

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034342

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.29

(21) Номер заявки
201590501

(22) Дата подачи заявки
2013.09.03

(51) Int. Cl. C07H 19/073 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЕ, НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, ВЕЩЕСТВО, НЕСУЩЕЕ МЕТКУ, И СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ

(31) 2012-193727

(32) 2012.09.04

(33) JP

(43) 2016.01.29

(86) PCT/JP2013/073721

(87) WO 2014/038561 2014.03.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КАБУСИКИ КАЙСЯ ДиЭнЭйФОРМ
(JP)

(72) Изобретатель:
Хайясизаки Йосихиде, Сома
Такахиро, Ханами Такеси, Канамори
Хадзиме, Баба Масару (JP)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) IKEDA, Shuji et al., Doubly thiazole orange-labeled cytidine for functional expansion of a hybridization-sensitive probe, Tetrahedron Letters, 2009, Vol. 50 (51), p. 7191-7195

WO-A1-2008111485

WO-A1-2012091091

JP-A-2006047183

WO-A1-2011132801

OKAMOTO, Akimitsu, Excitonic Interaction: Another Photophysical Process for Fluorescence-Controlled Nucleic Acid Sensin, The Chemical Record, 2010, Vol. 10, p. 188-196

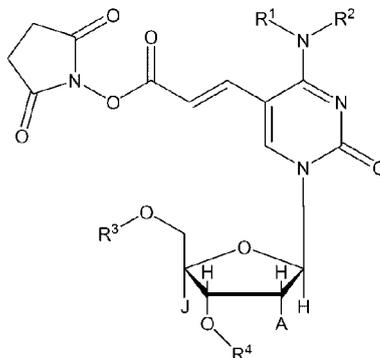
JP-A-2008526877

Shuji IKEDA et al., "Kakusan Kenshutsu no Tamen Shinki Keiko Probe", Symposium on Photochemistry, 21 September 2007 (21.09.2007), 182

IKEDA, Shuji et al., pH-Dependent fluorescence of uncharged benzothiazole-based dyes binding to DNA, Photochemical & Photobiological Sciences, 2007, Vol. 6, No. 11, p. 1197-1201

JP-A-2002507203

(57) Изобретение относится к соединению, представленному химической формулой (1a), таутомеру, стереоизомеру или его соли:



1 a

где каждый из R¹ и R² представляет собой водород, трифторацетильную группу, формильную группу, C₁₋₆алкилкарбонильную группу, C₁₋₆алкилсульфонильную группу, трет-бутоксикарбонильную группу, бензилоксикарбонильную группу, аллилксикарбонильную группу, флуоренилметоксикарбонильную группу, фенилкарбонильную группу, нафтилкарбонильную группу, фенилсульфонильную группу, нафтилсульфонильную группу, C₁₋₆алкилоксикарбонильную группу, C₇₋₁₀аралкилкарбонильную группу,

B1

034342

034342

B1

метильную группу, бензильную группу, дифенилметильную группу, тритильную группу и могут быть идентичными или отличаться друг от друга или R^1 и R^2 совместно могут образовывать защитную группу аминогруппы, представленную $=C-NR^{100}_2$, где каждый R^{100} является линейной или разветвленной C_{1-20} алкильной группой; R^3 означает диметокситритильную группу, монометокситритильную группу или пикрильную группу; R^4 означает атом водорода или фосфорамидитную группу; J означает атом водорода, C_{1-20} алкильную группу, C_{1-20} алкоксигруппу, аминогруппу, сульфидную группу или силильную группу; A означает атом водорода, гидроксигруппу, C_{1-20} алкильную группу, ар- C_{1-20} алкильную группу, C_{1-20} алкоксигруппу, галоген, трифторметильную группу, фтор- C_{1-20} алкильную группу, силиленовую группу или сульфидную группу или в качестве альтернативы J и A совместно могут образовывать линкер и каждый из J и A представляет собой CH_2 , NH, O или S и могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга.

034342

B1

034342

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к соединению, нуклеиновой кислоте, веществу, несущему метку, и способу обнаружения.

Уровень техники

Анализ биологических явлений на клеточном уровне и диагностика заболеваний на молекулярном уровне требуют обнаружения определенных последовательностей нуклеиновых кислот. С этой целью в различных экспериментах используются модифицированные ДНК олигомеры, в которые введены функциональные молекулы, например флуоресцентные красители или биологически активные вещества.

При химической модификации ДНК олигомера в конец или в одно из оснований нуклеиновой кислоты вводят реакционноспособный сайт.

В частности, если можно ввести реакционноспособный сайт в одно из оснований нуклеиновой кислоты, появится возможность вводить различные функциональные молекулы в конец или в одно из оснований нуклеиновой кислоты соответственно.

Относительно легко ввести реакционноспособный сайт в конец нуклеиновой кислоты. Однако в силу сложности синтеза основания, входящего в нуклеиновую кислоту, если модифицированный ДНК олигомер синтезируют путем введения функциональной молекулы в основание нуклеиновой кислоты, наиболее распространенной практикой является введение функциональной молекулы в тиминовое основание, включающее активный сайт.

Методика, широко применяемая для этих целей, заключается во введении NHS-группы (N-гидроксисукцинимидной группы) в качестве активного сайта с последующим введением функциональной молекулы реакцией с амином. Поэтому для введения функциональной молекулы подходит тиминовое основание, которое не содержит аминогруппы, поскольку протекание побочных реакций является менее вероятным (непатентный документ 1).

Список литературы

Непатентные документы.

Непатентный документ 1: Glen Research, Cat. No. 10-153-90, 10-1535-02.

Описание изобретения

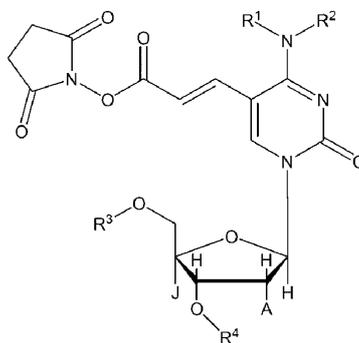
Проблема, которую предполагается решить настоящим изобретением

Модификацию тиминового основания осуществляли во многих исследованиях. Однако, поскольку модификация других нуклеиновых оснований затруднена, на строение модифицированных ДНК олигомеров налагаются значительные ограничения.

Таким образом, для уменьшения ограничений, налагаемых на структуру последовательностей модифицированных олигомеров нуклеиновых кислот, цель настоящего изобретения заключается в разработке соединения, которое отличается от производных тимина и может применяться в качестве реагента для синтеза нуклеиновых кислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте и веществу, несущему метку, которые можно получать с применением упомянутого соединения, а также способу обнаружения, в котором применяется вещество, несущее метку.

Средства для решения указанной проблемы

Для достижения указанной выше цели в настоящем изобретении предложено соединение, представленное химической формулой 1a, таутомер, стереоизомер или соль этого соединения, таутомера или стереоизомера:



1 a

где каждый из R^1 и R^2 представляет собой водород, трифторацетильную группу, формильную группу, C_{1-6} алкилкарбонильную группу, C_{1-6} алкилсульфонильную группу, трет-бутоксикарбонильную группу, бензилоксикарбонильную группу, аллилксикарбонильную группу, флуоренилметоксикарбонильную группу, фенилкарбонильную группу, нафтилкарбонильную группу, фенилсульфонильную группу, нафтилсульфонильную группу, C_{1-6} алкилоксикарбонильную группу, C_{7-10} аралкилкарбонильную группу, метильную группу, бензильную группу, дифенилметильную группу, тритильную группу и могут быть

идентичными или отличаться друг от друга или R^1 и R^2 совместно могут образовывать защитную группу аминогруппы, представленную $=C-NR^{100}_2$, где каждый R^{100} является линейной или разветвленной C_{1-20} алкильной группой;

R^3 означает диметокситритильную группу, монометокситритильную группу или пикрильную группу;

R^4 означает атом водорода или фосфорамидитную группу;

J означает атом водорода, C_{1-20} алкильную группу, C_{1-20} алкоксигруппу, аминогруппу, сульфидную группу или силильную группу;

A означает атом водорода, гидроксигруппу, C_{1-20} алкильную группу, ар- C_{1-20} алкильную группу, C_{1-20} алкоксигруппу, галоген, трифторметильную группу, фтор- C_{1-20} алкильную группу, силиленовую группу или сульфидную группу или

в качестве альтернативы J и A совместно могут образовывать линкер, и каждый из J и A представляет собой CH_2 , NH, O или S, и могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга.

Далее, настоящее изобретение относится к веществу, несущему метку, полученному с применением соединения по настоящему изобретению, таутомера или стереоизомера этого соединения или соли указанного соединения, его таутомера или стереоизомера.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу обнаружения, включающему стадию обнаружения соединения, которое необходимо обнаружить, путем приведения соединения, несущего метку, по настоящему изобретению в контакт с веществом, которое необходимо обнаружить.

Эффекты изобретения

Соединение по настоящему изобретению является производным не тимина, а цитозина. Таким образом, соединение по настоящему изобретению может применяться как реагент для синтеза нуклеиновых кислот (например, ДНК и РНК), отличающийся от производного тимина, с тем, чтобы ослабить ограничения на структуру последовательностей модифицированных олигомеров нуклеиновых кислот (например, ДНК и РНК). Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением предложены нуклеиновые кислоты и вещества, несущие метки, которые можно получать с применением соединения по настоящему изобретению, а также способ обнаружения, в котором применяются указанные соединения, несущие метки.

Краткое описание иллюстративного материала

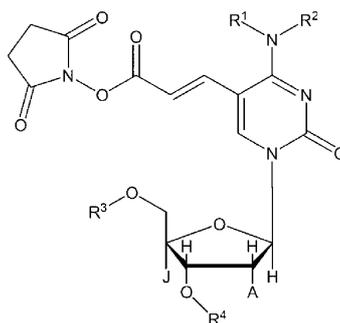
На фигуре показана эффективность модифицированных олигомеров ДНК в способе изотермической амплификации нуклеиновых кислот в примере по настоящему изобретению.

Варианты осуществления настоящего изобретения

Далее по тексту настоящее изобретение будет описано более конкретно со ссылками на иллюстративные примеры. Однако следует отметить, что настоящее изобретение не ограничено приведенным ниже описанием.

Настоящее изобретение можно описать, например, приведенными ниже пп.1-15. Тем не менее, следует отметить, что настоящее изобретение ни в коем случае не ограничено этими пунктами.

1. Соединение формулы 1a, таутомер, стереоизомер или соль этого соединения, таутомера или стереоизомера:



1 а

где каждый из R^1 и R^2 представляет собой водород, трифторацетильную группу, формильную группу, C_{1-6} алкилкарбонильную группу, C_{1-6} алкилсульфонильную группу, трет-бутоксикарбонильную группу, бензилоксикарбонильную группу, аллилкарбонильную группу, флуоренилметоксикарбонильную группу, фенилкарбонильную группу, нафтилкарбонильную группу, фенилсульфонильную группу, нафтилсульфонильную группу, C_{1-6} алкилоксикарбонильную группу, C_{7-10} аралкилкарбонильную группу, метильную группу, бензильную группу, дифенилметильную группу, тритильную группу и могут быть идентичными или отличаться друг от друга или R^1 и R^2 совместно могут образовывать защитную группу аминогруппы, представленную $=C-NR^{100}_2$, где каждый R^{100} является линейной или разветвленной C_{1-20} алкильной группой;

R^3 означает диметокситритильную группу, монометокситритильную группу или пикрильную группу;

R^4 означает атом водорода или фосфорамидитную группу;

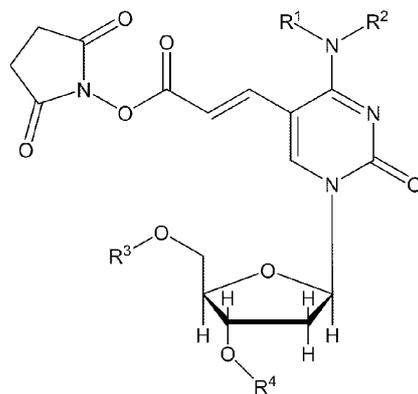
J означает атом водорода, C_{1-20} алкильную группу, C_{1-20} алкоксигруппу, аминогруппу, сульфидную группу или силильную группу;

A означает атом водорода, гидроксигруппу, C_{1-20} алкильную группу, ар- C_{1-20} алкильную группу, C_{1-20} алкоксигруппу, галоген, трифторметильную группу, фтор- C_{1-20} алкильную группу, силиленовую группу или сульфидную группу или

в качестве альтернативы J и A совместно могут образовывать линкер, и каждый из J и A представляет собой CH_2 , NH, O или S, и могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга.

