(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0009435
(43) 공개일자 2024년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2018.05)
C12Q 2525/186 (2019.08)
(21) 출원번호 10-2023-7041808
(22) 출원일자(국제) 2022년05월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/063647
(87) 국제공개번호 WO 2022/243480
국제공개일자 2022년11월24일
(30) 우선권주장
63/190,983 2021년05월20일 미국(US)

(71) 출원인
일루미나, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200
일루미나 케임브리지 리미티드
영국 케임브리지 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크
(72) 발명자
이아비콜리, 파트리지아
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200 일루미나, 인코포레이티드 내
윤, 철 스티븐
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200 일루미나, 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

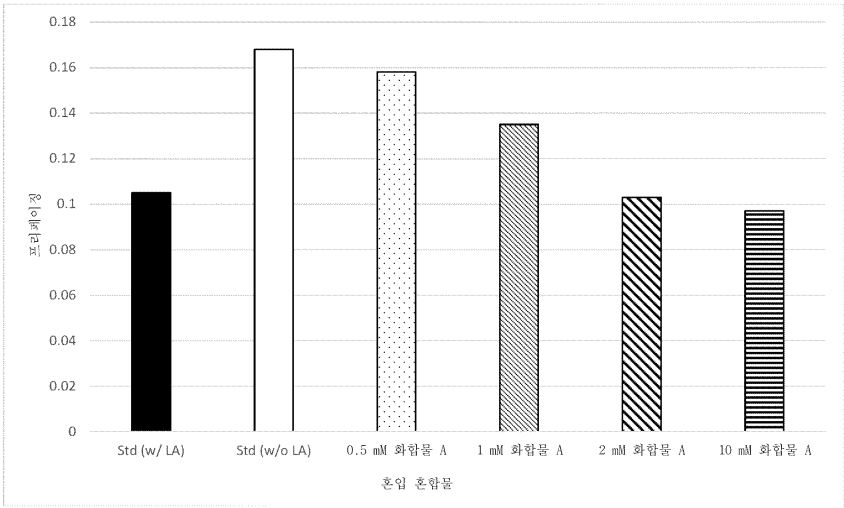
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 **합성에 의한 시퀀싱을 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 출원은 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저를 사용하여 페이징 및 프리페이징 값과 같은 시퀀싱 측정 기준을 개선하는 합성에 의한 시퀀싱을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2527/125 (2019.08)
C12Q 2535/122 (2019.08)
(72) 발명자
마리아니, 안젤리카
영국 케임브리지 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내
프랑수와, 앙투안느
영국 케임브리지 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 유나이티드 킹덤 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내
토핑, 프레더릭 제임스
영국 케임브리지 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내
윈나르드, 크리스토퍼
영국 케임브리지 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내
발딩, 필립
영국 케임브리지 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내

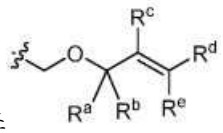
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는, 복수의 표적 폴리뉴클레오티드의 서열을 결정하는 방법:

(a) 혼성화 조건 하에서 고체 지지체를 시퀀싱 프라이머와 접촉시키는 단계, 여기서 고체 지지체는 그 위에 고정된 복수의 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 시퀀싱 프라이머는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적임;

(b) DNA 폴리머라제 매개 프라이머 연장에 적합한 조건 하에서 DNA 폴리머라제와 4가지 다른 유형의 뉴클레오티드 중 하나 이상을 포함하는 제1 수용액과 고체 지지체를 접촉시키는 단계, 여기서 각각의 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는 3' 차단기를 포함함;

(c) 한 유형의 뉴클레오티드를 시퀀싱 프라이머에 혼입하여 확장된 카피 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;

(d) 확장된 카피 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 형광 측정을 수행하는 단계; 및

(e) 팔라듐 촉매를 사용하여 혼입된 뉴클레오티드의 3' 차단기를 제거하는 단계;

여기서 남아있는 팔라듐 촉매의 적어도 일부는 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저에 의해 불활성화되고, 적어도 하나의 팔라듐 스캐빈저는 -O-알릴, -S-알릴, -NR-알릴, $-N^{+}RR'$-알릴 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하고;

R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e는 각각 독립적으로 H, 할로겐, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 또는 C_1-C_6 할로알킬이고;

R은 H, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 미치환된 또는 치환된 C_2-C_6 알케닐, 미치환된 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐, 미치환된 또는 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 미치환된 또는 치환된 5원 내지 10원 헤테로아릴, 미치환된 또는 치환된 C_3-C_{10} 카르보사이클릴, 또는 미치환된 또는 치환된 5원 내지 10원 헤테로사이클릴이고;

R'는 H, 미치환된 C_1-C_6 알킬 또는 치환된 C_1-C_6 알킬임.

청구항 2

제1항에 있어서, 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부의 서열이 결정될 때까지 단계 (b) 내지 (e)를 반복하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, (f) 혼입된 뉴클레오티드의 3' 차단기를 제거한 후 고체 지지체를 제2 수용액으로 세척하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부의 서열이 결정될 때까지 단계 (b) 내지 (f)를 반복하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제2항 또는 제4항에 있어서, 단계 (b) 내지 (e) 또는 (b) 내지 (f)가 적어도 50회, 적어도 100회, 적어도 150회, 적어도 200회, 적어도 250회, 또는 적어도 300회 반복되는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 한 유형의 혼입된 뉴클레오티드가 검출 가능한 표지를 포함하고, 단계 (e)가 또한 검출 가능한 표지를 제거하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 제1 수용액 중에 존재하는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 제1 수용액 중 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저의 농도가 약 0.1 mM 내지 약 100 mM, 약 0.5 mM 내지 약 50 mM, 약 1 mM 내지 약 20 mM, 또는 약 2 mM 내지 약 10 mM인, 방법.

청구항 9

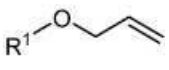
제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 제2 수용액 중에 존재하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 제2 수용액 중 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저의 농도가 약 0.1 mM 내지 약 100 mM, 약 0.5 mM 내지 약 50 mM, 약 1 mM 내지 약 20 mM, 또는 약 2 mM 내지 약 10 mM인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 -O-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기 구조를 갖는, 방법:



,

상기 식에서, R^1은 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알키닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, C_6-C_{10} 아릴, (C_6-C_{10} 아릴)C_1-C_6 알킬, 5 내지 10원 헤테로아릴, (5 내지 10원 헤테로아릴)C_1-C_6 알킬, C_3-C_{10} 카르보사이클릴, (C_3-C_{10} 카르보사이클릴)C_1-C_6 알킬, 3 내지 10원 헤테로사이클릴, (3 내지 10원 헤테로사이클릴)C_1-C_6 알킬, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 올리고당류 모이어티, 아미노산 모이어티, $-C(=O)NR^{f1}R^{g1}$, $-P(=O)OR^{f1}OR^{g1}$, $-C(=O)R^{h1}$, $-C(=O)OR^{h1}$ 또는 $-S(=O)_2R^{j1}$이며, 여기서 C_6-C_{10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, C_3-C_{10} 카르보사이클릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴 각각은 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환되고;

R^{f1} 및 R^{g1}은 각각 독립적으로 H, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

R^{h1}은 각각 독립적으로 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

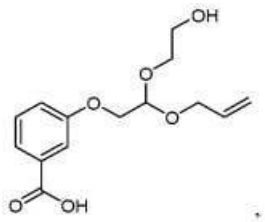
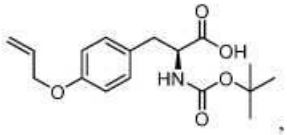
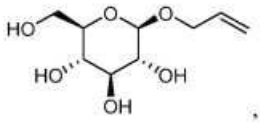
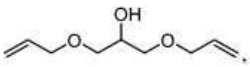
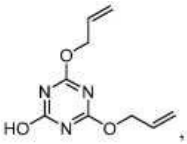
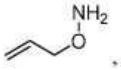
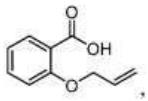
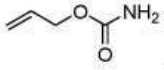
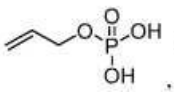
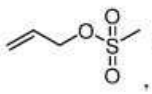
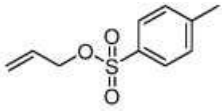
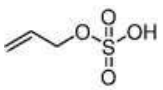
R^{j1}은 각각 독립적으로 하이드록시, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

R^x는 각각 독립적으로 아미노, 할로, 하이드록시, 카르복시, 시아노, (C_1-C_6 알킬)아미노, C-아미도, N-아미도,

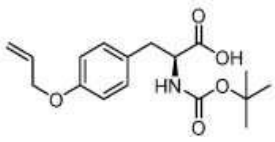
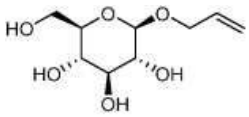
미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 설포, 설포네이트, 또는 -O-CH_2-CH=CH_2임.

청구항 12

제11항에 있어서, 하나 이상의 -O-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법:

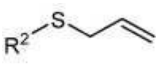

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

, 및

, 및 이들의 염.

청구항 13

제12항에 있어서, 팔라듐 스캐빈저는

또는

, 또는 이들의 염을 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 -S-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기 구조를 갖는, 방법:


,

상기 식에서, R^2는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알키닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, C_6-C_{10} 아릴, (C_6-C_{10} 아릴)C_1-C_6 알킬, 5 내지 10원 헤테로아릴, (5 내지 10원 헤테로아릴)C_1-C_6 알킬, C_3-C_{10} 카르보사이클릴, (C_3-C_{10} 카르보사이클릴)C_1-C_6 알킬, 3 내지 10원 헤테로사이클릴, (3 내지 10원 헤테로사이클릴)C_1-C_6 알킬, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 올리고당류 모이어티, 아미노산 모이어티, $-C(=O)NR^{f2}R^{g2}$, $-P(=O)OR^{f2}OR^{g2}$, $-C(=O)R^{h2}$, $-C(=O)OR^{h2}$ 또는 $-S(=O)_2R^{j2}$이며, 여기서 C_6-C_{10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, C_3-C_{10} 카르보사이클릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴 각각은 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환되고;

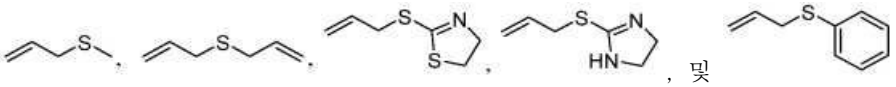
R^{f2} 및 R^{g2}은 각각 독립적으로 H, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

R^{h2}는 각각 독립적으로 하나 이상의 R^{y}로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^{y}로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^{y}로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

R^{j2}은 각각 독립적으로 하이드록시, 하나 이상의 R^{y}로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^{y}로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^{y}로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

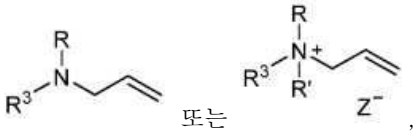
R^{y}는 각각 독립적으로 아미노, 할로, 하이드록시, 카르복시, 시아노, (C_1-C_6 알킬)아미노, C-아미도, N-아미도, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 설포, 설포네이트, 또는 -S-CH_2-CH=CH_2임.

청구항 15

제14항에 있어서, 하나 이상의 -S-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법: , 및 .

청구항 16

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 -NR-알릴 또는 -N^{+}RR'-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기 구조를 갖는, 방법:

 또는 ,

상기 식에서, Z는 음이온이고;

R^{3}은 각각 독립적으로 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알키닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, C_6-C_{10} 아릴, (C_6-C_{10} 아릴)C_1-C_6 알킬, 5 내지 10원 헤테로아릴, (5 내지 10원 헤테로아릴)C_1-C_6 알킬, C_3-C_{10} 카르보사이클릴, (C_3-C_{10} 카르보사이클릴)C_1-C_6 알킬, 3 내지 10원 헤테로사이클릴, (3 내지 10원 헤테로사이클릴)C_1-C_6 알킬, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 올리고당류 모이어티, 아미노산 모이어티, -C(=O)$NR^{f3}R^{g3}$, -P(=O)$OR^{f3}OR^{g3}$, -C(=O)R^{h3}, -C(=O)OR^{h3} 또는 -S(=O)$_2R^{j3}$이며, 여기서 C_6-C_{10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, C_3-C_{10} 카르보사이클릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴 각각은 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환되고;

R^{f3} 및 R^{g3}은 각각 독립적으로 H, 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

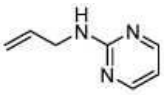
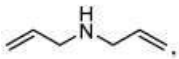
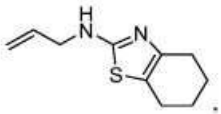
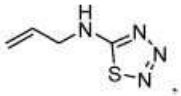
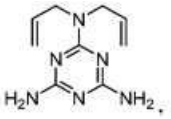
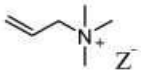
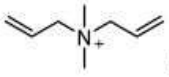
R^{h3}는 각각 독립적으로 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

R^{j3}은 각각 독립적으로 하이드록시, 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^{z}로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

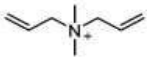
R^z는 각각 독립적으로 아미노, 할로, 하이드록시, 카르복시, 시아노, (C_1-C_6 알킬)아미노, C-아미도, N-아미도, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 설포, 설포네이트, 또는 -NH-CH_2-CH=CH_2임.

청구항 17

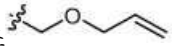
제16항에 있어서, 하나 이상의 -NR-알릴 또는 -N^+RR'-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는


,

,

,

,

,

Z$^-$ 및

Z$^-$ (여기서, Z$^-$는 Cl^- 또는 F^-임)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 팔라듐 스캐빈저는

Cl^-를 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 3' 차단기가 뉴클레오티드의 3' 산소에

부착된 구조를 갖는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 팔라듐 촉매가 팔라듐 착물과 수용성 포스핀으로부터 계내에서 생성된 Pd(0) 촉매인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 팔라듐 착물은 [Pd(알릴)Cl]$_2$, Na_2PdCl_4, K_2PdCl_4, [Pd(알릴)(THP)]Cl, [Pd(알릴)(THP)$_2$]Cl, $Pd(CH_3CN)_2Cl_2$, $Pd(OAc)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, $Pd(dba)_2$, $Pd(Acac)_2$, $PdCl_2$(COD), 또는 $Pd(TFA)_2$, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 팔라듐 착물은 [Pd(알릴)Cl]$_2$ 또는 Na_2PdCl_4를 포함하는, 방법.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 수용성 포스핀은 트리스(하이드록시프로필)포스핀(THP), 트리스(하이드록시메틸)포스핀(THMP), 1,3,5-트리아자-7-포스파아다만테인(PTA), 비스(p-설포나토페닐)페닐포스핀 디하이드레이트 포타슘 염, 트리스(카르복시에틸)포스핀(TCEP), 또는 트리페닐포스핀-3,3',3"-트리설폰산 트리소듐 염, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 팔라듐 촉매 대 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저의 몰비가 약 1:100, 1:50, 1:20, 1:10 또는 1:5인, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저가 적어도 하나의 Pd(II) 스캐빈저를

추가로 포함하는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, Pd(II) 스캐빈저는 이소시아노아세테이트(ICNA) 염, 에틸 이소시아노아세테이트, 메틸 이소시아노아세테이트, 시스테인 또는 이의 염, L-시스테인 또는 이의 염, *N*-아세틸-L-시스테인, 티오설페이트 염, 소듐 티오설페이트, 포타슘 티오설페이트, 포타슘 에틸잔토제네이트, 포타슘 이소프로필 잔테이트, 글루타티온, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 이미노디아세트산, 니트릴로디아세트산, 트리메르캅토-S-트리아진, 디메틸디티오카르바메이트, 디티오트레이톨, 메르캅토에탄올, 알릴 알코올, 프로파르길 알코올, 티올, 3차 아민 및/또는 3차 포스핀, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, Pd(II) 스캐빈저는 L-시스테인 또는 소듐 티오설페이트를 포함하는, 방법.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, Pd(II) 스캐빈저는 제1 수용액, 제2 수용액, 또는 둘 모두에 존재하는, 방법.

청구항 29

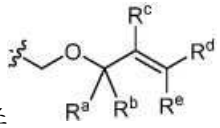
제28항에 있어서, 제1 또는 제2 수용액 중 Pd(II) 스캐빈저의 농도가 약 0.1 mM 내지 약 100 mM, 0.2 mM 내지 약 75 mM, 약 0.5 mM 내지 약 50 mM, 약 1 mM 내지 약 20 mM, 또는 약 2 mM 내지 약 10 mM인, 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 고체 지지체가 고정된 표적 폴리뉴클레오티드의 어레이를 포함하는, 방법.

청구항 31

하기를 포함하는 시퀀싱 장치와 함께 사용하기 위한 키트:

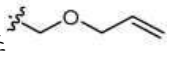
네 가지 다른 유형의 뉴클레오티드 중 하나 이상, 여기서 각각의 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는 3' 차단기를 포함하고, R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e는 각각 독립적으로 H, 할로겐, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 또는 C_1-C_6 할로알킬임; 및

하나 이상의 팔라듐 스캐빈저, 여기서 적어도 하나의 팔라듐 스캐빈저는 -O-알릴, -S-알릴, -NR-알릴, $-N^+RR'$-알릴 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함함;

여기서 R은 H, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 미치환된 또는 치환된 C_2-C_6 알케닐, 미치환된 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐, 미치환된 또는 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 미치환된 또는 치환된 5원 내지 10원 헤테로아릴, 미치환된 또는 치환된 C_3-C_{10} 카르보사이클릴, 또는 미치환된 또는 치환된 5원 내지 10원 헤테로사이클릴이고;

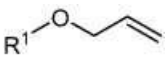
R'는 H, 미치환된 C_1-C_6 알킬 또는 치환된 C_1-C_6 알킬임.

청구항 32

제31항에 있어서, 3' 차단기가 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는, 키트.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 하나 이상의 -O-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기 구조:


를 갖는, 키트:

상기 식에서, R^1은 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알키닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, C_6-C_{10} 아릴, (C_6-C_{10} 아릴)C_1-C_6 알킬, 5 내지 10원 헤테로아릴, (5 내지 10원 헤테로아릴)C_1-C_6 알킬, C_3-C_{10} 카르보사이클릴, (C_3-C_{10} 카르보사이클릴)C_1-C_6 알킬, 3 내지 10원 헤테로사이클릴, (3 내지 10원 헤테로사이클릴)C_1-C_6 알킬, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 올리고당류 모이어티, 아미노산 모이어티, $-C(=O)NR^{f1}R^{g1}$, $-P(=O)OR^{f1}OR^{g1}$, $-C(=O)R^{h1}$, $-C(=O)OR^{h1}$ 또는 $-S(=O)_2R^{j1}$이며, 여기서 C_6-C_{10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, C_3-C_{10} 카르보사이클릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴 각각은 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환되고;

R^{f1} 및 R^{g1}은 각각 독립적으로 H, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

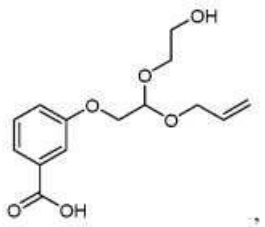
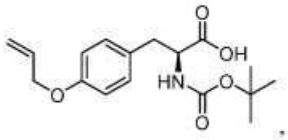
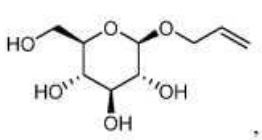
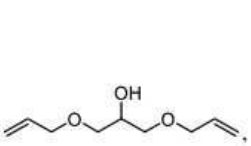
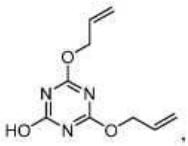
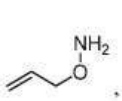
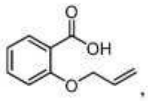
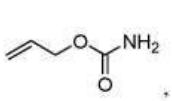
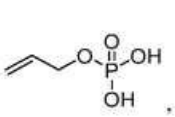
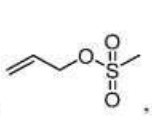
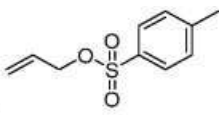
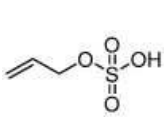
R^{h1}은 각각 독립적으로 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

R^{j1}은 각각 독립적으로 하이드록시, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

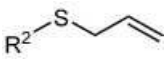
R^x는 각각 독립적으로 아미노, 할로, 하이드록시, 카르복시, 시아노, (C_1-C_6 알킬)아미노, C-아미도, N-아미도, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 설포, 설포네이트, 또는 $-O-CH_2-CH=CH_2$임.

청구항 34

제33항에 있어서, 하나 이상의 -O-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트:


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

, 및

, 및 이들의 염.

청구항 35

제31항 또는 제32항에 있어서, 하나 이상의 -S-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기 구조:  를 갖는, 키트:

상기 식에서, R^2는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알키닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, C_6-C_{10} 아릴, (C_6-C_{10} 아릴)C_1-C_6 알킬, 5 내지 10원 헤테로아릴, (5 내지 10원 헤테로아릴)C_1-C_6 알킬, C_3-C_{10} 카르보사이클릴, (C_3-C_{10} 카르보사이클릴)C_1-C_6 알킬, 3 내지 10원 헤테로사이클릴, (3 내지 10원 헤테로사이클릴)C_1-C_6 알킬, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 올리고당류 모이어티, 아미노산 모이어티, $-C(=O)NR^{f2}R^{g2}$, $-P(=O)OR^{f2}OR^{g2}$, $-C(=O)R^{h2}$, $-C(=O)OR^{h2}$ 또는 $-S(=O)_2R^{j2}$이며, 여기서 C_6-C_{10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, C_3-C_{10} 카르보사이클릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴 각각은 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환되고;

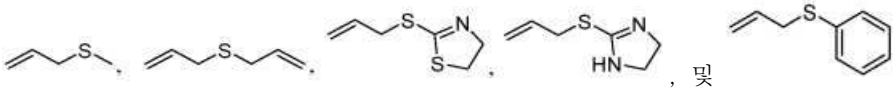
R^{f2} 및 R^{g2}은 각각 독립적으로 H, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

R^{h2}는 각각 독립적으로 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

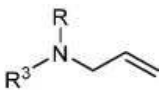
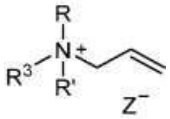
R^{j2}은 각각 독립적으로 하이드록시, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

R^y는 각각 독립적으로 아미노, 할로, 하이드록시, 카르복시, 시아노, (C_1-C_6 알킬)아미노, C-아미도, N-아미도, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 설포, 설포네이트, 또는 $-S-CH_2-CH=CH_2$임.

청구항 36

제35항에 있어서, 하나 이상의 -S-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트:  .

청구항 37

제31항 또는 제32항에 있어서, 하나 이상의 -NR-알릴 또는 $-N^+RR'$-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 구조:  또는  를 갖는, 키트:

상기 식에서, Z는 음이온이고;

R^3은 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알키닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, C_6-C_{10} 아릴, (C_6-C_{10} 아릴)C_1-C_6 알킬, 5 내지 10원 헤테로아릴, (5 내지 10원 헤테로아릴)C_1-C_6 알킬, C_3-C_{10} 카르보사이클릴, (C_3-C_{10} 카르보사이클릴)C_1-C_6 알킬, 3 내지 10원 헤테로사이클릴, (3 내지 10원 헤테로사이클릴)C_1-C_6 알킬, 단당류 모이어티, 이

당류 모이어티, 올리고당류 모이어티, 아미노산 모이어티, $-C(=O)NR^{f3}R^{g3}$, $-P(=O)OR^{f3}OR^{g3}$, $-C(=O)R^{h3}$, $-C(=O)OR^{h3}$ 또는 $-S(=O)_2R^{j3}$이며, 여기서 C_6-C_{10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, C_3-C_{10} 카르보사이클릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴 각각은 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환되고;

R^{f3} 및 R^{g3}은 각각 독립적으로 H, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

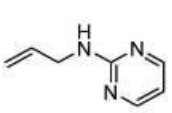
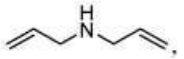
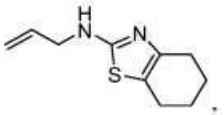
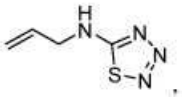
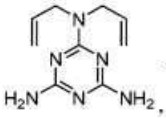
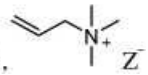
R^{h3}는 각각 독립적으로 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

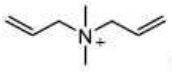
R^{j3}은 각각 독립적으로 하이드록시, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

R^z는 각각 독립적으로 아미노, 할로, 하이드록시, 카르복시, 시아노, (C_1-C_6 알킬)아미노, C-아미도, N-아미도, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 설포, 설포네이트, 또는 $-NH-CH_2-CH=CH_2$임.

청구항 38

제37항에 있어서, 하나 이상의 -NR-알릴 또는 $-N^+RR'$-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는







및


Z^- (여기서, Z^-는 Cl^- 또는 F^-임)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트.

청구항 39

제31항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, DNA 폴리머라제 및 하나 이상의 완충액 조성물을 추가로 포함하는, 키트.

청구항 40

복수의 챔버를 포함하는 시퀀싱 장치와 함께 사용하기 위한 카트리지로서, 복수의 챔버 중 하나는 제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 키트와 함께 사용하기 위한 것인, 카트리지.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] 기술분야

[0002] 본 개시내용은 일반적으로 폴리뉴클레오티드 시퀀싱 방법, 조성물 및 시퀀싱용 키트에 관한 것이다.

[0003] 배경기술

[0004] 분자 연구의 진보는 부분적으로 분자 또는 분자의 생물학적 반응을 특성화하는데 사용되는 기술의 향상에 의해

주도되었다. 특히, 핵산 DNA와 RNA에 대한 연구는 서열 분석과 혼성화 사건 연구에 사용되는 기술 개발에 의해 혜택을 받았다.

[0005] 핵산 연구를 개선한 기술의 예는 고정화 핵산의 제조된 어레이의 개발이다. 이러한 어레이는 전형적으로 고체 지지체 재료 상에 고정된 폴리뉴클레오티드의 고밀도 매트릭스로 구성된다. 예를 들어, 마스크로 보호되는 화학적으로 증감된 유리 표면을 사용하지만, 적절하게 변형된 뉴클레오티드 포스포르아미다이트의 부착을 허용하기 위해 한정된 영역에 노출되는 핵산을 조립하는 방법을 설명하는 문헌[Fodor et al., *Trends Biotech.* 12: 19-26, 1994]을 참조한다. 제조된 어레이는 또한 기지의 폴리뉴클레오티드를 소정 위치에서 고체 지지체 상에 "스포팅(spotting)"하는 기술에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, 문헌[Stimpson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6379-6383, 1995]).

[0006] 어레이에 결합된 핵산의 뉴클레오티드 서열을 결정하는 한 가지 방법은 "합성에 의한 시퀀싱(sequencing by synthesis)" 또는 "SBS"라고 한다. DNA 서열을 결정하기 위한 이러한 기술은 이상적으로는 시퀀싱되는 핵산에 대한 정확한 상보적 뉴클레오티드의 제어된(즉, 한 번에 하나씩) 도입을 필요로 한다. 이것은 각각의 뉴클레오티드 잔기가 한 번에 하나씩 시퀀싱되어 제어되지 않은 일련의 도입이 발생하는 것을 방지함에 따라 다수의 사이클에서 뉴클레오티드를 첨가함으로써 정확한 시퀀싱을 가능하게 한다. 도입된 뉴클레오티드는 표지 모이어티의 제거 및 그 후의 다음 라운드의 시퀀싱 전에 이에 부착된 적절한 표지를 사용하여 리딩된다.

[0007] 단 하나의 도입만이 일어나는 것을 보장하기 위해, 구조적 변형("보호기" 또는 "블로킹기")이 단 하나의 뉴클레오티드만 도입되도록 성장 사슬에 부가되는 각각의 표지된 뉴클레오티드에 포함된다. 보호기를 갖는 뉴클레오티드가 부가된 후에, 이어서 보호기는 시퀀싱되는 DNA의 완전성을 방해하지 않는 반응 조건 하에서 제거된다. 그 후에, 시퀀싱 사이클은 다음의 보호되고 표지된 뉴클레오티드의 도입을 계속할 수 있다. DNA 시퀀싱에 유용하도록, 통상 뉴클레오티드 트리포스페이트인 뉴클레오티드는 일반적으로, 뉴클레오티드 상의 염기가 부가되면 폴리뉴클레오티드 사슬에 뉴클레오티드를 도입하는데 사용되는 폴리머라제가 복제를 계속하는 것을 방지하도록 3'-하이드록시 차단기를 필요로 한다.

