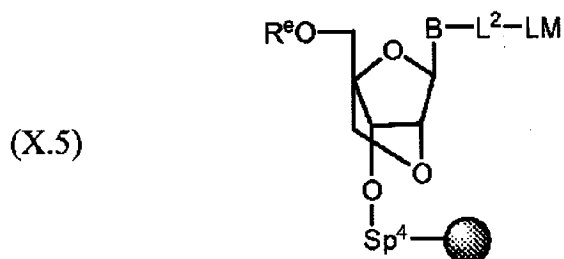
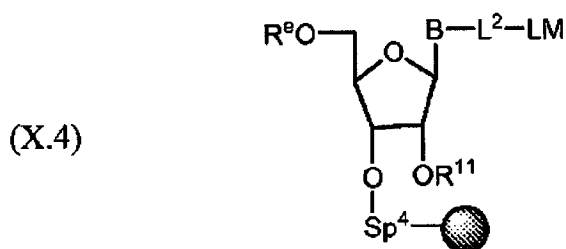


[0259] 其中Z、LM、G、Sp<sup>1</sup>、Sp<sup>2</sup>和R<sup>e</sup>如先前对结构式(IX.1)相关的定义及Sp<sup>4</sup>代表选择性可剪切的间隔部分。在一些具体实施方式中,可选择性(selectively)剪切的间隔部分Sp<sup>4</sup>包括酯键结。

[0260] 在一些实施方式中,结构式(X)的固相支持体合成试剂是根据结构式(formulae)(X.2)、(X.3)、(X.4)或(X.5)的核苷试剂:



[0261]



[0262] 其中LM、R<sup>e</sup>、B、L<sup>2</sup>如先前为结构式(IX.2)、(IX.3)、(IX.4)和/或(IX.5)所定义，R<sup>11</sup>如先前为结构式(IX.4)所定义及Sp<sup>4</sup>代表如上文所描述的选择性可剪切的间隔部分，其在一些实施方式中，包括酯键结。

[0263] 5.11其它示例性实施方式

[0264] 将理解，本公开通篇描述的各种部分、基团和连接体的具体实施方式可以包括在本文描述的所有试剂中。此外，虽然特定组合已经被具体地示例，各种具体实施方式可以任何组合方式彼此组合。作为一个具体例子，任何一个本文描述的标记部分LM的具体实施方式可被包括在任何本文描述的非核苷和核苷固相支持体和合成试剂的具体示例的实施方式(embodiments)中。作为另一个具体例子，任何一个磷酸酯前体基团PEP的具体实施方式，如前文的结构式(P.1)的亚磷酰胺基团，可被包括在任何本文描述的合成试剂中。

[0265] 5.12试剂的用途

[0266] 本文描述的各种试剂可用在寡核苷酸的分步合成中以合成在合成树脂上用罗丹明染料直接标记的寡核苷酸。因此，各种试剂提供以各式各样不同罗丹明合成地标记寡核苷酸的能力，避免耗力的合成后修饰的需要。示例性合成试剂合成用NH罗丹明染料标记的寡核苷酸的用途在图9A-9D中阐述。

[0267] 如将被本领域技术人员所意识到的，由于可利用亚磷酰胺试剂作为罗丹明染料的

供体、受体或甚至猝灭剂,本文描述的试剂具有合成以能量传递染料和/或原位合成的罗丹明猝灭剂染料对标记的寡核苷酸的能力。用NH-罗丹明-荧光素能量传递染料对标记的寡核苷酸的示例性合成在图10A-10C和图11A-11D中被阐述,所述染料对显示了本文描述的试剂所提供的通用性。因为本文描述的试剂实质上允许任何NH-罗丹明染料包括在固相支持体和/或合成试剂中,以能量传递染料对标记的寡核苷酸可方便地被原位合成,而不需要合成后修饰,所述能量传递染料对具有光谱性质且被调整以用于指定应用。此外,用各式各样不同能量传递染料对组合标记的寡核苷酸可以单一单体试剂被合成,避免了制造含有指定染料对的合成试剂的需要。染料对的每一个成员可通过或不通过添加插入连接部分而在逐步方式中被连接到的新生的寡核苷酸中。

[0268] 参照图9A-9D,连接于支持物的合成的寡核苷酸(oligonucleotide)200用酸处理以除去保护它的5'-羟基的DMT基团,产生5'-脱保护的连接于支持物的寡核苷酸202。偶联N-保护的NH-罗丹明亚磷酰胺试剂204后,氧化以产生连接于支持物的NH-罗丹明标记的寡核苷酸(oligonucleotide)206。用浓缩的氢氧化铵处理以除去任何保护基团并从固相支持体(树脂)上剪切合成的寡核苷酸以生成以NH-罗丹明染料标记的寡核苷酸208。

[0269] 参照图10A-10C,包括作为标记部分的保护的NH-罗丹明-荧光素能量传递染料对的固相支持体试剂210可经历三个合成循环以产生连接于支持物的标记的寡核苷酸212。从固相支持体剪切以产生脱保护的、标记的寡核苷酸214。

[0270] 参照图11A-11D,连接于支持物的新生寡核苷酸220可通过将N-保护的NH-罗丹明亚磷酰胺合成试剂222偶联到寡核苷酸220的5'-羟基上而被原位合成的NH-罗丹明-荧光素染料对标记,所得产物在氧化之后,生成NH-罗丹明-标记的寡核苷酸224。除去DMT基团,随后用O-保护亚磷酰胺(其在阐述的具体例子中为FAM-亚磷酰胺)偶联以产生标记的、连接于支持物的寡核苷酸226。剪切并脱保护以生成寡核苷酸228,其以NH-罗丹明-FAM能量传递染料对标记。

[0271] 可通过使用亚磷酰胺连接体试剂调整连接供体和受体染料的键结的长度和性质。此方面在图12A-12C中被阐述,在图中连接体亚磷酰胺230被偶联到罗丹明-标记的寡核苷酸225上,产生试剂232。用FAM-亚磷酰胺偶联,随后氧化、脱保护并剪切以产生寡核苷酸234,其被NH-罗丹明-FAM能量传递染料对所标记。在连接体亚磷酰胺230中,"Sp"是如先前所定义的间隔体。例如,"Sp"可代表如先前所定义的(Sp.1)、(Sp.2)、(Sp.3)、(Sp.4)或(Sp.5)。

[0272] 在图12A-12C阐述的合成图中,连接NH-罗丹明和FAM染料的连接体的长度和性质可通过在FAM-亚磷酰胺与试剂232偶联之前将其它连接体亚磷酰胺偶联到试剂232上而被调整。连接体亚磷酰胺(phosphoramidites)可相同,或它们可不同。用这种方式,以能量传递染料对标记的寡核苷酸易于被原位合成,在所述染料对中供体和受体染料及连接供体和受体的连接体出于特定目的被调整。

[0273] 虽然图11A-11D和图12A-12C示例了特定的N-保护的NH-罗丹明试剂的用途,本领域技术人员将意识到,可使用作为FAM受体起作用的任何N-保护的NH-罗丹明试剂。此外,可使用其它O-保护荧光素,如可使用其它类型的亚磷酰胺(phosphoramidite)染料。既然染料可作为单体被加入,可利用的能量传递染料标记的数目比合成它们所必需的亚磷酰胺试剂的数目要大。例如,用不同的能量传递染料对标记的寡核苷酸可以3个不同的N-保护的NH-

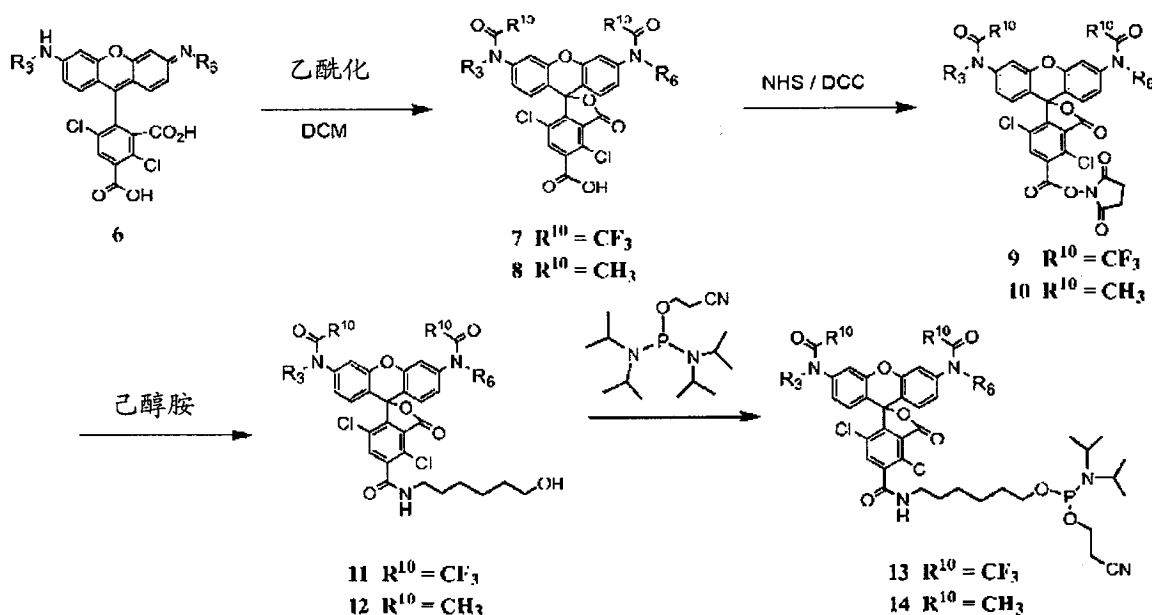
罗丹明亚磷酰胺试剂(试剂A、B和C)和3个不同的O-保护的荧光素亚磷酰胺试剂(试剂1、2和3)合成:寡核苷酸-A1、寡核苷酸-A2、寡核苷酸-A3、寡核苷酸-B1、寡核苷酸-B2、寡核苷酸-B3、寡核苷酸-C1、寡核苷酸-C2和寡核苷酸-C3。

