



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0052856
(43) 공개일자 2020년05월15일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07D 413/04</i> (2006.01) <i>C07D 417/04</i> (2006.01)
 <i>C07F 9/6558</i> (2006.01) <i>C07F 9/6561</i> (2006.01)
 <i>C12Q 1/68</i> (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C07D 413/04</i> (2013.01)
 <i>C07D 417/04</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7038714
 (22) 출원일자(국제) 2018년10월16일
 심사청구일자 2020년04월14일
 (85) 번역문제출일자 2019년12월27일
 (86) 국제출원번호 PCT/GB2018/052971
 (87) 국제공개번호 WO 2019/077331
 국제공개일자 2019년04월25일
 (30) 우선권주장
 1716931.9 2017년10월16일 영국(GB)</p> | <p>(71) 출원인
 일루미나 케임브리지 리미티드
 영국 케임브리지 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19
 그랜타 파크</p> <p>(72) 발명자
 로마노브, 니콜라이 니콜레비치
 영국 씨비21 6디에프 케임브리지 그레이트 애빙턴
 그랜타 파크 19 일루미나 케임브리지 리미티드 (내)
 맥컬리, 패트릭
 영국 씨비21 6디에프 케임브리지 그레이트 애빙턴
 그랜타 파크 19 일루미나 케임브리지 리미티드 (내)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인 남앤남</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 64 항

(54) 발명의 명칭 **이차 아민-치환된 쿠마린 화합물 및 형광 표지로서의 이들의 용도**

(57) 요약

본 출원은 이차 아민-치환된 쿠마린 화합물 및 형광 표지로서의 이들의 용도에 관한 것이다. 화합물은 핵산 서열화 적용에서 뉴클레오타이드에 대한 형광 표지로서 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C07F 9/65586 (2013.01)

C07F 9/65616 (2013.01)

C12Q 1/68 (2018.05)

C12Q 2563/107 (2013.01)

(72) 발명자

아나스타시, 캐롤

영국 씨비21 6디에프 케임브리지 그레이트 애빙턴
그랜타 파트 19 일루미나 케임브리지 리미티드 (내)

우, 샤오린

영국 씨비21 6디에프 케임브리지 그레이트 애빙턴
그랜타 파트 19 일루미나 케임브리지 리미티드 (내)

하이네스, 니올

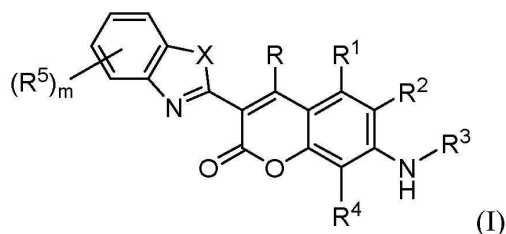
영국 씨비21 6디에프 케임브리지 그레이트 애빙턴
그랜타 파트 19 일루미나 케임브리지 리미티드 (내)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염:



상기 식에서,

X는 O, S, Se, 또는 NR^n 이고, 여기서 R^n 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이며;

R 및 R^1 은 각각 독립적으로 H, 할로, $-\text{CN}$, $-\text{CO}_2\text{H}$, 아미노, $-\text{OH}$, C-아미도, N-아미도, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이고;

R^2 및 R^4 는 각각 독립적으로 H, 할로, $-\text{CN}$, $-\text{CO}_2\text{H}$, 아미노, $-\text{OH}$, C-아미도, N-아미도, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이거나; R^2 및 R^4 중 하나는 R^3 에 결합하여 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;

R^3 은 H, C_{1-6} 알킬, 치환된 C_{2-6} 알킬, 치환되거나 비치환된 C_{2-6} 알케닐, 치환되거나 비치환된 C_{2-6} 알키닐, 또는 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 또는 헤테로아릴이거나, R^3 은 R^2 또는 R^4 에 결합하여 치환되거나 비치환된 고리를 형성하고;

여기서 R이 $-\text{CN}$ 일 때, R^3 은 C_{1-6} 알킬이 아니며;

각각의 R^5 는 독립적으로 할로, $-\text{CN}$, $-\text{CO}_2\text{H}$, 아미노, $-\text{OH}$, C-아미도, N-아미도, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이고;

m은 0, 1, 2, 3, 또는 4이다.

청구항 2

제1항에 있어서, R이 H, 할로, $-\text{CO}_2\text{H}$, 아미노, $-\text{OH}$, C-아미도, N-아미도, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴인 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R^2 및 R^4 가 각각 독립적으로 H, 할로, $-CN$, $-CO_2H$, 아미노, $-OH$, C-아미도, N-아미도, $-NO_2$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이고; R^2 및 R^4 중 어느 것도 R^3 에 결합하여 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릭 고리를 형성하지 않는 화합물.

청구항 4

제2항에 있어서, R^2 가 $-SO_3H$ 이고/이거나; R^4 가 $-SO_3H$ 인 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, X가 O 또는 S인 화합물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, X가 NR^n 이고, 여기서 R^n 은 H 또는 C_{1-6} 알킬인 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, (a) R^3 이 H이거나; (b) R^3 이 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 2차-부틸, 3차-부틸, 펜틸, 또는 헥실이거나; (c) R^3 이 에틸인 화합물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, R^3 이 치환된 C_{2-6} 알킬인 화합물.

청구항 9

제8항에 있어서, R^3 이 $-CO_2H$ 로 치환된 C_{2-6} 알킬인 화합물.

청구항 10

제8항에 있어서, R^3 이 $-(CH_2)_nCOOH$ 이고, 여기서 n은 2, 3, 4, 5 또는 6인 화합물.

청구항 11

제8항에 있어서, R^3 이 $-(CH_2)_nSO_3H$ 이고, 여기서 n은 2, 3, 4, 5 또는 6인 화합물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, m이 0, 1, 또는 2인 화합물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 R^5 가 독립적으로 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알킬, 할로, $-CN$, $-CO_2H$, 아미노, $-OH$, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 인 화합물.

청구항 14

제13항에 있어서, 각각의 R^5 가 할로, $-CN$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, 또는 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알킬인 화합물.

청구항 15

제14항에 있어서, R^5 가 $-CO_2H$, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 로 치환된 C_{2-6} 알킬인 화합물.

청구항 16

제15항에 있어서, R^5 가 $-(CH_2)_xCOOH$ 이고, 여기서 x 는 2, 3, 4, 5 또는 6인 화합물.

청구항 17

제4항에 있어서, R^5 가 $-SO_3H$ 또는 $-SO_2NH_2$ 인 화합물.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, R^1 이 H, 할로, 또는 C_{1-6} 알킬인 화합물.

청구항 19

제18항에 있어서, R^1 이 H 또는 Cl인 화합물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, R이 H, 할로, 또는 C_{1-6} 알킬인 화합물.

청구항 21

제20항에 있어서, R^1 이 H 또는 Cl인 화합물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, R이 H, 할로, $-CO_2H$, 아미노, $-OH$, C-아미도, N-아미도, $-NO_2$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴인 화합물.

청구항 23

제22항에 있어서, R이 H인 화합물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 H, 치환되거나 비치환된 알킬, $-CO_2H$ 또는 $-SO_3H$ 로 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알킬, 또는 $-SO_3H$ 인 화합물.

청구항 25

제24항에 있어서, R^2 가 H 또는 $-SO_3H$ 인 화합물.

청구항 26

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 가 R^3 에 결합하여 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릭 고리, 바람직하게는 하나 이상의 알킬 기로 치환되거나 비치환된 피롤리딘 또는 피페리딘을 형성하는 화합물.

청구항 27

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, R^4 가 H, 치환되거나 비치환된 알킬, $-CO_2H$ 또는 $-SO_3H$ 로 치환되거나

비치환된 C₁₋₄알킬, 또는 -SO₃H인 화합물.

청구항 28

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, R⁴가 R³에 결합하여 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릭 고리, 바람직하게는 하나 이상의 알킬 기로 치환되거나 비치환된 피롤리딘 또는 피페리딘을 형성하는 화합물.

청구항 29

제1항에 있어서, X가 O 또는 S이고; R¹이 H이고; R³이 -(CH₂)_nCOOH이고, 여기서 n은 2, 3, 4, 5, 또는 6이며; R⁵가 H, -SO₃H, 또는 -SO₂NH₂이고; R²가 H 또는 -SO₃H이고; R⁴가 H 또는 -SO₃H인 화합물.

청구항 30

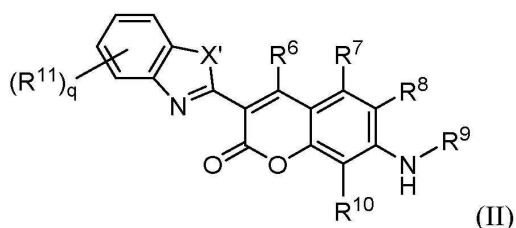
제29항에 있어서, R³이 -(CH₂)₂COOH인 화합물.

청구항 31

제29항에 있어서, R³이 -(CH₂)₅COOH인 화합물.

청구항 32

하기 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 염:



상기 식에서,

X'는 O, S, 및 NR^p로부터 선택되고, 여기서 R^p는 H 또는 C₁₋₆알킬이며;

R⁶은 H 또는 C₁₋₄알킬이고;

R⁷은 H, 할로, -CN, -OH, 치환되거나 비치환된 C₁₋₄알킬, 치환되거나 비치환된 C₁₋₄알케닐, 치환되거나 비치환된 C₂₋₄알키닐, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁₋₄알킬), -SO₂N(C₁₋₄알킬)₂, 및 치환되거나 비치환된 C₁₋₄알콕시이고;

R⁸ 및 R¹⁰은 각각 독립적으로 H, 할로, -CN, -CO₂H, 아미노, -OH, -SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁₋₄알킬), -SO₂N(C₁₋₄알킬)₂, 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알킬, 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알케닐, 치환되거나 비치환된 C₂₋₆알키닐, 또는 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알콕시이거나;

R⁸ 및 R¹⁰ 중 하나는 H, 할로, -CN, -CO₂H, 아미노, -OH, -SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁₋₄알킬), -SO₂N(C₁₋₄알킬)₂, 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알킬, 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알케닐, 치환되거나 비치환된 C₂₋₆알키닐, 또는 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알콕시이고, R⁸ 및 R¹⁰ 중 다른 하나는 R⁹와 함께 취해져 치환되거나 비치환된 4- 내지 7-원 헤테로 사이클릭 고리를 형성하고;

R⁹는 -CO₂H, -CO₂C₁₋₄알킬, -CONH₂, -CONH(C₁₋₄알킬), -CON(C₁₋₄알킬)₂, -CN, -SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁₋₄알킬), 또

는 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})_2$ 로 치환된 C_{1-6} 알킬 또는 C_{2-6} 알킬이고;

각각의 R^{11} 은 독립적으로 할로, $-\text{CN}$, 카르복시, 아미노, $-\text{OH}$, C-아미도, N-아미도, 니트로, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$, $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 및 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알콕시이고;

q 는 0, 1, 또는 2이다.

청구항 33

제32항에 있어서, X' 가 0이거나 X' 가 S인 화합물.

청구항 34

제32항에 있어서, X' 가 NR^p 이고, 여기서 R^p 는 H 또는 C_{1-6} 알킬인 화합물.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, R^6 이 H이거나 R^6 이 C_{1-4} 알킬인 화합물.

청구항 36

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, R^7 이 H이거나 R^7 이 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알킬, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$, $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})$, 또는 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})_2$ 인 화합물.

청구항 37

제36항에 있어서, R^7 이 $-\text{CO}_2\text{H}$ 로 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알킬인 화합물.

청구항 38

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, R^8 이 H이거나 R^8 이 $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, 또는 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 인 화합물.

청구항 39

제32항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, R^{10} 이 H이거나 $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, 또는 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 인 화합물.

청구항 40

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, (a) R^8 이 H이고 R^{10} 이 $-\text{SO}_3\text{H}$ 이거나 (b) R^8 이 $-\text{SO}_3\text{H}$ 이고 R^{10} 이 H인 화합물.

청구항 41

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, R^8 및 R^{10} 중 하나가 H, 할로, $-\text{CN}$, $-\text{CO}_2\text{H}$, 아미노, $-\text{OH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$, $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})_2$, 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알킬, 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알케닐, 치환되거나 비치환된 C_{2-6} 알키닐, 또는 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알콕시이고, R^8 및 R^{10} 중 다른 하나가 R^9 와 함께 취해져 치환되거나 비치환된 4- 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리를 형성하는 화합물.

청구항 42

제32항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, R^9 가 C_{2-6} 알킬이거나 R^9 가 $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CO}_2\text{C}_{1-4}\text{알킬}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONH}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})$ 인 화합물.

₄알킬), $-\text{CON}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})_2$, $-\text{CN}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$, $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})$, 또는 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})_2$ 로 치환된 C_{1-6} 알킬인 화합물.

청구항 43

제42항에 있어서, R^9 가 $-\text{CO}_2\text{H}$ 로 치환된 C_{1-6} 알킬이고, 바람직하게는 R^9 가 $-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}_2\text{H}$ 이며, 여기서 y 는 2, 3, 4, 또는 5인 화합물.

청구항 44

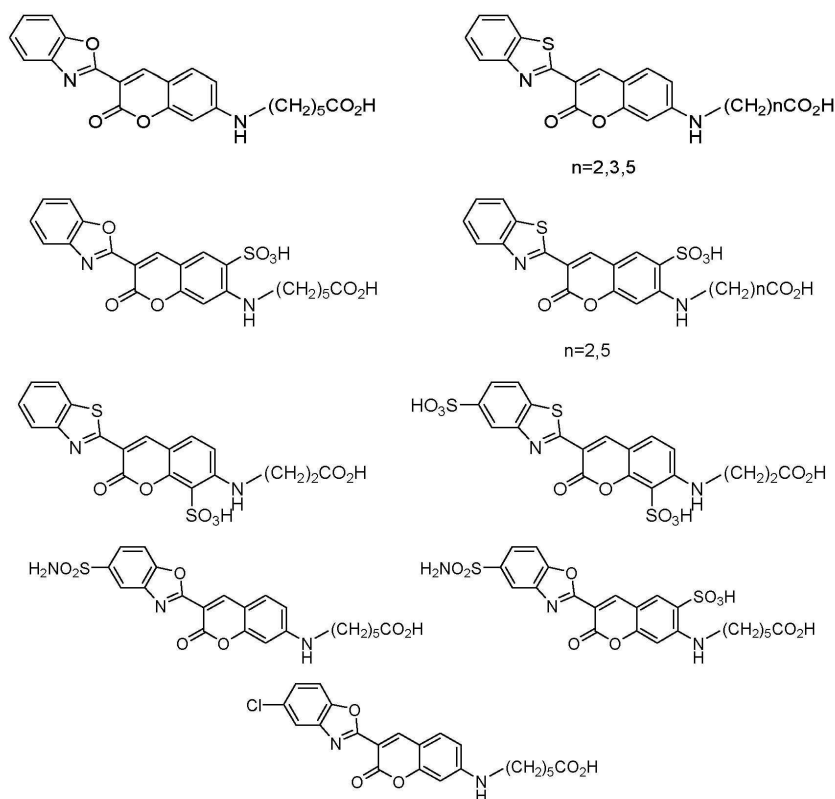
제32항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 R^{11} 이 독립적으로 할로, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2$, $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{알킬})_2$, 또는 치환되거나 비치환된 알킬인 화합물.

청구항 45

제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, q 가 0, 1, 또는 2인 화합물.

청구항 46

하기로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물:



및 이의 염.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 부착되는 화합물.

청구항 48

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 따른 화합물로 표시된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 49

제48항에 있어서, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 화합물이 화학식 (I)의 R^3 또는 화학식 (II)의 R^9 를 통해 부착되는 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 50

제49항에 있어서, 화학식 (I)의 R^3 이 $-(CH_2)_nCOOH$ 이고, 여기서 n 은 2, 3, 4, 5, 또는 6이거나, 화학식 (II)의 R^9 가 $-(CH_2)_yCOOH$ 이고, 여기서 y 는 2, 3, 4, 5, 또는 6이며, 상기 부착이 $-COOH$ 기를 사용하여 아미드를 형성하는 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 51

제48항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 표지가 링커 모이어터를 통해 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-테아자 퓨린 염기의 C7 위치에 부착되는 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 52

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오타이드의 리보스 또는 데옥시리보스 당에 공유 부착된 3' OH 차단기를 추가로 포함하는 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 53

제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 제1 표지된 뉴클레오타이드 및 제2 표지된 뉴클레오타이드를 포함하는 키트.

청구항 54

제53항에 있어서, 제2 표지된 뉴클레오타이드가 제1 표지된 뉴클레오타이드와 상이한 화합물로 표지되거나 표지되지 않는 키트.

청구항 55

제54항에 있어서, 제1 및 제2 표지된 뉴클레오타이드가 단일 레이저 파장을 사용하여 여기 가능한 키트.

청구항 56

제53항 또는 제54항에 있어서, 제3 뉴클레오타이드 및 제4 뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 이 때 제2, 제3 및 제4 뉴클레오타이드 각각은 상이한 화합물로 표지되거나 표지되지 않으며, 각각의 표지는 다른 표지로부터 구별 가능한 별개의 최대 흡광도를 갖는 키트.

청구항 57

제53항에 있어서, 키트가 4개의 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 4개의 뉴클레오타이드 중 첫 번째는 제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 표지된 뉴클레오타이드이고, 상기 4개의 뉴클레오타이드 중 두 번째는 제2 표지를 갖고, 제3 뉴클레오타이드는 제3 표지를 갖고, 제4 뉴클레오타이드는 표지되지 않는(다크) 키트.

청구항 58

제53항에 있어서, 키트가 4개의 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 4개의 뉴클레오타이드 중 첫 번째는 제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 표지된 뉴클레오타이드이고, 상기 4개의 뉴클레오타이드 중 두 번째는 제2 표지를 갖고, 제3 뉴클레오타이드는 2개 표지의 혼합물을 갖고, 제4 뉴클레오타이드는 표지되지 않는(다크) 키트.

청구항 59

서열화, 발현 분석, 하이브리드화 분석, 유전자 분석, RNA 분석, 또는 단백질 결합 검정에서 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 따른 뉴클레오타이드, 제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 올리고뉴클레오타이드, 또는 제53항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 키트의 용도.

