



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0133890
(43) 공개일자 2018년12월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 9/09 (2006.01) C09B 69/10 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 9/091 (2013.01)
C09B 69/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7032251
(22) 출원일자(국제) 2017년04월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년11월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/026451
(87) 국제공개번호 WO 2017/177065
국제공개일자 2017년10월12일
(30) 우선권주장
62/318,935 2016년04월06일 미국(US)

(71) 출원인
소니 주식회사
일본국 도쿄도 미나토구 코난 1-7-1
소니 코포레이션 오브 아메리카
미국 10010 뉴욕주 뉴욕 매디슨 애비뉴 25
(72) 발명자
매트레이 트레이시
미국 98296 워싱턴주 스노호미시 78쓰 애비뉴 에
스이 15233
싱 샤라트
미국 92067 캘리포니아주 란초 산타 페 탑 오 모
닝 웨이 8171
(74) 대리인
장훈

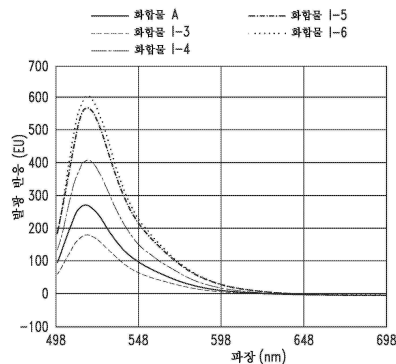
전체 청구항 수 : 총 129 항

(54) 발명의 명칭 스페이싱 링커 그룹을 포함하는 초고명도 이량체성 또는 중합체성 염료

(57) 요약

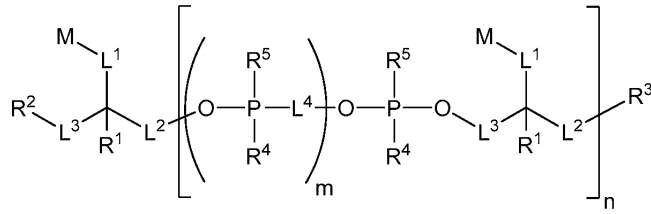
형광 또는 유색 염료로서 유용한 화합물이 개시된다. 상기 화합물 또는 이의 입체 이성질체, 염, 또는 토포머는
(뒷면에 계속)

대표도 - 도4



화학식 I을 갖는다.

[화학식 I]



상기 화학식 I에서,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , M, m 및 n은 본원에 정의된 바와 같다.

이러한 화합물의 제조 및 용도와 관련된 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

C09K 11/06 (2013.01)

G01N 33/533 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

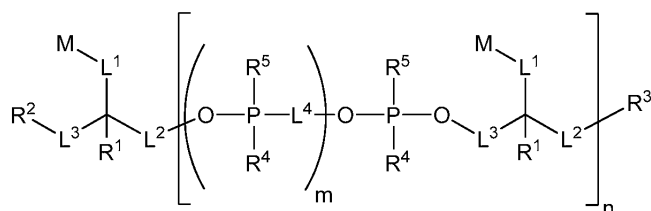
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 I의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 입체 이성질체, 염, 또는 토토머.

[화학식 I]



상기 화학식 I에서,

M은 각각의 발생시 독립적으로, 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 1 이상의 공액도(degree of conjugation)를 포함하는 모이어티(moiety)이고;

L¹은 각각의 발생시 독립적으로, i) 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이거나; 또는 ii) 2개의 상보적인 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능성 그룹을 포함하는 링커이고;

L² 및 L³은 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이고;

L⁴는 각각의 발생시 독립적으로, 길이가 3개 원자 이상인 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고, 이들의 헤테로 원자는 O, N 및 S로부터 선택되고;

R¹은 각각의 발생시 독립적으로, H, 알킬 또는 알콕시이고;

R² 및 R³은 각각 독립적으로, H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 헤테로알킬, -OP(=R_a)(R_b)R_c, Q, 또는 이들의 보호된 형태이거나, 또는 L'이고;

R⁴는 각각의 발생시 독립적으로, OH, SH, O⁻, S⁻, OR_d 또는 SR_d이고;

R⁵는 각각의 발생시 독립적으로, 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

R_a는 O 또는 S이고;

R_b는 OH, SH, O⁻, S⁻, OR_d 또는 SR_d이고;

R_c는 OH, SH, O⁻, S⁻, OR_d, OL', SR_d, 알킬, 알콕시, 헤테로알킬, 헤테로알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

R_d는 짝이온이고;

Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티 또는 이의 보호된 형태이고, 분석물 분자, 표적 지향 모이어티(targeting moiety), 고형 지지체 또는 상보적인 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있고;

L'는, 각각의 발생시 독립적으로, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체 잔기(residue)에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오타이드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

m은, 각각의 발생시 독립적으로, 0 이상의 정수이며, 단, 하나 이상의 m의 발생은 1 이상의 정수이고;

n은 1 이상의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, L⁴가 각각의 발생시 독립적으로, 헤테로알킬렌 링커인, 화합물.

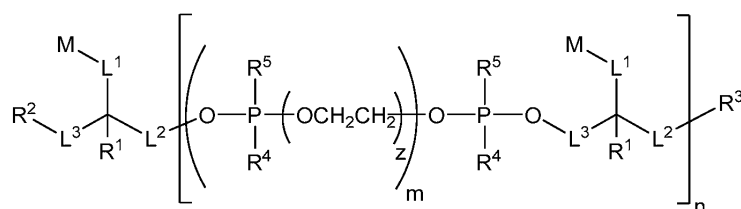
청구항 3

제2항에 있어서, L⁴가 각각의 발생시 독립적으로, 알킬렌 옥사이드 링커인, 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, L⁴가 폴리에틸렌 옥사이드이고, 화학식 IA의 구조를 갖는, 화합물.

[화학식 IA]



상기 화학식 IA에서,

z는 2 내지 100의 정수이다.

청구항 5

제4항에 있어서, z가 3 내지 6의 정수인, 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서, L¹이 각각의 발생시, 2개의 상보적인 반응성 그룹의 반응에 의해 형성할 수 있는 관능성 그룹을 포함하는 링커인, 화합물.

청구항 7

제6항에 있어서, L¹의 하나 이상의 발생에 대하여, 상기 관능성 그룹이, 알데하이드, 옥심, 하이드라존, 알킨, 아민, 아지드, 아실아지드, 아실할라이드, 니트릴, 니트론, 설프하이드릴, 디설파이드, 설포닐 할라이드, 이소티오시아네이트, 이미도에스테르, 활성화 에스테르, 케톤, α,β-불포화 카보닐, 알켄, 말레이미드, α-할로이미드, 에폭사이드, 아지리딘, 테트라진, 테트라졸, 포스핀, 비오틴 또는 티오란 관능성 그룹과 상보적인 반응성 그룹과의 반응에 의해 형성될 수 있는, 화합물.

청구항 8

제6항에 있어서, L¹의 적어도 하나의 발생에 대하여, 상기 관능성 그룹이 알킨과 아지드의 반응에 의해 형성될 수 있는, 화합물.

청구항 9

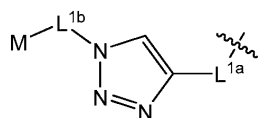
제6항에 있어서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대하여, 상기 관능성 그룹이 알켄, 에스테르, 아마이드, 티오에스테르, 티오우레아, 디설파이드, 카보사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 그룹을 포함하는, 화합물.

청구항 10

제6항에 있어서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대하여, L^1 이 트리아졸릴 관능성 그룹을 포함하는 링커인, 화합물.

청구항 11

제6항에 있어서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대하여, L^1 -M이 다음 구조의 화학식을 갖는, 화합물:

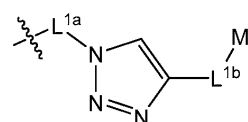


상기 화학식에서,

L^{1a} 및 L^{1b} 는 각각 독립적으로, 임의의 링커이다.

청구항 12

제6항에 있어서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대하여, L^1 -M이 다음 구조의 화학식을 갖는, 화합물:



상기 화학식에서,

L^{1a} 및 L^{1b} 는 각각 독립적으로, 임의의 링커이다.

청구항 13

제11항에 있어서, L^{1a} 또는 L^{1b} , 또는 둘 다 부재하는, 화합물.

청구항 14

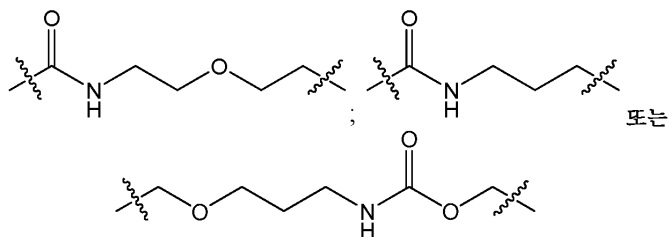
제11항에 있어서, L^{1a} 또는 L^{1b} , 또는 둘 다 존재하는, 화합물.

청구항 15

제14항에 있어서, L^{1a} 및 L^{1b} 가 존재하는 경우, 이들은 각각 독립적으로, 알킬렌 또는 헤테로알킬렌인, 화합물.

청구항 16

제14항에 있어서, L^{1a} 및 L^{1b} 가 존재하는 경우, 독립적으로 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 화합물:



청구항 17

제1항에 있어서, L^1 이 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커인, 화합물.

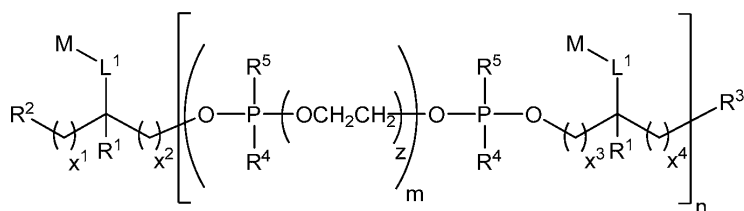
청구항 18

제1항에 있어서, L^2 및 L^3 이, 각각의 발생시 독립적으로, C_1-C_6 알킬렌, C_2-C_6 알케닐렌 또는 C_2-C_6 알키닐렌인, 화합물.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 화합물이 다음 구조의 화학식 IB를 갖는, 화합물.

[화학식 IB]



상기 화학식 IB에서,

x^1 , x^2 , x^3 및 x^4 는, 각각의 발생시 독립적으로, 0 내지 6의 정수이고;

z 는 2 내지 100의 정수이다.

청구항 20

제19항에 있어서, x^1 , x^2 , x^3 또는 x^4 의 하나 이상의 발생은 1인, 화합물.

청구항 21

제19항에 있어서, x^1 , x^2 , x^3 및 x^4 가 각각의 발생시 각각 1인, 화합물.

청구항 22

제19항에 있어서, L^1 이 각각의 발생시 독립적으로, 트리아졸릴 관능성 그룹을 포함하는, 화합물.

청구항 23

제19항에 있어서, L^1 이 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커인, 화합물.

청구항 24

제1항에 있어서, R^4 가 각각의 발생시 독립적으로, OH, O^- 또는 OR_d 인, 화합물.

청구항 25

제1항에 있어서, R^5 가 각각의 발생시 옥소인, 화합물.

청구항 26

제1항에 있어서, R^1 이 각각의 발생시 H인, 화합물.

청구항 27

제1항에 있어서, R^2 및 R^3 이 각각 독립적으로, OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 인, 화합물.

청구항 28

제1항에 있어서, R^2 또는 R^3 중 하나가 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인, 화합물.

청구항 29

제1항에 있어서, R^2 및 R^3 이 각각 독립적으로, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 인, 화합물.

청구항 30

제29항에 있어서, R_c 가 OL' 인, 화합물.

청구항 31

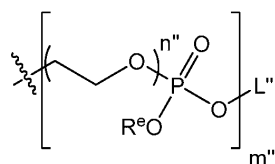
제30항에 있어서, L' 가, 표적 지향 모이어티, 분석물 분자, 고형 지지체, 고형 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 헤테로알킬렌 링커인, 화합물.

청구항 32

제31항에 있어서, L' 가 알킬렌 옥사이드 또는 포스포디에스테르 모이어티, 또는 이들의 조합을 포함하는, 화합물.

청구항 33

제32항에 있어서, L' 가 다음 구조의 화학식을 갖는, 화합물:



상기 화학식에서,

m'' 및 n'' 는 독립적으로 1 내지 10의 정수이고;

R^e 는 H, 전자쌍 또는 짝이온이고;

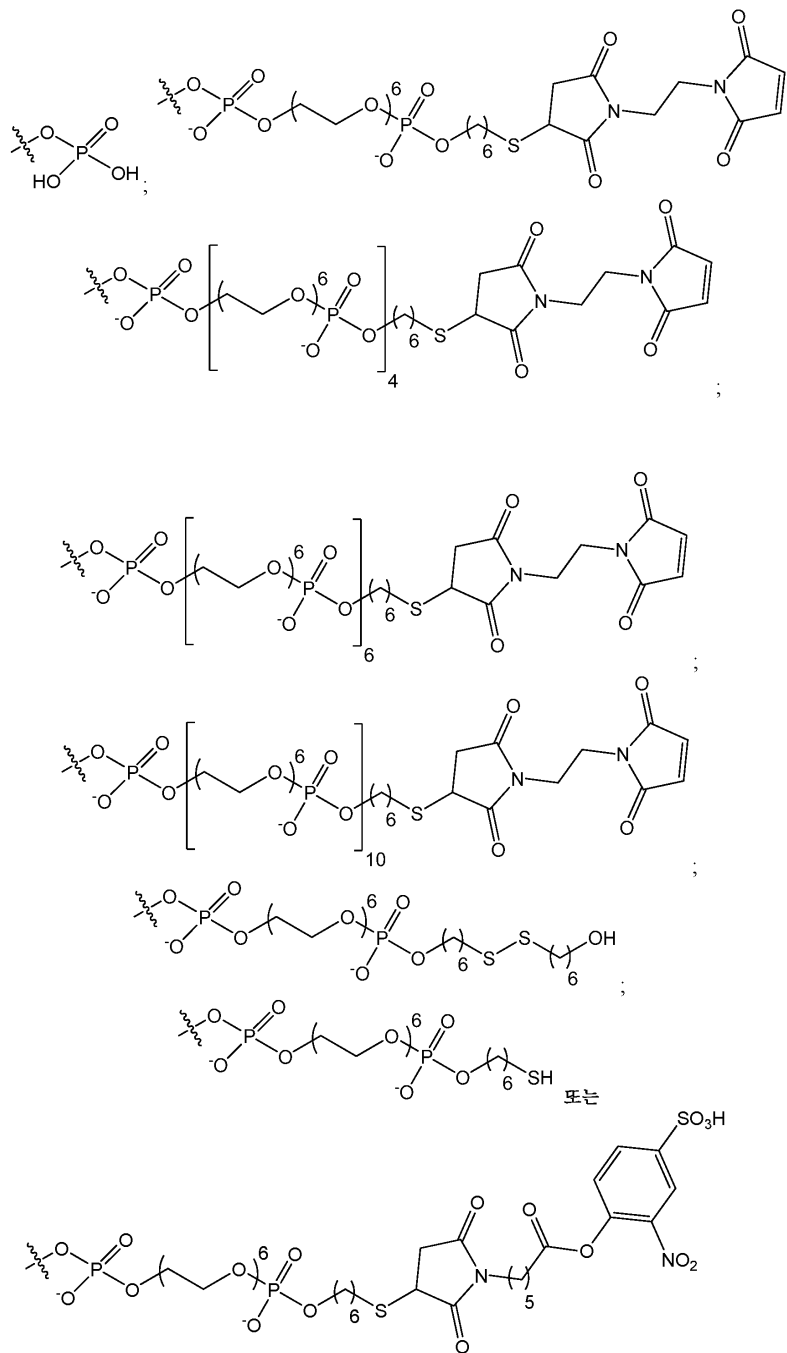
L'' 는 R^e 이거나, 직접 결합이거나, 또는 Q, 표적 지향 모이어티, 분석물 분자, 고형 지지체, 고형 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 링커지(linkage)이다.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 표적 지향 모이어티가 항체 또는 세포 표면 수용체 길항제인, 화합물.

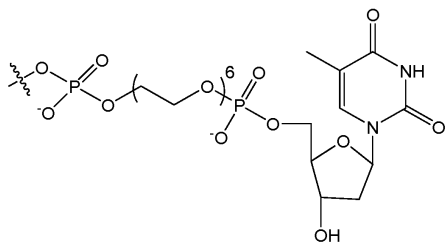
청구항 35

제29항에 있어서, R² 또는 R³이 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 화합물:



청구항 36

제29항에 있어서, R^2 또는 R^3 이 다음 구조식을 갖는, 화합물:



청구항 37

제1항에 있어서, Q가 친핵성 반응성 그룹, 친전자성 반응성 그룹 또는 부가환화(cycloaddition) 반응성 그룹을 포함하는, 화합물.

청구항 38

제37항에 있어서, Q가 설포하이드릴, 디설파이드, 활성화 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨, 알켄, 디엔, 디에노필, 산 할라이드, 설포닐 할라이드, 포스핀, α -할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이미드 관능성 그룹을 포함하는, 화합물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 활성화 에스테르가 N-석신이미드 에스테르, 이미도에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르인, 화합물.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 아지드가 알킬 아지드 또는 아실 아지드인, 화합물.

청구항 41

제1항에 있어서, Q가 표 1로부터 선택되는 모이어티인, 화합물.

청구항 42

제1항에 있어서, R^2 또는 R^3 중 하나가 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 또는 고정 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인, 화합물.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 분석물 분자가 핵산, 아미노산 또는 이들의 중합체인, 화합물.

청구항 44

제42항에 있어서, 상기 분석물 분자가 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앵타머 또는 프리온인, 화합물.

청구항 45

제42항에 있어서, 상기 표적 지향 모이어티가 항체 또는 세포 표면 수용체 길항제인, 화합물.

청구항 46

제42항에 있어서, 상기 고정 지지체가 중합체성 비드 또는 비중합체성 비드인, 화합물.

청구항 47

제1항에 있어서, m이 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 10의 정수인, 화합물.

청구항 48

제1항에 있어서, m이 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 5의 정수인, 화합물.

청구항 49

제1항에 있어서, n이 1 내지 100의 정수인, 화합물.

청구항 50

제1항에 있어서, n이 1 내지 10의 정수인, 화합물.

청구항 51

제1항에 있어서, M이 각각의 발생시 독립적으로, 4개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이들의 조합을 포함하는 모이어티인, 화합물.

청구항 52

제1항에 있어서, M이 각각의 발생시 독립적으로, 형광성 또는 유색인, 화합물.

청구항 53

제52항에 있어서, M이 형광성인, 화합물.

청구항 54

제1항에 있어서, M이 각각의 발생시 독립적으로, 4개 이상의 융합된 환을 포함하는 융합된 멀티사이클릭 아릴 모이어티인, 화합물.

청구항 55

제1항에 있어서, M이, 각각의 발생시 독립적으로, 디메틸아미노스틸벤, 퀴나크리돈, 플루오로페닐-디메틸-BODIPY, 히스-플루오로페닐-BODIPY, 아크리딘, 테릴렌, 섹시페닐, 포르피린, 벤조피렌, (플루오로페닐-디메틸-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, (비스플루오로페닐-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, 쿼터페닐, 비-벤조티아졸, ter-벤조티아졸, 비-나프틸, 비-안트라실, 스쿠아라인, 스쿠아릴륨, 9,10-에티닐안트라센 또는 ter-나프틸 모이어티인, 화합물.

청구항 56

제1항에 있어서, M이, 각각의 발생시 독립적으로, p-테르페닐, 페릴렌, 아조벤젠, 페나진, 페난트롤린, 아크리딘, 티오크산트렌, 크리센, 루브렌, 코로넨, 시아닌, 페릴렌 이미드, 또는 페릴렌 아미드 또는 이들의 유도체인, 화합물.

청구항 57

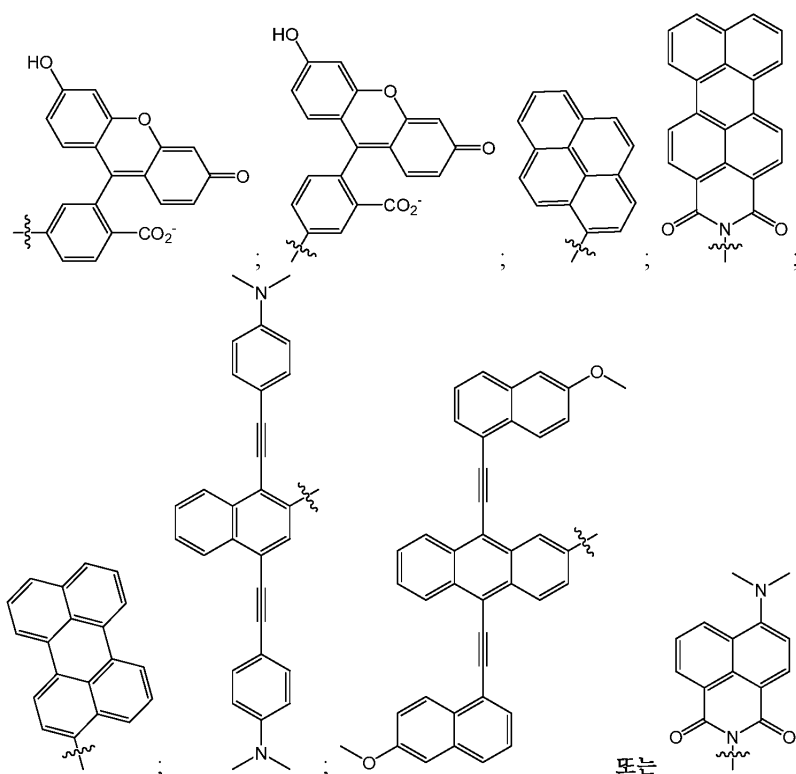
제1항에 있어서, M이, 각각의 발생시 독립적으로, 쿠마린 염료, 레조루핀 염료, 디피로메텐보론 디플루오라이드 염료, 루테늄 비피리딜 염료, 에너지 전이 염료, 티아졸 오렌지 염료, 폴리메틴 또는 N-아릴-1,8-나프탈이미드 염료인, 화합물.

청구항 58

제1항에 있어서, M이, 각각의 발생시 독립적으로, 피렌, 페릴렌, 페릴렌 모노이미드 또는 6-FAM 또는 이들의 유도체인, 화합물.

청구항 59

제1항에 있어서, M이 각각의 발생시 독립적으로, 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 화합물:



청구항 60

표 2로부터 선택되는 화합물.

청구항 61

제1항의 화합물을, 샘플이 적절한 파장으로 조명될(illuminated) 때 광학 반응을 일으키기에 충분한 양으로, 샘플에 가하는 단계를 포함하는, 샘플의 검색 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 광학 반응이 형광 반응인, 샘플의 염색 방법.

청구항 63

제61항에 있어서, 상기 샘플이 세포를 포함하는, 샘플의 염색 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 유세포 분석법으로 상기 세포를 관찰하는 단계를 추가로 포함하는, 샘플의 염색 방법.

청구항 65

제62항에 있어서, 상기 형광 반응을, 검출 가능한 상이한 광학 특성들을 갖는 제2 형광 물질의 형광 반응으로부터 구별하는 단계를 추가로 포함하는, 샘플의 염색 방법.

청구항 66

분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법으로서,

- (a) R² 또는 R³이 상기 분석 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 제1항의 화합물을 제공하는 단계; 및
- (b) 상기 화합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 분석물 분자를 시각적으로 검출하는

방법

청구항 67

분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법으로서,

- (a) R^2 또는 R^3 이 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 제1항의 화합물을, 상기 분석물 분자와 혼합하는 단계;
- (b) 상기 화합물과 상기 분석물 분자의 접합물을 형성하는 단계; 및
- (c) 상기 접합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법.

청구항 68

분석물을 시각적으로 검출하는 방법으로서,

- (a) R^2 또는 R^3 이 상기 분석물에 대한 특이성을 갖는 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커를 포함하는 제1항의 화합물을 제공하는 단계;
- (b) 상기 화합물과 상기 분석물을 혼합하여, 상기 표적 지향 모이어티와 상기 분석물을 회합시키는 단계; 및
- (c) 상기 화합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 분석물을 시각적으로 검출하는 방법.

청구항 69

제1항의 화합물 및 하나 이상의 분석물 분자를 포함하는, 조성물.

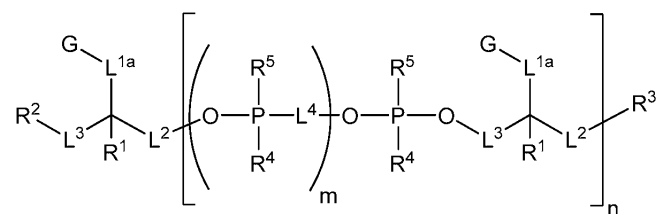
청구항 70

상기 하나 이상의 분석물 분자를 검출하기 위한 분석 방법에서의 제69항의 조성물의, 용도.

청구항 71

화학식 II의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 입체 이성질체, 염, 또는 토포머.

[화학식 II]



상기 화학식 II에서,

G는 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티 또는 이의 보호된 형태이고, 상보적인 반응성 그룹과 공유 결합을 형성할 수 있고;

L^{1a} , L^2 및 L^3 은, 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이고;

L^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 길이가 3개 원자 이상인 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알킬닐렌 링 커이고, 이들의 헤테로 원자는 O, N 및 S로부터 선택되고;

R¹은 각각의 발생시 독립적으로, H, 알킬 또는 알콕시이고;

R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로, H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 헤테로알킬, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, 또는 L'이

고;

R^4 는 각각의 발생시 독립적으로, OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;

R^5 는 각각의 발생시 독립적으로, 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

R_a 는 O 또는 S이고;

R_b 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;

R_c 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d , OL' , SR_d , 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

R_d 는 짝이온이고;

Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티 또는 이의 보호된 형태이고, 분석물 분자, 표적 지향 모이어티, 고형 지지체 또는 상보적인 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있고;

L' 는, 각각의 발생시 독립적으로, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체 잔기에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 화학식 II의 추가의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

m은, 각각의 발생시 독립적으로, 0 이상의 정수이며, 단, 하나 이상의 m의 발생은 1 이상의 정수이고;

n은 1 이상의 정수이다.

청구항 72

제71항에 있어서, G가 각각의 발생시 독립적으로, 알데하이드, 옥심, 하이드라존, 알킨, 아민, 아지드, 아실아지드, 아실할라이드, 니트릴, 니트론, 설프하이드릴, 디설파이드, 설포닐 할라이드, 이소티오시아네이트, 이미도에스테르, 활성화 에스테르, 케톤, α, β -불포화 카보닐, 알켄, 말레이미드, α -할로이미드, 에폭사이드, 아지리딘, 테트라진, 테트라졸, 포스핀, 비오틴 또는 티이관 관능성 그룹을 포함하는, 화합물.

청구항 73

제71항에 있어서, G가 각각의 발생시 독립적으로, 알킨 또는 아지드 그룹을 포함하는, 화합물.

청구항 74

제71항에 있어서, G가 각각의 발생시 독립적으로, 상보적인 반응성 그룹과 반응시, 알켄, 에스테르, 아미드, 티오에스테르, 디설파이드, 카보사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 그룹을 포함하는 관능성 그룹을 형성할 수 있는 반응성 그룹을 포함하는, 화합물.

청구항 75

제74항에 있어서, 상기 헤테로아릴이 트리아졸릴인, 화합물.

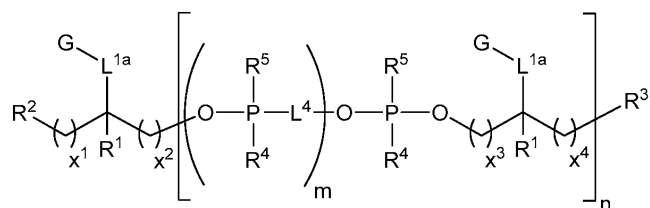
청구항 76

제71항에 있어서, L^2 및 L^3 이 각각의 발생시 독립적으로, C_1-C_6 알킬렌, C_2-C_6 알케닐렌 또는 C_2-C_6 알키닐렌인, 화합물.

청구항 77

제71항에 있어서, 상기 화합물이 다음 구조의 화학식 IIA를 갖는, 화합물.

[화학식 IIA]



상기 화학식 IIA에서,

x^1 , x^2 , x^3 및 x^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 0 내지 6의 정수이다.

청구항 78

제71항에 있어서, 각각의 L^{1a} 가 부재하는, 화합물.

청구항 79

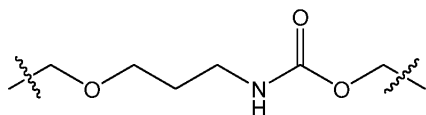
제71항에 있어서, 각각의 L^{1a} 가 존재하는, 화합물.

청구항 80

제79항에 있어서, L^{1a} 가 각각의 발생시 독립적으로, 헤테로알킬렌인, 화합물.

청구항 81

제80항에 있어서, L^{1a} 가 다음 구조식을 갖는, 화합물:



청구항 82

제81항에 있어서, G가 각각의 발생시 독립적으로, $\text{---}\equiv$ 또는 ---N_3 인, 화합물.

청구항 83

제77항에 있어서, x^1 , x^2 , x^3 또는 x^4 중 적어도 하나의 발생은 1인, 화합물.

청구항 84

제77항에 있어서, x^1 , x^2 , x^3 및 x^4 가 각각의 발생시 각각 1인, 화합물.

청구항 85

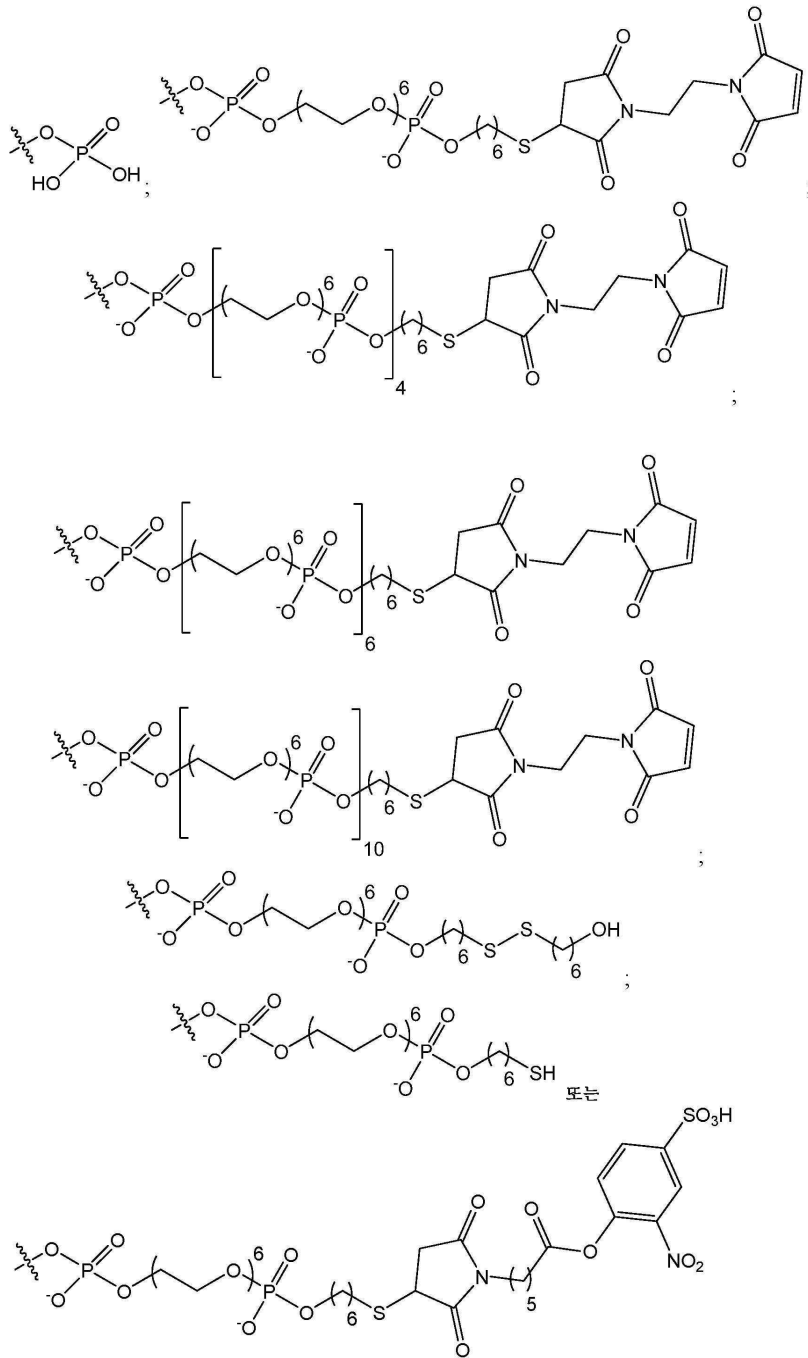
제71항에 있어서, L^4 가 제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 화합물.

청구항 86

제71항에 있어서, R^4 가 각각의 발생시 독립적으로, OH, O^- 또는 OR_d 인, 화합물.

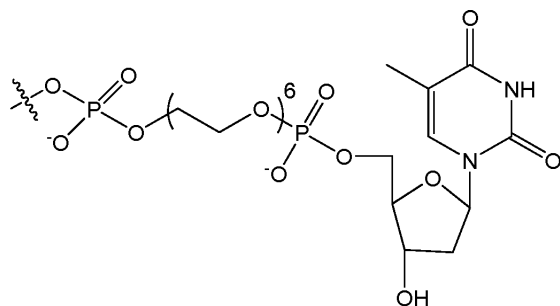
청구항 87

제91항에 있어서, R^2 또는 R^3 이 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 화합물:



청구항 98

제91항에 있어서, R^2 또는 R^3 이 다음 구조식을 갖는, 화합물:



청구항 99

제71항에 있어서, Q가 친핵성 반응성 그룹, 친전자성 반응성 그룹 또는 부가환화 반응성 그룹을 포함하는, 화합물.

청구항 100

제99항에 있어서, Q가 설포하이드릴, 디설파이드, 활성화 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨, 알켄, 디엔, 디에노필, 산 할라이드, 설포닐 할라이드, 포스핀, α -할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이미드 관능성 그룹을 포함하는, 화합물.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 활성화 에스테르가 N-석신이미드 에스테르, 이미도에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르인, 화합물.

청구항 102

제100항에 있어서, 상기 알킨이 알킬 아지드 또는 아실 아지드인, 화합물.

청구항 103

제71항에 있어서, Q가 표 1로부터 선택되는 모이어티인, 화합물.

청구항 104

제71항에 있어서, R^2 또는 R^3 중 하나가 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 또는 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인, 화합물.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 분석물 분자가 핵산, 아미노산 또는 이들의 중합체인, 화합물.

청구항 106

제104항에 있어서, 상기 분석물 분자가 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앵타머 또는 프리온인, 화합물.

청구항 107

제104항에 있어서, 상기 표적 지향 모이어티가 항체 또는 세포 표면 수용체 길항제인, 화합물.

청구항 108

제104항에 있어서, 상기 고형 지지체가 중합체성 비드 또는 비중합체성 비드인, 화합물.

청구항 109

제71항에 있어서, m 이 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 10의 정수인, 화합물.

청구항 110

제71항에 있어서, m 이 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 5의 정수인, 화합물.

청구항 111

제71항에 있어서, n 이 1 내지 100의 정수인, 화합물.

청구항 112

제71항에 있어서, n 이 1 내지 10의 정수인, 화합물.

청구항 113

표 3으로부터 선택되는 화합물.

청구항 114

분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티를 표지화(labeling)하는 방법으로서,

(a) R^2 또는 R^3 이 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 제71항의 화합물을, 상기 분석물 분자 또는 상기 표적 지향 모이어티와 혼합하는 단계;

(b) 상기 화합물과 상기 분석물 분자 또는 상기 표적 지향 모이어티의 접합물을 형성하는 단계; 및

(c) 상기 접합물을 화학식 $M-L^{1b}-G'$ (여기서, M은 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 1의 공액도를 포함하는 모이어티이고; L^{1b} 는 임의의 알킬렌, 헤테로알킬렌 또는 헤테로 원자성 링커이고; G' 는 G에 대해 상보적인 반응성 그룹이다)의 화합물과 반응시켜, 적어도 하나의 G와 적어도 하나의 G' 의 반응에 의해 하나 이상의 공유 결합을 형성하는 단계를 포함하는, 분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티를 표지화하는 방법.

청구항 115

분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티를 표지화하는 방법으로서,

(a) R^2 또는 R^3 이 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 제71항의 화합물을, 화학식 $M-L^{1b}-G'$ (여기서, M은 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 1의 공액도를 포함하는 모이어티이고; L^{1b} 는 임의의 알킬렌, 헤테로알킬렌 또는 헤테로 원자성 링커이고; G' 는 G에 대해 상보적인 반응성 그룹이다)의 화합물과 혼합하여, G와 G' 의 반응에 의해 하나 이상의 공유 결합을 형성하는 단계; 및

(b) 단계 (a)의 생성물을 상기 분석물 분자 또는 상기 표적 지향 모이어티와 반응시켜, 단계 (a)의 생성물과 상기 분석물 분자 또는 상기 표적 지향 모이어티의 접합물을 형성하는 단계를 포함하는, 분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티를 표지화하는 방법.

청구항 116

제1항에 기재된 화합물의 제조방법으로서, 제71항의 화합물을 화학식 $M-L^{1b}-G'$ (여기서, M은 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 1의 공액도를 포함하는 모이어티이고; L^{1b} 는 임의의 알킬렌, 헤테로알킬렌 또는 헤테로 원자성 링커이고; G' 는 G에 대해 상보적인 반응성 그룹이다)의 화합물과 혼합하여, G와 G' 의 반응에 의해 하나 이상의 공유 결합을 형성하는 단계를 포함하는, 제1항에 기재된 화합물의 제조방법.

청구항 117

Y 개의 형광 모이어티들인 M을 포함하는 형광 화합물로서, 상기 형광 화합물은 소정 파장의 자외선으로 여기

(excitation)될 때, 상기와 동일한 파장의 자외선으로 여기될 때의 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y배의 85%보다 큰 피크 형광 방출을 가지며, 여기서, Y는 2 이상의 정수인, 형광 화합물.

청구항 118

제117항에 있어서, 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y배의 90%보다 큰 피크 형광 방출을 갖는, 형광 화합물.

청구항 119

제117항에 있어서, 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y배의 95%보다 큰 피크 형광 방출을 갖는, 형광 화합물.

청구항 120

제117항에 있어서, 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y배의 97%보다 큰 피크 형광 방출을 갖는, 형광 화합물.

청구항 121

제117항에 있어서, 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y배의 99%보다 큰 피크 형광 방출을 갖는, 형광 화합물.

청구항 122

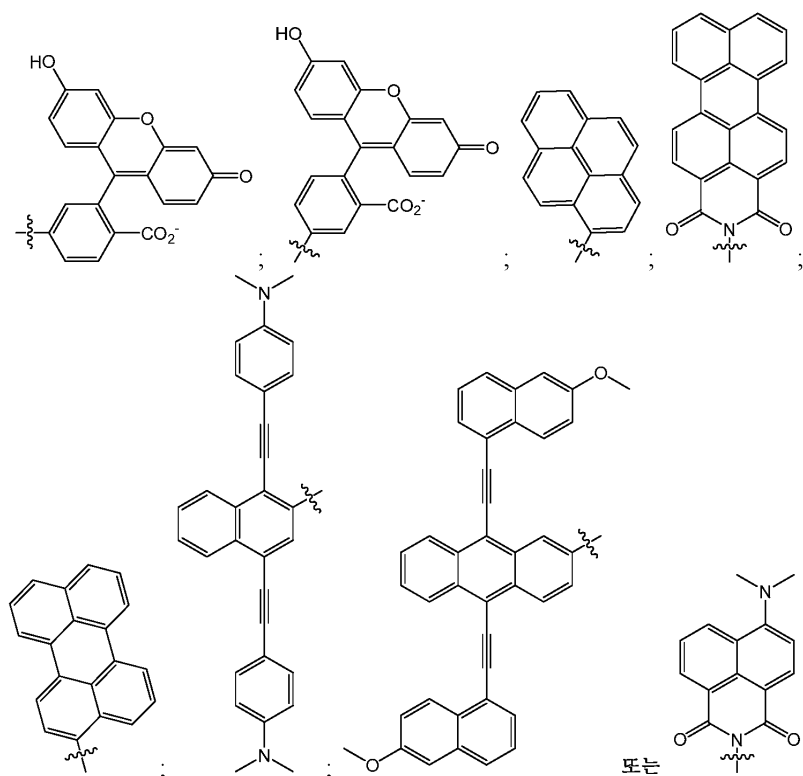
제117항에 있어서, Y가 2 내지 100의 정수인, 형광 화합물.

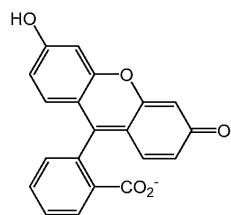
청구항 123

제117항에 있어서, Y가 2 내지 10의 정수인, 형광 화합물.

청구항 124

제117항에 있어서, 상기 M 모이어티가 독립적으로, 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 형광 화합물:





을 갖는, 형광 화합물.

청구항 127

제117항에 있어서, 상기 피크 형광 방출이 약 500 내지 약 550nm 범위의 파장의 피크 형광 방출인, 형광 화합물.

청구항 128

제117항에 있어서, 상기 형광 화합물이 적어도 1개의 에틸렌 옥사이드 모이어티를 포함하는, 형광 화합물.

청구항 129

제117항의 형광 화합물 및 분석물을 포함하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로, 강성 스페이싱(spacing) 그룹을 갖는 이량체성 또는 중합체성 형광 또는 유색 염료, 및 이들의 제조방법 및 다양한 분석 방법에서의 용로에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 형광 및/또는 유색 염료는 매우 민감한 검출 시약이 바람직한 적용에 대하여 특히 적합한 것으로 알려져 있다. 샘플의 특정 성분 또는 요소를 우선적으로 표시할 수 있는 염료는, 연구원이 특정 성분 또는 요소의 존재, 양 및/또는 위치를 측정할 수 있게 한다. 또한, 특정 시스템은 다양한 환경에서의 이들의 공간적 및 시간적 분포와 관련하여 모니터링할 수 있다.

[0003] 형광법 및 비색법은 화학 및 생물학에서 매우 광범위하다. 이러한 방법은 생체 분자의 존재, 구조, 거리, 방향, 복합화 및/또는 위치에 대한 유용한 정보를 제공한다. 또한, 시간 분해 방법이 역학 및 동역학 측정에 점점 더 많이 사용되고 있다. 그 결과, 핵산 및 단백질과 같은 생체 분자의 형광 또는 색상 표시화(labeling)를 위한 많은 전략이 개발되어 왔다. 생체 분자의 분석은 통상적으로 수성 환경에서 이루어지기 때문에, 수용성 염료의 개발과 사용에 초점을 맞춰왔다.

[0004] 이러한 염료의 사용은 신호대 잡음비를 증가시키고 다른 관련 이익을 제공하기 때문에, 높은 형광 또는 유색 염료가 바람직하다. 따라서, 공지된 형광 및/또는 착색 모이어티(moiety)로부터의 신호를 증가시키려는 시도가 있어 왔다. 예를 들어, 둘 이상의 형광 및/또는 유색 모이어티를 포함하는 이량체성 및 중합체성 화합물은, 이러한 화합물이 보다 밝은 염료를 생성할 것으로 예상되어 제조되어 왔다. 그러나, 분자 내 형광 켄칭의 결과로서, 공지된 이량체성 및 중합체성 염료는 원하는 명도의 증가를 달성하지 못했다.

[0005] 따라서, 증가된 몰 명도(molar brightness)를 갖는 수용성 염료에 대한 당업계의 요구가 존재한다. 이상적으로는, 이러한 염료 및 바이오마커는 강하게 착색되거나 형광이어야 하며, 다양한 색상 및 형광 파장으로 이용가능해야 한다. 본 발명은, 이러한 요구를 충족시키고 추가의 관련된 이점을 제공한다.

발명의 내용

[0006] 요약하면, 본 발명의 양태들은 일반적으로, 수용성, 형광성 및/또는 유색 염료 및/또는 생체 분자와 같은 분석물 분자뿐만 아니라 그의 제조를 위한 시약을 시각적으로 검출할 수 있는 프로브(probe)로서 유용한 화합물에 관한 것이다. 상기 염료를 사용하여 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법도 개시된다.

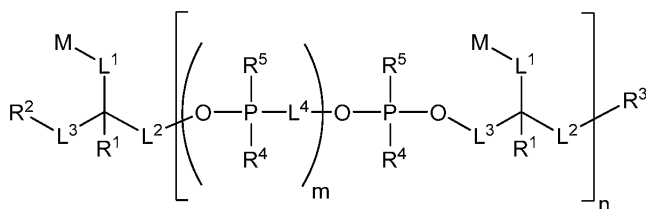
[0007] 본 발명에 개시된 염료의 양태들은 링커("L")에 의해 공유 결합에 의해 링크된 두 개 이상의 형광 및/또는 유색 모이어티를 포함한다. 이량체성 및/또는 중합체성 염료에 대한 이전 보고와는 대조적으로, 본 발명의 염료

는 상응하는 단량체성 염료 화합물보다 현저히 더 밝다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 상기 링커 모이어티는 형광 및/또는 유색 모이어티들 사이에 충분한 공간적 분리를 제공하여, 분자내 형광 켄칭이 감소되고/감소되거나 제거되는 것으로 여겨진다.

[0008] 본 발명의 양태들의 수용성, 형광 또는 유색 염료는 강한 유색 및/또는 형광이며, 육안 검사 또는 다른 수단에 의해 용이하게 관찰될 수 있다. 일부 양태에서, 본 발명의 화합물들은 사전 조명(illumination) 또는 화학적 또는 효소적 활성화 없이 관찰될 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 염료의 적절한 선택에 의해, 다양한 색의 시각적으로 검출 가능한 분석물 분자가 얻어질 수 있다.

[0009] 일양태에서, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 입체 이성질체, 염, 또는 토토머가 제공된다.

[0010] [화학식 I]



[0011]

[0012] 상기 화학식 I에서,

[0013] R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , M, m 및 n은 본원에 정의된 바와 같다.

[0014] 화학식 I의 구조를 갖는 화합물은 다양한 분석 방법에서 형광 및/또는 유색 염료로서의 용도를 포함하여 다수의 분야에서 유용성이 있다.

[0015] 또 다른 양태에서, 샘플의 염색 방법이 제공되며, 상기 방법은 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을, 상기 샘플이 적절한 파장으로 조명될 때 광학 반응을 일으키기에 충분한 양으로, 샘플에 가하는 단계를 포함한다.

[0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은,

[0017] (a) 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 제공하는 단계; 및

[0018] (b) 상기 화합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법을 제공한다.

[0019] 다른 개시된 방법은,

[0020] (a) 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 1개 이상의 생체 분자와 혼합하는 단계; 및

[0021] (b) 상기 화합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 생체 분자를 시각적으로 검출하는 방법을 포함한다.

[0022] 다른 방법은,

[0023] (a) R^2 또는 R^3 이 상기 분석물에 대한 특이성을 갖는 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커를 포함하는, 상기 개시된 화합물을 제공하는 단계;

[0024] (b) 상기 화합물과 상기 분석물을 혼합하여, 상기 표적 지향 모이어티와 상기 분석물을 회합시키는 단계; 및

[0025] (c) 상기 화합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 분석물을 시각적으로 검출하는 방법을 제공한다.

[0026] 다른 양태는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물 및 생체 분자와 같은 1개 이상의 분석물 분자를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 1개 이상의 생체 분자를 검출하기 위한 분석 방법에서의 이러한 조성물의 용도가 제공된다.

[0027] 일부 다른 상이한 양태에서는 화학식 II의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 입체 이성질체, 염, 또는 토토머가 제공된다.

광도 데이터이다.

도 3은, 50nM 및 pH 9에서의, 트리에틸렌 글리콜 스페이서 및 비교 화합물을 포함하는 대표적인 화합물에 대한 형광 방출 스펙트럼이다.

도 4는, 50nM 및 pH 9에서의, 헥사에틸렌 글리콜 스페이서 및 비교 화합물을 포함하는 대표적인 화합물에 대한 형광 방출 스펙트럼을 도시한다.

도 5는, 1개의 플루오레세인 모이어티를 갖는 비교 화합물과 비교한, 4개의 헥사에틸렌 글리콜 스페이서 및 2개 또는 3개의 플루오레세인 모이어티를 포함하는 대표 화합물에 대한 5 μ m에서의 UV 흡광도 데이터이다.

도 6은, 단일 플루오레세인 모이어티를 갖는 비교 화합물과 비교한, 4개의 헥사에틸렌 글리콜 스페이서 및 2개 또는 3개의 플루오레세인 모이어티를 포함하는 대표적인 화합물에 대한 5 μ m에서의 형광 방출 데이터의 그래프이다.

도 7은 다양한 m 값을 갖는 예시 화합물에 대한 비교 형광 방출 반응을 도시한다.

도 8은, 화합물 A에 대하여, m이 1, 2 또는 3 인 "HEG" 화합물에 대한 형광 방출을 비교하는 데이터를 제공한다.

도 9는, 화합물 I-32, 화합물 I-46 및 화합물 B에 대한 UV 흡광도 데이터를 제공한다.

도 10은 PAGE로 분석한 화합물 I-42의 삼량체화 반응의 결과를 도시한다.

도 11은, 죽거나 괴사된 세포 개체군에서 일곱 가지 화합물의 형광 신호를 비교하는 데이터를 제공한다.

도 12는, I-51의 항체 접합물 대 화합물 G의 항체 접합물의 형광 강도를 도시한다.

도 13은, I-51 접합 및 화합물 G 참조 항체의 비교를 도시한다.