#### [0274] 6. 实施例

[0275] 实施例1: N-保护的NH-罗丹明亚磷酰胺合成试剂的合成

[0276] 在C5-或C6-位上包括羧基取代基的母体NH-罗丹明染料被合成,如在美国专利第4,622,400号、美国专利第5,750,409号、美国专利第5,847,162号、美国专利第6,017,712号、美国专利第6,080,852号、美国专利第6,184,379号或美国专利第6,248,884号中所描述。母体NH-罗丹明染料随后在环外(exocyclic)胺上被乙酰基或三氟乙酰基保护基团保护,所产生的N-保护的NH-罗丹明染料经由相应的NHS酯衍生物被转化为羟基-酰胺衍生物且使用标准过程将羟基官能团转化为亚磷酰胺。整体合成图在下文中阐述:

[0277]



[0278] 用乙酰基保护. NH-罗丹明染料酸6(单TEA盐, 1.676mmol)被悬浮于DCM(40mL)和TEA(3.67mL)中。添加乙酸酐(3.13mL),并在室温下搅拌反应混合物3天。加入H<sub>2</sub>O(10mL)并继续搅拌30min。用DCM(200mL)稀释混合物,用NaHCO<sub>3</sub>溶液(200mLx2)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤,并蒸发。在二氧化硅上通过快速色谱纯化残余物(使用梯度为从5:20:75到20:20:60的MeOH/EtOAc/DCM作为洗脱液)。蒸发适当的组分以产生881mg(87%)无色内酯化的双乙酰基N-保护的NH-罗丹明染料8。

[0279] 用三氟乙酰基保护. NH-罗丹明染料酸6(单TEA盐, 1.5g, 2.402mmol)被悬浮在DCM(30mL)和TEA(6.696mL)中。将悬浮液冷却到0℃并用注射器逐滴加入三氟乙酸酐(2.0mL)。添加完成后,在室温下搅拌反应混合物10min(并超声以使染料颗粒破碎)。蒸发所得到的褐色溶液,使其重溶于DCM(50mL)中,并与5% HCl(40mL)一起在室温下搅拌1h。反应混合物被转移到分离漏斗中且分两层。DCM层以盐水溶液(40mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤并蒸发。残余物与MeCN(2x)共同蒸发以产生1.79g粗N-保护的NH-罗丹明染料7。

[0280] N-保护的NH-罗丹明NHS酯的合成. 向双-乙酰基染料8(588mg, 0.968mmol)和NHS

(334mg, 2.904mmol)的DCM(20mL)的溶液中,加入DCC(599mg, 2.904mmol)。反应混合物在室温下搅拌2小时,并随后过滤反应混合物。滤液用DCM(80mL)稀释,用H<sub>2</sub>O(50mLx2)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤并蒸发。在二氧化硅上用快速色谱纯化残余物(使用梯度为从1:1:20:78到1:5:20:74的AcOH/MeOH/EtOAc/DCM作为洗脱液)。蒸发适当的组分以产生680mg(100%)双乙酰基N-保护的NH-罗丹明NHS酯10。

[0281] 遵循上文描述的双乙酰基N-保护的NH-罗丹明NHS酯10,双-TFAN-保护的NH-罗丹明染料7(0.322mmol)的过程,以80-90%产率产生双-TFAN-保护的NH-罗丹明NHS酯9。

[0282] N-保护的NH-罗丹明亚磷酰胺的合成。NHS酯9(0.4mmol)被溶解在DCM(8mL)中。向此搅拌的溶液中,加入6-氨基-1-己醇/DIPEA/DCM(56mg/0.07mL/2mL)的混合物。反应在室温下搅拌30min。经过滤除去固体副产物并在二氧化硅上用快速色谱纯化滤液(使用梯度为从30%到60%的EtOAc/DCM作为洗脱液)。蒸发适当的组分以产生0.344mmol(86%)双-TFA-己醇胺罗丹明染料11。

[0283] 使用相似的过程将NHS酯10被转化为双-乙酰基-己醇胺NH-罗丹明染料12。

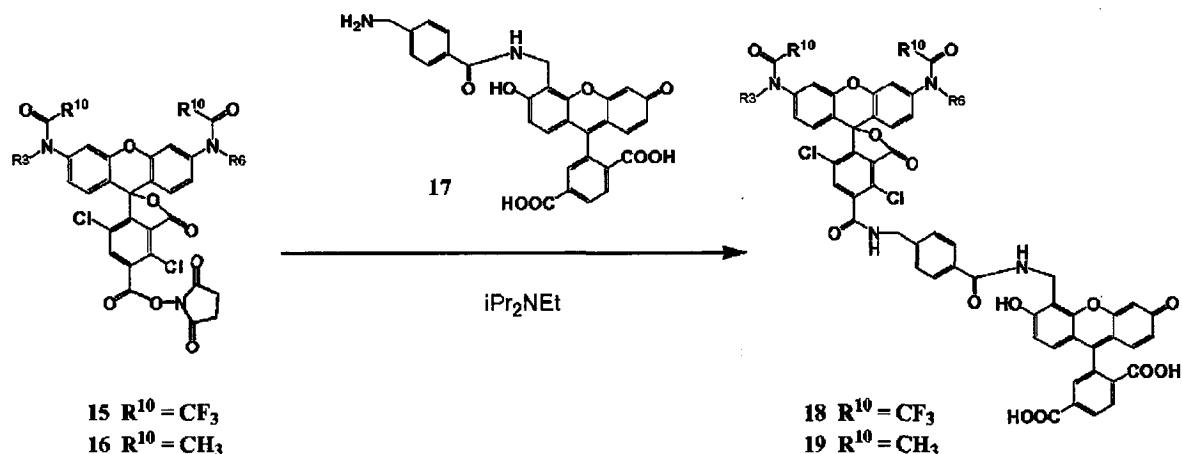
[0284] 向双-TFA-己醇胺罗丹明染料11(0.338mmol)和2-氰基乙基N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰胺(0.214mL, 0.674mmol, 2当量)的DCM(10mL)溶液中,一次性加入四唑胺(4mg)。在室温下搅拌反应混合物20h。挥发性物质经蒸发被除去且残余物经从DCM/己烷中沉淀三次被纯化。固体产物在真空下被干燥以产生0.256mmol(76%)双-TFA-N-保护的NH-罗丹明染料亚磷酰胺13。

[0285] 相似地,双-乙酰基染料12被转化为亚磷酰胺(phosphoramidite)14。

[0286] 实施例2:异二聚体染料网络的合成

[0287] 包括连接到N-保护的NH-罗丹明上的O-保护荧光素的染料网络如下文所阐述被合成:

[0288]



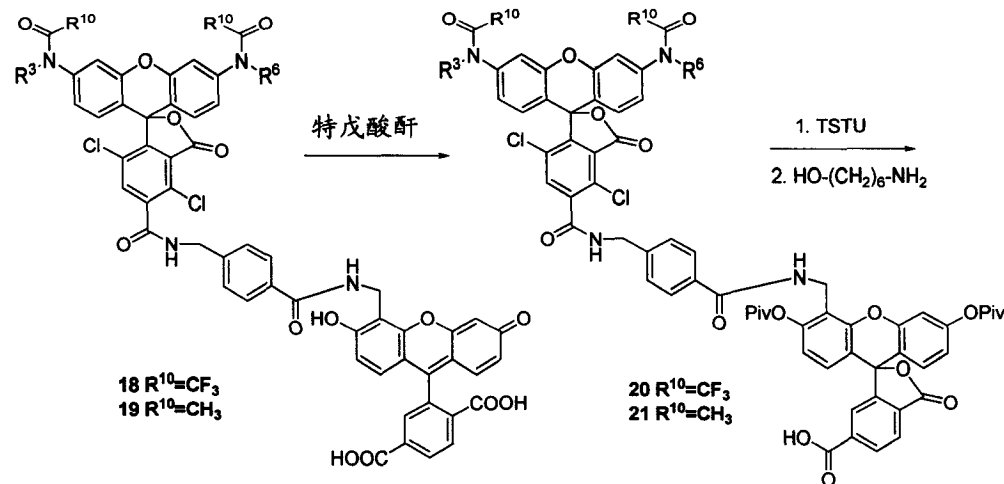
[0289] 双-乙酰基N-保护的NH-罗丹明NHS酯16(324mg, 0.460mmol)被溶解在DMF(8mL)和DIPEA(0.3mL)溶液中。添加荧光素(Fluorescein)衍生物17(239mg, 0.32mmol;如在美国专利第5,800,996号中所描述被合成)且在室温下搅拌反应混合物1h。混合物被蒸发且随后与MeOH(2x)共同蒸发。残余物被溶解在10%MeOH/DCM(100mL)中且使用盐水溶液(100mL)洗涤。用10%MeOH/DCM(50mLx3)萃取水层,且干燥合并的有机层(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),过滤并蒸发。在二氧化硅上使用快速色谱纯化残余物(使用梯度为从10%到30%的MeOH/DCM作为洗脱液)。蒸发