청구항 60

제59항에 있어서, 자동 서열화 기구가 상이한 파장에서 동작하는 2개의 레이저를 포함하는 자동 서열화 기구에 대한 용도.

청구항 61

제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 뉴클레오티드를 서열화 검정에 도입시키는 단계를 포함하는 서열화 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 뉴클레오티드를 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 63

제61항 또는 제62항에 있어서, 서열화 검정이 자동 서열화 기구에서 수행되고, 상기 자동 서열화 기구가 상이한 파장에서 동작하는 2개의 광원을 포함하는 방법.

청구항 64

본원에 기재된 화학식 (I) 또는 화학식 (II)의 화합물을 합성하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 이차 아민-치환된 쿠마린 화합물 및 형광 마커로서의 이들의 용도에 관한 것이다. 특히, 화합물은 핵산 서열화 적용에서 뉴클레오티드에 대한 형광 표지로서 사용될 수 있다.

배경 기술

- [0002] 배경
- [0003] 본 개시내용이 속하는 분야의 상태를 보다 충분히 설명하기 위해 여러 간행물 및 특허 문헌이 본 출원에서 참조된다. 이러한 간행물 및 문헌 각각의 개시내용은 본원에 참조로서 포함된다.
- [0004] 형광 표지를 이용하는 핵산의 비-방사성 검출은 분자 생물학에서 중요한 기술이다. 종래에 재조합 DNA 기술에 사용된 많은 절차는, 예를 들어, ^{32}P 로 방사성 표지된 뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 사용에 의존하였다. 방사성 화합물은 핵산 및 다른 관심 분자의 민감한 검출을 허용한다. 그러나, 방사성 동위원소의 사용에는 비용, 제한된 사용 수명, 불충분한 민감도, 및 보다 중요하게는 안전성 고려사항과 같은 심각한 제한이 있다. 방사성 표지에 대한 요구를 없애는 것은 안전성 위험 및, 예를 들어, 시약 폐기와 관련된 환경적 영향 및 비용 둘 모두를 감소시킨다. 비-방사성 형광 검출에 적합한 방법은 비제한적인 예로서, 자동 DNA 서열화, 하이드리드화 방법, 폴리머라제-연쇄-반응 생성물의 실시간 검출, 및 면역검정을 포함한다.
- [0005] 많은 응용에 있어서, 복수의 공간적으로 중첩되는 분석물의 독립적인 검출을 달성하기 위해 다수의 스펙트럼-구별 가능한 형광 표지를 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 복합적인 방법에서, 반응 용기의 수를 감소시켜, 실험 프로토콜을 단순화하고 적용-특이적 시약 키트의 생산을 촉진할 수 있다. 예를 들어, 다색 자동 DNA 서열화 시스템에서, 복합적인 형광 검출은 단일 전기영동 레인에서 다중 뉴클레오티드 염기의 분석을 가능하게 하고, 이에 의해 단색 방법에 비해 처리량을 증가시키고, 레인-간 전기영동 이동성 변동과 관련된 불확실성을 감소시킨다.
- [0006] 그러나, 복합적인 형광 검출은 문제가 될 수 있고, 적절한 형광 표지의 선택을 제한하는 다수의 중요한 요인들이 있다. 먼저, 주어진 응용에서 적합하게-분해되는 흡수 및 방출 스펙트럼을 갖는 염료 화합물을 찾기가 어려울 수 있다. 또한, 여러 형광 염료가 함께 사용되는 경우, 동시 여기에 의해 구별 가능한 스펙트럼 영역에서 형광 신호를 발생시키는 것은 복잡할 수 있는데, 그 이유는 염료의 흡수 밴드가 일반적으로 넓게 분리되어, 심지어 2개의 염료에 대해서도 유사한 형광 여기 효율을 달성하기가 어렵기 때문이다. 많은 여기 방법은 레이저와 같은 고효율 광원을 사용하므로, 염료는 이러한 여기를 견딜 수 있는 충분한 광-안정성을 가져야 한다. 분자 생물학 방법에 특히 중요한 최종 고려사항은 형광 염료가, 예를 들어, DNA 합성 용매 및 시약, 완충제, 폴리머라제 효소 및 리가제 효소와 같은 시약 화학물질과 상용성이어야 하는 정도이다.

[0007] 서열화 기술이 발전함에 따라, 상기의 모든 제약을 만족시키고 특히 고체상 서열화 등과 같은 고 처리량 분자 방법에 적합한 추가 형광 염료 화합물, 이들의 핵산 컨주게이트, 및 다중 염료 세트에 대한 필요성이 대두되었다.

[0008] 적합한 형광 강도, 형상, 및 형광의 최대 파장과 같은 개선된 형광 특성을 갖는 형광 염료 분자는 핵산 서열화의 속도 및 정확성을 향상시킬 수 있다. 강한 형광 신호는 대부분의 염료의 형광 강도가 수-기반 생물학적 완충제 및 고온에서 측정이 이루어질 때 현저히 낮기 때문에 이러한 조건에서 특히 중요하다. 또한, 염료가 부착되는 염기의 성질은 또한 최대 형광, 형광 강도, 및 다른 스펙트럼 염료 특성에 영향을 미친다. 핵염기와 형광 염료 사이의 서열-특이적 상호작용은 형광 염료의 특정 설계에 의해 조정될 수 있다. 형광 염료의 구조의 최적화는 뉴클레오타이드 혼입 효율을 개선하고, 서열화 오류의 수준을 감소시키며, 핵산 서열화에서 시약의 사용 및 이에 따라 비용을 감소시킬 수 있다.

[0009] 일부 광학 및 기술 개발은 이미 이미지 품질을 크게 개선시켰지만 불충분한 광학 해상도로 인해 결국 제한되었다. 일반적으로, 광현미경의 광학 해상도는 사용된 광의 파장의 대략 절반에서 이격된 물체로 제한된다. 실용적인 면에서, 그 때는, 아주 멀리 떨어져 있는 물체(적어도 200 내지 350nm)만이 광현미경으로 분석될 수 있었다. 이미지 해상도를 개선하고 표면적 단위당 분석 가능한 물체의 수를 증가시키는 한 가지 방법은 보다 짧은 파장의 여기 광을 사용하는 것이다. 예를 들어, 광 파장을 동일한 광학 장치로 $\Delta \lambda \sim 100$ nm만큼 줄이면, 해상도가 좋아지고(약 $\Delta 50$ nm/(약 15%)), 덜-왜곡된 이미지가 기록되며, 인지 가능한 영역의 물체의 밀도는 약 35% 증가할 것이다.

[0010] 특정 핵산 서열화 방법은 염료-표지된 뉴클레오타이드를 여기시키고 검출하기 위해 레이저 광을 사용한다. 이러한 기구는 660 nm에서 여기 가능한 적절한 염료와 함께, 적색 레이저와 같은 더 긴 파장의 광을 사용한다. 유용한 해상도를 유지하면서 더 조밀하게 패킹된 핵산 서열화 클러스터를 검출하기 위해, 더 짧은 파장의 청색 광원(450-460 nm)이 사용될 수 있다. 이 경우에, 광학 해상도는 장파장 적색 형광 염료의 방출 파장에 의해서가 아니라, 그 다음으로 가장 긴 파장 광원, 예를 들어, 532 nm의 "녹색 레이저"에 의해 여기될 수 있는 염료의 방출에 의해 제한될 것이다. 따라서, 서열화 응용에서 형광 검출에 사용하기 위한 청색 염료 표지가 필요하다.

[0011] 예를 들어, DVD 및 Blu-ray 디스크용 염료를 생산하기 위해, 청색-염료 화학 및 관련 레이저 기술이 개선되었지만, 이러한 화합물은 생물-표지화에 적합하지 않고 바이오마커로서 사용될 수 없다.

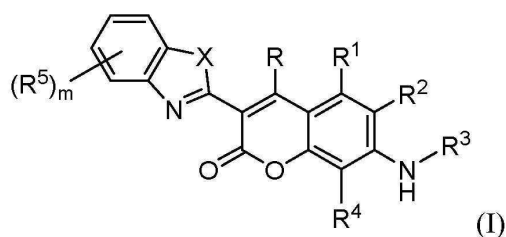
[0012] 불행하게도, 뉴클레오타이드 표지화에 적합한 강한 형광을 갖는 상업적으로 이용 가능한 청색 염료는 여전히 매우 드물다. 청색 광 여기 하에서 강한 형광을 갖는 뉴클레오타이드 표지화에 적합한 새로운 형광 화합물이 본원에 기재되어 있다.

발명의 내용

[0013] 개요

[0014] 본 발명은 이차 아민-치환된 쿠마린 유도체에 관한 것이다. 화합물은 특히 핵산 서열화 적용에서 뉴클레오타이드 표지화를 위한 형광 표지로서 유용할 수 있다. 일부 양태에서, 염료는 450-460 nm의 파장의 광을 최적으로 흡수하고, 450-460 nm의 파장을 갖는 청색 파장 여기 광원이 사용되는 상황에서 특히 유리하다. 청색 파장 여기는 더 짧은 파장의 형광 방출로 인해 단위 면적당 더 높은 밀도 양상의 검출 및 해상도를 허용한다. 이러한 염료가 뉴클레오타이드와의 컨주게이트에 사용될 때, 핵산 서열화 방법 동안 얻어진 서열화 판독물의 길이, 강도, 정확성, 및 품질에서의 개선을 볼 수 있다.

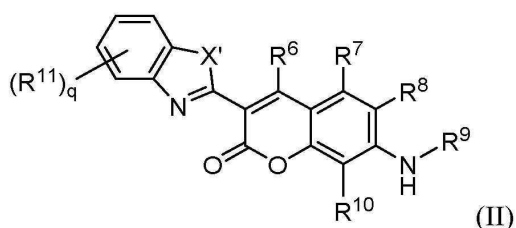
[0015] 첫 번째 양태는 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염이다:



[0016]

[0017] 상기 식에서,

- [0018] X는 O, S, Se, 또는 NR^n 이고, 여기서 R^n 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이며;
- [0019] R 및 R^1 은 각각 독립적으로 H, 할로, -CN, $-CO_2H$, 아미노, -OH, C-아미도, N-아미도, $-NO_2$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이고;
- [0020] R^2 및 R^4 는 각각 독립적으로 H, 할로, -CN, $-CO_2H$, 아미노, -OH, C-아미도, N-아미도, $-NO_2$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이거나; R^2 및 R^4 중 하나는 R^3 에 결합하여 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;
- [0021] R^3 은 H, C_{1-6} 알킬, 치환된 C_{2-6} 알킬, 치환되거나 비치환된 C_{2-6} 알케닐, 치환되거나 비치환된 C_{2-6} 알키닐, 또는 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 또는 헤테로아릴이거나, R^3 은 R^2 또는 R^4 에 결합하여 치환되거나 비치환된 고리를 형성하고;
- [0022] 여기서 R이 -CN일 때, R^3 은 C_{1-6} 알킬이 아니며;
- [0023] 각각의 R^5 는 독립적으로 할로, -CN, $-CO_2H$, 아미노, -OH, C-아미도, N-아미도, $-NO_2$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이고;
- [0024] m은 0, 1, 2, 3, 또는 4이다.
- [0025] 일부 양태에서, R은 -CN이 아니며, R은 H, 할로, $-CO_2H$, 아미노, -OH, C-아미도, N-아미도, $-NO_2$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이다.
- [0026] 또 다른 양태는 하기 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 염이다:



- [0027]
- [0028] 상기 식에서,
- [0029] X' 는 O, S, 및 NR^p 로부터 선택되고, 여기서 R^p 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이며;
- [0030] R^6 은 H 또는 C_{1-4} 알킬이고;
- [0031] R^7 은 H, 할로, -CN, -OH, 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알킬, 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알케닐, 치환되거나 비치환된 C_{2-4} 알키닐, $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2NH(C_{1-4}알킬)$, $-SO_2N(C_{1-4}알킬)_2$, 및 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알콕시이고;
- [0032] R^8 및 R^{10} 은 각각 독립적으로 H, 할로, -CN, $-CO_2H$, 아미노, -OH, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2NH(C_{1-4}알킬)$, $-SO_2N(C_{1-4}알$

킬)₂, 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알킬, 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알케닐, 치환되거나 비치환된 C₂₋₆알키닐, 또는 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알콕시이거나;

[0033] R⁸ 및 R¹⁰ 중 하나는 H, 할로, -CN, -CO₂H, 아미노, -OH, -SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁₋₄알킬), -SO₂N(C₁₋₄알킬)₂, 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알킬, 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알케닐, 치환되거나 비치환된 C₂₋₆알키닐, 또는 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알콕시이고, R⁸ 및 R¹⁰ 중 다른 하나는 R⁹와 함께 취해져 치환되거나 비치환된 4- 내지 7-원 헤테로 사이클릭 고리를 형성하고;

[0034] R⁹는 -CO₂H, -CO₂C₁₋₄알킬, -CONH₂, -CONH(C₁₋₄알킬), -CON(C₁₋₄알킬)₂, -CN, -SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁₋₄알킬), 또는 -SO₂N(C₁₋₄알킬)₂로 치환된 C₁₋₆알킬 또는 C₂₋₆알킬이고;

[0035] 각각의 R¹¹은 독립적으로 할로, -CN, 카르복시, 아미노, -OH, C-아미도, N-아미도, 니트로, -SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁₋₄알킬), -SO₂N(C₁₋₄알킬)₂, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 및 치환되거나 비치환된 C₁₋₆알콕시이고;

[0036] q는 0, 1, 또는 2이다.

[0037] 또 다른 구체예에서, 본 개시내용의 화합물은, 예를 들어, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 탄수화물, 리간드, 입자, 세포, 반-고체 표면(예를 들어, 겔), 또는 고체 표면과 같은 기질 모이어티와 컨쥬게이션된다. 컨쥬게이션은 카르복실기 -CO₂H를 통해 수행될 수 있고, 이는 당 분야에 공지된 공지된 방법을 사용하여 모이어티 상의 아미노 또는 하이드록실 기(예를 들어, 뉴클레오티드) 또는 이에 결합된 링커와 반응하여 아마이드 또는 에스테르를 형성할 수 있다.

[0038] 따라서, 본 개시내용의 추가 양태에 따르면, 예를 들어, 기질 모이어티에의 공유 부착을 가능하게 하는 링커기를 포함하는 염료 화합물이 제공된다. 결합은 임의의 R기를 포함하는 염료의 임의의 위치에서 수행될 수 있다. 결합은 화학식 (I)의 R³ 또는 R⁵를 통해, 또는 화학식 (II)의 R⁹ 또는 R¹¹을 통해 수행될 수 있다.

[0039] 추가 양태에 따르면, 본 개시내용은 하기 화학식에 의해 정의된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 화합물을 제공한다:

[0040] N-L-염료

[0041] 상기 식에서, N은 뉴클레오티드이고;

[0042] L은 선택적 링커 모이어티이고;

[0043] 염료는 본 개시내용에 따른 형광 화합물이다.

[0044] 따라서, 본원에 기술된 일부 구체예는 (a) 화학식 (I) 또는 (b) 화학식 (II)의 화합물로 표시된 모이어티, 특히 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다.

[0045] 추가 양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 염료 화합물을 사용한 서열화 방법을 제공한다.

[0046] 추가 양태에 따르면, 본 개시내용은 또한 다양한 번역학적 검정, 올리고뉴클레오티드 또는 핵산 표지화, 또는 합성에 의한 DNA 서열화에 사용될 수 있는 염료 화합물(유리 또는 컨쥬게이트 형태)을 포함하는 키트를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 자동화 기구 플랫폼 상에서 합성에 의한 서열화 사이클에 특히 적합한 염료 "세트"를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 양태는 하나 이상의 뉴클레오티드를 함유하는 키트이고, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오티드는 본원에 기술된 표지된 뉴클레오티드이다.

[0047] 본 개시내용의 추가 양태는 이차 아민-치환된 쿠마린 염료 및 이러한 염료로 표지된 뉴클레오티드와 같은 모이어티를 포함하는 본 개시내용의 화합물의 화학적 제조이다.

[0048] 추가 양태는 서열화 검정에서 본원에 기술된 표지된 뉴클레오티드를 폴리뉴클레오티드에 도입시키고, 도입된 표지된 뉴클레오티드를 검출하는 것을 포함하는 서열화 방법이다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도면의 간단한 설명

도 1A, 1B, 및 1C는 Illumina 합성에 의한 서열화(SBS) 화학을 사용한 본원에 기술된 3개의 청색 염료에 대한 가상 서열화 결과를 보여주는 산점도이다. 4개의 뉴클레오타이드 상의 염료는 실시예 5에 기술된 바와 같이 4개의 별개의 스펙트럼 분해 영역으로서 검출되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 상세한 설명

[0051] 본 개시내용은 형광 검출 및 합성에 의한 서열화 방법에 특히 적합한 이차 아민-치환된 쿠마린 화합물을 제공한다. 본원에 기술된 구체에는 화학식 (I)의 구조의 염료 및 이들의 유도체에 관한 것이다.

[0052] 제1 양태에 따르면, 본 개시내용은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염을 제공한다.

[0053] 다양한 치환기에 대한 특정 제한은 하기에 제시되어 있다. 달리 명시되지 않는 한, 각 단일 그룹은 임의의 다른 개별 제한과 조합될 수 있다.

[0054] 수-기반 용액에서 바이오마커 및 특히 이들의 바이오컨쥬게이트의 형광 특성을 개선시키기 위해, 화학식 (I)의 화합물은:

[0055] i) R^2 가 $-SO_3H$ 이고/이거나;

[0056] ii) R^4 가 $-SO_3H$ 이고/이거나;

[0057] iii) R^5 가 $-SO_3H$ 또는 $-SO_2NH_2$ 인 화합물이다.

[0058] 일부 양태에서, X는 O 또는 S이다. 일부 양태에서, X는 O이다. 일부 양태에서, X는 S이다. 일부 양태에서, X는 NR^n 이고, 여기서 R^n 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이며, 일부 양태에서, R^n 은 H이다.

[0059] 일부 양태에서, R^3 은 H이다. 일부 양태에서, R^3 은 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 2차-부틸, 3차-부틸, 펜틸, 또는 헥실이다. 다른 양태에서, R^3 은 에틸이다. 다른 양태에서, R^3 은 치환된 C_{2-6} 알킬이다. 다른 양태에서, R^3 은 $-CO_2H$ 로 치환된 C_{2-6} 알킬이다. 다른 양태에서, R^3 은 치환되거나 비치환된 C_{2-6} 알케닐 또는 치환되거나 비치환된 C_{2-6} 알키닐이다. 일부 양태에서, R^3 은 R^2 또는 R^4 에 결합하여 치환되거나 비치환된 고리를 형성한다.

