(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월10일
(11) 등록번호 10-2753367
(24) 등록일자 2025년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 9/22 (2006.01) *C07D 491/22* (2006.01)
C07H 19/073 (2006.01) *C07H 21/00* (2006.01)
C09B 11/24 (2006.01) *C09B 57/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 9/22 (2013.01)
C07D 491/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7035076
(22) 출원일자(국제) 2019년05월07일
심사청구일자 2022년05월02일
(85) 번역문제출일자 2020년12월04일
(65) 공개번호 10-2021-0035079
(43) 공개일자 2021년03월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/031188
(87) 국제공개번호 WO 2019/217470
국제공개일자 2019년11월14일
(30) 우선권주장
62/668,109 2018년05월07일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20050170363 A1
WO2011123820 A1
US5231191 A
CN101454315 A

(73) 특허권자
세페이드
미국 94089 캘리포니아주 서니베일 캐리비안 드라이브 904
(72) 발명자
룬드, 케빈, 피.
미국 94089 캘리포니아주 서니베일 캐리비안 드라이브 904 세페이드 씨/오
세르귀브, 드미트리
미국 94089 캘리포니아주 서니베일 캐리비안 드라이브 904 세페이드 씨/오
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

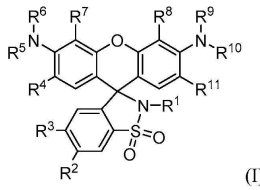
전체 청구항 수 : 총 27 항 심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 **설포로다민 포스포아미다이트 염료**

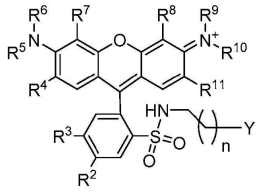
(57) 요 약

자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성-적합성 설포로다민 염료 포스포아미다이트 화합물 및 상기 염료를 포함하는 표지된 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.

대 표 도



(I),



(IV)

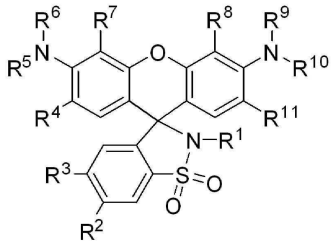
(52) CPC특허분류
C07H 19/073 (2013.01)
C07H 21/00 (2013.01)
C09B 11/24 (2013.01)
C09B 57/00 (2013.01)
(72) 발명자
카바, 마허, 엔.
미국 94089 캘리포니아주 서니베일 캐리비안 드라이브 904 세페이드 씨/오
갈, 알렉산더
미국 94089 캘리포니아주 서니베일 캐리비안 드라이브 904 세페이드 씨/오

명 세 서

청구범위

청구항 1

화학식 I으로 나타낸 화합물:



(I),

또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염으로서,

화학식 중:

R^1은 C_1-C_6 알킬 또는 L^1-X이고;

R^2는 할로겐 또는 SO_2NH_2이고,

R^3는 H 또는 할로겐이고;

R^4, R^7, R^8, 및 R^{11}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고,

R^5, R^6, R^9, 및 R^{10}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

R^4 및 R^5는, 함께 취해진 경우, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

R^6 및 R^7는, 함께 취해진 경우, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

R^8 및 R^9는, 함께 취해진 경우, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

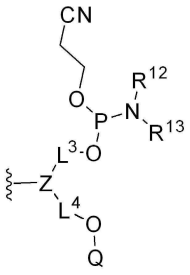
R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해진 경우, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

R^5 및 R^6는, R^5 및 R^6가 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

R^9 및 R^{10}은, R^9 및 R^{10}이 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

L^1은 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{20} 헤테로알킬렌이고;

X는 $-O-P(OCH_2CH_2CN)NR^{12}R^{13}$이거나, 또는 X는 다음의 화합물:



이되,

화학식 중

L^3 및 L^4는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{30} 헤테로알킬렌이고;

Q는 트라이틸 또는 다이메톡시트라이틸 기이고;

Z는 CH, N, NHC(O)N, 또는 OC(O)N이고;

R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬인 것인 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서, R^2는 Cl 및 R^3는 H인 것인 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, X는 $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i\text{-}Pr)_2$인 것인 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, L^1은 PEG_2-10 링커 또는 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$인 것인 화합물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, R^4 및 R^5는, 함께 취해져, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^{10} 및 R^{11}은, 함께 취해져, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^6 및 R^7은, 함께 취해져, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^8 및 R^9은, 함께 취해져, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이거나, 또는

R^4 및 R^5는, 함께 취해져, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해져, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^6 및 R^7는, 함께 취해져, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^8 및 R^9는, 함께 취해져, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬인 것인 화합물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, R^5, R^6, R^9, 및 R^{10}은 각각 메틸인 것인 화합물.

청구항 9

제1항에 있어서, X가 $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i\text{-}Pr)_2$인 것인 화합물.

청구항 10

삭제

청구항 11

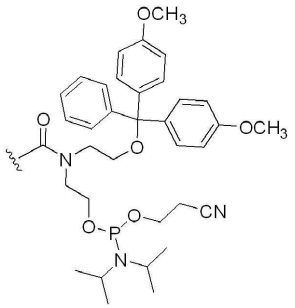
제1항에 있어서, L^3 및 L^4는 독립적으로 C_2-C_6 알킬렌 또는 $-(OCH_2CH_2)m-$이고, m은 2 내지 6 범위의 정수이거나, 또는 L^3 및 L^4는 독립적으로 CH_2CH_2인 것인 화합물.

청구항 12

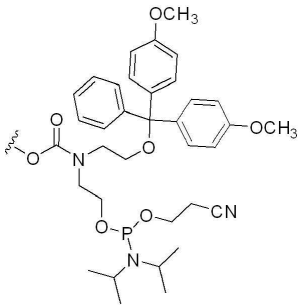
삭제

청구항 13

제1항에 있어서, X는



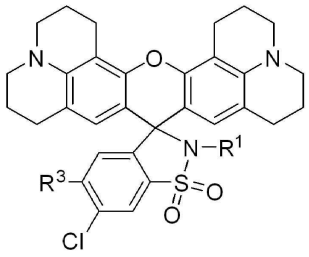
또는



인 것인 화합물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 화합물은 화학식 IA으로 나타낸 화합물:



(IA)

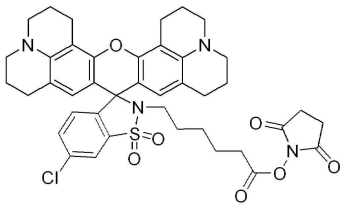
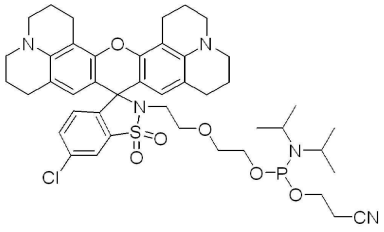
또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염이며, 화학식 중 R^1은 L^1X이고, R^3는 H 또는 할로겐인 것인 화합물.

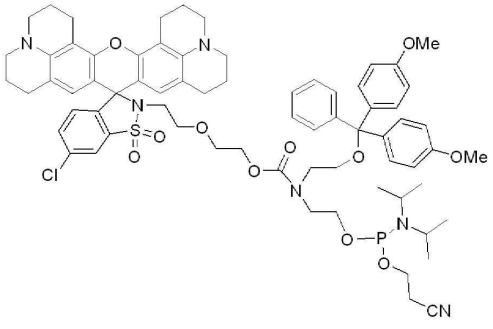
청구항 15

제14항에 있어서, X는 $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i\text{-}Pr)_2$인것인 화합물.

청구항 16

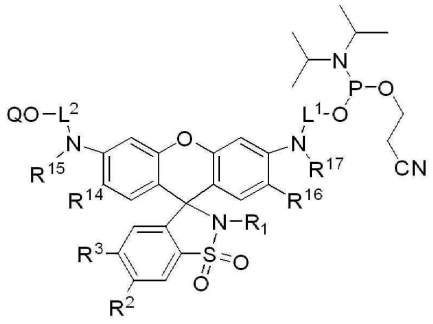
제1항에 있어서, 상기 화합물은



, , 또는


인 것인 화합물.

청구항 17

화학식 II으로 나타낸 화합물:


(II),

또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염으로서,

화학식 중:

R^1은 C_1-C_6 알킬이고;

R^2는 H, 할로겐, 또는 SO_2NH_2이고,

R^3는 H 또는 할로겐이고;

R^{14} 및 R^{16}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

R^{15} 및 R^{17}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

R^{14} 및 R^{15}은, 함께 취해져, R^{14} 및 R^{15}이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬을 형성하고;

R^{16} 및 R^{17}은, 함께 취해져, R^{16} 및 R^{17}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬을 형성하고;

Q는 트라이틸 또는 다이메톡시트라이틸 기이고;

L^1 및 L^2는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{20} 헤테로알킬렌인 것인 화합물.

청구항 18

제17항에 있어서, R^3는 H이거나, 또는 R^2는 H이거나, 또는 R^2는 Cl인 것인 화합물.

청구항 19

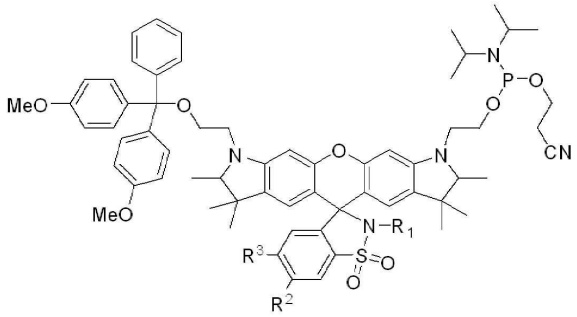
삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

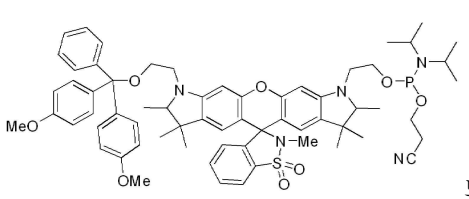
제17항에 있어서, 상기 화합물은 화학식 (IIA)으로 나타낸 것인 화합물:



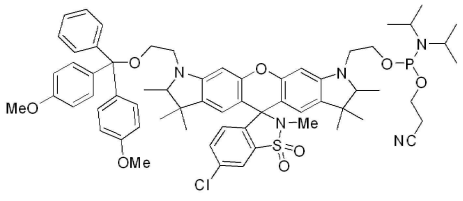
(IIA).

청구항 22

제17항에 있어서, 상기 화합물은



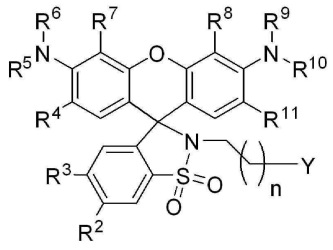
또는



인 것인 화합물.

청구항 23

화학식 (III)으로 나타낸 화합물:



(III),

또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염으로서,

화학식 중:

R^2는 H, 할로겐 또는 SO_2NH_2이고;

R^3는 할로겐 또는 H이고;

R^4, R^7, R^8, 및 R^{11}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고,

R^5, R^6, R^9, 및 R^{10}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

R^4 및 R^5는, 함께 취해진 경우, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

R^6 및 R^7는, 함께 취해진 경우, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

R^8 및 R^9는, 함께 취해진 경우, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

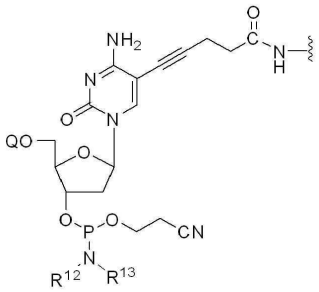
R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해진 경우, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

R^5 및 R^6는, R^5 및 R^6가 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

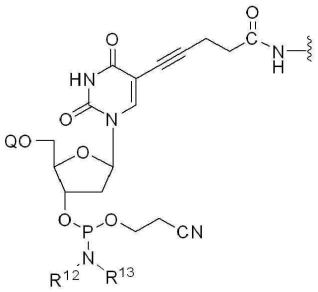
R^9 및 R^{10}은, R^9 및 R^{10}이 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

n은 1 내지 9의 정수이고;

Y는:



또는



이되;

화학식 중:

Q는 트라이틸 또는 다이메톡시트라이틸 기이고;

R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬인 것인 화합물.

청구항 24

제23항에 있어서, R^2는 Cl 및 R^3는 H이거나, 또는

R^4 및 R^5는, 함께 취해져, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^{10} 및 R^{11}은, 함께 취해져, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^6 및 R^7은, 함께 취해져, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^8 및 R^9은, 함께 취해져, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이거나, 또는

R^4 및 R^5는, 함께 취해져, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해져, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^6 및 R^7는, 함께 취해져, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^8 및 R^9는, 함께 취해져, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬인 것인 화합물.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

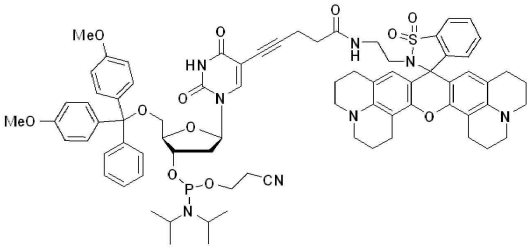
삭제

청구항 29

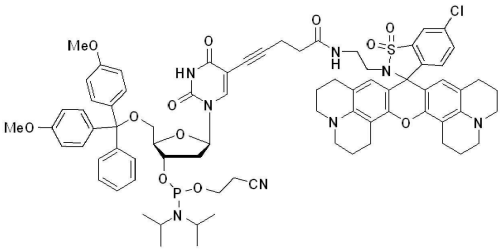
삭제

청구항 30

제23항에 있어서, 상기 화합물은



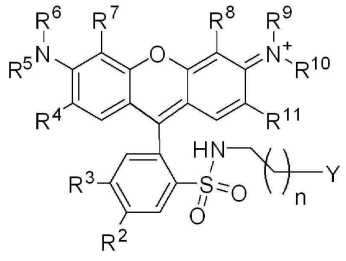
또는



인 것인 화합물.

청구항 31

화학식 IV의 화합물:



(IV)

또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염을 포함하는 표지된 폴리뉴클레오타이드로서,

화학식 중:

R^2는 할로겐 또는 SO_2NH_2이고;

R^3는 H 또는 할로겐이고;

R^4, R^7, R^8, 및 R^{11}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고,

R^5, R^6, R^9 및 R^{10}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

R^4 및 R^5는, 함께 취해진 경우, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

R^6 및 R^7는, 함께 취해진 경우, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

R^8 및 R^9는, 함께 취해진 경우, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

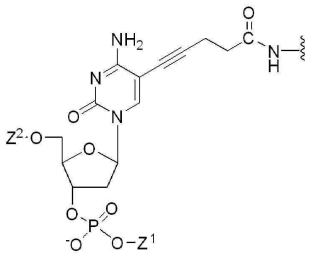
R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해진 경우, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

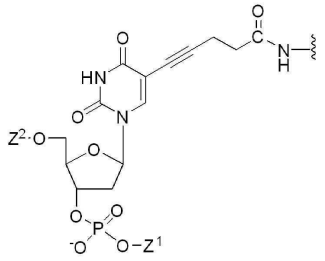
R^5 및 R^6는, R^5 및 R^6가 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

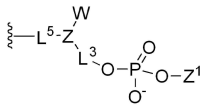
R^9 및 R^{10}은, R^9 및 R^{10}이 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

n은 1 내지 9의 정수이고;

Y는:



,


, 또는


이되;

화학식 중:

물결선은 화학식 III에 대한 부착점이고;

R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

W는 H 또는 L^4-O-Z^2이고;

L^3, L^4, 및 L^5는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{30} 헤테로알킬렌이고;

Z는 CH, N, NHC(O)N, 또는 OC(O)N이고;

Z^1은 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드이고;

Z^2는 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 또는 H인 것인 표지된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 32

제31항에 있어서, R^2는 Cl 및 R^3는 H인 것인 표지된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 33

제31항에 있어서, R^4 및 R^5는 R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^{10} 및 R^{11}은 R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^6 및 R^7은 R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^8 및 R^9은 R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬인 것인 표지된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 34

제31항에 있어서, 표지된 폴리뉴클레오타이드는 5'-뉴클레아제 PCR 프로브이거나, 또는

표지된 폴리뉴클레오타이드는 형광 소광제를 추가로 포함하거나, 또는

표지된 폴리뉴클레오타이드는 고체 지지체에 부착되거나, 또는

고체 지지체는 제어된 공극 유리 비드, 폴리스타이렌 비드, 자기 비드, 또는 마이크로웰 플레이트인 것인 표지된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 35

삭제

청구항 36

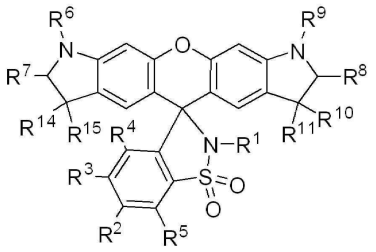
삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

화학식 VI으로 나타낸 화합물:



(VI),

또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염으로서,

화학식 중:

R^1은 L^1-X이고;

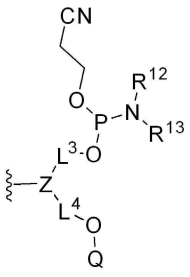
R^2, R^3, R^4, 및 R^5는 독립적으로 H, 할로겐, C_1-C_6 알킬, 또는 SO_2NH_2이고;

R^6 및 R^9은 독립적으로 H 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

R^7, R^8, R^{10}, R^{11}, R^{14}, 및 R^{15}은 독립적으로 H 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

L^1은 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{20} 헤테로알킬렌이고;

X는 -O-P(OCH_2CH_2CN)$NR^{12}R^{13}$이거나, 또는 X는 다음의 화합물:



이되,

화학식 중

L^3 및 L^4는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{30} 헤테로알킬렌이고;

Q는 트라이틸 또는 다이메톡시트라이틸 기이고;

Z는 CH, N, NHC(O)N, 또는 OC(O)N이고;

R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬인 것인 화합물.

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

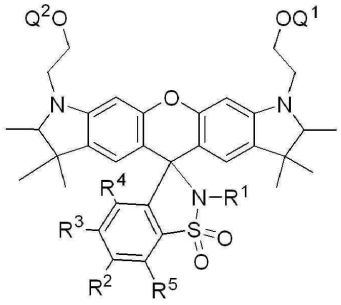
삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

제38항에 있어서, 화합물은



,

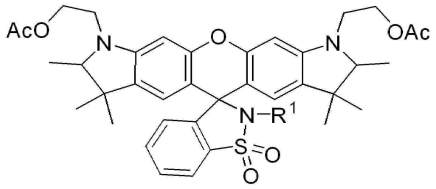
또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염으로서,

화학식 중:

R^1, R^2, R^3, R^4, 및 R^5는 제38항의 화합물에 대해 기재된 바와 같고;

Q^1 및 Q^2는 독립적으로 H 또는 C1-C6 아실이거나, 또는

화합물은



이고,

화학식 중 R^1은 제38항의 화합물에 대해 정의된 바와 같은 것인 화합물.

청구항 49

삭제

청구항 50

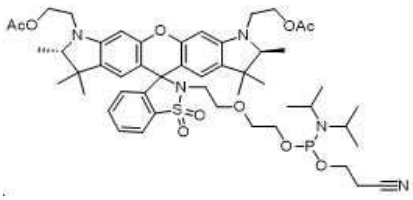
삭제

청구항 51

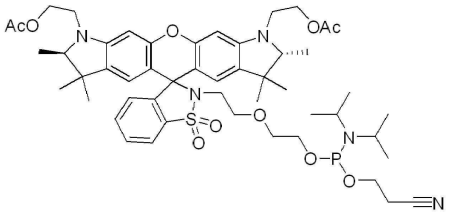
삭제

청구항 52

제38항에 있어서, 상기 화합물은



또는



인 것인 화합물.

청구항 53

리간드의 표지된 컨쥬게이트의 제조 방법으로서, 상기 방법은 화합물을 리간드에 공유적으로 부착시키기 충분한 조건하에 제1항 내지 제4항, 제6항, 제8항, 제9항, 제11항, 제13항 내지 제18항, 제21항 내지 제24항, 제30항 내지 제34항, 제38항, 제48항 및 제52항 중 어느 한 항에 기재된 화합물과 리간드를 접촉시켜, 표지된 컨쥬게이트를 형성하는 단계를 포함하고, 선택적으로 리간드는 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 펩타이드, 다당류, 에틸렌 백본을 가지는 중합체, 또는 고체 지지체이거나, 또는 리간드는 폴리뉴클레오타이드이고 여기서 상기 화합물을 리간드에 공유적으로 부착시키기 충분한 조건은 자동화된 포스포아미다이트 올리고뉴클레오타이드 합성 조건인 것인 방법.

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성-적합성 적색 염료로서 유용한 신규의 설포로다민 염료 포스포아미다이트(sulforhodamine dye phosphoramidite) 화합물을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 형광 염료는 PCR에서 시퀀싱에 이르는 다양한 응용 분야에서 민감한 검출을 제공하기 때문에 올리고뉴클레오타이드를 조작하는데 가장 일반적으로 사용되는 태그 중 하나이다. 로다민 염료는 플루오레세인과 같은 다른 염료보다 더 긴 파장의 최대 방출을 제공하며, 다색의 표지 및 염색의 기회를 제공하기 때문에 올리고뉴클레오타이드 표지에 널리 사용된다. 또한, 로다민은 플루오레세인 및 쿠마린보다 더 높은 광안정성을 나타낸다.

[0003] 형광 염료-표지된 폴리뉴클레오타이드의 제조는 일반적으로 합성-후 접합에 의해, 예를 들어, 활성화된 염료 중간체를 폴리뉴클레오타이드의 아미노 유도체와 반응시킴으로써 이루어진다. 이러한 접근법은 컨쥬게이션 수율이 낮고, 컨쥬게이션된 생성물의 추가적인 정제가 필요한 구체적인 단점을 가진다. 형광 염료를 자동화된 포스포아미다이트 합성을 통해 합성 폴리뉴클레오타이드 내로의 혼입시키는 것은 더욱 편리안 접근법을 제공한다. 그러나, 자동화된 고체 상 합성의 일부로서 형광 염료가 폴리뉴클레오타이드 내로 첨가될 수 있도록 하는 형광 염료의 포스포아미다이트 유도체는 상업적으로 입수하기 어렵다.

[0004] 유명한 올리고뉴클레오타이드 표지 염료 중 하나의 예로는 설포로다민 101 설포닐 클로라이드 (Texas Red® 염료)가 있다. 그러나, Texas Red® 염료의 포스포아미다이트 유도체가 공지되어 있지 않으므로 Texas Red® 염료는 오직 합성-후 커플링을 통해 올리고뉴클레오타이드 내로 도입될 수 있다. Texas Red® 염료가 불안정하기 때문에, 카복시로다민 염료 (예컨대 5-TAMRA, SE)보다 커플링 수율이 훨씬 낮으며, 이는 Texas Red® 표지된 올리고뉴클레오타이드의 제조와 관련된 비용을 증가시킨다.

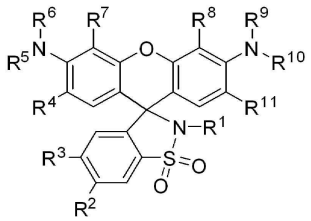
[0005] 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 위해 Texas Red® 염료에 대한 실행가능한 대안이 되려면, 형광단은 Texas Red® 염료의 스펙트럼 특성과 유사한 특성을 가져야 한다. 이러한 형광단은 표준 올리고뉴클레오타이드 합성 조건 (예를 들어, 아이오딘 처리, 캡핑, 및 산 탈보호 조건)에 대해 안정해야 하고, 올리고뉴클레오타이드 내 임의의 위치에 혼입될 수 있어야 한다. 또한, PCR 용도에 있어서, 이러한 형광단의 밝기는 생물학적으로 관련된 pH 범위에서 변화에 민감하지 않아야 하며, 염료는 소광된 프로브와 절단된 프로브 또는 소광되지 않은 프로브 (예를 들어, 혼성화된 프로브)의 형광 사이의 차이로서 측정되는 높은 종점 형광 (End-Point Fluorescence, EPF)을 생성하도록 충분히 소광될 필요가 있다.

[0006] 이전에 공지되어 있는 올리고 합성에 적합한 Texas Red® 염료의 대안은 구체적인 단점을 가진다. 예를 들어, CAL Fluor Red® 610 염료는 가시광선 스펙트럼의 주황색-적색 영역의 형광인 포스포아미다이트이며, 5' 표지의 프로브, 예컨대 5' 뉴클레아제 분석, 분자 비콘, 및 유사한 검출 분석에서 사용되는 프로브에 사용될 수 있다. 그러나, 이러한 염료는 보호된 하이드록실 기를 포함하지 않아, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에만 첨가될 수 있어, 이의 용도가 제한된다. 또 다른 염료 계열인, AquaPhluor®는, 최대 흡수 at 593 nm에서 최대 흡수 및 613 nm에서 최대 방출을 가지는, 높은 형광성의 적색 염료를 포함한다. 그러나, 이러한 염료는 구조적 한계로 인해 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 또는 3' 말단에만 혼입될 수 있다.

[0007] 이에 따라, 자동화된 포스포아미다이트 올리고뉴클레오타이드 합성의 조건에 적합하고, 폴리뉴클레오타이드 내 임의의 위치 내로 혼입될 수 있고, 종래의 PCR 기기에 적합한 최대 방출 및 흡수를 가지고, PCR 용도에서 높은 종점 형광 신호를 제공하는 적색 형광 염료에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0008] 하나의 양태에서, 화학식 I로 나타낸 구조를 가지는 화합물:

[0009]  (I),

[0010] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염이 본 명세서에 제공되며, 화학식 중:

[0011] R^1은 C_1-C_6 알킬 또는 L^1-X이고;

[0012] R^2는 할로겐 또는 SO_2NH_2이고,

[0013] R^3는 H 또는 할로겐이고;

[0014] R^4, R^7, R^8, 및 R^{11}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고,

[0015] R^5, R^6, R^9, 및 R^{10}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0016] R^4 및 R^5는, 함께 취해진 경우, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0017] R^6 및 R^7는, 함께 취해진 경우, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0018] R^8 및 R^9는, 함께 취해진 경우, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0019] R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해진 경우, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

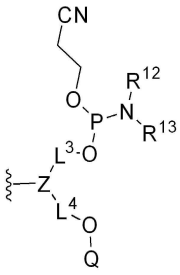
[0020] R^5 및 R^6는, R^5 및 R^6가 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0021] R^9 및 R^{10}은, R^9 및 R^{10}이 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0022] L^1은 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{20} 헤테로알킬렌이고;

[0023] X는 활성화된 에스터, N_3, 프로파인일, 말레이미도, 또는

[0024] $-O-P(OCH_2CH_2CN)NR^{12}R^{13}$ 또는 X는 다음의 화합물이되:



[0025] , 여기서

[0026] L^3 및 L^4는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{30} 헤테로알킬렌이고;

[0027] Q는 하이드록실 보호기이고;

[0028] Z는 CH, N, NHC(O)N, 또는 OC(O)N이고;

[0029] R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이다.

[0030] 일부 구현예에서, R^2는 Cl 및 R^3는 H이다. 일부 구현예에서, X는 $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i\text{-}Pr)_2$이다.

[0031] 일부 구현예에서, L^1은 PEG_{2-10} 링커이다. 특정 구체예에서, L^1은 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$이다.

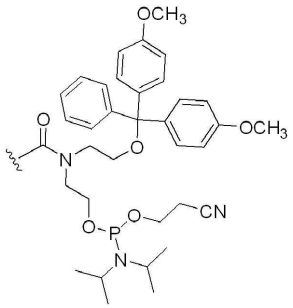
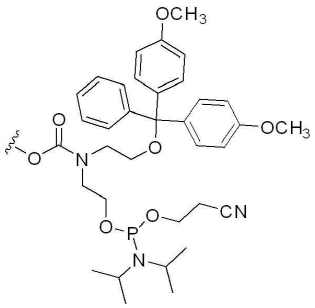
[0032] 일부 구현예에서, R^4 및 R^5는, 함께 취해져, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이

고; R^{10} 및 R^{11}은, 함께 취해져, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^6 및 R^7은, 함께 취해져, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^8 및 R^9은, 함께 취해져, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이다.

