



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월21일
(11) 등록번호 10-2512190
(24) 등록일자 2023년03월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 491/04 (2006.01) C07D 491/052 (2006.01)
C07D 491/147 (2006.01) C07H 19/10 (2006.01)
C07H 19/14 (2006.01) C07H 21/00 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01) C12Q 1/6816 (2018.01)
C12Q 1/6869 (2018.01) C12Q 1/6876 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 491/04 (2013.01)
C07D 491/052 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7037384
- (22) 출원일자(국제) 2017년12월15일
심사청구일자 2020년11월06일
- (85) 번역문제출일자 2018년12월21일
- (65) 공개번호 10-2019-0095873
- (43) 공개일자 2019년08월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/083128
- (87) 국제공개번호 WO 2018/114710
국제공개일자 2018년06월28일
- (30) 우선권주장
62/438,006 2016년12월22일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP07043896 A*
US20040260093 A1*
US20140220588 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
일루미나 케임브리지 리미티드
영국 케임브리지 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19
그랜타 파크
- (72) 발명자
로마노프 니콜라이
영국 에섹스 씨비10 1엑스엘 니어 사프론 윌든 리
틀 체스터포드 체스터포드 리서치 파크
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 16 항

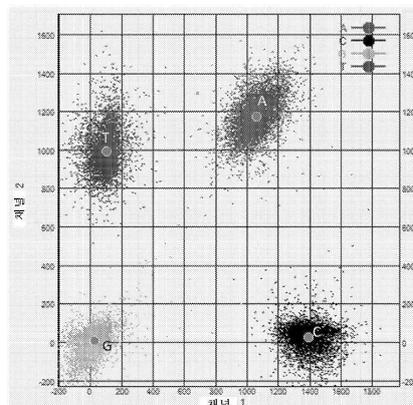
심사관 : 최정예

(54) 발명의 명칭 쿠마린 화합물 및 형광 표지로서의 이의 용도

(57) 요약

본 출원은 새로운 쿠마린 화합물 및 형광 표지로서의 이들의 용도에 관한 것이다. 상기 화합물은 핵산 서열분석 용도에서 뉴클레오타이드에 대한 형광 표지로서 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07D 491/147 (2013.01)

C07H 19/10 (2013.01)

C07H 19/14 (2013.01)

C07H 21/00 (2013.01)

C09K 11/06 (2022.01)

C12Q 1/6816 (2018.05)

C12Q 1/6869 (2018.05)

C12Q 1/6876 (2018.05)

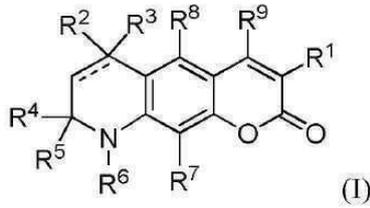
C12Q 2563/107 (2013.01)

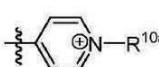
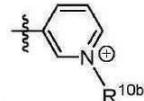
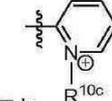
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 염:



식 중, R¹은 ,  또는  이고;

R² 및 R³은 독립적으로 H 및 C₁₋₆알킬로부터 선택되고, R² 및 R³ 중 적어도 하나는 C₁₋₆알킬이고;

R⁴ 및 R⁵은 독립적으로 H 및 C₁₋₆알킬로부터 선택되고, R⁴ 및 R⁵ 중 적어도 하나는 C₁₋₆알킬이고;

R⁶은 카복실로 치환된 C₁₋₆알킬이고;

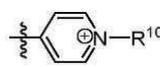
R⁹은 H이며;

각각의 R^{10a}, R^{10b} 및 R^{10c}는 독립적으로 설포네이트기로 치환된 C₁₋₆알킬이고;

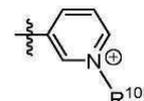
R⁷ 및 R⁸은 H이고;

실선 및 파선으로 나타낸 결합  는 단일 결합이다.

청구항 2

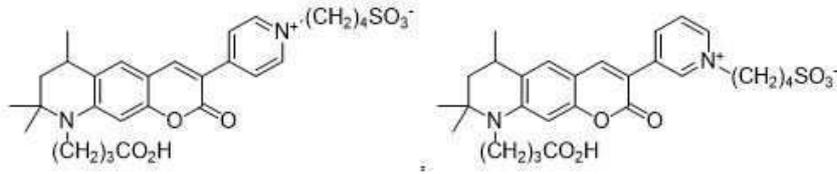
제1항에 있어서, R¹은  인, 화합물, 또는 이의 염.

청구항 3

제1항에 있어서, R¹은  인, 화합물, 또는 이의 염.

청구항 4

제1항에 있어서,



로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물, 또는 이의 염.

청구항 5

제1항에 따른 화합물 또는 이의 염으로 표지된 뉴클레오타이드.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 R⁶을 통해 뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되는, 뉴클레오타이드.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 R^{10a}, R^{10b} 또는 R^{10c}를 통해 뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되고, R^{10a}, R^{10b} 또는 R^{10c}는 설포네이트기로 치환된 C₁₋₆알킬인, 뉴클레오타이드.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 링커 모이어티를 통해 뉴클레오타이드의 피리미딘 염기의 C5 위치에 또는 7-데아자 퓨린 염기의 C7 위치에 부착되는, 뉴클레오타이드.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드의 리보스 또는 데옥시리보스 당에 공유적으로 부착된 3'-OH 차단기를 더 포함하는, 뉴클레오타이드.

청구항 10

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드인, 뉴클레오타이드.

청구항 11

하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 키트로서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 제5항에 따른 뉴클레오타이드인, 키트.

청구항 12

제11항에 있어서, 2 이상의 표지된 뉴클레오타이드를 포함하는, 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 표지된 뉴클레오타이드 중 둘은 단일 레이저를 이용하여 여기되는, 키트.

청구항 14

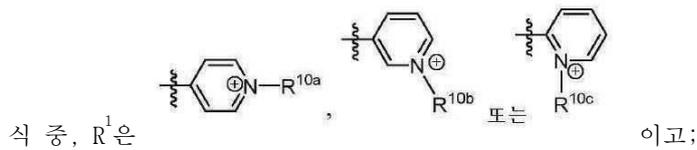
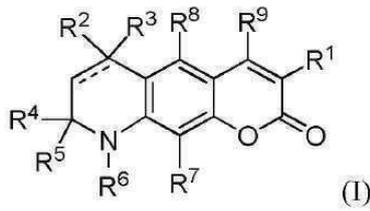
서열분석 어세이에서 제5항에 따른 뉴클레오타이드를 혼입시키는 단계를 포함하는, 서열분석 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드를 검출하는 단계를 더 포함하는, 서열분석 방법.

청구항 16

하기 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 염:



R²는 H, R³는 C₁₋₆알킬이고;

R⁴ 및 R⁵는 독립적으로 C₁₋₆알킬이고;

R⁹는 H이고;

각각의 R^{10a}, R^{10b} 및 R^{10c}는 독립적으로 설포네이트기로 치환된 C₁₋₆알킬이고;

R⁶은 카복실로 치환된 C₁₋₆알킬이고;

R⁷ 및 R⁸은 H이고;

실선 및 파선으로 나타낸 결합 는 단일 결합이다.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 쿠마린 화합물에 관한 것이다. 상기 화합물은, 특히 핵산 서열분석 용도에서 뉴클레오타이드 표지를 위한 형광 표지로서 사용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 형광 표지를 이용하는 핵산의 비방사성 검출은 분자 생물학에서 중요한 기술이다. 이전에 재조합 DNA 기법에서 사용된 다수의 절차는, 예를 들어 ^{32}P 로 방사성 표지된 뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 사용에 의존하였다. 방사성 화합물은 핵산 및 관심 대상의 다른 분자의 민감한 검출을 허용한다. 그러나, 방사성 동위원소의 사용에서, 그들의 비용, 제한된 보관수명 및 더 중요하게는 안전성 고려와 같은 심각한 제한이 있다. 방사성 표지에 대한 필요 제한은 안전성을 향상시키는 한편, 예를 들어, 시약 처분과 관련된 환경적 영향 및 비용을 감소시킨다. 비방사성 형광 검출로 처리할 수 있는 방법은 비제한적 예로서, 자동화된 DNA 서열분석, 혼성화

방법, 중합효소 연쇄 반응 산물의 실시간 검출 및 면역분석을 포함한다.

[0003] 다수의 적용을 위해, 복수의 공간적으로 중복되는 분석물의 독립적 검출을 달성하기 위해 다중 스펙트럼으로 구별 가능한 형광 표지를 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 다중복합 방법에서, 반응 용기의 수는 실험 프로토콜을 단순화시키기 위해 그리고 적용분야-특이적 시약 키트의 생산을 용이하게 하기 위해 감소될 수 있다. 다색 자동화 DNA 서열분석 시스템에서, 예를 들어, 다중 형광 검출은 단일 전기영동 레인에서 몇몇 상이한 뉴클레오타이드 염기의 분석을 허용한다. 이는 단색을 이용하는 검출 시스템 이상으로 처리량을 증가시키며, 또한 레인 내 전기영동 이동도 변화와 관련된 불확실성을 감소시킬 수 있다.

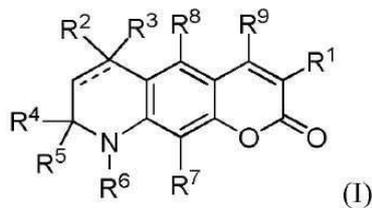
[0004] 그러나, 다중 형광 검출은 문제가 될 수 있으며, 형광 표지의 선택을 제한하는 다수의 중요한 인자가 있다. 첫째로, 흡수 및 방출 스펙트럼이 적합하게 스펙트럼으로 분해되는 염료 화합물을 발견하는 것이 어렵다. 추가로, 몇몇 형광 염료가 함께 사용될 때, 상이한 스펙트럼 영역에 대한 염료의 흡수 밴드가 크게 분리될 수 있기 때문에 동시 여기는 어려울 수 있다. 다수의 여기 방법은 고휒력 레이저를 사용하며, 따라서, 염료는 이러한 레이저 여기를 견뎌내는 충분한 광안정성을 가져야 한다. 분자 생물학 방법에서 특정 중요성의 최종 고려사항은 형광 염료가 시약 화학물질에 적합하여야 한다는 것이다. 따라서, 예를 들어 DNA 합성 또는 서열분석 반응에서 사용되는 형광 염료는 해당 반응에서 사용되는 용매 및 시약, 완충제, 중합효소 및 리가제 효소에 적합하여야 한다. 일 예에서, 국제 특허 출원 공개 WO 2007/135368은 형광 표지로서 사용되는 로다민 화합물의 부류를 기재한다.

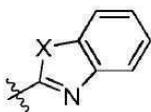
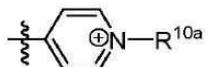
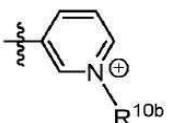
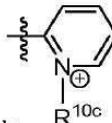
[0005] 쿠마린 염료 패밀리는 그들의 현저한 스펙트럼 특성에 기인하여 화학자의 주의를 끌었다. 그럼에도 불구하고, 상업적으로 이용 가능한 거대 스토크스 이동(large Stokes shift: LSS)을 갖는 단지 소수의 광-안정성 형광 염료가 있다. 대부분의 이들 염료는 또한 스캐폴드로서 쿠마린 단편을 함유한다. 예를 들어, 다이오믹스(Dyomics)로부터의 대부분의 염료는 약 480 내지 520nm에서 흡수되고, 560 내지 630의 영역에서 방출되는 쿠마린 유도체이다. 이 부류의 쿠마린 염료의 다른 예는 미국 특허 공개 제2014/0220588호에 개시된 바와 같은 인산화된 쿠마린계 염료 및 아베리아사(Abberior)로부터의 상업적으로 입수 가능한 염료 Star440SXP 및 Star 470SXP를 포함한다. 다른 실제로 유용한 쿠마린 염료는 각각 434nm 및 539nm에서 흡수 및 방출 최대값을 갖는 알렉사 플루오르(AlexaFluor)(상표명) 430이다. 다른 LSS 형광 염료는 퍼시픽 오렌지(Pacific Orange)(상표명)(흡수 390nm, 방출 540nm; 스토크스 이동 150nm, 인비트로젠(Invitrogen)) 및 BD 호리즌(Horizon)(상표명) V500(흡수 415nm, 방출 500nm; 스토크스 이동 85nm, BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences)) 크로메오(Chromo)(상표명) 494(흡수 494nm, 방출 628nm, 스토크스 이동 134nm, 활동력)를 포함한다.

발명의 내용

[0006] 본 명세서에서 생체분자 표지로서, 특히 핵산 서열분석에서 사용되는 뉴클레오타이드에 대한 표지로서 신규한 쿠마린 유도체 및 그들의 용도가 기재된다. 이러한 염료가 생체분자 접합체의 제조를 위해 사용될 때, 이들 새로운 형광 화합물의 사용에 기인하여 얻을 수 있는 서열분석 판독의 길이, 강도 및 품질에서의 개선을 볼 수 있다.

[0007] 본 명세서에 기재된 일부 실시형태는 쿠마린 화학식 (I)의 화합물, 이의 염 또는 메소메리 형태(mesomeric form)에 관한 것이다:



[0008] 식 중, R¹은 , , , 또는  이되, R¹은 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜

산염, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 사이클로알킬, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환체로 선택적으로 치환되고;

[0010] 각각의 R², R³, R⁴, R⁵ 및 R⁹는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0011] 각각의 R⁶, R^{10a}, R^{10b} 및 R^{10c}는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설펜일 하이드록사이드, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0012] 각각의 R⁷ 및 R⁸은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

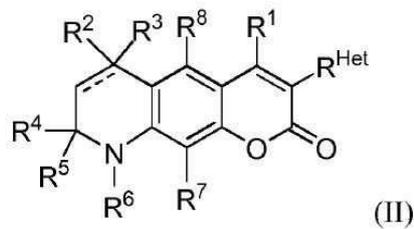
[0013] 대안적으로, R⁶과 R⁷은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 또는 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하고;

[0014] X는 O, S, NR¹¹ 및 Se로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0015] R¹¹은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 카복시알킬, 설펜네이토알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설펜, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되고; 그리고

[0016] 실선 및 파선으로 나타내는 결합  은 단일 결합 및 이중 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 단,  이 이중 결합일 때, R³은 없다.

[0017] 본 명세서에 기재된 일부 실시형태는 적어도 약 60nm의 스토크스 이동을 갖는 화학식 (II)의 형광 화합물, 이의 염 또는 메소메리 형태에 관한 것이다:



[0018]

[0019] 식 중, R^{Het}는 하나 이상의 R¹⁰으로 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

[0020] 각각의 R¹, R², R³, R⁴ 및 R⁵는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0021] R⁶은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설펜일 하이드록사이드, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

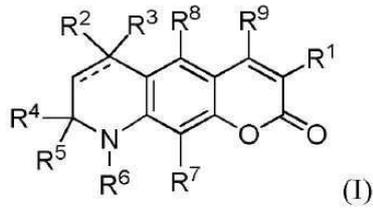
- [0022] 각각의 R⁷ 및 R⁸은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0023] 대안적으로, R⁶과 R⁷은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 또는 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택된 고리 또는 고리계를 형성하고;
- [0024] 각각의 R¹⁰은 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설펜일 하이드록사이드, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;
- [0025] 실선 및 파선으로 나타내는 결합 ----- 은 단일 결합 및 이중 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 단, ----- 이 이중 결합일 때, R³은 없다.
- [0026] 본 명세서에 기재된 일부 실시형태는 화학식 (I) 또는 화학식 (II)의 화합물로 표시된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다.
- [0027] 본 명세서에 기재된 일부 실시형태는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 함유하는 키트에 관한 것이며, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 표시된 뉴클레오타이드이다.
- [0028] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 서열분석에서 본 명세서에 기재된 표시된 뉴클레오타이드를 혼입시키고, 상기 표시된 뉴클레오타이드를 검출하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0029] **도 1**은 서열분석을 위해 본 명세서에 기재된 바와 같은 새로운 쿠마린 염료 **I 내지 16**으로 표시된 A-뉴클레오타이드의 유용성을 도시한 도면.
도 2는 서열분석에 대해 긴 스토크스 이동을 갖는 상업적 형광 염료 DY510XL로 표시한 A-뉴클레오타이드의 유용성을 도시한 도면.
도 3은 서열분석에 대해 긴 스토크스 이동을 갖는 상업적형광 염료 크로메오494(Chromeo494)로 표시한 A-뉴클레오타이드의 유용성을 도시한 도면.

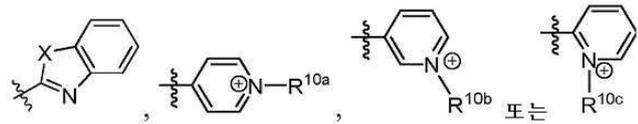
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 명세서에 기재된 실시형태는 형광 표시로서 사용하기 위한 화학식 (I)의 구조의 새로운 쿠마린 염료 및 이들의 유도체에 관한 것이다. 추가적인 실시형태는 적어도 약 60nm의 스토크스 이동을 갖는 화학식 (II) 구조의 형광 화합물에 관한 것이다.
- [0031] 이들 새로운 형광 염료는 핵산 서열분석 용도에서 뉴클레오타이드 표지를 위한 형광 표시로서 사용될 수 있다. 이들 형광 염료의 제조 방법 및 이들 염료를 이용하는 하류의 서열분석 적용이 또한 예시된다.
- [0032] 놀랍게도, 새로운 염료 및 그들의 생체 접합체의 형광 강도는 청색 또는 녹색광원 중 하나로 조사될 때와 거의 동일하다는 것을 발견하였다. 예를 들어, 염료가 460nm(청색) 및 540nm(녹색) 레이저 또는 LED에 의해 여기될 때, 형광 강도는 일부 경우에 거의 동일하다. 이하에 기재하는 바와 같이, 이 특성은 용액 중에서 그리고 유도 세포 상에서 그렇게 유지되어, 고품질을 갖는 단순화된 서열분석을 가능하게 한다.
- [0033] 화학식 (I)의 화합물
- [0034] 본 명세서에 기재된 일부 실시형태는 화학식 (I)의 새로운 쿠마린 유도체, 또는 이의 염, 메소메리 형태에 관한 것이다:



[0035]

[0036]

식 중, R¹은  이고, R¹은 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 사이클로알킬, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환체로 선택적으로 치환되며;

[0037]

각각의 R², R³, R⁴, R⁵ 및 R⁹는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0038]

각각의 R⁶, R^{10a}, R^{10b} 및 R^{10c}는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설펜일 하이드록사이드, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0039]

각각의 R⁷ 및 R⁸은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0040]

대안적으로, R⁶과 R⁷은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 또는 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하며;

[0041]

X는 O, S, NR¹¹ 및 Se로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0042]

R¹¹은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 카복시알킬, 설펜네이토알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설펜, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되며; 그리고

[0043]

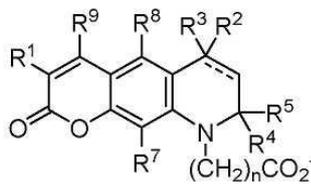
실선 및 파선으로 나타내는 결합  는 단일 결합 및 이중 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 단,  이 이중 결합일 때, R³은 없다.

[0044]

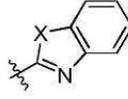
화학식 (I)의 화합물의 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 알킬 또는 치환된 알킬은 C₁₋₁₂ 알킬, 또는 더 바람직하게는 C₁₋₆ 알킬이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 알콕시는 C₁₋₁₂ 알콕시, 또는 더 바람직하게는 C₁₋₆ 알콕시이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 알켄일 및 알킨일기는 C₂₋₆ 알켄일 및 C₂₋₆ 알킨일이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 할로알킬, 할로알콕시, 아미노알킬, 하이드록시알킬, 헤테로알킬기는 C₁₋₁₂ 할로알킬, C₁₋₁₂ 할로알콕시, C₁₋₁₂ 아미노알킬, C₁₋₁₂ 하이드록시알킬 및 C₁₋₁₂ 헤테로알킬; 더 바람직하게는 C₁₋₆

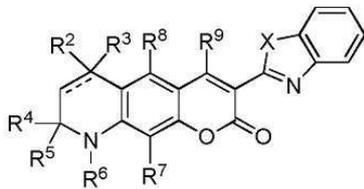
할로알킬, C₁₋₆ 할로알콕시, C₁₋₆ 아미노알킬, C₁₋₆ 하이드록시알킬 및 C₁₋₆ 헤테로알킬이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 알콕시알킬기는 C₁₋₆ 알콕시(C₁₋₆ 알킬)이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 선택적으로 치환되는 아릴은 선택적으로 치환되는 C₆₋₁₀ 아릴, 예를 들어, 페닐이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 선택적으로 치환되는 헤테로아릴은 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴; 더 바람직하게는, 선택적으로 치환되는 5 내지 6원 헤테로아릴이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 선택적으로 치환되는 카보사이클릴은 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 카보사이클릴, 특히 3 내지 7원 사이클로알킬이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴은 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴, 더 바람직하게는 5 내지 6원 헤테로사이클릴이다.

[0045] 화학식 (I)의 화합물의 일부 실시형태에서, 임의의 R² 내지 R⁹는 카복실(-CO₂H) 또는 카복실레이트(CO₂⁻), 설포(SO₃H) 또는 설포산염(SO₃⁻) 기로부터 선택되는 하나 이상의 치환체로 치환되는 알킬로부터 선택될 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 또한 유기 또는 무기 양이온에 의한 그의 염 형태 화학식 (I')로 나타낸다:

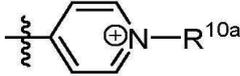


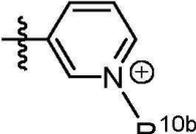
[0046] 는 정수이다. 식 중 K는 유기 또는 무기 양이온이고, n은 1 내지 20으로부터 선택되는 정수이다.