도 14는, UCHT1-I-51, UCHT1-BB515 및 UCHT1-FITC의 비교를 도시한다.

도 15는, MEF 표준 곡선에 대한 CD3의 발현 수준을 도시한다.

도 16은, UCHT1-I-16 분획 대 FITC의 비교를 도시한다.

도 17은, UCHT1-I-16 분획 대 I-56 접합물의 비교를 도시한다.

도 18은, UCHT1-I-51 유사 유사체인 UCHT1 I-16(10x)과, UCHT1 I-56(10x) 및 UCHT1 I-53(6x)과의 비교를 도시한다.

도 19는, UCHT1-I-51 유사 유사체인 UCHT1 I-16과 UCHT1 I-56(10x) 및 UCHT1 I-53(6x)을 비교하는 데이터를 제공한다.

도 20은, UCHT1 I-16 및 UCHT1 I-49 접합물 사이의 등가성을 입증하기 위한 접합의 시험시 제조된 데이터에 대해 실시된 회귀 분석 결과를 도시한다.

도 21a는, 회귀 분석을 사용하여 결정된 I-16과 I-45 사이의 상관 관계를 도시한다. 도 21b는, 적정 곡선 오버레이를 나타내고 참조 문헌과 비교한다. 도 21c는, 화합물 D와 I-45를 비교하는 백그라운드 FL 및 세포 형태를 보여주는 예시적인 정성적 데이터를 도시한다.

도 22는, FL1-A 채널에서 검출된 화합물 방출의 친화력 곡선을 히스토그램으로서 도시한다.

도 23a는, UCHT1-I-21B, UCHT1-I-16 및 참조 물질인 UCHT1-FITC의 비특이적 결합에 대한 오프 타겟(off target)의 형광 강도의 비교를 도시하며, 도 23b는, 지원 데이터를 나타낸다.

도 24는, 상관성 및 상대적 친화성을 검토하기 위해 데이터에 적용된 회귀 분석 결과를 나타낸다.

도 25는, UCHT1-I-21B, UCHT1-I-51 및 UCHT1-FITC에 대한 신호 대 잡음 데이터를 도시한다.

도 26a 및 26b는, PBMC를 사용하여 플라즈마 간접 연구에서 UCHT1 화합물 G 및 UCHT1 I-51을 비교하는 데이터를 제공한다. 도 26a는, 0% 글리신의 첨가로 생성된 데이터를 도시하고, 도 26b는 2.5% 글리신의 첨가로 생성된 데이터를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 다음 설명에서, 본 발명의 다양한 양태들의 완전한 이해를 제공하기 위해 특정의 특정 세부 사항들이 설명된다. 그러나, 당업자는 본 발명이 이러한 상세 없이 실시될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0045] 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 본원 명세서 및 청구범위에 걸쳐 용어 "포함한다" 및 이의 변형, 예를 들어 "포함한다" 및 "포함하는"은 개방적이고 포괄적인 의미로, 즉, "포함하지만, 이들로 제한되지는 않는"으로 간주되어야 한다.
- [0046] 본원 명세서에 걸쳐 "일양태" 또는 "양태"에 대한 언급은, 상기 양태와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 양태에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본원 명세서에 걸쳐 다양한 곳에서의 어구 "일양태에서" 또는 "양태에서"의 등장은, 반드시 동일한 양태를 언급하는 것은 아니다. 또한, 특정 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 양태에서, 임의의 적절한 방식으로 결합될 수 있다.
- [0047] "아미노"는 $-NH_2$ 그룹을 나타낸다.
- [0048] "카복시"는 $-CO_2H$ 그룹을 나타낸다.
- [0049] "시아노"는 $-CN$ 그룹을 나타낸다.
- [0050] "포르밀"은 $-C(=O)H$ 그룹을 나타낸다.
- [0051] "하이드록시" 또는 "하이드록실"은 $-OH$ 그룹을 나타낸다.
- [0052] "이미노"는 $=NH$ 그룹을 나타낸다.
- [0053] "니트로"는 $-NO_2$ 그룹을 나타낸다.
- [0054] "옥소"는 $=O$ 치환체 그룹을 나타낸다.
- [0055] "설프하이드릴"은 $-SH$ 그룹을 나타낸다.
- [0056] "티옥소"는 $=S$ 그룹을 나타낸다.
- [0057] "알킬"은, 탄소 및 수소 원자만으로 구성되고, 불포화를 포함하지 않고, 탄소수 1 내지 12(C_1-C_{12} 알킬), 탄소수 1 내지 8(C_1-C_8 알킬) 또는 탄소수 1 내지 6(C_1-C_6 알킬)이고, 단일 결합에 의해 분자의 나머지 부분에 부착된 선형 또는 분지형 탄화수소쇄 그룹을, 예를 들어, 메틸, 에틸, *n*-프로필, 1-메틸에틸(이소-프로필), *n*-부틸, *n*-펜틸, 1,1-디메틸에틸(*t*-부틸), 3-메틸헥실, 2-메틸헥실 등을 나타낸다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 알킬 그룹은 임의로 치환된다.
- [0058] "알킬렌" 또는 "알킬렌쇄"는, 분자의 나머지 부분을 라디칼 그룹에 링크시키고, 탄소 및 수소만으로 이루어지고, 불포화를 포함하지 않고, 탄소수 1 내지 12의 선형 또는 분지형 2가 탄화수소쇄, 예를 들어 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, *n*-부틸렌, 에테닐렌, 프로페닐렌, *n*-부테닐렌, 프로피닐렌, *n*-부티닐렌 등을 나타낸다. 상기 알킬렌쇄는 단일 결합을 통해 분자의 나머지 부분에, 그리고 단일 결합을 통해 라디칼 그룹에 부착된다. 분자의 나머지 부분에 대한 그리고 라디칼 그룹에 대한 알킬렌쇄에 대한 부착점은 상기쇄 내의 1개의 탄소 또는 임의의 2개의 탄소를 통할 수 있다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 알킬렌은 임의로 치환된다.
- [0059] "알케닐렌" 또는 "알케닐렌쇄"는, 분자의 나머지 부분을 라디칼 그룹에 링크시키고, 탄소 및 수소만으로 이루어지고, 1개 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 탄소수 1 내지 12의 선형 또는 분지형 2가 탄화수소쇄, 예를 들어, 에테닐렌, 프로페닐렌, *n*-부테닐렌 등을 나타낸다. 상기 알케닐렌쇄는 단일 결합을 통해 분자의 나머지 부분에 그리고 이중 결합 또는 단일 결합을 통해 라디칼 결합에 부착된다. 분자의 나머지 부분 및 라디칼 그룹에 대한 상기 알킬렌쇄에 대한 부착점은, 상기쇄 내의 1개의 탄소 또는 임의의 2개의 탄소를 통할 수 있다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 알케닐렌은 임의로 치환된다.
- [0060] "알키닐렌" 또는 "알키닐렌쇄"는, 분자의 나머지 부분을 라디칼 그룹에 링크시키고, 탄소 및 수소만으로 이루어지고, 1개 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 탄소수 2 내지 12의 선형 또는 분지형 2가 탄화수소쇄, 예를 들어, 에테닐렌, 프로페닐렌, *n*-부테닐렌 등을 나타낸다. 상기 알키닐렌쇄 단일 결합을 통해 분자의 나머지 부분에, 그리고 이중 결합 또는 단일 결합을 통해 라디칼 결합에 부착된다. 분자의 나머지 부분 및 라디칼 그룹에 대한 상기 알키닐렌쇄에 대한 부착점은, 상기쇄 내의 1개의 탄소 또는 임의의 2개의 탄소를 통할 수 있다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 알키닐렌은 임의로 치환된다.

[0061] "알킬에테르"는, 적어도 1개의 탄소-탄소 결합은 탄소-산소 결합으로 대체된, 상기 정의된 바와 같은 임의의 알킬 그룹을 나타낸다. 상기 탄소-산소 결합은 (알콕시 그룹에서와 같이) 말단 상에 있을 수 있거나 또는 상기 탄소 산소 결합이 내부에 존재할 수 있다(즉, C-O-C). 알킬에테르는 적어도 1개의 탄소 산소 결합을 포함하지만, 1개 이상의 탄소 산소 결합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)은 알킬에테르의 의미 내에 포함된다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 알킬에테르 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들어, 일부 양태에서, 알킬에테르는 알콜 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 로 치환되며, 여기서, 각각의 R_a , R_b 및 R_c 는 화학식 I에 대하여 정의된 바와 같다.

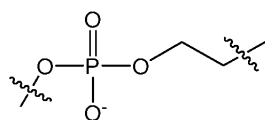
[0062] "알콕시"는, R_a 가 탄소수 1 내지 12의 상기 정의된 바와 같은 알킬 그룹인 화학식 $-OR_a$ 의 그룹을 나타낸다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 알콕시 그룹은 임의로 치환된다.

[0063] "알콕시알킬에테르"는, R_a 가 탄소수 1 내지 12의 상기 정의된 바와 같은 알킬렌 그룹이고, R_b 가 본원에 정의된 바와 같은 알킬에테르 그룹인 화학식 $-OR_aR_b$ 의 그룹을 나타낸다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 알콕시알킬에테르 그룹은 임의로, 예를 들어 알콜 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 로 치환되며, 여기서, 각각의 R_a , R_b 및 R_c 는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대하여 정의된 바와 같다.

[0064] "헤테로알킬"은, 상기 정의된 바와 같이, 알킬 그룹 내에 또는 상기 알킬 그룹의 말단에 적어도 1개의 헤테로 원자(예를 들어, N, O, P 또는 S)를 포함하는 알킬 그룹을 나타낸다. 일부 양태에서, 상기 헤테로 원자는 상기 알킬 그룹(즉, 상기 헤테로알킬이 적어도 1개의 탄소-[헤테로 원자]_x-탄소 결합을 포함하며, 여기서, x는 1, 2 또는 3이다) 내에 존재한다. 다른 양태에서, 상기 헤테로 원자는 알킬 그룹의 말단에 존재하며, 따라서 분자(예를 들어, M1-H-A(여기서, M1은 상기 분자의 일부이고, H는 헤테로 원자이고, A는 알킬 그룹이다))의 나머지 부분에 알킬 그룹을 연결하는(join) 역할을 한다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 헤테로알킬 그룹은 임의로 치환된다. 예시적인 헤테로알킬 그룹은, 임의로 인-산소 결합, 예를 들어 포스포디에스테르 결합을 포함하는 에틸렌 옥사이드(예를 들어, 폴리에틸렌 옥사이드)를 포함한다.

[0065] "헤테로알콕시"는 R_a 가 상기 정의된 바와 같이 탄소수 1 내지 12의 헤테로알킬 그룹인 화학식 OR_a 의 그룹을 나타낸다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 헤테로알콕시 그룹은 임의로 치환된다.

[0066] "헤테로알킬렌"은 상기 정의된 바와 같이 알킬렌쇄 내에 또는 상기 알킬렌쇄의 말단에 적어도 1개의 헤테로 원자(예를 들어, N, O, P 또는 S)를 포함하는 알킬렌 그룹을 나타낸다. 일부 양태에서, 상기 헤테로 원자는 상기 알킬렌쇄 내에 존재한다(즉, 상기 헤테로알킬렌은 적어도 1개의 탄소-[헤테로 원자]-탄소 결합을 포함하며, 여기서 x는 1, 2 또는 3이다). 다른 양태에서, 상기 헤테로 원자는 상기 알킬렌의 말단에 존재하고, 따라서 상기 분자의 나머지 부분에 상기 알킬렌을 연결하는 역할을 한다(예를 들어, M1-H-A-M2, 여기서, M1 및 M2는 분자의 일부이고, H는 헤테로 원자이고, A는 알킬렌이다). 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 헤테로알킬렌 그룹은 임의로 치환된다. 예시적인 헤테로알킬렌 그룹은 에틸렌 옥사이드(예를 들어, 폴리에틸렌 옥사이드)를 포함하며, "C" 링킹 그룹은 다음과 같이 예시된다:



"C 링커"

[0067]

[0068] 상기 C-링커의 다량체는 헤테로알킬렌 링커의 다양한 양태에 포함된다.

[0069] "헤테로알케닐렌"은 상기 정의된 바와 같이 적어도 1개의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 헤테로알킬렌이다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 헤테로알케닐렌 그룹은 임의로 치환된다.

[0070] "헤테로알키닐렌"은 적어도 1개의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 헤테로알킬렌이다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 헤테로알키닐렌 그룹은 임의로 치환된다.

[0071] "헤테로 원자성 링커"에 대한 "헤테로 원자성"은 1개 이상의 헤테로 원자로 구성되는 링커 그룹을 나타낸다. 예시적인 헤테로 원자성 링커는 O, N, P 및 S로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 단일 원자, 및 다수의 헤테로 원자 예를 들어 화학식 $-P(O^-)(=O)O-$ 또는 $-OP(O^-)(=O)O-$ 를 갖는 링커 및 다량체 및 이들의 조합을 포함한다.

- [0072] "포스페이트"는 $-OP(=O)(R_a)R_b$ 그룹(여기서, R_a 는 OH , O^- 또는 OR_c 이고, R_b 는 OH , O^- , OR_c 이고 R_c 는 짝이온(예를 들어, Na^+ 등)이다), 티오포스페이트 그룹 또는 추가의 포스페이트 그룹을 나타낸다.
- [0073] "포스포알킬"은 $-OP(=O)(R_a)R_b$ 그룹(여기서, R_a 는 OH , O^- 또는 OR_c 이고, R_b 는 $-O$ 알킬이고, R_c 는 짝이온(예를 들어, Na^+ 등)이다)을 나타낸다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 포스포알킬 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들어, 특정 양태에서, 상기 포스포알킬 그룹의 $-O$ 알킬 모이어티는 하이드록실, 아미노, 설프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스포알킬에테르 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, 중 하나 이상으로 임의로 치환되며, 여기서, 각각의 R_a , R_b 및 R_c 는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대하여 정의된 바와 같다.
- [0074] "포스포알킬에테르"는 $-OP(=O)(R_a)R_b$ 그룹(여기서, R_a 는 OH , O^- 또는 OR_c 이고, R_b 는 $-O$ 알킬에테르이고, R_c 는 짝이온(예를 들어, Na^+ 등)이다)을 나타낸다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 포스포알킬에테르 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들어, 특정 양태에서, 포스포알킬에테르 그룹의 상기 $-O$ 알킬에테르 모이어티는 하이드록실, 아미노, 설프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스포알킬에테르 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 중 하나로 임의로 치환되며, 여기서, 각각의 R_a , R_b 및 R_c 는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대하여 정의된 바와 같다.
- [0075] "티오포스페이트"는, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 그룹(여기서, R_a 는 O 또는 S 이고, R_b 는 OH , O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고, R_c 는 OH , SH , O^- , S^- , OR_d , SR_d , 포스페이트 그룹 또는 추가의 티오포스페이트 그룹이고, R_d 는 짝이온(예를 들어, Na^+ 등)이다)을 나타내며, 단, i) R_a 는 S 이고 ii) R_b 는 S^- 또는 SR_d 이고 iii) R_c 는 SH , S^- 또는 SR_d 이거나 iv) i), ii) 및/또는 iii)의 조합이다.
- [0076] "티오포스포알킬"은, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 그룹(여기서, R_a 는 O 또는 S 이고, R_b 는 OH , O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고, R_c 는 $-O$ 알킬이고, R_d 는 짝이온(예를 들어, Na^+ 등)이다)을 나타내며, 단, i) R_a 는 S 이고 ii) R_b 는 S^- 또는 SR_d 이거나 iii) R_a 는 S 이고 R_b 는 S^- 또는 SR_d 이다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 티오포스포알킬 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들어, 특정 양태에서, 티오포스포알킬 그룹의 상기 $-O$ 알킬 모이어티는 하이드록실, 아미노, 설프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스포알킬에테르 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 중 하나로 임의로 치환되며, 여기서, 각각의 R_a , R_b 및 R_c 는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대하여 정의된 바와 같다.
- [0077] "티오포스포알킬에테르"는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 그룹(여기서, R_a 는 O 또는 S 이고, R_b 는 OH , O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고, R_c 는 $-O$ 알킬에테르이고, R_d 는 짝이온(예를 들어, Na^+ 등)이다)을 나타내며, 단, i) R_a 는 S 이고 ii) R_b 는 S^- 또는 SR_d 이거나 iii) R_a 는 S 이고 R_b 는 S^- 또는 SR_d 이다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 티오포스포알킬에테르 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들어, 특정 양태에서, 티오포스포알킬 그룹의 $-O$ 알킬에테르 모이어티는 하이드록실, 아미노, 설프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스포알킬에테르 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 중 하나로 임의로 치환되며, 여기서, 각각의 R_a , R_b 및 R_c 는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대하여 정의된 바와 같다.
- [0078] "카보사이클릭"은 탄소수 3 내지 18의 안정한 3원 내지 18원의 방향족 또는 비방향족 환을 나타낸다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 카보사이클릭 환은 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있으며, 융합되거나 가교된 환 시스템을 포함할 수 있으며, 부분적으로 또는 완전히 포화될 수 있다. 비방향족 카보사이클릭 라디칼은 사이클로알킬을 포함하는 반면, 방향족 카보사이클릭 라디칼은 아릴을 포함한다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 카보사이클릭 그룹은 임의로 치환된다.

- [0079] "사이클로알킬"은 융합되거나 가교된 환 시스템을 포함할 수 있으며, 탄소수 3 내지 15, 바람직하게는 탄소수 3 내지 10이고, 포화되거나 불포화되고 단일 결합에 의해 분자의 나머지 부분에 부착된 안정한 비방향족 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 카보사이클릭 환을 나타낸다. 모노사이클릭 사이클로알킬은 예를 들어, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 및 사이클로옥틸을 포함한다. 폴리사이클릭 사이클로알킬은 예를 들어, 아다만틸, 노르보르닐, 데칼리닐, 7,7-디메틸-바이사이클로-[2.2.1]헵타닐 등을 포함한다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 사이클로알킬 그룹은 임의로 치환된다.
- [0080] "아릴"은 적어도 1개의 카보사이클릭 방향족 환을 포함하는 환 시스템을 나타낸다. 일부 양태에서, 아릴은 탄소수 6 내지 18이다. 상기 아릴 환은 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있으며, 이는 융합되거나 가교된 환 시스템을 포함할 수 있다. 아릴은 아세안트릴렌, 아세나프틸렌, 아세페난트릴렌, 안트라센, 아줄렌, 벤젠, 크리센, 플루오란텐, 플루오렌, *as*-인다센, *s*-인다센, 인단, 인텐, 나프탈렌, 페날렌, 페난트렌, 플레이아덴, 피렌, 및 트리페닐렌으로부터 유도된 아릴을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 아릴 그룹은 임의로 치환된다.
- [0081] "헤테로사이클릭"은, 탄소수 1 내지 12이고 질소, 산소 및 황으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1 내지 6개의 헤테로 원자를 포함하는 안정한 3원 내지 18원의 방향족 또는 비방향족 환을 나타낸다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 상기 헤테로사이클릭 환은 융합되거나 가교된 환 시스템을 포함할 수 있는 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있으며, 상기 헤테로사이클릭 환의 질소, 탄소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있고, 상기 질소 원자는 임의로 4급화될 수 있고, 상기 헤테로사이클릭 환은 부분적으로 또는 완전히 포화될 수 있다. 방향족 헤테로사이클릭 환의 예는 아래 헤테로아릴의 정의에 기재된다(즉, 헤테로사이클릭의 하위세트인 헤테로아릴). 비방향족 헤테로사이클릭 환의 예는, 디옥솔라닐, 티에닐[1,3]디티아닐, 테카하이드로이소퀴놀릴, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 이소티아졸리디닐, 이소옥사졸리디닐, 모르폴리닐, 옥타하이드로인돌릴, 옥타하이드로이소인돌릴, 2-옥소피페라지닐, 2-옥소피페리디닐, 2-옥소피롤리디닐, 옥사졸리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 피라졸리디닐, 피라졸로피리미디닐, 퀴놀리디닐, 티아졸리디닐, 테트라하이드로푸릴, 티옥사닐, 트리티아닐, 트리아지나닐, 테트라하이드로피라닐, 티오모르폴리닐, 티아모르폴리닐, 1-옥소-티오모르폴리닐, 및 1,1-디옥소-티오모르폴리닐을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 헤테로사이클릭 그룹은 임의로 치환된다.
- [0082] "헤테로아릴"은 탄소수 1 내지 13이고, 질소, 산소 및 황으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1 내지 6개의 헤테로 원자, 및 적어도 1개의 방향족 환을 포함하는 5원 내지 14원 환 시스템을 나타낸다. 본 발명의 특정 양태를 목적으로 하여, 상기 헤테로아릴 라디칼은 융합되거나 가교된 환 시스템을 포함할 수 있는 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있고; 상기 헤테로아릴 라디칼의 질소, 탄소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있고; 상기 질소 원자는 임의로 4급화될 수 있다. 예는, 아제피닐, 아크리디닐, 벤즈이미다졸릴, 벤즈티아졸릴, 벤즈인돌릴, 벤조디옥솔릴, 벤조푸라닐, 벤조옥사졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조티아디아졸릴, 벤조[*b*][1,4]디옥세피닐, 1,4-벤조디옥사닐, 벤조나프토프라닐, 벤조옥사졸릴, 벤조디옥솔릴, 벤조디옥시닐, 벤조피라닐, 벤조피라노닐, 벤조푸라닐, 벤조푸라노닐, 벤조티에닐(벤조티오페닐), 벤조트리아졸릴, 벤조[4,6]이미다조[1,2-*a*]피리디닐, 벤조옥사졸리노닐, 벤즈이미다졸티오닐, 카바졸릴, 신놀리닐, 디벤조푸라닐, 디벤조티오페닐, 푸라닐, 푸라노닐, 이소티아졸릴, 이미다졸릴, 인다졸릴, 인돌릴, 인다졸릴, 이소인돌릴, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 이소퀴놀릴, 인돌리지닐, 이소옥사졸릴, 나프티리디닐, 옥사디아졸릴, 2-옥소아제피닐, 옥사졸릴, 옥시라닐, 1-옥시도피리디닐, 1-옥시도피리미디닐, 1-옥시도피라지닐, 1-옥시도피리다지닐, 1-페닐-1*H*-피롤릴, 페나지닐, 페노티아지닐, 페녹사지닐, 프탈라지닐, 프테리디닐, 프테리디노닐, 퓨리닐, 피롤릴, 피라졸릴, 피리디닐, 피리디노닐, 피라지닐, 피리미디닐, 프리리미디노닐, 피리다지닐, 피롤릴, 피리도[2,3-*d*]피리미디노닐, 퀴나졸리닐, 퀴나졸리노닐, 퀴녹살리닐, 퀴녹살리노닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 테트라하이드로퀴놀리닐, 티아졸릴, 티아디아졸릴, 티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-오닐, 티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-오닐, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 트리아지닐, 및 티오페닐(즉, 티에닐)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본원 명세서에서 달리 특별히 언급하지 않는 한, 헤테로아릴 그룹은 임의로 치환된다.
- [0083] "융합된"은, 2개의 환이 1개 이상의 공통 환 원자, 예를 들어 2개의 공통 환 원자를 공유하는 2개 이상의 환을 포함하는 환 시스템을 나타낸다. 상기 융합된 환은 헤테로사이클릭 환 또는 헤테로아릴 환이고, 상기 통상적인 환 원자(들)은 탄소 또는 질소일 수 있다. 융합된 환은 바이사이클릭, 트리사이클릭, 테트라사이클릭 등을 포함한다.
- [0084] 본원에서 사용되는 용어 "치환된"은, 적어도 1개의 수소 원자(예를 들어, 1개, 2개, 3개 또는 전체 수소 원자)

가 예를 들어 비제한적으로 다음과 같은 비수소 원자에 대한 결합으로 치환된 임의의 상기 그룹(예를 들어, 알킬, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 헤테로알킬, 헤테로알콕시, 포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스포알킬, 티오포스포알킬에테르, 카보사이클릭, 사이클로알킬, 아릴, 헤테로사이클릭 및/또는 헤테로아릴)을 의미한다: 할로겐 원자, 예를 들어 F, Cl, Br, 및 I; 그룹, 예를 들어 하이드록실 그룹, 알콕시 그룹, 및 에스테르 그룹의 산소 원자; 그룹, 예를 들어 티올 그룹, 티오알킬 그룹, 설펜 그룹, 설펜올 그룹, 및 설펜사이드 그룹의 황 원자; 그룹, 예를 들어 아민, 아마이드, 알킬아민, 디알킬아민, 아릴아민, 알킬아릴아민, 디아릴아민, N-옥사이드, 이미드, 및 에나민의 질소 원자; 그룹, 예를 들어 트리알킬실릴 그룹, 디알킬아릴실릴 그룹, 알킬디아릴실릴 그룹, 및 트리아릴실릴 그룹의 규소 원자; 및 다양한 다른 그룹의 다른 헤테로 원자. "치환된"은 1개 이상의 수소 원자가 헤테로 원자, 예를 들어 옥소, 카보닐, 카복실, 및 에스테르 그룹의 산소; 및 이민, 옥심, 하이드라존, 및 니트릴과 같은 그룹의 질소에 대한 보다 고차의 결합(예를 들어, 이중 결합 또는 삼중 결합)으로 치환된 임의의 상기 그룹을 의미한다. 예를 들어, "치환된"은 1개 이상의 수소 원자가 $-NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)R_h$, $-NR_gC(=O)NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)OR_h$, $-NR_gSO_2R_h$, $-OC(=O)NR_gR_h$, $-OR_g$, $-SR_g$, $-SOR_g$, $-SO_2R_g$, $-OSO_2R_g$, $-SO_2OR_g$, $=NSO_2R_g$, 및 $-SO_2NR_gR_h$ 로 치환된 임의의 상기 그룹도 포함한다. "치환된"은 1개 이상의 수소 원자가 $-C(=O)R_g$, $-C(=O)OR_g$, $-C(=O)NR_gR_h$, $-CH_2SO_2R_g$, $-CH_2SO_2NR_gR_h$ 로 치환된 임의의 상기 그룹도 의미한다. 상기에서, R_g 및 R_h 는 동일하거나 상이하며, 독립적으로 수소, 알킬, 알콕시, 알킬아미노, 티오알킬, 아릴, 아르알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 할로알킬, 헤테로사이클릴, N-헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴알킬, 헤테로아릴, N-헤테로아릴 및/또는 헤테로아릴알킬이다. "치환된"은 1개 이상의 수소 원자가 아미노, 시아노, 하이드록실, 이민노, 니트로, 옥소, 티옥소, 할로, 알킬, 알콕시, 알킬아미노, 티오알킬, 아릴, 아르알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 할로알킬, 헤테로사이클릴, N-헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴알킬, 헤테로아릴, N-헤테로아릴 및/또는 헤테로아릴알킬 그룹에 대한 결합으로 치환된 임의의 상기 그룹을 추가로 의미한다. 일부 양태에서, 상기 임의의 치환체는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, 여기서, 각각의 R_a , R_b 및 R_c 는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대하여 정의된 바와 같다. 또한, 각각의 상기 치환체는, 상기 치환체들 중 하나 이상으로 임의로 치환될 수도 있다.

[0085] "공액(conjugation)"은 하나의 p-오비탈과 개재된 시그마 결합 맞은 편의 다른 p-오비탈의 중첩을 나타낸다. 공액은 사이클릭 또는 비사이클릭(acyclic) 화합물에서 발생할 수 있다. "공액도(degree of conjugation)"는 1개 이상의 p-오비탈과 개재된 시그마 결합 맞은 편의 다른 p-오비탈의 중첩을 나타낸다. 예를 들어, 1,3-부타디엔은 1의 공액도를 갖는 반면, 벤젠 및 다른 방향족 화합물은 통상적으로 다중의 공액도를 갖는다. 형광 및 유색 화합물은 통상적으로 적어도 1의 공액도를 포함한다.

[0086] "형광"은 특정 주파수의 빛을 흡수하여 상이한 주파수의 광을 방출할 수 있는 분자를 나타낸다. 형광 물질은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0087] "유색(colored)"은 유색 스펙트럼(즉, 적색, 황색, 청색 등) 내의 광을 흡수하는 분자를 나타낸다.

[0088] "링커"는 1개 이상의 원소, 예를 들어 탄소, 산소, 질소, 황, 인 및 이들의 조합의 인접 채로서 분자의 일부를 상기와 동일한 분자의 다른 부분 또는 다른 분자, 모이어티 또는 고형 지지체(예를 들어, 미세입자)에 연결시키는 채를 나타낸다. 링커는 공유 결합 또는 다른 수단, 예를 들어 이온 결합 또는 수소 결합 상호 작용을 통해 분자를 연결할 수 있다.

[0089] 용어 "생체 분자"는 핵산, 탄수화물, 아미노산, 폴리펩타이드, 당단백질, 호르몬, 앵타머 및 이들의 혼합물을 포함하는 임의의 다양한 생물학적 물질을 나타낸다. 보다 구체적으로는, 상기 용어는 비제한적으로 RNA, DNA, 올리고뉴클레오타이드, 개질되거나 유도체화된 뉴클레오타이드, 효소, 수용체, 프리온, 수용체 리간드(호르몬 포함), 항체, 항원 및 독소, 및 박테리아, 바이러스, 혈액 세포 및 조직 세포를 포함할 것을 의도한다. 본 발명의 시각적으로 검출 가능한 생체 분자(예를 들어, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 링크된 생체 분자를 갖는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물)는, 본원에 추가로 개시되는 바와 같이, 임의의 이용 가능한 원자 또는 관능성 그룹, 예를 들어 생체 분자상의 아미노, 하이드록시, 카복실 또는 설프하이드릴 그룹을 통해, 생체 분자를, 상기 생체 분자를 화합물에 부착시킬 수 있는 반응성 그룹을 갖는 화합물과 접촉시킴으로써 제조한다.

[0090] "반응성 그룹"은, 예를 들어 치환, 산화, 환원, 첨가 또는 부가환화(cycloaddition) 반응에 의해, 제2 반응성 그룹(예를 들어, "상보적인 반응성 그룹")과 반응하여, 하나 이상의 공유 결합을 형성할 수 있는 모이어티이다. 예시적인 반응성 그룹은 표 1에 제공되며, 예를 들어, 친핵체, 친전자체, 디엔, 디에노필, 알데하이드, 옥심, 하이드라존, 알킨, 아민, 아지드, 아실아지드, 아실할라이드, 니트릴, 니트론, 설프하이드릴, 디설프아이드, 설펜

닐 할라이드, 이소티오시아네이트, 이미도에스테르, 활성화 에스테르, 케톤, α, β -불포화 카보닐, 알켄, 말레 이미드, α -할로이미드, 에폭사이드, 아지리딘, 테트라진, 테트라졸, 포스핀, 비오틴, 티이관 등을 포함한다.

[0091] 용어 "가시적인" 및 "시각적으로 검출 가능한"은, 사전 조명 또는 화학적 또는 효소적 활성화 없이 육안 검사에 의해 관찰 가능한 물질을 나타내는 것으로 본원에서 사용된다. 이러한 시각적으로 검출 가능한 물질은 약 300 내지 약 900nm 범위의 스펙트럼 영역에서 광을 흡수 및 방출한다. 바람직하게는, 이러한 물질은 바람직하게는 약 $40,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이상, 보다 바람직하게는 약 $50,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이상, 보다 더 바람직하게는 약 $60,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이상, 더욱 바람직하게는 약 $70,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이상, 가장 바람직하게는 약 $80,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이상의 몰 흡광 계수로 강하게 착색된다. 본 발명의 화합물은 육안으로 관찰하여, 또는 흡수 분광 광도계, 투과 광 현미경, 디지털 카메라 및 스캐너를 비제한적으로 포함하는 광학 기반 검출 디바이스의 도움으로 검출될 수 있다. 시각적으로 검출 가능한 물질은 가시 스펙트럼에서 광을 방출하고/방출하거나 흡수하는 물질로 제한되지 않는다. 자외선(UV) 영역(약 10 내지 약 400nm), 적외선(IR) 영역(약 700 내지 약 1mm)에서 광을 방출하고/방출하거나 흡수하는 물질, 및 전자기 스펙트럼의 다른 영역에서 방출하고/방출하거나 흡수하는 물질도 "시각적으로 검출 가능한" 물질의 범위에 포함된다.

[0092] 본 발명의 양태의 목적을 위해, 용어 "광안정성 가시 염료(photostable visible dye)"는, 상기 본원에 정의된 바와 같은, 시각적으로 검출 가능하고, 광에 노출시 상당히 변경되거나 분해되지 않는 화학적 모이어티를 나타낸다. 바람직하게는, 광안정성 가시 염료는 적어도 1시간 동안 광에 노출된 후, 상당한 표백 또는 분해를 나타내지 않는다. 보다 바람직하게는, 상기 가시 염료는 적어도 12시간, 보다 더 바람직하게는 적어도 24시간, 더욱 더 바람직하게는 적어도 1주, 가장 바람직하게는 적어도 1개월 동안 광에 노출 후에도 안정하다. 본 발명의 화합물 및 방법에서 사용하기에 적합한 광안정성 가시 염료의 비제한적 예는, 아조 염료, 티오인디고 염료, 퀴나크리돈 안료, 디옥사진, 프탈로시아닌, 페리논, 디케토피롤로피롤, 퀴노프탈론, 및 트리아릴카보늄을 포함한다.

[0093] 본원에 사용되는 용어 "페릴렌 유도체"는 시각적으로 검출 가능한 임의의 치환된 페릴렌을 포함하는 것으로 의도된다. 그러나, 상기 용어는 페릴렌 자체를 포함하지 않을 것을 의도한다. 용어 "안트라센 유도체", "나프탈렌 유도체" 및 "피렌 유도체"는 유사하게 사용된다. 일부 바람직한 양태에서, 유도체(예를 들어, 페릴렌, 피렌, 안트라센 또는 나프탈렌 유도체)는 페릴렌, 안트라센, 나프탈렌 또는 피렌의 이미드, 비스이미드 또는 하이드라자미드이미드 유도체이다.

[0094] 본 발명의 다양한 양태들의 시각적으로 검출 가능한 분자는, 특정 분석물(예를 들어, 생체 분자)의 존재, 위치 또는 양을 결정할 필요가 있는 생화학적 및 생의학적 적용과 같은 폭넓은 분석 적용에서 유용하다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 생체 분자에 링크된 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 포함하는, 시각적으로 검출 가능한 생체 분자를 포함하는 생물학적 시스템을 제공하는 단계, 및 (b) 상기 생체 분자를 이의 가시적인 성질들에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 생체 분자를 시각적으로 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명의 목적을 위해, 어구 "생체 분자를 이의 가시적인 성질들에 의해 검출하는 것"은, 상기 생체 분자가, 조명 또는 화학적 또는 효소적 활성화 없이도 육안으로, 또는 흡수 분광 광도계, 투과 광 현미경, 디지털 카메라 및 스캐너를 비제한적으로 포함하는 광학 기반 검출 디바이스의 도움으로 관찰됨을 의미한다. 농도계(densitometer)는 존재하는 시각적으로 검출 가능한 생체 분자의 양을 정량하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 2개 샘플 내의 생체 분자들의 상대적 양은 상대 광학 밀도를 측정하여 결정될 수 있다. 생체 분자당 염료 분자의 화학량론이 공지되어 있으며, 염료 분자의 소광 계수가 공지되어 있는 경우라면, 생체 분자의 절대 농도 또한 광학 밀도 측정으로부터 결정될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "생물학적 시스템"은 시각적으로 검출 가능한 생체 분자 이외에 하나 이상의 생체 분자를 포함하는 임의의 용액 또는 혼합물을 나타내기 위해 사용된다. 이러한 생물학적 시스템의 비제한적 예는 세포, 세포 추출물, 조직 샘플, 전기영동 겔, 검정용 혼합물, 및 혼성화 반응 혼합물을 포함한다.

[0095] "고형 지지체"는 분자의 고체상 지지체에 대해 당업계에 공지된 임의의 고형 기질을 나타내며, 예를 들어 "미세 입자"는, 유리 비드, 자성 비드, 중합체성 비드, 비중합체성 비드 등을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는, 본 발명의 화합물에 부착하기에 유용한 다수의 소형 입자 중 임의의 것을 나타낸다. 특정 양태에서, 미세 입자는 폴리스티렌 비드를 포함한다.

[0096] "고형 지지체 잔기(residue)"는, 분자가 고형 지지체로부터 개열될 때 상기 분자에 부착되어 잔류하는 관능성 그룹을 나타낸다. 고형 지지체 잔기는 당업계에 공지되어 있으며, 상기 고형 지지체의 구조에 그리고 상기 분

자를 상기 고품 지지체에 링크시키는 그룹에 기초하여 용이하게 유도될 수 있다.

- [0097] "표적 지향 모이어티"는 분석물 분자와 같은 특정 표적과 선택적으로 결합하거나 회합하는 모이어티이다. "선택적으로" 결합하거나 회합한다는 것은, 표적 지향 모이어티가 다른 표적에 비해 원하는 표적과 우선적으로 회합하거나 결합하는 것을 의미한다. 일부 양태에서, 본원에 개시된 화합물은, 상기 화합물을 관심 분석물(즉, 표적 지향 모이어티의 표적)과 선택적으로 결합시키거나 회합시켜 분석물의 검출을 가능하게 하는 목적을 위한, 표적 지향 모이어티로의 링크지를 포함한다. 예시적인 표적 지향 모이어티는, 항체, 항원, 핵산 서열, 효소, 단백질, 세포 표면 수용체 길항제 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 일부 양태에서, 항체와 같은 표적 지향 모이어티는, 세포 상에 또는 세포 내의 표적 피쳐(target feature), 예를 들어 세포막 또는 다른 세포 구조상의 표적 피쳐에 선택적으로 결합하거나 회합하여, 관심 세포의 검출을 가능하게 한다. 원하는 분석물과 선택적으로 결합하거나 회합하는 소형 분자도 특정 양태에서, 표적 지향 모이어티로 고려된다. 당업자는 다양한 양태에서, 유용할 다른 분석물 및 상응하는 표적 지향 모이어티를 이해할 것이다.
- [0098] "염기쌍 형성 모이어티"는, 수소 결합을 통해 상보적인 헤테로사이클릭 모이어티와 하이브리드화(예를 들어, 왓슨-크릭 염기쌍 형성)될 수 있는 헤테로사이클릭 모이어티를 나타낸다. 염기쌍 형성 모이어티는 천연 및 비천연 염기를 포함한다. 염기쌍 형성 모이어티의 비제한적인 예는 RNA 및 DNA 염기, 예를 들어, 아데노신, 구아노신, 티미딘, 시토신 및 우라실 및 이들의 유사체이다.
- [0099] 본원에 개시된 본 발명의 양태는, 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자로 대체된 하나 이상의 원자를 가짐으로써 동위 원소로 표시된 화학식 I 또는 화학식 II의 모든 화합물도 포함하고자 한다. 개시된 화합물에 혼입될 수 있는 동위 원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 불소, 염소, 및 요오드의 동위원소, 예를 들면, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I , 및 ^{125}I 각각을 포함한다.
- [0100] 화학식 I 또는 화학식 II의 동위 원소로 표시된 화합물은 일반적으로, 당업자에게 공지된 통상적인 기술에 의해 또는 아래에 기재된 것들과 유사한 방법에 의해, 그리고 이전에 사용된 비표지된 시약 대신 적절한 동위 원소로 표시된 시약을 사용하는 하기 실시예에서 제조될 수 있다.
- [0101] "안정한 화합물" 및 "안정한 구조"는 반응 혼합물로부터 유용한 정도의 순도로의 분리, 및 효과적인 치료제로의 제형화를 존속시키기 위해 충분히 견고한 화합물을 나타내고자 한다.
- [0102] "임의의" 또는 "임의로"는, 후속적으로 개시되는 사건 또는 상황이 일어나거나 일어나지 않을 수 있으며, 본 기재는 상기 사건 또는 상황이 일어나는 경우를 그리고 이들이 일어나지 않는 경우를 포함함을 의미한다. 예를 들면, "임의로 치환된 알킬"은 알킬 그룹이 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있고, 본 기재는 치환된 알킬 그룹 및 치환되지 않은 알킬 그룹 둘 다를 포함함을 의미한다.
- [0103] "염"은 산 부가염 및 염기 부가염 둘 다를 포함한다.
- [0104] "산 부가염"은, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등이지만 이들로 제한되지는 않는 무기 산; 및 아세트산, 2,2-디클로로아세트산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산, 아스파르트산, 벤젠설폰산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 캄포르산, 캄포르-10-설폰산, 카프르산, 카프로산, 카프릴산, 탄산, 신남산, 시트르산, 사이클람산, 도데실황산, 에탄-1,2-디설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 포름산, 푸마르산, 갈락타르산, 겐티스산, 글루코헵톤산, 글루콘산, 글루쿠론산, 글루탐산, 글루타르산, 2-옥소-글루타르산, 글리세로인산, 글리콜산, 히푸르산, 이소부티르산, 락트산, 락토비온산, 라우르산, 말레산, 말산, 말론산, 만델산, 메탄설폰산, 점액산, 나프탈렌-1,5-디설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, 1-하이드록시-2-나프토산, 니코틴산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 팔미트산, 파모산, 프로피온산, 피로글루탐산, 피루브산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 세박산, 스테아르산, 석신산, 타르타르산, 티오시안산, *p*-톨루엔설폰산, 트리플루오로아세트산, 운테실렌산 등이지만 이들로 제한되지는 않는 유기 산으로 형성되는 염을 나타낸다.
- [0105] "염기 부가염"은 유리 산에 무기 염기 또는 유기 염기를 첨가하여 제조되는 염을 나타낸다. 무기 염기로부터 유래된 염은, 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄 염 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 유기 염기로부터 유래된 염은, 1급, 2급, 및 3급 아민, 자연 발생 치환된 아민을 포함하는 치환된 아민, 사이클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지, 예를 들면, 암모니아, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 디에탄올아민, 에탄올아민, 데아놀, 2-디메틸아미노에탄올, 2-디에틸아미노에탄올, 디사이클로헥실아민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 하이드라라민, 콜린, 베타인, 베타타민, 벤자민, 에틸렌디아민, 글루코사민, 메틸글루카민, 테오브로민, 트리에탄올아민, 트로메타민, 푸린, 피페라진, 피페리딘, N-에틸피페리딘, 폴리아민 수지 등을 포함하지만, 이들로 제

한되지는 않는다. 특히 바람직한 유기 염기는 이소프로필아민, 디에틸아민, 에탄올아민, 트리메틸아민, 디사이클로헥실아민, 콜린 및 카페인이다.

[0106] 결정화는 본원에 개시된 화합물의 용매화물을 생성시킬 수 있다. 본 발명의 양태들은 개시된 화합물들의 모든 용매화물을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "용매화물"은, 용매의 하나 이상의 분자를 포함하는 본 발명의 화합물의 하나 이상의 분자를 포함하는 집합체를 나타낸다. 용매는 물일 수 있으며, 이때 용매화물은 수화물일 수 있다. 다르게는, 용매는 유기 용매일 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 일수화물, 이수화물, 반수화물(hemihydrate), 세스퀴수화물(sesquihydrate), 삼수화물, 사수화물 등을 포함하는 수화물, 및 이에 상응하는 용매화된 형태로서 존재할 수 있다. 본 발명의 화합물은 진정한 용매화물일 수 있으며, 한편 다른 경우에는 본 발명의 화합물은 외래성 물(adventitious 물) 또는 또 다른 용매만을 보유할 수 있거나, 또는 물과 일부 외래성 용매의 혼합물일 수 있다.

[0107] 본 발명의 화합물(예를 들면, 화학식 I 또는 화학식 II의 구조를 갖는 화합물) 또는 이의 염, 토토머 또는 용매화물의 양태는, 하나 이상의 비대칭 중심을 함유할 수 있으며, 따라서 절대 입체화학 측면에서 (R)- 또는 (S)-로서, 또는 아미노산에 대해서는 (D)- 또는 (L)-로서 정의될 수 있는 거울상 이성질체, 부분 입체 이성질체, 및 다른 입체 이성질체를 야기할 수 있다. 본 발명의 양태들은 모든 이러한 가능한 이성체, 및 이의 라세미 형태 및 광학적으로 순수한 형태를 포함하고자 한다. 광학 활성 (+) 및 (-), (R)- 및 (S)-, 또는 (D)- 및 (L)-이성질체는 키랄 신포(chiral synthon) 또는 키랄 시약을 사용하여 제조되거나, 통상의 기술, 예를 들어, 크로마토그래피 및 분별 결정을 사용하여 분할될 수 있다. 개별 거울상 이성질체들의 제조/단리를 위한 통상의 기술은, 적합한 광학적으로 순수한 전구체로부터의 키랄 합성, 또는 예를 들어, 키랄 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하는 라세미체(또는 염 또는 유도체의 라세미체)의 분할을 포함한다. 본원에 기재된 화합물이 올레핀성 이중 결합 또는 기하학적 비대칭의 다른 중심을 함유하는 경우, 그리고 달리 구체화되지 않는 한, 상기 화합물은 E 및 Z 기하 이성질체 둘 다를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, 모든 토토머 형태 또한 포함되는 것으로 의도된다.

[0108] "입체 이성질체"는 동일한 결합에 의해 결합된 동일한 원자로 이루어지지만 호환가능하지 않은 상이한 3차원 구조를 갖는 화합물을 나타낸다. 본 발명은 다양한 입체 이성질체 및 이들의 혼합물을 고려하며, 분자가 서로의 겹쳐질 수 없는 거울상인 2개의 입체 이성질체를 나타내는 "거울상 이성질체"를 포함한다.

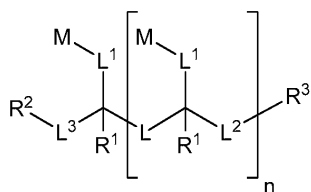
[0109] "토토머"는 분자의 하나의 원자로부터 동일한 분자의 또 다른 원자로의 양성자 이동을 나타낸다. 본 발명은 임의의 상기 화합물의 토토머를 포함한다. 화합물의 다양한 토토머 형태는 당업자에 의해 용이하게 유래할 수 있다.

[0110] 본원에 사용된 화학 명명 프로토콜 및 구조 다이어그램은 ACD/Name 버전 9.07 소프트웨어 프로그램 및/또는 ChemDraw Ultra 버전 11.0 소프트웨어 명명 프로그램(CambridgeSoft)을 사용하는, I.U.P.A.C. 명명법 시스템의 변형 형태이다. 당업자에게 친숙한 일반명 또한 사용된다.

[0111] 상기 주목된 바와 같이, 본 발명의 일양태에서, 다양한 분석 방법에서 형광 및/또는 유색 염료로서 유용한 화합물이 제공된다. 다른 양태에서, 형광 및/또는 유색 염료로서 유용한 화합물을 제조하기 위한 합성 중간체로서 유용한 화합물이 제공된다. 일반적으로, 본 발명의 양태는 형광 및/또는 유색 모이어티의 이량체 및 보다 고도의 중합체에 관한 것이다. 상기 형광 및/또는 유색 모이어티는 링킹 모이어티에 의해 링크된다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 링커는 분자내 켄칭이 감소되거나 제거되도록 형광 및/또는 유색 모이어티 사이의 충분한 공간 거리를 유지하는 것을 도움으로써, 높은 몰 "명도"(예를 들어, 높은 형광 방출)를 갖는 염료 화합물을 생성하는 것으로 여겨진다.

[0112] 따라서, 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 구조의 화학식 A를 갖는다.

[0113] [화학식 A]



[0114]

[0115] 상기 화학식 A에서,

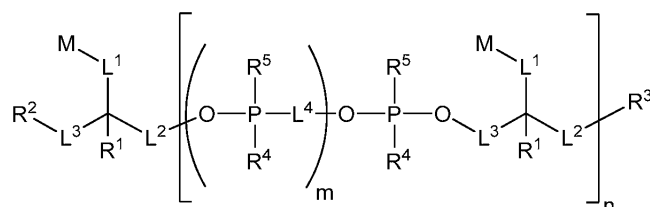
[0116] L은 하나 이상의(예를 들어 각각의) M 그룹 사이의 공간 분리를 유지하여, 분자내 켄칭이 감소되거나 제거되기에 충분한 링커이고,

[0117] R^1 , R^2 , R^3 , L^1 , L^2 , L^3 및 n은 화학식 I에 대하여 정의된 바와 같다.

[0118] 화학식 A의 일부 양태에서, L은 1개 이상의 에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 링커이다.

[0119] 다른 양태에서, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물, 또는 입체 이성질체, 염, 또는 이의 토토머가 제공된다.