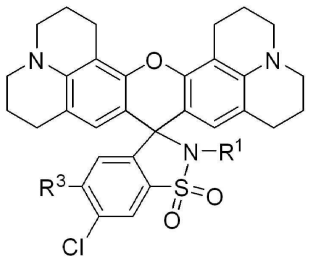
[0033] 일부 구현예에서, R^4 및 R^5는, 함께 취해져, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해져, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^6 및 R^7는, 함께 취해져, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^8 및 R^9는, 함께 취해져, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이다. 일부 구현예에서, R^5, R^6, R^9, 및 R^{10}은 각각 메틸이다.

[0034] 일부 구현예에서, Q는 산-불안정성 하이드록실 보호기이다. 일부 구현예에서, Q는 트라이틸 또는 다이메톡시트라이틸 기이다.

[0035] 일부 구현예에서, C_2-C_6 알킬렌 또는 $-(OCH_2CH_2)m-$이되, m은 2 내지 6 범위의 정수이다. 일부 구현예에서, L^3 및 L^4는 $-CH_2CH_2-$이다. 일부 구현예에서, X는:

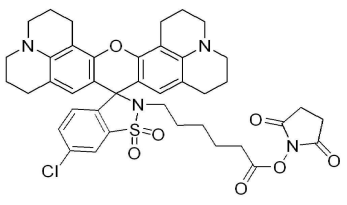
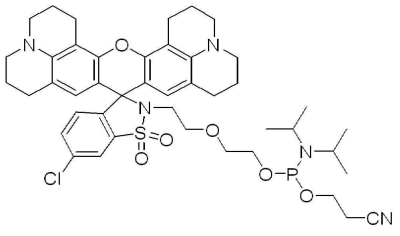
[0036]  또는  이다.

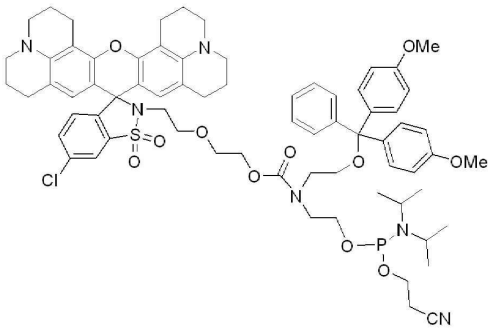
[0037] 일부 구현예에서, 화합물은 화학식 IA로 나타낸 구조체:

[0038]  (IA)

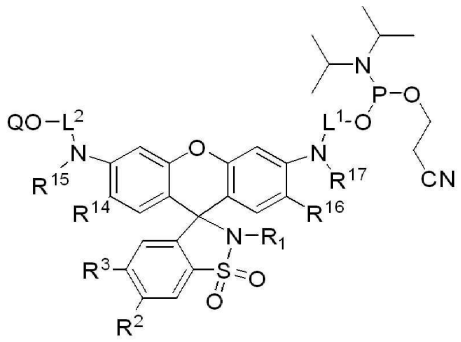
[0039] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염을 가지며, 화학식 중 R^1은 L^1X이고, R^3는 H 또는 할로겐이다. 일부 구현예에서, X는 $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i\text{-}Pr)_2$이다.

[0040] 일부 구체예들에서, 화합물은:

[0041] , , 또는

[0042]  이다.

[0043] 제2 양태에서, 화학식 II으로 나타낸 화합물:

[0044]  (II),

[0045] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염이 본 명세서에 제공되며, 화학식 중:

[0046] R^1은 C_1-C_6 알킬이고;

[0047] R^2는 H, 할로겐, 또는 SO_2NH_2이고,

[0048] R^3는 H 또는 할로겐이고;

[0049] R^{14} 및 R^{16}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0050] R^{15} 및 R^{17}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0051] R^{14} 및 R^{15}은, 함께 취해져, R^{14} 및 R^{15}이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬을 형성하고;

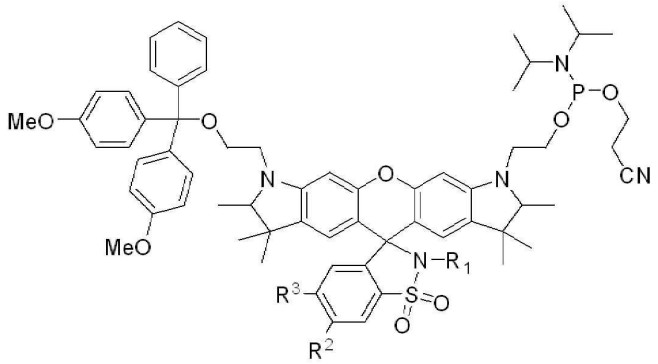
[0052] R^{16} 및 R^{17}은, 함께 취해져, R^{16} 및 R^{17}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬을 형성하고;

[0053] Q는 하이드록실 보호기이고;

[0054] L^1 및 L^2는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{20} 헤테로알킬렌이다.

[0055] 일부 구현예에서, R^3는 H이다. 일부 구현예에서, R^2는 H이다. 일부 구현예에서, R^2는 Cl이다.

[0056] 일부 구현예에서, 화합물은 화학식 (IIA):



[0057] (IIA),

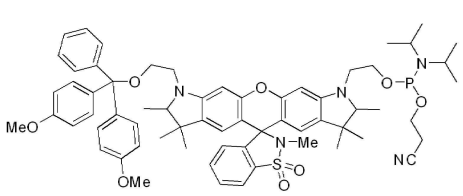
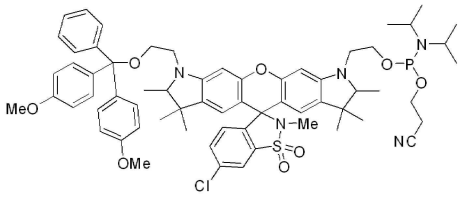
[0058] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염으로 나타내며, 화학식 중:

[0059] R^1은 C_1-C_6 알킬이고;

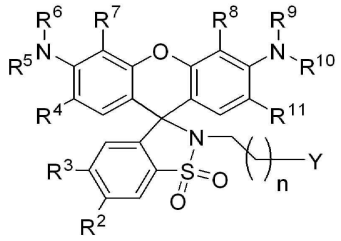
[0060] R^2는 H, 할로겐, 또는 SO_2NH_2이고;

[0061] R^3는 H 또는 할로겐이다.

[0062] 일부 구체예들에서, 화합물은:

[0063]  또는  이다.

[0064] 제3 양태에서, 화학식 (III)의 구조를 가지는 화합물:



[0065] (III),

[0066] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염이 본 명세서에 제공되며, 화학식 중:

[0067] R^2는 H, 할로겐 또는 SO_2NH_2이고;

[0068] R^3는 할로겐 또는 H이고;

[0069] R^4, R^7, R^8, 및 R^{11}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고,

[0070] R^5, R^6, R^9 및 R^{10}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0071] R^4 및 R^5는, 함께 취해진 경우, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0072] R^6 및 R^7는, 함께 취해진 경우, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0073] R^8 및 R^9는, 함께 취해진 경우, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

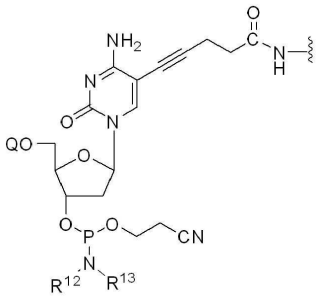
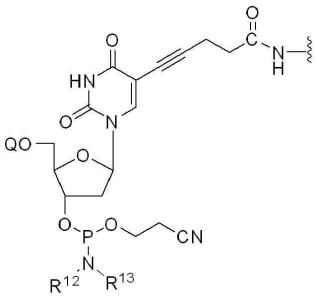
[0074] R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해진 경우, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0075] R^5 및 R^6는, R^5 및 R^6가 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0076] R^9 및 R^{10}은, R^9 및 R^{10}이 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0077] n은 1 내지 9의 정수이고;

[0078] Y는:

[0079]  또는  이되;

[0080] 화학식 중:

[0081] Q는 하이드록실 보호기이고;

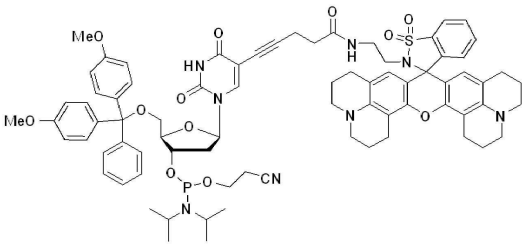
[0082] R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이다.

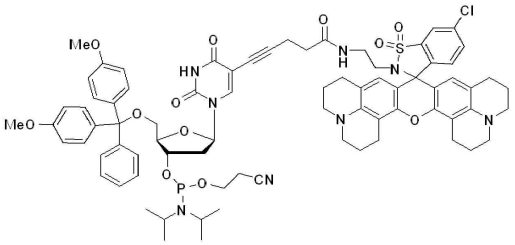
[0083] 일부 구현예에서, R^2는 Cl 및 R^3는 H이다.

[0084] 일부 구현예에서, R^4 및 R^5는, 함께 취해져, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^{10} 및 R^{11}은, 함께 취해져, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^6 및 R^7은, 함께 취해져, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^8 및 R^9은, 함께 취해져, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이다. 일부 구현예에서, R^4 및 R^5는, 함께 취해져, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해져, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^6 및 R^7는, 함께 취해져, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이고; R^8 및 R^9는, 함께 취해져, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 프로필렌 사슬이다.

[0085] 일부 구현예에서, Q는 산-불안정성 하이드록실 보호기이다. 일부 구현예에서, Q는 트라이틸 또는 다이메톡시트라이틸 기이다. 또 다른 구현예에서, R^{12} 및 R^{13}는 각각 아이소프로필이다.

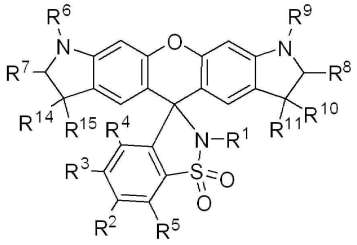
[0086] 일부 구체예들에서, 화합물은:

[0087]  또는



[0088] 이다.

[0089] 제4 양태에서, 화학식 VI으로 나타낸 화합물:



[0090] (VI),

[0091] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염이 본 명세서에 제공되며, 화학식 중:

[0092] R^1은 L^1-X이고;

[0093] R^2, R^3, R^4, 및 R^5는 독립적으로 H, 할로겐, C_1-C_6 알킬, 또는 SO_2NH_2이고;

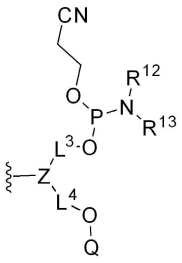
[0094] R^6 및 R^9은 독립적으로 H 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0095] R^7, R^8, R^{10}, R^{11}, R^{14}, 및 R^{15}은 독립적으로 H 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0096] L^1은 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{20} 헤테로알킬렌이고;

[0097] X는 활성화된 에스터, N_3, 프로파인일, 말레이미도, 또는

[0098] $-O-P(OCH_2CH_2CN)NR^{12}R^{13}$이거나, 또는 X는 다음의 화합물이되:



[0099] ,

[0100] 화학식 중

[0101] L^3 및 L^4는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{30} 헤테로알킬렌이고;

[0102] Q는 하이드록실 보호기이고;

[0103] Z는 CH, N, NHC(O)N, 또는 OC(O)N이고;

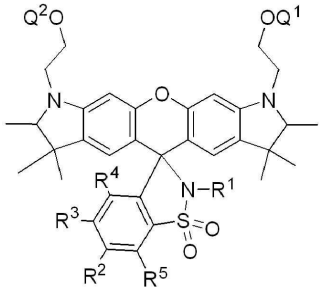
[0104] R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이다.

[0105] 화학식 VI의 일부 구현예에서, R^7, R^8, R^{10}, R^{11}, R^{14}, 및 R^{15}은 메틸이다. 특정 구체예에서, X는 $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i\text{-}Pr)_2$이다. 일부 구현예에서, L^1은 PEG_{2-10} 링커이고, 다른 구현예에서, L^1은 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$이

다. 특정 구체예에서, R^2, R^3, R^4, 및 R^5는 H이다.

[0106] 일부 구현예에서, R^6는 OH 또는 C1-C6 아실옥시로 치환된 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이며, 예를 들어, R^6는 OH 또는 OAc으로 치환된 에틸이다. 일부 구현예에서, R^9은 OH 또는 C1-C6 아실옥시로 치환된 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이며, 예를 들어, R^9은 OH 또는 OAc으로 치환된 에틸이다.

[0107] 화학식 VI의 일부 구현예에서, 화합물은

[0108] 

,

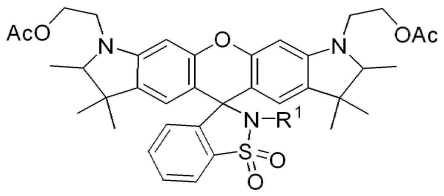
[0109] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염이며, 화학식 중:

[0110] R^1, R^2, R^3, R^4, 및 R^5는 화학식 VI에 대해 상기 기재된 바와 같고;

[0111] Q^1 및 Q^2는 독립적으로 H 또는 C1-C6 아실이다.

[0112] 일부 구현예에서, R^2, R^3, R^4, 및 R^5는 H이다. 일부 구현예에서, Q^1 및 Q^2는 아세틸렌이다.

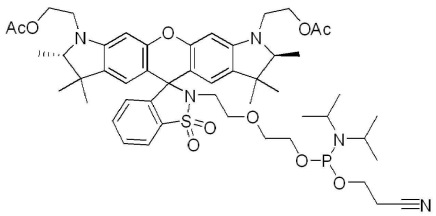
[0113] 화학식 VI의 일부 구현예에서, 화합물은

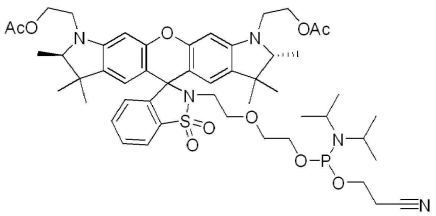
[0114] 

이되,

[0115] R^1은 화학식 VI에 대해 상기 정의된 바와 같다.

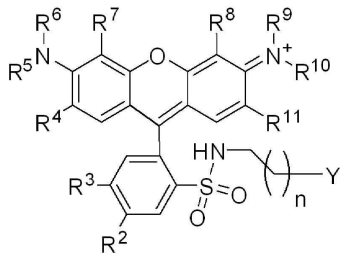
[0116] 화학식 VI의 일부 구현예에서, 화합물은

[0117] 

또는 

이다.

[0118] 제5 양태에서, 화학식 IV의 화합물을 포함하는 표지된 폴리뉴클레오타이드:

[0119] 

(IV),

[0120] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염이 본 명세서에 제공되며, 화학식 중:

[0121] R^2는 할로겐 또는 SO_2NH_2이고;

[0122] R^3는 H 또는 할로겐이고;

[0123] R^4, R^7, R^8, 및 R^{11}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고,

[0124] R^5, R^6, R^9, 및 R^{10}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0125] R^4 및 R^5는, 함께 취해진 경우, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0126] R^6 및 R^7는, 함께 취해진 경우, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0127] R^8 및 R^9는, 함께 취해진 경우, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

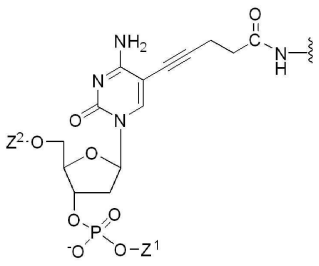
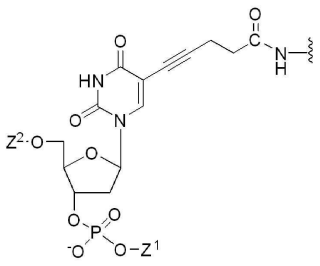
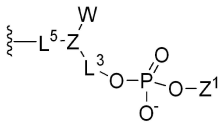
[0128] R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해진 경우, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0129] R^5 및 R^6는, R^5 및 R^6가 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0130] R^9 및 R^{10}은, R^9 및 R^{10}이 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0131] n은 1 내지 9의 정수이고;

[0132] Y는:

[0133] , , 또는  이되;

[0134] 화학식 중:

[0135] 물결선은 화학식 III에 대한 부착점이고;

[0136] R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0137] W는 H 또는 L^4-O-Z^2이고;

[0138] L^3, L^4, 및 L^5는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{30} 헤테로알킬렌이고;

[0139] Z는 CH, N, NHC(O)N, 또는 OC(O)N이고;

[0140] Z^1은 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드이고;

[0141] Z^2는 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 또는 H이다.

[0142] 일부 구현예에서, R^2은 Cl 및 R^3는 H이다. 다른 구현예에서, R^4 및 R^5는 R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^{10} 및 R^{11}은 R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^6 및 R^7은 R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이고; R^8 및 R^9은 R^8 및 R^9이

부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬이다.

[0143] 일부 구현예에서, 표지된 폴리뉴클레오타이드는 5'-뉴클레아제 PCR 프로브이다. 일부 구현예에서, 표지된 폴리뉴클레오타이드는 형광 소광제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 표지된 폴리뉴클레오타이드는 고체 지지체에 부착된다. 일부 구현예에서, 고체 지지체는 제어된 공극 유리 비드, 폴리스타이렌 비드, 자기 비드, 또는 마이크로웰 플레이트이다.

[0144] 제5 양태에서, 본 명세서에는 리간드의 표지된 컨쥬게이트를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 화합물을 리간드에 공유적으로 부착시키기 충분한 조건하에 적합한 용매에서 리간드를 본 명세서에 개시된 화합물과 접촉시켜 표지된 컨쥬게이트를 형성하는 단계를 포함한다.

[0145] 일부 구현예에서, 리간드는 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 펩타이드, 다당류, 에틸렌 백본을 가지는 중합체, 또는 고체 지지체이다. 일부 구현예에서, 리간드는 폴리뉴클레오타이드이다. 다른 구체예에서, 리간드에 공유적으로 부착하기에 충분한 조건이 자동화된 포스포아미다이트 올리고뉴클레오타이드 합성 조건이다.

도면의 간단한 설명

[0146] 본 발명의 전술한 양태 및 수반되는 수 많은 이점은 첨부하는 도면과 함께 다음의 상세한 설명을 참조하여 보다 잘 이해되는 것과 동일하게 더욱 용이하게 이해될 것이다:

도 1A는 Texas Red® 염료: (Tx Red)-TCAGAGTACCTGAAACA (Oligo A)로 표지된 예시적인 폴리뉴클레오타이드 서열 번호: 1의 여기 및 방출 스펙트럼 (Ex/Em max = 598 nm/616 nm)이다. 상기 도면에서, x 축은 nm이고 y 축은 형광 단위이다.

도 1B는 염료 S7: (S7)-TCAGAGTACCTGAAACA (Oligo B)로 표지된 예시적인 폴리뉴클레오타이드 서열 번호: 1의 여기 및 방출 스펙트럼이다 (Ex/Em = 598 nm/616 nm). 상기 도면에서, x 축은 nm이고 y 축은 형광 단위이다.

도 1C는 설포로다민 염료 S6: (S6)-TCAGAGTACCTGAAACA (Oligo C)으로 표지된 예시적인 폴리뉴클레오타이드 서열 번호: 1의 여기 및 방출 스펙트럼이다 (Ex/Em max = 568/589 nm). 상기 도면에서, x 축은 nm이고 y 축은 형광 단위이다.

도 1D는 설포로다민 염료 S10a으로 5'-표지된 예시적인 폴리뉴클레오타이드 서열 번호: 1의 여기 및 방출 스펙트럼이다 (Ex/Em max = 568/587 nm).

도 2A는 프라이머 서열 번호: 4 및 5를 사용한 모델 PCR 반응에서 Texas Red® 염료 (Oligo D)로 표지된 서열 번호: 2를 가지는 프로브와 예시적인 염료 (Oligo E)로 표지된 서열 번호: 2를 가지는 프로브의 성능을 비교한 PCR 곡선을 도시한다. 상기 도면에서, x 축은 Ct이고 y 축은 형광 단위이다.

도 2B는 프라이머 서열 번호: 6 및 7을 사용한 모델 PCR 반응에서 Texas Red® 염료 (Oligo F)로 표지된 서열 번호: 3를 가지는 Texas Red® 염료-표지된 프로브와 예시적인 염료 (Oligo G)로 표지된 서열 번호: 2를 가지는 프로브의 성능을 비교한 PCR 곡선을 도시한다. 상기 도면에서, x 축은 Ct이고 y 축은 형광 단위이다.

도 3A 및 3B는 라세미 예시적인 화합물 S10 (3A) 및 이의 이성질체 S10a (3B)으로 표지된 예시적인 올리고뉴클레오타이드의 HPLC 트레이스이다. 상기 도면에서, x 축은 분이고 y 축은 260nm에서의 흡광도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0147] 본 명세서에는 표준 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 올리고뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있는 설포로다민 염료 포스포아미다이트가 제공된다. 추가적으로, 다른 반응기를 포함하는 설포로다민 염료가 제공된다.

[0148] 본 명세서 및 첨부된 청구 범위 전체에 걸쳐, 용어 "포함하다(comprise 및 include)" 및 이의 변형, 예컨대 "포함하다(comprises)", "포함하는(comprising)" "포함하다(includes)" 및 "포함하는(including)"은 문맥이 허용하는 경우 구체적으로 언급되지 않은 다른 요소 또는 정수를 가능한 포함하는 것을 전달하기 위한 것이다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "이루어진(consisting of)"은 "이루어진"이라는 구절 다음에 오는 모든 것을 포함하며 이에 제한됨을 의미하기 위한 것이다. 이에 따라, "이루어진"이라는 문구는 나열된 요소가 필수이거나 필수이며 다른 요소가 존재할 수 없음을 나타낸다. 용어 "본질적으로 이루어진"은 추가 성분, 단계 및/또는 부품이 청구되는 조성물, 방법 또는 구조의 기본적인 및 신규한 특성을 실질적으로 변경하지 않는 경우에만, 조성물,

방법 또는 구조가 추가 성분, 단계 및/또는 부품을 포함할 수 있음을 의미한다.

[0149] 본 명세서에서 사용되는 단수 용어 ("a", "an" 및 "the")는, 본 명세서에서 달리 언급되지 않는 한, 또는 내용상 명확히 대조되는 것으로 언급되지 않는 한, 단수형 및 복수형 모두를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0150] 본 명세서에 달리 언급되지 않는 한, 또는 내용상 달리 명확하게 반대로 언급되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 모든 방법은 임의의 적합한 순서로 실시될 수 있다. 본 명세서에 제공되는 임의의 그리고 모든 예시, 그리고 예시적인 언어 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 본 발명을 보다 잘 설명하기 위한 것이며 청구범위에 기재된 발명의 범위를 달리 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0151] 본 명세서에 개시된 발명의 대안적 요소 또는 구체예의 그룹화는 제한으로 해석되어서는 안된다. 각 그룹 구성원은 본 출원에서 발견되는 해당 그룹의 다른 구성원 또는 다른 요소와 임의의 조합하여 또는 개별적으로 언급되고 청구될 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원은 편의성 및/또는 특허성을 이유로 하나의 그룹에 포함되거나 하나의 삭제될 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 임의의 포함 또는 삭제가 발생할 경우, 명세서는 본 출원에 변형된 기을 포함하고 첨부된 청구범위에서 사용되는 모든 마쿠쉬 그룹에 관한 기재 내용을 실시하는 것을 포함하는 것으로 한다.

[0152] 달리 지시되지 않는 한, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기재된다.

[0153] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "증폭"은 적어도 하나의 표적 핵산 또는 이의 서열 상보체의 적어도 부분 서열이, 일반적으로 주형-의존 방식으로 생성되는 임의의 수단을 지칭하며, 선형 또는 지수적으로 핵산 서열을 증폭하는 기법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 증폭 방법으로는 중합효소 사슬 반응 (PCR), 역전사효소 PCR, 실시간 PCR, 중첩 PCR, 다중 PCR, 정량적 PCR (Q-PCR), 핵산 서열 기반 증폭 (NASBA), 전사 매개 증폭 (TMA), 결찰효소 사슬 반응 (LCR), 롤링 서클 증폭 (RCA), 가닥 변위 증폭 (SDA), 결찰효소 검출 반응 (LDR), 다중 결찰-의존 프로브 증폭 (MLPA), 결찰 후 Q-복제효소 증폭, 프라이머 연장, 가닥 치환 증폭 (SDA), 과분지 가닥 치환 증폭, 다중 치환 증폭 (MDA), 핵산 가닥-기반 증폭 (NASBA), 2 단계 다중 증폭, 디지털 증폭, 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 기법에 대한 설명은 여러 문헌 중, 다음의 문헌에서 확인할 수 있다: Ausubel et al.; PCR Primer: A Laboratory Manual, Diffenbach, Ed., Cold Spring Harbor Press (1995); The Electronic Protocol Book, Chang Bioscience (2002); The Nucleic Acid Protocols Handbook, R. Rapley, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (2002); 및 Innis et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990).

[0154] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "염기"는 상보적 뉴클레오타이드 염기 또는 뉴클레오타이드 염기 유사체, 예를 들어 퓨린, 7-디아자퓨린, 또는 피리미딘과 수소 결합, 예를 들어, Watson-Crick 유형 수소 결합을 형성할 수 있는 질소 함유 헤테로사이클릭 모이어티를 의미한다. 아데닌, 사이토신, 구아닌, 타이민, 및 우라실은 천연에 존재하는 핵산에서 주로 발견되는 핵염기이다. 염기로는 또한 천연에 존재하는 염기의 유사체, 예컨대 디아자아데닌, 7-디아자-8-아자아데닌, 7-디아자구아닌, 7-디아자-8-아자구아닌, 이노신, 네뷸라린, 나이트로피롤, 나이트로인돌, 2-아미노-퓨린, 2,6-다이아미노-퓨린, 하이포잔틴, 5-메틸사이토신, 아이소사이토신, 슈도아이소사이토신, 5-브로모우라실, 5-프로필우라실, 6-아미노퓨린, 2-클로로-6-아미노퓨린, 잔틴, 하이포잔틴, 등을 포함한다.

[0155] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "상보성"은 염기 쌍에 대해 및 염기 쌍로부터 서로 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 능력을 지칭한다. 염기 쌍은 일반적으로 뉴클레오타이드 단위와 역평행 폴리뉴클레오타이드 가닥 사이이 수소 결합에 의해 형성된다. 상보적 폴리뉴클레오타이드 가닥은 Watson-Crick 방식으로 (예를 들어, A에서 T, A에서 U, C에서 G), 또는 이중 나선을 형성할 수 있는 임의의 다른 방식으로 염기 쌍을 형성할 수 있다. 표적 서열에 대한 프로브 서열의 "상보성"의 백분율은 표적 서열 또는 표적 서열의 보체에 대한 프로브 서열의 "동일성" 백분율이다. 프로브와 표적 서열 사이의 "상보성" 정도를 결정할 때, "상보성" 정도는 프로브의 서열과 표적 서열의 또는 이에 가장 잘 맞는 표적 서열의 서열의 보체의 서열 사이의 동일성 백분율로서 표현된다. 예시적인 프로브는 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드이다.

[0156] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "듀플렉스"는 상보적인 (또는 부분적으로 상보적인) 단일 가닥의 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, DNA, RNA, LNA, 또는 펩타이드 핵산 (PNA)을 어닐링 (혼성화)하여 형성된 이중 가닥의 혼성화 복합체를 의미한다.

[0157] 본 명세서에서 사용 시, "형광 소광"은 형광 샘플, 즉, 형광 폴리뉴클레오타이드 프로브의 형광 강도를 감소시키는 임의의 과정을 지칭한다. 다양한 분자 상호 작용으로 소광을 야기할 수 있다. 예로는 여기 상태 반응, 분

자 재배열, 에너지 전달, 기저 상태 복합체 형성, 및 충돌 소광을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0158] 본 명세서에서 사용 시, "할로겐"은 F, Cl, Br, 또는 I를 의미한다.