[0047] 화학식 (I) 또는 (I')의 화합물의 일부 실시형태에서, R¹은  이다. 일부 이러한 실시형태에서, X는 O이다. 일부 다른 실시형태에서, X는 O이다. 일부 이러한 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 또한 화학식 (Ia)로 나타낸다:

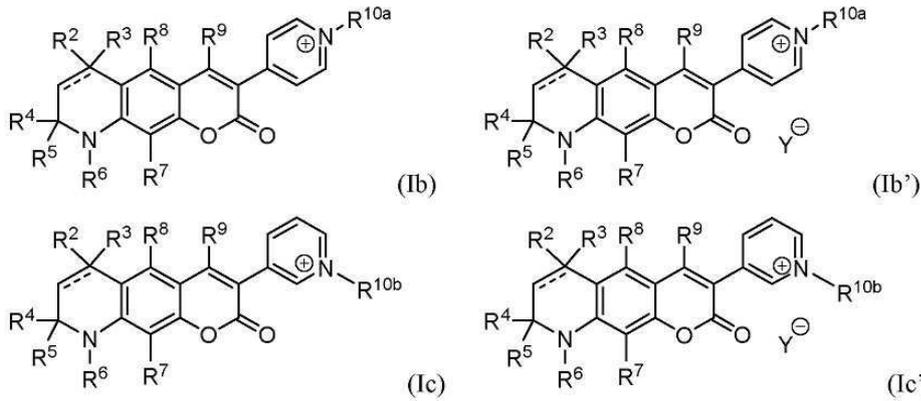


[0048] (Ia). 일부 실시형태에서, R¹은 알킬, 할로 및 C-카복시로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환체로 치환된다. 일 실시형태에서, R¹은 클로로(즉, -Cl)로 치환된다. 다른 실시형태에서, R¹은 카복실(즉, -C(O)OH)로 치환된다.

[0049] 화학식 (I)의 화합물 (I')의 일부 실시형태에서, R¹은  이다. 일부 다른 실시형태에서, R¹

은  이다. R^{10a}, R^{10b} 또는 R^{10c}가 질소 원자 상에서 양전하를 보유하는 피리딜기에 연결될 때, 전체로서 R¹이 전하 중성이도록 R^{10a}, R^{10b} 또는 R^{10c}는 음성 전하를 함유할 수 있다는 것이 이해된다. 대안적으로, R^{10a}, R^{10b} 또는 R^{10c}가 질소 원자 상에서 양전하를 보유하는 피리딜기에 연결될 때, 전체로서 화합물이 전하 중성이도록 본 명세서에 기재된 화합물은 반대이온을 함유할 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, R^{10a}, R^{10b} 또는 R^{10c}는 치환된 알킬, 예를 들어, 치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 또는 C₆ 알킬이다. 일부 이러한 실시형태에서, 알킬은 카

복식(-CO₂H), 카복실레이트(CO₂⁻), 설편(SO₃H) 또는 설편산염(SO₃⁻)으로 치환된다. 일부 이러한 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 또한 화학식 (Ib) 및 (Ic) 또는 그들의 염 화학식 (Ib') 및 (Ic')로 나타낸다:



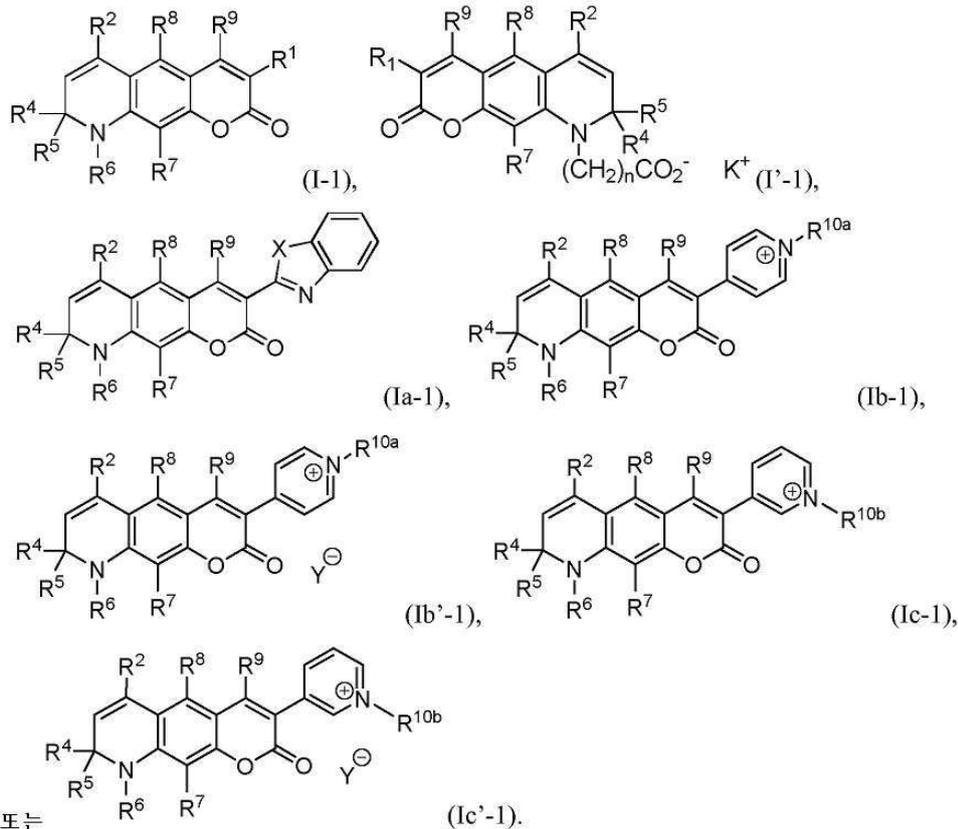
[0050]

[0051]

식 중, Y는 Ib를 갖는 전하 중성 화합물을 형성할 수 있는 음이온이다. 일부 실시형태에서, Y는 유기산 또는 무기산으로부터 유래된 음이온이다. 일부 실시형태에서, Y는 할로젠 음이온이다.

[0052]

화학식 (I), (I'), (Ia), (Ib), (Ib'), (Ic) 또는 (Ic')의 화합물의 일부 실시형태에서, 실선 및 파선으로 나타내는 결합 --- 는 이중 결합이고, 화합물은 또한 화학식 (I-1), (I'-1), (Ia-1), (Ib-1), (Ib'-1), (Ic-1) 또는 (Ic'-1)로 제시한다:



[0053]

[0054]

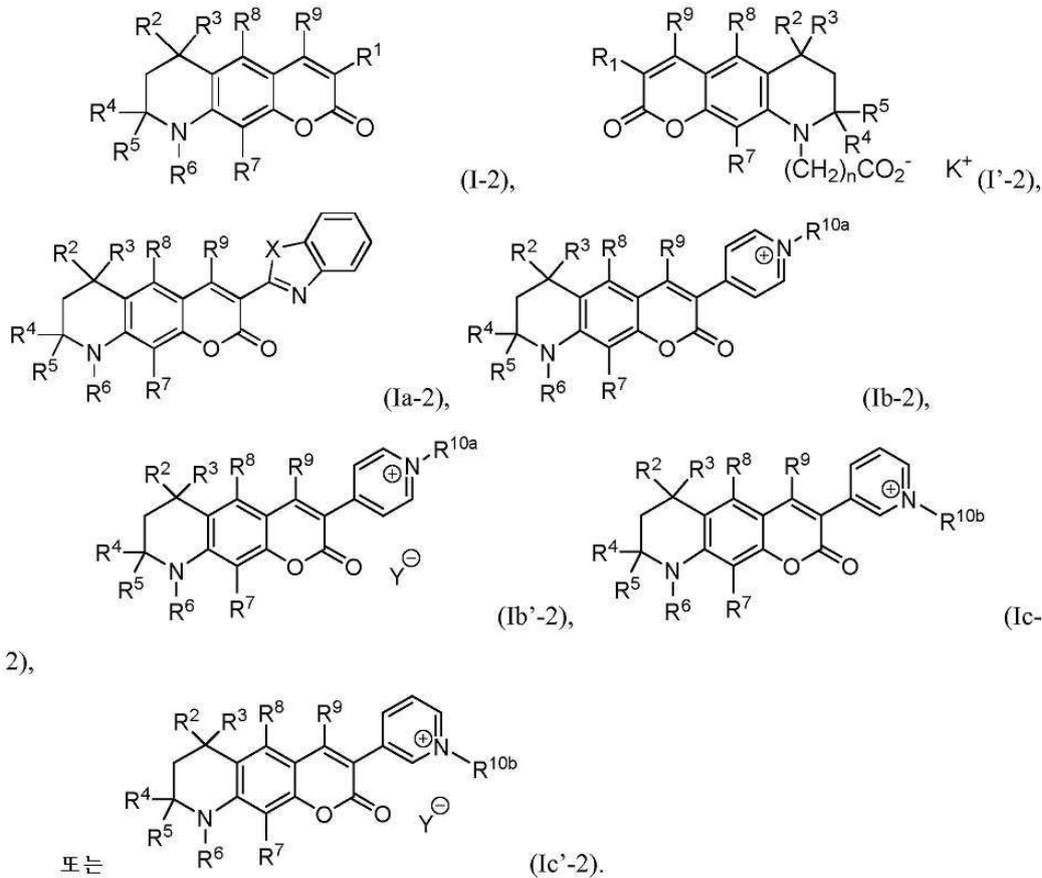
화학식 (I), (I-1), (I'-1), (Ia-1), (Ib-1), (Ib'-1), (Ic-1) 또는 (Ic'-1)의 화합물의 일부 실시형태에서, R²는 알킬이다. 일 실시형태에서, R²는 메틸이다. 일부 다른 실시형태에서, R²는 H이다.

[0055]

화학식 (I), (I-1), (I'-1), (Ia-1), (Ib-1), (Ib'-1), (Ic-1) 또는 (Ic'-1)의 화합물의 일부 실시형태에서, R⁴ 및 R⁵ 중 적어도 하나는 알킬이다. 일부 이러한 실시형태에서, 각각의 R⁴ 및 R⁵는 알킬이다. 일 실시형태에서, R⁴와 R⁵는 둘 다 메틸이다. 일부 대안의 실시형태에서, R⁴ 및 R⁵ 중 적어도 하나는 H이다. 하나의 이러한 실시형

태에서, R⁴와 R⁵는 둘 다 H이다.

[0056] 화학식 (I), (I'), (Ia), (Ib) 또는 (Ib')의 화합물의 일부 실시형태에서, 실선 및 파선으로 나타내는 결합 ----- 는 단일 결합이고, 화합물은 또한 화학식 (I-2), (I'-2), (Ia-2), (Ib-2), (Ib'-2), (Ic-2) 또는 (Ic'-2)로 제시한다:



[0057] 화학식 (I), (I-2), (I'-2), (Ia-2), (Ib-2), (Ib'-2), (Ic-2) 또는 (Ic'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R² 및 R³ 중 적어도 하나는 알킬이다. 일부 추가 실시형태에서, R²와 R³은 둘 다 알킬이다. 일 실시형태에서, R²와 R³은 둘 다 메틸이다. 일부 다른 실시형태에서, R² 및 R³ 중 적어도 하나는 H이다. 일 실시형태에서, R²와 R³은 둘 다 H이다.

[0059] 화학식 (I), (I-2), (I'-2), (Ia-2), (Ib-2), (Ib'-2), (Ic-2), 또는 (Ic'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R⁴ 및 R⁵ 중 적어도 하나는 H이다. 하나의 이러한 실시형태에서, R⁴와 R⁵는 둘 다 H이다. 일부 대안의 실시형태에서, R⁴ 및 R⁵ 중 적어도 하나는 알킬이다. 일부 이러한 실시형태에서, 각각의 R⁴ 및 R⁵는 알킬이다. 일 실시형태에서, R⁴와 R⁵는 둘 다 메틸이다.

[0060] 화학식 (I), (I'), (I-1), (I'-1), (Ia-1), (Ib-1), (Ib'-1), (Ic-1), (Ic'-1), (I-2), (I'-2), (Ia-2), (Ib-2), (Ib'-2), (Ic-2) 또는 (Ic'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R⁶은 치환된 알킬, 예를 들어, 치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 또는 C₆ 알킬이다. 일 실시형태에서, R⁶은 카복실로 치환되는 알킬이다. 일부 실시형태에서, R⁶은 -C(O)OR¹²로 치환되는 알킬이고, R¹²는 선택적으로 치환되는 알킬, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 및 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 이러한 실시형태에서, R¹²는 알킬, 예를 들어, 메틸, 에틸 또는 t-뷰틸이다. 일부 추가 실시형태에서, R⁶은 -C(O)NR¹³R¹⁴로 치환되는 알킬이고, 각각의 R¹³ 및 R¹⁴는 H, 선택적으로 치환되는 알킬, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 사이클로알킬로부터 독립적으로 선

택된다. 일부 추가 실시형태에서, R¹³ 및 R¹⁴는 카복실, 카복실레이트, -C(O)OR¹¹, 설포 및 설포산염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환체로 치환되는 알킬로부터 독립적으로 선택된다.

[0061] 화학식 (I), (I'), (I-1), (I'-1), (Ia-1), (Ib-1), (Ib'-1), (Ic-1), (Ic'-1), (I-2), (I'-2), (Ia-2), (Ib-2), (Ib'-2), (Ic-2), 또는 (Ic'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R⁷은 H이다.

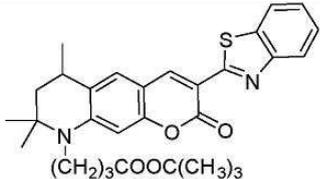
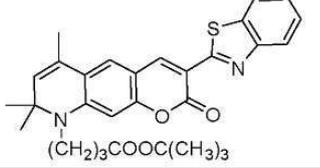
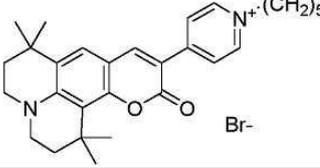
[0062] 화학식 (I), (I'), (I-1), (I'-1), (Ia-1), (Ib-1), (Ib'-1), (I-2), (I'-2), (Ia-2), (Ib-2) 또는 (Ib'-2)의 화합물의 일부 대안의 실시형태에서, R⁶과 R⁷은 이들이 부착되는 원자와 함께 결합하여 선택적으로 치환되는 3 내지 10원 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 6원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 이러한 실시형태에서, 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴은 하나의 헤테로원자를 함유한다. 일부 이러한 실시형태에서, 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴은 하나 이상의 알킬, 예를 들어, 메틸로 치환된다.

[0063] 화학식 (I), (I'), (I-1), (I'-1), (Ia-1), (Ib-1), (Ib'-1), (Ic-1), (Ic'-1), (I-2), (I'-2), (Ia-2), (Ib-2), (Ib'-2), (Ic-2) 또는 (Ic'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R⁸은 H이다.

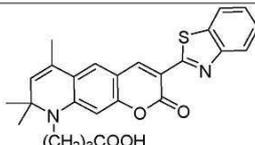
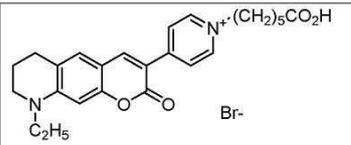
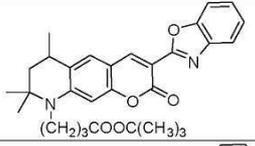
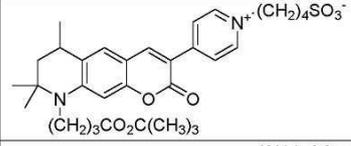
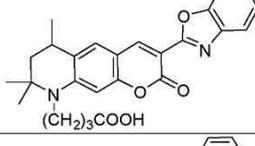
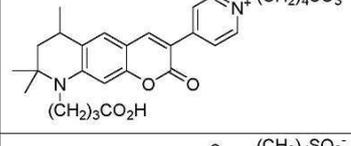
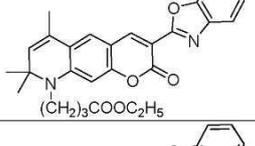
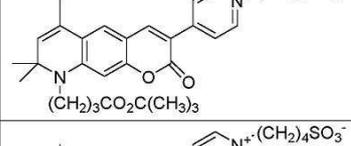
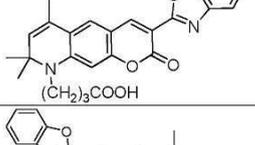
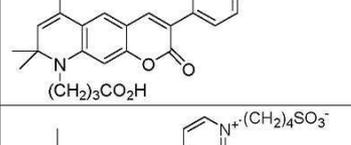
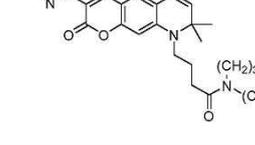
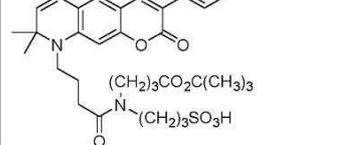
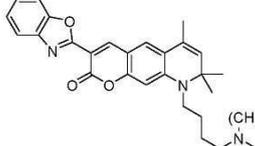
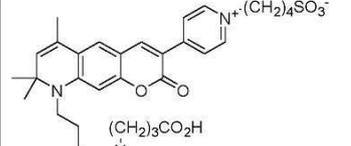
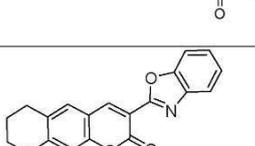
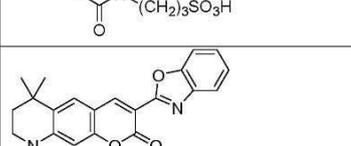
[0064] 화학식 (I), (I'), (I-1), (I'-1), (Ia-1), (Ib-1), (Ib'-1), (Ic-1), (Ic'-1), (I-2), (I'-2), (Ia-2), (Ib-2), (Ib'-2), (Ic-2) 또는 (Ic'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R⁹은 H이다.

[0065] 일부 구체적 실시형태에서, 예시적인 화학식 (I)의 화합물은 이하의 표 1에 나타내는 화합물 I-1 내지 I-20 및 화합물 I-22 내지 I-32를 포함한다:

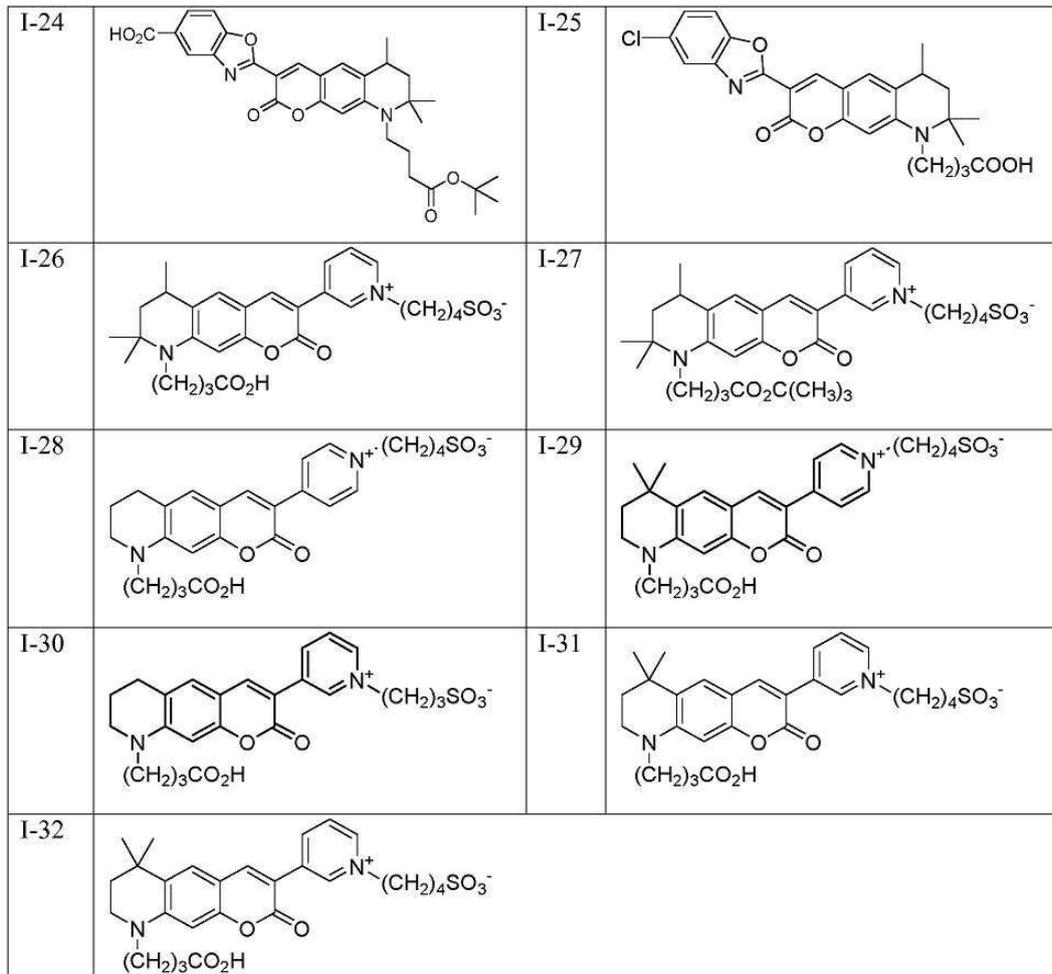
표 1

표 1.	
I-1	I-11
	
I-2	I-12
	
I-3	I-13
	

[0066]

I-4	 (CH ₂) ₃ COOH	I-14	 C ₂ H ₅ Br ⁻
I-5	 (CH ₂) ₃ COOC(CH ₃) ₃	I-15	 (CH ₂) ₃ CO ₂ C(CH ₃) ₃ (CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
I-6	 (CH ₂) ₃ COOH	I-16	 (CH ₂) ₃ CO ₂ H (CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
I-7	 (CH ₂) ₃ COOC ₂ H ₅	I-17	 (CH ₂) ₃ CO ₂ C(CH ₃) ₃ (CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
I-8	 (CH ₂) ₃ COOH	I-18	 (CH ₂) ₃ CO ₂ H (CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
I-9	 (CH ₂) ₃ CO ₂ C(CH ₃) ₃ (CH ₂) ₃ SO ₃ H	I-19	 (CH ₂) ₃ CO ₂ C(CH ₃) ₃ (CH ₂) ₃ SO ₃ H (CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
I-10	 (CH ₂) ₃ CO ₂ H (CH ₂) ₃ SO ₃ H	I-20	 (CH ₂) ₃ CO ₂ H (CH ₂) ₃ SO ₃ H (CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
I-22	 (CH ₂) ₃ CO ₂ H	I-23	 (CH ₂) ₃ COOH

[0067]



[0068]

[0069]

화학식 (I)의 화합물의 일부 실시형태에서, 화합물은 R⁶을 통해 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되고, R⁶은 치환된 알킬, 예를 들어, 치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 또는 C₆ 알킬이다. 일 실시형태에서, R⁶은 카복실로 치환되는 알킬이다.