适当的组分以产生270mg(63%)的异二聚体染料网络19(以DIPEA盐形式)。

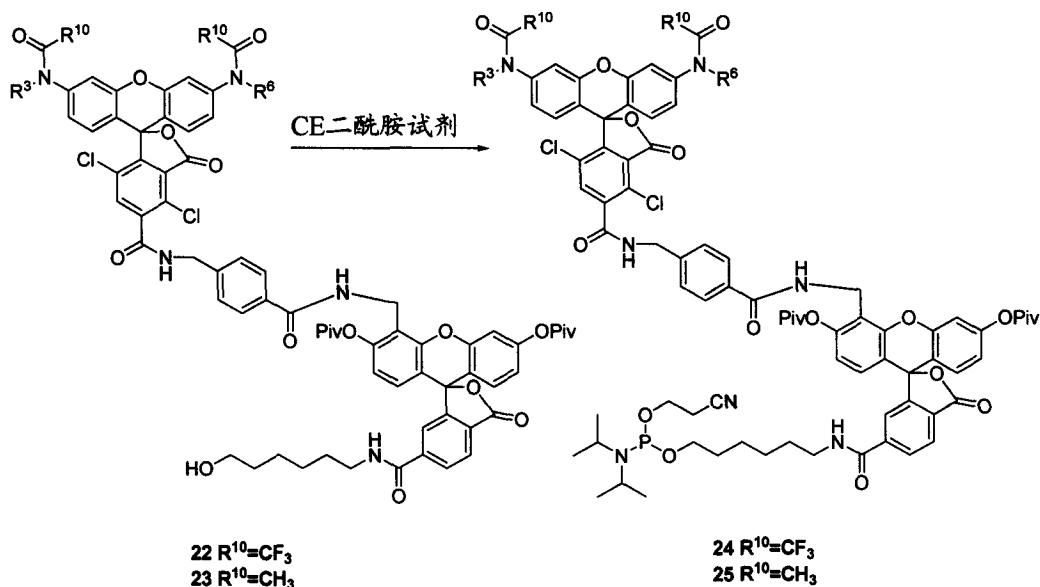
[0290] 对应的双-TFA保护的染料网络18经相似的过程被合成。

[0291] 实施例3:异二聚体染料网络亚磷酰胺的合成

[0292] 包括作为标记部分的异二聚体染料网络的亚磷酰胺合成试剂如下文所阐述被合成:



[0293]



[0294] 异二聚体染料网络19(0.173mmol)、DIPEA(1.028mL)和特戊酸酐(0.702mL)的DCM(10mL)溶液在室温下搅拌1天。添加 $\text{H}_2\text{O}$ (5mL)并继续搅拌1h。用DCM(50mL)稀释反应混合物且用 $\text{H}_2\text{O}$ (40mL)洗涤。用DCM(40mL)萃取水层。干燥合并的有机层( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),过滤并蒸发。在二氧化硅上用快速色谱纯化残余物(使用梯度为从3%到15%的 $\text{MeOH}/\text{DCM}$ 作为洗脱液)。蒸发适当的组分以产生0.145mmol(84%)双-乙酰基双-新戊酰基异二聚体染料衍生物21(以DIPEA盐形式)。

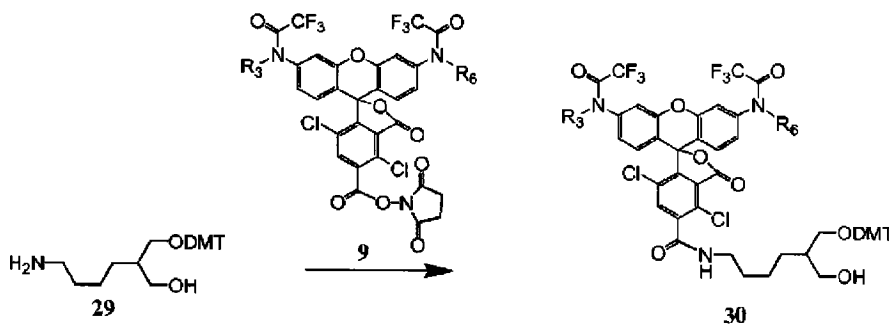
[0295] 染料衍生物21(0.146mmol)被悬浮在溶解的(a dissolved of)DIPEA(0.2mL)和DCM(8mL)中。添加固体N-羟基琥珀酰亚胺四甲基四氟硼酸脲(88mg)且反应在室温下搅拌1小时。添加6-氨基-1-己醇(51mg)并继续搅拌1小时。过滤反应混合物且用DCM(50mL)稀释滤液。使用盐水溶液(40 mL)洗涤DCM溶液,干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),过滤并蒸发。在硅胶上使用快速色谱纯化残余物(使用梯度为从5:20:75到15:20:65的 $\text{MeOH}:\text{EtOAc}:\text{DCM}$ 作为洗脱液)。蒸发适当

的组分以产生0.124mmol(85%)染料己醇胺衍生物23(以DIPEA盐形式)。

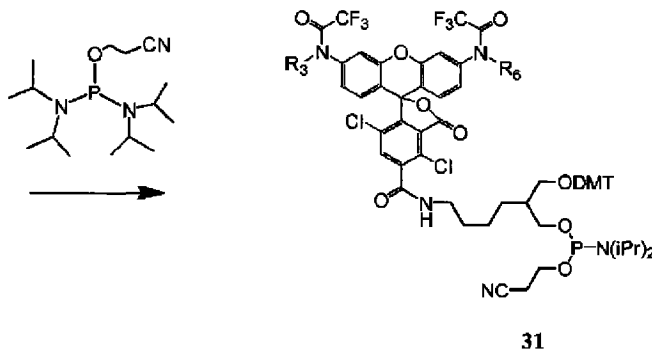
[0296] 染料衍生物23(91mg,0.057mmol)和四唑胺(2mg)被溶解在DCM(5mL)中。2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰胺(CE二酰胺)(0.04mL),并被加入且反应在室温下搅拌16小时。使用TEA:EtOAc:DCM(3:20:77,3mL)溶液稀释反应混合物并用硅胶色谱纯化(使用梯度为从3:0:20:77到3:5:20:72的TEA:MeOH:EtOAc:DCM作为洗脱液)。蒸发适当的组分并从DCM/己烷中沉淀以产生75mg(74%)的异二聚体染料亚磷酰胺25。

[0297] 实施例4:包括任意的合成片断的非核苷亚磷酰胺合成试剂的合成

[0298] 包括任意的式-OR<sup>e</sup>的合成片断的非核苷亚磷酰胺合成试剂如下文所述被合成:



[0299]



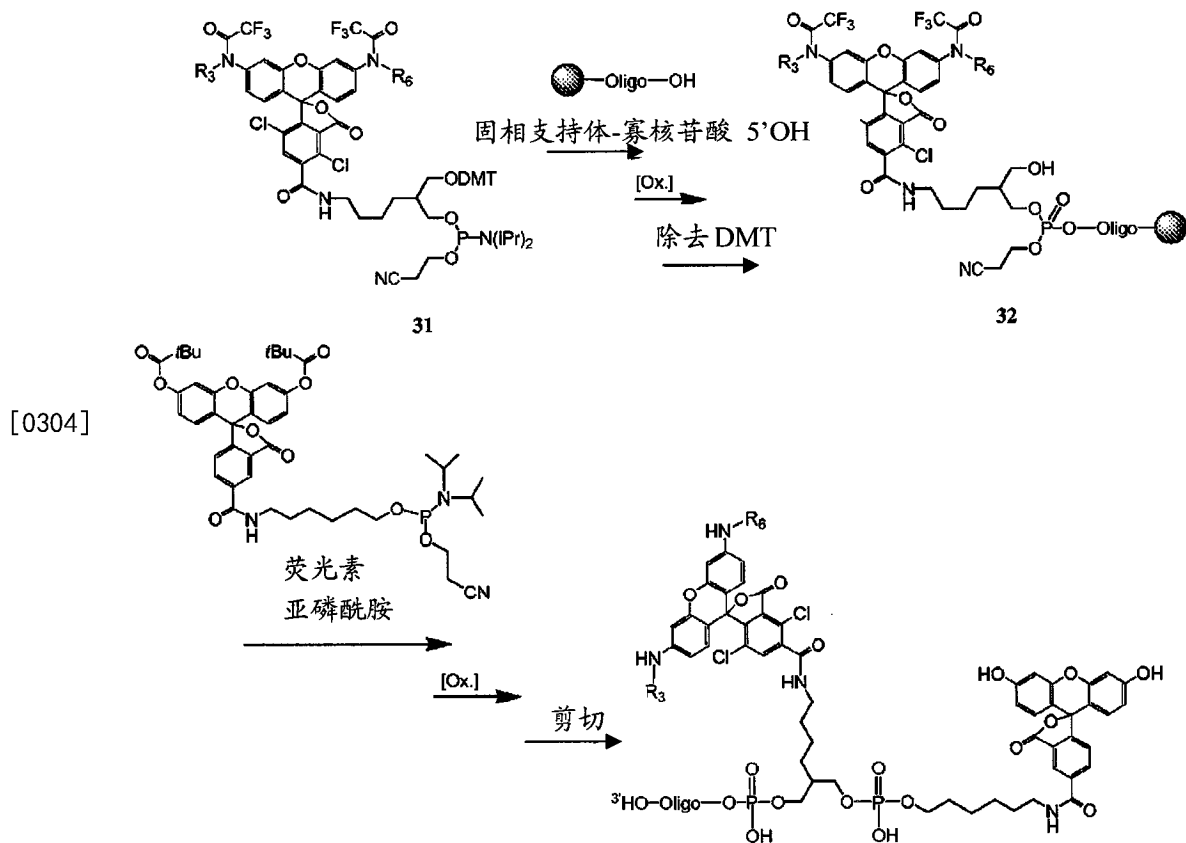
[0300] 双-TFA衍生物9(1.354mmol)被溶解在DIPEA(0.236mL)的DCM(30mL)溶液中。向搅拌的溶液中,加入连接体合成子29和DCM(0.609g,1.355mmol;如在Nelson等人,1992,Nucl.Acids Res.20:6253-6259的描述中被合成),所述溶液在室温下继续搅拌2h。加入EtOAc并将混合物装载在二氧化硅柱上。通过使用梯度从5:95到1:5的EtOAc:DCM洗脱分离出纯净产物。蒸发适当的组分以产生1.25g(80%)的双-TFA-罗丹明-羟基酰胺30。