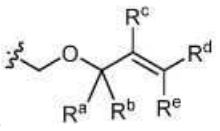
[0008] 시퀀싱 사이클의 각 단계에서 다양한 조성물이 사용된다. 예를 들어, 폴리머라제와 하나 이상의 상이한 유형의 뉴클레오티드를 포함하는 혼입 조성물이 혼입 단계 동안 사용된다. 그 중에서도 예를 들어, 뉴클레오티드가 검출을 위한 형광단 표지를 포함하는 경우, 검출 단계 동안 광유발 손상으로부터 폴리뉴클레오티드를 보호하기 위해 항산화제를 포함할 수 있는 스캔 조성물. 혼입된 뉴클레오티드로부터 차단 모이어티(예를 들어, 3' 하이드록시 차단기)를 절단하기 위한 시약을 포함하는 탈차단 조성물이 탈차단 단계 동안 사용된다. 수용성 포스핀 리간드(들)의 존재하에 팔라듐 착물로부터 제조된 팔라듐(Pd) 촉매와 같은 절단 시약이 탈차단 조성물에서 보고된 바 있으며, 예를 들어, 미국 특허출원공개 제2020/0216891호 및 미국 특허 제63/042,240호(이들 각각은 그 전체가 참고로 포함됨)에 보고되어 있다. Pd는 대부분 비활성 Pd(II) 형태로 DNA에 달라붙는 능력이 있으며, 이는 DNA와 폴리머라제 사이의 결합을 방해하여 위상화를 증가시킬 수 있다. Pd 스캐빈저 화합물을 포함하는 절단 후 세척 조성물은 디블로킹 단계 후에 사용될 수 있다. 예를 들어, 국제공개 WO 2020/126593호는 스캔 조성물 및/또는 절단 후 세척 조성물에 포함될 수 있는 3,3'-디티오디프로피온산(DDPA) 및 리포산(LA)과 같은 Pd 스캐빈저를 개시하고 있다. 절단 후 세척 용액에서 이러한 스캐빈저를 사용하는 목적은 Pd(0)를 스캐빈징하고, Pd(0)를 비활성 Pd(II) 형태로 전환시켜, 전위상화 값 및 시퀀싱 메트릭스를 개선하고, 신호 열화를 감소시키고, 시퀀싱 리드 길이를 신장시키는 것이다. 그러나, 성능을 최적화하기 위해 시퀀싱의 각 단계에서 사용할 조성물을 개발하려는 지속적인 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0009] 본 개시내용의 일부 양태는 하기를 포함하는 복수의 표적 폴리뉴클레오티드의 서열을 결정하는 방법에 관한 것이다:

[0010] (a) 혼성화 조건 하에서 고체 지지체를 시퀀싱 프라이머와 접촉시키는 단계, 여기서 고체 지지체는 그 위에 고정된 복수의 상이한 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 시퀀싱 프라이머는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적임;

[0011] (b) DNA 폴리머라제 매개 프라이머 연장에 적합한 조건 하에서 DNA 폴리머라제와 4가지 다른 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP 또는 dUTP) 중 하나 이상을 포함하는 제1 수용액과 고체 지지체를 접



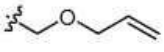
촉시키는 단계, 여기서 각각의 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조 를 갖는 3' 차단기를 포함함;

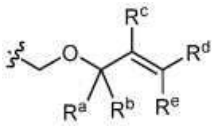
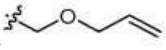
[0012] (c) 한 유형의 뉴클레오티드를 시퀀싱 프라이머에 혼입하여 확장된 카피 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;

[0013] (d) 확장된 카피 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 형광 측정을 수행하는 단계; 및

[0014] (e) 팔라듐 촉매를 사용하여 혼입된 뉴클레오티드의 3' 차단기를 제거하는 단계;

[0015] 여기서 남아있는 팔라듐 촉매의 적어도 일부는 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저에 의해 불활성화되고, 적어도 하나의 팔라듐 스캐빈저는 -O-알릴, -S-알릴, -NR-알릴, $-N^{+}RR'$-알릴 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하고;

[0016] R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e는 각각 독립적으로 H, 할로겐, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 또는 C_1-C_6 할로알킬이고; R은 H, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 미치환된 또는 치환된 C_2-C_6 알케닐, 미치환된 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐, 미치환된 또는 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 미치환된 또는 치환된 5원 내지 10원 헤테로아릴, 미치환된 또는 치환된 C_3-C_{10} 카르보사이클릴, 또는 미치환된 또는 치환된 5원 내지 10원 헤테로사이클릴이고; R'은 H, 미치환된 C_1-C_6 알킬 또는 치환된 C_1-C_6 알킬임. 일부 실시형태에서, 나머지 팔라듐 촉매(Pd(0) 및/또는 Pd(II)의 형태)는 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저에 의해 불활성화된다. 일부 실시형태에서, 제1 수용액 중 각각의 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는 3' 차단기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 수용액 중 하나 이상의 뉴클레오티드는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (b) 내지 (e)는 표적 폴리뉴클레오티드 일부의 서열이 결정될 때까지 반복된다.

[0017] 본 개시내용의 일부 양태는 다음을 포함하는 시퀀싱 장치와 함께 사용하기 위한 키트에 관한 것이다: 하나 이상의 서로 다른 유형의 뉴클레오티드(여기서 각각의 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는 3' 하이드록시 차단기를 포함하고, R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e는 각각 독립적으로 H, 할로겐, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 또는 C_1-C_6 할로알킬임); 및 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저(여기서 적어도 하나의 팔라듐 스캐빈저는 본원에 기술된 -O-알릴, -S-알릴, -NR-알릴, $-N^{+}RR'$-알릴 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함함). 일부 실시형태에서, 키트 중 각각의 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는 3' 하이드록시 차단기를 포함한다.

[0018] 본 개시내용의 일부 다른 양태는 복수의 챔버를 포함하는 시퀀싱 장치와 함께 사용하기 위한 카트리지에 관한 것이며, 각 챔버는 단일 조성물을 함유하고, 본원에 기술된 키트는 챔버 중 하나에서 사용하기 위한 것, 예를 들어 본원에 기술된 시퀀싱 방법의 혼입 단계에 사용하기 위한 것이다. 추가 조성물은 하나 이상의 항산화제 및 선택적으로 스캐빈저를 포함하는 스캔 완충제 조성물; 혼입된 뉴클레오티드 및/또는 형광 표지의 3' 하이드록시 차단기를 제거하기 위한 Pd 시약을 포함하는 절단 조성물; 및 시퀀싱의 다음 주기 전에 절단 반응 후 남은 Pd 촉매(Pd(0) 및/또는 Pd(II)의 형태)를 불활성화하기 위해 하나 이상의 추가적인 Pd 스캐빈저를 함유할 수 있는 세척 완충액을 포함할 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.

도면의 간단한 설명

[0019] **도 1**은 리포산을 사용한 표준 절단 후 세척과 비교하여 팔라듐 스캐빈저 화합물 A가 다양한 농도의 절단 후 세척 용액에 사용되는 경우 시퀀싱 실행의 프리페이징 값을 도시하는 막대 차트이다.

도 2a는 동일한 동역학 검정에서 스캐빈저가 없는 것과 비교하여 동역학 검정에서 다양한 팔라듐 스캐빈저의 동

역학 평가를 예시하는 선 차트이다.

도 2b는 여러 팔라듐 스캐빈저와 리포산을 비교한 도 2a의 원 영역을 확대한 선 차트이다.

도 3은 Pd(0) 스캐빈저 화합물 B 또는 C를 함유하는 혼입 혼합물을 Pd(0) 스캐빈저 없이 리포산 후 절단 세척 단계를 활용하는 표준 혼입 혼합물과 비교한 경우 Illumina의 iSeq™ 플랫폼에서 실행되는 시퀀싱의 퍼센트 프리페이징 값을 나타내는 막대 차트이다.

도 4는 두 가지 다른 혼입 시간(24초 및 19초)을 갖는 Pd 스캐빈저가 없는 표준 혼입 혼합물과 비교하여 Pd(0) 스캐빈저 화합물 B 또는 C를 함유하는 여러 혼입 혼합물을 활용하여 Illumina의 iSeq™ 플랫폼에서 실행되는 시퀀싱 실행의 시퀀싱 측정기준(각각 페이징 값, 프리페이징 값, 오류율 및 Q30)을 도시한다.

도 5는 Pd(0) 스캐빈저 화합물 O(DADMAC)와 비교하여 Pd(0) 스캐빈저 화합물 B를 사용하여 Illumina의 iSeq™ 플랫폼에서 실행되는 시퀀싱의 리드 1 및 리드 2에 대한 평균 백분율 프리페이징 값을 도시한다.

도 6은 Pd(II) 스캐빈저가 없는 것과 비교하여 Pd(II) 스캐빈저 L-시스테인 또는 소듐 티오설페이트를 사용하여 Illumina의 iSeq™ 플랫폼에서 시퀀싱 실행의 리드 1 및 리드 2에 대한 평균 백분율 페이징 값을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 개시내용의 일부 양태는 핵산 시퀀싱에서 시퀀싱 측정 기준, 예를 들어 합성에 의한 시퀀싱에서 페이징 및 프리페이징 값을 개선하기 위한 방법에 관한 것이다. 특히, 본원에 기술된 시퀀싱 방법은 다음 혼입 사이클 전에 혼입된 뉴클레오티드의 3' 하이드록시 차단기를 절단하기 위해 팔라듐(Pd) 촉매를 사용하는 것을 포함한다. Pd 촉매는 비활성화된 Pd(II) 형태 또는 촉매 활성 Pd(0) 형태로 합성에 의한 시퀀싱 동안 DNA와 같은 핵산(예를 들어, 카피 폴리뉴클레오티드)에 달라붙는 경향이 있다. Pd(II)가 DNA에 달라붙으면 성장하는 폴리뉴클레오티드 사슬과 DNA 폴리머라제의 결합 속도가 느려져 페이징이 생성될 수 있다. 과량의 Pd(0)가 DNA에 달라붙는 경우 혼입 및/또는 형광 측정(들) 단계 전에 혼입 혼합물에서 뉴클레오티드의 3' 하이드록시 차단기를 절단할 수 있다. 이런 일이 발생하면 프리페이징이 생성된다. 시퀀싱 측정 기준을 개선하기 위해 시퀀싱 방법에는 일반적으로 남은 Pd 촉매를 제거하기 위한 절단 후 세척 단계가 포함된다. 그러나, 단순한 세척 완충액으로는 잔류 Pd 촉매의 활성을 완전히 억제하지 못할 수도 있다. 또한, 다음 사이클 전에 잔류 팔라듐 촉매를 불활성화하기 위해 혼입 단계 후에 사용되는 하나 이상의 완충액(예를 들어, 절단 후 세척 완충액 또는 스캔 완충액 중 하나)에 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저가 포함될 수 있다. 리포산은 활성 Pd(0) 촉매를 Pd(II) 형태로 산화시켜 비활성화하는 효과적인 팔라듐 스캐빈저로 사용되어 왔다. 그러나, 산화성으로 인해, 리포산은 다른 시퀀싱 시약과 호환되지 않는다. 결과적으로 리포산을 사용하려면 다음 시퀀싱 사이클 전에 임의의 과량의 리포산을 제거하기 위한 별도의 세척 단계가 필요하다.

[0021] 본 개시내용의 특정 양태는 합성에 의한 시퀀싱의 여러 단계에서 대안적인 팔라듐 스캐빈저를 사용하는 것에 관한 것이며, 여기서 적어도 하나의 팔라듐 스캐빈저는 하나 이상의 알릴 모이어티(예를 들어, -O-알릴, -S-알릴, -NR-알릴, 또는 $-N^{+}RR'$-알릴), 또는 이들의 조합을 포함하고, 핵산에 붙어 있는 임의의 잔류 Pd(0)를 소비하는 경쟁적 기질로 작용한다. 본원에 기술된 시퀀싱 방법은 시퀀싱 측정 기준을 실질적으로 개선하고(예를 들어 페이징 및 프리페이징 값 감소) 특정 절단 후 처리 단계를 제거하여 각 사이클에 대한 시퀀싱 시간을 줄일 수도 있다.

[0022] 정의

[0023] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 용어 "포함하는"뿐만 아니라 "포함하다", "포함한다", 및 "포함된"과 같은 다른 형태의 사용은 제한적이지 않다. 용어 "갖는"뿐만 아니라 "갖다", "갖는다", 및 "가진"과 같은 다른 형태의 사용은 제한적이지 않다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 전이 문구 또는 청구범위의 중심부에서든, 용어 "포함한다(comprise(s))" 및 "포함하는(comprising)"은 개방 말단형 의미를 갖는 것으로 해석되어야 한다. 즉, 상기 용어는 문구 "적어도 ~ 갖는(having at least)" 또는 "적어도 ~ 포함하는(including at least)"과 동의어로 해석되어야 한다. 예를 들어, 프로세스의 맥락에서 사용될 때, 용어 "포함하는(comprising)"은 프로세스가 적어도 나열된 단계를 포함하지만, 추가 단계를 포함할 수 있음을 의미한다. 화합물, 조성물, 또는 장치의 맥락에서 사용될 때, 용어 "포함하는(comprising)"은 화합물, 조성물, 또는 장치가 적어도 나열된 특성 또는 구성요소를 포함하지만, 또한 추가 특성 또는 구성요소를 포함할 수 있음을 의미한다.

[0024] 일정 범위의 값이 제공되는 경우, 상한 및 하한, 상기 범위의 상한과 하한 사이의 각각의 중간값은 실시형태 내에 포함되는 것으로 이해된다.

[0025] 본원에 사용되는 일반적인 유기 약어는 하기와 같이 정의된다:

℃	섭씨 온도
dATP	데옥시아데노신 트리포스페이트
dCTP	데옥시시티딘 트리포스페이트
dGTP	데옥시구아노신 트리포스페이트
dTTP	데옥시티미딘 트리포스페이트
ddNTP	디데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트
ffN	완전 작용화된 뉴클레오티드
ffA	완전히 작용화된 "A" 뉴클레오티드
ffC	완전히 작용화된 "C" 뉴클레오티드
ffT	완전히 작용화된 "T" 뉴클레오티드
ffG	완전히 작용화된 "G" 뉴클레오티드
IMX	혼입 믹스 또는 혼입 혼합물
RT	실온
SBS	합성에 의한 시퀀싱

[0026]

[0027] 본원에서 사용되는 용어 "어레이"는 상이한 프로브 분자가 상대적 위치에 따라 서로 구별될 수 있도록 하나 이상의 기질에 부착된 상이한 프로브 분자의 집단을 지칭한다. 어레이는 기질 상의 상이한 어드레스가능한 위치에 각각 위치한 상이한 프로브 분자를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 어레이는 각각 상이한 프로브 분자를 갖는 별개의 기질을 포함할 수 있으며, 여기서 상이한 프로브 분자는 기질이 부착된 표면 상의 기질의 위치에 따라 또는 액체 중에서의 기질의 위치에 따라 식별될 수 있다. 별도의 기질이 표면에 위치하는 예시적인 어레이는 예를 들어, 미국 특허 제6,355,431 B1호, 미국 특허출원공개 US 2002/0102578호 및 국제공개 WO 00/63437호에 기재된 바와 같이, 웰에 비드를 포함하는 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 형광 활성화 세포 분별기(FACS) 와 같은 마이크로유체 소자를 사용하여 액체 어레이에서 비드를 구별하기 위해 본 발명에서 사용될 수 있는 예시적인 포맷은 예를 들어, 미국 특허 제6,524,793호에 기재되어 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 어레이의 추가의 예는 미국 특허 제5,429,807호; 제5,436,327호; 제5,561,071호; 제5,583,211호; 제5,658,734호; 제5,837,858호; 제5,874,219호; 제5,919,523호; 제6,136,269호; 제6,287,768호; 제6,287,776호; 제6,288,220호; 제6,297,006호; 제6,291,193호; 제6,346,413호; 제6,416,949호; 제6,482,591호; 제6,514,751호 및 제6,610,482호; 국제공개 제WO 93/17126호; 국제공개 WO 95/11995호; 국제공개 WO 95/35505호; 유럽 특허 EP 742 287호; 및 유럽 특허 EP 799 897호에 기재된 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0028] 본원에서 사용되는 용어 "공유 부착된(covalently attached)" 또는 "공유 결합된(covalently bonded)"은 원자들 사이에 전자쌍을 공유하는 것을 특징으로 하는 화학 결합의 형성을 지칭한다. 예를 들어, 공유 결합된 폴리머 코팅은 다른 수단, 예를 들어 접착 또는 정전기 상호작용을 통한 표면에 대한 부착과 비교하여, 기질의 작용화 표면과 화학 결합을 형성하는 폴리머 코팅을 지칭한다. 표면에 공유 결합된 폴리머는 또한 공유 결합 이외의 수단을 통해 결합될 수 있음이 이해될 것이다.

[0029] 본원에 사용되는 팔라듐 촉매를 "불활성화" 또는 "비활성화"하는 것은 팔라듐 스캐빈저를 사용하는 하기 여러 메커니즘을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다: (1) 팔라듐 스캐빈저는 핵산에 붙어 있는 임의의 잔류 활성 Pd(0)를 소비하는 경쟁적 기질로 작용할 수 있음; (2) 팔라듐 스캐빈저는 활성 Pd(0)를 비활성 Pd(II) 형태로 전환시키는 산화제 역할을 할 수 있음; 및 (3) 팔라듐 스캐빈저는 핵산에 부착된 Pd(예를 들어, Pd(0) 또는 Pd(II))를 제거하기 위한 경쟁적 리간드로 작용할 수 있음.

[0030] 본원에서 사용되는 임의의 "R"기(들)은 표시된 원자에 부착될 수 있는 치환기를 나타낸다. R기는 치환 또는 미치환될 수 있다.

[0031] 소정의 라디칼 명명 규약은 문맥에 따라 모노-라디칼 또는 디-라디칼 중 어느 하나를 포함할 수 있음이 이해되어야 한다. 예를 들어, 치환기가 분자의 나머지 부분에 대한 2개의 부착점을 필요로 하는 경우, 치환기는 디-라디칼인 것으로 이해된다. 예를 들어, 2개의 부착점을 필요로 하는 알킬로 확인되는 치환기는 디-라디칼, 예컨대 $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$ 등을 포함한다. 다른 라디칼 명명 규약은 라디칼이 "알킬렌" 또는 "알케닐렌"과 같은 디-라디칼임을 명확하게 나타낸다.

[0032] 본원에서 사용되는 용어 "할로겐" 또는 "할로"는 원소 주기율표의 17족의 방사성 안정 원자, 예를 들어 불소, 염소, 브롬 또는 요오드 중 임의의 하나를 의미하며, 불소 및 염소가 바람직하다.

[0033] 본원에서 사용되는 "C_a 내지 C_b"(여기서, "a" 및 "b"는 정수임)는 알킬기, 알케닐기 또는 알키닐기의 탄소 원자수, 또는 사이클로알킬기 또는 아릴기의 고리 원자수를 지칭한다. 즉, 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬 고리 및 아릴 고리는 "a" 내지 "b"개(종점 포함)의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 예를 들어, "C_1 내지 C_4 알킬"기는 1개 내지 4개의 탄소를 갖는 모든 알킬기, 즉, CH_3-, CH_3CH_2-, $CH_3CH_2CH_2$-, $(CH_3)_2CH$-, $CH_3CH_2CH_2CH_2$-, $CH_3CH_2CH(CH_3)$- 및 $(CH_3)_3C$-를 지칭하고; C_3 내지 C_4 사이클로알킬기는 3개 또는 4개의 탄소 원자를 갖는 모든 사이클로알킬기, 즉, 사이클로프로필 및 사이클로부틸을 지칭한다. 유사하게, "4원 내지 6원 헤테로사이클릴"기는 4 내지 6개의 총 고리 원자를 갖는 모든 헤테로사이클릴기, 예를 들어 아제티딘, 옥세탄, 옥사졸린, 피롤리딘, 피페리딘, 피페라진, 모르폴린 등을 지칭한다. "a" 및 "b"가 알킬기, 알케닐기, 알키닐기, 사이클로알킬기 또는 아릴기에 관하여 지정되어 있지 않다면, 이들 정의에 기재된 가장 넓은 범위가 가정되어야 한다. 본원에서 사용되는 용어 "C_1-C_6"는 C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 및 C_6, 및 임의의 이들 2개의 숫자에 의해 정의되는 범위를 포함한다. 예를 들어, C_1-C_6 알킬은 C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 및 C_6 알킬, C_2-C_6 알킬, C_1-C_3 알킬 등을 포함한다. 유사하게, C_2-C_6 알케닐은 C_2, C_3, C_4, C_5 및 C_6 알케닐, C_2-C_5 알케닐, C_3-C_4 알케닐 등을 포함하며; C_2-C_6 알키닐은 C_2, C_3, C_4, C_5 및 C_6 알키닐, C_2-C_5 알키닐, C_3-C_4 알키닐 등을 포함한다. C_3-C_8 사이클로알킬은 각각 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 및 8개의 탄소 원자, 또는 임의의 이들 2개의 숫자에 의해 정의되는 범위, 예컨대 C_3-C_7 사이클로알킬 또는 C_5-C_6 사이클로알킬을 포함하는 탄화수소 고리를 포함한다.

[0034] 본원에 사용되는 "알킬"은 완전 포화된(즉, 이중 또는 삼중 결합을 함유하지 않는) 직쇄 또는 분지형 탄화수소 사슬을 지칭한다. 알킬기는 1개 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다(본 명세서에 나타날 때마다, "1 내지 20"과 같은 수치 범위는 주어진 범위 내의 각각의 정수를 지칭하며; 예를 들어, "1개 내지 20개의 탄소 원자"는 알킬기가 1개의 탄소 원자, 2개의 탄소 원자, 3개의 탄소 원자 등, 20개를 포함하여 20개 이하의 탄소 원자로 이루어질 수 있음을 의미하지만, 본 정의는 또한 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "알킬"의 경우도 포함한다). 알킬기는 또한 1개 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알킬일 수 있다. 알킬기는 또한 1개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알킬일 수 있다. 알킬기는 "C_1-C_4알킬" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 단지 예로서, "C_1-C_6알킬"은 알킬 사슬에 1개 내지 6개의 탄소 원자가 존재함을 나타내는데, 즉, 알킬 사슬은 메틸, 에틸, 프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸, sec-부틸 및 t-부틸로 이루어진 군으로부터 선택된다. 전형적인 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 삼차 부틸, 펜틸, 헥실 등을 포함하지만 결코 이로 한정되지 않는다.

[0035] 본 명세서에 사용되는 "알콕시"는 화학식 -OR(여기서, R은 상기에 정의된 바와 같은 알킬임)을 지칭하는 것으로, 이는 예를 들어, "C_1-C_9 알콕시"이며, 이에는 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 1-메틸에톡시(아이소프로폭시), n-부톡시, 아이소-부톡시, sec-부톡시, 및 tert-부톡시 등이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0036] 본원에 사용되는 "알케닐"은 하나 이상의 이중 결합을 함유하는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 사슬을 지칭한다. 알케닐기는 2개 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 본 정의는 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "알케닐"의 경우도 포함한다. 알케닐기는 또한 2개 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알케닐일 수 있다. 알케닐기는 또한 2개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알케닐일 수 있다. 알케닐기는 "C_2-C_6 알케닐" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 단지 예로서, "C_2-C_6 알케닐"은 알케닐 사슬에 2개 내지 6개의 탄소 원자가 존재함을 나타내며, 즉, 알케닐 사슬은 에테닐, 프로펜-1-일, 프로펜-2-일, 프로펜-3-일, 부텐-1-일, 부텐-2-일, 부텐-3-일, 부텐-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-디에닐, 부타-1,2,-디에닐, 및 부타-1,2-디엔-4-일로 이루어진 군으로부터 선택된다. 전형적인 알케닐기에는 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 및 헥세닐 등이 포함되지만 결코 이로 한정되지 않는다.

[0037] 본원에 사용되는 "알키닐"은 하나 이상의 삼중 결합을 포함하는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 사슬을 지칭한다. 알키닐기는 2개 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 본 정의는 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "알키닐"의 경우도 포함한다. 알키닐기는 또한 2개 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알키닐일 수 있다. 알키닐기는 또한 2개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알키닐일 수 있다. 알키닐기는 "C_2-C_6 알키닐" 또는 유사

한 명칭으로 지정될 수 있다. 단지 예로서, "C_2-C_6 알키닐"은 알키닐 사슬에 2개 내지 6개의 탄소 원자가 존재함을 나타내는데, 즉, 알키닐 사슬은 에티닐, 프로핀-1-일, 프로핀-2-일, 부틴-1-일, 부틴-3-일, 부틴-4-일, 및 2-부티닐로 이루어진 군으로부터 선택된다. 전형적인 알키닐기에는 에티닐, 프로피닐, 부티닐, 펜티닐, 및 헥시닐 등이 포함되지만 결코 이로 한정되지 않는다.

[0038] 용어 "방향족"은 컨쥬게이트된 π 전자계를 갖는 고리 또는 고리계를 지칭하며, 카르보사이클릭 방향족기(예를 들어, 페닐) 및 헤테로사이클릭 방향족기(예를 들어, 피리딘)를 모두 포함한다. 이 용어는, 전체 고리계가 방향족이라면, 모노사이클릭 또는 융합 고리 폴리사이클릭(즉, 인접한 원자쌍을 공유하는 고리)기를 포함한다.

[0039] 본원에 사용되는 "아릴"은 고리 백본 내에 탄소만을 함유하는 방향족 고리 또는 고리계(즉, 2개의 인접한 탄소 원자를 공유하는 2개 이상의 융합된 고리)를 지칭한다. 아릴이 고리계일 때, 시스템 내의 모든 고리는 방향족이다. 아릴기는 6개 내지 18개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 본 정의는 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "아릴"의 경우도 포함한다. 일부 실시형태에서, 아릴기는 6 내지 10개의 탄소 원자를 갖는다. 아릴기는 "C_6-C_{10} 아릴", "C_6 또는 C_{10} 아릴", 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 아릴기의 예에는 페닐, 나프틸, 아줄레닐, 및 안트라세닐이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0040] "아르알킬" 또는 "아릴알킬"은 치환기로서, 알킬렌기를 통해 연결된 아릴기, 예컨대 "C_{7-14} 아르알킬" 등이며, 이에는 벤질, 2-페닐에틸, 3-페닐프로필, 및 나프틸알킬이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 경우에 따라서는, 알킬렌기는 저급 알킬렌기(즉, C_1-C_6 알킬렌기)이다.

[0041] 본원에서 사용되는 "아릴옥시"는 R은 위에서 정의한 바와 같은 아릴, 예를 들어 이에 제한되지는 않지만 페닐인 RO-를 지칭한다.

[0042] 본원에서 사용되는 "헤테로아릴"은 고리 백본 내에 하나 이상의 헤테로원자, 즉, 질소, 산소 및 황을 포함하지만 이로 한정되지 않는 탄소 이외의 원소를 함유하는 방향족 고리 또는 고리계(즉, 2개의 인접한 원자를 공유하는 2개 이상의 융합된 고리)를 지칭한다. 헤테로아릴이 고리계일 때, 시스템 내의 모든 고리는 방향족이다. 헤테로아릴기는 5개 내지 18개의 고리 구성원(즉, 탄소 원자 및 헤테로원자를 포함하는 고리 백본을 구성하는 원자수)을 가질 수 있지만, 본 정의는 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "헤테로아릴"의 경우도 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤테로아릴기는 5개 내지 10개의 고리 구성원 또는 5 내지 7개의 고리 구성원을 갖는다. 헤테로아릴기는 "5원 내지 7원 헤테로아릴", "5원 내지 10원 헤테로아릴", 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 헤테로아릴 고리의 예에는 푸릴, 티에닐, 프탈라지닐, 피롤릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 이소옥사졸릴, 이소티아졸릴, 트리아졸릴, 티아디아졸릴, 피리디닐, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 트리아지닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤조이미다졸릴, 벤족사졸릴, 벤조티아졸릴, 인돌릴, 이소인돌릴, 및 벤조티에닐이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0043] "헤테로아르알킬" 또는 "헤테로아릴알킬"은 치환기로서, 알킬렌기를 통해 연결된 헤테로아릴기이다. 예에는 2-티에닐메틸, 3-티에닐메틸, 푸릴메틸, 티에닐에틸, 피롤릴알킬, 피리딜알킬, 아이소옥사졸릴알킬, 및 이미다졸릴알킬이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 경우에 따라서는, 알킬렌기는 저급 알킬렌기(즉, C_1-C_6 알킬렌기)이다.

[0044] 본 명세서에 사용되는 "카르보사이클릴"은 고리계 골격에 탄소 원자만을 포함하는 비방향족 사이클릭 고리 또는 고리계를 의미한다. 카르보사이클릴이 고리계인 경우에는, 2개 이상의 고리가 융합된, 가교된 또는 스피로 연결된 형태로 함께 결합될 수 있다. 카르보사이클릴은 고리계의 적어도 하나의 고리가 방향족이 아니면 임의의 포화도를 가질 수 있다. 따라서, 카르보사이클릴에는 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 및 사이클로알키닐이 포함된다. 카르보사이클릴기는 3개 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 본 정의는 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "카르보사이클릴"의 경우도 포함한다. 카르보사이클릴기는 또한 3개 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 카르보사이클릴일 수 있다. 카르보사이클릴기는 또한 3개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 카르보사이클릴일 수 있다. 카르보사이클릴기는 "C_3-C_6카르보사이클릴" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 카르보사이클릴 고리의 예에는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헥세닐, 2,3-디하이드로-인덴, 바이사이클[2.2.2]옥타닐, 아다만틸, 및 스피로 [4.4]노나닐이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0045] 본 명세서에 사용되는 "사이클로알킬"은 완전 포화 카르보사이클릴 고리 또는 고리계를 의미한다. 예에는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 및 사이클로헥실이 포함된다.