[0070]

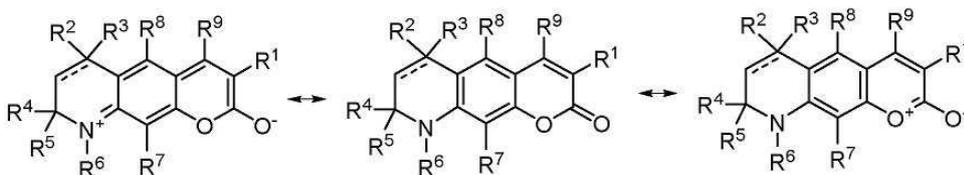
일부 대안의 실시형태에서, 화합물은 R⁸을 통해 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되며, R⁸은 치환된 알킬, 예를 들어, 치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 또는 C₆ 알킬이다. 일 실시형태에서, R⁸은 카복실로 치환되는 알킬이다.

[0071]

일부 대안의 실시형태에서, 화합물은 R^{10a}, R^{10b} 또는 R^{10c}를 통해 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되고, 각각의 R^{10a}, R^{10b} 또는 R^{10c}는 치환된 알킬, 예를 들어, 치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 또는 C₆ 알킬이다. 일 실시형태에서, 각각의 R^{10a}, R^{10b} 또는 R^{10c}는 카복실로 치환되는 알킬이다.

[0072]

일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물의 구조는 하나 이상의 메소메리 형태로 나타낸다:

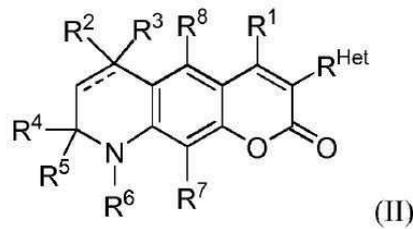


[0073]

[0074]

화학식 (II)의 화합물

[0075] 본 명세서에 기재된 일부 실시형태는 적어도 약 60nm의 스토크스 이동을 갖는 화학식 (II)의 형광 화합물, 또는 이의 염, 메소메리 형태에 관한 것이다:



[0076] 식 중, R^{Het}는 하나 이상의 R¹⁰로 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

[0078] 각각의 R¹, R², R³, R⁴ 및 R⁵는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0079] R⁶은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설펜일 하이드록사이드, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0080] 각각의 R⁷ 및 R⁸은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0081] 대안적으로, R⁶과 R⁷은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 또는 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하고;

[0082] 각각의 R¹⁰은 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설펜일 하이드록사이드, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

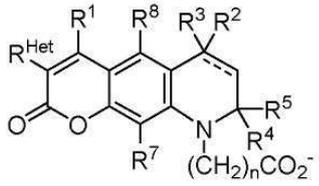
[0083] 실선 및 파선으로 나타내는 결합 ----- 는 단일 결합 및 이중 결합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 단, ===== 이 이중 결합일 때, R³은 없다.

[0084] 일부 실시형태에서, 화학식 (II)의 형광 화합물은 약 60nm 내지 약 100nm, 또는 약 60nm 내지 약 90nm 범위의 스토크스 이동을 가진다.

[0085] 화학식 (II)의 화합물의 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 알킬 또는 치환된 알킬은 C₁₋₁₂ 알킬 또는 더 바람직하게는 C₁₋₆ 알킬이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 알콕시는 C₁₋₁₂ 알콕시, 또는 더 바람직하게는 C₁₋₆ 알콕시이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 알켄일 및 알킨일기는 C₂₋₆ 알켄일 및 C₂₋₆ 알킨일이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 할로알킬, 할로알콕시, 아미노알킬, 하이드록시알킬, 헤테로알킬기는 C₁₋₁₂ 할로알킬, C₁₋₁₂ 할로알콕시, C₁₋₁₂ 아미노알킬, C₁₋₁₂ 하이드록시알킬 및 C₁₋₁₂ 헤테로알킬; 더 바람직하게는 C₁₋₆ 할로알킬, C₁₋₆ 할로알콕시, C₁₋₆ 아미노알킬, C₁₋₆ 하이드록시알킬 및 C₁₋₆ 헤테로알킬이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 알콕시알킬기는 C₁₋₆ 알콕시(C₁₋₆ 알킬)이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 선택적으로 치환되는 아릴은 선택적으로 치환되는 C₆₋₁₀ 아릴, 예를 들어, 페닐이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 선택적으로 선택적으로 치환되는 헤테로아릴은 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴; 더 바람직하게는, 선택적으로 치환되는 5 내지 6원 헤테로아릴이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 선택적으로 치환되는

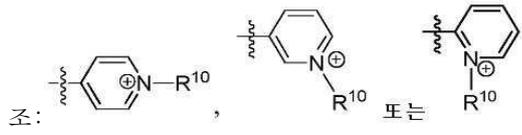
카보사이클릴은 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 카보사이클릴, 특히 3 내지 7원 사이클로알킬이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴은 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로 사이클릴, 더 바람직하게는 5 내지 6원 헤테로사이클릴이다.

[0086] 화학식 (II)의 화합물의 일부 실시형태에서, 임의의 R¹ 내지 R⁸은 카복실(-CO₂H) 또는 카복실레이트(CO₂⁻), 설펜(SO₃H) 또는 설펜산염(SO₃⁻) 기로부터 선택되는 하나 이상의 치환체로 알킬로부터 선택될 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 치환된 알킬은 치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 또는 C₆ 알킬이다. 일부 이러한 실시형태에서, 화학식 (II)의 화합물은 또한 유기 또는 무기 양이온과의 그의 염 형태 화학식 (II')로 나타낸다



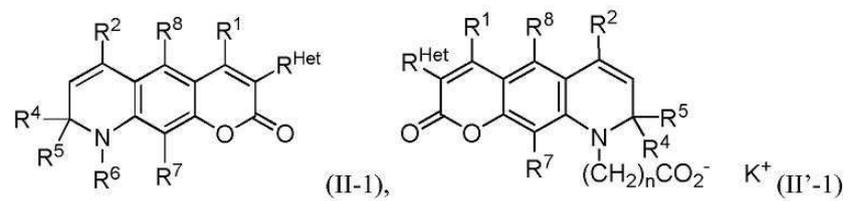
[0087] 식 중 K는 유기 또는 무기 양이온이고, n은 1 내지 20로부터 선택되는 정수이다.

[0088] 화학식 (II) 또는 (II')의 화합물의 일부 실시형태에서, R^{Het}는 하나 이상의 R¹⁰으로 선택적으로 치환되는 9원 헤테로아릴이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^{Het}는 선택적으로 치환되는 벤조티아졸릴 또는 벤족사졸릴, 예를 들어, 2-벤조티아졸릴 또는 2-벤족사졸릴로부터 선택된다. 일부 다른 실시형태에서, R^{Het}는 하나 이상의 R¹⁰으로 선택적으로 치환되는 6원 헤테로아릴이다. 하나의 이러한 실시형태에서, R^{Het}은 구



조: 를 갖는 치환된 피리딜, 예를 들어, 4-피리딜이다. R¹⁰은 질소 원자 상의 양전하를 보유하는 피리딜기에 연결될 때, 전체로서 R^{Het}가 전하 중성이 되도록 R¹⁰은 음성 전하를 함유할 수 있다는 것이 이해된다. 대안적으로, R¹⁰이 질소 원자 상에서 양전하를 보유하는 피리딜기에 연결될 때, 전체로서 화합물은 전하 중성이 되도록 본 명세서에 기재된 화합물은 반대이온을 함유할 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, R¹⁰은 치환된 알킬, 예를 들어, 치환된 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 또는 C₆ 알킬이다. 일부 이러한 실시형태에서, R¹⁰은 카복실(-CO₂H), 카복실레이트(CO₂⁻), 설펜(SO₃H) 또는 설펜산염(SO₃⁻)로 치환된다.

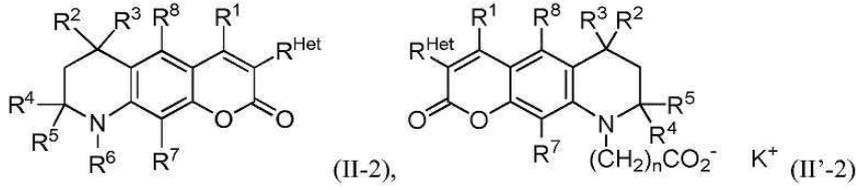
[0089] 화학식 (II) 또는 (II')의 화합물의 일부 실시형태에서, 화학식 (II)에서 실선 및 파선으로 나타내는 결합 ----- 는 이중 결합이며, 화합물은 또한 화학식 (II-1) 또는 (II'-1)로 나타낸다:



[0090] 화학식 (II), (II'), (II-1) 또는 (II'-1)의 화합물의 일부 실시형태에서, R²는 알킬이다. 일 실시형태에서, R²는 메틸이다. 일부 다른 실시형태에서, R²는 H이다.

[0092] 화학식 (II), (II'), (II-1) 또는 (II'-1)의 화합물의 일부 실시형태에서, R⁴ 및 R⁵ 중 적어도 하나는 알킬이다. 일부 이러한 실시형태에서, 각각의 R⁴ 및 R⁵는 알킬이다. 일 실시형태에서, R⁴와 R⁵는 둘 다 메틸이다. 일부 대안의 실시형태에서, R⁴ 및 R⁵ 중 적어도 하나는 H이다. 하나의 이러한 실시형태에서, R⁴와 R⁵는 둘 다 H이다.

[0093] 화학식 (II) 또는 (II')의 화합물의 일부 실시형태에서, 실선 및 파선으로 나타내는 결합 ----- 는 단일 결합이고, 화합물은 또한 화학식 (II-2) 또는 (II'-2)로 나타낸다:



[0094]

[0095] 화학식 (II), (II'), (II-2) 또는 (II'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R^2 및 R^3 중 적어도 하나는 알킬이다. 일부 추가 실시형태에서, R^2 와 R^3 은 둘 다 알킬이다. 일 실시형태에서, R^2 와 R^3 은 둘 다 메틸이다. 일부 다른 실시형태에서, R^2 및 R^3 중 적어도 하나는 H이다. 일 실시형태에서, R^2 와 R^3 은 둘 다 H이다.

[0096] 화학식 (II), (II'), (II-2) 또는 (II'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R^4 및 R^5 중 적어도 하나는 H이다. 하나의 이러한 실시형태에서, R^4 와 R^5 는 둘 다 H이다. 일부 대안의 실시형태에서, R^4 및 R^5 중 적어도 하나는 알킬이다. 일부 이러한 실시형태에서, 각각의 R^4 및 R^5 는 알킬이다. 일 실시형태에서, R^4 와 R^5 는 둘 다 메틸이다.

[0097] 화학식 (II), (II'), (II-1), (II'-1), (II-2) 또는 (II'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R^6 은 치환된 알킬, 예를 들어, 치환된 C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 또는 C_6 알킬이다. 일 실시형태에서, R^6 은 카복실로 치환되는 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^6 은 $-C(O)OR^{12}$ 로 치환되는 알킬이며, R^{12} 는 선택적으로 치환되는 알킬, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 및 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 이러한 실시형태에서, R^{12} 는 알킬, 예를 들어, 메틸, 에틸 또는 t-부틸이다. 일부 추가 실시형태에서, R^6 은 $-C(O)NR^{13}R^{14}$ 로 치환되는 알킬이고, 각각의 R^{13} 및 R^{14} 는 H, 선택적으로 치환되는 알킬, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 사이클로알킬로부터 독립적으로 선택된다. 일부 추가 실시형태에서, R^{13} 및 R^{14} 는 카복실, 카복실레이트, $-C(O)OR^{11}$, 설포 및 설포산염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환체로 치환되는 알킬로부터 독립적으로 선택된다.

[0098] 화학식 (II), (II'), (II-1), (II'-1), (II-2) 또는 (II'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R^7 은 H이다.

[0099] 화학식 (II), (II'), (II-1), (II'-1), (II-2) 또는 (II'-2)의 화합물의 일부 대안의 실시형태에서, R^6 과 R^7 은 이들이 부착되는 원자와 함께 결합되어 선택적으로 치환되는 3 내지 10원 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 6원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 이러한 실시형태에서, 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴은 하나의 헤테로원자를 함유한다. 일부 이러한 실시형태에서, 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴은 하나 이상의 알킬, 예를 들어, 메틸로 치환된다.

[0100] 화학식 (II), (II'), (II-1), (II'-1), (II-2) 또는 (II'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R^1 은 H이다.

[0101] 화학식 (II), (II'), (II-1), (II'-1), (II-2) 또는 (II'-2)의 화합물의 일부 실시형태에서, R^8 은 H이다.

[0102] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물이 양으로 또는 음으로 하전된 치환체기를 함유할 때, 전체로서 화합물이 중성이도록 이는 또한 양으로 또는 음으로 하전된 반대이온을 함유할 수 있다.

[0103] 정의

[0104] 본 명세서에서 사용되는 표제 부문은 단지 유기적 목적을 위한 것이며, 기재되는 대상을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0105] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학적 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 용어 "포함하는(including)"뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "포함하다(include)", "포함하다(includes)" 및 "포함된(included)"은 제한이 없다. 용어 "갖는"뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "가지다(have)", "가지다(has)" 및 "가졌다(had)"는 제한적이지 않다. 전통적인 어구에서이든 청구범위

의 대상에서이든 본 명세서에서 사용되는, 용어 "포함한다(comprise(s))" 및 "포함하는"은 제한을 두지 않은 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 즉, 상기 용어는 어구 "적어도 갖는" 또는 "적어도 포함하는"과 동시에 해석되어야 한다. 예를 들어, 과정과 관련하여 사용될 때, 용어 "포함하는"은 상기 과정은 적어도 인용된 단계를 포함하지만, 추가적인 단계를 포함할 수 있다는 것을 의미한다. 화합물, 조성물 또는 장치와 관련하여 사용될 때, 용어 "포함하는"은 화합물, 조성물 또는 장치는 적어도 인용된 특징 또는 성분을 포함하지만, 또한 추가적인 특징 또는 성분을 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0106]	본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 통상적인 유기물 약어는 다음과 같이 정의한다:	
[0107]	Ac	아세틸
[0108]	Ac ₂ O	아세트산 무기물
[0109]	aq.	수성
[0110]	BOC 또는 Boc	tert-부톡시카보닐
[0111]	BOP	(벤조트리아졸-1-일옥시)트리스(다이메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트
[0112]	cat.	촉매
[0113]	°C	섭씨 온도
[0114]	dATP	데옥시아데노신 삼인산염
[0115]	dCTP	데옥시사이티딘 삼인산염
[0116]	dGTP	데옥시구아노신 삼인산염
[0117]	dTTP	데옥시티미딘 삼인산염
[0118]	ddNTP(들)	다이데옥시뉴클레오타이드(들)
[0119]	DCM	염화메틸렌
[0120]	DMA	다이메틸아세트아마이드
[0121]	DMF	다이메틸폼아마이드
[0122]	Et	에틸
[0123]	EtOAc	에틸 아세테이트
[0124]	ffC	완전히 작용성인 뉴클레오타이드 접합체
[0125]	g	그램(들)
[0126]	h 또는 hr	시간(들)
[0127]	IPA	아이소프로필 알코올
[0128]	LCMS	액체 크로마토그래피-질량 분석법
[0129]	MeCN	아세토나이트릴
[0130]	mL	밀리리터(들)
[0131]	PG	보호기
[0132]	Ph	페닐
[0133]	ppt	침전물
[0134]	PyBOP	(벤조트리아졸-1-일옥시)트라이피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트
[0135]	RT, rt	실온
[0136]	SBS	합성에 의한 서열분석

- [0137] TEA 트라이에틸아민
- [0138] TEAB 테트라에틸암모늄 브로마이드
- [0139] TFA 트라이플루오로아세트산
- [0140] TRIS 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄
- [0141] Tert, t 3차
- [0142] THF 테트라하이드로퓨란
- [0143] TLC 박층 크로마토그래피
- [0144] TSTU O-(N-숙신이미딜)-N,N,N',N"-테트라메틸유로피움 테트라플루오로보레이트
- [0145] μ l 마이크로리터(들)
- [0146] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "공유적으로 부착된" 또는 "공유결합된"은 원자 사이의 전자 쌍의 공유를 특징으로 하는 화학적 결합의 형성을 지칭한다. 예를 들어, 공유적으로 부착된 중합체 코팅은 다른 수단, 예를 들어, 접착 또는 정전기적 상호작용을 통한 표면에 대한 부착에 비해 기질의 작용화된 표면과의 화학적 결합을 형성하는 중합체 코팅을 지칭한다. 표면에 공유적으로 부착된 중합체는 또한 공유적으로 부착에 추가적인 수단을 통해 결합될 수 있다는 것이 인식될 것이다.
- [0147] 본 명세서에서 사용되는 용어 "할로겐" 또는 "할로"는 주기율표 7족의 방사성 안정성 원자 중 하나, 예를 들어, 플루오린, 염소, 브로민 또는 요오드를 의미하며, 플루오린 및 염소가 바람직하다.
- [0148] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "알킬"은 완전히 포화된(즉, 이중 또는 삼중 결합을 함유하지 않음) 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소를 지칭한다. 알킬기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다(본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "알킬"의 존재를 아우른다고 해도, 그것이 본 명세서에서 나타나는 경우에, 수치적 범위, 예컨대 "1 내지 20"개는 주어진 범위 내의 각각의 정수를 지칭하고; 예를 들어, "1 내지 20개의 탄소 원자"는 알킬기가 1개의 탄소 원자, 2개의 탄소 원자, 3개의 탄소 원자 등(20개를 포함하여, 20개까지의 탄소 원자)으로 이루어질 수 있다는 것을 의미한다). 알킬기는 또한 1 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알킬일 수 있다. 알킬기는 또한 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 더 저급의 알킬일 수 있었다. 알킬기는 "C₁₋₄ 알킬" 또는 유사한 표기로서 표기될 수 있다. 단지 예로서, "C₁₋₆ 알킬"은 알킬쇄에서 1 내지 6개의 탄소 원자가 있다는 것, 알킬쇄는 메틸, 에틸, 프로필, 아이소-프로필, n-뷰틸, 아이소-뷰틸, sec-뷰틸 및 t-뷰틸로 이루어진 군으로부터 선택된다는 것을 나타낸다. 전형적인 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 뷰틸, 아이소뷰틸, 3차 뷰틸, 펜틸, 헥실 등을 포함하지만, 어떤 방법으로 제한되지 않는다.
- [0149] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "알콕시"는 화학식 -OR을 지칭하되, R은 상기 정의한 바와 같은 알킬, 예컨대 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 1-메틸에톡시(아이소프로폭시), n-뷰톡시, 아이소-뷰톡시, sec-뷰톡시, 및 tert-뷰톡시 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 "C₁₋₉ 알콕시"이다.
- [0150] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "알켄일"은 하나 이상의 이중 결합을 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소쇄를 지칭한다. 알켄일기는, 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "알켄일"의 존재를 아우르지만, 2 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 알켄일기는 또한 2 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알켄일일 수 있다. 알켄일기는 또한 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알켄일일 수 있었다. 알켄일기는 "C₂₋₆ 알켄일" 또는 유사한 표기로서 표기될 수 있다. 단지 예로서, "C₂₋₆ 알켄일"은 알켄일 쇠에 2 내지 6개의 탄소 원자가 있으며, 즉, 알켄일 쇠는 에테닐, 프로펜-1-일, 프로펜-2-일, 프로펜-3-일, 뷰텐-1-일, 뷰텐-2-일, 뷰텐-3-일, 뷰텐-4-일, 1-메틸-프로펜-1-일, 2-메틸-프로펜-1-일, 1-에틸-에텐-1-일, 2-메틸-프로펜-3-일, 부타-1,3-다이엔일, 부타-1,2-다이엔일, 및 부타-1,2-다이엔-4-일로 이루어진 군으로부터 선택된다는 것을 나타낸다. 전형적인 알켄일기는 에테닐, 프로펜일, 뷰텐일, 펜텐일, 및 헥센일 등을 포함하지만, 이런 방법으로 제한되지 않는다.
- [0151] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "알킨일"은 하나 이상의 삼중 결합을 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소를 지칭한다. 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "알킨일"의 존재를 아우른다고 해도, 알킨일기는 2 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 알킨일기는 또한 2 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알킨

일일 수 있다. 알킨일기는 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알킨일일 수 있었다. 알킨일기는 "C₂₋₆ 알킨일" 또는 유사한 표기로서 표기될 수 있다. 단지 예로서, "C₂₋₆ 알킨일"은 알킨일 쇠에 2 내지 6개의 탄소 원자가 있으며, 즉, 알킨일 쇠는 에틸일, 프로핀-1-일, 프로핀-2-일, 뷰틴-1-일, 뷰틴-3-일, 뷰틴-4-일 및 2-뷰틴일로 이루어진 군으로부터 선택된다는 것을 나타낸다. 전형적인 알킨일기는 에틸일, 프로핀일, 뷰틴일, 펜틴일 및 헥신일 등을 포함하지만, 어떤 방법으로 제한되지 않는다.

[0152] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "헤테로알킬"은 하나 이상의 헤테로원자, 즉, 쇠 골격 내 질소, 산소 및 황을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 탄소 이외의 원소를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소를 지칭한다. 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "헤테로알킬"의 존재를 아우르지만, 헤테로알킬기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 헤테로알킬기는 또한 1 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 헤테로원자일 수 있다. 헤테로알킬기는 또한 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 헤테로알킬일 수 있었다. 헤테로알킬기는 "C₁₋₆ 헤테로알킬" 또는 유사한 표기로서 표기될 수 있다. 헤테로알킬기는 하나 이상의 헤테로원자를 함유할 수 있다. 단지 예로서, "C₁₋₆ 헤테로알킬"은 헤테로알킬 쇠에 1 내지 6개의 탄소 원자 및 추가로 쇠의 골격에 하나 이상의 헤테로원자가 있다는 것을 나타낸다.

[0153] 용어 "방향족"은 접합된 파이 전자계를 갖는 고리 또는 고리계를 지칭하며, 탄소환식 방향족(예를 들어, 페닐)과 복소환식 방향족(예를 들어, 피리딘)을 둘 다 포함한다. 상기 용어는 단환식 또는 축합 고리 다환식(즉, 원자의 인접한 쌍을 공유하는 고리) 기를 포함하며, 단, 전체 고리계는 방향족이다.

[0154] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "아릴"은 고리 골격에서 탄소만을 함유하는 방향족 고리 또는 고리계(즉, 2개의 인접한 탄소 원자를 공유하는 2개 이상의 축합 고리)를 지칭한다. 아릴이 고리계일 때, 고리계의 모든 고리는 방향족이다. 본 정의는 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "아릴"의 발생을 아우르지만, 아릴기는 6 내지 18개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 아릴기는 6 내지 10개의 탄소 원자를 가진다. 아릴기는 "C₆₋₁₀ 아릴", "C₆ 또는 C₁₀ 아릴" 또는 유사한 표기로서 표기될 수 있다. 아릴기의 예는 페닐, 나프틸, 아줄렌일 및 안트라센일을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0155] "아르알킬" 또는 "아릴알킬"은 벤질, 2-페닐에틸, 3-페닐프로필, 및 나프틸알킬을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 "C₇₋₁₄ 아르알킬" 등과 같은 알킬렌기를 통해 치환체로서 연결되는 아릴기이다. 일부 경우에, 알킬렌기는 저급 알킬렌기(즉, C₁₋₆ 알킬렌기)이다.