[0060] R^3 을 통해 링커 또는 뉴클레오타이드에 커플링하는 경우, R^3 은 여기에 부착된 작용기에 커플링할 수 있는 충분한 길이를 가져야 한다. 일부 양태에서, R^3 은 $-CH_2COOH$ 또는 $-CH_2COO^-$ 가 아니다.

[0061] 선택적으로, R^3 은 $-(CH_2)_nCOOH$ 이고, 여기서 n은 2-6이다. 일부 양태에서, n은 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 다른 양태에서, n은 2 또는 5이다. 일부 양태에서, n은 2이다. 일부 양태에서, n은 5이다.

[0062] 선택적으로, R^3 은 $-(CH_2)_nSO_3H$ 이고, 여기서 n은 2-6이다. 일부 양태에서, n은 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 다른 양태에서, n은 2 또는 5이다. 일부 양태에서, n은 2이다. 일부 양태에서, n은 5이다.

[0063] 인돌 모이어티의 벤젠 고리는 임의의 1, 2, 3 또는 4개 위치에서 R^5 로 나타낸 치환기에 의해 치환되거나 비치환된다. m이 0인 경우, 벤젠 고리는 비치환된다. m이 1보다 큰 경우, 각각의 R^5 는 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 양태에서, m은 0이다. 다른 양태에서, m은 1이다. 다른 양태에서, m은 2이다. 일부 양태에서, m은 1, 2, 또는 3이고, 각각의 R^5 는 독립적으로 할로, $-CN$, $-CO_2H$, 아미노, $-OH$, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 이다. 일부 양태에서, R^5

는 $-(CH_2)_xCOOH$ 이고, 여기서 x 은 2-6이다. 일부 양태에서, x 는 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 다른 양태에서, x 는 2 또는 5이다. 일부 양태에서, x 는 2이다. 일부 양태에서, x 는 5이다.

[0064] 일부 양태에서, R^5 는 할로, $-CN$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, 또는 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알킬이다. 일부 양태에서, R^5 는 할로, $-CO_2H$, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 이다. 일부 양태에서, R^5 는 $-CO_2H$, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 로 치환된 C_{2-6} 알킬이다. 일부 양태에서, 각각의 R^5 는 독립적으로 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알킬, 할로, $-CN$, $-CO_2H$, 아미노, $-OH$, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 이다.

[0065] 일부 양태에서, R^1 은 H이다. 일부 양태에서, R^1 은 할로이다. 일부 양태에서, R^1 은 Cl이다. 일부 양태에서, R^1 은 C_{1-6} 알킬이다. 일부 양태에서, R^1 은 메틸이다.

[0066] 일부 양태에서, R 은 H이다. 일부 양태에서, R 은 할로이다. 일부 양태에서, R 은 Cl이다. 일부 양태에서, R 은 C_{1-6} 알킬이다. 일부 양태에서, R 은 메틸이다. 일부 양태에서, R 은 $-CN$ 이 아니다. 일부 양태에서, R 은 H, 할로, $-CO_2H$, 아미노, $-OH$, C-아미도, N-아미도, $-NO_2$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알케닐, 치환되거나 비치환된 알키닐, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아미노알킬, 치환되거나 비치환된 카르보사이클릴, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릴, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이다.

[0067] 일부 양태에서, R^2 는 H이다. 일부 양태에서, R^2 는 치환되거나 비치환된 알킬이다. 일부 양태에서, R^2 는 $-CO_2H$ 또는 $-SO_3H$ 로 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알킬이다. 일부 양태에서, R^2 는 $-SO_3H$ 이다. 일부 양태에서, R^2 는 R^3 에 결합하여 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릭 고리, 예를 들어, 하나 이상의 알킬 기로 치환되거나 비치환된 피롤리딘 또는 피페리딘을 형성한다, 일부 양태에서, R^2 는 H, 치환되거나 비치환된 알킬, $-CO_2H$ 또는 $-SO_3H$ 로 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알킬, 또는 $-SO_3H$ 이다. 일부 양태에서, R^2 는 H 또는 $-SO_3H$ 이다.

[0068] 일부 양태에서, R^4 는 H이다. 일부 양태에서, R^4 는 치환되거나 비치환된 알킬이다. 일부 양태에서, R^4 는 $-CO_2H$ 또는 $-SO_3H$ 로 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알킬이다. 일부 양태에서, R^4 는 $-SO_3H$ 이다. 일부 양태에서, R^4 는 R^3 에 결합하여 치환되거나 비치환된 헤테로사이클릭 고리, 예를 들어, 하나 이상의 알킬 기로 치환되거나 비치환된 피롤리딘 또는 피페리딘을 형성한다,

[0069] 화학식 (I)의 화합물의 특정 예는 X 가 O 또는 S이고; R 이 H이고; R^1 이 H이고; R^3 이 $-(CH_2)_nCOOH$ 이고, 여기서 n 은 2-6이며; R^5 가 H, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 이고; R^2 가 H 또는 $-SO_3H$ 이고; R^4 가 H 또는 $-SO_3H$ 인 화합물을 포함한다.

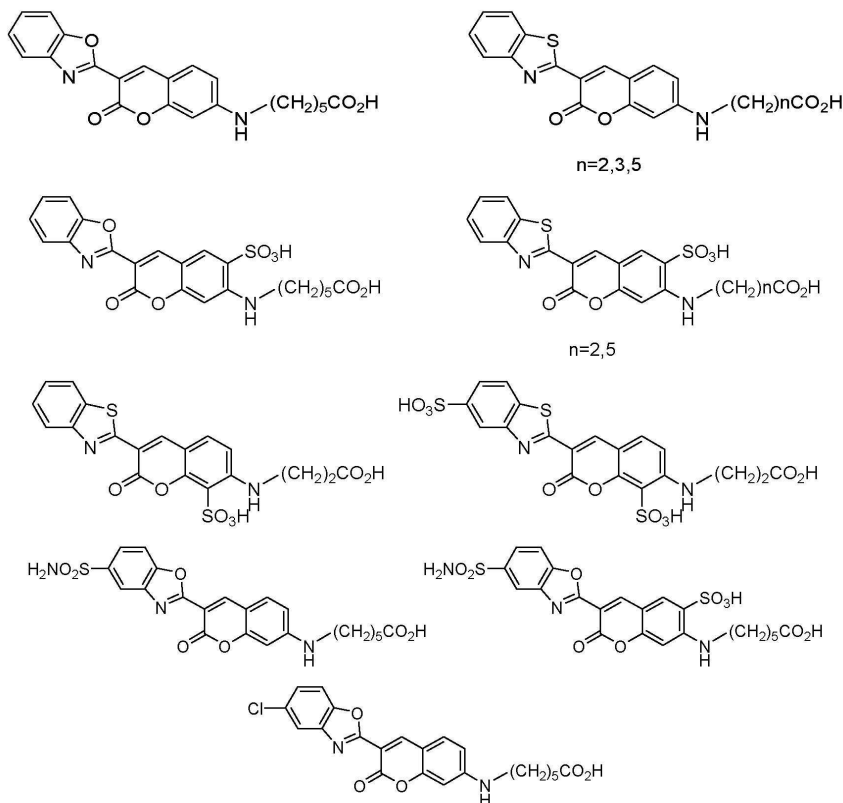
[0070] 화학식 (I)의 화합물의 특정 예는 X 가 O 또는 S이고; R 이 H이고; R^1 이 H이고; R^3 이 $-(CH_2)_2COOH$ 이고; R^5 가 H, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 이고; R^2 가 H 또는 $-SO_3H$ 이고; R^4 가 H 또는 $-SO_3H$ 인 화합물을 포함한다.

[0071] 화학식 (I)의 화합물의 특정 예는 X 가 O 또는 S이고; R 이 H이고; R^1 이 H이고; R^3 이 $-(CH_2)_5COOH$ 이고; R^5 가 H, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 이고; R^2 가 H 또는 $-SO_3H$ 이고; R^4 가 H 또는 $-SO_3H$ 인 화합물을 포함한다.

[0072] 화학식 (II)의 일부 양태에서, X' 는 O이다. 일부 양태에서, X' 는 S이다. 일부 양태에서, X' 는 NR^p 이고, 여기서 R^p 는 H 또는 C_{1-6} 알킬이다. 일부 양태에서, X' 는 NR^p 이고, 여기서 R^p 는 H이다.

[0073] 일부 양태에서, R^6 은 H이다. 일부 양태에서, R^6 은 C_{1-4} 알킬이다.

- [0074] 일부 양태에서, R^7 은 H이다. 일부 양태에서, R^7 은 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알킬, $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2NH(C_{1-4}알킬)$, 또는 $-SO_2N(C_{1-4}알킬)_2$ 이다. 일부 양태에서, R^7 은 $-CO_2H$ 로 치환되거나 비치환된 C_{1-4} 알킬이다.
- [0075] 일부 양태에서, R^8 은 H이다. 일부 양태에서, R^8 은 $-CO_2H$, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 이다. 일부 양태에서, R^8 은 $-SO_3H$ 이다.
- [0076] 일부 양태에서, R^{10} 은 H이다. 일부 양태에서, R^{10} 은 $-CO_2H$, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 이다. 일부 양태에서, R^{10} 은 $-SO_3H$ 이다. 일부 양태에서, R^8 은 H이고 R^{10} 은 $-SO_3H$ 이다. 일부 양태에서, R^8 은 $-SO_3H$ 이고 R^{10} 은 H이다.
- [0077] 일부 양태에서, R^8 및 R^{10} 중 하나는 H, 할로, $-CN$, $-CO_2H$, 아미노, $-OH$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2NH(C_{1-4}알킬)$, $-SO_2N(C_{1-4}알킬)_2$, 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알킬, 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알케닐, 치환되거나 비치환된 C_{2-6} 알키닐, 또는 치환되거나 비치환된 C_{1-6} 알콕시이고, R^8 및 R^8 중 다른 하나는 R^9 와 함께 취해져 치환되거나 비치환된 4- 내지 7-원 헤테로사이클릭 고리를 형성한다.
- [0078] 일부 양태에서, R^9 은 C_{2-6} 알킬이다. 일부 양태에서, R^9 은 $-CO_2H$, $-CO_2C_{1-4}알킬$, $-CONH_2$, $-CONH(C_{1-4}알킬)$, $-CON(C_{1-4}알킬)_2$, $-CN$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2NH(C_{1-4}알킬)$, 또는 $-SO_2N(C_{1-4}알킬)_2$ 로 치환된 C_{1-6} 알킬이다. 다른 양태에서, R^9 은 $-CO_2H$ 로 치환된 C_{1-6} 알킬이다. 일부 양태에서, R^9 은 $-(CH_2)_y-CO_2H$ 이고, 여기서 y는 2, 3, 4, 또는 5이다.
- [0079] 일부 양태에서, 각각의 R^{11} 은 독립적으로 할로, $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2NH(C_{1-4}알킬)$, $-SO_2N(C_{1-4}알킬)_2$, 또는 치환되거나 비치환된 알킬이다. 다른 양태에서, 각각의 R^{11} 은 독립적으로 할로, $-CO_2H$, $-SO_3H$, 또는 $-SO_2NH_2$ 이다.
- [0080] 일부 양태에서, q는 0이다. 다른 양태에서, q는 1이다. 또 다른 양태에서, q는 2이다.
- [0081] 이차 아민-치환된 쿠마린 염료의 특정 예는 다음을 포함한다:



[0082]

- [0083] 및 이의 염.
- [0084] 특히 유용한 화합물은 본원에 기재된 염료로 표지된 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드이다. 표지된 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 알킬-카르복시기를 통해 쿠마린 분자의 질소 원자에 부착되어 알킬-아미드를 형성하는 표지를 지닐 수 있다. 표지된 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 링커 모이어티를 통해 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-테아자 퓨린 염기의 C7 위치에 부착되는 표지를 지닐 수 있다.
- [0085] 표지된 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드의 리보스 또는 데옥시리보스 당에 공유 부착된 차단기를 지닐 수 있다. 차단기는 리보스 또는 데옥시리보스 당의 임의의 위치에 부착될 수 있다. 특정 구체예에서, 차단기는 뉴클레오티드의 리보스 또는 데옥시리보스 당의 3' OH 위치에 있다.
- [0086] 2개 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 키트로서, 여기서 적어도 하나의 뉴클레오티드가 본 개시내용의 화합물로 표지된 뉴클레오티드인 키트가 본원에 제공된다. 키트는 2개 이상의 표지된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드는 2개 이상의 형광 표지로 표지될 수 있다. 표지 중 2개 이상은 레이저일 수 있는 단일 여기원을 사용하여 여기될 수 있다. 예를 들어, 2개 이상의 표지에 대한 여기 밴드는 적어도 부분적으로 중첩되어 스펙트럼의 중첩 영역에서의 여기가 둘 모두의 표지로 하여금 형광을 방출하도록 할 수 있다. 특정 구체예에서, 2개 이상의 표지로부터의 방출은 표지 중 적어도 하나의 존재가 방출을 광학적으로 구별함으로써 결정될 수 있도록 스펙트럼의 상이한 영역에서 발생할 것이다.
- [0087] 키트는 4개의 표지된 뉴클레오티드를 함유할 수 있고, 여기서 4개의 뉴클레오티드 중 첫 번째는 본원에 개시된 바와 같은 화합물로 표지된다. 이러한 키트에서, 4개의 뉴클레오티드 각각은 다른 3개의 뉴클레오티드의 표지와 동일하거나 상이한 화합물로 표지될 수 있다. 따라서, 화합물 중 하나 이상은 화합물(들)이 다른 화합물과 구별될 수 있도록 별개의 최대 흡광도 및/또는 최대 방출을 가질 수 있다. 예를 들어, 각각의 화합물은 각 화합물이 다른 3개의 화합물과 구별될 수 있도록 별개의 최대 흡광도 및/또는 최대 방출을 가질 수 있다. 최대치 이외의 흡광도 스펙트럼 및/또는 방출 스펙트럼의 일부는 상이할 수 있고, 이러한 차이는 화합물을 구별하기 위해 이용될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 키트는 화합물 중 2개 이상이 별개의 최대 흡광도를 갖도록 할 수 있다. 본 발명의 화합물은 전형적으로 500 nm 미만의 영역에서 광을 흡수한다.
- [0088] 본원에 개시된 화합물, 뉴클레오티드, 또는 키트는 생물학적 시스템(예를 들어, 이의 공정 또는 성분 포함)을 검출, 측정, 또는 확인하는데 사용될 수 있다. 화합물, 뉴클레오티드, 또는 키트를 사용할 수 있는 예시적인 기술은 서열화, 발현 분석, 하이브리드화 분석, 유전자 분석, RNA 분석, 세포 검정(예를 들어, 세포 결합 또는 세포 기능 분석), 또는 단백질 검정(예를 들어, 단백질 결합 검정 또는 단백질 활성 검정)을 포함한다. 특정 기술을 수행하기 위해 자동 서열화 기구와 같은 자동화 기구에서 사용될 수 있다. 서열화 기구는 상이한 파장에서 동작하는 2개의 레이저를 포함할 수 있다.
- [0089] 본 개시내용의 화합물을 합성하는 방법이 본원에 개시된다. 본 개시내용에 따른 염료는 다양한 상이한 적합한 출발 물질로부터 합성될 수 있다. 쿠마린 염료를 제조하는 방법은 당 분야에 잘 알려져 있다.
- [0090] 정의
- [0091] 본원에서 사용되는 섹션 제목은 단지 구성적 목적을 위한 것이며, 기재된 요지를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0092] 본 명세서 및 첨부된 청구 범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 명시적으로 그리고 명백하게 하나의 지시대상으로 제한되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다는 점에 유의한다. 본 교시의 사상 또는 범위를 벗어나지 않으면서 본원에 기술된 다양한 구체예에 대한 다양한 수정 및 변형이 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본원에 기술된 다양한 구체예는 첨부된 청구 범위 및 이들의 등가물의 범위 내에서 다른 수정 및 변형을 포함하도록 의도된다.
- [0093] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 용어 "포함하는" 뿐만 아니라 다른 형태, 예를 들어, "들이 포함하다", "가 포함하다", 및 "포함된"의 사용은 제한적이지 않다. 용어 "갖는" 뿐만 아니라 다른 형태, 예를 들어, "갖다", "지니다", 및 "가졌다"의 사용은 제한적이지 않다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 전환 문구이든 또는 청구 범위의 본문이든 간에, 용어 "~가(들이) 포함하다" 및 "포함하는"은 개방된 의미를 갖는 것으로 해석되어야 한다. 즉, 상기 용어는 "적어도 갖는" 또는 "적어도 포함하는"이라는 문구와 동의어로 해석되어야 한다. 예를 들어, 공정의 맥락에서 사용될 때, 용어 "포함하는"은 공정이 적어도 언급된 단계를 포함하지만 추가 단계를 포함할 수 있음을

의미한다. 화합물, 조성물, 또는 장치의 맥락에서 사용될 때, 용어 "포함하는"은 화합물, 조성물, 또는 장치가 적어도 언급된 특징 또는 성분을 포함하지만 추가 특징 또는 성분도 포함할 수 있음을 의미한다.

[0094] 본원에서 사용되는 용어 "공유 부착된" 또는 "공유 결합된"은 원자 사이에 전자 쌍의 공유를 특징으로 하는 화학적 결합의 형성을 지칭한다. 예를 들어, 공유 부착된 중합체 코팅은 다른 수단, 예를 들어, 접착 또는 정전기적 상호작용을 통한 표면의 부착과 비교하여, 기질의 작용기화된 표면과 화학적 결합을 형성하는 중합체 코팅을 지칭한다. 표면에 공유 부착된 중합체는 또한 공유 부착 이외의 수단을 통해 결합될 수 있음을 이해할 것이다.

[0095] 본원에서 사용되는 용어 "할로젠" 또는 "할로"는 원소 주기율표의 7열의 방사-안정성 원자 중 어느 하나, 예를 들어, 불소, 염소, 브롬, 또는 요오드를 의미하고, 불소 및 염소가 선호된다.