[0046] 본 명세서에 사용되는 "헤테로사이클릴"은 고리 골격에 적어도 하나의 헤테로원자를 포함하는 비방향족 사이클릭 고리 또는 고리계를 의미한다. 헤테로사이클릴은 융합된, 가교된 또는 스피로 연결된 형태로 함께 결합될 수 있다. 헤테로사이클릴은 고리계의 적어도 하나의 고리가 방향족이 아니면 임의의 포화도를 가질 수 있다. 헤테로원자(들)는 고리계의 비방향족 또는 방향족 고리 중 어느 하나에 존재할 수 있다. 헤테로사이클릴기는 3개 내지 20개의 고리 구성원(즉, 탄소 원자 및 헤테로원자를 포함하는 고리 골격을 구성하는 원자수)을 가질 수 있지만, 본 정의는 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "헤테로사이클릴"의 경우도 포함한다. 헤테로사이클릴기는 또한 3개 내지 10개의 고리 구성원을 갖는 중간 크기 헤테로사이클릴일 수 있다. 헤테로사이클릴기는 또한 3개 내지 6개의 고리 구성원을 갖는 헤테로사이클릴일 수 있다. 헤테로사이클릴기는 "3원 내지 6원 헤테로사이클릴" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 바람직한 6원 모노사이클릭 헤테로사이클릴에서, 헤테로원자(들)는 O, N 또는 S 중 1개 내지 최대 3개로부터 선택되며, 바람직한 5원 모노사이클릭 헤테로사이클릴에서, 헤테로원자(들)는 O, N, 또는 S로부터 선택되는 1개 또는 2개의 헤테로원자로부터 선택된다. 헤테로사이클릴 고리의 예에는 아제피닐, 아크리디닐, 카르바졸릴, 신놀리닐, 디옥솔라닐, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 모르폴리닐, 옥시라닐, 옥세파닐, 티에파닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 디옥소피페라지닐, 피롤리디닐, 피롤리도닐, 피롤리디오닐, 4-피페리도닐, 피라졸리닐, 피라졸리디닐, 1,3-디옥시닐, 1,3-디옥사닐, 1,4-디옥시닐, 1,4-디옥사닐, 1,3-옥사티아닐, 1,4-옥사티이닐, 1,4-옥사티아닐, 2*H*-1,2-옥사지닐, 트리옥사닐, 헥사하이드로-1,3,5-트리아지닐, 1,3-디옥솔릴, 1,3-디옥솔라닐, 1,3-디티올릴, 1,3-디티올라닐, 이소옥사졸리닐, 이소옥사졸리디닐, 옥사졸리닐, 옥사졸리디닐, 옥사졸리디노일, 티아졸리닐, 티아졸리디닐, 1,3-옥사티올라닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티오페닐, 테트라하이드로티오피라닐, 테트라하이드로-1,4-티아지닐, 티아모르폴리닐, 디하이드로벤조푸라닐, 벤즈이미다졸리디닐, 및 테트라하이드로퀴놀린이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0047] 본원에 사용되는 "(아릴)알킬"은 상기 정의된 바와 같이 치환체로서 상기 기재된 바와 같이 알킬렌기를 통해 연결된 아릴기를 지칭한다. 아르알킬의 알킬렌 및 아릴기는 치환 또는 미치환될 수 있다. 예에는 벤질, 2-페닐알킬, 3-페닐알킬, 및 나프틸알킬이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 알킬렌은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 메틸렌 단위(들)를 함유하는 미치환된 직쇄이다.

[0048] 본원에서 사용되는 "(헤테로아릴)알킬"은 상기 정의된 바와 같은 알킬렌기를 통해 치환체로서 연결된 상기 정의된 바와 같은 헤테로아릴기를 지칭한다. 헤테로아르알킬의 알킬렌 및 헤테로아릴기는 치환 또는 미치환될 수 있다. 예에는 2-티에닐알킬, 3-티에닐알킬, 푸릴알킬, 티에닐알킬, 피롤릴알킬, 피리딜알킬, 아이속사졸릴알킬, 및 이미다졸릴알킬, 및 이들의 벤조-융합된 유사체가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 알킬렌은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 메틸렌 단위(들)를 함유하는 미치환된 직쇄이다.

[0049] 본원에서 사용되는 "(헤테로사이클릴)알킬"은 치환기로서, 상기에 정의된 바와 같은 알킬렌기를 통해 연결된 상기에 정의된 바와 같은 헤테로사이클릭기 또는 헤테로사이클릴기를 지칭한다. (헤테로사이클릴)알킬의 알킬렌기 및 헤테로사이클릴기는 치환 또는 미치환될 수 있다. 예에는 (테트라하이드로-2H-피란-4-일)메틸, (피페리딘-4-일)에틸, (피페리딘-4-일)프로필, (테트라하이드로-2H-티오피란-4-일)메틸, 및 (1,3-티아지난-4-일)메틸이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 알킬렌은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 메틸렌 단위(들)를 함유하는 미치환된 직쇄이다.

[0050] 본원에 사용되는 "(카르보사이클릴)알킬"은 알킬렌기를 통해 치환체로서 연결된 카르보사이클릴기(본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다. 예에는 사이클로프로필메틸, 사이클로부틸메틸, 사이클로펜틸에틸, 및 사이클로헥실프로필이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 알킬렌은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 메틸렌 단위(들)를 함유하는 미치환된 직쇄이다.

[0051] 본원에서 사용되는 "알콕시알킬" 또는 "(알콕시)알킬"은 알킬렌기를 통해 연결된 알콕시기, 예컨대 C_2-C_8 알콕시알킬, 또는 (C_1-C_6 알콕시)C_1-C_6 알킬, 예를 들어 -$(CH_2)_{1-3}$-OCH_3를 지칭한다.

[0052] 본원에서 사용되는 "-O-알콕시알킬" 또는 "-O-(알콕시)알킬"은 -O-(알킬렌)기를 통해 연결된 알콕시기, 예컨대 -O-(C_1-C_6 알콕시)C_1-C_6 알킬, 예를 들어, -O-$(CH_2)_{1-3}$-OCH_3를 지칭한다.

[0053] 본원에서 사용되는 "할로알킬"은 하나 이상의 수소 원자가 할로겐으로 대체된 알킬기(예를 들어, 모노-할로알킬, 디-할로알킬 및 트리-할로알킬)를 지칭한다. 이러한 기에는 클로로메틸, 플루오로메틸, 디플루오로메틸, 트리플루오로메틸 및 1-클로로-2-플루오로메틸, 2-플루오로이소부틸이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 할로알킬은 치환 또는 미치환될 수 있다.

[0054] 본원에 사용되는 "할로알콕시"는 하나 이상의 수소 원자가 할로겐으로 대체된 알콕시기를 지칭한다(예를 들어, 모노-할로알콕시, 디-할로알콕시 및 트리-할로알콕시). 이러한 기에는 클로로메톡시, 플루오로메톡시, 디플루오로메톡시, 트리플루오로메톡시 및 1-클로로-2-플루오로메톡시, 2-플루오로이소부톡시가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 할로알콕시는 치환 또는 미치환될 수 있다.

[0055] "아미노"기는 $-NH_2$기를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "모노-치환된 아미노기"는 수소 원자 중 하나가 치환체로 대체된 아미노($-NH_2$)기를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "디-치환된 아미노기"는 2개의 수소 원자 각각이 치환체로 대체된 아미노($-NH_2$)기를 지칭한다. 본원에 사용되는 용어 "선택적으로 치환된 아미노"는 $-NR_AR_B$기를 지칭하며, 여기서 R_A 및 R_B는 독립적으로 수소, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 아랄킬, 또는 헤테로사이클릴(알킬)이며, 이는 본원에 정의된 바와 같다.

[0056] "O-카르복시"기는 "$-OC(=O)R$"기를 지칭하며, 여기서 R은 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택되며, 이는 본원에 정의된 바와 같다.

[0057] "C-카르복시"기는 "$-C(=O)OR$"기를 지칭하며, 여기서 R은 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되며, 이는 본원에 정의된 바와 같다. 비제한적인 예에는 카르복실(즉, $-C(=O)OH$)이 포함된다.

[0058] "설포닐"기는 "$-SO_2R$"기를 지칭하며, 여기서 R은 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택되며, 이는 본원에 정의된 바와 같다.

[0059] "설피노"기는 "$-S(=O)OH$"기를 지칭한다.

[0060] "설포"기는 "$-S(=O)_2OH$" 또는 "$-SO_3H$"기를 지칭한다.

[0061] "설포네이트"기는 "$-SO_3^-$"기를 지칭한다.

[0062] "설페이트"기는 "$-SO_4^-$"기를 지칭한다.

[0063] "S-설폰아미도"기는 "$-SO_2NR_AR_B$"기를 지칭하며, 여기서 R_A 및 R_B는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택되며, 이는 본원에 정의된 바와 같다.

[0064] "N-설폰아미도"기는 "$-N(R_A)SO_2R_B$"기를 지칭하며, 여기서 R_A 및 R_B는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택되며, 이는 본원에 정의된 바와 같다.

[0065] "C-아미도"기는 " $-C(=O)NR_AR_B$"기를 지칭하며, 여기서 R_A 및 R_B는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택되며, 이는 본원에 정의된 바와 같다.

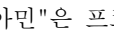
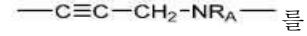
[0066] "N-아미도"기는 "$-N(R_A)C(=O)R_B$"기를 지칭하며, 여기서 R_A 및 R_B는 각각 독립적으로 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택되며, 이는 본원에 정의된 바와 같다.

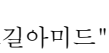
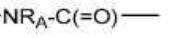
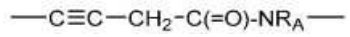
[0067] "O-카르바밀"기는 R_A 및 R_B가 S-설폰아미도에 대해 정의된 것과 동일할 수 있는 "$-OC(=O)N(R_AR_B)$"기를 지칭한다. O-카르바밀은 치환 또는 미치환될 수 있다.

[0068] "N-카르바밀"기는 R 및 R_A가 N-설폰아미도에 대해 정의된 것과 동일할 수 있는 "$ROC(=O)N(R_A)-$"기를 지칭한다. N-카르바밀은 치환 또는 미치환될 수 있다.

[0069] "O-티오카르바밀"기는 R_A 및 R_B가 S-설폰아미도에 대해 정의된 것과 동일할 수 있는 "-OC(=S)-N(R_AR_B)"기를 지칭한다. O-티오카르바밀은 치환 또는 미치환될 수 있다.

[0070] "N-티오카르바밀"기는 R 및 R_A가 N-설폰아미도에 대해 정의된 것과 동일할 수 있는 "ROC(=S)N(R_A)-"기를 지칭한다. N-티오카르바밀은 치환 또는 미치환될 수 있다.

[0071] 본원에서 사용되는 용어 "프로파르길아민"은 프로파르길기()로 치환된 아미노기를 지칭한다. 프로파르길아민이 문맥에서 2가 모이어티로서 사용되는 경우, 이는 를 포함하며, 여기서 R_A는 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴이며, 이는 본 명세서에 정의된 바와 같다.

[0072] 본 명세서에 사용되는 용어 "프로파르길아미드"는 프로파르길기()로 치환된 C-아미도기 또는 N-아미도기를 지칭한다. 프로파르길아미드가 문맥에서 2가 모이어티로서 사용되는 경우, 이는  또는 를 포함하며, 여기서 R_A는 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴이며, 이는 본 명세서에 정의된 바와 같다.

[0073] 본 명세서에 사용되는 용어 "알릴아민"은 알릴기(CH_2=CH-CH_2-)로 치환된 아미노기를 지칭한다. 알릴아민이 문맥에서 2가 모이어티로서 사용되는 경우, 이는 -CH=CH-CH_2-NR_A-를 포함하며, 여기서 R_A는 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴이며, 이는 본 명세서에 정의된 바와 같다.

[0074] 본 명세서에 사용되는 용어 "알릴아미드"는 알릴기(CH_2=CH-CH_2-)로 치환된 C-아미도기 또는 N-아미도기를 지칭한다. 알릴아미드가 문맥에서 2가 모이어티로서 사용되는 경우, 이는 -CH=CH-CH_2-NR_A-C(=O)- 또는 -CH=CH-CH_2-C(=O)-NR_A-를 포함하며, 여기서 R_A는 수소, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 알케닐, C_2-C_6 알키닐, C_3-C_7 카르보사이클릴, C_6-C_{10} 아릴, 5원 내지 10원 헤테로아릴, 및 3원 내지 10원 헤테로사이클릴이며, 이는 본 명세서에 정의된 바와 같다.

[0075] 용어 "알킬아미노" 또는 "(알킬)아미노"는 수소 중 하나 또는 둘 모두가 알킬기로 대체된 아미노기를 지칭한다.

[0076] "(알콕시)알킬"기는 알킬렌기를 통해 연결된 알콕시기, 예컨대 "(C_1-C_6 알콕시) C_1-C_6 알킬" 등을 지칭한다.

[0077] 본원에서 사용되는 용어 "하이드록시"는 -OH기를 지칭한다.

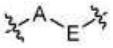
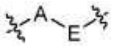
[0078] 본원에서 사용되는 용어 "시아노"기는 "-CN"기를 지칭한다.

[0079] 본원에 사용되는 용어 "아지도"는 $-N_3$기를 지칭한다.

[0080] 기가 "선택적으로 치환된"으로 기재되는 경우, 이는 미치환 또는 치환될 수 있다. 마찬가지로, 기가 "치환된"인 것으로 기술되는 경우, 치환기는 하나 이상의 표시된 치환기로부터 선택될 수 있다. 본원에서 사용되는 치환된 기는 비치환된 모기(parent group)의 하나 이상의 수소 원자를 다른 원자 또는 기로 교환한 것으로부터 유도된다. 달리 지시되지 않는 한, 기가 "치환된" 것으로 간주되는 경우, 그 기는 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알케닐, C_1-C_6 알키닐, C_1-C_6 헤테로알킬, C_3-C_7 카르보사이클릴(할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), C_3-C_7카르보사이클릴-C_1-C_6-알킬(할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 3원 내지 10원 헤테로사이클릴(할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 3원 내지 10원 헤테로사이클릴-C_1-C_6-알킬(할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 아릴(할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), (아릴)C_1-C_6 알킬(할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 5원 내지 10원 헤테로아릴(할로, C_1-C_6

알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), (5원 내지 10원 헤테로아릴)C_1-C_6 알킬(할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 할로, -CN, 하이드록시, C_1-C_6 알콕시, (C_1-C_6 알콕시)C_1-C_6 알킬, -O(C_1-C_6 알콕시)C_1-C_6 알킬; (C_1-C_6 할로알콕시)C_1-C_6 알킬; -O(C_1-C_6 할로알콕시)C_1-C_6 알킬; 아릴옥시, 설프하이드릴(메르캅토), 할로(C_1-C_6)알킬(예를 들어, $-CF_3$), 할로(C_1-C_6)알콕시(예를 들어, $-OCF_3$), C_1-C_6 알킬티오, 아릴티오, 아미노, 아미노(C_1-C_6)알킬, 니트로, O-카르바밀, N-카르바밀, O-티오카르바밀, N-티오카르바밀, C-아미도, N-아미도, S-설폰아미도, N-설폰아미도, C-카르복시, O-카르복시, 아실, 시아나토, 아이소시아나토, 티오시아나토, 이소티오시아나토, 설피닐, 설포닐, $-SO_3H$, 설포네이트, 설페이트, 설피노, $-OSO_2C_{1-4}$알킬, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트 및 옥소(=O)로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환된 것을 의미한다. 기가 "선택적으로 치환된"으로 기재되어 있는 경우에는 언제든지, 그 기는 상기 치환기로 치환될 수 있다.

[0081] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 명세서에 기재된 화합물은 이온화된 형태, 예컨대, $-CO_2^-$, $-SO_3^-$ 또는 $-O-SO_3^-$으로 존재할 수 있다. 화합물이 양으로 또는 음으로 하전된 치환기, 예를 들어 $-SO_3^-$을 함유하는 경우, 그것은 또한, 화합물이 전체적으로 중성이 되게 하는 음으로 또는 양으로 하전된 반대이온을 함유할 수 있다. 다른 양태에서, 화합물은 염 형태로 존재할 수 있으며, 여기서는 반대이온이 짝산 또는 짝염기에 의해 제공된다.

[0082] 치환기가 디-라디칼로서 표시된(즉, 분자의 나머지에 대해 2개의 부착점을 갖는) 경우는 어느 경우이든, 달리 지시되지 않는 한 치환기는 어떠한 방향 배치로도 부착될 수 있음이 이해되어야 한다. 따라서, 예를 들어, -AE- 또는  로 표시된 치환기는 **A**가 분자의 가장 왼쪽의 부착점에 부착되도록 치환기가 배향되는 것뿐만 아니라, **A**가 분자의 가장 오른쪽의 부착점에 부착되는 경우도 포함한다. 또한, 기 또는 치환기가  로 표시되고, L이 임의로 존재하는 링커 모이어티로 정의되는 경우; L이 존재하지 않는 경우(또는 부재하는 경우), 이러한 기 또는 치환기는  와 상응한다.

[0083] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "뉴클레오티드"는 질소 함유 헤테로사이클릭 염기, 당, 및 하나 이상의 포스페이트기를 포함한다. 이들은 핵산 서열의 단량체 단위이다. RNA에서, 당은 리보스이고, DNA에서는 데옥시리보스, 즉, 리보스에 존재하는 하이드록시기가 결여되어 있는 당이다. 질소 함유 헤테로사이클릭 염기는 퓨린 또는 피리미딘 염기일 수 있다. 퓨린 염기는 아데닌(A) 및 구아닌(G), 및 이들의 변형된 유도체 또는 유사체, 예컨대 7-데아자 아데닌 또는 7-데아자 구아닌을 포함한다. 피리미딘 염기는 시토신(C), 티민(T), 및 우라실(U), 및 이들의 변형된 유도체 또는 유사체를 포함한다. 데옥시리보스의 C-1 원자는 피리미딘의 N-1 또는 퓨린의 N-9에 결합된다.

[0084] 본 명세서에 사용되는 "뉴클레오시드"는 뉴클레오티드와 구조적으로 유사하지만 포스페이트 모이어티가 존재하지 않는다. 뉴클레오시드 유사체의 한 예는 표지가 염기에 연결되어 있고 당 분자에 부착된 포스페이트기가 없는 것일 것이다. 용어 "뉴클레오시드"는 당업자에게 명백한 이의 통상적인 의미로 본 명세서에 사용된다. 예에는 리보스 모이어티를 포함하는 리보뉴클레오시드 및 데옥시리보스 모이어티를 포함하는 데옥시리보뉴클레오시드가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 변형된 펜토스 모이어티는 산소 원자가 탄소로 치환되고/되거나 탄소가 황 또는 산소 원자로 치환된 펜토스 모이어티이다. "뉴클레오시드"는 치환된 염기 및/또는 당 모이어티를 가질 수 있는 단량체이다. 게다가, 뉴클레오시드는 더 큰 DNA 및/또는 RNA 폴리머 및 올리고머에 도입될 수 있다.

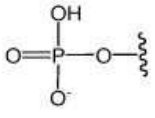
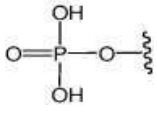
[0085] 용어 "퓨린 염기"는 당업자에게 명백한 이의 통상적인 의미로 본 명세서에 사용되며, 이의 호변이성질체를 포함한다. 유사하게, 용어 "피리미딘 염기"는 당업자에게 명백한 이의 통상적인 의미로 본 명세서에 사용되며, 이의 호변이성질체를 포함한다. 선택적으로 치환된 퓨린-염기의 비제한적인 목록은 퓨린, 아데닌, 구아닌, 데아자퓨린, 7-데아자 아데닌, 7-데아자 구아닌, 하이포잔틴, 잔틴, 알로잔틴, 7-알킬구아닌(예를 들어, 7-메틸구아닌), 테오브로민, 카페인, 요산 및 아이소구아닌을 포함한다. 피리미딘 염기의 예에는 시토신, 티민, 우라실, 5,6-디하이드로우라실 및 5-알킬시토신(예를 들어, 5-메틸시토신)이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0086] 본원에서 사용되는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드가 본 명세서에 기재된 뉴클레오시드 또는 뉴클레

오티드를 "포함하는" 또는 "혼입하는" 것으로 기재될 때, 그것은 본 명세서에 기재된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 공유 결합을 형성한다는 것을 의미한다. 유사하게, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 일부로서 기재될 때, 예컨대 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 "에 도입된" 것으로 기재될 때, 그것은 본 명세서에 기재된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 공유 결합을 형성한다는 것을 의미한다. 일부 이러한 실시형태에서, 공유 결합은 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 3' 탄소 원자와 뉴클레오티드의 5' 탄소 원자 사이의 포스포디에스테르 결합으로서, 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 3' 하이드록시기와 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드의 5' 포스페이트기 사이에 형성된다.

[0087] 본 명세서에 사용되는 용어 "절단가능한 링커"는 전체 링커가 제거되어야 하는 것을 내포하는 것으로 의미하지 않는다. 절단 부위는 링커의 일부가 절단 후 검출가능한 표지 및/또는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 모이어티에 부착된 채로 남아 있는 것을 보장하는 링커 상의 위치에 위치될 수 있다.

[0088] 본 명세서에 사용되는 "유도체" 및 "유사체"는 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 당 모이어티를 갖는 합성 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유도체를 의미한다. 이러한 유도체 및 유사체는, 예를 들어 문헌[Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley & Son, 1980)] 및 문헌[Uhlman *et al.*, *Chemical Reviews* 90:543-584, 1990]에 논의되어 있다. 뉴클레오티드 유사체는 또한, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬-포스포네이트, 포스포르아닐리데이트 및 포스포르아미데이트 결합을 포함한 변형된 포스포디에스테르 결합을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 "유도체", "유사체" 및 "변형된"은 상호교환 가능하게 사용될 수 있으며, 본 명세서에 정의된 용어 "뉴클레오티드" 및 "뉴클레오시드"에 의해 포함된다.

[0089] 본 명세서에 사용되는 용어 "포스페이트"는 당업자에게 명백한 이의 통상적인 의미로 사용되고, 이의 양성자화 형태(예를 들어,  및 )를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "모노포스페이트", "디포스페이트" 및 "트리포스페이트"는 당업자에게 명백한 이의 통상적인 의미로 사용되고, 양성자화 형태를 포함한다.

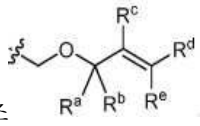
[0090] 본 명세서에 사용되는 용어 "보호기" 및 "보호기들"은 분자 내의 기존의 기가 원치 않는 화학 반응을 거치는 것을 방지하기 위해 분자에 부가되는 임의의 원자 또는 원자들의 군을 지칭한다. 때때로, "보호기"와 "차단기"는 상호교환 가능하게 사용될 수 있다.

[0091] 본 명세서에 사용되는 용어 "위상화"는 3' 터미네이터 및 플루오로포어의 불완전한 제거 및 주어진 시퀀싱 사이클에서의 폴리머라제에 의한 클러스터 내로의 일부 DNA 가닥의 도입 실패로 인한 SBS에서의 현상을 지칭한다. 전위상화는 유효한 3' 터미네이터를 갖지 않는 뉴클레오티드의 도입으로 인해 야기되는데, 여기서는 이러한 도입 사건이 종결 실패로 인해 1 사이클 먼저 앞서 간다. 위상화 및 전위상화는 특정 사이클에 대해 측정된 신호 강도가 현재 사이클로부터의 신호뿐만 아니라 선행 사이클 및 후행 사이클로부터의 잡음으로 이루어지게 한다. 사이클 횟수가 증가함에 따라, 위상화 및 전위상화에 의해 영향을 받는 클러스터당 서열의 분율이 증가하여, 올바른 염기의 확인을 방해한다. 전위상화는 합성에 의한 시퀀싱(SBS) 동안 미량의 비보호 또는 비블로킹된 3'-OH 뉴클레오티드의 존재로 인해 발생될 수 있다. 비보호된 3'-OH 뉴클레오티드는 제조 공정 동안 또는 가능하게는 저장 및 시약 취급 과정 동안 생성될 수 있다. 따라서, 전위상화의 발생률을 감소시키는 뉴클레오티드 유사체의 발견은 놀랍고, 기존의 뉴클레오티드 유사체에 비해 SBS 응용에서 큰 이점을 제공한다. 예를 들어, 제공된 뉴클레오티드 유사체는 보다 빠른 SBS 사이클 시간, 보다 낮은 위상화 및 전위상화 값, 및 보다 긴 시퀀싱 리드 길이를 가져올 수 있다.

[0092] 팔라듐 촉매를 활용한 시퀀싱 방법

[0093] 본 개시내용의 일부 실시형태는 다음을 포함하는 표적 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드)의 서열을 결정하는 방법에 관한 것이다:

[0094] (a) 제1 수용액에서 카피 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체를 하나 이상의 다른 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 또는 dUTP)와 접촉시키는 단계, 여기서 각각의 뉴클레오티드는 뉴클

레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는 3' 차단기를 포함하고, 카피 폴리뉴클레오티드는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적임;

[0095] (b) 확장된 카피 폴리뉴클레오티드를 생성하기 위해 한 유형의 뉴클레오티드를 카피 폴리뉴클레오티드에 혼입시키는 단계;

[0096] (c) 하나 이상의 형광 측정을 수행하여 혼입된 뉴클레오티드의 정체(identity)를 결정하는 단계; 및

[0097] (d) 팔라듐 촉매를 사용하여 혼입된 뉴클레오티드의 3' 차단기를 제거하는 단계;

[0098] 여기서 남아있는 팔라듐 촉매의 적어도 일부는 단계 (d) 후에 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저에 의해 불활성화되고, 적어도 하나의 팔라듐 스캐빈저는 -O-알릴, -S-알릴, -NR-알릴, $-N^{+}RR'$-알릴 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하고;

[0099] R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e는 각각 독립적으로 H, 할로겐, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 또는 C_1-C_6 할로알킬이고;

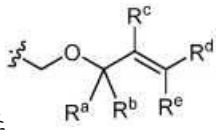
[0100] R은 H, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 미치환된 또는 치환된 C_2-C_6 알케닐, 미치환된 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐, 미치환된 또는 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 미치환된 또는 치환된 5원 내지 10원 헤테로아릴, 미치환된 또는 치환된 C_3-C_{10} 카르보사이클릴, 또는 미치환된 또는 치환된 5원 내지 10원 헤테로사이클릴이고;

[0101] R'는 H, 미치환된 C_1-C_6 알킬 또는 치환된 C_1-C_6 알킬임.

[0102] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 카피 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적인 단일 가닥 카피 폴리뉴클레오티드와 표적 폴리뉴클레오티드를 접촉시킴으로써 형성된다. 일부 실시형태에서, 혼입된 뉴클레오티드는 표지된 뉴클레오티드이고, 표지된 뉴클레오티드는 선택적으로 절단 가능한 링커를 통해 뉴클레오티드에 부착된 형광 표지를 포함한다(예를 들어, 형광 표지는 절단 가능한 링커를 통해 핵염기에 부착된다). 일부 이러한 실시형태에서, 단계 (d)는 또한 형광 표지를 제거한다. 일부 실시형태에서, 방법은 단계 (e): 혼입된 뉴클레오티드의 3' 차단기를 제거한 후 고체 지지체를 제2 수용액으로 세척하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 표적 폴리뉴클레오티드 가닥의 적어도 일부의 서열이 결정될 때까지 단계 (a) 내지 (d) 또는 (a) 내지 (e)를 반복하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 사이클(즉, 단계 (a) 내지 (d) 또는 단계 (a) 내지 (e))은 적어도 50회, 적어도 100회, 적어도 150회, 적어도 200회, 적어도 250회, 또는 적어도 300회 반복된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저에 의해 불활성화된 나머지 팔라듐 촉매는 Pd(II) 및/또는 Pd(0) 종의 형태이다. 일부 실시형태에서, 방법은 복수의 상이한 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드)를 결정하기 위해 동시에 수행된다.

[0103] 본 개시내용의 일부 추가 실시형태는 다음을 포함하는 복수의 표적 폴리뉴클레오티드의 서열을 결정하는 방법에 관한 것이다:

[0104] (a) 혼성화 조건 하에서 고체 지지체를 시퀀싱 프라이머와 접촉시키는 단계, 여기서 고체 지지체는 그 위에 고정된 복수의 상이한 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 시퀀싱 프라이머는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적임;

[0105] (b) DNA 폴리머라제 매개 프라이머 연장에 적합한 조건 하에서 DNA 폴리머라제와 4가지 다른 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP 또는 dUTP) 중 하나 이상을 포함하는 제1 수용액과 고체 지지체를 접촉시키는 단계, 여기서 각각의 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는 3' 차단기를 포함함;

[0106] (c) 한 유형의 뉴클레오티드를 시퀀싱 프라이머에 혼입하여 확장된 카피 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;

[0107] (d) 확장된 카피 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 형광 측정을 수행하는 단계; 및

[0108] (e) 팔라듐 촉매를 사용하여 혼입된 뉴클레오티드의 3' 차단기를 제거하는 단계;

[0109] 여기서 남아있는 팔라듐 촉매의 적어도 일부는 단계 (e) 후에 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저에 의해 불활성화되고, 적어도 하나의 팔라듐 스캐빈저는 -O-알릴, -S-알릴, -NR-알릴, $-N^{+}RR'$-알릴 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하고;

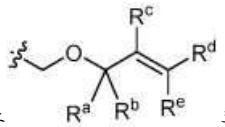
[0110] R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e는 각각 독립적으로 H, 할로겐, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 또는 C_1-C_6 할로알킬이고;

[0111] R은 H, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 미치환된 또는 치환된 C_2-C_6 알케닐, 미치환된 또는 치환된 C_2-C_6 알키닐, 미치환된 또는 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 미치환된 또는 치환된 5원 내지 10원 헤테로아릴, 미치환된 또는 치환된 C_3-C_{10} 카르보사이클릴, 또는 미치환된 또는 치환된 5원 내지 10원 헤테로사이클릴이고;

[0112] R'는 H, 미치환된 C_1-C_6 알킬 또는 치환된 C_1-C_6 알킬임.

[0113] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 혼입된 뉴클레오티드는 표지된 뉴클레오티드이고, 표지된 뉴클레오티드는 선택적으로 절단 가능한 링커를 통해 뉴클레오티드에 부착된 검출 가능한 표지(예를 들어, 형광 염료)를 포함한다(예를 들어, 검출 가능한 표지는 절단 가능한 링커를 통해 핵염기에 부착된다). 이러한 일부 실시형태에서, 단계 (e)는 또한 검출 가능한 표지를 제거한다. 일부 실시형태에서, 방법은 단계 (f): 혼입된 뉴클레오티드의 3' 차단기를 제거한 후 고체 지지체를 제2 수용액으로 세척하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부의 서열이 결정될 때까지 단계 (b) 내지 (e) 또는 단계 (b) 내지 (f)를 반복하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 사이클(즉, 단계 (b) 내지 (e) 또는 단계 (b) 내지 (f))은 적어도 50회, 적어도 100회, 적어도 150회, 적어도 200회, 적어도 250회, 또는 적어도 300회 반복된다. 일부 실시형태에서, 나머지 팔라듐 촉매는 Pd(II) 및/또는 Pd(0) 종 형태의 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저에 의해 불활성화된다.

