



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월22일

(11) 등록번호 10-2582172

(24) 등록일자 2023년09월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09K 11/06 (2006.01) *C07D 417/04* (2006.01)
C07D 491/04 (2006.01) *C12Q 1/6869* (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C09K 11/06 (2022.01)
C07D 417/04 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7041740(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년09월29일
 심사청구일자 2022년11월28일
- (85) 번역문제출일자 2022년11월28일
- (65) 공개번호 10-2022-0160714
- (43) 공개일자 2022년12월06일
- (62) 원출원 특허 10-2018-7037385
 원출원일자(국제) 2017년09월29일
 심사청구일자 2020년07월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/074880
- (87) 국제공개번호 WO 2018/060482
 국제공개일자 2018년04월05일
- (30) 우선권주장
 62/402,635 2016년09월30일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2000050525 A1*
 US04035740 A*
 STN REGISTRY, CAS No.
 343612-35-1(2011.06.27.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

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

전체 청구항 수 : 총 13 항

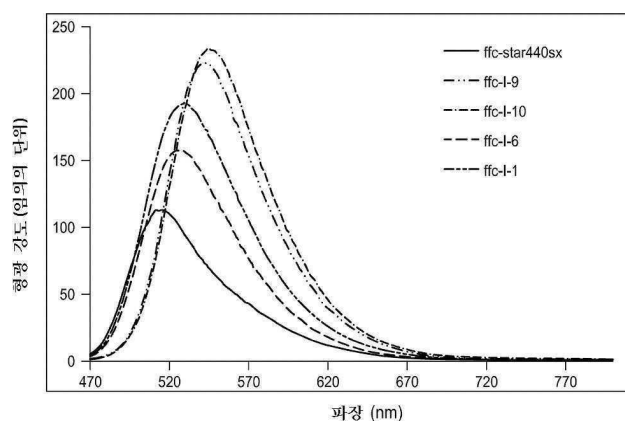
심사관 : 김영국

(54) 발명의 명칭 신규한 형광 염료 및 바이오마커로서의 이의 용도

(57) 요약

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

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07D 491/04 (2013.01)

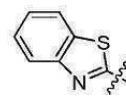
C12Q 1/6869 (2018.05)

C12Q 2563/107 (2013.01)

또는 올리고뉴클레오타이드.

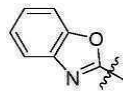
청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, R^{Het} 은 하나 이상의 R^5 로 선택적으로 치환된



구조를 갖는 2-벤조티아

졸릴 또는 하나 이상의 R^5 로 선택적으로 치환된



구조를 갖는 2-벤조사졸릴인, 표지된 뉴클레오타이드

또는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화합물은 $-C(=O)R$ 을 통해 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되고, 여기서 R 은 $-OR^7$ 인, 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화합물은 $-C(=O)R$ 을 통해 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되고, 여기서 R 은 $-NR^8R^9$ 인, 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화합물은 링커 모이어티를 통해 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-데아자 퓨린 염기의 C7 위치에 부착되는, 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 리보스 또는 데옥시리보스 당에 공유적으로 부착된 3'-OH 차단기를 추가로 포함하는, 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 10

하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 키트로서, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 제1항 또는 제2항에 따른 표지된 뉴클레오타이드인, 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 2개 이상의 표지된 뉴클레오타이드를 포함하는, 키트.

청구항 12

제10항에 있어서, 제3 및 제4 뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 제2, 제3 및 제4 뉴클레오타이드 각각은 상이한 화합물로 표지되고, 각각의 화합물은 구별되는 최대 흡광도를 갖고, 각각의 화합물은 다른 화합물과 구별가능한 것인, 키트.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 따른 표지된 뉴클레오타이드를 시퀀싱 분석에 통합하고 뉴클레오타이드를 검출하는 것을 포함하는, 시퀀싱 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 시퀀싱 분석은 자동화된 시퀀싱 기기에서 수행되고, 상기 자동화된 시퀀싱 기기는 상이한 파장에서 작동하는 2개의 광원을 포함하는 것인, 시퀀싱 방법.

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 임의의 우선권 출원에 대한 편입
- [0002] 본 출원은 2016년 9월 30일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/402635호(발명의 명칭: New Fluorescent Dyes and Their Uses as Biomarkers)의 유익을 주장하며, 이 기초출원은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함된다.
- [0003] 기술분야
- [0004] 본 출원은 형광 염료로서 사용하기 위한 신규한 벤조피란 유도체에 관한 것이다. 상기 화합물은, 특히 핵산 서열분석 용도에서 뉴클레오타이드 표지를 위한 형광 표지로서 사용될 수 있다.

배경 기술

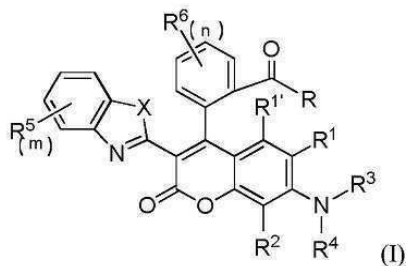
- [0005] 형광 표지를 이용하는 핵산의 비방사성 검출은 분자 생물학에서 중요한 기술이다. 이전에 재조합 DNA 기법에서 사용된 다수의 절차는, 예를 들어 ³²P로 방사성 표지된 뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 사용에 크게 의존하였다. 방사성 화합물은 핵산 및 관심 대상의 다른 분자의 민감한 검출을 허용한다. 그러나, 방사성 동위원소의 사용에서, 그들의 비용, 제한된 보관수명 및 더 중요하게는 안전성 고려와 같은 심각한 제한이 있다. 방사성 표지에 대한 필요 제한은 안전성을 향상시키는 한편, 예를 들어, 시약 처분과 관련된 환경적 영향 및 비용을 감소시킨다. 비방사성 형광 검출로 처리할 수 있는 방법은 비제한적 예로서, 자동화 DNA 서열분석, 혼성화 방법, 중합효소 연쇄 반응 산물의 실시간 검출 및 면역분석을 포함한다.
- [0006] 다수의 적용을 위해, 복수의 공간적으로 중복되는 분석물의 독립적 검출을 달성하기 위해 다중 스펙트럼으로 구별 가능한 형광 표지를 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 다중복합 방법에서, 반응 용기의 수는 실험 프로토콜을 단순화시키고 적용분야-특이적 시약 키트의 생산을 용이하도록 감소될 수 있다. 다색 자동화 DNA 서열분석 시스템에서, 예를 들어, 다중 형광 검출은 단일 전기영동 레인에서 다중 뉴클레오타이드 염기의 분석을 허용함으로써, 단색 방법 이상으로 처리량을 증가시키며, 레인내 전기영동 이동도 변화와 관련된 불확실성을 감소시킨다.
- [0007] 그러나, 다중 형광 검출은 문제가 될 수 있으며, 형광 표지의 선택을 제한하는 다수의 중요한 인자가 있다. 첫째로, 흡수 및 방출 스펙트럼이 적합하게 스펙트럼으로 분해되는 염료 화합물을 발견하는 것이 어렵다. 추가로, 몇몇 형광 염료가 함께 사용될 때, 상이한 스펙트럼 영역에 대한 염료의 흡수 밴드는 보통 크게 분리되기 때문에 동시에 여기는 어려울 수 있다. 다수의 여기 방법은 고출력 레이저를 사용하며, 따라서, 염료는 이러한 레이저 여기를 견뎌내는 충분한 광안정성을 가져야 한다. 분자 생물학 방법에서 특정 중요성의 최종 고려사항은 형광 염료가 사용되는 시약 화학물질, 예를 들어, DNA 합성 용매 및 시약, 완충제, 중합효소 및 리가제 효소에 적합하여야 한다는 것이다.
- [0008] 서열분석 기법이 진보함에 따라, 상기 오염물질 모두를 충족시키며 특히 고속 대량 분자 방법, 예컨대 고체상 서열분석 등을 처리할 수 있는 추가적인 형광 염료 화합물, 그들의 핵산 접합체 및 염료 세트에 대한 필요가 개발되었다.
- [0009] 국제 특허 출원 공개 WO 2007/135368은 형광 표지로서 사용하기에 적합한 로다민 화합물의 부류를 기재한다. 거기에 기재된 화합물은 고체상 핵산 서열분석 프로토콜에서 사용하기에 적합하다. 고체상 핵산 서열분석의 기법 및 처리량에서의 진보는 특히 형광 시약과 특정 핵산 서열 사이의 상호작용과 관련하여 형광 표지의 분자 설계에 대한 추가적인 개발 및 개선을 야기하였다.
- [0010] 개선된 형광 특성(예컨대 스토크스 이동(Stokes shift), 형광 강도, 형광 최대값의 위치 및 형광 밴드의 형상)을 갖는 형광 염료 분자는 핵산 서열분석의 속도 및 정확도를 개선시킬 수 있다. 스토크스 이동은 생물학적 적용에서의 형광 신호 동정에서 중요한 양상이다. 예를 들어, 방출광의 검출은 서로 매우 근접한(즉, 작은 스토크스

스 이동) 흡수 및 형광 최대값을 갖는 형광단을 이용할 때 여기광과 구별하는 것이 어려울 수 있는데, 여기 및 방출 파장 밴드가 크게 중복되기 때문이다. 대조적으로, 큰 스토크스 이동을 갖는 형광단은 여기와 방출 파장 사이의 더 큰 분리 때문에 구별하는 것이 용이하다. 스토크스 이동은 다중복합 형광 적용에서 특히 중요한데, 형광단의 방출 파장이 중복되고, 따라서 동일한 샘플에서 다른 형광단을 여기시킬 수 있기 때문이다. 추가로, 대부분의 염료의 형광은 이러한 조건에서 상당히 더 낮기 때문에, 형광 신호 강도는 측정이 수계 생물학적 완충제에서 그리고/또는 고온에서 이루어질 때 특히 중요하다. 게다가, 염료가 부착되는 염기의 특성은 또한 형광 최대값, 형광 강도 및 다른 스펙트럼 염료 특성에 영향을 미친다. 형광 염료와 핵염기 사이의 서열 특이적 상호작용은 형광 염료의 특정 설계에 의해 맞춤될 수 있다. 형광 염료 구조의 최적화는 그들의 형광 특성을 개선시키고, 또한 뉴클레오타이드 혼입의 효율을 개선시키며, 서열분석 오류 수준을 감소시키고, 핵산 서열분석의 용도 및 그에 따른 비용을 감소시킨다.

[0011] 본 명세서에서 신규한 벤조피란 유도체 및 생체분자 표지로서, 특히 핵산 서열분석에서 사용되는 뉴클레오타이드에 대한 표지로서 그들의 용도가 기재된다. 생체 분자 접합체로서 제조될 때 이러한 염료의 더 큰 스토크스 이동에서 그리고 새로운 형광 화합물을 이용하여 얻을 수 있는 서열분석 판독의 길이, 강도 및 품질에서의 개선을 알 수 있다.

발명의 내용

[0012] 본 명세서에 기재된 일부 실시형태는 화학식 (I)의 신규한 벤조피란 유도체 또는 이의 메소메리 형태(mesomeric form)에 관한 것이다:



[0013]

[0014] 식 중, 각각의 R^1 , R^2 및 $R^{1'}$ 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 아미노설포닐, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설포닐, 설포, 설피노, 설포산염, 설포닐 할로겐화물, S-설포아미도, N-설포아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0015] 대안적으로, R^1 과 $R^{1'}$ 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하며;

[0016] 각각의 R^3 및 R^4 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설포닐 하이드록사이드, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0017] 대안적으로, R^1 과 R^3 은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 또는 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하며;

[0018] 대안적으로, R^2 와 R^4 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하고;

[0019] R^5 및 R^6 은 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 아미노설포닐, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설포닐, 설포, 설피노, 설포산염, 설포닐 할로겐화물, S-설포아미도, N-설포아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치

환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0020] R은 $-OR^7$ 또는 $-NR^8R^9$ 로부터 선택되고;

[0021] R^7 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0022] 각각의 R^8 및 R^9 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 카복시알킬, 설포네이트알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설포, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0023] X는 O, S, NR^{10} 및 Se로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0024] R^{10} 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0025] m은 0 내지 4의 정수이며; 그리고

[0026] n은 0 내지 4의 정수이고; 단,

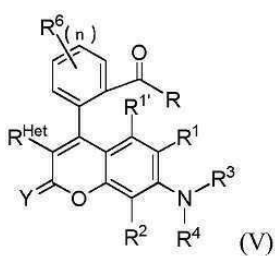
[0027] 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 가 H이며; 각각의 R^3 및 R^4 가 에틸이고; 각각의 m 및 n이 0이며; R이 $-NHCH(CH_3)CH_2OH$ 일 때; X는 O, S 또는 Se로부터 선택되고;

[0028] 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 가 H이며; 각각의 R^3 및 R^4 가 에틸이고; 각각의 m 및 n이 0이며; R이 $-OH$ 일 때; X는 S 또는 Se로부터 선택되고;

[0029] 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 가 H이고; 각각의 R^3 및 R^4 가 에틸이며; m이 1이고, R^5 가 메틸이며; n은 0이고; R은 $-OH$ 또는 $-OEt$ 일 때; X는 S, NR^{10} 또는 Se로부터 선택되고; 그리고

[0030] 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 가 H이고; 각각의 R^3 및 R^4 가 에틸이며; m이 1이고 R^5 가 $-S(O_2)Et$ 이고; n은 0이며; R은 $-OH$ 또는 $-OEt$ 일 때; X는 S, NR^{10} 또는 Se로부터 선택된다.

[0031] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 약 60nm 내지 약 100nm 범위의 스토크스 이동을 갖는 하기 화학식 (V)의 형광 화합물에 관한 것이다:



[0032]

[0033] 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 아미노설포닐, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설포닐, 설포, 설피노, 설포산염, 설포닐 할로겐화물, S-설포아미도, N-설포아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0034] 대안적으로, R^1 과 $R^{1'}$ 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하며;

[0035] 각각의 R^3 및 R^4 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설포

포, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0036] 대안적으로, R^1 과 R^3 은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 또는 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하며;

[0037] 대안적으로, R^2 와 R^4 은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하고;

[0038] R^{Het} 는 하나 이상의 R^5 로 선택적으로 치환되는 헤테로아릴이며;

[0039] 각각의 R^5 및 R^6 은 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 아미노설폰일, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설폰일, 설포, 설피노, 설폰산염, 설폰일 할로겐화물, S-설폰아미도, N-설폰아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0040] R은 $-OR^7$ 또는 $-NR^8R^9$ 로부터 선택되며;

[0041] Y는 O 또는 NH로부터 선택되고;

[0042] R^7 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0043] 각각의 R^8 및 R^9 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 카복시알킬, 설포네이트알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설포, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 그리고

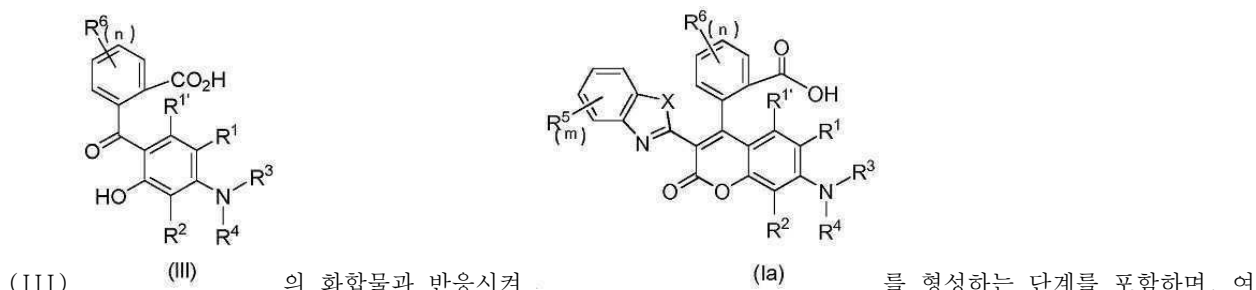
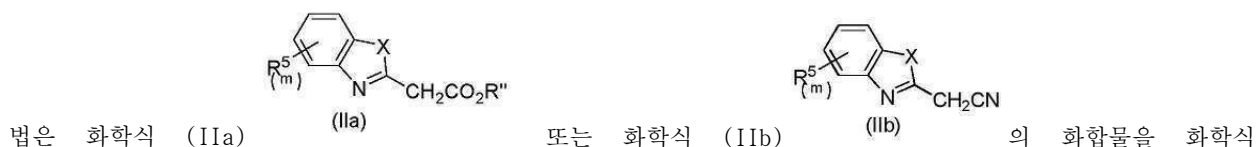
[0044] n은 0 내지 4의 정수이다.

[0045] 본 명세서에 기재된 일부 실시형태는 화학식 (I) 또는 (V)의 화합물로 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다.

[0046] 본 명세서에 기재된 일부 실시형태는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 함유하는 키트에 관한 것이며, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 형광 염료로 표지된 뉴클레오타이드이다.

[0047] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 서열분석에서 본 명세서에 기재된 표지된 뉴클레오타이드를 혼입시키는 단계, 및 표지된 뉴클레오타이드를 검출하는 단계를 포함하는, 서열분석 방법에 관한 것이다.

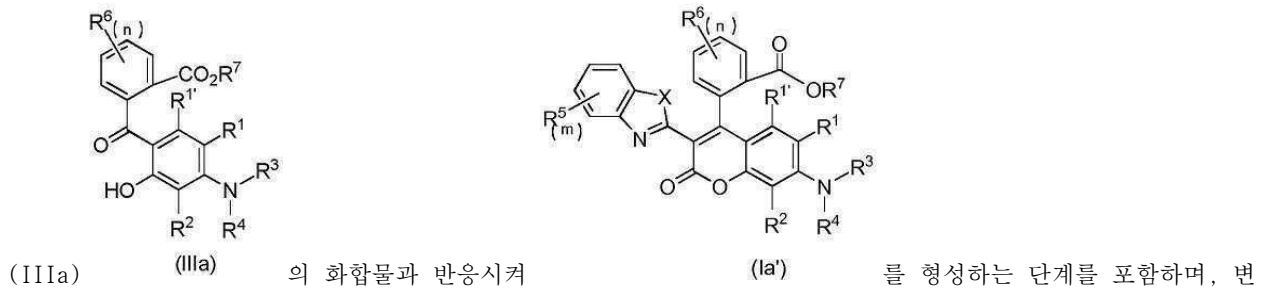
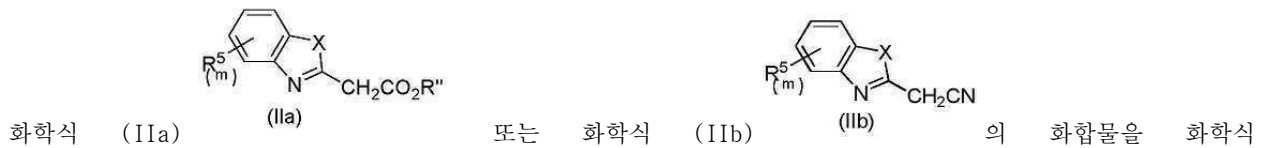
[0048] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 화학식 (Ia)의 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이며, 상기 방



기서, 변수 R^1 , $R^{1'}$, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , X, m 및 n은 화학식 (I)의 화합물의 개시내용에서 상기 정의되며, 그리고 R'' 는 H, 선택적으로 치환되는 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설포,

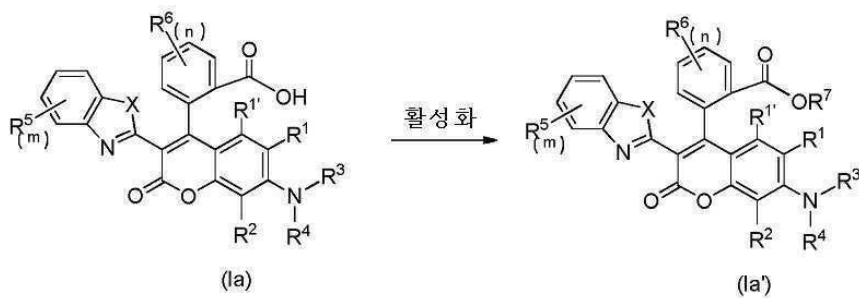
선택적으로 치환되는 아릴; 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0049] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 화학식 (Ia')의 화합물의 제조 방법에 관한 것이며, 상기 방법은



수 $R^1, R^{1'}, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, X, m$ 및 n 은 상기 정의된다.

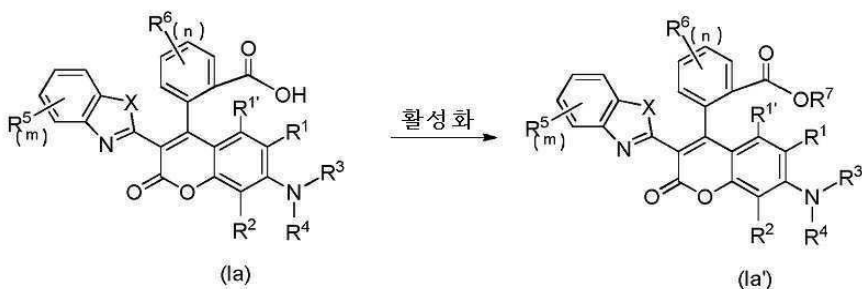
[0050] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 화학식 (Ia')의 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 카복실산 활성화를 통해 화학식 (Ia)의 화합물을 화학식 (Ia')의 화합물로 전환시키는 단계를 포함한다:



[0051]

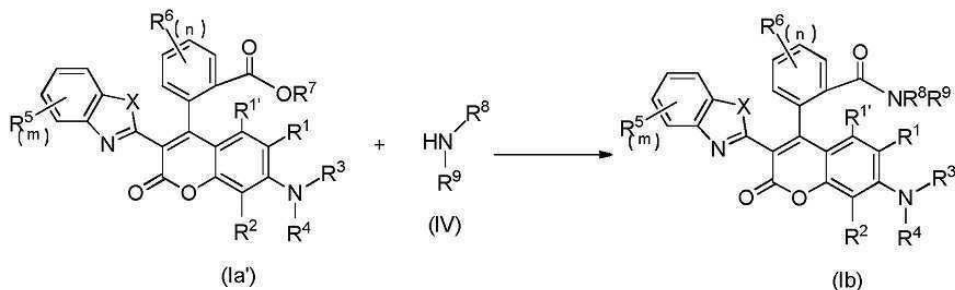
[0052] 여기서, 변수 $R^1, R^{1'}, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, X, m$ 및 n 은 화학식 (I)의 화합물의 개시내용에서 상기 정의된다.

[0053] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 화학식 (Ib)의 화합물의 제조 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 카복실산 활성화를 통해 화학식 (Ia)의 화합물을 화학식 (Ia')의 화합물로 전환시키는 단계:



[0054]

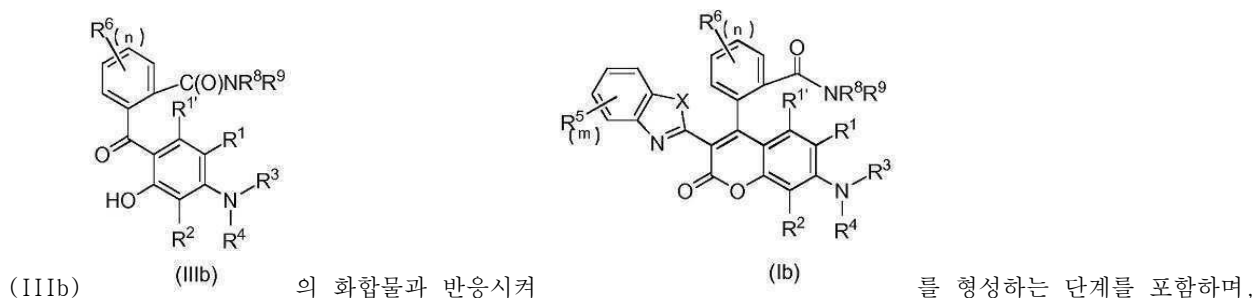
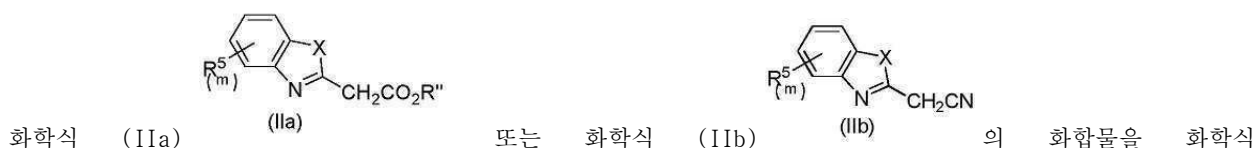
[0055] 화학식 (Ia')의 화합물을 화학식 (IV)의 1차 또는 2차 아민과 반응시키는 단계를 포함한다,



[0056]

[0057] 여기서, 변수 R¹, R^{1'}, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, X, m 및 n은 화학식 (I)의 화합물의 개시내용에서 상기 정의된다.

[0058] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 화학식 (Ib)의 화합물의 제조 방법에 관한 것이며, 상기 방법은



여기서 변수 R¹, R^{1'}, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, X, m 및 n은 상기 정의된다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 동일한 스펙트럼 영역에서 흡수가 있는 상업적 염료에 비교한 본 명세서에 기재된 바와 같은 벤조피란 형광 염료의 형광 스펙트럼을 도시하는 선 그래프를 도시한 도면.