[0156] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "헤테로아릴"은 하나 이상의 헤테로원자, 즉, 고리 골격 내 질소, 산소 및 황을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 탄소 이외의 원소를 함유하는 방향족 고리 또는 고리계(즉, 2개의 인접한 원자를 공유하는 2개 이상의 축합 고리)를 지칭한다. 헤테로아릴이 고리계일 때, 고리계의 모든 고리는 방향족이다. 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "헤테로아릴"의 존재를 아우르지만, 헤테로아릴기는 5 내지 18개의 고리 구성원(즉, 탄소 원자 및 헤테로원자를 포함하는 고리 골격을 구성하는 원자의 수)을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 헤테로아릴기는 5 내지 10개의 고리 구성원 또는 5 내지 7개의 고리 구성원을 가진다. 헤테로아릴기는 "5 내지 7원 헤테로아릴", "5 내지 10원 헤테로아릴" 또는 유사한 표기로서 표기될 수 있다. 헤테로아릴 고리의 예는 퓨릴, 티엔일, 프탈라진일, 피롤릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 아이소옥사졸릴, 아이소티아졸릴, 트리아졸릴, 티아다리아졸릴, 피리딘일, 피리다진일, 피리미딘일, 피라진일, 트리아진일, 퀴놀린일, 아이소퀴놀린일, 벤즈이미다졸릴, 벤족사졸릴, 벤조티아졸릴, 인돌릴, 아이소인돌릴 및 벤조티엔일을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0157] "헤테로아르알킬" 또는 "헤테로아릴알킬"은 알킬렌기를 통해 치환체로서 연결된 헤테로아릴기이다. 예는 2-티엔일메틸, 3-티엔일메틸, 퓨릴메틸, 티엔일메틸, 피롤릴알킬, 피리딜알킬, 아이소옥사졸릴알킬 및 이미다졸릴알킬을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 경우에, 알킬렌기는 저급 알킬렌기(즉, C₁₋₆ 알킬렌기)이다.

[0158] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "카보사이클릴"은 고리계 골격에서 탄소 원자만을 함유하는 비방향족 환식 고리 또는 고리계를 의미한다. 카보사이클릴이 고리계일 때, 2개 이상의 고리는 축합, 브릿지 또는 스피로 연결된 방식으로 함께 결합될 수 있다. 카보사이클릴은 고리계의 적어도 하나의 고리가 방향족이 아니라는 조건 하에서 임의의 포화 정도를 가질 수 있다. 따라서, 카보사이클릴은 사이클로알킬, 사이클로알켄일 및 사이클로알킨일을 포함한다. 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "카보사이클릴"의 존재를 아우르지만, 카보사이클릴기는 3 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 카보사이클릴기는 또한 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 카보사이클릴일 수 있다. 카보사이클릴기는 3 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 카보사이클릴일 수

있었다. 카보사이클릴기는 " C_{3-6} 카보사이클릴" 또는 유사한 표기로서 표기될 수 있다. 카보사이클릴 고리의 예는 사이클로프로필, 사이클로뷰틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헥센일, 2,3-다이하이드로-인덴, 바이사이클[2.2.2]옥탄일, 아다만틸 및 스피로[4.4]노난일을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0159] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "사이클로알킬"은 완전히 포화된 카보사이클릴 고리 또는 고리계를 의미한다. 예는 사이클로프로필, 사이클로뷰틸, 사이클로펜틸, 및 사이클로헥실을 포함한다.

[0160] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "헤테로사이클릴"은 고리에서 적어도 하나의 헤테로원자를 함유하는 비-방향족 환식 고리 또는 고리계를 의미한다. 헤테로사이클릴은 축합, 브릿지 또는 스피로 연결된 방식으로 함께 결합될 수 있다. 헤테로사이클릴은 고리계의 적어도 하나의 고리가 방향족이 아니라는 조건 하에서 임의의 포화 정도를 가질 수 있다. 헤테로원자(들)는 고리계에서 비방향족 또는 방향족 고리 중 하나로 존재할 수 있다. 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "헤테로사이클릴"의 존재를 아우르지만, 헤테로사이클릴기는 3 내지 20개의 고리 구성원(즉, 탄소 원자 및 헤테로원자를 포함하는 고리 골격을 구성하는 원자의 수)을 가질 수 있다. 헤테로사이클릴기는 또한 3 내지 10개의 고리 구성원을 갖는 중간 크기 헤테로사이클릴일 수 있다. 헤테로사이클릴기는 3 내지 6개의 고리 구성원을 갖는 헤테로사이클릴일 수 있었다. 헤테로사이클릴기는 "3 내지 6원 헤테로사이클릴" 또는 유사한 표기로서 표기될 수 있다. 바람직한 6원 단환식 헤테로사이클릴에서, 헤테로원자(들)는 O, N 또는 S 중 1 내지 3개로부터 그리고 바람직한 5원 단환식 헤테로사이클릴에서 선택되고, 헤테로원자(들)는 O, N 또는 S로부터 선택되는 1 또는 2개의 헤테로원자로부터 선택된다. 헤테로사이클릴 고리의 예는 아제핀일, 아크리딘일, 카바졸릴, 신놀린일, 다이옥솔란일, 이미다졸린일, 이미다졸리딘일, 몰폴린일, 옥시란일, 옥세판일, 티에판일, 피페리딘일, 피페라진일, 다이옥소피페라진일, 피롤리딘일, 피롤리돈일, 피롤리다이온일, 4-피페리돈일, 피라졸린일, 피라졸리딘일, 1,3-다이옥신일, 1,3-다이옥산일, 1,4-다이옥신일, 1,4-다이옥산일, 1,3-옥사티안일, 1,4-옥사틴일, 1,4-옥사티안일, 2H-1,2-옥사진일, 트라이옥산일, 헥사하이드로-1,3,5-트리아진일, 1,3-다이옥솔릴, 1,3-다이옥솔란일, 1,3-다йти올일, 1,3-다йти올란일, 아이소옥사졸린일, 아이소옥사졸린일, 옥사졸린일, 옥사졸리딘일, 옥사졸리디논일, 티아졸린일, 티아졸리딘일, 1,3-옥사티올란일, 인돌린일, 아이소인돌린일, 테트라하이드로퓨란일, 테트라하이드로피란일, 테트라하이드로티오펜일, 테트라하이드로티오피란일, 테트라하이드로퀴놀린을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0161] "O-카복시"기는 " $-OC(=O)R$ "기를 지칭하며, 이때 R은 본 명세서에 기재된 바와 같은 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-7} 카보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다.

[0162] "C-카복시"기는 " $-C(=O)OR$ "기를 지칭하며, 이때 R은 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-7} 카보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다. 비제한적 예는 카복실(즉, $-C(=O)OH$)을 포함한다.

[0163] "사이아노"기는 " $-CN$ "기를 지칭한다.

[0164] "설펜일"기는 " $-SO_2R$ "기를 지칭하며, R은 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-7} 카보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다.

[0165] "설펜" 또는 "설펜일 하이드록사이드"기는 " $-S(=O)_2-OH$ "기를 지칭한다.

[0166] "설펜노"기는 " $-S(=O)OH$ "기를 지칭한다.

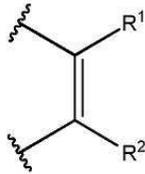
[0167] "설펜산염" 기는 $-SO_3^-$ 기를 지칭한다.

[0168] "S-설펜아미도"기는 " $-SO_2NR_A R_B$ "기를 지칭하며, 이때 R_A 및 R_B 는 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-7} 카보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 각각 독립적으로 선택된다.

[0169] "N-설펜아미도"기는 " $-N(R_A)SO_2R_B$ "기를 지칭하며, 이때 R_A 및 R_B 는 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-7} 카보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, 및 3 내지 10원 헤테로

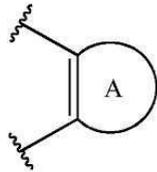
사이클릴로부터 각각 독립적으로 선택된다.

- [0170] "C-아미도"기는 $-C(=O)NR_A R_B$ 기를 지칭하며, 이때 R_A 및 R_B 는 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-7} 카보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 각각 독립적으로 선택된다.
- [0171] "N-아미도"기는 $-N(R_A)C(=O)R_B$ 기를 지칭하며, 이때 R_A 및 R_B 는 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-7} 카보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 각각 독립적으로 선택된다.
- [0172] "아미노"기는 $-NR_A R_B$ 기를 지칭하며, 이때 R_A 및 R_B 는 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-7} 카보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 각각 독립적으로 선택된다. 비제한적 예는 유리 아미노(즉, $-NH_2$)를 포함한다.
- [0173] "아미노알킬"기는 알킬렌기를 통해 연결된 아미노기를 지칭한다.
- [0174] "알콕시알킬"기는 알킬렌기, 예컨대 " C_{2-8} 알콕시알킬" 등을 통해 연결된 알콕시기를 지칭한다.
- [0175] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 치환된 기는 하나 이상의 수소 원자가 다른 원자 또는 기로 교환된 비치환 모(parent)기로부터 유래된다. 달리 표시되지 않는 한, 기가 "치환된"으로 여겨질 때, 기는 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알켄일, C_{1-6} 알킨일, C_{1-6} 헤테로알킬, C_{3-7} 카보사이클릴(할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬 및 C_{1-6} 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), C_{3-7} 카보사이클릴- C_{1-6} 알킬(할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬 및 C_{1-6} 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 3 내지 10원 헤테로사이클릴(할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬 및 C_{1-6} 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 3 내지 10원 헤테로사이클릴- C_{1-6} 알킬(할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬 및 C_{1-6} 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 3 내지 10원 헤테로사이클릴- C_{1-6} 알킬(할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬 및 C_{1-6} 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 아릴(할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬 및 C_{1-6} 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 아릴(C_{1-6})알킬(할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬 및 C_{1-6} 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 5 내지 10원 헤테로아릴(할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬 및 C_{1-6} 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 5 내지 10원 헤테로아릴(C_{1-6})알킬(할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬 및 C_{1-6} 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 할로, 사이아노, 하이드록시, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 알콕시(C_{1-6})알킬(즉, 에터), 아릴옥시, 설프하이드릴(머캅토), 할로(C_{1-6})알킬(예를 들어, $-CF_3$), 할로(C_{1-6})알콕시(예를 들어, $-OCF_3$), C_{1-6} 알킬티오, 아릴티오, 아미노, 아미노(C_{1-6})알킬, 나이트로, O-카밤일, N-카밤일, O-티오카밤일, N-티오카밤일, C-아미도, N-아미도, S-설프폰아미도, N-설프폰아미도, C-카복시, O-카복시, 아실, 사이아네이토, 아이소사이아네이토, 티오사이아네이토, 아이소티오사이아네이토, 설프닐, 설프닐, 설프, 설프노, 설프산염 및 옥소(=O)로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환체로 치환된다는 것을 의미한다. 기가 "선택적으로 치환된"으로 기재되는 경우에, 상기 기는 상기 치환체로 치환될 수 있다.
- [0176] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 화합물이 양으로 또는 음으로 하전된 치환체, 예를 들어, SO_3^- 를 함유한다면, 전체로서 화합물이 중성이도록, 이는 또한 양으로 또는 음으로 하전된 반대이온을 함유할 수 있다.
- [0177] 관습적으로 명명하는 특정 라디칼은 문맥에 따라서 1-라디칼 또는 2-라디칼 중 하나를 포함할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 예를 들어, 치환체가 분자의 나머지에 대한 2개의 부착 지점을 필요로 하는 경우에, 치환체는 2-라디칼이라는 것이 이해된다. 예를 들어, 2개의 부착 지점을 필요로 하는 알킬로서 동정되는 치환체는 2-라디칼, 예컨대 $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$ 등을 포함한다. 관습적으로 명명하는 다른 라디칼은 2-라디칼, 예컨대 "알킬렌" 또는 "알켄일렌"이라는 것을 분명하게 나타낸다.
- [0178] 두 "인접한" R기가 "이들이 부착되는 원자와 함께" 고리를 형성하는 것으로 언급될 때, 원자의 총괄적 단위, 개재 결합 및 2개의 기는 열거된 고리라는 것을 의미한다. 예를 들어, 다음의 구조가 존재할 때:



[0179]

[0180] R¹ 및 R²는 수소 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 바와 같이 정의되거나, 또는 R¹과 R²는 이들이 부착되는 원자와 함께 아릴 또는 카보사이클릴을 형성하고, R¹ 및 R²는 수소 또는 알킬로부터 선택될 수 있거나, 또는 대안적으로, 하위구조는 하기 구조를 가진다는 것을 의미한다:



[0181]

[0182] 식 중, A는 도시된 이중 결합을 함유하는 아릴 고리 또는 카보사이클릴이다.

[0183] 표지된 뉴클레오타이드

[0184] 본 명세서에 기재된 염료 화합물은 기질 모이어티에 대한 부착에 적합하다. 기질 모이어티는 사실상 본 명세서에 기재된 형광 염료가 접합될 수 있는 임의의 분자 또는 물질일 수 있으며, 예로서, 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, 탄수화물, 리간드, 입자, 고체 표면, 유기 및 무기 중합체 및 이들의 조합 또는 집합체, 예컨대, 염색체, 핵, 살아있는 세포 등을 포함할 수 있다. 염료는 소수성 인력, 이온 인력 및 공유적으로 부착을 포함하는 다양한 수단에 의해 선택적 링커에 의해 접합될 수 있다. 특히, 염료는 공유적으로 부착에 의해 기질에 접합된다. 더 구체적으로는, 공유적으로 부착은 링커 기에 의한다. 일부 예에서, 이러한 표지된 뉴클레오타이드는 또한 "변형된 뉴클레오타이드"로서 지칭된다.

[0185] 본 명세서에 기재된 바와 같은 긴 스토크스 이동을 갖는 새로운 형광 염료의 특히 유용한 적용은 생체분자, 예를 들어, 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 표지하기 위한 것이다. 본 출원의 일부 실시형태는 본 명세서에 기재된 새로운 형광 화합물로 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다.

[0186] 개선된 형광 특성(예컨대 스토크스 이동, 형광 강도, 형광 최대값의 위치 및 형광 밴드의 형상)을 갖는 형광 염료 분자는 핵산 서열분석의 속도 및 정확성을 개선시킬 수 있다. 스토크스 이동은 생물학적 적용에서의 형광 검출에서 중요한 양상이다. 예를 들어, 방출광의 검출은 서로 매우 근접한(즉, 작은 스토크스 이동) 흡수 및 형광 최대값을 갖는 형광단을 이용할 때 여기광과 구별하는 것이 어려울 수 있는데, 여기 및 방출 파장은 크게 중복되기 때문이다. 대조적으로, 큰 스토크스 이동을 갖는 형광단은 여기와 방출 파장 사이의 더 큰 분리 때문에 구별하는 것이 용이하다. 스토크스 이동은 다중복합 형광 적용에서 특히 중요한데, 형광단의 방출 파장이 중복되고, 따라서 동일한 샘플에서 다른 형광단을 여기시킬 수 있기 때문이다. 추가로, 대부분의 염료의 형광은 이러한 조건에서 상당히 더 낮기 때문에, 형광 신호 강도는 측정의 수계 생물학적 완충제에서 그리고/또는 고온에서 이루어질 때 특히 중요하다. 게다가, 염료가 부착되는 염기의 특성은 또한 형광 최대값, 형광 강도 및 다른 스펙트럼 염료 특성에 영향을 미친다. 형광 염료와 핵염기 사이의 서열 특이적 상호작용은 형광 염료의 특정 설계에 의해 맞춤될 수 있다. 형광 염료 구조의 최적화는 그들의 형광 특성을 개선시키고, 또한 뉴클레오타이드 혼입의 효율을 개선시키며, 서열분석 오류 수준을 감소시키고, 핵산 서열분석의 용도 및 그에 따른 비용을 감소시킨다.

[0187] 생체분자에 대한 부착은 화학식 (I) 또는 화학식 (II)의 화합물의 R⁶, R⁸, R^{10a}, R^{10b}, R^{10c} 또는 R¹⁰ 모이어티를 통해 할 수 있다. 일부 실시형태에서, R⁶, R⁸, R^{10a}, R^{10b}, R^{10c} 또는 R¹⁰은 치환된 알킬, 예를 들어 카복실(즉, -CO₂H) 또는 카복실기의 활성화된 형태로 치환된 알킬, 예를 들어, 아마이드 또는 에스터이다. 일 실시형태에서, R⁶, R⁸, R^{10a}, R^{10b}, R^{10c} 또는 R¹⁰은 추가적인 아마이드/펩타이드 결합 형성에 가장 적합한 활성화된 에스터 또는 아마이드 잔기를 함유할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "활성화된 에스터"는 온화한 조건에서, 예를 들어, 아미노기를 함유하는 화합물과 반응할 수 있는 카복실기 유도체를 지칭한다. 활성화된 에스터의 비제한적

예는 p-나이트로페닐, 펜타플루오로페닐 및 숙신이미도 에스터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0188] 일부 실시형태에서, 염료 화합물은 뉴클레오타이드 염기를 통해 올리고뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드에 공유적으로 부착될 수 있다. 예를 들어, 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 링커 모이어티를 통해 피리미딘 염기의 C5 위치에 또는 7-테아자 퓨린 염기의 C7 위치에 부착된 표지를 가질 수 있다. 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드의 리보스 또는 데옥시리보스 당에 공유적으로 부착된 3'-OH 차단기를 가질 수 있다.

[0189] 링커

[0190] 본 명세서에 개시된 바와 같은 염료 화합물은 다른 분자에 대한 화합물의 공유적으로 부착을 위한 치환체 위치 중 하나에서 반응성 링커를 포함할 수 있다. 반응성 연결기는 공유 결합을 형성할 수 있는 모이어티이다. 특정 실시형태에서, 링커는 절단성 링커일 수 있다. 용어 "절단성 링커"의 사용은 전체 링커가 제거될 필요가 있다는 것을 나타내는 것을 의미하지 않는다. 절단 부위는 링커의 부분이 절단 후 염료 및/또는 기질 모이어티에 부착된 채로 남아있다는 것을 보장하는 링커 상의 위치에 위치될 수 있다. 절단 가능한 링커는 비제한적 예로서 친전자적 절단성 링커, 친핵적 절단성 링커, 광 절단성 링커, 환원 조건(예를 들어, 링커를 함유하는 이황화물 또는 아자이드), 산화 조건 하의 절단성, 안전 장치 링커의 사용을 통한 절단성 및 제거 메커니즘에 의한 절단성일 수 있다. 기질 모이어티에 염료 화합물을 부착시키기 위한 절단성 링커의 사용은 표지는, 필요하다면 검출 후에 제거될 수 있고, 하류 단계에서 임의의 방해 신호를 회피할 수 있다는 것을 보장한다.

[0191] 표지, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 새로운 형광 화합물에 뉴클레오타이드의 염기를 연결하는 링커기의 비제한적 예는 국제특허출원 공개 W02004/018493(본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 것을 포함한다. 이들 링커는 전이 금속 및 적어도 부분적으로 수용성인 리간드로부터 형성된 수용성 포스핀 또는 수용성 전이금속을 이용하여 절단될 수 있다. 수용액에서 후자는 적어도 부분적으로 수용성인 전이 금속 착물을 형성한다. 사용될 수 있는 추가적인 적합한 링커는 국제 특허 출원 W02004/018493 및 W0 2007/020457(이들 둘 다 본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 것을 포함한다. 폴리에틸렌 글리콜 스페이서기를 도입함으로써 형광 염료(형광단)와 구아닌 염기 사이의 링커 길이를 변경시킴으로써 그리고 특히 증가시킴으로써, 당염기에 공지된 다른 결합을 통해 구아닌 염기에 부착된 동일한 형광단에 비해 형광 강도를 증가시킬 수 있다는 것이 발견되었다. 링커, 및 특히 그들의 증가된 길이의 설계는 또한 DNA와 같은 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 때, 구아노신 뉴클레오타이드의 구아닌 염기에 부착된 형광단의 밝기 개선을 허용한다. 따라서, 염료가 구아닌-함유 뉴클레오타이드에 부착된 형광 염료 표지의 검출을 필요로 하는 임의의 분석 방법에서 사용하기 위한 것일 때, W0 2007/020457에 기재된 바와 같이, 링커가 화학식 $-(\text{CH}_2)_n\text{O}-$ 의 스페이서기를 포함한다면 유리하며, n은 2 내지 50의 정수이다.

[0192] 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 당 또는 핵염기 상의 부위에 표지될 수 있다. 당염자에 의해 이해되는 바와 같은 "뉴클레오타이드"는 질소성 염기, 당, 및 하나 이상의 인산염기로 이루어진다. RNA에서, 당은 리보스이고, DNA에서 데옥시리보스, 즉, 리보스 상에 존재하는 하이드록실기가 없는 당이다. 질소성 염기는 퓨린 또는 피리미딘의 유도체이다. 퓨린은 아데닌(A) 및 구아닌(G)이고, 피리미딘은 사이토신(C) 및 티민(T)이거나 RNA와 관련하여, 유라실(U)이다. 데옥시리보스의 C-1 원자는 피리미딘의 N-1 또는 퓨린의 N-9에 결합된다. 뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오사이드의 인산염 에스터이고, 하이드록실기 상에서 생기는 에스터화는 당의 C-3 또는 C-5에 부착된다. 뉴클레오타이드는 보통 일-, 이- 또는 삼인산염이다.

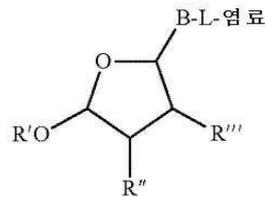
[0193] "뉴클레오사이드"는 뉴클레오타이드에 구조적으로 유사하지만, 인산염 모이어티가 상실된다. 뉴클레오사이드 유사체의 예는 표지가 염기에 연결되며 당 분자에 부착된 인산염기가 없는 것이다.