[0120] [화학식 I]



[0121]

[0122] 상기 화학식 I에서,

[0123] M은 각각의 발생시 독립적으로, 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 1 이상의 공액도를 포함하는 모이어티이고;

[0124] L^1 은 각각의 발생시 독립적으로, i) 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이거나; 또는 ii) 2개의 상보적인 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능성 그룹을 포함하는 링커이고;

[0125] L^2 및 L^3 은 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이고;

[0126] L^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 길이가 3개 원자 이상인 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고, 이들의 헤테로 원자는 O, N 및 S로부터 선택되고;

[0127] R^1 은 각각의 발생시 독립적으로, H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0128] R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로, H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 헤테로알킬, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, 또는 L' 이고;

[0129] R^4 는 각각의 발생시 독립적으로, OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;

[0130] R^5 는 각각의 발생시 독립적으로, 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

[0131] R_a 는 O 또는 S이고;

[0132] R_b 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;

[0133] R_c 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d , OL' , SR_d , 알킬, 알콕시, 헤테로알킬, 헤테로알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

[0134] R_d 는 짝이온이고;

[0135] Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티 또는 이의 보호된 형태이고, 분석물 분자, 표적 지향 모이어티, 고형 지지체 또는 상보적인 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있고;

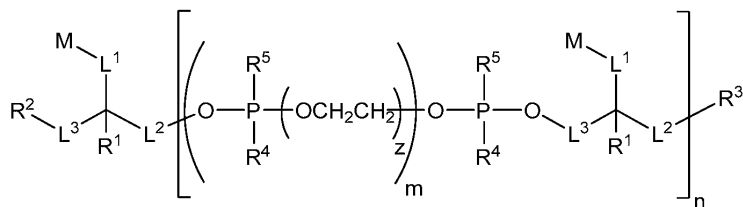
[0136] L' 는, 각각의 발생시 독립적으로, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는

링커, 고형 지지체 잔기에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

- [0137] m 은, 각각의 발생시 독립적으로, 0 이상의 정수이며, 단, 하나 이상의 m 의 발생은 1 이상의 정수이고;
- [0138] n 은 1 이상의 정수이다.
- [0139] 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 다른 양태에서,
- [0140] m 은, 각각의 발생시 독립적으로, 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 1 이상의 공액도를 포함하는 모이어티이고;
- [0141] L^1 은 각각의 발생시 독립적으로, i) 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이거나, 또는 ii) 2개의 상보적인 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능성 그룹을 포함하는 링커이고;
- [0142] L^2 및 L^3 은, 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이고;
- [0143] L^4 는, 각각의 발생시 독립적으로, 길이가 3개 원자 이상인 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고, 이들의 헤테로 원자는 O, N 및 S로부터 선택되고;
- [0144] R^1 은, 각각의 발생시 독립적으로, H, 알킬 또는 알콕시이고;
- [0145] R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로, H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커(여기서, R_a 는 O 또는 S이고; R_b 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고; R_c 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d , SR_d , 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고; R_d 는 짝 이온이다)이고;
- [0146] R^4 는, 각각의 발생시 독립적으로, OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;
- [0147] R^5 는, 각각의 발생시 독립적으로, 옥소, 티옥소이거나 부재하고;
- [0148] Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이고, 분석물 분자, 표적 지향 모이어티, 고형 지지체 또는 상보적인 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있고;
- [0149] m 은, 각각의 발생시 독립적으로, 0 이상의 정수이고, 단, m 의 적어도 하나의 발생은 1 이상의 정수이고;
- [0150] n 은 1 이상의 정수이다.
- [0151] 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 다양한 링커 및 치환체(예를 들어, M, Q, R^1 , R^2 , R^3 , R^c , L^1 , L^2 , L^3 및 L^4)는 임의로 하나 이상의 치환체로 치환된다. 예를 들어 일부 양태에서, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 수용성 또는 다른 특성이 최적화되도록 임의의 치환체가 선택된다. 특정 양태에서, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 각각의 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 및 티오포스포알킬에테르는, 하이드록실, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 설프하이드릴, 아미노, 알킬아미노, 카복실, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 및 티오포스포알킬에테르로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 치환체로 임의로 치환된다. 특정 양태에서, 임의의 치환체는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, 여기서, R_a , R_b 및 R_c 는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대하여 정의된 바와 같다.
- [0152] 일부 양태에서, L^1 은 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이다. 다른 양태에서, L^1 은 각각의 발생시 독립적으로, 2개의 상보적인 반응성 그룹, 예를 들어 Q 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능성 그룹을 포함하는 링커이다.

[0153] 일부 양태에서, L^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 헤테로알킬렌 링커이다. 다른 보다 특정한 양태에서, L^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 알킬렌 옥사이드 링커이다. 예를 들어, 일부 양태에서, L^4 는 폴리에틸렌 옥사이드이고, 화합물은 화학식 IA의 구조를 갖는다.

[0154] [화학식 IA]



[0155]

[0156] 상기 화학식 IA에서,

[0157] z 는 2 내지 100의 정수이다.

[0158] 화학식 IA의 일부 양태에서, z 는 2 내지 30, 예를 들어 약 20 내지 25의 정수, 또는 약 23이다. 일부 양태에서, z 는 2 내지 10, 예를 들어 3 내지 6의 정수이다. 일부 양태에서, z 는 3이다. 일부 양태에서, z 는 4이다. 일부 양태에서, z 는 5이다. 일부 양태에서, z 는 6이다.

[0159] 임의의 링커 L^1 은 화합물의 나머지 부분에 대한 M 모이어티에 대한 부착점으로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 일부 양태에서, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대한 합성 전구체가 제조되며, 상기 M 모이어티는 다수의 손쉬운 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 "클릭 화학(click chemistry)"으로 나타내는 방법을 사용하여 상기 합성 전구체에 부착된다. 이러한 목적을 위해, 신속하고 실질적으로 비가역적인 임의의 반응을 사용하여, M을 상기 합성 전구체에 부착하여, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 형성할 수 있다. 예시적인 반응은, 트리아졸을 형성하기 위한 아지드와 알킨의 구리 촉매 반응(후이스겐 1,3-쌍극성 부가환화), 디엔과 디노필의 반응(딜스-알더), 변형 촉진 알킨-니트론 부가환화, 변형 알켄과 아지드, 테트라진 또는 테트라졸의 반응, 알켄과 아지드의 [3+2] 부가환화, 알켄 및 테트라진의 역수요 딜스-알더(inverse-demand Diels-Alder), 알켄과 테트라졸의 광 반응 및 다양한 치환 반응, 예를 들어, 친전자성 원자에 대한 친핵성 공격에 의한 이탈 그룹의 치환을 포함한다. 예시적인 치환 반응은, 아민과, 활성화 에스테르; N-하이드록시석신이미드 에스테르; 이소시아네이트; 이소티오시아네이트 등과의 반응을 포함한다. 일부 양태에서, L^1 을 형성하는 반응은 수성 환경에서 실시될 수 있다.

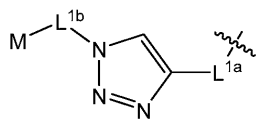
[0160] 따라서, 일부 양태에서, L^1 은 각각의 발생시, 2개의 상보적인 반응성 그룹, 예를 들어 상기 "클릭" 반응 중 하나의 생성물인 작용성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능성 그룹을 포함하는 링커이다. 다양한 양태에서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대해, 상기 관능성 그룹은 알데하이드, 옥심, 하이드라존, 알킨, 아민, 아지드, 아실아지드, 아실할라이드, 니트릴, 니트론, 설포하이드릴, 디설파이드, 설포닐 할라이드, 이소티오시아네이트, 이미도에스테르, 활성화 에스테르(예를 들어, N-하이드록시석신이미드 에스테르), 케톤, α, β -불포화 카보닐, 알켄, 말레이미드, α -할로이미드, 에폭사이드, 아지리딘, 테트라진, 테트라졸, 포스핀, 비오틴 또는 티오란 관능성 그룹과 상보적인 반응성 그룹과의 반응에 의해 형성될 수 있다. 예를 들어, 아민과 N-하이드록시석신이미드 에스테르 또는 이소티오시아네이트의 반응.

[0161] 다른 양태에서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대해, 상기 관능성 그룹은 알킨과 아지드의 반응에 의해 형성될 수 있다. 다른 양태에서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대해, 상기 관능성 그룹은 아민(예를 들어, 1급 아민)과 N-하이드록시석신이미드 에스테르 또는 이소티오시아네이트의 반응에 의해 형성될 수 있다.

[0162] 보다 더 많은 양태에서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대해, 상기 관능성 그룹은 알켄, 에스테르, 아마이드, 티오에스테르, 디설파이드, 카보사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 그룹을 포함한다. 추가의 양태에서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대해, 상기 관능성 그룹은 알켄, 에스테르, 아마이드, 티오에스테르, 티오우레아, 디설파이드, 카보사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 그룹을 포함한다. 다른 양태에서, 상기 관능성 그룹은 아마이드 또는 티오우레아를 포함한다. 일부 추가의 특정 양태에서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대해, L^1 은 트리아

졸릴 관능성 그룹을 포함하는 링커이다. 반면 다른 양태에서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대해, L^1 은 아마이드 또는 티오우레아 관능성 그룹을 포함하는 링커이다.

[0163] 또 다른 양태에서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대해, L^1 -M은 다음 구조의 화학식을 갖는다:

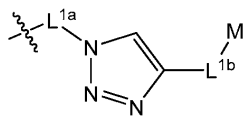


[0164]

[0165] 상기 화학식에서,

[0166] L^{1a} 및 L^{1b} 는 각각 독립적으로, 임의의 링커이다.

[0167] 상이한 양태에서, L^1 의 적어도 하나의 발생에 대해, L^1 -M은 다음 구조의 화학식을 갖는다:



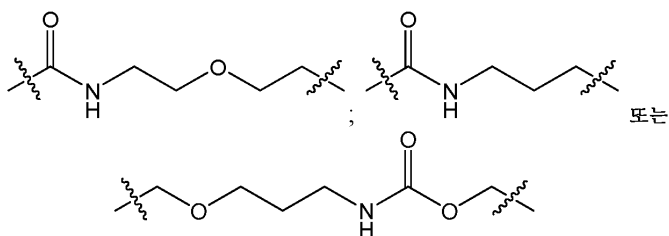
[0168]

[0169] 상기 화학식에서,

[0170] L^{1a} 및 L^{1b} 는 각각 독립적으로, 임의의 링커이다.

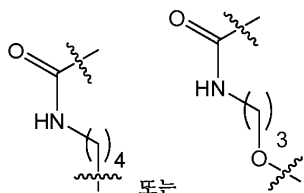
[0171] 상기 다양한 양태에서, L^{1a} 또는 L^{1b} , 또는 이들 둘 다는 부재한다. 다른 양태에서, L^{1a} 또는 L^{1b} , 또는 이들 둘 다는 존재한다.

[0172] 일부 양태에서, L^{1a} 및 L^{1b} 는, 존재하는 경우, 각각 독립적으로, 알킬렌 또는 헤테로알킬렌이다. 예를 들어 일부 양태에서, L^{1a} 및 L^{1b} 는, 존재하는 경우, 독립적으로 다음 구조들의 화학식들 중 하나를 갖는다:



[0173]

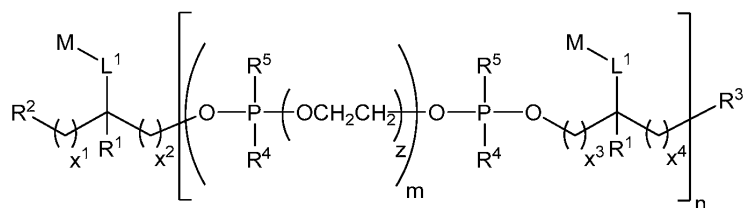
[0174] 화학식 I의 또 다른 상이한 양태에서, L^1 은 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커이다. 특정 양태에서, L^1 은 다음 구조들의 화학식들 중 하나를 갖는다:



[0175]

[0176] 추가의 양태에서, L^2 및 L^3 은, 각각의 발생시 독립적으로, C_1 - C_6 알킬렌, C_2 - C_6 알케닐렌 또는 C_2 - C_6 알키닐렌이다. 예를 들어 일부 양태에서, 상기 화합물은 다음 구조의 화학식 IB를 갖는다.

[0177] [화학식 IB]



[0178]

[0179] 상기 화학식 IB에서,

[0180] x^1 , x^2 , x^3 및 x^4 는, 각각의 발생시 독립적으로, 0 내지 6의 정수이고;

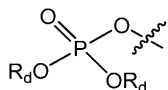
[0181] z 는 2 내지 100, 예를 들어 3 내지 6의 정수이다.

[0182] 화학식 IB의 특정 양태에서, x^1 , x^2 , x^3 또는 x^4 중 적어도 하나의 발생은 1이다. 다른 양태에서, x^1 , x^2 , x^3 및 x^4 는 각각의 발생시 각각 1이다. 다른 양태에서, x^1 및 x^3 은 각각의 발생시 각각 0이다. 일부 양태에서, x^2 및 x^4 는 각각의 발생시 각각 1이다. 또 다른 양태에서, x^1 및 x^3 은 각각의 발생시 각각 0이고, x^2 및 x^4 는 각각의 발생시 각각 1이다.

[0183] 화학식 IB의 일부 추가의 특정 양태에서, L^1 은 각각의 발생시 독립적으로, 트리아졸릴 관능성 그룹을 포함한다. 화학식 IB의 일부 다른 특정 양태에서, L^1 은 각각의 발생시 독립적으로, 아마이드 또는 티오우레아 관능성 그룹을 포함한다. 화학식 IB의 다른 양태에서, L^1 은 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커이다.

[0184] 화학식 I의 또 다른 양태에서, R^4 는, 각각의 발생시 독립적으로, OH, O^- 또는 OR_d 이다. " OR_d " 및 " SR_d "는 양이온과 회합된 O^- 및 S^- 를 나타낼 것을 의도하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 포스페이트 그룹의 이나트륨 염은 다음과 같이 존재할 수 있다:

[0185]



[0186] 상기 화학식에서,

[0187] R_d 는 나트륨(Na^+)이다.

[0188] 화학식 I의 다른 양태에서, R^5 는, 각각의 발생시, 옥소이다.

[0189] 임의의 상기 화합물의 일부 상이한 양태에서, R^1 은 H이다.

[0190] 다른 다양한 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로, OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이다. 일부 상이한 양태에서, R^2 또는 R^3 은 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고 R^2 또는 R^3 중 다른 것은 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다.

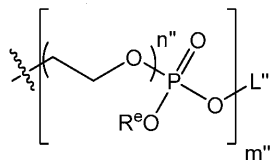
[0191] 임의의 상기 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 보다 추가의 상이한 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이다. 일부 이러한 양태에서, R_c 는 OL' 이다.

[0192] 다른 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로, $-OP(=R_a)(R_b)OL'$ 이고, L' 는 Q, 표적 지향 모이어티, 분석물(예를 들어, 분석물 분자), 고정 지지체, 고정 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커이다.

[0193] 상기 링커 L' 은 Q, 표적 지향 모이어티, 분석물(예를 들어, 분석물 분자), 고정 지지체, 고정 지지체 잔기, 뉴

클레오시드 또는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대한 화학식 I의 추가의 화합물에 부착하기에 적합한 임의의 링커일 수 있다. 유리하게는, 특정 양태는 상기 화합물의 수용성을 증가시키거나 최적화하기 위해 선택되는 L' 모이어티의 용도를 포함한다. 특정 양태에서, L'는 헤테로알킬렌 모이어티이다. 일부 다른 특정 양태에서, L'는 알킬렌 옥사이드 또는 포스포디에스테르 모이어티, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0194] 특정 양태에서, L'는 다음 구조의 화학식을 갖는다:



[0195]

[0196] 상기 화학식에서,

[0197] m'' 및 n''는 독립적으로 1 내지 10의 정수이고;

[0198] R''는 H, 전자쌍 또는 짝이온이고;

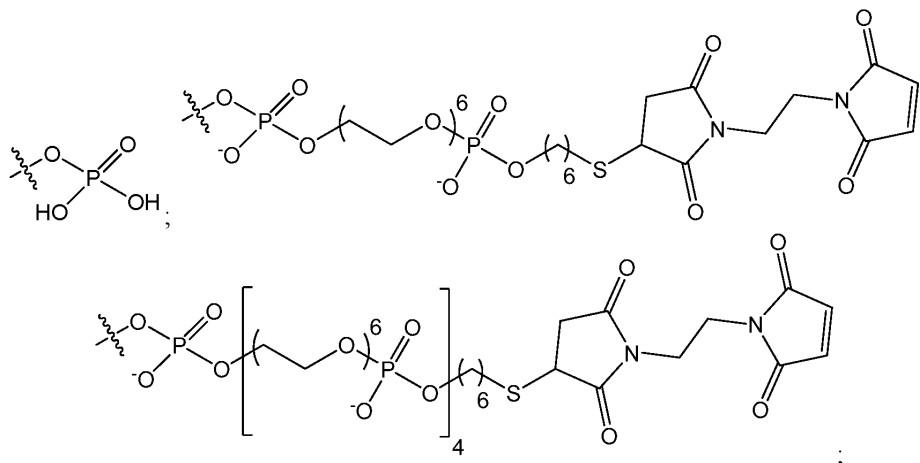
[0199] L''는 R''이거나, 직접 결합하거나, 또는 Q, 표적 지향 모이어티, 분석물(예를 들어, 분석물 분자), 고형 지지체, 고형 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 링키지(linkage)이다.

[0200] 일부 양태에서, m''는 4 내지 10의 정수, 예를 들어 4, 6 또는 10이다. 다른 양태에서, n''는 3 내지 6의 정수, 예를 들어 3, 4, 5 또는 6이다.

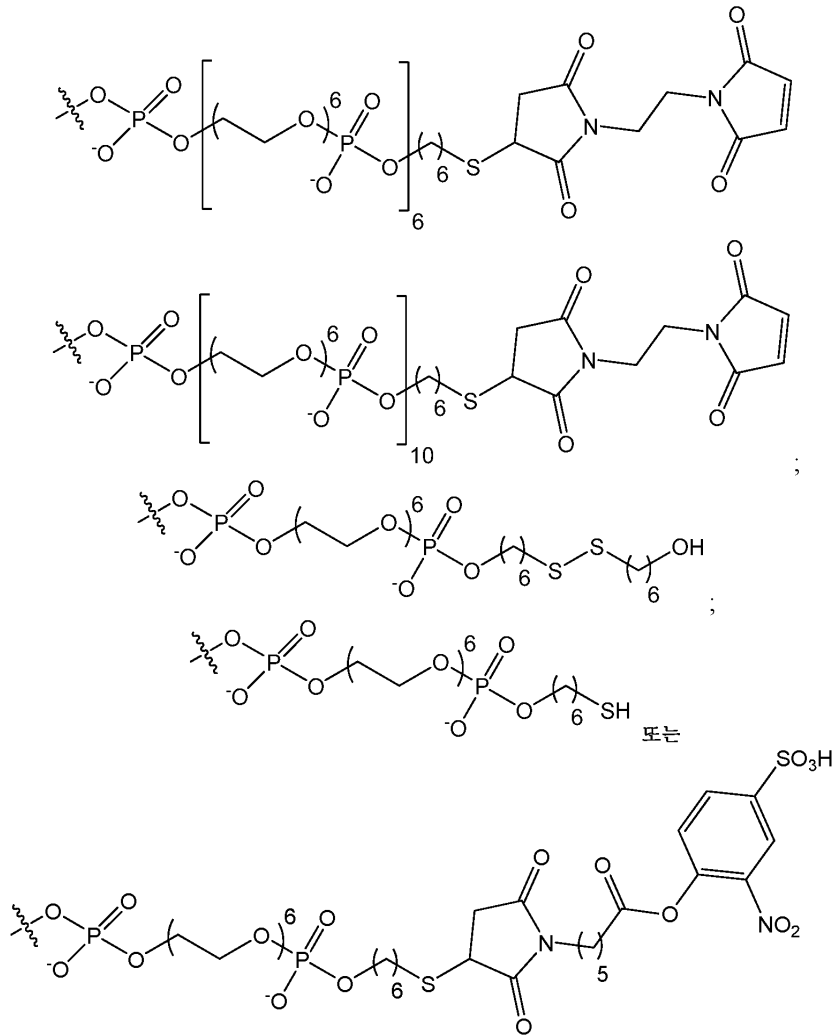
[0201] 일부 다른 양태에서, L''는 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 모이어티이다. 일부 다른 특정 양태에서, L''는 알킬렌 옥사이드, 포스포디에스테르 모이어티, 설프하이드릴, 디설파이드 또는 말레이미드 모이어티 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0202] 특정 상기 양태에서, 상기 표적 지향 모이어티는 항체 또는 세포 표면 수용체 길항제이다.

[0203] 임의의 상기 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 다른 추가의 특정 양태에서, R² 또는 R³은 다음 구조식들 중 하나를 갖는다:



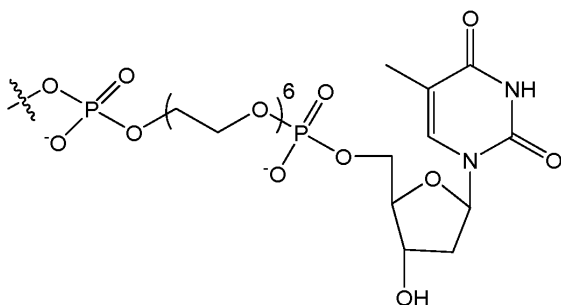
[0204]



[0205]

[0206]

화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 특정 양태는 올리고뉴클레오타이드의 제조에 대하여 당업계에 공지된 것과 유사한 고체 상 합성 방법에 따라 제조될 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, L'는 고정 지지체, 고정 지지체 잔기 또는 뉴클레오타이드에 대한 링키지이다. 활성화 데옥시티미딘(dT) 그룹을 포함하는 고정 지지체는 용이하게 입수가능하고, 일부 양태에서는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 제조하기 위한 출발 물질로서 사용될 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, R² 또는 R³은 다음 구조식을 갖는다:



[0207]

[0208]

당업자는 상기 묘사된 dT 그룹이 합성 및 경제 효율의 용이함을 위해서만 포함되며, 필수적이지는 않다는 것을 이해할 것이다. 다른 고정 지지체가 사용될 수 있으며, L' 상에 존재하는 상이한 뉴클레오타이드 또는 고정 지지체 잔기를 생성하거나, 상기 뉴클레오타이드 또는 고정 지지체 잔기는 합성 후 제거되거나 개질될 수 있다.

[0209]

또 다른 양태에서, Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 분석물 분자 또는 고정 지지체와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이다. 다른 양태에서, Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 상보적인 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이다. 예를 들어, 일부 양태에서, Q'

는 화학식 I의 추가의 화합물에 (예를 들어, R^2 또는 R^3 위치에) 존재하며, Q 및 Q'는 상보적인 반응성 그룹을 포함하여, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물과 화학식 I의 추가의 화합물의 반응은 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 공유 결합을 생성한다. 화학식 I의 다량체 화합물도 유사한 방식으로 제조될 수 있으며, 본 발명의 양태의 범위 내에 포함된다.

[0210] Q 그룹의 유형 및 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 잔기에 대한 Q 그룹의 연결성은 제한되지 않으며, 단, Q는 바람직한 결합을 형성하기에 적합한 반응성을 갖는 모이어티를 포함한다.

[0211] 특정 양태에서, Q는 수성 조건하에서 가수분해하기 쉽지 않은 모이어티이지만, 분석물 분자 또는 고정 지지체 (예를 들어, 아민, 아지드 또는 알킨) 상의 상응하는 그룹과 결합을 형성하기에 충분히 반응성이다.


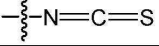
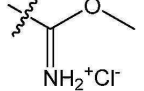
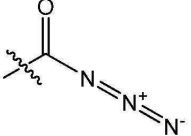
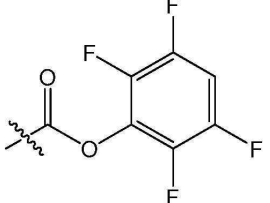
[0212] 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 특정 양태는 생체 접합(bioconjugation) 분야에서 통상적으로 사용되는 Q 그룹을 포함한다. 예를 들어 일부 양태에서, Q는 친핵성 반응성 그룹, 친전자성 반응성 그룹 또는 부가환화 반응성 그룹을 포함한다. 일부 추가의 특정 양태에서, Q는 설포하이드릴, 디설파이드, 활성화 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨, 알켄, 디엔, 디에노필, 산 할라이드, 설포닐 할라이드, 포스핀, α -할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이미드 관능성 그룹을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 활성화 에스테르는 N-석신이미드 에스테르, 이미도에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르이다. 다른 양태에서, 상기 알킨은 알킬 아지드 또는 아실 아지드이다.

[0213] 상기 Q 그룹은 편의상 보호 형태로 제공되어, 저장 안정성 또는 다른 바람직한 특성들을 증가시킬 수 있으며, 이후, 상기 보호 그룹은 예를 들어 표적 지향 모이어티 또는 분석물과의 접합을 위해 적절한 시점에서 제거된다. 따라서, Q 그룹은 상기 개시되고 아래 표 1에 기재된 임의의 반응성 그룹을 포함하여, "보호 형태"의 반응성 그룹을 포함한다. "보호 형태"의 Q는, 소정의 반응 조건하에서는 Q에 비하여 낮은 반응성을 갖지만, 바람직하게는 분해되지 않거나 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 다른 일부와 반응하지 않는 조건하에서 Q로 전환될 수 있는 모이어티를 나타낸다. 당업자는 특정 Q 및 원하는 최종 용도 및 저장 조건에 따라 적절한 보호 형태의 Q를 유도할 수 있다. 예를 들어, Q가 SH인 경우, Q의 보호 형태는 다이설파이드를 포함하며, 이는 통상적으로 공지된 기술 및 시약을 사용하여 SH 모이어티를 나타내도록 감소될 수 있다.

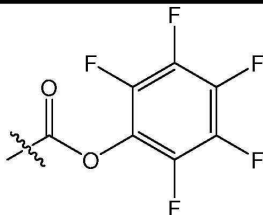
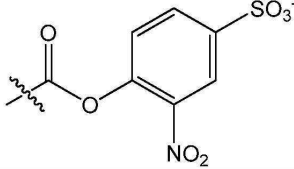
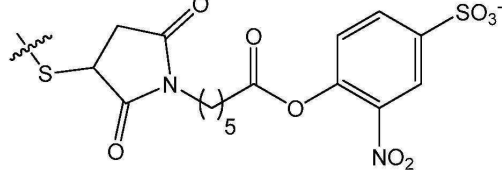
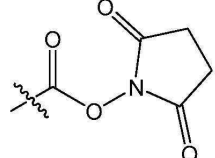
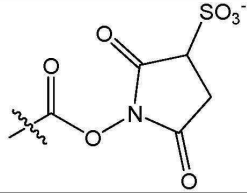
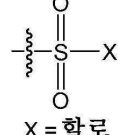
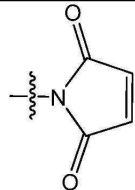
[0214] 예시적인 Q 모이어티는 아래 표 1에 제공된다.

[0215] [표 1]

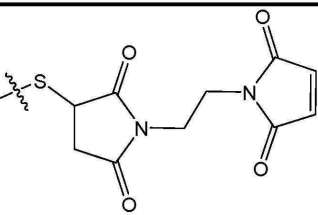
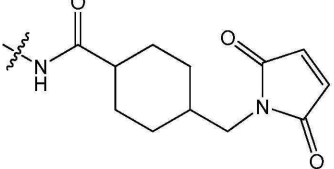
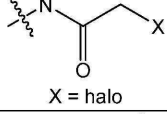
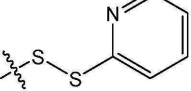
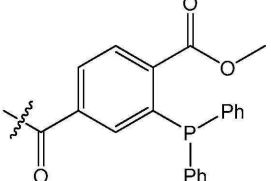


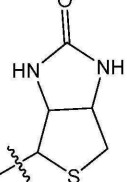


표 1. 예시적인 Q 모이어티

구조식	부류
	설포하이드릴
	이소티오시아네이트
	이미도에스테르
	아실 아지드
	활성화 에스테르

[0216]

구조식	부류
	활성화 에스테르
	활성화 에스테르
	활성화 에스테르
	활성화 에스테르
	활성화 에스테르
 X = 할로	설폰닐 할라이드
	말레이미드

[0217]

구조식	부류
	말레이미드
	말레이미드
 X = halo	α -할로이미드
	디설파이드
	포스핀
	아지드
	알킨
	비오틴
	디엔
	알켄/디에노필

[0218]

구조식	부류
 EWG = 전자 끄는 그룹	알켄/디에노필
-NH ₂	아미노

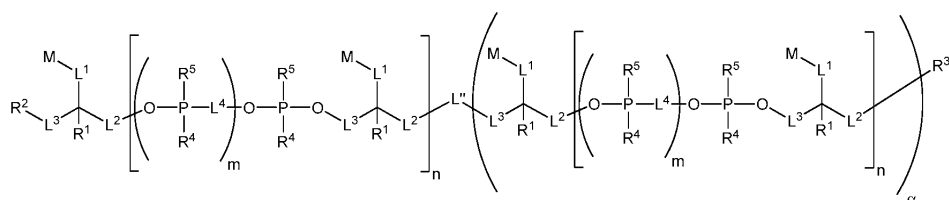
[0219]

[0220] Q는 SH인 일부 양태에서, 상기 SH 모이어티는 화학식 I의 또 다른 화합물 상의 또 다른 설포하이드릴 그룹과 디설파이드 결합을 형성하는 경향이 있을 수 있는 것에 주목한다. 따라서, 일부 양태는 디설파이드 이량체 형태의 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 포함하며, 상기 디설파이드 결합은 SH Q 그룹으로부터 유도된다.

[0221] R² 및 R³ 중 하나 또는 이들 둘 다가 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 링키지를 포함하는 화학식 I의 구조를 갖

는 화합물도 특정 양태의 범위 내에 포함된다. 예를 들어, R^2 및 R^3 중 하나 또는 이들 둘 다는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, 및 R_c 는 OL' 이고, L' 는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 이러한 화합물은 예를 들어 약 10개의 "M" 모이어티(즉, $n=9$)를 갖고, 화학식 I의 제2 화합물 상의 상보적인 Q' 그룹과 반응하기 위한 적절한 "Q"를 갖는, 화학식 I의 제1 화합물의 제조에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방식에서, 임의의 수의 "M" 모이어티, 예를 들어 100개 이상의 "M" 모이어티를 갖는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물은 각각의 단량체의 연속적인 커플링을 필요로 하지 않고 제조될 수 있다. 이러한 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 예시적인 양태는 다음 구조의 화학식 I'를 갖는다.

[화학식 I']



상기 화학식 I'에서,

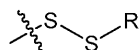
R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , M, m 및 n의 각각의 발생은 독립적으로 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대하여 정의된 바와 같고;

L' 는 Q 모이어티와 상응하는 Q' 모이어티의 반응으로부터 생성되는 관능성 그룹을 포함하는 링커이고;

α 는 1 이상, 예를 들어 1 내지 100, 또는 1 내지 10의 정수이다.

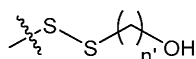
화학식 I'의 예시적인 화합물이 실시예 5에 제공된다. 화학식 I'의 다른 화합물은 예를 들어 본원에 제공되는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 이량체화 또는 중합에 의해 당업자에 의해 유도될 수 있다.

다른 양태에서, 상기 Q 모이어티는 편의적으로 디설파이드 모이어티로서 마스킹되어(예를 들어, 보호되어), 이후에 제거되어 원하는 분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티에 결합하기 위한 활성화 Q 모이어티를 제공할 수 있다. 예를 들어, 상기 Q 모이어티는 다음 구조식을 갖는 디설파이드로서 마스킹될 수 있다:



상기 구조식에서,

R은 임의로 치환된 알킬 그룹이다. 예를 들어 일부 양태에서, Q는 다음 구조식을 갖는 디설파이드 모이어티로서 제공된다:



상기 구조식에서,

일부 다른 양태에서, R^2 또는 R^3 중 하나는 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나는 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 고정 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 예를 들어 일부 양태에서, 상기 분석물 분자는 핵산, 아미노산 또는 이들의 중합체이다. 다른 양태에서, 상기 분석물 분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앵타머 또는 프리온이다. 더욱 상이한 양태에서, 상기 고정 지지체는 중합체성 비드 또는 비중합체성 비드이다.

m에 대한 값은 원하는 형광 및/또는 색상 강도에 따라 선택할 수 있는 또 다른 변수이다. 일부 양태에서, m은, 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 10의 정수이다. 다른 양태에서, m은, 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 5의 정수, 예를 들어 1, 2, 3, 4 또는 5이다.

다른 양태에서, m은, 각각의 발생시 독립적으로, 2 이상의 정수이고, z는 3 내지 10의 정수이고, 예를 들어 일부 양태에서, m은, 각각의 발생시 독립적으로, 2 이상의 정수, 예를 들어 3, 4, 5 또는 6이고, z는 3 내지 6의

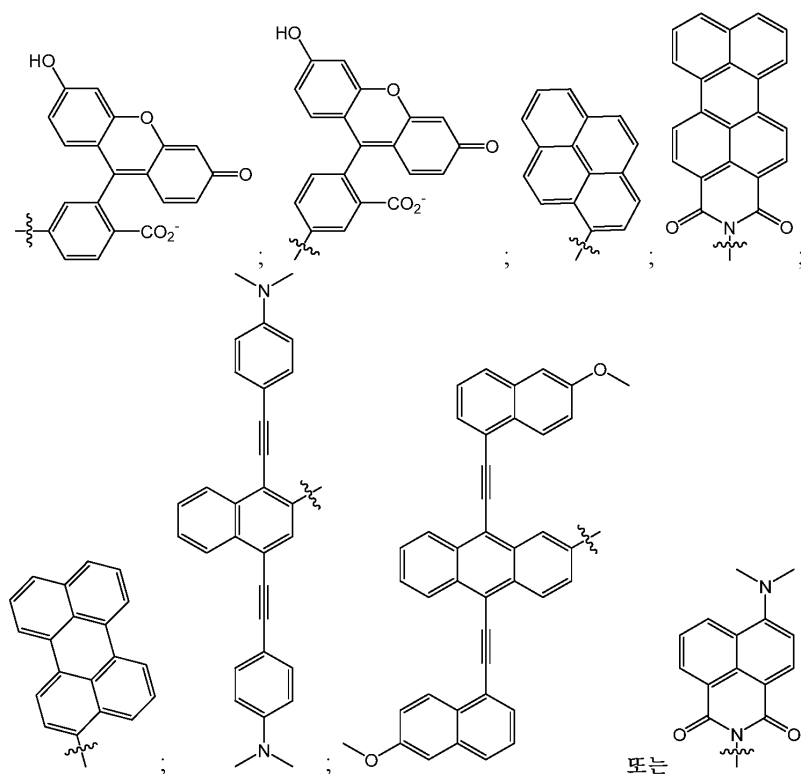
정수이다.

- [0238] 형광 강도는 상이한 값의 n 의 선택에 의해서도 조정될 수 있다. 특정 양태에서, n 은 1 내지 100의 정수이다. 다른 양태에서, n 은 1 내지 10의 정수이다. 일부 양태에서, n 은 1이다. 일부 양태에서, n 은 2이다. 일부 양태에서, n 은 3이다. 일부 양태에서, n 은 4이다. 일부 양태에서, n 은 5이다. 일부 양태에서, n 은 6이다. 일부 양태에서, n 은 7이다. 일부 양태에서, n 은 8이다. 일부 양태에서, n 은 9이다. 일부 양태에서, n 은 10이다.
- [0239] m 은 원하는 광학 특성에 따라, 예를 들어 원하는 색상 및/또는 형광 방출 파장에 따라 선택된다. 일부 양태에서, m 은 각각의 발생시 동일할 수 있지만, M 의 각각의 발생이 동일한 M 일 필요는 없으며, 특정 양태는 M 이 각각의 발생시 동일하지 않은 화합물을 포함하는 것에 주목하는 것이 중요하다. 예를 들어, 일부 양태에서, 각각의 m 은 동일하지 않으며, 상이한 M 모이어티는 형광 공명 에너지 전이(FRET) 방법에서 사용하기 위한 흡광 및/또는 방출을 갖도록 선택된다. 예를 들어 이러한 양태에서, 상이한 M 모이어티는, FRET 메커니즘에 의해 하나의 파장에서의 방사선의 흡광도가 상이한 파장에서의 방사선의 방출을 유발하도록 선택된다. 예시적인 M 모이어티는 원하는 최종 용도에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다. FRET 방법을 위한 예시적인 M 모이어티는 플루오레세인 및 5-TAMRA(5-카복시테트라메틸로다민, 석신이미딜 에스테르) 염료를 포함한다.
- [0240] M 은 M 의 임의의 위치(즉, 원자)로부터 분자의 잔기에 부착될 수 있다. 당업자는 M 을 분자의 잔기에 부착하기 위한 수단을 인식할 것이다. 예시적인 방법은 본원에 개시된 상기 "클릭" 반응을 포함한다.
- [0241] 일부 양태에서, m 은 형광 또는 유색 모이어티이다. 임의의 형광 및/또는 유색 모이어티가 사용될 수 있으며, 예를 들어 당업계에 공지되어 있고 통상적으로는 비색계, UV 및/또는 형광성 검정에서 사용되는 임의의 형광 및/또는 유색 모이어티가 사용될 수 있다. 본 발명의 다양한 양태에서, 유용한 M 모이어티의 예는, 크산텐 유도체(예를 들어, 플루오레세인, 로다민, 오레곤 그린, 예오신 또는 텍사스 레드); 시아닌 유도체(예를 들어, 시아닌, 인도카보시아닌, 옥사카보시아닌, 티아카보시아닌 또는 메로시아닌); 세타, 세타우, 및 스쿠아레 염료를 포함하는 스쿠아라인 유도체 및 환-치환된 스쿠아라인; 나프탈렌 유도체(예를 들어, 단실 및 프로단 유도체); 쿠마린 유도체; 옥사디아졸 유도체(예를 들어, 피리딜옥사졸, 니트로벤족사디아졸 또는 벤족사디아졸); 안트라센 유도체(예를 들어, DRAQ5, DRAQ7 및 CyTRAK 오렌지를 포함하는 안트라퀴논); 피렌 유도체 예를 들어 케스케이드 블루; 옥사진 유도체(예를 들어, 나일 레드, 나일 블루, 크레실 바이올렛, 옥사진 170); 아크리딘 유도체(예를 들어, 프로플라빈, 아크리딘 오렌지, 아크리딘 옐로우); 아릴메틴 유도체: 아우라민, 크리스탈 바이올렛, 말라카이트 그린; 및 테트라폴렌 유도체(예를 들어, 포르핀, 프탈로시아닌 또는 빌리루빈)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 다른 예시적인 M 모이어티는 시아닌 염료, 크산테이트 염료(예를 들어, Hex, Vic, Nedd, Joe 또는 Tet); 야키마 옐로우; 레드몬드 레드; 탐라; 텍사스 레드 및 알렉사 플루오르® 염료를 포함한다.
- [0242] 임의의 상기의 또 다른 양태에서, M 은 3개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이들의 조합, 예를 들어 4개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이들의 조합, 또는 5개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이들의 조합도 포함한다. 일부 양태에서, M 은 6개의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이들의 조합을 포함한다. 추가의 양태에서, 상기 환은 융합되어 있다. 예를 들어 일부 양태에서, M 은 3개 이상의 융합된 환, 4개 이상의 융합된 환, 5개 이상의 융합된 환, 또는 6개 이상의 융합된 환도 포함한다.
- [0243] 일부 양태에서, m 은 사이클릭이다. 예를 들어 일부 양태에서, m 은 카보사이클릭이다. 다른 양태에서, m 은 헤테로사이클릭이다. 상기의 또 다른 양태에서, M 은 각각의 발생시 독립적으로, 아릴 모이어티를 포함한다. 일부 이러한 양태에서, 상기 아릴 모이어티는 멀티사이클릭이다. 다른 보다 특정한 예에서, 상기 아릴 모이어티는, 예를 들어 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 심지어 4개 이상의 아릴 환을 포함할 수 있는 융합된-멀티사이클릭 아릴 모이어티이다.
- [0244] 화학식 I, IA, IB 또는 I'의 임의의 상기 화합물의 다른 양태에서, M 은 각각의 발생시 독립적으로, 적어도 1개의 헤테로 원자를 포함한다. 예를 들어 일부 양태에서, 상기 헤테로 원자는 질소, 산소 또는 황이다.
- [0245] 임의의 상기의 더욱 추가의 양태에서, M 은 각각의 발생시 독립적으로, 적어도 1개의 치환체를 포함한다. 예를 들어 일부 양태에서, 상기 치환체는 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 하이드록시, 설프하이드릴, 알콕시, 아릴옥시, 페닐, 아릴, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 이소프로필, t -부틸, 카복시, 설포네이트, 아마이드, 또는 포르밀 그룹이다.
- [0246] 상기의 일부 보다 더 구체적인 양태에서, M 은 각각의 발생시 독립적으로, 디메틸아미노스틸벤, 퀴나크리돈, 플루오로페닐-디메틸-BODIPY, 히스-플루오로페닐-BODIPY, 아크리딘, 테릴렌, 섹시페닐, 포르피린, 벤조피렌, (플

루오로페닐-디메틸-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐,
(비스플루오로페닐-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, 퀴터페닐, 비-벤조티아졸, ter-벤조티아졸, 비-나프틸,
비-안트라실, 스쿠아라인, 스쿠아릴륨, 9,10-에틸닐안트라센 또는 ter-나프틸 모이어티이다. 다른 양태에서, M
은 각각의 발생시 독립적으로, p-테르페닐, 페릴렌, 아조벤젠, 페나진, 페난트롤린, 아크리딘, 티옉크산트렌,
크리센, 루브렌, 코로넨, 시아닌, 페릴렌 이미드, 또는 페릴렌 아미드 또는 이들의 유도체이다. 더욱 추가의
양태에서, M은 각각의 발생시 독립적으로, 쿠마린 염료, 레조루핀 염료, 디피로메텐보론 디플루오라이드 염료,
루테늄 비피리딜 염료, 에너지 전이 염료, 티아졸 오렌지 염료, 폴리메틴 또는 N-아릴-1,8-나프탈이미드 염료이
다.

[0247] 임의의 상기의 보다 더 많은 양태에서, M은 각각의 발생시 동일하다. 다른 양태에서, 각각의 m은 상이하다. 더욱 추가의 양태에서, 1개 이상의 M이 동일하고, 1개 이상의 M이 상이하다.

[0248] 일부 양태에서, m은 피렌, 페틸렌, 페틸렌 모노이미드 또는 6-FAM 또는 이들의 유도체이다. 일부 다른 양태에서, M은 다음 구조식들 중 하나를 갖는다:



[0249]

[0250] 카복실산 그룹을 포함하는 M 모이어티가 음이온 형태(CO_2^-)로 도시되어 있지만, 당업자는 이것이 pH에 따라 달라질 것이며, 양성자화 형태(CO_2H)가 다양한 양태에 포함되는 것을 이해할 것이다.

[0251] 일부 특정 양태에서, 상기 화합물은 표 2로부터 선택되는 화합물이다. 표 2의 화합물을 실시예에 기재된 절차에 따라 제조하고, 이들의 동일성을 질량 분광법으로 확인했다.

[0252]

[표 2]

표 2. 예시적인 화학식 I의 화합물

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-1	1364.6 1365.2	
I-2	1576.2 1577.3	
I-3	1497.4 1497.3	
I-4	1841.4 1841.6	
I-5	2185.8 2185.9	
I-6	2532.2 2530.2	

[0253]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-7	1789.6 1789.5	
I-8	2001.6 2001.6	
I-9	2213.5 2213.8	
I-10	4481.6 4480.9	
I-11	8375.9 8374.3	
I-12	TBD	

[0254]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-13	TBD	
I-14	TBD	
I-15	TBD	
I-16	TBD	<p> $R^2 =$ </p> <p> $R^3 =$ </p>

[0255]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-17	15684.6 15681.5	<p> $R^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{S} \text{---} \text{S} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{OH}$ $R^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} \text{OdT}$ </p>
I-18	TBD	<p> $R^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{SH}$ $R^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} \text{OdT}$ </p>
I-19	TBD	<p> $R^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{S} \text{---} \text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2 \text{---} \text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2 \text{---} \text{A}$ $A = \text{ring}$ $R^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} \text{OdT}$ </p>

[0256]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-20	TBD	<p> $\text{R}^2 = \text{[Complex structure with phosphate, sulfonamide, and nitro group]}$ $\text{R}^3 = \text{[Phosphate group linked to OdT]}$ </p>
I-21	TBD	<p> $\text{R}^2 = \text{[Complex structure with phosphate, sulfonamide, and variable group m'']}$ $\text{R}^3 = \text{[Phosphate group linked to OdT]}$ </p>

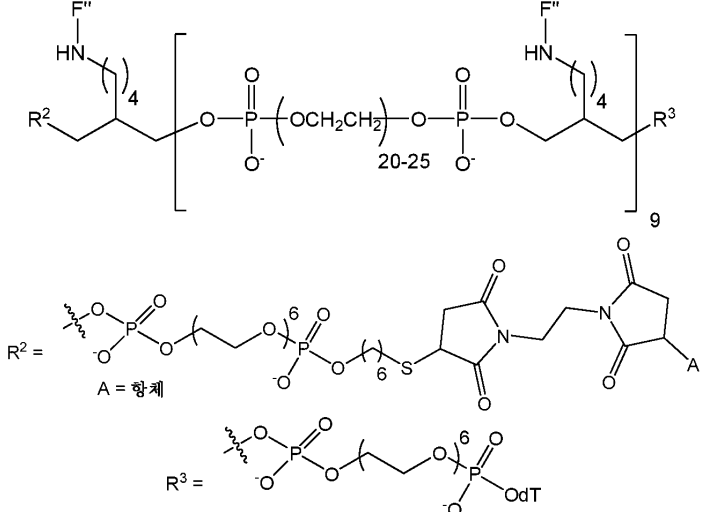
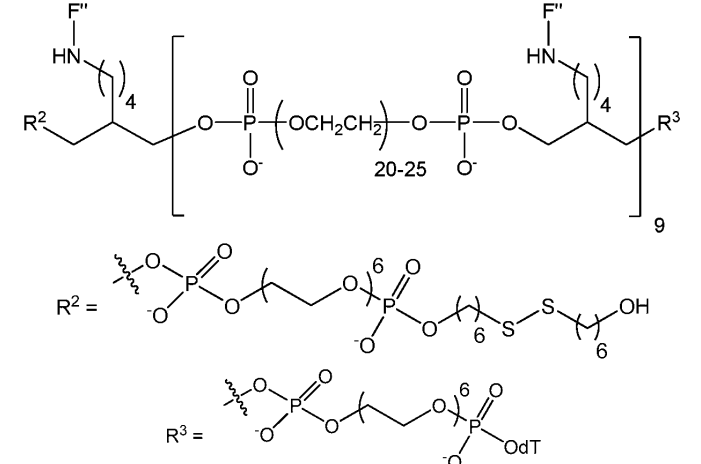
[0257]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-24	TBD	<p> $R^2 = \text{poly(4-vinylpyridine)}_{m''} \quad m'' = 4 \text{ 또는 } 10$ $R^3 = \text{poly(4-vinylpyridine)}_6 \text{ terminated with OdT}$ </p>
I-25	TBD	<p> $R^2 = \text{poly(4-vinylpyridine)}_{m''} \quad m'' = 4 \text{ 또는 } 10$ $R^3 = \text{poly(4-vinylpyridine)}_6 \text{ terminated with OdT}$ </p>

[0259]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-26	TBD	<p> $R^2 = \text{[Complex structure with thiol and cyclic amide]}$ $R^3 = \text{[Phosphate-linked chain ending in OdT]}$ </p>
I-27	TBD	<p> $R^2 = \text{[Phosphate-linked chain ending in SH]}$ $R^3 = \text{[Phosphate-linked chain ending in OdT]}$ </p>

[0260]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-28	TBD	
I-29	TBD	

[0261]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-30	TBD	
I-31	TBD	

[0262]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-32	7241.2 7238.2	<p> $R^2 = \text{[Complex molecule with phosphonate, PEG, thioether, and pyrrolidine]}$ $R^3 = \text{[Phosphonate-PEG-thioether-pyrrolidine]}$ </p>
I-33	TBD	<p> $R^2 = \text{[Complex molecule with phosphonate, PEG, thioether, and thiol]}$ $R^3 = \text{[Phosphonate-PEG-thioether-pyrrolidine]}$ </p>

[0263]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-34	TBD	<p> $R^2 =$ $A = \text{ring}$ $R^3 =$ </p>
I-35	TBD	<p> $R^2 =$ $R^3 =$ </p>

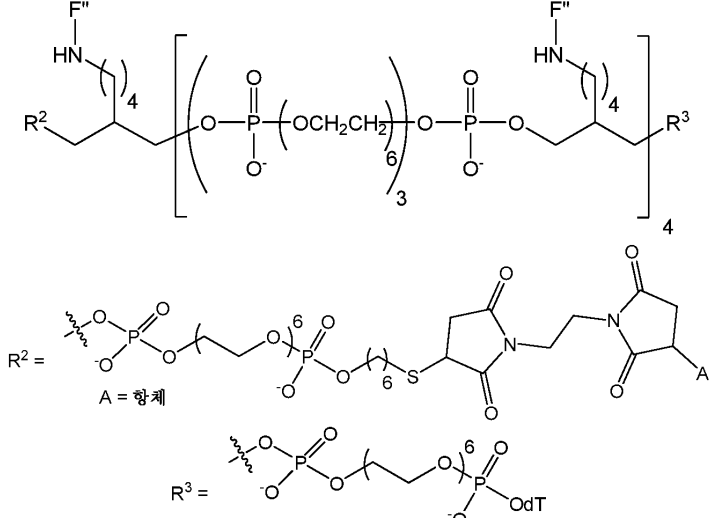
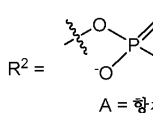
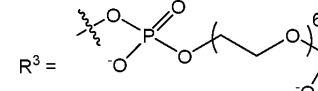
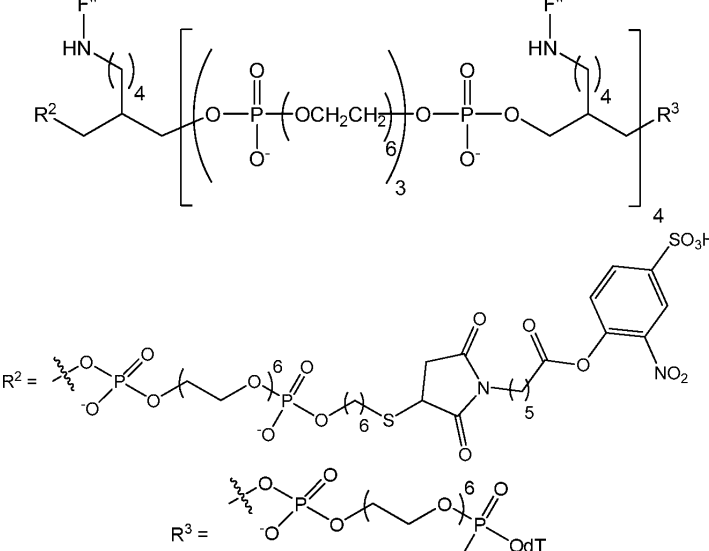
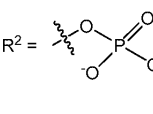
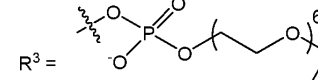
[0264]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-36	TBD	
I-37	6997.1 6997.0	