도 2A 및 도 2B는 서열분석에 대해 본 명세서에 기재된 바와 같은(검정색으로 나타냄) 신규한 형광 염료로 표시된 C-뉴클레오타이드의 유용성을 도시하는 플롯을 도시한 도면.

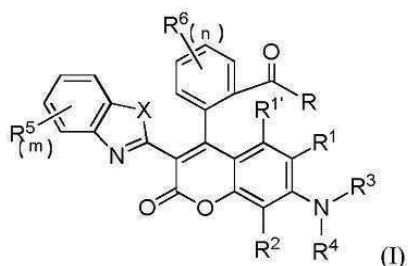
도 3은 이들 염료가 청색(460nm) 또는 녹색(530nm)광에 의해 여기될 때 본 명세서에 기재된 바와 같은 신규한 형광 염료로 표시된 C-뉴클레오타이드의 형광 강도를 도시하는 막대 그래프를 도시한 도면.

도 4는 두 상이한 온도에서의 상업적 온도에 비해 본 명세서에 기재된 바와 같은 신규한 형광 염료로 표시한 C-뉴클레오타이드의 형광 강도를 도시하는 막대 그래프를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 본 명세서에 기재된 실시형태는 형광 염료로서 사용하기 위한 화학식 (I) 또는 (V) 구조의 신규한 벤조피란 유도체에 관한 것이다. 이들 신규한 형광 염료는 더 큰 스토크스 이동을 가지고, 형광 표지로서, 특히, 핵산 서열 분석 용도에서 뉴클레오타이드 표지를 위해 사용될 수 있다. 이들 형광 염료의 제조 방법 및 이들 염료를 이용하는 하류의 서열분석 적용이 또한 예시된다.

[0061] 본 명세서에 기재된 일부 실시형태는 화학식 (I)의 신규한 벤조피란 유도체 또는 이의 메소메리 형태에 관한 것이다:



[0062]

[0063]

식 중, 각각의 R^1 , R^2 및 $R^{1'}$ 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 아미노설펜일, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, 설펜일 할로겐화물, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0064]

대안적으로, R^1 과 $R^{1'}$ 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하며;

[0065]

각각의 R^3 및 R^4 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설펜, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0066]

대안적으로, R^1 과 R^3 은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 또는 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하며;

[0067]

대안적으로, R^2 와 R^4 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하고;

[0068]

R^5 및 R^6 은 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 아미노설펜일, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염, 설펜일 할로겐화물, S-설펜아미도, N-설펜아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되며;

[0069]

R은 $-OR^7$ 또는 $-NR^8R^9$ 로부터 선택되고;

[0070]

R^7 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0071]

각각의 R^8 및 R^9 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 카복시알킬, 설펜네이트알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설펜, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0072]

X는 O, S, NR^{10} 및 Se로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0073]

R^{10} 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0074]

m은 0 내지 4의 정수이며; 그리고

[0075]

n은 0 내지 4의 정수이고; 단,

[0076]

각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 가 H이며; 각각의 R^3 및 R^4 가 에틸이고; 각각의 m 및 n이 0이며; R이 $-NHCH(CH_3)CH_2OH$ 일 때;

X는 O, S 또는 Se로부터 선택되고;

[0077] 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 가 H이며; 각각의 R^3 및 R^4 가 에틸이고; 각각의 m 및 n이 0이며; R이 -OH일 때; X는 S 또는 Se로부터 선택되고;

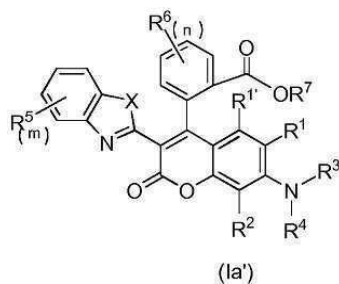
[0078] 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 가 H이고; 각각의 R^3 및 R^4 가 에틸이며; m이 1이고, R^5 가 메틸이며; n은 0이고; R은 -OH 또는 -OEt일 때; X는 S, NR^{10} 또는 Se로부터 선택되고; 그리고

[0079] 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 가 H이고; 각각의 R^3 및 R^4 가 에틸이며; m이 1이고 R^5 가 $-S(O_2)Et$ 이고; n은 0이며; R은 -OH 또는 -OEt일 때; X는 S, NR^{10} 또는 Se로부터 선택된다.

[0080] 화학식 (I)의 화합물의 일부 실시형태에서, 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 이 H이고; 각각의 R^3 및 R^4 가 에틸이며; m이 1이고; R^5 가 Cl일 때; X는 S, O 또는 Se로부터 선택되고, 바람직하게는 O이다.

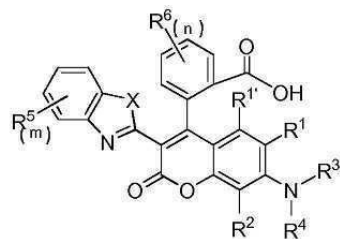
[0081] 화학식 (I)의 화합물의 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시되는 선택적으로 치환되는 아릴은 선택적으로 치환되는 C_{6-10} 아릴, 예를 들어, 페닐이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시되는 선택적으로 치환되는 헤테로아릴은 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴; 더 바람직하게는, 선택적으로 치환되는 5 내지 6원 헤테로아릴이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시되는 선택적으로 치환되는 카보사이클릴은 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 카보사이클릴, 특히, 3 내지 7원 사이클로알킬이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시되는 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴은 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴, 더 바람직하게는 5 내지 6원 헤테로사이클릴이다.

[0082] 화학식 (I)의 화합물의 일부 실시형태에서, R은 $-OR^7$ 이고, 화학식 (I)의 화합물은 또한 화학식 (Ia'):



(Ia')

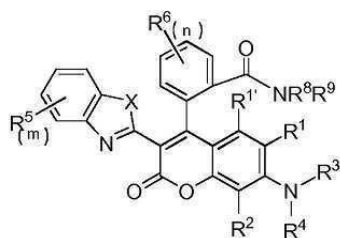
로 나타낸다. 일 실시형태에서, R^7 은 H이고, 화학식 (I)의 화합물은 또한 하기 화



(Ia)

학식 (Ia)로 나타낸다:

[0083] 화학식 (I)의 화합물의 일부 실시형태에서, R은 $-NR^8R^9$ 이고, 화학식 (I)의 화합물은 또한 하기 화학식 (Ib)로 나



(Ib)

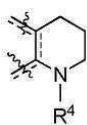
타낸다: . 일 실시형태에서, 각각의 R^8 및 R^9 는 H이다. 일부 다른 실시형태에서, R^8 은 H이고 R^9 는 치환된 알킬이다. 일부 추가 실시형태에서, R^8 과 R^9 는 둘 다 치환된 알킬이다. 일부 이러한 실

시형태에서, 치환된 알킬은 카복실($-C(=O)OH$), 설포($-SO_3H$) 또는 설포산염($-SO_3^-$)으로 치환되는 알킬로부터 선택된다. 일부 다른 실시형태에서, 치환된 알킬은 C-아미도기로 치환되는 알킬로부터 선택된다.

[0084] 화학식 (I), (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 화합물의 일부 실시형태에서, 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 는 H이다. 일부 다른 실시형태에서, R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 중 적어도 하나는 알킬이다.

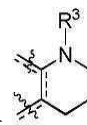
[0085] 화학식 (I), (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 화합물의 일부 실시형태에서, 각각의 R^3 및 R^4 는 알킬이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^3 및/또는 R^4 는 메틸 또는 에틸로부터 선택될 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, R^3 은 H이고, R^4 는 알킬이다. 일부 실시형태에서, R^3 및 R^4 는 에틸이다.

[0086] 화학식 (I), (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 화합물의 일부 다른 실시형태에서, R^1 과 R^3 은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 6원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 실시형태에서, 헤테로사이클릴 고리는 1개의 헤테로원자(즉, 질소)를 가진다. 일부 다른 실시형태에서, 헤테로사이클릴 고리는 2개 이상의 헤테로원자를 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 선택적으로 치환되는



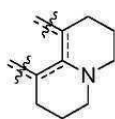
6-원 헤테로사이클릴은 구조 를 가지며, 여기서 고리 내 각각의 탄소 원자가 중성이고 하전되지 않도록, 는 단일 결합 또는 이중 결합 중 하나를 나타낸다. 일부 이러한 실시형태에서, R^4 는 H 또는 알킬로부터 선택된다. 일 실시형태에서, R^4 는 에틸이다. 일부 이러한 실시형태에서, $R^{1'}$ 및 R^2 중 적어도 하나는 H이다. 일 실시형태에서, $R^{1'}$ 과 R^2 는 둘 다 H이다.

[0087] 화학식 (I), (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 화합물의 일부 다른 실시형태에서, R^2 와 R^4 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 6원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 실시형태에서, 헤테로사이클릴 고리는 1개의 헤테로원자(즉, 질소)를 가진다. 일부 다른 실시형태에서, 헤테로사이클릴 고리는 2개 이상의 헤테로원자를 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 선택적으로 치환되는



6-원 헤테로사이클릴은 구조 를 가지며, 여기서 고리 내 각각의 탄소 원자가 중성이고 하전되지 않도록, 는 단일 결합 또는 이중 결합 중 하나를 나타낸다. 일부 이러한 실시형태에서, R^3 은 H 또는 알킬로부터 선택된다. 일 실시형태에서, R^3 은 에틸이다. 일부 이러한 실시형태에서, $R^{1'}$ 및 R^1 중 적어도 하나는 H이다. 일 실시형태에서, $R^{1'}$ 과 R^1 은 둘 다 H이다.

[0088] 화학식 (I), (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 화합물의 일부 대안의 실시형태에서, R^1 과 R^3 은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 6원 헤테로사이클릴을 형성하고; 그리고 R^2 와 R^4 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 6원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 실시형태에서, 얻어진 축합된 헤테로사이클릴 고리계는 1개의 헤테로원자(즉, 질소)를 가진다. 일부 다른 실시형태에서, 얻어진 축합된 헤테로사이클릴 고리계는 2개 이상의 헤테로원자를 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 얻어진 축합된 헤테로사이클릴 고리계는 구



조 를 가지며, 여기서 고리 내 각각의 탄소 원자가 중성이고 하전되지 않도록, 는 단일 결합 또는 이중 결합 중 하나를 나타낸다. 일 실시형태에서, $R^{1'}$ 는 H이다.

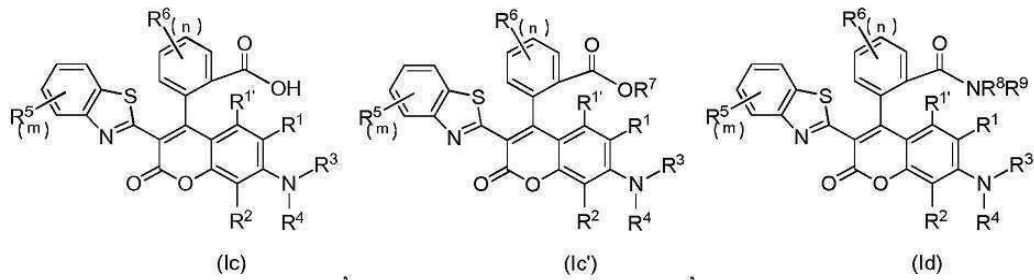
[0089] 화학식 (I), (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 화합물의 일부 실시형태에서, R^1/R^3 및/또는 R^2/R^4 에 의해 형성되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴 고리는 비치환된다. 일부 다른 실시형태에서, 이러한 3 내지 7원 헤테로사이클릴은 하나

이상의 알킬, 예를 들어, 메틸로 치환된다.

[0090] 화학식 (I), (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 화합물의 일부 실시형태에서, m은 0이다. 일부 다른 실시형태에서, m은 1이다. 일부 이러한 실시형태에서, R⁵는 설포, 설포닐 할로겐화물, 예를 들어, 염화설포닐, 또는 아미노설포닐로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, R⁵는 할로겐이다. 일부 실시형태에서, R⁵는 염소이다.

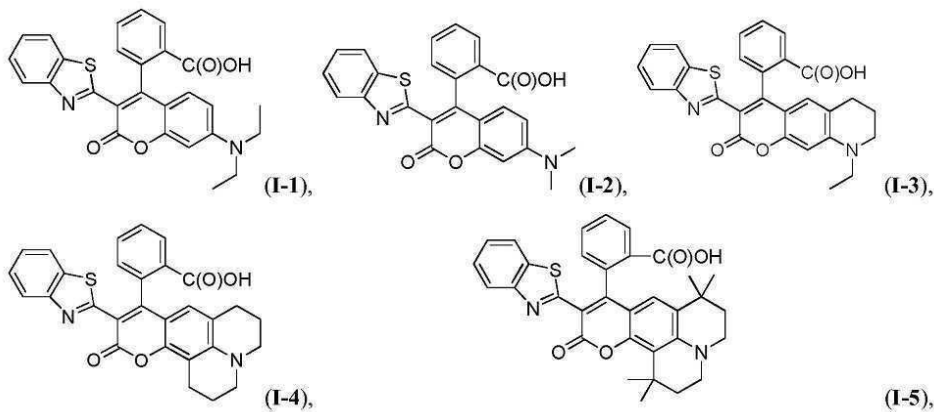
[0091] 화학식 (I), (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 일부 실시형태에서, n은 0이다.

[0092] 본 명세서에 개시된 화학식 (I), (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 화합물의 실시형태 중 임의의 하나에서, X는 S(황)일 수 있다. 본 명세서에 개시된 화학식 (I), (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 화합물의 실시형태 중 임의의 하나에서, X는 O(산소)일 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 화학식 (Ia), (Ia') 및 (Ib)의 화합물은 또한 각각 화학식 (Ic), (Ic') 및 (Id)로 나타낼 수 있다:

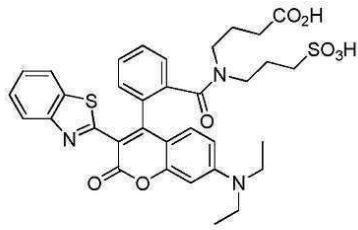


[0093]

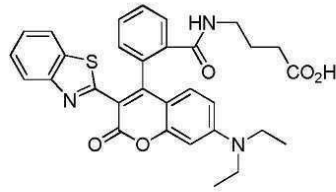
[0094] 일부 구체적인 실시형태에서, 예시적인 화학식 (I)의 화합물은:



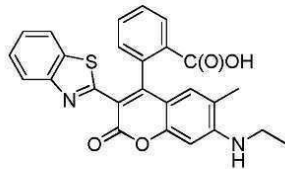
[0095]



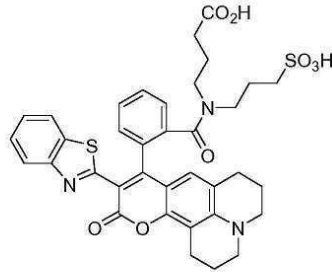
(I-6),



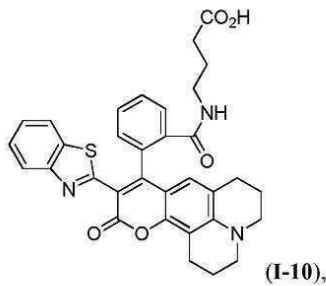
(I-7),



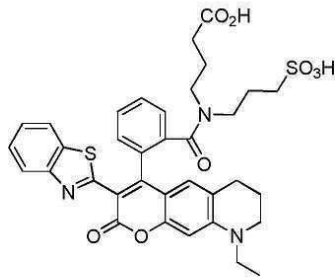
(I-8),



(I-9),



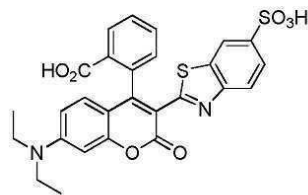
(I-10),



(I-11),



(I-12),



(I-13),

[0096]



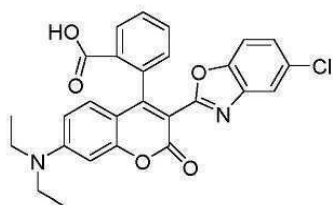
(I-14),



(I-15)

[0097]

및



(I-16) 또는 이들의 메소메리 형태를 포함한다.

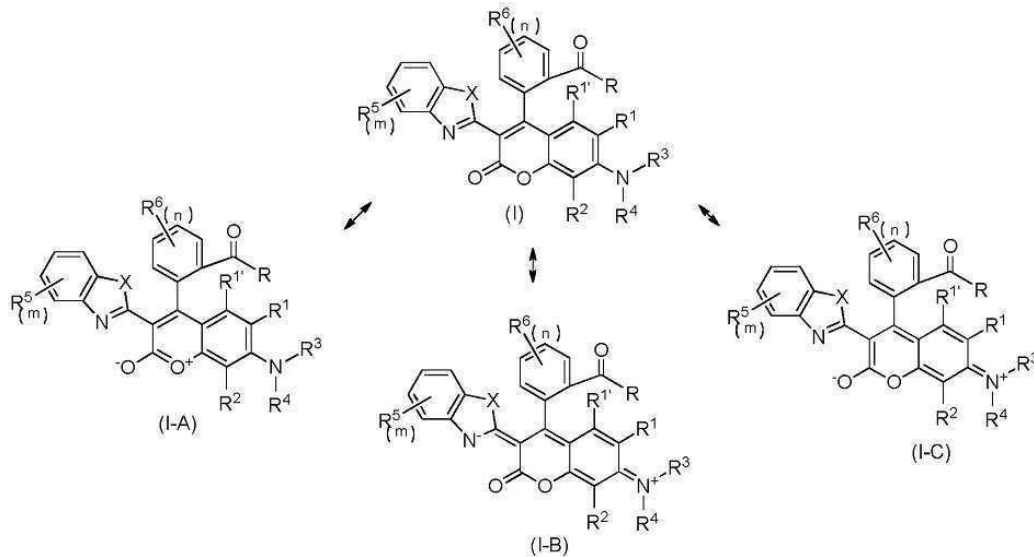
[0098]

화합식 (I)의 화합물의 일부 실시형태에서, 화합물은 C(=O)R를 통해 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되며, R은 -OR⁷이고, 그리고 R⁷은 치환된 알킬이다.

[0099]

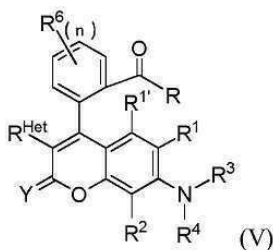
일부 대안의 실시형태에서, 상기 화합물은 C(=O)R를 통해 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되며, R은 -NR⁸R⁹이고, R⁸ 또는 R⁹ 중 적어도 하나는 생체분자에 대한 부착을 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 작용기를 포함하고, 예를 들어, R⁸ 또는 R⁹ 중 하나는 적어도 하나의 카복실기를 포함하는 치환된 알킬이다.

[0100] 일부 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 하나 이상의 메소메리 형태 (I-A), (I-B) 또는 (I-C)로 존재한다:



[0101]

[0102] 본 명세서에 개시된 일부 실시형태는 약 60nm 내지 약 100nm 범위의 스토크스 이동을 갖는 하기 화학식 (V)의 형광 화합물에 관한 것이다:



[0103]

[0104] 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 아미노설포닐, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설포닐, 설포, 설피노, 설포산염, 설포닐 할로겐화물, S-설포아미도, N-설포아미도, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0105] 대안적으로, R^1 과 $R^{1'}$ 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하며;

[0106] 각각의 R^3 및 R^4 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설포, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0107] 대안적으로, R^1 과 R^3 은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 또는 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하며;

[0108] 대안적으로, R^2 와 R^4 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 고리 또는 고리계를 형성하고;

[0109] R^{Het} 는 하나 이상의 R^5 로 선택적으로 치환되는 헤테로아릴이며;

[0110] 각각의 R^5 및 R^6 은 알킬, 치환된 알킬, 알콕시, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 할로알콕시, 알콕시알킬, 아미노, 아미노알킬, 아미노설포닐, 할로, 사이아노, 하이드록시, 하이드록시알킬, 헤테로알킬, C-카복시, O-카복시, C-아미도, N-아미도, 나이트로, 설포닐, 설포, 설피노, 설포산염, 설포닐 할로겐화물, S-설포아미도, N-설포아미도,

선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0111] R은 $-OR^7$ 또는 $-NR^8R^9$ 로부터 선택되며;

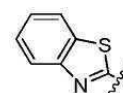
[0112] Y는 O 또는 NH로부터 선택되고;

[0113] R^7 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택되며;

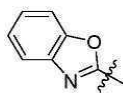
[0114] 각각의 R^8 및 R^9 는 H, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 카복시알킬, 설포네이트알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설포, 선택적으로 치환되는 아릴, 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 그리고

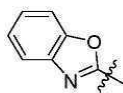
[0115] n은 0 내지 4의 정수이다.

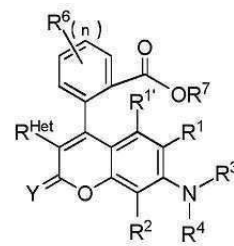
[0116] 화학식 (V)의 일부 실시형태에서, R^{Het} 는 선택적으로 치환되는 5 내지 10원 헤테로아릴로부터 선택된다. 일부 이러한 실시형태에서, R^{Het} 는 선택적으로 치환되는 9원 헤테로아릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 벤조티아졸로



부터 선택된다. 일 실시형태에서, R^{Het} 는 선택적으로 치환되는 2-벤조티아졸릴: 일 실시형태에



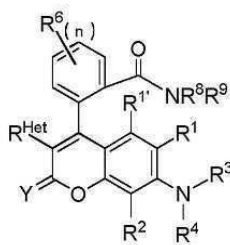
서, R^{Het} 는 구조 를 갖는 선택적으로 치환되는 2-벤조자졸릴이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^{Het} 는 설포, 설포닐 할로겐화물 또는 아미노설포닐로부터 선택되는 하나 이상의 치환체로 치환된다. 일부 이러한 실시형태에서, R^{Het} 는 하나 이상의 할로겐으로 치환된다. 일부 이러한 실시형태에서, R^{Het} 는 염소로 치환된다.



[0117] 일부 실시형태에서, R은 $-OR^7$ 이고, 화학식 (V)의 화합물은 또한 화학식 (Va):

낸다. 일 실시형태에서, R^7 은 H이다. 다른 실시형태에서, R^7 은 치환된 알킬이다.

[0118] 일부 실시형태에서, R은 $-NR^8R^9$ 이고, 화학식 (V)의 화합물은 또한 하기 화학식 (Vb):



(Vb)로 나타낸다. 일 실시형태에서, 각각의 R^8 및 R^9 는 H이다. 일부 다른 실시형태에서, R^8 은 H이고, R^9 는 치환된 알킬이다. 일부 추가 실시형태에서, R^8 과 R^9 는 둘 다 치환된 알킬이다. 일부 이러한 실시형태에서, 치환된 알킬은 카복실($-C(=O)OH$) 또는 설포($-SO_3H$) 또는 설포산염($-SO_3^-$)으로 치환되는 알킬로부터 선택된다. 일부 다른 실시형태에서, 치환된 알킬은 C-아미도기로 치환되는 알킬로부터 선택된다.

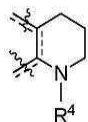
[0119] 화학식 (V), (Va) 또는 (Vb)의 화합물의 일부 실시형태에서, Y는 O이다.

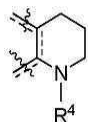
[0120] 화학식 (V), (Va) 또는 (Vb)의 화합물의 일부 실시형태에서, 각각의 R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 는 H이다. 일부 다른 실시형태

에서, R^1 , $R^{1'}$ 및 R^2 중 적어도 하나는 알킬이다.

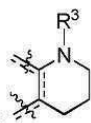
[0121] 화학식 (V), (Va) 또는 (Vb)의 화합물의 일부 실시형태에서, 각각의 R^3 및 R^4 는 알킬이다. 일부 이러한 실시형태에서, R^3 및/또는 R^4 는 메틸 또는 에틸로부터 선택될 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, R^3 은 H이고, R^4 는 알킬이다.

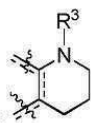
[0122] 화학식 (V), (Va) 또는 (Vb)의 화합물의 일부 다른 실시형태에서, R^1 과 R^3 은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 6원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 실시형태에서, 헤테로사이클릴 고리 1개의 헤테로원자(즉, 질소)를 가진다. 일부 다른 실시형태에서, 헤테로사이클릴 고리는 2개 이상의 헤테로원자를 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 선택적으로 치환되는 6-원 헤테로



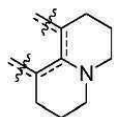
사이클릴은 구조  를 가지며, 여기서, 고리 내 각각의 탄소 원자가 중성이고 하전되지 않도록 -----는 단일 결합 또는 이중 결합 중 하나를 나타낸다. 일부 이러한 실시형태에서, R^4 는 H 또는 알킬로부터 선택된다. 일 실시형태에서, R^4 는 에틸이다. 일부 추가 실시형태에서, $R^{1'}$ 및 R^2 중 적어도 하나는 H이다. 일 실시형태에서, $R^{1'}$ 과 R^2 는 둘 다 H이다.