[0194] 염기는 보통 퓨린 또는 피리미딘으로서 지칭되지만, 당염자는 왓슨-크릭 염기쌍을 겪는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드의 능력을 변경시키지 않는 유도체 및 유사체가 이용 가능하다는 것을 인식할 것이다. "유도체" 또는 "유사체"는 코어 분자가 동일한 또는 모 화합물과 매우 유사하지만, 유도체 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드가 다른 분자에 연결되도록 허용하는 화학적 또는 물리적 변형, 예컨대 상이한 또는 추가적인 측기를 갖는 화합물 또는 분자를 의미한다. 예를 들어, 염기는 테아자퓨린일 수 있다. 유도체는 왓슨-크릭 쌍을 겪을 수 있어야 한다. "유도체" 및 "유사체"는 또한 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 당 모이어티를 갖는 합성 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 유도체를 의미한다. 이러한 유도체 및 유사체는, 예를 들어, 문헌[Scheit, *Nucleotide analogs* (John Wiley & Son, 1980) 및 Uhlman *et al.*, *Chemical Reviews* 90:543-584, 1990]에서 논의된다. 뉴클레오타이드 유사체는 또한 포스포포티오에이트, 포스포로다이티오에이트, 알킬-포스포네이트, 포스포라닐리테이트, 포스포르아미테이트 결합 등을 포함하는 변형된 포스포다이에스터 결합을 포함할 수 있다.

[0195] 염료는 링커를 통해 뉴클레오타이드 염기 상의 임의의 위치에 부착될 수 있고, 단, 왓슨-크릭 염기쌍은 여전히 수행될 수 있다. 특정 핵염기 표지 부위는 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-테아자 퓨린 염기의 C7 위치를 포함한다. 상기 기재한 바와 같은, 링커기는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 염료를 공유적으로 부착하기 위해 사용될 수 있다.

[0196] 특정 실시형태에서 표지 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드는 효소적으로 혼입 가능하고 효소적으로 연장될 수 있다. 따라서, 화합물이 핵산 복제 효소에 의한 뉴클레오타이드의 전반적인 결합 및 인식을 상당히 방해하지 않도록 링커 모이어티는 화합물에 뉴클레오타이드를 연결하기에 충분한 길이를 가질 수 있다. 따라서, 링커는 또한 스페이서 단위, 스페이서 거리, 예를 들어, 절단 부위 또는 표지로부터의 뉴클레오타이드 염기를 포함할 수 있다.

[0197] 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료로 표지된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드는 하기 식을 가질 수 있다:



[0198]

[0199] 식 중, 염료는 염료 화합물이고, B는 핵염기, 예를 들어 유라실, 티민, 사이토신, 아데닌, 구아닌 등이며, L은 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 선택적 링커기이다. R'은 H, 일인산염, 이인산염, 삼인산염, 티오인산염, 인산염 에스터 유사체, 반응성 인 함유기에 부착된 -O- 또는 차단기에 의해 보호된 -O-일 수 있다. R''은 H, OH, 포스포르아미다이트 또는 3'-OH 차단기일 수 있으며, R'''는 H 또는 OH이고; 여기서, R''는 포스포르아미다이트이며, R'는 자동화된 합성 조건 하에서 후속적 단량체 결합을 허용하는 산-절단성 하이드록실 보호기이다.

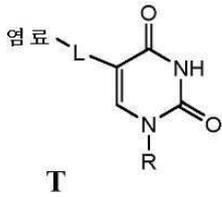
[0200] 일부 예에서, 차단기는 별개의 그리고 독립적인 염료 화합물이며, 즉, 그에 부착되지 않는다. 대안적으로, 염료는 3'-OH 차단기의 모두 또는 부분을 포함할 수 있다. 따라서, R''은 염료 화합물을 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있는 3'-OH 차단기일 수 있다. 추가적인 대안의 실시형태에서, 염료에 부착되는 펜토스 당 및 염료 (또는 염료 및 링커 작제물)의 3' 탄소 상에서 차단기는 없으며, 예를 들어, 3' 부위 이외의 지점으로부터 추가적인 뉴클레오타이드의 혼입에 대한 차단으로서 작용하기에 충분한 크기 또는 구조일 수 있다. 따라서, 차단은 입체 장애에 기인할 수 있거나 또는 크기, 전하 및 구조의 조합에 기인할 수 있다.

[0201] 차단기의 사용은, 예컨대 변형된 뉴클레오타이드가 혼입될 때 연장을 중단시킴으로써 중합이 제어되도록 허용한다. 차단 효과가, 예를 들어 비제한적 예로서, 화학적 조건을 변형시킴으로써 또는 화학적 차단 제거에 의해 가역적이라면, 연장은 특정 지점에서 중단될 수 있고, 계속해서 허용되었다. 3'-OH 차단기의 비제한적 예는 본 명세서에 참고로 포함되는 WO 2004/018497 및 W02014/139596에 개시된 것을 포함한다. 예를 들어 차단기는 아지도메틸(-CH₂N₃) 또는 치환된 아지도메틸(예를 들어, -CH(CHF₂)N₃ 또는 CH(CH₂F)N₃), 또는 알릴일 수 있다.

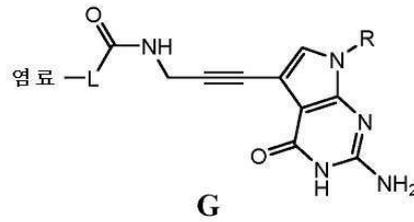
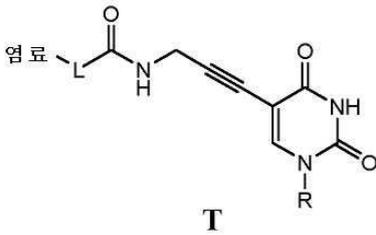
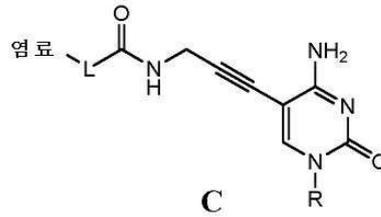
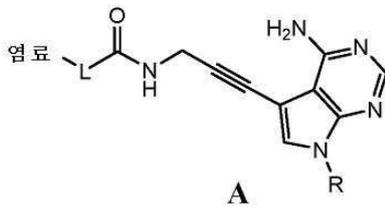
[0202] 특정 실시형태에서, 링커와 차단기가 둘 다 존재하며, 실질적으로 유사한 조건 하에서 둘 다 절단성인 별개의 모이어티이다. 따라서 탈보호 및 탈차단 과정은 더 효율적일 수 있는데, 염료 화합물과 차단기 둘 다를 제거하는 데 단일 처리만이 필요할 것이기 때문이다.

[0203] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 염료 화합물을 혼입시키는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것에 관한 것이다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 포스포다이에스터 결합에 결합된 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드를 각각 포함하는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 천연 유래 뉴클레오타이드, 본 명세서에 기재된 표지된 뉴클레오타이드 이외의 비-천연 유래(또는 변형된) 뉴클레오타이드 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있으며, 단, 본 출원에 따른 염료 화합물로 표지된 적어도 하나의 뉴클레오타이드가 존재한다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 비천연 골격 결합 및/또는 비-뉴클레오타이드 화학적 변형을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 표지된 뉴클레오타이드를 포함하는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드의 혼합물을 포함한 키메라 구조가 또한 상정된다.

[0204] 본 명세서에 기재된 비제한적인 예시적 표지 뉴클레오타이드는 하기를 포함한다:

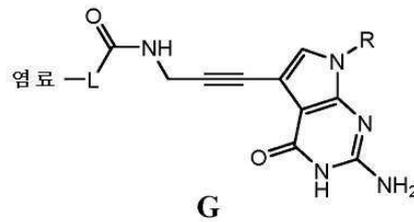
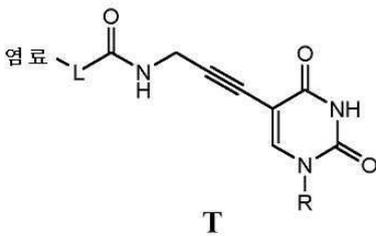
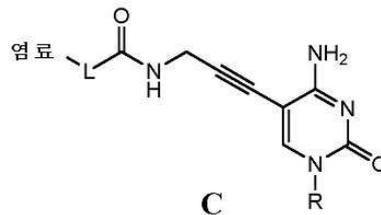
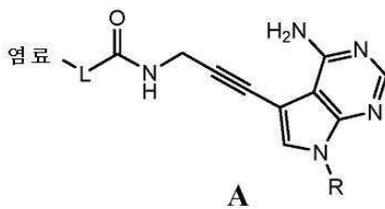


[0205]



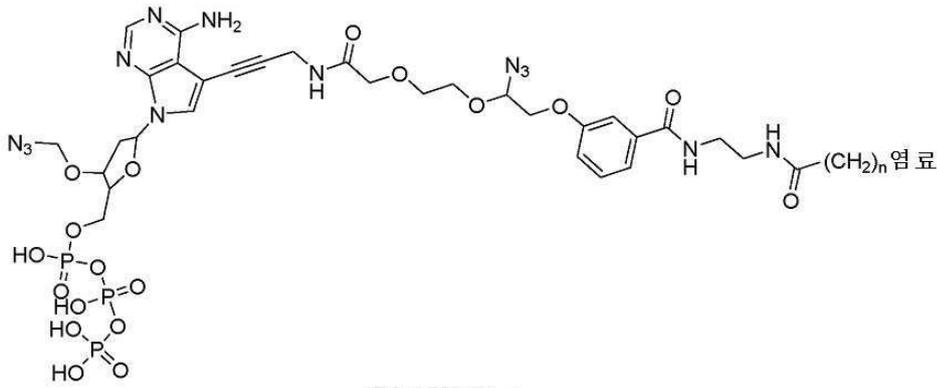
[0206]

[0207] 식 중, L은 링커를 나타내고, R은 상기 기재한 바와 같은 당 잔기를 나타낸다.

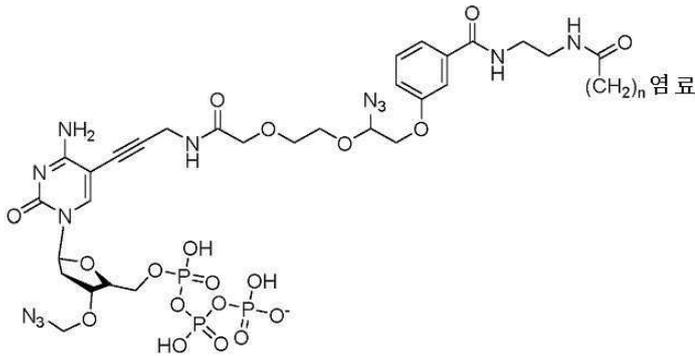


[0208]

[0209] 일부 실시형태에서, 비제한적인 예시적 형광 염료 접합체를 이하에 나타낸다:



ffA-LN3-염료



ffC-LN3-염료

[0210]

[0211]

키트

[0212]

본 명세서에 개시된 일부 실시형태는 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료로 표지된 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드를 포함하는 키트이다. 이러한 키트는 일반적으로 적어도 1종의 추가적인 성분과 함께 염료로 표지된 적어도 하나의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드를 포함할 것이다. 추가적인 성분(들)은 추가로 변형된 또는 비변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드일 수 있다. 예를 들어, 염료로 표지된 뉴클레오타이드는 비표지 또는 천연 뉴클레오타이드와 그리고/또는 형광 표지된 뉴클레오타이드 또는 이들의 임의의 조합물과 조합하여 공급될 수 있다. 뉴클레오타이드의 조합은 별개의 개개 성분으로서 또는 뉴클레오타이드 혼합물로서 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하되, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 새로운 형광 화합물로 표지된 뉴클레오타이드이다. 키트는 2 이상의 표지된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드는 2 이상의 형광 표지로 표지될 수 있다. 표지 중 2 이상은 레이저일 수 있는 단일 여기 공급원을 이용하여 여기될 수 있다.

[0213]

키트는 4개의 뉴클레오타이드를 함유할 수 있으며, 여기서 4개의 뉴클레오타이드 중 제1 뉴클레오타이드는 본 명세서에 개시된 바와 같은 화합물로 표지되고, 제2, 제3 및 제4 뉴클레오타이드는 각각 상이한 화합물로 표지될 수 있고, 각각의 화합물은 별개의 형광 최대값을 가지며, 각각의 화합물은 다른 3가지 화합물과 구별 가능하다. 키트는 2 이상의 화합물이 유사한 흡광도 최대값을 갖지만, 상이한 스토크스 이동을 갖는 것일 수 있다.

[0214]

본 명세서에 기재된 형광 염료 화합물, 표지된 뉴클레오타이드 또는 키트는 서열분석, 발현 분석, 혼성화 분석, 유전자 분석, RNA 분석 또는 단백질 결합 분석에서 사용될 수 있다. 자동 서열분석 기기 상에서 사용될 수 있다. 서열분석 기기는 상이한 파장에서 작동하는 2가지의 레이저를 수용할 수 있다.

[0215]

키트가 염료 화합물로 표지된 복수의, 특히 2개, 더 특별하게는 4개의 뉴클레오타이드를 포함하는 경우에, 상이한 뉴클레오타이드는 상이한 염료 화합물로 표지될 수 있거나, 또는 염료 화합물을 이용하지 않고 어두워질 수 있다. 상이한 뉴클레오타이드가 상이한 염료 화합물로 표지된 경우에, 이는 상기 염료 화합물이 분광학적으로 구별 가능한 형광 염료인 키트의 특징이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "분광학적으로 구별 가능한 형광 염료"는 2 이상의 이러한 염료가 하나의 샘플에 존재할 때 형광 검출 장비(예를 들어, 상업적 모세관 기반 DNA 서열분석 플랫폼)에 의해 구별될 수 있는 파장에서 형광 에너지를 방출하는 형광 염료를 지칭한다. 형광 염료 화합물로 표지된 2개의 뉴클레오타이드가 키트 형태로 공급될 때, 분광학적으로 구별 가능한 형광 염료 중 2

가지는, 예를 들어 일부 실시형태에서 동일한 레이저에 의해 동일한 파장에서 여기될 수 있다. 형광 염료 화합물로 표시된 4개의 뉴클레오타이드가 키트 형태로 공급될 때, 분광학적으로 구별 가능한 형광 염료는 둘 다 하나의 파장에서 여기될 수 있고, 일부 실시형태에서 다른 2가지의 분광학적으로 구별 가능한 염료 염료는 둘 다 다른 파장에서 여기될 수 있다. 특정 여기 파장은 약 460nm이다.

- [0216] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 상이한 파장을 갖는 두 레이저를 이용하여 여기 가능한 염료로 표시될 수 있다.
- [0217] 일 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 화합물로 표시된 뉴클레오타이드 및 제2 염료로 표시된 제2 뉴클레오타이드를 포함하되, 염료는 적어도 10nm, 특히 20nm 내지 50nm의 흡광도 최대값의 차이를 가진다. 더 구체적으로는 2개의 염료 화합물은 15 내지 40nm 또는 20 내지 40nm의 스토크스 이동을 가진다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "스토크스 이동"은 피크 흡수와 피크 방출 파장 사이의 거리이다.
- [0218] 추가 실시형태에서, 상기 키트는 형광 염료로 표시된 2개의 다른 뉴클레오타이드를 추가로 포함하되, 상기 염료는 약 440nm 내지 약 560nm에서 레이저에 의해 여기된다.
- [0219] 대안의 실시형태에서, 키트는 동일한 염기가 두 상이한 화합물로 표시된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 제1 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 화합물로 표시될 수 있다. 제2 뉴클레오타이드는 분광학적으로 별개인 화합물, 예를 들어 600nm 초과에서 흡수하는 '적색' 염료로 표시될 수 있다. 제2 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 형광 염료 화합물과 분광학적으로 별개인 화합물의 혼합물로서 표시될 수 있고, 제4 뉴클레오타이드는 '어두울 수 있으며' 표시를 함유하지 않는다. 따라서 단순한 용어에서, 뉴클레오타이드 1 내지 4는 '녹색', '적색', '적색/녹색' 및 어두운 색으로 표시될 수 있다. 기기를 추가로 단순화시키기 위해, 4개의 뉴클레오타이드는 단일 레이저로 여기된 2개의 염료로 표시될 수 있고, 따라서 뉴클레오타이드 1 내지 4의 표시는 '녹색 1', '녹색 2', '녹색 1/녹색 2' 및 어두운 색일 수 있다.
- [0220] 다른 실시형태에서 키트는 폴리뉴클레오타이드 내로 뉴클레오타이드의 혼입을 촉매할 수 있는 중합효소를 포함할 수 있다. 이러한 키트에 포함될 다른 성분은 완충제 등을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료로 표시된 뉴클레오타이드, 및 상이한 뉴클레오타이드의 혼합물을 포함하는 다른 임의의 뉴클레오타이드 성분은 사용하기 전에 희석될 농축 형태로 키트에서 제공될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 적합한 희석 완충제가 또한 포함될 수 있다.
- [0221] 서열분석 방법
- [0222] 본 명세서에 기재된 형광 염료를 포함하는 뉴클레오타이드(또는 뉴클레오사이드)는 그 자체이든 또는 더 큰 분자 구조 또는 접합체 내로 혼입되든 또는 이와 결합되든 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드에 부착된 형광 표시의 검출이 필요한 임의의 분석 방법에서 사용될 수 있다. 본 출원의 일부 실시형태는 하기를 포함하는 서열분석 방법에 관한 것이다: (a) 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 표시된 뉴클레오타이드를 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입시키는 단계; 및 (b) 상기 변형된 뉴클레오타이드(들)에 부착된 새로운 형광 염료로부터 형광 신호를 검출함으로써 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입된 표시된 뉴클레오타이드(들)를 검출하는 단계.
- [0223] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 표시된 뉴클레오타이드는 중합효소 작용에 의해 합성 단계에서 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입된다. 그러나, 표시된 뉴클레오타이드를 폴리뉴클레오타이드에 혼입시키는 다른 방법, 예컨대 화학적 올리고뉴클레오타이드 합성 또는 표시된 올리고뉴클레오타이드의 비표지 올리고뉴클레오타이드에 대한 결합은 제외되지 않는다. 따라서, 폴리뉴클레오타이드 내로 뉴클레오타이드를 "혼입시키는"이라는 용어는 화학적 방법뿐만 아니라 효소적 방법에 의한 폴리뉴클레오타이드 합성을 포함한다.
- [0224] 방법의 모든 실시형태에서, 검출 단계가 수행될 수 있는 한편, 표시된 뉴클레오타이드가 혼입된 폴리뉴클레오타이드 가닥은 주형 가닥으로 어닐링되고, 또는 이후에 2개 가닥이 분리되는 변성 단계가 수행된다. 추가 단계, 예를 들어 화학적 또는 효소적 반응 단계 또는 정제 단계가 합성 단계와 검출 단계 사이에 포함될 수 있다. 특히, 표시된 뉴클레오타이드(들)를 혼입시키는 표적 가닥이 단리되거나 또는 정제될 수 있고, 이어서, 추가로 가공되거나 또는 후속적 분석에서 사용될 수 있다. 예로서, 합성 단계에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 변형된 뉴클레오타이드(들)로 표시된 표적 폴리뉴클레오타이드는 후속적으로 표시된 프로브 또는 프라이머로서 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서 합성 단계 (a)의 생성물은 추가 반응 단계가 실시될 수 있고, 원한다면, 이들 후속 단계의 생성물은 정제되거나 또는 단리된다.
- [0225] 합성 단계에 대한 적합한 조건은 표준 분자 생물학 기법에 익숙한 것으로 잘 알려질 것이다. 일 실시형태에서, 합성 단계는 적합한 중합효소의 존재 하에 주형에 상보적인 연장된 표적 가닥을 형성하기 위해 본 개시내용에

따른 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 전구체를 이용하는 표준 프라이머 연장 반응과 유사할 수 있다. 다른 실시형태에서, 합성 단계는 표적 및 주형 폴리뉴클레오타이드의 복제로부터 유래된 어닐링된 상보성 가닥을 포함한 표지된 이중 가닥 증폭 산물을 생성하는 증폭 반응의 부분을 그 자체로 형성할 수 있다. 다른 예시적인 "합성" 단계는 틸 번역, 가닥 변위 중합, 무작위 프라이밍 DNA 표지 등을 포함한다. 합성 단계에서 사용되는 중합효소는 본 개시내용에 따른 변형된 뉴클레오타이드의 혼입을 촉매할 수 있어야 한다. 다르게는, 중합효소의 정확한 특성은 특히 제한되지 않지만, 합성 반응의 조건에 의존할 수 있다. 예로서, 합성 반응이 열순환을 이용하여 수행된다면, 열안정성 중합효소가 필요한 반면, 이는 표준 프라이머 연장 반응에 필수적이지 않을 수도 있다. 본 개시내용에 따른 변형된 뉴클레오타이드를 혼입할 수 있는 적합한 열안정성 중합효소는 WO 2005/024010 또는 WO 2006/120433에 기재된 것을 포함한다. 더 낮은 온도, 예컨대 37°C에서 수행된 합성 반응에서, 중합효소는 반드시 열안정성 중합효소일 필요는 없으며, 따라서, 다수의 인자, 예컨대 반응 온도, pH, 가닥-변위 활성 등에 의존할 것이다.

[0226] 특정 비제한적 실시형태에서, 본 출원에 따른 더 스톱스 이동을 갖는 새로운 형광 염료로 표지된 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드는 핵산 서열분석, 재서열분석, 전체 게놈 서열분석, 단일 뉴클레오타이드 다형성 스코어링, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 때 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 검출을 수반하는 임의의 다른 적용, 또는 본 출원에 따른 형광 염료를 포함하는 변형된 뉴클레오타이드로 표지된 폴리뉴클레오타이드의 사용을 필요로 하는 임의의 다른 적용 방법에서 사용될 수 있다.

[0227] 특정 실시형태에서, 본 출원은 폴리뉴클레오타이드 "합성에 따른 서열분석"에서 본 명세서에 기재된 염료 화합물을 포함하는 변형된 뉴클레오타이드의 용도를 제공한다. 합성에 따른 서열분석은 일반적으로 서열분석될 주형 핵산에 상보적인 연장된 폴리뉴클레오타이드 쇄를 형성하기 위해 중합효소 또는 리가제를 이용하여 5'에서 3' 방향으로 늘어나는 폴리뉴클레오타이드 쇄에 대한 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 순차적 첨가를 수반한다. 첨가된 뉴클레오타이드(들) 중 하나 이상에 존재하는 염기의 동일성은 검출 또는 "영상화" 단계에서 결정된다. 첨가된 염기의 동일성은 각각의 뉴클레오타이드 혼입 단계 후에 결정될 수 있다. 이어서, 주형의 서열은 통상적인 왓슨-크릭 염기쌍 규칙을 이용하여 부여될 수 있다. 단일 염기의 동일성 결정을 위해 본 개시내용에 따른 염료로 표지된 변형된 뉴클레오타이드의 용도는, 예를 들어, 단일 뉴클레오타이드 다형성의 스코어링에서 유용할 수 있으며, 이러한 단일 염기 연장 반응은 본 출원의 범주 내이다.