2. Соединение по п.1, где в A алкильная группа представляет собой метильную группу, этильную группу, пропильную группу, бутильную группу, пентильную группу или гексильную группу, аралкильная группа представляет собой бензильную группу, алкоксигруппа является метоксигруппой, таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

3. Соединение по п.1, где структура, представлена формулой 1

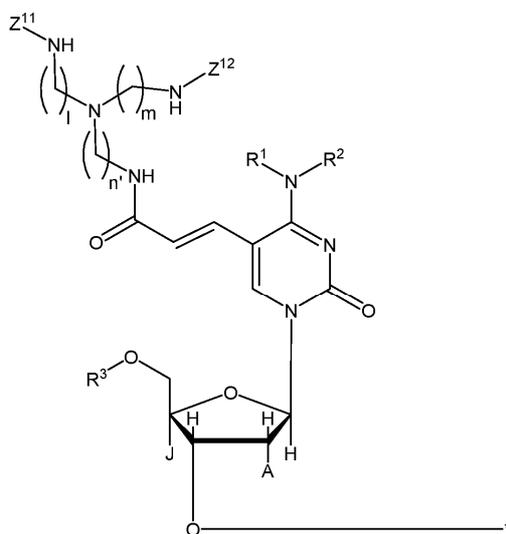


1

где R^1 , R^2 , R^3 и R^4 соответствуют определениям, данным для формулы 1a,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

4. Нуклеиновая кислота, включающая по меньшей мере один структурный фрагмент, представленный формулой (1a-2)



(1a-2),

где R^1 , R^2 , R^3 , J и A соответствуют определениям, данным для формулы 1a в любом из пп.1-3;

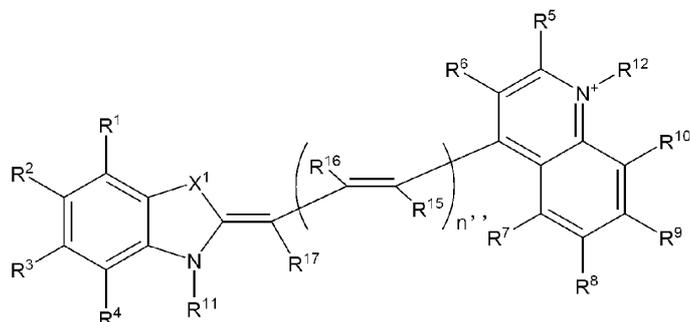
l, m, n', каждый, означают целое число от 2 до 100, l, m и n' могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга;

Z^{11} и Z^{12} , каждый, представляют собой фрагмент флуоресцентного красителя, который демонстрирует экситонный эффект;

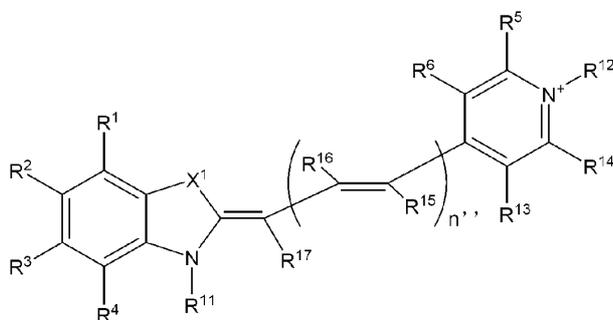
символ "*" показывает положение, по которому изображенный структурный фрагмент связан с другим атомом или группой атомов в нуклеиновой кислоте,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

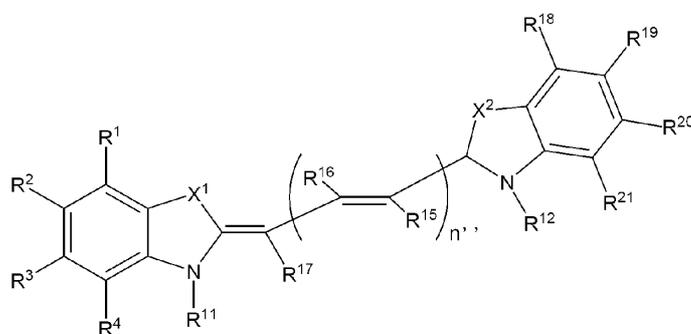
5. Соединение по п.4, где в формуле (Ia-2) Z^{11} и Z^{12} представляет собой одну из следующих формул (7)-(9):



(7)



(8)



(9)

где X^1 и X^2 представляют собой атомы S, O или Se;

n'' означает 0 или целое положительное число 1;

каждый из R^1 - R^{10} и R^{13} - R^{21} независимо представляет собой атом водорода, атом галогена, C_{1-6} алкильную группу, C_{1-6} алкоксигруппу, нитрогруппу или аминогруппу;

один из R^{11} и R^{12} представляет собой связующую группу, которая связана с NH в формулах (Ia-2), и другой является атомом водорода или C_{1-6} алкильной группой,

где связующая группа представляет собой полиметилкарбонильную группу с числом атомов углерода от 2 до 100 и она связана с NH в формулах (Ia-2) через карбонильную группу,

если в формулах (7), (8) или (9) присутствует несколько R^{15} , они могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга,

если в формулах (7), (8) или (9) присутствует несколько R^{16} , они могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга; и

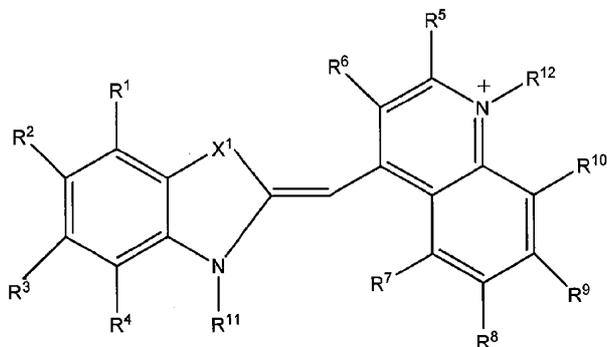
X^1 , X^2 и R^1 - R^{21} в Z^{11} и X^1 , X^2 и R^1 - R^{21} в Z^{12} могут являться одинаковыми или отличаться друг от друга соответственно,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или

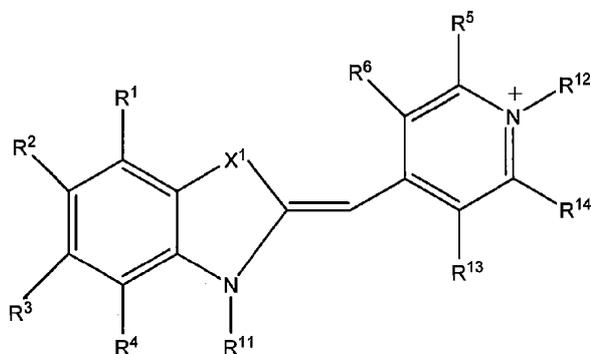
стереоизомера.

6. Соединение по п.5, где в R^1 - R^{21} в формулах (7)-(9) C_{1-6} алкильная группа является линейной или разветвленной алкильной группой и C_{1-6} алкоксигруппа является линейной или разветвленной алкоксигруппой, таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

7. Соединение по п.5 или 6, где в формуле (Ia-2) каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является группой атомов, представленной формулами (7) или (8), и представляют собой группы, представленные формулой (19) или (20):



(19)



(20)

где X^1 , R^1 - R^{10} , R^{13} и R^{14} , R^{11} и R^{12} соответствуют определениям, данным для формул (7)-(9); таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

8. Соединение по п.7, где каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является группой, представленной приведенной выше формулой (19), где

X^1 означает S;

R^1 - R^{10} являются атомами водорода и

один из R^{11} и R^{12} является связующей группой, которая связана с NH в формуле (Ia-2), а другой представляет собой метильную группу;

где связующая группа представляет собой полиметилкарбонильную группу с числом атомов углерода от 2 до 100 и она связана с NH в формуле (Ia-2) через карбонильную группу, таутомер или стереоизомер указанного соединения,

или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

9. Соединение по п.7, где в формуле (Ia-2) каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является группой, представленной приведенной выше формулой (19), где

X^1 означает S;

R^1 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^9 и R^{10} являются атомами водорода;

R^2 , R^3 и R^{12} являются метильными группами;

R^8 является атомом галогена;

R^{11} является связующей группой, которая связана с NH в формуле (Ia-2),

где связующая группа представляет собой полиметилкарбонильную группу с числом атомов углерода от 2 до 100 и она связана с NH в формуле (Ia-2) через карбонильную группу, таутомер или стереоизомер указанного соединения,

или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

10. Соединение по п.5, где в формуле (Ia-2), каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является группой, представленной приведенной выше формулой (7), где

X^1 означает S,

n означает 1;

R^1 - R^{10} , R^{15} , R^{16} и R^{17} являются атомами водорода;

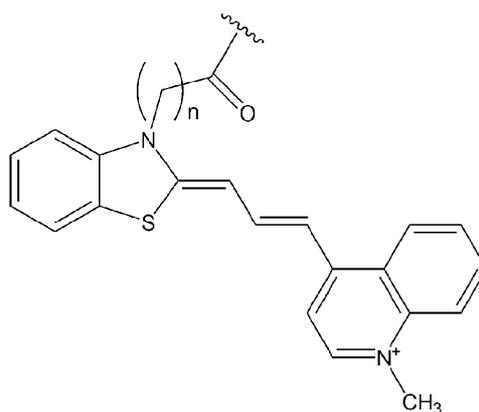
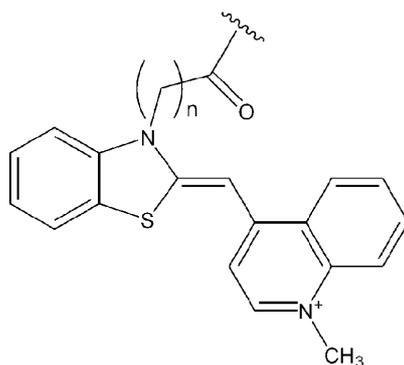
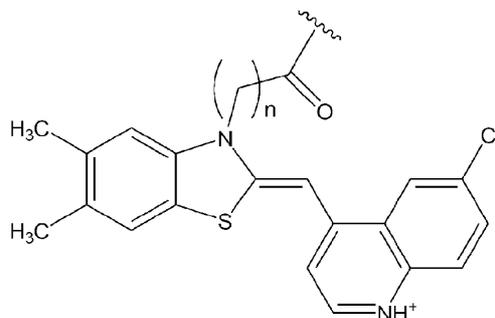
R^{11} является связующей группой, которая связана с NH в формуле (Ia-2); и

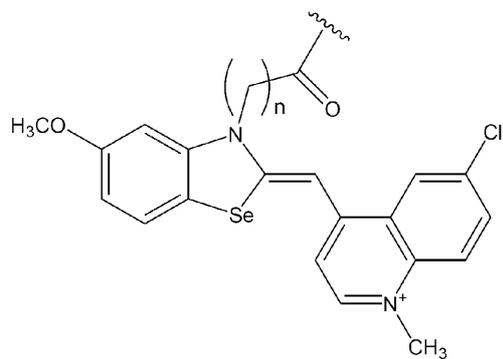
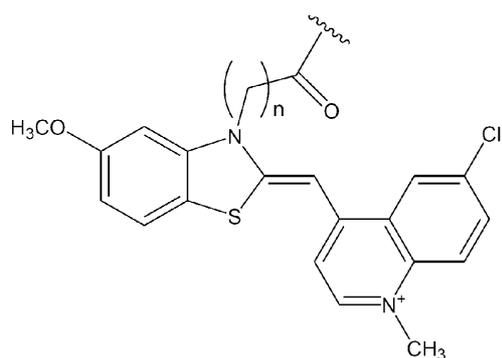
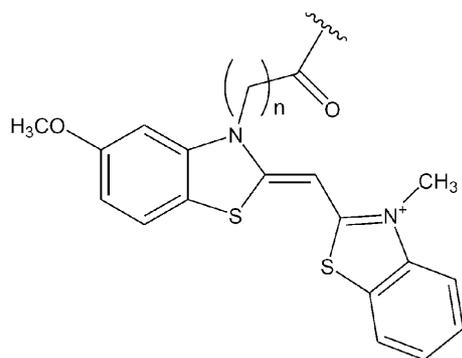
R^{12} является метильной группой,

где связующая группа представляет собой полиметиленкарбонильную группу с числом атомов углерода от 2 до 100 и она связана с NH в формуле (Ia-2) через карбонильную группу,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

11. Соединение по п.4, где в формуле (Ia-2) каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой группу атомов, представленную любой из приведенных ниже формул:





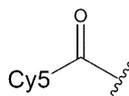
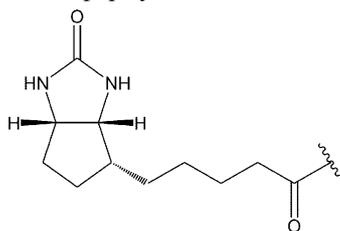
где волнистая линия показывает положение, по которому изображенная группа атомов связана с NH; и

n составляет от 2 до 100,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

12. Соединение по п.11, где длина линкера n находится в диапазоне от 2 до 6, таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