[0265]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-38	TBD	<p> $R^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} \text{SH}$ $R^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} \text{OdT}$ </p>
I-39	TBD	<p> $R^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} \text{SH}$ $R^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} \text{OdT}$ </p>

[0266]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-40	TBD	 <p>$R^2 =$  A = 항체</p> <p>$R^3 =$ </p>
I-41	TBD	 <p>$R^2 =$ </p> <p>$R^3 =$ </p>

[0267]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-42	TBD	<p>$R^2 \text{ \& } R^3 =$ </p>
I-43	3103.9 3103.6	
I-44	5619.5 5619.8	

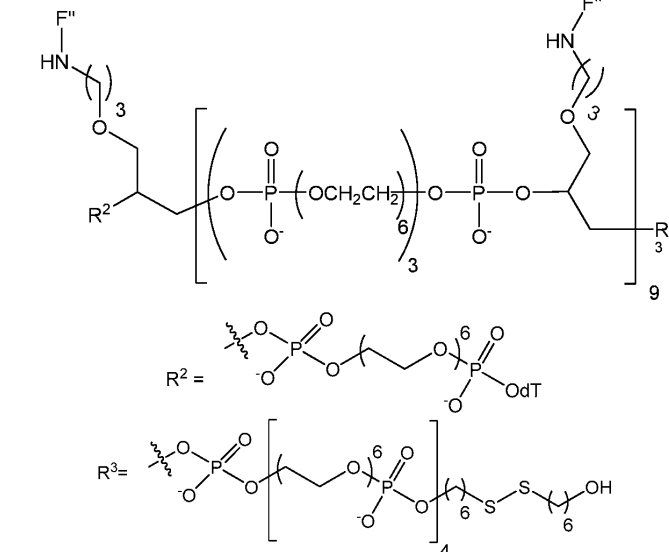
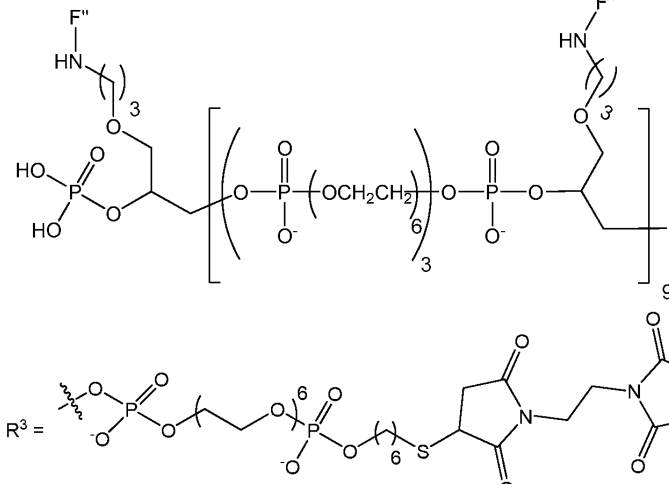
[0268]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-45	15684.6 15681.5	
I-46	6997.1 6997.0	
I-47	11912.1 11910.1	

[0269]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-48	9273.9 9272.0	 $R^3 = \text{---}O-P(=O)(O^-)-O-(CH_2)_6-O-P(=O)(O^-)-O-(CH_2)_6-S-S-(CH_2)_6-OH$
I-49	16252.9 16250.0	 $R^2 = \text{---}O-P(=O)(O^-)-O-(CH_2)_6-O-P(=O)(O^-)-O-Tf$ $R^3 = \text{---}O-P(=O)(O^-)-O-(CH_2)_6-O-P(=O)(O^-)-O-(CH_2)_6-S-S-(CH_2)_6-OH$

[0270]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-50	17260.3 17260.0	
I-51	TBD	

[0271]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-52	TBD	<p> $\text{R}^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{SH}$ </p>
I-53	TBD	<p> $\text{R}^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O})_2 \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{S} \text{---} \text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2 \text{---} \text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2 \text{---} \text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2$ </p>

[0272]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-54	TBD	<p style="text-align: center;">R³=</p>
I-55	TBD	<p style="text-align: center;">R²=</p> <p style="text-align: center;">R³=</p>

[0273]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-56	TBD	
I-57	TBD	

[0274]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-58	TBD	<p>R² = $\text{---}[\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-(\text{CH}_2)_6-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{OH}]$</p> <p>A = 항제</p>
I-59	TBD	<p>R³ = $\text{---}[\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-(\text{CH}_2)_6-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{OH}]$</p> <p>A = 항제</p>

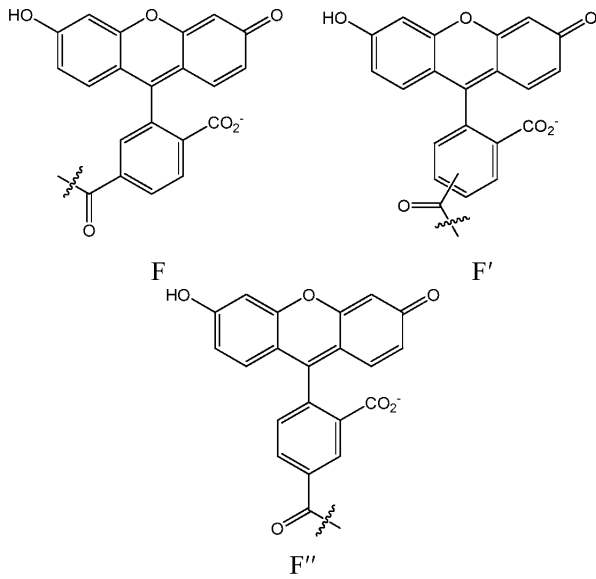
[0275]

번호	분자량 실측치 계산치	구조식
I-60	TBD	<p>PEG 분자량 = 약 1,000이 되게 하는 n=약 23</p>

* TBD = to be determined

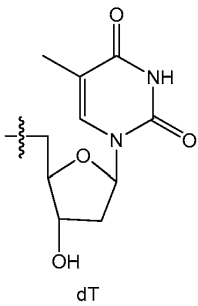
[0276]

[0277] 표 2에서 사용하는 바와 같이, 그리고 본원 명세서 전체에서 R^2 , R^3 , m, n 및 L'는 달리 언급되지 않는 한, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 대하여 제공된 정의를 가지며, F, F' 및 F''는 각각 다음 구조식을 갖는 형광 모이어티를 나타낸다:



[0278]

[0279] "dT"는 다음 구조식을 나타낸다:



[0280]

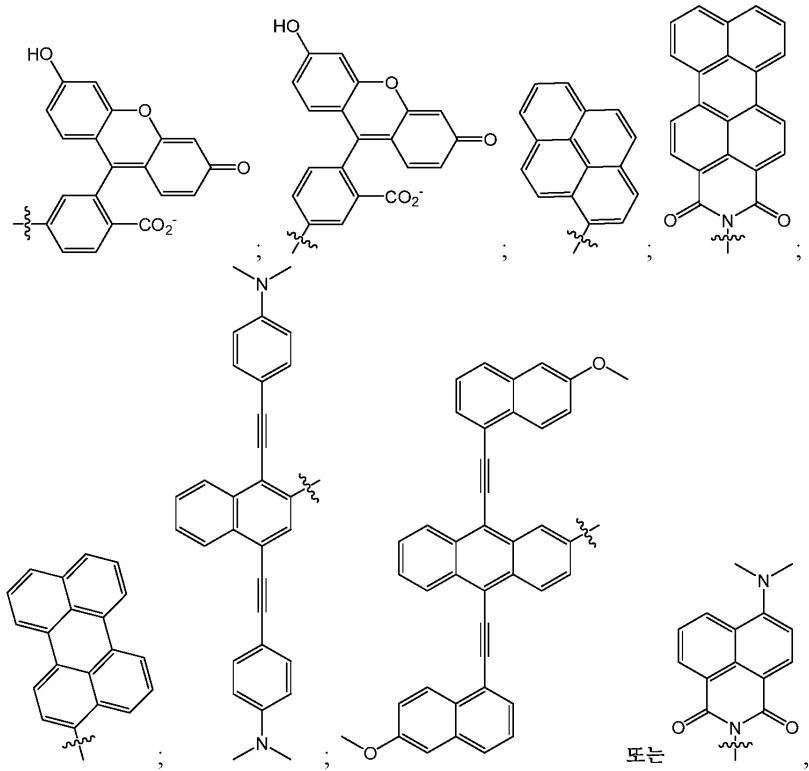
[0281] 일부 양태는, 항체와 같은 표적 지향 모이어티에 접합된, 표 2에 제공된 특정 화합물을 포함하는 임의의 상기 화합물을 포함한다.

[0282] 본 발명은 일반적으로 초기 공지된 화합물에 비해 증가된 형광 방출을 갖는 화합물을 제공한다. 따라서, 특정 양태는 Y개의 형광 모이어티들인 M을 포함하는 형광 화합물에 관한 것이고, 여기서, 상기 형광 화합물은, 특정 파장의 자외선 광에 의한 여기시 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y배의 85%보다 큰, 상기와 동일한 파장의 자외선 광으로 여기시의 피크 형광 방출을 가지며, 여기서, Y는 2 이상의 정수이다. 형광 화합물은 자외선 광과 같은 광으로 여기시 형광 신호를 방출하는 화합물을 포함한다.

[0283] 일부 양태에서, 형광 화합물은 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출의 적어도 Y배의 90%보다 큰, Y배의 95%보다 큰, Y배의 97%보다 큰 또는 Y배의 99%보다 큰 피크 형광 방출을 갖는다.

[0284] 일부 양태에서, Y는 2 내지 100의 정수, 예를 들어 2 내지 10이다.

[0285] 일부 양태에서, Y M 모이어티는 독립적으로, 다음 구조들의 화학식들 중 하나를 갖는다:

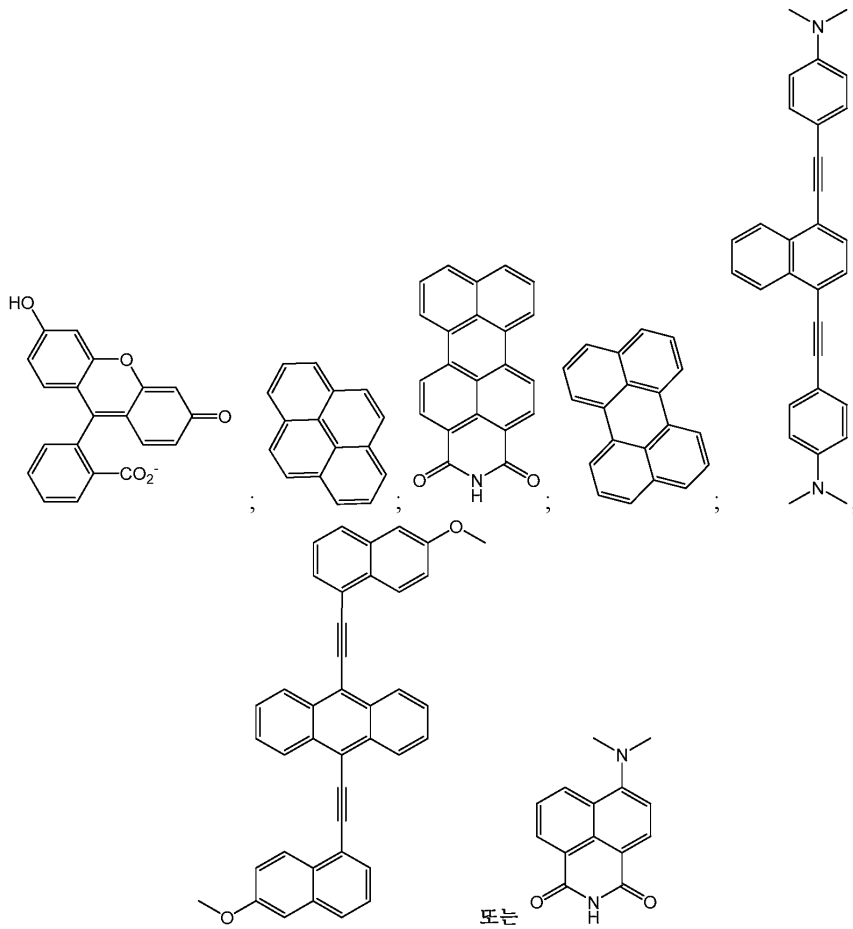


[0286]

[0287] 상기 화학식에서,

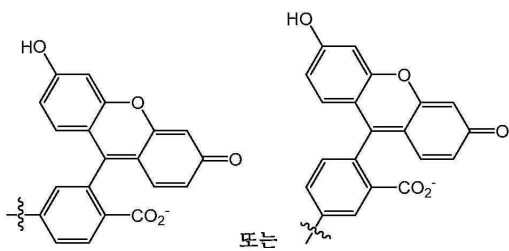
[0288] ~~~ 는 형광 화합물에 대한 부착점을 나타낸다.

[0289] 다른 양태에서, 단일한 M 모이어티는 독립적으로, 다음 구조식들 중 하나를 갖는다:



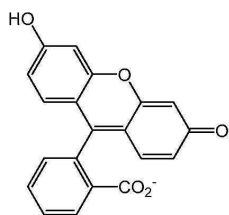
[0290]

[0291] 추가의 특정 양태에서, 상기 형광 화합물은, 독립적으로 다음 구조식들:



[0292]

[0293] (여기서, \sim 는 상기 형광 화합물에 대한 부착점을 나타낸다) 중 하나를 갖는 M 모이어티를 Y개 포함하고, 상기 단일한 M 모이어티는 다음 구조식:



[0294]

을 갖는다.

[0295]

다른 양태에서, 상기 피크 형광 방출은 약 500 내지 약 550nm 범위의 파장에서 이루어진다.

[0296]

더욱 추가의 양태에서, 상기 형광 화합물은 적어도 1개의 에틸렌 옥사이드 모이어티를 포함한다.

[0297]

청구범위 중 어느 한 항의 형광 화합물 및 분석물을 포함하는 조성물도 제공된다.

- [0298] 본 발명에 개시되는 화합물은 "조정가능(tunable)"하며, 이는 상기 화합물 중 임의의 화합물에서의 변수의 적절한 선택에 의해, 당업자는 원하는/원하거나 소정의 물 형광(물 명도)을 갖는 화합물에 도달할 수 있는 것을 의미한다. 화합물의 조정가능성은, 사용자가 특정 검정에서 사용하기 위한 또는 관심 특정 분석물을 확인하기 위한 원하는 형광 및/또는 색상을 갖는 화합물에 쉽게 도달할 수 있게 한다. 모든 변수가 화합물의 물 형광에 영향을 미칠 수 있지만, M , L^4 , m 및 n 의 적절한 선택은 화합물의 물 형광에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 따라서, 일 양태에서, 원하는 물 형광을 갖는 화합물을 수득하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 공지된 형광을 갖는 M 모이어티를 선택하는 단계, 상기 M 모이어티를 포함하는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 제조하는 단계, 및 L^4 , m 및 n 에 대한 적합한 변수를 선택하여 원하는 물 형광에 도달할 수 있다.
- [0299] 특정 양태에서의 물 형광은, 모 형광단(parent fluorophore)(예를 들어, 단량체)의 형광 방출에 대한 증가 또는 감소 배율로 표현될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 본 발명의 화합물의 물 형광은, 모 형광단에 비해 1.1x, 1.5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x 또는 그 이상의 배율이다. 다양한 양태는 L^4 , m 및 n 의 적절한 선택에 의해 모 형광단에 비해 원하는 형광 증가 배율을 갖는 화합물을 제조하는 것을 포함한다.
- [0300] 예시를 용이하게 하기 위해, 인 모이어티(예를 들어, 인산염 등)를 포함하는 다양한 화합물이 음이온 상태(예를 들어, $-OPO(OH)O^-$, $-OPO_3^{2-}$)로 묘사된다. 당업자는 전하가 pH에 따르고, 비전하(예를 들어, 양성자화 또는 염, 예를 들어 나트륨 또는 다른 양이온) 형태도 본 발명의 양태의 범위에 포함되는 것을 쉽게 이해할 것이다.
- [0301] 임의의 상기 화합물 및 하나 이상의 분석물 분자(예를 들어, 생체 분자)를 포함하는 조성물이 다양한 다른 양태에서, 제공된다. 일부 양태에서, 하나 이상의 분석물 분자를 검출하기 위한 분석 방법에서의 이러한 조성물의 용도도 제공된다.
- [0302] 또 다른 양태에서, 화합물은 다양한 분석 방법에서 유용하다. 예를 들어 특정 양태에서, 본원 명세서는 샘플의 염색 방법을 제공하며, 상기 방법은, 상기 샘플에 화학식 I의 구조를 갖는 화합물, 예를 들어 R^2 또는 R^3 중 하나는 분석물 분자(예를 들어, 생체 분자)에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 미세 입자이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나는 H, OH, 알킬, 알콕시, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 인 화합물을, 상기 샘플이 적절한 파장에 조명될 때 광학 반응을 일으키기에 충분한 양으로, 가하는 단계를 포함한다.
- [0303] 상기 방법의 일부 양태에서, R^2 는 생체 분자와 같은 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 예를 들어, 핵산, 아미노산 또는 이들의 중합체(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드). 또 다른 양태에서, 생체 분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앵타머 또는 프리온이다.
- [0304] 상기 방법의 또 다른 양태에서, R^2 는 미세 입자와 같은 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 예를 들어 일부 양태에서, 상기 미세 입자는 중합체성 비드 또는 비중합체성 비드이다.
- [0305] 더 많은 양태에서, 상기 광학 반응은 형광 반응이다.
- [0306] 다른 양태에서, 상기 샘플은 세포를 포함하고, 일부 양태는 상기 세포를 유세포 분석법으로 관찰하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0307] 또 다른 양태에서, 상기 방법은 상기 형광 반응을, 검출 가능하게 상이한 광학 특성들을 갖는 제2 형광단의 형광 반응으로부터 구별하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0308] 다른 양태에서, 본 발명은, 생체 분자와 같은 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법으로서,
- [0309] (a) R^2 또는 R^3 중 하나가 상기 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 H, OH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 인 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 제공하는 단계; 및
- [0310] (b) 상기 화합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 생체 분자와 같은 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법을 제공한다.
- [0311] 일부 양태에서, 상기 분석물 분자는 핵산, 아미노산 또는 이들의 중합체(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드)이다. 또 다른 양태에서, 상기 분석물 분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앵타머 또는 프리온이다.

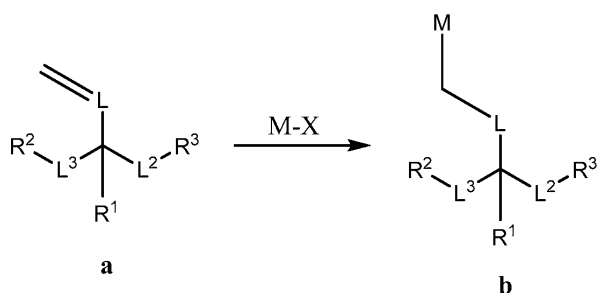
- [0312] 다른 양태에서, 생체 분자와 같은 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법으로서,
- [0313] (a) 상기 화합물을 하나 이상의 분석물 분자와 혼합하는 단계; 및
- [0314] (b) 상기 화합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 생체 분자와 같은 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법을 제공한다.
- [0315] 다른 양태에서, 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법으로서,
- [0316] (a) R^2 또는 R^3 이 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 제1항의 화합물을, 상기 분석물 분자와 혼합하는 단계;
- [0317] (b) 상기 화합물과 상기 분석물 분자의 접합물을 형성하는 단계; 및
- [0318] (c) 상기 접합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법이 제공된다.
- [0319] 다른 예시적인 방법은, 분석물을 검출하는 방법으로서,
- [0320] (a) R^2 또는 R^3 이 상기 분석물에 대한 특이성을 갖는 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커를 포함하는, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 제공하는 단계;
- [0321] (b) 상기 화합물과 상기 분석물을 혼합하여, 상기 표적 지향 모이어티와 상기 분석물을 회합시키는 단계; 및
- [0322] (c) 상기 화합물을 이의 가시적인 또는 형광 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 분석물을 검출하는 방법을 포함한다.
- [0323] 상기 방법의 특정 양태에서, 분석물은 세포와 같은 입자이고, 상기 방법은 유세포 분석법의 사용을 포함한다. 예를 들어, 상기 화합물에는 목적하는 세포와 선택적으로 회합하여 가시적인 검출 또는 형광 검출과 같은 임의의 수의 기술에 의해 세포를 검출 가능하게 할 수 있는 항체와 같은 표적 지향 모이어티가 제공될 수 있다. 적절한 항체는 원하는 최종 용도에 따라 당업자에 의해 선택될 수 있다. 특정 양태에서, 사용하기 위한 예시적인 항체는 UCHT1 및 MOPC-21을 포함한다.
- [0324] 따라서, 본 발명의 화합물의 양태들은 다음을 포함하지만 제한되지는 않는 다수의 방법에서의 유용성을 발견한다: 세포 계수; 세포 분류; 바이오마커 검출; 세포 사멸의 정량화; 세포 생존률 측정; 세포 표면 항원의 확인; 총 DNA 및/또는 RNA 함량의 측정; (예를 들어, 핵산 프로브로서의) 특정 핵산 서열의 확인; 혈액 암과 같은 질병의 진단.
- [0325] 상기 방법들 이외에, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 양태들은, 다음을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는 다양한 분야 및 방법에서 유용성을 발견한다: 암 및 다른 조직의 확인을 위한 내시경 절차에서의 영상화; 단일 세포 및/또는 단일 분자 분석법, 예를 들어 증폭이 거의 또는 전혀 없는 폴리뉴클레오타이드의 검출; 항체 또는 당 또는 암 세포에 우선적으로 결합하는 다른 모이어티와 같은 표적 지향 모이어티를 화학식 I의 구조를 갖는 화합물에 포함시킴에 의한 암 영상화; 외과 수술 절차에서의 영상화; 다양한 질환의 확인을 위한 히스톤의 결합; 예를 들어, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물 M 모이어티를 활성 약물 모이어티로 대체함에 의한 약물 전달; 및/또는 다양한 식물상 및/또는 유기체에 대한 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 우선적인 결합에 의한 치과 작업 및 기타 절차에서의 조영제.
- [0326] 상기 제시된 화학식 I의 임의의 화합물, 및 상기 제시된 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , L' , L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , M, m 및/또는 n 변수에 대해 본원에 제시된 임의의 특정한 선택은, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 다른 양태 및/또는 변수와 독립적으로 조합되어 상기 특정하게 제시되지 않은 본 발명의 양태를 형성할 수 있는 것으로 이해된다. 또한, 특정 양태 및/또는 청구범위에서 임의의 특정 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , L' , L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , M, m 및/또는 n 변수에 대한 선택 목록이 나열되는 경우, 각각의 개별적인 선택은 특정 양태 및/또는 청구항으로부터 삭제될 수 있고, 나머지 선택 리스트는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주될 것으로 이해한다.
- [0327] 본 명세서에서, 도시된 화학식의 치환체 및/또는 변수의 조합은 이러한 기여가 안정한 화합물을 생성하는 경우에만 허용되는 것으로 이해한다.

[0328] 본원에 기재된 방법에서 중간체 화합물의 관능성 그룹이 적합한 보호 그룹에 의해 보호될 필요가 있을 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 이러한 관능성 그룹은 하이드록시, 아미노, 머캅토 및 카복실산을 포함한다. 하이드록시에 대해 적합한 보호 그룹은, 트리알킬실릴 또는 디알킬알킬실릴(예를 들어, *t*-부틸디메틸실릴, *t*-부틸디페닐실릴 또는 트리메틸실릴), 테트라하이드로피라닐, 벤질 등을 포함한다. 아미노, 아미디노 및 구아니디노에 대해 적합한 보호 그룹은, *t*-부톡시카보닐, 벤질옥시카보닐 등을 포함한다. 머캅토에 대해 적합한 보호 그룹은 -C(O)-R"(여기서, R"는 알킬, 아릴 또는 아릴알킬임), *p*-메톡시벤질, 트리틸 등을 포함한다. 카복실산에 대해 적합한 보호 그룹은 알킬, 아릴 또는 아릴알킬 에스테르s를 포함한다. 보호 그룹은 당업자에게 공지되어 있고 본 명세서에 기재된 표준 기술에 따라 첨가되거나 제거될 수 있다. 보호 그룹의 사용은, 문헌[Green, T.W. 및 P.G.M. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 3rd Ed., Wiley]에 자세히 개시되어 있다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 보호 그룹은 왕(Wang) 수지, 링크(Rink) 수지 또는 2-클로로트리틸-클로라이드 수지와 같은 중합체 수지일 수도 있다.

[0329] 또한, 유리 염기 또는 산 형태로 존재하는 본 발명의 모든 화합물은, 당업자에게 공지된 방법에 의해 적절한 무기 또는 유기 염기 또는 산을 사용하는 처리에 의해 이들의 염으로 전환시킬 수 있다. 본 발명의 화합물의 염은 표준 기술에 의해 이들의 유리 염기 또는 산 형태로 전환시킬 수 있다.

[0330] 하기 반응 도식은 본 발명의 화합물을 제조하는 예시적인 방법을 설명한다. 유사한 방법에 의해 또는 당업자에게 공지된 다른 방법들을 조합함으로써 이러한 화합물을 제조할 수 있는 것으로 이해된다. 또한, 당업자가, 이하에 기재된 바와 유사한 방식으로, 필요에 따라 적절한 출발 성분을 사용하고 합성의 파라미터를 변경함으로써 아래에 구체적으로 설명되지 않은 화학식 I의 다른 화합물을 제조할 수 있을 것이 이해된다. 일반적으로, 출발 성분은 Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI, 및 Fluorochem USA 등과 같은 공급처로부터 입수할 수 있거나, 당업자에게 공지된 공급처(예를 들면, 문헌[Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition (Wiley, December 2000)] 참조)에 따라 합성될 수 있거나, 본 발명에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

반응 도식 I

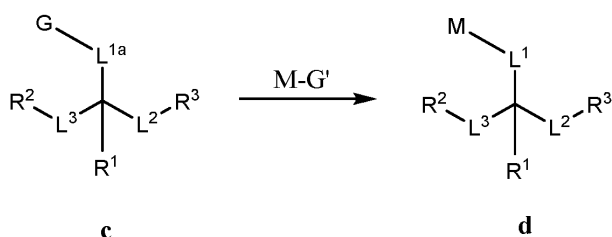


[0331]

[0332] 반응 도식 1은, R^1 , L^2 , L^3 및 M이 상기 정의된 바와 같고, R^2 및 R^3 이 상기 정의된 바와 같거나 이의 보호된 변이체이고, L이 임의의 링커인 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 제조에 유용한 중간체를 제조하는 예시적인 방법을 예시한다. 반응 도식 1을 참조하면, 화학식 a의 화합물은 구입되거나 당업자에게 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 당업계에 공지된 스즈키 커플링 조건 하에서, a와 M-X(여기서, X는 할로젠, 예를 들어 브로모이드)의 반응은 화학식 b의 화합물을 생성한다. 화학식 b의 화합물은 아래 개시된 바와 같은 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 제조에 사용될 수 있다.

[0333] 반응 도식

반응 도식 II

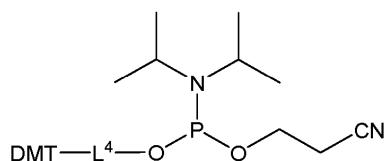


[0334]

[0335] 반응 도식 II는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 제조에 유용한 중간체를 제조하기 위한 다른 방법을 예시한다. 반응 도식 II를 참조하여, R^1 , L^1 , L^2 , L^3 , G 및 M이 상기 정의된 바와 같고, R^2 및 R^3 이 상기 정의된 바와 같거나 이의 보호된 변이체인, 구입할 수 있거나 널리 공지된 기술에 의해 제조될 수 있는 화학식 c의 화합물은, M-G'와 반응하여 화학식 d의 화합물을 수득한다. 여기서, G 및 G'는 상보적인 반응성을 갖는 관능성 그룹(즉, 반응하여 공유 결합을 형성하는 관능성 그룹)을 나타낸다. G'는 M이거나 M의 구조 골격의 일부일 수 있다. G 및 G'는 본원에 개시된 임의의 수의 관능성 그룹, 예를 들어 각각 알킨 및 아지드, 각각 아민 및 활성화 에스테르, 또는 각각 아민 및 이소티오시아네이트 동일 수 있다.

[0336] 화학식 I의 구조를 갖는 화합물은 널리 공지된 자동화 DNA 합성 조건 하에서 다음 구조의 화학식 e를 갖는 포스포라미다이트 화합물과의 반응에 의해 화학식 b 또는 d 중 하나로부터 제조될 수 있다:

[0337] [화학식 e]



[0338]

[0339] 상기 화학식 e에서,

[0340] A는 본원에 정의된 바와 같고,

[0341] 각각의 L은 독립적으로, 임의의 링커이다.

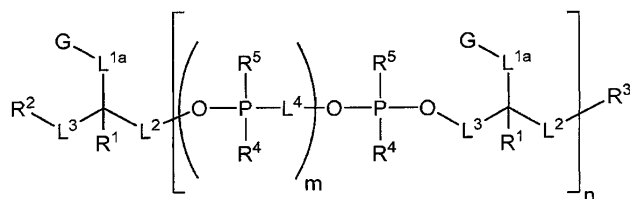
[0342] DNA 합성 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 간단하게는, 상기 중간체 b 또는 d의 R^2 및 R^3 과 같은 2개의 알콜 그룹은, 각각 디메톡시트리틸(DMT) 그룹 및 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노 포스포라미다이트 그룹으로 관능화된다. 포스포라미다이트 그룹은, 전형적으로는 테트라졸과 같은 활성화제의 존재하에 알콜 그룹에 커플링된 후, 인 원자를 요오드로 산화된다. 디메톡시트리틸 그룹은 포스포라미다이트 그룹과 반응할 수 있는 유리 알콜을 노출시키기 위해, 산(예를 들어, 클로로아세트산)으로 제거할 수 있다. 2-시아노에틸 그룹은 수성 암모니아로의 처리에 의한 올리고머화 후에 제거할 수 있다.

[0343] 올리고머화 방법에 사용되는 포스포라미다이트의 제조도 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 1급 알콜(예를 들어 R^3)은 DMT-Cl과의 반응에 의해 DMT 그룹으로서 보호될 수 있다. 2급 알콜(예를 들어, R^2)은 2-시아노에틸 N,N-디이소프로필클로로포스포라미다이트와 같은 적절한 시약과의 반응에 의해 포스포라미다이트로서 관능화된다. 포스포라미다이트의 제조방법 및 이들의 올리고머화는 당업계에 널리 공지되어 있으며 실시예에서 보다 상세히 기술된다.

[0344] 화학식 I의 구조를 갖는 화합물은 상기 개시된 널리 공지된 포스포라미다이트의 화학적 성질(chemistry)에 따라 중간체 b 또는 d 및 e의 올리고머화에 의해 제조된다. 원하는 수의 m 및 n 반복 단위가 원하는 회수의 포스포라미다이트 커플링을 반복함으로써 분자 내로 혼입된다. 아래 개시된 구조식 (II)의 화합물은 유사한 방법으로 제조될 수 있음을 이해할 것이다.

[0345] 다양한 다른 양태에서, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 제조에 유용한 화합물이 제공된다. 상기 화합물은 단량체, 이량체 및/또는 올리고머 형태로 상기 개시한 바와 같이 제조될 수 있으며, 이어서 임의의 수의 합성 방법론(예를 들어, 상기 개시한 "클릭" 반응)을 통해 상기 화합물에 공유 결합되어, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 형성할 수 있다. 따라서, 다양한 양태에서, 다음 구조의 화학식 II를 갖는 화합물, 이의 입체 이성질체, 염, 또는 토토머가 제공된다.

[0346] [화학식 II]



[0347]

[0348] 상기 화학식 II에서,

[0349] G는 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티 또는 이의 보호된 형태이고, 상보적인 반응성 그룹과 공유 결합을 형성할 수 있고;

[0350] L^{1a} , L^2 및 L^3 은, 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이고;

[0351] L^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 길이가 3개 원자 이상인 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고, 이들의 헤테로 원자는 O, N 및 S로부터 선택되고;

[0352] R^1 은 각각의 발생시 독립적으로, H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0353] R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로, H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 헤테로알킬, $-\text{OP}(=\text{R}_a)(\text{R}_b)\text{R}_c$, Q, 또는 L' 이고;

[0354] R^4 는 각각의 발생시 독립적으로, OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;

[0355] R^5 는 각각의 발생시 독립적으로, 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

[0356] R_a 는 O 또는 S이고;

[0357] R_b 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;

[0358] R_c 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d , OL' , SR_d , 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

[0359] R_d 는 짝이온이고;

[0360] Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티 또는 이의 보호된 형태이고, 분석물 분자, 표적 지향 모이어티, 고형 지지체 또는 상보적인 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있고;

[0361] L' 는, 각각의 발생시 독립적으로, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체 잔기에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 화학식 II의 추가의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

[0362] m은, 각각의 발생시 독립적으로, 0 이상의 정수이며, 단, 하나 이상의 m의 발생은 1 이상의 정수이고;

[0363] n은 1 이상의 정수이다.

[0364] 화학식 II의 다른 양태에서,

[0365] G는 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이고, 상보적인 반응성 그룹과 공유 결합을 형성할 수 있고;

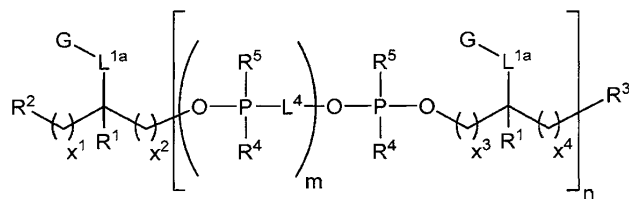
[0366] L^{1a} , L^2 및 L^3 은, 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이고;

- [0367] L^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 길이가 3개 원자 이상인 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링 커이고, 이들의 헤테로 원자는 O, N 및 S으로부터 선택되고;
- [0368] R^1 은 각각의 발생시 독립적으로, H, 알킬 또는 알콕시이고;
- [0369] R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로, H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 헤테로알킬, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, 또는 L' 이고;
- [0370] R^4 는 각각의 발생시 독립적으로, OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;
- [0371] R^5 는 각각의 발생시 독립적으로, 옥소, 티옥소이거나 부재하고;
- [0372] R_a 는 O 또는 S이고;
- [0373] R_b 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;
- [0374] R_c 는 H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커(여기서, R_a 는 O 또는 S이고; R_b 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고; R_c 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d , SR_d , 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이다)이고;
- [0375] R_d 는 짝이온이고;
- [0376] R^4 는 각각의 발생시 독립적으로, OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;
- [0377] R^5 는 각각의 발생시 독립적으로, 옥소, 티옥소이거나 부재하고;
- [0378] Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이고, 분석물 분자, 고형 지지체, 또는 상보적인 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있고;
- [0379] m은, 각각의 발생시 독립적으로, 0 이상의 정수이며, 단, 하나 이상의 m의 발생은 1 이상의 정수이고;
- [0380] n은 1 이상의 정수이다.
- [0381] 화학식 II의 구조를 갖는 화합물의 G는, M 모이어티 상의 상보적인 그룹과 공유 결합을 형성할 수 있는 적절한 반응성 그룹을 갖는 그룹을 포함하는 임의의 모이어티로부터 선택될 수 있다. 예시적인 양태에서, 상기 G 모이어티는 표 1에 제공된 특정 예를 포함하여 본원에 개시된 Q 모이어티들 중 임의의 것으로부터 선택될 수 있다. 일부 양태에서, G는, 각각의 발생시 독립적으로, 다음을 포함하는 반응에 대하여 적합한 모이어티를 포함한다: 트리아졸을 형성하기 위한 아지드와 알킨의 구리 촉매 반응(후이스겐 1,3-쌍극성 부가환화), 디엔과 디노필의 반응(딜스-알더), 변형 촉진 알킨-니트론 부가환화, 변형 알켄과 아지드, 테트라진 또는 테트라졸의 반응, 알켄과 아지드의 [3+2] 부가환화, 알켄 및 테트라진의 역수요 딜스-알더, 알켄과 테트라졸의 광 반응 및 다양한 치환 반응, 예를 들어, 친전자성 원자에 대한 친핵성 공격에 의한 이탈 그룹의 치환.
- [0382] 일부 양태에서, G는, 각각의 발생시 독립적으로, 알데하이드, 옥심, 하이드라존, 알킨, 아민, 아지드, 아실아지드, 아실할라이드, 니트릴, 니트론, 설포하이드릴, 디설파이드, 설포닐 할라이드, 이소티오시아네이트, 이미도 에스테르, 활성화 에스테르, 케톤, α, β -불포화 카보닐, 알켄, 말레이미드, α -할로이미드, 에폭사이드, 아지리딘, 테트라진, 테트라졸, 포스핀, 비오틴 또는 티이탄 관능성 그룹을 포함하는 모이어티이다.
- [0383] 다른 양태에서, G는 각각의 발생시 독립적으로, 알킨 또는 아지드 그룹을 포함한다. 다른 양태에서, G는 각각의 발생시 독립적으로, 아미노, 이소티오시아네이트 또는 활성화 에스테르 그룹을 포함한다. 상이한 양태에서, G는, 각각의 발생시 독립적으로, 상보적인 반응성 그룹과 반응시, 알켄, 에스테르, 아마이드, 티오에스테르, 디설파이드, 카보사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 그룹을 포함하는 관능성 그룹을 형성할 수 있는 반응성 그룹을 포함한다. 예를 들어, 일부 양태에서, 상기 헤테로아릴은 트리아졸릴이다.

[0384] 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 다양한 다른 양태에서, L^2 및 L^3 은, 각각의 발생시 독립적으로, C_1-C_6 알킬렌, C_2-C_6 알케닐렌 또는 C_2-C_6 알키닐렌이다.

[0385] 다른 양태에서, 상기 화합물은 다음 구조의 화학식 IIA를 갖는다.

[0386] [화학식 IIA]

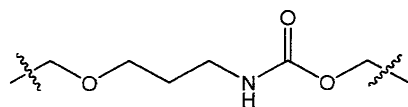


[0387]

[0388] 상기 화학식 IIA에서,

[0389] x^1 , x^2 , x^3 및 x^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 0 내지 6의 정수이다.

[0390] 화학식 II의 다른 양태에서, 각각의 L^{1a} 는 부재한다. 다른 양태에서, 각각의 L^{1a} 는 존재하고, 예를 들어 각각의 L^{1a} 는 각각의 발생시 독립적으로, 헤테로알킬렌이다. 특정 양태에서, L^{1a} 는 다음 구조식을 갖는다:



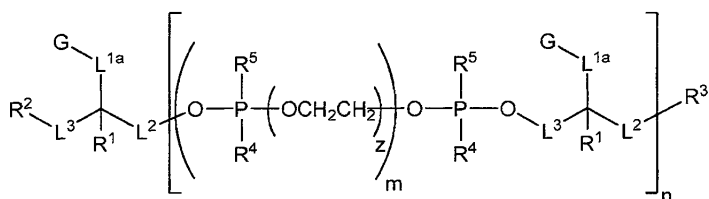
[0391]

[0392] 화학식 II의 상기 임의의 다른 양태에서, G는 각각의 발생시 독립적으로, 또는 이다.

[0393] 화학식 I의 구조를 갖는 화합물A의 다양한 양태에서, x^1 , x^2 , x^3 또는 x^4 중 적어도 하나의 발생은 1이다. 다른 양태에서, x^1 , x^2 , x^3 및 x^4 는 각각의 발생시 각각 1이다. 다른 양태에서, x^1 및 x^3 은 각각의 발생시 각각 0이다. 일부 양태에서, x^2 및 x^4 는 각각의 발생시 각각 1이다. 또 다른 양태에서, x^1 및 x^3 은 각각의 발생시 각각 0이고, x^2 및 x^4 는 각각의 발생시 각각 1이다.

[0394] 화학식 I 또는 IIA의 화합물의 일부 다른 양태에서, L^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 헤테로알킬렌 링커이다. 다른 추가의 특정 양태에서, L^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 알킬렌 옥사이드 링커이다. 예를 들어 일부 양태에서, L^4 는 폴리에틸렌 옥사이드이고, 상기 화합물은 다음 구조의 화학식 IB를 갖는다.

[0395] [화학식 IB]



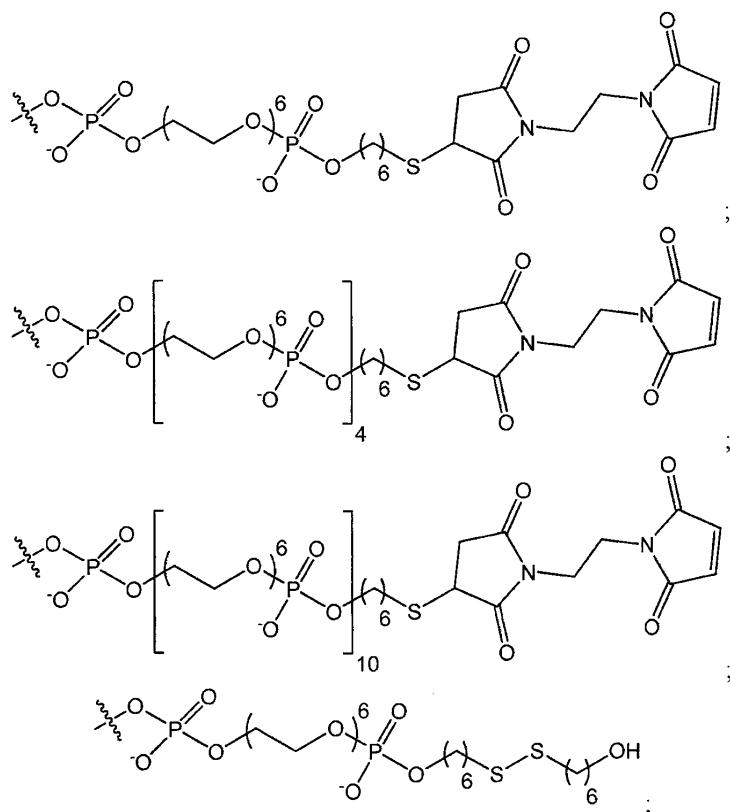
[0396]

[0397] 상기 화학식 IB에서,

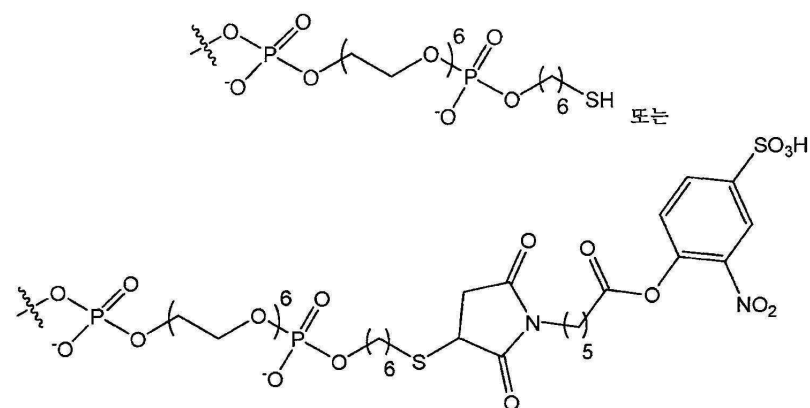
[0398] z는 2 내지 100의 정수, 예를 들어 3 내지 6의 정수이다.

[0399] 다른 양태에서, R^4 는 각각의 발생시 독립적으로, OH, O^- 또는 OR_d 이고, 상이한 양태에서, R^5 는 각각의 발생시, 옥소이다.

[0412] 화학식 II의 임의의 상기 화합물의 다른 보다 특정한 양태에서, R^2 또는 R^3 은 다음 구조식들 중 하나를 가진다:

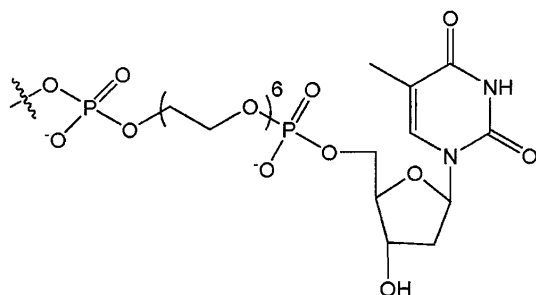


[0413]



[0414]

[0415] 화학식 II의 구조를 갖는 화합물의 특정 양태는, 올리고뉴클레오타이드의 제조에 대해 당업계에 공지된 것과 유사한 고체 상 합성 방법에 따라 제조될 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, L' 는 고형 지지체, 고형 지지체 잔기 또는 뉴클레오시드에 대한 링키지이다. 활성화 테옥시티미딘(dT) 그룹을 포함하는 고형 지지체는 용이하게 입수가 가능하며, 일부 양태에서는 구조식 (II)의 화합물을 제조하기 위한 출발 물질로서 사용될 수 있다. 따라서, 일부 실시 양태에서, R^2 또는 R^3 은 다음 구조식을 갖는다:



[0416]

[0417]

화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 또 다른 양태에서, Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이고, 분석물 분자 또는 고형 지지체와 공유 결합을 형성할 수 있다. 다른 양태에서, Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이고, 상보적인 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있다. 예를 들어, 일부 양태에서, Q'는 화학식 I의 추가의 화합물 상에(예를 들어, R² 또는 R³ 위치에) 존재하고, Q 및 Q'는 상보적인 반응성 그룹을 포함하여, 상기 화학식 I의 구조를 갖는 화합물과 상기 화학식 I의 추가의 화합물의 반응이 상기 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 공유 결합을 생성한다. 다량체 화학식 I의 구조를 갖는 화합물도 유사한 방식으로 제조될 수 있고, 이는 본 발명의 양태들의 범위 내에 포함된다.

[0418]

Q 그룹의 유형 및 상기 Q 그룹의 상기 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 잔기에 대한 연결성은 제한되지 않지만, 단, Q는 원하는 결합을 형성하기에 적절한 반응성을 갖는 모이어티를 포함한다.

[0419]

화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 특정 양태에서, Q는 수성 조건하에서 가수분해하기 쉽지 않은 모이어티이지만, 분석물 분자 또는 고형 지지체(예를 들어, 아민, 아지드 또는 알킨) 상의 상응하는 그룹과 결합을 형성하기에 충분히 반응성이다.

[0420]

화학식 II의 구조를 갖는 화합물의 특정 양태는 생체 접합 분야에서 통상적으로 사용되는 Q 그룹을 포함한다. 예를 들어 일부 양태에서, Q는 친핵성 반응성 그룹, 친전자성 반응성 그룹 또는 부가환화 반응성 그룹을 포함한다. 일부 추가의 특정 양태에서, Q는 설포하이드릴, 디설파이드, 황산화 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨, 알켄, 디엔, 디에노필, 산 할라이드, 설포닐 할라이드, 포스핀, α-할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이미드 관능성 그룹을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 황산화 에스테르는 N-석신이미드 에스테르, 이미도 에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르이다. 다른 양태에서, 상기 알킨은 알킬 아지드 또는 아실 아지드이다.

[0421]

화학식 II의 구조를 갖는 화합물에 대한 예시적인 Q 모이어티는 상기 표 1에 제공되어 있다.

[0422]

화학식 I의 구조를 갖는 화합물과 같이, Q가 SH인 화학식 II의 구조를 갖는 화합물의 일부 양태에서, 상기 SH 모이어티는 화학식 II의 또 다른 화합물 상의 또 다른 설포하이드릴 그룹과 디설파이드 결합을 형성하는 경향이 있을 수 있다. 따라서, 일부 양태는 디설파이드 이량체 형태의 화학식 II의 구조를 갖는 화합물을 포함하며, 상기 디설파이드 결합은 SH Q 그룹으로부터 유도된다.

[0423]

화학식 II의 구조를 갖는 화합물의 일부 다른 양태에서, R² 또는 R³ 중 하나는 OH 또는 -OP(=R_a)(R_b)R_c이고, R² 또는 R³ 중 다른 하나는 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 예를 들어 일부 양태에서, 상기 분석물 분자는 핵산, 아미노산 또는 이들의 중합체이다. 다른 양태에서, 상기 분석물 분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앵타머 또는 프리온이다. 일부 양태에서, 상기 표적 지향 모이어티는 항체 또는 세포 표면 수용체 길항체이다. 더욱 상이한 양태에서, 상기 고형 지지체는 중합체성 비드 또는 비중합체성 비드이다.

[0424]

화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 다른 양태에서, m은, 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 10의 정수이다. 예를 들어 일부 양태에서, m은, 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 5의 정수, 예를 들어 1, 2, 3, 4 또는 5이다. 일부 양태에서, m은 1이다. 일부 양태에서, m은 2이다. 일부 양태에서, m은 3이다. 일부 양태에서, m은 4이다. 일부 양태에서, m은 5이다.