[0228] 실시형태에서, 주형 폴리뉴클레오타이드의 서열은 혼입된 뉴클레오타이드(들)에 부착된 형광 표지(들)의 검출을 통해 서열분석될 주형 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 초기 가닥 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드 혼입을 검출함으로써 결정된다. 주형 폴리뉴클레오타이드의 서열분석은 적합한 프라이머로 프라이밍되고(또는 헤어핀의 부분으로서 프라이머를 함유할 헤어핀 작제물로서 제조됨), 초기 쇄는 중합효소 촉매 반응에서 프라이머의 3' 말단에 대한 뉴클레오타이드의 첨가에 의해 단계적 방식으로 연장된다.

[0229] 특정 실시형태에서, 각각의 상이한 뉴클레오타이드 삼인산염(A, T, G 및 C)은 독특한 형광단으로 표지될 수 있고, 또한 비제한적 중합을 방지하기 위해 3' 위치에서 차단기를 포함한다. 대안적으로, 4개의 뉴클레오타이드 중 하나는 비표지(어두운 색)일 수 있다. 중합효소는 주형 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 초기 쇄 내로 뉴클레오타이드를 혼입시키고, 차단기는 뉴클레오타이드의 추가적인 혼입을 방지한다. 임의의 비혼입 뉴클레오타이드는 제거되며, 각각의 혼입된 뉴클레오타이드로부터의 형광 신호는 적합한 수단, 예컨대 레이저 여기 및 적합한 방출 필터를 이용하는 전하 결합 소자에 의해 광학적으로 "판독"된다. 이어서, 3'-차단기 및 형광 염료 화합물은, 추가적인 뉴클레오타이드 혼입에 대해 초기 쇄를 노출시키기 위해 특히 동일한 화학적 또는 효소적 방법에 의해 제거된다(탈보호된다). 전형적으로, 혼입된 뉴클레오타이드의 동일성은 각각의 혼입 단계 후에 결정될 것이지만, 이는 엄격하게 필수적이지 않다. 유사하게, 미국 특허 제5,302,509호는 고체 지지체 상에 고정된 폴리뉴클레오타이드를 서열분석하는 방법을 개시한다. 상기 방법은 DNA 중합효소의 존재 하에서 고정된 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 점점 늘어나는 가닥 내로의 형광 표지된, 3'-차단된 뉴클레오타이드 A, G, C 및 T의 혼입에 의존한다. 중합효소는 표적 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 염기를 혼입하지만, 3'-차단기에 의한 추가적인 첨가로부터 방지된다. 이어서, 혼입된 뉴클레오타이드의 표지는 결정될 수 있으며, 차단기는 추가적인 중합이 일어나도록 화학적 절단에 의해 제거될 수 있다. 합성 반응에 따른 서열분석에서 서열분석될 핵산 주형은 서열분석이 요망되는 임의의 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 서열분석 반응을 위한 핵산 주형은 전형적으로 서열분석 반응에서 추가적인 뉴클레오타이드의 첨가를 위한 프라이머 또는 개시 지점으로서 작용하는 유리 3' 하이드록실기를 갖는 이중 가닥 영역을 포함할 것이다. 서열분석될 주형의 영역은 상보성 가닥 상에서 이런 유리 3' 하이드록실기를 돌출시킬 것이다. 서열분석될 주형의 돌출 영역은 단일 가닥일 수 있지만, 이중 가닥일 수 있고, 단, "틈"은 서열분석 반응의 개시를 위해 유리 3' OH기를 제공하도록 서열분석될 주형 가닥에 상보적인

가닥 상에 존재한다. 이러한 실시형태에서, 서열분석은 가닥 변위에 의해 진행될 수 있다. 특정 실시형태에서, 유리 3' 하이드록실기를 보유하는 프라이머는 서열분석될 주형의 단일 가닥 영역에 혼성화하는 별개의 성분(예를 들어, 짧은 올리고뉴클레오타이드)으로서 첨가될 수 있다. 대안적으로, 서열분석될 프라이머 및 주형 가닥은 각각 분자내 이중가닥, 예컨대 헤어핀 루프 구조를 형성할 수 있는 부분적으로 자기-상보성인 핵산 가닥의 부분을 형성할 수 있다. 헤어핀 폴리뉴클레오타이드 및 그들이 고체 지지체에 부착될 수 있는 방법은 국제 특허 출원 공개 WO 2001/057248 및 WO 2005/047301에 개시되어 있다. 뉴클레오타이드는 유리 3'-하이드록실기에 연속해서 첨가되어, 5'에서 3' 방향으로 폴리뉴클레오타이드 쇄의 합성을 초래한다. 첨가된 염기의 특성은, 특히 반드시 각각의 뉴클레오타이드 첨가 후는 아니지만, 결정될 수 있으며, 따라서 핵산 주형에 대한 서열 정보를 제공한다. 본 내용에서 핵산 가닥(또는 폴리뉴클레오타이드) 내로 뉴클레오타이드의 "혼입"이라는 용어는 뉴클레오타이드의 5' 인산염기와 포스포다이에스터 결합의 형성을 통한 핵산 가닥의 유리 3' 하이드록실기에 대한 뉴클레오타이드의 결합을 지칭한다.

[0230] 서열분석될 핵산 주형은 DNA 또는 RNA, 또는 심지어 데옥시뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함한 혼성 분자일 수 있다. 핵산 주형은 천연 유래 및/또는 비천연 유래 뉴클레오타이드 및 천연 또는 비천연 골격 결합을 포함할 수 있으며, 단, 이들은 서열분석 반응에서 주형의 복제를 방지하지 않는다.

[0231] 특정 실시형태에서, 서열분석될 핵산 주형은 당업계에 공지된 임의의 적합하나 결합 방법을 통해, 예를 들어, 공유적으로 부착을 통해 고체 지지체에 부착될 수 있다. 특정 실시형태에서, 주형 폴리뉴클레오타이드는 고체 지지체(예를 들어, 실리카계 지지체)에 직접 부착될 수 있다. 그러나, 다른 실시형태에서, 고체 지지체의 표면은 주형 폴리뉴클레오타이드의 직접 공유적으로 부착을 허용하기 위해 또는 그 자체가 고체 지지체에 비공유적으로 부착될 수 있는 하이드로겔 또는 고분자전해질을 통해 주형 폴리뉴클레오타이드를 고정시키기 위해 일부 방법에서 변형될 수 있다.

[0232] 폴리뉴클레오타이드가 실리카계 지지체에 직접 부착된 어레이는, 예를 들어 국제 특허 출원 WO 2000/006770에 개시된 것이되, 폴리뉴클레오타이드는 유리 상의 현수 예폭사이드기와 폴리뉴클레오타이드 상의 내부 아미노기 사이의 반응에 의해 유리 지지체 상에 고정된다. 추가로, 국제 특허 출원 공개 WO2005/047301은, 예를 들어 황계 친핵체와 고체 지지체와의 반응에 의한, SMA의 제조에서 사용하기 위한 고체 지지체에 부착된 폴리뉴클레오타이드의 어레이를 개시한다. 고체-지지된 주형 폴리뉴클레오타이드의 또한 추가적인 예는 실리카계 또는 다른 고체 지지체 상에서 지지된 하이드로겔에 부착되는 경우이다. 실리카계 지지체는 전형적으로 국제 특허 출원 공개 WO 00/31148, WO 01/01143, WO02/12566, WO 03/014392, WO 00/53812 및 미국 특허 제6,465,178호에 기재된 바와 같은 하이드로겔 및 하이드로겔 어레이를 지지하기 위해 사용된다.

[0233] 주형 폴리뉴클레오타이드가 고정될 수 있는 특정 표면은 폴리아크릴아마이드 하이드로겔이다. 폴리아크릴아마이드 하이드로겔은 선행기술에 기재되어 있으며, 이 중 일부는 상기 논의된다. 본 출원에서 사용될 수 있는 특정 하이드로겔은 WO 2005/065814 및 미국 특허 공개 제2014/0079923호에 기재된 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 하이드로겔은 PAZAM(폴리(N-(5-아지도아세트아미딜펜틸) 아크릴아마이드-코-아크릴아마이드))이다.

[0234] DNA 주형 분자는, 예를 들어 미국 특허 제6,172,218호에 기재된 바와 같은 서열분석 목적을 위해 비드 또는 마이크로입자에 부착될 수 있다. 각각의 비드가 상이한 DNA 서열을 함유하는 비드 라이브러리 제조의 추가적인 예는 문헌[Margulies *et al.*, Nature 437, 376-380 (2005); Shendure *et al.*, Science. 309(5741):1728-1732 (2005)]에서 발견할 수 있다. 기재한 바와 같은 뉴클레오타이드를 이용하는 이러한 비드의 어레이의 서열분석은 본 출원의 범주 내이다.

[0235] 서열분석될 주형(들)은 고체 지지체 상의 "어레이"의 부분을 형성할 수 있으며, 이 경우에 어레이는 임의의 편리한 형태를 취할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 방법은 단일 분자 어레이, 클러스터링된 어레이 및 비드 어레이를 포함하는 모든 유형의 "고밀도" 어레이에 적용 가능하다. 본 출원의 염료 화합물로 표시된 변형된 뉴클레오타이드는 고체 지지체, 더 구체적으로는 임의의 유형의 고밀도 어레이 상에서 핵산 분자의 고정에 의해 형성되는 본질적으로 임의의 유형의 어레이 상의 주형의 서열분석을 위해 사용될 수 있다. 그러나, 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료로 표시된 변형된 뉴클레오타이드는 클러스터링된 어레이의 서열분석과 관련하여 특히 유리하다.

[0236] 다중-폴리뉴클레오타이드 또는 클러스터링된 어레이에서, 어레이 상의 별개의 영역은 다중 폴리뉴클레오타이드 주형 분자를 포함한다. 용어 "클러스터링 어레이"는 어레이 상의 별개의 영역 또는 부위가 광학 수단에 의해 개별적으로 분해 가능하지 않은 다중 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는 어레이를 지칭한다. 어레이가 형성되는 방법에 따라서, 어레이 상의 각각의 부위는 하나의 개개 폴리뉴클레오타이드 분자의 다중 복제물 또는 심지어

소수의 상이한 폴리뉴클레오타이드 분자의 다중 복제물(예를 들어, 2개의 상보성 핵산 가닥의 다중 복제물)을 포함할 수 있다. 핵산 분자의 다중-폴리뉴클레오타이드 또는 클러스터링된 어레이는 당업계에 일반적으로 공지된 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 예로서, WO 98/44151과 WO 00/18957은 둘 다 핵산의 증폭 방법을 기재하되, 주형과 증폭 산물은 둘 다 고정된 핵산 분자의 클러스터 또는 "콜로니"를 포함한 어레이를 형성하기 위해 고체 지지체 상에서 고정된 채로 남아있다. 이들 방법에 따라 제조되는 클러스터링된 어레이 상에 존재하는 핵산 분자는 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료로 표지된 변형된 뉴클레오타이드를 이용하는 서열분석을 위한 적합한 주형이다.

[0237] 본 출원의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오타이드는 또한 단일 분자 어레이 상에서의 주형의 서열분석에서 유용하다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "단일 분자 어레이" 또는 "SMA"는 고체 지지체 위로 분포된(또는 어레이된) 폴리뉴클레오타이드 분자의 집단을 지칭하되, 모든 다른 집단으로부터의 임의의 개개 폴리뉴클레오타이드의 간격은 폴리뉴클레오타이드의 개개 분해를 달성할 수 있도록 한다. 따라서 고체 지지체의 표면 상에 고정된 표적 핵산 분자는 광학 수단에 의해 분해될 수 있어야 한다. 이는 사용되는 특정 영상화 장치의 분해 가능한 영역 내에서, 각각 하나의 폴리뉴클레오타이드를 나타내는 하나 이상의 별개의 신호가 있어야 한다는 것을 의미한다.

[0238] 이는 달성될 수 있되, 어레이 상의 인접한 폴리뉴클레오타이드 분자 사이의 간격은 적어도 100nm, 더 구체적으로는 적어도 250nm, 훨씬 더 구체적으로는 적어도 300nm, 더욱 더 구체적으로는 적어도 350nm이다. 따라서, 각각의 분자는 단일 분자 형광 지점으로서 개별적으로 분해 가능하고 검출가능하며, 상기 단일 분자 형광 지점으로부터의 형광은 또한 단일 단계 광표백을 나타낸다.

[0239] 용어 "개별적으로 분해된" 그리고 "개개의 분해"는 시각화될 때 그의 이웃하는 분자로부터의 어레이 상의 하나의 분자를 구별할 수 있다는 것을 구체화하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 어레이 상의 개개 분자의 분리는 개개 분자를 분해시키기 위해 사용되는 특정 기법에 의해 부분적으로 결정될 것이다. 단일 분자 어레이의 일반적인 특징은 국제 특허 출원 공개 WO 2000/006770 및 WO 2001/057248을 참고로 하여 이해될 것이다. 본 개시내용의 변형된 뉴클레오타이드의 한 가지 적용은 합성 반응에 따른 서열분석이지만, 이러한 표지된 뉴클레오타이드의 효용은 이러한 방법으로 제한되지 않는다. 사실, 뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드에 혼입된 뉴클레오타이드에 부착된 형광 표지의 검출을 필요로 하는 임의의 서열분석 방법에서 유리하게 사용될 수 있다.

[0240] 특히, 본 출원의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오타이드는 자동 형광 서열분석 프로토콜, 특히, 생어 및 공동작업자의 쇠 종결 서열분석 방법에 기반한 형광 염료 종결자 순환 서열분석에서 사용될 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 프라이머 연장 서열분석 반응에서 형광 표지된 다이데옥시뉴클레오타이드를 혼입시키기 위해 효소 및 순환 서열분석을 사용한다. 소위 생어 서열분석 방법, 및 관련된 프로토콜(생어 유형)은 표지된 다이데옥시뉴클레오타이드에 의한 무작위 쇠 종결에 의존한다.

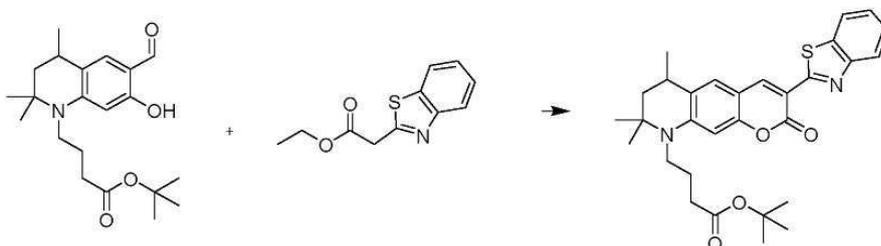
[0241] 따라서, 본 개시내용은 또한 3'과 2' 위치 둘 다에서 하이드록실기가 없는 다이데옥시뉴클레오타이드인 본 명세서에 기재된 바와 같은 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며, 이러한 변형된 다이데옥시뉴클레오타이드는 생어 유형 서열분석 방법 등에서 사용하기에 적합하다.

[0242] 실시예

[0243] 다음의 실시예에서 추가적인 실시형태를 추가로 상세하게 개시하며, 이는 청구범위의 범주를 어떤 방법으로 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0244] 실시예 1

[0245] tert-부틸 4-[3-(벤조[d]티아졸-2-일)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-7,8-다이하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(6H)-일]부타노에이트(화합물 I-1)

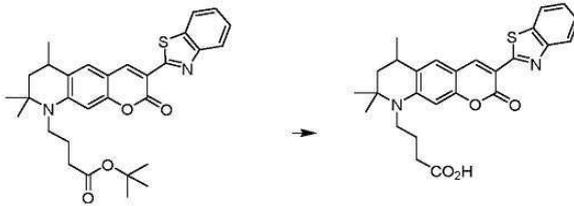


[0246]

[0247] tert-부틸 4-(6-폼일-7-하이드록시-2,2,4-트라이메틸-3,4-다이하이드로퀴놀린-1(2H)-일)부타노에이트(0.19g)를 에탄올(2ml) 중에 용해시켰다. 에틸 2-(벤조[d]티아졸-2-일)아세테이트(0.124g)를 첨가하고 나서, 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반시켰다. 피페리딘(5 μ l)을 첨가하고 나서, 반응 혼합물의 색은 적황색으로 바뀌었다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시키면서 두었다. 다음날 조질의 반응 혼합물은 수성 워크업, 건조, 및 크로마토그래피(용리액으로서 석유 에터/에틸 아세테이트를 이용하는 실리카겔)에 의해 정제시켜 화합물 I-1을 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 518.22. 실측치: (-) 517 (M-1).

[0248] 실시예 2

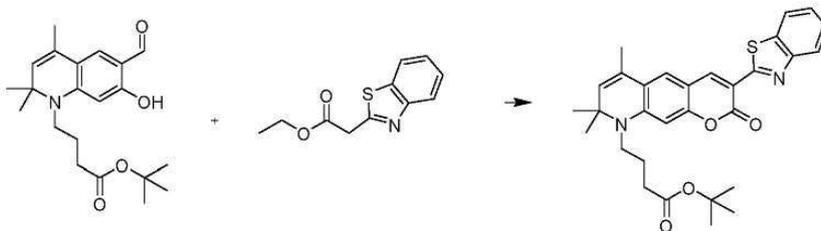
[0249] 4-[3-(벤조[d]티아졸-2-일)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-7,8-다이하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(6H)-일]부탄산(화합물 I-2)



[0250] 화합물 I-1(51.8mg)을 DCM(5ml) 중에 용해시키고 나서, 트리플루오로아세트산(0.5ml)을 주사기를 통해 첨가하고, 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반시키면서 두었다. 회전 증발기를 이용하여 용매를 증류시키고, 잔사를 물(5ml)과 함께 분쇄시키고 나서, 고체를 여과시키고 건조시켜 화합물 I-2를 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 462.16. 실측치: (-) 461 (M-1).

[0252] 실시예 3

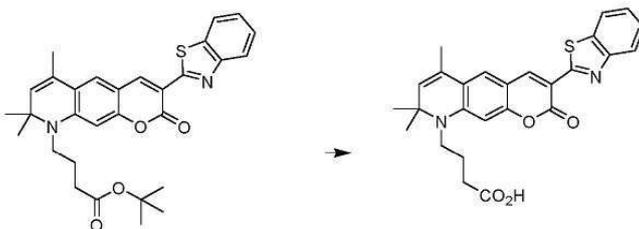
[0253] tert-부틸 4-[3-(벤조[d]티아졸-2-일)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(6H)-일]부타노에이트(화합물 I-3)



[0254] tert-부틸 4-(6-폼일-7-하이드록시-2,2,4-트라이메틸-퀴놀린-1(2H)-일)부타노에이트(0.19g)를 에탄올(2ml) 중에 용해시켰다. 에틸 2-(벤조[d]티아졸-2-일)아세테이트(0.124g)를 첨가하고 나서, 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반시켰다. 피페리딘(5 μ l)을 첨가하였고, 반응 혼합물의 색은 적황색으로 바뀌었다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시키면서 두었고, 조질의 반응 혼합물은 수성 워크업, 건조 및 크로마토그래피(용리액으로서 석유 에터/에틸 아세테이트를 이용하는 실리카겔)에 의해 정제시켜 화합물 I-3을 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 516.22. 실측치: (-) 515 (M-1); (+) 517 (M+1).

[0256] 실시예 4

[0257] 4-[3-(벤조[d]티아졸-2-일)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(6H)-일]부탄산(화합물 I-4)



[0258] 화합물 I-3(51.7mg)을 DCM(6ml) 중에 용해시키고 나서, 트리플루오로아세트산(1ml)을 주사기를 통해

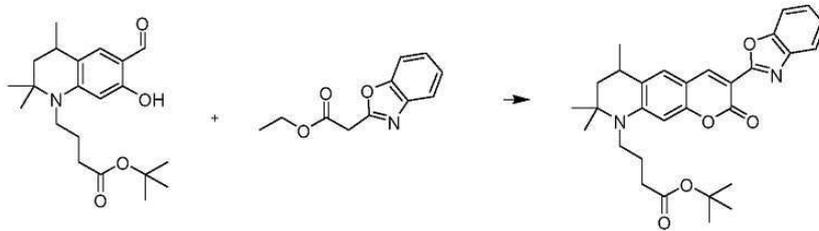
첨가하고, 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반시키면서 두었다. 회전 증발기를 이용하여 용매를 증류시키고, 잔사를 물(5ml)과 함께 분쇄시켰다. 형성된 고체를 여과 후, 건조시켜 화합물 1-4를 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 460.15. 실측치: (+) 461 (M+1).

[0260]

실시예 5

[0261]

t-부틸 4-[3-(벤조사졸린-2-일)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-7,8-다이하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(6H)-일]부타노에이트(화합물 I-5)



[0262]

[0263]

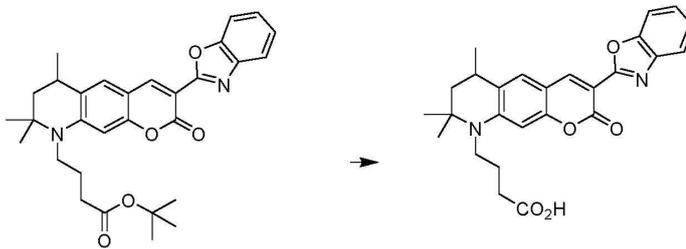
tert-부틸 4-(6-폼일-7-하이드록시-2,2,4-트라이메틸-3,4-다이하이드로퀴놀린-1(2H)-일)부타노에이트(0.18g)를 에탄올(3ml) 중에 용해시켰다. 에틸 2-(벤조사졸린)아세테이트(0.124g)를 첨가하고 나서, 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반시켰다. 피페리딘(5 μ l)을 첨가하였다. 반응 혼합물의 색은 적황색으로 바뀌었다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시키면서 두었다. 조질의 반응 혼합물을 수성 워크업, 건조 및 크로마토그래피(용리액으로서 석유 에터/에틸 아세테이트를 이용하는 실리카겔)에 의해 정제시켜 화합물 1-5를 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 502.25. 실측치: (-) 501 (M-1).