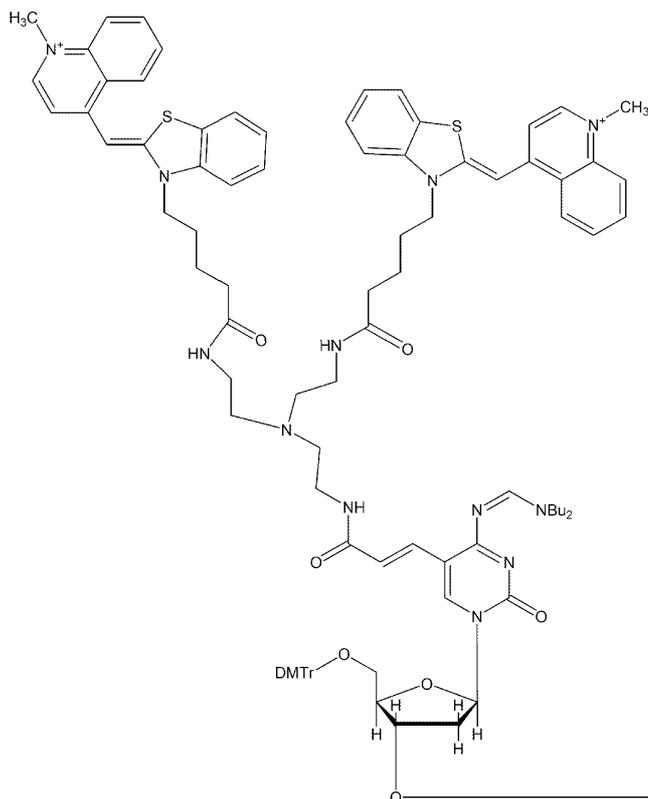
13. Соединение по п.4, где в формуле (Ia-2) каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является группой атомов, представленной любой из следующих формул:



где волнистая линия показывает положение, по которому изображенная группа атомов связана с NH; и

Cy5 означает остаток цианинового красителя Cy5,
таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

14. Нуклеиновая кислота по п.4, представленная химической формулой 1001:



1 0 0 1

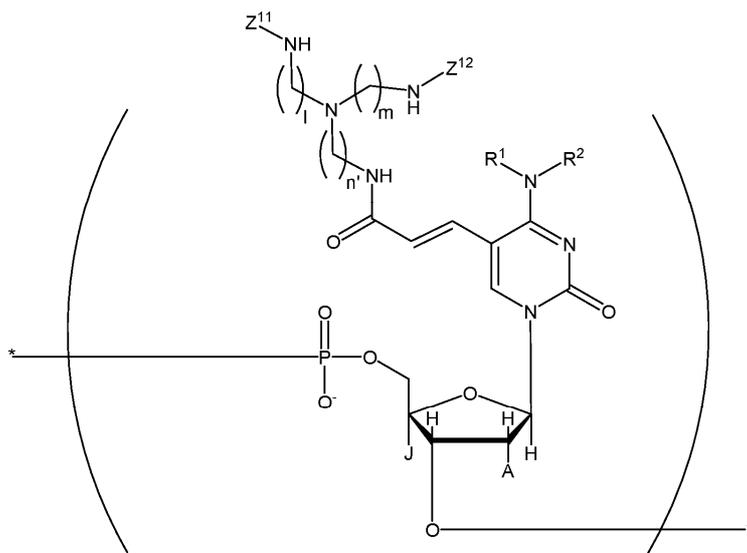
где символ "*" имеет то же значение, что и в формуле (Ia-2);

"Bu" означает n-бутиловую группу;

"DMTr" означает 4,4-диметокситрифенилметильную группу,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

15. Нуклеиновая кислота, включающая по меньшей мере один структурный фрагмент, представленный следующей химической формулой (IIa-1):



(IIa-1),

где R^1 , R^2 , J, A, l, m, n', Z^{11} и Z^{12} соответствуют определениям, приведенным для формулы (Ia-2) в любом из пп.4-12;

символ "*" означает положение, по которому указанный структурный фрагмент присоединен к другим атомам или группам атомов в нуклеиновой кислоте; и

по меньшей мере один атом O в связующем фрагменте фосфорной кислоты может быть заменен атомом S,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соли указанного соединения, его таутомера или стереоизомера.

Соединение по настоящему изобретению

Авторы настоящего изобретения провели кропотливые исследования, направленные на улучшение модифицированных ДНК олигомеров. В результате они разработали реагент для синтеза ДНК, который представляет собой основание, отличающееся от коммерчески доступных производных тимина. При применении этого реагента можно добиться связывания функциональной молекулы, например красителя, в аппарате для синтеза ДНК (ДНК-синтезаторе), что позволяет резко упростить стадию очистки. Однако следует отметить, что соединения по настоящему изобретению не ограничены соединениями для синтеза ДНК, но, кроме того, включают, например, соединения для синтеза других нуклеиновых кислот, например РНК.

Для решения описанных выше проблем авторы настоящего изобретения разработали и синтезировали основание нуклеиновой кислоты, которое содержит такой же реакционноспособный сайт, как и коммерчески доступные производные тимина. Т.е. соединение по настоящему изобретению (производное основания нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению) представляет собой соединение, отличающееся тем, что, как видно на приведенной выше химической формуле (1a), оно включает группу NHS в качестве реакционноспособного сайта, таутомер или стереоизомер этого соединения или его соль.

В химической формуле (1a) длина основной цепи (количество атомов в основной цепи) фрагмента L предпочтительно представляет собой целое число, равное 2 или более. Верхний предел этого параметра не ограничен конкретными цифрами и составляет, например, 100 или менее, более предпочтительно 30 или менее и особенно предпочтительно 10 или менее. Структура линкера L и структура группы атомов Z, содержащей метку, не ограничены конкретными рамками, и они могут быть, например, такими же, как и соответствующие фрагменты нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которые описаны ниже.

В соединении по настоящему изобретению (соединении формулы (1a)) на защитную группу не налагается конкретных ограничений, и для каждой функциональной группы может применяться подходящая защитная группа (для справки см., например, Protective groups in organic chemistry, Wiley-inter science). В настоящем изобретении защитная группа аминогруппы не ограничена конкретными рамками. Примеры таких защитных групп включают трифторацетильную группу, формильную группу, C_{1-6} алкилкарбонильную группу (например, ацетил и этилкарбонил), C_{1-6} алкилсульфонильную группу, трет-бутоксикарбонильную группу (далее по тексту именуемую также "Boc"), бензилоксикарбонильную группу, аллилкарбонильную группу, флуоренилметоксикарбонильную группу, арилкарбонильную группу (например, фенилкарбонильную и нафтилкарбонильную) и арилсульфонильную группу (например, фенилсульфонильную и нафтилсульфонильную), C_{1-6} алкилоксикарбонильную группу (например, метоксикарбонильную и этоксикарбонильную), C_{7-10} аралкилкарбонильную группу (например, бензилкарбонильную), метильную группу и аралкильную группу (например, бензильную, дифенилметильную и

третичную группы). Перечисленные группы могут быть замещены, например, одним-тремя атомами галогенов (например, атомами фтора, хлора или брома) или нитрогруппами. Конкретные примеры замещенных групп включают *p*-нитробензилоксикарбонильную группу, *p*-хлорбензилоксикарбонильную группу, *m*-хлорбензилоксикарбонильную группу и *p*-метоксибензилоксикарбонильную группу. В настоящем изобретении защитная группа гидроксильной группы (включая защитную группу, которую можно удалить кислотой) не ограничена конкретными рамками. Примеры защитных групп включают диметокситрительную группу, монометокситрительную группу и пикрильную группу.

В химической формуле (1a) каждый из R^1 и R^2 представляет собой водород, трифторацетильную группу, формильную группу, C_{1-6} алкилкарбонильную группу, C_{1-6} алкилсульфонильную группу, трет-бутоксикарбонильную группу, бензилоксикарбонильную группу, аллилоксикарбонильную группу, флуоренилметоксикарбонильную группу, фенилкарбонильную группу, нафтилкарбонильную группу, фенилсульфонильную группу, нафтилсульфонильную группу, C_{1-6} алкилоксикарбонильную группу, C_{7-10} аралкилкарбонильную группу, метильную группу, бензильную группу, дифенилметильную группу, третичную группу и могут быть идентичными или отличаться друг от друга или R^1 и R^2 совместно могут образовывать защитную группу аминогруппы, представленную $=C-NR^{100}_2$, где каждый R^{100} является линейной или разветвленной C_{1-20} алкильной группой. Конкретные примеры R^{100} включают *n*-бутильную группу. R^3 может представлять собой диметокситрительную группу, монометокситрительную группу или пикрильную группу. В настоящем изобретении "алкильная группа" не ограничена конкретными рамками и может представлять собой, например, алкильную группу с числом атомов углерода от 1 до 20. Конкретные примеры алкильных групп включают метильную группу, этильную группу, *n*-пропильную группу, изопропильную группу, *n*-бутильную группу, изобутильную группу, втор-бутильную группу, трет-бутильную группу, пентильную группу, гексильную группу, гептильную группу, октильную группу, нонильную группу, децильную группу, ундецильную группу, додецильную группу, тридецильную группу, тетрадецильную группу, пентадецильную группу, гексадецильную группу, гептадецильную группу, октадецильную группу, нонадецильную группу и эйкозильную группу. То же самое относится к группам, в структуру которых входит алкильная группа (алкоксигруппам, аралкильным группам и т.д.). "Арильная группа" не ограничена конкретными рамками и может представлять собой, например, арильную группу с числом атомов углерода от 5 до 24. Конкретные примеры арильных групп включают фенильную группу, нафтильную группу, толильную группу и анизильную группу. То же относится к группам, в структуру которых входит арильная группа (аралкильным группам и т.д.). В настоящем изобретении "аралкильная группа" не ограничена конкретными рамками и может представлять собой, например, бензильную группу, дифенилметильную группу, третичную группу, фенэтильную группу и т.п. "Ацильная группа" не ограничена конкретными рамками и может представлять собой, например, формильную группу, ацетильную группу, пропионильную группу, изобутирильную группу, валерильную группу, изовалерильную группу, пивалоильную группу, гексаноильную группу, циклогексаноильную группу, бензоильную группу, этоксикарбонильную группу и т.п. "Защитная амидиновая группа" не ограничена конкретными рамками и может представлять собой, например, диметилформамидиновую группу, диэтилформамидиновую группу, дипропилформамидиновую группу, дибутилформамидиновую группу и т.п. "Циклическая алкильная группа" не ограничена конкретными рамками и может представлять собой циклическую бутильную группу, циклическую пентильную группу и т.п. "Силильная группа" не ограничена конкретными рамками и может представлять собой триметилсилильную группу, триэтилсилильную группу, триизопропилсилильную группу, трет-бутилдиметилсилильную группу, трет-бутилдифенилсилильную группу и т.п. "Циклический фрагмент простого эфира" не ограничен конкретными рамками и может представлять собой 1,2-диоксиэтильную группу, 1,3-диоксипропильную группу и т.п. "Циклическая аминогруппа" не ограничена конкретными рамками и может представлять собой 1,2-диаминоэтильную группу, 1,3-диаминопропильную группу и т.п. Термин "элемент 17 группы" относится к любому галогену, и примеры галогенов включают фтор, хлор, бром и йод. Термин "элемент 16 группы" относится к любому халькогену, и примеры халькогенов включают серу, селен и теллур.

Если соединение по настоящему изобретению, а также нуклеиновая кислота и соединение, несущее метку, по настоящему изобретению имеют изомер, например таутомер или стереоизомер (например, геометрический изомер, конформер или оптический изомер), любой из этих изомеров может применяться в настоящем изобретении. Соль соединения или нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может представлять собой кислотную-аддитивную соль, а также основную-аддитивную соль. Кроме того, кислота, которая образует кислотную-аддитивную соль, может быть неорганической кислотой или органической кислотой, и основание, которое образует основную-аддитивную соль, может быть неорганическим основанием или органическим основанием. Неорганическая кислота не ограничена конкретными рамками, и примеры таких кислот включают серную кислоту, фосфорную кислоту, фтористоводородную кислоту, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, йодистоводородную кислоту, гипохлористую кислоту, гипохлористую кислоту, гипобромистую кислоту, гипойодистую кислоту, фтористую кислоту, хлористую кислоту, бромистую кислоту, йодистую кислоту, фторноватую кислоту, хлорноватую кислоту, йодноватую кислоту, фторную кислоту, хлорную кислоту, бромную кислоту и йодную кислоту. Органические кислоты также не ограничены конкретными рамками, и их примеры включают

п-толуолсульфоновую кислоту, метансульфоновую кислоту, щавелевую кислоту, п-бромбензолсульфоновую кислоту, угольную кислоту, янтарную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту и уксусную кислоту. Неорганическое основание не ограничено конкретными рамками, и примеры таких оснований включают гидроксид аммония, гидроксиды щелочных металлов, гидроксиды щелочноземельных металлов, карбонаты и гидрокарбонаты. Более конкретные примеры неорганических оснований включают гидроксид натрия, гидроксид калия, карбонат калия, карбонат натрия, бикарбонат натрия, гидрокарбонат калия, гидроксид кальция и карбонат кальция. Органические основания также не ограничены конкретными рамками, и их примеры включают этаноламин, триэтиламин и трис-(гидроксиметил)аминометан. Способ получения солей также не ограничен конкретными рамками. Их можно получать, например, добавляя указанную выше подходящую кислоту или основание по известной методике. Кроме того, если заместитель или другая группа имеет изомер, может применяться любой из изомеров. Например, в случае "нафтильной группы" она может представлять собой 1-нафтильную группу или 2-нафтильную группу.