[0123] 화학식 (V), (Va) 또는 (Vb)의 화합물의 일부 다른 실시형태에서, R^2 와 R^4 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 6원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 실시형태에서, 헤테로사이클릴 고리는 1개의 헤테로원자(즉, 질소)를 가진다. 일부 다른 실시형태에서, 헤테로사이클릴 고리는 2개 이상의 헤테로원자를 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 선택적으로 치환되는 6-원 헤테



로사이클릴은 구조  를 가지며, 여기서, 고리 내 각각의 탄소 원자가 중성이고 하전되지 않도록 -----는 단일 결합 또는 이중 결합 중 하나를 나타낸다. 일부 이러한 실시형태에서, R^3 은 H 또는 알킬로부터 선택된다. 일 실시형태에서, R^3 은 에틸이다. 일부 추가 실시형태에서, $R^{1'}$ 및 R^1 중 적어도 하나는 H이다. 일 실시형태에서, $R^{1'}$ 과 R^1 은 둘 다 H이다.

[0124] 화학식 (V), (Va) 또는 (Vb)의 화합물의 일부 대안의 실시형태에서, R^1 과 R^3 은 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 6원 헤테로사이클릴을 형성하고; 그리고 R^2 와 R^4 는 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환되는 6원 헤테로사이클릴을 형성한다. 일부 실시형태에서, 얻어진 축합된 헤테로사이클릴 고리계는 1개의 헤테로원자(즉, 질소)를 가진다. 일부 다른 실시형태에서, 얻어진 축합된 헤테로사이클릴 고리계는 2개 이상의 헤테로원자를 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 얻어진 축합된 헤테로사이클릴 고리계는 구조



를 가지며, 여기서, 고리 내 각각의 탄소 원자가 중성이고 하전되지 않도록 -----는 단일 결합 또는 이중 결합 중 하나를 나타낸다. 일 실시형태에서, $R^{1'}$ 는 H이다.

[0125] 화학식 (V), (Va) 또는 (Vb)의 화합물의 일부 실시형태에서, R^1 / R^3 및/또는 R^2 / R^4 에 의해 형성되는 3 내지 7원 헤테로사이클릴 고리는 비치환된다. 일부 다른 실시형태에서, 이러한 3 내지 7원 헤테로사이클릴은 하나 이상의 알킬, 예를 들어, 메틸로 치환된다.

[0126] 화학식 (V), (Va) 또는 (Vb)의 화합물의 일부 실시형태에서, n은 0이다.

[0127] 화학식 (V), (Va) 또는 (Vb)의 일부 특정 실시형태에서, 예시적인 화학식(V)의 화합물은 본 명세서에 개시된 바

와 같은 화합물 I-1 내지 I-15를 포함한다.

[0128] 일부 실시형태에서, 화학식 (V)의 형광 화합물은 $C(=O)R$ 을 통해 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되며, R은 $-OR^7$ 이고, R^7 은 치환된 알킬이다.

[0129] 일부 대안의 실시형태에서, 화학식 (V)의 형광 화합물은 $C(=O)R$ 을 통해 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 공유적으로 부착되며, R은 $-NR^8R^9$ 이고, 그리고 R^8 또는 R^9 중 적어도 하나는 치환된 알킬이다.

[0130] 정의

[0131] 본 명세서에서 사용되는 표제 부문은 단지 유기적 목적을 위한 것이며, 기재되는 대상을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0132] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학적 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 용어 "포함하는(including)"뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "포함하다(include)", "포함하다(includes)" 및 "포함된(included)"은 제한이 없다. 용어 "갖는"뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "가지다(have)", "가지다(has)" 및 "가졌다(had)"는 제한적이지 않다. 전통적인 어구에서이든 청구범위의 대상에서이든 본 명세서에서 사용되는, 용어 "포함한다(comprise(s))" 및 "포함하는"은 제한을 두지 않은 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 즉, 상기 용어는 어구 "적어도 갖는" 또는 "적어도 포함하는"과 동시에 해석되어야 한다. 예를 들어, 과정과 관련하여 사용될 때, 용어 "포함하는"은 상기 과정은 적어도 인용된 단계를 포함하지만, 추가적인 단계를 포함할 수 있다는 것을 의미한다. 화합물, 조성물 또는 장치와 관련하여 사용될 때, 용어 "포함하는"은 화합물, 조성물 또는 장치는 적어도 인용된 특징 또는 성분을 포함하지만, 또한 추가적인 특징 또는 성분을 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0133] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 통상적인 유기물 약어는 다음과 같이 정의한다:

[0134]	Ac	아세틸
[0135]	Ac ₂ O	아세트산 무기물
[0136]	aq.	수성
[0137]	BOC 또는 Boc	tert-부톡시카보닐
[0138]	BOP	(벤조트라이아졸-1-일옥시)트리스(다이메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트
[0139]	cat.	촉매
[0140]	°C	섭씨 온도
[0141]	dATP	데옥시아데노신 삼인산염
[0142]	dCTP	데옥시사이티딘 삼인산염
[0143]	dGTP	데옥시구아노신 삼인산염
[0144]	dTTP	데옥시티미딘 삼인산염
[0145]	ddNTP(들)	다이데옥시뉴클레오타이드(들)
[0146]	DCM	염화메틸렌
[0147]	DMA	다이메틸아세트아마이드
[0148]	DMF	다이메틸폼아마이드
[0149]	Et	에틸
[0150]	EtOAc	에틸 아세테이트
[0151]	ffN	완전히 작용성인 뉴클레오타이드 집합체
[0152]	ffC	완전히 작용성인 사이티딘 집합체
[0153]	g	그램(들)

[0154]	h 또는 hr	시간(들)
[0155]	IPA	아이소프로필 알코올
[0156]	LCMS	액체 크로마토그래피-질량 분석법
[0157]	MeCN	아세토나이트릴
[0158]	mL	밀리리터(들)
[0159]	PG	보호기
[0160]	Ph	페닐
[0161]	ppt	침전물
[0162]	PyBOP	(벤조트리아아졸-1-일옥시)트라이피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트
[0163]	RT, rt	실온
[0164]	SBS	합성에 의한 서열분석
[0165]	TEA	트라이에틸아민
[0166]	TEAB	테트라에틸암모늄 바이카보네이트
[0167]	TFA	트라이플루오로아세트산
[0168]	Tert, t	3차
[0169]	THF	테트라하이드로퓨란
[0170]	TLC	박층 크로마토그래피
[0171]	TSTU	O-(N-숙신이미딜)-N,N,N',N"-테트라메틸유로폼 테트라플루오로보레이트
[0172]	$\mu\ell$	마이크로리터(들)
[0173]	본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "공유적으로 부착된" 또는 "공유결합된"은 원자 사이의 전자 쌍의 공유를 특징으로 하는 화학적 결합의 형성을 지칭한다. 예를 들어, 공유적으로 부착된 중합체 코팅은 다른 수단, 예를 들어, 접착 또는 정전기적 상호작용을 통한 표면에 대한 부착에 비해 기질의 작용화된 표면과의 화학적 결합을 형성하는 중합체 코팅을 지칭한다. 표면에 공유적으로 부착된 중합체는 또한 공유적으로 부착에 추가적인 수단을 통해 결합될 수 있다는 것이 인식될 것이다.	
[0174]	본 명세서에서 사용되는 용어 "할로젠" 또는 "할로"는 주기율표 7족의 방사성 안정성 원자 중 하나, 예를 들어, 플루오린, 염소, 브로민 또는 요오드를 의미하며, 플루오린 및 염소가 바람직하다.	
[0175]	본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "알킬"은 완전히 포화된(즉, 이중 또는 삼중 결합을 함유하지 않음) 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소를 지칭한다. 알킬기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다(본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "알킬"의 존재를 아우른다고 해도, 그것이 본 명세서에서 나타나는 경우에, 수치적 범위, 예컨대 "1 내지 20"개는 주어진 범위 내의 각각의 정수를 지칭하고; 예를 들어, "1 내지 20개의 탄소 원자"는 알킬기가 1개의 탄소 원자, 2개의 탄소 원자, 3개의 탄소 원자 등(20개를 포함하여, 20개까지의 탄소 원자)으로 이루어질 수 있다는 것을 의미한다). 알킬기는 또한 1 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알킬일 수 있다. 알킬기는 또한 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 더 저급의 알킬일 수 있었다. 알킬기는 "C ₁₋₄ 알킬" 또는 유사한 표기로서 표기될 수 있다. 단지 예로서, "C ₁₋₆ 알킬"은 알킬쇄에서 1 내지 6개의 탄소 원자가 있다는 것, 알킬쇄는 메틸, 에틸, 프로필, 아이소-프로필, n-뷰틸, 아이소-뷰틸, sec-뷰틸 및 t-뷰틸로 이루어진 군으로부터 선택된다는 것을 나타낸다. 전형적인 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 뷰틸, 아이소뷰틸, 3차 뷰틸, 펜틸, 헥실 등을 포함하지만, 어떤 방법으로 제한되지 않는다.	
[0176]	본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "알콕시"는 화학식 -OR을 지칭하되, R은 상기 정의한 바와 같은 알킬, 예컨대 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 1-메틸에톡시(아이소프로폭시), n-뷰톡시, 아이소-뷰톡시, sec-뷰톡시, 및 tert-뷰톡시 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 "C ₁₋₉ 알콕시"이다.	

- [0177] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "알켄일"은 하나 이상의 이중 결합을 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소쇄를 지칭한다. 알켄일기는, 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "알켄일"의 존재를 아우르지만, 2 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 알켄일기는 또한 2 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알켄일일 수 있다. 알켄일기는 또한 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알켄일일 수 있었다. 알켄일기는 " C_{2-6} 알켄일" 또는 유사한 표기로 표기될 수 있다. 단지 예로서, " C_{2-6} 알켄일"은 알켄일쇄에 2 내지 6개의 탄소 원자가 있으며, 즉, 알켄일쇄는 에테닐, 프로펜-1-일, 프로펜-2-일, 프로펜-3-일, 뷰텐-1-일, 뷰텐-2-일, 뷰텐-3-일, 뷰텐-4-일, 1-메틸-프로펜-1-일, 2-메틸-프로펜-1-일, 1-에틸-에텐-1-일, 2-메틸-프로펜-3-일, 부타-1,3-다이엔일, 부타-1,2-다이엔일, 및 부타-1,2-다이엔-4-일로 이루어진 군으로부터 선택된다는 것을 나타낸다. 전형적인 알켄일기는 에테닐, 프로펜일, 뷰텐일, 펜텐일, 및 헥센일 등을 포함하지만, 이런 방법으로 제한되지 않는다.
- [0178] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "알킨일"은 하나 이상의 삼중 결합을 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소를 지칭한다. 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "알킨일"의 존재를 아우른다고 해도, 알킨일기는 2 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 알킨일기는 또한 2 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알킨일일 수 있다. 알킨일기는 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알킨일일 수 있었다. 알킨일기는 " C_{2-6} 알킨일" 또는 유사한 표기로 표기될 수 있다. 단지 예로서, " C_{2-6} 알킨일"은 알킨일쇄에 2 내지 6개의 탄소 원자가 있으며, 즉, 알킨일쇄는 에틴일, 프로핀-1-일, 프로핀-2-일, 뷰틴-1-일, 뷰틴-3-일, 뷰틴-4-일 및 2-뷰틴일로 이루어진 군으로부터 선택된다는 것을 나타낸다. 전형적인 알킨일기는 에틴일, 프로핀일, 뷰틴일, 펜틴일 및 헥신일 등을 포함하지만, 어떤 방법으로 제한되지 않는다.
- [0179] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "헤테로알킬"은 하나 이상의 헤테로원자, 즉, 쇠 골격 내 질소, 산소 및 황을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 탄소 이외의 원소를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소를 지칭한다. 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "헤테로알킬"의 존재를 아우르지만, 헤테로알킬기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 헤테로알킬기는 또한 1 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 헤테로알킬일 수 있다. 헤테로알킬기는 또한 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 헤테로알킬일 수 있었다. 헤테로알킬기는 " C_{1-6} 헤테로알킬" 또는 유사한 표기로 표기될 수 있다. 헤테로알킬기는 하나 이상의 헤테로원자를 함유할 수 있다. 단지 예로서, " C_{1-6} 헤테로알킬"은 헤테로알킬쇄에 1 내지 6개의 탄소 원자 및 추가로 쇠의 골격에 하나 이상의 헤테로원자가 있다는 것을 나타낸다.
- [0180] 용어 "방향족"은 접합된 파이 전자계를 갖는 고리 또는 고리계를 지칭하며, 탄소환식 방향족(예를 들어, 페닐)과 복소환식 방향족기(예를 들어, 피리딘)를 둘 다 포함한다. 상기 용어는 단환식 또는 축합 고리 다환식(즉, 원자의 인접한 쌍을 공유하는 고리) 기를 포함하며, 단, 전체 고리계는 방향족이다.
- [0181] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "아릴"은 고리 골격에서 탄소만을 함유하는 방향족 고리 또는 고리계(즉, 2개의 인접한 탄소 원자를 공유하는 2개 이상의 축합 고리)를 지칭한다. 아릴이 고리계일 때, 고리계의 모든 고리는 방향족이다. 본 정의는 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "아릴"의 발생을 아우르지만, 아릴기는 6 내지 18개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 아릴기는 6 내지 10개의 탄소 원자를 가진다. 아릴기는 " C_{6-10} 아릴", " C_6 또는 C_{10} 아릴" 또는 유사한 표기로 표기될 수 있다. 아릴기의 예는 페닐, 나프틸, 아줄렌일 및 안트라센일을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0182] "아르알킬" 또는 "아릴알킬"은 벤질, 2-페닐에틸, 3-페닐프로필, 및 나프틸알킬을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 " C_{7-14} 아르알킬" 등과 같은 알킬렌기를 통해 치환체로서 연결되는 아릴기이다. 일부 경우에, 알킬렌기는 저급 알킬렌기(즉, C_{1-6} 알킬렌기)이다.
- [0183] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "헤테로아릴"은 하나 이상의 헤테로원자, 즉, 고리 골격 내 질소, 산소 및 황을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 탄소 이외의 원소를 함유하는 방향족 고리 또는 고리계(즉, 2개의 인접한 원자를 공유하는 2개 이상의 축합 고리)를 지칭한다. 헤테로아릴이 고리계일 때, 고리계의 모든 고리는 방향족이다. 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "헤테로아릴"의 존재를 아우르지만, 헤테로아릴기는 5 내지 18개의 고리 구성원(즉, 탄소 원자 및 헤테로원자를 포함하는 고리 골격을 구성하는 원자의 수)을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 헤테로아릴기는 5 내지 10개의 고리 구성원 또는 5 내지 7개의 고리 구성원을 가진다. 헤테로아릴기는 "5 내지 7원 헤테로아릴", "5 내지 10원 헤테로아릴" 또는 유사한 표기로 표기될 수 있다. 헤테로아릴 고리의 예는 퓨릴, 티엔일, 프탈라진일, 피롤릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴,

아이소옥사졸릴, 아이소티아졸릴, 트리아아졸릴, 티아다아아졸릴, 피리딘일, 피리다진일, 피리미딘일, 피라진일, 트리아아진일, 퀴놀린일, 아이소퀴놀린일, 벤즈이미다졸릴, 벤족사졸릴, 벤조티아졸릴, 인돌릴, 아이소인돌릴 및 벤조티엔일을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0184] "헤테로아릴알킬" 또는 "헤테로아릴알킬"은 알킬렌기를 통해 치환체로서 연결된 헤테로아릴기이다. 예는 2-티엔일메틸, 3-티엔일메틸, 퓨릴메틸, 티엔일메틸, 피롤릴알킬, 피리딜알킬, 아이소옥사졸릴알킬 및 이미다졸릴알킬을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 경우에, 알킬렌기는 저급 알킬렌기(즉, C₁₋₆ 알킬렌기)이다.

[0185] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "카보사이클릴"은 고리계 골격에서 탄소 원자만을 함유하는 비방향족 환식 고리 또는 고리계를 의미한다. 카보사이클릴이 고리계일 때, 2개 이상의 고리는 축합, 브릿지 또는 스피로 연결된 방식으로 함께 결합될 수 있다. 카보사이클릴은 고리계의 적어도 하나의 고리가 방향족이 아니라는 조건 하에서 임의의 포화 정도를 가질 수 있다. 따라서, 카보사이클릴은 사이클로알킬, 사이클로알켄일 및 사이클로알킨일을 포함한다. 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "카보사이클릴"의 존재를 아우르지만, 카보사이클릴기는 3 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 카보사이클릴기는 또한 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 카보사이클릴일 수 있다. 카보사이클릴기는 3 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 카보사이클릴일 수 있었다. 카보사이클릴기는 "C₃₋₆ 카보사이클릴" 또는 유사한 표기로 표기될 수 있다. 카보사이클릴 고리의 예는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헥센일, 2,3-다이하이드로-인텐, 바이사이클[2.2.2]옥탄일, 아다만틸 및 스피로[4.4]노난일을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0186] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "사이클로알킬"은 완전히 포화된 카보사이클릴 고리 또는 고리계를 의미한다. 예는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 및 사이클로헥실을 포함한다.

[0187] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "헤테로사이클릴"은 고리에서 적어도 하나의 헤테로원자를 함유하는 비-방향족 환식 고리 또는 고리계를 의미한다. 헤테로사이클릴은 축합, 브릿지 또는 스피로 연결된 방식으로 함께 결합될 수 있다. 헤테로사이클릴은 고리계의 적어도 하나의 고리가 방향족이 아니라는 조건 하에서 임의의 포화 정도를 가질 수 있다. 헤테로원자(들)는 고리계에서 비방향족 또는 방향족 고리 중 하나로 존재할 수 있다. 본 정의가 또한 수치적 범위가 표기되지 않은 용어 "헤테로사이클릴"의 존재를 아우르지만, 헤테로사이클릴기는 3 내지 20개의 고리 구성원(즉, 탄소 원자 및 헤테로원자를 포함하는 고리 골격을 구성하는 원자의 수)을 가질 수 있다. 헤테로사이클릴기는 또한 3 내지 10개의 고리 구성원을 갖는 중간 크기 헤테로사이클릴일 수 있다. 헤테로사이클릴기는 3 내지 6개의 고리 구성원을 갖는 헤테로사이클릴일 수 있었다. 헤테로사이클릴기는 "3 내지 6원 헤테로사이클릴" 또는 유사한 표기로 표기될 수 있다. 바람직한 6원 단환식 헤테로사이클릴에서, 헤테로원자(들)는 O, N 또는 S 중 1 내지 3개로부터 그리고 바람직한 5원 단환식 헤테로사이클릴에서 선택되고, 헤테로원자(들)는 O, N 또는 S로부터 선택되는 1 또는 2개의 헤테로원자로부터 선택된다. 헤테로사이클릴 고리의 예는 아제핀일, 아크리딘일, 카바졸릴, 신놀린일, 다이옥솔란일, 이미다졸린일, 이미다졸리딘일, 몰폴린일, 옥시란일, 옥세판일, 티에판일, 피페리딘일, 피페라진일, 다이옥소피페라진일, 피롤리딘일, 피롤리돈일, 피롤리다이온일, 4-피페리돈일, 피라졸린일, 피라졸리딘일, 1,3-다이옥신일, 1,3-다이옥산일, 1,4-다이옥신일, 1,4-다이옥산일, 1,3-옥사티안일, 1,4-옥사틴일, 1,4-옥사티안일, 2H-1,2-옥사진일, 트라이옥산일, 헥사하이드로-1,3,5-트리아진일, 1,3-다이옥솔릴, 1,3-다이옥솔란일, 1,3-다йти올일, 1,3-다йти올란일, 아이소옥사졸린일, 아이소옥사졸린일, 옥사졸린일, 옥사졸리딘일, 옥사졸리디논일, 티아졸린일, 티아졸리딘일, 1,3-옥사티올란일, 인돌린일, 아이소인돌린일, 테트라하이드로퓨란일, 테트라하이드로피란일, 테트라하이드로티오펜일, 테트라하이드로티오피란일, 테트라하이드로-1,4-티아진일, 티아몰폴린일, 다이하이드로벤조퓨란일, 벤즈이미다졸리딘일, 및 테트라하이드로퀴놀린을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0188] "O-카복시"기는 "-OC(=O)R" 기를 지칭하며, 이때 R은 본 명세서에 기재된 바와 같은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다.

[0189] "C-카복시"기는 "-C(=O)OR" 기를 지칭하며, 이때 R은 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다. 비제한적 예는 카복실(즉, -C(=O)OH)을 포함한다.

[0190] "사이아노"기는 "-CN" 기를 지칭한다.

[0191] "설폰일"기는 "-SO₂R"기를 지칭하며, R은 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨

일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다.

[0192] "설포" 또는 "설포닐 하이드록사이드"기는 "-S(=O)₂-OH" 기를 지칭한다.

[0193] "설포노"기는 "-S(=O)OH" 기를 지칭한다.

[0194] "설포산염"기는 -SO₃⁻ 기를 지칭한다.

[0195] "설포닐 할로겐화물"기는 "-S(=O)₂-X"기를 지칭하며, X는 할로겐화물이다.

[0196] "S-설포아미도"기는 "-SO₂NR_AR_B"기를 지칭하며, 이때 R_A 및 R_B는 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 각각 독립적으로 선택된다.

[0197] "N-설포아미도"기는 "-N(R_A)SO₂R_B" 기를 지칭하며, 이때 R_A 및 R_B는 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 각각 독립적으로 선택된다.

[0198] "C-아미도"기는 "-C(=O)NR_AR_B"기를 지칭하며, 이때 R_A 및 R_B는 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 각각 독립적으로 선택된다.

[0199] "N-아미도"기는 "-N(R_A)C(=O)R_B"기를 지칭하며, 이때 R_A 및 R_B는 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 각각 독립적으로 선택된다.

[0200] "아미노"기는 "-NR_AR_B"기를 지칭하며, 이때 R_A 및 R_B는 본 명세서에 정의된 바와 같은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5 내지 10원 헤테로아릴, 및 3 내지 10원 헤테로사이클릴로부터 각각 독립적으로 선택된다. 비제한적 예는 유리 아미노(즉, -NH₂)를 포함한다.

[0201] "아미노알킬"기는 알킬렌 기를 통해 연결된 아미노기를 지칭한다.

[0202] "아미노설포닐"기는 "-S(=O)₂NH₂"기를 지칭한다.

[0203] "알콕시알킬"기는 알킬렌기, 예컨대 "C₂₋₈ 알콕시알킬" 등을 통해 연결된 알콕시기를 지칭한다.

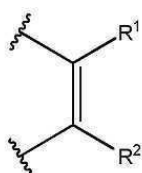
[0204] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 치환된 기는 하나 이상의 수소 원자가 다른 원자 또는 기로 교환된 비치환 모(parent)기로부터 유래된다. 달리 표시되지 않는 한, 기가 "치환된"으로 여겨질 때, 기는 C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알켄일, C₁₋₆ 알킨일, C₁₋₆ 헤테로알킬, C₃₋₇ 카보사이클릴(할로, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₆ 할로알킬 및 C₁₋₆ 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), C₃₋₇-카보사이클릴-C₁₋₆-알킬(할로, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₆ 할로알킬 및 C₁₋₆ 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 3 내지 10원 헤테로사이클릴(할로, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₆ 할로알킬 및 C₁₋₆ 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 3 내지 10원 헤테로사이클릴-C₁₋₆-알킬(할로, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₆ 할로알킬 및 C₁₋₆ 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 아릴(할로, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₆ 할로알킬 및 C₁₋₆ 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 아릴(C₁₋₆)알킬(할로, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₆ 할로알킬 및 C₁₋₆ 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 5 내지 10원 헤테로아릴(할로, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₆ 할로알킬 및 C₁₋₆ 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 5 내지 10원 헤테로아릴(C₁₋₆)알킬(할로, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₆ 할로알킬 및 C₁₋₆ 할로알콕시로 선택적으로 치환됨), 할로, 사이아노, 하이드록시, C₁₋₆ 알콕시, C₁₋₆ 알콕시(C₁₋₆)알킬(즉, 에터), 아릴옥시, 설프하이드릴(머캅토), 할로(C₁₋₆)알킬(예를 들어, -CF₃), 할로(C₁₋₆)알콕시(예를 들어, -OCF₃), C₁₋₆ 알킬티오, 아릴티오, 아미노, 아미노(C₁₋₆)알킬, 나이트로, O-카밤일, N-카밤일, O-티오카밤일, N-티오카밤일, C-아미도, N-아미도, S-설포아미

도, N-설펜아미도, C-카복시, O-카복시, 아실, 사이아네이트, 아이소사이아네이트, 티오사이아네이트, 아이소티오사이아네이트, 설펜일, 설펜일, 설펜, 설펜노, 설펜산염 및 옥소(=O)로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환체로 치환된다는 것을 의미한다. 기가 "선택적으로 치환된"으로 기재되는 경우에, 상기 기는 상기 치환체로 치환될 수 있다.

[0205] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 화합물이 양으로 또는 음으로 하전된 치환체, 예를 들어, SO_3^- 를 함유한다면, 전체로서 화합물이 중성이도록, 이는 또한 양으로 또는 음으로 하전된 반대이온을 함유할 수 있다.