[0425]

화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 다른 상이한 양태에서 n은 1 내지 100의 정수이다. 예를 들어 일부 양태에서, n은 1 내지 10의 정수이다. 일부 양태에서, n은 1이다. 일부 양태에서, n은 2이다. 일부

양태에서, n은 3이다. 일부 양태에서, n은 4이다. 일부 양태에서, n은 5이다. 일부 양태에서, n은 6이다. 일부 양태에서, n은 7이다. 일부 양태에서, n은 8이다. 일부 양태에서, n은 9이다. 일부 양태에서, n은 10이다.

다른 상이한 양태에서, 상기 화학식 I의 구조를 갖는 화합물은 표 3으로부터 선택된다.

[표 3]

표 3. 예시적인 화학식 II의 화합물

번호	화학식
I-1	
II-2	
II-3	
II-4	
II-5	
II-6	

번호	화학식
II-7	
II-8	
II-9	
II-10	
II-11	
II-12	<p> $z = 3, 4, 5 \text{ 또는 } 6$ $m = 2, 3, 4 \text{ 또는 } 5$ $n = 1-10$ </p>

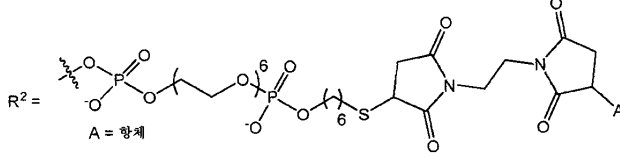
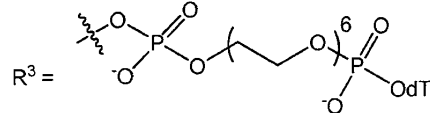
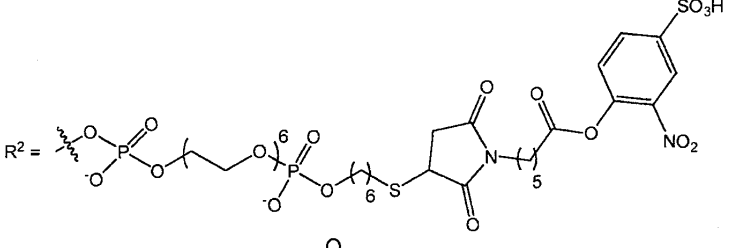
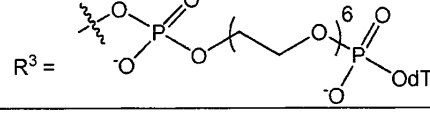
[0429]

번호	화학식
II-13	$R^2-CH_2-CH(G-L^{1a})-CH_2-\left[\left(O-P(=O)(O^-)-(OCH_2CH_2)_6 \right)_m -O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH(G-L^{1a})-CH_2-R^3 \right]_n$
II-14	$R^2-CH_2-CH(G-L^{1a})-CH_2-\left[\left(O-P(=O)(O^-)-(OCH_2CH_2)_6 \right)_3 -O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH(G-L^{1a})-CH_2-R^3 \right]_9$
II-15	$L'O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH(G-L^{1a})-CH_2-\left[\left(O-P(=O)(O^-)-(OCH_2CH_2)_6 \right)_3 -O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH(G-L^{1a})-CH_2-O-P(=O)(O^-)-OL' \right]_9$
II-16	$R^2-CH_2-CH(G-L^{1a})-CH_2-\left[\left(O-P(=O)(O^-)-(OCH_2CH_2)_6 \right)_3 -O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH(G-L^{1a})-CH_2-R^3 \right]_9$ <p> $R^2 =$ </p> <p> $R^3 =$ </p>

[0430]

번호	화학식
II-17	$ \begin{array}{c} \text{G} \text{---} \text{L}^{1a} \\ \text{R}^2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH} \text{---} \left[\text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \left(\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_6 \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{R}^3 \right]_9 \end{array} $ $ \text{R}^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \left(\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_6 \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \left(\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_6 \text{O} \text{---} \text{S} \text{---} \text{S} \text{---} \left(\text{CH}_2 \right)_6 \text{OH} $ $ \text{R}^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \left(\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_6 \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \text{OdT} $
II-18	$ \begin{array}{c} \text{G} \text{---} \text{L}^{1a} \\ \text{R}^2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH} \text{---} \left[\text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \left(\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_6 \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{R}^3 \right]_9 \end{array} $ $ \text{R}^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \left(\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_6 \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \left(\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_6 \text{O} \text{---} \text{SH} $ $ \text{R}^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \left(\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_6 \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \text{OdT} $

[0431]

번호	화학식
II-19	$R^2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{G-L}^{1a}) \text{---} \left[\text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{G-L}^{1a}) \right]_9 \text{---} R^3$ <p> $R^2 =$  $A = \text{항제}$ </p> <p> $R^3 =$  </p>
II-20	$R^2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{G-L}^{1a}) \text{---} \left[\text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{G-L}^{1a}) \right]_9 \text{---} R^3$ <p> $R^2 =$  </p> <p> $R^3 =$  </p>

[0432]

번호	화학식
II-23	$ \begin{array}{c} \text{G} \text{---} \text{L}^{1a} \\ \text{R}^2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH} \left(\text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \left(\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_6 \right)_3 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{R}^3 \\ \left[\quad \quad \quad \right]_9 \end{array} $ $ \begin{array}{c} \text{R}^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \left(\text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{O} \right)_6 \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \left(\text{CH}_2 \right)_6 \text{---} \text{SH} \\ m'' = 4 \text{ 또는 } 10 \end{array} $ $ \begin{array}{c} \text{R}^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \left(\text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{O} \right)_6 \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \text{OdT} \end{array} $
II-24	$ \begin{array}{c} \text{G} \text{---} \text{L}^{1a} \\ \text{R}^2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH} \left(\text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \left(\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right)_6 \right)_3 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{R}^3 \\ \left[\quad \quad \quad \right]_9 \end{array} $ $ \begin{array}{c} \text{R}^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \left(\text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{O} \right)_6 \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \left(\text{CH}_2 \right)_6 \text{---} \text{S} \text{---} \text{S} \text{---} \left(\text{CH}_2 \right)_6 \text{---} \text{OH} \\ m'' = 4 \text{ 또는 } 10 \end{array} $ $ \begin{array}{c} \text{R}^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \left(\text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{O} \right)_6 \text{---} \text{P} \left(\text{O}^- \right) \text{O} \text{---} \text{OdT} \end{array} $

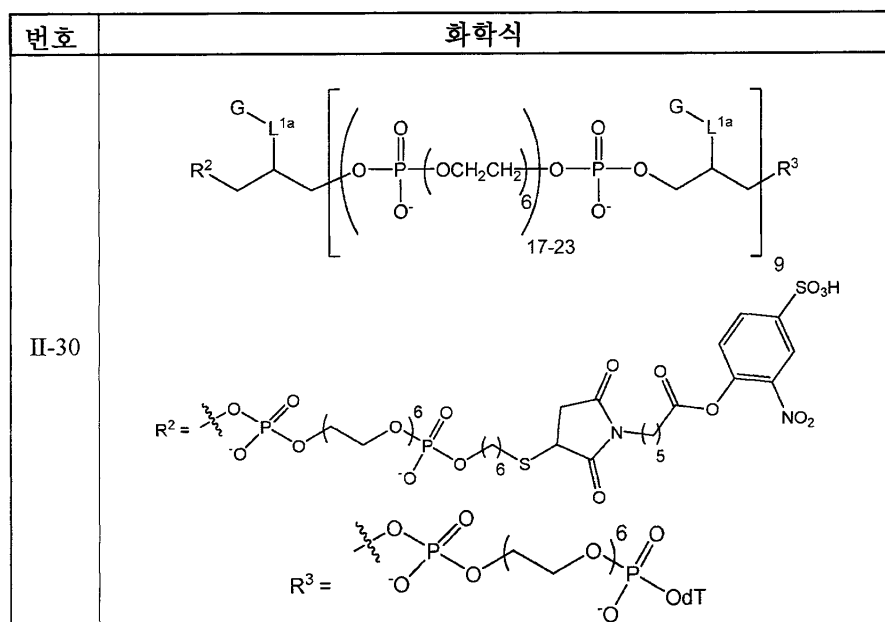
[0434]

번호	화학식
II-25	<p> $R^2 = \text{[Polymer backbone with phosphonate groups]}$ $m' = 4 \text{ 또는 } 10$ $R^3 = \text{[Polymer backbone with phosphonate groups and OdT label]}$ </p>
II-26	<p> $R^2 = \text{[Polymer backbone with phosphonate groups]}$ $R^3 = \text{[Polymer backbone with phosphonate groups and OdT label]}$ </p>

[0435]

번호	화학식
II-27	$R^2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{G}) \text{---} \left[\text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{G}) \right]_9 \text{---} R^3$ $R^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{SH}$ $R^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{OdT}$
II-28	$R^2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{G}) \text{---} \left[\text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{G}) \right]_9 \text{---} R^3$ $R^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{S} \text{---} \text{A}$ <p>A = 황제</p> $R^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{OdT}$
II-29	$R^2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{G}) \text{---} \left[\text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}(\text{G}) \right]_9 \text{---} R^3$ $R^2 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{S} \text{---} \text{S} \text{---} (\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{OH}$ $R^3 = \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6 \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}(\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{OdT}$

[0436]



[0437]

[0438]

다양한 양태에서, 표 3의 화합물의 G는 알킬닐, 예를 들어 에틸닐이다. 다른 양태에서, 표 3의 화합물의 G는 아지드이다. 다른 양태에서, 표 3의 화합물의 G는 아미노(NH₂)이다. 다른 양태에서, 표 3의 화합물의 G는 이소티오시아네이트이다. 다른 양태에서, 표 3의 화합물의 G는 활성화 에스테르, 예를 들어 N-하이드록시석신이미드의 에스테르이다.

[0439]

화학식 I의 구조를 갖는 화합물은 다양한 방법, 예를 들어 분석물, 예를 들어 분석물 분자, 또는 표적 지향 모이어티를 표지하는 방법이 제공되는 양태에서, 사용할 수 있으며, 상기 방법은,

[0440]

분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티를 표지화하는 방법으로서,

[0441]

(a) R² 또는 R³이 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 임의의 개시된 화학식 II의 구조를 갖는 화합물을, 상기 분석물 분자와 혼합하는 단계;

[0442]

(b) 상기 화합물과 상기 분석물 또는 표적 지향 모이어티의 접합물을 형성하는 단계; 및

[0443]

(c) 상기 접합물을 화학식 M-L^{1b}-G'의 화합물과 반응시켜, 적어도 하나의 G와 적어도 하나의 G'의 반응에 의해 하나 이상의 공유 결합을 형성하는 단계를 포함하며,

[0444]

여기서, M은 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 1의 공액도를 포함하는 모이어티이고;

[0445]

L^{1b}는 임의의 알킬렌, 헤테로알킬렌 또는 헤테로 원자성 링커이고; G'는 G에 대해 상보적인 반응성 그룹이다.

[0446]

상기한 양태는, 분석물, 예를 들어 분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티를 표지화하는 방법으로서, 상기 방법은,

[0447]

(a) R² 또는 R³이 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 본원에 개시된 임의의 화학식 II의 구조를 갖는 화합물을, 화학식 M-L^{1b}-G'의 화합물과 혼합하여, G와 G'의 반응에 의해 하나 이상의 공유 결합을 형성하는 단계; 및

[0448]

(b) 단계 (a)의 생성물을 상기 분석물 또는 표적 지향 모이어티와 반응시켜, 단계 (a)의 생성물과 상기 분석물 분자의 접합물을 형성하는 단계를 포함하며,

[0449]

여기서,

[0450]

M은 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 1의 공액도를 포함하는 모이어티이고;

[0451]

L^{1b}는 임의의 알킬렌, 헤테로알킬렌 또는 헤테로 원자성 링커이고;

- [0452] G'는 G에 대해 상보적인 반응성 그룹이다.
- [0453] 또한, 상기 주목된 바와 같이, 화학식 II의 구조를 갖는 화합물은 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 제조에 대하여 유용하다. 따라서, 일양태에서, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물의 제조방법이 제공되며, 상기 방법은, 화학식 II의 구조를 갖는 화합물을 화학식 $M-L^{1b}-G'$ 의 화합물과 혼합하여, G와 G'의 반응에 의해 하나 이상의 공유 결합을 형성하는 단계를 포함하며,
- [0454] 여기서,
- [0455] M은 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 1의 공액도를 포함하는 모이어티이고;
- [0456] L^{1b} 는 임의의 알킬렌, 헤테로알킬렌 또는 헤테로 원자성 링커이고;
- [0457] G'는 G에 대해 상보적인 반응성 그룹이다.
- [0458] 다음 실시예들이 예시의 목적으로 제공되며, 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0459] 실시예
- [0460] **일반 방법**
- [0461] 질량 스펙트럼 분석을 매스링스 4.1(MassLynx 4.1) 획득 소프트웨어(acquisition software)를 사용하여 Waters/Micromass Quattro 마이크로 MS/MS 시스템 상에서 (MS 유일 모드로) 실시하였다. 염료에서 LC/MS에 사용된 이동상은 100mM 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(HFIP), 8.6mM 트리에틸아민(TEA), pH 8이었다. 포스포라미다이트 및 전구체 분자를, 아세트오니트릴/물 이동상 구배를 사용하는, 45°C에서 유지된 2.1mm×50mm Acquity BEH-C18 컬럼을 갖춘 Waters Acquity UHPLC 시스템을 사용하여 분석하였다. 단량체 중간체의 분자량을 Waters/Micromass Quattro 마이크로 MS/MS 시스템 상에서 (MS 유일 모드로) 트로필륨 양이온 주입 강화 이온화를 사용하여 수득했다. 여기 및 방출 프로파일 실험을 Cary Eclipse 스펙트럼 광도계에서 기록했다.
- [0462] 달리 언급되지 않는 한, 모든 반응을 질소 대기하에 오븐 건조된 유리 제품에서 실시했다. 상업적으로 입수가 가능한 DNA 합성 시약을 Glen Research(미국 버지니아주 스티어링)로부터 구입하였다. 무수 피리딘, 톨루엔, 디클로로메탄, 디이소프로필에틸 아민, 트리에틸아민, 아세트산, 피리딘, 및 THF를 Aldrich로부터 구입하였다. 모든 다른 화학물질을 Aldrich 또는 TCI로부터 구입하고 추가 정제 없이 그대로 사용하였다.
- [0463] 실시예 1
- [0464] 에틸렌 글리콜 스페이서를 사용하는 염료의 합성
- [0465] 에틸렌 옥사이드 링커를 포함하는 화합물을 다음과 같이 제조하였다:
- [0466] 올리고플루오로시드 구조물(즉, 화학식 I의 구조를 갖는 화합물)이, 1μmol 규모의 Applied Biosystem 394 DNA/RNA 합성기 상에서 합성되고, 3'-포스페이트 그룹 또는 3'-S₂-(CH₂)₆-OH 그룹 또는 본원에 개시된 임의의 다른 그룹을 가졌다. 합성은 표준 포스포라미다이트의 화학적 성질을 사용하여 CPG 비드 상에서 또는 폴리스티렌 고정 지지체 상에서 직접 실시했다. 올리고플루오로시드는 표준 고체 상 DNA 방법을 사용하여 3' 투 5'(3' to 5') 방향으로 합성되었고, 커플링은 표준 β-시아노에틸 포스포라미다이트의 화학적 성질을 사용했다. 플루오로시드 포스포라미다이트 및 스페이서(예를 들어, 헥사에틸옥시-글리콜 포스포라미다이트, 트리에틸옥시-글리콜 포스포라미다이트, 폴리에틸렌 글리콜 포스포라미다이트) 및 링커(예를 들어, 5'-아미노-개질제 포스포라미다이트 및 티올-개질제 S2 포스포라미다이트)를 아세트오니트릴에 용해시켜 0.1M 용액으로 만들고, 다음 합성 사이클을 사용하여 연속적인 순서로 첨가했다: 1) 디클로로메탄 중 디클로로아세트산으로 5'-디메톡시트리틸 보호 그룹을 제거, 2) 아세트오니트릴에서 활성화제로 다음 포스포라미다이트의 커플링, 3) P(III)를 산화시켜 요오드/피리딘/물을 포함하는 안정한 P(V)의 형성, 및 4) 아세트산 무수물/1-메틸이미디졸/아세트오니트릴과 비반응된 임의의 5'-하이드록실 그룹의 캡핑(capping). 전체 길이의 올리고플루오로시드 구조물이 어셈블링될 때까지 합성 사이클을 반복했다. 쉘 어셈블리의 말단에서 모노메톡시트리틸(MMT) 그룹 또는 디메톡시트리틸(DMT) 그룹을 디클로로메탄 중 디클로로아세트산으로 제거했다.
- [0467] 상기 화합물을 표지된 에펜도르프(Eppendorf) 튜브의 0.2μmol 규모의 제어 공극 유리(CPG: controlled-pore glass) 지지체 상에 제공했다. 400μl의 20 내지 30% NH₄OH를 첨가하고, 온화하게 혼합했다. 개방 튜브를 ~5분 동안 또는 초과 가스가 방출될 때까지 55°C에 배치한 뒤, 단단히 밀폐하고 2시간(+/-15분) 동안 항온 처리했다.

튜브를 가열 블록으로부터 제거하고 상온에 도달시킨 후, 13,400RPM으로 30초 동안 원심분리하여 상청액 및 고형물을 강화시켰다. 상청액을 조심스럽게 제거하고, 표지된 튜브에 배치한 뒤, 150 μ l의 아세토니트릴을 가하여 지지체를 세척했다. 상기 세척액을 튜브에 가한 후, 건조될 때까지 40℃에서 CentriVap 장치에 배치했다.

[0468] 생성물을 ESI-MS(표 2 참조), UV 흡광도 및 형광 분광법으로 특성확인했다.

[0469] 실시예 2

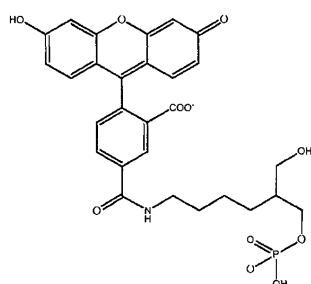
[0470] 화합물의 스펙트럼 시험

[0471] 건조된 화합물을, ~1mM의 스톡(stock)을 만들기 위해 150 μ l의 0.1M Na₂CO₃ 완충액에 재구성시켰다. 농축 스톡을 0.1x PBS로 50배로 희석하고, NanoDrop UV 분광기로 분석하여 흡광도를 판독했다. 흡광도 판독은 흡광 계수(각 FAM 단위당 75,000 M⁻¹ cm⁻¹)와 비어의 법칙을 함께 사용하여 스톡의 실제 농도를 결정했다.

[0472] 계산된 스톡 농도로부터, ~4mL의 5 μ M 용액을 0.1M Na₂CO₃(pH 9)로 만들어, 300 내지 700nm의 스펙트럼 범위를 사용하여 Cary 60 UV 분광계 상에서 1x1cm 석영 큐벳에서 분석하여, 상기 그룹에 대한 전체 흡광도를 측정했다. 이러한 5 μ M 용액으로부터, Cary Eclipse Fluorimeter 상에서의 스펙트럼 분석을 위해, (이 또한 0.1M Na₂CO₃, pH 9에서인) 50nM 또는 25nM로의 두번째 희석을 했다. 여기는 494nm에서로 설정되었고, 방출 스펙트럼은 499 내지 700nm에서 수집되었다.

[0473] 도 1 및 도 2는, 화학식 I의 대표 화합물 및 비교 화합물("화합물 A")의 UV 흡광도를 제공한다. 도 1 및 도 2에서 확인되는 바와 같이, 2개의 플루오레세인 모이어티를 포함하는 화학식 I의 대표 화합물의 UV 흡광 계수는 화합물 A의 약 2배이다.

[0474] [화합물 A]

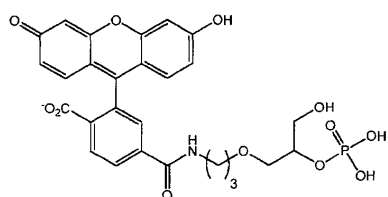


[0475]

[0476] 화학식 I의 대표 화합물의 형광 방출 스펙트럼을 측정하고, 화합물 A의 방출 스펙트럼과 비교했다. 도 3 및 도 4의 데이터에 의해 입증되는 바와 같이, 화학식 I의 대표 화합물의 형광 방출은 화합물 A보다 높고, 트리에틸렌 글리콜 또는 헥사에틸렌 글리콜 단위의 수가 증가함에 따라 방출이 증가한다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 형광 방출의 이러한 예기치 않은 증가는 L⁴에 의해 제공된 공간적 거리와 관련된 내부 켄칭의 감소와 관련이 있다고 여겨진다.

[0477] 화합물 I-10 및 화합물 I-11을 시험하여, 상기 화합물의 UV 흡광도 및 형광 방출에 대한 M 모이어티의 수의 영향을 측정했다. 도 5는 화합물 I-10 및 화합물 I-11의 UV 흡광도를 5 μ M로 단일한 M 모이어티("화합물 B")를 갖는 비교 화합물과 비교하는 데이터를 제공한다. 5 μ M에서, 화합물 I-10(3개의 FAM 단위)은 1.17AU에서 흡수되었고 화합물 I-11(5개의 FAM 단위)은 2.00AU에서 흡수된 반면, 화합물 B는 0.43AU에서 흡수되는 단일 FAM 단위를 함유한다.

[0478] [화합물 B]



[0479]

[0480] 25nM에서 화합물 I-10, I-11 및 B에 대한 형광 발광 스펙트럼을 도 6에 도시한다. (보다 밀접하게 이격된 FAM

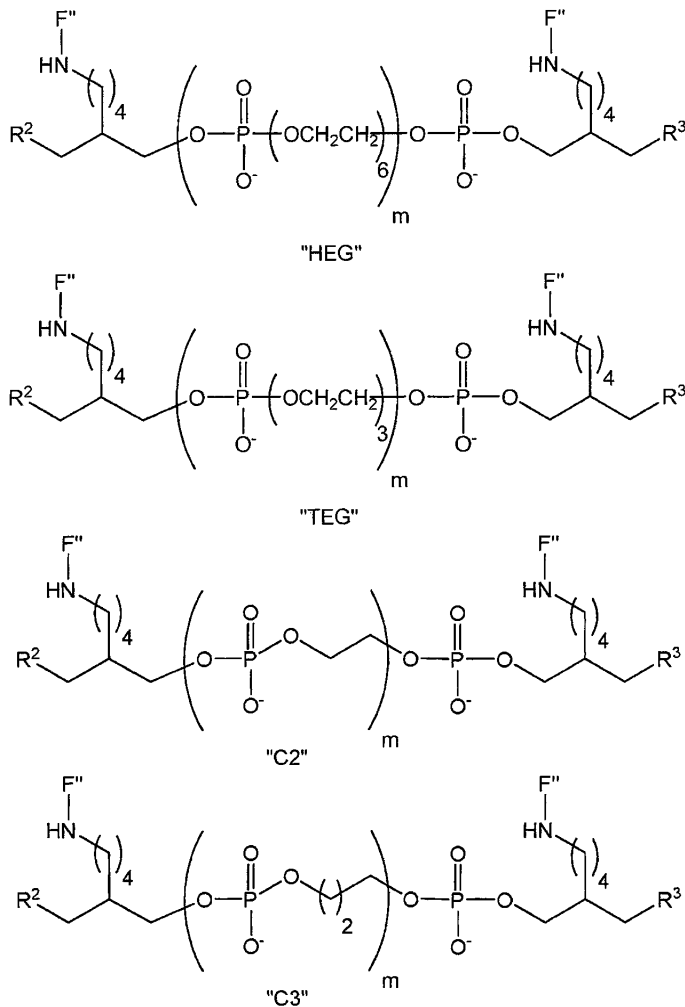
단위가 그러하듯이) 켄칭보다, 화합물 I-10 및 I-11은 화합물 B의 값에 비해 각각 2.5x 및 4.3x만큼 증가된 방출 반응을 나타냈다.

[0481] 실시예 3

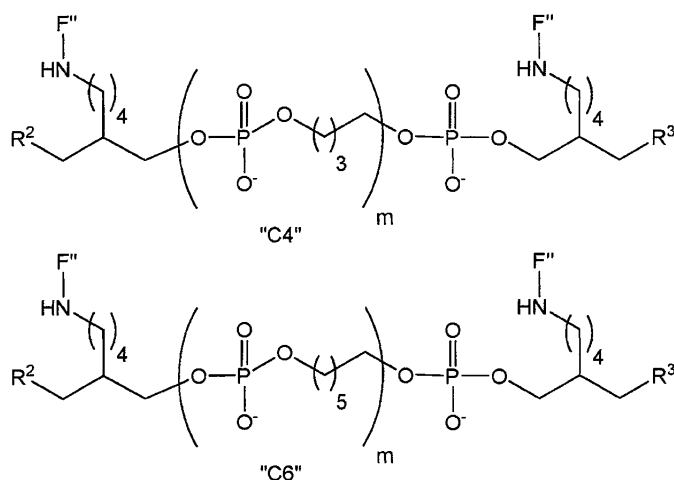
[0482] 필적하는 형광 방출 반응

[0483] R^2 및 R^3 이 화합물 I-3에서 정의된 바와 같고, m 이 1 내지 9로 다양한 화합물 "HEG", "TEG", "C2", "C3", "C4" 및 "C6"을 제조하고, 이들의 형광 방출 스펙트럼을 측정했다. 결과를 도 7에 도시했다. 데이터는 본 발명의 양태에 따른 화합물(즉, HEG 및 TEG)이 다른 염료 화합물에 비해 적은 수의 반복 스페이서 모이어티(즉, 더 낮은 m 의 값)를 갖고도 형광 방출을 증가시킨다는 것을 보여준다.

[0484] 도 8은 화합물 A(50nM, pH=9)에 비해, m 이 1, 2 또는 3인 "HEG" 화합물에 대한 형광 방출을 비교하는 데이터를 제공한다. 상기 데이터는 m 이 2 이상일 때 화합물 A에 비해 HEG에 대한 형광 방출의 증가를 도시한다.



[0485]



[0486]

[0487]

[0488]

[0489]

화합물 I-29, I-32 및 대표 유사체를 제조하고, L⁴가 긴 링커(~1,000dalton PEG)인 화합물이 더 짧은 L⁴ 링커이지만 다수의 반복체(즉, m은 1 이상임)를 갖는 화합물과 유사한 특성을 갖는지 여부를 결정했다. 도 9는, 화합물 I-60, 화합물 I-46 및 화합물 B에 대한 UV 흡광도 데이터를 제공한다. 상기 데이터는 긴 L⁴ 링커를 갖는 화합물이 더 짧은 링커의 다중 반복을 갖는 화합물의 UV 흡광도와 유사한 UV 흡광도를 나타내며, 두 화합물 모두 대조 화합물 B에 비해 흡광도를 증가시켰다.

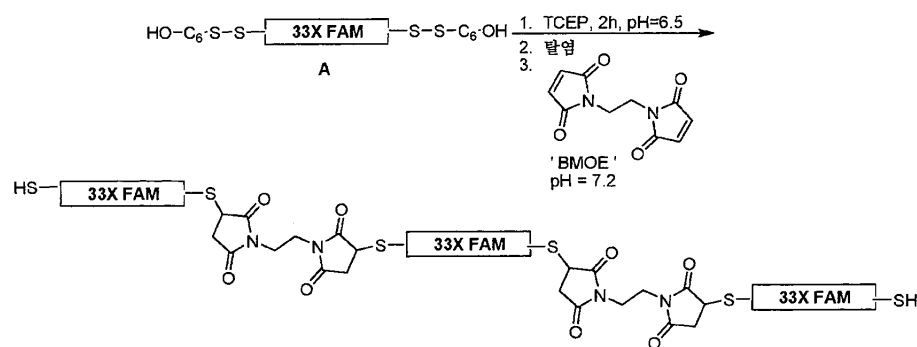
[0490]

[0491]

[0492]

99-Mer 염료의 제조

33개의 플루오레세인 모이어티를 갖는 화합물 I-42를 본원에 기재된 표준 고체 상 올리고뉴클레오타이드 기술을 사용하여 제조했다. I-42(아래 도식에서 "A"로 나타냄)는 아래 예시하고 개시한 바와 같이 삼량체화되어 99-mer 염료를 형성했다.



[0493]

[0494]

200 μ l 폴리프로필렌 튜브에, 인산나트륨 완충액(3.5 μ l, 100mM, pH=6.5) 및 I-42 비스-디설파이드 용액(5.5 μ l, 물 중 0.18mM)을 배치했다. 여기에, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP, 1.0 μ l, 물 중 10mM) 용액을 첨가했다. 상기 튜브를 캡핑하고, 볼텍싱(vortex)하고, 실온에서 2시간 동안 항온 처리했다. 상기 혼합물을 마이크로 Zeba Spin 탈염 컬럼(Pierce, Cat #89877)을 통해 탈염시켰다. 탈염된 용액을 인산 나트륨 완충액(2.0 μ l, 500 mM, pH=7.2) 및 비스말레이미도에탄의 DMSO 용액(BMOE, 1.0 μ l, 0.25mM)으로 처리하고, 실온에서 밤새 항온 처리했다. 상기 반응 혼합물을 물(100 μ l)로 희석하고, PAGE(도 10, Invitrogen EC6875, 10% TBE-우레아 겔, 180V 상수, UV 방사(365nm)에 의해 완료되고 시각화된 최고 MW 화학종의 분해능으로 정지되는 전기 영동)로 분석했다.

[0495]

임의의 원하는 수의 염료 모이어티를 갖는 다른 올리고머 염료가 유사한 방식으로 제조된다.

[0496]

실시예 6

[0497] 일반 유세포 분석법

[0498] 달리 명시하지 않는 한, 다음의 일반 절차를 다음 실시예 전체에서 사용했다.

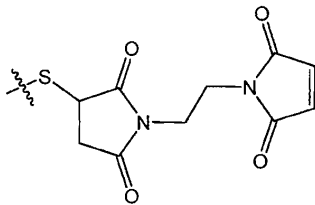
[0499] **전혈의 용해:**

[0500] **완충 염화암모늄 방법.** 살아있는 세포를 염색하기 위해, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 항응고되는 정상 인간 혈액을, 염화암모늄 용액(ACK)으로, 실온(RT)에서 15분 동안 15mL의 혈액으로부터 35mL의 용해물로 벌크 용해시킨다. 상기 세포를 50% 헵크 평형 염 용액(HBSS) 및 0.02%의 나트륨 아지드를 포함하는 50% 1% 소 태아 혈청(FBS) 1x 둘베코 포스페이트-완충 염수(DPBS)로 2회 세척했다. 이어서, 상기 세포를 공여자 혈장에 100 μ L/시험/0.1 내지 1x10⁶으로 재현탁시켰다. 혈장 내 세포를, 폴리프로필렌 96웰 HTS 플레이트에서 100 μ L의 V_f 에 대해 1% 소 혈청 알부민(BSA) 및 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 1x DPBS의 사전 희석된 항체에 첨가했다. 45분 동안 RT에서 항온배양한 후, 세포를 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 50% HBSS 및 50% 1% FBS 1x DPBS로 2회 세척했다.

[0501] **용해/고정 방법.** 혈액을 1.0mL의 RBC 용해 용액(염화암모늄)으로, 실온에서 15분 동안 100 - 15mL의 혈액으로부터 35mL의 용해물로 용해시켰다. 이후, 상기 세포를 50% HBSS 및 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 50% - 1% FBS 1x DPBS로 2회 세척했다. 이후, 세포를 공여자 혈장에 100 μ L/시험/1x10⁶으로 재현탁시켰다. 사전 희석된 항체를 100 μ L의, 1% BSA 및 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 1x DPBS에 첨가했다. 100 μ L의 세포를 96웰 폴리프로필렌 HTS 플레이트에 첨가했다(총 200 μ L 시험 크기). 45분 동안 항온배양한 후, 실온에서 상기 세포를 50% HBSS 및 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 50% 1% FBS 1x DPBS로 2회 세척했다.

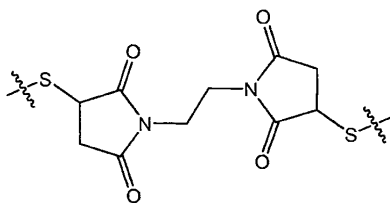
[0502] **항체 접합물의 제조:**

[0503] 항체 접합물은, 다음 구조식을 갖는 Q 모이어티를 포함하는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 원하는 항체와 반응시켜 제조했다:



[0504]

[0505] 따라서 상기 화합물 및 항체는 상기 항체 상의 S와 상기 Q 모이어티의 반응에 의해 접합되어 다음 링킹 구조를 형성한다:



[0506]

[0507] 항체 접합물은 항체 이름에 이어 화합물 번호로 표시된다. 예를 들어, UCHT1-I-45는 화합물 I-45와 UCHT1 항체 사이에 형성된 접합물을 나타낸다. 참조된 화합물 번호가 표 2의 상기 Q 모이어티를 포함하지 않는 경우, Q 모이어티가 정착되어, 생성되는 Q 모이어티를 갖는 화합물로부터 접합물이 제조되는 것으로 이해된다.

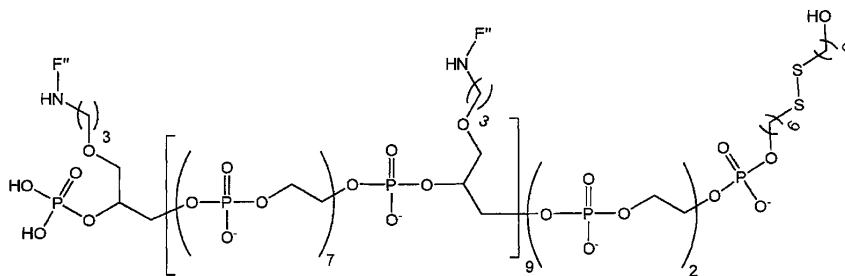
[0508] **접합물의 희석:**

[0509] 항체를 실온으로 옮겼다. 항체 접합물을 세포 염색 완충액(1X DPBS, 1% BSA, 0.02% 나트륨 아지드)에서 0.1 내지 540nM 범위의 농도(시험당 8.0 μ g 이하)로 희석시켰다. 일부 실시예에서, 각 샘플에 대한 연속 희석을 269nM의 세포 염색 완충액 중 항체에서 시작하고, 상기 항체 희석물은 사용시까지 광으로부터 보호된 채 유지되었다. 다른 실험에서는, 희석을 4.0 μ g의 항체/시험 크기에서 시작했으며, 시험 크기는 100 내지 200 μ L 범위이다. 결합 곡선을 생성하기 위해 2배 또는 4배 희석액에서 역가를 실시했다. 일부 경우, 8.0 또는 2.0 μ g/시험 크기를 희석 시리즈의 첫 번째 웰에서 사용했다.

[0510] **접합물에 대한 유세포 분석법:**

[0511] 물리적 특성확인 후, 접합물을 활성 및 관능성(항체 결합 친화도 및 염료의 명도)에 대해 시험하고, 참조 항체 염색과 비교했다. 이후, 자동 형광 음성 대조군과 비교하여 명도를, 그리고 유세포 분석기를 사용하여 다른 비 특이적 결합을 검토하여 해상도의 품질을 결정했다. MOPC-21 비특이적 결합이 이전 시험에서 UCHT1-화합물 C 및 UCHT1-I-45의 시험 동안 특성확인되었기 때문에, I-45를 시험할 때 마우스 IgG1, k 이소형 대조군 MOPC-21 접합물에 대한 광범위한 연구는 포함되지 않았다. I-45 접합물은, 저칼 T 세포, 라모스 B 세포, 및 인간 혈액 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서의 이중 세포 백혈구에서, 폴리스티렌 산양-항-마우스 Ig 코팅된 비드를 사용하여 시험했다. UCHT1 I-45 및 이의 유사체를 시험하기 위해 전혈 스크리닝이 가장 많이 반복되었다. 새로운 구조물이 형성됨에 따라 가교 연구가 실시되었다. 접합물(UCHT1-I-56, I-48, I-49, I-16 및 I-21B)을 시험할 때 추가의 유세포 분석법을 사용하고, 대부분의 연구에서 Sony Biotechnology로부터의 항체 접합물 참조(UCHT1-FITC) 및 이전에 특성확인된 주요 가교 참조(예를 들어 UCHT1-I-45, UCHT1-I-49)를 비교했다.

[0512] [화합물 C]

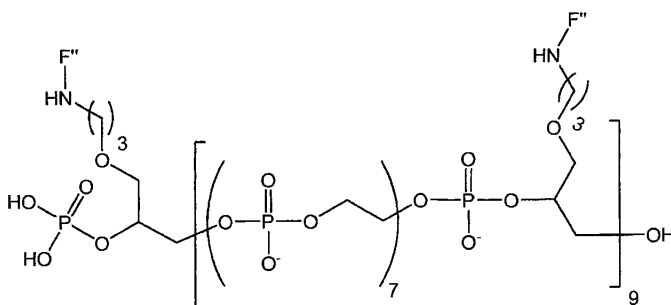


[0513]

[0514] 유리 염료 유세포 분석법 실시:

[0515] 분자 및 물리적 특성확인 후, 상기 염료를 참조 염료 염색에 비해 세포에 대한 잠재적 친화성에 대해서도 시험했다. 염료는 세포 프로브와 같은 기능에 대한 잠재력을 갖고 세포 물질에 결합할 수 있기 때문에, 일반적으로 특정한 특성을 확인하기 위해 고농도(>100nM 내지 10,000nM)의 혈액에 대해 염료를 스크리닝할 수 있다. 예상되는 또는 예상치 못한 표적 결합은, 자동 형광 음성 대조군 및 유세포 분석기를 사용하는 다른 염료 대조군과 비교하여 희석시 명도 및 선형성을 평가함으로써 평가했다. 화합물 D(화합물 C 유리 염료이지만, 관능화되지 않음)의 연구는, 염료의 밝은 타겟 결합에 대한 양성 대조군이었고, 접합물 형태일 때 사전 특성확인되었다. I-45 염료는, 세포가 용해 및 고정 용액으로 처리되고, 혈액이 노화되거나 PBMC 단핵구 집단에 적용될 때, 인간 혈액에서 백혈구의 이중 집단에 대해 시험되었다. 염료 로트 비교를 위해 친화도를 등급화하는 가교 시험(화합물 D, I-45, I-49 및 I-16)을 실시하고, 화합물 D를 특성확인할 때 매우 초기 연구로부터의 염료를 포함시켰다.

[0516] [화합물 D]



[0517]

[0518] 유세포 분석법 작업흐름:

[0519] 세포를 항온배양하여, 염료 스크리닝 또는 표적 결합 해제를 위한 대사성 스트레스의 시각적 징후를 관찰하거나(데이터는 나타나지 않음), 새로운 건강한 세포를 접합물 스크리닝에 사용했다. 세포 밀도를 주기적으로 계수했다(1 x 10⁵ 및 1 x 10⁶개의 생존 세포/mL). 항체 접합물을 염색 완충액(DPBS, 0.1% BSA, 0.02% 나트륨 아지드)에서 세포를 채취하기 전에(바람직하게는 플레이트 또는 튜브에서) 희석시켰다. 80 내지 85%의 생존 범위를 가진 세포를 사용했다. 세포를 원심분리하고 완충액으로 세척하여 pH 지시약을 제거하고, FBS에 함유된 Ig 및 다른 단백질로 세포를 블로킹함으로써 세포를 2회 세척했다. 세포 밀도는 염색 완충액에서 시험 크기로 조정했다. 세포를 플레이트하고, 웰당 1개의 시험 또는 염료(사전 희석)를 플레이트의 세포에 가했다. 이후, 상기 세포를 23℃에서 45분간 항온배양했다. 상기 세포를 원심 분리하고 세척 완충액으로 세포를 세척한 뒤 상

기 플레이트를 흡인함으로써 2회 세척했다. 세포를 획득 완충액에 재현탁시켰다. 5000개의 손상되지 않은 세포를 유세포 분석법으로 획득했다.

[0520] 염료의 형광을 525/50 밴드패스 필터를 사용하여 검출된 피크 방출(521nm)을 갖는 유세포 분석법으로 488nm 청색 레이저 라인에 의해 검출했다. 3,000 내지 5,000개의 손상되지 않은 세포의 표적 획득을 포함하여, 적어도 1,500개의 손상되지 않은 세포를 유세포 분석법으로 수집하고, 세포 제조시 존재하는 생존가능한 세포를 확인하기 위해 분석했다.

[0521] 데이터 분석 방법:

[0522] 기술 통계. EC-800 소프트웨어는 사용자에게 각 샘플 획득에 대한 수많은 통계 데이터를 수집할 수 있게 한다. FL1-A 채널의 평균 또는 중간 형광 강도(MFI: Mean Fluorescence Intensity)는, 항체-염료 시약의 명도가 유세포 분석법으로 조사되고 잡음이 검토될 때 항체-염료 시약의 명도를 측정하는 데 사용했다. 다른 통계치를, 중간 신호 대 잡음 및 절대 형광(중간 또는 기하 평균)을 포함하는 시약의 염료 특성과 전반적인 품질을 결정하기 위해 평가했다.

[0523] 히스토그램. 유세포 분석법 사건은 전방 대 측면 산란(세포 부피 대 세포 과립도)의 크기에 의해 게이팅했다 (gated). 이후, 이러한 세포들을 평균 형광 강도(MFI)에 대해 515nm에서의 형광 발광에 의해 게이팅했다. 수집된 데이터는 x축의 로그 스케일로 표시되는 형광 강도 대 y축의 사건의 수로 플로팅된 이중 파라미터 히스토그램으로 표시된다. 데이터는 친화성 곡선, 또는 상대 형광 강도의 히스토그램으로 요약될 수 있다.

[0524] 결합 곡선. MFI는 FCM으로 조사할 때 항체-염료 시약의 명도를 가장 잘 측정하는 파라미터이기 때문에 선택되었다. 이는 기하 평균, 중간 또는 평균으로 표현할 수 있으며, 절대 형광 측정을 나타낸다. 비교를 위해, 잡음이 매우 잘 확인될 수 있는 곳에서는 신호 대 잡음 비가 MFI, S/N으로 보고된다. 실시예 7, 8 및 14에서, UCHT1-화합물 C 접합물의 MFI 대 농도가 시약의 결합 곡선을 입증하기 위해 도시된다.

[0525] 이중 변량, 이중 파라미터 히스토그램. 일부 경우, FCM 사건은 질적 결과를 검토하기 위해 게이팅되지 않았으며, 데이터는 세포 과립도(SSC) 대 염료 형광으로 표현된다. 이러한 방법은 전혈에서 회수된 모든 집단에 대한 전반적인 평가를 가능하게 한다.

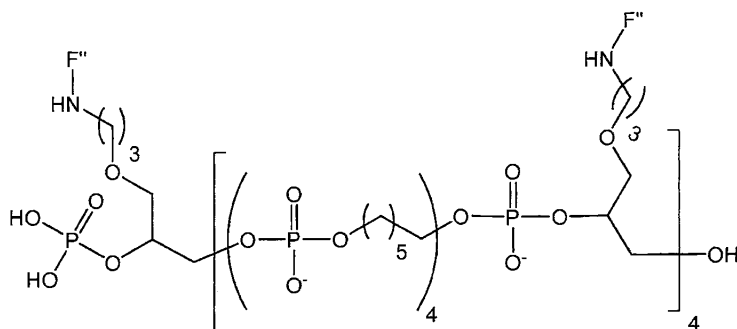
[0526] 실시예 7

[0527] 열 스트레스가 가해진 저칼 T 세포의 괴사 및 자멸사 집단을 사용하는

[0528] 비특이적 및 비표적 결합을 위한 염료의 평가

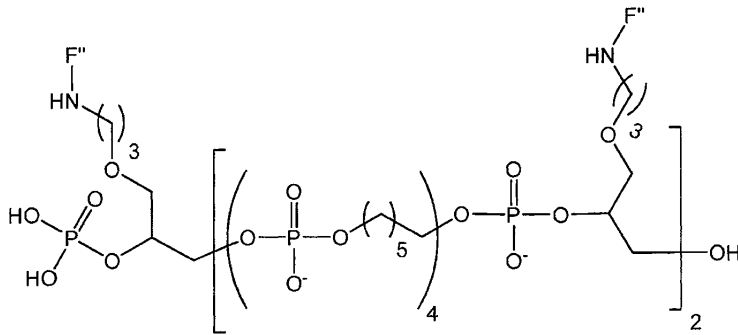
[0529] 저각 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)이 제공하는 지시에 따라 항온배양하고, 생육하고, 열 스트레스를 받고, 2 내지 3회 세척하고, 접합물 항체로 염색된다. 염색은 사전 희석된 염료 및 사전 희석된 접합된 항체에 세포를 적용하고, 항온배양하고, 세척한 뒤, 유세포 분석법으로 획득함으로써 실시했다. 죽은 및 괴사성 세포 집단(획득된 세포의 ~10%)을 형광 신호에 대해 평가했다. 그 결과를 도 11에 도시한다. 도 11에 도시된 바와 같이, 형광은 10x I-47, 5x 화합물 E, 5x I-44, 3x 화합물 F 및 3x I-43에 비해 10x 화합물 D 유리 염료에서 더 높게 관찰된다.

[0530] [화합물 E]



[0531]

[0532] [화합물 F]



[0533]

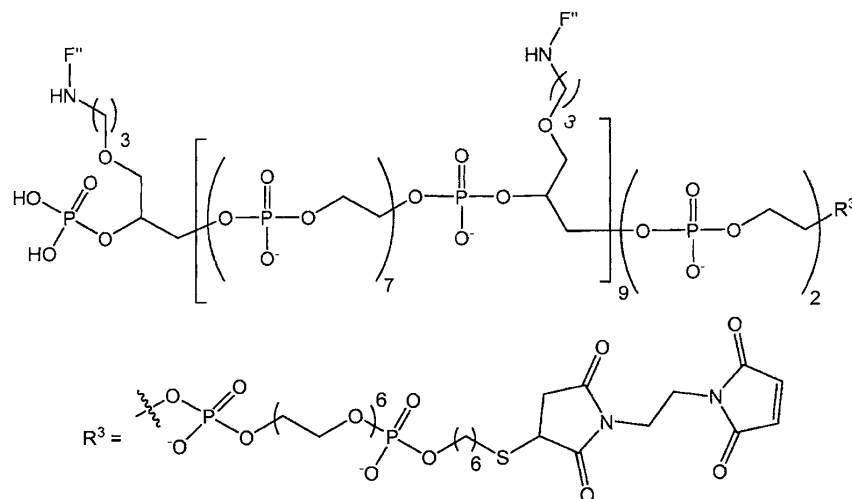
[0534] 실시예 8

[0535] 형광 강도에 대한 접합물의 평가: UCHT1-화합물 G 대 UCHT1-I-51

[0536] 생존가능한 저각 세포를 ATCC가 제공하는 지시에 따라 항온배양하고 수확한 뒤, 23℃로 세트된 온도 조절 원심 분리기에서 6분 동안 ~225RCF에서 회복시켰다. 상청액을 제거했다. 이후, 세포를 세포 현탁액 완충액(칼슘 및 마그네슘을 함유하지 않는 1x DPBS, 1.0% FBS, 0.02% 나트륨 아지드, pH 7.2)에서 2회 세척했다. 두번째 세척 후, 세포를 원심분리하고, 상청액을 제거한 뒤, 세포(샘플당 $\sim 5 \times 10^5$ 개의 생존가능한 세포)를 시험 크기(최종 용적 $100 \mu\text{l}$)로 재현탁했다. 세포를 항체 염료 접합물 용액으로 45분 동안 실온에서 항온배양했다. 항온배양 후, 샘플을 2회 세척한 뒤, 획득 완충액에 현탁시켰다.

[0537] 데이터를 획득하고 SONY EC-800 FCM 상에서 평가하고, 도 12에 도시한 바와 같이 nM의 항체 단백질 대 상대 형광의 기하 평균을 플로팅했다. 확인할 수 있는 바와 같이, MOPC-21-화합물 G는 비특이적 결합을 갖지만, 접합물 둘 다는 FITC 참조보다 4 내지 5배 더 밝다. 이러한 실시예는 MOPC21-I-51이 UCHT1-화합물 G 접합물(표지(DOL) 수준의 이들 염료에서)과 비교하여 감소된 비특이적 결합을 나타내는 것도 보여준다.

[0538] [화합식 G]



[0539]

[0540] 실시예 9

[0541] 이중 세포 샘플 및 말초 전혈 세포에서의 CD3 발현(특이성 및 해상도) 평가

[0542] 정상 공여자로부터 전혈을 뽑아 수송 및 단기 저장용 EDTA 안정화된 샘플 튜브 내로 옮겼다. 상기 혈액을 ACK를 사용하여, 실온에서 15분 동안 15mL 혈액으로부터 35mL의 용해물로 용해시켰다. 상기 세포를 50% 헵크 평형 염 용액(HBSS)과 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 50% 내지 1% FBS 1x DPBS로 2회 세척했다. 세포를 공여자 혈장에 $100 \mu\text{l}$ /시험/ 1×10^6 으로 재현탁시켰다. 항체를 $100 \mu\text{l}$ 의, 1% BSA 및 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 1x DPBS에 사전 희석하고, 폴리프로필렌 96웰 HTS 플레이트에서 $100 \mu\text{l}$ 의 세포에 첨가했다(총 $200 \mu\text{l}$ 의 시험 크기). 상기 세포를 45분 동안 항온배양했다. RT에서 50% HBSS 및 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 50% 내지 1% FBS

1x DPBS로 2회 세척하고, 0.02% 아지드를 포함하는 1% FBS 1x DPBS에 재현탁시켰다.