Соединение по настоящему изобретению может представлять собой, например, производное NHS-карбоксихлированного цитозина, представленное химической формулой 1. Это производное NHS-карбоксихлированного цитозина имеет такой же реакционный сайт, как и коммерчески доступные производные NHS-карбоксихлированного тимина. Таким образом, реакционная способность и стабильность соединения по настоящему изобретению эквивалентны соответствующим характеристикам коммерчески доступных производных NHS-карбоксихлированного тимина, и соединения по настоящему изобретению можно хранить на воздухе при комнатной температуре. До настоящего времени, если ДНК олигомеры, которые было необходимо модифицировать, не имели в своей последовательности тимина, синтез таких модифицированных ДНК олигомеров был невозможен. Разработка указанного производного NHS-карбоксихлированного цитозина делает возможным, например, синтез таких ДНК олигомеров.

Способ получения соединения по настоящему изобретению не ограничен конкретными рамками. Например, соединение по настоящему изобретению можно получать с применением любого подходящего из известных способов синтеза (способов получения) или способа, основанного на этих известных способах синтеза. Конкретно, соединение по настоящему изобретению можно получать, например, любым из способов синтеза, описанных в приведенных ниже примерах, способов, эквивалентных описанным способам, или способов, основанных на описанных способах.

Например, соединение, не содержащее метки (соединение, представленное химической формулой (1a), где Z является группой атомов, которая может образовывать пептидную связь с соединением, несущим метку, и само не содержит метки), можно получать способом, эквивалентным способу синтеза соединения 4 в приведенном ниже примере 1, или способом, основанным на описанном.

Далее, соединение, несущее метку и предназначенное для введения метки, например соединение, представленное приведенной ниже химической формулой 5, можно получить взаимодействием соединения 109, показанного на приведенной ниже схеме 1, с соединением, полученным введением защитной группы аминогруппы в трис-(2-аминоэтил)амин.

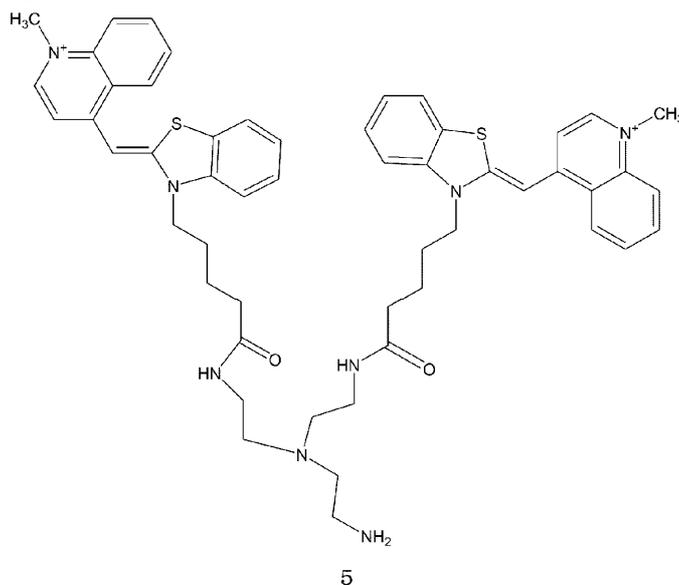
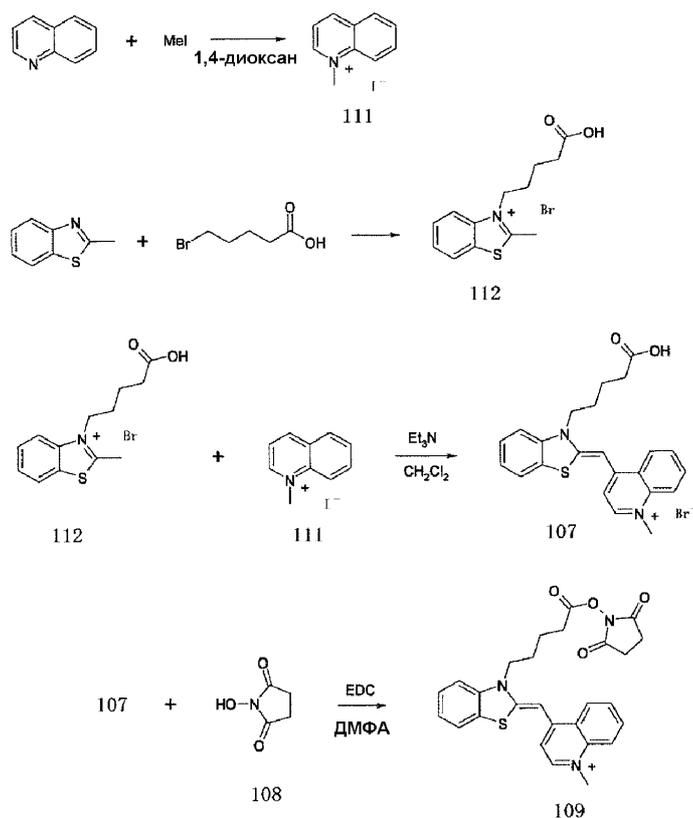


Схема 1



Пример способа синтеза соединения 109 согласно схеме 1 показан ниже. Схема 1 и способ синтеза согласно схеме 1 (который будет описан ниже) описаны в патенте Японии № 4370385.

(1) Синтез N-метилхинолиний йодида (соединение 111).

На первом этапе осуществляли синтез N-метилхинолиний йодида (соединения 111) в соответствии с методикой, описанной в приведенной выше ссылке. Конкретно, 2,4 мл хинолина и 4 мл метилйодида добавляли к 42 мл безводного диоксана и полученную смесь перемешивали при 150°C в течение 1 ч. Затем смесь фильтровали и собирали осадок. Осадок промывали эфиром и петролейным эфиром и после этого высушивали. Описанным способом получали N-метилхинолиний йодид (соединение 111).

(2) Синтез 3-(4-карбоксивбутил)-2-метилбензотиазолий бромида (соединение 112)/

8 мл 2-метилбензотиазола (FW = мол. масса) 149,21, d=1,173) и 9,4 г 5-бромвалериановой кислоты (5-бромпентановой кислоты) (FW 181,03) перемешивали при 110°C в течение 16 ч. Неочищенный продукт охлаждали до комнатной температуры, полученное таким образом твердое вещество суспендировали в 20 мл метанола и затем добавляли к суспензии 40 мл эфира. Полученный осадок отделяли фильтрованием и затем промывали диоксаном до исчезновения запаха 2-метилбензотиазола. После этого осадок промывали эфиром и высушивали при пониженном давлении. Описанным способом получали 9,8 г белого порошка. Регистрировали ¹H ЯМР спектр полученного белого порошка. В результате обнаружили, что порошок является смесью 3-(4-карбоксивбутил)-2-метилбензотиазолий бромида (соединения 112), т.е. желаемого вещества, положение 2 которого было алкилировано, и 3-(4-карбоксивбутил)бензотиазолий бромида, положение 2 которого не было алкилировано. Соотношение площадей пиков в протонном спектре составляло не алкилированное производное:алкилированное производное=10:3. Этот неочищенный продукт использовали на следующей стадии без дополнительной обработки.

(3) Синтез 1-метил-4-[{3-(4-карбоксивбутил)-2(3H)бензотиазолилиден}метил]хинолиний бромида (соединение 107)/

2,18 г неочищенного продукта, содержащего 3-(4-карбоксивбутил)-2-метилбензотиазолий бромид (соединения 112), который был получен на описанной выше стадии (2), и 700 мг N-метилхинолиний йодида (соединения 111) (FW 271,10) перемешивали в 10 мл метилхлорида при 25°C в течение 2 ч в присутствии 3,6 мл триэтиламина (FW 101,19, d=0,726). Затем к реакционной смеси добавляли 50 мл эфира и полученный осадок отделяли фильтрованием, промывали эфиром и затем высушивали при пониженном давлении. Остаток суспендировали в 50 мл особо чистой воды, затем фильтровали, промывали особо чистой водой и затем высушивали при пониженном давлении. После этого осадок суспендировали в 50 мл ацетонитрила, фильтровали, промывали ацетонитрилом и затем высушивали при пониженном давлении. В результате получали 307,5 мг красного порошка (выход: 25,3%). Подтверждали, что полученный красный порошок является желаемым веществом (соединением 107), путем сравнения спектра ¹H ЯМР с эталонным спектром.

Кроме того, можно синтезировать 3-(4-карбоксибутил)-2-метилбензотиазолий бромид (соединение 112) и 1-метил-4-[{3-(4-карбоксибутил)-2(3H)бензотиазолилиден}метил]хинолиний бромид (соединение 107) следующим способом. Более конкретно, на первой стадии 11,7 мл (92 ммоль) 2-метилбензотиазола (FW 149,21, $d=1,173$) и 13,7 г (76 ммоль) 5-бромвалериановой кислоты (5-бромпентановой кислоты) (FW 181,03) перемешивали при 150°C в течение 1 ч. Неочищенный продукт охлаждали до комнатной температуры и полученное твердое вещество суспендировали в 50 мл метанола. Затем добавляли к этой смеси 200 мл эфира. Полученный осадок отделяли фильтрованием, промывали эфиром и затем высушивали при пониженном давлении. Получали 19,2 г светло-пурпурного порошка. Этот порошок представлял собой смесь желаемого соединения 112 (3-(4-карбоксибутил)-2-метилбензотиазолий бромида) и 2-метилбензотиазолий бромида. Регистрировали ^1H ЯМР спектр полученной смеси (в ДМСО- d_6) и вычисляли, что выход желаемого соединения составлял 9,82 г (14 ммоль, 32%) исходя из соотношения площадей пиков при 8,5 м.д. (сигнал желаемого соединения 112) и при 8,0 м.д. (сигнал 2-метилбензотиазолий бромида). Эту смесь (неочищенный продукт) использовали на следующей стадии без очистки. Таким же способом, который описан выше, за исключением того, что 5-бромвалериановую кислоту (5-бромпентановую кислоту) заменяли 4-броммасляной кислотой (4-бромбутановой кислотой) синтезировали 3-(4-карбоксипропил)-2-метилбензотиазолий бромид с линкером (полиметиленовой цепью, связанной с карбоксильной группой) с числом атомов углерода n , равным 3, причем выход указанного продукта составлял 4%. Кроме того, описанным выше способом, за исключением того, что 5-бромвалериановую кислоту (5-бромпентановую кислоту) заменяли 6-бромгексановой кислотой, синтезировали 3-(4-карбоксипентил)-2-метилбензотиазолий бромид с линкером (полиметиленовой цепью, связанной с карбоксильной группой) с числом атомов углерода n , равным 5, причем выход указанного продукта составлял 35%. Помимо этого, описанным выше способом, за исключением того, что 5-бромвалериановую кислоту (5-бромпентановую кислоту) заменяли 7-бромгептановой кислотой, синтезировали 3-(4-карбоксипропил)-2-метилбензотиазолий бромид с линкером (полиметиленовой цепью, связанной с карбоксильной группой) с числом атомов углерода n , равным 6, причем выход указанного продукта составлял 22%.

На следующей стадии 1,36 г (5,0 ммоль) N-метилхинолиний йодида (соединения 111) (FW 271,10), 7,0 мл (50 ммоль) триэтиламина (FW 101,19, $d=0,726$) и 100 мл метиленхлорида добавляли к 3,24 г смеси (неочищенного продукта), содержащего соединение 112 (3-(4-карбоксибутил)-2-метилбензотиазолий бромид) и 2-метилбензотиазолий бромид. В результате получали прозрачный раствор. Этот раствор перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Затем выпаривали растворитель при пониженном давлении. К остатку добавляли ацетон, образовавшийся осадок отделяли фильтрованием и промывали ацетоном. Полученный продукт высушивали при пониженном давлении и полученный после высушивания красный осадок промывали дистиллированной водой (50 мл). Полученный осадок снова отделяли фильтрованием, промывали дистиллированной водой и затем высушивали при пониженном давлении. Получали желаемое вещество (соединение 107) в виде красного порошка (654 мг, 1,39 ммоль, 28%). Подтверждали, что полученный красный порошок является желаемым веществом (соединением 107), сравнивая ^1H ЯМР спектр продукта с эталонным образцом. Ниже приведены химические сдвиги сигналов в спектрах ^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР (ДМСО- d_6) и измеренные значения масс ионов в спектрах HRMS (масс-спектрологии высокого разрешения).