[0114] 본원에 기재된 방법의 다른 실시형태에서, 혼입된 뉴클레오티드는 표지되지 않는다. 하나 이상의 형광 염료를 함유하는 표지된 친화성 시약을 사용하여 도입 후에 하나 이상의 형광 표지가 도입될 수 있다. 예를 들어, 제1 수용액 중 4개의 서로 다른 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 또는 dUTP) 중 1개, 2개, 3개 또는 각각은 표지되지 않을 수 있다. 4가지 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, dNTP) 각각은 폴리머라제에 의해 카피 폴리뉴클레오티드의 3' 말단에 단일 염기만 추가될 수 있도록 본원에 설명된 3' 하이드록시 차단기를 가지고 있다. 표지되지 않은 뉴클레오티드의 혼입 후에, 이어서, 도입된 dNTP에 특이적으로 결합하는 친화성 시약이 혼입되어, 혼입된 dNTP를 포함하는 표지된 연장 산물을 제공한다. 합성에 의한 시퀀싱에서의 비표지된 뉴클레오티드 및 친화성 시약의 용도는 미국 특허출원공개 US 2013/0079232 호에 개시되어 있다. 비표지된 뉴클레오티드를 사용한 본 발명의 변형된 시퀀싱 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0115] (a') 제1 수용액에서 카피 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체를 하나 이상의 표지되지 않은 뉴클레오티드(예를 들어, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 또는 dUTP)와 접촉시키는 단계, 여기서 각각의 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는 3' 차단기를 포함하고(R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e 각각은 위에 정의되어 있음), 카피 폴리뉴클레오티드는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적임;

[0116] (b'-1) 확장된 카피 폴리뉴클레오티드를 생성하기 위해 한 유형의 뉴클레오티드를 카피 폴리뉴클레오티드에 혼입시키는 단계;

[0117] (b'-2) 혼입된 비표지된 뉴클레오티드에 하나의 친화성 시약이 특이적으로 결합하는 조건 하에서, 신장된 카피 폴리뉴클레오티드를 친화성 시약의 세트와 접촉시켜 표지된 신장된 카피 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체를 제공하는 단계;

[0118] (c') 혼입된 뉴클레오티드의 정체를 결정하기 위해 표지된 신장된 카피 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체의 하나 이상의 형광 측정을 수행하는 단계; 및

[0119] (d') 팔라듐 촉매를 사용하여 혼입된 뉴클레오티드의 3' 차단기를 제거하는 단계;

[0120] 여기서 남아있는 팔라듐 촉매의 적어도 일부는 단계 (d') 후에 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저에 의해 불활성화되고, 적어도 하나의 팔라듐 스캐빈저는 -O-알릴, -S-알릴, -NR-알릴, -N^{+}RR'-알릴 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함한다.

[0121] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 카피 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적인 단일 가닥 카피 폴리뉴클레오티드와 표적 폴리뉴클레오티드를 접촉시킴으로써 형성된다. 친화성 시약은 뉴클레오티드의 합텐 모이어티(예컨대, 스트렙타비딘-비오틴, 항 DIG 및 DIG, 항 DNP 및 DNP), 항체(항체의 결합 단편, 단일 사슬 항체, 이중특이적 항체 등을 포함하지만 이에 한정되지 않음), 앱타머(aptamer), 노틴(knottin), 아피머(affimer), 또는 적절한 특이성 및 친화성으로 도입된 뉴클레오티드에 결합하는 임의의 다른 공지된 제제에 결합할 수 있는 소분자 또는 단백질 태그를 포함할 수 있다. 추가의 실시형태에서, 하나의 친화성 시약은 동일한 형광 염료의 다수의 카피로 표지될 수 있다. 일부 실시형태에서, Pd 촉매는 또한 표지된 친화성 시약을 제거한다. 예를 들어, 표지되지 않은 뉴클레오티드의 합텐 모이어티는 Pd 촉매에 의해 절단될 수 있는 절단 가능한 링커를 통해 핵염기에 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, 방법은 표적 폴리뉴클레오티드 가닥의 적어도 일부의 서열이 결정될 때까지 단계 (a') 내지 (d')를 반복하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 사이클(즉, 단계 (a') 내지 (d'))은 적어도 50회, 적어도 100회, 적어도 150회, 적어도 200회, 적어도 250회, 또는 적어도 300회 반복된다. 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 (e') 제2 수용액을 사용하여 카피 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체로부터 제거된 3' 차단기를 세척하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 표적 폴리뉴클레오티드 가닥의 적어도 일부의 서열이 결정될 때까지 단계 (a') 내지 (e')를 반복하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 사이클(즉, 단계 (a') 내지 (e'))은 적어도 50회, 적어도 100회, 적어도 150회, 적어도 200회, 적어도 250회, 또는 적어도 300회 반복된다. 일부 실시형태에서, 나머지 팔라듐 촉매는 Pd(II) 및/또는 Pd(0) 종 형태의 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저에 의해 불활성화된다. 일부 실시형태에서, 이 변형된 방법은 복수의 상이한 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드)를 결정하기 위해 동시에 수행된다.

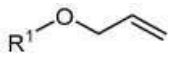
[0122] 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 팔라듐 스캐빈저는 제1 수용액에 존재하는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함한다. 일부 경우에, 제1 수용액은 혼입 혼합물(IMX)로도 알려져 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 이러한 팔라듐 스캐빈저는 하나 이상의 상이한 유형의 뉴클레오티드 외에 폴리머라제(예컨대 DNA 폴리머라제)도 포함할 수 있는 제1 수용액의 다른 시퀀싱 시약과 상용성이다. 이러한 일부 실시형태에서, 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, 예컨대 9° N 폴리머라제의 돌연변이체(예를 들어, 참고로 포함된 국제공개 WO 2005/024010호에 개시된 것들), 예를 들어 Pol 812, Pol 1901, Pol 1558 또는 Pol 963이다. Pol 812, Pol 1901, Pol 1558 또는 Pol 963 DNA 폴리머라제의 아미노산 서열은 예를 들어, 본원에 참고로 포함되는 미국 특허출원공개 제2020/0131484 A1호 및 제2020/0181587 A1호에 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, 제1 수용액은 하나 이상의 완충제를 추가로 포함한다. 완충제는 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민, 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 추가의 실시형태에서, 완충제는 에탄올아민 또는 글리신, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시형태에서, 완충제는 글리신을 포함하거나 글리신이다. 추가 실시형태에서, 팔라듐 스캐빈저는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하며, 다음 혼입 주기 전에 별도의 세척 단계를 필요로 하지 않는다. 추가 실시형태에서, 제1 수용액 중 팔라듐 스캐빈저는 본원에 기재된 Pd(0) 스캐빈저이다. 일부 실시형태에서, Pd(0) 스캐빈저는 DNA 폴리머라제 및/또는 4가지 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 또는 dUTP) 중 하나 이상과 사전 혼합된다. 다른 실시형태에서, Pd(0) 스캐빈저는 DNA 폴리머라제 및/또는 4가지 유형의 뉴클레오티드 중 하나 이상과 별도로 저장되며 시퀀싱 실행이 시작되기 직전에 이들 성분과 혼합된다.

[0123] 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 제1 수용액 중 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저(예를 들어, Pd(0) 스캐빈저)의 농도는 약 0.1 mM 내지 약 100 mM, 0.2 mM 내지 약 75 mM, 약 0.5 mM 내지 약 50 mM, 약 1 mM 내지 약 20 mM, 또는 약 2 mM 내지 약 10 mM이다. 추가 실시형태에서, 팔라듐 스캐빈저(예를 들어, Pd(0) 스캐빈저)의 농도는 약 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3, mM, 0.4 mM, 0.5 mM, 0.6 mM, 0.7 mM, 0.8 mM, 0.9 mM, 1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 3.5 mM, 4 mM, 4.5 mM, 5 mM, 5.5 mM, 6 mM, 6.5 mM, 7 mM, 7.5 mM, 8 mM, 8.5 mM, 9 mM, 9.5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 17.5 mM 또는 20 mM, 또는 이전 값 중 임의의 두 값으로 정의된 범위이다. 일 실시형태에서, Pd 스캐빈저는 약 2 mM 농도의 화합물 B이다. 다른 실시형태에서, Pd 스캐빈저는 약 0.5 mM 농도의 화합물 O이다. 추가 실시형태에서, 이러한 팔라듐 스캐빈저의 농도는 제1 수용액 중의 농도이다. 추가 실시형태에서, 제1 수용액의 pH는 약 9이다.

[0124] 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 다른 실시형태에서, 팔라듐 스캐빈저는 하나 이상의 형광 측정을 수행할 때 용액 중에 존재하는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함한다. 이러한 실시형태에서, 이러한 팔라듐 스캐빈저는 스캐닝 용액(스캔 혼합물로도 알려짐)의 시퀀싱 시약과 상용성이다. 추가 실시형태에서, 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저는 다음 혼입 사이클 전에 별도의 세척 단계를 필요로 하지 않는다. 추가 실시형태에서, 스캔 용액 중 팔라듐 스캐빈저는 본원에 기재된 Pd(0) 스캐빈저이다.

[0125] 본원에 기재된 방법의 다른 실시형태에서, 팔라듐 스캐빈저는 절단 후 세척 용액(즉, 제2 수용액)에 존재하는 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함한다. 추가 실시형태에서, 절단 후 세척 용액 중 팔라듐 스캐빈저는 본원에 기재된 Pd(0) 스캐빈저이다. 일부 이러한 실시형태에서, 절단 후 세척 용액은 리포산 또는 3,3'-디티오디프로피온산(DDPA)을 포함하지 않는다.

[0126] 본원에 기재된 방법의 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 제1 수용액(예를 들어, 혼입 혼합물)과 제2 수용액(예를 들어, 절단 후 세척 용액) 모두에 존재할 수 있거나, 제1 수용액과 스캔 혼합물 모두에 존재할 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 절단 후 세척 용액은 리포산 또는 DDPA를 포함하지 않는다.

[0127] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 -O-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기 구조를 갖는다: ,

[0128] 상기 식에서, R^1은 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알키닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, C_6-C_{10} 아릴, (C_6-C_{10} 아릴)C_1-C_6 알킬, 5 내지 10원 헤테로아릴, (5 내지 10원 헤테로아릴)C_1-C_6 알킬, C_3-C_{10} 카르보사이클릴, (C_3-C_{10} 카르보사이클릴)C_1-C_6 알킬, 3 내지 10원 헤테로사이클릴, (3 내지 10원 헤테로사이클릴)C_1-C_6 알킬, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 올리고당류 모이어티, 아미노산 모이어티, $-C(=O)NR^{f1}R^{g1}$, $-P(=O)OR^{f1}OR^{g1}$, $-C(=O)R^{h1}$, $-C(=O)OR^{h1}$ 또는 $-S(=O)_2R^{j1}$이며, 여기서 C_6-C_{10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, C_3-C_{10} 카르보사이클릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴 각각은 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환되고;

[0129] R^{f1} 및 R^{g1}은 각각 독립적으로 H, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

[0130] R^{h1}은 각각 독립적으로 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

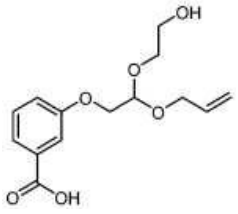
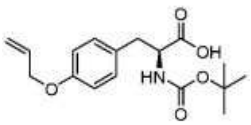
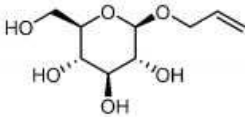
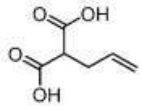
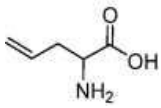
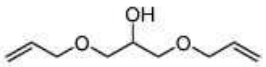
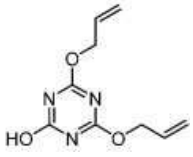
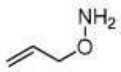
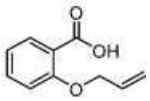
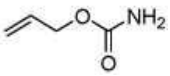
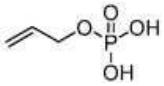
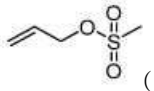
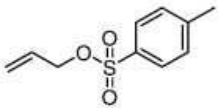
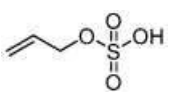
[0131] R^{j1}은 각각 독립적으로 하이드록시, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

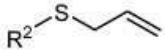
[0132] R^x는 각각 독립적으로 아미노, 할로, 하이드록시, 카르복시, 시아노, (C_1-C_6 알킬)아미노, C-아미도, N-아미도, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 설포, 설포네이트, 또는 $-O-CH_2-CH=CH_2$임.

[0133] 일부 실시형태에서, R^1은 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 하나 이상의 R^x로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 아미노산 모이어티, $-C(=O)NH_2$, $-P(=O)(OH)_2$, 또는 $-S(=O)_2OH$이고, 여기서 각각의 R^x는 독립적으로 아미노, 시아노, 할로, 하이드록

시, 카르복시, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 또는 -O-CH_2-CH=CH_2이다. 이러한 일부 실시형태에서, R^1은 5원 또는 6원 당 고리를 갖는 단당류 모이어티, 또는 이의 변형된 유사체(예를 들어, 글루코피라노시드)이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^1은 미치환되거나 하나 이상의 R^x로 치환된 C_1-C_6 알킬이고, 여기서 R^x는 독립적으로 하이드록시, 카르복시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시(예를 들어, -OPh) 및 -O-CH_2-CH=CH_2이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^1은 C_2-C_6 알케닐(예를 들어, C_3 알케닐)이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^1은 추가로 보호될 수 있는 아미노산 모이어티이다(예를 들어, R^1은 N-Boc-보호된 티로신 잔기이다). R^1이 아미노산 모이어티인 경우, 이는 또한 아미노산 모이어티의 임의의 유도체 또는 유사체를 포함한다. 예를 들어, 아미노산 잔기의 유리 아미노기는 아미노 보호기(예를 들어, tert-부틸옥시카르보닐 또는 Boc 보호기)로 보호될 수 있다. 아미노산 잔기의 카르복시기는 에스테르 형태일 수 있다. 일 실시형태에서, R^1은 아미노기이다. 일부 다른 실시형태에서, R^1은 하나 이상의 R^x(여기서 R^x는 독립적으로 하이드록시, 카르복시 및 -O-CH_2-CH=CH_2임)로 선택적으로 치환된 O, S 및 N으로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 헤테로원자를 포함하는 5원, 6원, 9원 또는 10원 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴이다. 일부 다른 실시형태에서, R^1은 하나 이상의 R^x(여기서 R^x는 독립적으로 하이드록시, 카르복시 및 -O-CH_2-CH=CH_2임)로 선택적으로 치환된 페닐이다. R^1이 포스페이트, 설포 또는 설포네이트를 포함하는 경우, 하나 이상의 하이드록시기는 음이온 형태일 수 있고 팔라듐 스캐빈저는 또한 스캐빈저가 염 형태이고 어떠한 전하도 갖지 않도록 하나 이상의 양이온을 포함할 수 있다. 하나 이상의 -O-알릴 모이어티를 포함하는 Pd 스캐빈저의 임의의 실시형태에서, 알릴 모이어티의 하나 이상의 수소 원자는 또한 치환될 수 있다(예를 들어, 할로겐, C_1-C_6 알킬 또는 C_1-C_6 할로알킬로).

[0134] 하나 이상의 -O-알릴 또는 알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저의 비제한적인 예는 하기를 포함한다:

[0135]  (화합물 A),  (화합물 B, N-Boc 티로신(알릴)-OH),  (화합물 C, 알릴-b-d-글루코피라노사이드),  (화합물 D),  (화합물 E),  (화합물 F),  (화합물 G),  (화합물 H),  (화합물 I),  (화합물 J),  (화합물 K),  (화합물 L),  (화합물 M), 및  (화합물 N).

[0136] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 -S-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기 구조를 갖는다: ,

[0137] 상기 식에서, R^2는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알키닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, C_6-C_{10} 아릴, (C_6-C_{10} 아릴)C_1-C_6 알킬, 5 내지 10원 헤테로아릴, (5 내지 10원 헤테로아릴)C_1-C_6 알킬, C_3-C_{10} 카르보사이클릴, (C_3-C_{10} 카르보사이클릴)C_1-C_6 알킬, 3 내지 10원 헤테로사이클릴, (3 내지 10원 헤테로사이클릴)C_1-C_6 알킬, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 올리고당류 모이어티, 아미노산 모이어티, $-C(=O)NR^{f2}R^{g2}$, $-P(=O)OR^{f2}OR^{g2}$, $-C(=O)R^{h2}$, $-C(=O)OR^{h2}$ 또는 $-S(=O)_2R^{j2}$이며, 여기서 C_6-C_{10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, C_3-C_{10} 카르보사이클릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴 각각은 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환되고;

[0138] R^{f2} 및 R^{g2}은 각각 독립적으로 H, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

[0139] R^{h2}는 각각 독립적으로 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

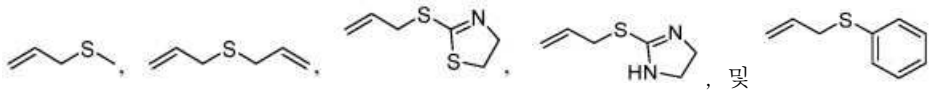
[0140] R^{j2}은 각각 독립적으로 하이드록시, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

[0141] R^y는 각각 독립적으로 아미노, 할로, 하이드록시, 카르복시, 시아노, (C_1-C_6 알킬)아미노, C-아미도, N-아미도, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 설포, 설포네이트, 또는 $-S-CH_2-CH=CH_2$임.

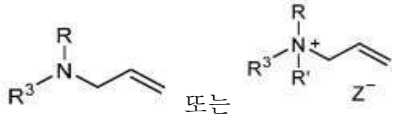
[0142] 일부 실시형태에서, R^2는 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 하나 이상의 R^y로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 아미노산 모이어티, $-C(=O)NH_2$, $-P(=O)(OH)_2$, 또는 $-S(=O)_2OH$이고, 여기서 각각의 R^y는 독립적으로 아미노, 시아노, 할로, 하이드록시, 카르복시, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 또는 $-S-CH_2-CH=CH_2$이다. 이러한 일부 실시형태에서, R^2는 5원 또는 6원 당 고리를 갖는 단당류 모이어티, 또는 이의 변형된 유사체(예를 들어, 글루코피라노시드)이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^2는 미치환되거나 하나 이상의 R^y로 치환된 C_1-C_6 알킬이고, 여기서 R^y는 독립적으로 하이드록시, 카르복시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시(예를 들어, -OPh) 및 $-S-CH_2-CH=CH_2$이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^2는 C_2-C_6 알케닐(예를 들어, C_3 알케닐)이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^2는 추가로 보호될 수 있는 아미노산 모이어티이다(예를 들어, R^2는 N-Boc-보호된 티로신 잔기이다). R^2가 아미노산 모이어티인 경우, 이는 또한 아미노산 모이어티의 임의의 유도체 또는 유사체를 포함한다. 예를 들어, 아미노산 모이어티의 유리 아미노기는 아미노 보호기(예를 들어, tert-부틸옥시카르보닐 또는 Boc 보호기)로 보호될 수 있다. 아미노산 모이어티의 카르복시기는 에스테르 형태일 수 있다. 일 실시형태에서, R^2는 아미노기이다. 일부 다른 실시형태에서, R^2는 하나 이상의 R^y(여기서 R^y는 독립적으로 하이드록시, 카르복시 및 $-S-CH_2-CH=CH_2$임)로 선택적으로 치환된 O, S 및 N으로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 헤테로원자를 포함하는 5원, 6원, 9원 또는 10원 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이다. 일부 다른 실시형태에서, R^2는 하나 이상의 R^y(여기서 R^y는 독립적으로 하이

드록시, 카르복시 및 -S-CH_2-CH=CH_2임)로 선택적으로 치환된 페닐이다. R^2가 포스페이트, 설포 또는 설포네이트를 포함하는 경우, 하나 이상의 하이드록시기는 음이온 형태일 수 있고 팔라듐 스캐빈저는 또한 스캐빈저가 염 형태이고 어떠한 전하도 갖지 않도록 하나 이상의 양이온을 포함할 수 있다. 하나 이상의 -S-알릴 모이어티를 포함하는 Pd 스캐빈저의 임의의 실시형태에서, 알릴 모이어티의 하나 이상의 수소 원자는 또한 치환될 수 있다(예를 들어, 할로겐, C_1-C_6 알킬 또는 C_1-C_6 할로알킬로).

[0143] 하나 이상의 -S-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저의 비제한적인 예는 하기를 포함한다:



[0144] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 -NR-알릴 또는 -N^+RR'-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 하기 구조를 갖는다:



[0145] 상기 식에서, Z는 음이온이고;

[0146] R^3은 각각 독립적으로 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알케닐, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_2-C_{12} 알키닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, C_6-C_{10} 아릴, (C_6-C_{10} 아릴)C_1-C_6 알킬, 5 내지 10원 헤테로아릴, (5 내지 10원 헤테로아릴)C_1-C_6 알킬, C_3-C_{10} 카르보사이클릴, (C_3-C_{10} 카르보사이클릴)C_1-C_6 알킬, 3 내지 10원 헤테로사이클릴, (3 내지 10원 헤테로사이클릴)C_1-C_6 알킬, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 올리고당류 모이어티, 아미노산 모이어티, -C(=O)$NR^{f3}R^{g3}$, -P(=O)$OR^{f3}OR^{g3}$, -C(=O)R^{h3}, -C(=O)OR^{h3} 또는 -S(=O)$_2R^{j3}$이며, 여기서 C_6-C_{10} 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, C_3-C_{10} 카르보사이클릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴 각각은 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환되고;

[0147] R^{f3} 및 R^{g3}은 각각 독립적으로 H, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

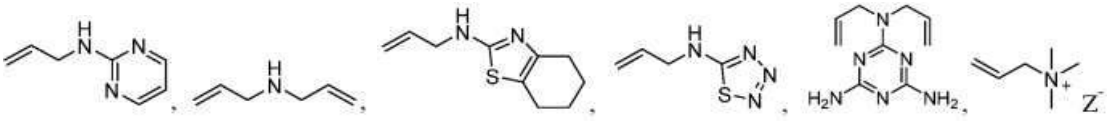
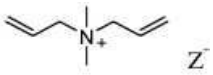
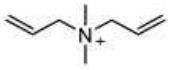
[0148] R^{h3}는 각각 독립적으로 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

[0149] R^{j3}은 각각 독립적으로 하이드록시, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴이고;

[0150] R^z는 각각 독립적으로 아미노, 할로, 하이드록시, 카르복시, 시아노, (C_1-C_6 알킬)아미노, C-아미도, N-아미도, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 설포, 설포네이트, 또는 -NH-CH_2-CH=CH_2임.

[0151] 일부 실시형태에서, R은 H 또는 C_1-C_6 알킬이다. 일부 실시형태에서, R'는 H 또는 C_1-C_6 알킬이다. 일부 추가 실시형태에서, R^3은 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 미치환된 아미노, 치환된 아미노, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 하나 이상의 R^z로 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴, 단당류 모이어티, 이당류 모이어티, 아미노산 모이어티, -C(=O)NH_2, -P(=O)$(OH)_2$, 또는 -S(=O)$_2$OH이고, 여기서 각각의 R^z는 독립적으로 아미노, 시아노, 할로, 하이드록

시, 카르복시, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 미치환된 및 치환된 C_1-C_6 알콕시, 미치환된 및 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시, 또는 -NH-CH_2-CH=CH_2이다. 이러한 일부 실시형태에서, R^3은 5원 또는 6원 당 고리를 갖는 단당류 모이어티, 또는 이의 변형된 유사체(예를 들어, 글루코피라노시드)이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^3은 하나 이상의 R^z로 치환된 C_1-C_6 알킬이고, 여기서 R^z는 독립적으로 하이드록시, 카르복시, 치환된 C_1-C_6 알콕시, 치환된 C_6-C_{10} 아릴옥시(예를 들어, -OPh) 및 -NH-CH_2-CH=CH_2이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^3은 C_2-C_6 알케닐(예를 들어, C_3 알케닐)이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^3은 추가로 보호될 수 있는 아미노산 모이어티이다(예를 들어, R^3는 N-Boc-보호된 티로신 잔기이다). R^3이 아미노산 잔기인 경우, 이는 또한 아미노산 모이어티의 임의의 유도체 또는 유사체를 포함한다. 예를 들어, 아미노산 모이어티의 유리 아미노기는 아미노 보호기(예를 들어, tert-부틸옥시카르보닐 또는 Boc 보호기)로 보호될 수 있다. 아미노산 모이어티의 카르복시기는 에스테르 형태일 수 있다. 일 실시형태에서, R^3은 아미노기이다. 일부 다른 실시형태에서, R^3은 하나 이상의 R^z(여기서 R^z는 독립적으로 하이드록시, 카르복시 및 -NH-CH_2-CH=CH_2임)로 선택적으로 치환된 O, S 및 N으로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 헤테로원자를 포함하는 5원, 6원, 9원 또는 10원 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이다. 일부 다른 실시형태에서, R^3은 하나 이상의 R^z(여기서 R^z는 독립적으로 하이드록시, 카르복시 및 -NH-CH_2-CH=CH_2임)로 선택적으로 치환된 페닐이다. R^3이 포스페이트, 설포 또는 설포네이트를 포함하는 경우, 하나 이상의 하이드록시기는 음이온 형태일 수 있고 팔라듐 스캐빈저는 또한 스캐빈저가 염 형태이고 어떠한 전하도 갖지 않도록 하나 이상의 양이온을 포함할 수 있다. 하나 이상의 -NR-알릴 또는 -N^+RR'-알릴 모이어티를 포함하는 Pd 스캐빈저의 임의의 실시형태에서, 알릴 모이어티의 하나 이상의 수소 원자는 또한 치환될 수 있다(예를 들어, 할로겐, C_1-C_6 알킬 또는 C_1-C_6 할로알킬로).

[0152] 하나 이상의 -NR-알릴 또는 -N^+RR'-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저의 비제한적인 예는 하기를 포함한다:  또는 , 여기서 Z^-는 음이온(예를 들어, 할라이드 음이온, 예컨대 F^- 또는 Cl^-)임. 일 실시형태에서, 키트는 팔라듐 스캐빈저  Cl^-(화합물 O, 디알릴디메틸암모늄 클로라이드, DADMAC로도 알려짐)을 포함한다.

[0153] 하나 이상의 알릴 모이어티(예를 들어, -O-알릴, -S-알릴, -NR-알릴 또는 -N^+RR'-알릴)를 포함하는 Pd 스캐빈저의 임의의 실시형태에서, 이러한 Pd 스캐빈저는 Pd(0) 스캐빈저이다.

[0154] *팔라듐 촉매*

[0155] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 3' 차단기를 제거하거나 절단하기 위해 사용된 Pd 촉매는 수용성이다. 일부 이러한 실시형태에서, Pd 촉매는 활성 Pd(0) 형태이다. 일부 경우에, Pd(0) 촉매는 알켄, 알코올, 아민, 포스핀 또는 금속 수소화물과 같은 시약에 의한 Pd 착물 또는 Pd 전촉매(예를 들어, Pd(II) 착물)의 환원으로부터 계내에서 생성될 수 있다. 적절한 팔라듐 공급원은 $Pd(CH_3CN)_2Cl_2$, $[PdCl(알릴)]_2$, [Pd(알릴)(THP)]Cl, [Pd(알릴)$(THP)_2$]Cl, $Pd(OAc)_2$, $Pd(PPh_3)_4$, $Pd(dba)_2$, $Pd(Acac)_2$, $PdCl_2$(COD) 및 $Pd(TFA)_2$를 포함한다. 이러한 일 실시형태에서, Pd(0) 착물은 팔라데이트(II)의 유기 또는 무기 염, 예를 들어 Na_2PdCl_4 또는 K_2PdCl_4로부터 계내에서 생성된다. 다른 실시형태에서, 팔라듐 공급원은 알릴 Pd(II) 클로라이드 이량체 $[(알릴)PdCl]_2$ 또는 $[PdCl(C_3H_5)]_2$이다. 일부 실시형태에서, Pd(0) 촉매는 Pd(II) 착물을 수용성 포스핀과 혼합함으로써 수용액 중에서 생성된다. 적합한 포스핀은 수용성 포스핀, 예컨대 트리스(하이드록시프로필)포스핀(THP), 트리스(하이드

록시메틸)포스핀(THMP), 1,3,5-트리아자-7-포스파아다만탄(PTA), 비스(p-설포네이토페닐)페닐포스핀 2수화물 칼륨염, 트리스(카르복시에틸)포스핀(TCEP) 및 트리페닐포스핀-3,3',3"-트리설폰산 삼나트륨염, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0156] 일부 실시형태에서, 팔라듐 촉매는 계내에서 [(알릴)PdCl]$_2$를 THP와 혼합함으로써 제조된다. [(알릴)PdCl]$_2$와 THP의 몰비는 약 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10일 수 있다. 일 실시형태에서, [(알릴)PdCl]$_2$ 대 THP의 몰비는 1:10이다. 일부 다른 실시형태에서, 팔라듐 촉매는 계내에서 수용성 Pd 시약, 예컨대 Na_2PdCl_4 또는 K_2PdCl_4를 THP와 혼합함으로써 제조된다. Na_2PdCl_4 또는 K_2PdCl_4와 THP의 몰비는 약 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10일 수 있다. 일 실시형태에서, Na_2PdCl_4 또는 K_2PdCl_4 대 THP의 몰비는 약 1:3이다. 다른 실시형태에서, Na_2PdCl_4 또는 K_2PdCl_4 대 THP의 몰비는 약 1:3.5이다.