- [0543] 도 13은, I-51 접합물과 화합물 G 참조 항체의 비교를 도시한다. 도 13에서, 세포 모폴로지(SSC-Lin)는 FL1-A 채널에서 검출된 염료 방출을 포함하는 이중 파라미터 히스토그램으로 도시된다. 이는, 주로 호중구와 단핵구의 세포의 이중 집단에 대한 화합물 G 접합물의 비특이적 결합(NSB)을 도시하는 반면, I-51 접합물은 NSB를 나타내지 않는 것을 나타낸다. 용해된 전혈에서의 UCHT1-화합물 G의 NSB는 CD3에 결합하는데 이용가능한 항체를 효과적으로 감소시킨다
- [0544] 도 14는, UCHT1-I-51, UCHT1 BB515 및 UCHT1-FITC의 비교를 도시한다. UCHT1-I-51은 UCHT1-FITC보다 6배 더 밝다.
- [0545] 실시예 10
- [0546] 등가물 플루오로크롬의 분자(MEF: Molecules of Equivalent Fluorochrome) 표준 곡선과 비교한 CD3의 발현 수준
- [0547] 용해된 전혈을 사용하여, 높은 항원 밀도 CD3 발현을 형광 강도 결과로 시각화하고, MEF 값을 추정하기 위해 6 피크(또는 8피크) 비드 형광 출력(Sony Biotech, Cat. No. AE700520)과 비교했다. 참조로 사용되는 UCHT1-FITC, UCHT1-화합물 G 및 UCHT1-I-51 및 추가 참조 접합물로 사용되는 UCHT1-BB515를 표준 절차를 사용하는 동일한 실험에서 비교했다. 6피크 비드는 6가지 상이한 형광 강도의 3.8micron 비드의 혼합물로 구성되며, 해당 프로토콜에서 병렬로 실행시 장비의 선형성과 민감도를 검증하고 MEF를 추정하기 위해 사용된다.
- [0548] 도 15는, MEF 표준 곡선과 비교한 CD3의 발현 수준을 도시한다. 확인할 수 있는 바와 같이, I-51은 참조보다 약 6배 더 밝으며, 화합물 G는 약 2배 밝다. 표시된 농도 범위는 133nM 이하이다. 비교에서, 도 13은 용해된 전혈에서의 UCHT1-화합물 G의 비특이적 결합이 CD3에 대한 결합에 이용가능한 항체를 효과적으로 감소시켰다는 것을 도시하는 것을 주목한다.
- [0549] 실시예 11
- [0550] UCHT1 I-16 분획과 FITC 및 I-56 접합물의 비교
- [0551] 비드를 전처리(불텍싱 및 초음파 처리)하고 세척하고, 예비 실험에서 결정된 바와 같이 비드 수치를 2배 C 희석으로 보정하여, 획득을 최적화하고 선형 포화 곡선을 표적으로 했다. 비드를 항체 접합물과 함께 항온 처리하고, 세척한 뒤, 유세포 분석법으로 수득했다. 1x DPBS 중 BSA 용액 0.1%를 비드 희석, 세척 및 획득에 사용했다. 항체를 96웰 폴리프로필렌 플레이트에서 1% BSA 염색 완충액으로 사전 희석하여, 첫 번째 웰의 200 μ l 용적에서 4.0 μ g으로 시작한 다음, 적어도 8회 희석하여 각 후속 웰에 100 μ l로 연속 희석시켰다(2배). 이후, 철저히 불텍싱된 비드(2x C에서)가 첨가되고, 100 μ l의 비드를 각 웰의 100 μ l의 항체에 첨가했다. 상기 비드를 실온에서 20분 동안 항온 처리하고, 세척하고, 유세포 분석법으로 획득했다.
- [0552] 그 결과를 도 16에 도시한다. DOL ~3.0에서의 UCHT1-I-16은 이론적인 최대치에 도달했다. 도 17에 도시된 바와 같이, 유사한 실험을 실시하여 UCHT1-I-16과 더 긴 채(tether)를 포함하는 가교 참조인 UCHT1-I-56의 주목된 진화도 곡선 차이를 강조했다.
- [0553] 실시예 12
- [0554] UCHT1 I-56(10x) 및 UCHT1 I-53(6x)과 비교한 UCHT1 I-51 유사 유사체, UCHT1 I-16
- [0555] 서서히 로킹(rocking)하면서 말초 WBC를 용해 완충액으로 처리하고, 25℃에서 20분 동안 ACK로 완충하는 동시에, 원심분리하고 상기 용해 완충액을 제거했다. 세포를 pH 7.2의 HBSS로 1회 세척한 뒤, 0.5% FBS를 함유하는 1x HBSS 및 pH 7.2의 0.02% 나트륨아지드로 세척하고, 염색 완충액(1xDPBS, 1% BSA, 0.02% 나트륨아지드, Ph 7.2)에 재현탁시킨다. 이어서, 세포를 사전 희석된 접합된 항체에 가하고, 광으로부터 보호된 23 내지 25℃에서 40분 동안 항온배양했다.
- [0556] 도 18은, UCHT1-I-51 유사 유사체, UCHT1-I-16과 UCHT1-I-56(10x), 및 UCHT1-I-53(6x)의 비교를 도시한다.
- [0557] 실시예 13
- [0558] UCHT1 I-56(10x) 및 UCHT1 I-53(6x)과 비교한 UCHT1 I-51 유사 유사체, UCHT1 I-16
- [0559] 항체를 유세포 분석법으로 특이적 결합 및 형광 해상도에 대해 평가했다. 저각 세포를 ATCC에서 제공된 지시에 따라 항온배양하고 생육했다. 세포가 사전 희석된 접합된 항체에 적용되고, 20 내지 40분 동안 항온배양되고,

세척된 후, 유세포 분석법으로 획득될 때 염색을 실시했다. UCHT1-I-51 유사 유사체, UCHT1-I-16을 UCHT1-I-56(10x) 및 UCHT1-I-53(6x)과 비교했다. 그 결과를 도 19에 도시한다.

- [0560] 실시예 14
- [0561] 회귀 분석에 의한 UCHT1의 접합물 해상도의 비교
- [0562] 세포를 말초 혈액으로부터 단리하고, 동결 완충액 중에서 동결시켰다. 세포를 해동시키고, 휴식시키고, 자가 혈장으로 처리하여 FcR을 블로킹하고 전혈 환경을 모방하고, 2 내지 3회 세척한 뒤, 전혈을 사용할 때와 같이 접합물로 염색했다. 비드는 획득을 최적화하고 항체 염색에서 포화를 표적하기 위해 사전 보정되었다. 비드를 항체 접합물과 함께 항온 처리하고, 세척한 뒤, 유세포 분석법으로 수득했다.
- [0563] UCHT1-I-16 및 UCHT1-I-49를 시험할 때 생성된 데이터에 대해 회귀 분석을 실시하여, 접합 간의 등가성을 입증했다. 그 결과를 도 20에 도시한다.
- [0564] 실시예 15
- [0565] I-49 및 I-16의 전혈에서의 원료 염료의 친화성 시험
- [0566] 염료는 전혈을 염색, 용해, 고정, 및 세척 전혈 방법을 사용하여 스크리닝하여, 과량의 염료의 존재하에서의 동등성 시험에서 단핵구, 과립구, 및 림프구의 3가지 집단의 배경을 평가했다. 전혈에 존재하는 과립구가 분석의 주된 표적으로 선택되었다. 림프구와 단핵구도 연구되었지만 회귀 그래프에는 데이터를 표시하지 않았다.
- [0567] 원료 염료를, 2개의 거의 동일한 구조물 사이의 비특이적 결합 차이를 강조하기 위해, 뿐만 아니라 평가하기 위해 항체 접합물이 존재하지 않고 과잉으로(제1 적정을 10,000nM에서 출발함) 사용했다. 말단 WBC를 25℃에서 20분 동안 완충된 ACK인 용해 완충액으로 처리하는 동시에 서서히 로킹하고, 원심분리하고, 상기 용해 완충액을 제거했다. 적혈구 용해 및 고정 용액을 염료 및 세포에 가한 뒤, 세포를 우선 pH 7.2의 HBSS로 세척한 뒤, 0.5% FBS를 함유하는 HBSS 및 pH 7.2의 0.02% 나트륨 아지드로 세척한 뒤, 염색 완충액(1x DPBS, 1% BSA, 0.02% 나트륨 아지드, pH 7.2)에 재현탁시켰다.
- [0568] 관련 MFI 데이터를 농도 매칭하고, 회귀 분석에 의해 비교하여, 원료 I-45와 I-16 사이의 일치 수준 또는 유사성을 입증했다. 이 시험에서, I-45와 I-16은 거의 동일한 수준의 배경을 가졌다. 염료 스크리닝으로부터 동일한 데이터를 사용하여, I-45 유사체(I-49와 I-16)는 전체 적정 곡선 및 대조군을 검사할 때, 서로 오버레이된다. 참조용으로 포함된 대조군의 MFI들 사이에 있는 I-45 유사체는 화합물 D(10x), 및 보다 긴 알킬렌 스페이서 그룹을 갖는 2개의 유사체 화합물 D(유사체 i 및 ii)였다. I-49는 I-16보다 약간 높은 배경을 가지며, I-16 배경은 I-45와 매우 유사하다. 10x 형광단 구조물은 6x보다 비특이적 결합에서 더 어두우며, 10x 분자의 비특이적 결합 특성을 감소시키면서 추가적인 형광단을 수용하기 위한 주쇄 조절의 효과를 입증한다. 그 결과를 도 21a 내지 도 21c에 도시한다. 도 21a는 I-16과 I-45 사이의 상관 관계를 도시한다. 도 21b는 적정 곡선 오버레이를 도시하고 참조와 비교하며; 도 21c는 화합물 D와 I-45를 비교하는 배경 FL 및 세포 모폴로지를 도시하는 예시적인 정성적 데이터를 도시한다.
- [0569] 실시예 16
- [0570] 72시간 동안 고정 및 저장되었던 혈액 세포에서의
- [0571] UCHT1-I-21B와 UCHT1-I-16의 비교
- [0572] 정상 공여자로부터 전혈을 뽑아 수송 및 단기 저장용 EDTA 안정화된 샘플 튜브 내로 옮겼다. 혈액을 항체로 염색하기 전이나 후에 용해제로 처리했다. 세포를, 실온에서 15분간 15mL 혈액에서 35mL로 용해물로 ACK로 용해한 뒤, 50% HBSS 및 0.02% 나트륨아지드를 포함하는 50% 1% FBS 1x DPBS 로 2회 세척했다. 세포를 공여자 혈장에서 100 μ L/시험/1 \times 10e6으로 재현탁시켰다. 100 μ L의, 1% BSA와 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 1x DPBS의 사전 희석된 항체를 100 μ L 세포에 첨가한 뒤, 96웰 HTS 폴리프로필렌 플레이트에 첨가했다(총 200 μ L의 시험 크기). 45분 동안 실온에서 세포를 항온배양한 후, 상기 세포를 50% HBSS + 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 50% 1% FBS 1x DPBS로 2회 세척했다. 이어서, 상기 세포를, 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 1% FBS 1x DPBS에 재현탁시켰다. 세포를 다시 한번 세척하고, 2% 파라포름알데히드 C에 고정시키고, 1x DPBS를 사용하여 다시 한번 세척한 뒤, 1x DPBS에서 0.1% BSA를 사용하여 수득했다.
- [0573] 접합물의 해상도를, 참조, UCHT1-FITC 및 DOL 3.0의 이론적 명도와 비교했다. 새로운 구조 UCHT1-I-21B는, DOL이 이러한 방법에서 3.0일 때 이론적으로 가장 잘 매칭되며, UCHT1-FITC보다 7배 더 밝다. 도 22에 도시된

바와 같이, 히스토그램으로서의 친화도 곡선은 FL1-A 채널에서 검출된 화합물 방출을 포함하여 도시된다.

[0574] 과립구의 형광을 측정함으로써 비특이적 결합의 평가를 완료했다. 도 23은, UCHT1-I-21B, UCHT1-I-16 및 참조인 UCHT1-FITC의 비특이적 결합의 표적을 벗어나는 형광 강도의 비교를 도시한다. UCHT1-I-21B의 모든 분획물 및 복제물은 다른 구조물보다 적은 배경을 나타내고, FITC 참조는 상기 시험에 포함된다. 도 24에 도시된 바와 같이, 회귀 분석을 데이터에 적용하여 상관 관계 및 상대 친화력을 검토했으며, UCHT1-I-21B는 UCHT1-I-16과 선형 관계가 없는 것으로 확인되었다.

[0575] 실시예 17

[0576] 저각 세포 모델 및 단순 2점 역가를 사용하는 UCHT1 I-21B

[0577] 실시예 16과 유사하게, UCHT1 I-21B의 시험은 항체의 시험당 2.0 및 0.125 μ g의 단순한 2점 역가로 실시했다. 저각 세포를 ATCC에서 제공한 지시에 따라 항온배양하고, 생육되거나 열 스트레스를 받고, 2 내지 3회 세척한 뒤, 접합물 항체로 염색했다. 세포가 사전 희석된 접합된 항체에 적용되고, 항온배양되고, 세척되고, 이어서 유세포 분석법으로 획득될 때 염색을 실시했다.

[0578] 도 25에 도시된 바와 같이, UCHT1-I-21B는 예상대로 UCHT1-I-51에 비해 낮은 농도에서 더 높은 친화성을 입증한다. 실제 신호 대 잡음 비는 시험당 0.125 μ g의, 부 포화도 C에서의 이론치를 초과하며 UCHT1-I-51을 능가한다.

[0579] 실시예 18

[0580] PBMC를 사용하는 혈장 간섭 연구에서의 UCHT1 화합물 G와 UCHT1 I-51의 비교

[0581] PBMC와 자가 혈장은 이전에 말초 혈액으로부터 단리한 뒤, 냉동 매체에서 동결시켰다. 세포를 해동하고, 잠시 쉬고, 2 내지 3회 세척한 뒤, 전혈로부터 새롭게 단리되는 것처럼, 접합물 항체로, 자가 혈장으로, 또는 항체 염색 동안 존재하는 HBSS로 염색했다.

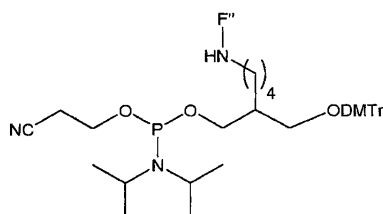
[0582] UCHT1-화합물 G는 단핵구와 상호 작용하여, 활성화 및 비활성화된 공여자 혈장의 존재하에 그리고 2.5% 글리신의 첨가하에 형광 사건을 형성한다. 도 26a는 0% 글리신의 첨가로부터 생성되는 결과를 도시하고, 도 26b는 2.5% 글리신의 첨가로부터 생성되는 데이터를 도시한다. 쯔비터이온 아미노산 글리신은, 면역 분석에서 천연 폴리아민에 대한 아미드 결합 또는 천연 폴리아민에 의한 블로킹에 대한 대리 친화성의 역할을 하며, 따라서, 살아있는 세포의 염색 시스템에서 다른 시약의 효과를 과장하거나 블로킹한다. PBMC에 재도입된 혈장은 (1) 보 완제를 사용하여 혈소판을 정상 수준으로 활성화시키거나, (2) 대부분의 혈소판을 제거하기 위해 열, 여과 및 원심분리에 의해 (혈장 보완 및 기타 요인 모두) 비활성화된다. 비활성화 혈장은 블로킹제로서 더 많이 작용하는 반면, 활성화 혈장은 높은 간섭을 가질 것으로 예상된다.

[0583] 본 연구는 혈액이 동원되거나, 혈장이 존재하거나, 잔류하거나, 희석되거나 세척제거될 때, 전혈에서 가능한 다양한 효과를 모방한다. 화합물 C 및 I-45는 예상되는 거동의 뚜렷한 차이를 보여주며, 배경 결합의 감소 및 I-45에 대한 구조적 개질에 의한 활성의 명백한 개선을 지지한다. 일반적으로, 글리신은 존재하는 경우 I-51의 배경 염색을 약간 향상시키고, UCHT1-화합물 G의 특히 특히 비활성화 혈장 및 무용매 대조군에서의 배경을 억제하는 반면, UCHT1-I-51 배경은 화합물 G와 비교하여 제한된다는 것이 관찰된다. 전반적으로, UCHT1-화합물 G는 보다 높은 단핵구 배경을 갖는다.

[0584] 실시예 19

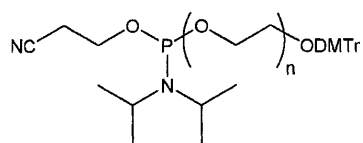
[0585] 포스포라미다이트 및 화합물의 제조

[0586] 예시적인 화합물은 표준 고체상 올리고뉴클레오타이드 합성 프로토콜 및 아래 화학식을 갖는 플루오레세인 함유 포스포라미다이트를 사용하여 제조하였으며, 이는 ChemGenes(Cat.# CLP-9780)으로부터 구입했다:



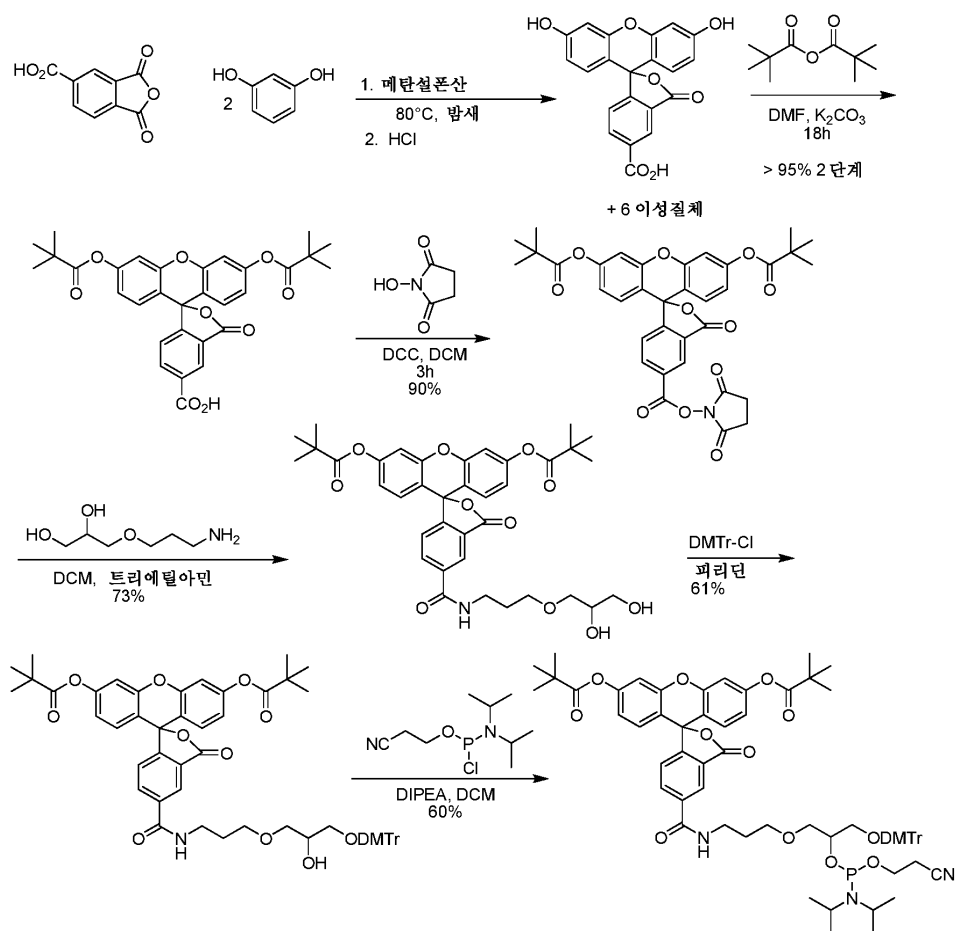
[0587]

[0588] 다음 구조식을 갖는 포스포라미다이트와의 커플링에 의해 예시적인 링커(L⁴)가 화합물에 포함되었으며, 이 또한 상업적으로 입수가 가능하다:



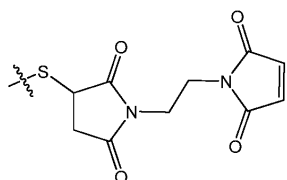
[0589]

[0590] 다른 예시적인 화합물은 하기 반응 도식에 따라 제조된 포스포라미다이트를 사용하여 제조했다:



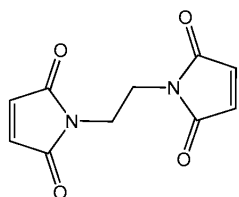
[0591]

[0592] 최종 탈보호는 원하는 F'' 모이어티를 생성한다. 다른 상업적으로 입수가 가능한 포스포라미다이트 시약이 화합물의 다양한 부분을 정착되기에 적절하게 사용되었다. 다음 화학식:



[0593]

을 갖는 Q 모이어티는,



[0594]

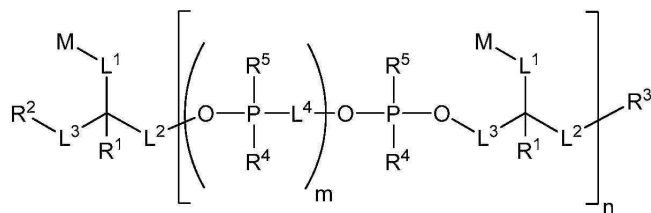
와 유리 설프하이드릴의 반응에 의해 정착된다. 다른 Q 모이어티는 당업자의 지식에 따라 유사한 방식으로 정착된다.

[0595]

대표 양태는 다음을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0596] 양태 1. 화학식 I의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 입체 이성질체, 염, 또는 토포머.

[0597] [화학식 I]



[0598]

[0599] 상기 화학식 I에서,

[0600] M은 각각의 발생시 독립적으로, 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 1 이상의 공액도를 포함하는 모이어티이고;

[0601] L¹은 각각의 발생시 독립적으로, i) 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이거나; 또는 ii) 2개의 상보적인 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능성 그룹을 포함하는 링커이고;

[0602] L² 및 L³은 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이고;

[0603] L⁴는 각각의 발생시 독립적으로, 길이가 3개 원자 이상인 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고, 이들의 헤테로 원자는 O, N 및 S로부터 선택되고;

[0604] R¹은 각각의 발생시 독립적으로, H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0605] R² 및 R³은 각각 독립적으로, H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 헤테로알킬, -OP(=R_a)(R_b)R_c, Q, 또는 이들의 보호된 형태이거나, 또는 L'이고;

[0606] R⁴는 각각의 발생시 독립적으로, OH, SH, O⁻, S⁻, OR_d 또는 SR_d이고;

[0607] R⁵는 각각의 발생시 독립적으로, 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

[0608] R_a는 O 또는 S이고;

[0609] R_b는 OH, SH, O⁻, S⁻, OR_d 또는 SR_d이고;

[0610] R_c는 OH, SH, O⁻, S⁻, OR_d, OL', SR_d, 알킬, 알콕시, 헤테로알킬, 헤테로알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

[0611] R_d는 짝이온이고;

[0612] Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티 또는 이의 보호된 형태이고, 분석물 분자, 표적 지향 모이어티, 고형 지지체 또는 상보적인 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있고;

[0613] L'는, 각각의 발생시 독립적으로, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체 잔기에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

[0614] m은, 각각의 발생시 독립적으로, 0 이상의 정수이며, 단, 하나 이상의 m의 발생은 1 이상의 정수이고;

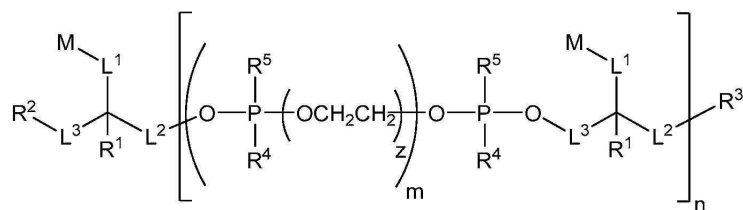
[0615] n은 1 이상의 정수이다.

[0616] 양태 2. L⁴가 각각의 발생시 독립적으로, 헤테로알킬렌 링커인, 양태 1의 화합물.

[0617] 양태 3. L^4 가 각각의 발생시 독립적으로, 알킬렌 옥사이드 링커인, 양태 2의 화합물.

[0618] 양태 4. L^4 가 폴리에틸렌 옥사이드이고, 화학식 IA의 구조를 갖는, 양태 1의 화합물.

[0619] [화학식 IA]



[0620]

[0621] 상기 화학식 IA에서,

[0622] z 는 2 내지 100의 정수이다.

[0623] 양태 5. z 가 3 내지 6의 정수인, 양태 4의 화합물.

[0624] 양태 6. L^1 이 각각의 발생시, 2개의 상보적인 반응성 그룹의 반응에 의해 형성할 수 있는 관능성 그룹을 포함하는 링커인, 양태 1 내지 양태 5 중 어느 하나의 화합물.

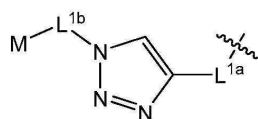
[0625] 양태 7. L^1 의 하나 이상의 발생에 대하여, 상기 관능성 그룹이, 알데하이드, 옥심, 하이드라존, 알킨, 아민, 아지드, 아실아지드, 아실할라이드, 니트릴, 니트론, 설포하이드릴, 디설파이드, 설포닐 할라이드, 이소티오시아네이트, 이미도에스테르, 활성화 에스테르, 케톤, α, β -불포화 카보닐, 알켄, 말레이미드, α -할로이미드, 에폭사이드, 아지리딘, 테트라진, 테트라졸, 포스핀, 비오틴 또는 티이관 관능성 그룹과 상보적인 반응성 그룹과의 반응에 의해 형성될 수 있는, 양태 6의 화합물.

[0626] 양태 8. L^1 의 적어도 하나의 발생에 대하여, 상기 관능성 그룹이 알킨과 아지드의 반응에 의해 형성될 수 있는, 양태 6의 화합물.

[0627] 양태 9. L^1 의 적어도 하나의 발생에 대하여, 상기 관능성 그룹이 알켄, 에스테르, 아마이드, 티오에스테르, 티오우레아, 디설파이드, 카보사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 그룹을 포함하는, 양태 6의 화합물.

[0628] 양태 10. L^1 의 적어도 하나의 발생에 대하여, L^1 이 트리아졸릴 관능성 그룹을 포함하는 링커인, 양태 6의 화합물.

[0629] 양태 11. L^1 의 적어도 하나의 발생에 대하여, L^1 -M이 다음 구조의 화학식을 갖는, 양태 6의 화합물:

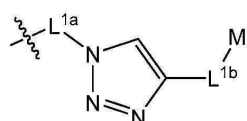


[0630]

[0631] 상기 화학식에서,

[0632] L^{1a} 및 L^{1b} 는 각각 독립적으로, 임의의 링커이다.

[0633] 양태 12. L^1 의 적어도 하나의 발생에 대하여, L^1 -M이 다음 구조의 화학식을 갖는, 양태 6의 화합물:



[0634]

[0635] 상기 화학식에서,

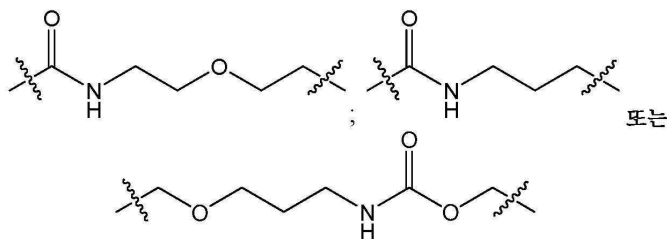
[0636] L^{1a} 및 L^{1b}는 각각 독립적으로, 임의의 링커이다.

[0637] 양태 13. L^{1a} 또는 L^{1b} , 또는 둘 다가 부재하는, 양태 11 또는 양태 12의 화합물.

[0638] 양태 14. L^{1a} 또는 L^{1b} , 또는 둘 다가 존재하는, 양태 11 또는 양태 12의 화합물.

[0639] 양태 15. L^{1a} 및 L^{1b} 가 존재하는 경우, 이들은 각각 독립적으로, 알킬렌 또는 헤테로알킬렌인, 양태 14의 화합물.

[0640] 양태 16. L^{1a} 및 L^{1b} 가 존재하는 경우, 독립적으로 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 양태 14의 화합물:



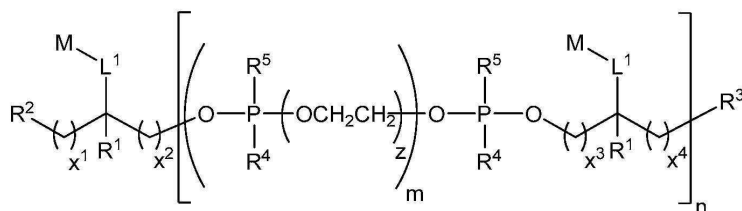
[0641]

[0642] 양태 17. L¹이 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커인, 양태 1 내지 양태 5 중 어느 하나의 화합물.

[0643] 양태 18. L^2 및 L^3 이, 각각의 발생시 독립적으로, C_1 - C_6 알킬렌, C_2 - C_6 알케닐렌 또는 C_2 - C_6 알키닐렌인, 양태 1 내지 양태 17 중 어느 하나의 화합물.

[0644] 양태 19. 상기 화합물이 다음 구조의 화학식 IB를 갖는, 양태 1 내지 양태 18 중 어느 하나의 화합물.

[0645] [화학식 IB]



[0646]

[0647] 상기 화학식 IB에서,

[0648] x^1, x^2, x^3 및 x^4 는, 각각의 발생시 독립적으로, 0 내지 6의 정수이고;

[0649] z 는 2 내지 100의 정수이다.

[0650] 양태 20. x^1, x^2, x^3 또는 x^4 의 하나 이상의 발생은 1인, 양태 19의 화합물.

[0651] 양태 21. x^1, x^2, x^3 및 x^4 가 각각의 발생시 각각 1인, 양태 19 또는 양태 20의 화합물.

[0652] 양태 22. L¹이 각각의 발생시 독립적으로, 트리아줄릴 관능성 그룹을 포함하는, 양태 19 내지 양태 21 중 어느 하나의 화합물.

[0653] 양태 23. L¹이 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커인, 양태 19 내지 양태 21 중 어느 하나의 화합물.

[0654] 양태 24. R^4 가 각각의 발생시 독립적으로, OH, O^- 또는 OR_d 인, 양태 1 내지 양태 23 중 어느 하나의 화합물.

[0655] 양태 25. \mathbb{R}^5 가 각각의 발생시 옥소인, 양태 1 내지 양태 24 중 어느 하나의 화합물.

[0656] 양태 26. R^1 이 각각의 발생시 H인, 양태 1 내지 양태 25 중 어느 하나의 화합물.

[0657] 양태 27. R^2 및 R^3 이 각각 독립적으로, OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 인, 양태 1 내지 양태 26 중 어느 하나의 화합물.

[0658] 양태 28. R^2 또는 R^3 중 하나가 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인, 양태 1 내지 양태 26 중 어느 하나의 화합물.

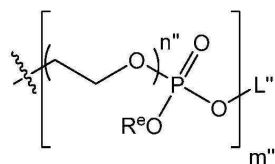
[0659] 양태 29. R^2 및 R^3 이 각각 독립적으로, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 인, 양태 1 내지 양태 26 중 어느 하나의 화합물.

[0660] 양태 30. R_c가 OL'인, 양태 29의 화합물.

[0661] 양태 31. L'가, 표적 지향 모이어티, 분석물 분자, 고형 지지체, 고형 지지체 잔기, 뉴클레오타이드 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 헤테로알킬렌 링커인, 양태 30의 화합물.

[0662] 양태 32. L'가 알킬렌 옥사이드 또는 포스포디에스테르 모이어티, 또는 이들의 조합을 포함하는, 양태 31의 화합물.

[0663] 양태 33. L'가 다음 구조의 화학식을 갖는, 양태 32의 화합물:



[0664]

[0665] 상기 화학식에서,

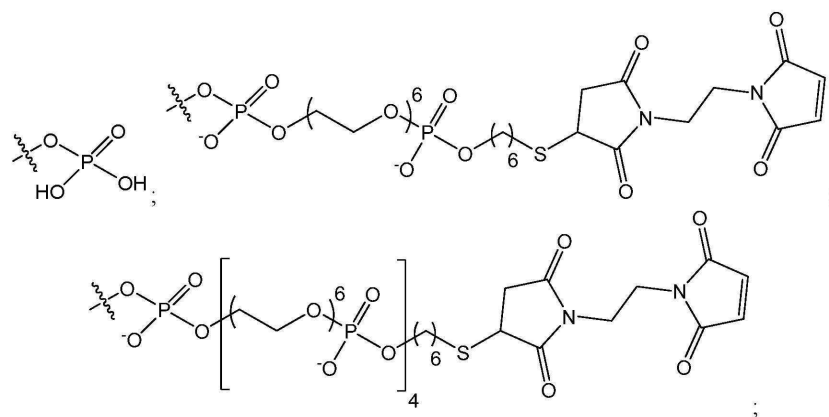
[0666] m'' 및 n'' 는 독립적으로 1 내지 10의 정수이고;

[0667] R^e 는 H, 전자쌍 또는 짝이온이고;

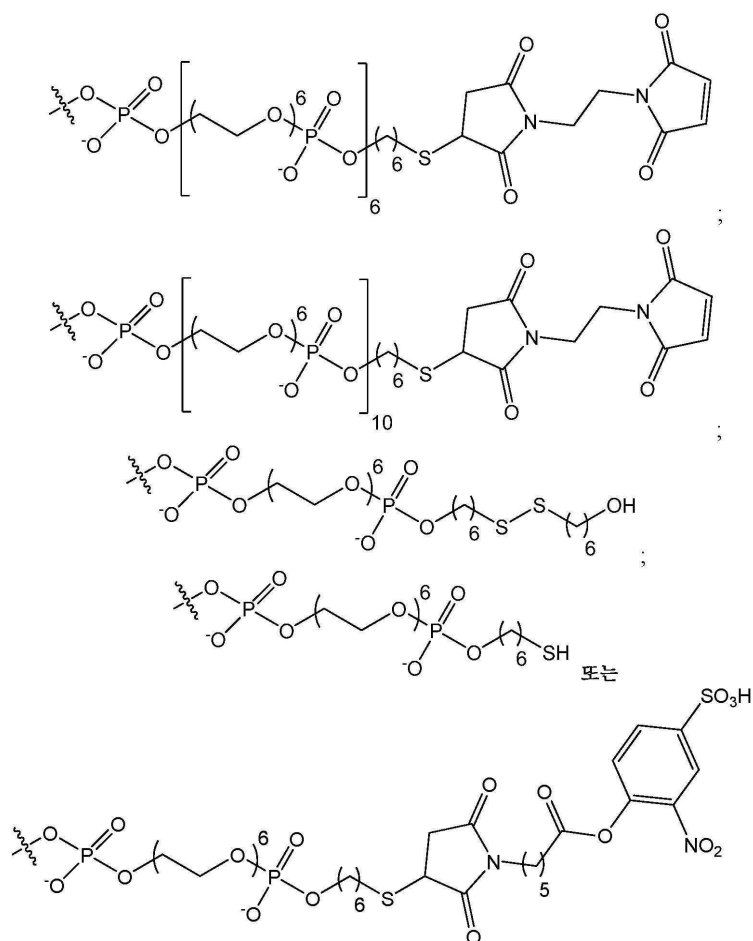
[0668] L'는 R^e이거나, 직접 결합이거나, 또는 Q, 표적 지향 모이어티, 분석물 분자, 고형 지지체, 고형 지지체 잔기, 뉴클레오사이드 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 링키지이다.

[0669] 양태 34. 상기 표적 지향 모이어티가 항체 또는 세포 표면 수용체 길항제인, 양태 29 내지 양태 33 중 어느 하나의 화합물.

[0670] 양태 35. R^2 또는 R^3 이 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 양태 29 내지 양태 34 중 어느 하나의 화합물:

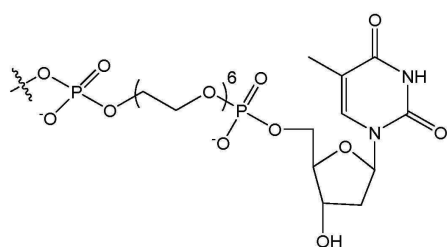


[0671]



[0672]

[0673] 양태 36. R^2 또는 R^3 이 다음 구조식을 갖는, 양태 29 내지 양태 35 중 어느 하나의 화합물:



[0674]

[0675] 양태 37. Q가 친핵성 반응성 그룹, 친전자성 반응성 그룹 또는 부가환화 반응성 그룹을 포함하는, 양태 1 내지 양태 26 중 어느 하나의 화합물.

[0676] 양태 38. Q가 설프하이드릴, 디설프아이드, 황산화 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨, 알켄, 디엔, 디에노필, 산 할라이드, 설폰일 할라이드, 포스핀, α -할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이미드 관능성 그룹을 포함하는, 양태 37의 화합물.

[0677] 양태 39. 상기 황산화 에스테르가 N-석신이미드 에스테르, 이미도에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르인, 양태 38의 화합물.

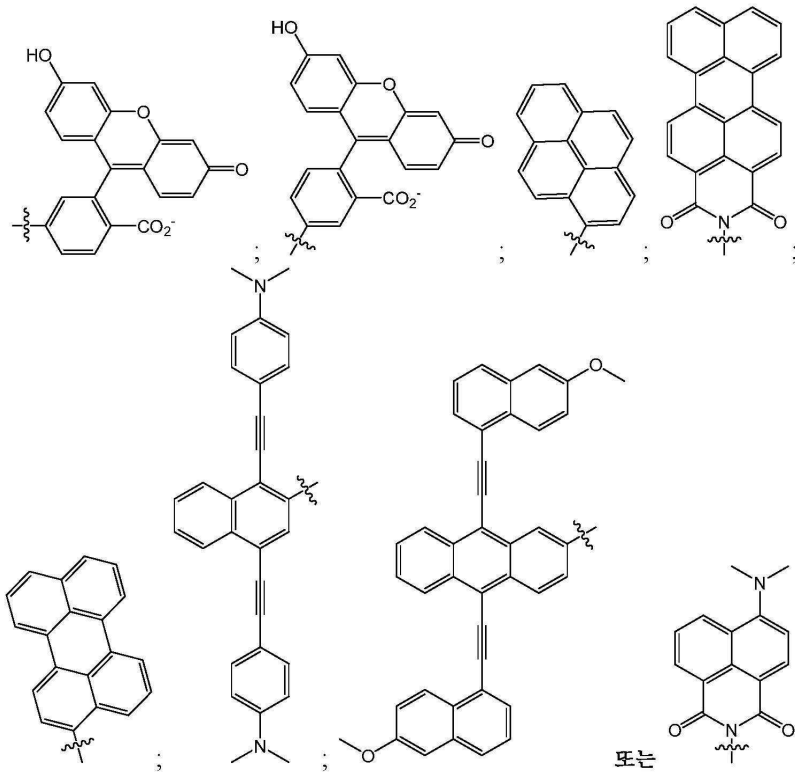
[0678] 양태 40. 상기 아지드가 알킬 아지드 또는 아실 아지드인, 양태 38의 화합물.

[0679] 양태 41. Q가 표 1로부터 선택되는 모이어티인, 양태 1 내지 양태 33 중 어느 하나의 화합물.

[0680] 양태 42. R^2 또는 R^3 중 하나가 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 또는 고형 지지체에 대한 공

유 결합을 포함하는 링커인, 양태 1 내지 양태 26 중 어느 하나의 화합물.

- [0681] 양태 43. 상기 분석물 분자가 핵산, 아미노산 또는 이들의 중합체인, 양태 42의 화합물.
- [0682] 양태 44. 상기 분석물 분자가 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앵타머 또는 프리온인, 양태 42의 화합물.
- [0683] 양태 45. 상기 표적 지향 모이어티가 항체 또는 세포 표면 수용체 길항제인, 양태 42의 화합물.
- [0684] 양태 46. 상기 고형 지지체가 중합체성 비드 또는 비중합체성 비드인, 양태 42의 화합물.
- [0685] 양태 47. m이 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 10의 정수인, 양태 1 내지 양태 46 중 어느 하나의 화합물.
- [0686] 양태 48. m이 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 5의 정수인, 양태 1 내지 양태 46 중 어느 하나의 화합물.
- [0687] 양태 49. n이 1 내지 100의 정수인, 양태 1 내지 양태 48 중 어느 하나의 화합물.
- [0688] 양태 50. n이 1 내지 10의 정수인, 양태 1 내지 양태 48 중 어느 하나의 화합물.
- [0689] 양태 51. M이 각각의 발생시 독립적으로, 4개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이들의 조합을 포함하는 모이어티인, 양태 1 내지 양태 50 중 어느 하나의 화합물.
- [0690] 양태 52. M이 각각의 발생시 독립적으로, 형광성 또는 유색인, 양태 1 내지 양태 51 중 어느 하나의 화합물.
- [0691] 양태 53. M이 형광성인, 양태 52의 화합물.
- [0692] 양태 54. M이 각각의 발생시 독립적으로, 4개 이상의 융합된 환을 포함하는 융합된 멀티사이클릭 아릴 모이어티인, 양태 1 내지 양태 53 중 어느 하나의 화합물.
- [0693] 양태 55. M이, 각각의 발생시 독립적으로, 디메틸아미노스틸벤, 퀴나크리돈, 플루오로페닐-디메틸-BODIPY, 히스-플루오로페닐-BODIPY, 아크리딘, 테릴렌, 섹시페닐, 포르피린, 벤조피렌, (플루오로페닐-디메틸-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, (비스플루오로페닐-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, 퀴터페닐, 비-벤조티아졸, ter-벤조티아졸, 비-나프틸, 비-안트라실, 스쿠아라인, 스쿠아릴륨, 9,10-에티닐안트라센 또는 ter-나프틸 모이어티인, 양태 1 내지 양태 54 중 어느 하나의 화합물.
- [0694] 양태 56. M이, 각각의 발생시 독립적으로, p-테르페닐, 페릴렌, 아조벤젠, 페나진, 페난트롤린, 아크리딘, 티오크산트렌, 크리센, 루브렌, 코로넨, 시아닌, 페릴렌 이미드, 또는 페릴렌 아미드 또는 이들의 유도체인, 양태 1 내지 양태 54 중 어느 하나의 화합물.
- [0695] 양태 57. M이, 각각의 발생시 독립적으로, 쿠마린 염료, 레조루핀 염료, 디피로메텐보론 디플루오라이드 염료, 루테늄 비피리딜 염료, 에너지 전이 염료, 티아졸 오렌지 염료, 폴리메틴 또는 N-아릴-1,8-나프탈이미드 염료인, 양태 1 내지 양태 54 중 어느 하나의 화합물.
- [0696] 양태 58. M이, 각각의 발생시 독립적으로, 피렌, 페릴렌, 페릴렌 모노이미드 또는 6-FAM 또는 이들의 유도체인, 양태 1 내지 양태 54 중 어느 하나의 화합물.
- [0697] 양태 59. M이 각각의 발생시 독립적으로, 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 양태 1 내지 양태 54 중 어느 하나의 화합물:



[0698]

[0699]

양태 60. 표 2로부터 선택되는 화합물.

[0700]

양태 61. 양태 1 내지 양태 60 중 어느 하나의 화합물을, 샘플이 적절한 과장으로 조명될 때 광학 반응을 일으키기에 충분한 양으로, 샘플에 가하는 단계를 포함하는, 샘플의 염색 방법.

[0701]

양태 62. 상기 광학 반응이 형광 반응인, 양태 61의 샘플의 염색 방법.

[0702]

양태 63. 상기 샘플이 세포를 포함하는, 양태 61 또는 양태 62의 샘플의 염색 방법.

[0703]

양태 64. 유세포 분석법으로 상기 세포를 관찰하는 단계를 추가로 포함하는, 양태 63의 샘플의 염색 방법.

[0704]

양태 65. 상기 형광 반응을, 검출 가능한 상이한 광학 특성들을 갖는 제2 형광 물질의 형광 반응으로부터 구별하는 단계를 추가로 포함하는, 양태 62의 샘플의 염색 방법.

[0705]

양태 66. 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법으로서,

[0706]

(a) R^2 또는 R^3 이 상기 분석 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 양태 1의 화합물을 제공하는 단계; 및

[0707]

(b) 상기 화합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법.

[0708]

양태 67. 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법으로서,

[0709]

(a) R^2 또는 R^3 이 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 양태 1의 화합물을, 상기 분석물 분자와 혼합하는 단계;

[0710]

(b) 상기 화합물과 상기 분석물 분자의 접합물을 형성하는 단계; 및

[0711]

(c) 상기 접합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법.

[0712]

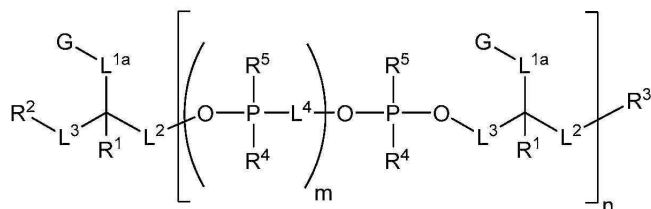
양태 68. 분석물을 시각적으로 검출하는 방법으로서,

[0713]

(a) R^2 또는 R^3 이 상기 분석물에 대한 특이성을 갖는 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커를 포함하는, 양태 1 내지 양태 36 중 어느 하나의 화합물을 제공하는 단계;

- [0714] (b) 상기 화합물과 상기 분석물을 혼합하여, 상기 표적 지향 모이어티와 상기 분석물을 회합시키는 단계; 및
- [0715] (c) 상기 화합물을 이의 가시적인 특성에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 분석물을 시각적으로 검출하는 방법.
- [0716] 양태 69. 양태 1 내지 양태 60 중 어느 하나의 화합물 및 하나 이상의 분석물 분자를 포함하는, 조성물.
- [0717] 양태 70. 상기 하나 이상의 분석물 분자를 검출하기 위한 분석 방법에서의 양태 69의 조성물의, 용도.
- [0718] 양태 71. 화학식 II의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 입체 이성질체, 염, 또는 토토머.

[0719] [화학식 II]



[0720]

[0721] 상기 화학식 II에서,

[0722] G는 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티 또는 이의 보호된 형태이고, 상보적인 반응성 그룹과 공유 결합을 형성할 수 있고;

[0723] L^{1a} , L^2 및 L^3 은, 각각의 발생시 독립적으로, 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로 원자성 링커이고;

[0724] L^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 길이가 3개 원자 이상인 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고, 이들의 헤테로 원자는 O, N 및 S로부터 선택되고;

[0725] R^1 은 각각의 발생시 독립적으로, H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0726] R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로, H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 헤테로알킬, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, 또는 L' 이고;

[0727] R^4 는 각각의 발생시 독립적으로, OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;

[0728] R^5 는 각각의 발생시 독립적으로, 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

[0729] R_a 는 O 또는 S이고;

[0730] R_b 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;

[0731] R_c 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d , OL' , SR_d , 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

[0732] R_d 는 짝이온이고;

[0733] Q는, 각각의 발생시 독립적으로, 반응성 그룹을 포함하는 모이어티 또는 이의 보호된 형태이고, 분석물 분자, 표적 지향 모이어티, 고형 지지체 또는 상보적인 반응성 그룹 Q' 와 공유 결합을 형성할 수 있고;

[0734] L' 는, 각각의 발생시 독립적으로, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고형 지지체 잔기에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 화학식 II의 추가의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

[0735] m은, 각각의 발생시 독립적으로, 0 이상의 정수이며, 단, 하나 이상의 m의 발생은 1 이상의 정수이고;

[0736] n은 1 이상의 정수이다.

[0737] 양태 72. G가 각각의 발생시 독립적으로, 알데하이드, 옥심, 하이드라존, 알킨, 아민, 아지드, 아실아지드, 아실할라이드, 니트릴, 니트론, 설프하이드릴, 디설파이드, 설포닐 할라이드, 이소티오시아네이트, 이미도에스테르, 활성화 에스테르, 케톤, α, β -불포화 카보닐, 알켄, 말레이미드, α -할로이미드, 에폭사이드, 아지리딘, 테트라진, 테트라졸, 포스핀, 비오틴 또는 티이란 관능성 그룹을 포함하는, 양태 71의 화합물.

[0738] 양태 73. G가 각각의 발생시 독립적으로, 알킨 또는 아지드 그룹을 포함하는, 양태 71의 화합물.

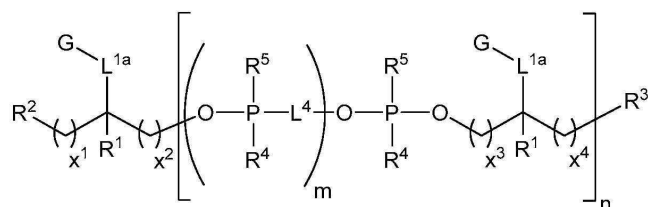
[0739] 양태 74. G가 각각의 발생시 독립적으로, 상보적인 반응성 그룹과 반응시, 알켄, 에스테르, 아마이드, 티오에스테르, 디설파이드, 카보사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 그룹을 포함하는 관능성 그룹을 형성할 수 있는 반응성 그룹을 포함하는, 양태 71의 화합물.

[0740] 양태 75. 상기 헤테로아릴이 트리아졸릴인, 양태 74의 화합물.

[0741] 양태 76. L^2 및 L^3 이 각각의 발생시 독립적으로, C_1 - C_6 알킬렌, C_2 - C_6 알케닐렌 또는 C_2 - C_6 알키닐렌인, 양태 71 내지 양태 75 중 어느 하나의 화합물.

[0742] 양태 77. 상기 화합물이 다음 구조의 화학식 IIA를 갖는, 양태 71의 화합물.

[0743] [화학식 IIA]



[0744]

[0745] 상기 화학식 IIA에서,

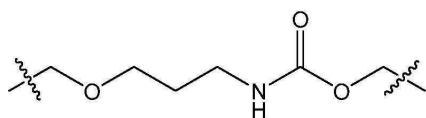
[0746] x^1 , x^2 , x^3 및 x^4 는 각각의 발생시 독립적으로, 0 내지 6의 정수이다.