[0301] 双-TFA-罗丹明-羟基酰胺30(1.081mmol)和四唑胺(18.5mg)的溶液被溶解在DCM(35mL)中。添加CE二酰胺(0.685mL)且反应在室温下搅拌18h。在减压下除去溶剂且残余物从DCM/己烷(3x)中沉淀出来以产生1.081mmol(100%)的纯净双-TFA-罗丹明DMT亚磷酰胺31。

[0302] 实施例5:标记的寡核苷酸的固相合成

[0303] 在AB 3900自动化DNA合成仪上,使用标准操作条件,在聚苯乙烯固相支持体上合成以N-保护的NH-罗丹明亚磷酰胺合成试剂标记的寡核苷酸。N-保护的NH-罗丹明亚磷酰胺可溶在乙腈溶剂中以用于偶联反应,且N-保护的NH-罗丹明染料加合物对重复的合成循环稳定,所述循环使用以二氯乙酸除去DMT、加入核苷亚磷酰胺单体、以乙酸酐加帽及用碘氧化以产生核苷酸间磷酸酯键。也发现此类NH-罗丹明对用于从固相支持体中脱保护和剪切合成的标记的寡核苷酸的条件稳定(在60°C下用氢氧化铵处理1到2小时)。用于合成标记的

寡核苷酸的整体合成图在下文阐述：



[0305] 利用此工艺，TFA-罗丹明DMT亚磷酰胺31被偶联到连接于支持物的寡核苷酸的5'-羟基上以生成亚磷酸酯中间体32。荧光素亚磷酰胺(GlennResearch)被偶联到中间体32的游离羟基上。所产生的标记的寡核苷酸被氧化，在60℃下以浓缩的氢氧化铵处理1-2h而从支持物上被剪切，以乙腈(acetonitrile)/水洗涤并在减压下干燥以产生标记的寡核苷酸(oligonucleotide)33。使用标准的乙酸钠/EtOH沉淀方法使寡核苷酸33再沉淀。标记的寡核苷酸33以大于(than)90%的纯度及大于85%的产率被生产(从0.2μM支持物得到170,000pM)并无需进一步纯化而被使用。

[0306] 实施例6:以合成试剂合成的标记的寡核苷酸展现良好光谱性质

[0307] 用NH-罗丹明或NH-罗丹明-荧光素染料对标记的聚(脱氧胸苷)10寡核苷酸如上文所阐述被合成。剪切后，记录荧光光谱。所有合成的标记的寡核苷酸展现了良好的荧光性质。

[0308] 虽然前面的发明已经在一定程度上被详细地描述以促进理解，将很明显：某些改变和修饰可在附带权利要求的范围内被实施。因此，描述的实施方式将被考虑为阐述性的而非限制性，且本文描述的各种发明将不限于本文提供的细节。