Соединение 107:

^1H ЯМР (ДМСО- d_6): δ 8,74 (д, $J=8,3$ Гц, 1H), 8,51 (д, $J=7,3$ Гц, 1H), 7,94-7,89 (м, 3H), 7,74-7,70 (м, 1H), 7,65 (д, $J=8,3$ Гц, 1H), 7,55-7,51 (м, 1H), 7,36-7,32 (м, 1H), 7,21 (д, $J=7,3$ Гц, 1H), 6,83 (с, 1H), 4,47 (т, $J=7,1$ Гц, 2H), 4,07 (с, 3H), 2,22 (т, $J=6,6$ Гц, 1H), 1,77-1,63 (м, 4H);

^{13}C ЯМР (ДМСО- d_6): δ 174,6, 158,8, 148,4, 144,5, 139,5, 137,6, 132,7, 127,9, 126,8, 125,5, 124,1, 123,7, 123,6, 122,4, 117,5, 112,6, 107,6, 87,4, 45,6, 42,0, 35,5, 26,2, 22,3;

HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($[\text{M}.\text{Br}]^+$) 391,1480, найдено 391,1475.

(4) Синтез N-гидроксисукцинимидилового эфира 109.

9,4 мг (20 мкмоль) 1-метил-4-[{3-(4-карбоксибутил)-2(3H)бензотиазолилиден}метил]хинолиний бромида (соединения 107) (FW 471,41), 4,6 мг (40 мкмоль) N-гидроксисукцинимидила (соединения 108) (FW 115,09) и 7,6 мг (40 мкмоль) EDC (гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида) (FW 191,70) перемешивали в 1 мл ДМФА при 25°C в течение 16 ч. Получали N-гидроксисукцинимидиловый эфир (соединение 109), в котором активирована карбоксигруппа красителя (соединения 107). Продукт реакции не очищали и реакционный раствор (20 мкМ красителя) использовали в следующей стадии без дополнительной обработки.

Как указано выше, соединение химической формулы 5 можно получать взаимодействием соединения 109 с соединением, полученным введением защитной группы аминогруппы в трис-(2-аминоэтил)амин. Более конкретно, соединение химической формулы 5 можно получать, например, проводя указанную реакцию при комнатной температуре в ДМФА (диметилформамиде), как в описанных выше примерах, но методика получения этого соединения не ограничена этим способом.

Введение метки в соединение по настоящему изобретению можно осуществить, например, взаимодействием соединения, не содержащего метку (соединения, представленного химической формулой (1a), где Z означает группу атомов, которая может образовывать пептидную связь с соединением, несущим метку, и не содержит метки сама по себе), с соединением, несущим метку (например, соединением химической формулы 5). Более конкретно, введение метки можно осуществить, например, следующим способом: смешивают соединение, несущее метку, $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ буфер и воду, затем добавляют раствор соединения по настоящему изобретению, не содержащего метку, в ДМФА, перемешивают и полученную смесь оставляют стоять при комнатной температуре, что вызывает протекание описанной выше реакции. Введение метки можно также осуществить, например, взаимодействием соединения, не содержащего метку, с соединением, несущим метку, в автоматизированном устройстве для синтеза нуклеиновых кислот. Условия проведения реакции в аппарате для синтеза нуклеиновых кислот могут быть, например, такими же, как и для обычной реакции, проводимой в таком аппарате (например, полимеризации нуклеотидов фосфорамидитным способом). Поскольку соединение по настоящему изобретению является производным цитозина, оно может обеспечить благоприятный эффект, заключающийся, например, в том, что в него можно легко ввести метку, проводя реакцию в автоматизированном устройстве для синтеза нуклеиновых кислот. Однако следует отметить, что этот эффект является лишь иллюстративным и не ограничивает настоящее изобретение каким-либо образом.

Нуклеиновые кислоты и соединения, несущие метку, по настоящему изобретению

Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению, как указано выше, представляет собой нуклеиновую кислоту, включающую по меньшей мере один структурный фрагмент, представленный химической формулой (IIa-1), ее таутомер или стереоизомер или их соль.

В химической формуле (IIa-1) длина основной цепи (количество атомов в основной цепи) L предпочтительно является целым числом, равным 2 или более. Верхний предел этого параметра не ограничен конкретными значениями и составляет, например, 100 или менее, более предпочтительно 30 или менее и особенно предпочтительно 10 или менее.

В химических формулах (IIa-1) длина основной цепи (количество атомов в основной цепи) каждого из L^1 , L^2 и L^3 предпочтительно представляет собой целое число, равное 2 или более. Верхний предел этого параметра не ограничен конкретными значениями и составляет, например, 100 или менее, более предпочтительно 30 или менее и особенно предпочтительно 10 или менее.

Z^{11} и Z^{12} предпочтительно являются фрагментами флуоресцентных красителей, которые демонстрируют экситонный эффект. При такой конфигурации происходит существенное изменение окружения в окрестности фрагмента флуоресцентного красителя при связывании с целевой последовательностью, например формирование структуры двойной спирали вызывает усиление флуоресценции, поэтому целевую последовательность можно обнаружить более эффективно.

Фрагменты флуоресцентных красителей в Z^{11} и Z^{12} , которые демонстрируют экситонный эффект, не ограничены конкретными рамками. Более конкретно, каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является остатком любого из таких красителей, как тиазоловый оранжевый, оксазоловый желтый, цианин, гемицианин, другие цианиновые красители, метиловый красный, азокрасители и их производные. Кроме того, при необходимости могут применяться остатки любого другого известного красителя. Сообщалось о большом количестве флуоресцентных красителей, которые меняют интенсивность флуоресценции при связывании с нуклеиновыми кислотами, например ДНК. В качестве типового примера известно, что этидиум бромид демонстрирует сильную флуоресценцию при включении в структуру двойной спирали и часто используется для обнаружения ДНК. Кроме того, известны флуоресцентные красители, интенсивность флуоресценции которых можно регулировать в соответствии с микроскопической полярностью, например пиренкарбоксамид и продан. Тиазоловый оранжевый представляет собой флуоресцентный краситель, в котором бензотиазольный цикл и хинолиновый цикл связаны друг с другом через метиновую группу. Обычно он демонстрирует слабую флуоресценцию, но испускает сильное флуоресцентное излучение при включении в молекулу ДНК, имеющую структуру двойной спирали. Другие примеры включают такие красители, как флуоресцеин и Су3.

Более предпочтительно каждая из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой фрагмент красителя одной из приведенных выше формул (7)-(9).

Более предпочтительно, чтобы в формулах (7)-(9) в R^1 - R^{21} низшая алкильная группа представляла собой линейную или разветвленную алкильную группу с числом атомов углерода от 1 до 6 и низшая алкоксигруппа представляла собой линейную или разветвленную алкоксигруппу с числом атомов углерода от 1 до 6.

Более предпочтительно, чтобы в формулах (7)-(9) в R^{11} и R^{12} связующая группа представляла собой полиметиленкарбонильную группу с числом атомов углерода не менее 2, которая связана с L^1 или L^2 в формулах (IIa-1) по карбонильной группе. Верхний предел числа атомов углерода в полиметиленкарбонильной группе не ограничен конкретными значениями и составляет, например, 100 или менее, более предпочтительно 30 или менее и особенно предпочтительно 10 или менее.

Более предпочтительно, чтобы в формуле (IIa-1) каждый из коэффициентов l, m и n' представлял собой целое число, равное 2 или более. Верхний предел каждого из этих параметров не ограничен кон-

кретными значениями и составляет, например, 100 или менее, более предпочтительно 30 или менее и особенно предпочтительно 10 или менее.

Способ получения нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению не ограничен конкретными рамками. Например, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению можно синтезировать (получить) с применением соединения по настоящему изобретению, представленного химической формулой (1a). На конкретный способ получения не налагается определенных ограничений. Например, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению можно получать с использованием известных методик синтеза (способов получения), которые подходят для конкретного случая, или по методикам, основанным на этих известных способах. Для получения нуклеиновой кислоты из соединения по настоящему изобретению синтез можно проводить, например, известным способом, например фосфорамидитным способом с использованием автоматического ДНК-синтезатора и т.п. Для введения метки в нуклеиновую кислоту можно ввести во взаимодействие, например, группу NCS, введенную в соединение по настоящему изобретению, представленное химической формулой (1a), с соединением, содержащим метку. Более конкретно, например, карбонильную группу (химическая формула 1, 1a), активированную путем получения группы NCS, можно ввести во взаимодействие с аминокислотным соединением, включающим метку. Эта метка может представлять собой, например, фрагмент флуоресцентного красителя (предпочтительно, фрагмент флуоресцентного красителя, который демонстрирует экситонный эффект), как указано выше. Стадию взаимодействия NCS группы с меткой можно проводить либо до, либо после полимеризации (синтеза нуклеиновой кислоты). Например, для предотвращения повреждения фрагмента, содержащего метку, на стадии синтеза метку можно вводить после полимеризации (синтеза нуклеиновой кислоты). Однако, как и в описанных ниже примерах, метку можно также вводить до полимеризации (синтеза нуклеиновой кислоты). Поскольку соединение по настоящему изобретению, представленное химической формулой (1a), является производным цитозина, оно обеспечивает благоприятный эффект, заключающийся в том, что, например, даже если метка введена в соединение до полимеризации (синтеза нуклеиновой кислоты), меченый фрагмент менее склонен к повреждению на стадии синтеза. Кроме того, например, после того, как соединение без метки вводят в реакцию с соединением, несущим метку, в аппарате для синтеза нуклеиновых кислот, с целью введения метки, как указано выше, полимеризацию (синтез нуклеиновой кислоты) можно затем осуществлять в том же аппарате для синтеза нуклеиновых кислот. В этом случае введение метки и полимеризацию (синтез нуклеиновой кислоты) можно проводить в автоматическом устройстве для синтеза нуклеиновых кислот, т.е. в одной емкости (одном реакционном сосуде). Это обеспечивает полезный эффект, заключающийся в том, что синтез можно проводить очень легко. Описанного выше эффекта можно добиться благодаря тому факту, что соединение по настоящему изобретению, представленное химической формулой (1a), является производным цитозина, которое, например, обладает повышенной реакционной способностью. Однако следует отметить, что этот эффект является лишь иллюстративным и не ограничивает настоящее изобретение каким бы то ни было образом.

Как указано выше, на метку не налагается конкретных ограничений, и может применяться любой остаток флуоресцентного красителя (краситель) и т.п. Например, предпочтительным является цианиновый краситель и особенно предпочтительно тиазоловый оранжевый. Цианиновые красители имеют химическую структуру, в которой, например, два гетероцикла, включающие гетероатомы, связаны друг с другом метиновым линкером. Можно синтезировать флуоресцентные красители с возбуждением/эмиссией на разных длинах волн, например, меняя тип гетероциклов или длину метинового линкера или вводя в гетероциклы заместители. Кроме того, введение линкера для присоединения к молекуле ДНК также осуществляется относительно легко. Хотя тиазоловый оранжевый слабо флуоресцирует в водной среде, он испускает сильное флуоресцентное излучение при взаимодействии с ДНК или РНК. Считается, что благодаря взаимодействию с нуклеиновой кислотой предотвращается взаимодействие между молекулами красителя, а также вращение вокруг метинового линкера, расположенного между двумя гетероциклами в молекуле красителя, что приводит к повышению интенсивности флуоресценции. Способ применения красителя тиазоловый оранжевый хорошо известен. Его можно применять, например, как указано в H.S. Rye, M.A. Quesada, K. Peck, R.A. Mathies and A.N. Glazer, High-sensitivity two-color detection of double-stranded DNA with a confocal fluorescence gel scanner using ethidium homodimer and thiazole orange, *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 327-33; и L.G. Lee, C.H. Chen и L.A. Chiu, Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis, *Cytometry*, 1986, 7, 508-17.

Более конкретно, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению можно получать, например, любым из способов синтеза, описанных в приведенных ниже примерах, способов, эквивалентных этим способам, а также способов, основанных на описанных в примерах.

Вещество, несущее метку, синтезированное с применением производного нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, представляет собой вещество, полученное с применением самого соединения по настоящему изобретению, его таутомера или стереоизомера, или их солей. Конкретные примеры веществ, несущих метку, включают ДНК, РНК и искусственные нуклеиновые кислоты, например, PNA (пептидную нуклеиновую кислоту) и LNA ("запертую" нуклеиновую кислоту). Более конкретные примеры вещества, несущего метку, включают мононуклеотиды, несущие метку, олигонуклеотиды, несущие метку, нуклеиновые кислоты, несущие метку и производные нуклеиновых кислот, несущие метку.

Если вещество, несущее метку, по настоящему изобретению является нуклеиновой кислотой, его можно соответственно применять для обнаружения или подтверждения амплификации нуклеиновой кислоты в форме зонда или праймера, представляющего собой нуклеиновую кислоту.