[0157] 본원에 기술된 방법의 절단 단계에 사용하기 위한 Pd 착물 및 수용성 포스핀은 절단 혼합물이라고도 불리는 조성물 또는 혼합물로 존재할 수 있다. 일부 추가 실시형태에서, 절단 혼합물은 추가의 완충 시약, 예컨대 일차 아민, 이차 아민, 삼차 아민, 천연 아미노산, 비천연 아미노산, 카르보네이트염, 포스페이트염 또는 보레이트염, 또는 이들의 조합을 함유할 수 있다. 일부 추가의 실시형태에서, 완충 시약은 에탄올아민(EA), 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris), 글리신, 탄산나트륨, 인산나트륨, 붕산나트륨, 디메틸에탄올아민(DMEA), 디에틸에탄올아민(DEEA), N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민(TMEDA), 또는 N,N,N',N'-테트라에틸에틸렌디아민(TEEDA), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 완충 시약은 DEEA를 포함한다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 완충 시약은 하나 이상의 무기 염, 예컨대 카르보네이트염, 포스페이트염 또는 보레이트염, 또는 이들의 조합을 함유한다. 일 실시형태에서, 무기 염은 나트륨 염이다.

[0158] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저에 대한 팔라듐 촉매의 몰비는 약 1:100, 1:50, 1:20, 1:10 또는 1:5이다. 일부 추가 실시형태에서, 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는 Pd 촉매의 활성 형태인 Pd(0)에 대한 팔라듐 스캐빈저이다.

[0159] 일부 실시형태에서, 3' 차단기에 대한 절단 조건은 뉴클레오티드의 절단 가능한 링커를 절단하기 위한 조건과 동일하다. 예를 들어, 뉴클레오티드는 3' 차단기와 동일한 링커 모이어티를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 3' 차단기에 대한 절단 조건은 뉴클레오티드의 절단 가능한 링커를 절단하기 위한 조건과 상이하다.

[0160] *추가 팔라듐 스캐빈저*

[0161] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 Pd(II) 스캐빈저(들)와 같은 추가의 팔라듐 스캐빈저(들)를 추가로 사용할 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 추가 Pd 스캐빈저(들)의 사용은 시퀀싱 측정기준의 페이징 값을 개선할 수 있다. 예를 들어, 추가의 Pd 스캐빈저(들)는 이소시아노아세테이트(ICNA) 염, 에틸 이소시아노아세테이트, 메틸 이소시아노아세테이트, 시스테인(예를 들어, L-시스테인) 또는 이의 염(예를 들어, *N*-아세틸-L-시스테인), 포타슘 에틸잔토제네이트, 포타슘 이소프로필 잔테이트, 글루타티온, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 이미노디아세트산, 니트릴로디아세트산, 트리메르캅토-S-트리아진, 디메틸디티오카르바메이트, 디티오트레이톨, 메르캅토에탄올, 알릴 알코올, 프로파르길 알코올, 티올, 티오설페이트 염(예를 들어, 소듐 티오설페이트 또는 포타슘 티오설페이트), 3차 아민 및/또는 3차 포스핀, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 방법은 또한 L-시스테인 또는 이의 염의 사용을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 방법은 또한 소듐 티오설페이트($Na_2S_2O_3$)와 같은 티오설페이트 염의 사용을 포함한다. 일부 실시형태에서, 추가 Pd 스캐빈저는 Pd(II)에 대한 스캐빈저이다. 일부 이러한 실시형태에서, Pd(II) 스캐빈저(예를 들어, L-시스테인 또는 소듐 티오설페이트)는 제1 수용액에 존재한다. 다른 실시형태에서, Pd(II) 스캐빈저(예를 들어, L-시스테인 또는 소듐 티오설페이트)는 절단 후 세척 용액(즉, 제2 수용액)에 존재한다. 다른 실시형태에서, Pd(II) 스캐빈저(예를 들어, L-시스테인 또는 소듐 티오설페이트)는 제1 수용액 및 제2 수용액 둘 모두에 존재할 수 있다. 다른 실시형태에서, Pd(II) 스캐빈저(예를 들어, L-시스테인 또는 소듐 티오설페이트)는 스캔 혼합물(즉, 혼입된 뉴클레오티드의 하나 이상의 형광 측정이 수행되는 용액)에 존재할 수 있다. 다른 실시형태에서, Pd(II) 스캐빈저는 혼입 혼합물(예를 들어, 제1 수용액), 스캔 혼합물, 또는 절단 후 세척 용액(예를 들어, 제2 수용액) 중 하나 이상에 존재할 수 있다. 추가 실시형태에서, 제1 수용액 또는 제2 수용액 중 L-시스테인 또는 소듐 티오설페이트와 같은 Pd(II) 스캐빈저의 농도는 약 0.1 mM 내지 약 100 mM, 0.2 mM 내지 약 75 mM, 약 0.5 mM 내지 약 50 mM, 약 1 mM 내지 약 20 mM, 또는 약 2 mM 내지 약 10 mM이다. 추가 실시형태에서, L-시스테인 또는 소듐 티오설페이트와 같은 Pd(II) 스캐빈저의 농도는 약 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 6.5 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 17.5 mM 또는 20 mM, 또는 이전 값 중 임의의 두 값으로

정의된 범위이다. 추가 실시형태에서, Pd(II) 스캐빈저는 제2 수용액에 존재하고, 제2 수용액 중 Pd(II) 스캐빈저의 농도는 약 10 mM이다.

[0162] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 모든 Pd 스캐빈저는 제1 수용액에 존재한다. 본원에 기재된 방법의 일부 다른 실시형태에서, 모든 Pd 스캐빈저는 제2 수용액에 존재한다. 일부 다른 실시형태에서, 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 하나 이상의 Pd 스캐빈저(예를 들어, Pd(0) 스캐빈저)가 혼입 혼합물(즉, 제1 수용액) 중에 존재하고, Pd(II) 스캐빈저(들)는 절단 후 세척 용액(즉, 제2 수용액)에 존재한다. 추가 실시형태에서, 절단 후 세척 용액은 리포산 또는 DDPA를 함유하지 않는다. 다른 실시형태에서, 방법은 절단 후 세척 단계를 포함하지 않는다.

[0163] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 하나 이상의 Pd 스캐빈저(예를 들어, Pd(0) 스캐빈저)의 사용은 시퀀싱 실행의 프리페이징 값을 약 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02% 또는 0.01% 미만으로 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 프리페이징 값은 50회 사이클, 75회 사이클, 100회 사이클, 125회 사이클, 150회 사이클, 200회 사이클, 250회 사이클 또는 300회 사이클 후에 측정된 값을 지칭한다.

[0164] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 Pd(II) 스캐빈저의 사용은 시퀀싱 실행의 페이징 값을 약 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 또는 0.05% 미만으로 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 페이징 값은 50회 사이클, 75회 사이클, 100회 사이클, 125회 사이클, 150회 사이클, 200회 사이클, 250회 사이클 또는 300회 사이클 후에 측정된 값을 지칭한다.

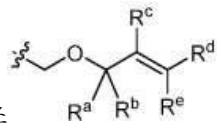
[0165] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 표적 폴리뉴클레오티드는 기재의 표면에 고정된다. 일부 추가 실시형태에서, 표면은 복수의 고정된 표적 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 상이한 고정된 표적 폴리뉴클레오티드의 어레이를 포함한다. 일부 이러한 실시형태에서, 기재는 유리, 변형되거나 작용화된 유리, 플라스틱, 다당류, 나일론, 니트로셀룰로오스, 수지, 실리카, 실리콘, 변형된 실리콘, 탄소, 금속, 무기 유리, 또는 광섬유 다발, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 추가 실시형태에서, 기재는 플로우셀, 나노입자 또는 비드(예컨대 구형 실리카 비드, 무기 나노입자, 자성 나노입자, 카드뮴 기반 도트, 및 무(無)카드뮴 도트, 또는 참고로 포함된 미국 특허출원공개 제2021/0187470 A1호에 개시된 비드)이다. 일 실시형태에서, 기재는 틈새 영역에 의해 분리된 패턴화된 나노웰을 포함하는 플로우 셀이고, 여기서 고정화된 표적 폴리뉴클레오티드는 패턴화된 나노웰 내부에 존재한다.

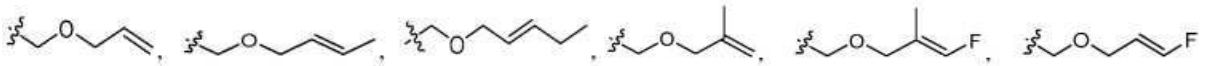
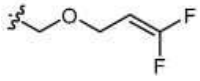
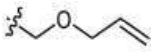
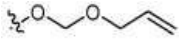
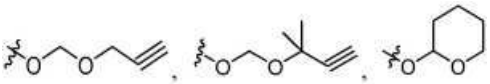
[0166] 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 자동화된 시퀀싱 기기에서 수행되고, 자동화된 시퀀싱 기기는 상이한 파장에서(예를 들어, 약 450 nm 내지 약 460 nm, 및 약 520 nm 내지 약 540 nm, 특히 약 460 nm 및 약 532 nm에서) 작동하는 2개의 광원을 포함한다. 다른 실시형태에서, 자동화된 시퀀싱 기기는 하나의 파장에서 작동하는 단일 광원을 포함한다.

[0167] 본원에 기재된 방법의 임의의 실시형태에서, 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저는 리포산 또는 3,3'-디티오디프로피온산(DDPA)을 포함하지 않는다.

[0168] 본원에 기재된 방법의 임의의 실시형태에서, 당업자는 팔라듐 스캐빈저가 절단 단계 후에 잔류/남아 있는 Pd 촉매(Pd(0) 및/또는 Pd(II) 종의 형태)를 완전히 불활성화할 수 없고 미량의 Pd(0) 또는 Pd(II) 종이 남아 있을 수 있다는 것을 이해해야 한다. 결과적으로, 프리페이징 및 페이징 값이 0으로 줄어들지 않을 수 있다.

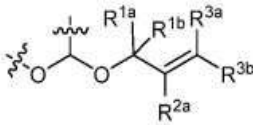
[0169] *3' 차단기를 갖는 뉴클레오티드*

[0170] 본 개시내용의 일부 실시형태는 핵염기, 리보스 또는 데옥시리보스 모이어티, 및 알릴 모이어티를 포함하는 3' 하이드록시 차단기, 예컨대 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는 3' 차단기를 포함하는 뉴클레오티드 분자에 관한 것이다(여기서 R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e는 각각 독립적으로 H, 할로겐, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 또는 C_1-C_6 할로알킬임). 일 실시형태에서, R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e는 각각 H이다. 일부 다른 실시형태에서, R^a 및 R^b는 각각 H이고, R^c, R^d 및 R^e 중 적어도 하나는 독립적으로 할로겐(예를 들어, 플루오로, 클로로) 또는 미치환된 C_1-C_6 알킬(예를 들어, 메틸, 에틸, 이소프로필, 이소부틸 또는 t-부틸)이다. 예를

들어, R^c는 미치환된 C_1-C_6 알킬이고, R^d 및 R^e는 각각 H이다. 다른 예에서, R^c는 H이고, R^d 및 R^e 중 하나 또는 둘 모두는 할로겐 또는 미치환된 C_1-C_6 알킬이다. 3' 차단기의 비제한적 실시형태는  또는  를 포함한다. 일 실시형태에서, 3' 차단기는 이고, 3' 산소와 함께 리보스 또는 데옥시리보스 모이어티의 3' 탄소 원자에 부착된  ("AOM")기를 형성한다. 3' 차단기의 추가의 실시형태는 그 전체가 본원에 참고로 포함되는 미국 특허출원공개 제2020/0216891 A1호에 기재되어 있으며, 리보스 또는 데옥시리보스 모이어티의 3' 탄소 원자에 부착된  및  와 같은 3' 차단기의 추가의 예를 포함한다. 본원에 기재된 뉴클레오티드의 임의의 실시형태에서, 뉴클레오티드는 3' 차단된 2-데옥시리보스 모이어티를 포함할 수 있다. 또한, 뉴클레오티드는 뉴클레오시드 트리포스페이트일 수 있다.

[0171] *표지된 뉴클레오티드*

[0172] 일부 실시형태에서, 3' 차단된 뉴클레오티드는 또한 검출가능한 표지를 포함하며, 이러한 뉴클레오티드는 표지된 뉴클레오티드 또는 완전 작용화된 뉴클레오티드(ffN)라고 한다. 표지(예를 들어, 형광 염료)는 소수성 인력, 이온성 인력 및 공유 결합을 포함하는 다양한 수단에 의해 절단가능한 링커를 통해 컨쥬게이트된다. 일부 양태에서, 염료는 절단가능한 링커를 통해 공유 결합에 의해 뉴클레오티드에 컨쥬게이트된다. 당업자는 표지가 표지의 작용기(예를 들어, 카르복실)를 링커의 작용기(예를 들어, 아미노)와 반응시킴으로써 링커에 공유 결합될 수 있음을 이해한다. 이러한 일부 실시형태에서, 절단 가능한 링커는 3' 차단기와 동일한 모이어티를 포함할 수 있다. 이와 같이, 절단 가능한 링커와 3' 차단기는 동일한 반응 조건에서 절단되거나 제거될 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 절단 가능한 링커는 알릴 모이어티를 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 하기 구조의 모이어티를 포함한다:

[0173] , 상기 식에서, R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{3a} 및 R^{3b}는 각각 독립적으로 H, 할로겐, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 또는 C_1-C_6 할로알킬이다.

[0174] 일부 실시형태, 염료는 뉴클레오티드 염기를 통해 올리고뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드에 공유 결합될 수 있다. 예를 들어, 표지된 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 절단가능한 링커 모이어티를 통해 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-데아자퓨린 염기의 C7 위치에 부착된 표지를 가질 수 있다.

[0175] 뉴클레오티드는 당 또는 핵산염기 상의 부위에 표지될 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, "뉴클레오티드"는 질소성 염기(nitrogenous base), 당 및 하나 이상의 포스페이트기로 이루어진다. RNA에서, 당은 리보스이고, DNA에서는 데옥시리보스, 즉, 리보스에 존재하는 하이드록시기가 결여되어 있는 당이다. 질소성 염기는 퓨린(예를 들어, 데아자퓨린, 7-데아자퓨린) 또는 피리미딘의 유도체이다. 퓨린은 아데닌(A) 및 구아닌(G)이고, 피리미딘은 시토신(C) 및 티민(T), 또는 RNA와 관련해서는, 우라실(U)이다. 데옥시리보스의 C-1 원자는 피리미딘의 N-1 또는 퓨린의 N-9에 결합된다. 뉴클레오티드는 또한 뉴클레오시드의 포스페이트 에스테르이며, 이때 에스테르화는 당의 C-3 또는 C-5에 부착된 하이드록시기에서 발생한다. 뉴클레오티드는 통상 모노, 디- 또는 트리포스페이트이다.

[0176] 염기는 통상 퓨린 또는 피리미딘으로 지칭되지만, 당업자는 왓슨-크릭 염기쌍 형성(Watson-Crick base pairing)을 거치는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 능력을 변경시키지 않는 유도체 및 유사체가 이용가능하다는 것을 인식할 것이다. "유도체" 또는 "유사체"는, 코어 구조가 모 화합물의 코어 구조와 동일하거나 근접하게 유사하지만, 예를 들어 유도체 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드가 다른 분자에 연결될 수 있게 하는 상이한 또는 추가적인 측기와 같은 화학적 또는 물리적 변형을 갖는 화합물 또는 분자를 의미한다. 예를 들어, 염기는 데아

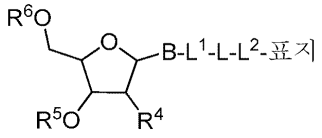
자퓨린일 수 있다. 특정 실시형태에서, 유도체는 왓슨-크릭 쌍형성을 거칠 수 있어야 한다. "유도체" 및 "유사체"는 또한, 예를 들어, 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 당 모이어티를 갖는 합성 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유도체를 포함한다. 이러한 유도체 및 유사체는, 예를 들어 문헌[Scheit, *Nucleotide analogs* (John Wiley & Son, 1980) 및 Uhlman *et al.*, *Chemical Reviews* 90:543-584, 1990]에 논의되어 있다. 뉴클레오티드 유사체는 또한 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬-포스포네이트, 포스포르아닐리데이트, 포스포르아미다이트 결합 등을 포함한 변형된 포스포디에스테르 결합을 포함할 수 있다.

[0177] 특정 실시형태에서, 표지된 뉴클레오티드는 효소적으로 도입가능하고 효소적으로 신장가능할 수 있다. 따라서, 링커 모이어티는 화합물이 핵산 복제 효소에 의한 뉴클레오티드의 전체적인 결합 및 인식을 크게 방해하지 않도록 뉴클레오티드를 화합물에 연결하기에 충분한 길이를 가질 수 있다. 따라서, 링커는 또한 스페이서 단위를 포함할 수 있다. 스페이서는, 예를 들어 절단 부위 또는 표지로부터 뉴클레오티드 염기를 이격시킨다.

[0178] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 뉴클레오티드를 혼입시킨 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합으로 연결된 데옥시리보뉴클레오티드들 또는 리보뉴클레오티드들로 각각 구성된 DNA 또는 RNA일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 변형된(예를 들어, 염료 화합물로 표지된) 뉴클레오티드와 조합된, 본 명세서에 기재된 표지된 뉴클레오티드 이외의 천연 발생 뉴클레오티드, 비천연 발생(또는 변형된) 뉴클레오티드, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 또한 비천연 골격 결합 및/또는 비-뉴클레오티드 화학적 변형을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 표지된 뉴클레오티드를 포함하는 리보뉴클레오티드 및 데옥시리보뉴클레오티드의 혼합물로 구성된 키메라 구조가 또한 고려된다.

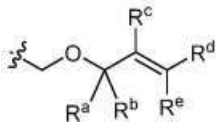
[0179] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 표지된 뉴클레오티드는 화학식 (I)의 구조를 포함하거나 갖는다:

[0180] [화학식 (I)]

[0181] 

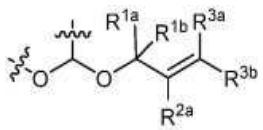
[0182] 상기 식에서, B는 핵산염기이고;

[0183] R^4는 H 또는 OH이고;

[0184] R^5는 본원에 기술된 바와 같은 

와 같은 3' 차단기를 함유하는 알릴 또는 포스포르아미다이트이고;

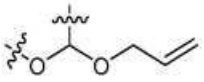
[0185] R^6은 H, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 티오포스페이트, 포스페이트 에스테르 유사체, 반응성인 함유기 또는 하이드록시 보호기이고;

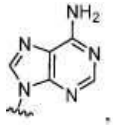
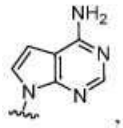
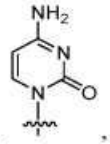
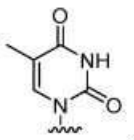
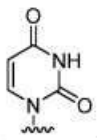
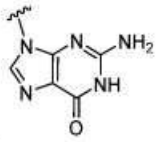
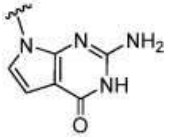
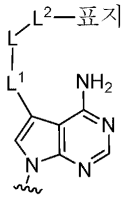
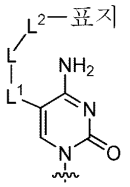
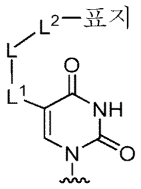
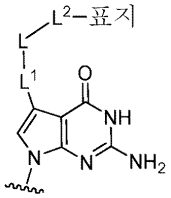
[0186] L은 링커를 함유하는 알릴 모이어티, 예컨대 

이고;

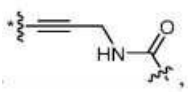
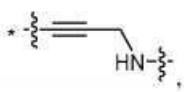
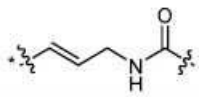
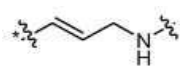
[0187] L^1 및 L^2는 각각 독립적으로 선택적으로 존재하는 링커 모이어티이다.

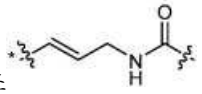
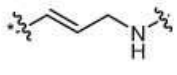
[0188] 본원에 기재된 뉴클레오티드의 일부 실시형태에서, R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{3a} 및 R^{3b} 각각은 H이다. 다른 실시형태에서, R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{3a} 및 R^{3b} 중 적어도 하나는 할로겐(예를 들어, 플루오로, 클로로) 또는 미치환된 C_1-C_6 알킬(예를 들어, 메틸, 에틸, 이소프로필, 이소부틸 또는 t-부틸)이다. 일부 이러한 경우에는, R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 H이고, R^{2a}, R^{3a} 및 R^{3b} 중 적어도 하나는 비치환된 C_1-C_6 알킬 또는 할로겐(예를 들어, R^{2a}는 비치환된 C_1-C_6 알킬이

고, R^{3a} 및 R^{3b}는 각각 H이거나; R^{2a}는 H이고, R^{3a} 및 R^{3b} 중 하나 또는 둘 모두는 할로겐 또는 미치환된 C_1-C_6 알킬임)이다. 일 실시형태에서, 절단가능한 링커 또는 L은  ("AOL" 링커 모이어티)를 포함한다.

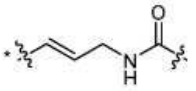
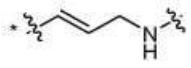
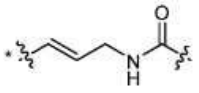
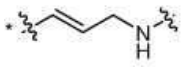
[0189] 본원에 기재된 뉴클레오티드의 일부 실시형태에서, 핵산염기(화학식 (I)에서 "B")는 퓨린(아데닌 또는 구아닌), 데아자 퓨린 또는 피리미딘(예를 들어, 시토신, 티민 또는 우라실)이다. 추가의 일부 실시형태에서, 데아자 퓨린은 7-데아자 퓨린(예를 들어, 7-데아자 아데닌 또는 7-데아자 구아닌)이다. B의 비제한적인 예는 , , , , ,  또는 , 또는 이들의 임의로 치환된 유도체 및 유사체를 포함한다. 추가의 일부 실시형태에서, 표지된 핵산염기는 구조 , , , 또는  를 포함한다.

[0190] 본원에 기재된 뉴클레오티드의 일부 다른 실시형태에서, 화학식 (I)의 R^5는 포스포르아미다이트이다. 이러한 실시형태에서, R^6는 산 절단가능한 하이드록시 보호기이며, 이는 자동화 합성 조건 하에서 후속 단량체 커플링을 가능하게 한다.

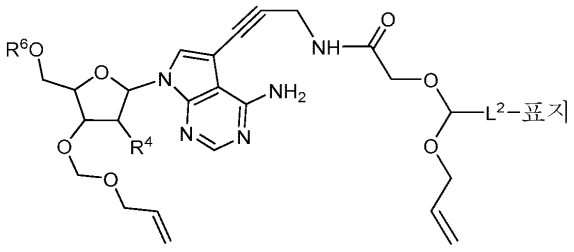
[0191] 본원에 기재된 뉴클레오티드의 일부 실시형태에서, L^1은 존재하고, L^1은 프로파르길아민, 프로파르길아미드, 알릴아민, 알릴아미드 및 이들의 임의로 치환된 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되는 모이어티를 포함한다. 일부 추가의 실시형태에서, L^1은 , , , 또는  를 포함한다. 일부 추가의 실시형태에서, 별표 *는 핵산염기에 대한 L^1의 부착점(예를 들어, 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-데아자 퓨린 염기의 C7 위치)을 나타낸다.

[0192] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드는 완전 작용화된 뉴클레오티드(ffN)이고, 본 명세서에 기재된 3'-OH 블로킹기 및 본 명세서에 기재된 절단가능한 링커를 통해 핵산염기에 공유 결합된 염료 화합물을 포함하며, 상기 절단가능한 링커는 구조  또는  의 L^1을 포함하고, *는 핵산염기에 대한 L^1의 부착점(예를 들어, 시토신, 티민 또는 우라실 염기의 C5 위치, 또는 7-데아자 아데닌 또는 7-데아자 구아닌의 C7 위치)을 나타낸다. 일부 경우에는, 본원에 기술된 알릴아민 또는 알릴아미드 링커 모이어티를 갖

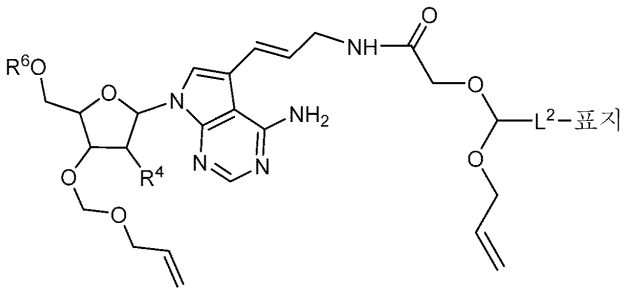
는 ffN은 ffN-DB, ffN-db, ffN-(DB) 또는 ffN-(db)라고도 하며, 여기서 "DB" 또는 "db"는 모두 링커 모이어티의 이중 결합을 지칭한다. 어떤 경우에는, 하나 이상의 ffN이 ffN-DB인 ffN 세트(ffA, ffT, ffC 및 ffG 포함)를 사용한 시퀀싱 런은 본 명세서에 기재된 프로파르길아민 또는 프로파르길아미드 링커 모이어티(ffN-PA 또는 ffN-(PA)로도 알려짐)를 갖는 ffN 세트와 비교하여, ffN의 우수한 도입률을 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 알릴아민 또는 알릴아미드 링커 모이어티 및 3'-AOM 블로킹기를 갖는 ffN-DB 세트는 동일한 기간 동안 동일한 조건에서 3'-O-아지도메틸 블로킹기를 갖는 ffN-PA 세트와 비교하여, 도입률을 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% 또는 500% 향상시켜, 위상화 값을 향상시킬 수 있다. 다른 실시형태에서, 도입률/도입 속도는 기질(예를 들어, 플로우 셀 또는 cBot 시스템) 표면의 표면 동역학 Vmax로 측정된다. 예를 들어, 3'-AOM 블로킹기를 갖는 ffN-DB 세트는 동일한 기간 동안 동일한 조건에서 3'-O-아지도메틸 블로킹기를 갖는 ffN-PA 세트와 비교하여, Vmax 값(ms^{-1})을 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% 또는 500% 향상시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 도입률/도입 속도는 주위 온도에서 또는 주위 온도 미만의 온도(예컨대, 4 내지 10℃)에서 측정된다. 다른 실시형태에서, 도입률/도입 속도는 고온, 예컨대 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃ 또는 65℃에서 측정된다. 일부 이러한 실시형태에서, 도입률/도입 속도는 염기성 pH 환경, 예를 들어 pH 9.0, 9.2, 9.4, 9.6, 9.8 또는 10.0의 용액에서 측정된다. 일부 이러한 실시형태에서, 도입률/도입 속도는 효소, 예컨대 폴리머라제(예를 들어, DNA 폴리머라제), 터미널 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 또는 역전사효소의 존재에 의해 측정된다. 일부 실시형태에서, ffN-DB는 ffT-DB, ffC-DB 또는 ffA-DB이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 위상화 값이 개선된 ffN-DB 세트는 ffT-DB, ffC, ffA 및 ffG를 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 위상화 값이 개선된 ffN-DB 세트는 ffT-DB, ffC-DB, ffA 및 ffG를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 위상화 값이 개선된 ffN-DB 세트는 ffT-DB, ffC-DB, ffA-DB 및 ffG를 포함한다.

[0193] 추가의 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드의 핵산염기가 티민 또는 이의 임의로 치환된 유도체 및 유사체인 경우(즉, 뉴클레오티드가 T임), L^1은 알릴아민 모이어티 또는 알릴아미드 모이어티, 또는 이들의 임의로 치환된 변이체를 포함한다. 특정 예에서, L^1은  또는  를 포함하고, * 는 티민 염기의 C5 위치에 대한 L^1의 부착점을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 T 뉴클레오티드는 티민 염기의 C5 위치에 직접 부착된  또는  를 포함하는 절단가능한 링커를 통해 염료 분자로 표지된 완전 작용화된 T 뉴클레오티드(ffT)(즉, ffT-DB)이다. 어떤 경우에는, ffT-DB가 팔라듐 촉매의 존재 하에 시퀀싱 응용에 사용되는 경우, 위상화, 전위상화 및 에러율과 같은 시퀀싱 측정 기준을 크게 개선시킬 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 3'-AOM 블로킹기를 갖는 ffT-DB가 사용되는 경우, 3'-O-아지도메틸 블로킹기를 갖는 표준 ffT-PA가 사용되는 경우와 비교하여, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 시퀀싱 측정 기준을 적어도 50%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 1500%, 2000%, 2500% 또는 3000% 개선시킬 수 있다.

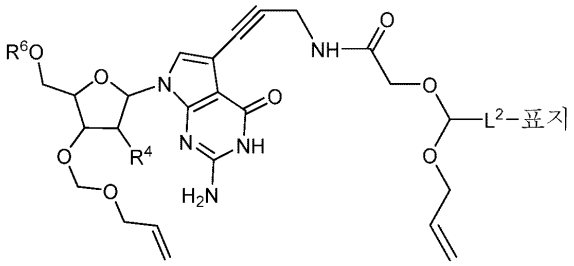
[0194] 본 명세서에 기재된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드의 추가의 일부 실시형태는 화학식 (Ia), (Ia'), (Ib), (Ic), (Ic') 또는 (Id)를 갖는 것을 포함한다:

[0195] 

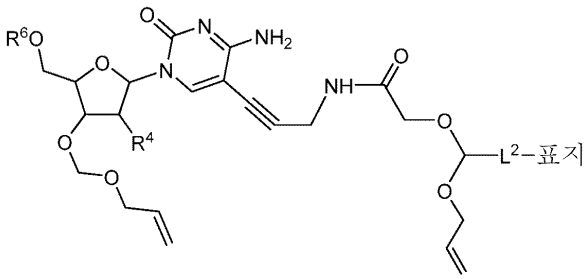
(Ia),

[0196] 

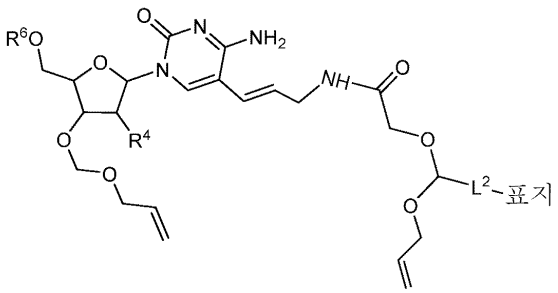
(Ia′),

[0197] 

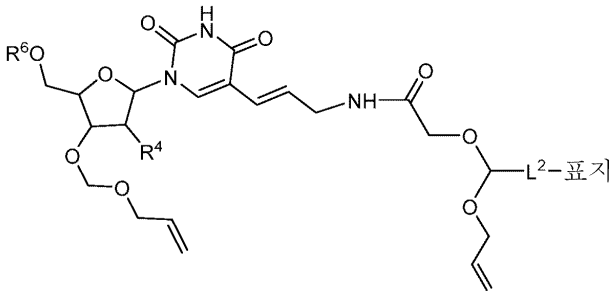
(Ib),

[0198] 

(Ic),

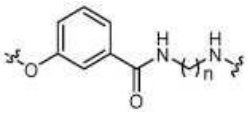
[0199] 

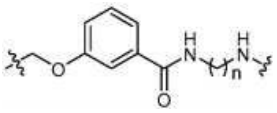
(Ic′) 또는



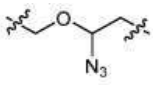
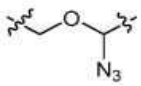
(Id).