[0747] 양태 78. 각각의 L^{1a} 가 부재하는, 양태 71 내지 양태 77 중 어느 하나의 화합물.

[0748] 양태 79. 각각의 L^{1a} 가 존재하는, 양태 71 내지 양태 77 중 어느 하나의 화합물.

[0749] 양태 80. L^{1a} 가 각각의 발생시 독립적으로, 헤테로알킬렌인, 양태 79의 화합물.

[0750] 양태 81. L^{1a} 가 다음 구조식을 갖는, 양태 80의 화합물:



[0751]

[0752] 양태 82. G가 각각의 발생시 독립적으로, \equiv 또는 $-N_3$ 인, 양태 81의 화합물.

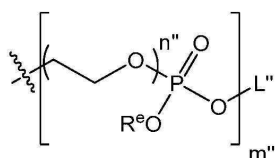
[0753] 양태 83. x^1 , x^2 , x^3 또는 x^4 중 적어도 하나의 발생은 1인, 양태 77 내지 양태 82 중 어느 하나의 화합물.

[0754] 양태 84. x^1 , x^2 , x^3 및 x^4 가 각각의 발생시 각각 1인, 양태 77 내지 양태 83 중 어느 하나의 화합물.

[0755] 양태 85. L^4 가 제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 양태 71 내지 양태 84 중 어느 하나의 화합물.

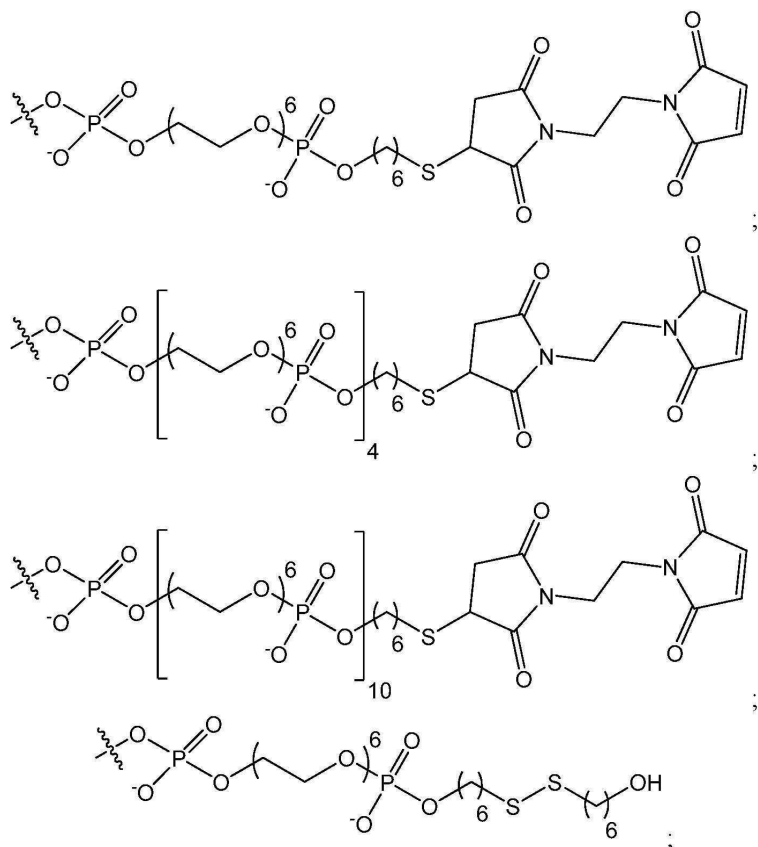
[0756] 양태 86. R^4 가 각각의 발생시 독립적으로, OH, O^- 또는 OR_d 인, 양태 71 내지 양태 85 중 어느 하나의 화합물.

- [0757] 양태 87. R^5 가 각각의 발생시, 옥소인, 양태 71 내지 양태 86 중 어느 하나의 화합물.
- [0758] 양태 88. R^1 이 H인, 양태 71 내지 양태 87 중 어느 하나의 화합물.
- [0759] 양태 89. R^2 및 R^3 이 각각 독립적으로, OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 인, 양태 71 내지 양태 88 중 어느 하나의 화합물.
- [0760] 양태 90. R^2 또는 R^3 중 하나가 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인, 양태 71 내지 양태 88 중 어느 하나의 화합물.
- [0761] 양태 91. R^2 및 R^3 이 각각 독립적으로, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 인, 양태 71 내지 양태 88 중 어느 하나의 화합물.
- [0762] 양태 92. R_c 가 OL'인, 양태 91의 화합물.
- [0763] 양태 93. L'가, Q, 표적 지향 모이어티, 분석물 분자, 고형 지지체, 고형 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 헤테로알킬렌 링커인, 양태 92의 화합물.
- [0764] 양태 94. L'가 알킬렌 옥사이드 또는 포스포디에스테르 모이어티, 또는 이들의 조합을 포함하는, 양태 93의 화합물.
- [0765] 양태 95. L'가 다음 구조의 화학식을 갖는, 양태 94의 화합물:

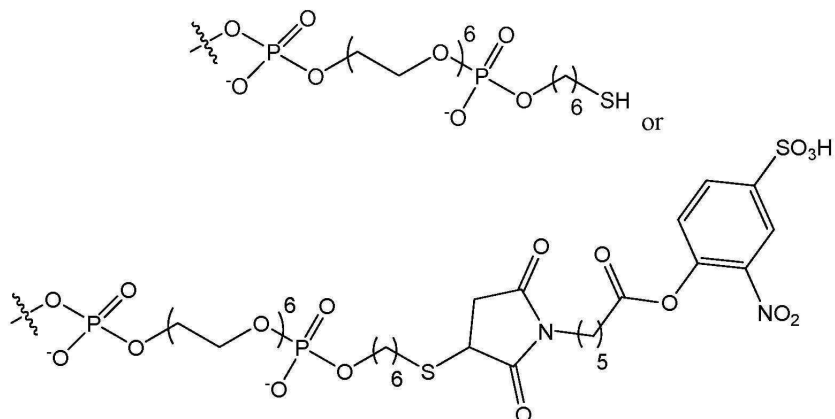


- [0766]
- [0767] 상기 화학식에 있어서,
- [0768] m'' 및 n'' 는 독립적으로 1 내지 10의 정수이고;
- [0769] R^e 는 H, 전자쌍 또는 짝이온이고;
- [0770] L''는 R^e 이거나, 직접 결합이거나, 또는 Q, 표적 지향 모이어티, 분석물 분자, 고형 지지체, 고형 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 화학식 I의 추가의 화합물에 대한 링커지이다.
- [0771] 양태 96. 상기 표적 지향 모이어티가 항체 또는 세포 표면 수용체 길항제인, 양태 91 내지 양태 95 중 어느 하나의 화합물.

[0772] 양태 97. R^2 또는 R^3 이 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 양태 91 내지 양태 96 중 어느 하나의 화합물:

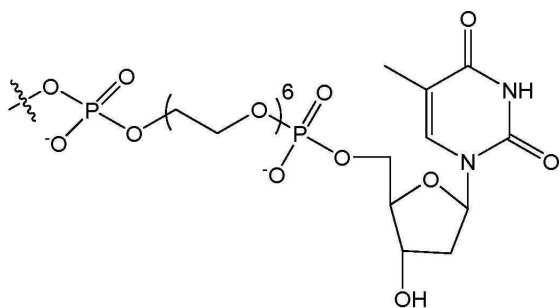


[0773]



[0774]

[0775] 양태 98. R^2 또는 R^3 이 다음 구조식을 갖는, 양태 91 내지 양태 97 중 어느 하나의 화합물:



[0776]

[0777] 양태 99. Q가 친핵성 반응성 그룹, 친전자성 반응성 그룹 또는 부가환화 반응성 그룹을 포함하는, 양태 71 내지

양태 98 중 어느 하나의 화합물.

- [0778] 양태 100. Q가 설프하이드릴, 디설파이드, 황산화 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨, 알켄, 디엔, 디에노필, 산 할라이드, 설폰일 할라이드, 포스핀, α -할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이미드 관능성 그룹을 포함하는, 양태 99의 화합물.
- [0779] 양태 101. 상기 황산화 에스테르가 N-석신이미드 에스테르, 이미도에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르인, 양태 100의 화합물.
- [0780] 양태 102. 상기 알킨이 알킬 아지드 또는 아실 아지드인, 양태 100의 화합물.
- [0781] 양태 103. Q가 표 1로부터 선택되는 모이어티인, 양태 71 내지 양태 98 중 어느 하나의 화합물.
- [0782] 양태 104. R^2 또는 R^3 중 하나가 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적 지향 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 또는 고정 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인, 양태 61 내지 양태 88 중 어느 하나의 화합물.
- [0783] 양태 105. 상기 분석물 분자가 핵산, 아미노산 또는 이들의 중합체인, 양태 104의 화합물.
- [0784] 양태 106. 상기 분석물 분자가 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앵타머 또는 프리온인, 양태 104의 화합물.
- [0785] 양태 107. 상기 표적 지향 모이어티가 항체 또는 세포 표면 수용체 길항제인, 양태 104의 화합물.
- [0786] 양태 108. 상기 고정 지지체가 중합체성 비드 또는 비중합체성 비드인, 양태 104의 화합물.
- [0787] 양태 109. m이 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 10의 정수인, 양태 71 내지 양태 108 중 어느 하나의 화합물.
- [0788] 양태 110. m이 각각의 발생시 독립적으로, 1 내지 5의 정수인, 양태 71 내지 양태 108 중 어느 하나의 화합물.
- [0789] 양태 111. n이 1 내지 100의 정수인, 양태 71 내지 양태 110 중 어느 하나의 화합물.
- [0790] 양태 112. n이 1 내지 10의 정수인, 양태 71 내지 양태 110 중 어느 하나의 화합물.
- [0791] 양태 113. 표 3으로부터 선택되는 화합물.
- [0792] 양태 114. 분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티를 표지화하는 방법으로서,
- [0793] (a) R^2 또는 R^3 이 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 양태 71의 화합물을, 상기 분석물 분자 또는 상기 표적 지향 모이어티와 혼합하는 단계;
- [0794] (b) 상기 화합물과 상기 분석물 분자 또는 상기 표적 지향 모이어티의 접합물을 형성하는 단계; 및
- [0795] (c) 상기 접합물을 화학식 $M-L^{1b}-G'$ (여기서, M은 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 1의 공액도를 포함하는 모이어티이고; L^{1b} 는 임의의 알킬렌, 헤테로알킬렌 또는 헤테로 원자성 링커이고; G' 는 G에 대해 상보적인 반응성 그룹이다)의 화합물과 반응시켜, 적어도 하나의 G와 적어도 하나의 G' 의 반응에 의해 하나 이상의 공유 결합을 형성하는 단계를 포함하는, 분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티를 표지화하는 방법.
- [0796] 양태 115. 분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티를 표지화하는 방법으로서,
- [0797] (a) R^2 또는 R^3 이 Q이거나 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 양태 71의 화합물을, 화학식 $M-L^{1b}-G'$ (여기서, M은 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 1의 공액도를 포함하는 모이어티이고; L^{1b} 는 임의의 알킬렌, 헤테로알킬렌 또는 헤테로 원자성 링커이고; G' 는 G에 대해 상보적인 반응성 그룹이다)의 화합물과 혼합하여, G와 G' 의 반응에 의해 하나 이상의 공유 결합을 형성하는 단계; 및
- [0798] (b) 단계 (a)의 생성물을 상기 분석물 분자 또는 상기 표적 지향 모이어티와 반응시켜, 단계 (a)의 생성물과 상기 분석물 분자 또는 상기 표적 지향 모이어티의 접합물을 형성하는 단계를 포함하는, 분석물 분자 또는 표적 지향 모이어티를 표지화하는 방법.
- [0799] 양태 116. 양태 1에 기재된 화합물의 제조방법으로서, 양태 71의 화합물을 화학식 $M-L^{1b}-G'$ (여기서, M은 2개 이

상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 1의 공액도를 포함하는 모이어티이고; L^{1b} 는 임의의 알킬렌, 헤테로알킬렌 또는 헤테로 원자성 링커이고; G' 는 G 에 대해 상보적인 반응성 그룹이다)의 화합물과 혼합하여, G 와 G' 의 반응에 의해 하나 이상의 공유 결합을 형성하는 단계를 포함하는, 양태 1에 기재된 화합물의 제조방법.

[0800] 양태 117. Y 개의 형광 모이어티들인 M 을 포함하는 형광 화합물로서, 상기 형광 화합물은 소정 파장의 자외선으로 여기될 때, 상기와 동일한 파장의 자외선으로 여기될 때의 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y 배의 85%보다 큰 피크 형광 방출을 가지며, 여기서, Y 는 2 이상의 정수인, 형광 화합물.

[0801] 양태 118. 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y 배의 90%보다 큰 피크 형광 방출을 갖는, 양태 117의 형광 화합물.

[0802] 양태 119. 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y 배의 95%보다 큰 피크 형광 방출을 갖는, 양태 117의 형광 화합물.

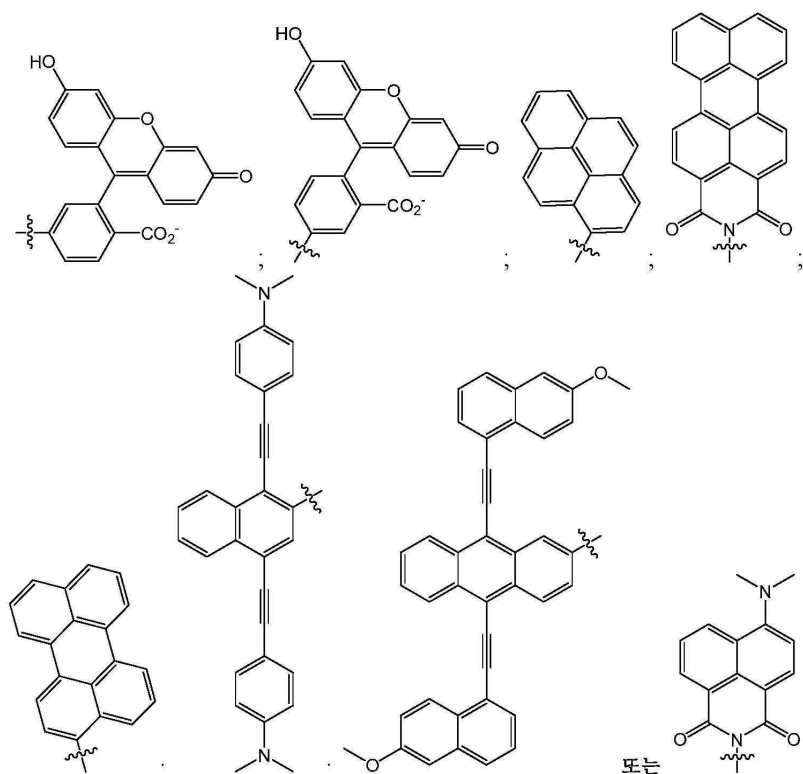
[0803] 양태 120. 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y 배의 97%보다 큰 피크 형광 방출을 갖는, 양태 117의 형광 화합물.

[0804] 양태 121. 단일한 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 Y 배의 99%보다 큰 피크 형광 방출을 갖는, 양태 117의 형광 화합물.

[0805] 양태 122. Y 가 2 내지 100의 정수인, 양태 117 내지 양태 121 중 어느 하나의 형광 화합물.

[0806] 양태 123. Y 가 2 내지 10의 정수인, 양태 117 내지 양태 121 중 어느 하나의 형광 화합물.

[0807] 양태 124. 상기 M 모이어티가 독립적으로, 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 양태 117 내지 양태 123 중 어느 하나의 형광 화합물:

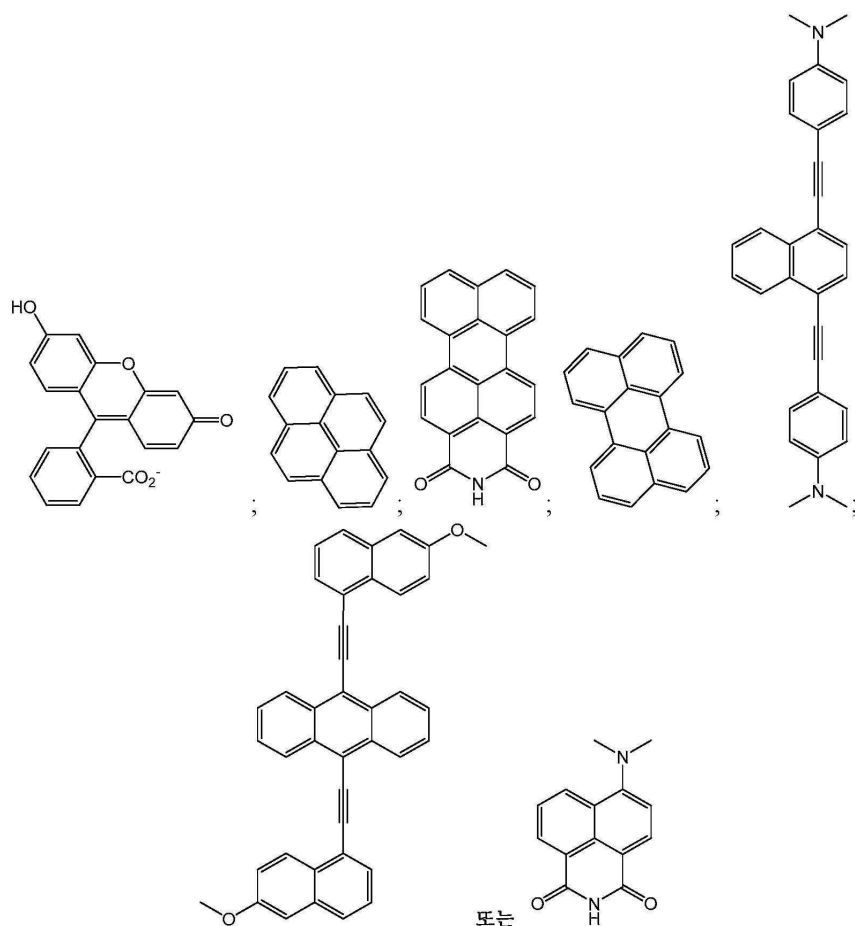


[0808]

[0809] 상기 구조식에서,

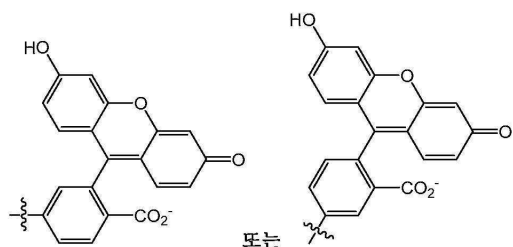
[0810] ~~~ 는 상기 형광 화합물에 대한 부착점을 나타낸다.

[0811] 양태 125. 상기 단일한 M 모이어티가 독립적으로, 다음 구조식들 중 하나를 갖는, 양태 117 내지 양태 124 중 어느 하나의 형광 화합물:



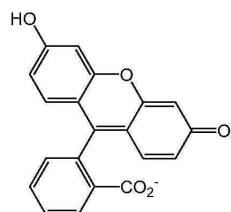
[0812]

[0813] 양태 126. 상기 형광 화합물이, 독립적으로 다음 구조식들:



[0814]

[0815] (여기서, \sim 는 상기 형광 화합물에 대한 부착점을 나타낸다) 중 하나를 갖는 M 모이어티를 Y개 포함하고, 상기 단일한 M 모이어티는 다음 구조식:



[0816]

을 갖는, 양태 117 내지 양태 123 중 어느 하나의 형광 화합물.

[0817]

양태 127. 상기 피크 형광 방출이 약 500 내지 약 550nm 범위의 파장의 피크 형광 방출인, 양태 117 내지 양태 126 중 어느 하나의 형광 화합물.

[0818]

양태 128. 상기 형광 화합물이 적어도 1개의 에틸렌 옥사이드 모이어티를 포함하는, 양태 117 내지 양태 127 중 어느 하나의 형광 화합물.

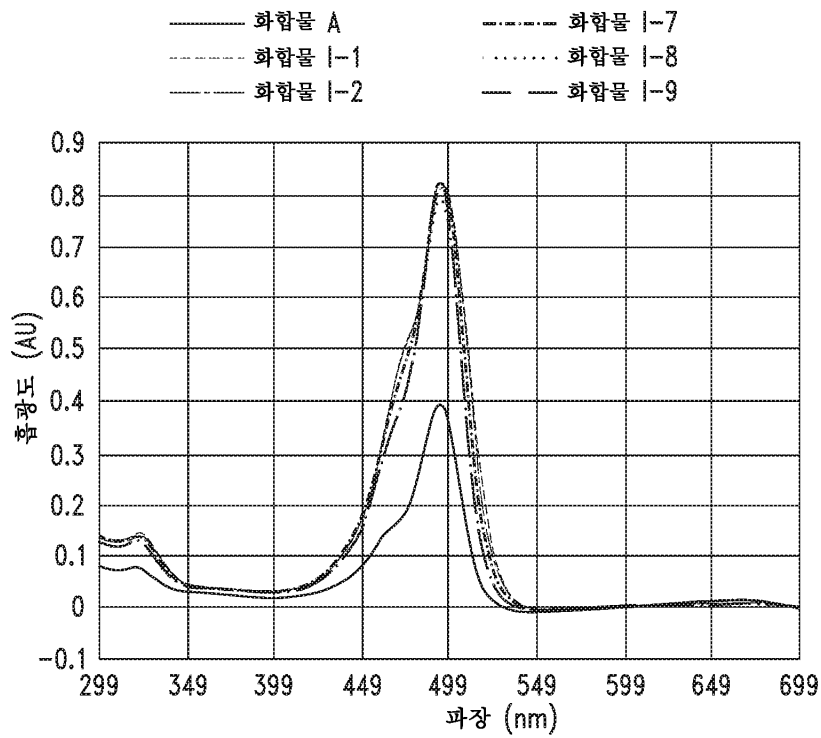
[0819] 양태 129. 양태 117 내지 양태 128 중 어느 하나의 형광 화합물 및 분석물을 포함하는, 조성물.

[0820] 본원 명세서에 참조된 모든 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비특허 공보는, 본원 명세서와 모순되지 않는 범위 내에서 이들 전체가 참조에 의해 포함된다.

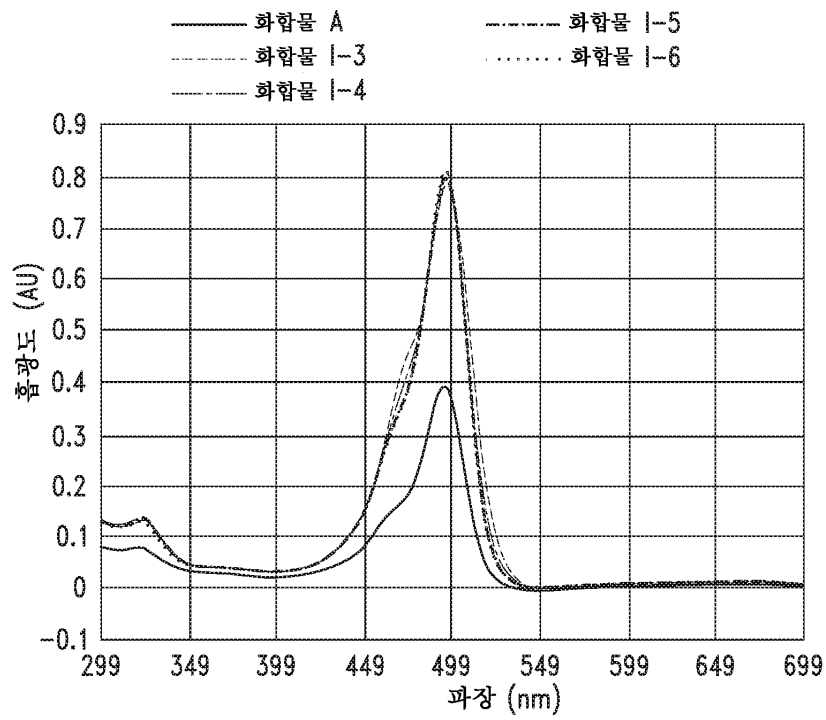
[0821] 상기로부터, 본 발명의 특정 양태가 설명의 목적으로 개시되었지만, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구범위를 제외하고는 제한되지 않는다.

도면

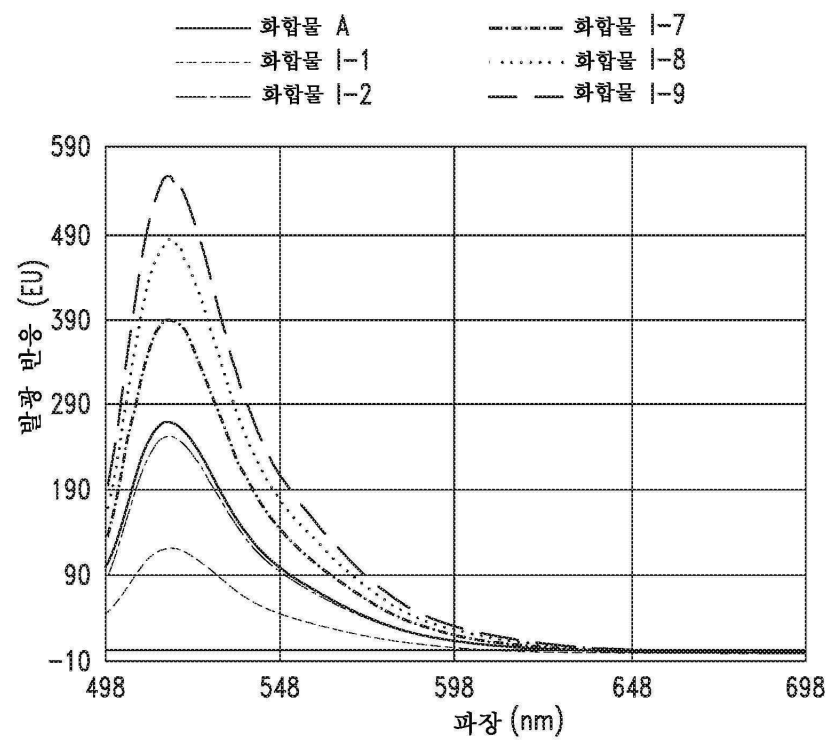
도면1



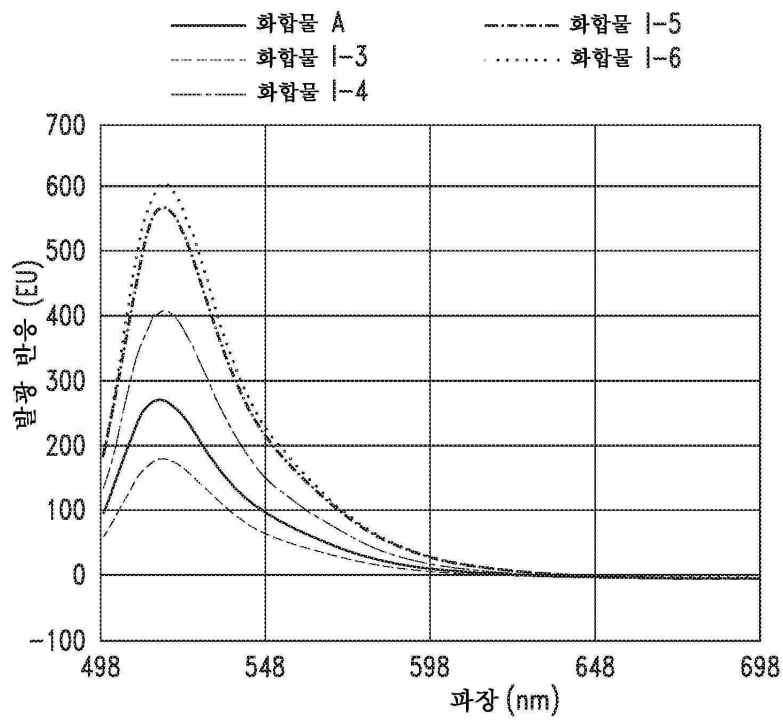
도면2



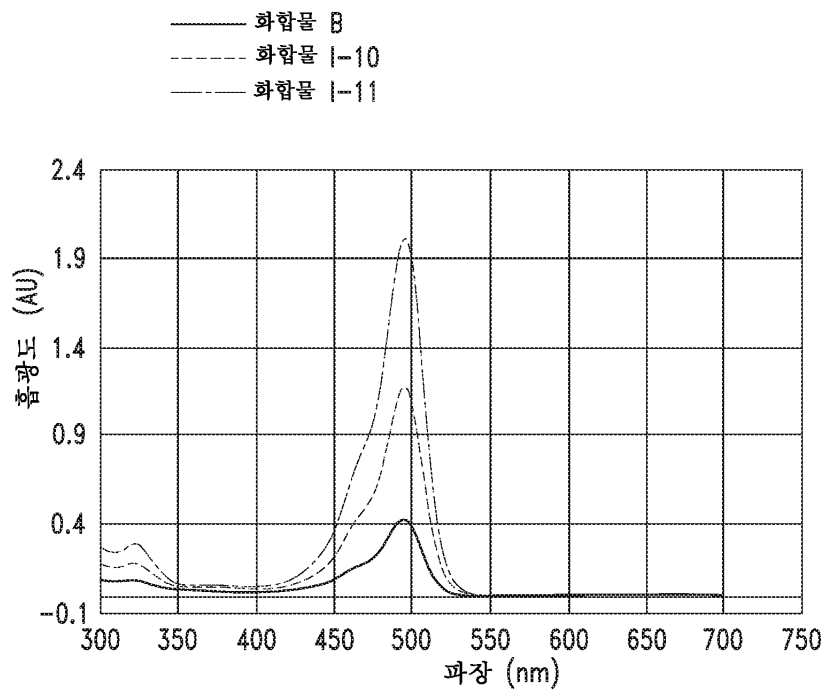
도면3



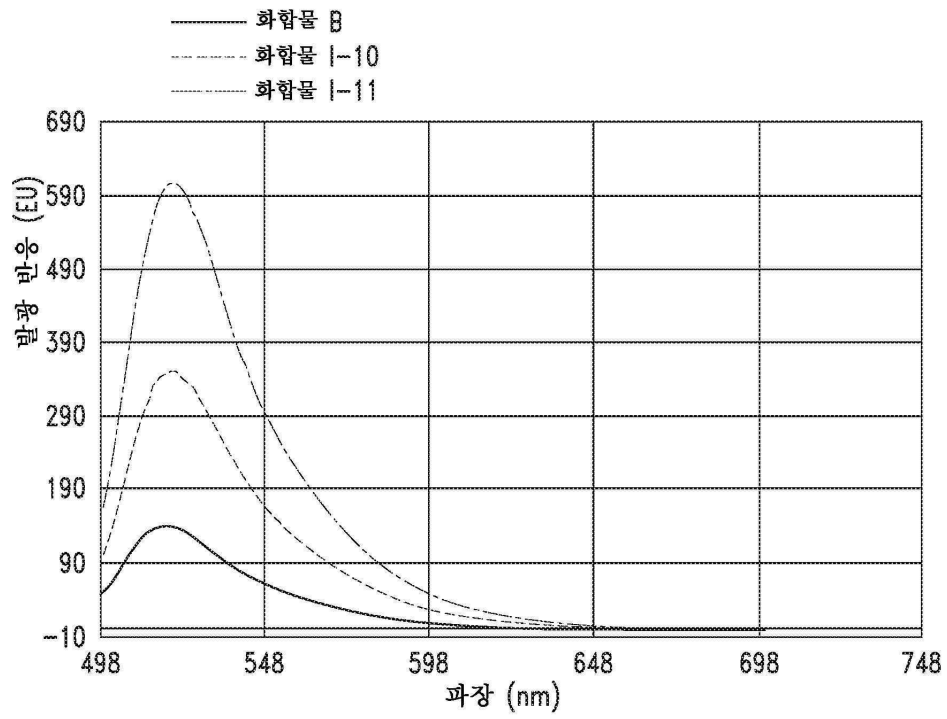
도면4



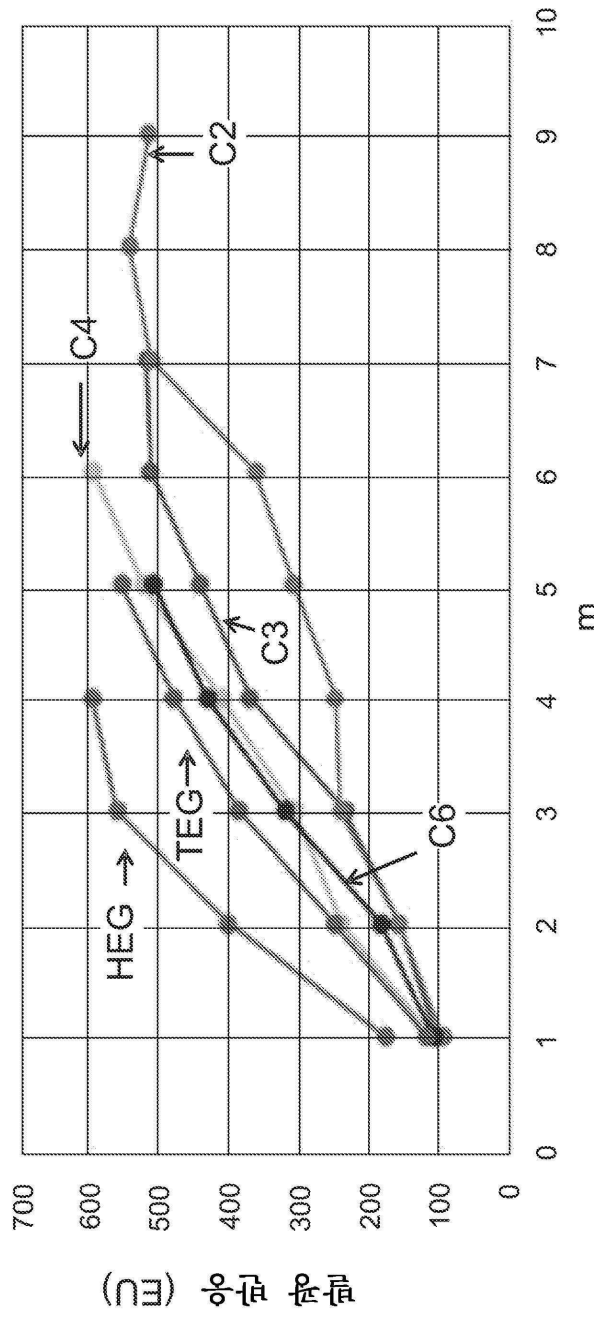
도면5



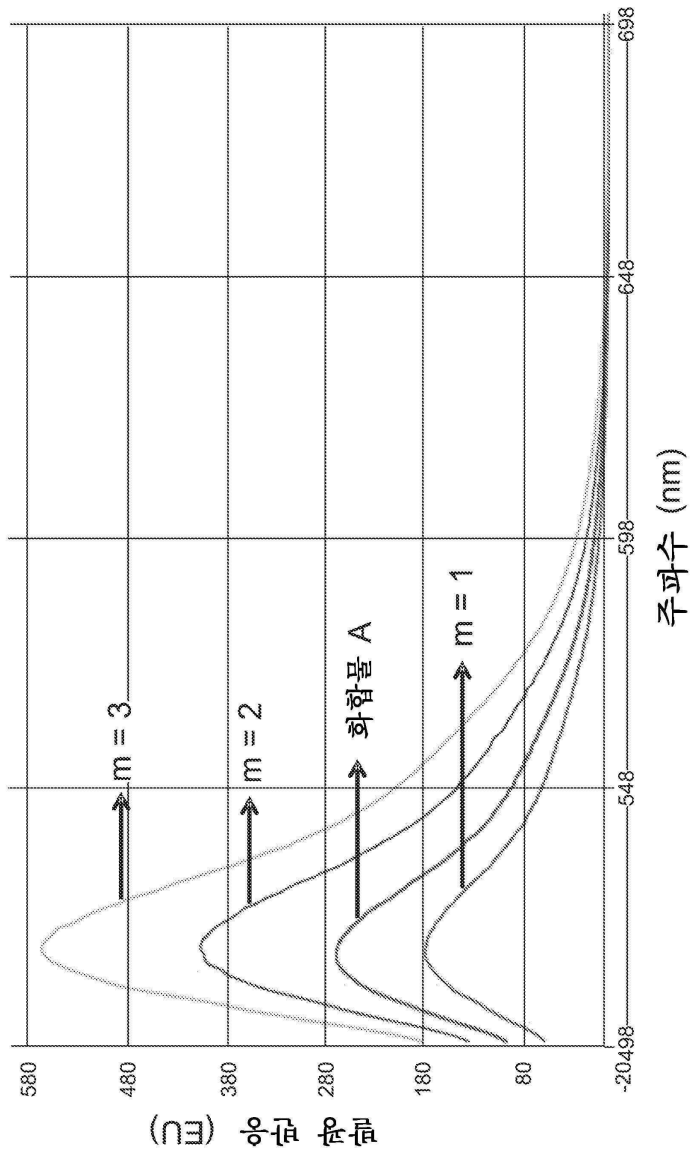
도면6



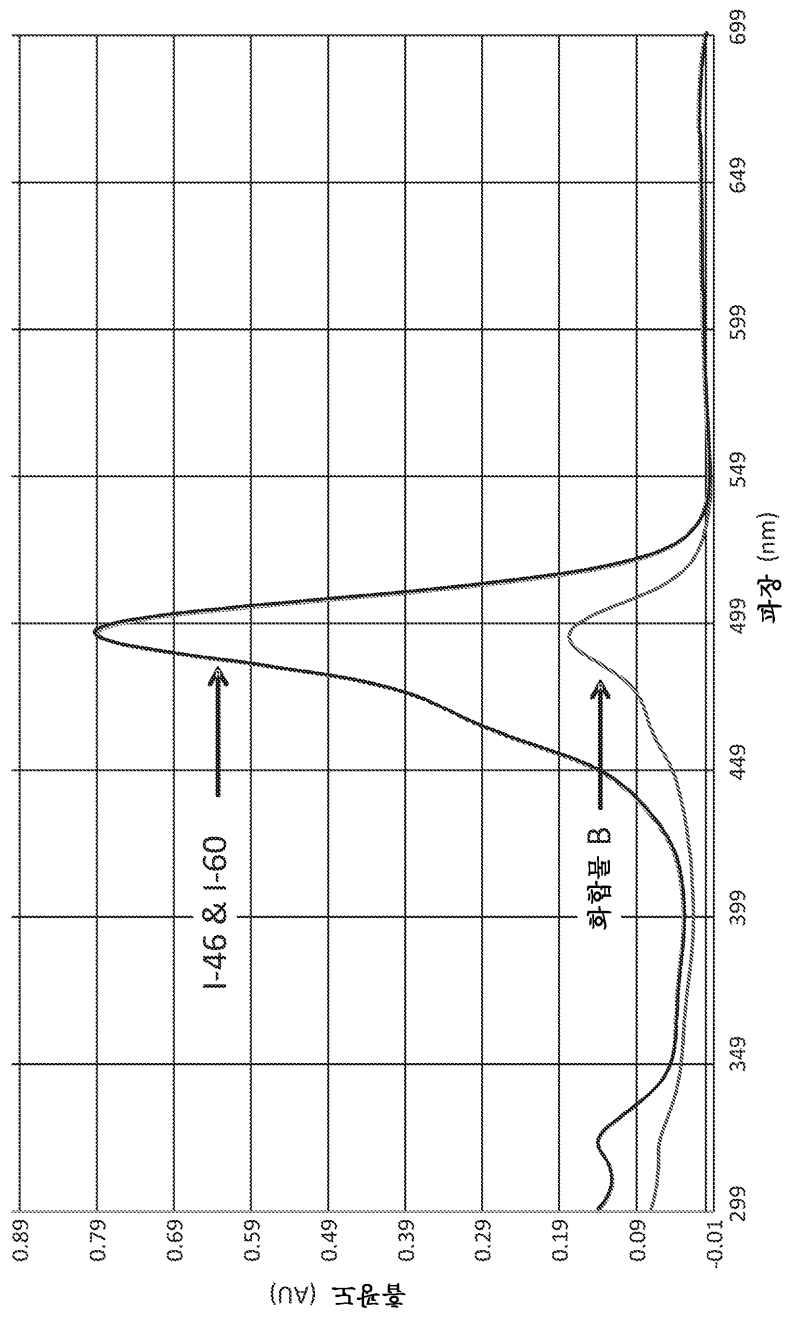
도면7



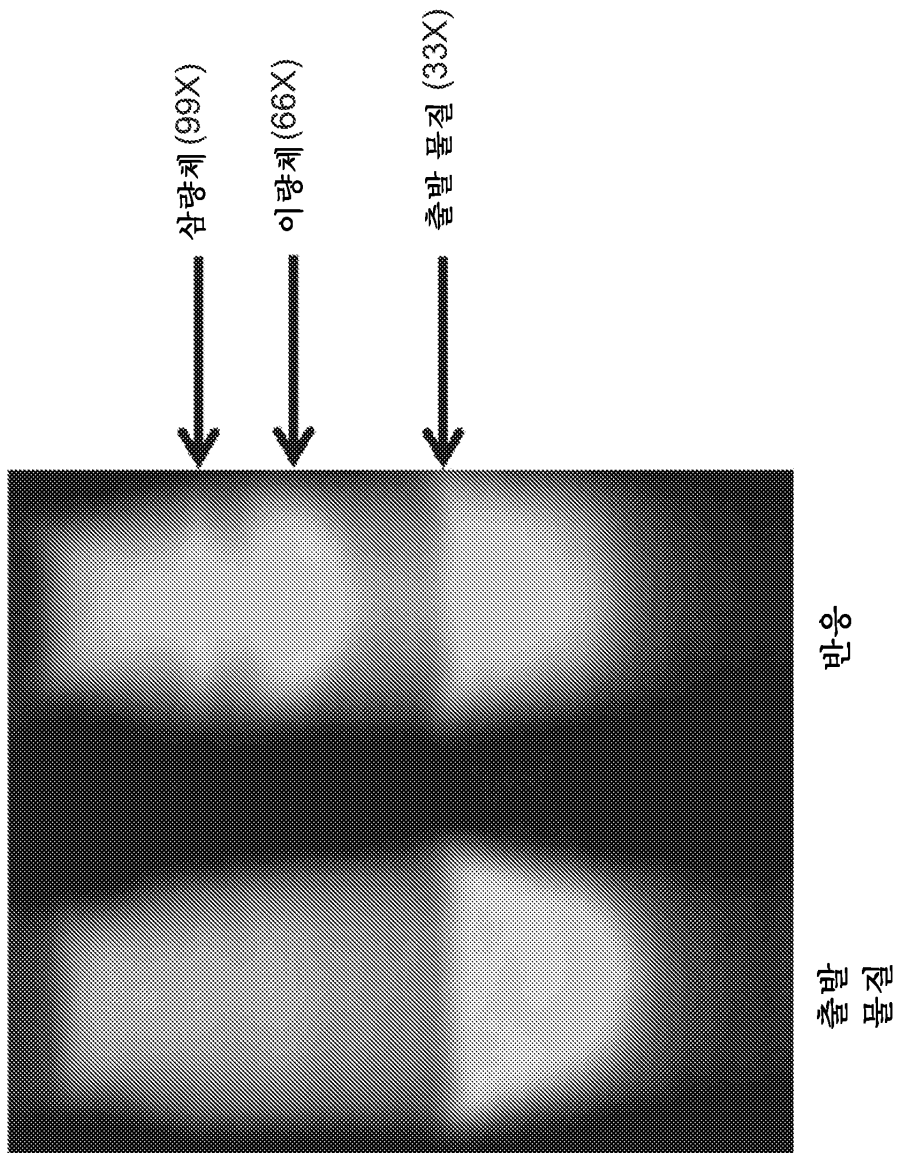
도면8



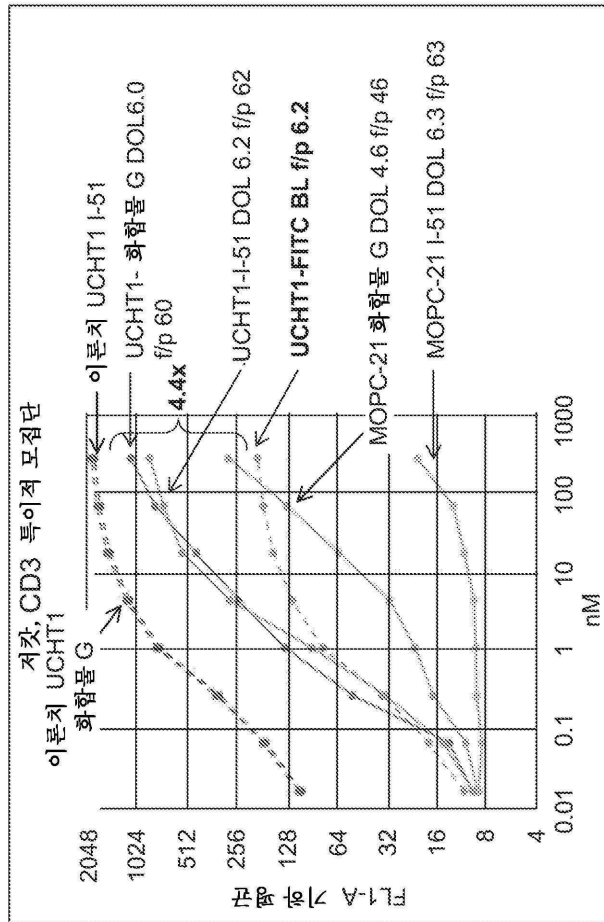
도면9



도면10



도면12

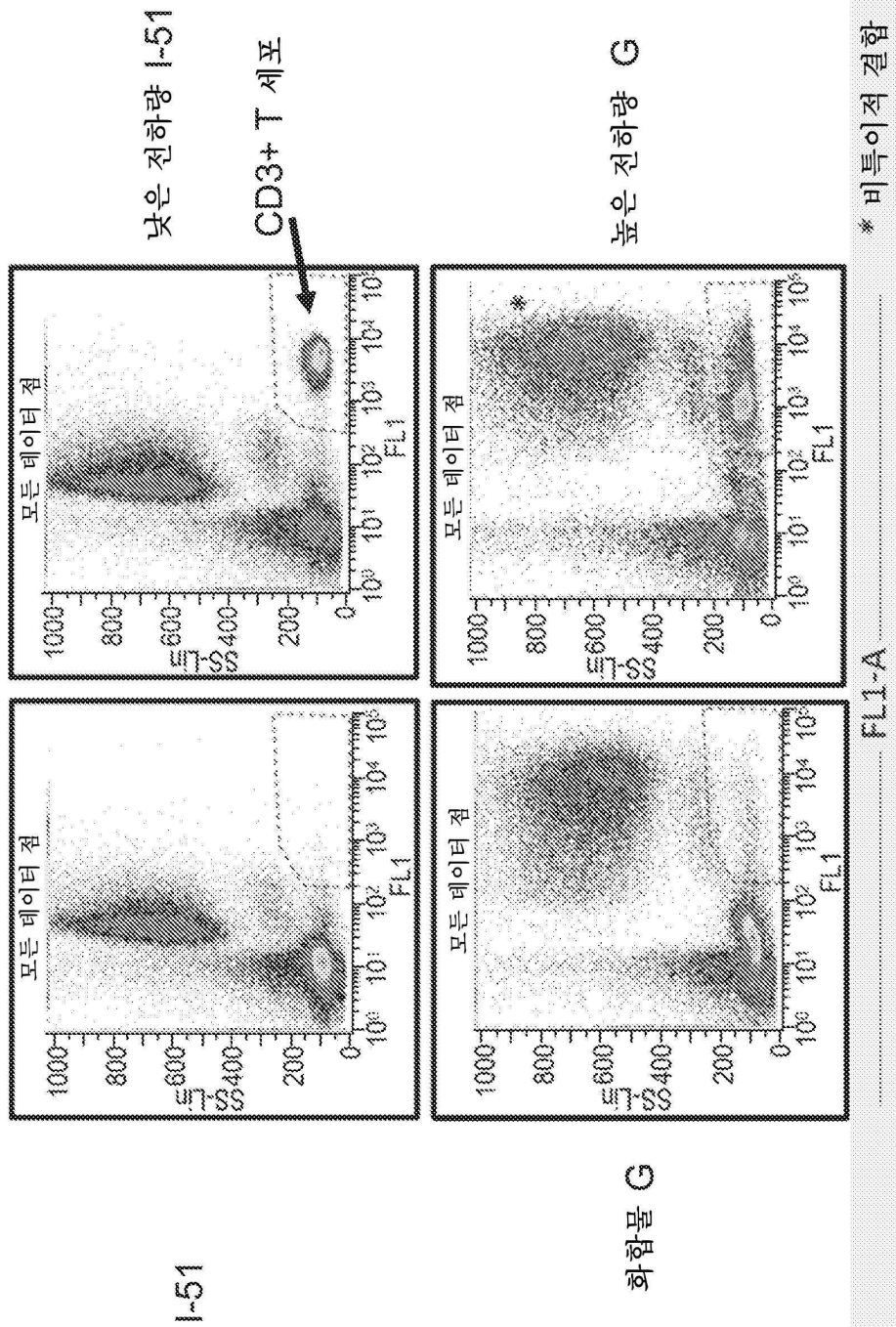


UCHT1보다 "배(x)" 더 밝은
CD3-FITC f/p 6.2

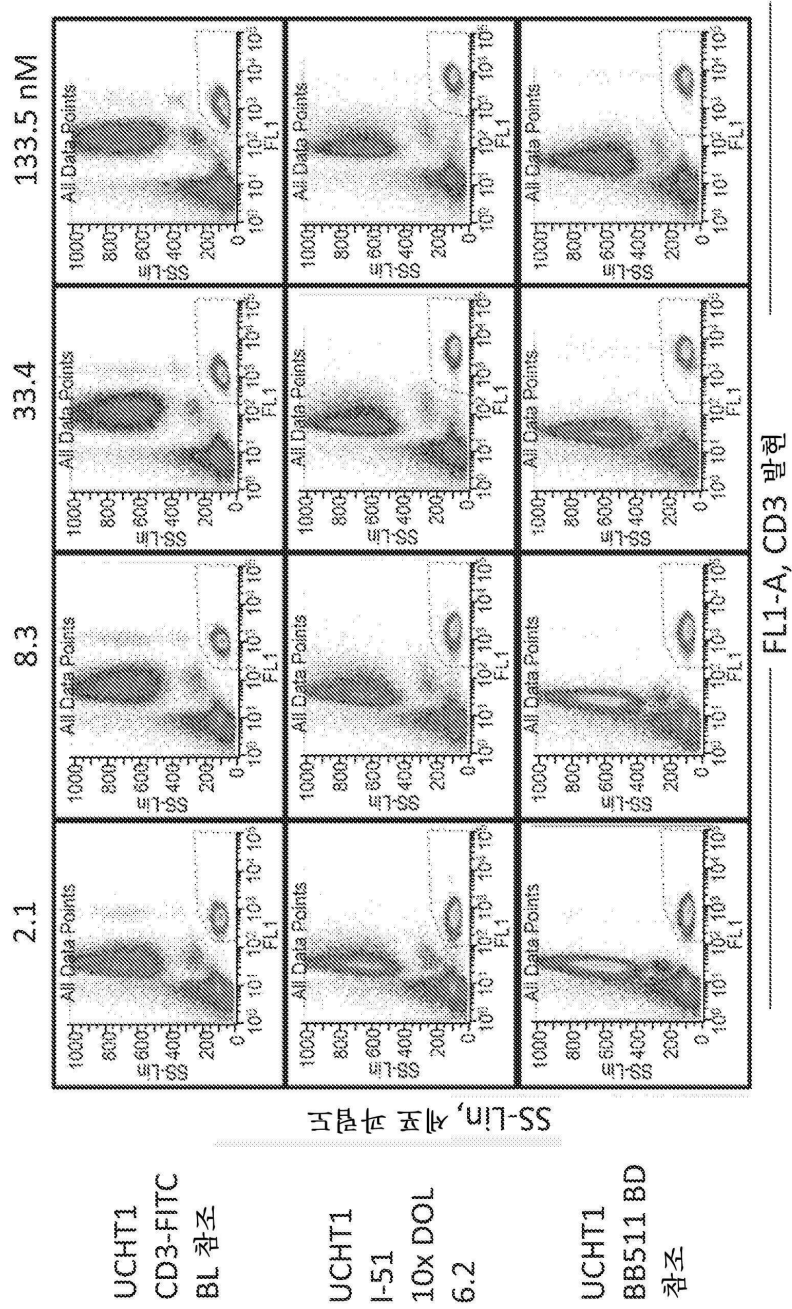
nM	UCHT1- 화합물 G	UCHT1- I-51
0.004	1.1	1.1
0.016	0.9	0.9
0.066	0.7	0.8
0.26	1.5	0.9
1.05	1.7	1.2
4.2	2.1	2.4
16.7	2.9	3.5
66.8	4.5	4.0
267	5.8	4.4