[0096] 본원에서 사용되는 "알킬"은 완전히 포화된(즉, 이중 또는 삼중 결합을 함유하지 않는) 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 사슬을 지칭한다. 알킬 기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다(본원에 표시될 때마다, "1 내지 20"과 같은 수치 범위는 주어진 범위 내의 각 정수를 지칭한다; 예를 들어, "1 내지 20개의 탄소 원자"는 알킬기가 1개의 탄소 원자, 2개의 탄소 원자, 3개의 탄소 원자 등, 최대 20개를 포함하는 탄소 원자로 구성될 수 있음을 의미하지만, 본 정의는 또한 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "알킬"의 발생을 포함한다). 알킬 기는 또한 1 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알킬일 수 있다. 알킬 기는 또한 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알킬일 수 있다. 알킬 기는 "C₁₋₄알킬" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 단지 예로서, "C₁₋₆알킬"은 알킬 사슬에 1 내지 6개의 탄소 원자가 있음을 나타내며, 즉, 알킬 사슬은 메틸, 에틸, 프로필, 이소-프로필, n-부틸, 이소-부틸, 2차-부틸, 및 t-부틸로 구성된 군으로부터 선택된다. 전형적인 알킬 기는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 3차 부틸, 펜틸, 헥실 등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0097] 본원에서 사용되는 "알콕시"는 R이 상기 정의된 바와 같은 알킬인 화학식 -OR을 지칭하고, 예를 들어, "C₁₋₉알콕시"이며, 비제한적으로 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 1-메틸에톡시(이소프로폭시), n-부톡시, 이소-부톡시, 2차-부톡시, 및 3차-부톡시 등을 포함한다.

[0098] 본원에서 사용되는 "알케닐"은 하나 이상의 이중 결합을 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 사슬을 지칭한다. 알케닐 기는 2 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 본 정의는 또한 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "알케닐"의 발생을 포함한다. 알케닐 기는 또한 2 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알케닐일 수 있다. 알케닐 기는 또한 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알케닐일 수 있다. 알케닐 기는 "C₂₋₆알케닐" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 단지 예로서, "C₂₋₆알케닐"은 알케닐 사슬에 2 내지 6개의 탄소 원자가 있음을 나타내고, 즉, 알케닐 사슬은 에테닐, 프로펜-1-일, 프로펜-2-일, 프로펜-3-일, 부텐-1-일, 부텐-2-일, 부텐-3-일, 부텐-4-일, 1-메틸-프로펜-1-일, 2-메틸-프로펜-1-일, 1-에틸-에텐-1-일, 2-메틸-프로펜-3-일, 부타-1,3-디에닐, 부타-1,2,-디에닐, 및 부타-1,2-디엔-4-일로 구성된 군으로부터 선택된다. 전형적인 알케닐 기는 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 및 헥세닐 등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0099] 본원에서 사용되는 "알키닐"은 하나 이상의 삼중 결합을 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 사슬을 지칭한다. 알키닐 기는 2 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 본 정의는 또한 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "알키닐"의 발생을 포함한다. 알키닐 기는 또한 2 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알키닐일 수 있다. 알키닐 기는 또한 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알키닐일 수 있다. 알키닐 기는 "C₂₋₆알키닐" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 단지 예로서, "C₂₋₆알키닐"은 알키닐 사슬에 2 내지 6개의 탄소 원자가 있음을 나타내고, 즉, 알키닐 사슬은 에티닐, 프로핀-1-일, 프로핀-2-일, 부틴-1-일, 부틴-3-일, 부틴-4-일, 및 2-부티닐로 구성된 군으로부터 선택된다. 전형적인 알키닐 기는 에티닐, 프로피닐, 부티닐, 펜티닐, 및 헥시닐 등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0100] 본원에서 사용되는 "헤테로알킬"은 하나 이상의 헤테로원자, 즉, 비제한적으로 질소, 산소 및 황을 포함하는 탄소 이외의 원소를 사슬 백본에 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 사슬을 지칭한다. 헤테로알킬 기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 본 정의는 또한 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "헤테로알킬"의 발생을 포함한다. 또한 헤테로알킬 기는 1 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 헤테로알킬일 수 있다. 헤테로알킬 기는 또한 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 헤테로알킬일 수 있다. 헤테로알킬 기는 "C₁₋₆ 헤테로알킬" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 헤테로알킬 기는 하나 이상의 헤테로원자를 함유할 수 있다. 단지 예로서, "C₄₋₆헤테로알킬"은 헤테로알킬 사슬에 4 내지 6개의 탄소 원자가 있고 사슬의 백본에 하나 이상의 헤테로원자가

추가로 있음을 나타낸다.

- [0101] 용어 "방향족"은 컨쥬게이션된 파이 전자 시스템을 갖는 고리 또는 고리 시스템을 지칭하고 카르보사이클릭 방향족(예를 들어, 페닐) 및 헤테로사이클릭 방향족 기(예를 들어, 피리딘) 둘 모두를 포함한다. 상기 용어는 전체 고리 시스템이 방향족인 경우 모노사이클릭 또는 융합된-고리 폴리사이클릭(즉, 인접한 원자 쌍을 공유하는 고리) 기를 포함한다.
- [0102] 본원에서 사용되는 "아릴"은 고리 백본 내에 탄소만을 함유하는 방향족 고리 또는 고리 시스템(즉, 2개의 인접한 탄소 원자를 공유하는 2개 이상의 융합된 고리)을 지칭한다. 아릴이 고리 시스템인 경우, 시스템의 모든 고리는 방향족이다. 아릴 기는 6 내지 18개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 본 정의는 또한 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "아릴"의 발생을 포함한다. 일부 구체예에서, 아릴 기는 6 내지 10개의 탄소 원자를 갖는다. 아릴 기는 "C₆₋₁₀ 아릴", "C₆ 또는 C₁₀ 아릴" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 아릴 기의 예는 페닐, 나프틸, 아줄레닐, 및 안트라세닐을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0103] "아르알킬" 또는 "아릴알킬"은, 치환기로서, 알킬렌 기를 통해 연결된 아릴 기이며, 예를 들어, 비제한적으로 벤질, 2-페닐에틸, 3-페닐프로필, 및 나프틸알킬을 포함하는 "C₇₋₁₄ 아르알킬" 등이다. 일부 경우에, 알킬렌 기는 저급 알킬렌 기(즉, C₁₋₆ 알킬렌 기)이다.
- [0104] 본원에서 사용되는 "헤테로아릴"은 하나 이상의 헤테로 원자, 즉, 비제한적으로 질소, 산소 및 황을 포함하는 탄소 이외의 원소를 고리 백본에 함유하는 방향족 고리 또는 고리 시스템(즉, 2개의 인접한 원자를 공유하는 2개 이상의 융합된 고리)을 지칭한다. 헤테로아릴이 고리 시스템인 경우, 시스템의 모든 고리는 방향족이다. 헤테로아릴 기는 5 내지 18개의 고리 구성원(즉, 탄소 원자 및 헤테로원자를 포함하는 고리 백본을 구성하는 원자의 수)을 가질 수 있지만, 본 정의는 또한 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "헤테로아릴"의 발생을 포함한다. 일부 구체예에서, 헤테로아릴 기는 5 내지 10개의 고리 구성원 또는 5 내지 7개의 고리 구성원을 갖는다. 헤테로아릴 기는 "5-7원 헤테로아릴", "5-10원 헤테로아릴", 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 헤테로아릴 고리의 예는 비제한적으로 푸릴, 티에닐, 프탈라지닐, 피롤릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 이속사졸릴, 이소티아졸릴, 트리아졸릴, 티아디아졸릴, 피리디닐, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 트리아지닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 벤즈옥사졸릴, 벤조티아졸릴, 인돌릴, 이소인돌릴, 및 벤조티에닐을 포함한다.
- [0105] "헤테로아르알킬" 또는 "헤테로아릴알킬"은, 치환기로서, 알킬렌 기를 통해 연결된 헤테로아릴 기이다. 예는 2-티에닐메틸, 3-티에닐메틸, 푸릴메틸, 티에닐에틸, 피롤릴알킬, 피리딜알킬, 이속사졸릴알킬, 및 이미다졸릴알킬을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 알킬렌 기는 저급 알킬렌 기(즉, C₁₋₆ 알킬렌 기)이다.
- [0106] 본원에서 사용되는 "카르보사이클릴"은 고리 시스템 백본 내에 탄소 원자만을 함유하는 비방향족 사이클릭 고리 또는 고리 시스템을 의미한다. 카르보사이클릴이 고리시스템인 경우, 2개 이상의 고리는 융합, 가교 또는 스피로-연결 방식으로 함께 결합될 수 있다. 카르보사이클릴은 고리 시스템의 적어도 하나의 고리가 방향족이 아닌 경우 임의의 포화도를 가질 수 있다. 따라서, 카르보사이클릴은 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 및 사이클로알키닐을 포함한다. 카르보사이클릴 기는 3 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 본 정의는 또한 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "카르보사이클릴"의 발생을 포함한다. 카르보사이클릴 기는 또한 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 카르보사이클릴일 수 있다. 카르보사이클릴 기는 또한 3 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 카르보사이클릴일 수 있다. 카르보사이클릴 기는 "C₃₋₆ 카르보사이클릴" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 카르보사이클릴 고리의 예는 비제한적으로 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헥세닐, 2,3-디하이드로-인텐, 바이사이클[2.2.2]옥타닐, 아다만틸, 및 스피로[4.4]노나닐을 포함한다.
- [0107] 본원에서 사용되는 "사이클로알킬"은 완전히 포화된 카르보사이클릴 고리 또는 고리 시스템을 의미한다. 예는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 및 사이클로헥실을 포함한다.
- [0108] 본원에서 사용되는 "헤테로사이클릴"은 고리 백본에 적어도 하나의 헤테로원자를 함유하는 비방향족 사이클릭 고리 또는 고리 시스템을 의미한다. 헤테로사이클릴은 융합, 가교, 또는 스피로-연결 방식으로 함께 결합될 수 있다. 헤테로사이클릴은 고리 시스템의 적어도 하나의 고리가 방향족이 아닌 경우 임의의 포화도를 가질 수 있다. 헤테로원자(들)는 고리 시스템에서 비방향족 또는 방향족 고리에 존재할 수 있다. 헤테로사이클릴 기는 3 내지 20개의 고리 구성원(즉, 탄소 원자 및 헤테로원자를 포함하는 고리 백본을 구성하는 원자의 수)을 가질 수 있지만, 본 정의는 또한 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "헤테로사이클릴"의 발생을 포함한다. 헤테로사이클릴

기는 또한 3 내지 10개의 고리 구성원을 갖는 중간 크기 헤테로사이클릴일 수 있다. 헤테로사이클릴 기는 또한 3 내지 6개의 고리 구성원을 갖는 헤테로사이클릴일 수 있다. 헤테로사이클릴 기는 "3-6원 헤테로사이클릴" 또는 유사한 명칭으로 지정될 수 있다. 바람직한 6원 모노사이클릭 헤테로사이클릴에서, 헤테로원자(들)는 O, N 또는 S 중 하나 내지 최대 3개로부터 선택되고, 바람직한 5원 모노사이클릭 헤테로사이클릴에서, 헤테로원자(들)는 O, N 또는 S로부터 선택되는 1 또는 2개의 헤테로원자로부터 선택된다. 헤테로사이클릴 고리의 예는 비제한적으로 아제피닐, 아크리디닐, 카르바졸릴, 신놀리닐, 디옥솔라닐, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 모르폴리닐, 옥시라닐, 옥세파닐, 티에파닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 디옥소피페라지닐, 피롤리디닐, 피롤리도닐, 피롤리도닐, 4-피페리도닐, 피라졸리닐, 피라졸리디닐, 1,3-디옥시닐, 1,3-디옥사닐, 1,4-디옥사닐, 1,4-디옥사닐, 1,3-옥사티아닐, 1,4-옥사티아닐, 1,4-옥사티아닐, 2H-1,2-옥사지닐, 트리옥사닐, 헥사하이드로-1,3,5-트리아지닐, 1,3-디옥솔릴, 1,3-디옥솔라닐, 1,3-디티올릴, 1,3-디티올라닐, 이속사졸리닐, 이속사졸리디닐, 옥사졸리닐, 옥사졸리디닐, 옥사졸리디도닐, 티아졸리닐, 티아졸리디닐, 1,3-옥사티올라닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티오페닐, 테트라하이드로티오피라닐, 테트라하이드로-1,4-티아지닐, 티아모르폴리닐, 디하이드로벤조푸라닐, 벤즈이미다졸리디닐, 및 테트라하이드로퀴놀린을 포함한다.

[0109] "O-카르복시" 기는 본원에 정의된 바와 같이 R이 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₇ 카르보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴, 및 3-10원 헤테로사이클릴로부터 선택되는 "-OC(=O)R" 기를 지칭한다.

[0110] "C-카르복시" 기는 본원에 정의된 바와 같이 R이 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₇ 카르보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴, 및 3-10원 헤테로사이클릴로부터 선택되는 "-C(=O)OR" 기를 지칭한다. 비제한적인 예는 카르복실(즉, -C(=O)OH)을 포함한다.

[0111] "설폰닐" 기는 본원에 정의된 바와 같이 R이 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₇ 카르보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴, 및 3-10원 헤테로사이클릴로부터 선택되는 "-SO₂R" 기를 지칭한다.

[0112] "설폰노" 기는 "-S(=O)OH" 기를 지칭한다.

[0113] "S-설폰아미도" 기는 본원에 정의된 바와 같이 R_A 및 R_B가 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₇ 카르보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴, 및 3-10원 헤테로사이클릴로부터 선택되는 "-SO₂NR_AR_B" 기를 지칭한다.

[0114] "N-설폰아미도" 기는 본원에 정의된 바와 같이 R_A 및 R_B가 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₇ 카르보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴, 및 3-10원 헤테로사이클릴로부터 선택되는 "-N(R_A)SO₂R_B" 기를 지칭한다.

[0115] "C-아미도" 기는 본원에 정의된 바와 같이 R_A 및 R_B가 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₇ 카르보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴, 및 3-10원 헤테로사이클릴로부터 선택되는 "-C(=O)NR_AR_B" 기를 지칭한다.

[0116] "N-아미도" 기는 본원에 정의된 바와 같이 R_A 및 R_B가 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₇ 카르보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴, 및 3-10원 헤테로사이클릴로부터 선택되는 "-N(R_A)C(=O)R_B" 기를 지칭한다.

[0117] "아미노" 기는 본원에 정의된 바와 같이 R_A 및 R_B가 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₇ 카르보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴, 및 3-10원 헤테로사이클릴로부터 선택되는 "-NR_AR_B" 기를 지칭한다. 비제한적인 예는 유리 아미노(즉, -NH₂)를 포함한다.

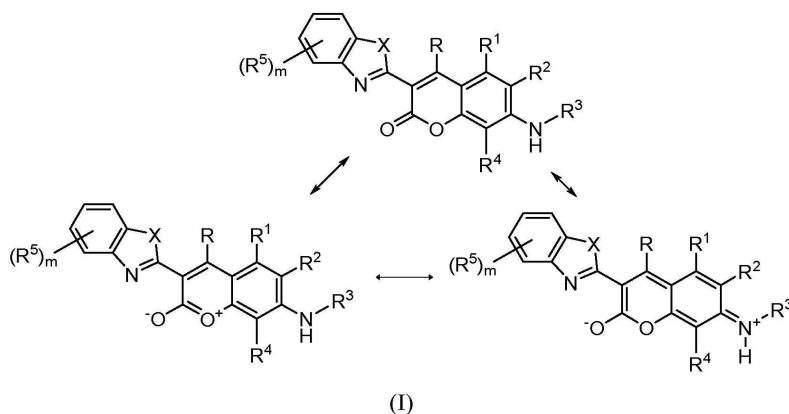
[0118] "아미노알킬" 기는 알킬렌 기를 통해 연결된 아미노 기를 지칭한다.

[0119] "알콕시알킬" 기는 알킬렌 기를 통해 연결된 알콕시 기를 지칭하고, 예를 들어, "C₂₋₈ 알콕시알킬" 등이다.

[0120] 본원에서 사용된 바와 같이, 치환된 기는 하나 이상의 수소 원자가 다른 원자 또는 기로 교환된 비치환된 부모 기로부터 유래된다. 달리 지시되지 않는 한, 기가 "치환된" 것으로 간주될 때, 상기 기는 C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알케닐, C₁-C₆ 알킬닐, C₁-C₆ 헤테로알킬, C₃-C₇ 카르보사이클릴(할로, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 할로알킬, 및 C₁-C₆ 할로알콕시로 치환되거나 비치환됨), C₃-C₇-카르보사이클릴-C₁-C₆-알킬(할로, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 할로알킬, 및 C₁-C₆ 할로알콕시로 치환되거나 비치환됨), 3-10원 헤테로사이클릴(할로, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 할로알킬, 및 C₁-C₆ 할로알콕시로 치환되거나 비치환됨), 3-10원 헤테로사이클릴-C₁-C₆-알킬(할로, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 할로알킬, 및 C₁-C₆ 할로알콕시로 치환되거나 비치환됨), 아릴(할로, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 할로알킬, 및 C₁-C₆ 할로알콕시로 치환되거나 비치환됨), 아릴(C₁-C₆)알킬(할로, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 할로알킬, 및 C₁-C₆ 할로알콕시로 치환되거나 비치환됨), 5-10원 헤테로아릴(할로, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 할로알킬, 및 C₁-C₆ 할로알콕시로 치환되거나 비치환됨), 5-10원 헤테로아릴(C₁-C₆)알킬(할로, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 할로알킬, 및 C₁-C₆ 할로알콕시로 치환되거나 비치환됨), 할로, -CN, 하이드록시, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시(C₁-C₆)알킬(즉, 에테르), 아릴옥시, 설프하이드릴(메르캅토), 할로(C₁-C₆)알킬(예를 들어, -CF₃), 할로(C₁-C₆)알콕시(예를 들어, -OCF₃), C₁-C₆ 알킬티오, 아릴티오, 아미노, 아미노(C₁-C₆)알킬, 니트로, O-카르바밀, N-카르바밀, O-티오키아르바밀, N-티오키아르바밀, C-아미도, N-아미도, S-설프아미도, N-설프아미도, C-카르복시, O-카르복시, 아실, 시아나토, 이소시아나토, 티오시아나토, 이소티오시아나토, 설프닐, 설프닐, -SO₃H, 설프노, -OSO₂C₁₋₄알킬, 및 옥소(=O)로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환된 것을 의미한다. 기가 "치환되거나 비치환됨"으로 기술된 경우, 그 기는 상기 치환기로 치환될 수 있다.