[0309] 本公开通篇引用的所有文献和专利参考出于所有目的通过引用被合并于本申请。

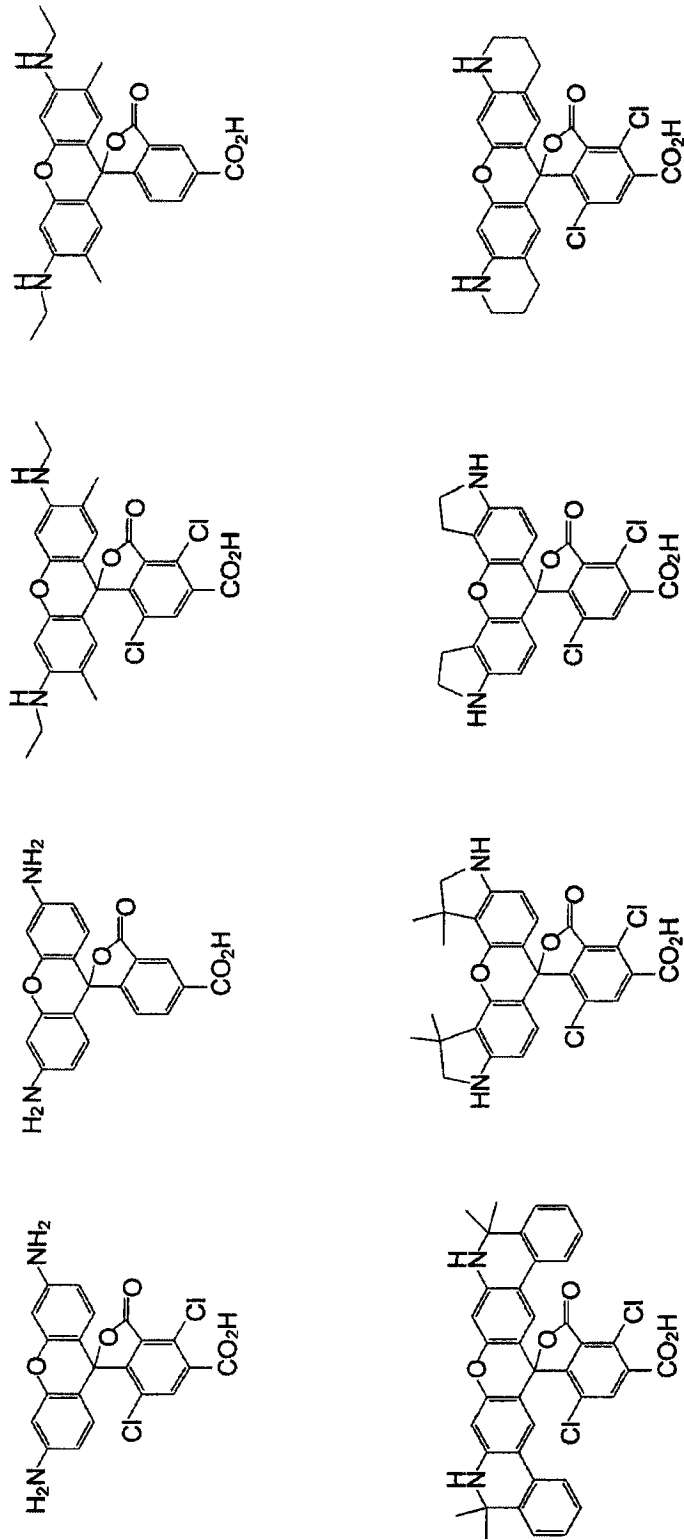


图 1A

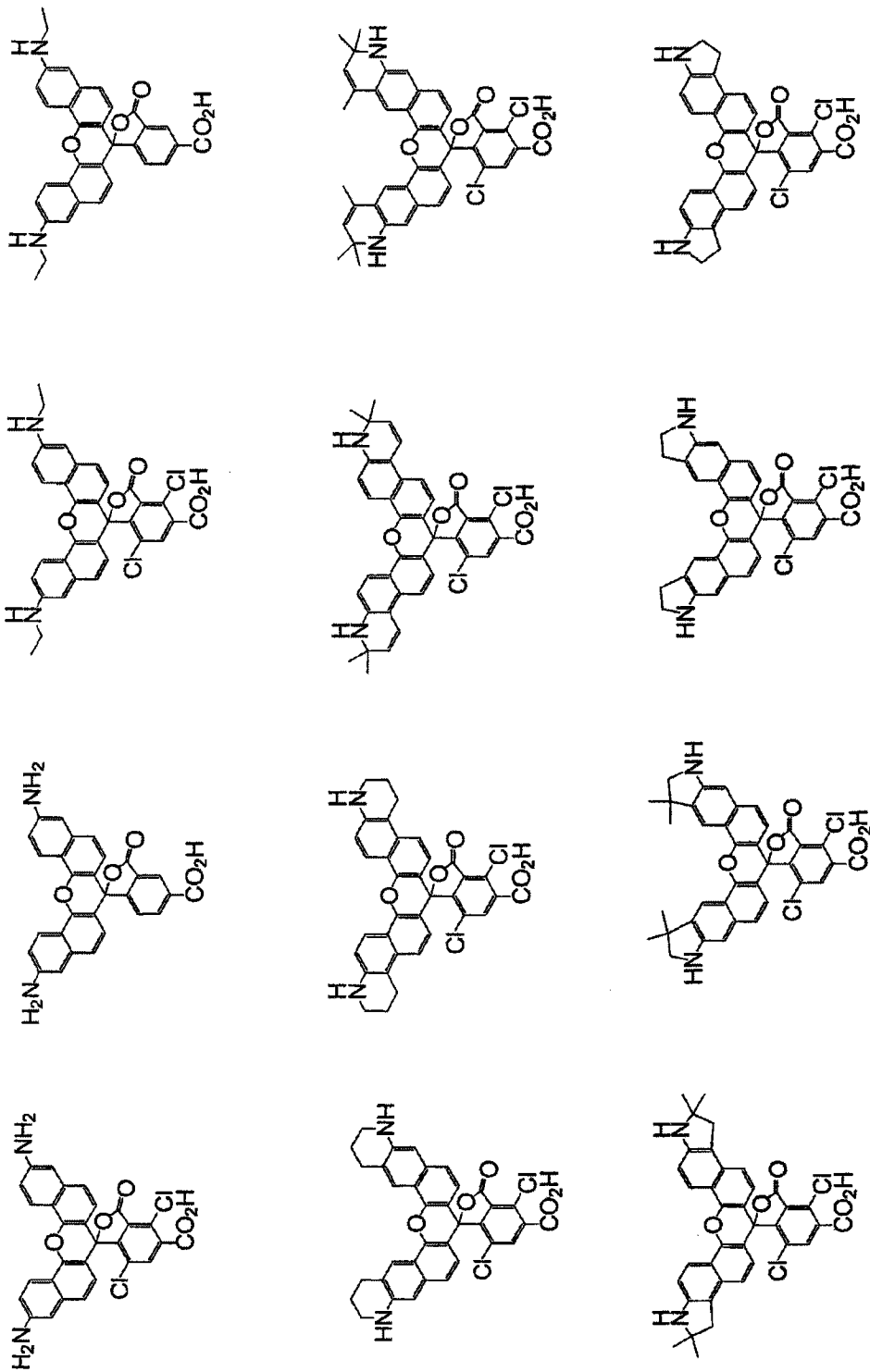


图1B

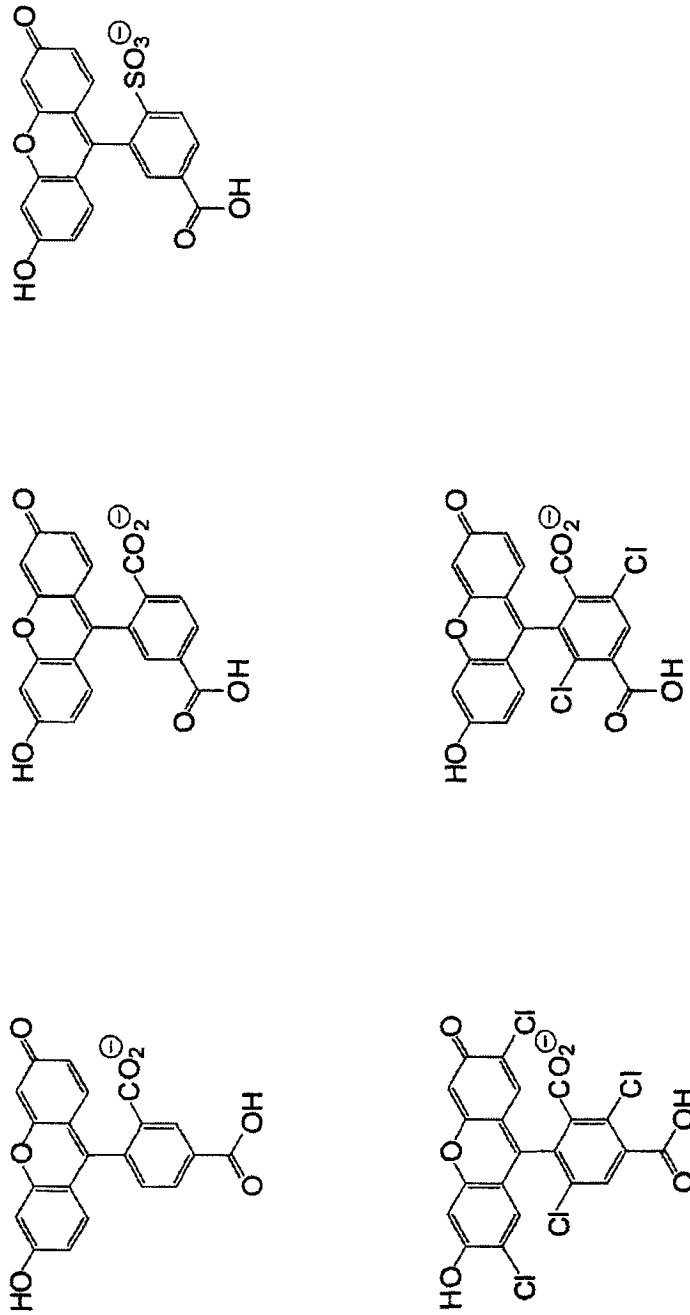


图1C

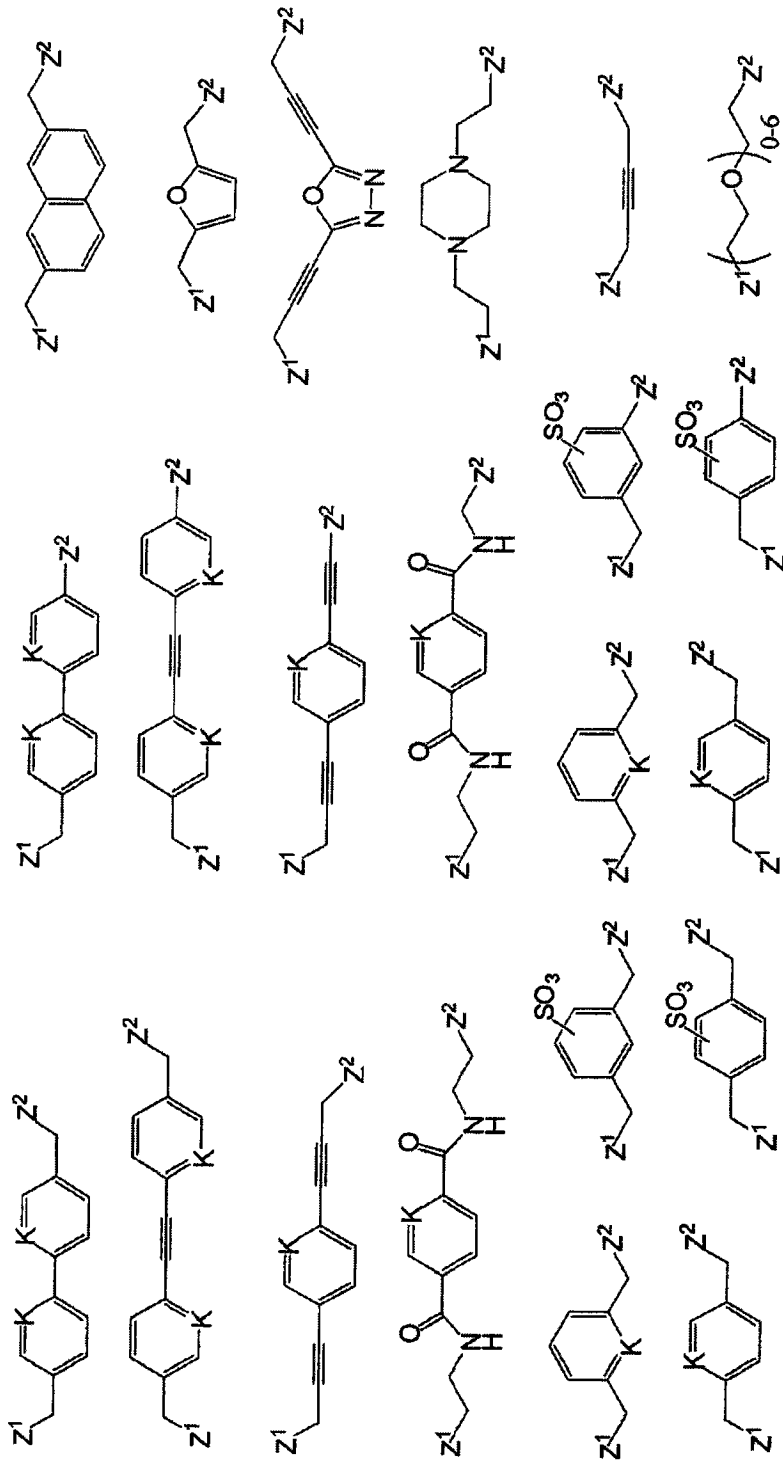


图2