I-51은 화합물 G의 75 내지 88%로 밝다

도면13

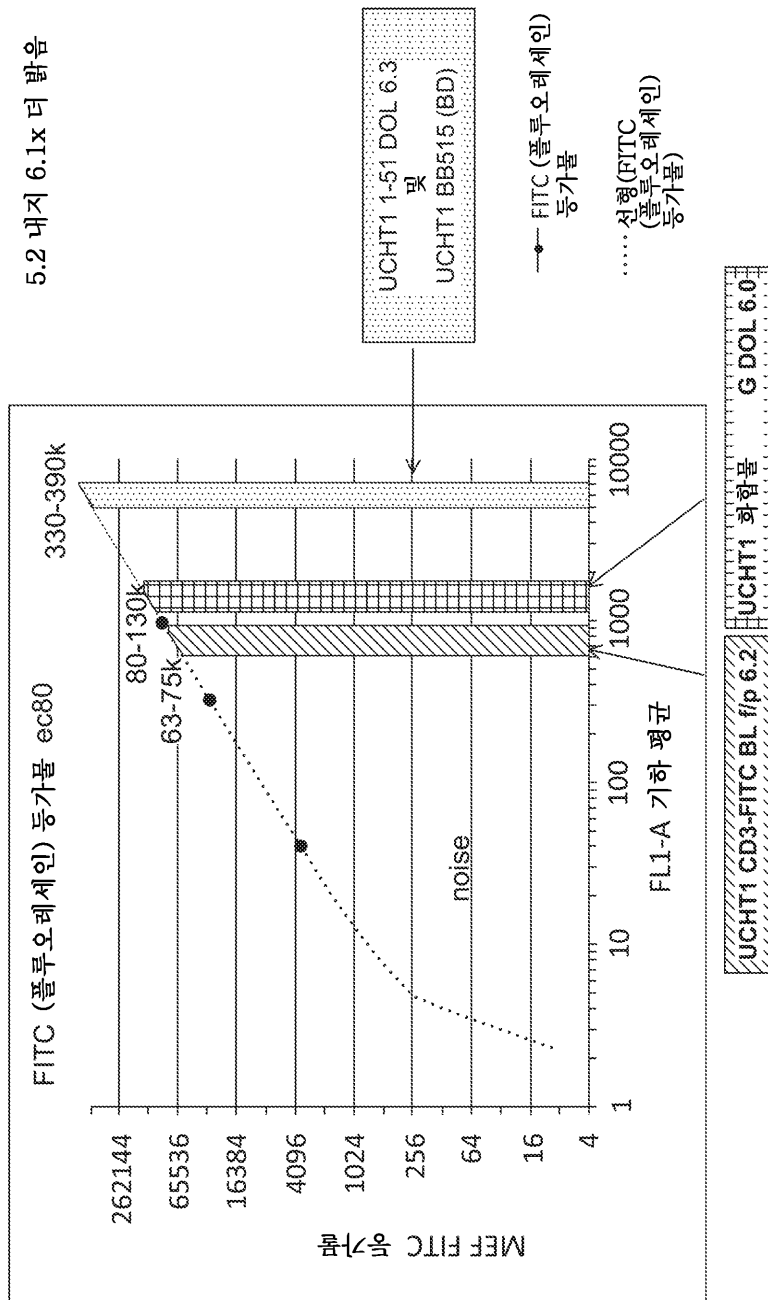


도면14

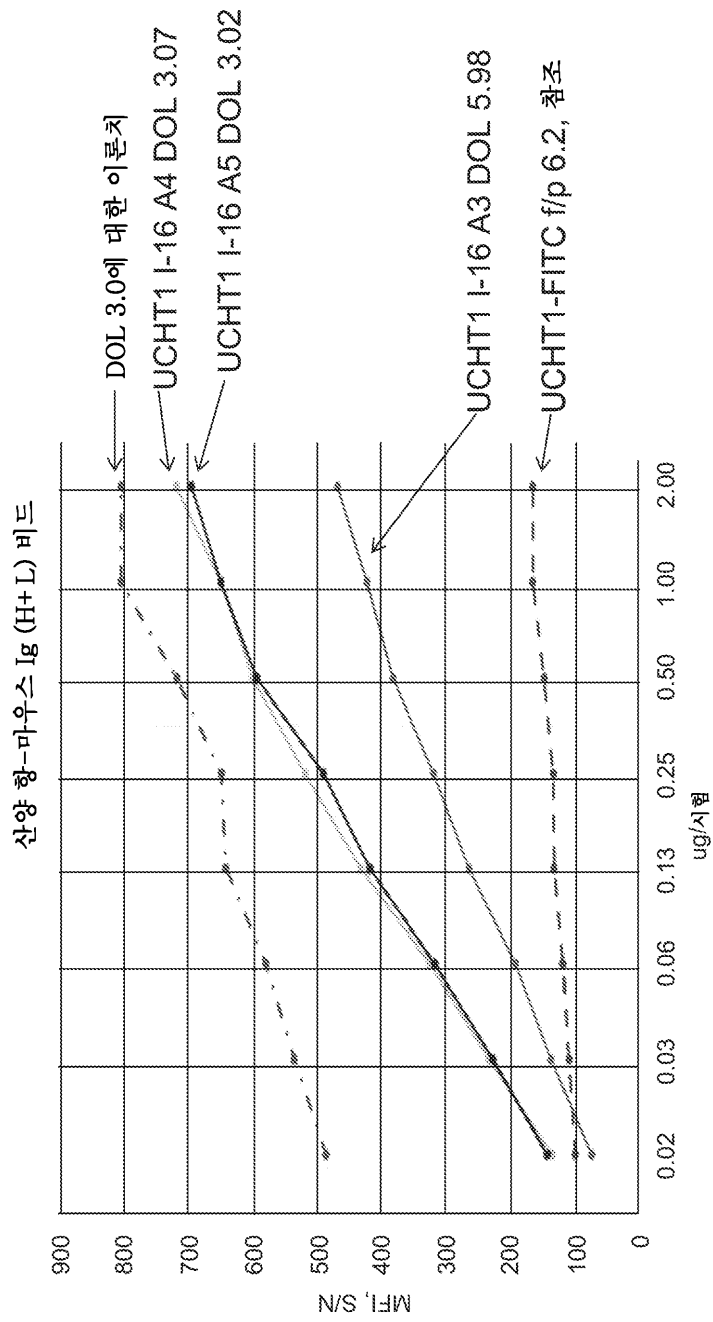


도면15

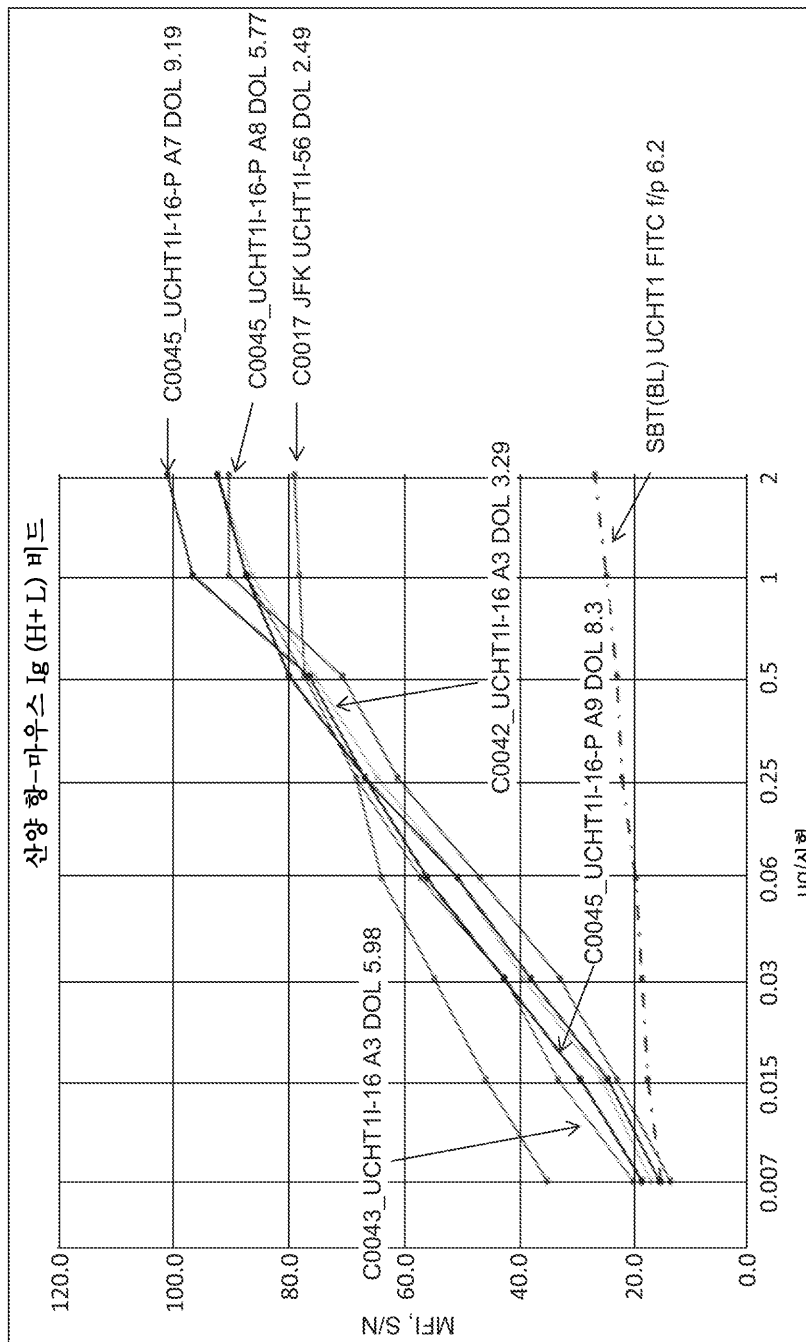
5.2 내지 6.1x 더 밝음



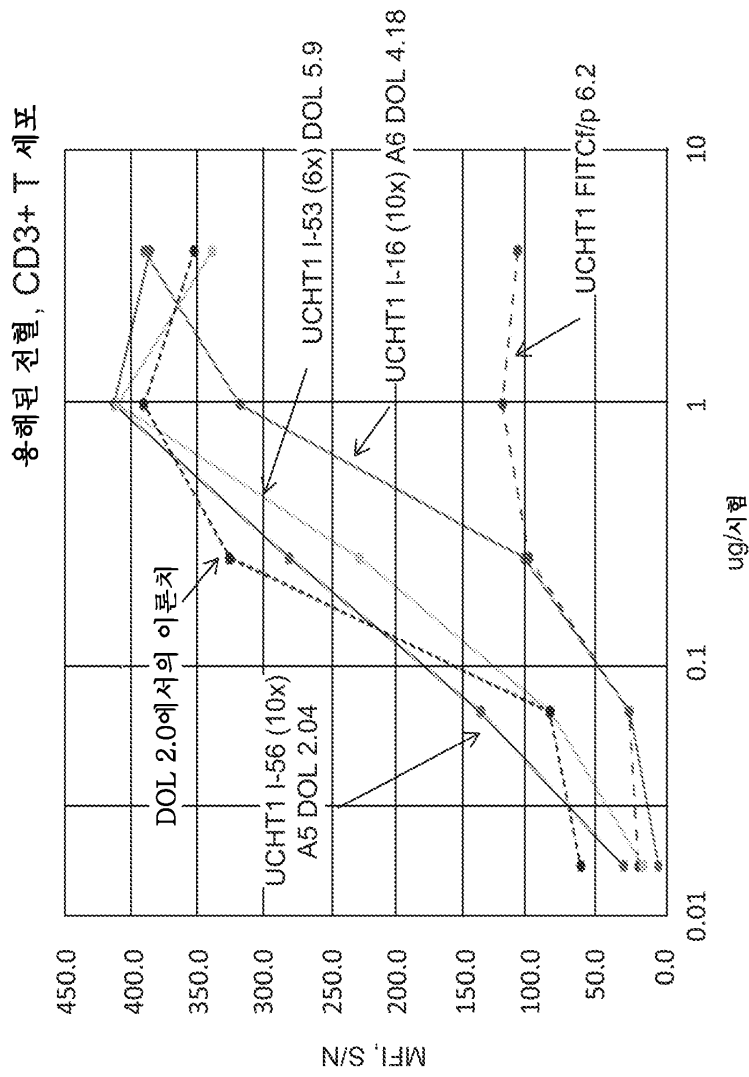
도면16



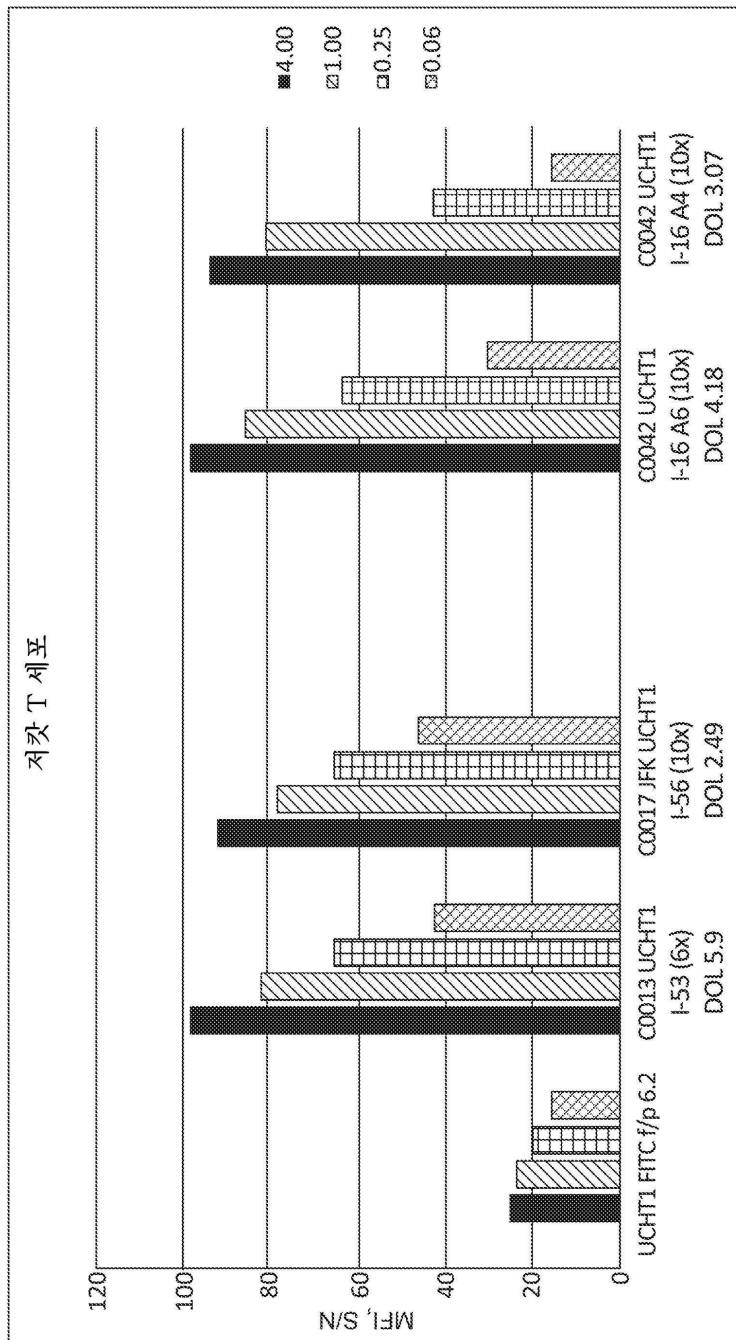
도면17

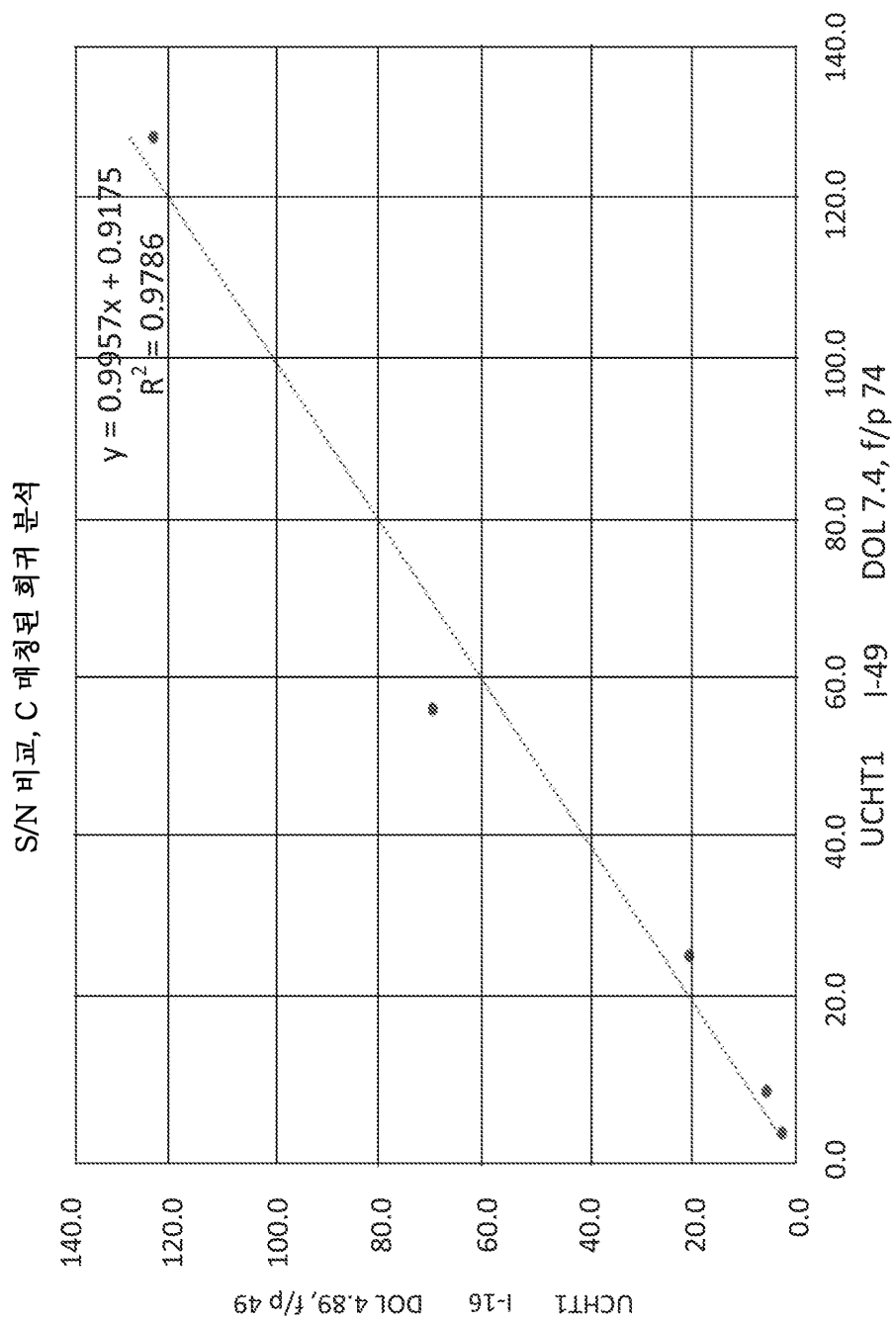


도면18

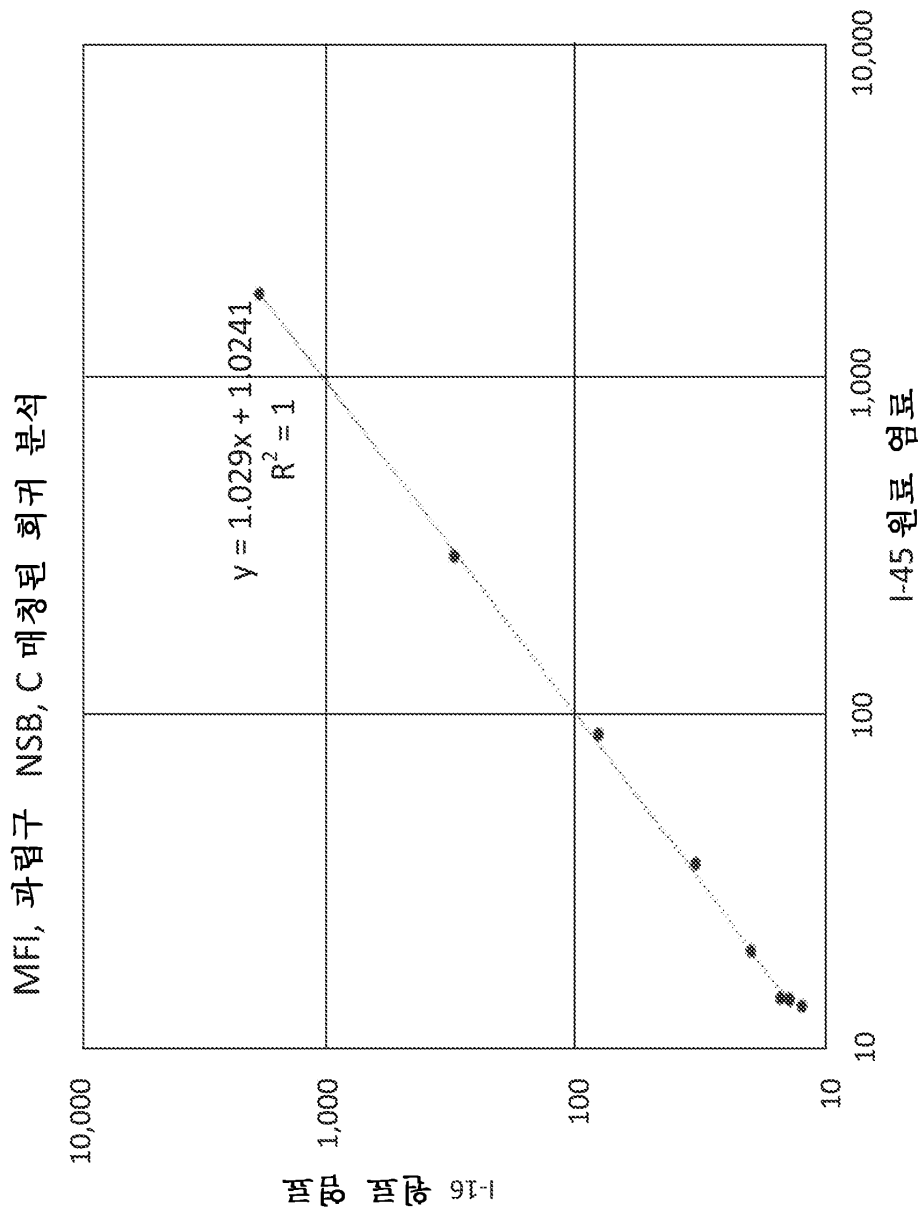


도면19

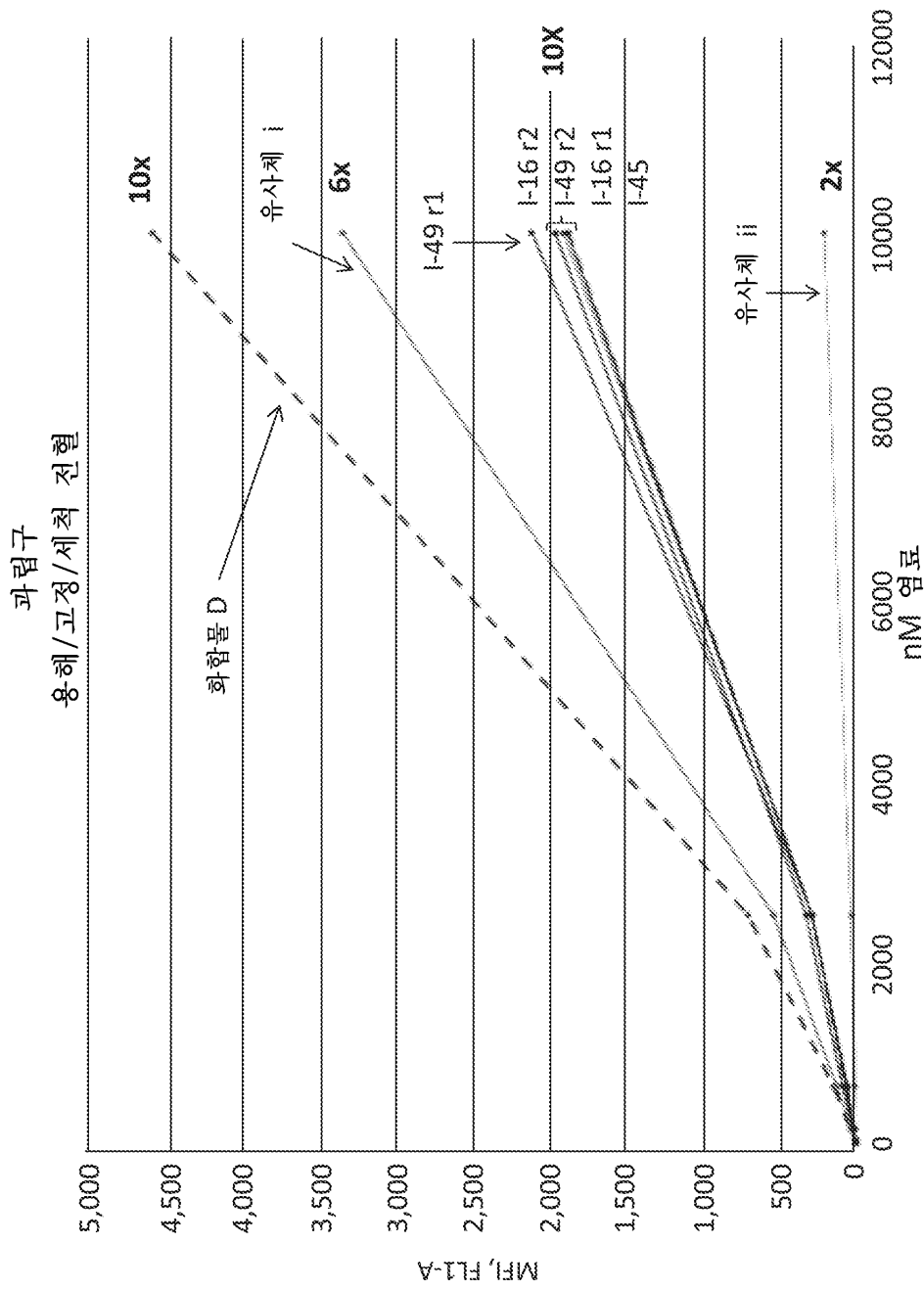




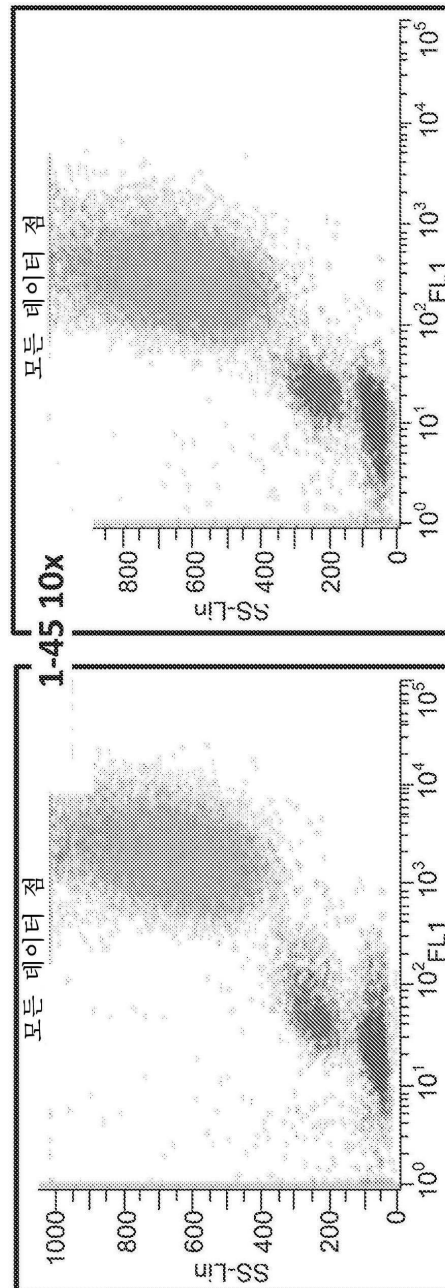
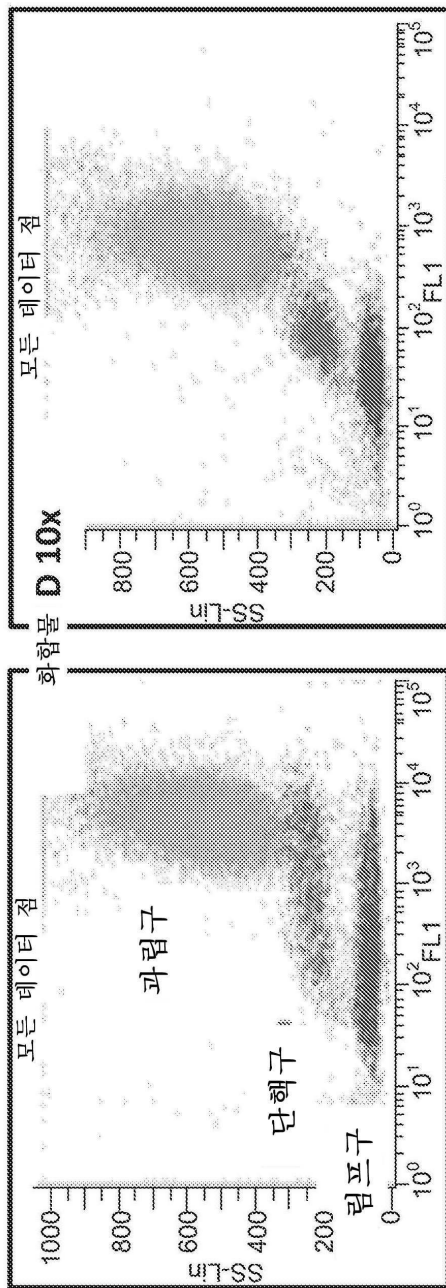
도면21a



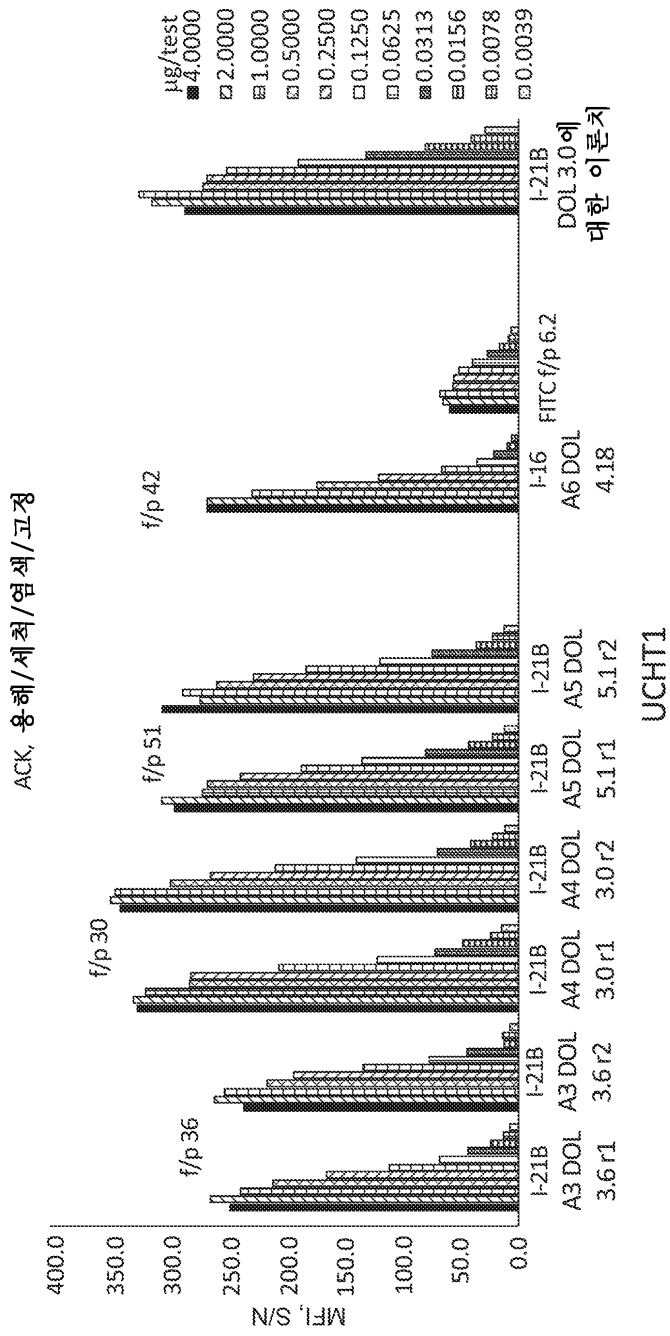
도면21b



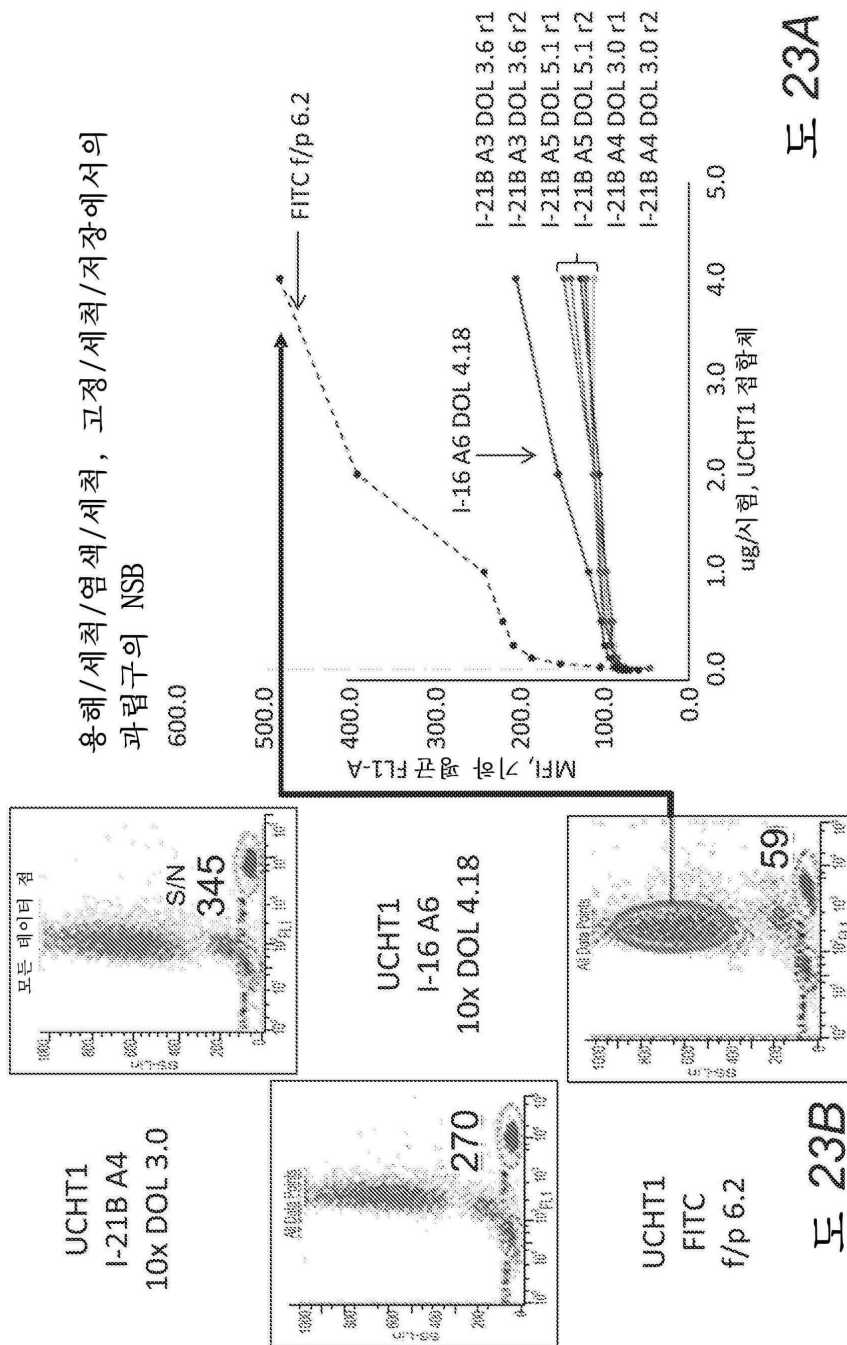
도면21c



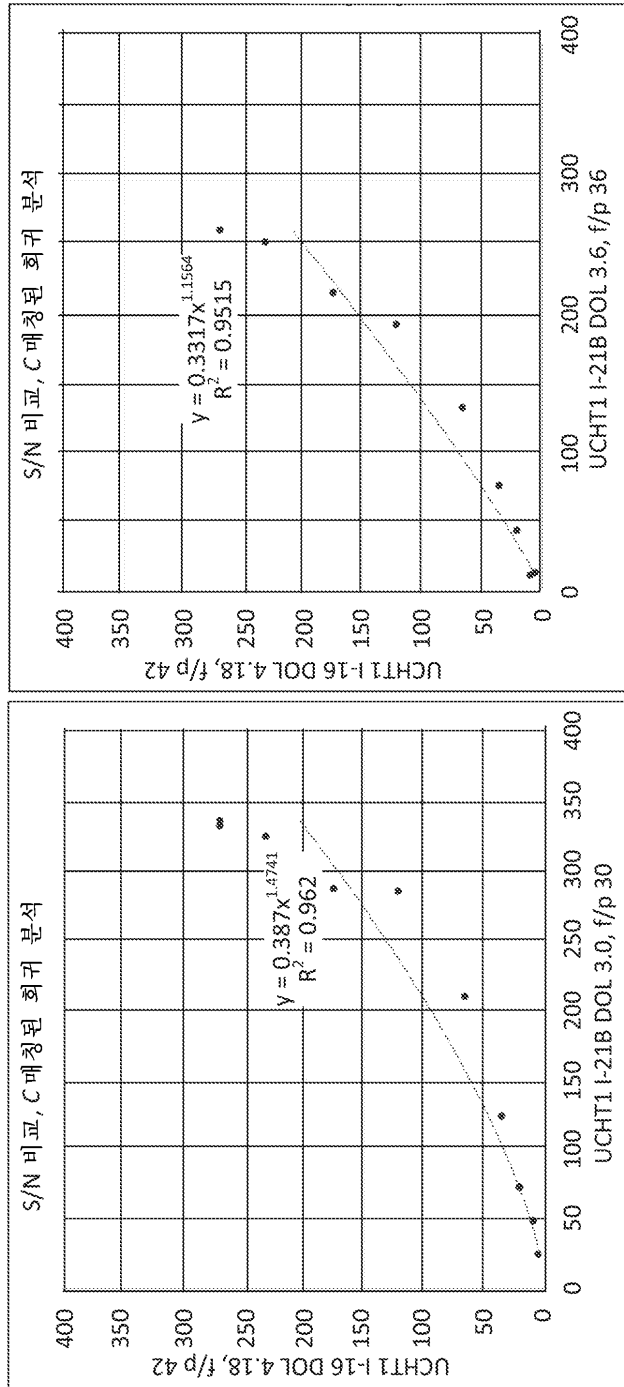
도면22



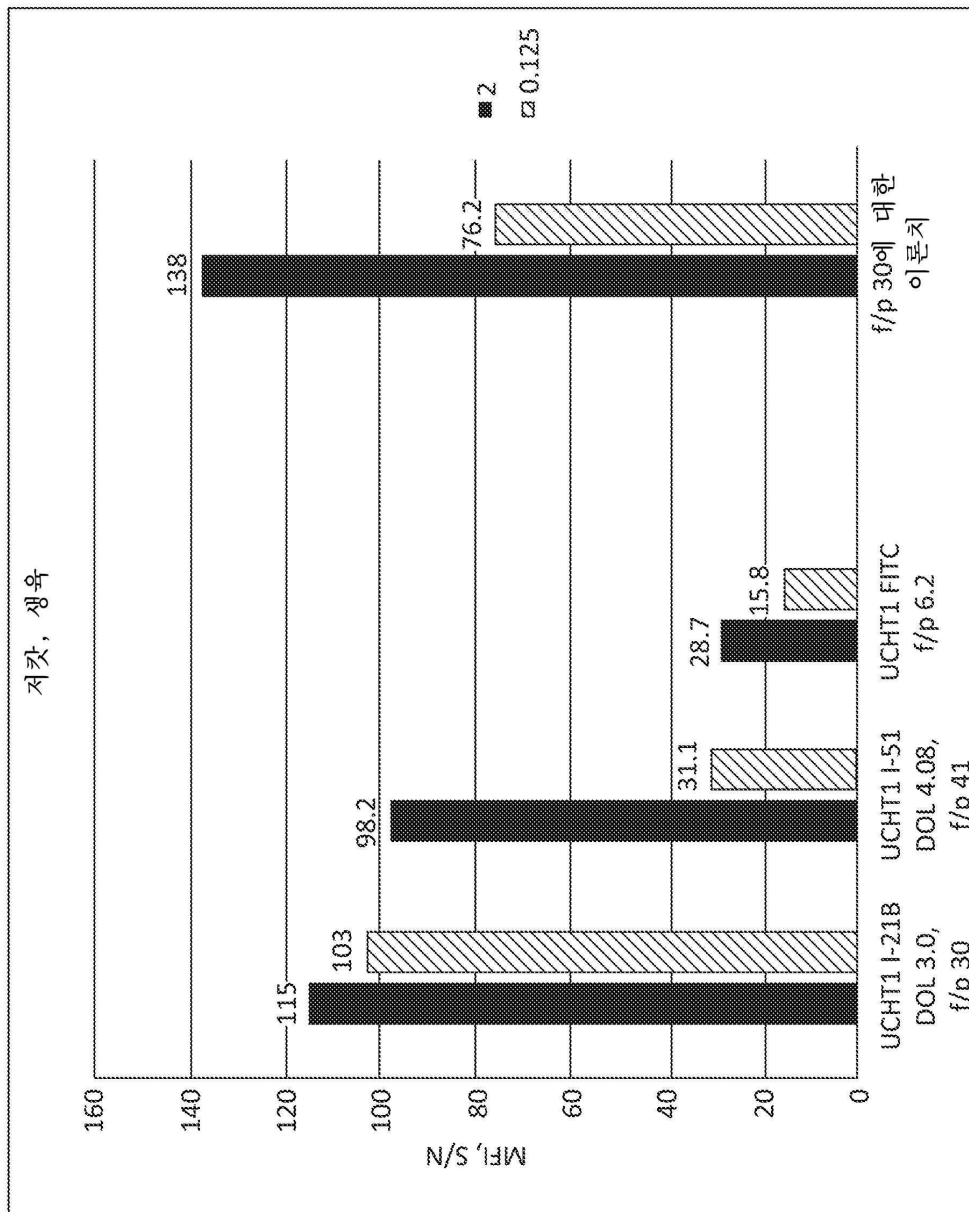
도면23



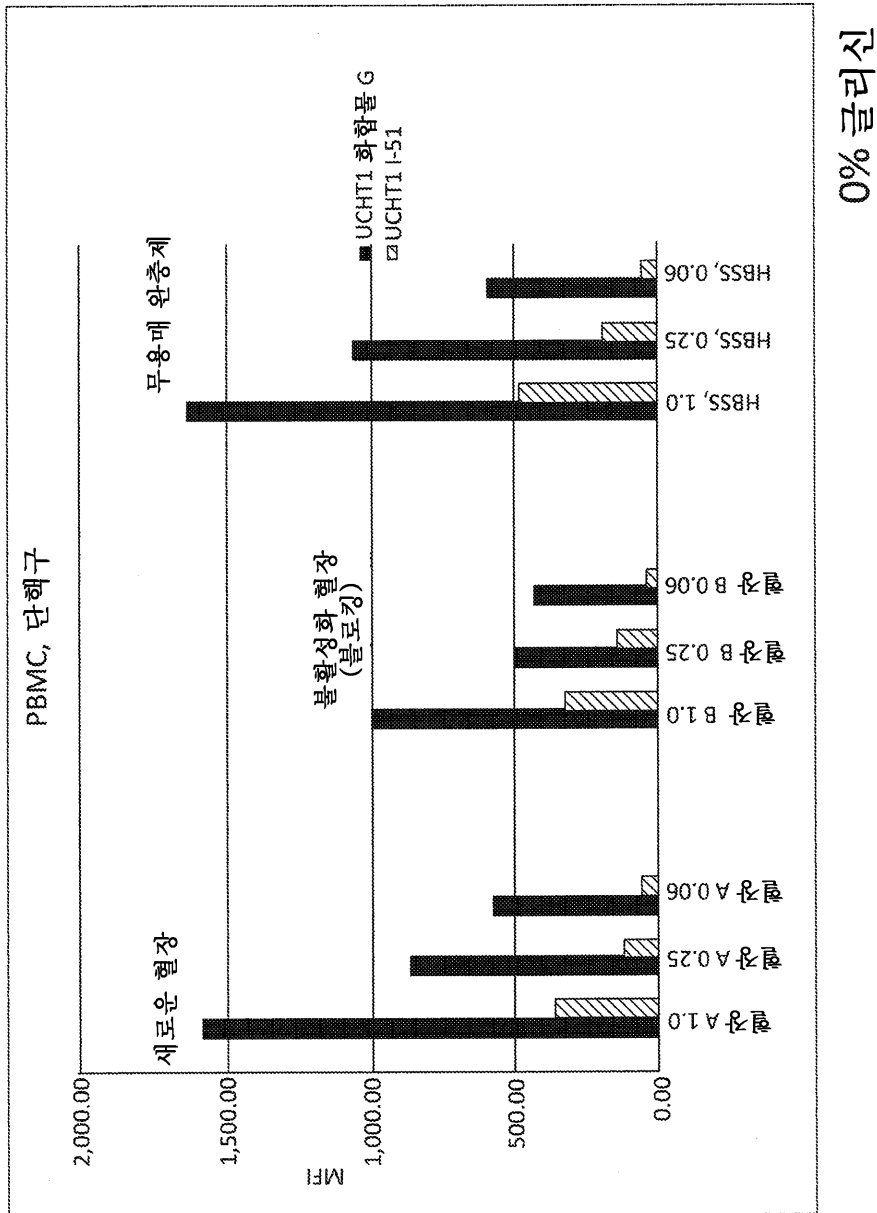
도면24



도면25



도면26a



도면26b