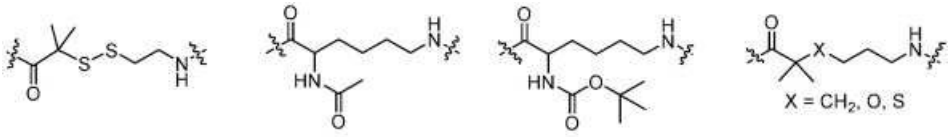
[0200]

[0201] 본원에 기재된 뉴클레오티드의 일부 추가 실시형태에서, L^2가 존재하고 L^2는  또는



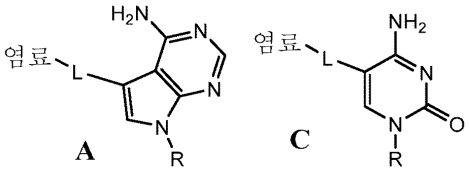
를 포함하며, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10의 정수이고 페닐 모이어티는 선택적으로 치환된다. 일부 이러한 실시형태에서, n은 5이고, L^2의 페닐 모이어티는 비치환된다.

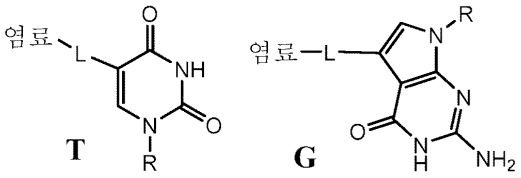
[0202] 본원에 기재된 뉴클레오티드의 임의의 실시형태에서, 절단가능한 링커 또는 L^1/L^2는 추가로 디설파이드 모이어티 또는 아지도 모이어티(예컨대,  또는 ), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. L^1 또는 L^2에 혼입될 수 있는 링커 모이어티의 추가의 비제한적인 예는:

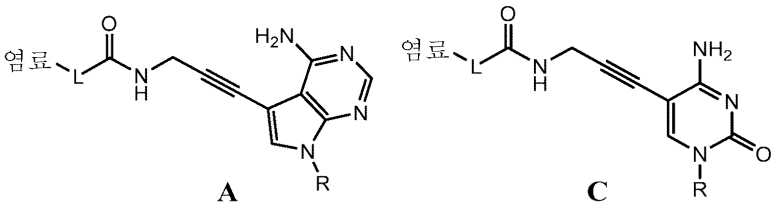
[0203] 

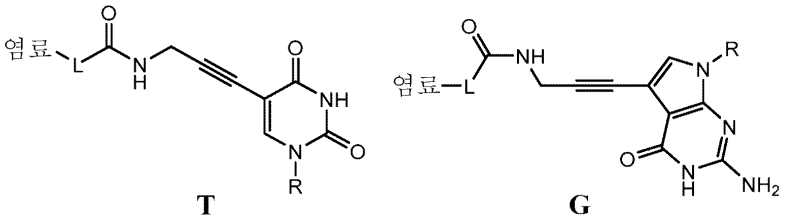
를 포함한다. 추가의 링커 모이어티는 본원에 참고로 포함되는 국제공개 WO 2004/018493호 및 미국 특허출원공개 US 2016/0040225호에 개시되어 있다.

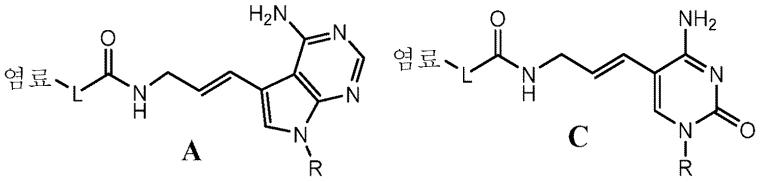
[0204] 본 명세서에 기재된 바와 같은 비제한적인 예시적인 표지된 뉴클레오티드는 하기를 포함한다:

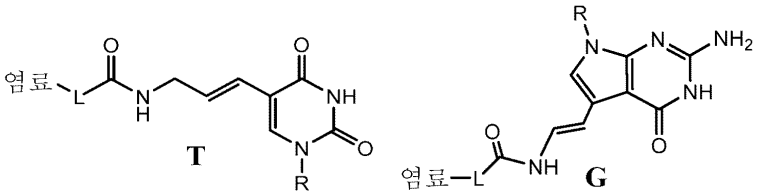
[0205] 

[0206] 

[0207] 

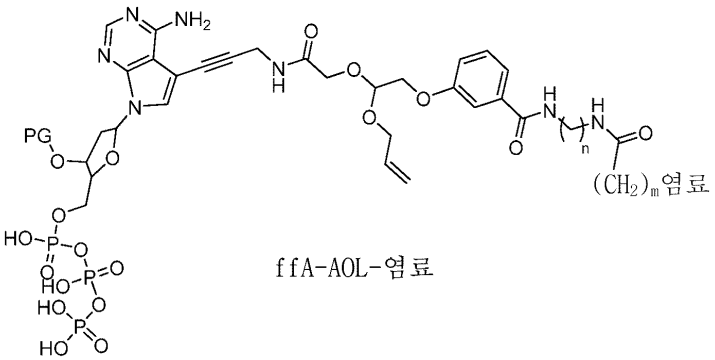
[0208] 

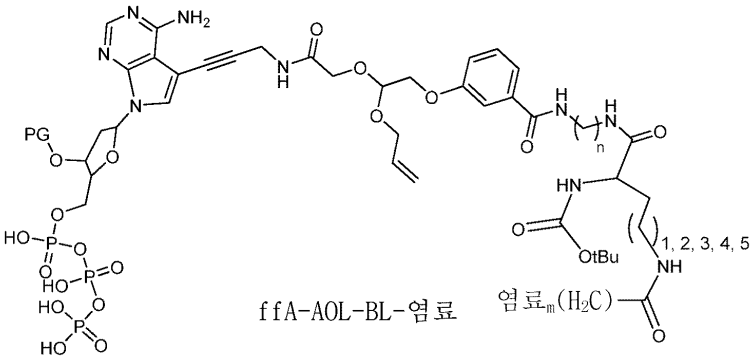
[0209] 

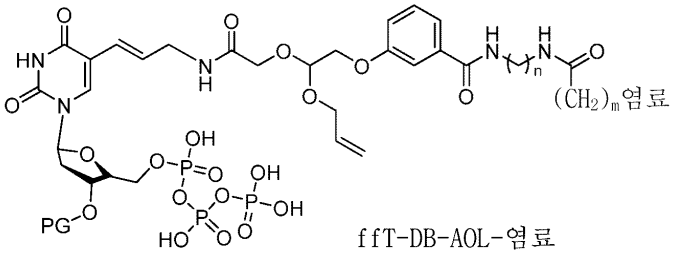
[0210] 

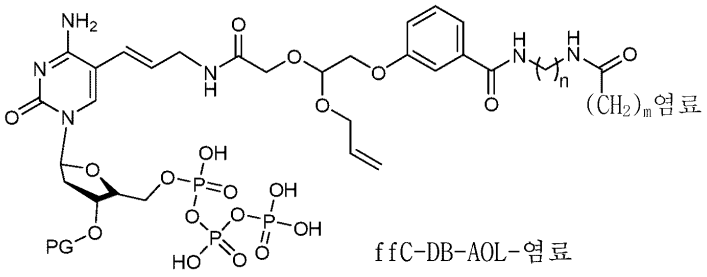
[0211] 여기서, L은 절단가능한 링커(임의로 본 명세서에 기재된 L^2를 포함함)를 나타내고, R은 상술한 바와 같은 리보스 또는 데옥시리보스 모이어티, 또는 1개, 2개 또는 3개의 포스페이트로 치환된 5' 위치를 갖는 리보스 또는 데옥시리보스 모이어티를 나타낸다.

[0212] 일부 실시형태에서, 비제한적인 예시적인 형광 염료 컨쥬게이트가 하기에 나타나 있다:

[0213] 

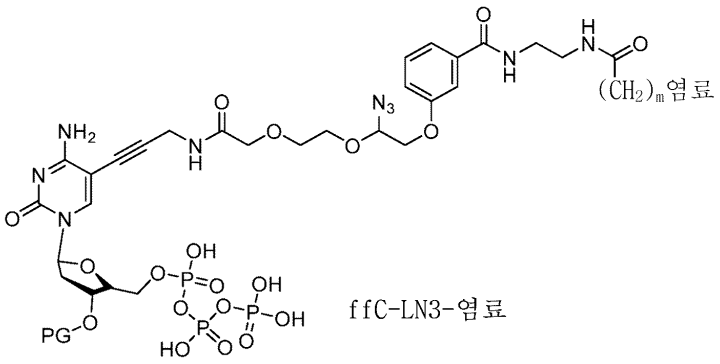
[0214] 

[0215] 



ffC-DB-AOL-염료

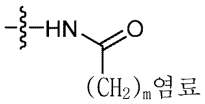
[0216]



ffC-LN3-염료

[0217]

[0218] 여기서, PG는 본원에 기재된 3' 차단기를 나타내고; n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 정수이고; m은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이다. 일 실시형태에서, -O-PG는 AOM이다. 일 실시형태에서, n은 5이다.



는 링커 모이어티의 아미노기와 염료의 카르복실기 사이의 반응의 결과로서 염료와 절단가능한 링커의 연결점을 지칭한다.

[0219] 다양한 형광 염료, 특히 청색광(예를 들어, 약 450 nm 내지 약 460 nm) 또는 녹색광(예를 들어, 약 520 nm 내지 약 540 nm)에 의해 여기될 수 있는 염료가 본 개시내용에서 검출 가능한 표지로서 사용될 수 있다. 이러한 염료는 각각 "청색 염료" 및 "녹색 염료"라고도 할 수 있다. 쿠마린 염료, 크로메노퀴놀린 염료, 및 비스보론 함유 헤테로고리를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 유형의 청색 염료의 예는 미국 특허출원공개 2018/0094140호, 2018/0201981호, 2020/0277529호, 2020/0277670호, 2021/0188832호 및 2022/0033900호, 및 미국 특허 제17/550271호, 제17/736688호, 및 제63/325057호(이들 각각은 그 전체가 참고로 포함됨)에 개시되어 있다. 시아닌 또는 폴리메틴 염료를 포함하는 녹색 염료의 예는 국제공개 제WO2013/041117호, 제WO2014/135221호, 제WO 2016/189287호, 제WO2017/051201호 및 제WO2018/060482A1호(이들 각각은 그 전체가 참고로 포함됨)에 개시되어 있다.

[0220] 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드의 임의의 실시형태에서, 뉴클레오티드는 2' 데옥시리보스 모이어티를 포함한다(즉, 화학식 (I) 및 화학식 (Ia) 내지 화학식 (Id)의 R^4는 H임). 일부 추가의 양태에서, 2' 데옥시리보스는 당 고리의 5' 위치에 1개, 2개 또는 3개의 포스페이트기를 포함한다. 일부 추가의 측면에서, 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드는 뉴클레오티드 트리포스페이트이다(즉, 화학식 (I) 및 화학식 (Ia) 내지 화학식 (Id)의 $-OR^6$은 트리포스페이트를 형성함).

[0221] 본 발명의 추가의 실시형태는 본 명세서에 기재된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 일부 이러한 실시형태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드는 주형 또는 표적 폴리뉴클레오티드에 혼성화된다. 일부 이러한 실시형태에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 고체 지지체에 고정화된다.

[0222] 본 발명의 추가의 실시형태는 다수의 고정화된 주형 또는 표적 폴리뉴클레오티드의 어레이를 포함하는 고체 지지체에 관한 것이며, 이러한 고정화된 주형 또는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부는 본 명세서에 기재된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드에 혼성화된다.

[0223] 본 출원은 또한 DNA와 관련하여 더욱 상세히 설명될 것이지만, 달리 명시되지 않는 한, 설명은 RNA, PNA 및 다

른 핵산에도 적용될 것이다.

[0224] *절단가능한 링커의 절단 조건*

[0225] 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 임의의 실시형태에서, 3' 블로킹기 및 절단가능한 링커(및 부착된 표지)는 동일하거나 실질적으로 동일한 화학 반응 조건 하에 제거될 수 있으며, 예를 들어 3' 블로킹기 및 검출가능한 표지는 단일 화학 반응으로 제거될 수 있다. 다른 실시형태에서, 3' 블로킹기 및 검출가능한 표지는 2개의 별개의 단계에서 제거된다.

[0226] 본 명세서에 기재된 절단가능한 링커는 다양한 화학적 조건 하에서 제거되거나 절단될 수 있다. 비제한적인 절단 조건은 포스핀 리간드, 예를 들어 트리스(하이드록시프로필)포스핀 또는 트리스(하이드록시메틸)포스핀의 존재 하에서의 팔라듐 촉매, 예컨대 Pd(II) 착물(예를 들어, $Pd(OAc)_2$, 알릴Pd(II) 클로라이드 이량체[(알릴)$PdCl]_2$ 또는 Na_2PdCl_4)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 3' 블로킹기는 절단가능한 링커에 대한 것과 동일하거나 실질적으로 동일한 절단 조건 하에서 절단될 수 있다.

[0227] *선형화와의 적합성*

[0228] 핵산 시퀀싱 반응의 처리량을 최대화하기 위해, 다수의 주형 분자를 병행하여 시퀀싱할 수 있는 것이 유리하다. 다수의 주형의 병행 처리는 핵산 어레이 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 이러한 어레이는 전형적으로 고체 지지체 재료 상에 고정된 폴리뉴클레오티드의 고밀도 매트릭스로 구성된다.

[0229] 국제공개 WO 98/44151호 및 국제공개 WO 00/18957호는 모두, 복수의 동일한 고정된 폴리뉴클레오티드 가닥 및 복수의 동일한 고정된 상보적 가닥으로부터 형성된 클러스터 또는 "콜로니"로 구성된 어레이를 형성하기 위해 증폭 산물이 고체 지지체 상에 고정되도록 하는 핵산 증폭 방법을 기술한다. 이러한 유형의 어레이는 본 명세서에서 "클러스터링된 어레이"로 지칭된다. 이들 방법에 따라 제조된 클러스터링된 어레이 상의 DNA 콜로니에 존재하는 핵산 분자는, 예를 들어 국제공개 WO 98/44152호에 기재된 바와 같이, 시퀀싱 반응을 위한 주형을 제공할 수 있다. 국제공개 WO 98/44151호 및 국제공개 WO 00/18957호에 기재된 것과 같은 고상 증폭 반응의 산물은 고정된 폴리뉴클레오티드 가닥과 고정된 상보적 가닥 쌍의 어닐링에 의해 형성된 소위 "가교된" 구조이며, 두 가닥은 모두 5' 말단에서 고체 지지체에 부착된다. 핵산 시퀀싱에 더욱 적합한 주형을 제공하기 위해, "가교된" 구조에서 고정된 가닥 중 하나의 실질적으로 전부 또는 적어도 일부를 제거하여, 적어도 부분적으로 단일 가닥인 주형을 생성하는 것이 바람직하다. 따라서, 단일 가닥인 주형의 부분은 시퀀싱 프라이머에 대한 혼성화에 사용가능할 것이다. "가교된" 이중 가닥 핵산 구조에서 고정된 하나의 가닥 전체 또는 일부를 제거하는 과정은 "선형화"로 지칭된다. 효소적 절단, 광화학적 절단 또는 화학적 절단을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 선형화 방법이 있다. 선형화 방법의 비제한적인 예는 전체적으로 참고로 포함되는 국제공개 WO 2007/010251호, 미국 특허출원공개 US 2009/0088327호, 미국 특허출원공개 US 2009/0118128호 및 미국 특허출원공개 US 2019/0352327호에 개시되어 있다.

[0230] 일부 실시형태에서, 3' 차단기 및/또는 절단 가능한 링커의 제거를 위한 조건은 또한 선형화 공정, 예를 들어 Pd 착물 및 포스핀의 사용을 포함하는 화학적 선형화 공정과 양립 가능하다. 일부 실시형태에서, Pd 착물은 Pd(II) 착물(예를 들어, $Pd(OAc)_2$, [(알릴)$PdCl]_2$ 또는 Na_2PdCl_4)이며, 포스핀(예를 들어, THP)의 존재 하에 계 내에서 Pd(0)를 생성한다.

[0231] *합성에 의한 시퀀싱의 실시형태 및 대안*

[0232] 일부 실시형태는 파이로시퀀싱 기술을 포함한다. 파이로시퀀싱은 특정 뉴클레오티드가 신생 가닥에 도입될 때 무기 파이로포스페이트(PPi)의 방출을 검출한다(문헌[Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. and Nyren, P. (1996) "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release." Analytical Biochemistry 242(1), 84-9]; 문헌[Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing." Genome Res. 11(1), 3-11]; 문헌[Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. (1998) "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." *Science* 281(5375), 363]; 미국 특허 제6,210,891호; 미국 특허 제6,258,568호 및 미국 특허 제6,274,320호, 이들의 개시 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨). 파이로시퀀싱에서, 방출된 PPi는 ATP 설퍼라제에 의해 즉시 아데노신 삼인산(ATP: adenosine triphosphate)으로 전환되어 검출될 수 있으며, 생성된 ATP의 수준은 루시퍼라제-생성 광자를 통해 검출된다. 시퀀싱될 핵산은 어레이에서의 특징부에 부착될 수 있고, 어레이의 특징에서 뉴클레오티드의 혼입으로 인해 생성되는 화학발광 신호를 캡처하기 위해 어레이가 이미지화될 수 있다. 어레이를 특정 뉴클레오티드 유형(예를 들어, A, T, C 또는

G)으로 처리한 후 영상이 수득될 수 있다. 각 뉴클레오티드 유형을 추가한 후 수득된 영상은 어레이의 피처가 검출되는 것과 관련하여 상이하다. 이미지의 이러한 차이는 어레이에 있는 특징부의 상이한 서열 내용을 반영한다. 그러나, 각 피처의 상대적 위치는 영상에서 변경되지 않은 상태로 유지된다. 이미지는 본원에 기술된 방법을 사용하여 저장, 처리 및 분석될 수 있다. 예를 들어, 각각의 상이한 뉴클레오티드 유형으로 어레이를 처리한 후 수득된 영상은 가역적 터미네이터-기반 서열분석 방법에 대해 서로 상이한 검출 채널에서 수득된 영상에 대해 본원에 예시된 것과 동일한 방식으로 처리될 수 있다.

[0233] SBS의 다른 예시적인 유형에서, 사이클 시퀀싱은 예를 들어, 그 개시내용이 본원에 참고로 포함되는 국제공개 WO 04/018497호 및 미국 특허 제7,057,026호에 기재된 바와 같은 절단가능한 또는 광표백성 염료 표지를 포함하는 가역적 종결자 뉴클레오티드의 단계적 부가에 의해 달성된다. 이러한 접근법은 솔렉사(Solexa, 현재 Illumina, Inc.)에 의해 상업화되고 있으며, 또한 각각이 본 명세서에 참고로 포함되는 국제공개 WO 91/06678호 및 국제공개 WO 07/123,744호에 기재되어 있다. 종결이 역전될 수 있고, 형광 표지가 절단될 수 있는 형광 표지된 종결자의 이용가능성은 효율적인 주기적 가역적 종결(CRT) 시퀀싱을 용이하게 한다. 폴리머라제는 또한 이러한 변형된 뉴클레오티드를 효율적으로 도입하고 신장하도록 공동 조작될 수 있다.

[0234] 바람직하게는 가역적 종결자 기반 시퀀싱 실시형태에서, 표지는 SBS 반응 조건 하에서 신장을 실질적으로 저해하지 않는다. 그러나, 검출 표지는 예를 들어 절단 또는 분해에 의해 제거될 수 있다. 배열된 핵산 특징부에 표지를 혼입한 후 이미지가 캡처될 수 있다. 특정 실시형태에서, 각각의 사이클은 어레이에 4종의 상이한 뉴클레오티드 유형을 동시에 전달하는 것을 포함하고, 각각의 뉴클레오티드 유형은 스펙트럼적으로 구별되는 표지를 갖는다. 그 다음 4개의 이미지가 수득될 수 있으며, 각각은 4개의 상이한 표지 중 하나에 대해 선택적인 검출 채널을 사용한다. 대안적으로, 상이한 뉴클레오티드 유형은 순차적으로 부가될 수 있으며, 각각의 부가 단계 사이에 어레이의 이미지가 얻어질 수 있다. 이러한 실시형태에서, 각각의 이미지는 특정 유형의 뉴클레오티드가 도입된 핵산 특징부를 나타낼 것이다. 각 특징부의 서열 내용이 상이하기 때문에 상이한 이미지에 상이한 특징부가 있거나 없을 수 있다. 그러나, 특징부의 상대적 위치는 이미지에서 변경되지 않은 상태로 유지된다. 이러한 가역적 종결자-SBS 방법으로부터 얻어진 이미지는 본원에 기재된 바와 같이 저장, 처리 및 분석될 수 있다. 이미지 캡처 단계 후에, 표지는 제거될 수 있고, 가역적 종결자 모이어티는 뉴클레오티드 부가 및 검출의 후속 사이클을 위해 제거될 수 있다. 특정 사이클에서 검출된 후 후속 사이클 이전에 표지가 제거되면 배경 신호와 사이클 사이의 누화를 줄이는 이점을 제공할 수 있다. 유용한 표지 및 제거 방법의 예가 하기에 기재된다.

[0235] 일부 실시형태는 4개 미만의 상이한 표지를 사용하여 4개의 상이한 뉴클레오티드의 검출을 사용할 수 있다. 예를 들어, SBS는 미국 특허출원공개 US 2013/0079232호에 포함된 문헌에 기술된 방법 및 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 첫 번째 예로서, 한 쌍의 뉴클레오티드 유형은 동일한 파장에서 검출될 수 있지만, 쌍의 한 구성원이 다른 구성원과 비교하여 강도 차이를 기준으로 하거나 쌍 중 한 구성원의 변화(예컨대 화학적 변형, 광화학적 변형 또는 물리적 변형을 통해) 쌍의 다른 구성원에 대해 검출된 신호와 비교하여 명백한 신호가 나타나거나 사라지게 한다. 두 번째 예로서, 4개의 상이한 뉴클레오티드 유형 중 3개가 특정 조건 하에서 검출될 수 있는 반면, 네 번째 뉴클레오티드 유형은 이러한 조건 하에서 검출가능한 표지가 없거나, 이러한 조건 하에서 최소한으로 검출된다(예컨대, 배경 형광으로 인한 최소 검출 등). 핵산으로의 처음 3개의 뉴클레오티드 유형의 혼입은 그들 각각의 신호의 존재에 기초하여 결정될 수 있고 핵산으로의 네 번째 뉴클레오티드 유형의 혼입은 임의의 신호의 부재 또는 최소 검출에 기초하여 결정될 수 있다. 세 번째 예로서, 하나의 뉴클레오티드 유형은 두 개의 상이한 채널에서 검출되는 표지(들)를 포함할 수 있는 반면, 다른 뉴클레오티드 유형은 하나 이상의 채널에서 검출되지 않는다. 전술한 3개의 예시적인 구성은 상호 배타적인 것으로 간주되지 않으며, 다양한 조합으로 사용될 수 있다. 모든 3개의 예를 조합한 예시적인 실시형태는 제1 채널에서 검출되는 제1 뉴클레오티드 유형(예를 들어, 제1 여기 파장에 의해 여기되는 경우 제1 채널에서 검출되는 표지를 갖는 dATP), 제2 채널에서 검출되는 제2 뉴클레오티드 유형(예를 들어, 제2 여기 파장에 의해 여기되는 경우 제2 채널에서 검출되는 표지를 갖는 dCTP), 제1 채널 및 제2 채널 둘 다에서 검출되는 제3 뉴클레오티드 유형(예를 들어, 제1 여기 파장 및/또는 제2 여기 파장에 의해 여기되는 경우 두 채널 모두에서 검출되는 적어도 하나의 표지를 갖는 dTTP) 및 어느 하나의 채널에서도 검출되지 않거나 최소한으로 검출되는 표지가 결여된 제4 뉴클레오티드 유형(예를 들어, 표지를 갖지 않는 dGTP)을 사용하는 형광 기반 SBS 방법이다.

[0236] 또한, 미국 특허출원공개 US 2013/0079232호에 포함된 문헌에 기술된 바와 같이, 단일 채널을 사용하여 서열분석 데이터가 수득될 수 있다. 이러한 소위 1-염료(one-dye) 시퀀싱 접근법에서, 첫 번째 뉴클레오티드 유형에 표지화되어 있지만 첫 번째 이미지가 생성된 후 표지가 제거되고, 두 번째 뉴클레오티드 유형은 첫 번째 이미지

가 생성된 후에만 표지화된다. 세 번째 뉴클레오티드 유형은 첫 번째 이미지와 두 번째 이미지 모두에서 표지를 유지하고, 네 번째 뉴클레오티드 유형은 두 이미지 모두에서 표지화되지 않은 상태로 유지된다.

[0237] 일부 실시형태는 라이게이션 기술에 의한 시퀀싱을 사용할 수 있다. 이러한 기술은 DNA 리가제를 사용하여 올리고뉴클레오티드를 도입하고 이러한 올리고뉴클레오티드의 도입을 확인한다. 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 올리고뉴클레오티드가 혼성화하는 서열에서 특정 뉴클레오티드의 동일성과 상관관계가 있는 상이한 표지를 갖는다. 다른 SBS 방법과 마찬가지로, 표지된 시퀀싱 시약으로 핵산 특징부 어레이를 처리한 후 이미지가 수득될 수 있다. 각 이미지는 특정 유형의 표지가 포함된 핵산 특징부를 나타낸다. 각 특징부의 서열 내용이 다르기 때문에 상이한 특징부가 상이한 이미지에 있거나 없을 수 있지만, 특징부의 상대적 위치는 이미지에서 변경되지 않은 채로 유지된다. 라이게이션 기반 시퀀싱 방법으로부터 얻어진 이미지들은 본원에 기재된 바와 같이 저장, 처리 및 분석될 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법 및 시스템과 함께 사용될 수 있는 예시적인 SBS 시스템 및 방법은 이들의 개시 내용이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제6,969,488호, 제6,172,218호 및 제6,306,597호에 기술되어 있다.

[0238] 일부 실시형태는 나노포어 시퀀싱을 이용할 수 있다(문헌[Deamer, D. W. & Akeson, M. "Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing." *Trends Biotechnol.* 18, 147-151 (2000)]; 문헌[Deamer, D. and D. Branton, "Characterization of nucleic acids by nanopore analysis", *Acc. Chem. Res.* 35:817-825 (2002)]; 문헌[Li, J., M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, and J. A. Golovchenko, "DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope" Nat. Mater. 2:611-615 (2003)], 이들의 개시 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨). 이러한 실시형태에서, 표적 핵산은 나노포어를 통과한다. 나노포어는 α-헤몰리신과 같은 합성 포어 또는 생물학적 막 단백질일 수 있다. 표적 핵산이 나노포어를 통과할 때, 각각의 염기쌍은 나노포어의 전기 전도도의 변동을 측정함으로써 확인될 수 있다. (미국 특허 제7,001,792호; 문헌[Soni, G. V. & Meller, "A. Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state nanopores." *Clin. Chem.* 53, 1996-2001 (2007)]; 문헌[Healy, K. "Nanopore-based single-molecule DNA analysis." *Nanomed.* 2, 459-481 (2007)]; 문헌[Cockroft, S. L., Chu, J., Amorin, M. & Ghadiri, M. R. "A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution." *J. Am. Chem. Soc.* 130, 818-820 (2008)], 이들의 개시 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨). 나노포어 시퀀싱으로부터 얻어진 데이터는 본원에 기재된 바와 같이 저장, 처리 및 분석될 수 있다. 특히, 데이터는 본원에 언급된 광학 이미지 및 다른 이미지의 예시적인 처리에 따라 이미지로서 처리될 수 있다.

[0239] 시퀀싱 방법의 일부 다른 실시형태는 그 개시 내용이 참고로 포함되는 미국 특허 제9,222,132호에 기술된 바와 같은 나노볼 시퀀싱 기술에서 본 명세서에 기재된 3' 블로킹된 뉴클레오티드를 사용하는 것을 포함한다. 롤링 서클 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA) 과정을 통해, 다수의 별개의 DNA 나노볼이 생성될 수 있다. 이어서, 나노볼 혼합물은 단일 나노볼이 각 위치와 연관될 수 있게 하는 특징부를 포함하는 패턴화된 슬라이드 표면 상에 분포된다. DNA 나노볼 생성에서, DNA는 단편화되어 4개의 어댑터 서열 중 첫 번째에 라이게이션된다. 주형은 II형 엔도뉴클레아제로 증폭, 원형화 및 절단된다. 제2 세트의 어댑터가 부가된 후에, 증폭, 원형화 및 절단이 이루어진다. 이 프로세스는 나머지 두 어댑터에 대해 반복된다. 최종 산물은 각각 주형 서열에 의해 분리된 4개의 어댑터를 갖는 원형 주형이다. 라이브러리 분자는 롤링 서클 증폭 단계를 거쳐, DNA 나노볼이라고 하는 대량의 콘카테머(concatemer)를 생성한 다음에, 플로우 셀에 증착된다. 문헌[Goodwin *et al.*, "Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies," Nat Rev Genet. 2016;17(6):333-51].