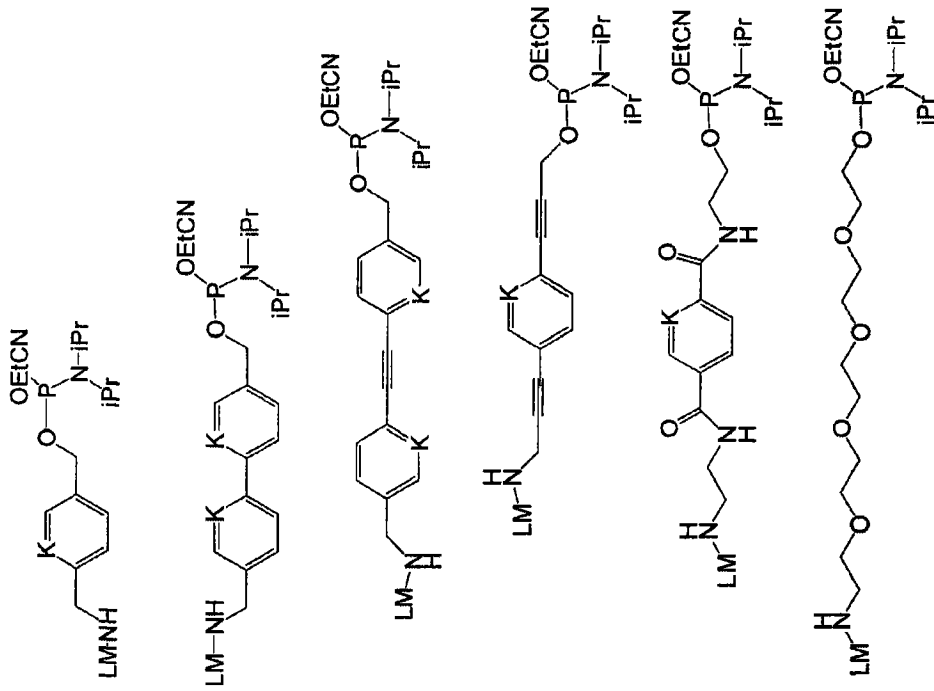


图 3A



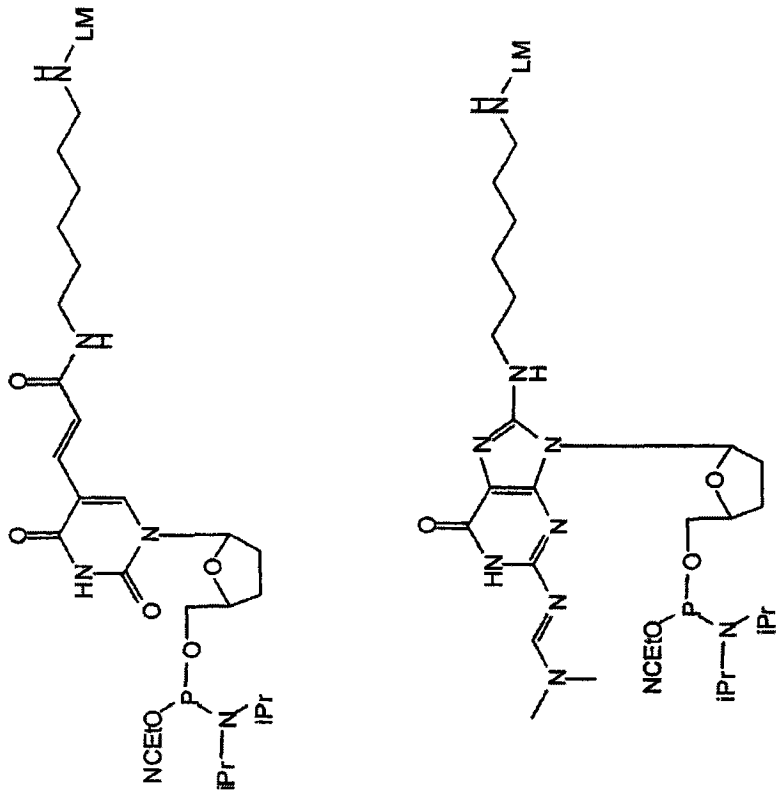


图4

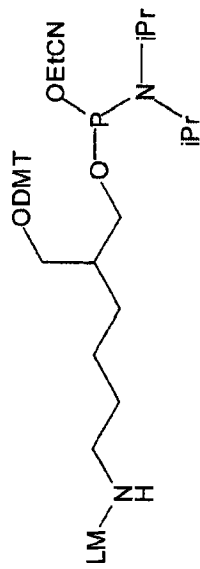


图5

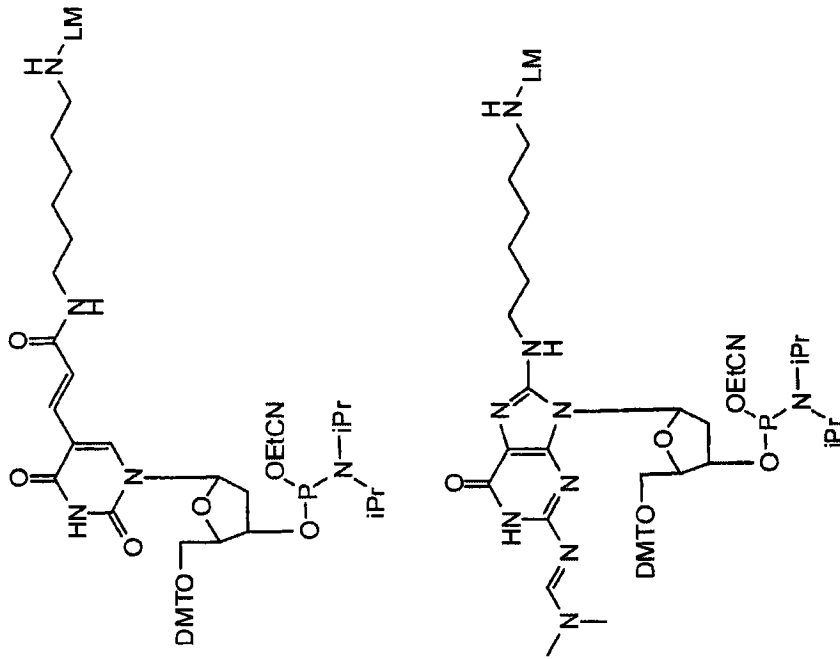


图6





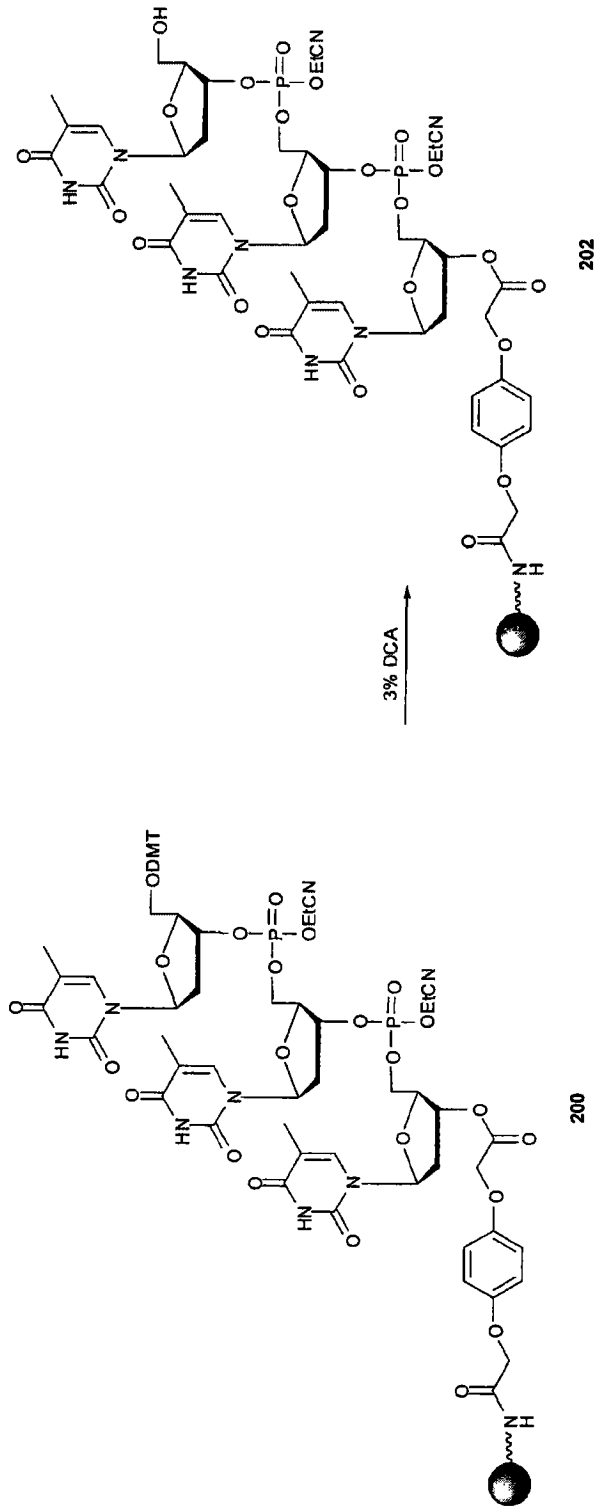


图 9A