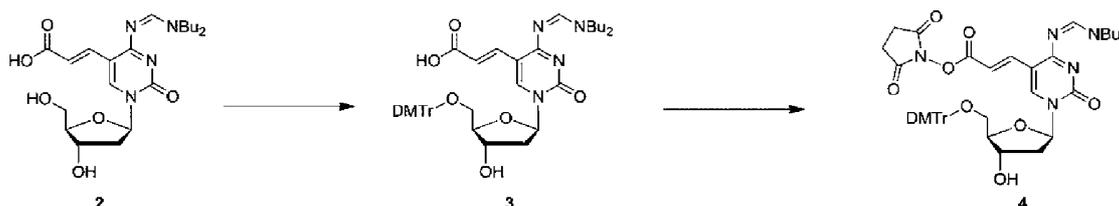
Примеры

Ниже по тексту описаны примеры по настоящему изобретению. В этих примерах показаны: производное нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; пример синтеза соединения, несущего метку, с применением производного нуклеиновой кислоты; а также пример применения соединения, несущего метку, по настоящему изобретению в качестве экситонного олигомера. Однако следует отметить, что настоящее изобретение никоим образом не ограничено следующими примерами.

Пример 1.

Согласно приведенной схеме 2 производное нуклеиновой кислоты 4 (соединение по настоящему изобретению), представленное следующей химической формулой 4, синтезировали из производного нуклеиновой кислоты 2 (приведенной ниже химической формулы 2).

Схема 2



Производное нуклеиновой кислоты 2 (формула 2), которое используется в качестве исходного вещества, было описано ранее (является известным соединением) (наименование документа: Tetrahedron Letters 2009, 50, 7191). Поэтому производное нуклеиновой кислоты 2 синтезировали по методике этого документа. В качестве аппарата для синтеза ДНК использовали ДНК-синтезатор H-8 DNA synthesizer (NIHON TECHNO SERVICE CO., LTD). ВЭЖХ проводили с использованием прибора серии LC-20 (Shimadzu Corporation). Масс-спектрометрию MALDI-TOF-MASS проводили с использованием прибора Microflex (Bruker Daltonics).

Синтез производного нуклеиновой кислоты 3 (формула 3).

Производное нуклеиновой кислоты 2 (1,31 г, 3,0 ммоль) добавляли в 300 мл сосуд Шленка. После вытеснения воздуха азотом в сосуд помещали 100 мл высушенного пиридина и 3,0 г молекулярного сита 3Å и полученную смесь перемешивали в течение 2,5 ч на ледяной бане. В сосуд добавляли 4,4'-диметокситритилхлорид (1,52 г, 4,50 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (0,062 г, 0,51 ммоль) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 ч. После удаления растворителя в вакууме смесь подвергали очистке колоночной хроматографией на силикагеле (элюент метанол:метиленхлорид=1:10). Растворитель удаляли выпариванием при пониженном давлении, получая желаемое производное нуклеиновой кислоты 3 (формула 3) в форме твердого вещества белого цвета (1,30 г, выход: 59%). Ниже приведены данные физико-химических исследований для производного нуклеиновой кислоты 3 (формула 3).

Производное нуклеиновой кислоты 3 (формула 3):

¹H ЯМР (270 МГц, CD₃OD-d₄): δ 8,69 (с, 1H), 8,17 (с, 1H), 7,46-7,11 (м, 10H), 6,80-6,75 (м, 4H), 6,52 (д, J=13,5 Гц, 1H), 6,13 (т, J=8,1 Гц, 1H), 4,32 (м, 1H), 4,11 (м, 1H), 3,70 (с, 6H), 3,58 (т, J=8,1 Гц, 2H), 3,44 (т, J=8,1 Гц, 2H), 3,27 (т, J=5,4 Гц, 2H), 2,56-2,42 (м, 1H), 2,32-2,18 (м, 1H), 1,72-1,58 (м, 4H), 1,42-1,23 (м, 4H), 0,97-0,89 (м, 6H).

Синтез производного нуклеиновой кислоты 4 (формула 4).

Производное нуклеиновой кислоты 3 (1,10 г, 3,0 ммоль) помещали в 300-мл сосуд Шленка. После вытеснения воздуха азотом в сосуд помещали 200 мл высушенного ацетонитрила и 4,0 г молекулярного сита 3Å и полученную смесь перемешивали в течение 2 ч на ледяной бане. В сосуд добавляли N-гидроксисукцинимид (0,240 г, 2,09 ммоль) и гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (0,432 г, 2,20 ммоль) и полученную смесь перемешивали в течение 22 ч. Реакционный раствор фильтровали и затем концентрировали в вакууме. К остатку добавляли 100 мл метиленхлорида и 50 мл насыщенного раствора соли. 300 мл полученного раствора добавляли в делительную воронку и промывали органический слой. После промывки органического слоя 5 порциями насыщенного раствора соли по 50 мл отделяли органический слой. К органическому слою добавляли сульфат магния и оставляли стоять. Сульфат магния отделяли фильтрованием и удаляли растворитель выпариванием при пониженном давлении. Получали желаемое производное нуклеиновой кислоты 4 (формула 4) в форме твердого вещества белого цвета (1,05 г, выход 84%). Ниже приведены данные физико-химических исследований для производного нуклеиновой кислоты 4 (формула 4).

Производное нуклеиновой кислоты 4 (формула 4):

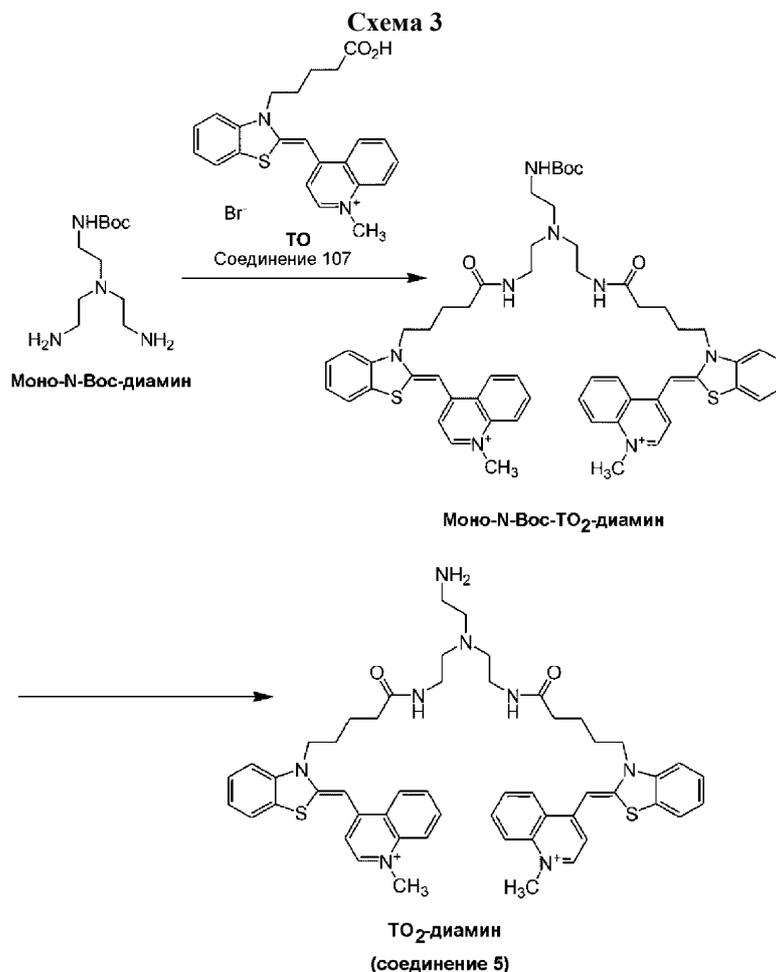
¹H ЯМР (270 МГц, CD₃OD-d₄): δ 8,66 (с, 1H), 8,19 (с, 1H), 7,38 (д, J=13,5 Гц, 1H), 7,28-7,04 (м, 9H), 6,89 (д, J=13,5 Гц, 1H), 6,71-6,67 (м, 4H), 6,05 (т, J=8,1 Гц, 1H), 4,32 (м, 1H), 4,11 (м, 1H), 3,70 (с, 6H), 3,52

(т, J=8,1 Гц, 2H), 3,28 (т, J=8,1 Гц, 2H), 3,18 (т, J=5,4 Гц, 2H), 2,70 (с, 4H), 2,56-2,45 (м, 1H), 2,28-2,18 (м, 1H), 1,65-1,55 (м, 4H), 1,29-1,16 (м, 4H), 0,88-0,79 (м, 6H).

Пример 2. Синтез модифицированного ДНК олигомера.

В настоящем примере в качестве ДНК-синтезатора использовали H-8 DNA synthesizer (торговое наименование, NIHON TECHNO SERVICE CO., LTD), ВЭЖХ проводили с использованием прибора серии LC-20 (торговое наименование, Shimadzu Corporation) и масс-спектрометрию MALDI-TOF-MASS проводили с использованием прибора Microflex (торговое наименование, Bruker Daltonics).

На первой стадии в качестве исходного вещества для синтеза модифицированного ДНК олигомера по приведенной схеме 3 синтезировали TO₂-диамид (соединение, представленное химической формулой 5).



На схеме 3 моно-N-Вос-диамин и ТО, использованные в качестве исходных веществ, являются известными соединениями. Поэтому их получали на основании способов, которые были опубликованы ранее. Следует отметить, что ТО полностью аналогично соединению 107, синтезированному по приведенной выше схеме 1. На схеме 3, "Вос" представляет собой трет-бутоксикарбонильную группу.

Синтез моно-N-Вос-ТО₂-диамида.

ТО (0,763 г, 1,62 ммоль), 7,0 мл ДМФА, НОВт (0,243 г, 1,80 ммоль) и НВТУ (0,521 г, 1,62 ммоль) помещали в 50 мл колбу с обратным холодильником. После вытеснения воздуха азотом смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 25 мин. К этому раствору добавляли 3 мл раствора моно-N-Вос-диамида (0,186 г, 0,755 ммоль) в ДМФА и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 95 мин. Полученный раствор по каплям добавляли к 100 мл эфира и образовавшийся осадок отделяли центрифугированием. Выделенный осадок очищали флэш-хроматографией на обращенной фазе (RP-18) (элюент MeOH:0,1% TFA градиент от 50:50 до 60:40) и удаляли растворитель выпариванием при пониженном давлении. Получали желаемый моно-N-Вос-ТО₂-диамид в форме красно-оранжевого твердого вещества (0,584 г, выход 67%).

Ниже приведены данные физико-химических исследований для моно-N-Вос-ТО₂-диамида.

Моно-N-Вос-ТО₂-диамид:

¹H ЯМР (270 МГц, DMSO-d₆): δ 8,67 (д, J=8,1 Гц, 2H), 8,56 (д, J=8,1 Гц, 2H), 8,2-7,91 (м, 10H), 7,74-7,65 (м, 4H), 7,55 (т, J=8,1 Гц, 2H), 7,37 (т, J=8,1 Гц, 2H), 7,31 (д, J=8,1 Гц, 2H), 6,84 (с, 2H), 4,61-4,51 (м, 4H), 4,14 (с, 6H), 3,23-3,13 (м, 4H), 2,35-2,24 (м, 4H), 1,85-1,64 (м, 8H), 1,33 (с, 9H);

МС(ESI) m/z 496 (M²⁺), 446 (M²⁺-Вос).

Синтез TO_2 -диамида (соединение 5).

Моно-N-Вос- TO_2 -диамид (0,220 г, 191 мкмоль), 3,0 мл ацетонитрила и 3,0 мл трифторуксусной кислоты помещали в 30 мл колбу с обратным холодильником и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 30 мин. Растворитель удаляли выпариванием при пониженном давлении. Затем добавляли 2 мл триэтиламина и после этого удаляли выпариванием при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией на обращенной фазе (RP-18) (элюент $\text{MeOH}:0,1\% \text{TFA}$ градиент от 50:50 до 60:40) и удаляли растворитель выпариванием при пониженном давлении. Получали желаемый TO_2 -диамид (соединение 5) в форме красно-оранжевого твердого вещества (0,139 г, выход 69%).

Ниже приведены данные физико-химических исследований для TO_2 -диамида (соединения 5).