[0121] 일부 구체예에서, 치환된 알킬, 알케닐, 또는 알킬닐 기는 할로, -CN, SO₃⁻, SR^a, OR^a, NR^bR^c, 옥소, CONR^bR^c, COOH, 및 COOR^b로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되고, 여기서 R^a, R^b 및 R^c는 각각 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알킬닐, 치환된 알킬닐, 아릴, 및 치환된 아릴로부터 선택된다.

[0122] 본원에 기술된 화합물은 여러 메소머(mesomeric) 형태로 표현될 수 있다. 단일 구조가 그려진 경우, 임의의 관련 메소머 형태가 의도된다. 본원에 기술된 쿠마린 화합물은 단일 구조로 표현되지만 임의의 관련 메소머 형태로서 동일하게 제시될 수 있다. 하기 화학식 (I)에 대한 예시적인 메소머 구조가 아래에 제시되어 있다:



[0123]

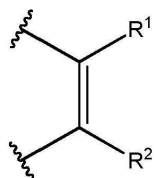
[0124] 본원에 기술된 화합물의 단일 메소머 형태가 제시되는 각각의 경우에, 대안적인 메소머 형태가 동일하게 고려된다.

[0125]

당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 기재된 화합물은 이온화된 형태, 예를 들어, -CO₂⁻ 또는 -SO₃⁻로 존재할 수 있다. 화합물이 양 또는 음으로 하전된 치환기, 예를 들어, SO₃⁻를 함유하는 경우, 화합물 전체가 중성이 되도록 음 또는 양으로 하전된 반대이온을 또한 함유할 수 있다. 다른 양태에서, 화합물은 염 형태로 존재할 수 있고, 여기서 반대이온은 컨쥬게이트 산 또는 염기에 의해 제공된다.

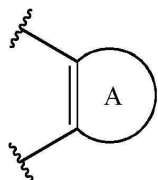
[0126] 특정 라디칼 명명 규칙은 상황에 따라 모노-라디칼 또는 디-라디칼을 포함할 수 있음이 이해되어야 한다. 예를 들어, 치환기가 분자의 나머지에 대한 2개의 부착점을 필요로 하는 경우, 치환기는 디-라디칼인 것으로 이해된다. 예를 들어, 2개의 부착점을 필요로 하는 알킬로서 확인된 치환기는 $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 등과 같은 디-라디칼을 포함한다. 다른 라디칼 명명 규칙은 라디칼이 "알킬렌" 또는 "알케닐렌"과 같은 디-라디칼임을 분명히 나타낸다.

[0127] 2개의 "인접한" R 기가 "이들이 부착된 원자와 함께" 고리를 형성한다고 할 때, 이는 원자의 집합 단위, 개재 결합, 및 2개의 R 기가 나열된 고리임을 의미한다. 예를 들어, 다음 하부구조가 존재하고:



[0128]

[0129] R^1 및 R^2 가 수소 및 알킬로 구성된 군으로부터 선택되는 것으로 정의되거나, R^1 및 R^2 가 이들이 부착된 원자와 함께 아릴 또는 카르보사이클릴을 형성할 때, R^1 및 R^2 는 수소 또는 알킬로부터 선택될 수 있거나, 대안적으로, 하부구조가 다음 구조를 갖는 것을 의미한다:



[0130]

[0131] 상기 식에서, A는 묘사된 이중 결합을 포함하는 아릴 고리 또는 카르보사이클릴이다.

[0132] 표지된 뉴클레오타이드

[0133] 본 개시내용의 양태에 따르면, 기질 모이어티에 부착하기에 적합한 염료 화합물, 특히 기질 모이어티에 부착을 가능하게 하는 링커기를 포함하는 염료 화합물이 제공된다. 기질 모이어티는 사실상 본 개시내용의 염료가 컨주게이션될 수 있는 임의의 분자 또는 물질일 수 있고, 비제한적인 예로서 뉴클레오시드, 뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, 탄수화물, 리간드, 입자, 고체 표면, 유기 및 무기 중합체, 염색체, 핵, 살아 있는 세포, 및 이들의 조합물 또는 어셈블리를 포함할 수 있다. 염료는 소수성 인력, 이온성 인력, 및 공유 부착을 포함하는 다양한 수단에 의해 선택적 링커에 의해 컨주게이션될 수 있다. 일부 양태에서, 염료는 공유 부착에 의해 기질에 컨주게이션된다. 보다 특히, 공유 부착은 링커기에 의해 이루어진다. 일부 경우에, 이러한 표지된 뉴클레오타이드는 "변형된 뉴클레오타이드"로도 지칭된다.

[0134] 본 개시내용은 본원에 개시된 염료 중 하나 이상으로 표지된 뉴클레오시드 및 뉴클레오타이드의 컨주게이트를 추가로 제공한다(변형된 뉴클레오타이드). 표지된 뉴클레오시드 및 뉴클레오타이드는, 예를 들어, 비제한적인 예로서, PCR 증폭, 등은 증폭, 고체상 증폭, 폴리뉴클레오타이드 서열화(예를 들어, 고체상 서열화), 닉(nick) 번역 반응 등에서 효소적 합성에 의해 형성된 폴리뉴클레오타이드를 표지화하는데 유용하다.

[0135] 생체분자에 대한 부착은 화학식 (I)의 화합물의 R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , 또는 X 위치를 통해 이루어질 수 있다. 일부 양태에서, 연결은 화학식 (I)의 R^3 또는 R^5 기를 통해 이루어진다. 화학식 (II)의 경우, 부착은 임의의 위치 R^{6-11} 또는 X'에 있을 수 있다. 일부 구체예에서, 치환기는 생체분자의 아미노 또는 하이드록실 기에의 부착에 사용될 수 있는 치환된 알킬, 예를 들어, $-\text{CO}_2\text{H}$ 로 치환된 알킬 또는 카르복실 기의 활성화된 형태, 예를 들어, 아마이드 또는 에스테르이다. 한 구체예에서, 화학식 (I)의 R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , 또는 X 기 또는 화학식 (II)의 R^{6-11} 또는 X' 기는 추가 아마이드/펩티드 결합 형성에 가장 적합한 활성화된 에스테르 또는 아마이드 잔기를 함유할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "활성화된 에스테르"는 온화한 조건에서, 예를 들어, 아미노 기를 함유하는 화합물과 반응할 수 있는 카르복실 기 유도체를 지칭한다. 활성화된 에스테르의 비제한적인 예는 p-니트로페닐,

펜타플루오로페닐 및 석신이미도 에스테르를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0136] 일부 구체예에서, 염료 화합물은 뉴클레오타이드 염기를 통해 올리고뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드에 공유 부착될 수 있다. 예를 들어, 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 링커 모이어티를 통해 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-테아자 퓨린 염기의 C7 위치에 부착되는 표지를 지닐 수 있다. 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드의 리보스 또는 데옥시리보스 당에 공유 부착된 3'-OH 차단기를 지닐 수 있다.

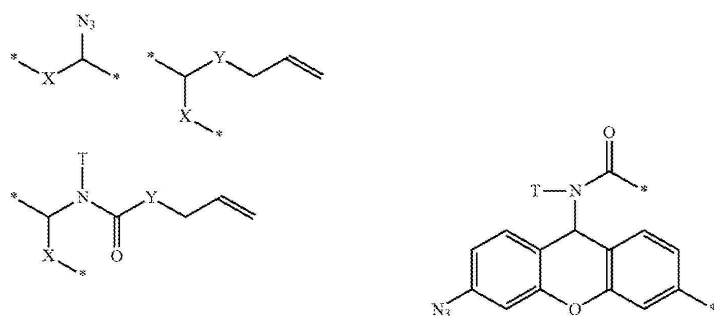
[0137] 본원에 기술된 바와 같은 새로운 형광 염료의 특히 유용한 적용은, 예를 들어, 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드와 같은 생체분자를 표지하기 위한 것이다. 본 출원의 일부 구체예는 본원에 기재된 바와 같은 새로운 형광 화합물로 표지된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다.

[0138] 링커

[0139] 본원에 기재된 염료 화합물은 화합물을 기질 또는 다른 분자에 공유 부착시키기 위한 반응성 링커기를 지환기 위치 중 하나에 포함할 수 있다. 반응성 링커기는 결합(예를 들어, 공유 또는 비공유 결합), 특히 공유 결합을 형성할 수 있는 모이어티이다. 특정 구체예에서, 링커는 절단 가능한 링커일 수 있다. "절단 가능한 링커"라는 용어의 사용은 전체 링커가 제거되어야 함을 의미하고자 하는 것은 아니다. 절단 부위는 절단 후 링커의 일부가 염료 및/또는 기질 모이어티에 부착된 채로 유지되도록 보장하는 링커 상의 위치에 있을 수 있다. 절단 가능한 링커는, 비제한적인 예로서, 친전자적으로 절단 가능한 링커, 친핵적으로 절단 가능한 링커, 광분해 가능한 링커, 환원성 조건하에서 절단 가능한 (예를 들어, 디설파이드 또는 아지드 함유 링커), 산화성 조건하에서 절단 가능한 링커, 안전성-포착 링커의 사용을 통해 절단 가능한 링커, 및 제거 메커니즘에 의해 절단 가능한 링커일 수 있다. 염료 화합물을 기질 모이어티에 부착하기 위한 절단 가능한 링커의 사용은, 하류 단계에서 임의의 간섭 신호를 피하면서, 필요한 경우, 검출 후 표지가 제거될 수 있도록 보장한다.

[0140] 유용한 링커기는 PCT 공개 번호 W02004/018493호(본원에 참조로서 포함됨)에서 찾아볼 수 있고, 이의 예는 수용성 포스포닉 또는 전이 금속 및 적어도 부분적으로 수용성 리간드로부터 형성된 수용성 전이 금속 착매를 사용하여 절단될 수 있는 링커를 포함한다. 수용액에서, 후자는 적어도 부분적으로 수용성 전이 금속 착매를 형성한다. 이러한 절단 가능한 링커는 본원에 제시된 염료와 같은 표지에 뉴클레오타이드의 염기를 연결하는데 사용될 수 있다.

[0141] 특정 링커는 하기 화학식의 모이어티를 포함하는 것들과 같은 PCT 공개 번호 W02004/018493호(본원에 참조로서 포함됨)에 개시된 것들을 포함한다:



[0142]

[0143] (상기 식에서, X는 O, S, NH 및 NQ를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 Q는 C1-10 치환되거나 비치환된 알킬 기이며, Y는 O, S, NH 및 N(알릴)을 포함하는 군으로부터 선택되고, T는 수소 또는 C₁-C₁₀ 치환되거나 비치환된 알킬 기이고, *는 상기 모이어티가 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 나머지 부분에 연결되는 위치를 나타낸다). 일부 양태에서, 링커는 뉴클레오타이드의 염기를, 예를 들어, 본원에 기재된 염료 화합물과 같은 표지에 연결시킨다.

[0144] 특정 구체예에서, 형광 염료(형광단)와 구아닌 염기 사이의 링커의 길이는, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 스펀서 기를 도입함으로써 변경될 수 있고, 이에 의해 당 분야에 공지된 다른 결합을 통해 구아닌 염기에 부착된 동일한 형광단에 비해 형광 강도를 증가시킬 수 있다. 예시적인 링커 및 이들의 특성은 PCT 공개 번호 W02007020457호(본원에 참조로서 포함됨)에 기재되어 있다. 링커의 설계, 및 특히 이들의 증가된 길이는 DNA와 같은 폴리뉴클레오타이드에 도입될 때 구아노신 뉴클레오타이드의 구아닌 염기에 부착되는 형광단의 밝기를 향상시킬 수 있다. 따라서, 염료가 구아닌-함유 뉴클레오타이드에 부착되는 형광 염료 표지의 검출을 필요로 하는 임의

의 분석 방법에 사용되는 경우, 링커는 WO 2007/020457호에 기재된 바와 같은 n 이 2 내지 50의 정수인 화학식 $-(CH_2)_n-$ 의 스페이서 기를 포함하는 것이 유리하다.

[0145] 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드는 당 또는 핵염기 상의 부위에서 표지될 수 있다. 당 분야에 공지된 바와 같이, "뉴클레오티드"는 질소성 염기, 당, 및 하나 이상의 포스페이트 기로 구성된다. RNA에서, 당은 리보스이고, DNA에서는 데옥시리보스, 즉, 리보스에 존재하는 하이드록실 기가 없는 당이다. 질소성 염기는 퓨린 또는 피리미딘의 유도체이다. 퓨린은 아데닌(A) 및 구아닌(G)이고, 피리미딘은 시토신(C) 및 티민(T)이거나, RNA의 맥락에서, 우라실(U)이다. 데옥시리보스의 C-1 원자는 피리미딘의 N-1 또는 퓨린의 N-9에 결합한다. 뉴클레오티드는 또한 뉴클레오시드의 포스페이트 에스테르이고, 에스테르화는 당의 C-3 또는 C-5에 부착되는 하이드록실 기 상에서 일어난다. 뉴클레오티드는 일반적으로 모노, 디- 또는 트리포스페이트이다.

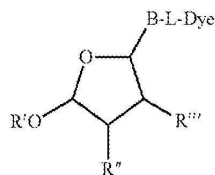
[0146] "뉴클레오시드"는 구조적으로 뉴클레오티드와 유사하지만 포스페이트 모이어티가 빠져 있다. 뉴클레오시드 유사체의 예는 표지가 염기에 연결되고 당 분자에 부착된 포스페이트 기가 없는 것일 것이다.

[0147] 염기는 일반적으로 퓨린 또는 피리미딘으로 지칭되지만, 당업자는 왓슨-크릭 염기 페어링을 겪는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 능력을 변경하지 않는 유도체 및 유사체가 이용 가능하다는 것을 이해할 것이다. "유도체" 또는 "유사체"는 코어 구조가 모 화합물과 동일하거나 거의 유사하지만, 예를 들어, 상이하거나 추가의 측 기와 같은 화학적 또는 물리적 변형을 가져, 유도체 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드로 하여금 다른 분자에 연결되도록 하는 화합물 또는 분자를 의미한다. 예를 들어, 염기는 데아자퓨린일 수 있다. 특정 구체예에서, 유도체는 왓슨-크릭 페어링을 겪을 수 있어야 한다. "유도체" 및 "유사체"는 또한 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 당 모이어티를 갖는, 예를 들어, 합성 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유도체를 포함한다. 이러한 유도체 및 유사체는, 예를 들어, 문헌[Scheit, *Nucleotide analogs* (John Wiley & Son, 1980) and Uhlman et al., *Chemical Reviews* 90:543-584, 1990]에 논의되어 있다. 뉴클레오티드 유사체는 또한 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬-포스포네이트, 포스포라닐리테이트, 및 포스포라미데이트 결합 등을 포함하는 변형된 포스포디에스테르 결합을 포함할 수 있다.

[0148] 염료는, 예를 들어, 링커를 통해 뉴클레오티드 염기의 임의의 위치에 부착될 수 있다. 특정 구체예에서, 결과적인 유사체에 대해 왓슨-크릭 염기 페어링이 여전히 수행될 수 있다. 특정 핵염기 표지화 부위는 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-데아자 퓨린 염기의 C7 위치를 포함한다. 상기 기술된 바와 같이 링커기를 사용하여 염료를 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드에 공유 부착시킬 수 있다.

[0149] 특정 구체예에서, 표지된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드는 효소적으로 통합 가능하고 효소적으로 연장 가능할 수 있다. 따라서, 링커 모이어티는 화합물이 핵산 복제 효소에 의한 뉴클레오티드의 전체 결합 및 인지를 유익하게 방해하지 않도록 뉴클레오티드를 화합물에 연결하기에 충분한 길이일 수 있다. 따라서, 링커는 또한 스페이서 단위를 포함할 수 있다. 스페이서는, 예를 들어, 뉴클레오티드 염기가 절단 부위 또는 표지에 관여하지 않게 한다.