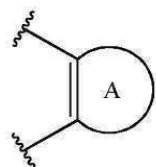
[0206] 관습적으로 명명하는 특정 라디칼은 문맥에 따라서 1-라디칼 또는 2-라디칼 중 하나를 포함할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 예를 들어, 치환체가 분자의 나머지에 대한 2개의 부착 지점을 필요로 하는 경우에, 치환체는 2-라디칼이라는 것이 이해된다. 예를 들어, 2개의 부착 지점을 필요로 하는 알킬로서 동정되는 치환체는 2-라디칼, 예컨대 $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 등을 포함한다. 관습적으로 명명하는 다른 라디칼은 2-라디칼, 예컨대 "알킬렌" 또는 "알켄일렌"이라는 것을 분명하게 나타낸다.

[0207] 두 "인접한" R기가 "이들이 부착되는 원자와 함께" 고리를 형성하는 것으로 언급될 때, 원자의 총괄적 단위, 개재 결합 및 2개의 기는 열거된 고리라는 것을 의미한다. 예를 들어, 다음의 구조가 존재할 때:



[0208]

[0209] R^1 및 R^2 는 수소 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 바와 같이 정의되거나, 또는 R^1 과 R^2 는 이들이 부착되는 원자와 함께 아릴 또는 카보사이클릴을 형성하고, R^1 및 R^2 는 수소 또는 알킬로부터 선택될 수 있거나, 또는 대안적으로, 하위구조는 하기 구조를 가진다는 것을 의미한다:



[0210]

[0211] 식 중, A는 도식된 이중 결합을 함유하는 아릴 고리 또는 카보사이클릴이다.

[0212] 표지된 뉴클레오타이드

[0213] 본 명세서에 기재된 염료 화합물은 기질 모이어티에 대한 부착에 적합하다. 기질 모이어티는 사실상 본 명세서에 기재된 형광 염료가 접합될 수 있는 임의의 분자 또는 물질일 수 있으며, 예로서, 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, 탄수화물, 리간드, 입자, 고체 표면, 유기 및 무기 중합체 및 이들의 조합 또는 집합체, 예컨대, 염색체, 핵, 살아있는 세포 등을 포함할 수 있다. 염료는 소수성 인력, 이온 인력 및 공유적으로 부착을 포함하는 다양한 수단에 의해 선택적 링커에 의해 접합될 수 있다. 특히, 염료는 공유적으로 부착에 의해 기질에 접합된다. 더 구체적으로는, 공유적으로 부착은 링커 기에 의한다. 일부 예에서, 이러한 표지된 뉴클레오타이드는 또한 "변형된 뉴클레오타이드"로서 지칭된다.

[0214] 본 명세서에 기재된 바와 같은 긴 스토크스 이동을 갖는 새로운 형광 염료의 특히 유용한 적용은 생체분자, 예를 들어, 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 표지를 위한 것이다. 본 출원의 일부 실시형태는 본 명세서에 기재된 새로운 형광 화합물로 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다.

[0215] 생체분자에 대한 부착은 화학식 (I) 또는 (V)의 화합물의 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ 모이어티를 통할 수 있다. 일부 실시형태에서, R은 $-\text{OR}^7$ 이고, R^7 은 생체분자의 아미노기에 대한 부착을 위해 사용될 수 있는 치환된 알킬이다. 일 실시형태에서, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ 모이어티는 추가적인 아마이드/펩타이드 결합 형성에 가장 적합한 활성화된 에스터 잔기일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "활성화된 에스터"는 온화한 조건에서, 예를 들어, 아미노기를 함유하는 화합물과 반응할 수 있는 카복시기 유도체를 지칭한다. 활성화된 에스터의 비제한적 예는 p-나이트로페닐, 펜타플루오로페닐 및 숙신이미도 에스터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 다른 실시형태

에서, R은 $-NR^8R^9$ 이며, R^8 또는 R^9 중 적어도 하나는 생체분자에 대한 부착을 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 작용기를 함유하고, 예를 들어, R^8 또는 R^9 중 하나는 적어도 하나의 카복실을 포함하는 치환된 알킬이다.

[0216] 일부 실시형태에서, 염료 화합물은 뉴클레오타이드 염기를 통해 올리고뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드에 공유적으로 부착될 수 있다. 예를 들어, 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 링커 모이어티를 통해 피리미딘 염기의 C5 위치에 또는 7-테아자 퓨린 염기의 C7 위치에 부착된 표지를 가질 수 있다. 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드의 리보스 또는 데옥시리보스 당에 공유적으로 부착된 3'-OH 차단기를 가질 수 있다.

[0217] 링커

[0218] 본 명세서에 개시된 바와 같은 염료 화합물은 다른 분자에 대한 화합물의 공유적으로 부착을 위한 치환체 위치 중 하나에서 반응성 링커를 포함할 수 있다. 반응성 연결기는 공유 결합을 형성할 수 있는 모이어티이다. 특정 실시형태에서, 링커는 절단성 링커일 수 있다. 용어 "절단성 링커"의 사용은 전체 링커가 제거될 필요가 있다는 것을 나타내는 것을 의미하지 않는다. 절단 부위는 링커의 부분이 절단 후 염료 및/또는 기질 모이어티에 부착된 채로 남아있다는 것을 보장하는 링커 상의 위치에 위치될 수 있다. 절단 가능한 링커는 비제한적 예로서 친전자적 절단성 링커, 친핵적 절단성 링커, 광 절단성 링커, 환원 조건(예를 들어, 링커를 함유하는 이황화물 또는 아자이드), 산화 조건 하의 절단성, 안전 장치 링커의 사용을 통한 절단성 및 제거 메커니즘에 의한 절단성일 수 있다. 기질 모이어티에 염료 화합물을 부착시키기 위한 절단성 링커의 사용은 표지는, 필요하다면 검출 후에 제거될 수 있고, 하류 단계에서 임의의 방해 신호를 회피할 수 있다는 것을 보장한다.

[0219] 표지, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 새로운 형광 화합물에 뉴클레오타이드의 염기를 연결하는 링커기의 비제한적 예는 국제특허출원 공개 WO2004/018493(본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 것을 포함한다. 이들 링커는 전이 금속 및 적어도 부분적으로 수용성인 리간드로부터 형성된 수용성 포스핀 또는 수용성 전이금속을 이용하여 절단될 수 있다. 수용액에서 후자는 적어도 부분적으로 수용성인 전이 금속 착물을 형성한다. 사용될 수 있는 추가적인 적합한 링커는 국제 특허 출원 WO2004/018493 및 WO 2007/020457(이들 둘 다 본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 것을 포함한다. 폴리에틸렌 글리콜 스페이서기를 도입함으로써 형광 염료(형광단)와 구아닌 염기 사이의 링커 길이를 변경시킴으로써 그리고 특히 증가시킴으로써, 당업계에 공지된 다른 결합을 통해 구아닌 염기에 부착된 동일한 형광단에 비해 형광 강도를 증가시킬 수 있다는 것이 발견되었다. 링커, 및 특히 그들의 증가된 길이의 설계는 또한 DNA와 같은 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 때, 구아노신 뉴클레오타이드의 구아닌 염기에 부착된 형광단의 밝기 개선을 허용한다. 따라서, 염료가 구아닌-함유 뉴클레오타이드에 부착된 형광 염료 표지의 검출을 필요로 하는 임의의 분석 방법에서 사용하기 위한 것일 때, WO 2007/020457에 기재된 바와 같이, 링커가 화학식 $-((CH_2)_2O)_n-$ 의 스페이서기를 포함한다면 유리하며, n은 2 내지 50의 정수이다.

[0220] 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드는 당 또는 핵염기 상의 부위에 표지될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같은 "뉴클레오타이드"는 질소성 염기, 당, 및 하나 이상의 인산염기로 이루어진다. RNA에서, 당은 리보스이고, DNA에서 데옥시리보스, 즉, 리보스 상에 존재하는 하이드록실기가 없는 당이다. 질소성 염기는 퓨린 또는 피리미딘의 유도체이다. 퓨린은 아데닌(A) 및 구아닌(G)이고, 피리미딘은 사이토신(C) 및 티민(T)이거나 RNA와 관련하여, 유라실(U)이다. 데옥시리보스의 C-1 원자는 피리미딘의 N-1 또는 퓨린의 N-9에 결합된다. 뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오사이드의 인산염 에스터이고, 하이드록실기 상에서 생기는 에스터화는 당의 C-3 또는 C-5에 부착된다. 뉴클레오타이드는 보통 일-, 이- 또는 삼인산염이다.

[0221] "뉴클레오사이드"는 뉴클레오타이드에 구조적으로 유사하지만, 인산염 모이어티가 상실된다. 뉴클레오사이드 유사체의 예는 표지가 염기에 연결되며 당 분자에 부착된 인산염기가 없는 것이다.

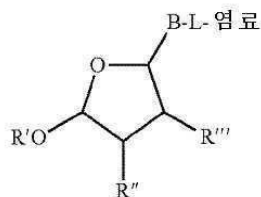
[0222] 염기는 보통 퓨린 또는 피리미딘으로서 지칭되지만, 당업자는 왓슨-크릭 염기쌍을 겪는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드의 능력을 변경시키지 않는 유도체 및 유사체가 이용 가능하다는 것을 인식할 것이다. "유도체" 또는 "유사체"는 코어 분자가 동일한 또는 모 화합물과 매우 유사하지만, 유도체 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드가 다른 분자에 연결되도록 허용하는 화학적 또는 물리적 변형, 예컨대 상이한 또는 추가적인 측기를 갖는 화합물 또는 분자를 의미한다. 예를 들어, 염기는 테아자퓨린일 수 있다. 유도체는 왓슨-크릭 쌍을 겪을 수 있어야 한다. "유도체" 및 "유사체"는 또한 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 당 모이어티를 갖는 합성 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 유도체를 의미한다. 이러한 유도체 및 유사체는, 예를 들어, 문헌[Scheit, *Nucleotide analogs* (John Wiley & Son, 1980) 및 Uhlman *et al.*, *Chemical Reviews* 90:543-584, 1990]에서 논의된다. 뉴클레오타이드 유사체는 또한 포스포로티오에이트, 포스포로다이티오에이트, 알킬-포스포네이트, 포

스포르아닐리데이트, 포스포르아미데이트 결합 등을 포함하는 변형된 포스포다이에스터 결합을 포함할 수 있다.

[0223] 염료는 링커를 통해 뉴클레오타이드 염기 상의 임의의 위치에 부착될 수 있고, 단, 왓슨-크릭 염기쌍은 여전히 수행될 수 있다. 특정 핵염기 표지 부위는 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-테아자 퓨린 염기의 C7 위치를 포함한다. 상기 기재한 바와 같은, 링커 기는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 염료를 공유적으로 부착하기 위해 사용될 수 있다.

[0224] 특정 실시형태에서 표지 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드는 효소적으로 혼입 가능하고 효소적으로 연장될 수 있다. 따라서, 화합물이 핵산 복제 효소에 의한 뉴클레오타이드의 전반적인 결합 및 인식을 상당히 방해하지 않도록 링커 모이어티는 화합물에 뉴클레오타이드를 연결하기에 충분한 길이를 가질 수 있다. 따라서, 링커는 또한 스페이서 단위, 스페이서 거리, 예를 들어, 절단 부위 또는 표지로부터의 뉴클레오타이드 염기를 포함할 수 있다.

[0225] 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료로 표지된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드는 하기 식을 가질 수 있다:



[0226]

[0227] 식 중, 염료는 염료 화합물이고, B는 핵염기, 예를 들어 유라실, 티민, 사이토신, 아데닌, 구아닌 등이며, L은 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 선택적 링커기이다. R'은 H, 일인산염, 이인산염, 삼인산염, 티오인산염, 인산염 에스터 유사체, 반응성 인 함유기에 부착된 -O- 또는 차단기에 의해 보호된 -O-일 수 있다. R''은 H, OH, 포스포르아미데이트 또는 3'-OH 차단기일 수 있으며, R'''는 H 또는 OH이고; 여기서, R''는 포스포르아미데이트이며, R'는 자동화된 합성 조건 하에서 후속적 단량체 결합을 허용하는 산-절단성 하이드록실 보호기이다.

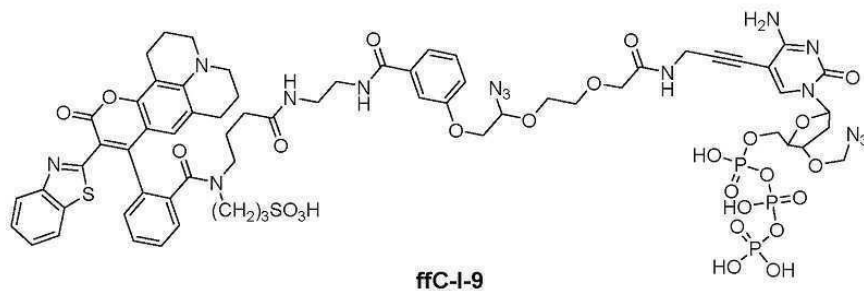
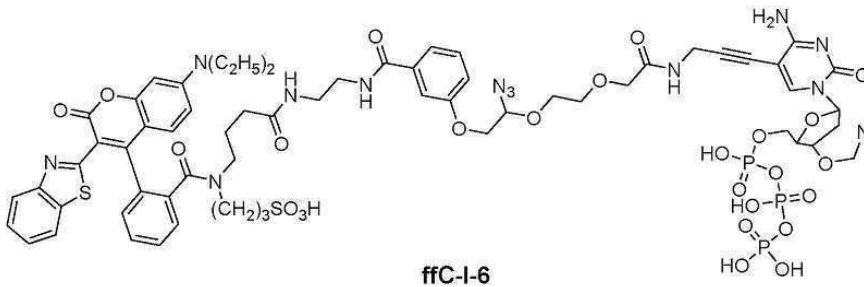
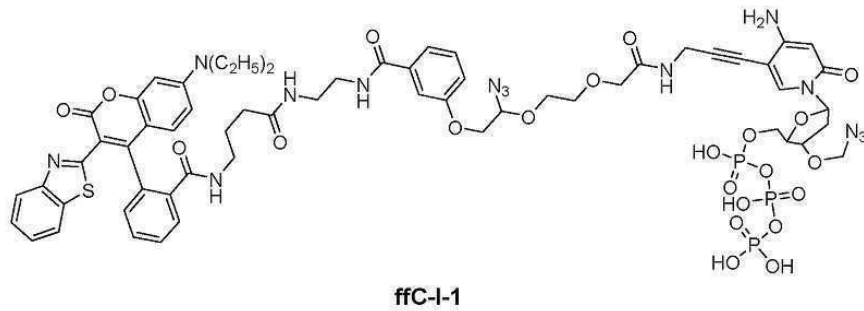
[0228] 일부 예에서, 차단기는 별개의 그리고 독립적인 염료 화합물이며, 즉, 그에 부착되지 않는다. 대안적으로, 염료는 3'-OH 차단기의 모두 또는 부분을 포함할 수 있다. 따라서, R''은 염료 화합물을 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있는 3'-OH 차단기일 수 있다. 추가적인 대안의 실시형태에서, 염료에 부착되는 펜토스 당 및 염료 (또는 염료 및 링커 작제물)의 3' 탄소 상에서 차단기는 없으며, 예를 들어, 3' 부위 이외의 지점으로부터 추가적인 뉴클레오타이드의 혼입에 대한 차단으로서 작용하기에 충분한 크기 또는 구조일 수 있다. 따라서, 차단은 입체 장애에 기인할 수 있거나 또는 크기, 전하 및 구조의 조합에 기인할 수 있다.

[0229] 차단기의 사용은, 예컨대 변형된 뉴클레오타이드가 혼입될 때 연장을 중단시킴으로써 중합이 제어되도록 허용한다. 차단 효과가, 예를 들어 비제한적 예로서, 화학적 조건을 변형시킴으로써 또는 화학적 차단 제거에 의해 가역적이라면, 연장은 특정 지점에서 중단될 수 있고, 계속해서 허용되었다. 3'-OH 차단기의 비제한적 예는 본 명세서에 참고로 포함되는 WO 2004/018497 및 WO2014/139596에 개시된 것을 포함한다. 예를 들어 차단기는 아지도메틸(-CH₂N₃) 또는 치환된 아지도메틸(예를 들어, -CH(CHF₂)N₃ 또는 CH(CH₂F)N₃), 또는 알릴일 수 있다.

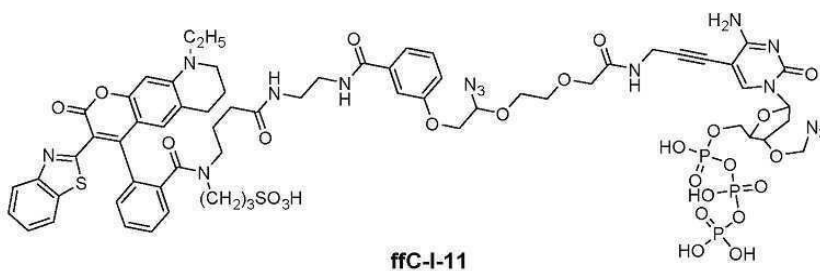
[0230] 특정 실시형태에서, 링커와 차단기가 둘 다 존재하며, 실질적으로 유사한 조건 하에서 둘 다 절단성인 별개의 모이어티이다. 따라서 탈보호 및 탈차단 과정은 더 효율적일 수 있는데, 염료 화합물과 차단기 둘 다를 제거하는 데 단일 처리만이 필요할 것이기 때문이다.

[0231] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 염료 화합물을 혼입시키는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것에 관한 것이다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 포스포다이에스터 결합에 결합된 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드를 각각 포함하는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 천연 유래 뉴클레오타이드, 본 명세서에 기재된 표지된 뉴클레오타이드 이외의 비-천연 유래(또는 변형된) 뉴클레오타이드 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있으며, 단, 본 출원에 따른 염료 화합물로 표지된 적어도 하나의 뉴클레오타이드가 존재한다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 비천연 골격 결합 및/또는 비-뉴클레오타이드 화학적 변형을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 표지된 뉴클레오타이드를 포함하는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드의 혼합물을 포함한 키메라 구조가 또한 상정된다.

[0232] 본 명세서에 기재된 비제한적인 예시적 표지 뉴클레오타이드는 하기를 포함한다:



[0233] 및



[0234]

[0235] 키트

[0236] 본 명세서에 개시된 일부 실시형태는 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료로 표지된 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드를 포함하는 키트이다. 이러한 키트는 일반적으로 적어도 1종의 추가적인 성분과 함께 염료로 표지된 적어도 하나의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드를 포함할 것이다. 추가적인 성분(들)은 추가로 변형된 또는 비변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드일 수 있다. 예를 들어, 염료로 표지된 뉴클레오타이드는 비표지 또는 천연 뉴클레오타이드와 그리고/또는 형광 표지된 뉴클레오타이드 또는 이들의 임의의 조합물과 조합하여 공급될 수 있다. 뉴클레오타이드의 조합은 별개의 개개 성분으로서 또는 뉴클레오타이드 혼합물로서 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하되, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 새로운 형광 화합물로 표지된 뉴클레오타이드이다. 키트는 2 이상의 표지된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드는 2 이상의 형광 표지로 표지될 수 있다. 표지 중 2 이상은 레이저일 수 있는 단일 여기 공급원을 이용하여 여기될 수 있다.

- [0237] 키트는 4개의 뉴클레오타이드를 함유할 수 있으며, 여기서 4개의 뉴클레오타이드 중 제1 뉴클레오타이드는 본 명세서에 개시된 바와 같은 화합물로 표지되고, 제2, 제3 및 제4 뉴클레오타이드는 각각 상이한 화합물로 표지될 수 있고, 각각의 화합물은 별개의 형광 최대값을 가지며, 각각의 화합물은 다른 3가지 화합물과 구별 가능하다. 키트는 2 이상의 화합물이 유사한 흡광도 최대값을 갖지만, 상이한 스토크스 이동을 갖는 것일 수 있다.
- [0238] 본 명세서에 기재된 형광 염료 화합물, 표지된 뉴클레오타이드 또는 키트는 서열분석, 발현 분석, 혼성화 분석, 유전자 분석, RNA 분석 또는 단백질 결합 분석에서 사용될 수 있다. 자동 서열분석 기기 상에서 사용될 수 있다. 서열분석 기기는 상이한 파장에서 작동하는 2가지 레이저를 수용할 수 있다.
- [0239] 키트가 염료 화합물로 표지된 복수의, 특히 2개, 더 특별하게는 4개의 뉴클레오타이드를 포함하는 경우에, 상이한 뉴클레오타이드는 상이한 염료 화합물로 표지될 수 있거나, 또는 염료 화합물을 이용하지 않고 어두워질 수 있다. 상이한 뉴클레오타이드가 상이한 염료 화합물로 표지된 경우에, 이는 상기 염료 화합물이 분광학적으로 구별 가능한 형광 염료인 키트의 특징이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "분광학적으로 구별 가능한 형광 염료"는 2 이상의 이러한 염료가 하나의 샘플에 존재할 때 형광 검출 장비(예를 들어, 상업적 모세관 기반 DNA 서열분석 플랫폼)에 의해 구별될 수 있는 파장에서 형광 에너지를 방출하는 형광 염료를 지칭한다. 형광 염료 화합물로 표지된 2개의 뉴클레오타이드가 키트 형태로 공급될 때, 분광학적으로 구별 가능한 형광 염료 중 2가지는, 예를 들어 일부 실시형태에서 동일한 레이저에 의해 동일한 파장에서 여기될 수 있다. 형광 염료 화합물로 표지된 4개의 뉴클레오타이드가 키트 형태로 공급될 때, 분광학적으로 구별 가능한 형광 염료는 둘 다 하나의 파장에서 여기될 수 있고, 일부 실시형태에서 다른 2가지의 분광학적으로 구별 가능한 염료 염료는 둘 다 다른 파장에서 여기될 수 있다. 특정 여기 파장은 약 460nm이다.
- [0240] 일 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 화합물로 표지된 뉴클레오타이드 및 제2 염료로 표지된 제2 뉴클레오타이드를 포함하되, 염료는 적어도 10nm, 특히 20nm 내지 50nm의 흡광도 최대값의 차이를 가진다. 더 구체적으로는 2개의 염료 화합물은 15 내지 40nm 또는 20 내지 40nm의 스토크스 이동을 가진다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "스토크스 이동"은 동일한 전자 전이의 흡수 스펙트럼의 밴드 최대값 위치와 방출 스펙트럼의 밴드 최대값 위치 사이의 차이이다.
- [0241] 추가 실시형태에서, 상기 키트는 형광 염료로 표지된 2개의 다른 뉴클레오타이드를 추가로 포함하되, 상기 염료는 약 460nm 내지 약 540nm에서 동일한 레이저에 의해 여기된다.
- [0242] 대안의 실시형태에서, 키트는 동일한 염기가 두 상이한 화합물로 표지된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 제1 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 화합물로 표지될 수 있다. 제2 뉴클레오타이드는 분광학적으로 별개인 화합물, 예를 들어 600nm 초과에서 흡수하는 '적색' 염료로 표지될 수 있다. 제2 뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 형광 염료 화합물과 분광학적으로 별개인 화합물의 혼합물로서 표지될 수 있고, 제4 뉴클레오타이드는 '어두울 수 있으며' 표지를 함유하지 않는다. 따라서 단순한 용어에서, 뉴클레오타이드 1 내지 4는 '녹색', '적색', '적색/녹색' 및 어두운 색으로 표지될 수 있다. 기기를 추가로 단순화시키기 위해, 4개의 뉴클레오타이드는 단일 레이저로 여기된 2개의 염료로 표지될 수 있고, 따라서 뉴클레오타이드 1 내지 4의 표지는 '녹색 1', '녹색 2', '녹색 1/녹색 2' 및 어두운 색일 수 있다.
- [0243] 다른 실시형태에서 키트는 폴리뉴클레오타이드 내로 뉴클레오타이드의 혼입을 촉매할 수 있는 중합효소를 포함할 수 있다. 이러한 키트에 포함될 다른 성분은 완충제 등을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료로 표지된 뉴클레오타이드, 및 상이한 뉴클레오타이드의 혼합물을 포함하는 다른 임의의 뉴클레오타이드 성분은 사용하기 전에 희석될 농축 형태로 키트에서 제공될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 적합한 희석 완충제가 또한 포함될 수 있다.
- [0244] 서열분석 방법
- [0245] 본 명세서에 기재된 형광 염료를 포함하는 뉴클레오타이드(또는 뉴클레오사이드)는 그 자체이든 또는 더 큰 분자 구조 또는 접합체 내로 혼입되거나 또는 이와 결합되는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드에 부착된 형광 표지의 검출이 필요한 임의의 분석 방법에서 사용될 수 있다. 본 출원의 일부 실시형태는 하기를 포함하는 서열 분석 방법에 관한 것이다: (a) 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 표지된 뉴클레오타이드를 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입시키는 단계; 및 (b) 상기 변형된 뉴클레오타이드(들)에 부착된 새로운 형광 염료로부터 형광 신호를 검출함으로써 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입된 표지된 뉴클레오타이드(들)를 검출하는 단계.
- [0246] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 표지된 뉴클레오타이드는 중합효소 작용에 의해 합성 단계에서 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입된다. 그러나, 표지된 뉴클레오타이드를 폴리뉴클레오타이드에 혼입시키는 다른 방법, 예컨대

화학적 올리고뉴클레오타이드 합성 또는 표지된 올리고뉴클레오타이드의 비표지 올리고뉴클레오타이드에 대한 결합은 제외되지 않는다. 따라서, 폴리뉴클레오타이드 내로 뉴클레오타이드를 "혼입시키는"이라는 용어는 화학적 방법뿐만 아니라 효소적 방법에 의한 폴리뉴클레오타이드 합성을 포함한다.