TO_2 -Диамид (соединение 5):

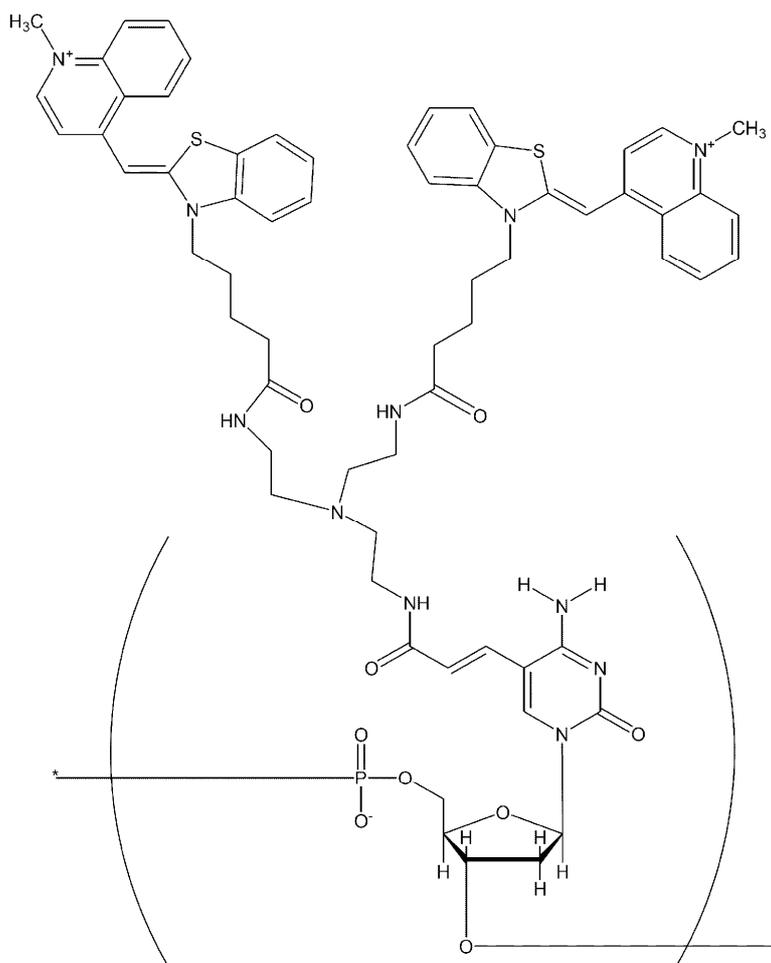
^1H ЯМР (270 МГц, DMCO-d_6): δ 8,67 (д, $J=8,1$ Гц, 2H), 8,53 (д, $J=8,1$ Гц, 2H), 8,0-7,80 (м, 10H), 7,72-7,63 (м, 4H), 7,53 (т, $J=8,1$ Гц, 2H), 7,36 (т, $J=8,1$ Гц, 2H), 7,27 (д, $J=8,1$ Гц, 2H), 6,81 (с, 2H), 4,55-4,48 (м, 4H), 4,12 (с, 6H), 3,10-2,95 (м, 4H), 2,35-2,24 (м, 4H), 2,23-2,15 (шир., 2H) 1,83-1,66 (м, 8H);

МС (ESI) m/z 446 (M^{2+}).

На следующей стадии модифицированный ДНК олигомер (нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению) синтезировали стандартным амидитным способом. Более конкретно, вначале в желаемое положение вводили NHS-карбокси-dC, как описано в примере 1 (химическая формула 4), и сразу же после этого вводили в реакцию с TO_2 -диамидом (соединением химической формулы 5) в автоматическом ДНК-синтезаторе. Реакцию между соединениями 4 и 5 в автоматическом ДНК-синтезаторе проводили в условиях, которые обычно применяются для проведения подобных реакций в автоматическом ДНК-синтезаторе (т.е. для полимеризации нуклеотидов амидитным способом). Давали пройти реакции в автоматическом ДНК-синтезаторе, в результате чего происходила полимеризация нуклеотидов с образованием олигонуклеотида. Полученный олигонуклеотид отделяли от CPG и проводили снятие защиты 28% водном растворе аммиака при 55°C в течение 4 ч. Олигонуклеотид очищали на приборе ВЭЖХ, снабженном колонкой с обращенной фазой (R-18). Структуру целевой последовательности (SEQ ID NO: 1, показанную ниже) подтверждали способом MALDI-TOF-MASS. Получали следующие результаты.

5'-GAGTGCcTTGACGATAC-3' (SEQ ID NO: 1), вычислено 6156,61, найдено 6158,3.

В показанной выше последовательности SEQ ID NO: 1 "c" (символ "c" в нижнем регистре) указывает на меченое производное цитозина, которое представлено химической формулой 1000

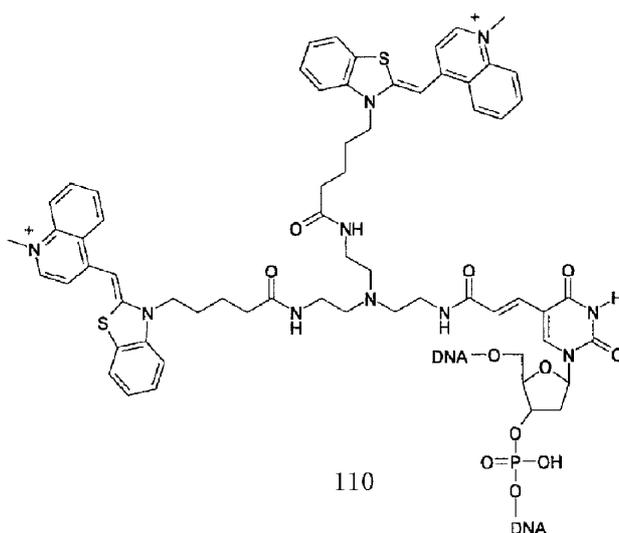


1 0 0 0

Пример 3. Эффективность модифицированного ДНК олигомера в методике изотермической амплификации нуклеиновой кислоты.

В методике SmartAmp (Nature Methods (2007), vol. 4, No. 3, p. 257, Japanese Patent No. 3897805), которая является известной методикой изотермической амплификации нуклеиновой кислоты, сравнивали эффективность ДНК олигомера, в котором флуоресцентным красителем модифицировано тиминное основание (SEQ ID NO: 2, показанная ниже), с эффективностью ДНК олигомера, в котором флуоресцентным красителем модифицировано цитидиновое основание (SEQ ID NO: 1, показанная выше) (см. фигуру). SEQ ID NO: 2 аналогична SEQ ID NO: 1, за исключением того, что флуоресцентным красителем модифицировано тиминное, а не цитидиновое основание. В SEQ ID NO: 2 буква "t" в нижнем регистре указывает на тиминное основание, модифицированное флуоресцентным красителем. Тиминное основание, модифицированное флуоресцентным красителем, представленное приведенной ниже химической формулой 110.

5'-GAGTGCCTtGACGATAC-3' (SEQ ID NO: 2)



На фигуре показаны результаты амплификации нуклеиновых кислот при применении описанной выше методики SmartAmp. Как можно видеть на фигуре, как при использовании ДНК олигомера, в котором флуоресцентным красителем модифицировано тиминное основание (SEQ ID NO: 2), так и при использовании ДНК-олигомера, в котором флуоресцентным красителем модифицировано цитидиновое основание (SEQ ID NO: 1), сигналы, указывающие на амплификацию, наблюдались примерно через 16 мин. Это показывает, что эффективность обоих олигомеров является практически эквивалентной.

Промышленная применимость

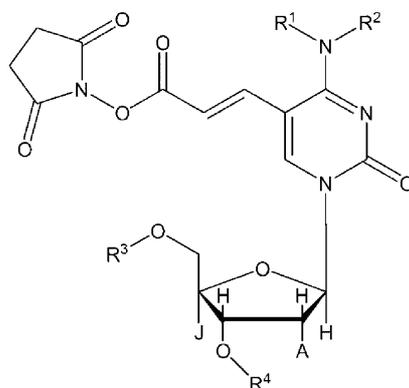
Как конкретно указано выше, соединение по настоящему изобретению является производным цитозина, а не тимина. Поэтому соединение по настоящему изобретению может применяться в качестве реагента, отличающегося от производного тимина, для синтеза нуклеиновых кислот (как, например, ДНК и РНК), что может ослабить ограничения на структуру последовательностей олигомеров модифицированных нуклеиновых кислот (как, например, ДНК и РНК). Кроме того, в настоящем изобретении разработаны нуклеиновая кислота и соединение, несущее метку, которые можно синтезировать с применением соединения по настоящему изобретению, а также способ обнаружения, в котором применяется соединение, несущее метку, по настоящему изобретению. Кроме того, применения соединений по настоящему изобретению не ограничены описанными выше, и эти соединения подходят для широкого круга приложений.

Список последовательностей

TF13033WO sequence list 2013.08.30_ST25_ST25.txt.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы 1a, таутомер, стереоизомер или соль этого соединения, таутомера или стереоизомера:



1 a

где каждый из R¹ и R² представляет собой водород, трифторацетильную группу, формильную группу, C₁₋₆алкилкарбонильную группу, C₁₋₆алкилсульфонильную группу, трет-бутоксикарбонильную группу, бензилоксикарбонильную группу, аллилкарбонильную группу, флуоренилметоксикарбонильную группу, фенилкарбонильную группу, нафтилкарбонильную группу, фенилсульфонильную группу, нафтилсульфонильную группу, C₁₋₆алкилоксикарбонильную группу, C₇₋₁₀аралкилкарбонильную группу, ме-

тильную группу, бензильную группу, дифенилметильную группу, тритильную группу и могут быть идентичными или отличаться друг от друга или R^1 и R^2 совместно могут образовывать защитную группу аминогруппы, представленную $=C-NR^{100}_2$, где каждый R^{100} является линейной или разветвленной C_{1-20} алкильной группой;

R^3 означает диметокситритильную группу, монометокситритильную группу или пикрильную группу;

R^4 означает атом водорода или фосфорамидитную группу;

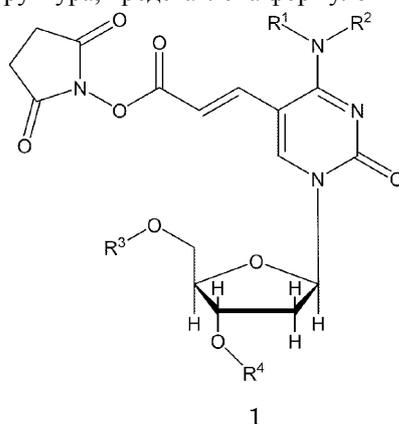
J означает атом водорода, C_{1-20} алкильную группу, C_{1-20} алкоксигруппу, аминогруппу, сульфидную группу или силильную группу;

A означает атом водорода, гидроксигруппу, C_{1-20} алкильную группу, ар C_{1-20} алкильную группу, C_{1-20} алкоксигруппу, галоген, трифторметильную группу, фтор- C_{1-20} алкильную группу, силиленовую группу или сульфидную группу или

в качестве альтернативы J и A совместно могут образовывать линкер, и каждый из J и A представляет собой CH_2 , NH, O или S, и могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга.

2. Соединение по п.1, где в A алкильная группа представляет собой метильную группу, этильную группу, пропильную группу, бутильную группу, пентильную группу или гексильную группу, аралкильная группа представляет собой бензильную группу, алкоксигруппа является метоксигруппой, таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

3. Соединение по п.1, где структура, представлена формулой 1

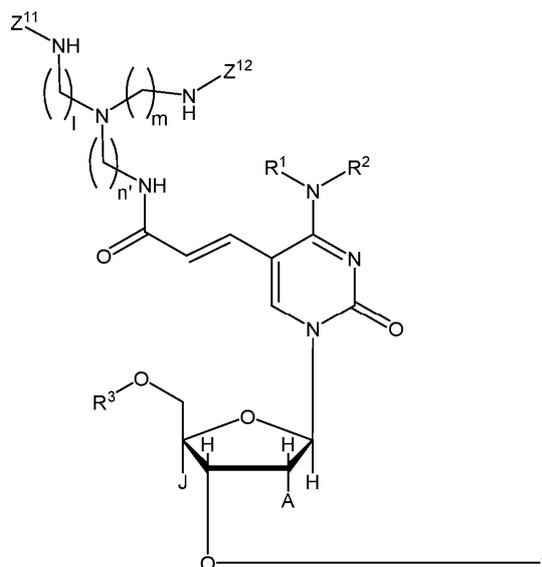


1

где R^1 , R^2 , R^3 и R^4 соответствуют определениям, данным для формулы 1a,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

4. Нуклеиновая кислота, включающая по меньшей мере один структурный фрагмент, представленный формулой (Ia-2)



(Ia-2),

где R^1 , R^2 , R^3 , J и A соответствуют определениям, данным для формулы 1a в любом из пп.1-3;

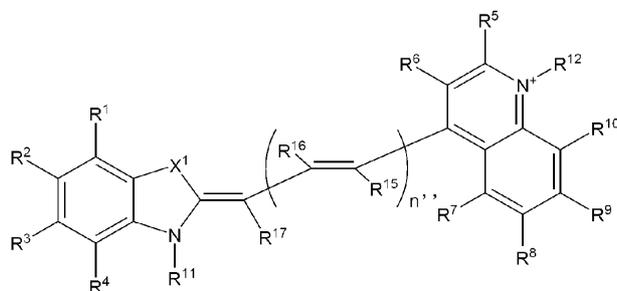
l, m, n', каждый, означают целое число от 2 до 100 и l, m и n' могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга;

Z^{11} и Z^{12} , каждый, представляют собой фрагмент флуоресцентного красителя, который демонстрирует экситонный эффект; и

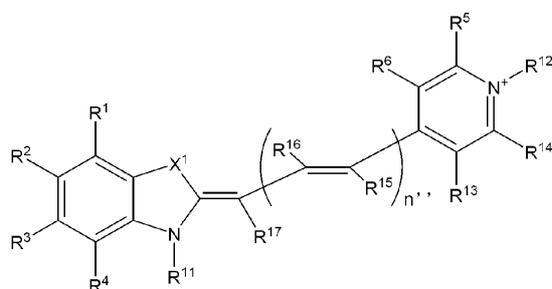
символ "*" показывает положение, по которому изображенный структурный фрагмент связан с другим атомом или группой атомов в нуклеиновой кислоте,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