[0150] 본원에 기술된 염료로 표지된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드는 하기 화학식을 지닐 수 있다:



[0151]

[0152] 상기 식에서,

[0153] 염료는 염료 화합물이고,

[0154] B는 핵염기, 예를 들어, 이를 테면, 우라실, 티민, 시토신, 아데닌, 구아닌 등이고,

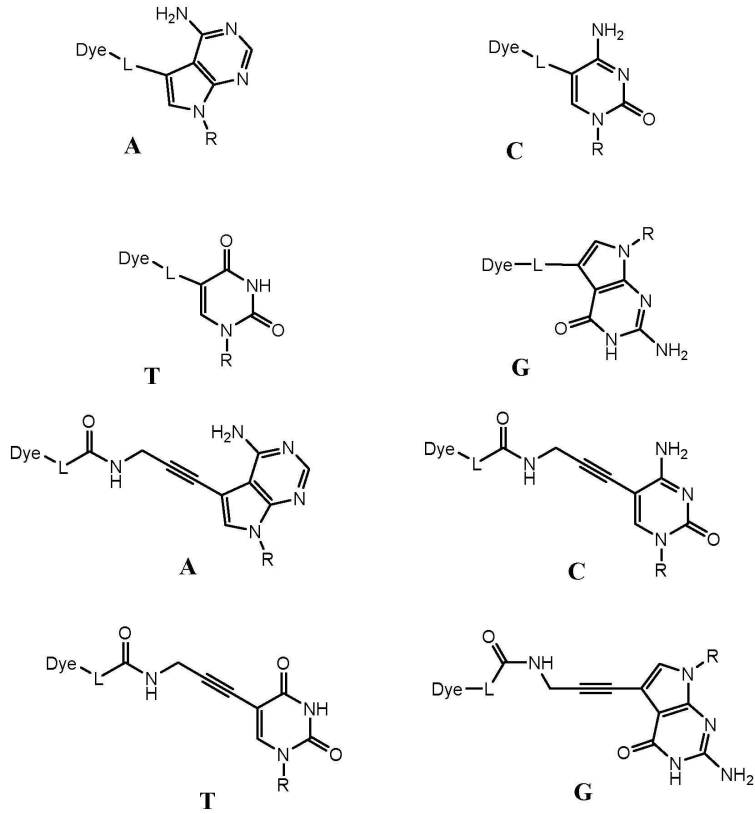
[0155] L은 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 선택적 링커기이고,

[0156] R'는 H, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 티오포스페이트, 포스페이트 에스테르 유사체, 반응성인 함유 기에 부착된 -O-, 또는 차단기에 의해 보호된 -O-일 수 있고,

[0157] R''은 H, OH, 포스포라미데이트, 또는 3'-OH 차단기일 수 있고,

- [0158] R''은 H 또는 OH이다.
- [0159] R"가 포스포라미다이트인 경우, R'는 산-절단 가능한 하이드록실 보호기이고, 이는 자동 합성 조건하에서 후속적인 단량체 커플링을 가능하게 한다.
- [0160] 특정 구체예에서, 차단기는 염료 화합물과 별개이고 무관하며, 즉, 여기에 부착되지 않는다. 대안적으로, 염료는 3'-OH 차단기의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 따라서, R"은 염료 화합물을 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 3'-OH 차단기일 수 있다.
- [0161] 또 다른 대안적인 구체예에서, 펜토스 당의 3' 탄소 상에는 차단기가 없고, 염기에 부착된 염료(또는 염료 및 링커 구조물)는, 예를 들어, 추가 뉴클레오타이드의 도입에 대한 차단물로서 작용하기에 충분한 크기 또는 구조를 가질 수 있다. 따라서, 차단은, 염료가 당의 3' 위치에 부착되는지 여부에 관계없이, 입체 장애로 인한 것일 수 있거나, 크기, 전하 및 구조의 조합으로 인한 것일 수 있다.
- [0162] 또 다른 대안적인 구체예에서, 차단기는 펜토스 당의 2' 또는 4' 탄소 상에 존재하고 추가 뉴클레오타이드의 도입에 대한 차단물로서 작용하기에 충분한 크기 또는 구조를 가질 수 있다.
- [0163] 차단기를 사용함으로써, 변형된 뉴클레오타이드가 혼입될 때, 예를 들어, 연장을 중단시킴으로써, 중합화가 제어될 수 있다. 차단 효과가, 예를 들어, 비제한적인 예로서 화학적 조건을 변경하거나 화학적 차단물을 제거함으로써 가역적인 경우, 특정 위치에서 연장을 중단한 다음, 이후 계속할 수 있다.
- [0164] 또 다른 특정 구체예에서, 3'-OH 차단기는 본원에 참조로서 포함되는 W02004/018497호 및 W02014/139596호에 개시된 모이어티를 포함할 것이다. 예를 들어, 차단기는 아지도메틸(-CH₂N₃) 또는 치환된 아지도메틸(예를 들어, -CH(CHF₂)N₃ 또는 CH(CH₂F)N₃), 또는 알릴일 수 있다.
- [0165] 특정 구체예에서, 링커(염료와 뉴클레오타이드 사이) 및 차단기는 둘 모두가 존재하며 별도의 모이어티이다. 특정 구체예에서, 링커 및 차단기는 둘 모두가 실질적으로 유사한 조건하에서 절단될 수 있다. 따라서, 탈보호 및 탈차단 공정은 염료 화합물 및 차단기 둘 모두를 제거하는데 단일 처리만이 필요할 것이므로 보다 효율적일 수 있다. 그러나, 일부 구체예에서, 링커 및 차단기는 유사한 조건하에서 절단될 필요가 없고, 대신 별개의 조건하에서 개별적으로 절단될 수 있다.
- [0166] 본 개시내용은 또한 염료 화합물을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 결합으로 연결된 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드를 각각 포함하는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 본원에 개시된 적어도 하나의 변형된 뉴클레오타이드(예를 들어, 염료 화합물로 표지됨)와 함께, 천연 발생 뉴클레오타이드, 본원에 기술된 표지된 뉴클레오타이드 이외의 비천연 발생(또는 변형된) 뉴클레오타이드 또는 이의 임의의 조합물을 포함할 수 있다. 본 개시내용에 따른 폴리뉴클레오타이드는 또한 비천연 백본 결합 및/또는 비-뉴클레오타이드 화학적 변형을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 표지된 뉴클레오타이드를 포함하는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드의 혼합물을 포함하는 키메라 구조가 또한 고려된다.

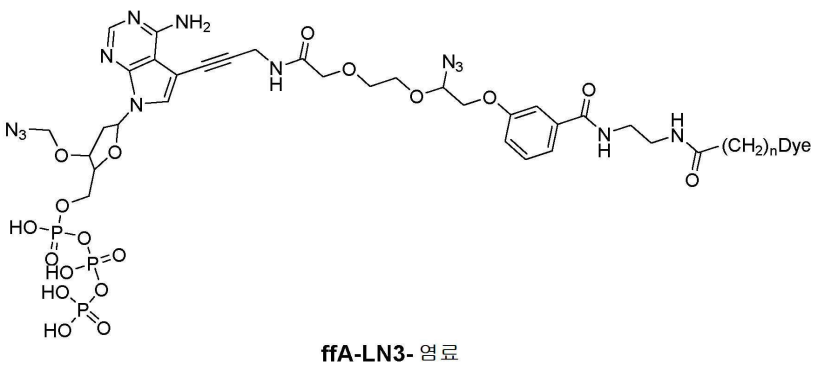
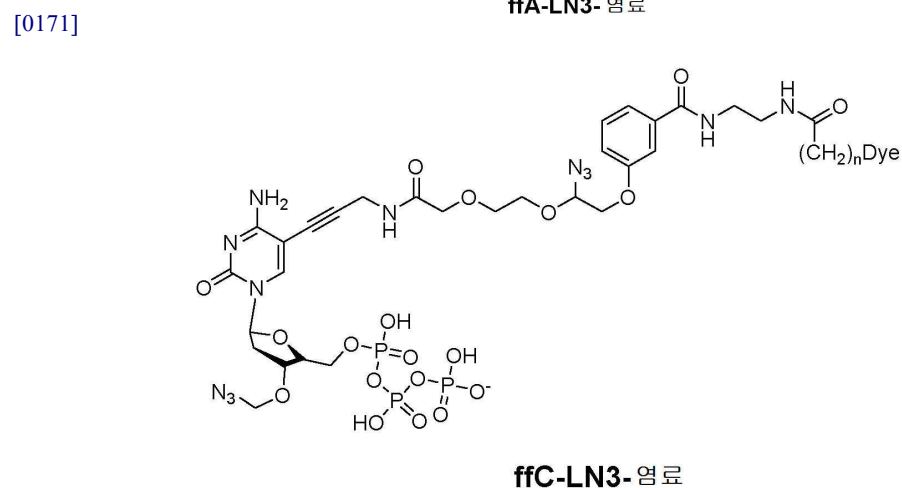
[0167] 본원에 기술된 바와 같은 비제한적인 예시적인 표지된 뉴클레오타이드는 다음을 포함한다:



[0168]

[0169] 상기 식에서, L은 링커를 나타내고 R은 상기 기술된 당 잔기를 나타낸다.

[0170] 일부 구체예에서, 비제한적인 예시적인 형광 염료 컨쥬게이트는 하기에 제시되어 있다:



[0172]

- [0173] 키트
- [0174] 본 개시내용은 또한 염료로 표지된 변형된 뉴클레오시드 및/또는 뉴클레오티드를 포함하는 키트를 제공한다. 이러한 키트는 일반적으로 적어도 하나의 추가 성분과 함께 본원에 개시된 염료로 표지된 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드를 포함할 것이다. 추가 성분(들)은 본원에 개시된 방법 또는 하기 실시예 섹션에서 확인된 하나 이상의 성분일 수 있다. 본 개시내용의 키트에 조합될 수 있는 성분의 일부 비제한적인 예는 하기에 제시되어 있다.
- [0175] 특정 구체예에서, 키트는 변형되거나 비변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드와 함께 본원에 개시된 염료로 표지된 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용에 따른 염료로 표지된 변형된 뉴클레오티드는 표지되지 않거나 천연 뉴클레오티드, 및/또는 형광 표지된 뉴클레오티드 또는 이의 임의의 조합과 함께 공급될 수 있다. 따라서, 키트는 본 개시내용에 따른 염료로 표지된 변형된 뉴클레오티드 및 다른, 예를 들어, 종래 기술의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 조합은 별도의 개별 성분(예를 들어, 용기 또는 튜브당 하나의 뉴클레오티드 타입) 또는 뉴클레오티드 혼합물(예를 들어, 동일한 용기 또는 튜브에서 혼합된 2개 이상의 뉴클레오티드)로서 제공될 수 있다.
- [0176] 키트가 염료 화합물로 표지된 복수, 특히 2개, 또는 3개, 또는 더욱 특히 4개의 변형된 뉴클레오티드를 포함할 때, 상이한 뉴클레오티드는 상이한 염료 화합물로 표지될 수 있거나, 하나는 염료 화합물이 없는 다크(dark)일 수 있다. 상이한 뉴클레오티드가 상이한 염료 화합물로 표지되는 경우, 염료 화합물이 스펙트럼적으로 구별 가능한 형광 염료인 것이 키트의 특징이다. 본원에서 사용되는 용어 "스펙트럼적으로 구별 가능한 형광 염료"는 2개 이상의 이러한 염료가 하나의 샘플에 존재할 때 형광 검출 장비(예를 들어, 상업적 모세관-기반 DNA 서열화 플랫폼)에 의해 구별될 수 있는 파장의 형광 에너지를 방출하는 형광 염료를 지칭한다. 형광 염료 화합물로 표지된 2개의 변형된 뉴클레오티드가 키트 형태로 공급될 때, 스펙트럼적으로 구별 가능한 형광 염료는, 예를 들어, 이를 테면, 동일한 레이저에 의해 동일한 파장에서 여기될 수 있다는 것이 일부 구체예의 특징이다. 형광 염료 화합물로 표지된 4개의 변형된 뉴클레오티드가 키트 형태로 공급될 때, 스펙트럼적으로 구별 가능한 형광 염료 중 2개는 모두 하나의 파장에서 여기될 수 있고 다른 2개의 스펙트럼적으로 구별 가능한 염료는 모두 다른 파장에서 여기될 수 있는 일부 구체예의 특징이다. 특정 여기 파장은 488 nm 및 532 nm이다.
- [0177] 한 구체예에서, 키트는 본 개시내용의 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오티드 및 제2 염료로 표지된 제2 변형된 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 염료는 적어도 10 nm, 특히 20 nm 내지 50 nm의 최대 흡광도에서의 차이를 갖는다. 보다 구체적으로, 2개의 염료 화합물은 15-40 nm의 스톡스 이동(Stokes shifts)을 가지며, "스톡스 이동"은 피크 흡수 및 피크 방출 파장 사이의 거리이다.
- [0178] 추가 구체예에서, 키트는 형광 염료로 표지된 2개의 다른 변형된 뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있고, 여기서 염료는 동일한 레이저에 의해 532 nm에서 여기된다. 염료는 적어도 10 nm, 특히 20 nm 내지 50 nm의 최대 흡광도에서의 차이를 가질 수 있다. 보다 구체적으로, 2개의 염료 화합물은 20-40 nm의 스톡스 이동을 가질 수 있다. 본 개시내용의 염료와 스펙트럼적으로 구별 가능하고 상기 기준을 충족시키는 특정 염료는 미국 특허 번호 5,268,486호(예를 들어, Cy3) 또는 WO 0226891호(Alexa 532; Molecular Probes A20106)에 기재된 바와 같은 폴리메틴 유사체 또는 미국 특허 번호 6,924,372호에 기재된 바와 같은 비대칭 폴리메틴이고, 상기 특허 각각은 본원에 참조로서 포함된다. 대안적인 염료는 로다민 유사체, 예를 들어, 테트라메틸 로다민 및 이의 유사체를 포함한다.
- [0179] 대안적인 구체예에서, 본 개시내용의 키트는 동일한 염기가 2개의 상이한 화합물로 표지된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 제1 뉴클레오티드는 본 개시내용의 화합물로 표지될 수 있다. 제2 뉴클레오티드는 스펙트럼적으로 별개인 화합물, 예를 들어, 600 nm 미만에서 흡수하는 '녹색' 염료로 표지될 수 있다. 제3 뉴클레오티드는 본 개시내용의 화합물 및 스펙트럼적으로 별개인 화합물의 혼합물로서 표지될 수 있고, 제4 뉴클레오티드는 '다크'일 수 있고 표지를 함유하지 않을 수 있다. 따라서, 간단히 말해, 뉴클레오티드 1-4는 '청색', '녹색', '청/녹색'으로 표지되고, 다크일 수 있다. 계측을 더 단순화하기 위해, 4개의 뉴클레오티드는 단일 레이저로 여기되는 2개의 염료로 표지될 수 있고, 따라서, 뉴클레오티드 1-4의 표지화는 '청색 1', '청색 2', '청색1/청색2', 및 다크일 수 있다.
- [0180] 뉴클레오티드는 본 개시내용의 2개의 염료를 함유할 수 있다. 키트는 본 개시내용의 염료로 표지된 2개 이상의 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 키트는 추가 뉴클레오티드를 함유할 수 있고, 여기서 뉴클레오티드는 520 nm 내지 560 nm의 영역에서 흡수되는 염료로 표지된다. 키트는 표지되지 않은 뉴클레오티드를 추가로 함유할 수 있

다.

- [0181] 키트가 상이한 염료 화합물로 표지된 상이한 뉴클레오티드를 갖는 구성과 관련하여 본원에서 예시되지만, 키트는 동일한 염료 화합물을 갖는 2, 3, 4개 이상의 상이한 뉴클레오티드를 포함할 수 있음이 이해될 것이다.
- [0182] 특정 구체예에서, 키트는 변형된 뉴클레오티드의 폴리뉴클레오티드로의 도입을 촉매화할 수 있는 폴리머라제 효소를 포함할 수 있다. 이러한 키트에 포함되는 다른 성분은 완충제 등을 포함할 수 있다. 본 개시내용에 따른 염료로 표지된 변형된 뉴클레오티드, 및 상이한 뉴클레오티드의 혼합물을 포함하는 다른 임의의 뉴클레오티드 성분은 키트에 농축된 형태로 제공되어 사용 전에 희석될 수 있다. 이러한 구체예에서, 적합한 희석 완충제가 또한 포함될 수 있다. 또한, 본원에 제시된 방법에서 확인된 하나 이상의 성분이 본 개시내용의 키트에 포함될 수 있다.
- [0183] 서열화 방법
- [0184] 본 개시내용에 따른 염료 화합물을 포함하는 변형된 뉴클레오티드(또는 뉴클레오시드)는, 단독으로든 또는 더 큰 분자 구조 또는 컨주게이트에 포함 또는 회합되든지 간에, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드에 부착된 형광 표지의 검출을 포함하는 방법과 같은 임의의 분석 방법에 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 용어 "폴리뉴클레오티드에 도입"은 5' 포스페이트가 제2(변형되거나 비변형된) 뉴클레오티드의 3' 하이드록실 기에 포스포디에스테르 결합으로 연결되는 것을 의미할 수 있고, 이는 그 자체로 더 긴 폴리뉴클레오티드 사슬의 일부를 형성할 수 있다. 본원에 개시된 변형된 뉴클레오티드 세트의 3' 말단은 추가의 (변형되거나 비변형된) 뉴클레오티드의 5' 포스페이트에 포스포디에스테르 결합으로 연결되거나 연결되지 않을 수 있다. 따라서, 하나의 비제한적인 구체예에서, 본 개시내용은 (a) 본 개시내용의 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 폴리뉴클레오티드에 도입하는 단계 및 (b) 상기 변형된 뉴클레오티드(들)에 부착된 염료 화합물로부터 형광 신호를 검출함으로써 상기 폴리뉴클레오티드에 도입된 상기 변형된 뉴클레오티드(들)를 검출하는 단계를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 도입된 변형된 뉴클레오티드를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0185] 이러한 방법은 본 개시내용에 따른 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드가 폴리뉴클레오티드에 도입되는 합성 단계 (a) 및 폴리뉴클레오티드에 도입된 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드(들)가 이들의 형광을 검출하거나 정량적으로 측정함으로써 검출되는 검출 단계 (b)를 포함할 수 있다.
- [0186] 본 출원의 일부 구체예는 (a) 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 표지된 뉴클레오티드를 폴리뉴클레오티드에 도입하는 단계; 및 (b) 상기 변형된 뉴클레오티드(들)에 부착된 새로운 형광 염료로부터 형광 신호를 검출함으로써 상기 폴리뉴클레오티드에 도입된 상기 표지된 뉴클레오티드(들)를 검출하는 단계를 포함하는 서열화 방법에 관한 것이다.
- [0187] 한 구체예에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드는 합성 단계에서 폴리머라제 효소의 작용에 의해 폴리뉴클레오티드에 도입된다. 그러나, 변형된 뉴클레오티드를 폴리뉴클레오티드에 결합시키는 다른 방법, 예를 들어, 이를 테면, 화학적 올리고뉴클레오티드 합성 또는 비표지된 올리고뉴클레오티드에 표지된 올리고뉴클레오티드의 라이게이션이 사용될 수 있다. 따라서, 용어 "도입"은 뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용될 때 화학적 방법 뿐만 아니라 효소적 방법에 의한 폴리뉴클레오티드 합성을 포함할 수 있다.
- [0188] 특정 구체예에서, 합성 단계가 수행되며, 상기 단계는 선택적으로 주형 폴리뉴클레오티드 가닥을 본 개시내용의 형광 표지된 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 반응 혼합물과 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 폴리머라제는 또한 주형 폴리뉴클레오티드 가닥에 어닐링된 폴리뉴클레오티드 가닥 상의 유리 3' 하이드록실 기 및 변형된 뉴클레오티드 상의 5' 포스페이트 기 사이에 포스포디에스테르 결합의 형성을 허용하는 조건하에서 제공될 수 있다. 따라서, 합성 단계는 주형 가닥에 대한 뉴클레오티드의 상보적인 염기-페어링에 의해 지시되는 폴리뉴클레오티드 가닥의 형성을 포함할 수 있다.
- [0189] 상기 방법의 모든 구체예에서, 검출 단계는 표지된 뉴클레오티드가 도입된 폴리뉴클레오티드 가닥이 주형 가닥에 어닐링되는 동안, 또는 두 가닥이 분리되는 변성 단계 후에 수행될 수 있다. 추가 단계, 예를 들어, 화학적 또는 효소적 반응 단계 또는 정제 단계가 합성 단계와 검출 단계 사이에 포함될 수 있다. 특히, 표지된 뉴클레오티드(들)를 포함하는 표적 가닥은 분리 또는 정제된 후 추가로 처리되거나 후속 분석에서 사용될 수 있다. 예로서, 합성 단계에서 본원에 기술된 바와 같이 변형된 뉴클레오티드(들)로 표지된 표적 폴리뉴클레오티드는 이후 표지된 프로브 또는 프라이머로 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 본원에 개시된 합성 단계의 생성물은 추가 반응 단계를 거칠 수 있고, 요망되는 경우, 이러한 후속 단계의 생성물은 정제 또는 분리될 수 있다.
- [0190] 합성 단계에 적합한 조건은 표준 분자 생물학 기술에 익숙한 사람들에게 잘 알려져 있을 것이다. 한

구체예에서, 합성 단계는 적합한 폴리머라제 효소의 존재하에서 주형 가닥에 상보적인 연장된 표적 가닥을 형성하기 위해, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 전구체를 사용하는 표준 프라이머 연장 반응과 유사할 수 있다. 다른 구체예에서, 합성 단계는 그 자체로 표적 및 주형 폴리뉴클레오타이드 가닥을 복사하는 것으로부터 유래된 어닐링된 상보적 가닥을 포함하는 표지된 이중 가닥 증폭 생성물을 생산하는 증폭 반응의 일부를 형성할 수 있다. 다른 예시적인 합성 단계는 Nick 번역, 가닥 치환 중합화, 랜덤 프라이밍 DNA 표지화 등을 포함한다. 합성 단계에 특히 유용한 폴리머라제 효소는 본원에 기술된 변형된 뉴클레오타이드의 도입을 촉매화할 수 있는 것이다. 다양한 자연 발생 또는 변형된 폴리머라제가 사용될 수 있다. 예로서, 열안정성 폴리머라제는 열순환 조건을 사용하여 수행되는 합성 반응에 사용될 수 있는 반면, 열안정성 폴리머라제는 등은 프라이머 연장 반응에 바람직하지 않을 수 있다. 본 개시내용에 따른 변형된 뉴클레오타이드를 도입할 수 있는 적합한 열안정성 폴리머라제는 WO 2005/024010호 또는 W006120433호에 기술된 것들을 포함하고, 상기 특허 각각은 본원에 참조로서 포함된다. 37°C와 같은 보다 낮은 온도에서 수행되는 합성 반응에서, 폴리머라제 효소가 반드시 열안정성 폴리머라제일 필요는 없으므로, 폴리머라제의 선택은 반응 온도, pH, 가닥-치환 활성 등과 같은 다수의 인자에 좌우될 것이다.