[0247] 방법의 모든 실시형태에서, 검출 단계가 수행될 수 있는 한편, 표지된 뉴클레오타이드가 혼입된 폴리뉴클레오타이드 가닥은 주형 가닥으로 어닐링되고, 또는 이후에 2개 가닥이 분리되는 변성 단계가 수행된다. 추가 단계, 예를 들어 화학적 또는 효소적 반응 단계 또는 정제 단계가 합성 단계와 검출 단계 사이에 포함될 수 있다. 특히, 표지된 뉴클레오타이드(들)를 혼입시키는 표적 가닥이 단리되거나 또는 정제될 수 있고, 이어서, 추가로 가공되거나 또는 후속적 분석에서 사용될 수 있다. 예로서, 합성 단계에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 변형된 뉴클레오타이드(들)로 표지된 표적 폴리뉴클레오타이드는 후속적으로 표지된 프로브 또는 프라이머로서 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서 합성 단계 (a)의 생성물은 추가 반응 단계가 실시될 수 있고, 원한다면, 이들 후속 단계의 생성물은 정제되거나 또는 단리된다.

[0248] 합성 단계에 대한 적합한 조건은 표준 분자 생물학 기법에 익숙한 것으로 잘 알려질 것이다. 일 실시형태에서, 합성 단계는 적합한 중합효소의 존재 하에 주형에 상보적인 연장된 표적 가닥을 형성하기 위해 본 개시내용에 따른 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 전구체를 이용하는 표준 프라이머 연장 반응과 유사할 수 있다. 다른 실시형태에서, 합성 단계는 표적 및 주형 폴리뉴클레오타이드의 복제로부터 유래된 어닐링된 상보성 가닥을 포함한 표지된 이중 가닥 증폭 산물을 생성하는 증폭 반응의 부분을 그 자체로 형성할 수 있다. 다른 예시적인 "합성" 단계는 튜 번역, 가닥 변위 중합, 무작위 프라이밍 DNA 표지 등을 포함한다. 합성 단계에서 사용되는 중합효소는 본 개시내용에 따른 변형된 뉴클레오타이드의 혼입을 촉매할 수 있어야 한다. 다르게는, 중합효소의 정확한 특성은 특히 제한되지 않지만, 합성 반응의 조건에 의존할 수 있다. 예로서, 합성 반응이 열순환을 이용하여 수행된다면, 열안정성 중합효소가 필요한 반면, 이는 표준 프라이머 연장 반응에 필수적이지 않을 수도 있다. 본 개시내용에 따른 변형된 뉴클레오타이드를 혼입할 수 있는 적합한 열안정성 중합효소는 WO 2005/024010 또는 WO 2006/120433에 기재된 것을 포함한다. 더 낮은 온도, 예컨대 37°C에서 수행된 합성 반응에서, 중합효소는 반드시 열안정성 중합효소일 필요는 없으며, 따라서, 다수의 인자, 예컨대 반응 온도, pH, 가닥-변위 활성 등에 의존할 것이다.

[0249] 특정 비제한적 실시형태에서, 본 출원에 따른 더 스토크스 이동을 갖는 새로운 형광 염료로 표지된 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드는 핵산 서열분석, 재서열분석, 전체 게놈 서열분석, 단일 뉴클레오타이드 다형성 스코어링, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 때 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 검출을 수반하는 임의의 다른 적용, 또는 본 출원에 따른 형광 염료를 포함하는 변형된 뉴클레오타이드로 표지된 폴리뉴클레오타이드의 사용을 필요로 하는 임의의 다른 적용 방법에서 사용될 수 있다.

[0250] 특정 실시형태에서, 본 출원은 폴리뉴클레오타이드 "합성에 따른 서열분석"에서 본 명세서에 기재된 염료 화합물을 포함하는 변형된 뉴클레오타이드의 용도를 제공한다. 합성에 따른 서열분석은 일반적으로 서열분석될 주형 핵산에 상보적인 연장된 폴리뉴클레오타이드 쇄를 형성하기 위해 중합효소 또는 리가제를 이용하여 5'에서 3' 방향으로 늘어나는 폴리뉴클레오타이드 쇄에 대한 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 순차적 첨가를 수반한다. 첨가된 뉴클레오타이드(들) 중 하나 이상에 존재하는 염기의 동일성은 검출 또는 "영상화" 단계에서 결정된다. 첨가된 염기의 동일성은 각각의 뉴클레오타이드 혼입 단계 후에 결정될 수 있다. 이어서, 주형의 서열은 통상적인 왓슨-크릭 염기쌍 규칙을 이용하여 부여될 수 있다. 단일 염기의 동일성 결정을 위해 본 개시내용에 따른 염료로 표지된 변형된 뉴클레오타이드의 용도는, 예를 들어, 단일 뉴클레오타이드 다형성의 스코어링에서 유용할 수 있으며, 이러한 단일 염기 연장 반응은 본 출원의 범주 내이다.

[0251] 실시형태에서, 주형 폴리뉴클레오타이드의 서열은 혼입된 뉴클레오타이드(들)에 부착된 형광 표지(들)의 검출을 통해 서열분석될 주형 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 초기 가닥 내로의 하나 이상의 뉴클레오타이드 혼입을 검출함으로써 결정된다. 주형 폴리뉴클레오타이드의 서열분석은 적합한 프라이머로 프라이밍되고(또는 헤어핀의 부분으로서 프라이머를 함유할 헤어핀 작제물로서 제조됨), 초기 쇄는 중합효소 촉매 반응에서 프라이머의 3' 말단에 대한 뉴클레오타이드의 첨가에 의해 단계적 방식으로 연장된다.

[0252] 특정 실시형태에서, 각각의 상이한 뉴클레오타이드 삼인산염(A, T, G 및 C)은 독특한 형광단으로 표지될 수 있고, 또한 비제어 중합을 방지하기 위해 3' 위치에서 차단기를 포함한다. 대안적으로, 4개의 뉴클레오타이드 중 하나는 비표지(어두운 색)일 수 있다. 중합효소는 주형 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 초기 쇄 내로 뉴클레오타이드를 혼입시키고, 차단기는 뉴클레오타이드의 추가적인 혼입을 방지한다. 임의의 비혼입 뉴클레오타이드는 제거되며, 각각의 혼입된 뉴클레오타이드로부터의 형광 신호는 적합한 수단, 예컨대 레이저 여기 및 적합한 방

출 필터를 이용하는 전하 결합 소자에 의해 광학적으로 "판독"된다. 이어서, 3'-차단기 및 형광 염료 화합물은, 추가적인 뉴클레오타이드 혼입에 대해 초기 쇄를 노출시키기 위해 특히 동일한 화학적 또는 효소적 방법에 의해 제거된다(탈보호된다). 전형적으로, 혼입된 뉴클레오타이드의 동일성은 각각의 혼입 단계 후에 결정될 것이지만, 이는 엄격하게 필수적이지 않다. 유사하게, 미국 특허 제5,302,509호는 고체 지지체 상에 고정된 폴리뉴클레오타이드를 서열분석하는 방법을 개시한다. 상기 방법은 DNA 중합효소의 존재 하에서 고정된 폴리뉴클레오타이드에 상보성인 점점 늘어나는 가닥 내로의 형광 표지된, 3'-차단된 뉴클레오타이드 A, G, C 및 T의 혼입에 의존한다. 중합효소는 표적 폴리뉴클레오타이드에 상보성인 염기를 혼입하지만, 3'-차단기에 의한 추가적인 첨가로부터 방지된다. 이어서, 혼입된 뉴클레오타이드의 표지는 결정될 수 있으며, 차단기는 추가적인 중합이 일어나도록 화학적 절단에 의해 제거될 수 있다. 합성 반응에 따른 서열분석에서 서열분석될 핵산 주형은 서열분석이 요망되는 임의의 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 서열분석 반응을 위한 핵산 주형은 전형적으로 서열분석 반응에서 추가적인 뉴클레오타이드의 첨가를 위한 프라이머 또는 개시 지점으로서 작용하는 유리 3' 하이드록실기를 갖는 이중 가닥 영역을 포함할 것이다. 서열분석될 주형의 영역은 상보성 가닥 상에서 이런 유리 3' 하이드록실기를 돌출시킬 것이다. 서열분석될 주형의 돌출 영역은 단일 가닥일 수 있지만, 이중 가닥일 수 있고, 단, "틈"은 서열분석 반응의 개시를 위해 유리 3' OH 기를 제공하도록 서열분석될 주형 가닥에 상보성인 가닥 상에 존재한다. 이러한 실시형태에서, 서열분석은 가닥 변위에 의해 진행될 수 있다. 특정 실시형태에서, 유리 3' 하이드록실기를 보유하는 프라이머는 서열분석될 주형의 단일 가닥 영역에 혼성화하는 별개의 성분(예를 들어, 짧은 올리고뉴클레오타이드)으로서 첨가될 수 있다. 대안적으로, 서열분석될 프라이머 및 주형 가닥은 각각 분자내 이중가닥, 예컨대 헤어핀 루프 구조를 형성할 수 있는 부분적으로 자기-상보성인 핵산 가닥의 부분을 형성할 수 있다. 헤어핀 폴리뉴클레오타이드 및 이들이 고체 지지체에 부착될 수 있는 방법은 국제 특허 출원 공개 WO 2001/057248 및 WO 2005/047301에 개시되어 있다. 뉴클레오타이드는 유리 3'-하이드록실기에 연속해서 첨가되어, 5'에서 3' 방향으로 폴리뉴클레오타이드 쇄의 합성을 초래한다. 첨가된 염기의 특성은, 특히 반드시 각각의 뉴클레오타이드 첨가 후는 아니지만, 결정될 수 있으며, 따라서 핵산 주형에 대한 서열 정보를 제공한다. 본 내용에서 핵산 가닥(또는 폴리뉴클레오타이드) 내로 뉴클레오타이드의 "혼입"이라는 용어는 뉴클레오타이드의 5' 인산염기와 포스포다이에스터 결합의 형성을 통한 핵산 가닥의 유리 3' 하이드록실기에 대한 뉴클레오타이드의 결합을 지칭한다.

[0253] 서열분석될 핵산 주형은 DNA 또는 RNA, 또는 심지어 데옥시뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함한 혼성 분자일 수 있다. 핵산 주형은 천연 유래 및/또는 비천연 유래 뉴클레오타이드 및 천연 또는 비천연 골격 결합을 포함할 수 있으며, 단, 이들은 서열분석 반응에서 주형의 복제를 방지하지 않는다.

[0254] 특정 실시형태에서, 서열분석될 핵산 주형은 당업계에 공지된 임의의 적합하나 결합 방법을 통해, 예를 들어, 공유적으로 부착을 통해 고체 지지체에 부착될 수 있다. 특정 실시형태에서, 주형 폴리뉴클레오타이드는 고체 지지체(예를 들어, 실리카계 지지체)에 직접 부착될 수 있다. 그러나, 다른 실시형태에서, 고체 지지체의 표면은 주형 폴리뉴클레오타이드의 직접 공유적으로 부착을 허용하기 위해 또는 그 자체가 고체 지지체에 비공유적으로 부착될 수 있는 하이드로겔 또는 고분자전해질을 통해 주형 폴리뉴클레오타이드를 고정시키기 위해 일부 방법에서 변형될 수 있다.

[0255] 폴리뉴클레오타이드가 실리카계 지지체에 직접 부착된 어레이는, 예를 들어 국제 특허 출원 WO 2000/006770에 개시된 것이 되, 폴리뉴클레오타이드는 유리 상의 현수 에폭사이드기와 폴리뉴클레오타이드 상의 내부 아민기 간의 반응에 의해 유리 지지체 상에 고정된다. 추가로, 국제 특허 출원 공개 WO2005/047301은, 예를 들어 황계 친핵체와 고체 지지체와의 반응에 의한, SMA의 제조에서 사용하기 위한 고체 지지체에 부착된 폴리뉴클레오타이드의 어레이를 개시한다. 고체-지지된 주형 폴리뉴클레오타이드의 또한 추가적인 예는 실리카계 또는 다른 고체 지지체 상에서 지지된 하이드로겔에 부착되는 경우이다. 실리카계 지지체는 전형적으로 국제 특허 출원 공개 WO 00/31148, WO 01/01143, WO02/12566, WO 03/014392, WO 00/53812 및 미국 특허 제6,465,178호에 기재된 바와 같은 하이드로겔 및 하이드로겔 어레이를 지지하기 위해 사용된다.

[0256] 주형 폴리뉴클레오타이드가 고정될 수 있는 특정 표면은 폴리아크릴아마이드 하이드로겔이다. 폴리아크릴아마이드 하이드로겔은 선행기술에 기재되어 있으며, 이 중 일부는 상기 논의된다. 본 출원에서 사용될 수 있는 특정 하이드로겔은 WO 2005/065814 및 미국 특허 공개 제2014/0079923호에 기재된 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 하이드로겔은 PAZAM(폴리(N-(5-아지도아세트아미드)펜틸) 아크릴아마이드-코-아크릴아마이드)이다.

[0257] DNA 주형 분자는, 예를 들어 미국 특허 제6,172,218호에 기재된 바와 같은 서열분석 목적을 위해 비드 또는 마이크로입자에 부착될 수 있다. 각각의 비드가 상이한 DNA 서열을 함유하는 비드 라이브러리 제조의 추가적인 예는 문헌[Margulies *et al.*, Nature 437, 376-380 (2005); Shendure *et al.*, Science. 309(5741):1728-1732

(2005)]에서 발견할 수 있다. 기재한 바와 같은 뉴클레오타이드를 이용하는 이러한 비드의 어레이의 서열분석은 본 출원의 범주 내이다.

[0258] 서열분석될 주형(들)은 고체 지지체 상의 "어레이"의 부분을 형성할 수 있으며, 이 경우에 어레이는 임의의 편리한 형태를 취할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 방법은 단일 분자 어레이, 클러스터링된 어레이 및 비드 어레이를 포함하는 모든 유형의 "고밀도" 어레이에 적용 가능하다. 본 출원의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오타이드는 고체 지지체, 더 구체적으로는 임의의 유형의 고밀도 어레이 상에서 핵산 분자의 고정에 의해 형성되는 본질적으로 임의의 유형의 어레이 상의 주형의 서열분석을 위해 사용될 수 있다. 그러나, 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료로 표지된 변형된 뉴클레오타이드는 클러스터링된 어레이의 서열분석과 관련하여 특히 유리하다.

[0259] 다중-폴리뉴클레오타이드 또는 클러스터링된 어레이에서, 어레이 상의 별개의 영역은 다중 폴리뉴클레오타이드 주형 분자를 포함한다. 용어 "클러스터링 어레이"는 어레이 상의 별개의 영역 또는 부위가 광학 수단에 의해 개별적으로 분해 가능하지 않은 다중 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는 어레이를 지칭한다. 어레이가 형성되는 방법에 따라서, 어레이 상의 각각의 부위는 하나의 개개 폴리뉴클레오타이드 분자의 다중 복제물 또는 심지어 소수의 상이한 폴리뉴클레오타이드 분자의 다중 복제물(예를 들어, 2개의 상보성 핵산 가닥의 다중 복제물)을 포함할 수 있다. 핵산 분자의 다중-폴리뉴클레오타이드 또는 클러스터링된 어레이는 당업계에 일반적으로 공지된 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 예로서, WO 98/44151과 WO 00/18957은 둘 다 핵산의 증폭 방법을 기재하되, 주형과 증폭 산물은 둘 다 고정된 핵산 분자의 클러스터 또는 "콜로니"를 포함한 어레이를 형성하기 위해 고체 지지체 상에서 고정된 채로 남아있다. 이들 방법에 따라 제조되는 클러스터링된 어레이 상에 존재하는 핵산 분자는 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료로 표지된 변형된 뉴클레오타이드를 이용하는 서열분석을 위한 적합한 주형이다.

[0260] 본 출원의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오타이드는 또한 단일 분자 어레이 상에서의 주형의 서열분석에서 유용하다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "단일 분자 어레이" 또는 "SMA"는 고체 지지체 위로 분포된(또는 어레이된) 폴리뉴클레오타이드 분자의 집단을 지칭하되, 모든 다른 집단으로부터의 임의의 개개 폴리뉴클레오타이드의 간격은 폴리뉴클레오타이드의 개개 분해를 달성할 수 있도록 한다. 따라서 고체 지지체의 표면 상에 고정된 표적 핵산 분자는 광학 수단에 의해 분해될 수 있어야 한다. 이는 사용되는 특정 영상화 장치의 분해 가능한 영역 내에서, 각각 하나의 폴리뉴클레오타이드를 나타내는 하나 이상의 별개의 신호가 있어야 한다는 것을 의미한다.

[0261] 이는 달성될 수 있되, 어레이 상의 인접한 폴리뉴클레오타이드 분자 사이의 간격은 적어도 100nm, 더 구체적으로는 적어도 250nm, 훨씬 더 구체적으로는 적어도 300nm, 더욱 더 구체적으로는 적어도 350nm이다. 따라서, 각각의 분자는 단일 분자 형광 지점으로서 개별적으로 분해 가능하고 검출가능하며, 상기 단일 분자 형광 지점으로부터의 형광은 또한 단일 단계 광표백을 나타낸다.

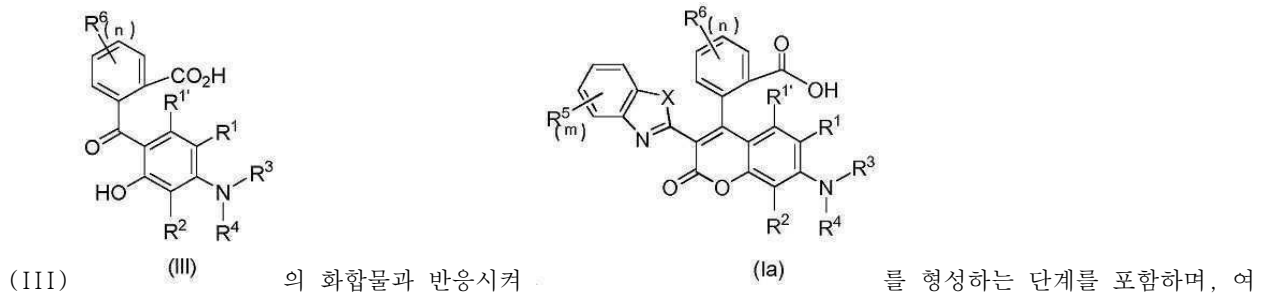
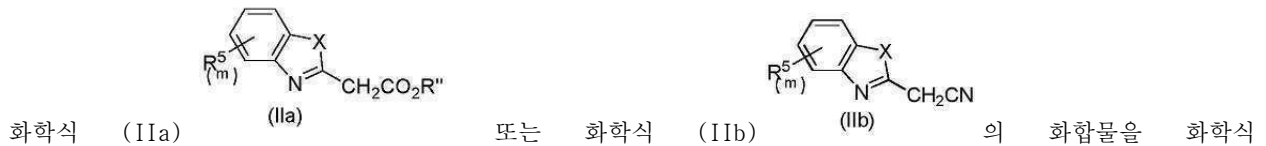
[0262] 용어 "개별적으로 분해된" 그리고 "개개의 분해"는 시각화될 때 그의 이웃하는 분자로부터의 어레이 상의 하나의 분자를 구별할 수 있다는 것을 구체화하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 어레이 상의 개개 분자의 분리는 개개 분자를 분해시키기 위해 사용되는 특정 기법에 의해 부분적으로 결정될 것이다. 단일 분자 어레이의 일반적 특징은 국제 특허 출원 공개 WO 2000/006770 및 WO 2001/057248을 참고로 하여 이해될 것이다. 본 개시내용의 변형된 뉴클레오타이드의 한 가지 적용은 합성 반응에 따른 서열분석이지만, 이러한 표지된 뉴클레오타이드의 효용은 이러한 방법으로 제한되지 않는다. 사실, 뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드에 혼입된 뉴클레오타이드에 부착된 형광 표지의 검출을 필요로 하는 임의의 서열분석 방법에서 유리하게 사용될 수 있다.

[0263] 특히, 본 출원의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오타이드는 자동 형광 서열분석 프로토콜, 특히, 생어 및 공동작업자의쇄 종결 서열분석 방법에 기반한 형광 염료 종결자 순환 서열분석에서 사용될 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 프라이머 연장 서열분석 반응에서 형광 표지된 다이데옥시뉴클레오타이드를 혼입시키기 위해 효소 및 순환 서열분석을 사용한다. 소위 생어 서열분석 방법, 및 관련된 프로토콜(생어 유형)은 표지된 다이데옥시뉴클레오타이드에 의한 무작위쇄 종결에 의존한다.

[0264] 따라서, 본 개시내용은 또한 3'과 2' 위치 둘 다에서 하이드록실기가 없는 다이데옥시뉴클레오타이드인 본 명세서에 기재된 바와 같은 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오타이드를 포함하며, 이러한 변형된 다이데옥시뉴클레오타이드는 생어 유형 서열분석 방법 등에서 사용하기에 적합하다.

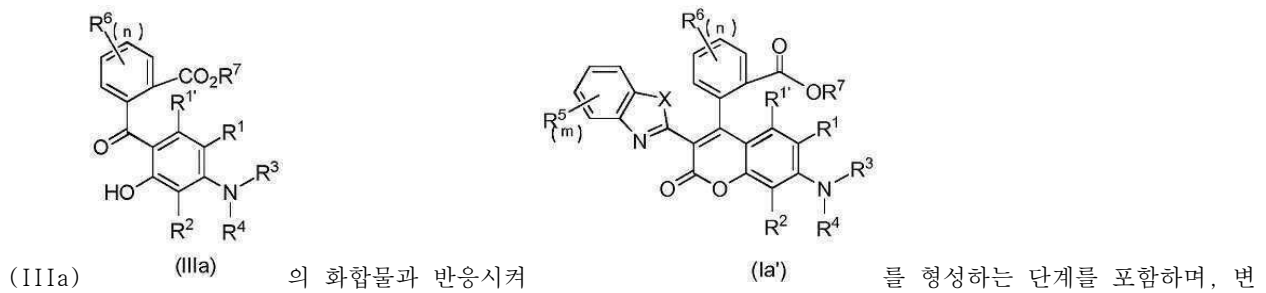
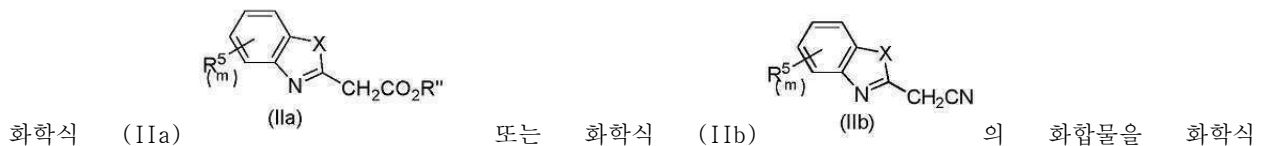
[0265] 제조 방법

[0266] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 화학식 (Ia)의 화합물의 제조 방법에 관한 것이며, 상기 방법은



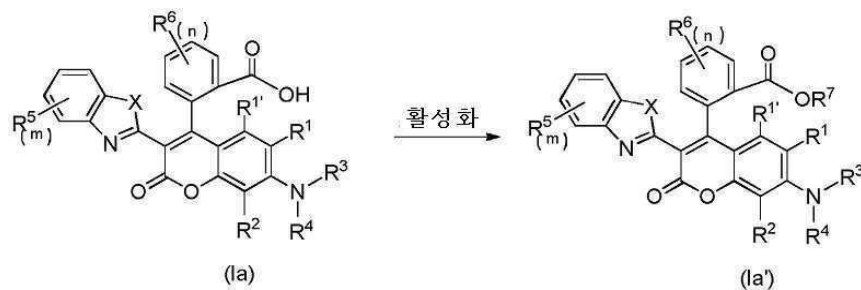
기서, 변수 R^1 , $R^{1'}$, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , X , m 및 n 은 화학식 (I)의 화합물의 개시내용에서 상기 정의되고, 그리고 R'' 는 H, 선택적으로 치환되는 알킬, 알켄일, 알킨일, 아미노알킬, 할로알킬, 헤테로알킬, 알콕시알킬, 설포, 선택적으로 치환되는 아릴; 선택적으로 치환되는 헤테로아릴, 선택적으로 치환되는 카보사이클릴, 및 선택적으로 치환되는 헤테로사이클릴로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0267] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 화학식 (Ia')의 화합물의 제조 방법에 관한 것이며, 상기 방법은



수 R^1 , $R^{1'}$, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R'' , X , m 및 n 은 상기 정의된다.