[0240] 일부 실시형태는 DNA 폴리머라제 활성의 실시간 모니터링을 수반하는 방법을 이용할 수 있다. 뉴클레오티드 혼입은 예를 들어, 미국 특허 제7,329,492호 및 제7,211,414호(이들 둘 다는 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같이 형광단 보유 폴리머라제와 γ-포스페이트 표지된 뉴클레오티드 간의 형광 공명 에너지 전달(FRET) 상호작용을 통해 검출될 수 있거나, 뉴클레오티드 도입은 예를 들어, 미국 특허 제7,315,019호(이는 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같은 제로-모드 도파관으로 그리고 예를 들어, 미국 특허 제7,405,281호 및 미국 특허 공개 제2008/0108082호(이들 둘 다는 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같은 형광 뉴클레오티드 유사체 및 조작된 폴리머라제를 사용하여 검출될 수 있다. 조명은 형광 표지된 뉴클레오티드의 도입이 저백그라운드에서 관찰될 수 있도록 표면 테더링된(surface-tethered) 폴리머라제 주변의 젭토리터 스케일(zeptoliter-scale)의 부피로 제한될 수 있다(문헌[Levene, M. J. *et al.* "Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations." *Science* 299, 682-686 (2003)]; 문헌[Lundquist, P. M. *et al.* "Parallel confocal detection of single molecules in real time." *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008)]; 문헌

[Korlach, J. *et al.* "Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nano structures." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008)], 이들의 개시 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨). 이러한 방법으로부터 얻어진 이미지는 본 명세서에 기재된 바와 같이 저장, 처리 및 분석될 수 있다.

[0241] 일부 SBS 실시형태는 연장 생성물 내로 뉴클레오티드의 혼입 시에 방출되는 양성자의 검출을 포함한다. 예를 들어, 방출된 양성자의 검출에 기초한 시퀀싱은 Ion Torrent(미국 코네티컷주 길포드 소재, Life Technologies의 자회사)로부터 시판되고 있는 전기적 검출기 및 관련 기술, 또는 미국 특허출원공개 US 2009/0026082호; 2009/0127589호; 2010/0137143호; 및 2010/0282617호(이들 모두는 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 시퀀싱 방법 및 시스템을 사용할 수 있다. 역학적 배제(kinetic exclusion)를 사용하여 표적 핵산을 증폭하기 위한 본원에 제시된 방법은 양성자를 검출하는 데 사용되는 기재에 용이하게 적용될 수 있다. 보다 구체적으로, 본원에 제시된 방법은 양성자를 검출하는 데 사용되는 앰플리콘의 클론 집단을 제작하는 데 사용될 수 있다.

[0242] 상기 SBS 방법은 멀티플렉스 포맷으로 유리하게 수행되어 다수의 상이한 표적 핵산이 동시에 조작될 수 있다. 특정 실시형태에서, 상이한 표적 핵산이 일반적인 반응 용기에서 또는 특정 기질의 표면에서 처리될 수 있다. 이것은 멀티플렉스 방식으로 시퀀싱 시약의 전달, 미반응 시약의 제거 및 도입 이벤트의 검출을 편리하게 해준다. 표면 결합된 표적 핵산을 사용한 실시형태에서, 표적 핵산은 어레이 포맷으로 존재할 수 있다. 어레이 포맷에서, 표적 핵산은 통상 공간적으로 구별가능한 방식으로 표면에 결합될 수 있다. 표적 핵산은 직접 공유 결합, 비드 또는 다른 입자에 대한 부착 또는 표면에 부착된 폴리머라제 또는 다른 분자에 대한 결합에 의해 결합될 수 있다. 어레이는 각각의 부위(특징부라고도 지칭됨)에서 표적 핵산의 단일 카피를 포함할 수 있거나, 동일한 서열을 갖는 다수의 카피가 각각의 부위 또는 특징부에 존재할 수 있다. 다수의 카피는 아래에 더욱 상세하게 기술된 바와 같은 증폭 방법, 예컨대 브릿지 증폭 또는 에멀젼 PCR에 의해 생성될 수 있다.

[0243] 본원에 기재된 방법은 예를 들어, 적어도 약 10개의 특징부/cm^2, 100개의 특징부/cm^2, 500개의 특징부/cm^2, 1,000개의 특징부/cm^2, 5,000개의 특징부/cm^2, 10,000개의 특징부/cm^2, 50,000개의 특징부/cm^2, 100,000개의 특징부/cm^2, 1,000,000개의 특징부/cm^2, 5,000,000개의 특징부/cm^2 또는 그 이상을 포함하는, 다양한 밀도들 중 임의의 밀도의 특징부를 갖는 어레이를 사용할 수 있다.

[0244] 본원에 제시된 방법의 한 가지 이점은 이들이 병렬로 복수의 표적 핵산의 신속하고 효율적인 검출을 제공한다는 것이다. 따라서, 본 개시는 위에 예시된 것과 같은 당업계에 알려진 기술을 사용하여 핵산을 제조 및 검출할 수 있는 통합 시스템을 제공한다. 따라서, 본 개시내용의 통합 시스템은 증폭 시약 및/또는 시퀀싱 시약을 하나 이상의 고정된 DNA 단편으로 전달할 수 있는 유체 구성요소를 포함할 수 있으며, 상기 시스템은 펌프, 밸브, 저장소, 유체 라인 등과 같은 구성요소를 포함한다. 플로우 셀은 표적 핵산의 검출을 위한 통합 시스템으로 구성되고/되거나 이에 사용될 수 있다. 예시적인 플로우 셀은 예를 들어, 미국 특허출원공개 US 2010/0111768호 및 미국 특허 US 13/273,666호에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다. 플로우셀에 대한 예시로서, 통합 시스템의 유체 구성요소 중 하나 이상이 증폭 방법과 검출 방법에 사용될 수 있다. 핵산 시퀀싱 구현예를 예로 들면, 통합 시스템의 유체 구성요소 중 하나 이상이 본원에 제시된 증폭 방법과, 위에 예시된 것과 같은 시퀀싱 방법에서 시퀀싱 시약의 전달에 사용될 수 있다. 대안적으로, 통합 시스템은 증폭 방법을 수행하고 검출 방법을 수행하기 위한 별개의 유체 시스템을 포함할 수 있다. 증폭된 핵산을 생성하고 또한 핵산의 서열을 결정할 수 있는 통합 시퀀싱 시스템의 예는, 제한 없이, MiSeq™ 플랫폼(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 Illumina, Inc.) 및 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제13/273,666호에 개시된 장치를 포함한다.

[0245] 폴리뉴클레오티드가 실리카 기반 지지체에 직접 부착된 어레이는, 예를 들어 국제공개 WO 00/06770호(본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 것들이며, 여기서는 폴리뉴클레오티드가 유리 상의 펜던트 에폭사이드기와 폴리뉴클레오티드 상의 내부 아미노기 사이의 반응에 의해 유리 지지체 상에 고정화된다. 게다가, 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 국제공개 WO 2005/047301호(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 황 기반 친핵체와 고체 지지체의 반응에 의해 고체 지지체에 부착될 수 있다. 고체 지지된 주형 폴리뉴클레오티드의 또 다른 추가의 예는 주형 폴리뉴클레오티드가 실리카 기반 또는 다른 고체 지지체 상에 지지된 하이드로겔에 부착되어 있는 경우로서, 이는, 예를 들어 국제공개 WO 00/31148호, WO 01/01143호, WO 02/12566호, WO 03/014392호, WO 00/53812호 및 미국 특허 제6,465,178호에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0246] 주형 폴리뉴클레오티드가 고정화될 수 있는 특정 표면은 폴리아크릴아미드 하이드로겔이다. 폴리아크릴아미드

하이드로겔은 상기에 인용된 참고문헌에 그리고 국제공개 WO 2005/065814호에 기재되어 있으며, 이는 본 명세서에 참고로 포함된다. 사용될 수 있는 구체적인 하이드로겔은 국제공개 WO 2005/065814호 및 미국 특허출원공개 US 2014/0079923호에 기재된 것들을 포함한다. 일 실시형태에서, 하이드로겔은 PAZAM(폴리(N-(5-아지도아세트아미딜펜틸) 아크릴아미드-코-아크릴아미드))이다.

[0247] DNA 주형 분자는, 예를 들어 미국 특허 제6,172,218호(이는 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같이 비드 또는 마이크로입자에 부착될 수 있다. 비드 또는 마이크로입자에 대한 부착은 시퀀싱 응용에 유용할 수 있다. 비드 라이브러리가 제조될 수 있으며, 여기서는 각각의 비드가 상이한 DNA 서열을 포함한다. 예시적인 라이브러리 및 이의 생성 방법은 문헌[*Nature*, 437, 376-380 (2005)]; 문헌[*Science*, 309, 5741, 1728-1732 (2005)]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드를 사용하는 이러한 비드들의 어레이의 시퀀싱은 본 발명의 범주 내에 있다.

[0248] 시퀀싱하고자 하는 주형은 고체 지지체 상의 "어레이"의 일부를 형성할 수 있으며, 이 경우에 어레이는 임의의 편리한 형태를 취할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 단일-분자 어레이, 클러스터링된 어레이, 및 비드 어레이를 포함한 모든 유형의 고밀도 어레이에 적용가능하다. 본 발명의 표지된 뉴클레오티드는, 고체 지지체 상에의 핵산 분자의 고정화에 의해 형성된 것들을 포함하지만 이로 한정되지 않는 본질적으로 임의의 유형의 어레이 상의 주형을 시퀀싱하는 데 사용될 수 있다.

[0249] 그러나, 본 발명의 표지된 뉴클레오티드는 클러스터링된 어레이의 시퀀싱과 관련하여 특히 유리하다. 클러스터링된 어레이에서, 어레이 상의 별개의 영역(종종 부위 또는 특징부로 지칭됨)들은 다수의 폴리뉴클레오티드 주형 분자를 포함한다. 일반적으로, 이러한 다수의 폴리뉴클레오티드 분자는 광학적 수단에 의해 개별적으로 해상가능하지 않고 대신에 앙상블(ensemble)로서 검출된다. 어레이가 어떻게 형성되는지에 따라, 어레이 상의 각각의 부위는 하나의 개별 폴리뉴클레오티드 분자의 다수의 카피(예를 들어, 그 부위는 특정 단일- 또는 이중-가닥 핵산 종에 대해 균질함) 또는 심지어 소수의 상이한 폴리뉴클레오티드 분자들의 다수의 카피(예를 들어, 2개의 상이한 핵산 종의 다수의 카피)를 포함할 수 있다. 핵산 분자들의 클러스터링된 어레이는 당업계에서 일반적으로 알려진 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 예로서, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 국제공개 WO 98/44151호 및 WO 00/18957호는 핵산의 증폭 방법을 기재하는데, 여기서는 고정화된 핵산 분자들의 클러스터들 또는 "콜로니"들로 구성된 어레이를 형성하기 위하여, 주형 및 증폭 산물이 고체 지지체 상에 고정화된 채로 남아 있다. 이들 방법에 따라 제조된 클러스터링된 어레이 상에 존재하는 핵산 분자들은 본 발명의 염료 화합물로 표지된 뉴클레오티드를 사용하여 시퀀싱하기에 적합한 주형이다.

[0250] 본 발명의 표지된 뉴클레오티드는 또한 단일 분자 어레이 상의 주형의 시퀀싱에 유용하다. 본 명세서에 사용되는 용어 "단일 분자 어레이" 또는 "SMA"는 고체 지지체 상에 분포된(또는 배열된) 폴리뉴클레오티드 분자들의 집단을 지칭하며, 여기서 집단의 모든 다른 것들로부터 임의의 개별 폴리뉴클레오티드의 간격은 개별 폴리뉴클레오티드 분자들을 개별적으로 해상하는 것이 가능하도록 하는 것이다. 따라서, 고체 지지체의 표면 상에 고정화된 표적 핵산 분자는 일부 실시형태에서 광학적 수단에 의해 해상될 수 있다. 이는, 각각의 신호가 하나의 폴리뉴클레오티드를 나타내는 하나 이상의 별개의 신호가, 사용되는 특정 이미징 장치의 해상가능한 영역 내에서 발생할 것임을 의미한다.

[0251] 어레이 상의 인접한 폴리뉴클레오티드 분자들 사이의 간격이 적어도 100 nm, 더 특히 적어도 250 nm, 훨씬 더 특히 적어도 300 nm, 더욱 더 특히 적어도 350 nm인 단일 분자 검출이 달성될 수 있다. 따라서, 각각의 분자는 개별적으로 해상가능하고 단일 분자 형광점으로서 검출가능하고, 상기 단일 분자 형광점으로부터의 형광은 또한 단일 단계 광표백을 나타낸다.

[0252] 용어 "개별적으로 해상된" 및 "개별 해상도"는, 시각화될 때, 어레이 상의 하나의 분자를 그의 이웃하는 분자와 구별하는 것이 가능함을 명시하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 어레이 상의 개별 분자들 사이의 분리는 개별 분자들을 해상하는 데 사용되는 특정 기법에 의해 부분적으로 결정될 것이다. 단일 분자 어레이의 일반적인 특징은 국제공개 WO 00/06770호 및 WO 01/57248호를 참조함으로써 이해될 것이며, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 발명의 뉴클레오티드의 한 가지 용도가 합성에 의한 시퀀싱 반응에 대한 것이지만, 뉴클레오티드의 유용성은 이러한 방법으로 제한되지 않는다. 실제로, 뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드에 도입된 뉴클레오티드에 부착된 형광 표지의 검출을 필요로 하는 임의의 시퀀싱 방법에서 유리하게 사용될 수 있다.

[0253] 특히, 본 발명의 표지된 뉴클레오티드는 자동화 형광 시퀀싱 프로토콜, 특히 생어(Sanger) 및 그 동료들의 사슬 종결 시퀀싱 방법에 기초한 형광 염료-종결자 사이클 시퀀싱에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 효소, 및 프라이머 신장 시퀀싱 반응에서 형광 표지된 디데옥시뉴클레오티드를 도입시키는 사이클 시퀀싱을 사용

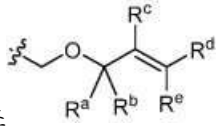
한다. 이른바 생어 시퀀싱 방법, 및 관련 프로토콜(Sanger-type)은 표지된 디데옥시뉴클레오티드를 갖는 랜덤화된 사슬 종결을 이용한다.

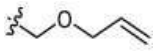
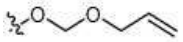
[0254] 따라서, 본 발명은 또한 3' 및 2' 위치 둘 모두에서 하이드록시기가 결여된 디데옥시뉴클레오티드인 표지된 뉴클레오티드를 포함하며, 이러한 디데옥시뉴클레오티드는 생어 유형 시퀀싱 방법 등에 사용하기에 적합하다.

[0255] 3' 차단기를 혼입시킨 본 개시내용의 표지된 뉴클레오티드(이것은 인식될 것임)가 또한 생어 방법 및 관련 프로토콜에 이용될 수 있는데, 그 이유는, 디데옥시 뉴클레오티드를 사용함으로써 달성되는 것과 동일한 효과가 3'-OH 차단기를 갖는 뉴클레오티드를 사용함으로써 달성될 수 있기 때문이다: 둘 모두는 후속 뉴클레오티드의 혼입을 방지한다. 본 개시내용에 따르고 3' 차단기를 갖는 뉴클레오티드가 생어 유형 시퀀싱 방법에서 사용되는 경우, 뉴클레오티드에 부착된 염료 화합물 또는 검출가능한 표지는 절단가능한 링커를 통해 연결될 필요가 없음이 이해될 것인데, 그 이유는, 본 개시내용의 표지된 뉴클레오티드가 혼입되는 각각의 경우에, 뉴클레오티드는 후속으로 도입될 필요가 없으며, 이에 따라 표지는 뉴클레오티드로부터 제거될 필요가 없기 때문이다.

[0256] 본원에 기재된 방법의 임의의 실시형태에서, 시퀀싱 응용에 사용되는 뉴클레오티드는 본 명세서에 기재된 3' 블로킹된 뉴클레오티드, 예를 들어 화학식 (I) 및 화학식 (Ia) 내지 화학식 (Id)의 뉴클레오티드이다. 임의의 실시형태에서, 3' 차단된 뉴클레오티드는 뉴클레오시드 트리포스페이트이다.

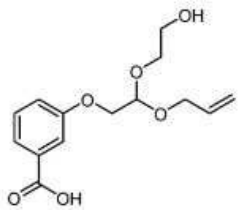
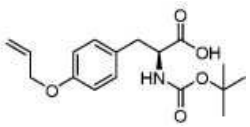
[0257] 키트

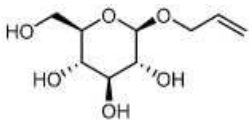
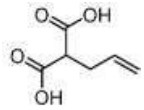
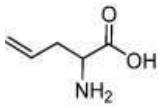
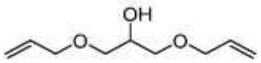
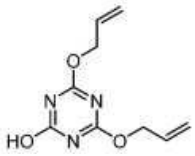
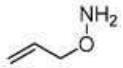
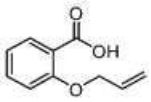
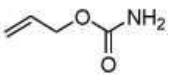
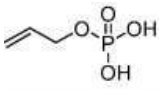
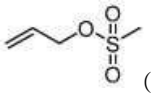
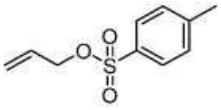
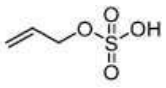
[0258] 본 개시내용은 또한 다음을 포함하는 시퀀싱 장치와 함께 사용하기 위한 키트를 제공한다: 하나 이상의 서로 다른 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, A, T, C 및 G 또는 U의 4가지 서로 다른 유형의 뉴클레오티드; dATP, dTTP, dCTP 및 dGTP 또는 dUTP)(여기서 각각의 뉴클레오티드는 알릴 모이어티를 포함하는 3' 차단기, 예컨대 뉴클레오티드의 3' 산소에 부착된 구조  를 갖는 3' 차단기를 포함하고, R^a, R^b, R^c, R^d 및 R^e는 각각 독립적으로 H, 할로겐, 미치환된 또는 치환된 C_1-C_6 알킬, 또는 C_1-C_6 할로알킬임); 및 하나 이상의 팔라듐 스캐빈저(여기서 적어도 하나의 팔라듐 스캐빈저는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 알릴 모이어티(예를 들어, -O-알릴, -S-알릴, -NR-알릴 또는 $-N^+RR'$-알릴, 또는 이들의 조합)을 포함함).

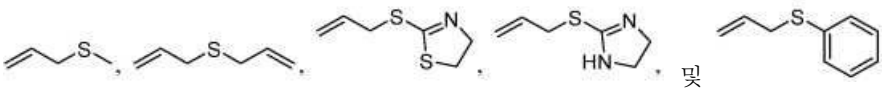
[0259] 일부 실시형태에서, 키트 중 각 뉴클레오티드의 3' 차단기는 이고, 3' 산소와 함께 리보스 또는 데옥시리보스 모이어티의 3' 탄소 원자에 부착된  ("AOM")기를 형성한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 상이한 유형의 뉴클레오티드는 본원에 기재된 표지된 뉴클레오티드, 예를 들어 화학식 (I), (Ia), (Ia'), (Ib), (Ic), (Ic') 또는 (Id)의 3' 차단된 뉴클레오티드이다. 특정 실시형태에서, 키트는 표지된 또는 미표지된 뉴클레오티드와 함께 적어도 하나의 표지된 3' 차단된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 염료로 표지된 뉴클레오티드는 미표지 또는 천연 뉴클레오티드 및/또는 형광 표지된 뉴클레오티드, 또는 이들의 임의의 조합과 조합되어 공급될 수 있다. 뉴클레오티드들의 조합은 별개의 개별 성분들(예를 들어, 베셀(vessel) 또는 튜브당 하나의 뉴클레오티드 유형)로서 또는 뉴클레오티드 혼합물(예를 들어, 동일한 베셀 또는 튜브 내에서 혼합된 2개 이상의 뉴클레오티드)로서 제공될 수 있다.

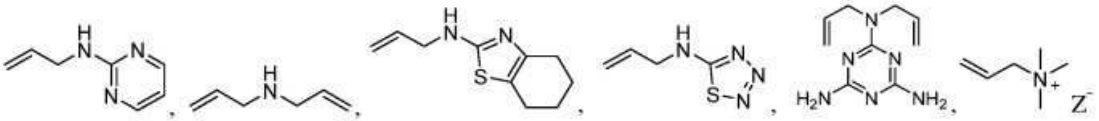
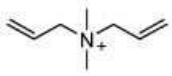
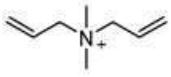
[0260] 다른 실시형태에서, 뉴클레오티드는 표지되지 않으며, 키트는 본원에 기재된 바와 같이 하나 이상의 검출 가능한 표지를 포함하는 친화성 시약 세트와 함께 사용될 수 있다.

[0261] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 -O-알릴 또는 알릴 모이어티를 포함하는 Pd 스캐빈저는 하기로부터 선택될 수 있다:

[0262]  (화합물 A),  (화합물 B, N-Boc 티로신(알릴)-OH),


(화합물 C, 알릴-b-d-글루코피라노사이드),  (화합물 D), 
(화합물 E),  (화합물 F),  (화합물 G),  (화합물 H),
 (화합물 I),  (화합물 J),  (화합물 K),  (화합물
L),  (화합물 M), 및  (화합물 N). 일 실시형태에서, 키트는 화합물 A를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 키트는 화합물 B를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 키트는 화합물 C를 포함한다.

[0263] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 -S-알릴 모이어티를 포함하는 Pd 스캐빈저는  로부터 선택될 수 있다.

[0264] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 -NR-알릴 또는 -N^{+}RR'-알릴 모이어티를 포함하는 팔라듐 스캐빈저는  또는  Z^{-}로부터 선택될 수 있으며, 여기서 Z^{-}는 음이온(예를 들어, 할라이드 음이온, 예컨대 F^{-} 또는 Cl^{-})이다. 일 실시형태에서, 키트는 팔라듐 스캐빈저  Cl^{-} (화합물 O, 디알릴디메틸암모늄 클로라이드, DADMAC로도 알려짐)을 포함한다.

[0265] 일부 실시형태에서, 키트는 본원에 기재된 방법의 혼입 단계에서 사용될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 키트는 9°N 폴리머라제의 돌연변이체, 예를 들어 Pol 812, Pol 1901, Pol 1558 또는 Pol 963과 같은 DNA 폴리머라제와 같은 추가 시약을 포함할 수 있다. Pol 812, Pol 1901, Pol 1558 또는 Pol 963 DNA 폴리머라제의 아미노산 서열. 일부 실시형태에서, 키트는 본원에 기재된 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 표지된 뉴클레오티드(A, C, T 및 G 또는 U; dATP, dCTP, dTTP 및 dGTP 또는 dUTP)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 또한 하나 이상의 완충제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 완충제는 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민, 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 추가의 실시형태에서, 완충제는 에탄올아민 또는 글리신, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시형태에서, 완충제는 글리신을 포함하거나 글리신이다. 일부 실시형태에서, 키트는 Pd(II) 종을 불활성화하기 위한 Pd(II) 스캐빈저와 같은 본원에 기재된 추가적인 Pd 스캐빈저(들)를 추가로 포함할 수 있다(예를 들어, L-시스테인 또는 이의 염, 또는 티오설페이트 염, 예컨대 소듐 티오설페이트). 일부 실시형태에서, Pd(II) 스캐빈저는 Pd(0) 스캐빈저와 별도의 구획에 있다. 예를 들어, Pd(0) 스캐빈저는 혼입 혼합물에 있고 Pd(II) 스캐빈저는 절단 후 세척 용액에 있다. 다른 실시형태에서, Pd(0) 및 Pd(II) 스캐빈저는 동일한 구획에 있다.

[0266] 일부 실시형태에서, 키트의 구성요소 또는 시약은 건조 또는 동결건조 상태이고, 키트는 임의의 수용액을 함유하지 않는다. 따라서, 키트의 시약은 완충 용액으로 재구성된다. 예를 들어, DNA 폴리머라제 및/또는 하나 이상의 4개 유형의 뉴클레오티드는 건조 또는 동결건조 형태일 수 있으며, 이는 재구성되어 혼입 혼합물(예를 들

어, 제1 수용액)을 형성하게 된다. 일부 이러한 실시형태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 알릴 모이어티를 포함하는 Pd 스캐빈저(예를 들어, Pd(0) 스캐빈저)는 또한 건조 또는 동결건조된 형태이고, DNA 폴리머라제 및/또는 뉴클레오티드와 사전 혼합되거나 별도의 용기/구획에 존재하고 재구성되고 폴리머라제 및 뉴클레오티드와 혼합되어 시퀀싱 실행 직전 또는 시작 시 제1 수용액을 형성한다. 추가 실시형태에서, Pd(II) 스캐빈저는 또한 DNA 폴리머라제 및/또는 뉴클레오티드와 미리 혼합된 건조 또는 동결건조 형태일 수 있다. 다른 실시형태에서, Pd(0) 스캐빈저는 건조 또는 동결건조된 형태가 아니고, DNA 폴리머라제 및/또는 뉴클레오티드와 별도로 저장되고, DNA 폴리머라제 및 뉴클레오티드를 함유하는 혼입 혼합물과 혼합되어 제1 수용액을 형성한다. 다른 실시형태에서, Pd(II) 스캐빈저는 절단 후 세척 용액에 존재할 수 있거나, 절단 후 세척 용액에서 재구성되도록 건조 또는 동결건조된 상태일 수 있다. 다른 실시형태에서, 키트의 구성요소는 사용 전에 희석되도록 농축된 형태로 제공될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 적절한 희석 완충액이 또한 포함될 수 있다. 다른 실시형태에서, 키트의 구성성분은 즉시 사용 가능한 완충 용액(예를 들어, 제1 수용액 또는 제2 수용액)에 존재한다. 일부 실시형태에서, 제1 용액 또는 제2 용액은 약 9의 pH를 갖는다.

[0267] 키트가 염료 화합물과 같은 검출 가능한 표지로 표지된 복수, 특히 2개 또는 3개, 보다 특히 4개의 3' 차단된 뉴클레오티드를 포함하는 경우, 상이한 뉴클레오티드는 상이한 염료 화합물로 표지될 수 있거나, 하나는 염료 화합물을 함유하지 않아 어두울 수 있다. 상이한 유형의 뉴클레오티드가 상이한 염료 화합물들로 표지되는 경우, 이러한 염료 화합물들은 스펙트럼적으로 구별가능한 형광 염료라는 것이 상기 키트의 특징이다. 본원에서 사용되는 용어 "스펙트럼적으로 구별가능한 형광 염료"는 2개 이상의 이러한 염료가 하나의 샘플 내에 존재할 때 형광 검출 장비(예를 들어, 시판 모세관 기반 DNA 시퀀싱 플랫폼)에 의해 구별될 수 있는 파장에서 형광 에너지를 방출하는 형광 염료를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 형광 염료 화합물로 표지된 2개 이상의 뉴클레오티드가 키트 형태로 공급되는 경우, 표지된 뉴클레오티드가 동일한 파장, 예를 들어 동일한 레이저에 의해 여기될 수 있다는 것이 일부 실시형태의 특징이다. 이러한 특징 중 하나는 세 가지 유형의 뉴클레오티드가 동일한 파장에 의해 여기될 수 있으며 네 번째 유형의 뉴클레오티드는 표지되지 않은(어두운) 것이다. 또 다른 특징에서, 두 가지 유형의 표지된 뉴클레오티드가 첫 번째 파장에서 여기될 수 있고 두 가지 유형의 표지된 뉴클레오티드가 두 번째 파장에서 여기될 수 있다. 또 다른 특징에서, 한 유형의 표지된 뉴클레오티드는 첫 번째 파장에서 여기될 수 있고, 두 번째 유형의 표지된 뉴클레오티드는 두 번째 파장에서 여기될 수 있고, 세 번째 표지된 뉴클레오티드는 첫 번째 및 두 번째 파장 모두에서 여기될 수 있다. 뿐만 아니라, 제4 유형의 뉴클레오티드는 표지되지 않는다. 예를 들어, ffC는 첫 번째 파장에서 여기될 수 있고, ffT는 두 번째 파장에서 여기될 수 있고, ffA는 첫 번째와 두 번째 파장 모두에서 여기될 수 있고, ffG는 표지되지 않는다(어두움). 특정 여기 파장은 약 450 내지 460 nm, 약 490 내지 500 nm, 또는 약 530 내지 540 nm(예를 들어, 약 532 nm)이다.

[0268] 다른 실시형태에서, 키트는 4개의 표지된 3' 블로킹된 뉴클레오티드(예를 들어, A, C, T, 및 G 또는 U; dATP, dCTP, dTTP 및 dGTP 또는 dUTP)를 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 유형의 뉴클레오티드는 동일한 3' 블로킹기 및 형광 표지를 포함하고, 각각의 형광 표지는 별개의 형광 최대값을 갖고, 각각의 형광 표지는 다른 3개의 표지와 구별될 수 있다. 키트는 형광 표지 중 2개 이상이 유사한 흡광도 최대치를 갖지만 상이한 스토크스 이동을 갖도록 할 수 있다. 다른 일부 실시형태에서, 한 유형의 뉴클레오티드가 비표지된다.