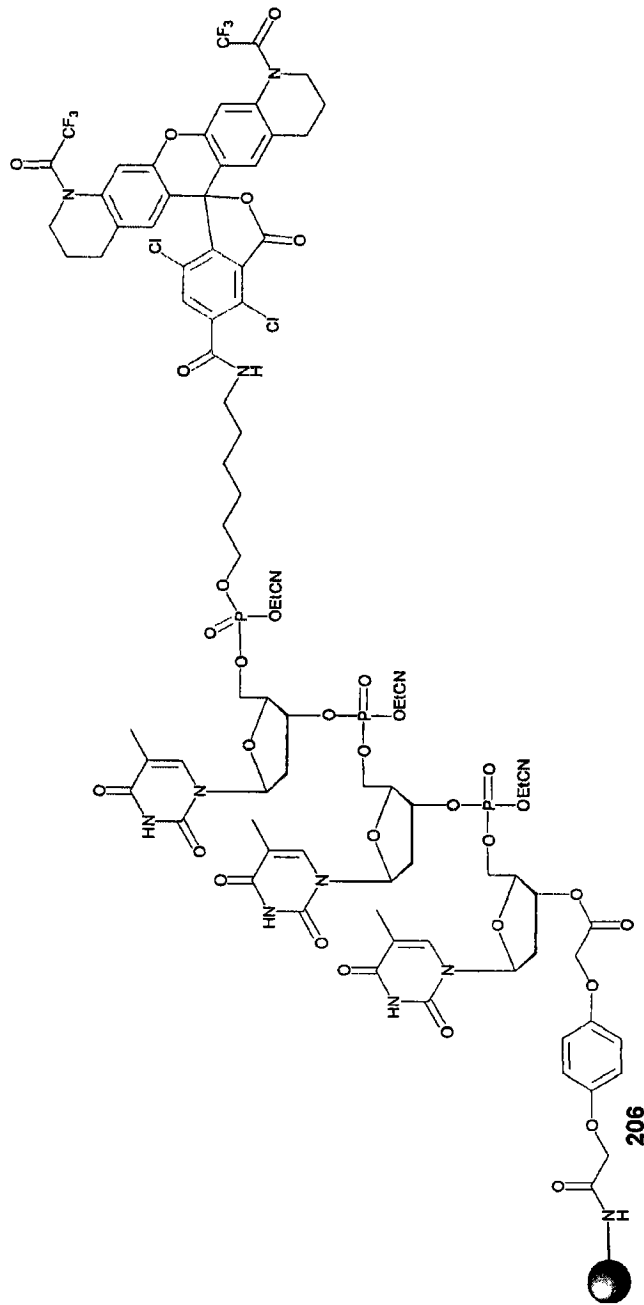


图9C

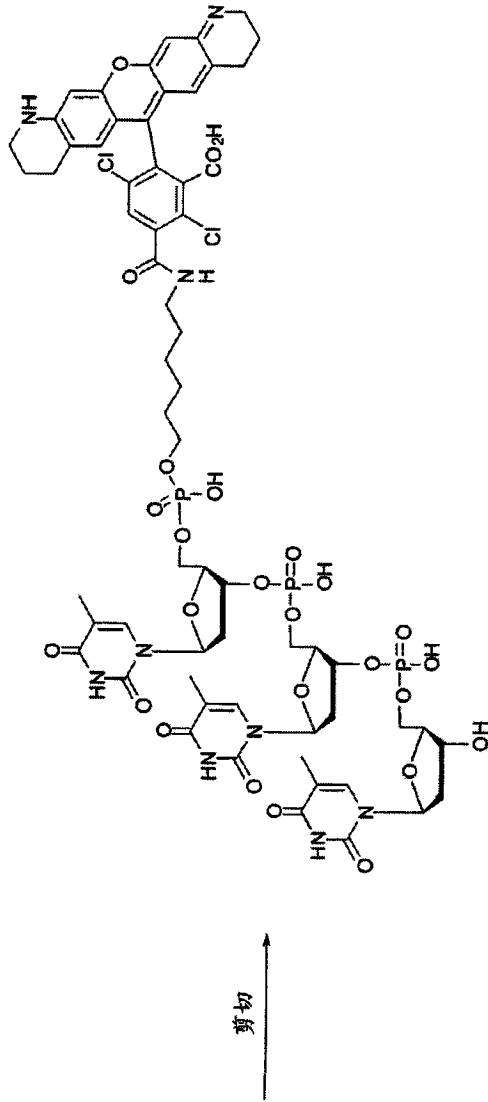


图9D

208

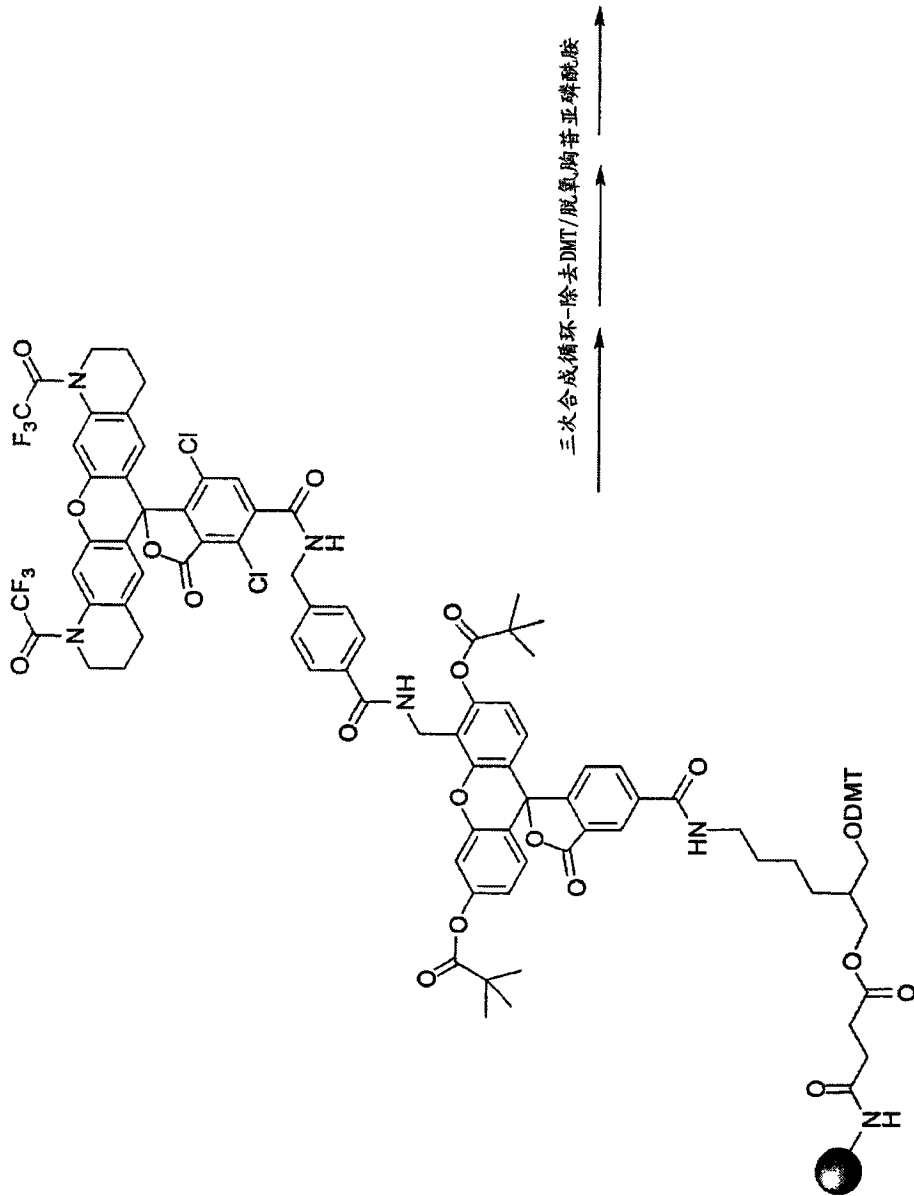


图 10A



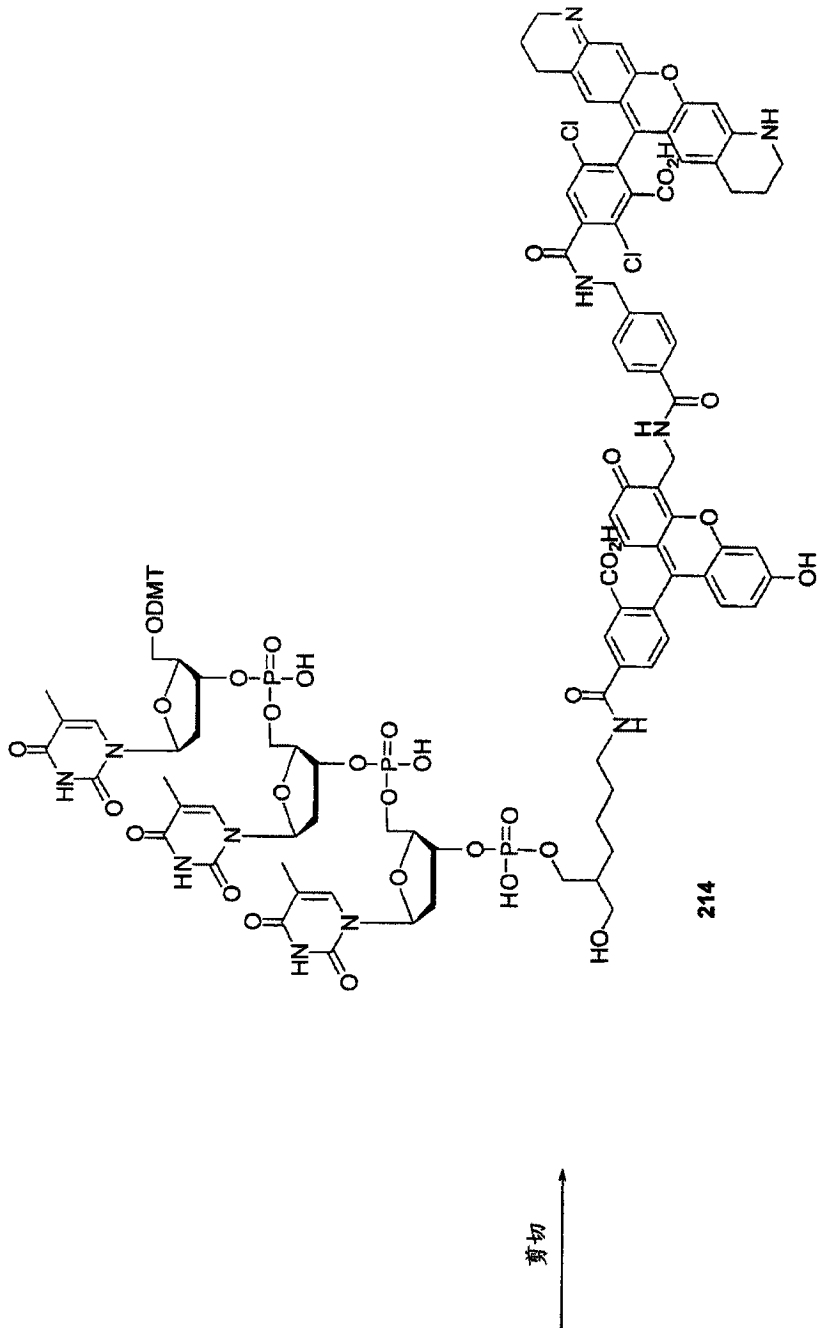


图10C

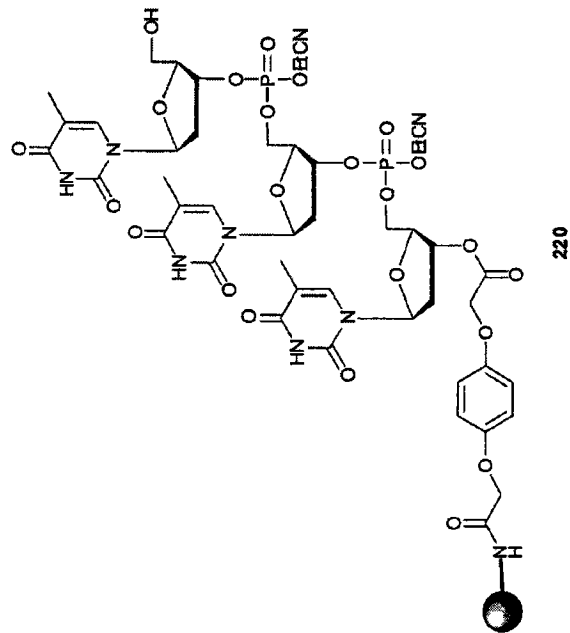