[0191] 특정의 비제한적인 구체예에서, 본 개시내용은 핵산 서열화, 재서열화, 전체 게놈 서열화, 단일 뉴클레오타이드 다형성 스코어링, 폴리뉴클레오타이드에 도입된 본원에 개시된 염료로 표지된 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 검출을 수반하는 임의의 다른 적용을 포함한다. 형광 염료를 포함하는 변형된 뉴클레오타이드로 표지된 폴리뉴클레오타이드의 사용이 유리한 임의의 다양한 다른 적용은 본원에 개시된 염료를 갖는 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드를 사용할 수 있다.

[0192] 특정 구체예에서, 본 개시내용은 폴리뉴클레오타이드 합성에 의한 서열화 반응에서 본 개시내용에 따른 염료 화합물을 포함하는 변형된 뉴클레오타이드의 사용을 제공한다. 합성에 의한 서열화는 일반적으로 서열화되는 주형 핵산에 상보적인 연장된 폴리뉴클레오타이드 사슬을 형성하기 위해 폴리머라제 또는 리가제를 사용하여 5'에서 3' 방향으로 성장하는 폴리뉴클레오타이드 사슬에 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 순차적인 첨가를 포함한다. 첨가된 뉴클레오타이드(들) 중 하나 이상에 존재하는 염기의 정체성은 검출 또는 "영상화" 단계에서 결정될 수 있다. 첨가된 염기의 정체성은 각각의 뉴클레오타이드 도입 단계 후에 결정될 수 있다. 이후 주형의 서열은 통상적인 왓슨-크릭 염기-페어링 규칙을 사용하여 추론될 수 있다. 단일 염기의 정체성을 결정하기 위한 본원에 개시된 염료로 표지된 변형된 뉴클레오타이드의 사용은, 예를 들어, 단일 뉴클레오타이드 다형성의 스코어링에 유용할 수 있고, 이러한 단일 염기 연장 반응은 본 개시내용의 범위 내에 있다.

[0193] 본 개시내용의 구체예에서, 주형 폴리뉴클레오타이드의 서열은 도입된 뉴클레오타이드(들)에 부착된 형광 표지(들)의 검출을 통해 서열화되는 주형 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 초기 가닥으로의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 도입을 검출함으로써 결정된다. 주형 폴리뉴클레오타이드의 서열화는 적합한 프라이머로 프라이밍될 수 있고(또는 헤어핀의 일부로서 프라이머를 함유할 헤어핀 작제물로서 제조될 수 있음), 초기 사슬은 뉴클레오타이드를 폴리머라제-촉매화 반응에서 프라이머의 3' 말단에 첨가함으로써 단계적으로 연장된다.

[0194] 특정 구체예에서, 상이한 뉴클레오타이드 트리포스페이트(A, T, G 및 C) 각각은 독특한 형광단을 표지될 수 있고, 또한 제어되지 않은 중합화를 방지하기 위해 3' 위치에 차단기를 포함한다. 대안적으로, 4개의 뉴클레오타이드 중 하나는 표지되지 않을 수 있다(다크). 폴리머라제 효소는 뉴클레오타이드를 주형 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 초기 사슬에 도입하고, 차단기는 뉴클레오타이드의 추가 도입을 방지한다. 임의의 비도입된 뉴클레오타이드는 세척될 수 있고, 각각의 도입된 뉴클레오타이드로부터의 형광 신호는 적합한 수단, 예를 들어, 레이저 여기 및 적합한 방출 필터를 사용하는 전하-커플링된 장치에 의해 광학적으로 "판독"될 수 있다. 이후 3'-차단기 및 형광 염료 화합물을 제거(탈보호)하여(동시에 또는 순차적으로) 추가 뉴클레오타이드 도입을 위한 초기 사슬을 노출시킬 수 있다. 통상적으로, 도입된 뉴클레오타이드의 정체성은 각 도입 단계 후에 결정될 것이지만, 이것이 반드시 필수적인 것은 아니다. 유사하게, 미국 특허 번호 5,302,509호(본원에 참조로서 포함됨)는 고체 지지체 상에 고정된 폴리뉴클레오타이드를 서열화하는 방법을 개시하고 있다.

[0195] 상기 예시된 바와 같은 방법은 DNA 폴리머라제의 존재하에서 고정된 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 성장하는 가닥으로의 형광 표지된 3'-차단된 뉴클레오타이드 A, G, C, 및 T의 도입을 활용한다. 폴리머라제는 표적 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 염기를 도입하지만 3'-차단기에 의해 추가 첨가는 방지된다. 이후 도입된 뉴클레오타이드의 표지를 결정할 수 있고, 차단기는 추가 중합화가 일어날 수 있도록 화학적 절단에 의해 제거될 수 있다. 합성에 의한 서열화 반응에서 서열화되는 핵산 주형은 서열화가 요구되는 임의의 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 서열화 반응을 위한 핵산 주형은 전형적으로 서열화 반응에서 추가의 뉴클레오타이드를 첨가하기 위한 프라이머 또는 개시점으로서 작용하는 유리 3' 하이드록실 기를 갖는 이중 가닥 영역을 포함할 것이다. 서열화되는 주형의 영역

은 상보적 가닥 상에 이러한 유리 3' 하이드록실 기를 돌출시킬 것이다. 서열화되는 주형의 돌출 영역은 단일 가닥일 수 있지만, 서열화 반응의 개시를 위한 유리 3' OH 기를 제공하기 위해 서열화되는 주형 가닥에 상보적인 가닥 상에 "닉이 존재" 하는 경우, 이중-가닥일 수 있다. 이러한 구체예에서, 서열화는 가닥 치환에 의해 진행될 수 있다. 특정 구체예에서, 유리 3' 하이드록실 기를 갖는 프라이머는 서열화되는 주형의 단일-가닥 영역에 하이브리화되는 분리된 성분(예를 들어, 짧은 올리고뉴클레오타이드)으로서 첨가될 수 있다. 대안적으로, 프라이머 및 서열화되는 주형 가닥은 각각 분자내 듀플렉스, 예를 들어, 이를 테면, 헤어핀 루프 구조를 형성할 수 있는 부분적으로 자기-상보적인 핵산 가닥의 일부를 형성할 수 있다. 헤어핀 폴리뉴클레오타이드 및 이들을 고체 지지체에 부착할 수 있는 방법은 PCT 공개 번호 W00157248호 및 W02005/047301호에 개시되어 있고, 상기 특허 각각은 본원에 참조로서 포함된다. 뉴클레오타이드는 성장하는 프라이머에 연속적으로 첨가되어, 5'에서 3' 방향으로 폴리뉴클레오타이드 사슬을 합성할 수 있다. 첨가된 염기의 성질은, 특히 반드시 각각의 뉴클레오타이드 첨가 후에 결정될 필요는 없지만, 결정될 수 있고, 이에 따라 핵산 주형에 대한 서열 정보를 제공한다. 따라서, 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 5' 포스페이트 기와의 포스포디에스테르 결합의 형성을 통해 뉴클레오타이드를 핵산 가닥의 유리 3' 하이드록실 기에 연결시킴으로써 핵산 가닥(또는 폴리뉴클레오타이드)에 도입된다.

[0196] 서열화되는 핵산 주형은 DNA 또는 RNA, 또는 심지어 테옥시뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 하이브리드 분자일 수 있다. 핵산 주형은 천연 발생 및/또는 비천연 발생 뉴클레오타이드 및 천연 또는 비천연 백본 결합이 서열화 반응에서 주형의 복사를 방해하지 않는 한, 이들을 포함할 수 있다.

[0197] 특정 구체예에서, 서열화되는 핵산 주형은 당 분야에 공지된 임의의 적합한 결합 방법, 예를 들어, 공유 부착을 통해 고체 지지체에 부착될 수 있다. 특정 구체예에서, 주형 폴리뉴클레오타이드는 고체 지지체(예를 들어, 실리카-기반 지지체)에 직접 부착될 수 있다. 그러나, 본 개시내용의 다른 구체예에서, 고체 지지체의 표면은 주형 폴리뉴클레오타이드의 직접 공유 부착을 허용하거나, 그 자체가 고체 지지체에 비공유적으로 부착할 수 있는 하이드로겔 또는 중합전해질 다층을 통해 주형 폴리뉴클레오타이드를 고정시키기 위해 일부 방식으로 변형될 수 있다.

[0198] 폴리뉴클레오타이드가 실리카-기반 지지체에 직접 부착된 예는, 예를 들어, W000006770호(본원에 참조로서 포함됨)에 개시된 것들이고, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 유리 상의 펜던트 에폭사이드 기와 폴리뉴클레오타이드 상의 내부 아미노 기 사이의 반응에 의해 유리 지지체 상에 고정된다. 또한, 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, W02005/047301호(본원에 참조로서 포함됨)에 기재된 바와 같이, 황-기반 친핵체와 고체 지지체의 반응에 의해 고체 지지체에 부착될 수 있다. 고체-지지된 주형 폴리뉴클레오타이드의 또 다른 추가 예는, 예를 들어, 각각이 본원에 참조로서 포함되는 W000/31148, W001/01143, W002/12566, W003/014392, 미국 특허 번호 6,465,178호 및 W000/53812호에 기재된 바와 같이, 주형 폴리뉴클레오타이드가 실리카-기반 또는 다른 고체 지지체 상에 지지된 하이드로겔에 부착된 것이다.

[0199] 주형 폴리뉴클레오타이드가 고정될 수 있는 특정 표면은 폴리아크릴아미드 하이드로겔이다. 폴리아크릴아미드 하이드로겔은 상기 인용된 참조문헌 및 본원에 참조로서 포함되는 W02005/065814호에 기재되어 있다. 사용될 수 있는 특정 하이드로겔은 WO 2005/065814호 및 미국 공개 번호 2014/0079923호에 기재된 것들을 포함한다. 한 구체예에서, 하이드로겔은 PAZAM(폴리(N-(5-아지도아세트아미드)펜틸) 아크릴아미드-코-아크릴아미드)이다.

[0200] DNA 주형 분자는, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,172,218호(본원에 참조로서 포함됨)에 기재된 바와 같이, 비드 또는 마이크로입자에 부착될 수 있다. 비드 또는 마이크로입자에 대한 부착은 서열화 적용에 유용할 수 있다. 각각의 비드가 상이한 DNA 서열을 함유하는 비드 라이브러리가 제조될 수 있다. 예시적인 라이브러리 및 이들의 생성을 위한 방법은 각각 본원에서 참조로서 포함되는 문헌[Nature, 437, 376-380 (2005); Science, 309, 5741, 1728-1732 (2005)]에 기재되어 있다. 본원에 개시된 뉴클레오타이드를 사용하는 이러한 비드의 어레이에 대한 서열화는 본 개시내용의 범위 내에 있다.

[0201] 서열화되는 주형(들)은 고체 지지체 상에 "어레이"의 일부를 형성할 수 있고, 이 경우에 어레이는 임의의 편리한 형태를 취할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 방법은 단일-분자 어레이, 클러스터형 어레이 및 비드 어레이를 포함하는 모든 유형의 고밀도 어레이에 적용 가능하다. 본 개시내용의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오타이드는 고체 지지체 상에 핵산 분자를 고정시킴으로써 형성된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 본질적으로 임의의 유형의 어레이에서 주형을 서열화하는데 사용될 수 있다.

[0202] 그러나, 본 개시내용의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오타이드는 클러스터형 어레이의 서열화의 맥락에서 특히 유리하다. 클러스터형 어레이에서, 어레이 상의 별개의 영역(종종 부위, 또는 특징으로 지칭됨)은 다수의 폴리뉴클레오타이드 주형 분자를 포함한다. 일반적으로, 다수의 폴리뉴클레오타이드 분자는 광학 수단에 의해 개별적으로 분해될 수 없고 대신 집합체로서 검출된다. 어레이가 형성되는 방법에 따라, 어레이 상의 각각의 부위는

하나의 개별적인 폴리뉴클레오티드 분자의 다수의 복사체(예를 들어, 부위는 특정 단일- 또는 이중-가닥 핵산 중에 대해 동일하다) 또는 심지어 소수의 상이한 폴리뉴클레오티드 분자의 다수의 복사체(예를 들어, 2개의 상이한 핵산 종의 다수의 복사체)를 포함할 수 있다. 핵산 분자의 클러스터형 어레이는 당 분야에 일반적으로 공지된 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 예로서, 각각이 본원에 참조로서 포함되는 WO 98/44151호 및 W000/18957호는 고정된 핵산 분자의 클러스터 또는 "콜로니"를 포함하는 어레이를 형성하기 위해 주형 및 증폭 생성물 둘 모두가 고체 지지체 상에 고정된 채로 유지되는 핵산의 증폭 방법을 기술하고 있다. 이러한 방법에 따라 제조된 클러스터형 어레이 상에 존재하는 핵산 분자는 본 개시내용의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오티드를 사용한 서열화에 적합한 주형이다.

[0203] 본 개시내용의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오티드는 또한 단일 분자 어레이 상의 주형을 서열화하는데 유용하다. 본원에서 사용되는 용어 "단일 분자 어레이" 또는 "SMA"는 고체 지지체 상에 분포된(또는 배열된) 폴리뉴클레오티드 분자의 집단을 지칭하며, 여기서 집단의 모든 다른 것들로부터 임의의 개별적인 폴리뉴클레오티드의 간격은 상기 개별적인 폴리뉴클레오티드 분자들을 개별적으로 분해할 수 있게 한다. 따라서, 고체 지지체의 표면에 고정된 표적 핵산 분자는 일부 구체예에서 광학 수단에 의해 분해될 수 있다. 이것은 각각 하나의 폴리뉴클레오티드를 나타내는 하나 이상의 별개의 신호가 사용된 특정 영상화 장치의 분해 가능한 영역 내에서 발생할 것임을 의미한다.

[0204] 단일 분자 검출은 어레이 상의 인접한 폴리뉴클레오티드 분자 사이의 간격이 적어도 100 nm, 보다 특히 적어도 250 nm, 또한 보다 특히 적어도 300 nm, 심지어 보다 특히 적어도 350 nm인 경우에 달성될 수 있다. 따라서, 각각의 분자는 개별적으로 분해 가능하고 단일 분자 형광점으로서 검출 가능하고, 상기 단일 분자 형광점으로부터의 형광은 또한 단일 단계 광표백(photobleaching)을 나타낸다.

[0205] 용어 "개별적으로 분해된" 및 "개별 해상도"는 가시화될 때 어레이 상의 하나의 분자를 이의 이웃하는 분자와 구별할 수 있음을 명시하기 위해 본원에서 사용된다. 어레이 상의 개별 분자들 사이의 분리는 개별 분자를 분해하는데 사용되는 특정 기술에 의해 부분적으로 결정될 것이다. 단일 분자 어레이의 일반적인 특징은 각각이 본원에 참조로서 포함되는 공개 출원 W000/06770호 및 WO 01/57248호를 참조하여 이해될 것이다. 본 개시내용의 변형된 뉴클레오티드의 하나의 사용은 합성에 의한 서열화 반응에서의 사용이지만, 변형된 뉴클레오티드의 유용성은 이러한 방법으로 제한되지 않는다. 실제로, 뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드에 도입된 뉴클레오티드에 부착된 형광 표지의 검출을 필요로 하는 임의의 서열화 방법에서 유리하게 사용될 수 있다.

[0206] 특히, 본 개시내용의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오티드는 자동 형광 서열화 프로토콜, 특히 Sanger 및 동료의 사슬 종결 서열화 방법에 기반한 형광 염료-종결자 사이클 서열화에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 프라이머 연장 서열화 반응에서 형광 표지된 디데옥시 뉴클레오티드를 도입하기 위해 효소 및 사이클 서열화를 사용한다. 소위 Sanger 서열화 방법 및 관련 프로토콜(Sanger-타입)은 표지된 디데옥시뉴클레오티드에 의한 무작위화 사슬 종결을 활용한다.