[0159] 용어 "혼성화하다" 및 "혼성화"는, 일부 구현예에서, 엄격한 조건하에서 핵산 분자가 특정 뉴클레오타이드 서열에 대해 우선적으로 결합, 이중화, 또는 어닐링하는 것인 "특이적 혼성화"와 관련하여 본 명세서에서 사용된다. 용어 "엄격한 조건"은 프로브가 이의 표적 서열에 우선적으로 혼성화할 것이며, 다른 서열에는 그보다 적은 정도로, 또는 전혀 혼성화하지 않는 조건을 지칭한다. "엄격한 혼성화" 및 "엄격한 혼성화 세척 조건"은 핵산 혼성화의 맥락에서 서열-의존적이며, 상이한 환경 파라미트 하에서 상이하다. 핵산의 혼성화에 대한 광범위한 가이드는, 예를 들어, Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I, Ch. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, NY에 기재되어 있다. 폴리뉴클레오타이드가 표적 서열에 대해 혼성화하는 정도는 혼성화 강도로도 공지되어 있으며, 기술 분야 내 잘 알려진 방법에 의해 결정된다. 바람직한 방법은 주어진 혼성 듀플렉스의 Tm을 결정하는 것이다. 이것은 용액에서 형성된 듀플렉스를 점진적으로 온도를 증가시키고, 예를 들어 변성을 수반하는 염기 쌍의 중첩붕괴(unstacking)함께 증가하는 자외선의 흡광도에 의한 듀플렉스의 변성을 모니터링함으로써 달성될 수 있다. Tm은 일반적으로 DNA 가닥의 절반이 단일 가닥 (ssDNA) 상태에 있는 온도로 정의된다. Tm은 다양한 파라미터, 예컨대 혼성화된 상보적인 가닥 서열의 길이, 이의 특이적인 뉴클레오타이드 서열, 염기 조성, 염기 변형, 및 상보적인 가닥의 농도에 의존한다.

[0160] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "표지" 및 "검출 가능한 표지"는 상호교환적으로 사용되며, 이는 생체 분자, 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드에 부착된 경우, 이러한 생체 분자, 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드가 적합한 검출 수단에 의해 검출 가능하게 만드는 모이어티를 지칭한다. 예시적인 표지로는 형광단, 발색단, 방사성 동위 원소, 스핀-표지, 효소 표지, 화학 발광 표지, 전기화학 발광 화합물, 자성 표지, 마이크로 스피어, 콜로이드 금속, 면역 학적 표지, 리간드, 효소 등을 포함한다.

[0161] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "변형된 뉴클레오타이드 염기" 또는 "변형된 염기"는 천연에 존재하는 염기의 구조를 가지지 않으며, 이에 따라 천연에 존재하지 않는 염기를 지칭한다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "변형된 당"은 천연에 존재하는 당, 예를 들어, 리보스 또는 디옥시리보스 당의 구조를 가지지 않고, 이에 따라 천연에 존재하지 않는 당 또는 당 유사체를 지칭한다.

[0162] 본 명세서에서 사용 시, 핵산 분자와 관련하여 용어 "천연에 존재하는"은 자연에서 발생하며, 오직 자연에서 발생한 염기, 당, 뉴클레오사이드, 및 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 가지는 RNA 또는 DNA 분자 (단일 가닥 또는 이중 가닥)을 의미한다.

[0163] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "뉴클레오사이드"는 본 명세서에 언급된 유형의 당에, 예를 들어, 리보스 또는 디옥시리보스 당에 베타-글루코사이드 연결부를 통해 결합된, 본 명세서에 언급된 유형의 질소함유 염기로 구성된 분자를 지칭한다. 뉴클레오사이드의 예로는 아데노신, 사이토딘, 구아노신, 티미딘, 우리딘 및 이노신을 포함한다.

[0164] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "뉴클레오타이드"는 독립적인 단량체로서 또는 폴리뉴클레오타이드 내의 하위 단위로서, 뉴클레오사이드의 포스페이트 에스터를 의미한다. 뉴클레오타이드 단량체는 예를 들어 뉴클레오타이드 5'-모노포스페이트, 5'-다이포스페이트, 5'-트라이포스페이트, 및 3'-모노포스페이트를 포함한다. 뉴클레오타이드 트라이포스페이트는 종종 리보스 당의 구조적인 특징을 구체적으로 가르키기 위해 "NTP", "dNTP" (2'-디옥시펜토스) 또는 "ddNTP" (2', 3'-다이디옥시펜토스)로서 표시된다. "뉴클레오타이드 5'-트라이포스페이트"는 5' 위치에 트라이포스페이트 에스터 기를 가지는 뉴클레오타이드를 지칭한다. 트라이포스페이트 에스터 기는 하나 이상의 포스페이트 산소 원자에 대한 황 치환, 예를 들어 알파-싸이오뉴클레오타이드5'-트라이포스페이트를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 모노포스페이트, 다이포스페이트 또는 트라이포스페이트는핵산 또는 핵산 중간체의 변형을 촉매화하는 핵산 가공 효소에 대한 기질로 작용할 수 있다.

[0165] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 광범위하게 주로 또는 전체적으로 약 2 내지 약 300개의 천연 존재의 또는 변형된 뉴클레오타이드 단량체 단위로 구성된 단일 가닥 사슬을 지칭하며, 예를 들어, A, C, G, T, 또는 U 염기로 치환된 디옥시리보스 또는 리보스 당 고리로 구성되고, 이는 종래의 포스페이트 백본 모이어티에 연결된다. 더욱 구체적으로, 용어는 상기 기재된 크기 범위의 디옥시리보뉴클레오타이드의 단일 가닥 사슬을 지칭한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 염기 및/또는 당을 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 단량체 단위 이외에도, 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 검출 가능한 표지 및/또

는 하나 이상의 반응기를 포함할 수 있다.

[0166] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "복수"는 하나 이상을 의미한다.

[0167] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 일반적으로 약 10 내지 약 300 개의 뉴클레오타이드 단량체 단위를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 뉴클레오타이드 단량체 단위 이외에도, 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 검출 가능한 표지 및/또는 하나 이상의 반응기를 포함할 수 있다.

[0168] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "프라이머"는 표적 핵산 가닥에 상보적인 폴리뉴클레오타이드 가닥을 합성하기 위한 출발점으로서 효과적인 폴리뉴클레오타이드 또는 변형된 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 예를 들어, PCR에 사용하기 위한 프라이머는 정방향 및 역방향 프라이머를 포함하며, 정방향 프라이머는 표적 핵산 가닥의 영역에 상보적인 서열을 포함하고, 상보적인 가닥의 합성을 가이드한다. 역방향 프라이머는 반대 가닥에 상보적인 서열을 포함하며, 표적 핵산 가닥의 반대 가닥을 따라 합성을 가이드한다.

[0169] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "프로브"는 표적 핵산 서열의 영역에 상보적인 서열을 포함하는 표지된 올리고뉴클레오타이드 또는 표지된 변형된 올리고뉴클레오타이드를 지칭하며, 프로브가 표적 서열과 함께 듀플렉스를 형성하도록 하여 표적 서열의 영역이 존재함을 나타내는 검출 가능한 신호를 생성한다. 검출 가능한 신호는 혼성화 도중 또는 후에 직접적으로 또는 간접적으로 생성된다. 일부 용도에서, 5'-뉴클레아제 PCR에서 프라이머 연장 도중에, 프로브는 프로브의 중합효소-매개 연장을 방지하기 위해 연장 가능한 3' 하이드록실 기를 가지지 않는다. 특정 구체예에서, 프로브는 TaqMan® 프로브, TaqMan MGB® 프로브, Pleiades® 프로브, 분자 비콘 (예를 들어, Tyagi, Sanjay & Kramer, Fred. (2012) Molecular Beacons in Diagnostics. F1000 의학 보고서. 4. 10. 10.3410/M4-10에 기재된 분자 비콘) 등을 포함한다.

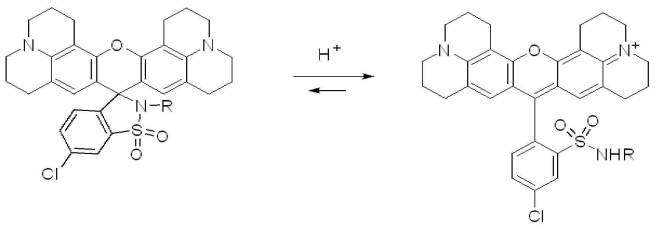
[0170] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "보호기," "보호기", 또는 "보호된 형태"는 작용기의 작용성을 보존 및/또는 후속 화학 반응에서의 화학선택성을 얻기 위해 의도된 작용기 (예를 들어, 하이드록실)의 불안정한 화학적 변형을 지칭한다. 보호기는 탈보호 처리(예를 들어, 산 처리)에 의해 최종 생성물로부터 제거된다.

[0171] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "고체 지지체"는 입자 (예를 들어, 비드), 섬유, 단일체(monolith), 멤브레인, 필터, 플라스틱 스트립, 어레이, 마이크로웰 플레이트, 등을 포함하는 임의의 불용성 물질을 지칭한다. 일부 구현예에서, 고체 지지체는 자동화된 포스포아미다이트 올리고뉴클레오타이드 합성에 적합한 고체 지지체, 예컨대 폴리스타이렌 및 제어된 공극 유리 (CPG)이다.

[0172] 설포로다민 염료 및 이의 포스포아미다이트

[0173] 하나의 양태에서, 본 명세서에는 하나 이상의 반응기, 예를 들어, 포스포아미다이트 기를 포함하는 설포로다민 염료가 제공된다.

[0174] 특정 구체예에서, 본 명세서에 개시된 염료는 설탐 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 염료는 개방형 또는 폐쇄형으로 존재할 수 있으며, 하나의 예시적인 화합물이 하기에 도시된다:



[0175]

[0176] "폐쇄형" (스파이로) "개방형".

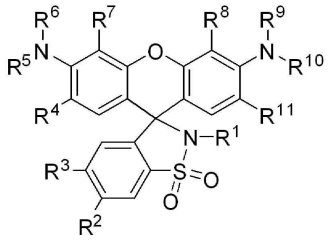
[0177] 이의 사이클릭 또는 "폐쇄"형태, 본 발명의 설포로다민 염료 및 이의 포스포아미다이트는 무색이며 비-형광이다. 그러나, 양성자화, 예를 들어, 산성 조건에 대한 노출 시, 고리형은 형광성인 "개방형"으로 전환될 수 있다. 본 명세서에서 사용 시, 본 명세서에 개시된 염료을 지칭할 때, 용어 "설포로다민 염료"는 개방 형광 형태, 및 개방형만 형광인 경우에도, 이의 상응하는 폐쇄형 모두를 포함한다.

[0178] 설포로다민 염료로부터 유래된 설탐의 가역적인 개방-폐쇄, pH 의존적 상호 전환과 관련된 유색-무색 전이 현상은 기술 분야 내에 공지되어 있다 (예를 들어, Corrie J.E.T. and Munasinghe V.R. *Dyes and Pigments* 79 (2008): 76-82 참조) 생물학적 분자를 표지하기 위해 사용되는 설포로다민 염료의 특정 반응성 유도체, 예컨대 설포로다민 B 클로라이드는, 일반적으로 상업적 공급업체로부터 두 가지 설포닐 클로라이드 이성질체인, 오쏘

및 파라 이성질체의 혼합물로서 입수 가능하지만, 잔틸륨 시스템에 대해 오쏘인 설포닐 클로라이드 이성질체만 상기 도시된 고리-사슬 과정을 거치는 사이클릭 설폰아마이드 (설탐) 화합물을 형성할 수 있다. 따라서, 이러한 염료의 오쏘 이성질체는 일반적으로 생물학적 용도에 바람직하지 않은 것으로 보고되어 있는데, 이는 오쏘-이성질체의 형광이 pH-의존적이기 때문이다 (예를 들어, Corrie J.E.T. et al. *Bioconjugate Chem.* 12 (2001): 186-194 참조). 놀랍게도, 본 발명의 발명자는 본 발명의 염료의 폴리뉴클레오타이드 컨쥬게이트가, 기술 분야 내 개시된 염료의 컨쥬게이트와는 달리, PCR 용도에 관련된 pH 범위, 예를 들어, 약 6.5 내지 약 8.5에서 pH-의존적이지 않은 형광을 가지며, 종래의 소광제, 예컨대 BHQ-2 소광제 (Biosearch)로 잘 소광되어, 높은 종점 형광 (EPF)을 생성할 수 있는 것을 발견하였다. 본 명세서에서 사용 시, 종점 형광은 절단된 프로브 형광 사이의 차이, 또는 소광된 프로브와 혼성화된 프로브 형광 사이의 차이이다.

[0179] 특정 구체예에서, 본 명세서에 개시된 설포로다민 염료의 "개방" 형태는 놀랍게도 설포로다민 101 염료 또는 TAMRA 염료의 최대 방출 및 흡수와 유사한, 또는 일치하는 스펙트럼 성질을 가진다. 그러나, 극성 설폰산 기를 포함하여 포스포아미다이트 시약의 형태로 제조될 수 없는 설포로다민 101-유형 염료와 달리, 본 명세서에 개시된 설포로다민 염료는 폐쇄 (설탐) 형태로 비극성이며 자동화된 포스포아미다이트 합성 및/또는 생체접합 조건에 적합한 유기 용매에 용이하게 용해된다. 본 명세서에 개시된 염료의 유리한 특성은 또한 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피와 같은 종래의 실험실 기법에 의한 정제를 용이하게 한다.

[0180] 일부 구현예에서, 염료는 화학식 IA로 나타낸 구조:



[0181] (I),

[0182] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염을 가지며, 화학식 중:

[0183] R^1은 C_1-C_6 알킬 또는 L^1-X이고;

[0184] R^2는 할로겐 또는 SO_2NH_2이고,

[0185] R^3는 H 또는 할로겐이고;

[0186] R^4, R^7, R^8, 및 R^{11}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고,

[0187] R^5, R^6, R^9, 및 R^{10}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0188] R^4 및 R^5는, 함께 취해진 경우, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0189] R^6 및 R^7는, 함께 취해진 경우, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0190] R^8 및 R^9는, 함께 취해진 경우, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0191] R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해진 경우, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

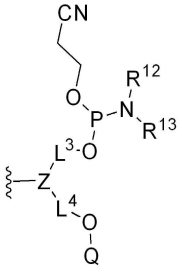
[0192] R^5 및 R^6는, R^5 및 R^6가 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0193] R^9 및 R^{10}은, R^9 및 R^{10}이 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0194] L^1은 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{20} 헤테로알킬렌이고;

[0195] X는 활성화된 에스터, N_3, 프로파인일, 말레이미도, 또는

[0196] $-O-P(OCH_2CH_2CN)NR^{12}R^{13}$ 또는 X는 다음의 화합물:



[0197] 이되,

[0198] 화학식 중

[0199] L^3 및 L^4는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{30} 헤테로알킬렌이고;

[0200] Q는 하이드록실 보호기이고;

[0201] Z는 CH, N, NHC(O)N, 또는 OC(O)N이고;

[0202] R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이다.

[0203] 일부 구현예에서, 화학식 I는 하나의 반응기를 포함한다. 다른 구체예에서, 화학식 I는 직교하는 두 개의 반응기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 포스포아미다이트 기와 같은 반응기 이외에도, 화학식 I는 산-불안정성 보호기, 예컨대 트라이틸 또는 다이메톡시트라이틸 기로 보호된 하이드록실 기를 포함한다.

[0204] 화학식 I의 특정 구체예에서, R^2는 Cl 및 R^3는 H이다. 다른 구현예에서, R^4 및 R^5는 R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성하고; R^{11} 및 R^{10}은 R^{11} 및 R^{10}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성하고; R^6 및 R^7은 R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성하고; R^8 및 R^9은 R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성한다. 일부 구현예에서, R^1은 L^1X이다. 다른 구체예에서, R^1은 메틸 또는 에틸이다. 일부 구현예에서, C_3 알킬렌은 프로필렌이다.

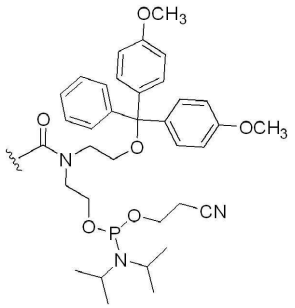
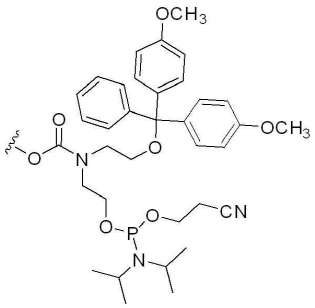
[0205] 반응성 모이어티가 포스포아미다이트인 경우, X는 $OP(OCH_2CH_2CN)N(i\text{-}Pr)_2$이다. L^1은 N, O, S, P, 및 이의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, L^1은 PEG_{2-10} 링커이다. 다른 구체예에서, L^1은 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$이다.

[0206] 특정 구체예에서, R^5, R^6, R^9, 및 R^{10}은 C1-C3 알킬, 예를 들어, 메틸이다.

[0207] 일부 구현예에서, L^3 및 L^4는 독립적으로 C_2-C_6 알킬렌 또는

[0208] $-(OCH_2CH_2)m-$이되, m은 2 내지 6 범위의 정수이다. 다른 구체예에서, L^3 및 L^4는 $-CH_2CH_2-$이다.

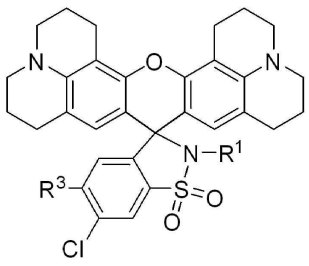
[0209] 특정 구체예에서, X는

[0210]  또는  이다.

[0211] 본 명세서에 나타낸 화학식에서, Q는 하이드록실 보호기를 나타낸다. 이러한 보호기의 예시는 기술 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, Peter G. M. Wuts, Greene's protective groups in organic synthesis (2006) 참조). 적합한 하이드록실 보호기로는 염기-불안정성 및 산-불안정성 기를 포함한다. 일부 구현예에서, Q는 자동화된 포스포아미다이트 올리고뉴클레오타이드 합성 조건에 적합한 하이드록실 보호기, 예컨대 트라이틸 또는 다이메톡시트라이틸 기이다.

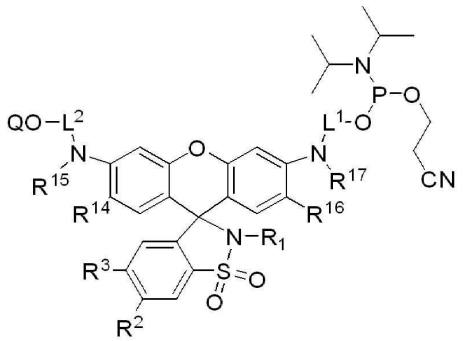
[0212] 다른 반응성 모이어티 또는 반응기, 예를 들어, 1차 아민과 화학 결합을 형성할 수 있는 반응기를 포함하는 설포로다민 염료가 또한 본 명세서의 범위 내에 속한다. 이러한 반응기로는 아이소싸이오시아네이트, 아이소시아네이트, 아실 아자이드, NHS 에스터, 설포닐 클로라이드, 알데하이드, 글리옥살, 에폭사이드, 옥시란, 카보네이트, 아릴 할라이드, 이미도에스터, 카보이마이드, 카보다이이마이드, 무수물, 나이트로페닐 에스터, 및 플루오로페닐 에스터를 포함한다. 바람직하게, 반응기는 활성화된 에스터이다. 본 명세서에서 사용 시, "활성화된 에스터"는 아마이드의 형성으로 아미노 기와 반응할 수 있는 카복실 산의 에스터이다. 활성화된 에스터로는 N-하이드록시석신이미드 (NHS) 에스터, 펜타플루오로페닐 에스터, 테트라플루오로페닐 에스터, 및 p-나이트로페닐 에스터를 포함한다. 인 시츄로 (예를 들어, 카보다이이미드와 같은 활성화제를 카복실산에 첨가함으로써) 생성되는 활성화된 에스터도 여기에 포함된다.

[0213] 일부 구현예에서, 설포로다민 염료는 화학식 IA로 나타낸 구조체:

[0214]  (IA),

[0215] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염을 가지며, 화학식 중 R^1은 L^1X이고, R^3는 H 또는 할로겐이다. 화학식 IA의 일부 구현예에서, R^1은 $CH_2CH_2OCH_2CH_2OP(OCH_2CH_2CN)N(i\text{-}Pr)_2$이다.

[0216] 일부 구현예에서, 설포로다민 염료 포스포아미다이트는 화학식 II으로 나타내며:

[0217]  (II),

[0218] 화학식 중:

[0219] R^1은 C_1-C_6 알킬이고;

[0220] R^2는 H, 할로겐, 또는 SO_2NH_2이고,

[0221] R^3는 H 또는 할로겐이고;

[0222] R^{14} 및 R^{16}은, 단독의 경우, 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0223] R^{15} 및 R^{17}은, 단독의 경우, 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0224] 또는 R^{14} 및 R^{15}은, 함께 취해져, R^{14} 및 R^{15} 가 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬을 형성하고;

[0225] R^{16} 및 R^{17}은, 함께 취해져, R^{16} 및 R^{17}이가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬을 형성하고;

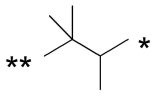
[0226] Q는 하이드록실 보호기이고;

[0227] L^1 및 L^2는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{20} 헤테로알킬렌이다.

[0228] 화학식 II일부 구현예에서, R^3는 H이다. 다른 구체예에서, R^2는 H이다. 또 다른 구현예에서, R^2는 Cl이다.

[0229] 다른 구체예에서, R^{14} 및 R^{15}은 R^{14} 및 R^{15}이 부착된 원자를 연결하는, 1, 2, 또는 3개의 메틸 기로 임의 치환된 C_2 알킬렌 사슬을 형성하고; 또 다른 구현예에서, R^{16} 및 R^{17}은 R^{16} 및 R^{17}이 부착된 원자를 연결하는, 1, 2, 또는 3개의 메틸 기로 임의 치환된 C_2 알킬렌 사슬을 형성한다. 특정 구체예에서, R^{14} 및 R^{15}은 3개의 메틸 기로 치환된 에틸렌 사슬을 형성하고, R^{16} 및 R^{17}은 3개의 메틸 기로 치환된 에틸렌 사슬을 형성한다.

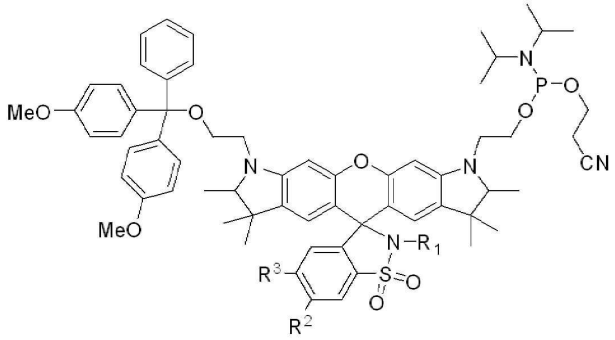
[0230] 특정 구체예에서, 함께 취해진 R^{14} 및 R^{15} 및 함께 취해진 R^{16} 및 R^{17}은 다음과 같다:

[0231] 

,

[0232] 여기서 *는 질소 원자에 대한 부착점을 나타내고 **는 방향족 탄소 원자에 대한 부착점을 나타낸다.

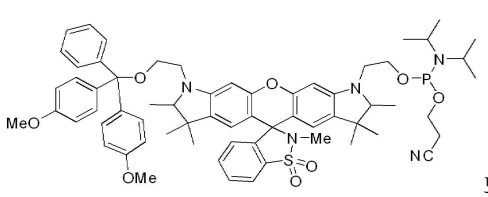
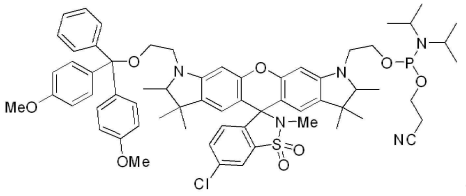
[0233] 특정 구체예에서, 화합물은 화학식 (IIA):

[0234] 

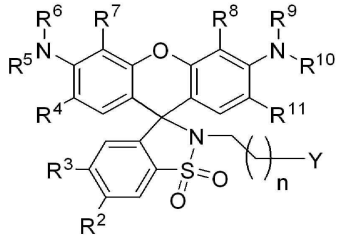
(IIA)

[0235] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염으로 나타낸다.

[0236] 구체적인 구현예에서, 화합물은

[0237]  또는  이다.

[0238] 일부 구현예에서, 설포로다민 염료 포스포아미다이트는 화학식 (III)으로 나타낸 화합물:

[0239]  (III),

[0240] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염이며, 화학식 중:

[0241] R^2는 H, 할로겐, 또는 SO_2NH_2이고;

[0242] R^3는 할로겐 또는 H이고;

[0243] R^4, R^7, R^8, 및 R^{11}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고,

[0244] R^5, R^6, R^9, 및 R^{10}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0245] R^4 및 R^5는, 함께 취해진 경우, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0246] R^6 및 R^7는, 함께 취해진 경우, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0247] R^8 및 R^9는, 함께 취해진 경우, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

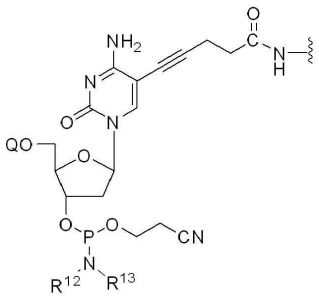
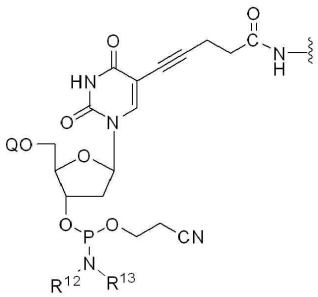
[0248] R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해진 경우, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0249] R^5 및 R^6는, R^5 및 R^6가 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0250] R^9 및 R^{10}은, R^9 및 R^{10}이 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0251] n은 1 내지 9의 정수이고;

[0252] Y는:

[0253]  또는  이되;

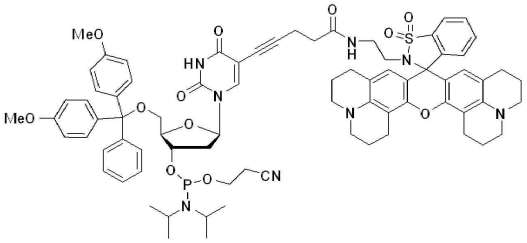
[0254] 화학식 중:

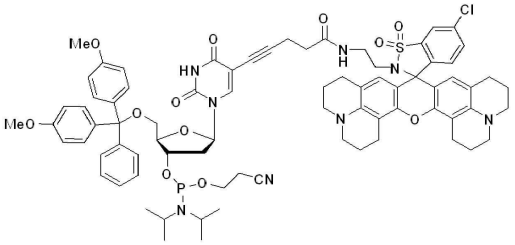
[0255] Q는 하이드록실 보호기이고;

[0256] R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이다.

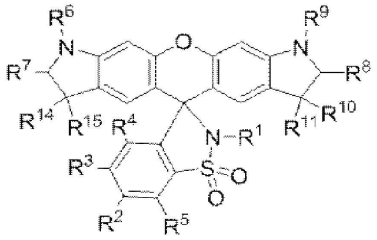
[0257] 특정 구체예에서, R^2는 Cl 및 R^3는 H이다. 일부 구현예에서, R^4 및 R^5는 각각이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성하고; R^{11} 및 R^{10}은 각각이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성하고; R^6 및 R^7은 각각이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성하고; 및 R^8 및 R^9은 각각이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성한다.

[0258] 특정 구체예에서, 화합물은

[0259]  또는

[0260]  이다.

[0261] 일부 구현예에서, 설포로다민 염료는 화학식 VI으로 나타낸 화합물:

[0262]  (VI),

[0263] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염이며, 화학식 중:

[0264] R^1은 L^1-X이고;

[0265] R^2, R^3, R^4, 및 R^5는 독립적으로 H, 할로겐, C_1-C_6 알킬, 또는 SO_2NH_2이고;

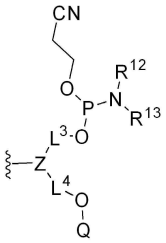
[0266] R^6 및 R^9은 독립적으로 H 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0267] R^7, R^8, R^{10}, R^{11}, R^{14}, 및 R^{15}은 독립적으로 H 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0268] L^1은 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{20} 헤테로알킬렌이고;

[0269] X는 활성화된 에스터, N_3, 프로파인일, 말레이미도, 또는

[0270] $-O-P(OCH_2CH_2CN)NR^{12}R^{13}$이거나, 또는 X는 다음의 화합물이되:

[0271] 
,

[0272] 화학식 중 L^3 및 L^4는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{30} 헤테로알킬렌이고;

[0273] Q는 하이드록실 보호기이고;

[0274] Z는 CH, N, NHC(O)N, 또는 OC(O)N이고;

[0275] R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이다.