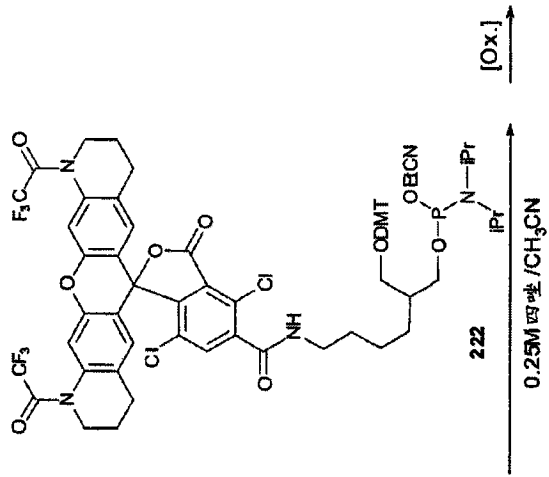


图11A



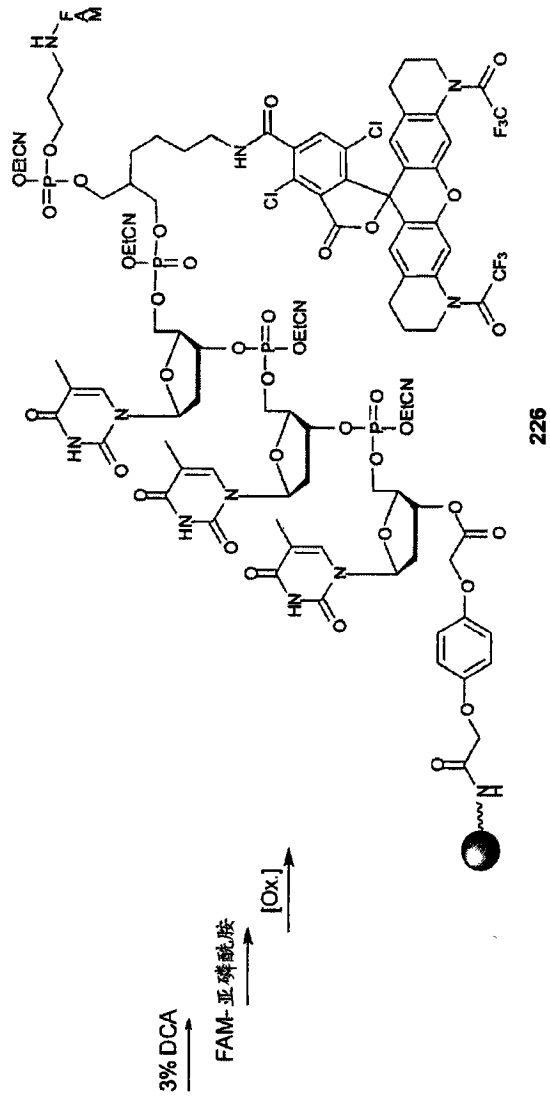


图11C

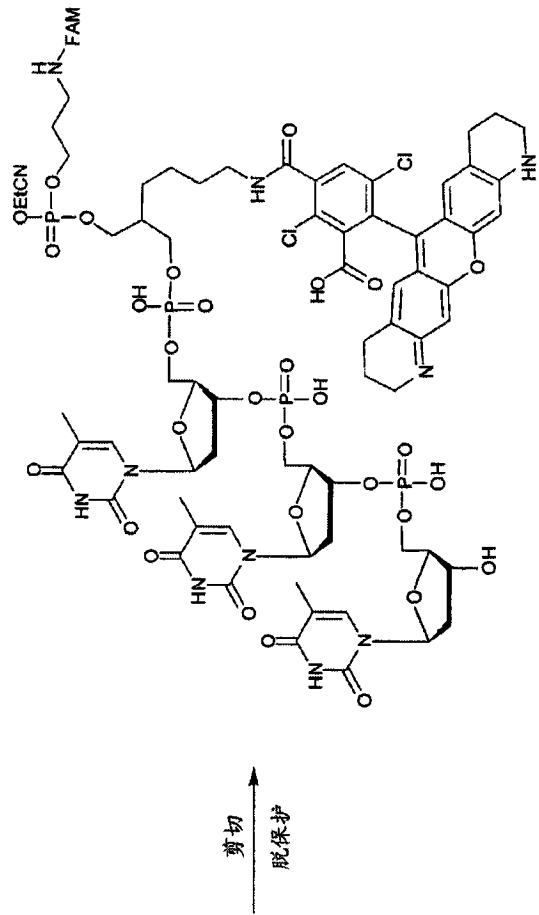


图11D

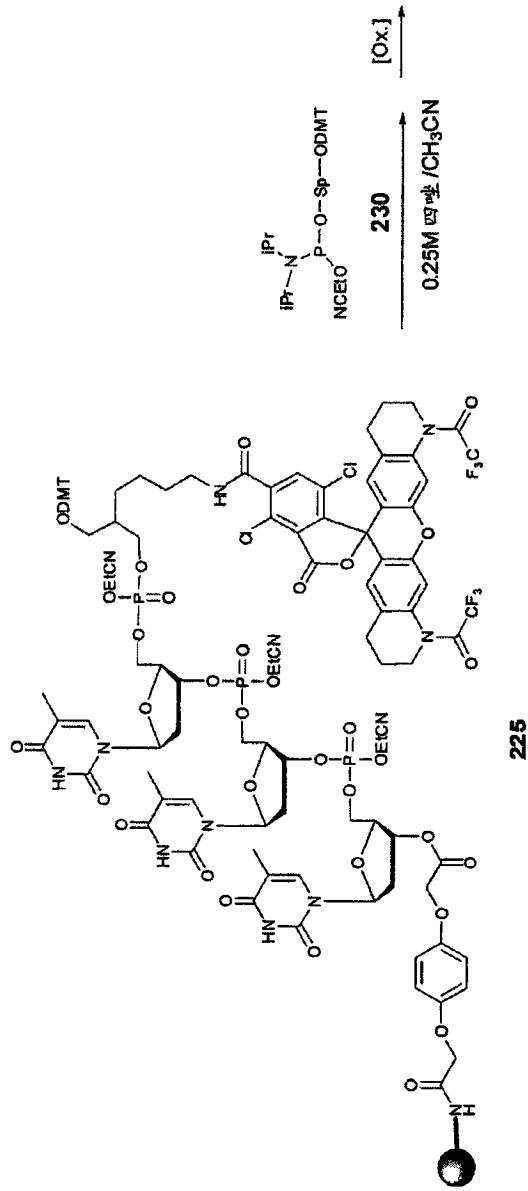
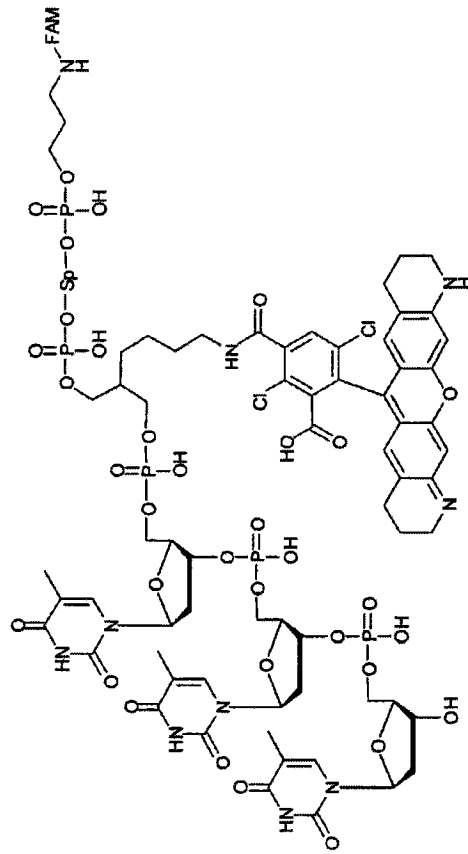


图12A





234

图12C