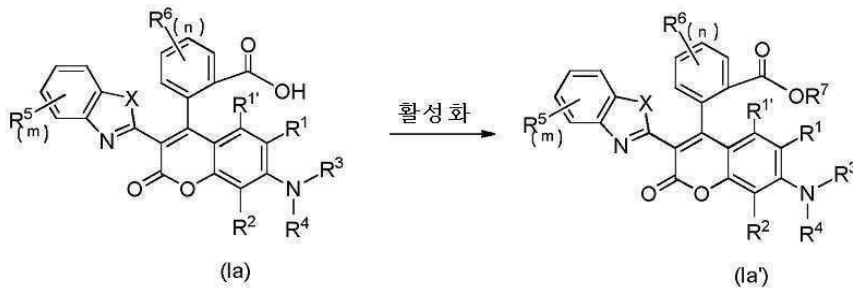
[0268] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 화학식 (Ia')의 화합물의 제조 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 카복실산 활성화를 통해 화학식 (Ia)의 화합물을 화학식 (Ia')의 화합물로 전환시키는 단계를 포함한다:



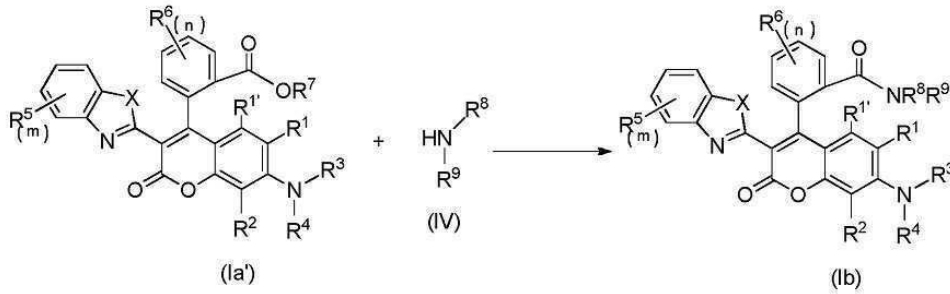
[0269]

[0270] 여기서, 변수 R^1 , $R^{1'}$, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , X , m 및 n 은 화학식 (I)의 화합물의 개시내용에서 상기 정의된다.

[0271] 본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 화학식 (Ib)의 화합물의 제조 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 카복실산 활성화를 통해 화학식 (Ia)의 화합물을 화학식 (Ia')의 화합물로 전환시키는 단계:

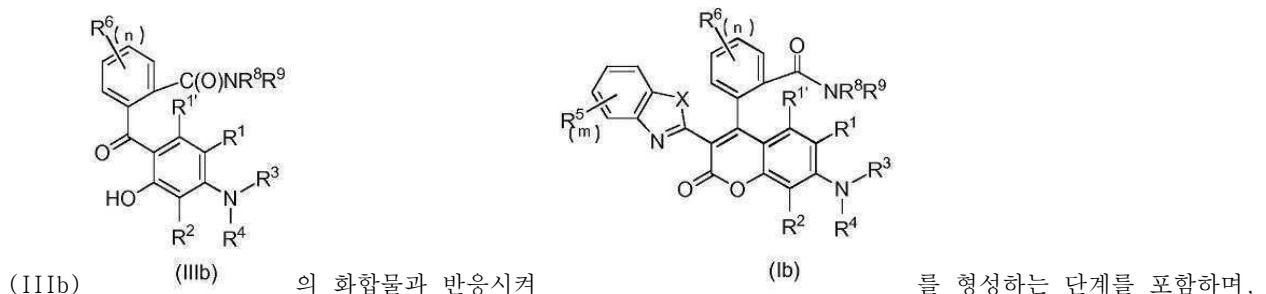
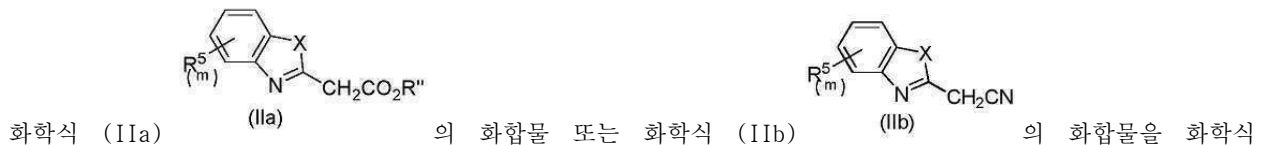


화학식 (Ia')의 화합물을 화학식 (IV)의 1차 또는 2차 아민과 반응시키는 단계를 포함한다,



여기서, 변수 R^1 , $R^{1'}$, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , X , m 및 n 은 화학식 (I)의 화합물의 개시내용에서 상기 정의된다.

본 명세서에 기재된 일부 추가적인 실시형태는 화학식 (Ib)의 화합물의 제조 방법에 관한 것이며, 상기 방법은



여기서, 변수 R^1 , $R^{1'}$, R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R'' , X , m 및 n 은 상기 정의된다.

화학식 (Ia)의 화합물의 제조는 촉매와 함께 또는 촉매 없이 유기 용매 중에서 화학식 (IIa) 또는 (IIb)의 출발 물질을 화학식 (III)의 중간체 화합물과 바람직하게는 1 대 1 몰비로 반응시킴으로써 달성될 수 있다. 유기 촉매(예를 들어, 트라이플루오로아세트산 또는 메탄설폰산)와 무기 촉매(예를 들어, 인산 또는 황산)가 둘 다 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제조는 용매 없이 또는 용매로서 촉매를 이용하여 충족될 수 있다.

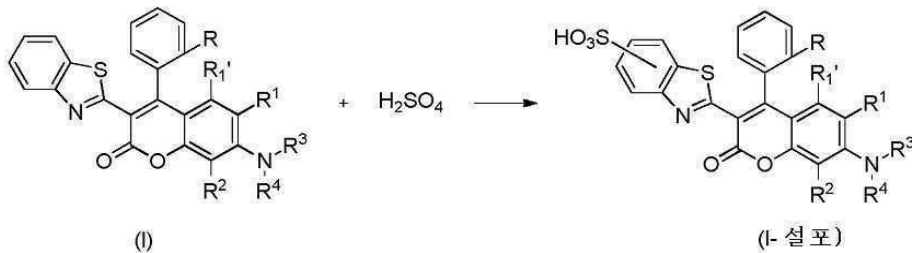
화학식 (Ia') 또는 (Ib)의 제조는, 예를 들어, 활성화 시약으로서 카보다이이미드, 0-(벤조트라이아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸유로프 염, BOP 또는 PyBOP를 이용하는 실온에서 유기 용매 중의 화학식 (Ia)의 출발 물질의 제1 산 활성화, 다음에 결합 단계를 위해 화학식 (IV)의 적절한 하이드록시 유도체 HOR^7 또는 아민과의 반응에 의해 달성될 수 있다.

화학식 (V), (Va) 또는 (Vb)의 화합물은 화학식 (Ia), (Ia') 또는 (Ib)의 화합물의 제조에서 상기 기재한 바와 유사한 합성 반응식에 따라 제조될 수 있다.

화학식 (I)의 화합물은 일부 유기 반응에서, 예를 들어 신규한 염료 합성을 위한 출발 물질로서 친핵성 방향족 치환 반응에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 설포닐화 반응에 의한 일부 시아닌 염료 분자 변형이 이러한 유도체

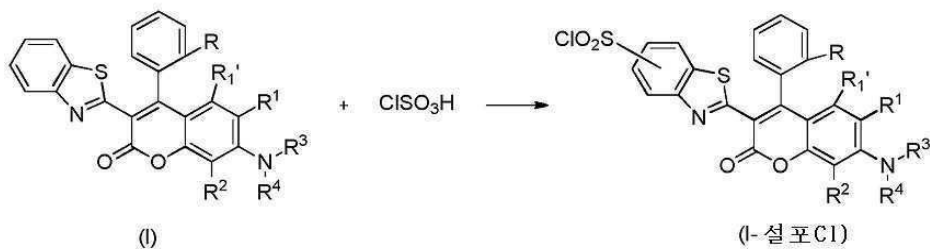
의 형광 특성을 개선시킬 수 있다는 것은 이전에 문헌[Alan S. Waggoner (*Bioconjugate Chemistry*, 1993, 4(2):105-111)]에 의해 입증되었고; 또한 미국 특허 공개 제2015/0274976호를 참조한다.

[0281] 화합물 (I)의 설폰화는, 예를 들어 황산 중에서 삼산화황과 삼산화황 유도체 또는 용액과의 반응에 의해 충족될 수 있다,



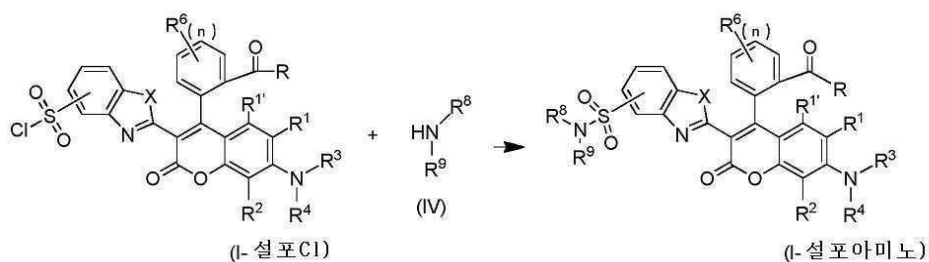
[0282]

[0283] 화합물 (I)의 황 염소화는 클로로설폰산과의 반응에 의해 충족될 수 있다.



[0284]

[0285] 설폰산- 또는 클로로설폰산기를 함유하는 화학식 (I)의 화합물은, 예를 들어, 암모니아, 1차- 또는 2차 아민 화학식 (IV)와 반응시킴으로써 추가로 변형될 수 있다:



[0286]

[0287] 여기서, 변수 R¹, R^{1'}, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, X, n은 화학식 (I)의 화합물의 개시내용에서 상기 정의된다.

[0288]

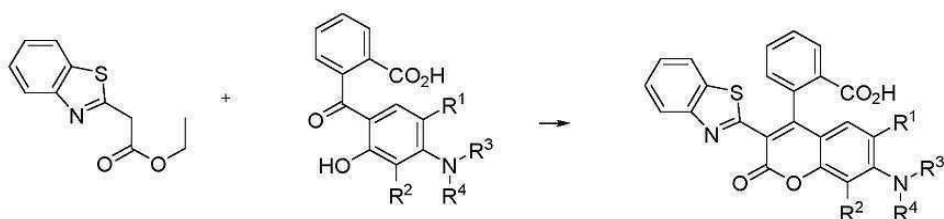
실시예

[0289]

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

[0290]

화학식 (Ia)의 화합물의 합성을 위한 일반적 절차



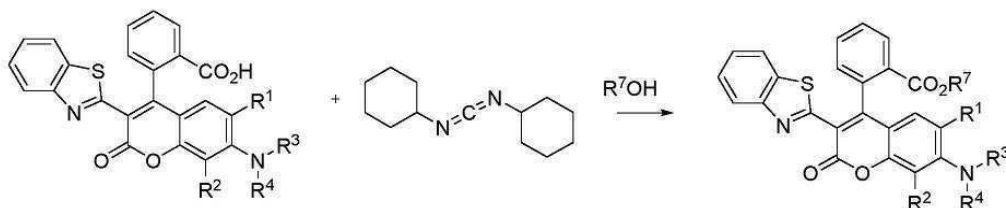
[0291]

[0292]

에틸 벤조티아졸릴-2 아세트산(2.2 g, 0.01mol)과 하이드록시 벤조일 벤조산의 적절한 유도체(0.011mol)의 혼합물을 진한 황산(5ml) 중에 용해시켰다. 이 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반시키고 그리고, 이어서, 반응이 완료될 때까지, 예를 들어, 80 내지 120℃에서 1 내지 2시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 얼음(약 50g)

에 붓고 나서, 생성물을 여과 후, 물로 세척하였다. 다수의 경우에, 최종 생성물은 어떠한 추가적인 정제도 필요로 하지 않는다.

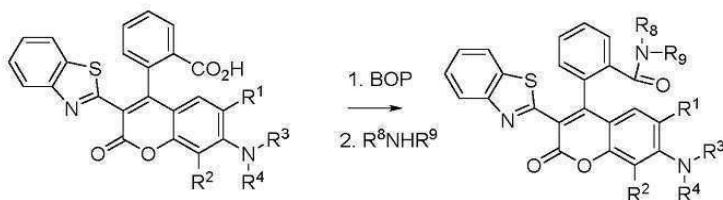
[0293] 화학식 (Ia')의 화합물의 합성을 위한 일반적 절차



[0294]

[0295] 화학식 (Ia)의 화합물(0.001mol)을 무수 DMF(1.5ml) 중에 용해시켰다. 이 용액에 카보다이이미드(0.0012mol) 또는 다른 활성화 시약을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반시키고, 그리고, 이어서, 적절한 하이드록시 유도체 R^7OH 를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반시키고, 이어서, 여과 후 얼음(약 50g)에 부었다. 생성물을 여과시키고 나서, 물로 세척하였다. 수율: 55-75%. 다수의 경우에, 최종 생성물은 어떠한 추가적인 정제도 필요로 하지 않는다.

[0296] 화학식 (Ib)의 화합물의 합성을 위한 일반적 절차

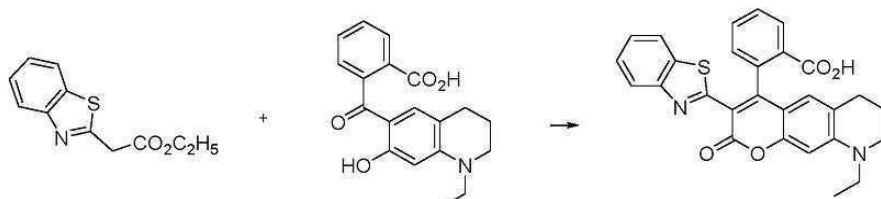


[0297]

[0298] 화학식 (Ia)의 화합물(0.001mol)을 적합한 무수 유기 용매(DMF, 1.5ml) 중에 용해시켰다. 이 용액에 활성화 시약으로서 TSTU, BOP 또는 PyBOP를 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온에서 약 20분 동안 교반시키고, 이어서, 적절한 아민 NHR^8R^9 를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반시키고, 여과 후, 수 중 0.1M TEAB 용액을 이용하여 과량의 활성화 시약을 킁칭시켰다. 용매를 진공에서 증발시키고 나서, 잔사를 HPLC에 의해 정제하였다. 수율: 65 내지 75%.

[0299] 실시예 1

[0300] 2-[3-(벤조티아졸-2-일)-9-에틸-2-옥소-6,7,8,9-테트라하이드로-2H-피라노[3,2-g]퀴놀린-4-일]벤조산(화합물 I-3)



[0301]

[0302] 황산(2ml)을 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 이어서, 0 내지 5℃로 냉각시키고 나서, 0.325g(1.0mmol, 1 eq)의 2-(1-에틸-7-하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로퀴놀린-6-카보닐)벤조산을 교반시키면서 첨가한 후, 0.3g(1.4mmol, 1.4 eq) 에틸 2-(벤조티아졸-2-일)아세테이트를 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 30분 동안 교반시키고, 이어서, 1.5시간 동안 가열하는 한편, 100℃에서 교반시켰다. 반응 진행을 TLC(DCM-MeOH, 10%)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[0303] 반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 0.5시간 동안 두고, 이어서, 분쇄된 얼음(약 100g)과 아세트산나트륨(약 5g)의 혼합물에 부었다. 1시간 후에 생성물을 여과시키고 중성까지 물로 세척하고, 이어서, 여과액을 공기 건조시켰다. 수율: 0.35g(0.73mmol, 73%). 최종 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS (DUIS): MW 계산치 482.13. 실측치: (-) 481 (M-1), (+) 483 (M+1). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.71 (s, 1H), 8.11 - 8.02 (m, 1H), 7.96 (dd, J = 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7.56 (tt, J = 7.5, 5.8 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.39 - 7.25

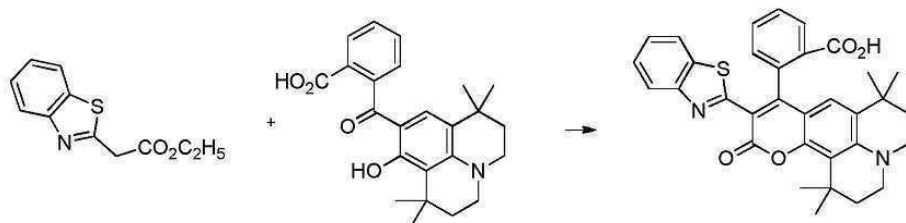
(m, 2H), 7.16 (dd, $J = 6.6, 2.1$ Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 3.48 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.36 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.65 - 2.55 (m, 2H), 1.79 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.15 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

[0304]

실시예 2

[0305]

2-[10-(벤조티아졸-2-일)-1,1,7,7-테트라메틸-11-옥소-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일]벤조산(화합물 I-5)



[0306]

[0307]

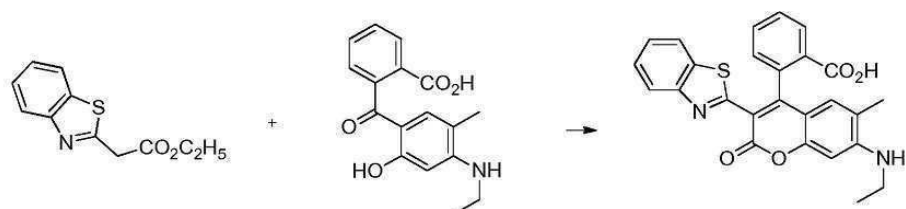
0.75g(1.90mmol, 1 eq)의 2-(8-하이드록시-1,1,7,7-테트라메틸-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H-피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-카보닐)벤조산과 0.44g(1.99mmol, 1.04 eq) 에틸 2-(벤조티아졸-2-일)아세테이트의 혼합물을 실온에서(약 20℃) 진한 황산(7ml)에 교반시키면서 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반시키고, 이어서, 2.5시간 동안 가열하는 한편, 120℃에서 교반시켰다. 반응 진행을 TLC(DCM-MeOH, 10%)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다. 반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 0.5시간 동안 두고, 이어서, 분쇄 얼음(약 50g)과 아세트산나트륨(약 5g)의 혼합물에 부었다. 1시간 후에 생성물을 여과시키고 중성까지 물로 세척하고 공기 건조시켰다. 수율: 0.58g(1.05mmol, 55%). 최종 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS (DUIS): MW 계산치 550.19. 실측치: (-) 549 (M-1).

[0308]

실시예 3

[0309]

2-[3-(벤조티아졸-2-일)-7-(에틸아미노)-6-메틸-2-옥소-2H-크로멘-4-일]벤조산(화합물 I-8)



[0310]

[0311]

황산(5ml)을 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 이어서, 약 0 내지 5℃로 냉각시키고 나서, 0.7g(2.34mmol, 1 eq)의 2-(4-(에틸아미노)-2-하이드록시-5-메틸벤조일)벤조산을 교반시키면서 첨가한 후 0.7g(3.16mmol, 1.35 eq) 에틸 2-(벤조티아졸-2-일)아세테이트를 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 30분 동안 교반시키고 나서, 이어서, 1시간 동안 가열하는 한편, 95℃에서 교반시켰다. 반응 진행을 TLC(DCM-MeOH, 10%)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[0312]

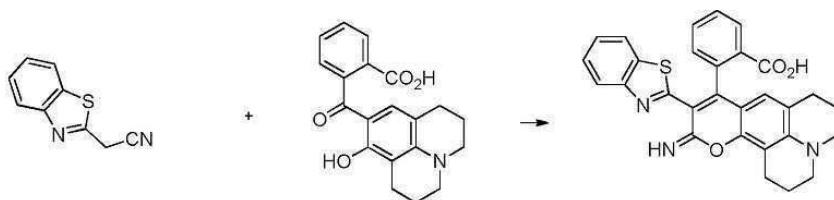
반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 0.5시간 동안 두고, 이어서, 분쇄 얼음(약 100g)과 아세트산나트륨(약 5g)의 혼합물에 부었다. 1시간 후에 생성물을 여과시키고 중성까지 물로 세척하고 공기 건조시켰다. 수율: 1.01g(2.22mmol, 95%). 최종 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS (DUIS): MW 계산치 456.11. 실측치: (-) 455 (M-1), (+) 457 (M+1). ^1H NMR (400 MHz, 메탄올- d_4) δ 8.19 - 8.12 (m, 1H), 7.92 - 7.78 (m, 1H), 7.64 (dd, $J = 8.3, 1.1$ Hz, 1H), 7.61 - 7.48 (m, 2H), 7.43 - 7.36 (m, 1H), 7.36 - 7.26 (m, 1H), 7.21 - 7.14 (m, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.56 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 3.41 - 3.34 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.38 - 1.27 (m, 3H).

[0313]

실시예 4-1

[0314]

2-[10-(벤조티아졸-2-일)-11-이미노-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일]벤조산(화합물 I-4A)



[0315]

[0316]

이어서, 황산(10ml)을 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 이어서, 1g(2.96mmol, 1 eq)의 2-(8-하이드록시-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H-피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-카보닐)벤조산을 교반시키면서 첨가한 후에 0.57g(3.26mmol, 1.1 eq) 2-(벤조티아졸-2-일)아세트나이트릴을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 30분 동안 교반시키고, 이어서, 1.5시간 동안 가열하는 한편, 80℃에서 그리고 90℃에서 1시간 동안 교반시켰다. 반응 진행을 TLC(DCM-MeOH, 10%)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[0317]

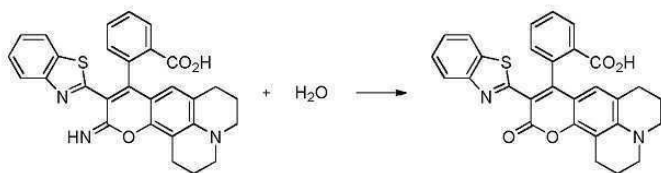
반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 0.5시간 동안 두고, 이어서, 분쇄 얼음(약 100g)의 혼합물에 부었다. 0.5시간 후에 생성물을 여과시키고, 중성까지 물로 세척하고 공기 건조시켰다. 수율: 0.8g(1.62mmol, 55 %). 최종 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS (DUIS): MW 계산치 493.15. 실측치: (-) 492 (M-1), (+) 494 (M+1).

[0318]

실시예 4-2

[0319]

2-[10-(벤조티아졸-2-일)-11-옥소-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일]벤조산(화합물 I-4).



[0320]

[0321]

이전의 단계(실시예 4-1)로부터의 이민(I-4A) 및 물(25ml)의 현탁액을 5시간 동안 80℃에서 교반시켰다. 이 시간의 마지막에, 출발 물질의 적색은 거의 사라졌고, 매우 강한 형광이 생겼다. 반응 진행을 TLC(DCM-MeOH, 10 %)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다. 반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 0.5시간 동안 두고, 이어서, 생성물을 여과시키고, 물로 세척하고 나서, 공기 건조시켰다. 수율: 0.77g(1.56mmol, 96%). The 최종 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS (DUIS): MW 계산치 494.13. 실측치: (-) 493 (M-1), (+) 495 (M+1).

[0322]

실시예 5

[0323]

2-[10-(벤조티아졸-2-일)-11-옥소-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일]벤조산(화합물 I-4).



[0324]

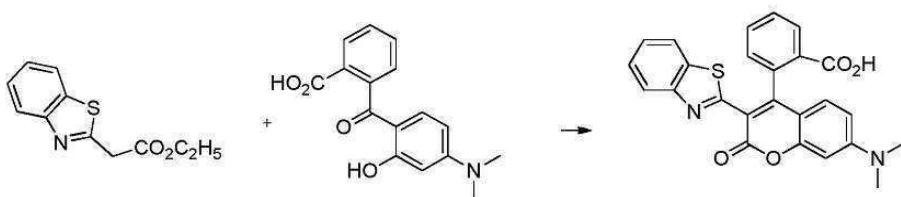
[0325]

황산(10ml)을 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 이어서, 1g(2.96mmol, 1 eq)의 2-(8-하이드록시-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H-피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-카보닐)벤조산을 교반시키면서 첨가한 후에, 0.57g(3.26mmol, 1.1 eq)의 2-사이아노메틸벤조티아졸을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 30분 동안 교반시키고, 이어서, 2 시간 동안 가열하는 한편, 95℃에서 교반시켰다. 반응 혼합물을 실온(약 20℃)으로 냉각시킨 채로 두고, 이어서, 물과 분쇄 얼음(약 75g)의 혼합물에 부었다. 이 혼합물을 밤새 교반시키고, 실온에서 생성물을 여과시키고 중성까지 물로 세척하고 공기 건조시켰다. 최종 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다. 수율: 1.09g(2.21mmol, 75%). MS (DUIS): MW 계산치 494.13. 실측치: (-) 493 (M-1), (+) 495 (M+1).