[0264]

실시예 6

[0265]

4-[3-벤조사졸-2-일)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-7,8-다이하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(6H)-일]부탄산(화합물 I-6)



[0266]

[0267]

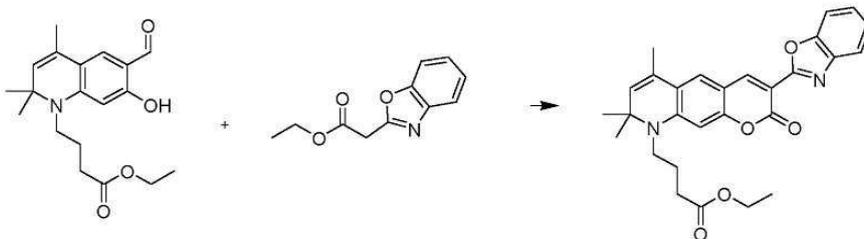
화합물 I-5(50mg)를 DCM(5ml) 중에 용해시키고 나서, 트리플루오로아세트산(0.5ml)을 주사기를 통해 첨가하고, 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반시키면서 두었다. 회전 증발기를 이용하여 용매를 증류시키고, 잔사를 물(5ml)과 함께 분쇄시켰다. 형성된 고체를 여과 후, 건조시켜 화합물 I-6을 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 446.16. 실측치: (-) 445 (M-1).

[0268]

실시예 7

[0269]

에틸 4-[3-(벤조사졸-2-일)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-7,8-다이하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(6H)-일]부타노에이트(화합물 I-7)



[0270]

[0271]

에틸 4-[6-폼일-7-하이드록시-2,2,4-트라이메틸-3,4-퀴놀린-1(2H)-일]부타노에이트(0.17g)를 무수 에탄올(2.5ml) 중에 용해시켰다. 에틸 2-(벤조사졸-2-일)아세테이트(0.102g)을 첨가하였고, 혼합물을 실온에서

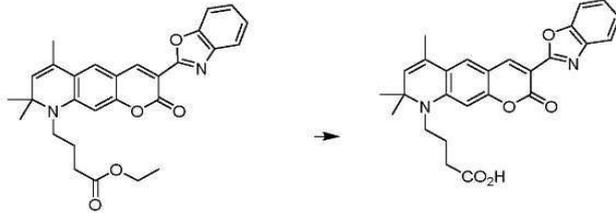
15분 동안 교반시켰다. 피페리딘(5 μ l)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시키면서 두었다. 조질의 반응 혼합물을 수성 워크업, 건조 및 크로마토그래피(용리액으로서 석유 에터/에틸 아세테이트를 이용하는 실리카겔)에 의해 정제시켜 화합물 I-7을 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 472.20. 실측치: (+) 473 (M+1).

[0272]

실시예 8

[0273]

4-[3-(벤조사졸-2-일)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(6H)-일]부탄산(화합물 I-8)



[0274]

[0275]

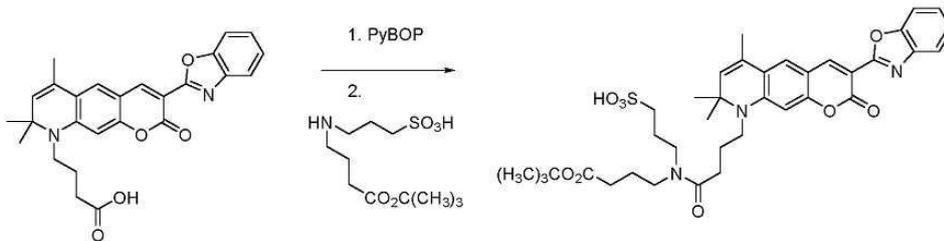
화합물 I-7(51.8mg)을 아세트산(2.5ml) 중에 용해시키고 나서, 염산(5ml)을 첨가하였고, 반응 혼합물을 밤새 60 $^{\circ}$ C에서 교반시키면서 두었다. 회전 증발기를 이용하여 용매를 증류시키고, 잔사를 물(5ml)과 함께 분쇄시켰다. 화합물 I-8을 여과시키고 나서, 진공에서 건조시켰다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 444.17. 실측치: (+) 445 (M+1).

[0276]

실시예 9

[0277]

3-[4-(3-(벤조사졸-2-일)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(8H)-일)-N-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부틸)부탄아미도]프로판-1-설폰산(화합물 I-9)



[0278]

[0279]

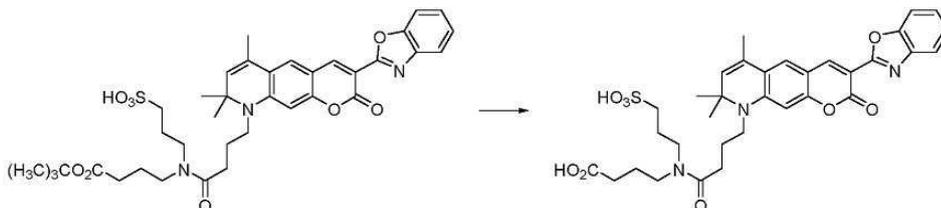
화합물 I-8(50mg, 112 μ mol)을 다이메틸폼아마이드(1ml) 중에 용해시키고, 그리고, 이어서, 용매를 진공에서 증류시켰다. 이 작업을 2회 반복하였고, 이어서, 건조시킨 화합물 I-8을 실온에서 DMF(1ml) 중에서 재용해시켰다. (벤조트리아졸-1-일옥시)트라이피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyBOP, 1.5 eq., 64mg, 169 μ mol)를 플라스크에 첨가하고, 이어서, N,N-다이아이소프로필에틸아민(DIPEA, 3 eq., 336 μ mol, 43mg, 58 μ l)을 마이크로피펫을 통해 첨가하였다. 반응 플라스크를 질소 가스 하에 밀봉시켰다. 반응이 완료된 후에, DMF 중의 활성화된 염료 용액을 3-[(4-(tert-부톡시)-4-옥소부틸)아미도]프로판-1-설폰산염(1.5 eq., 224 μ mol, 63mg)과 혼합하였다. 더 많은 DIPEA(3 eq., 336 μ mol, 43mg, 58 μ l)를 첨가하였다. 플라스크를 질소 가스 하에 다시 밀봉시키고 나서, 밤새 실온에 두었다. TLC, HPLC 및 (LCMS)에 의해 반응 진행을 모니터링하였다. 반응이 완료되었을 때, 물(2ml)을 첨가하였고, 반응 혼합물을 15분 동안 교반시키고 그리고, 이어서, 진공으로 실온에서 용매를 반응 혼합물로부터 증류시켰다. 화합물 I-9를 어떠한 추가적인 정제도 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[0280]

실시예 10

[0281]

4-[4-(3-(벤조사졸-2-일)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(8H)-일)-N-(3-설포프로필)부탄아미도]부탄산(화합물 I-10)

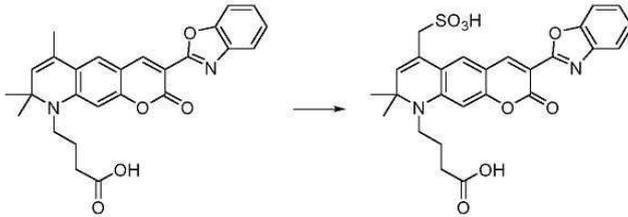


[0282]

[0283] 건조시킨 조질의 화합물 I-9를 다이클로로메탄(2ml) 중에 재용해시켰다. 트라이플루오로아세트산(0.5ml)을 첨가하였고, 반응물을 밤새 실온에서 교반시키면서 두었다. 반응물을 물로 킁칭시키고 나서, 진공에서 농축시키고, 이어서, 분취-HPLC에 의해 정제하였다. 생성물의 순도, 구조 및 조성을 HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 651.23. 실측치: (-) 650 (M-1).

[0284] 실시예 11

[0285] 4-[3-(벤조사졸-2-일)-8,8-다이메틸-2-옥소-6-(설포메틸)-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-9(8H)-일]부탄산(화합물 I-11)

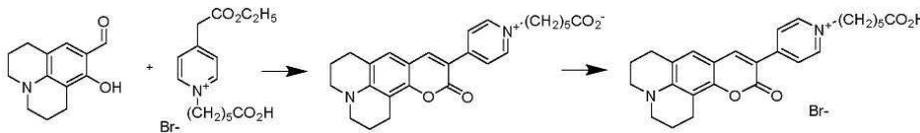


[0286]

[0287] 황산(2.5ml)을 약 5℃로 냉각시키고, 이어서, 화합물 I-8(45mg)을 첨가하고 나서, 반응 혼합물을 20 내지 25℃에서 1시간 동안 교반시켰다. 이어서, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 유지시켰다. 반응 혼합물을 무수 에터 외부 냉각의 존재 하에 무수 에터로 서서히 희석시켰다. 침전물을 여과시키고 나서, 물(5ml)과 아세트나이트릴(5ml)의 혼합물 중에 용해시켰다. 용액을 여과시키고 나서 분취 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물의 순도, 구조 및 조성을 HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 524.13. 실측치: (-) 623 (M-1).

[0288] 실시예 12

[0289] 1-[(5-카복시헵틸)-4-(11-옥소-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-10-일)피리디늄 브로마이드(화합물 I-12)

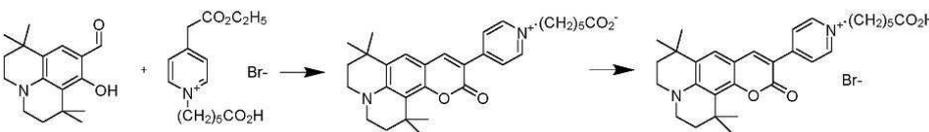


[0290]

[0291] 8-하이드록시-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H-피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-카보알데하이드(0.217g)를 에탄올(6ml) 중에 용해시켰다. 이 용액에 1-[(5-카복시헵틸)-(4-에톡시카보닐)메틸]피리디늄 브로마이드(0.36g)를 첨가하였고, 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반시켰다. 에탄올(5ml) 중의 피페리딘(20mg) 및 아세트산(20mg)으로부터 제조한 피페리딘 아세테이트 용액을 첨가하였고, 이 반응 혼합물을 60℃에서 5시간 동안 교반시키고, 이어서, 밤새 실온에서 교반시켰다. 용매를 증류시키고 나서, 잔사를 물(15ml)과 아세트나이트릴(15ml)의 혼합물 중에 용해시켰다. 얻어진 용액을 여과시키고 나서, 분취 HPLC에 의해 정제하였다. 이 화합물은 더 안정한 브로민화수소산염 형태로 전환되어 화합물 I-12를 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 432.20. 실측치: (+) 433 (M+1).

[0292] 실시예 13

[0293] 1-(5-카복시헵틸)-4-(1,1,7,7-테트라메틸-11-옥소-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-10-일)피리딘-1-이움 브로마이드(화합물 I-13)



[0294]

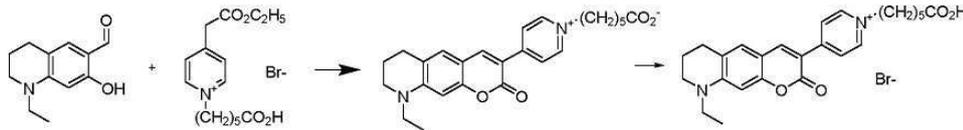
[0295] 8-하이드록시-2,3,6,7-테트라하이드로-1,1,7,7-테트라메틸-1H,5H-피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-카보알데하이드(0.27g)를 에탄올(7ml) 중에 용해시켰다. 1-[(5-카복시헵틸)-(4-에톡시카보닐)메틸]피리디늄 브로마이드(0.36g)를 첨가하였고, 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반시켰다. 에탄올(5ml) 중에서 피페리딘(20mg) 및 아세트산(20mg)으로부터 제조한 피페리딘 아세테이트 용액을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 60℃에서 5시간 동안 교반시키고, 이어서, 밤새 실온에서 교반시켰다. 용매를 증류시키고 나서, 적색 잔사를 물(15ml)과 아세트나이트릴(15ml)의 혼

합물 중에 용해시켰다. 얻어진 용액을 여과시키고 나서, 분취 HPLC에 의해 정제하였다. 이 화합물을 아세트산 (10%, 0.3ml) 중에서 HBr 용액과의 반응에 의해 더 안정한 브로민화수소산염 형태로 전환시켜 화합물 I-13을 얻었다.

[0296] HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 488.27. 실측치: (+) 489 (M+1).

[0297] 실시예 14

[0298] 1-(5-카복시펜틸)-4-(9-에틸-2-옥소-6,7,8,9-테트라하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-3-일)피리딘-1-이움 브로마이드(화합물 I-14)

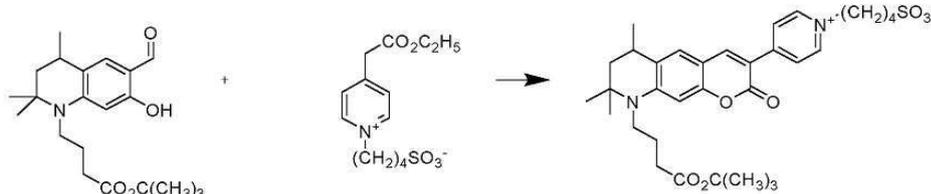


[0299]

[0300] 1-에틸-7-하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로퀴놀린-6-카르보알데하이드(0.2g)를 에탄올(10ml) 중에 용해시켰다. 1-[(5-카복시펜틸)-(4-에톡시카보닐)메틸]피리디늄 브로마이드(0.36g)를 첨가하고 나서, 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반시켰다. 에탄올(5ml) 중에서 피페리딘(20mg) 및 아세트산(20mg)으로부터 제조된 피페리딘 아세테이트 용액을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 80℃에서 2시간 동안 교반시키고, 이어서, 밤새 실온에서 교반시켰다. 용매를 증류시키고 나서, 잔사를 물(10ml)과 아세트나이트릴(10ml)의 혼합물 중에 용해시켰다. 얻어진 용액을 여과시키고 나서, 분취 HPLC에 의해 정제하였다. 이 화합물을 아세트산(10%, 0.3ml) 중에서 HBr 용액과의 반응에 의해 더 안정한 브로민화수소산염 형태로 전환시켜 화합물 I-14를 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 420.20. 실측치: (+) 421 (M+1).

[0301] 실시예 15

[0302] 4-[4-(9-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부틸)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-6,7,8,9-테트라하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-3-일)피리딘-1-이움-1-일]부탄-1-설포산염(화합물 I-15)

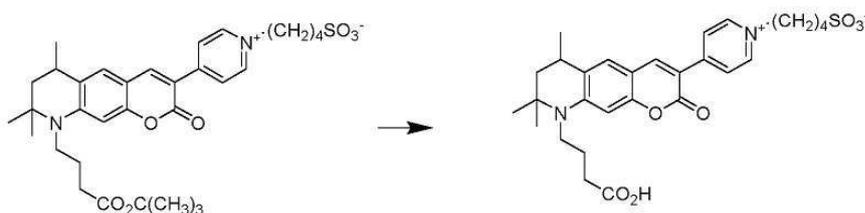


[0303]

[0304] tert-부틸 4-(6-폼일-7-하이드록시-2,2,4-트라이메틸-3,4-다이하이드로퀴놀린-1(2H)-일)부타노에이트(0.72g)를 에탄올(25ml) 중에 용해시켰다. 4-[4-(2-에톡시-2-옥소에틸)피리딘-1-이움-1-일]부탄-1-설포산염(0.60g)을 첨가하였고, 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반시켰다. 에탄올(15ml) 중에서 피페리딘(50mg) 및 아세트산(50mg)으로부터 제조한 피페리딘 아세테이트 용액을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 80℃에서 3시간 동안 교반시키고, 이어서, 밤새 실온에서 교반시켰다. 용매를 증류시키고 나서, 잔사를 물(20ml)과 아세트나이트릴(20ml)의 혼합물 중에 용해시켰다. 얻어진 용액을 여과시키고 나서, 분취 HPLC에 의해 정제하여 화합물 I-15를 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 598.20. 실측치: (+) 599 (M+1).

[0305] 실시예 16

[0306] 4-[4-(9-(3-카복시프로필)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-6,7,8,9-테트라하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-3-일)피리딘-1-이움-1-일]부탄-1-설포산염(화합물 I-16)

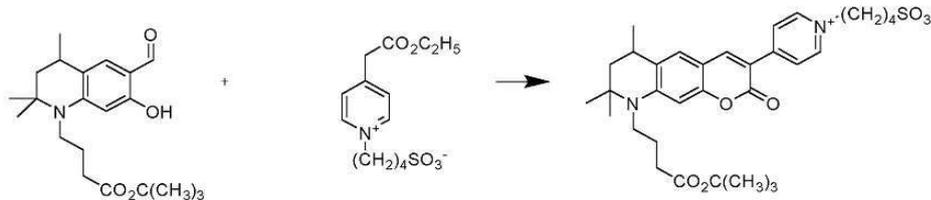


[0307]

[0308] 화합물 I-15를 DCM(5ml) 중에 용해시키고 나서, TFA를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반시켰다. 용매를 진공에서 증류시켰다. 잔사에 물(1.5ml) 및 아세트나이트릴(10ml)을 첨가하고 나서, 용매를 증류시키고, 다시 TFA를 제거하였다. 남아있는 오렌지색 결정질 생성물을 물(12ml)과 아세트나이트릴(12ml)의 혼합물 중에 용해시켰다. 얻어진 용액을 여과시키고 나서, 분취 HPLC에 의해 정제하였다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 542.21. 실측치: (+) 543 (M+1).

[0309] 실시예 17

[0310] 4-[4-(9-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부틸)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-8,9-다이하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-3-일)피리딘-1-이움-1-일]부탄-1-설포산염(화합물 I-17)

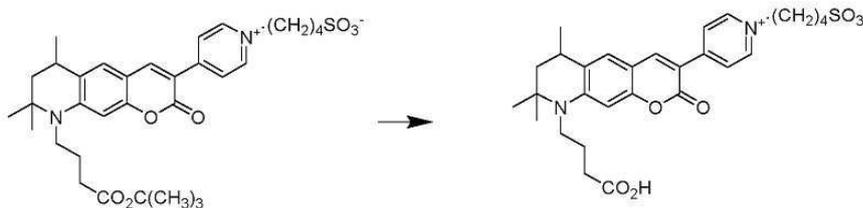


[0311]

[0312] tert-부틸 4-(6-폼일-7-하이드록시-2,2,4-트라이메틸-퀴놀린-1(2H)-일)부타노에이트(0.36g)를 에탄올(5ml) 중에서 현탁시켰다. 4-[4-(2-에톡시-2-옥소에틸)피리딘-1-이움-1-일]부탄-1-설포산염 (0.30g)을 첨가하였고, 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반시켰다. 에탄올(15ml) 중에서 피페리딘(50mg) 및 아세트산(50mg)으로부터 제조한 피페리딘 아세테이트 용액을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 50°C에서 5시간 동안 교반시키고, 이어서, 밤새 실온에서 교반시켰다. 용매를 증류시키고 나서, 잔사를 물(10ml)과 아세트나이트릴(10ml)의 혼합물 중에서 용해시켰다. 얻어진 용액을 여과시키고 나서, 분취 HPLC에 의해 정제하여 화합물 I-17을 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 596.26. 실측치: (+) 597 (M+1).

[0313] 실시예 18

[0314] 4-[4-(9-(3-카복시프로필)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-8,9-다이하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-3-일)피리딘-1-이움-1-일]부탄-1-설포산염(화합물 I-18)

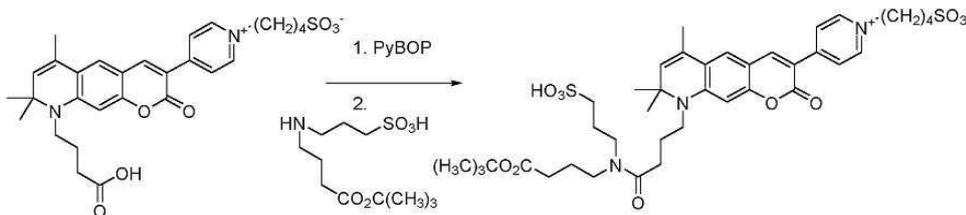


[0315]

[0316] 화합물 I-17을 DCM(5ml) 중에 용해시키고 나서, TFA를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반시키고, 이어서, 용매를 진공에서 증류시켰다. 잔사에 물(2ml) 및 아세트나이트릴(10ml)을 첨가하고 나서, 용매를 다시 증류시켜 잔사 TFA를 제거하였다. 남아있는 오렌지색 결정질 생성물을 에터와 함께 분쇄시키고 나서, 여과 후, 분취 HPLC에 의해 정제하여 화합물 I-18을 얻었다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 540.19. 실측치: (-) 539 (M-1); (+) 541 (M+1).

[0317] 실시예 19

[0318] 4-(4-(9-(4-((4-(tert-부톡시)-4-옥소부틸)(3-설포프로필)아미노)-4-옥소부틸)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-8,9-다이하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-3-일)피리딘-1-이움-1-일)부탄-1-설포산염 (화합물 I-19)



[0319]

[0320] 화합물 I-8(50mg)을 DMF(1ml) 중에 용해시키고, 이어서, 용매를 진공에서 증류시켰다. 이 작업을 2회 반복하였다. 건조시킨 화합물 I-8을 DMF(1.5ml) 중에서 실온에서 재용해시켰다. (벤조트리아졸-1-일옥시)트라이피롤리

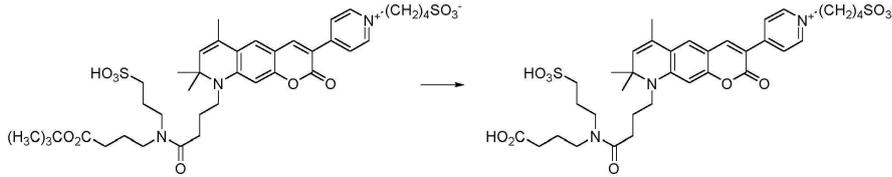
디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyBOP, 1.5 eq., 64mg, 169 μmol)를 플라스크에 첨가하고, 이어서, 과량의 DIPEA(60 μl)를 첨가하였다. 반응 플라스크를 질소 가스 하에 밀봉시켰다. 반응이 완료된 후에, DMF 중의 활성화된 염료 용액을 3-[(4-(tert-부톡시)-4-옥소부틸)아미노]프로판-1-설포산염(63mg)과 혼합하였다. 더 많은 DIPEA(58 μl)를 첨가하였다. 플라스크를 질소 가스 하에 다시 밀봉시키고 나서, 밤새 실온에 두었다. 반응 진행을 TLC, HPLC 및 (LCMS)에 의해 모니터링하였다. 반응이 완료되었을 때, 물(2ml)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 교반시키고 그리고, 이어서, 반응 혼합물로부터 진공하에 실온에서 용매를 증류시켜 화합물 I-19를 얻었다. 이 화합물을 어떠한 추가적인 정제도 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[0321]

실시예 20

[0322]

4-(4-(9-(4-((3-카복시프로필)(3-설포프로필)아미노)-4-옥소부틸)-6,8,8-트라이메틸-2-옥소-8,9-다이하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-3-일)피리딘-1-이움-1-일)부탄-1-설포산염 (화합물 I-20)



[0323]

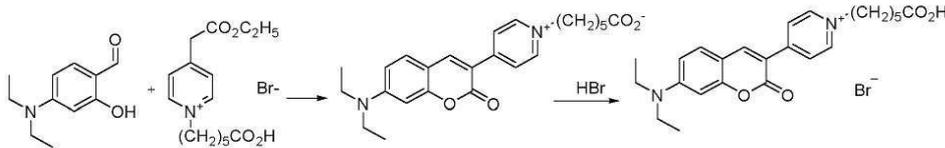
건조시킨 화합물 I-19를 다이클로로메탄(5ml) 중에 용해시켰다. 트라이플루오로아세트산(0.5ml)을 첨가하였고, 반응물을 밤새 실온에서 교반시키면서 두었다. 반응물을 물(0.5ml)로 퀀칭시키고 나서, 진공에서 농축시키고, 이어서, 분취-HPLC에 의해 정제하였다. 생성물의 순도, 구조 및 조성을 HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 747.25. 실측치: (-) 746 (M-1).