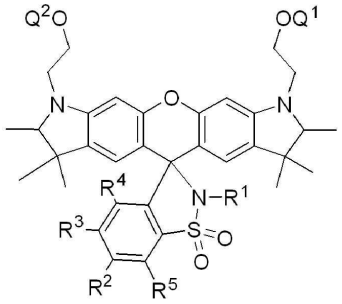
[0276] 화학식 VI의 일부 구현예에서, R^7, R^8, R^{10}, R^{11}, R^{14}, 및 R^{15}은 메틸이다. 화학식 VI의 특정 구체예에서, X는 $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i\text{-}Pr)_2$이다.

[0277] 화학식 VI의 일부 구현예에서, L^1은 PEG_2-$_{10}$ 링커이다. 화학식 VI의 다른 구체예에서, L^1은 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2$-이다.

[0278] 화학식 VI의 일부 구현예에서, R^2, R^3, R^4, 및 R^5는 H이다. 화학식 VI의 구체적인 구현예에서, R^6는 OH 또는 C1-C6 아실옥시로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이다. 화학식 VI의 특정 구현예에서, R^9은 OH 또는 C1-C6 아실옥시로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이다.

[0279] 화학식 VI의 특정 구체예에서, R^6는 OH 또는 OAc으로 치환된 에틸이다. 화학식 VI의 일부 구현예에서, R^9은 OH 또는 OAc으로 치환된 에틸이다.

[0280] 화학식 VI의 일부 구현예에서, 화합물은

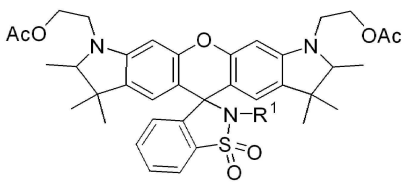
[0281] 
,

[0282] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염이며, 화학식 중:

[0283] R^1, R^2, R^3, R^4, 및 R^5는 화학식 VI의 화합물에 대해 기재된 바와 같고;

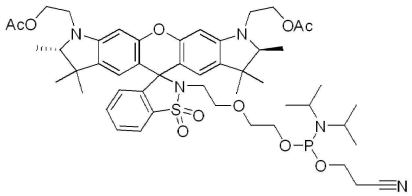
[0284] Q^1 및 Q^2는 독립적으로 H 또는 C1-C6 아실이다.

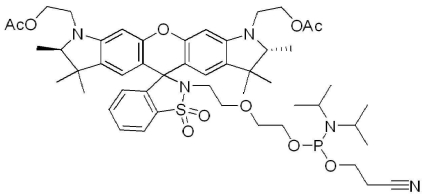
[0285] 일부 구체예들에서, 화합물은:

[0286] 
이고,

[0287] R^1은 화학식 VI의 화합물에 대해 정의된 바와 같다.

[0288] 구체적인 구현예에서, 화합물은



[0289]  또는 이다.

[0290] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "알킬," "알케닐," 및 "알키닐"은 직선형-사슬, 분지형-사슬, 및 사이클릭 1가 하이드로카빌 라디칼, 및 이들의 조합을 포함하며, 이들은 치환되지 않을 때 오직 C 및 H만을 함유한다. 예로는 메틸, 에틸, 아이소뷰틸, 사이클로헥실, 사이클로펜틸에틸, 2-프로페닐, 3-뷰티닐, 등을 포함한다. 이러한 각각의 기의 전체 탄소 원자 수가 종종 본 명세서에 기재되며, 예를 들어, 기가 최대 10개의 탄소 원자를 포함할 수 있는 경우, 1-10C, C_1-C_{10}, C-C10, 또는 C1-10로서 나타낼 수 있다.

[0291] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "헤테로알킬," "헤테로알케닐," 및 "헤테로알키닐"은 하나 이상의 사슬 탄소 원자가 헤테로원자로 대체된 상응하는 탄화수소를 의미한다. 예시적인 헤테로원자로는 N, O, S, 및 P를 포함한다. 헤테로원자가, 예를 들어 헤테로알킬 기 내의 탄소 원자를 대체할 수 있는 경우, 기를 설명하는 숫자는, 예를 들어 C3-C10으로서 표기되지만, 이는 고리 또는 사슬 내 탄소 원자의 수와, 기재된 고리 또는 사슬 내 탄소 원자에 대한 대체물로서 포함된 헤테로원자 수의 합을 나타낸다.

[0292] 일반적으로, 알킬, 알케닐, 및 알키닐 치환기는 1-10개의 탄소 원자 (알킬) 또는 2-10개의 탄소 원자 (알케닐 또는 알키닐)을 함유한다. 바람직하게는, 1-8개의 탄소 원자 (알킬) 또는 2-8개의 탄소 원자 (알케닐 또는 알키닐)을 함유한다. 종종, 1-6 개의 탄소 원자 (알킬) 또는 2-6 개의 탄소 원자 (알케닐 또는 알키닐)를 함유하는 것을 의미하는 "저급 알킬"로도 지칭한다. 단일 기는 하나 이상의 유형의 다중 결합 또는 하나 이상의 다중 결합을 포함할 수 있고; 이러한 기는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 함유하는 경우 용어 "알케닐"의 정의 내에 포함되며, 이들이 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 함유하는 경우 용어 "알키닐"에 포함된다.

[0293] 본 명세서에서 사용 시, 용어 "알킬렌," "알케닐렌," 및 "알키닐렌"은 직선형-사슬, 분지형-사슬, 및 사이클릭 2가 하이드로카빌 라디칼, 및 이의 조합을 포함한다.

[0294] 알킬, 알케닐, 및 알키닐 기는 이러한 치환이 화학적으로 타당한 정도로 임의 치환될 수 있다. 일반적인 치환기로는 다음을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 할로겐 (F, Cl, Br, I), =O, =N-CN, =N-또는, =NR, 또는, NR_2, SR, SO_2R, SO_2NR_2, $NRSO_2R$, $NRCONR_2$, NRC(O)OR, NRC(O)R, CN, C(O)OR, $C(O)NR_2$, OC(O)R, C(O)R, 및 NO_2, 여기서 각각의 R은 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬, C_2-C_8 헤테로알킬, C_1-C_8 아실, C_2-C_8 헤테로아실, C_2-C_8 알케닐, C_2-C_8 헤테로알케닐, C_2-C_8 알키닐, C_2-C_8 헤테로알키닐, C_6-C_{10} 아릴, 또는 C_5-C_{10} 헤테로아릴이고, 각각의 R은 할로겐 (F, Cl, Br, I), =O, =N-CN, =N-또는', =NR', 또는', NR'_2, SR', SO_2R', $SO_2NR'_2$, $NR'SO_2R'$, $NR'CONR'_2$, NR'C(O)OR', NR'C(O)R', CN, C(O)OR', $C(O)NR'_2$, OC(O)R', C(O)R', 및 NO_2으로 임의 치환되며, 여기서 각각의 R'는 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬, C_2-C_8 헤테로알킬, C_1-C_8 아실, C_2-C_8 헤테로아실, C_6-C_{10} 아릴, 또는 C_5-C_{10} 헤테로아릴이다. 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 또한 C_1-C_8 아실, C_2-C_8 헤테로아실, C_6-C_{10} 아릴, 또는 C_5-C_{10} 헤테로아릴으로 치환될 수 있으며, 상기 각각은 특정 기에 적절한 치환기로 치환될 수 있다.

[0295] 본 명세서에서 사용 시 "알킬"은 사이클로알킬 및 사이클로알킬알킬 기를 포함하며, 용어 "사이클로알킬"은 본 명세서에서 고리 탄소 원자를 통해 연결된 카보사이클릭 비-방향족 기를 설명하도록 사용되며, "사이클로알킬알킬"은 알킬 링커를 통해 분자에 연결된 카보사이클릭 비-방향족 기를 설명하도록 사용된다. 이와 유사하게, "헤테로사이클릴"은 고리 구성원으로서 적어도 하나의 헤테로원자를 포함하고 고리 원자 (이는 C 또는 N일 수 있음)를 통해 분자에 연결되는 비-방향족 사이클릭 기를 식별하는데 사용되며; "헤테로사이클릴알킬"은 알킬렌 링커를 통해 또 다른 분자에 연결된 기를 설명하는데 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용 시, 이러한 용어는 또한 고리가 방향족이 아닌 한 이중 결합 또는 2 개를 함유하는 고리를 포함한다.

[0296] "방향족" 또는 "아릴" 치환체 또는 모이어티는 잘 알려진 방향족 특성을 가지는 모노사이클릭 또는 접합된 바이사이클릭 모이어티를 지칭하며; 예로는 페닐 및 나프틸을 포함한다. 이와 유사하게, 용어 "헤테로방향족" 및 "헤테로아릴"은 고리 구성원으로서 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 모노사이클릭 또는 접합된 바이사이클릭

고리 시스템을 지칭한다. 적합한 헤테로원자로는 N, O, 및 S를 포함하며, 이를 포함하여 5-원 고리 뿐만 아니라 6-원 고리의 방향족성을 허용한다. 일반적인 헤테로방향족 시스템으로는 모노사이클릭 C5-C6 방향족 기 예컨대 피리딜, 피리미딜, 피라진일, 싸이엔일, 퓨란일, 피롤릴, 피라졸릴, 싸이아졸릴, 옥사졸릴, 및 이미다졸릴, 및 C8-C10 바이사이클릭 기를 형성하기 위해 이러한 모노사이클릭 기 중 하나를 페닐 고리와 또는 임의의 헤테로방향족 모노사이클릭 기와 접합하여 형성된 접합된 바이사이클릭 모이어티, 예컨대 인돌릴, 벤즈이미다졸릴, 인다졸릴, 벤조트라이아졸릴, 아이소퀴놀릴, 퀴놀릴, 벤조싸이아졸릴, 벤조퓨란일, 피라졸로피리딜, 퀴나졸린일, 퀴녹살린일, 시놀린일, 등을 포함한다. 고리 시스템 전체에 걸친 전자 분포의 측면에서 방향족 특성을 가지는 임의의 모노사이클릭 또는 접합된 고리 바이사이클릭 시스템이 이러한 정의에 포함된다. 또한 방향족의 특성을 가지는 분자의 나머지 부분에 직접적으로 부착되는 바이사이클릭 기를 포함한다. 일반적으로, 고리 시스템은 5-12 개의 고리 구성원 원자를 포함한다. 바람직하게, 모노사이클릭 헤테로아릴은 5-6 개의 고리 구성원을 포함하며, 바이사이클릭 헤테로아릴은 8-10 개의 고리 구성원을 포함한다.

[0297] 아릴 및 헤테로아릴 모이어티는 다양한 치환기, 예를 들어 C_1-C_8 알킬, C_2-C_8 알케닐, C_2-C_8 알키닐, C_5-C_{12} 아릴, C_1-C_8 아실, 및 이의 헤테로폼으로 치환될 수 있고, 상기 각각은 그 자체가 추가로 치환될 수 있다; 아릴 및 헤테로아릴 모이어티에 대한 다른 치환기로로는 다음을 포함한다: 할로겐 (F, Cl, Br, I), 또는, NR_2, SR, SO_2R, SO_2NR_2, $NRSO_2R$, $NRCONR_2$, NRC(O)OR, NRC(O)R, CN, C(O)OR, $C(O)NR_2$, OC(O)R, C(O)R, 및 NO_2, 여기서 각각의 R은 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬, C_2-C_8 헤테로알킬, C_2-C_8 알케닐, C_2-C_8 헤테로알케닐, C_2-C_8 알키닐, C_2-C_8 헤테로알키닐, C_6-C_{10} 아릴, C_5-C_{10} 헤테로아릴, C_7-C_{12} 아릴알킬, 또는 C_6-C_{12} 헤테로아릴알킬이며, 각각의 R은 알킬 기에 대해 상기 기재된 바와 같이 임의 치환된다. 물론 아릴 또는 헤테로아릴 기 상의 치환기는 본 명세서에서 치환기의 각 유형 또는 치환기의 각 성분에 대해 적합한 것으로 기재된 기로 추가로 치환될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 아릴알킬 치환체는 아릴 부분에서 아릴 기에 대해 전형적인 것으로 본 명세서에 기재된 치환기로 치환될 수 있으며, 알킬 부분에 알킬 기에 전형적이거나 적합한 것으로 본 명세서에 기재된 치환기로 추가적으로 치환될 수 있다.

[0298] 본 명세서에서 사용 시, "임의 치환"은 기재되는 구체적인 기가 비-수소 치환체로 대체된 하나 이상의 수소 치환기를 가질 수 있음을 나타낸다. 일부 임의 치환된 기 또는 모이어티에서, 모든 수소 치환기는 비-수소 치환체, 예를 들어, C_1-C_6 알킬, C_2-C_6 헤테로알킬, 알키닐, 할로겐 (F, Cl, Br, I), N_3, 또는, NR_2, SR, SO_2R, SO_2NR_2, $NRSO_2R$, $NRCONR_2$, NRC(O)OR, NRC(O)R, CN, C(O)OR, $C(O)NR_2$, OC(O)R, C(O)R, 옥소, 및 NO_2 (각각의 R은 독립적으로 H, C_1-C_6 알킬, 또는 C_2-C_6 헤테로알킬)로 치환된다. 임의 치환기가 카보닐 산소 또는 옥소 (=O)와 같이 이중 결합을 통해 부착되는 경우, 이러한 기는 2 개의 가용 원자가를 차지하므로, 포함될 수 있는 총 치환기 수는 사용 가능한 원자가 수에 따라 감소한다.

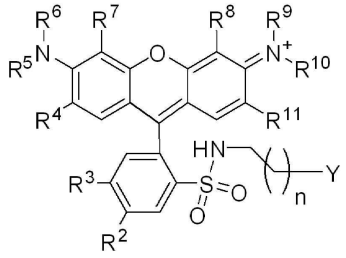
[0299] 본 명세서에 개시된 설포로다민 화합물, 예컨대 화학식 I, IA, II, IIA, 및 III의 화합물의, 염, 입체이성질체, 및 호변 이성질체가 본 발명의 범위 내에 있다. 본 명세서에서 사용 시, "입체 이성질체" 또는 "입체이성질체"는 하나 이상의 입체 중심의 카이랄이 상이한 화합물을 지칭한다. 입체 이성질체는 거울상 이성질체 및 부분입체 이성질체를 포함한다. 본 명세서에서 사용 시, "호변 이성질체"는 양성자 위치가 상이한 화합물의 다른 형태, 예컨대 에놀-케토 및 이민-에나민 호변 이성질체를 지칭한다. 본 명세서에서 사용 시, 화합물의 "염"은 반대 이온과 이온 결합된 화합물의 이온을 의미한다. 화합물의 염은 산 및 염기의 중화 반응에 의해 형성된다. 염은 기술 분야 내 공지된 다양한 유기 및 무기 반대 이온으로부터 유도될 수 있으며, 소듐, 포타슘, 칼슘, 마그네슘, 암모늄, 및 테트라알킬암모늄; 및 분자가 염기성 작용기를 가지는 경우, 유기 또는 무기 산의 염, 예컨대 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 타트레이트, 메실레이트, 아세테이트, 말리에이트, 및 옥살레이트를 을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에 개시된 화합물의 구조는 하나의 공명 형태로만 나타낼 수 있지만, 모든 공명 형태가 포함되는 것으로 이해된다.

[0300] 본 명세서에 개시된 설포로다민 화합물, 예를 들어, 화학식 I, IA, II, IIA, III, 및 VI의 화합물은 기술 분야 내에 공지된 기법 및 방법을 사용하여 임의의 적합한 방식으로 합성될 수 있다. 예를 들어, Beija M. et al, *Chem. Soc. Rev.*, (2009): 38, 2410-2433; Kreimerman et al, *Current Radiopharmaceuticals*, (2017): 10, 212-220; Corrie J.E.T. and Munasinghe V.R. *Dyes and Pigments* 79 (2008): 76-82; Corrie J.E.T. et al. *Bioconjugate Chem.* 12 (2001): 186-194를 참조한다. 하기 나타낸 실시예 1-9는 본 명세서의 일부 예시적인 화합물의 합성을 예시한다.

[0301] 표지된 폴리뉴클레오타이드

[0302] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 본 명세서에 개시된 포스포아미다이트 설포로다민 염료로부터 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성에 의해 제조된 설포로다민 염료-표지된 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 본 명세서에서 사용 시, "설포로다민 염료-표지된 폴리뉴클레오타이드"는 본 명세서에 개시된 포스포아미다이트 설포로다민 염료로부터 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성에 의해 제조되며 개방형 또는 폐쇄형의 설포로다민 염료 모이어티를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0303] 일부 구현예에서, 화학식 IV의 화합물:

[0304]  (IV),

[0305] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염을 포함하는 표지된 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공되며, 화학식 중:

[0306] R^2는 H, 할로겐, 또는 SO_2NH_2이고;

[0307] R^3는 H 또는 할로겐이고;

[0308] R^4, R^7, R^8, 및 R^{11}은 단독의 경우 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고,

[0309] R^5, R^6, R^9 및 R^{10}은 단독의 경우 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0310] R^4 및 R^5는, 함께 취해진 경우, R^4 및 R^5가 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0311] R^6 및 R^7는, 함께 취해진 경우, R^6 및 R^7이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0312] R^8 및 R^9는, 함께 취해진 경우, R^8 및 R^9이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

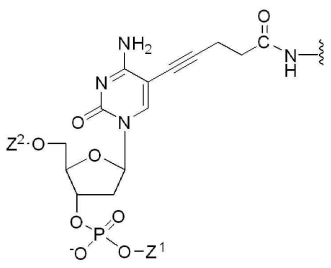
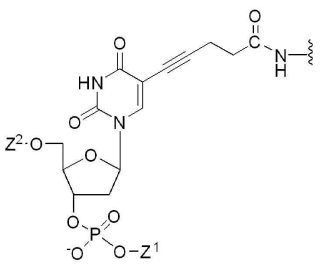
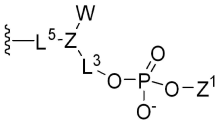
[0313] R^{10} 및 R^{11}는, 함께 취해진 경우, R^{10} 및 R^{11}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬이고;

[0314] R^5 및 R^6는, R^5 및 R^6가 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0315] R^9 및 R^{10}은, R^9 및 R^{10}이 부착되는 질소 원자와 함께, 5-원 또는 6-원 불포화 고리를 형성하고;

[0316] n은 1 내지 9의 정수이고;

[0317] Y는:

[0318] , , 또는  이되,

[0319] 화학식 중:

[0320] 물결선은 화학식 IV에 대한 부착점이고;

[0321] L^3, L^4, 및 L^5는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{30} 헤테로알킬렌이고;

[0322] Z는 CH, N, NHC(O)N, 또는 OC(O)N이고;

[0323] R^{12} 및 R^{13}은 독립적으로 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0324] W는 H 또는 L^4-O-Z^2이고;

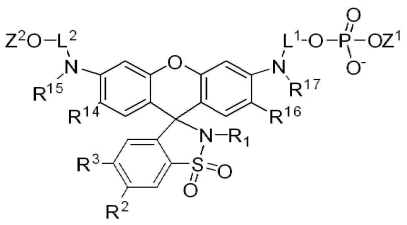
[0325] Z^1은 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드이고;

[0326] Z^2는 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 또는 H이다.

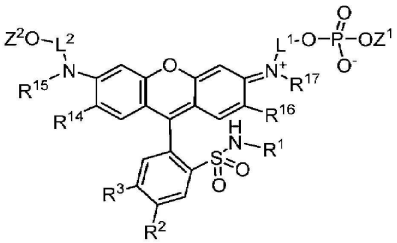
[0327] 일부 구현예에서, R^4 및 R^5는 각각이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성하고; R^{11} 및 R^{10}은 각각이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성하고; R^6 및 R^7은 각각이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성하고; 및 R^8 및 R^9은 각각이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_3 알킬렌 사슬을 형성한다. 특정 구체예에서, R^2는 Cl 및 R^3는 H이다.

[0328] L^3는 N, O, S, P, 및 이의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함할 수 있다. 화학식 IV의 일부 구현예에서, L^3는 -$(OCH_2CH_2)_n$-이고, n은 1 내지 5의 정수이다.

[0329] 일부 구현예에서, 화학식 VA 또는 VB의 화합물:



[0330] (VA) 또는



(VB),

[0331] 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 또는 염을 포함하는 표지된 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공되며, 화학식 중:

[0332] R^1은 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0333] R^2는 H, 할로겐, 또는 SO_2NH_2이고,

[0334] R^3는 H 또는 할로겐이고;

[0335] R^{14} 및 R^{16}은, 단독의 경우, 독립적으로 H, 할로겐, 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0336] R^{15} 및 R^{17}은, 단독의 경우, 독립적으로 H이거나 또는 임의 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0337] R^{14} 및 R^{15}은, 함께 취해져, R^{14} 및 R^{15}이 부착된 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬을 형성하고;

[0338] R^{16} 및 R^{17}은, 함께 취해져, R^{16} 및 R^{17}이 부착되는 원자를 연결하는 임의 치환된 C_2-C_3 알킬렌 사슬을 형성하고;

[0339] L^1 및 L^2는 독립적으로 임의 치환된 C_2-C_{10} 알킬렌 또는 임의 치환된 C_2-C_{20} 헤테로알킬렌이고;

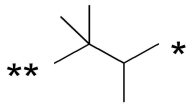
[0340] Z^1은 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드이고;

[0341] Z^2는 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 또는 H이다.

[0342] 화학식 VA 또는 VB의 일부 구현예에서, R^3는 H이다. 다른 구체예에서, R^2는 H이다. 또 다른 구현예에서, R^2는 Cl이다.

[0343] 화학식 VA 또는 VB의 다른 구체예에서, R^{14} 및 R^{15}은 R^{14} 및 R^{15}이 부착된 원자를 연결하는, 1, 2, 또는 3개의 메틸 기로 임의 치환된 C_2 알킬렌 사슬을 형성하고; 또 다른 구현예에서, R^{16} 및 R^{17}은 R^{16} 및 R^{17}이 부착된 원자를 연결하는, 1, 2, 또는 3개의 메틸 기로 임의 치환된 C_2 알킬렌 사슬을 형성한다. 특정 구체예에서, R^{14} 및 R^{15}은 3개의 메틸 기로 치환된 에틸렌 사슬을 형성하고, R^{16} 및 R^{17}은 3개의 메틸 기로 치환된 에틸렌 사슬을 형성한다.

[0344] 화학식 VA 또는 VB의 특정 구체예에서, 함께 취해진 R^{14} 및 R^{15} 및 함께 취해진 R^{16} 및 R^{17}은 다음과 같다:

[0345] 

,

[0346] 여기서 *는 질소 원자에 대한 부착점을 나타내고 **는 방향족 탄소 원자에 대한 부착점을 나타낸다.

[0347] 본 명세서에 개시된 표지된 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 추가적인 화합물을 포함할 수 있다. 본 명세서의 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 작은 홈(minor groove) 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 인터컬레이터(intercalator)를 포함한다.

[0348] 일반적으로, 본 명세서에 개시된 염료로 표지된 폴리뉴클레오타이드는 백본이 2'-디옥시리보스 또는 리보스를 포함하는 폴리뉴클레오타이드이다. 그러나, 표지된 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 당 변형체, 예를 들어, 변형된 당을 포함한다. 다양한 당 변형체가 유용하다. 일부 당 변형체로는 아라비노스, d-아라비노-헥시톨, 2-플루오로아라비노스, 자일룰로스, 헥소스, 또는 바이사이클릭 당을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0349] 본 발명의 표지된 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 백본 변형체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 백본 변형체를 포함한다. 일부 구현예에서, 백본 변형체는 변형된 당 포스페이트 백본, 잠금 핵산 백본, 펩타이드 백본, 포스포트라이에스터 백본, 포스포아미데이트 백본, 실록산 백본, 카복시메틸에스터 백본, 아세트아미데이트 백본, 카바메이트 백본, 싸이오에터 백본, 가교된 메틸렌 포스포네이트 백본, 포스포로싸이오에이트 백본, 메틸포스포네이트 백본, 알킬포스포네이트 백본, 포스페이트 에스터 백본, 알킬포스포노싸이오에이트 백본, 포르포로다이싸이오에이트 백본, 카보네이트 백본, 포스페이트 트라이에스터 백본, 카복시메틸에스터 백본, 메틸포스포로싸이오에이트 백본, 포르포로다이싸이오에이트 백본, p-에톡시 연결부를 가지는 백본, 및 전술한 것을 중 임의의 둘 이상의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 본 발명의 구체적인 구현예에서, 백본 변형체는 변형된 당 포스페이트 백본이다.

[0350] 본 명세서에 개시된 표지된 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 또는 비천연 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기로는 변형된 타이민 및 사이토신 염기 (예를 들어, 미국 특허 9,598,455 및 9,598,456에 개시된 염기), 2,6-다이아미노퓨린 염기, 보편적인 염기, 등을 포함한다. 본 명세서에 개시된 표지된 폴리뉴클레오타이드는 비-뉴클레오사이드 세그먼트 또는 비-뉴클레오사이드 단량체 (예를 들어, 폴리(에틸렌글리콜) 링커와 같은 링커)를 포함할 수 있다.

[0351] 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드는 프로브, 예를 들어, 5'-뉴클레아제 PCR 프로브이다.

[0352] 특정 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 추가적인 표지, 예를 들어, 형광 소광제를 추가로 포함한다. 당업자는 올리고뉴클레오타이드 내 표지의 위치는 달라질 수 있으며, 본 명세서의 내용에 제한되지 않음을 이해할 것이다.

[0353] 일부 구현예에서, 본 명세서에는 서열의 한 쪽 말단에 형광단으로서 설포로다민 염료 모이어티를 포함하고, 서

열의 다른 말단에 형광 소광제를 포함하는 변형된 폴리뉴클레오타이드가 제공되는데, 이러한 형광 소광제가 에너지 전달 메커니즘, 예컨대 형광 공명 에너지 전달 ("FRET")을 통해 온전한 프로브 (즉, 프로브로서 사용되는 올리고뉴클레오타이드)에서 형광단의 형광 신호를 억제할 수 있다. 중합효소가 프로브가 또한 혼성화되는 주형을 따라 프라이머를 연장하는 경우, 중합효소의 5'-뉴클레아제 활성이 프로브를 절단하여, 형광 소광제로부터 형광단이 확산하고 형광 신호가 감지되도록 한다. 신호는 절단되는 프로브의 양에 비례하여 각 PCR 주기에 따라 증가하여, 이에 따라, 증폭 산물 (예를 들어, 앰플리콘, 표적 서열)의 양에 비례하여 증가한다. 이를 통해 표적 DNA 서열을 직접적으로 검출하고 정량화하게 된다.

[0354] 일부 구현예에서, 설포로다민 염료 모이어티는 표지된 폴리뉴클레오타이드의 서열 말단으로부터 떨어진 적어도 하나의 뉴클레오타이드 위치에 있는 염기에 부착되고, 형광 소광제는 변형된 폴리뉴클레오타이드의 다른 말단으로부터 떨어진 적어도 하나의 뉴클레오타이드 위치에 있는 염기에 부착된다. 일부 구현예에서, 형광단, 예를 들어, 설포로다민 염료 모이어티, 및 형광 소광제는 프로브 내부에 위치된다. 당업자는 프로브 내의 형광단 및/또는 형광 소광제의 위치는 달라질 수 있으며, 제한적이지 않음을 이해할 것이다.

[0355] 일부 구현예에서, 형광단, 예를 들어, 설포로다민 염료 모이어티, 및 형광 소광제는 FRET 프로브의 말단에 위치하지 않는다. 일부 구현예에서, 설포로다민 염료의 방출 스펙트럼은 형광 소광제의 흡수 스펙트럼과 상당히 중첩된다. 그러나, 이러한 스펙트럼 중첩은 소광이 충돌 메커니즘을 포함하는 경우, 또는 중첩이, 예를 들어, 반응 조건 또는 프로브 구조로 인해 증가하는 경우, 별로 중요하지 않거나 요구되지 않는다.