[0269] 본 개시내용은 또한 복수의 챔버를 포함하는 시퀀싱 장치와 함께 사용하기 위한 카트리지를 제공하며, 여기서 복수의 챔버 중 하나는 본원에 기재된 키트(예를 들어, 본원에 기재된 시퀀싱 방법의 혼입 단계를 위한 혼입 혼합물 키트)와 함께 사용하기 위한 것이다. 또한, 본 명세서에 제시된 방법에서 확인된 하나 이상의 구성요소가 키트에 포함될 수 있다. 본원에 기술된 스캔 혼합물, 절단 혼합물 또는 절단 후 세척 용액은 각각 본원에 기술된 시퀀싱 카트리지의 별도의 챔버에서 사용되도록 설계된 키트의 형태일 수 있다.

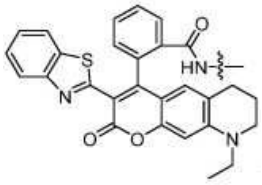
[0270] 실시예

[0271] 추가의 실시형태가 하기 실시예에서 더욱 상세히 개시되며, 이러한 실시예는 어떤 식으로든 청구범위의 범위를 제한하고자 의도되지 않는다.

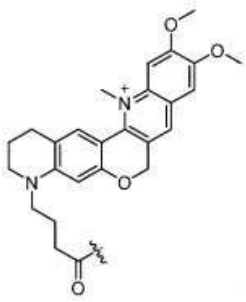
[0272] 실시예 1. iSeq™ 플랫폼에서 합성을 통한 시퀀싱에 사용되는 Pd 스캐빈저 화합물 A

[0273] 이 실험에서, Pd 스캐빈저(화합물 A)의 효율성은 절단 후 세척 용액에서 리포산을 사용하는 표준 SBS 실행에 대해 Illumina의 iSeq™에서 시험되었다. 온보드 iSeq™ 청색(~450 nm) 및 녹색(~520 nm) 여기 소스를 사용하는 2-여기/1-방출 SBS(또는 2Ex SBS)를 사용하여 시퀀싱을 수행하였다. PhiX는 시퀀싱 템플릿으로 사용되었다. 표준 재사용, 35초 혼입 및 Na_2PdCl_4 절단 혼합물을 사용한 10초 절단 시간을 포함하는 등온 60℃ 2Ex SBS 시퀀싱 레시피가 사용되었으며 RTA 데이터는 Illumina Sequencing Analysis 소프트웨어를 사용하여 분석되었다. 화

합물 A를 다양한 농도(0.5 mM, 1 mM, 2 mM 및 10 mM)로 혼입 혼합물(IMX)에 첨가하였다. 혼입 혼합물의 추가 구성 요소는 하기를 포함한다: (1) ffC-db-AOM-AOL-Dye 1, ffA-db-AOM-AOL-Dye 2, ffT-db-AOM-AOL-NR550S0 및 pppG-AOM(어두운 G)을 포함하는 뉴클레오티드 세트; (2) DNA 폴리머라제 폴리 1901; 및 (3) 글리신 완충제. Pd 스캐빈저로서 리포산을 사용한 시퀀싱 실행의 경우 두 번의 절단 후 세척 단계를 수행하였다. 20 mM의 리포산은 첫 번째 절단 후 세척 용액에 있었고, 10 mM L-시스테인을 포함하는 두 번째 절단 후 세척 용액을 사용하여 다음 사이클 전에 남은 리포산과 불활성 Pd(II)를 세척하였다. Pd(0) 스캐빈저로서 화합물 A를 사용한 시퀀싱 실행의 경우, 리포산 함유 첫 번째 절단 후 세척 용액을 L-시스테인 함유 두 번째 절단 후 세척 용액으로 대체하여 시퀀싱 실행에서 시약의 수를 줄였다. 염료 1은 ffC와 컨쥬게이트되는 경우에 구조 모이어티



을 갖는 미국 특허출원공개 US 2018/0094140호에 개시된 쿠마린 염료이다. 염료 2는 참조로 포함되는 미국 특허 제17/550271호에 개시된 크로메노퀴놀린 염료이며, ffA와 컨쥬게이트될 때 구조 모이어티

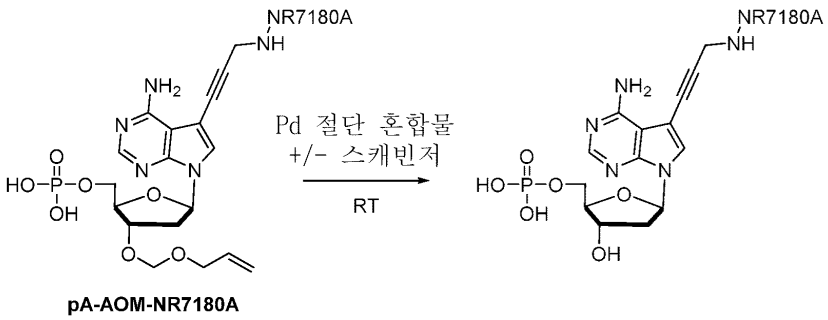


을 갖는다. NR550S0은 참고로 포함된 국제공개 WO2014/135221 A1호에 개시된 공지된 녹색 염료이다.

[0274] 도 1에 도시된 바와 같이, 절단 후 세척 완충액에 리포산을 사용하지 않은 경우, 프리페이징 값이 훨씬 더 높았다. 혼합 혼합물에 화합물 A를 첨가하면 프리페이징을 개선할 수 있었다. 2 mM 또는 10 mM 화합물 A가 혼입 혼합물에 사용된 경우, 프리페이징 값은 첫 번째 절단 후 세척 단계에서 리포산이 사용된 표준 시퀀싱 실행과 유사했다.

[0275] 실시예 2. 다양한 Pd 스캐빈저의 동역학적 평가

[0276] 이 실험은 표준 기질(pA-AOM-NR7180A)과 경쟁할 때 Pd 스캐빈저의 억제 능력을 평가하기 위한 목적으로 수행되었다.



pA-AOM-NR7180A

[0277]

[0278] 스캐빈저 후보는 표준 완충 용액(용해도에 따라 100 내지 25 mM)으로 구성되었으며 pH 9.1±0.75로 조정되었다. Eppendorf 튜브에 H_2O(148.8 μL), 2 M DEEA(20 μL, pH 9.4), 스캐빈저 스톡 용액(스톡 농도에 따라 40 내지 160 μL), NaCl, EDTA, Tris 및 Tween-20을 함유하는 완충 용액(스캐빈저 스톡 농도에 따라 0 내지 120 μL), 0.76 mM pA-AOM-NR7180A(51.2 μL)를 첨가하였다. 마지막으로, 10 mM [알릴$PdCl]_2$ 절단 믹스(20 μL)를 첨가하여 반응을 시작하였다. 각 반응 혼합물의 총 부피는 400 μL였고, 조성은 0.1 M DEEA, 10 mM 스캐빈저, 0.1 mM pA-AOM-NR7180A 및 1 mM Pd였다. 각 시점마다, 40 μL의 용액을 EDTA/H_2O_2(0.25:0.25 M)의 1:1 혼합물 10 μL로 즉시 켄칭하고 3'OH-pA-NR7180A에서 pA-AOM-NR7180A의 전환을 UPLC로 분석했다. NR7180은 그 전문이 참고

로 포함되는 미국 특허 제8754244호에 개시된 공지된 로다민 염료이다.

[0279] 도 2a 및 도 2b에 도시된 바와 같이, 화합물 A, B 및 C는 리포산과 비교하여 Pd(0) 종에 대한 유사한 효율적인 억제를 보여 전환율을 4% 이하로 제한했다.

[0280] 실시예 3. iSeq™ 플랫폼에서 합성을 통한 시퀀싱에 사용되는 Pd 스캐빈저 화합물 B 및 C

[0281] 이 실험에서, 2개의 Pd 스캐빈저(화합물 B 및 화합물 C)의 효율성은 상기 실시예 1에 설명된 유사한 조건에 따라 절단 후 세척 용액에서 리포산을 사용하는 표준 SBS 실행에 대해 Illumina의 iSeq™에서 시험되었다. 시퀀싱 레시피는 69℃ 등온, 재사용 없음, 혼입 시간 24초 및 절단 시간 5.8초를 사용하여 약간 상이하였다. 화합물 B 또는 C를 혼입 혼합물에 2 mM로 첨가하였다. 혼입 혼합물의 추가 구성 요소는 하기를 포함한다: (1) ffC-db-AOM-AOL-Dye 1, ffA-db-AOM-AOL-Dye 2, ffT-db-AOM-AOL-NR550S0 및 pppG-AOM(어두운 G)을 포함하는 뉴클레오티드 세트; (2) DNA 폴리머라제 폴리 1901; 및 (3) 글리신 완충제. 리포산을 사용한 시퀀싱 실행의 경우 두 번의 절단 후 세척 단계를 수행하였다. 20 mM의 리포산은 첫 번째 절단 후 세척 용액에 있었고, 10 mM L-시스테인을 포함하는 두 번째 절단 후 세척 용액을 사용하여 다음 사이클 전에 남은 리포산과 Pd(II)를 세척하였다. Pd(0) 스캐빈저로서 화합물 B 또는 C를 사용한 시퀀싱 실행의 경우, 리포산 함유 첫 번째 절단 후 세척 용액을 L-시스테인 함유 두 번째 절단 후 세척 용액으로 대체하여 시퀀싱 실행에서 시약의 수를 줄였다.

[0282] 도 3에 도시된 바와 같이, 혼입 혼합물에 화합물 B 또는 화합물 C를 첨가하는 것은 표준 절단 후 세척 단계(리포산을 함유하는 제1 세척 용액, L-시스테인을 함유하는 제2 세척 용액)를 사용하는 것과 비교하여 프리페이징 측정기준을 개선할 수 있었다.

[0283] IMX에서 L-시스테인의 상용성을 시험하기 위해 Pd 스캐빈저 화합물 B 또는 C를 함유하는 혼입 혼합물에 5 mM L-시스테인을 첨가하여 추가 실험을 수행하였다. 또한, 두 가지 시퀀싱 레시피가 사용되었다: 혼합 시간 24초 또는 19초, 69℃ 등온, 재사용 없음, 및 $[알릴PdCl]_2$ 절단 혼합물 사용 시 절단 시간 6초. 화합물 B 또는 C를 혼입 혼합물에 2 mM로 첨가하였다. 혼입 혼합물의 추가 구성 요소는 하기를 포함한다: (1) ffC-db-AOM-AOL-Dye 1, ffA-db-AOM-AOL-Dye 2, ffT-db-AOM-AOL-NR550S0 및 pppG-AOM(어두운 G)을 포함하는 뉴클레오티드 세트; (2) DNA 폴리머라제 폴리 1901; 및 (3) 글리신 완충제. 절단 후 세척 프로토콜은 다음과 같았다: (i) 20 mM 리포산을 함유한 제1 세척 용액 및 10 mM L-시스테인을 함유한 제2 세척 용액; (ii) 10 mM L-시스테인을 함유한 세척 용액 2회; (iii) 및 (iv) L-시스테인을 함유하지 않는 다른 시퀀싱 단계(예컨대 클러스터링 및 쌍 말단 판독)에 사용되는 표준 완충액(수용액은 Tris, NaCl, EDTA 및 Tween-20을 함유함).

[0284] 도 4에 도시된 바와 같이, 혼입 혼합물 중 스캐빈저는 모두 표준 레시피보다 낮은 페이징을 제공하는 것으로 관찰되었다. 예상대로 19초 혼입 시간이 짧아지면서 ER%가 증가하고 페이징이 크게 증가했다. 혼입 믹스에 L-시스테인을 추가하면 표준 레시피에서 생성된 값과 유사한 프리페이징 값을 제공할 수 있었다. 혼입 혼합물에 L-시스테인을 추가하는 주요 이점은 별도의 세척 후 시약/키트를 개발할 필요가 없다는 것이다. 다른 시퀀싱 단계(예컨대 클러스터링 및 쌍 말단 판독)에 사용되는 표준 완충 용액을 절단 후 세척 용액으로 사용할 수 있다. 뿐만 아니라, 시퀀싱 실험에서는 Pd 스캐빈저와 혼입 혼합물의 다른 성분 사이의 부정적인 상호작용에 대한 어떠한 증거도 보여주지 않았다.

[0285] 프리페이징을 줄이는 것 외에도 혼입 혼합물에 이러한 스캐빈저를 포함하면 카트리지 및 유체 교차 오염과 관련된 프리페이징 증가 위험을 억제할 수 있는 잠재력이 있다.

[0286] 실시예 4. iSeq™ 플랫폼에서 합성을 통한 시퀀싱에 사용되는 Pd 스캐빈저 화합물 O

[0287] Pd(0) 스캐빈저 디알릴디메틸암모늄 클로라이드 또는 DADMAC(화합물 O)의 효율성은 이전에 시험된 Pd 스캐빈저 N-Boc 티로신(알릴)-OH(화합물 B)에 대해 Illumina의 iSeq™에서 시험되었다. 온보드 iSeq 청색(~450 nm) 및 녹색(~520 nm) 여기 소스를 사용하는 2-여기/1-방출 SBS(또는 2Ex SBS)를 사용하여 시퀀싱을 수행하였다. 100 pM의 PhiX가 시퀀싱 템플릿으로 사용되었다. 표준 재사용, 25초 혼입 및 Na2PdCl4 절단 혼합물을 사용한 6초 절단 시간을 포함하는 등온 65℃ 2Ex SBS 시퀀싱 레시피가 사용되었다. RTA 데이터는 Telescope를 사용하여 분석되었다.

[0288] 화합물 B 또는 화합물 O를 각각 2 mM 및 0.5 mM로 혼입 혼합물(IMX)에 첨가하였다. 혼입 혼합물의 추가 구성 요소는 하기를 포함한다: (1) ffC-db-AOM-AOL-Dye 1, ffA-db-AOM-AOL-Dye 2, ffT-db-AOM-AOL-NR550S0 및 pppG-AOM(어두운 G)을 포함하는 뉴클레오티드 세트; (2) DNA 폴리머라제 폴리 1901; 및 (3) 글리신 완충제. 소듐 티오설페이트를 절단 후 세척 완충액에 10 mM 최종 농도로 첨가했다.

[0289] 도 5에 도시된 바와 같이, 0.5 mM의 화합물 0 또는 2 mM의 화합물 B를 혼입 혼합물에 첨가하면 SBS 실행에서 유사한 프리페이징 값이 제공되었다.

[0290] 실시예 5. iSeq™ 플랫폼에서 합성을 통한 시퀀싱에 사용되는 Pd 스캐빈저 소듐 티오설페이트

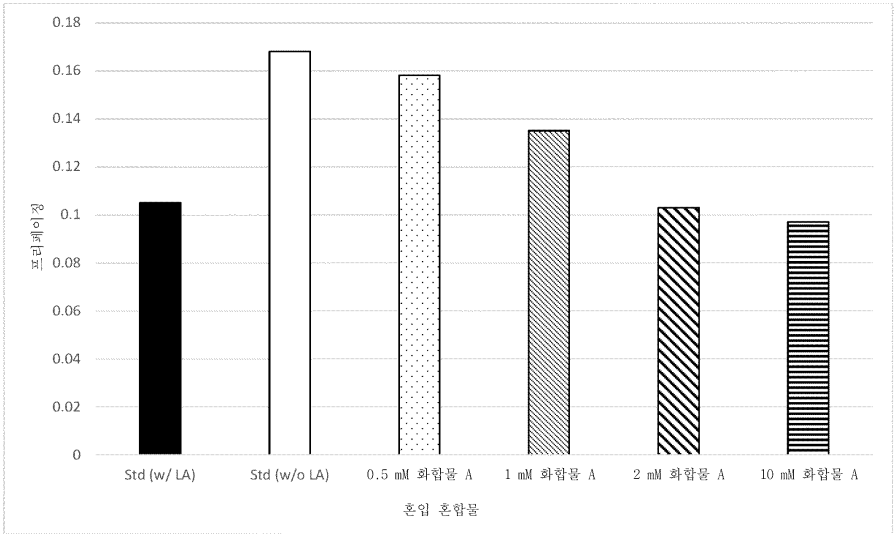
[0291] Pd(II) 스캐빈저 소듐 티오설페이트의 효율성은 동일한 농도에서 이전에 시험된 Pd(II) 스캐빈저 L-시스테인에 대해 Illumina의 iSeq™에서 시험되었다. 온보드 iSeq 청색(~450 nm) 및 녹색(~520 nm) 여기 소스를 사용하는 2-여기/1-방출 SBS(또는 2Ex SBS)를 사용하여 시퀀싱을 수행하였다. 100 pM의 PhiX가 시퀀싱 템플릿으로 사용되었다. 표준 재사용, 25초 혼입 및 Na_2PdCl_4 절단 혼합물을 사용한 14초 절단 시간을 포함하는 등온 65℃ 2Ex SBS 시퀀싱 레시피가 사용되었다. RTA 데이터는 Telescope를 사용하여 분석되었다.

[0292] Pd(0) 스캐빈저 화합물 B를 혼입 혼합물(IMX)에 2 mM로 첨가하였다. 혼입 혼합물의 추가 구성 요소는 하기를 포함한다: (1) ffC-db-AOM-AOL-Dye 1, ffA-db-AOM-AOL-Dye 2, ffT-db-AOM-AOL-NR550SO 및 pppG-AOM(어두운 G)을 포함하는 뉴클레오티드 세트; (2) DNA 폴리머라제 폴리 1901; 및 (3) 글리신 완충제. 절단 후 세척 완충액에 10 mM 최종 농도로 소듐 티오설페이트 또는 L-시스테인 중 하나를 첨가하거나 아무것도 첨가하지 않았다.

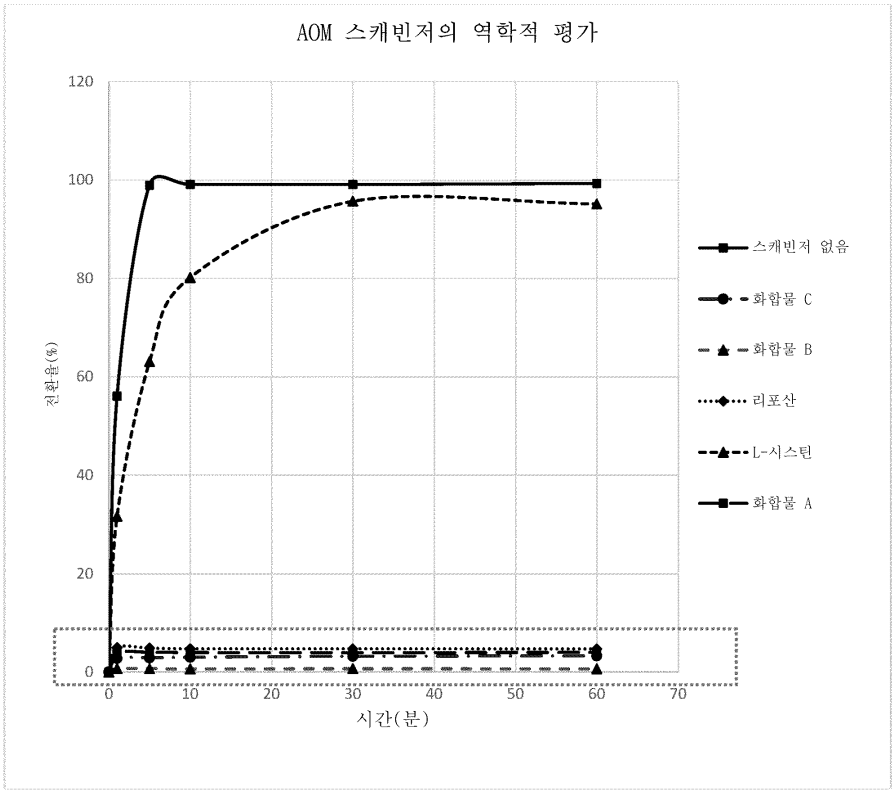
[0293] 도 6에 도시된 바와 같이, 절단 후 세척 완충액에 Pd(II) 스캐빈저를 사용하지 않은 경우 페이징 값이 훨씬 더 높았다. 세척 완충액에 L-시스테인 또는 소듐 티오설페이트를 첨가하면 페이징을 개선할 수 있었다.

도면

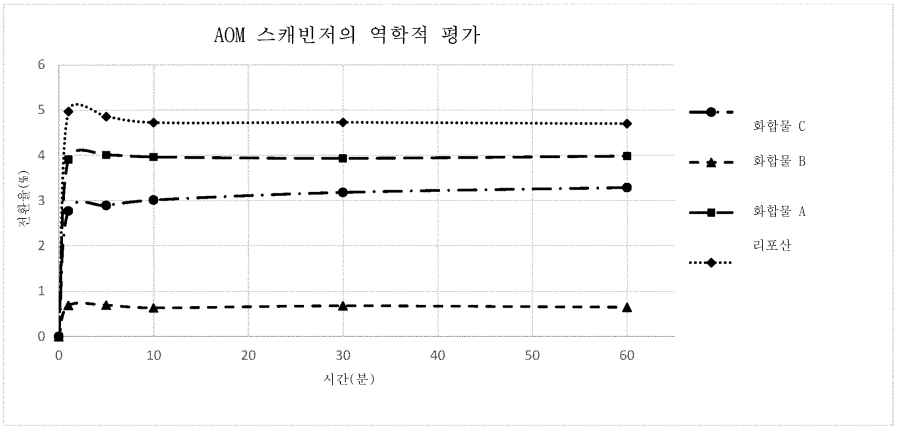
도면1



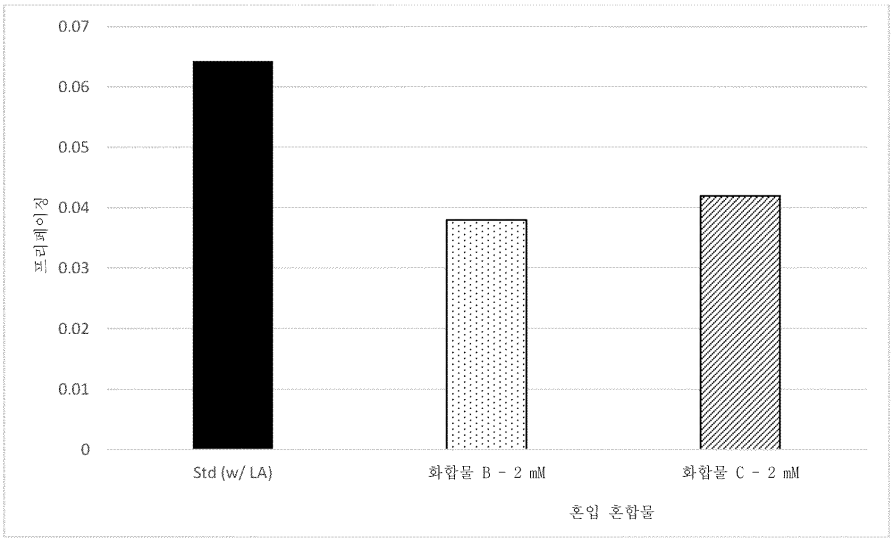
도면2a


AOM 스캐빈저의 역학적 평가
120
100
80
60
40
20
0
전환율(%)
0
10
20
30
40
50
60
70
시간(분)
스캐빈저 없음
화합물 C
화합물 B
리포산
L-시스틴
화합물 A

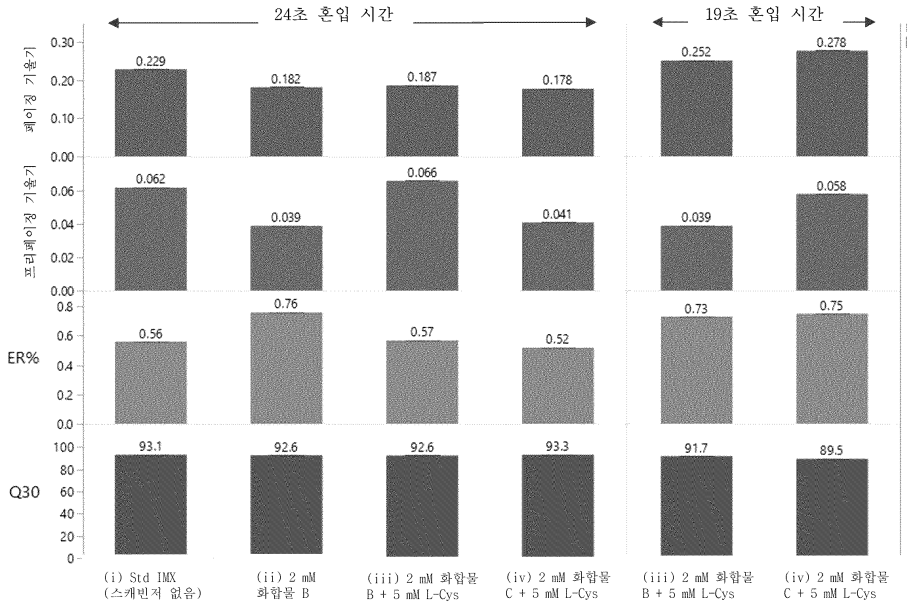
도면2b


AOM 스캐빈저의 역학적 평가
6
5
4
3
2
1
0
전환율(%)
0
10
20
30
40
50
60
시간(분)
화합물 C
화합물 B
화합물 A
리포산

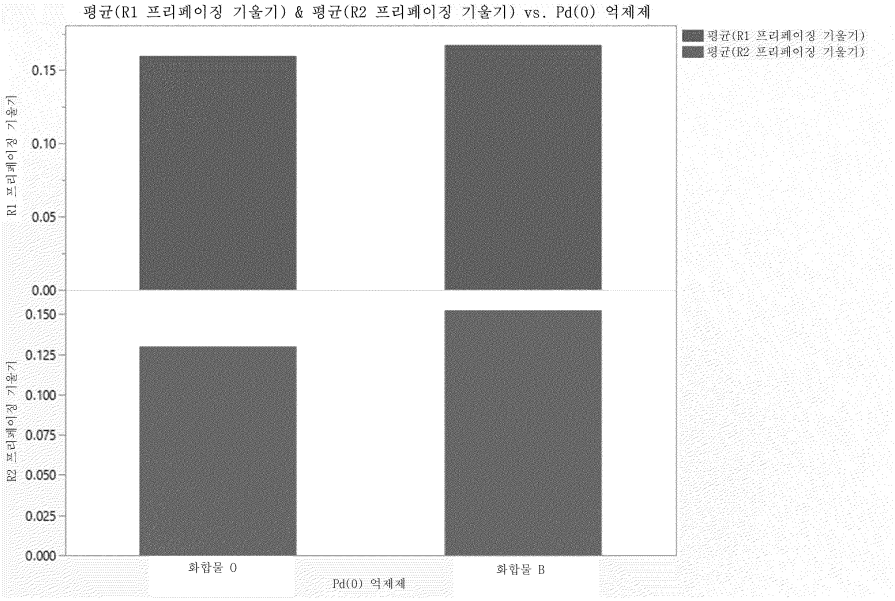
도면3


0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
프리페이징
Std (w/ LA)
화합물 B - 2 mM
화합물 C - 2 mM
혼입 혼합물

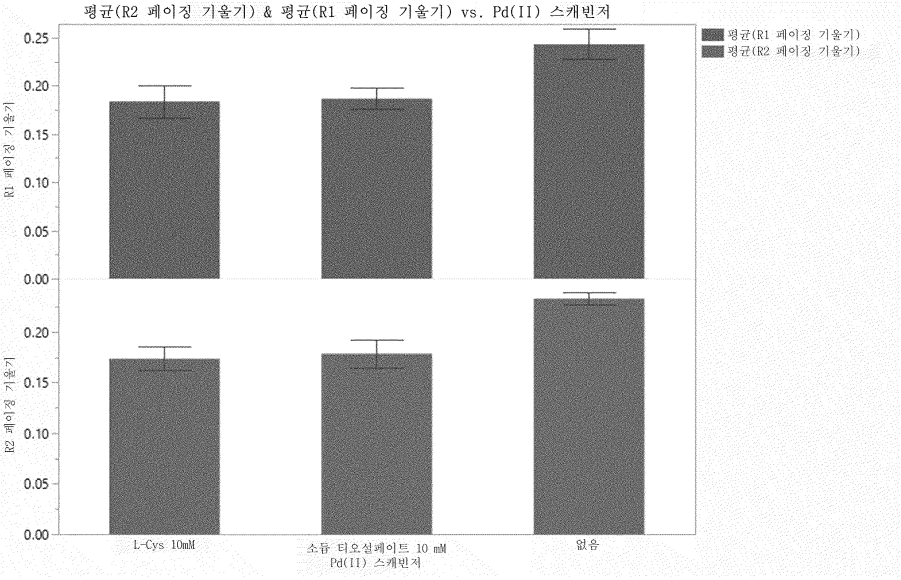
도면4


24초 혼입 시간
19초 혼입 시간
페이징 기울기
프리페이징 기울기
ER%
Q30
0.229
0.182
0.187
0.178
0.252
0.278
0.062
0.039
0.066
0.041
0.039
0.058
0.56
0.76
0.57
0.52
0.73
0.75
93.1
92.6
92.6
93.3
91.7
89.5
(i) Std IMX (스캐빈저 없음)
(ii) 2 mM 화합물 B
(iii) 2 mM 화합물 B + 5 mM L-Cys
(iv) 2 mM 화합물 C + 5 mM L-Cys
(iii) 2 mM 화합물 B + 5 mM L-Cys
(iv) 2 mM 화합물 C + 5 mM L-Cys

도면5


평균(R1 프리페이징 기울기) & 평균(R2 프리페이징 기울기) vs. Pd(0) 억제제
평균(R1 프리페이징 기울기)
평균(R2 프리페이징 기울기)
R1 프리페이징 기울기
0.15
0.10
0.05
0.00
R2 프리페이징 기울기
0.150
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
화합물 0
화합물 B
Pd(0) 억제제

도면6


평균(R2 페이징 기울기) & 평균(R1 페이징 기울기) vs. Pd(II) 스캐빈저
평균(R1 페이징 기울기)
평균(R2 페이징 기울기)
R1 페이징 기울기
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
R2 페이징 기울기
L-Cys 10mM
소듐 티오설페이트 10 mM
없음
Pd(II) 스캐빈저