[0326]

실시예 6

[0327] 2-[3-(벤조티아졸-2-일)-7-(다이메틸아미노)-2-옥소-2H-크로멘-4-일]벤조산(화합물 I-2)



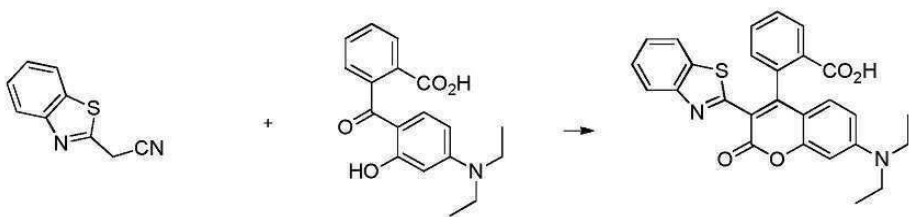
[0328]

[0329] 0.285g(1.0mmol, 1 eq)의 2-[4-(다이메틸아미노)-2-하이드록시벤조일]벤조산과 0.243g(1.1mmol, 1.1 eq) 에틸 2-(벤조티아졸-2-일)아세테이트의 혼합물을 실온(약 20℃)에서 황산(5ml)에 교반시키면서 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반시키고, 이어서, 4시간 동안 가열한 한편, 100℃에서 교반시켰다. 반응 진행을 TLC(DCM-MeOH, 10%)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다. 반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 밤새 두고, 이어서, 물-분쇄 얼음(약 100g)과 아세트산나트륨(약 5g)의 혼합물에 부었다. 1시간 후에 생성물을 여과시키고 중성까지 물로 세척하고 공기 건조시켰다. 수율: 0.429g(0.96mmol, 97%). 최종 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS (DUIS): MW 계산치 442.10. 실측치: (-) 441 (M-1). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.70 (s, 1H), 8.14 - 8.04 (m, 1H), 8.04 - 7.94 (m, 1H), 7.58 (h, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.40 - 7.29 (m, 2H), 7.19 (dd, *J* = 7.2, 1.7 Hz, 1H), 6.78 - 6.63 (m, 3H), 3.07 (s, 6H).

[0330]

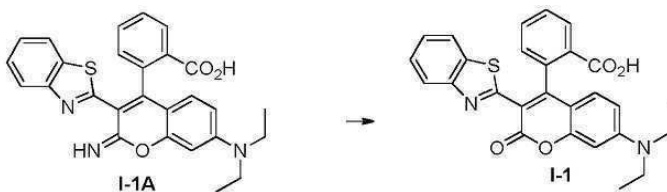
실시예 7-1

[0331] 2-[3-(벤조티아졸-2-일)-7-(다이에틸아미노)-2-옥소-2H-크로멘-4-일]벤조산(화합물 I-1).



[0332]

[0333] 황산(8ml)을 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 이어서, 0.25g(0.8mmol, 1 eq) 2-[4-(다이에틸아미노)-2-하이드록시벤조일]벤조산을 교반시키면서 첨가한 후에, 0.14g(0.8mmol, 1 eq) 2-사이아노메틸벤조티아졸을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 30분 동안 교반시키고, 이어서, 2시간 동안 가열시킨 한편, 95℃에서 교반시켰다. 이 반응 혼합물을 빙랭 물(약 75g)에 부었다. 이 단계에서, 대응하는 이민 중합체(I-1A)를 형성하고 나서, 여과에 의해 단리시켰다. 수 중에서 또는 물의 존재와 함께 유기 용매 중에서 그리고 특히 산 조건에서, 이민 중합체의 추가적인 가수분해를 달성할 수 있다.



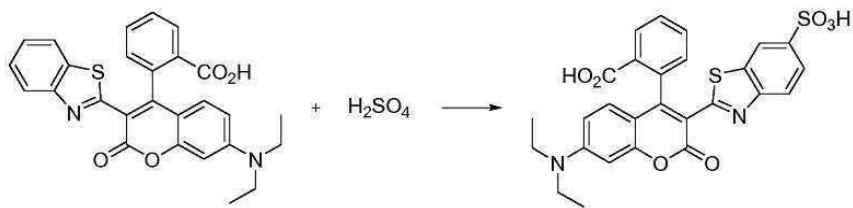
[0334]

[0335] 이 혼합물을 밤새 실온에서 교반시키고, 생성물을 중성까지 여과시키고 물로 세척하고 공기 건조시켰다. 수율: 0.33g(0.7mmol, 88 %). 최종 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS (DUIS): MW 계산치 470.13. 실측치: (-) 469 (M-1), (+) 471 (M+1). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.71 (s, 1H), 8.08 (dt, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 8.03 - 7.92 (m, 1H), 7.64 - 7.52 (m, 2H), 7.45 - 7.39 (m, 1H), 7.39 - 7.27 (m, 2H), 7.19 (dd, *J* = 6.9, 2.3 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.69 - 6.61 (m, 2H), 3.47 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.23 - 1.05 (m, 6H).

[0336]

실시예 7-2

[0337] 2-(7-(다이에틸아미노)-2-옥소-3-(6-설포벤조티아졸-2-일)-2H-크로멘-4-일)벤조산(화합물 **I-13**).



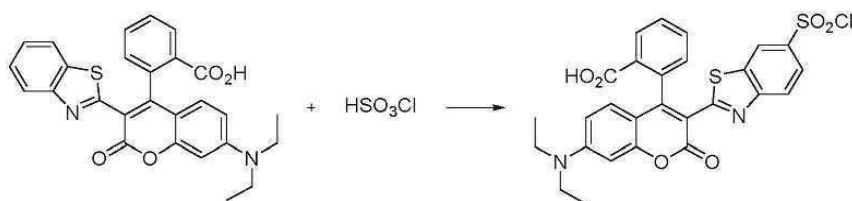
[0338]

[0339] 2-[3-(벤조티아졸-2-일)-7-(다이에틸아미노)-2-옥소-2H-크로멘-4-일]벤조산(화합물 **I-1**)(1.3 g, 2.76mmol)을 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 고진공에서 건조시키고, 이어서, 아세톤-드라이 아이스 욕에서 냉각시켰다. 발연 황산(20%, 5.8ml, 27mmol)을 적가한 한편, 교반시켰다. 이 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반시키고, 이어서, 1시간 동안 50℃에서 가열하고, 출발 물질을 용해시켰다. 반응 혼합물을 냉각시키고 나서, 무수 에터를 조심해서 첨가하였다. 회백색 검습성 침전물을 여과시키고 나서, 여과액을 다시 에터와 함께, 이어서, EtOH와 함께 분쇄시켰다. 핑크 침전물을 수집하였다. 수율 1.21g(80%). 최종 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS (DUIS): MW 계산치 550.09. 실측치: (-) 549 (M-1), (+) 551 (M+1). ¹H NMR (400 MHz, TFA) δ 8.85 - 8.78 (m, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.57 - 8.45 (m, 2H), 8.26 - 8.15 (m, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.63 - 7.56 (m, 1H), 7.45 (dd, *J* = 8.8, 4.5 Hz, 1H), 3.94 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). HPLC 및 NMR 스펙트럼 분석에 따라, 이 생성물은 주로 하나의 이성질체로 이루어진다.

[0340]

실시예 7-3

[0341] 2-(7-(다이에틸아미노)-2-옥소-3-(6-클로로설포닐벤조티아졸-2-일)-2H-크로멘-4-일)벤조산(화합물 **I-14**).



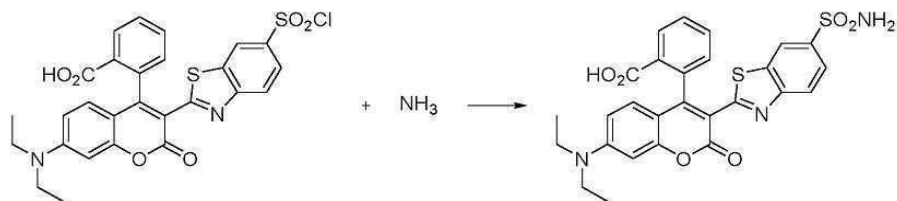
[0342]

[0343] 클로로설포닐산(5ml, 75mmol)을 빙욕에서 냉각시키고 나서, 염료 **I-1**(1.2 g, 2.55mmol)를 5분의 기간에 걸쳐 교반시키면서 소량을 조심해서 첨가하였다. 합한 혼합물을 실온(대략 20℃)에서 1.5시간 동안 교반시키고, 이어서, 95 내지 100℃에서 6시간 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후에, 혼합물을 대략 20ml의 얼음/물 혼합물에 매우 서서히 첨가하였다. 분리된 적색 고체를 빠르게 여과시키고 나서, 냉수(2 x 30ml)로 세척하고, 진공에서 건조시켰다. 수율 1.2g(83%, 2.11mmol). 이 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[0344]

실시예 7-4

[0345] 2-(7-(다이에틸아미노)-2-옥소-3-(6-아미노설포닐벤조티아졸-2-일)-2H-크로멘-4-일)벤조산(화합물 **I-15**).



[0346]

[0347] 2-(7-(다이에틸아미노)-2-옥소-3-(6-클로로설포닐벤조티아졸-2-일)-2H-크로멘-4-일) 벤조산(**I-14**)(1.2 g, 2.11mmol)을 5분의 기간에 걸쳐 빙욕에서 냉각시킨 암모니아 용액(5ml, 25%)에 교반시키면서 소량을 조심해서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온(대략 20℃)에서 1시간 동안 교반시키고 나서, 용매를 실온에서 진공에서 증류시켰다. 플래시 칼럼(실리카겔, 용리액으로서 DCM-MeOH)에 의해 화합물을 정제하였다. 수율 0.34g(30%, 0.62mmol). 이 화합물은 소량의 다른 이성질체를 함유하고, 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. MS (DUIS): MW 계산치 549.10. 실측치: (-) 548 (M-1), (+) 550 (M+1). ¹H NMR (400 MHz, TFA) δ 8.83-8.73 (m, 1H), 8.62 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.57 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.42 (dd, *J* = 8.9, 1.8 Hz, 1H), 8.24-8.13 (m, 2H), 7.82 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.64-7.52 (m, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.90 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.37 (t, *J* = 7.2

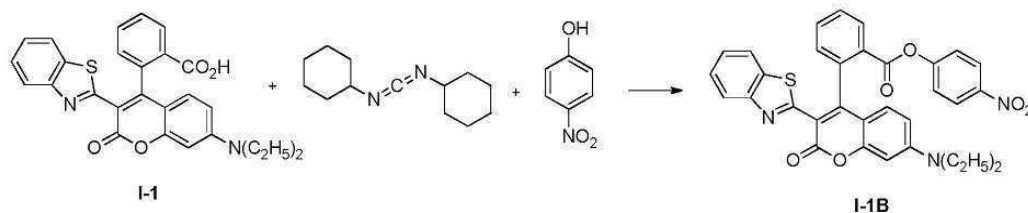
Hz, 6H).

[0348]

실시예 8

[0349]

4-나이트로페닐 2-[3-(벤조티아졸-2-일)-7-(다이에틸아미노)-2-옥소-2H-크로멘-4-일]벤조에이트(화합물 **I-1B**)



[0350]

[0351]

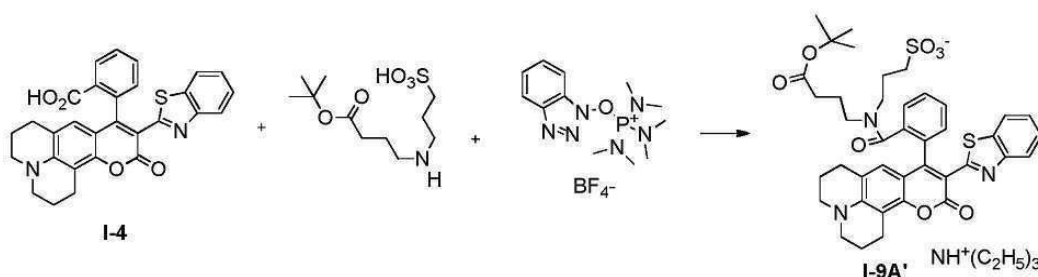
무수 DMF(1.5ml) 중에 94mg(0.2mmol, 1 eq)의 2-[3-(벤조티아졸-2-일)-7-(다이에틸아미노)-2-옥소-2H-크로멘-4-일]벤조산(I-1, NR440)을 용해시켰다. 이 용액에 다이사이클로헥실카보다이이미드(62mg, 0.3mmol, 1.5 eq)를 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반시키고, 이어서, p-나이트로페놀(33mg, 0.24mmol, 1.2 eq)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반시키고, 이어서, 다이사이클로헥실 유레아를 여과시켰다. 용매를 진공으로 실온에서 증류시키고 나서, 유성 잔사를 얼음(약 5g)에 부었다. 황색 고체 생성물을 여과시키고 나서, 물로 세척하였다. 수율: 79mg(67 %, 0.134mmol). MS (DUIS): MW 계산치 591.15. 실측치: (-) 590 (M-1), (+) 592 (M+1).

[0352]

실시예 9

[0353]

트라이에틸암모니오 3-(2-(10-(벤조티아졸-2-일)-11-옥소-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일)-N-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부틸)벤즈아미도프로판-1-설포산염(화합물 **1-9A'**)



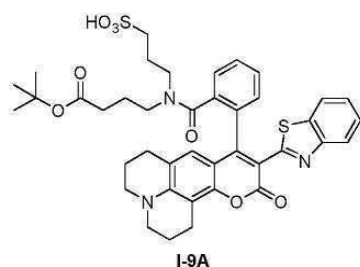
[0354]

[0355]

화합물 **I-4**(150mg, 0.3mmol, 1 eq)를 무수 DMA(1.5ml) 중에 용해시켰다. 이 용액에, 활성화 시약으로서 과량의 트라이에틸아민(1ml) 및 [(1H-벤조트리아졸-1-일)옥시]트리스(다이에틸아미노)포스포늄 테트라플루오로보레이트(140mg, 0.36mmol, 1.2 eq)를 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온에서 약 20분 동안 교반시키고, 이어서, 3-((3-(tert-부톡시)카보닐)아미노)프로판-1-설포산(140mg, 0.5mmol, 1.6 eq)을 첨가하였다. 반응 진행을 TLC(아세트나이트릴-물, 10%)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다.

[0356]

반응 혼합물을 밤새 교반시키고, 여과시키고 나서, 수 중에서 0.1M TEAB 용액을 이용하여 과량의 활성화 시약을 퀀칭시켰다. 용매를 진공에서 증발시키고, 잔사를 HPLC에 의해 정제하였다. 수율: 180mg(0.21mmol, 69 %). MS (DUIS): MW 계산치 757.25. 실측치: 대응하는 양성자화된 음이온 화합물 **I-9A**에 대해 (-) 756 (M-1), (+) 758 (M+1):



[0357]

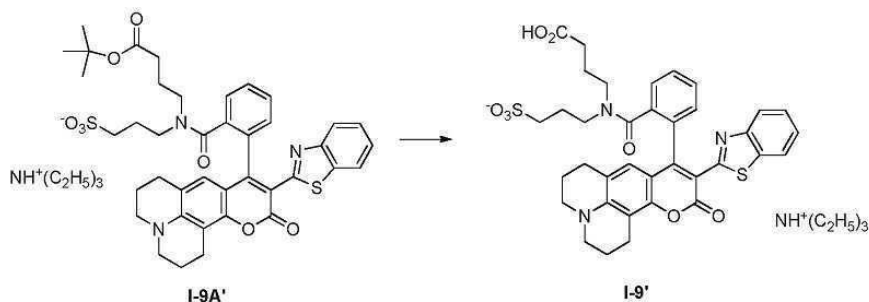
[0358]

실시예 10

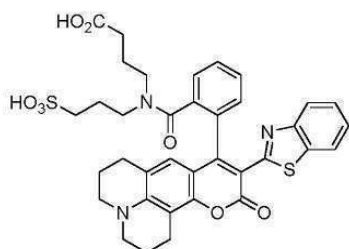
[0359]

트라이에틸암모니오 4-(2-(10-(벤조티아졸-2-일)-11-옥소-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일)-N-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부틸)벤즈아미도프로판-1-설포산염(화합물 **1-9A'**)

리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일)-N-(3-설포네이트프로필)벤즈아미도)부타노에이트(화합물 **I-9'**)



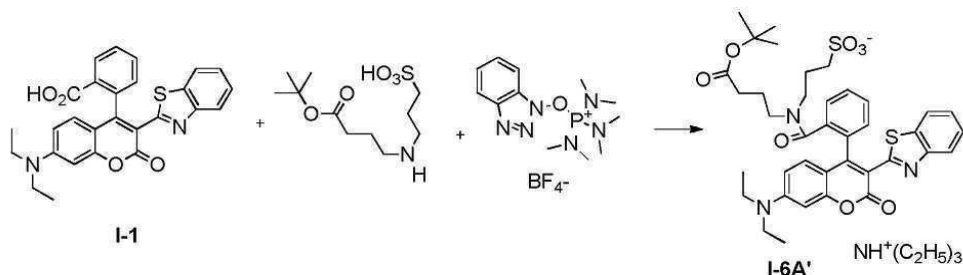
용매(180mg, 0.21mmol)의 증발 후에 이전의 단계로부터의 화합물 **I-9A'**를 DCM(150ml) 중에 용해시키고 나서, 트라이플루오로아세트산(5ml)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 두었다. 탈보호 반응의 진행을 TLC(아세토나이트릴-물, 용리액으로서 10%)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다. DCM 증류시켰다. 잔사를 아세토나이트릴 중에 용해시키고 나서, 트라이에틸아민(1ml)을 첨가하였다. 황색 침전물을 여과시켰다. MS (DUI): MW 계산치 701.19. 실측치: 대응하는 양성자화된 음이온 화합물 **I-9**에 대해 (-) 700 (M-1):



실시예 11

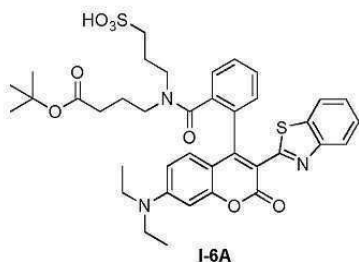
트라이에틸암모니오

3-(2-(3-(벤조티아졸-2-일)-7-(다이에틸아미노)-2-옥소-2H-크로멘-4-일)-N-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부틸)벤즈아미도)프로판-1-설포산염. (화합물 **I-6A'**)



2-(3-(벤조티아졸-2-일)-7-(다이에틸아미노)-2-옥소-2H-크로멘-4-일)벤조산(화합물 **I-1**)(94mg, 0.2mmol, 1 eq)을 무수 DMA (2ml) 중에 용해시켰다. 이 용액에 과량의 N-에틸-N,N-다이아이소프로필아민(1ml)을 첨가하였다. 이 용액에 활성화 시약으로서 [(1H-벤조트리아졸-1-일)옥시]트리스(다이에틸아미노)포스포늄 테트라플루오로보레이트(80mg, 0.21mmol, 1.04 eq)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반시켰다.

반응 진행을 TLC(아세토나이트릴-물, 용리액으로서 10%)에 의해 모니터링하였다. 이어서, 3-((3-(tert-부톡시)카보닐)아미노)프로판-1-설포산(70mg, 0.25mmol, 1.25 eq)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반시키고 나서, 여과시키고, 과량의 활성화 시약을 물(3ml) 중의 0.1M TEAB 용액으로 퀀칭시켰다. 용매를 진공에서 증발시키고 나서, 잔사를 HPLC에 의해 정제하였다. 수율: 113mg(0.136mmol, 68%). MS (DUI): MW 계산치 733.25. 실측치: 대응하는 양성자화된 음이온 화합물 **I-6A**에 대해 (-) 732 (M-1):



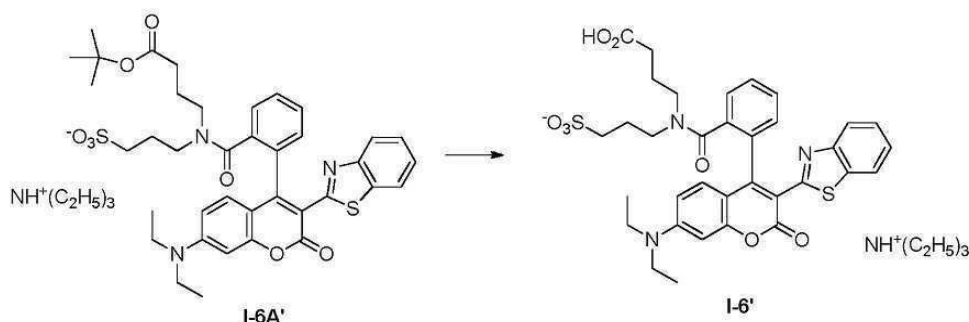
[0368]

[0369]

실시예 12

[0370]

트라이에틸암모니오 4-(2-(3-(벤조티아졸-2-일)-7-(다이에틸아미노)-2-옥소-2H-크로멘-4-일)-N-(3-설포네이토프로필)벤즈아미도)부타노에이트, (화합물 **1-6'**)



[0371]

[0372]

용매의 증발 후에 이전의 단계로부터의 화합물 **I-6A'**(180mg, 0.21mmol)을 DCM(50ml) 중에 용해시키고 나서, 트라이플루오로아세트산(2.5ml)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시키면서 두었다. 반응 진행을 TLC(아세토나이트릴-물, 용리액으로서 10%)에 의해 모니터링하였다. 용매를 증류시키고 나서, 잔사를 아세토나이트릴 중에 용해시키고 나서, 트라이에틸아민(1.8ml)을 첨가하였다. 아세토나이트릴 및 과량의 트라이에틸아민을 증류시켰다. 플라스크 내 잔사에 무수 다이에틸 에터를 첨가하고 나서, 생성물을 황색 결정질 침전물로서 형성하고, 여과시켰다. MS (DUIS): MW 계산치 677.19. 실측치: 산 **I-6**에 대해 (-) 676 (M-1):



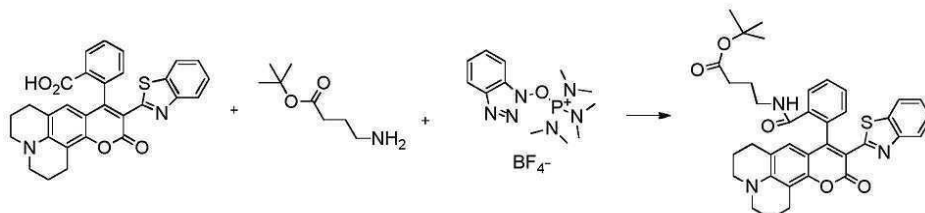
[0373]

[0374]

실시예 13

[0375]

tert-부틸 4-(2-(10-(벤조티아졸-2-일)-11-옥소-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일)벤즈아미도)부타노에이트(**I-10A**)



[0376]

[0377]

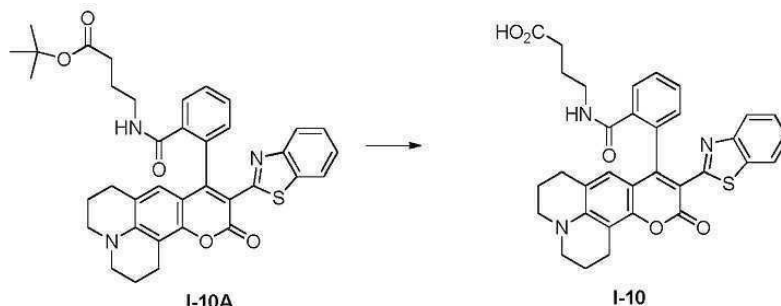
화합물 **I-4**(97mg, 0.196mmol, 1 eq)을 새로 증류시킨 무수 DMF(2.5ml) 중에 용해시켰다. 이 용액에 활성화 시약으로서 과량의 N-에틸-N,N-다이아이소프로필아민(0.253mg, 1.961mmol, 10 eq) 및 [(1H-벤조트리아졸-1-일)옥시]트리스(다이메틸아미노)포스포늄 테트라플루오로보레이트(113mg, 0.294mmol, 1.5 eq)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 약 20분 동안 교반시키고, 이어서, tert-부틸 4-아미노부타노에이트 염산염(58mg, 0.294mmol, 1.5 eq)을 첨가하였다. 반응 진행을 TLC (아세토나이트릴-물, 10%)에 의해 그리고 LCMS

에 의해 모니터링하였다.

[0378] 반응 혼합물을 밤새 교반시키고, 여과시키고 나서, 과량의 활성화 시약을 수 중의 0.1M TEAB 용액으로 퀀칭시켰다. 용매를 진공에서 증발시키고 나서, 잔사를 HPLC에 의해 정제하였다. 수율: 105mg(0.165mmol, 84%). MS (DUIS): MW 계산치 635.25. 실측치: (-) 634 (M-1), (+) 636 (M+1).

[0379] 실시예 14

[0380] 4-(2-(10-(벤조티아졸-2-일)-11-옥소-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일)벤즈아미도)부탄산 (화합물 I-10)

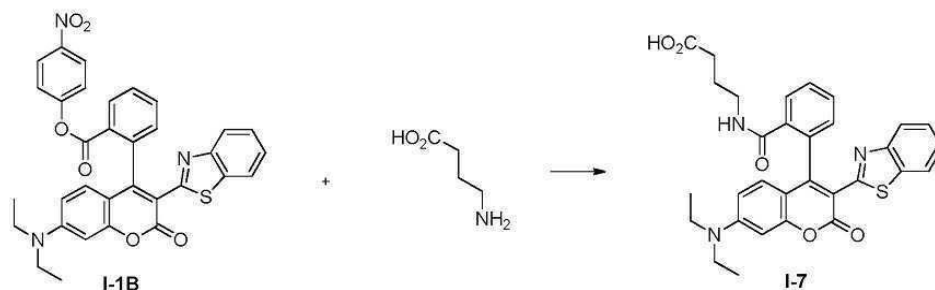


[0381]

[0382] 용매의 증발 후에 이전의 단계로부터의 화합물 I-10A(64mg, 0.1mmol)를 DCM(25ml) 중에 용해시키고, 트라이플루오로아세트산(3.5ml)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 두었다. 반응 진행을 TLC(아세트나이트릴-물, 용리액으로서 10%)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다. 용매를 증류시켰다. 잔사를 아세트나이트릴 중에 용해시키고 나서, 트라이에틸아민(1ml)을 첨가하였다. 아세트나이트릴 및 과량의 트라이에틸아민을 증류시켰다. 플라스크 내 잔사를 진공에서 밤새 건조시키고, 이어서, 석유 에스터(25ml)로 1시간 동안 초음파 처리하였다. 황색 침전물을 여과시켰다. MS (DUIS): MW 계산치 579.18. 실측치: (-) 578 (M-1), (+) 580 (M+1).