[0356] 특정 프로브에 대해 적절한 형광단-소광제 쌍을 선택하기 위해 기술 분야 내에서 이용 가능한 실용적인 많은 지침이 존재한다. 예를 들어, FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, New York, 1971)을 참조한다. 본 명세서에 개시된 프로브에 포함시키기에 유용한 소광제로는 비스-아조소광제 (예를 들어, 미국 특허 6,790,945에 개시된 소광제), Biosearch Technologies, Inc.로부터 입수 가능한 소광제 (Black HoleTM Quenchers: BHQ-1, BHQ-2, 및 BHQ-3), TAMRA, 카복시테트라메틸 로다민, 4-((4-(다이메틸아미노)페닐)아조)벤조산 (Dabcyl), Zen® 소광제, Blackberry® 소광제, 2,3-다이클로로-5,6-다이사이아노-1,4-벤조퀴논 (DDQ)-I, 및 2-[6-(1,3-다이하이드로-2H-아이소인돌-2-일)-9-{2-[(4-[(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일)옥시]카보닐 피페리딘-1-일)설포닐]페닐}-3H-잔텐-3-일리덴]-2,3-다이하이드로-1H-아이소인돌륨 클로라이드 (QSY 21) 및 기술 분야 내에 공지된 다른 소광제를 포함한다.

[0357] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 리간드의 표지된 컨쥬게이트를 제조하는 방법이 개시되며, 상기 방법은 화합물을 리간드에 공유적으로 부착시키기 충분한 조건하에 적합한 용매에서 리간드와 본 명세서에 제공된 설포로다민 염료 화합물을 접촉시켜, 염료-표지된 컨쥬게이트를 형성하는 단계를 포함한다. 적합한 리간드로는 생체 분자 (예를 들어, 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 항체, 펩타이드, 또는 다당류), 합성 중합체 (예를 들어, 폴리아크릴산과 같이 에틸렌 백본을 가지는 중합체), 및 고체 지지체 (예를 들어, 제어된 공극 유리 또는 폴리스타이렌)을 포함한다.

[0358] 일부 구현예에서, 리간드는 폴리뉴클레오타이드이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 화합물을 리간드, 즉, 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드에 공유적으로 부착하기 충분한 조건은, 자동화된 포스포아미다이트 올리고뉴클레오타이드 합성 조건이다. 합성 올리고뉴클레오타이드를 합성 및 탈보호하는데 사용되는 자동화된 포스포아미다이트 올리고뉴클레오타이드 합성 조건은 기술 분야 내에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, [Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Vol. I, Beaucage et al., Eds., John Wiley & Sons, 2002]에 기재되어 있고, 상기 문헌의 내용은 본 명세서에 참조 문헌으로 포함된다.

[0359] 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어, DNA, 합성의 포스포아미다이트 방법은 대부분의 자동화된 합성기에서 사용되는 표준 합성 방법으로서 간주된다. 합성에 사용되는 빌딩 블록은 보통 뉴클레오타이드 빌딩 블록, 단량체, 또는 뉴클레오사이드 포스포아미다이트로서 지칭되며, 이는 활성화된 뉴클레오사이드 유도체 (포스포아미다이트)이다. 산-절단 가능 보호기, 일반적으로, 다이메톡시트라이틸 (DMT) 기가 뉴클레오사이드의 5'-말단을 보호하기 위해 사용되며, β-사이아노에틸 기가 3'-포스파이트 모이어티를 보호하기 위해 사용된다.

[0360] 단량체는 또한 다른 모이어티, 예를 들어, 핵염기 내 반응성 1차 아민을 보호하는 역할을 하는 추가적인 기를 포함할 수 있다. 보호기는 합성 동안 분지화 또는 다른 원하지 않는 부반응이 발생하는 것을 방지하기 위해 선택된다. 당업자는 특정 합성 및 탈보호 및/또는 절단 조건하에서 사용하기에 적합한 성질을 가지는 보호기를 쉽게 선택할 수 있을 것이다. 다양한 아민 보호기는, 예를 들어, Greene & Wuts, "Protective Groups In Organic Chemistry," 3d Edition, John Wiley & Sons, 1999 (이하에서 "Green & Wuts")에 교시되어 있다.

[0361] 일반적으로, 올리고뉴클레오타이드는 고체 지지체, 예를 들어, 제어 공극 유리 (CPG)- 또는 폴리스타이렌-충전 컬럼, 멤브레인, 또는 유사한 재료 상에서 합성된다. 올리고뉴클레오타이드는 보통 3'에서 5'-말단으로 합성된다. 제1 뉴클레오타이드 빌딩 블록 또는 단량체는, 일반적으로, 링커, 예컨대 장쇄 알킬아민-제어 공극 유리 (LCAA-CPG)를 통해 보통 지지체에 고정된다.

[0362] 일부 구현예에서, 포스포아미다이트 시약을 사용하는 합성 상법은 다음의 여러 과정을 포함한다: (i) (영향을 받을 수 있는) 유리 하이드록실이 드러나도록 DMT 탈보호, 예를 들어, 다이클로로메탄에서 2.5% 또는 3% 다이- 또는 트라이-클로로아세트산으로 처리; (ii) (수행될 수 있는) 유리 하이드록실에 대해 뉴클레오사이드 또는 다른 포스포아미다이트 시약의 커플링, 예를 들어, 테트라졸 (예를 들어, 0.45 M 또는 0.5 M 테트라졸)을 함유하는 아세토 나이트릴에서의 커플링; (iii) (수행될 수 있는) 산화, 예를 들어, I_2/2,6-루티딘/H_2O으로 처리; 및 (수행될 수 있는) 캡핑, 예를 들어, THF에서 10% 1-메틸이미다졸 (NMI)으로 활성화된 테트라하이드로퓨란 (THF) 중의 6.5% 아세트산 무수물로 처리.

[0363] 합성의 다양한 단계를 수행하기 위한 다른 조건도 당업계에 공지되어 있으며, 본 명세서에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 포스포아미다이트 커플링은 0.25 M 5-에틸싸이오-1H-테트라졸, 0.25 M 4,5-다이사이아노이미다졸 (DCI) 또는 0.25 M 5-벤질싸이오-1H-테트라졸 (BTT)을 함유하는 아세토나이트릴에서 수행될 수 있다.

[0364] 산화는 THF/H_2O/피리딘 (7:2:1)에서 0.1 M, 0.05 M 또는 0.02 M I_2으로 수행될 수 있다. 캡핑은 THF/루티딘/아세트산 무수물으로 처리한 후 THF 중의 16% NMI으로 처리하여 수행될 수 있다.

[0365] 합성 시약으로부터 임의의 보호기의 제거 및 절단은 일반적으로 60 ℃에서 1-12 시간 동안 농축 암모늄 하이드록사이드로 처리하여 달성되지만, 뉴클레오사이드 포스포아미다이트가 온화한 조건하에서 제거될 수 있는 기로 보호된 경우, 예컨대 실온에서 4-17 시간 동안 농축 암모늄 하이드록사이드로의 처리 또는 메탄올 중의 0.05 M 포타슘 카보네이트로의 처리, 또는 물/EtOH 중의 25% t-뷰틸아민으로의 처리 또한 공지되어 있으며, 사용될 수 있다.

[0366] 용어 "절단"은 고체 상 올리고뉴클레오타이드 합성과 관련하여 올리고뉴클레오타이드를 고체 상 지지체에 부착하는 결합을 끊는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 절당는 부착된 올리고뉴클레오타이드의 3' 하이드록실과 고체 상 지지체 사이의 석시네이트 에스터 결합의 가수 분해를 포함한다.

[0367] 본 명세서에서 사용 시 용어 "탈보호"는 올리고뉴클레오타이드의 헤테로사이클릭 염기의 고리 외(exocyclic) 아민으로부터 보호기를 제거하는 것을 의미한다. 일반적으로 탈보호는 고리 외 아민 및 아미노 보호기, 예를 들어 벤조일 또는 아이소뷰티릴으로 구성된 아마이드 모이어티의 가수 분해를 포함한다. 다양한 탈보호 기법 및 방법이 기술 분야 내 공지되어 있다.

[0368] 본 발명의 요소 각각이 여러 구체예를 포함하는 것으로 본 명세서에 기재되어 있지만, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 주어진 요소의 구체예 각각은 본 발명의 다른 요소의 구체예 각각과 함께 사용될 수 있고, 이러한 각각의 사용은 본 발명의 상이한 구체예를 형성하는 것으로 의도된 것임을 이해해야 한다.

[0369] 본 명세서에 언급된 모든 특허, 특허 출원, 및 과학 문헌은, 각 개별적인 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함되도록 지시된 바와 같이, 그 전체가 본 명세서에 참조 문헌으로 인용된다. 본 명세서에서 언급된 참조와 본 명세서의 특정 내용 사이의 충돌은 후자를 위해 해결되어야 한다. 마찬가지로, 분야에서 이해되는 단어 또는 문구의 정의와 본 명세서에서 구체적으로 교시되는 단어 또는 문구의 정의 사이의 충돌은 후자를 위해 해결되어야 한다.

[0370] 본 발명은 다음의 실시예에 의해 설명된다. 이러한 실시예는 오직 설명의 목적으로 제공되는 것이며, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0371] 실시예

[0372] 양성자 (^{1}H, 400 MHz) 및 인 (^{31}P, 160 MHz) 핵 자기 공명 (NMR) 스펙트럼은 Bruker Biospin 400 기기로부터 수득하였다. DMSO-d_6 및 CD_3CN에서 NMR 샘플을 제조하고 잔여의 양성자화된 용매를 내부 화학적 이동 표준으로 사용하였다. LCMS 데이터를 Agilent 1200 시리즈 (LC/MSD Trap XCT Plus) 및 Agilent 1260 infinity (6130 Quadrupole LC/MS) 기기에서 전자분무 이온화 (ESI)를 통해 수득하였다. 실리카 겔 60 상에서 Biotage Isolera LS 및 Teledyne ISCO Torrent® Combi Flash instruments를 사용하여 자동화된 크로마토그래피를 수행하였다. 분석용 박막 크로마토그래피를 알루미늄-지지된 실리카 겔 60 F254에서 수행하였고, 플레이트를 UV 램프 (254

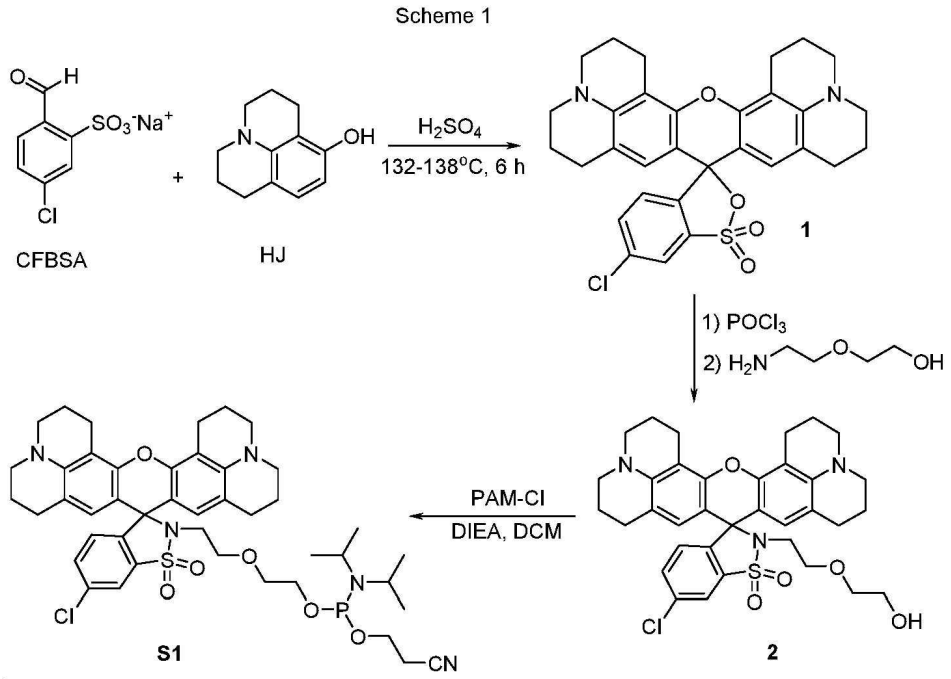
및 365 nm) 하에서 시각화하였다. 모든 시약은 달리 명시하지 않는 한 상업적 공급원으로부터 입수하였다.

[0373] 실시예 1: 설포로다민 염료 S1의 합성

[0374] 본 실시예에서는 포스포아미다이트 기를 포함하는 예시적인 설포로다민 염료 S1의 합성을 기재한다. 이러한 염료는 표준 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단 내로 혼입하기에 적합하다.

[0375] 화합물 S1은 반응식 1에 개괄된 절차에 따라 제조하였다.

Scheme 1



[0376]

[0377] 화합물 1

[0378] 화합물 CFBSA (4.0 g, 1 당량) 및 8-하이드록시주롤리딘 (HJ, 6.2g, 2 당량)의 건조 혼합물을 132-138 ℃에서 다중포트 용기 (≥3; 사용하지 않는 임의의 포트는 대기로 개방) 중의 황산 수용액 (60%, 32 mL)에 적가하였다. HPLC를 사용하여 반응 과정을 모니터링하였다. 반응이 완료되면 (7-16 시간), 반응 혼합물을 실온으로 냉각시킨 후 차가운 묽은 NaOH (110 mL) 수용액에 부었다.

[0379] pH를 8.5-11로 조정한 후, 사이클로축합 반응의 생성물 (화합물 1)을 여과로 분리한 후 16 시간 이상 동안 45-50 ℃의 진공 오븐에서 건조시켰다.

[0380] 생성물을 130 mL의 다이클로로메탄 (DCM)에 용해시키고, 용액을 여과하였다. DCM 층을 농축하여 화합물 1을 수득하고 (6g, 65%), 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. LCMS: m/z 561.5; [M+H] ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 7.94 (d, 1H, J 2.4 Hz), 7.60 (dd, 1H, J = 8.0, 2.4 Hz), 7.10 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.59 (s, 2H), 3.58 (m, 8H), 2.98 (m, 4H), 2.52 (m, 4H), 1.99 (m, 4H), 1.83 (m, 4H).

[0381] 화합물 2

[0382] 화합물 1 (8g, 14.3 mmol)을 실온 (RT)에서 무수 DCM (120 mL)에 현탁시키고 밤새 $POCl_3$ (13.1 mL, 10 당량)으로 처리하였다. 반응 진행/완료 후 TLC (10% MeOH/DCM)가 이어졌다. 반응이 완료되면, 혼합물을 진공하에서 농축시키고, 생성된 폼을 90-150 분 동안 40 ℃의 진공하에서 건조하였다. 그 다음, 아르곤 하에서 폼을 무수 다이클로로메탄 (150 mL)에 용해시켰다. 반응 용액을 0-5 ℃으로 냉각하고, 온도를 8 ℃ 이하로 유지하면서 N,N-다이아이소프로필에틸아민 (DIEA) (25 mL, 10 당량) 및 2-아미노에톡시에탄올 (AEE) (7.2 mL, 5 당량)으로 처리하였다.

[0383] 반응을 밤새 교반하면서 1-2 시간에 걸쳐 실온으로 가온시킨 후, 밤새 실온에서 교반하였다. 반응 과정을 TLC (10% MeOH/DCM)으로 모니터링하였다. 반응 혼합물을 DCM (250 mL)으로 희석시키고 1 N HCl (2 X185 mL), 염수

(1 X 200 mL)으로 세척하고, Na_2SO_4으로 건조하였다. 여과하여 농축하고 실리카 겔 컬럼 정제를 사용하는 정제를 통해, 순수한 화합물 2를 수득하였다 (3.74g, 40% 수율). LCMS: m/z 648.5 [M+H]; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 8.19 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 7.60 (dd, 1H, J = 8.0, 2.0 Hz), 6.95 (1H, d, J = 8 Hz), 6.28 (s, 2H), 4.4 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 3.30 (m, 3H), 3.15 (m, 12H), 2.90 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 2.82 (m, 4H), 2.51 (m, 4H), 1.96 (m, 4H), 1.81 (m, 4H).

[0384] 화합물 S1

[0385] 화합물 2 (2.8g, 4.3 mmol)를 3구 둥근바닥 플라스크에 넣고, 적어도 90 분 동안 고진공 (≤2 mBar) 하에서 건조하였다. 그 다음, 아르곤 하에서 건조된 화합물을 무수 DCM (88 mL)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 0-5 ℃로 냉각시키고, DIEA (7.5 mL, 10 당량)를 첨가한 후, 내부 온도를 0-5 ℃로 유지하면서 2-사이아노에틸 N,N-다이아이소프로필클로로포스포아미다이트 (PAM-Cl) (1.2 mL,1.4 당량)를 적가하였다.

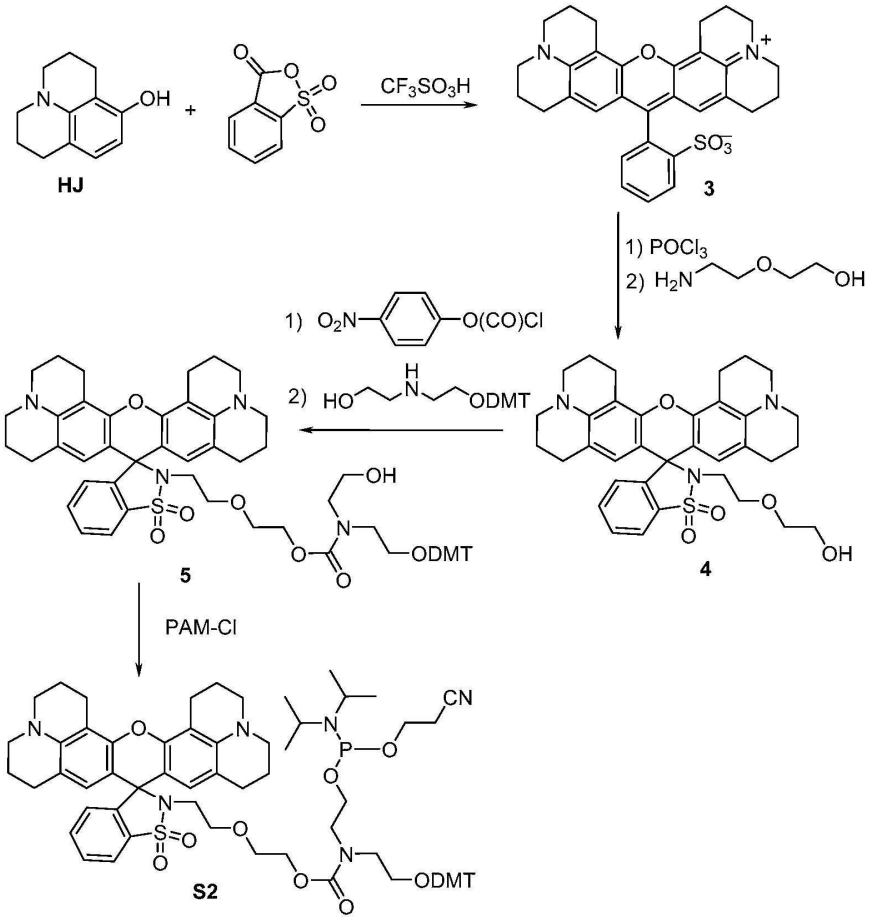
[0386] 반응이 완료될 때까지 (2-3 시간) 반응을 밤새 교반하면서 실온으로 가온시켰다. 반응을 DCM (88 mL)로 희석시키고, $NaHCO_3$ (2 X 45 mL) 및 염수 (45 mL)로 세척하고, 유기층을 Na_2SO_4로 건조시켰다. 미정제로 생성물을 여과하여 농축하고 실리카 겔 컬럼 정제를 사용하는 정제를 통해, 분홍색 고체로서 순수한 생성물을 수득하였다 (1.75g, 48% 수율). LCMS: m/z 848.2 [M+H]; ^{31}P NMR (CD3CN, 160 MHz): δ 148.25; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 8.18 (d, 1H, J 2 Hz), 7.59 (dd, 1H, J = 8.4, 2.0 Hz), 6.96 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.27 (s, 2H), 3.66 (m, 2H), 3.27 (t, 2H, J = 5.2 Hz), 3.20 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 3.10-3.20 (m, 8H), 2.90 (t, 2H, 6.8 Hz), 2.82 (t, 4H, J = 6.4 Hz), 2.70 (t, 2H, J = 7.0 Hz)), 2.40-2.51 (m, 4H), 1.95 (m, 4H), 1.78 (m, 4H), 1.13 (d, 6H, J = 8 Hz), 1.05 (d, 6H, J = 8 Hz).

[0387] 실시예 2: 설포로다민 염료 S2의 합성

[0388] 본 실시예는 포스포아미다이트 기, 및 다이메톡시트라이틸 기로 보호된 하이드록실 기를 포함하는 예시적인 설포로다민 염료 S2를 기재한다. 이러한 염료는 표준 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 또는 중간 위치 내로 혼입시키기에 적당하다.

[0389] 화합물 S2은 반응식 2에 개괄된 절차에 따라 제조하였다.

Scheme 2



[0390]

[0391] 화합물 3

[0392] 150 mL 둥근 바닥 플라스크 내의 트라이플루오로메탄 설폰산 (50 mL)을 아르곤 분위기 하에서 0 ℃로 냉각하였다. 8-하이드록시주롤리딘 (HJ) (15.0 g, 79.3 mmol)을 20 분에 걸쳐 적가하고, 혼합물을 RT로 가온시킨 후 8-하이드록시주롤리딘이 완전히용해될 때까지 실온에서 교반하였다. 2-설포벤조산 사이클릭 무수물 (10.95 g, 59.5 mmol) was 한 번에 첨가하였다. 혼합물을 110 ℃로 가열하고 18 시간 동안 교반한 뒤, RT로 냉각시켰다. 반응 혼합물을 3M NaOAc (300 mL) 및 분쇄된 얼음 (200 mL)의 혼합물에 적가하였다. 생성된 혼합물에, DCM를 첨가하고 (500 mL), 혼합물을 분별 깔때기로 옮겼다. 유기층을 수집하여 물 및 염수로 세척하였다. 조합된 수성층을 DCM으로 역추출하고, 모든 유기층을 조합하였다. Na_2SO_4으로 건조한 후, 용액을 여과하고, DCM을 진공하에 제거하였다. 생성물을 2% 내지 10% 물/아세토나이트릴 (ACN)을 사용하여 실리카 겔 (3"x7" 베드) 상의 크로마토그래피로 정제하였다. 진한 빨간색 불순물이 용매 전면과 함께 컬럼에서 나온다. TLC 상에서 생성물의 R_f는 10% 물/ACN에서 0.4이다. 생성물 함유 분획을 농축하여 화합물 3 (8.34 g, 40%)을 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 7.80 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 7.60 (t, 1H, J = 7.6 Hz), 7.51 (t, 1H, J = 7.4 Hz), 7.09 (d, 1 H, J = 7.4 Hz) 6.58 (s, 2H), 3.49 (m, 8H), 2.98 (m, 4H), 2.62 (m, 4H), 2.02 (m, 4H), 1.83 (m, 4H); LCMS: m/z 527.5 [M+H].

[0393] 화합물 4

[0394] 아르곤 하에서, 화합물 3 (6.50 g, 12.3 mmol)을 60 mL의 무수 DCM에 용해시키고,$POCl_3$ (5.00 mL, 53.6 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 24 시간 동안 교반하였다. 실온에서 DCM을 감압하에 제거한 다음, 60 ℃에서 과량의 $POCl_3$를 감압하에 제거하여 폼을 수득하였다. 아르곤 하에서 폼을 150 mL의 무수 DCM에 용해시키고, 용액을 0 ℃로 냉각시켰다. 다이아이소프로필에틸아민 (22.0 mL, 124 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 다시 0 ℃로 냉각하고, 2-(2-아미노에톡시)에탄올 (6.20 mL, 62.2 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 가온하고

2.5 시간 동안 교반하였다. 모든 고체를 용해시키기 위해 충분한 메탄올을 첨가하여 반응을 퀜칭하였다. 혼합물을 포화 $NaHCO_3$, 물, 및 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시켰다. 생성물을 실리카 겔 (3"x6"), 30% EtOAc/헥산 내지 60% EtOAc/10% 트라이에틸아민 (TEA) 함유 헥산에서 크로마토그래피하여, 4.56 g (60%)의 화합물 4을 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 7.94 (dd, 1H, J = 3.6, 2.8 Hz), 7.58 (dd, 2H, J = 5.6, 3.2 Hz), 6.93 (dd, 1H, J = 6.4, 3.2 Hz), 6.27 (s, 2H), 4.4 (t, 1 H, J = 5.6 Hz), 3.31 (m, 2 H), 3.07-3.20 (m, 12H), 2.89 (t, 2H J = 7.2 Hz), 2.83 (t, 4H, J = 6.4 Hz)), 2.45 (m, 4H), 1.95 (m, 4H), 1.79 (m, 4H). LCMS: m/z 614.5 [M+H].

[0395] 화합물 5

[0396] 아르곤 하에서, 화합물 4 (1.58 g, 2.57 mmol)을 50 mL의 무수 DCM에 용해시키고,TEA (3.60 mL, 25.8 mmol)를 첨가한 후 p-나이트로페닐클로로포메이트 (777 mg, 3.85 mmol)를 첨가하였다.

[0397] 생성된 혼합물을 실온에서 18 시간 동안 교반하였다. 모노-DMT-다이에탄올아민 (2.09 g, 5.13 mmol)을 첨가하고, 또 다른 24 시간 동안 실온에서 교반을 지속하였다. 혼합물을 포화 $NaHCO_3$, 물, 및 염수로 세척하고, Na_2SO_4.으로 건조하였다. 생성물을 실리카 겔, 40% EtOAc/헥산 내지 70% EtOAc/10% TEA 함유 헥산 상의 크로마토그래피로 정제하여, 1.78 g (66%)의 화합물 5를 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 7.85 (m, 1H), 7.42 (m, 4H), 7.29 (m, 7H), 6.99 (m, 1H), 6.82 (d, 4H, J = 8.8 Hz), 6.44 (s, 2H), 4.10 (m, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.76 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.57-3.21 (m, 10H), 3.18-3.02 (m, 11H), 2.89 (t, 4H, J = 6.5 Hz), 2.54 (m, 4H), 2.04 (m, 4H), 1.87 (m, 4H). LCMS: m/z 1047.7 [M+H].

[0398] 화합물 S2

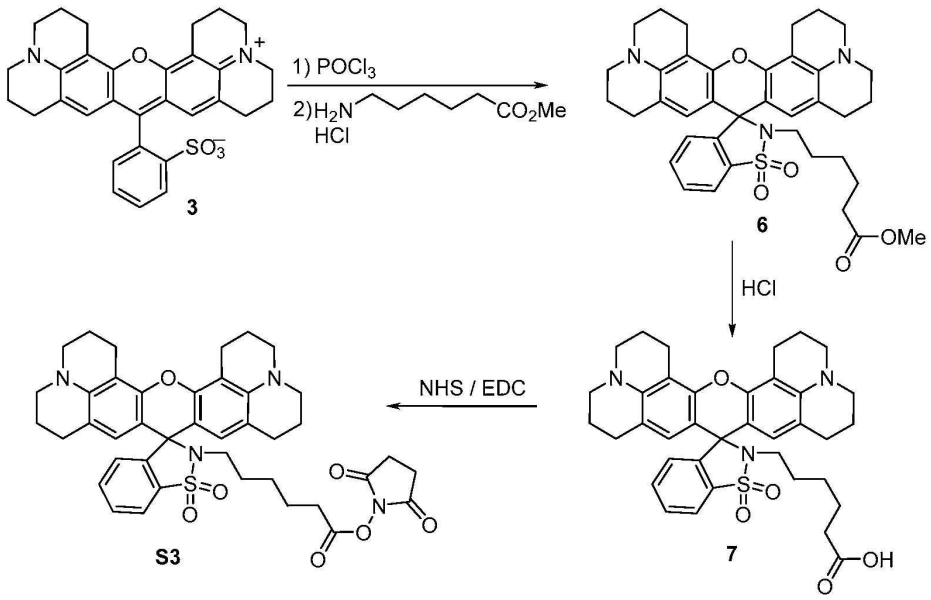
[0399] 아르곤 하에서, 화합물 5 (300 mg, 0.287 mmol)을 20 mL의 무수 DCM에 용해시켰다. DIEA (0.500 mL, 2.87 mmol)를 첨가한 후, PAM-Cl (0.080 mL, 0.389 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 4 시간 동안 실온에서 교반한 다음, 포화 $NaHCO_3$, 물, 및 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시켰다. 실리카 겔, 20% EtOAc/헥산 내지 40% EtOAc/5% TEA 함유 헥산 상의 크로마도그래피로, 0.213 g (60%)의 화합물 S2를 수득하였다. ^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz): 7.82 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 7.42 (m, 4H), 7.24 (m, 7H), 6.82 (m, 5H), 6.36 (s, 2H), 3.93 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.65 (m, 4H), 3.45 (m, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 3.27 (m, 1H), 3.19 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 3.06 (m, 10H), 2.92 (m, 1H), 2.82 (m, 4H), 2.60 (m, 1H), 2.48 (m, 2H), 2.41 (m, 2H), 1.96 (m, 4H), 1.77 (m, 4H), 1.19 (m, 12H). ^{31}P NMR (CD_3CN, 160 MHz): 147.5.