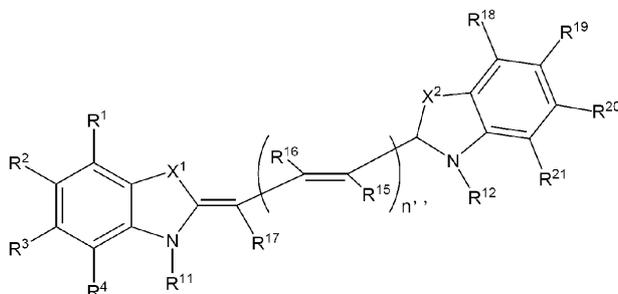
5. Соединение по п.4, где в формуле (Ia-2) Z^{11} и Z^{12} представляет собой одну из следующих формул (7)-(9):



(7)



(8)



(9)

где X^1 и X^2 представляют собой атомы S, O или Se;

n означает 0 или целое положительное число 1;

каждый из R^1 - R^{10} и R^{13} - R^{21} независимо представляет собой атом водорода, атом галогена, C_{1-6} алкильную группу, C_{1-6} алкоксигруппу, нитрогруппу или аминогруппу;

один из R^{11} и R^{12} представляет собой связующую группу, которая связана с NH в формулах (Ia-2), и другой является атомом водорода или C_{1-6} алкильной группой, где связующая группа представляет собой полиметилкарбонильную группу с числом атомов углерода от 2 до 100, и она связана с NH в формулах (Ia-2) через карбонильную группу, если в формулах (7), (8) или (9) присутствует несколько R^{15} , они могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга, если в формулах (7), (8) или (9) присутствует несколько R^{16} , они могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга; и

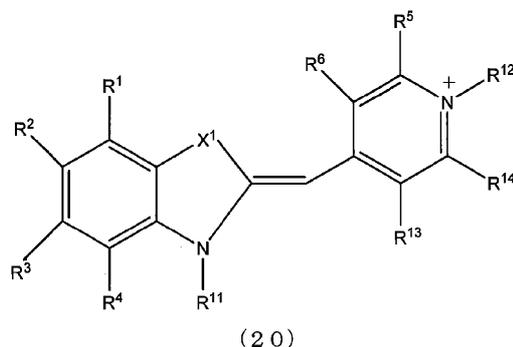
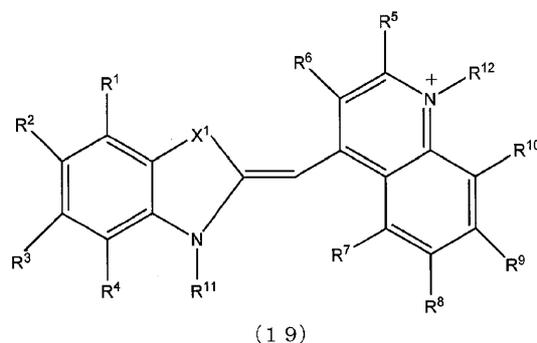
X^1 , X^2 и R^1 - R^{21} в Z^{11} и X^1 , X^2 и R^1 - R^{21} в Z^{12} могут являться одинаковыми или отличаться друг от друга соответственно,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

6. Соединение по п.5, где в R^1 - R^{21} в формулах (7)-(9), C_{1-6} алкильная группа является линейной или разветвленной алкильной группой и C_{1-6} алкоксигруппа является линейной или разветвленной алкок-

сигруппой, таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

7. Соединение по п.5 или 6, где в формуле (Ia-2) каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является группой атомов, представленной формулами (7) или (8), и представляют собой группы, представленные формулой (19) или (20):



где X^1 , R^1 - R^{10} , R^{13} и R^{14} , R^{11} и R^{12} соответствуют определениям, данным для формул (7)-(9), таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

8. Соединение по п.7, где каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является группой, представленной приведенной выше формулой (19), где

X^1 означает S;

R^1 - R^{10} являются атомами водорода и

один из R^{11} и R^{12} является связующей группой, которая связана с NH в формуле (Ia-2), а другой представляет собой метильную группу,

где связующая группа представляет собой полиметилкарбонильную группу с числом атомов углерода от 2 до 100 и она связана с NH в формуле (Ia-2) через карбонильную группу,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

9. Соединение по п.7, где в формуле (Ia-2) каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является группой, представленной приведенной выше формулой (19), где X^1

означает S; R^1 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^9 и R^{10} являются атомами водорода;

R^2 , R^3 и R^{12} являются метильными группами;

R^8 является атомом галогена;

R^{11} является связующей группой, которая связана с NH в формуле (Ia-2),

где связующая группа представляет собой полиметилкарбонильную группу с числом атомов углерода от 2 до 100 и она связана с NH в формуле (Ia-2) через карбонильную группу,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

10. Соединение по п.5, где в формуле (Ia-2), каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является группой, представленной приведенной выше формулой (7), где

X^1 означает S,

n означает 1;

R^1 - R^{10} , R^{15} , R^{16} и R^{17} являются атомами водорода;

R^{11} является связующей группой, которая связана с NH в формуле (Ia-2); и

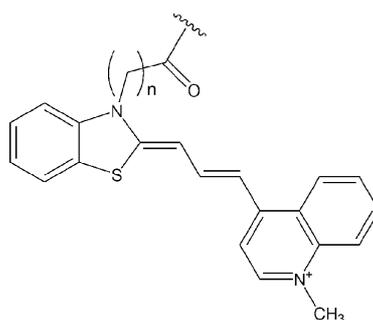
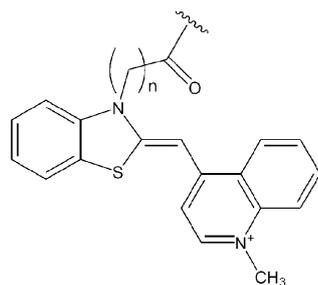
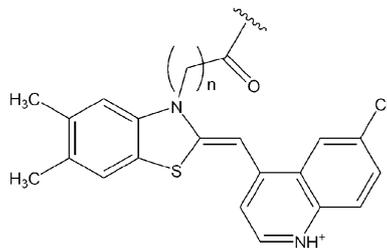
R^{12} является метильной группой,

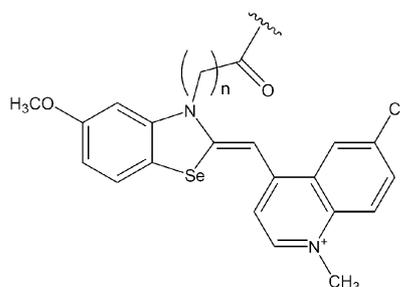
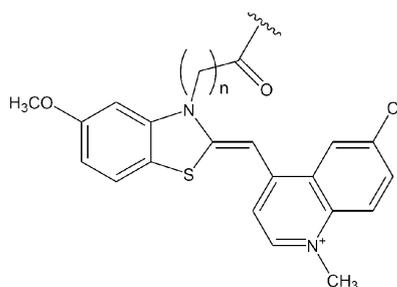
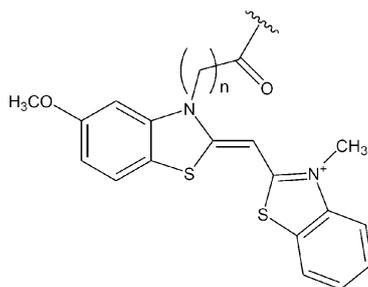
где связующая группа представляет собой полиметилкарбонильную группу с числом атомов углерода от 2 до 100 и она связана с NH в формуле (Ia-2) через карбонильную группу,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или

стереоизомера.

11. Соединение по п.4, где в формуле (Ia-2) каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой группу атомов, представленную любой из приведенных ниже формул:





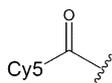
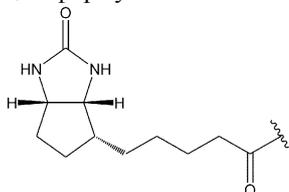
где волнистая линия показывает положение, по которому изображенная группа атомов связана с NH; и

n является от 2 до 100,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

12. Соединение по п.11, где длина линкера n находится в диапазоне от 2 до 6, таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

13. Соединение по п.4, где в формуле (Ia-2) каждый из Z^{11} и Z^{12} независимо является группой атомов, представленной любой из следующих формул:

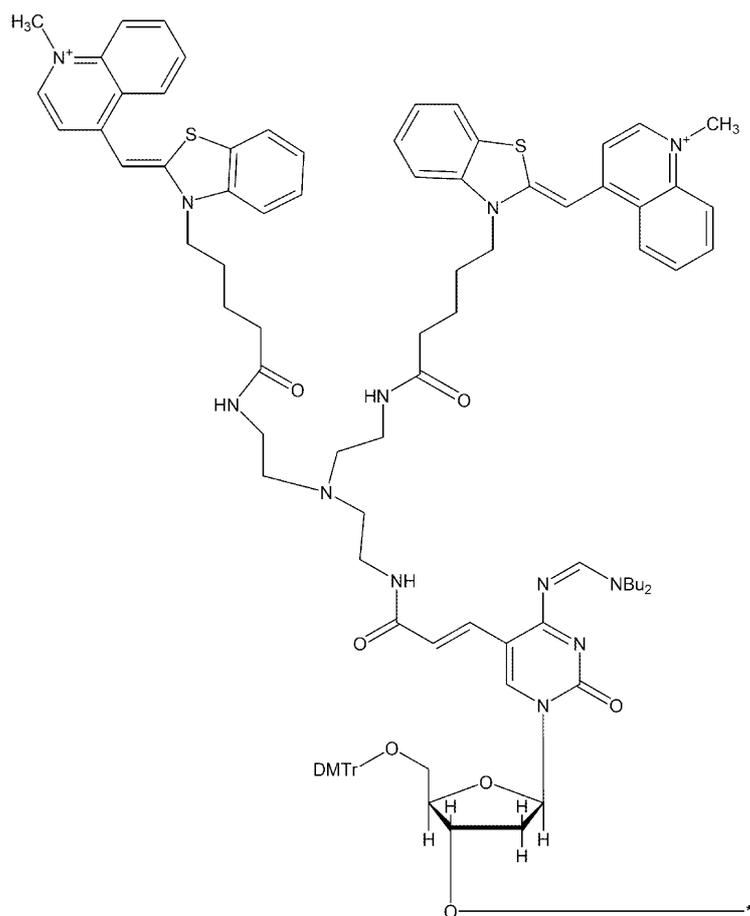


где волнистая линия показывает положение, по которому изображенная группа атомов связана с NH; и

Cy5 означает остаток цианинового красителя Cy5,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

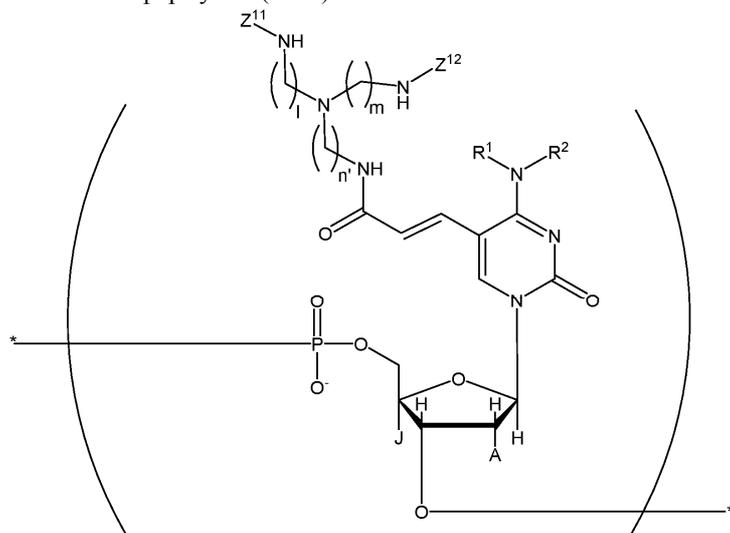
14. Нуклеиновая кислота по п.4, представленная химической формулой 1001



1 0 0 1

где символ "*" имеет то же значение, что и в формуле (Ia-2);
 "Bu" означает n-бутиловую группу;
 "DMT" означает 4,4-диметокситрифенилметильную группу,
 таутомер или стереоизомер указанного соединения или соль указанного соединения, таутомера или стереоизомера.

15. Нуклеиновая кислота, включающая по меньшей мере один структурный фрагмент, представленный следующей химической формулой (IIa-1):



(IIa-1),

где R^1 , R^2 , J, A, l, m, n' , Z^{11} и Z^{12} соответствуют определениям, приведенным для формулы (Ia-2) в любом из пп.4-12;

символ "*" означает положение, по которому указанный структурный фрагмент присоединен к другим атомам или группам атомов в нуклеиновой кислоте;

по меньшей мере один атом O в связующем фрагменте фосфорной кислоты может быть заменен атомом S,

таутомер или стереоизомер указанного соединения или соли указанного соединения, его таутомера или стереоизомера.