[0383] 실시예 15

[0384] 4-(2-(10-(벤조티아졸-2-일)-11-옥소-2,3,6,7-테트라하이드로-1H,5H,11H-피라노[2,3-f]피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일)벤즈아미도)부탄산 (화합물 I-7)

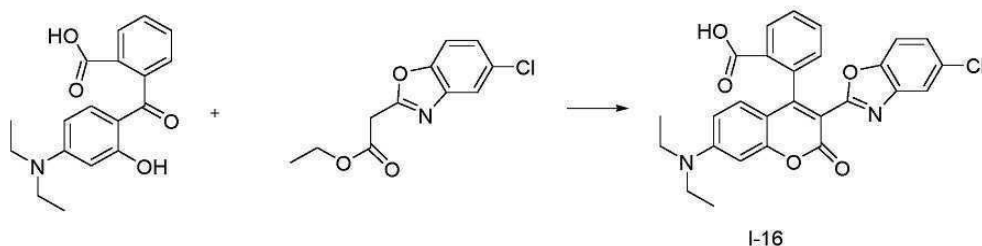


[0385]

[0386] 화합물 I-1B(180mg, 0.3mmol, 1 eq)을 무수 DMF(5ml) 중에 용해시키고 나서, 다이메틸아미노피리딘(56mg, 0.45mmol, 1.5 eq)을 첨가하였다. 이 반응 혼합물에 4-아미노부탄산(47mg, 0.45mmol, 1.5 eq)을 첨가하였고, 이 반응 혼합물을 실온에서 밤새 두었다. 반응 진행을 TLC(아세트나이트릴-물, 용리액으로서 10%)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다. 용매를 진공 하에 실온에서 증류시켰다. 잔사를 물(25ml)로 희석시키고 나서, 생성물을 황색 침전물로서 형성하고, 여과시켰다. MS (DUIS): MW 계산치 555.18. 실측치: (-) 554 (M-1), (+) 556 (M+1).

[0387] 실시예 16

[0388] 2-(3-(5-클로로벤조사졸-2-일)-7-(다이에틸아미노)-2-옥소-2H-크로멘-4-일)벤조산(화합물 I-16)



[0389]

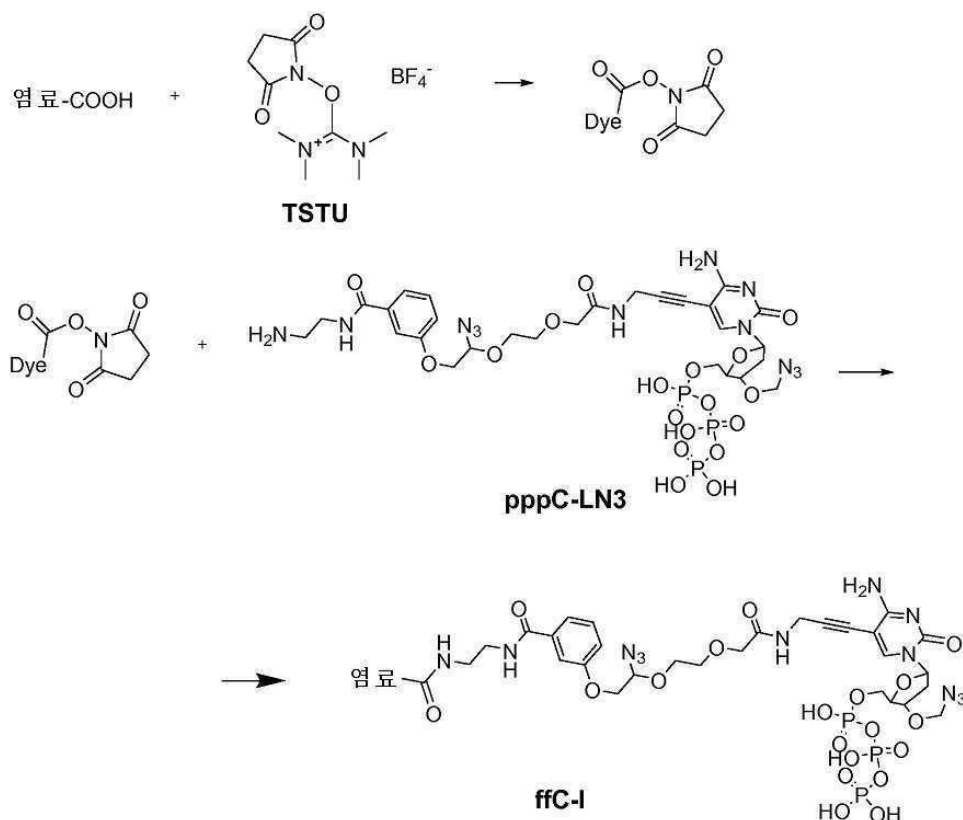
[0390] 0.313g(1.0mmol, 1 eq)의 2-[4-(다이에틸아미노)-2-하이드록시벤조일]벤조산과 0.263g(1.1mmol, 1.1 eq) 에틸 2-(5-클로로벤조사졸-2-일)아세테이트의 혼합물을 황산(5ml)에 실온(약 20℃)에서 교반시키면서 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반시키고, 이어서, 4시간 동안 가열하는 한편, 100℃에서 교반시켰다. 반응 진행을 TLC(DCM-MeOH, 용리액으로서 10%)에 의해 그리고 LCMS에 의해 모니터링하였다. 반응 혼합물을 실온(약 20℃)에서 밤새 드고, 이어서, 물-분쇄 얼음(약 100g)과 아세트산나트륨(약 5g)의 혼합물에 부었다. 1시간 후에, 생성물을 여과시키고 중성 반응물(pH 약 7)까지 물로 세척하고 공기 건조시켰다. 수율: 0.453g(0.93mmol, 93 %). 최종 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다. MS (DUI): MW 계산치 488.11. 실측치: (-) 487 (M-1).

[0391]

실시예 17

[0392] 완전히 작용성인 뉴클레오타이드 접합체의 합성을 위한 일반적 절차

[0393] 적절한 뉴클레오타이드 유도체와 결합시킴으로써 화합물 (I) 또는 화합물 (V-O)로부터 신규한 염료-뉴클레오타이드 접합체를 합성하였다.

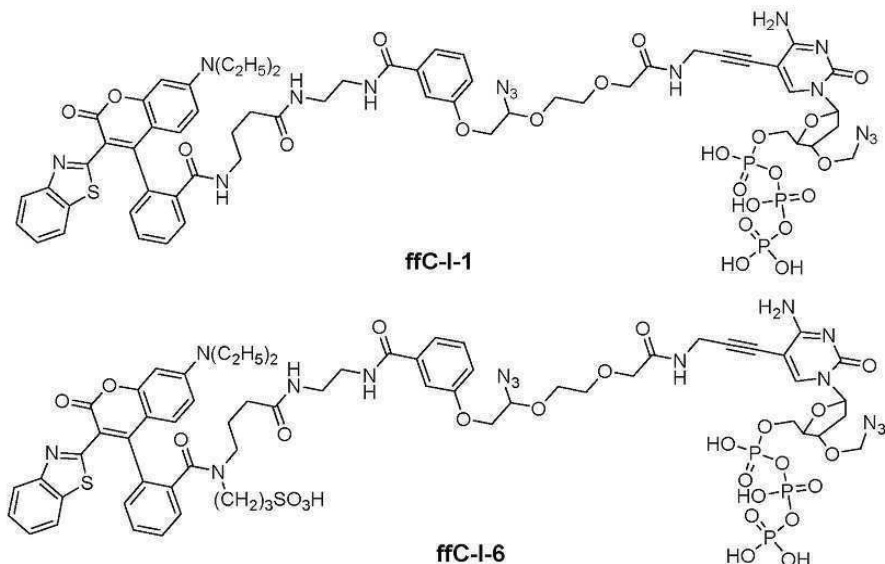


[0394]

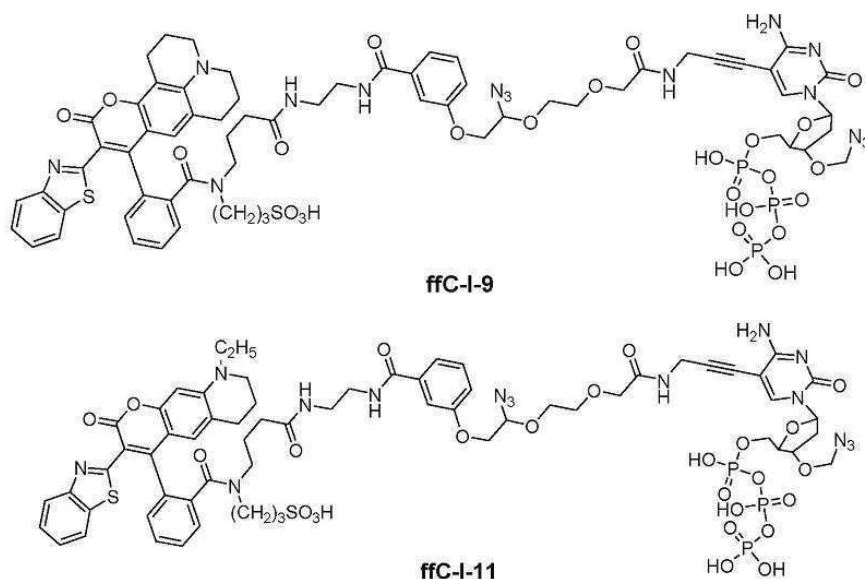
[0395] 무수 DMA(2.5ml), *N,N,N',N'*-테트라메틸-*O*-(*N*-숙신이미딜)유로폼 테트라플루오로보레이트(20mg, 60 μmol) 및 후니그 염기(0.05ml)를 적절한 염료의 건조 샘플(50 μmol)에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반시켰다. TLC(아세트로나이트릴-물, 10%)에 따라, 활성화는 보통 20 내지 30분에 완료되었다. 활성화가 완료된 후에, DMA(0.75ml)와 물(0.30ml)의 혼합물 중의 트라이에틸암모늄 염(55 μmol)으로서 pppC-LN3 용액을 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 밤새 교반시켰다. 얼음욕을 이용하여 반응 혼합물을 약 4℃로 냉각시키고, 이어서, 수 중의 0.1M TEAB(5ml) 용액을 첨가하고 나서, 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반

시켰다. 반응 혼합물을 수 중의 0.05M TEAB 용액에서 약 25g의 DEAE 세파텍스 수지 현탁액으로 칼럼에 적용하고 나서, TEAB(0.1M로부터 1M까지의 농도 구배)로 세척하였다. 색이 있는 분획을 수집하고 나서, 증발시키고, 이어서, 물을 이용하여 다시 공동 증발시켜 더 많은 TEAB를 제거하고, 진공 건조시켰다. 이어서, 잔사를 TEAB 0.1M 중에 재용해시켰다. 주사기 필터 0.2nm 기공 크기를 통해 이 용액을 여과시켰다. 아세토나이트릴-0.1M TEAB로 C18 역상 칼럼을 이용하는 HPLC에 의해 생성물을 정제하였다. 수율: 60-75%.

[0396] 상기 기재한 일반 절차를 이용하여, 다음의 뉴클레오타이드 접합체를 제조하였다:



[0397]



[0398]

[0399]

실시예 18

[0400]

본 실시예에서, 본 명세서에 기재한 다양한 형광 염료 및 대응하는 뉴클레오타이드 접합체의 스펙트럼 특성을 시험하고, 상업적으로 이용 가능한 염료와 비교하였다.

[0401]

표 1A는 에탄올 용액 중의 동일한 스펙트럼 영역에서 흡수를 갖는 일부 예시적 상업 염료에 비해 본 명세서에 기재된 신규한 형광 염료의 스펙트럼 특성을 도시한다. 본 출원의 각각의 신규한 형광 염료는 *Star440sx*에 비해 더 긴 스토크스 이동을 가진다는 것을 관찰할 수 있다.

표 1A
EtOH 용액 중에서 염료를 달리한 스펙트럼 특성의 비교

염료	흡수 최대값 (nm)	방출 최대값 (nm)	스토크스 이동 (nm)
Star440sx *	433	502	69
I-9	460	540	80
I-10	457	543	86
I-6	450	525	75
I-1	445	520	75
I-8	424	510	86
I-3	427	511	84
I-5	465	538	73

*Star440sx - 상업적 긴 스토크스 이동 염료

추가로, 염료 I-1의 스펙트럼 특성을 메탄올 용액 중의 설폰화된 염료 I-13 및 I-15에 비교하였고, 결과를 표 1B에 요약한다. 이들 데이터는 설폰화된 유도체 I-13 및 I-15가 대응하는 비치환 유사체 I-1에 비교할 때 용액 중에서 2 내지 5배 더 강한 형광을 가진다는 것을 입증한다. 이들 결과는 바이오파커로서 설폰화된 염료의 잠재적 용도를 입증한다.

표 1B
메탄올 용액 중의 설폰화된 염료의 스펙트럼 특성 비교

염료	흡수 최대값 (nm)	형광 최대값 (nm)	형광 강도 (정규화) %	스토크스 이동 (nm)
I-1	410	506	100	95
I-13	418	511	235	93
I-15	425	511	496	86

도 1은 동일한 스펙트럼 영역에서 흡수를 갖는 상업적 염료 Star440sx에 비교한 본 출원의 신규한 형광 염료의 형광 스펙트럼을 도시한다(유니버설 스캐닝 혼합물(Universal Scanning Mixture) 중의 용액; 염료를 460nm에서 여기시킴). 더 큰 스토크스 이동에 기인하여, 이들 새로 개발된 염료는 460nm에서의 여기광으로부터 더 양호한 분리를 갖는 검출 영역에서 더 많은 신호를 제공할 수 있다.

표 2는 동일한 스펙트럼 영역에서 흡수를 갖는 상업적 염료로 표지된 적절한 뉴클레오타이드에 비교한 신규한 염료로 표지한 C-뉴클레오타이드의 상대적 형광 강도를 도시한다. 본 명세서에 기재된 새로운 형광 염료가 그들의 더 강한 형광 및 더 큰 스토크스 이동에 기인하여 460nm에서의 광으로 여기될 때 570nm(검출 영역)에서 60 내지 400% 더 많은 신호를 제공할 수 있다는 것을 나타낸다.

표 2

예시적인 표지된 완전 작용성 C-뉴클레오타이드의 상대적 형광 강도	
ffC	570nm에서 강도
ffC-star440sx *	1.0
ffC-I-9	3.5
ffC-I-10	4.0
ffC-I-6	1.6
ffC-I-1	2.3
염료 I-1, I-6, I-9 및 I-10 30,000에 대한 추정	
* Star440sx 22,700에 대한 ε	

표 3은 용액 중에서 본 명세서에 기재된 신규한 형광 염료로 표지된 C-뉴클레오타이드의 스펙트럼 특성을 예시하는데, 이는 본 출원의 형광 염료로 표지된 대부분의 뉴클레오타이드가 동일한 스펙트럼 영역에 대한 상업적

염료에 비해 더 긴 스토크스 이동을 가진다는 표 1의 관찰과 일치된다.

표 3

[0409]

용액 중의 예시적인 표지된 완전 작용성 C-뉴클레오타이드의 스펙트럼 특성			
ffc	흡수 최대값 (nm)	방출 최대값 (nm)	스토크스 이동 (nm)
ffc-star440sx	447	516	69
ffc-I-9	475	542	67
ffc-I-10	467	545	78
ffc-I-6	453	527	74
ffc-I-1	449	530	81

[0410]

도 2는 서열분석을 위해 본 명세서에 기재된 신규한 형광 염료(검정색으로 나타냄)로 표지한 C-뉴클레오타이드의 유용성을 도시한다. 이 서열분석 예에서, 2-채널 검출 방법을 사용하였다. 본 명세서에 기재된 2-채널 방법에 대해, 미국 특허 출원 공개 제2013/0079232호(이의 개시내용은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 방법 및 시스템을 이용하여 핵산을 서열분석할 수 있다. 2-채널 검출에서, 핵산은 제1 채널에서 검출된 제1 뉴클레오타이드 유형, 제2 채널에서 검출된 제2 뉴클레오타이드 유형, 제1 채널과 제2 채널 둘 다에서 검출된 제3 뉴클레오타이드 유형 및 채널 중 하나에서 검출되지 않거나 또는 최소로 검출된 표지가 없는 제4 뉴클레오타이드 유형을 제공함으로써 서열분석할 수 있다. 각각의 도 2A 및 도 2B에서, "G" 뉴클레오타이드는 비표지되고, 하부 좌측 클라우드로서 나타낸다. 2개의 표지된 "A" 뉴클레오타이드, 즉, 0.5 μ M에서 쿠마린 유도체 염료로 표지된 하나 그리고 1.5 μ M에서 벤조피란 유도체 I-6로 표지된 하나의 혼합물이 있으며, 상부 우측 클라우드로서 나타낸다. NR550S0 염료 표지된 "T" 뉴클레오타이드로부터의 신호를 상부 좌측 클라우드로 나타내고, 표지된 "C" 뉴클레오타이드 신호를 하부 우측 클라우드로서 나타낸다. X-축은 하나의 채널에 대한 신호 강도를 나타내고, Y-축은 다른 채널에 대한 신호 강도를 나타낸다. 도 2A 및 도 2B에서, ffc는 각각 I-6 및 I-1로 표지한다. 실험 설정: 기기: M15 주기 번호: C5에서 C-I-6, C9에서 C-I-1, 서열분석 라이브러리: 표준 PhiX. 이는 염료 I-6 및 I-1로 표지된 완전 작용성 C-뉴클레오타이드가 충분한 신호 강도 및 더 양호한 클라우드 분리를 제공하였다는 것을 나타낸다.

[0411]

도 3은, 청색(460nm) 또는 녹색(530nm)광에 의해 여기될 때 다양한 형광 염료로 표지된 C-뉴클레오타이드의 상대적 형광 강도를 도시한다. 이 막대 그래프는 나타낸 염료가 혼합된 클러스터의 원 강도를 나타낸다. 각각의 측정을 Ex460nm에서 수동으로 취하였고, 60℃에서 1초 동안 노출시켰다. MTS [MiSeq R&D (시험) 소프트웨어]를 M15 상에서 사용하여 이미지를 촬영하였고, 이미지 분석 도구 파이어크레스트(Firecrest)를 사용하여 강도 데이터를 추출하였다.

[0412]

결과는 본 명세서에 기재된 신규한 형광 염료로 표지된 ffc가 동일한 스펙트럼 영역에 대한 상업적 긴 스토크스 염료에 비해 300%까지 더 밝은 신호를 제공하였다는 것을 나타낸다.

[0413]

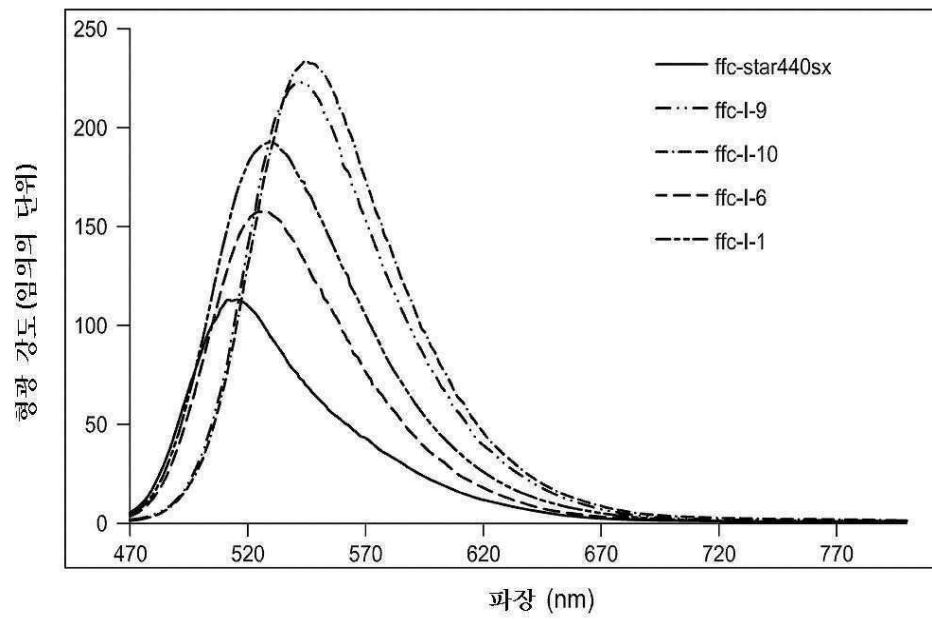
도 4는 두 상이한 온도(22℃에서 실온 및 60℃에서 승온)에서 청색(460nm)광으로 여기시켰을 때 상업적 및 신규한 형광 염료 I-6으로 표지된 접합된 C-뉴클레오타이드의 상대적 밝기를 도시한다. 신규한 형광 염료 I-6으로 표지한 ffc는 온도 둘 다에서 일부 스펙트럼 영역에 대해 상업적 긴 스토크스 염료 Star440ls로 표지한 ffc에 비교할 때 더 밝은 신호를 제공하였다.

[0414]

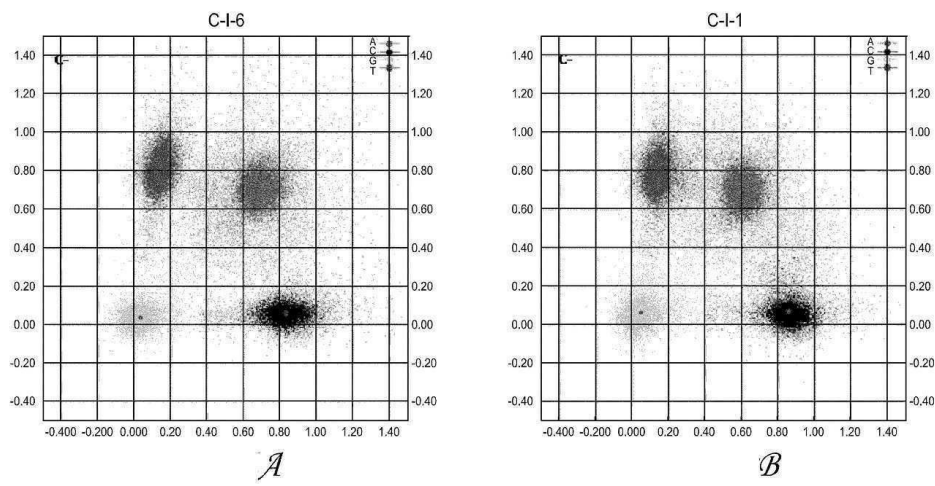
본 명세서에서 사용하는 표제 및 부제는 단지 읽을 때의 편리함을 위한 것이며, 본 개시내용의 범주를 정하거나 또는 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 상기 기재한 본 출원은 방법 및 물질의 변형뿐만 아니라 제작 방법 및 장비에서의 변경의 여지가 있는 화합물 및 방법에 관한 것이다. 이러한 변형은 본 명세서에 개시된 출원의 개시 내용 또는 실행을 고려하여 당업자에게 분명하게 될 것이다. 결과적으로, 본 개시내용은 본 명세서에 개시된 특정 실시형태로 제한하는 것으로 의도되지 않지만, 본 개시내용의 진정한 범주와 정신 내의 모든 변형 및 대안을 아우르는 것으로 의도된다.

도면

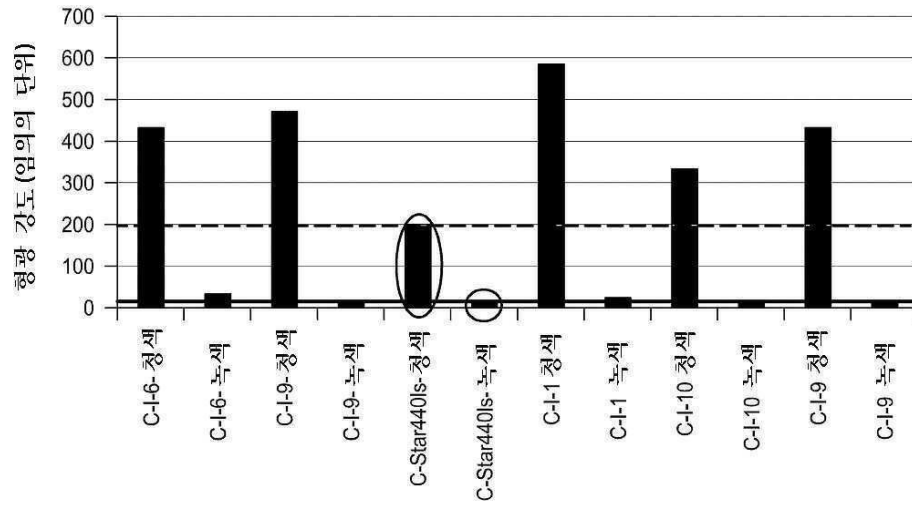
도면1



도면2



도면3



도면4