[0400] 실시예 3. 설포로다민 염료 S3의 합성

[0401] 본 실시예는 NHS 에스터를 포함하는 예시적인 설포로다민 염료 S3의 합성을 기재한다. 이러한 염료는 아미노 기와의 컨쥬게이션 반응을 통해 생체 분자, 예를 들어, 펩타이드의 형광 표지에 적합하다.

[0402] 화합물 S3은 반응식 3에 개괄된 절차에 따라 제조하였다.

Scheme 3



[0403]

[0404] 화합물 6

[0405] 아르곤 하에서 화합물 3 (2.87 g, 5.28 mmol)을 50 mL의 무수 DCM에 용해시키고, $POCl_3$ (2.5 mL, 26.8 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. DCM 및 $POCl_3$를 진공 하에서 제거하고, 중간체를 무수 DCM (100 mL)에서 재용해시켰다. 아르곤 하에서 용액을 0 ℃로 냉각시켰다. DIEA (18.5 mL, 106 mmol)를 첨가한 후, 메틸-6-아미노카프로에이트-HCl (4.83 g, 26.6 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 가온시키고, 2 시간 동안 교반한 다음, 물 (3x) 및 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시켰다. 생성물을 40% EtOAc/10% TEA 함유 헥산을 사용하여 실리카 겔 상의 크로마토그래피로 정제하였다. 염기성 조건하에서 형성되는 고리 형태의 생성물은 무색이며; TLC 스팟은 TEA가 증발함에 따라 천천히 분홍색으로 변한다. 정제하여 1.30 g (37%) 화합물 6을 연청색 폼으로 수득하였다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 7.87 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 7.46 (m, 2H), 7.00 (m, 1H), 6.44 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.16 (m, 8H), 2.91 (m, 6H), 2.58 (m, 4H), 2.14 (m, 2H), 2.07 (m, 4H), 1.89 (m, 4H), 1.39 (m, 4H), 1.15 (m, 2H). LCMS: m/z 654.3 [M+H].

[0406] 화합물 7

[0407] 화합물 6 (1.30 g, 1.99 mmol)을 아세토나이트릴 (60 mL), 물 (15 mL), 및 4.5 mL의 진한 HCl에 용해시켰다. 용액을 18 시간 동안 80 ℃로 가열한 후, DCM로 희석시키고, 포화 $NaHCO_3$, 물, 및 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시켜 1.21 g의 미정제 화합물 7을 수득하였고, 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. LCMS: m/z 640.3 [M+H].

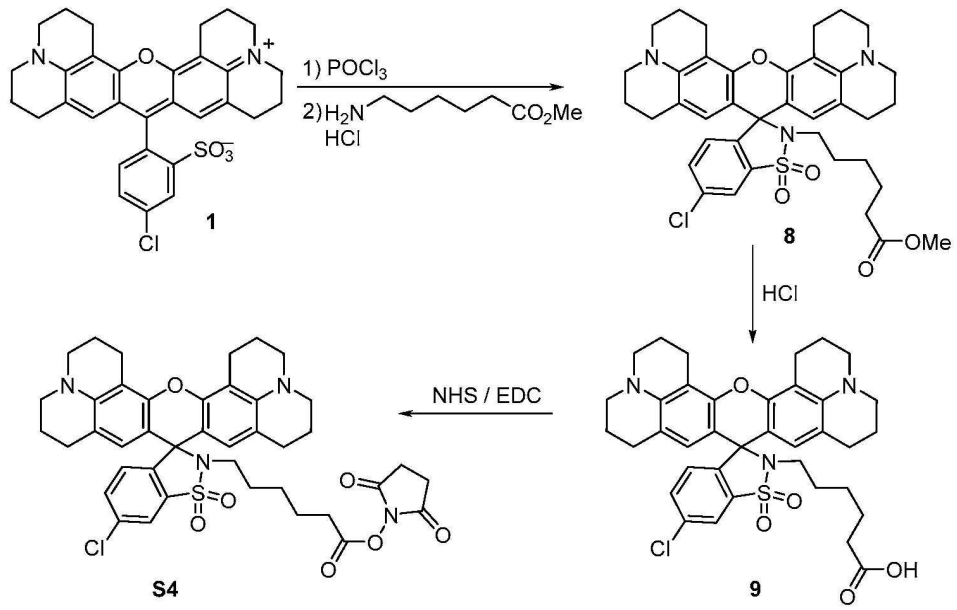
[0408] 화합물 S3

[0409] 아르곤 하에서 화합물 7 (1.21 g, 1.89 mmol)을 25 ml의 무수 다이메틸폼아마이드 (DMF)에 용해시켰다. N-하이드록시석신이미드 (435 mg, 3.78 mmol) 및 N-(다이메틸아미노프로필)-N'-에틸카보다이이미드 (EDC) (725 mg, 3.78 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반한 다음, DMF를 진공 하에서 제거하였다. 잔류물을 DCM에 용해시키고, 용액을 1 N HCl, 물, 및 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시켰다. DCM 중의 5% HOAc 및 1% MeOH 내지 5% MeOH의 실리카 겔 상의 크로마토그래피로, 880 mg (63%)의 화합물 S3을 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 7.92 (m, 1H), 7.58 (m, 2H), 6.95 (m, 1H), 6.24 (s, 2H), 3.11 (m, 8H), 2.84 (m, 6H), 2.82 (s, 4H), 2.46 (m, 4H), 1.94 (m, 6H), 1.79 (m, 4H), 1.21 (m, 4H), 1.12 (m, 2H). LCMS: m/z 737.3 [M+H].

[0410] 실시예 4: 설포로다민 염료 S4의 합성

[0411] 활성화된 에스터 유도체를 포함하는 또 다른 예시적인 염료 S4는 화합물 S3에 대해 상기 기재된 반응 조건을 사용하여 반응식 4에 개괄된 절차에 따라 용이하게 제조될 수 있다.

Scheme 4



[0412]

[0413] 화합물 8

[0414] 아르곤 분위기 하에서 화합물 1 (4.0g, 0.0071 몰)을 무수 DCM (60 mL)에 용해시켰다. 순수 포스포러스 옥시클로라이드 (6.5 mL, 0.071 몰)을 한 번에 첨가하고, 반응을 24 시간 동안 실온에서 교반하였다. 용매를 회전 증발기에서 제거하고, 생성된 폼을 5 mbar에서 2 시간 동안 건조시켰다. 아르곤 분위기 하에서 폼에 무수 DCM (75 mL)를 첨가하고 반응 플라스크를 얼음/물 배스에 두었다. N,N-다이아이소프로필에틸아민 (18.5 mL, 0.107 몰)을 0-5 ℃에서 천천히 첨가하였다. 고체 메틸 6-아미노헥사노에이트 하이드로클로라이드 (6.5g, 0.0360 몰)을 10 분에 걸쳐 조금씩 나누어 첨가하였다. 1 시간 후, 아이스 배스를 제거하고 반응 혼합물을 실온에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM (125 mL)로 희석시키고, 1N HCl (2 X 90 mL) 및 염수 (1 X 120 mL)로 세척한 다음, 소듐 설페이트으로 건조하였다. 여과하여 농축하고 실리카 겔 컬럼 정제 (에틸 아세테이트/헵테인/TEA, 30:10:60)를 통해, 금색의 고체로서 생성물을 수득하였다 (2.4g, ~49% 수율). LCMS: m/z 688.5 [M+H] ^{1}H NMR (CDC13, 400 MHz): δ 7.83 (d, 1H, J = 1.6 Hz), 7.4 (dd, 1H, J = 8.4, 2.0 Hz), 6.95 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.42 (s, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.16 (m, 8H), 2.89 (m, 6H), 2.58 (m, 4H), 2.14 (t, 2H, J = 8 Hz), 2.06 (m, 4H), 1.91 (m, 4H), 1.40 (m, 4H), 1.15 (m, 2H).

[0415] 화합물 S4

[0416] 화합물 8 (0.60g, 0.00087 몰)을 아세토나이트릴 (30 mL)에서 교반하면서 현탁시켰다. 탈이온수 (7 mL)를 첨가하고 현탁액을 수 분간 교반하였다. 진한 염산 (3 mL)을 적가하여, 적색/자주색 용액으로 만들었다. 용액을 온화한 환류로 2-3 시간 동안 가열한 다음 15 시간에 걸쳐 실온으로 교반하였다. 회전 증발기에서 증발에 의해 반응 혼합물 부피 (자색)을 절반으로 줄이고 실온에서 반응 용액을 탈이온수 (75 mL)에 부어 생성물을 침전시켰다. 현탁액을 여과하고, 케이크를 추가의 탈이온수 (15 mL)로 세척하고, 40-50 ℃ 및 2 mbar 이하의 진공의 진공 오븐에서 20 시간 동안 건조시켜, 자주색 분말로서 화합물 9 0.54g (93% 수율)을 수득하였고, 이를 다음 단계에서 그대로 사용하였다.

[0417] 상기 수득된 화합물 9 (0.2g, 0.000296 몰)을 10mL 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 아르곤 분위기 하에서 무수 DMF (3.0mL)에 용해시켰다. 생성된 자색의 용액, N-하이드록시석신이미드 (0.04g. 0.00034 몰, 1.15 당량) 및 EDC (0.075g, 0.00039 몰, 1.3 당량)을 첨가하고, 반응을 주위 온도에서 21 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM (40mL)으로 희석시키고, 물 (20mL)로 세척하고 Na_2SO_4로 건조하였다. 용매를 증발시키고 잔류물을 5-15% MeOH/DCM를 사용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 0.14g (61% 수율)의 화합물 S4를 수득하였다. LCMS: m/z 771.6 [M+H] ^{1}H NMR (DMSO-d6, 400 MHz): δ 8.17 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 7.60 (dd, 1H, J = 8.4, 2.0 Hz),

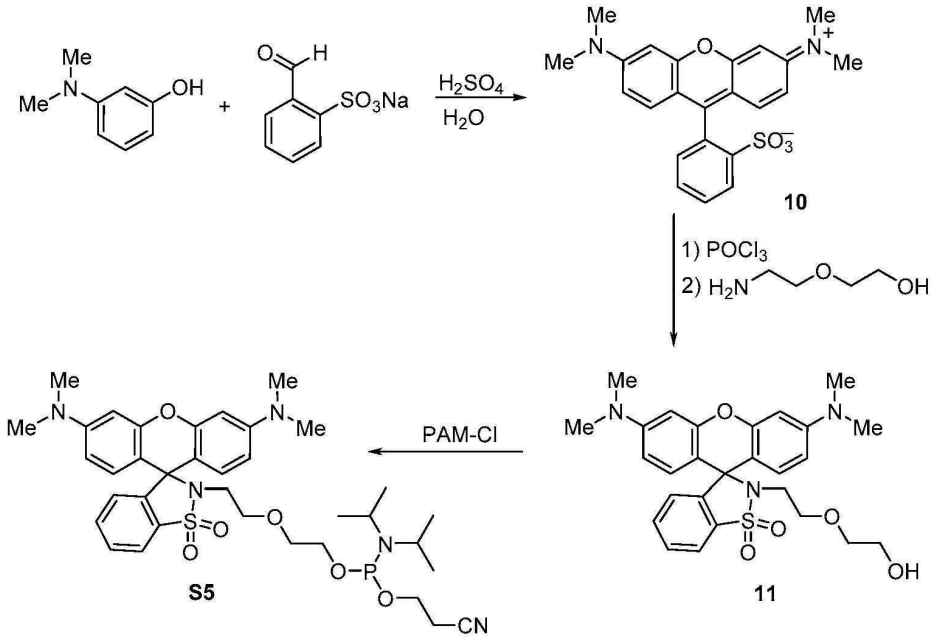
6.98 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.24 (s, 2H), 3.13 (m, 8H), 2.82 (m, 6H), 2.74 (m, 2H), 2.55 (m, 4H), 2.41 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 1.94 (m, 4H), 1.79 (m, 4H), 1.10-1.35 (m, 8 H)

[0418] 실시예 5: 설포로다민 염료 S5의 합성

[0419] 본 실시예는 포스포아미다이트 기를 포함하는 예시적인 설포로다민 염료 S5를 기재한다. 이러한 염료는 표준 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 올리고뉴클레오타이드 5'-말단으로 혼입하기에 적합하다.

[0420] 화합물 S5은 반응식 5에 개괄된 절차에 따라 제조하였다.

Scheme 5



[0421]

[0422] 화합물 10

[0423] 물 (27 mL)을 0 ℃로 냉각시키고, 41 mL의 진한 H_2SO_4을 천천히 첨가하였다. 용액을 160 ℃로 가열하였다. 완전히 사전에 혼합된 2-포밀벤젠설폰산 (5.03 g, 24.2 mmol) 및 3-(다이메틸아미노)페놀 (6.63 g, 48.3 mmol)을 황산 용액에 1 분에 걸쳐 조금씩 나누어 첨가하였다. 용액을 공기 하의 160 ℃에서 8 시간 동안 교반한 다음, 실온으로 냉각하고 또 다른 8 시간 동안 교반하였다. Cold 물 (300 mL, 약 0 ℃)을 100 mL의 10 M NaOH과 혼합하였다. 온도를 25 ℃로 유지하면서 미정제 반응 혼합물을 NaOH 용액에 적가하였다. 반응 혼합물을 첨가한 후, pH가 약 8.5가 될 때까지 10 M NaOH를 추가로 첨가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 고체를 진공 여과로 수집하고 고진공 하에서 KOH으로 건조시켜, 대략 50% 무기 염을 포함하는 10.6 g의 미정제 물질을 수득하였으며. 3.57 g의 미정제 물질 부분을 MeOH/DCM 용매 구배 (4% 내지 10% MeOH)를 사용하는 실리카 겔 컬럼 (2" x 7") 상에서 크로마토그래피하였다. 이성질체의 혼합물이 생성되었으며, 원하는 이성질체가 먼저 용리해되었다. 780 mg (22%)의 화합물 10을 수득하였다. LCMS: m/z 423.4 [M+H].

[0424] 화합물 11

[0425] 아르곤 하에서 75 mL의 무수 DCM 중의 화합물 10 (740 mg, 1.75 mmol)에 $POCl_3$ (1.64 mL, 6.50 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 18 시간 동안 교반하였다. 실온에서 DCM을 감압하에 제거한 다음, 60 ℃에서 과량의 $POCl_3$를 감압하에 제거하여 폼을 수득하였다. 아르곤 하에서 폼을 125 mL의 무수 DCM에 용해시키고, 용액을 0 ℃로 냉각시켰다. 트라이에틸아민 (3.10 mL, 17.8 mmol) 및 2-(2-아미노에톡시)에탄올 (0.875 mL, 8.78 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온으로 가온시키고, 1 시간 동안 교반한 다음, 물 및 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시켰다. 실리카 겔 (1"x7"), 40% EtOAc/헥산 내지 60% EtOAc/10% TEA 함유 헥산 상의 크로마토그래피로, 438 mg (49%)의 화합물 11을 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 8.00 (m, 1H), 7.61 (m, 2H), 6.96 (m, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.53 (m, 2H), 6.43 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 4.44 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.31 (m, 2H), 3.14 (m, 4H), 2.93 (s, 12H), 2.91 (m, 2H). LCMS: m/z 510.4 [M+H].

[0426] 화합물 S5

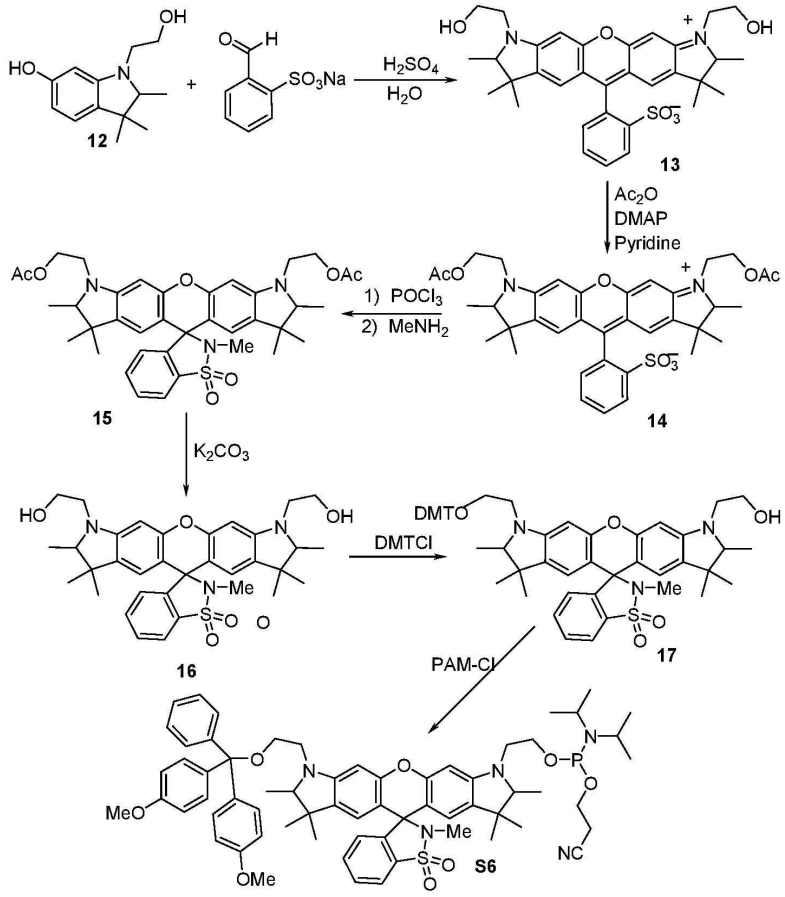
[0427] 아르곤 하에서 화합물 11 (423 mg, 0.830 mmol)을 25 mL의 무수 DCM에 용해시키고, DIEA (0.725 mL, 4.16 mmol)를 첨가한 후 PAM-Cl (0.190 mL, 0.924 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 교반하고, 포화 $NaHCO_3$, 물, 및 염수로 세척하고, 유기층을 Na_2SO_4로 건조시켰다. 실리카 겔, 20% EtOAc/헥산 내지 40% EtOAc/10% TEA 함유 헥산 상의 크로마도그래피로, 485 mg (82%)의 화합물 S5를 수득하였다. ^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz): 7.89 (m, 1H), 7.57 (m, 2H), 6.97 (m, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.52 (m, 2H), 6.44 (m, 2H), 3.73 (m,2H), 3.56 (m, 4H), 3.26 (m, 4H), 2.97 (s, 12H), 2.61 (m, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.19 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 1.12 (d, J = 6.8 Hz, 6H) ^{31}P NMR (CD_3CN, 160 MHz): 148.1.

[0428] 실시예 6: 설포로다민 염료 S6의 합성

[0429] 본 실시예는 포스포아미다이트 기, 및 다이메톡시트라이틸 기로 보호된 하이드록실 기를 포함하는 예시적인 설포로다민 염료 S6를 기재한다. 이러한 염료는 표준 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 또는 중간 위치에 혼입시키기에 적당하다.

[0430] 화합물 S6은 반응식 6의 절차에 따라 제조하였다.

Scheme 6



[0431]

[0432] 화합물 13

[0433] 화합물 12의 합성은 아세트산 중의 에틸렌 옥사이드 2,3,3-트라이메틸-2,3-다이하이드로-1H-인돌-6-올 (FCH Group, 라트비아)으로 처리하여 수행하였다. 물 (27 mL)을 약 0 ℃으로 냉각하고, 진한 H_2SO_4 (41 mL)을 천천히 첨가하였다. 생성된 용액을 250 mL의 3구 둥근 바닥 플라스크에서 160 ℃으로 가열하였다. 완전히 사전에 혼합된 2-포밀벤젠설폰산 (3.21 g, 15.4 mmol) 및 화합물 12 (6.82 g, 30.8 mmol)를 1 분에 걸쳐 황산 용액에 적가하였다. 용액을 대기에 개방하여 6 시간 동안 160 ℃으로 가열한 다음, 실온으로 냉각시키고 300 mL의 냉각된 5 M NaOH에 천천히 첨가하였다. H_2SO_4을 사용하여 pH를 9로 조절하였다. 혼합물을 DCM로 추출하였다(2x).

조합된 유기층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조하였다. 용매를 진공 하에서 제거하고, 미정제 고체를 고진공 하에서 KOH으로 건조시켜 2.25 g의 미정제 물질을 수득하였다. ACN/물 용매 시스템 (5 내지 8% H_2O)을 사용하는 실리카 겔 컬럼 (2" x 6") 상의 크로마토그래피로, 526 mg (6%)의 화합물 13을 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 8.03 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.64 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.15 (m, 1H), 6.82 (s, 2H), 6.64 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 3.76 (m, 8H), 3.48 (m, 2H), 1.11 (m, 18H). LCMS: m/z 591.5 [M+H].

[0434] 화합물 14

[0435] 아르곤 하에서 화합물 13 (525 mg, 0.889 mmol)을 15 mL의 무수 피리딘에 용해시켰다. 아세트산 무수물 (0.210 mL, 2.22 mmol) 및 DMAP (11 mg, 0.090 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. 피리딘을 진공 하에서 제거하고, 잔류물을 MeOH/DCM 용매 시스템 (2 내지 10%)을 사용하는 실리카 겔 (1"x7") 상이 크로마토그래피로 정제하여, 531 mg (89%)의 화합물 14를 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 8.03 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.66 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.18 (m, 1H), 6.94 (s, 2H), 6.69 (s, 2H), 4.31 (m, 4H), 3.96 (m, 2H), 3.78 (m, 2H), 3.71 (m,2H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.18 (m, 12H), 0.98 (s, 6H). LCMS: m/z 675.5 [M+H].

[0436] 화합물 15

[0437] 아르곤 하에서 화합물 14 (520 mg, 0.771 mmol)을 25 mL의 무수 DCM에 용해시키고, $POCl_3$ (0.360 mL, 3.68 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 5 시간 동안 교반한 다음, THF 중의 2.0 M 메틸아민 (11.6 mL, 23.1 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 1 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 물, 포화 $NaHCO_3$, 및 염수로 세척하고, 유기층을 Na_2SO_4로 건조시켰다. 실리카 겔 (1"x7"), 10% EtOAc/헥산 내지 30% EtOAc/10% TEA 함유 헥산 상의 크로마토그래피로, 437 mg (82%)의 화합물 15를 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 8.01 (m, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.02 (m, 1H), 6.43 (m, 2H), 6.33 (m, 2H), 4.18 (m, 4H), 3.47 (m, 2H), 3.29 (m, 4H), 2.27 (s, 3H), 1.98 (m, 6H), 1.09 (m, 9H), 0.97 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.71 (s, 3H). LCMS: m/z 688.5 [M+H].

[0438] 화합물 16

[0439] 화합물 15을 20 mL의 MeOH에 용해시키고, 5 mL의 K_2CO_3 수용액을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. MeOH을 진공 하에서 제거하고, 잔류물을 물 및 염수로 세척하고 고진공하에서 Na_2CO_3 으로 건조하여, 336 mg (90%)의 화합물 16을 수득하였으며, 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 7.99 (m, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.01 (m, 1H), 6.41 (s, 2H), 6.24 (m, 2H), 4.71 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.54 (m, 4H), 3.28 (m, 4H), 3.16 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.08 (m, 9H), 0.97 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.71 (3H). LCMS: m/z 604.5 [M+H].

[0440] 화합물 17

[0441] 화합물 16 (329 mg, 0.545 mmol)을 12 mL의 무수 피리딘 (2X)으로 공비 증발에 의해 건조시켰다. 건조된 물질을 12 mL의 무수 피리딘에 용해시키고, DMTCl (258 mg, 0.761 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 18 시간 동안 교반하고, 반응을 메탄올 (2 mL)으로 퀜칭하였다. 용매를 진공 하에서 제거하였다. 실리카 겔 (1"x7"), 30% EtOAc/헥산 내지 40% EtOAc/10% TEA 함유 헥산 상의 크로마토그래피로, 232 mg (47%)의 화합물 17을 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 8.01 (m, 1H), 7.62 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.35 (m, 2H), 7.22 (m, 7H), 7.05 (m, 1H), 6.81 (m, 4H), 6.43 (m, 1H), 6.36 (m, 1H), 6.29 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 3.68 (m, 6H), 3.57 (m, 3H), 3.25 (m, 7H), 2.25 (m, 3H), 1.09 (m, 9H), 0.97 (m, 3H), 0.86 (m, 3H), 0.73 (m, 3H). LCMS: m/z 906.8 [M-H].

[0442] 화합물 S6

[0443] 아르곤 하에서 20 mL의 무수 DCM 중의 화합물 17 (227 mg, 0.251 mmol) 용액에, DIEA (0.218 mL, 1.25 mmol)를 첨가한 후, PAM-Cl (0.075 mL, 0.365 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반한 다음,

$NaHCO_3$, 물, 및 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시켰다. 실리카 겔, 20% EtOAc/헥산 내지 30% EtOAc/10% TEA 함유 헥산 상의 크로마도그래피로, 212 mg (77%)의 화합물 S6을 수득하였다. ^{1}H NMR (CD_3CN, 400 MHz): 7.91 (m, 1H), 7.57 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 7.28 (m, 7H), 7.03 (m, 1H), 6.81 (m, 4H), 6.56 (m, 2H), 6.32 (m, 2H), 3.79 (m, 2H), 3.72 (m, 6H), 3.58 (m, 4H), 3.41 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 3.22 (m, 2H), 2.53 (m, 2H), 2.32 (m, 3H), 1.11 (m, 21H), 1.03 (m, 3H), 0.93 (m, 3H), 0.80 (m, 3H). ^{31}P NMR (CD_3CN, 160 MHz): 147.3.

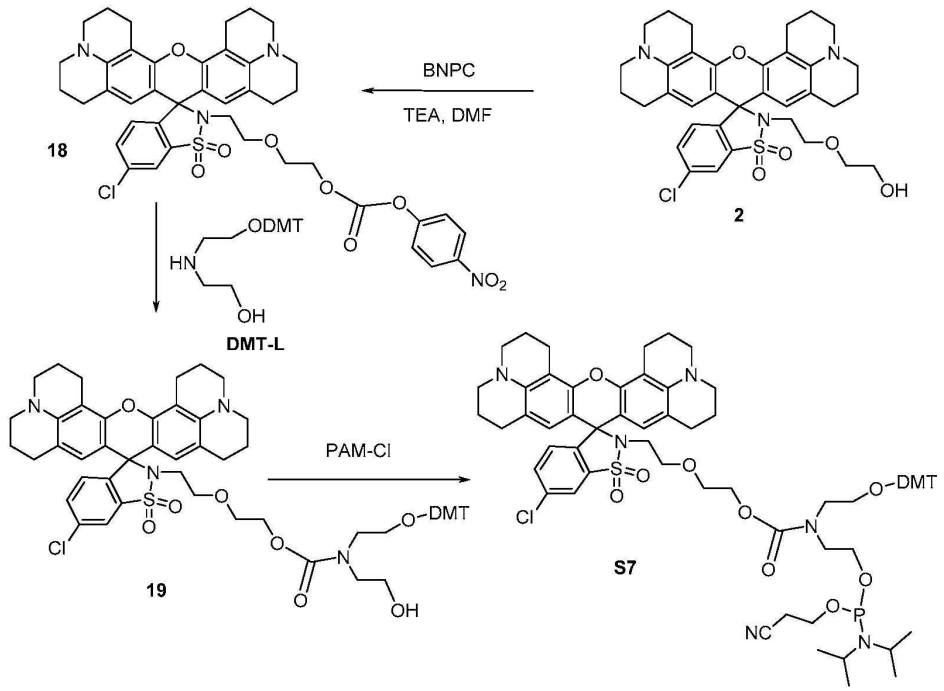
[0444] 화합물 S6이 모델 올리고뉴클레오타이드 (서열 번호: 1)의 5'-말단 내로 혼입되었다. 예시적인 올리고뉴클레오타이드의 여기 및 방출 스펙트럼이 도 3에 도시된다.