[0325]

실시예 21

[0326]

1-(5-카복시펜틸)-4-(7-(다이에틸아미노)-2-옥소-2H-크로멘-3-일)피리딘-1-이움 브로마이드(화합물 I-21)



[0327]

[0328]

4-다이에틸아미노살리실릭 알데하이드(0.19g)를 에탄올(5ml) 중에서 용해시켰다. 1-(5-카복시펜틸)-(4-에톡시 카보닐)메틸피리디늄 브로마이드(0.36g)를 첨가하였고, 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반시켰다. 에탄올(5ml) 중에서 피페리딘(10mg) 및 아세트산(10mg)으로부터 제조한 피페리딘 아세테이트 용액을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 70°C에서 5시간 동안 교반시키고, 이어서, 밤새 실온에서 교반시켰다. 생성물을 여과시키고 나서, 아세트산 중의 HBr 용액(20%, 1ml) 중에서 현탁시켰다. 이 현탁액을 실온에서 2시간 동안 교반시키고 나서, 최종 생성물을 여과시켜 더 안정한 HBr 염 형태 화합물 I-21을 얻었다. 이 염료를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 순도, 구조 및 조성을 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 408.20. 실측치: (+) 409 (M+1), 817 (2M+1).

[0329]

표 2는 실시예에 개시된 새로운 쿠마린 형광 염료의 수율, 특성규명 데이터 및 스펙트럼 특성을 요약한다.

표 2

화합물 #	수율 (%)	스펙트럼 특성		
		흡수 nm	형광 nm	스토크스 이동 nm
I-1	65	n/a	n/a	n/a
I-2	78	469 (CH ₃ OH)	512 (CH ₃ OH)	43
I-3	84	n/a	n/a	n/a
I-4	87	475 (H ₂ O)	n/a	n/a
I-5	39	465 (EtOH)	500 (EtOH)	35
I-6	54	459 (EtOH) 463 (H ₂ O)	498 (EtOH)	39
I-7	45	465 (EtOH)	n/a	n/a
I-8	76	470 (EtOH)	515 (EtOH)	45
I-9	77	n/a	n/a	n/a
I-10	87	470 (H ₂ O)	521 (H ₂ O)	51
I-11	45	470 (H ₂ O)	n/a	n/a
I-12	56	502 (H ₂ O)	n/a	n/a
I-13	69	500 (H ₂ O)	n/a	n/a
I-14	77	495 (EtOH)	565 (EtOH)	70
I-15	59	500 (EtOH)	n/a	n/a
I-16	76	501 (EtOH)	575 (EtOH)	74
I-17	78	510 (EtOH)	n/a	n/a
I-18	79	509 (EtOH)	592 (EtOH)	83
I-19	53	512 (EtOH)	n/a	n/a
I-20	58	510 (EtOH)	n/a	n/a
I-21	76	482(EtOH)	555 (EtOH)	73

[0330]

[0331]

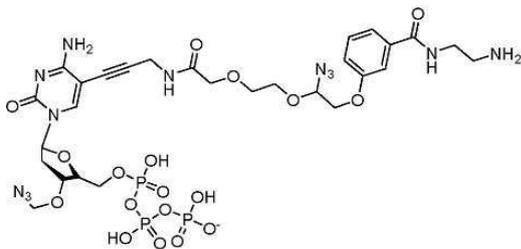
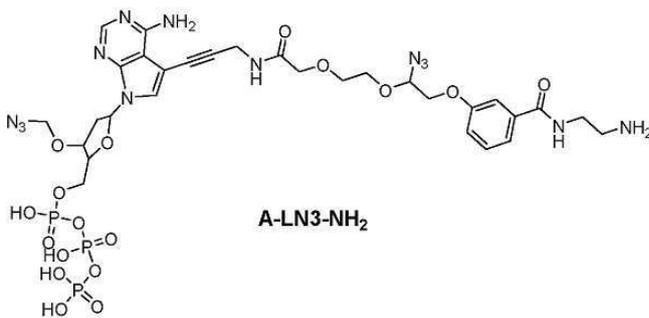
실시예 22

[0332]

완전히 작용성인 뉴클레오타이드 접합체의 합성을 위한 일반적 절차

[0333]

본 명세서에 개시된 쿠마린 형광 염료는 적절한 카복실기의 활성화 후에 아미노-치환된 뉴클레오타이드 A-LN3-NH₂ 또는 C-LN3-NH₂와 결합된다:



[0334]

[0335]

염료(10 μ mol)를 다이메틸폼아마이드(1ml) 중에 용해시키고, 그리고, 이어서, 용매를 진공에서 증류시킨다. 이

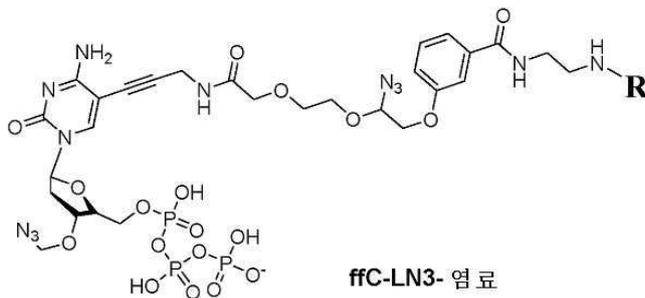
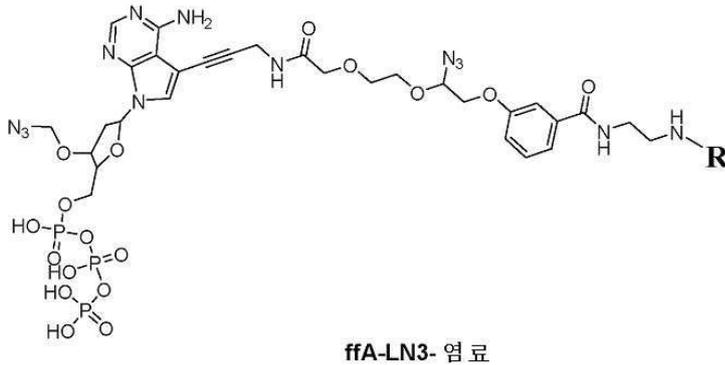
절차를 2회 더 반복한다. 건조시킨 염료를 실온에서 5ml 둥근 바닥 플라스크 내 N,N-다이메틸아세트아마이드 (DMA, 0.2ml) 중에서 용해시킨다.

[0336] N,N,N',N"-테트라메틸-O-(N-숙신이미딜)유로퓸 테트라플루오로보레이트(TSTU, 1.5eq., 15 μmol, 4.5mg)를 플라스크에 첨가하고, 이어서, N,N-다이아이스프로필에틸아민(DIPEA, 3eq., 30 μmol, 3.8mg, 5.2 μl)을 이 용액에 마이크로피펫을 통해 첨가한다. 반응 플라스크를 질소 가스 하에 밀봉시킨다. 15분 후에, TLC(용리액 H₂O/아세트나이트릴 1:9) 및 HPLC에 의해 반응 진행을 모니터링한다. 한편으로, 적절한 N-LN3-NH₂ 유도체 용액(20mM, 1.5eq, 15 μmol, 0.75ml)을 진공에서 농축시키고, 이어서, 물(20 μl) 중에서 재용해시킨다. DMA 중의 활성 염료 용액을 N-LN3-NH₂의 용액을 함유하는 플라스크에 옮겼다. 더 많은 DIPEA(3eq, 30 μmol, 3.8mg, 5.2 μl)를 트라이에틸아민 (1 μl)과 함께 첨가한다. 결합의 진행을 TLC, HPLC 및 LCMS에 의해 매시간 모니터링한다.

[0337] 반응이 완료될 때, 트라이에틸아민 중탄산염 완충제(TEAB, 대략 0.05M, 3ml)를 피펫을 통해 첨가한다. DEAE-세파덱스(Sephadex)(등록상표) 칼럼(빈 25 g 바이오티지(Biotage) 카트리지, 용매 시스템 TEAB/MeCN 내로 부은 세파덱스)을 통해 퀀칭 반응 혼합물을 실행함으로써 완전히 작용화된 뉴클레오타이드의 초기 정제를 수행한다. 이는 대부분의 남아있는 염료를 제거한다.

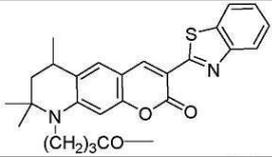
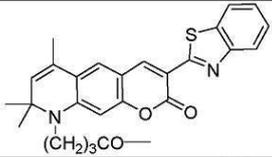
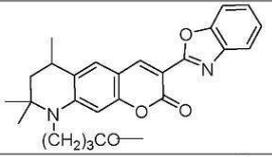
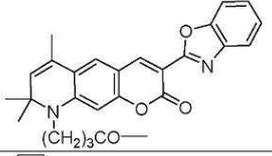
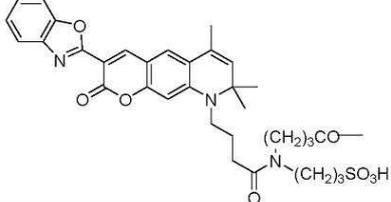
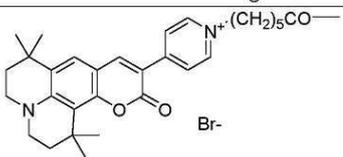
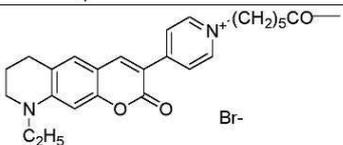
[0338] 세파덱스 칼럼으로부터의 분획은 진공에서 농축시킨다. 조질의 물질을 최소 용적의 물 및 아세트나이트릴 중에 재용해시킨 후에, 20 μm 나일론 필터를 통해 여과시킨다. 여과된 용액을 분취-HPLC에 의해 정제하였다. 제조한 화합물의 조성을 LCMS에 의해 확인하였다.

[0339] 표 3은 본 명세서에 개시된 새로운 쿠마린 염료로 표지된 다양한 뉴클레오타이드의 구조 및 스펙트럼 특성을 요약한다. ffA-LN3-염료는 LN3 링커를 갖고 본 명세서에 개시된 쿠마린 염료로 표지된 완전히 작용화된 A 뉴클레오타이드를 지칭한다. ffC-LN3-염료는 LN3 링커를 갖고 본 명세서에 개시된 쿠마린 염료로 표지된 완전히 작용화된 C 뉴클레오타이드를 지칭한다. 각각의 구조에서 R기는 접합 후에 쿠마린 염료 모이어티를 지칭한다.

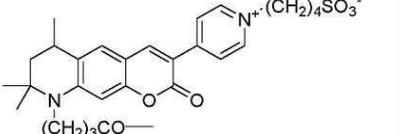
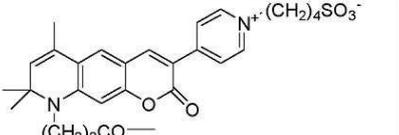
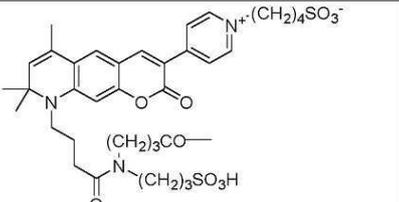
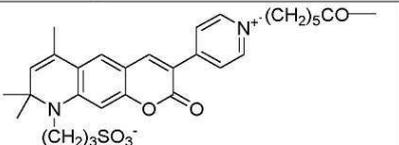


[0340]

표 3

화합물	R	스펙트럼 특성		
		흡수 nm	형광 nm	스토크스 이동 nm
C-I-1		488 (트리스)	524 (Tris) (트리스)	36
A-I-4		499 (트리스)	538 (트리스)	39
C-I-6		473 (USM)	507 (USM)	34
C-I-8		455 (트리스)	524 (트리스)	69
C-I-10		480 (트리스)	524 (트리스)	43
A-I-13		519 (트리스)	579 (트리스)	80
A-I-14		513 (SRE)	573 (SRE)	60

[0341]

A-I-16		504 (SRE)	570 (SRE)	66
A-I-18		511 (트리스)	593 (트리스)	82
A-I-20		514 (H ₂ O)	593 (SRE)	78
A-DY510XL (기준)		493 (H ₂ O)	585 (H ₂ O)	92

[0342]

[0343]

긴 스톡스 이동을 갖는 새로운 쿠마린 염료 I-16으로 표지된 A 뉴클레오타이드의 효율은 상업적 염료 DY510XL 및 크로메오(Chromeo)(상표명) 494(CH494)로 표지된 적절한 A 뉴클레오타이드와의 비교에 의해 입증되었다. 이 서열분석 예에서, 2-채널 검출 방법을 사용하였다. 본 명세서에 기재된 2-채널 방법에 대해, 핵산은 미국 특허 출원 공개 제2013/0079232호에 기재된 방법 및 시스템을 이용하여 서열분석할 수 있으며, 이의 개시내용은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함된다. 2-채널 검출에서, 핵산은 제1 채널에서 검출된 제1 뉴클레오타이드 유형, 제2 채널에서 검출된 제2 뉴클레오타이드 유형, 제1 채널과 제2 채널 둘 다에서 검출된 제3 뉴클레오타이드 유형 및 채널 중 하나에서 검출되지 않거나 또는 최소로 검출된, 표지가 없는 제4 뉴클레오타이드 유형을 제공함으로써 서열분석할 수 있다. I-16, Dy510XL 및 크로메오(상표명) 494로 표지된 완전히 작용화된 A 뉴클레오타이드의 상대적 강도를 비교하기 위해 실험의 RTA2.0.93 분석에 의해 산점도를 생성하였다. 서열분석 프라이머를 재혼성화하고 짧은(26주기) SBS 실행을 수행함으로써 동일한 실행(동일한 유동 세포 및 서열분석 시약)에서 비교하였다. 도 1 내지 도 3에 도시한 산점도는 각각의 26주기 실행의 주기 5에서였다.

[0344]

도 1은 Po1812(청색 노출(채널 1) 500ms, 녹색 노출(채널 2) 1000ms; 스캐닝 혼합물에서 스캐닝)가 있는 혼입 완충제 중에서 A-I-16(2 μM), C-NR440(2 μM), 다크 G(2 μM) 및 T-NR550S0(1 μM)를 함유하는 완전히 작용화된 뉴클레오타이드(ffN) 혼합물의 산점도를 도시한다.

[0345]

도 2는 Po1812(청색 노출(채널 1) 500ms, 녹색 노출(채널 2) 1000 ms; SRE에서 스캐닝됨)가 있는 혼입 완충제 중에서 A-DY510XL(2 μM), C-NR440(2 μM), 다크G(2 μM) 및 T-NR550S0(1 μM)를 함유하는 ffN 혼합물의 산점도를 도시한다.

[0346]

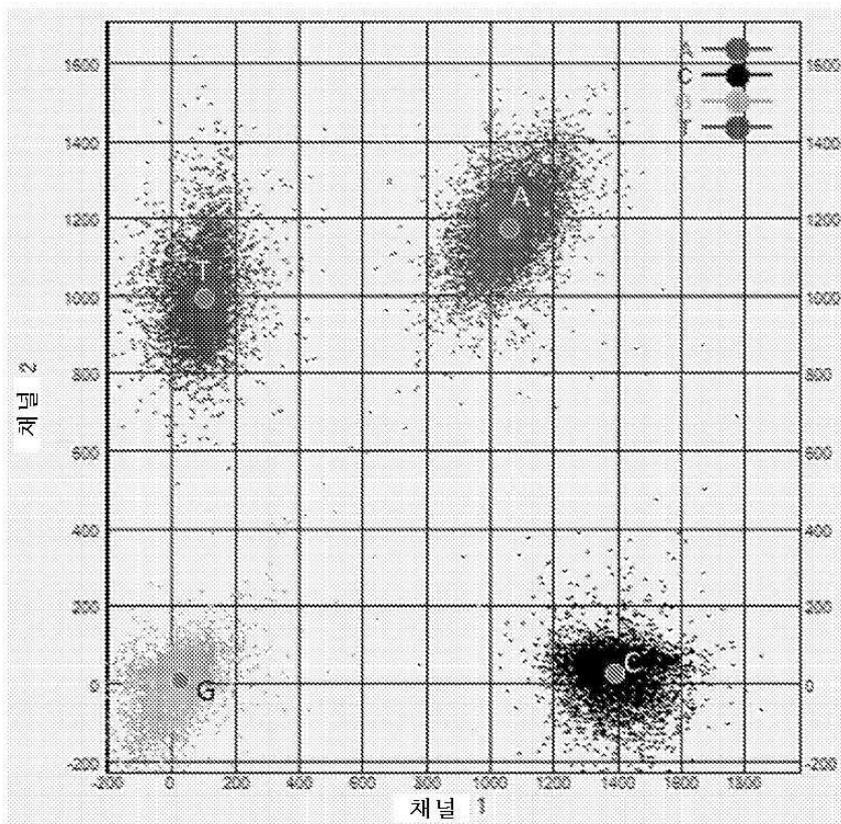
도 3은 Po1812(청색 노출(채널 1) 500ms, 녹색 노출(채널 2) 1000ms; 스캐닝 혼합물에서 스캐닝)가 있는 혼입 완충제 중에서 A-CH494(2 μM), C-NR440(2 μM), 다크G(2 μM) 및 T-NR550S0 (1 μM)를 함유하는 ffN 혼합물의 산점도를 도시한다.

[0347]

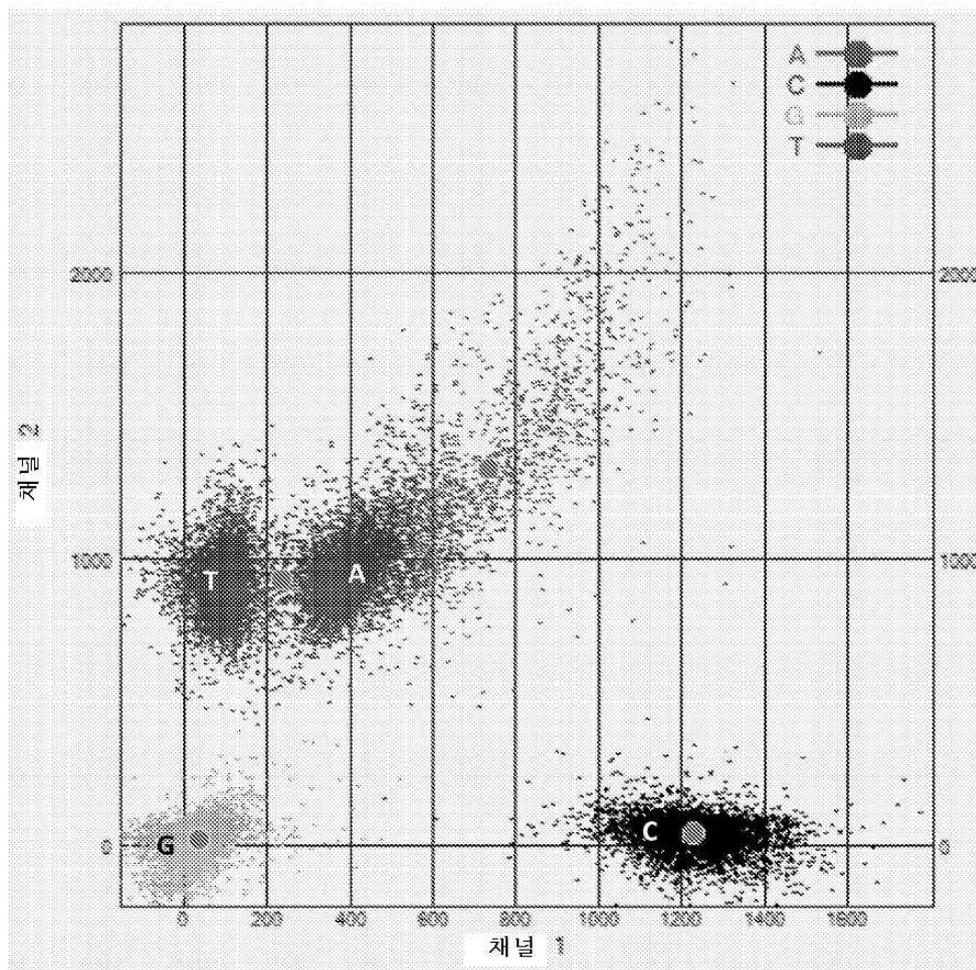
각각의 도 1 내지 3에서, "G" 뉴클레오타이드는 비표지이고, 하부 좌측의 클라우드("다크 G")로 나타낸다. 새로운 쿠마린 염료 I-16, DY510XL 및 CH494 표지된 "A" 뉴클레오타이드로부터의 신호를 각각 도 1, 도 2 및 도 3에서 상부 우측 클라우드로서 나타낸다. NR550S0 염료 표지된 "T" 뉴클레오타이드로부터의 신호를 상부 좌측 클라우드로서 나타내고, NR440 염료 표지된 "C" 뉴클레오타이드 신호를 하부 우측 클라우드로서 나타낸다. X-축은 하나의 채널에 대한 신호 강도를 나타내고, Y-축은 다른 채널에 대한 신호 강도를 나타낸다. 이는 염료 I-16으로 표지된 완전히 작용성인 A-뉴클레오타이드 접합체는 상업적 긴 스톡스 이동 염료 DY510XL 및 CH494에 비해 충분한 신호 강도 및 실질적으로 더 양호한 클라우드 분리를 제공한다는 것을 나타낸다. NR440의 구조는 미국 가출원 특허 제62/402,635호에 개시되어 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