[0445] 실시예 7: 설포로다민 염료 S7의 합성

[0446] 본 실시예는 포스포아미다이트 기, 및 다이메톡시트라이틸 기로 보호된 하이드록실 기를 포함하는 예시적인 설포로다민 염료 S7을 기재한다. 이러한 염료는 표준 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 또는 중간 위치에 혼입시키기에 적당하다.

[0447] 화합물 S7은 반응식 7의 절차에 따라 제조하였다.

Scheme 7



[0448]

[0449] 화합물 19

[0450] 실온의 아르곤 하에서 무수 DMF (50 mL) 중의 화합물 2 (4.9g, 7.6mmol)의 현탁액을 과량의 TEA (5.3 mL, 5 당량)으로 처리한 후, 비스-나이트로페닐 카보네이트 BNPC (2.8g, 1.2 당량)으로 처리하였다. 검은색의 현탁액을 중간체 18의 형성이 완료될 때까지 (BNPC 첨가 후 1.5-3 시간) 30-35 ℃으로 가열하였다. 모노-DMT-다이에탄올아민 (DMT-L) (4.6g, 1.5 당량)을 한 번에 첨가하고, 반응 혼합물을 30-35 ℃에서 교반한 후 (1-3 시간) 반응이 완료될 때까지 실온에서 (> 2 시간) 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (530 mL)으로 희석시키고, 분별 깔때기로 옮겼다. EtOAc 층을 탈이온수 (4 X 380 mL) 및 염수 (1 X 380 mL)로 세척하였다. EtOAc층을 Na_2SO_4를 통해 건조하고, 여과하고, 증발시켜 미정제 화합물 19를 수득하였다. 미정제 생성물을 실리카 겔 컬럼으로 정제하여 라벤더 내지 자색의 고체 (7.5g, 91% 수율)로서 순수한 화합물 19를 수득하였다. LCMS: m/z 1082.0 [M+H]. ^{1}HNMR (DMSO-d6, 400 MHz): δ 8.18 (d, 1H, J = 2 Hz), 7.22 (dd, 1H, J = 8.4, 1.6 Hz), 7.16-7.36 (m, 10H), 6.95 (m, 1H), 6.86 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.81 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.28 (s, 2H), 4.60 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.70 (m, 6H), 3.40 (m, 3H), 3.30 (m, 3H), 3.16 (m, 2H), 3.07 (m, 12H), 2.90 (m, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.78 (m, 4H), 2.44 (m, 4H), 1.92 (m, 4H), 1.75 (m, 4H).

[0451] 화합물 S7

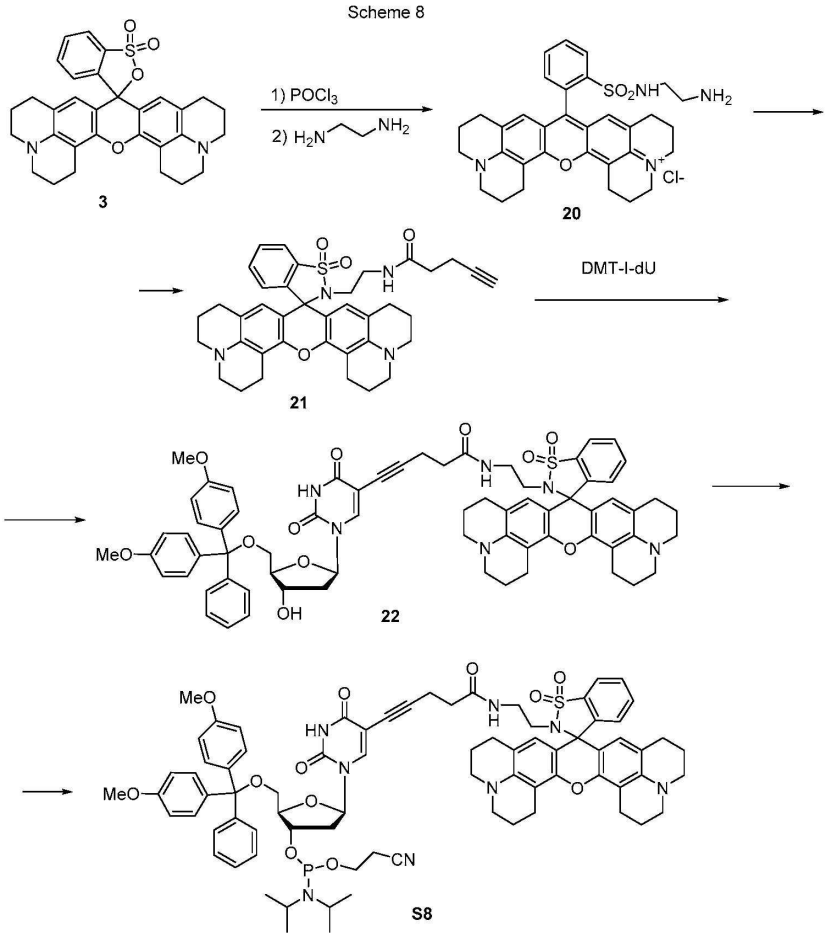
[0452] 화합물 19 (6.5g, 6 mmol)을 3구 둥근 바닥 플라스크에 넣고 ≤2 mBar의 고진공 하에서 ≥90 분 동안 건조하였다. 그 다음, 아르곤 하에서 건조된 화합물 19를 무수 DCM (130 mL)에 용해시켰다. 반응 플라스크를 0-5 ℃로 냉각하고, DIEA (10.5 mL, 10 당량)를 첨가한 후 내부 온도를 0-5 ℃으로 유지하면서 N,N-다이아이소프로필-클로로포스포아미다이트-Cl (PAM-Cl) (1.7 mL, 1.3 당량)을 적가하였다. 반응이 완료될 때까지 (2-3 시간) 실온에서 교반하였다. 반응을 DCM (130 mL)로 희석시키고, $NaHCO_3$ (2 X 80 mL), 염수 (150 mL)로 세척하고 Na_2SO_4로 건조하였다. 미정제로 생성물을 여과하여 농축하고 실리카 겔 컬럼 정제를 사용하는 정제를 통해, 분홍색 내지 라벤더색 고체로서 화합물 S7을 수득하였다 (6.07g, 78% 수율). LCMS: m/z 1281.2 [M+H]. ^{31}P NMR (DMSO-d6, 160 MHz): δ 147.57. ^{1}H NMR (DMSO-d6, 400 MHz): δ 7.90 (s, 1H), 7.48 (dd, 1H, J 8.4, 2.0 Hz), 7.40 (m, 2H), 7.20-7.30 (m, 7H), 6.82 (m, 5H), 6.35 (s, 2H), 3.93 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.76 (m, 8 H), 3.62 (m, 4H), 3.46 (m, 2H), 3.41 (m, 1H), 3.33 (m, 1H), 3.25 (m, 1H)3.19 (m, 1H), 3.13 (m, 11H), 2.98 (m, 1H), 2.84-2.91 (m, 5H), 2.64 (m, 2H), 2.40-2.56 (m, 6H), 1.95 (m, 4H), 1.78 (m, 4H), 1.10-1.23 (m, 12H).

[0453] 실시예 8: 화합물 S8의 합성

[0454] 본 실시예는 포스포아미다이트 기, 및 다이메톡시트라이틸 기로 보호된 하이드록실 기를 포함하는 예시적인 설포로다민 염료 S8을 기재한다. 이러한 염료는 표준 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 또는 중간 위치에 혼입시키기에 적당하다.

[0455] 화합물 S8은 반응식 8의 절차에 따라 제조하였다.

Scheme 8



[0456]

[0457] 화합물 20

[0458] 화합물 3 (2.80 g, 1 당량)을 무수 다이클로로메탄 (50 mL)에 용해시키고 주위 온도에서 $POCl_3$ (6.9 mL, 14 당량)를 적가하였다. 4 시간 후, 반응 혼합물을 증발 건조시켜, 진한 청색의 고체로서 미정제 중간체를 제공하였

다. 에틸렌 다이아민 (EDA, 6.0 mL, 17.0 당량)을 무수 다이클로로메탄 (40 mL)에 용해시키고, 용액을 5 ℃으로 냉각시켰다. 고체를 무수 다이클로로메탄 (20 mL)에 용해시키고, EDA 용액에 적가하였다. 4 ℃에서 17 시간 후 반응 혼합물을 포화 소듐 바이카보네이트 (2 x 40 mL)로 세척한 다음 탈이온수 (40 mL)로 세척하였다. 유기층을 증발 건조시켜, 진한 청색의 고체로서 화합물 20 (3.08 g, 96%)을 수득하였다. LCMS: m/z 569.4 [M+H$^+$]. 계산치-d: 569.25. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 7.92 (dd, 1H, J = 6.0, 2.8 Hz), 7.54 - 7.56 (m, 2H), 6.90 (dd, 1H, J = 6.4, 2.8 Hz), 6.30 (s, 2H), 3.3 (br., 2H), 3.07 - 3.14 (m, 8H), 2.75 - 2.88 (m, 6H), 2.35 - 2.49 (m, 6H), 1.95 (m, 4H), 1.79 (m, 4H).

[0459] 화합물 21

[0460] 4-펜티노산 (4PA, 0.67 g, 1.1 당량)을 무수 아세토나이트릴 (6.5 mL)에 용해시키고, 용액을 5 ℃로 냉각시켰다. 다이아이소프로필에틸아민 (3.3 mL, 3.0 당량)을 첨가한 후, 펜타플루오로페닐 트라이플루오로아세테이트 (PFP-TFA, 1.2 mL, 1.1 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 화합물 20 (3.1 g, 1.0 당량)을 10 mL N,N-다이메틸폼아마이드, 10 mL 다이클로로메탄 및 5 mL 다이메틸설폭사이드의 혼합물에 현탁시켰다. 현탁액을 활성화된 4-펜티노산 용액에 첨가하고 주위 온도에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 반응 혼합물을 50 mL 에틸 아세테이트로 희석시키고, 포화 소듐 바이카보네이트 (2 x 30 mL)으로 세척한 후, 탈이온수 (30 mL)로 세척하였다. 유기층을 증발 건조시켰다. 미정제 생성물을 실리카 겔 컬럼 정제를 사용하여 정제하여, 청색 고체로서 화합물 21 (2.74 g, 68% 수율)을 수득하였다. LCMS: m/z 649.5 [M+H$^+$]. 계산치-d: 649.28. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 7.93 - 7.96 (m, 1H), 7.65 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 7.54 - 7.58 (m, 2H), 6.87 - 6.90 (m, 1H), 6.32 (s, 2H), 3.05-3.16 (m, 8H), 2.97 - 3.04 (m, 2H), 2.79 - 2.88 (m, 6H), 2.72 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.39 - 2.58 (m, 4H, DMSO-d5와 중첩), 2.20 - 2.27 (m, 2H), 2.10 (t, 2H, 7.6 Hz), 1.95 (m, 4H), 1.79 (m, 4H).

[0461] 화합물 22

[0462] 화합물 21 (2.7 g, 1.0 당량)을 N,N-다이메틸폼아마이드 (22.0 mL)에 용해시키고 트라이에틸아민 (1.7 mL, 3.0 당량)을 첨가하였다. 불활성 분위기 하에서 제조된 용액을 5-아이오도-5'-다이메톡시트라이틸-2'-디옥시우리딘 (2.7 g, 1.0 당량; DMT-I-dU), 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0) (0.48 g, 0.1 당량) 및 쿠퍼 (I) 아이오다이드 (0.24 g, 0.3 당량)의 고체 혼합물에 첨가하고, 반응 혼합물을 주위 온도에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 (120 mL)로 희석시키고, 0.1M EDTA 용액 (2 x 80 mL)으로 세척하였다. 유기층을 무수 소듐 설페이트 (25 g, 18 시간)으로 건조하고, 여과하여, 증발 건조시켰다 (청색 고체). 미정제 생성물을 실리카 겔 컬럼 정제를 사용하여 정제하여, 청색 고체로서 화합물 22 (4.73 g, 97% 수율)을 수득하였다. LCMS: m/z 1177.9 [M+H$^+$]. 계산치-d: 1177.47 ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): 7.93 - 7.96 (m, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.54 - 7.58 (m, 2H), 7.49 (t, 1H, J = 6.0 Hz), 7.37 - 7.41 (m, 2H), 7.25 - 7.31 (m, 6H), 7.18 - 7.22 (m, 1H), 6.83 - 6.90 (m, 5H), 6.32 (s, 2H), 6.11 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 5.33 (s, 1H), 4.27 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.71 (s, 6H), 3.21 - 3.26 (m, 2H), 3.05-3.14 (m, 8H), 2.97 - 3.04 (m, 2H), 2.77 - 2.88 (m, 6H), 2.38 - 2.59 (m, 4H, DMSO-d5와 중첩), 2.14 - 2.28 (m, 4H), 1.98 - 2.03 (m, 2H), 1.93 (m, 4H), 1.77 (m, 4H).

[0463] 화합물 S8

[0464] 아르곤 하에서 화합물 22 (4.6 g, 1.0 당량)을 무수 다이클로로메탄 (27.6 mL)에 용해시켰다. 반응 플라스크를 0-5 ℃로 냉각하고 다이아이소프로필에틸아민 (2.0 mL, 3.0 당량)을 첨가한 후 내부 온도를 0-5 ℃로 유지하면서 PAM-Cl (1.1 mL, 1.3 당량)을 적가하였다. 반응을 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 반응을 에틸 아세테이트 (150 mL)로 희석시키고, $NaHCO_3$ (2 x 100 mL), 염수 (80 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트 (46 g, 20 시간)으로 건조하고, 여과하고, 증발시켜 건조하였다 (청색 고체). 생성물을 200 mL 다이클로로메탄에 용해시키고, 에터 및 헥산의 동일 혼합물 (2 L)에 에서 침전시켜 정제하였다. 여과 및 건조하여 청색 고체로서 생성물을 수득하였다 (1.92 g, 36% 수율). LCMS: m/z 1378.3 [M+H]. ^{31}P NMR (CD3CN, 160 MHz): 두 개의 단일항 (부분입체 이성질체) δ 147.97 ppm 및 148.04 ppm. ^{1}H NMR (CD3CN, 400 MHz): δ 9.2 (br, 1H), 7.94 and 7.97 (s, 1H), 7.85 - 7.89 (m, 1H), 7.53 - 7.59 (m, 2H), 7.42 - 7.47 (m, 2H), 7.30 - 7.37 (m, 4H), 7.19 - 7.29 (m, 3H), 6.80 - 6.92 (m, 5H), 6.35 (s, 2H), 6.13 - 6.21 (m, 1H), 5.36 - 5.41 (m, 1H), 4.55 -

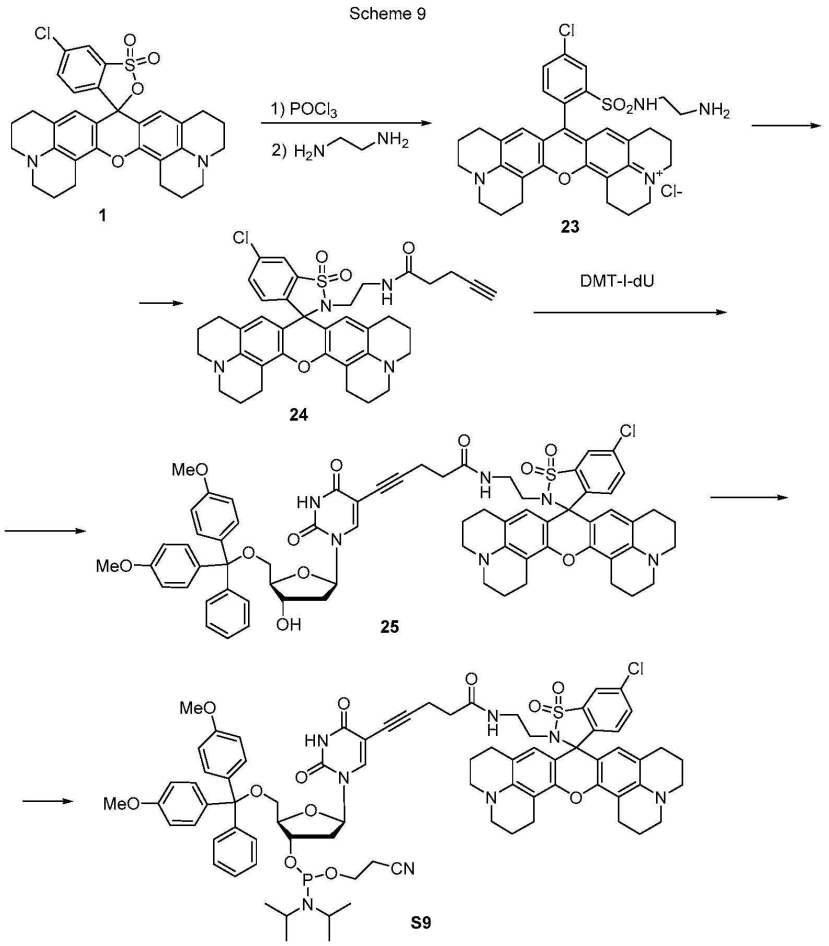
4.64 (m, 1H), 4.08 - 4.15 (m, 1H), 3.73 - 3.75 (m, 6H), 3.55 - 3.70 (m, 4H), 3.25 - 3.40 (m, 2H), 3.05-3.16 (m, 8H), 2.93 - 3.00 (m, 2H), 2.72 - 2.88 (m, 6H), 2.66 (t, 1H, 6.0 Hz), 2.33 - 2.59 (m, 7H), 2.15 - 2.22 (m, 2H), 1.92 - 2.00 (m, 2H), 1.75 - 1.88 (m, 6H), 1.14 - 1.21 (m, 9H), 1.07 and 1.06 (2 x s, 3H).

[0465] 실시예 9: 화합물 S9의 합성

[0466] 본 실시예는 포스포아미다이트 기, 및 다이메톡시트라이틸 기로 보호된 하이드록실 기를 포함하는 예시적인 설포로다민 염료 S9을 기재한다. 이러한 염료는 표준 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 또는 중간 위치에 혼입시키기에 적당하다.

[0467] 화합물 S9는 반응식 9에 따라 상기 기재된 화합물 S8의 제조와 유사하게 제조한다.

Scheme 9



[0468]

[0469] 실시예 10: 설포로다민 염료 포스포아미다이트로부터

[0470] 형광 표지된 폴리뉴클레오타이드의 제조

[0471] 설포로다민 염료를 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 DMT 제거 - 커플링 - 캡핑 - 산화 - 캡핑의 주기로 표준 200 nmol DNA 프로토콜을 사용하는 MerMade-12 올리고뉴클레오타이드 합성기에서 합성하였다. 설포로다민 염료 포스포아미다이트의 커플링 시간을 6 분으로 연장하였다.

[0472] 5' 설포로다민 염료를 함유하는 폴리뉴클레오타이드의 경우, 마지막 설포로다민 염료 포스포아미다이트 커플링 주기 이후 합성을 완료하였다. 설포로다민 염료 포스포아미다이트의 내부 혼입의 경우, 염료의 커플링 이후 더 많은 뉴클레오사이드 단량체를 첨가하였다. 최종 DMT 기가 폴리뉴클레오타이드에 남아있다.

[0473] 완전히 조립된 폴리뉴클레오타이드를 고체 지지체로부터 절단하고, 55 ℃에서 10-12 시간 동안 30% 암모늄 하이드록사이드에 의해 탈보호하였다. 암모니아의 제거 이후, 올리고뉴클레오타이드를 역상 HPLC (RP-HPLC)에 의해 C18 Gemini 컬럼 상에서 아세토나이트릴/0.1 M 트라이에틸암모늄 바이카보네이트 (pH 7)의 선형 구배로 용리하여 분석 및 정제하였다. DMT 기 제거 이후, 폴리뉴클레오타이드를 두 번째로 정제하였다.

[0474] 설포로다민 101-표지된 올리고뉴클레오타이드는 아미노-C_6-올리고와 상업용 Texas Red®-X (NHS 에스터) 시약 (혼합 이성질체, Thermo Fisher Scientific)의 컨쥬게이션에 의해 제조하였다. 모든 정제된 폴리뉴클레오타이드는 질량 분광법으로 특성을 분석하였다.

[0475] 예시적인 설포로다민 염료를 포함하는 5'-뉴클레아제 프로브는 상업적으로 입수 가능한 BHQ-2 소광제 CPG, Glycolate 500 Angstrom 컬럼 (BioSearch Technologies)를 사용하여 제조하였다. A01은 상업적으로 입수 가능한 2-아미노-dA-CE 포스포아미다이트 (Glen Research, 제품 카탈로그 번호: 10-1085)를 사용하여 혼입된 2-아미노-dA (2,6-다이아미노- 2'-디옥시퓨린 리보사이드)를 지칭한다.

[0476] 설포로다민 염료 포스포아미다이트를 혼입한 예시적인 올리고뉴클레오타이드 및 설포로다민 101 (Tx Red)-표지된 올리고뉴클레오타이드가 표 1에 나열된다.

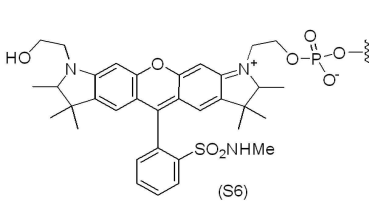
[0477] 표 1.

표 1

[0478]

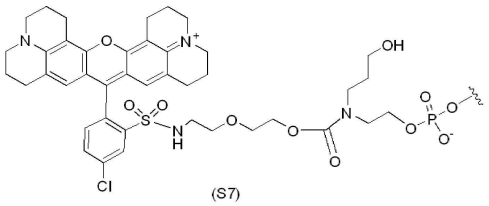
명칭	5' 염료	서열	3' 소광제
Oligo A	Tx Red	서열 번호: 1	해당 없음
Oligo B	(S6)	서열 번호: 1	해당 없음
Oligo C	(S7)	서열 번호: 1	해당 없음
Oligo D	Tx Red	서열 번호: 2	BHQ-2
Oligo E	(S7)	서열 번호: 2	BHQ-2
Oligo F	Tx Red	서열 번호: 3	BHQ-2
Oligo G	(S7)	서열 번호: 3	BHQ-2

[0479] 표 1에서, 폴리뉴클레오타이드의 5'-말단에 혼입된 염료 모이어티는 다음의 구조를 가지며:

[0480] 

(S6)

및



(S7)

,

[0481] 올리고뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:

[0482] TCA GAG TAC CTG AAA CA (서열 번호: 1),

[0483] CC(A01) CGG (A01)GC G(A01)G AC(A01) TCT CGG CC (서열 번호: 2), 및

[0484] CC(A01) G(A01)G CAA ACT GGG CGG C(A01) (SEQ ID NO:3),

[0485] 여기서 A01은 2,6-다이아미노퓨린2'-디옥시리보사이드를 나타낸다.

[0486] 표지된 올리고뉴클레오타이드의 여기 및 방출 스펙트럼은 Agilent Cary 형광계 (200 nM 올리고뉴클레오타이드, 0.1 M Tris 완충액, pH 8)으로 기록하였다. 도 1A 및 1B에 도시된 바와 같이, 예시적인 염료 포스포아미다이트 시약 화합물 S7 (Oligo C)을 사용여 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 제조된 예시적인 올리고뉴클레오타이드의 최대 여기 및 방출은 Texas Red® 염료 (Oligo A)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 최대 여기 및 방출 값과 일치한다. 도 1C에 도시된 바와 같이, 예시적인 염료 포스포아미다이트 시약 화합물 S6 (Oligo B)를 사용하여 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 제조된 예시적인 올리고뉴클레오타이드의 최대 여기 및 방출은 문헌에 기록된 TAMRA 염료-표지된 올리고뉴클레오타이드의 최대 여기 및 방출에 근접하다.

[0487] 실시예 11: 5'-뉴클레아제 PCR에서 예시적인 설포로다민 염료 및

[0488] Texas Red® 염료의 성능 비교

[0489] 상기 실시예에서, 5'-뉴클레아제 PCR 반응은 본 발명의 염료 및 상업적으로 입수 가능한 소광제 BHQ-2를 포함하는 절단 가능한 소광된 형광 프로브를 사용하여 수행하였다. 도 2A 및 2B에 도시된 PCR 프로파일은 본 발명의 염료를 포함하는 프로브가 검출 프로브로서 효과적으로 수행하였음을 입증한다.

[0490] 본 발명의 염료를 포함하는 5'-뉴클레아제 PCR 프로브를 평가하고 Texas Red® 포함 PCR 로브에 대해 비교하였다. 인간 게놈 DNA 베타-글로불린 하우스키핑 유전자를 표적으로 사용하였다. 정방향 및 역방향 프라이머는 다음의 서열을 가진다:

[0491] AAA CCT CCA GGC CAG AAA GAG AGA GTA (서열 번호: 4)

[0492] AAA AGG CAT TCC TGA AGC TGA CAG CAT TC (서열 번호: 5)

[0493] AAA ACC TGC CTT CTG CGT GAG ATT CT (서열 번호: 6)

[0494] CTG TAC GAA AAG ACC ACA GGG CCC AT (서열 번호: 7)

[0495] PCR은 4개의 모듈을 가지는 GeneXpert® (Cepheid) 기구 (검출: Tx Red 채널, Ex 585 nm, Em 610 nm)로 수행하였다. 각 PCR 곡선은 평균 4 회 반복한다. 다음의 PCR 프로토콜을 사용하였다:

[0496] 앰플리콘: 길이 96 bp, 1,000 복제본/반응;

[0497] ATP, CTP, GTP, TTP 각각에 대한 뉴클레오타이드 트라이포스페이트 (NTP) 농도: 0.25 mmol;

[0498] Taq 중합효소: 3 단위/25 uL 반응;

[0499] 프라이머 (각각) 농도: 200 nM; 및

[0500] 프로브 농도: 250 nM;

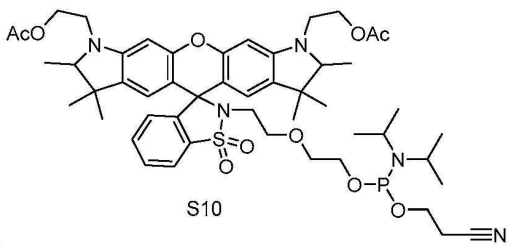
[0501] 95 ℃에서 35 초 동안 변성, 66 ℃에서 30 초 동안 어닐링-연장의 주기 2회; 및 95 ℃에서 8 초 동안 변성, 66 ℃에서 30 초 동안 어닐링-연장 주기 45회.

[0502] 결과 PCR 데이터는 도 2A 및 2B에 도시되어 있다. 데이터에 의해 입증된 바와 같이, 본 발명의 예시적인 염료로 표지된 5' 뉴클레아제 PCR 프로브는 Texas Red®표지된 PCR 프로브의 성능과 유사한 성능을 가진다. 도 2A 및 2B의 데이터로부터 알 수 있는 바와 같이, 예시적인 염료 S7을 포함하는 프로브는 Texas Red®으로 표지된 프로브에 의해 입증되는 종점과 유사한 종점을 입증한다.

[0503] 실시예 12: 화합물 S10a 및 S10b의 합성

[0504] 본 실시예는 포스포아미다이트 기를 포함하는 예시적인 설포로다민 염료 S10a 및 S10b를 기재한다. 이러한 염료는 표준 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 통해 올리고뉴클레오타이드 5'-말단 위치에 혼입하기에 적합하다.

[0505] 하기 도시된 화합물 S10와 같은 라세미 중간체 12로부터 제조된 설포로다민 염료는 2개의 카이랄 중심을 포함하여, 4가지 부분입체 이성질체의 혼합물로서 존재하는 최종 염료를 생성한다.

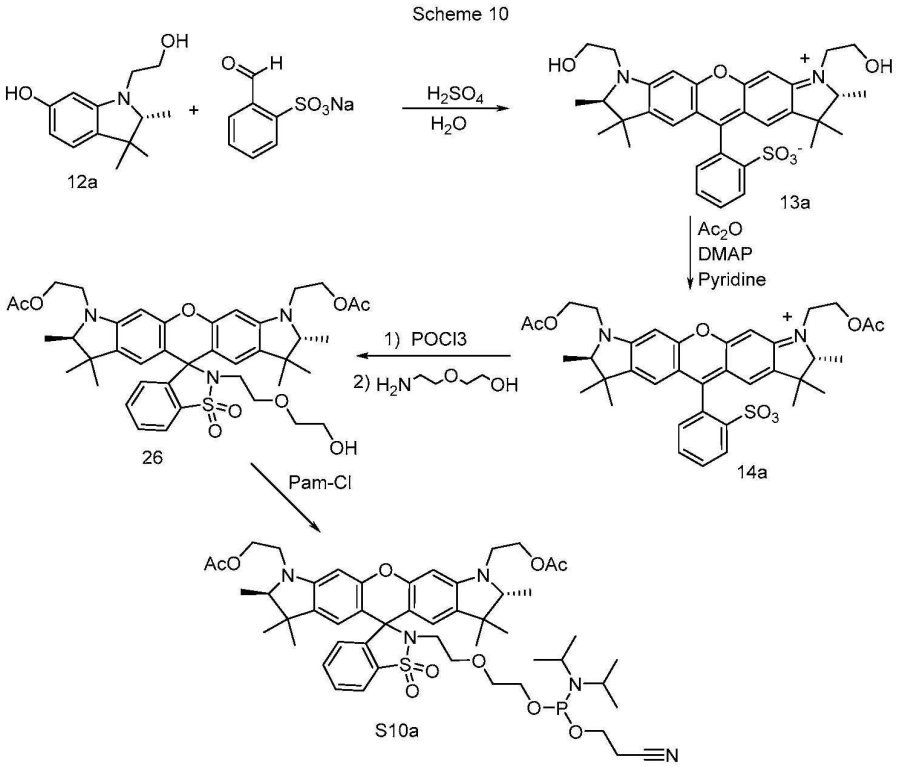
[0506] 

S10

[0507] 이러한 염료를, 예를 들어, 포스포아미다이트 합성 또는 컨쥬게이션에 의해, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입하면, 형광 표지된 폴리뉴클레오타이드의 부분입체이성질체 혼합물이 생성된다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 동일한 광학 특성을 갖지만, 폴리뉴클레오타이드가 다중 또는 넓은 피크로 용리되기 때문에 HPLC에 의한 정제가 어려울 수 있다. 염료의 순수한 입체 이성질체를 사용하면 이러한 표지된 폴리뉴클레오타이드의 크로마토그래피 정제를 단순화할 수 있다.

[0508] 화합물 S10a는 화합물 12의 단일 거울상 이성질체인 12a로부터 합성된 설포로다민 염료의 예이며, 화합물 S10a이 단일 부분입체 이성질체로서 존재하게 된다. 화합물 12a는 카이랄 촉매 RuCl(p-사이멘)[(R,R)-Ts-DPEN] (Aldrich cat # 703907)을 사용하는 비대칭 전이 수소화 (Org. Lett. 2018, 20, 5107-5111에 기재)를 통해 2,3,3-트라이메틸-3H-인돌-6-올 (FCH 기, 라티바)로부터 합성될 수 있다. 이와 유사하게, 화합물 12a의 입체 이성질체인 화합물 12b는, RuCl(p-사이멘)[(S,S)-Ts-DPEN] (Aldrich)을 사용하여 유사한 절차로 합성할 수 있다.

Scheme 10



[0509]

[0510] 화합물 13a

[0511] 2-포밀벤젠설폰산 소듐 염 (1.41 g, 6.77 mmol) 및 1 당량의 화합물 12a (1.50 g, 6.77 mmol)를 40 mL의 60% H_2SO_4에 용해시켰다. 용액을 3 시간 동안 60 ℃로 가열하고, 또 다른 당량의 화합물 12a를 첨가하고, 혼합물을 100 ℃로 가열하였다. 72 시간 후, 반응 혼합물을 RT로 냉각시키고, 40 mL의 물로 희석시키고, 500 mL의 분쇄된 얼음에 붓고, 1.5 시간 동안 교반하였다. 생성된 고체를 여과시켜 수집하였다. 염수 (100 mL)를 여액에 붓고, 여액을 다이클로로메탄 (2X)으로 추출하였다. 조합된 유기층을 Na_2SO_4로 건조하고, 여과하여, 진공하에서 용매를 제거하였다. 유기물로부터 추출된 물질과 침전물을 조합하고 ACN/물 시스템의 구배 (4% 내지 10% H_2O)를 사용하는 실리카 겔 컬럼 (2" x 7") 상의 크로마토그래피로 정제하여, 1.08 g (27%)의 화합물 13A를 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz): 8.03 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.55 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.15 (d, J=7.5 Hz, 1H), 6.91 (m, 1H), 6.81 (d, J=3.6 Hz, 1H), 6.65 (m, 2H), 4.98 (m, 1H), 4.93 (m, 1H), 3.96 (m, 1H), 3.82 (m, 2H), 3.70 (m, 5H), 3.45 (m, 2H), 1.18 (m, 9H), 1.12 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.97 (s, 3H). LCMS: m/z 591.5 [M+H].

[0512] 화합물 14a

[0513] 아르곤 하에서, 화합물 13a (1.06 g, 1.79 mmol)을 25 mL의 무수 피리딘에 용해시켰다. 아세트산 무수물 (0.510 mL, 5.39 mmol) 및 DMAP (22 mg, 0.180 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 5 시간 동안 교반하였다. 피리딘을 진공 하에서 제거하고, 잔류물을 using a MeOH/DCM 용매 시스템 (4 to 8% MeOH)을 사용하는 실리카 겔 컬럼 (1.5"x5") 상에서 크로마토그래피하여 475 mg (39%)의 화합물 14a를 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz): 8.03 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.16 (d, J= 7.3 Hz, 1H), 6.93 (d, J=5.3 Hz, 2H), 6.70 (s, 2H), 4.29 (m, 4H), 3.96 (m, 2H), 3.78 (m, 2H), 3.69 (m,2H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.21 (d, J=6.7 Hz, 3H), 1.17 (d, J=6.6 Hz, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.98 (s, 3H). LCMS: m/z 675.5 [M+H].

[0514] 화합물 26

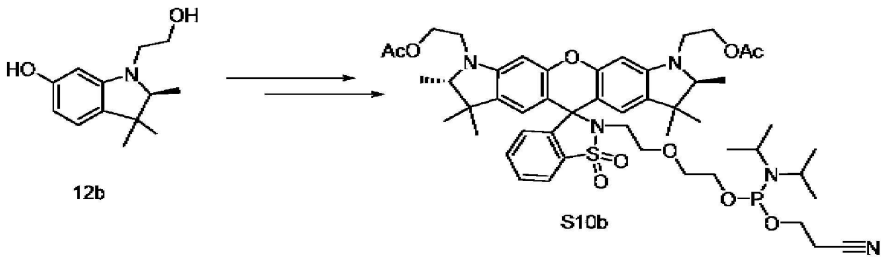
[0515] 아르곤 하에서 화합물 14a (455 mg, 0.674 mmol)을 25 mL의 무수 DCM에 용해시키고, $POCl_3$ (0.630 mL, 6.76 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 18 시간 동안 실온에서 교반한 후, DCM 및 $POCl_3$를 진공으로 제거하였다. 생성된

오일을 25 mL의 무수 DCM에 용해시키고, 용액을 0 ℃로 냉각하고, DIEA (1.15 mL, 6.60 mmol) 및 2-(2-아미노에톡시)에탄올 (338 uL 3.37 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온으로 가온시키고, 2 시간 동안 교반한 다음, 포화 $NaHCO_3$으로 추출하였다. 추출물을 Na_2SO_4으로 건조하였다. 미정제 생성물을 실리카 겔 (1"x6" 컬럼) 상에서 MeOH/DCM (2 to 6% MeOH)의 구배를 사용하여 크로마토그래피하여, 382 mg (74%)의 화합물 26을 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 500 MHz): 8.00 (m, 1H), 7.60 (m, 2H), 6.99 (m, 1H), 6.43 (d, J=1.3 Hz, 2H), 6.32 (d, J=5.6 Hz, 2H), 4.41 (t, J=4.78, 1H), 4.16 (m, 4H), 3.29 (m, 2H), 3.15 (m, 6H), 3.09 (m, 4H), 2.90 (m, 2H), 1.98 (m, 6H), 1.09 (m, 9H), 0.97 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.72 (s, 3H). LCMS: m/z 762.6 [M+H].

[0516] 화합물 S10a

[0517] 아르곤 하에서 화합물 26 (367 mg, 0.481 mmol)을 20 mL의 무수 DCM에 용해시키고, DIEA (0.419 mL, 2.41 mmol)를 첨가한 후, N,N-다이아이소프로필아미노 사이아노에틸 포스폰아미딕-Cl (0.129 mL, 0.627 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 3 시간 동안 실온에서 교반한 다음, 포화 $NaHCO_3$, 물, 및 염수로 추출하였다. 추출물을 Na_2SO_4으로 건조하였다. 실리카 겔 (1"x6" 컬럼), 20% EtOAc/헥산 내지 30% EtOAc/10% TEA 함유 헥산 상의 크로마도그래피로, 350 mg (78%)의 화합물 S6a를 수득하였다. ^{1}H NMR (CD_3CN, 500 MHz): 7.91 (m, 1H), 7.59 (m, 2H), 6.97 (m, 1H), 6.54 (d, J=8.2 Hz, 2H), 6.28 (s, 2H), 4.25 (m, 4H), 3.73 (m, 2H), 3.54 (m, 6H), 3.32 (m, 6H), 3.22 (m, 2H), 2.98 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.97 (pentet, J=2.5 Hz, 2H), 1.15 (m, 15H), 1.12 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.93 (m, 3H), 0.79 (s, 3H). ^{31}P NMR (CD_3CN, 500 MHz): 148.2. LCMS: m/z 963.0 [M+H].

[0518] 화합물 S10b는 유사한 방식으로 중간체 12b로부터 제조될 수 있다.



[0519]

[0520] 5' 말단에 염료 S10 및 S10a를 혼입한 서열 번호: 1의 예시적인 표지된 폴리뉴클레오타이드를 상기 기재된 바와 같이 자동화된 올리고뉴클레오타이드로 제조하였다. 염료 S10를 혼입한 표지된 폴리뉴클레오타이드를 20 분에 걸쳐 HPLC에 의해 Phenomenex Gemini 컬럼 (5㎛ C18 110 Å) 상에서 0.1 M 트라이에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 중의 16-34% ACN의 구배로 용리하여 정제하였다. 염료 S10a를 혼입한 표지된 폴리뉴클레오타이드를 20 분에 걸쳐 HPLC에 의해 Phenomenex Gemini 컬럼 (5㎛ C18 110 Å) 상에서 0.1 M 트라이에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 중의 18-38% ACN의 구배로 용리하여 정제하였다. 두 가지 예시적인 표지된 폴리뉴클레오타이드의 HPLC 프로파일이 도 3A 및 3B에 도시되어 있다.

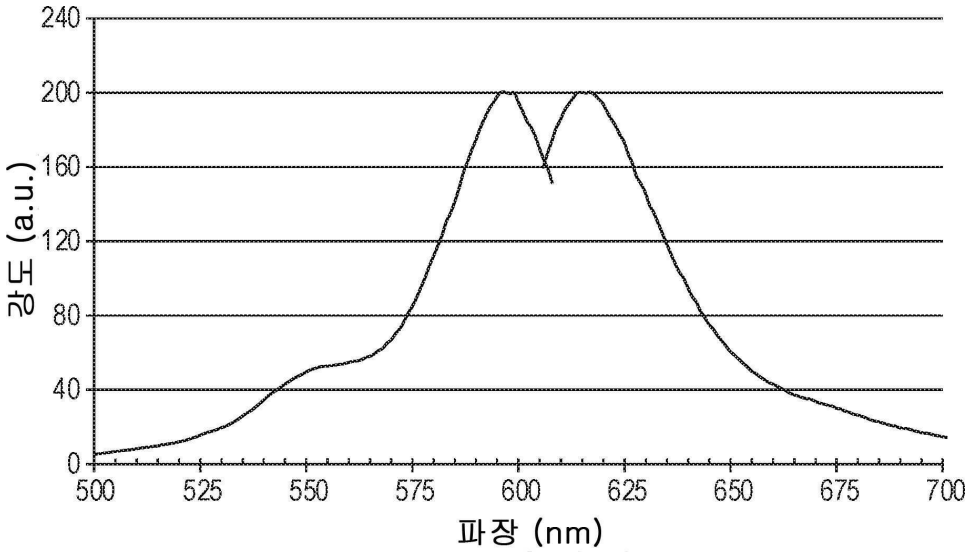
[0521] 도 1D는 S10a-표지된 올리고뉴클레오타이드 서열 번호: 1의 방출/여기 스펙트럼을 도시하며, 이는 S10a이 TAMRA 염료의 대체품으로 사용될 수 있음을 입증한다. 게다가, 도 3B에 도시된 바와 같이, 예시적인 S10-표지된 폴리뉴클레오타이드 (도 3A)에 의해 생성된 다중 피크와 비교하여, 예시적인 S10a-표지된 폴리뉴클레오타이드는 HPLC에 의해 단일 피크를 주로 생성하며, 이는 이러한 올리고뉴클레오타이드의 크로마토그래피 정제를 단순화한다.

[0522] 본 발명의 실행은 본 명세서에서 달리 지시되지 않는 한, 당업계의 기술 내에 있는 세포 생물학, 분자 생물학, 미생물학, 바이러스학, 재조합 DNA 등의 통상적인 기법을 사용할 수 있다. 이러한 기법은 문헌에 상세히 설명되어 있다. 예를 들어, Sambrook, Fritsch, and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989), Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait Ed., 1984), Animal Cell Culture (R. I. Freshney, Ed., 1987), the series Methods In Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos eds. 1987), Current Protocols In Molecular Biology (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Siedman, J. A. Smith, and K. Struhl, eds., 1987)를 참조한다.

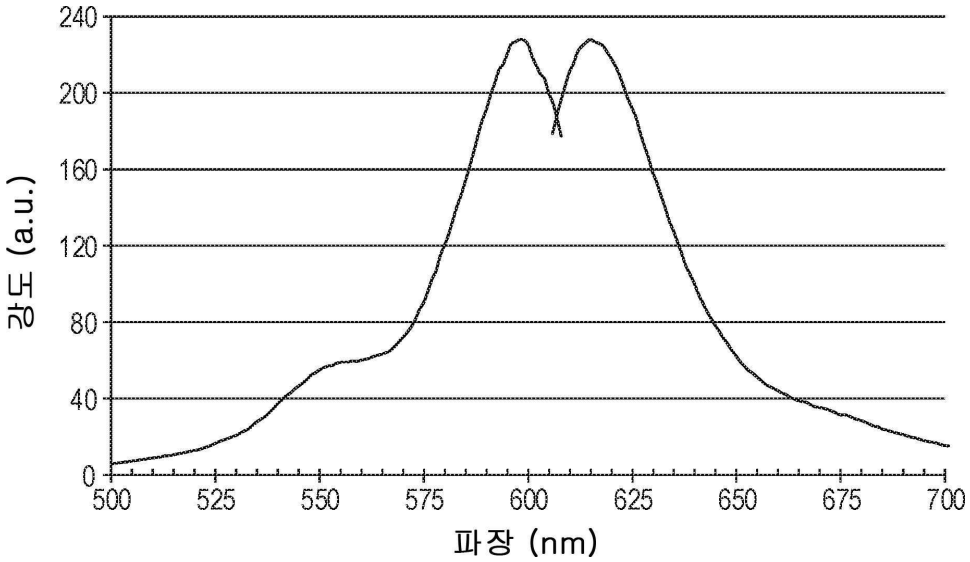
[0523] 예시적인 구체예가 예시되고 설명되었지만, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

도면

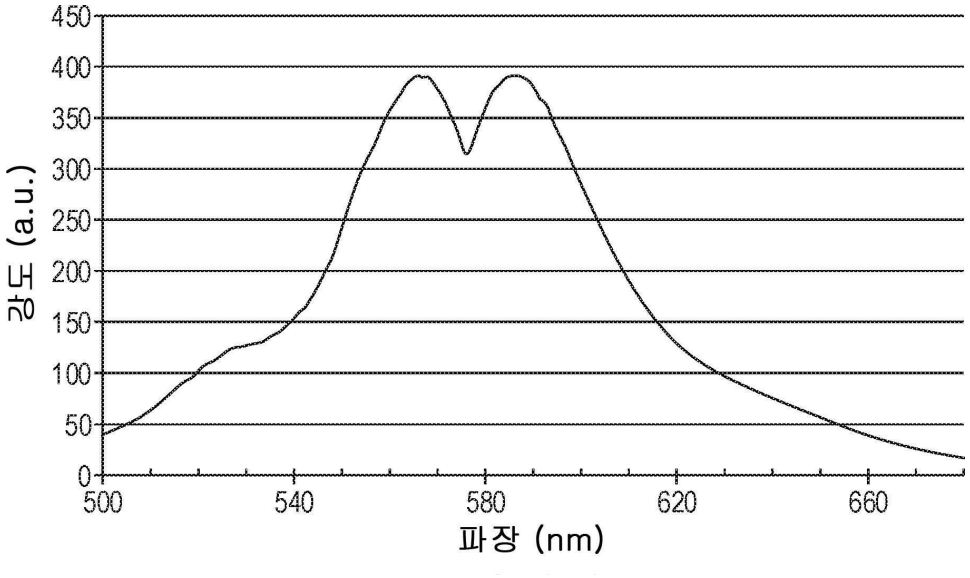
도면1a



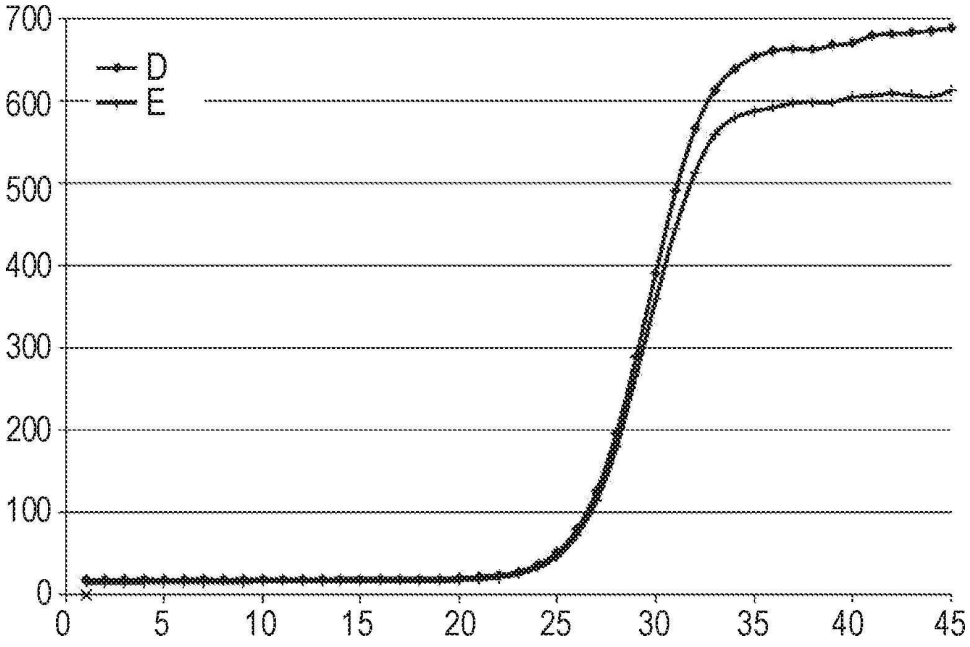
도면1b



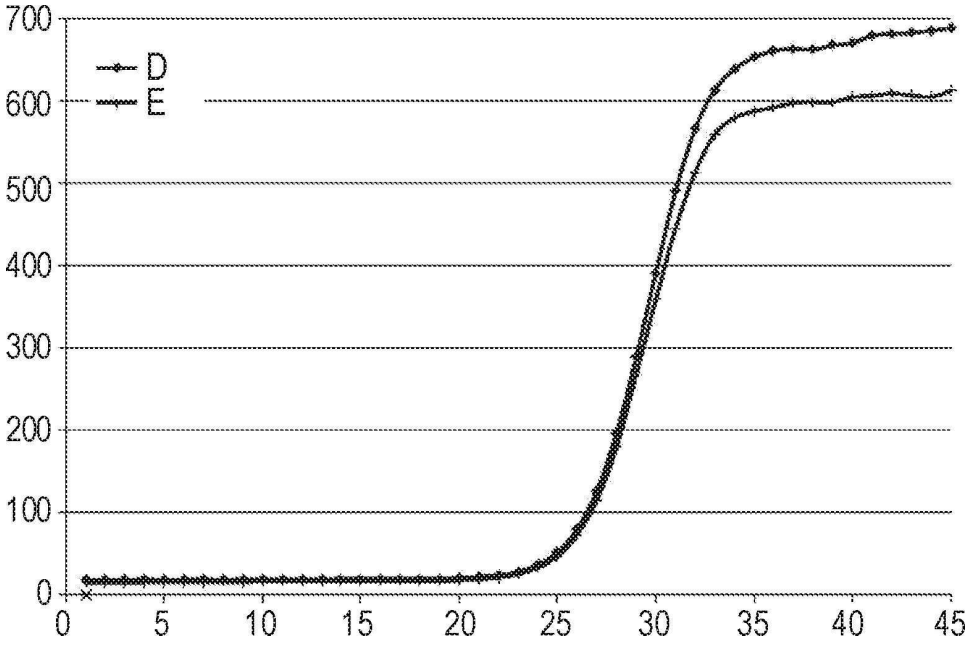
도면1c


450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
강도 (a.u.)
500
540
580
620
660
파장 (nm)

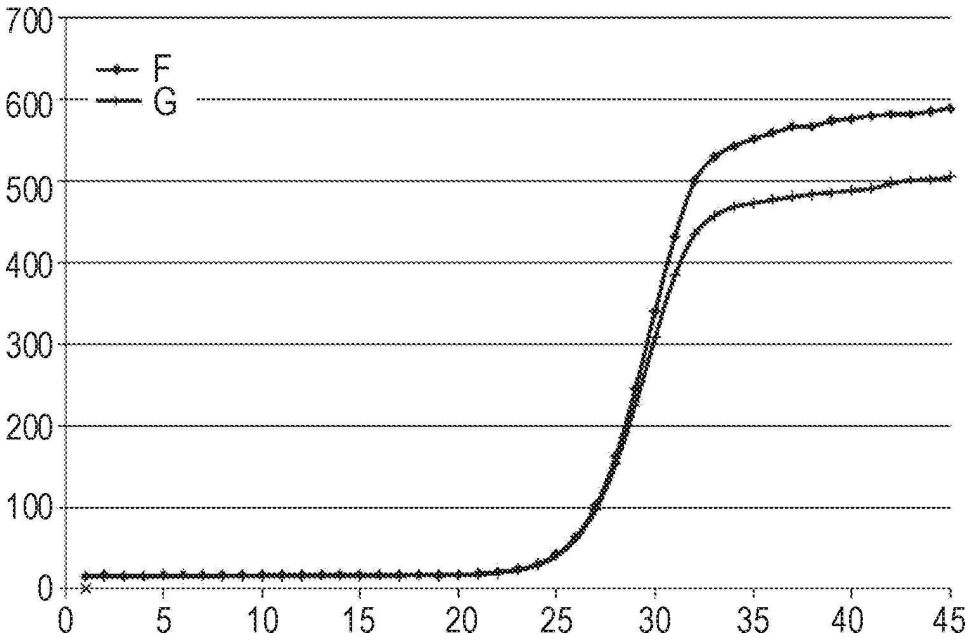
도면1d


700
600
500
400
300
200
100
0
D
E
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45

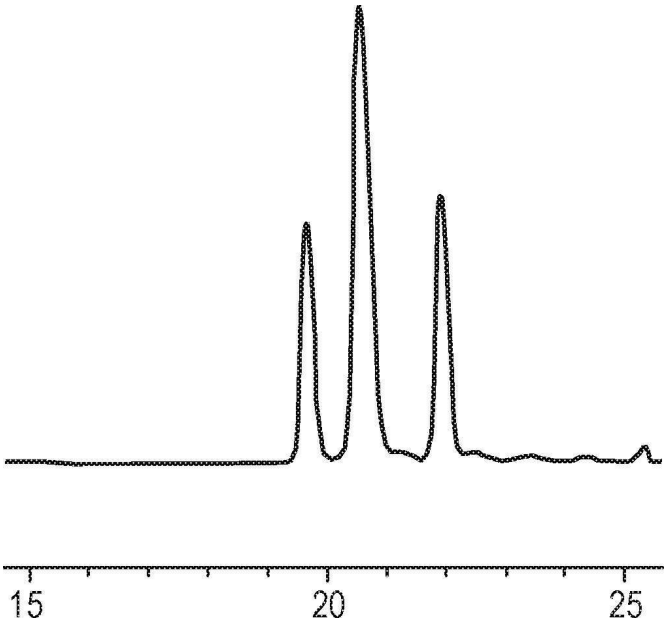
도면2a


700
600
500
400
300
200
100
0
D
E
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45

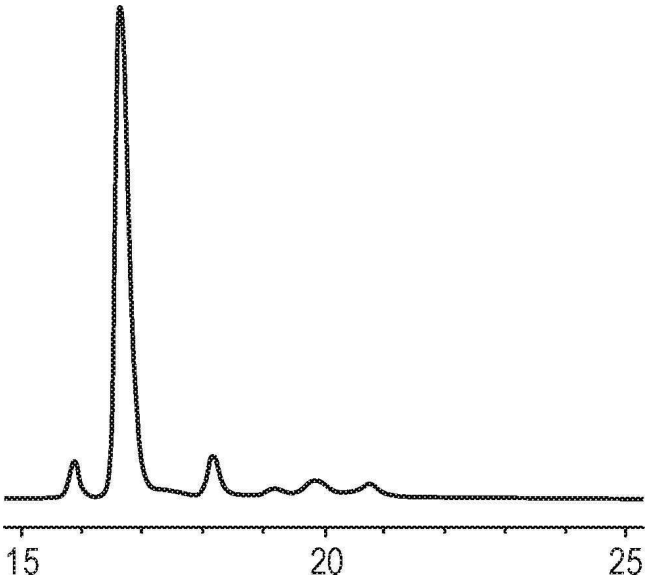
도면2b


700
600
500
400
300
200
100
0
F
G
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45

도면3a



도면3b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Cepheid

Lund, Kevin P.

Sergueev, Dmitri

Qabar, Maher N.

Gall, Alexander

<120> Sulforhodamine Phosphoramidite Dyes

<130> CEPH-1-69367

<150> 62/668,109

<151> 2018-05-07

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

tcagagtacc tgaaaca 17

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> 2,6-diaminopurine

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2,6-diaminopurine

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2,6-diaminopurine

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> 2,6-diaminopurine

<400> 2

ccncggngcg ngacntctcg gcc 23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> 2,6-diaminopurine

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> 2,6-diaminopurine

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> 2,6-diaminopurine

<400> 3

ccngngcaaa ctgggcggcn 20

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

aaacctccag gccagaaaga gagagta 27

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

aaaaggcatt cctgaagctg acagcattc 29

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

aaaacctgcc ttctgcgtga gattct 26

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

ctgtacgaaa agaccacagg gcccat 26