[0207] 따라서, 본 개시내용은 또한 3' 및 2' 위치 둘 모두에 하이드록실기가 없는 디데옥시뉴클레오티드인 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 이러한 변형된 디데옥시뉴클레오티드는 Sanger 타입 서열화 방법 등에 사용하기에 적합하다.

[0208] 3' 차단기를 도입하는 본 개시내용의 염료 화합물로 표지된 변형된 뉴클레오티드는 또한 Sanger 방법 및 관련 프로토콜에서 유용할 수 있는 것으로 인지될 것인데, 그 이유는 변형된 디데옥시뉴클레오티드를 사용함으로써 달성된 동일한 효과가 3'-OH 차단기를 갖는 변형된 뉴클레오티드를 사용함으로써 달성될 수 있기 때문이다: 둘 모두는 후속적인 뉴클레오티드의 도입을 방지한다. 본 개시내용에 따른 3' 차단기를 갖는 뉴클레오티드가 Sanger-타입 서열화 방법에 사용되는 경우, 뉴클레오티드에 부착된 염료 화합물 또는 검출 가능한 표지는 절단 가능한 링커를 통해 연결될 필요가 없다는 것이 이해될 것인데, 그 이유는 본 개시내용의 표지된 뉴클레오티드가 도입되는 각각의 예에서, 뉴클레오티드는 후속하여 도입될 필요가 없으므로, 표지가 뉴클레오티드로부터 제거될 필요가 없기 때문이다.

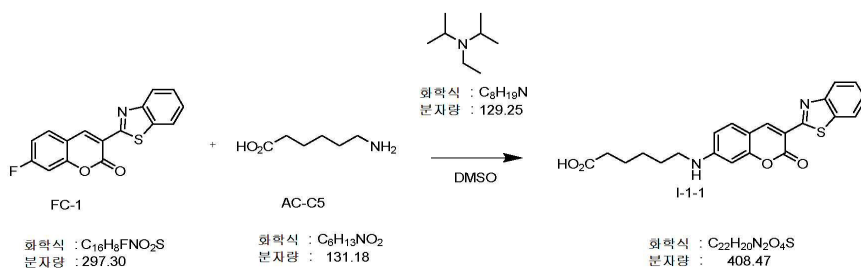
[0209] 실시예

[0210] 어떠한 방식으로든 청구 범위의 범위를 제한하려는 의도가 아닌 추가 실시예가 하기 실시예에 추가로 상세하게 개시되어 있다.

[0211] 어떠한 방식으로든 청구 범위의 범위를 제한하려는 의도가 아닌 추가 실시예가 하기 실시예에 추가로 상세하게 개시되어 있다. 표 2는 실시예에 개시된 새로운 쿠마린 형광 염료의 스펙트럼 특성을 요약한 것이다. 표 3은 본

원에 개시된 새로운 염료로 표지된 다양한 뉴클레오타이드의 구조 및 스펙트럼 특성을 요약한 것이다.

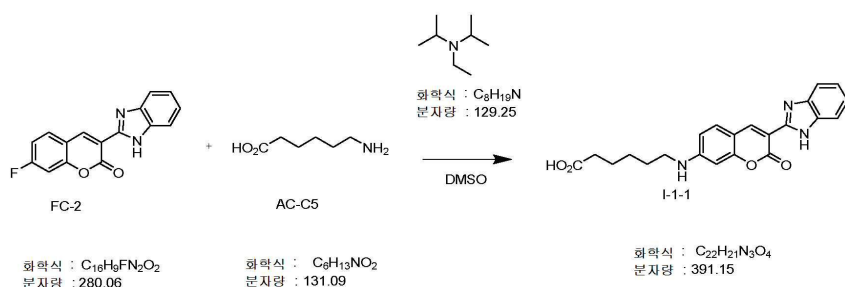
[0212] 실시예 1-1-1: 7-(5-카르복시헵틸)아미노-3-(벤조티아졸-2-일)쿠마린



[0213]

[0214] 3-(벤조티아졸-2-일)-7-플루오로-쿠마린 유도체(FC-1, 0.4 g, 1.345 mmol, 1 eqv) 및 6-아미노헥산산(AC-C5, 0.25 g, 1.906 mmol, 1.417 eqv)을 무수 디메틸 설폭사이드(DMSO, 3 mL)에 첨가하였다. 첨가가 완료된 후, 혼합물을 수 분 동안 실온에서 교반한 다음 N,N-디이소프로필-N-에틸아민(DIPEA, 0.25 g, 2 mmol, 2 eqv)을 이 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 3시간 동안 120℃에서 교반하였다. 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후, 황색 반고체 반응 혼합물을 물(5 mL)로 희석하고, 밤새 교반하였다. 생성된 침전물을 흡입 여과에 의해 수집하였다. 수율 0.36 g (65.5%). MS (DUIS): MW 계산치 408.47. 실측치 m/z: (+) 409 (M+1)⁺; (-), 407 (M-1)⁻. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.03 (m, 2H), 9.00 (s, 1H), 8.12 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.73 (dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 3.18 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.57 (dp, J = 14.7, 7.2 Hz, 4H), 1.39 (dq, J = 9.2, 4.5, 3.5 Hz, 2H).

[0215] 실시예 1-1-2: 7-(5-카르복시헵틸)아미노-3-(벤즈이미다졸-2-일)쿠마린

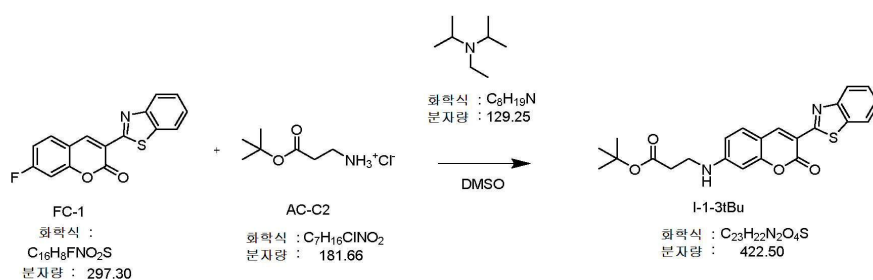


[0216]

[0217] 3-(벤즈이미다졸-2-일)-7-플루오로-쿠마린(FC-2, 0.28 g, 1 mmol, 1 eqv) 및 6-아미노헥산산(AC-C5, 0.13 g, 1 mmol, 1 eqv)을 무수 디메틸 설폭사이드(DMSO, 2 mL)에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 수 분 동안 실온에서 교반한 다음 DIPEA(0.25 g, 2 mmol, 2 eqv)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 4시간 동안 온도 130℃에서 교반하였다. 추가 부분의 6-아미노헥산산(AC-1, 0.13 g, 1 mmol, 1 eqv) 및 DIPEA(0.26 g, 2 mmol, 2 eqv)를 반응 혼합물에 첨가하고, 130℃에서 계속 가열하여 5시간 동안 지속시켰다. 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후, 담황색 반응 혼합물을 물(5 mL)로 희석하고, 밤새 교반하였다. 생성된 침전물을 흡입 여과에 의해 수집하였다. 수율 0.26 g (68.5%). 생성물의 순도, 구조 및 조성을 HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 391.15. 실측치 m/z: (+) 392 (M+1)⁺; (-) 390 (M-1)⁻, 781 (2M-1)⁻.

[0218] 실시예 1-1-3: 7-(2-카르복시에틸)아미노-3-(벤조티아졸-2-일)쿠마린

[0219] 단계 A: 7-[2-(t-부틸옥시카르보닐)에틸]아미노-3-(벤조티아졸-2-일)쿠마린.



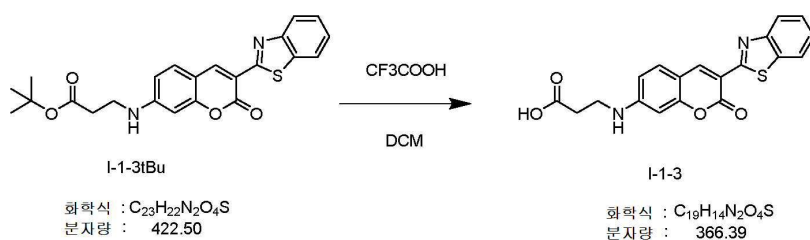
[0220]

[0221]

3-(벤조티아졸-2-일)-7-플루오로-쿠마린(FC-1, 0.3 g, 1.01 mmol, 1 eqv) 및 t-부틸 3-아미노프로피오네이트 하이드로클로라이드(AC-C2, 0.2 g, 1.1 mmol, 1.09 eqv)를 무수 디메틸 설펍사이드(DMSO, 2 mL)에 첨가하고, 생성된 혼합물을 수 분 동안 실온에서 교반한 다음 DIPEA(0.26 g, 2 mmol, 2 eqv)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 2시간 동안 100℃에서 교반하였다. 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후, 황색 반응 혼합물을 물(7 mL)로 희석하고, 밤새 교반하였다. 생성된 침전물을 흡입 여과에 의해 수집하였다. 수율 0.38 g (69%). MS (DUI): MW 계산치 422.13. 실측치 m/z: (+) 423 (M+1)⁺; (-), 421 (M-1)⁻. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.28 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.27 - 8.16 (m, 1H), 8.10 (tt, J = 8.3, 0.9 Hz, 2H), 8.05 - 7.92 (m, 1H), 7.72 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.66 - 7.55 (m, 1H), 7.51 (dddd, J = 11.4, 8.2, 7.1, 1.3 Hz, 2H), 7.46 - 7.32 (m, 2H), 6.74 (dd, J = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.41 (q, J = 6.3 Hz, 2H), 2.55 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H).

[0222]

단계 B.



[0223]

[0224]

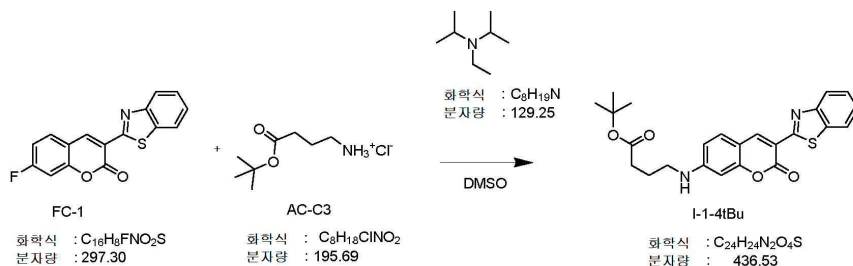
무수 디클로로메탄(20 mL) 중 7-[2-(t-부틸옥시카르보닐)에틸]아미노-3-(벤조티아졸-2-일)쿠마린(I-1-3tBu, 0.2 g, 0.473 mmol)의 용액을 트리플루오로아세트산(0.5 mL)으로 처리하고, 생성된 혼합물을 24시간 동안 실온에서 교반하였다. 용매를 증류 제거하고, 잔류물을 물(10 mL)로 분쇄하였다. 생성된 침전물을 흡입 여과에 의해 수집하였다. 수율 0.15 g (86%). 순도, 구조 및 조성을 HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 확인하였다. MS (DUI): MW 계산치 366.39. 실측치 m/z: (+) 367 (M+1)⁺; (-), 365 (M-1)⁻.

[0225]

실시예 1-1-4: 7-(3-카르복시프로필)아미노-3-(벤조티아졸-2-일)쿠마린

[0226]

단계 A: 7-[3-(t-부틸옥시카르보닐)프로필]아미노-3-(벤조티아졸-2-일)쿠마린.

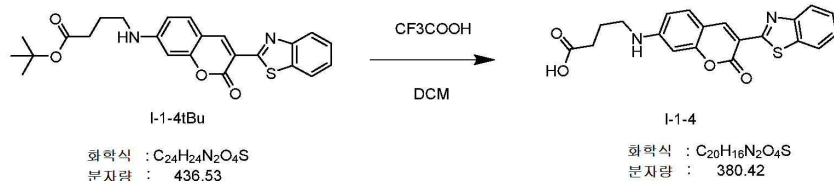


[0227]

[0228]

3-(벤조티아졸-2-일)-7-플루오로-쿠마린(FC-1, 0.6 g, 2.02 mmol, 1 eqv) 및 t-부틸 4-아미노부타노에이트 하이드로클로라이드(AC-C3, 0.5 g, 2.56 mmol, 1.27 eqv)를 무수 디메틸 설펍사이드(DMSO, 5 mL)에 첨가하였다. 첨가를 완료한 후, 혼합물을 수 분 동안 실온에서 교반한 다음 DIPEA(0.65 g, 5 mmol, 4 eqv)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 3시간 동안 온도 100℃에서 교반하였다. 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후, 황색 반고체 반응 혼합물을 물(10 mL)로 희석하고 밤새 교반하였다. 생성된 침전물을 흡입 여과에 의해 수집하였다. 수율 0.7 g (79%). 순도, 구조 및 조성을 HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 확인하였다. MS (DUI): MW 계산치 436.53. 실측치 m/z: (+) 437 (M+1)⁺; (-), 435 (M-1)⁻.

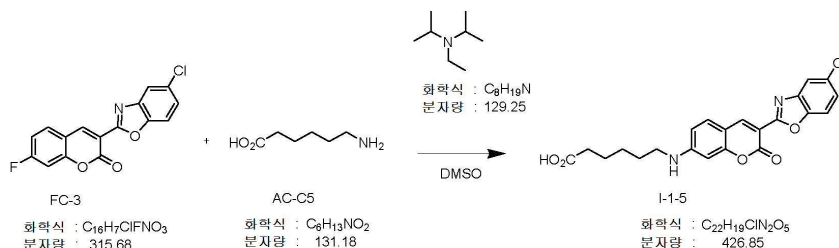
[0229] 단계 B.



[0230]

[0231] 무수 디클로로메탄(25 mL) 중 7-[3-(*t*-부틸옥시카르보닐)프로필]아미노-3-(벤조티아졸-2-일)쿠마린(I-1-4tBu, 0.7 g, 1.604 mmol)의 용액을 트리플루오로아세트산(1 mL)으로 처리하고, 반응 혼합물을 24시간 동안 실온에서 교반하였다. 용매를 증류 제거하고, 잔류물을 물(10 mL)로 분쇄하였다. 생성된 침전물을 흡입 여과에 의해 수집하였다. 수율 0.59 g (97%). 순도, 구조 및 조성을 HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 366.39. 실측치 m/z : (+) 381 (M+1)⁺; (-), 379 (M-1)⁻. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.17 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.48 - 7.30 (m, 2H), 6.73 (dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.21 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 2.36 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 1.80 (p, J = 7.3 Hz, 2H).

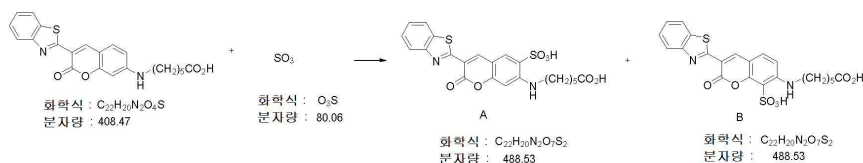
[0232] 실시예 1-1-5: 7-(5-카르복시헥틸)아미노-3-(5-클로로-벤조티아졸-2-일)쿠마린



[0233]

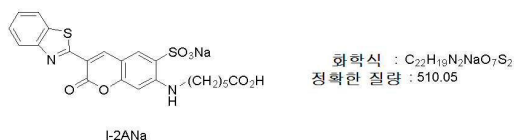
[0234] 3-(5-클로로-벤조티아졸-2-일)-7-플루오로-쿠마린(FC-3, 0.32 g, 1 mmol, 1 eqv) 및 6-아미노헥산산(AC-C5, 0.26 g, 2 mmol, 2 eqv)을 둥근 바닥 플라스크에서 무수 디메틸 설폭사이드(DMSO, 5 mL)에 첨가하였다. 첨가를 완료한 후, 혼합물을 수 분 동안 실온에서 교반한 다음 DIPEA(0.52 g, 4 mmol, 2 eqv)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 7시간 동안 온도 135°C에서 교반하였다. 추가 부분의 6-아미노헥산산(AC-1, 0.13 g, 1 mmol, 1 eqv) 및 DIPEA(0.26 g, 2 mmol, 2 eqv)를 첨가하고, 가열을 135°C에서 5시간 동안 계속하였다. 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후, 담황색 반응 혼합물을 물(15 mL)로 희석하고, 밤새 교반하였다. 생성된 침전물을 흡입 여과에 의해 수집하였다. 수율 0.09 g (21%). 생성물의 순도, 구조 및 조성을 HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 426.10. 실측치 m/z : (+) 427 (M+1)⁺; (-) 425 (M-1)⁻, 851 (2M-1)⁻.

[0235] 실시예 2: 7-(5-카르복시헥틸)아미노-3-(벤조티아졸-2-일)쿠마린-6-설폰산 (2A) 및 7-(5-카르복시헥틸)아미노-3-(벤조티아졸-2-일)쿠마린-8-설폰산 (2B)



[0236]

[0237] 화합물 I-1-1(0.1 g, 0.245 mmol)을 드라이-아이스/아세톤 조에서 냉각된 20% 발연 황산(1 mL)으로 교반하면서 소량씩 첨가하였다. 첨가를 완료한 후, 혼합물을 1시간 동안 0°C에서 교반하고, 실온으로 가온시킨 다음, 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 용액을 무수 에테르(25 mL)에 부었다. 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후, 생성된 침전물을 흡입 여과에 의해 수집하였다. 수율 78 mg (65%). ¹H NMR (d₆-DMSO)은 화합물 2A와 소량(약 4%)의 화합물 2B를 나타내었다.



[0238]

[0239]

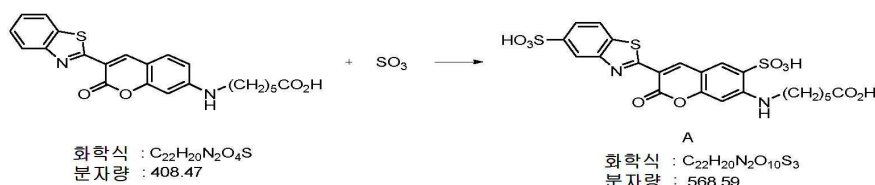
실시에 2A, 소듐 염: 상기로부터의 침전물을 물(2 mL)에 재현탁시키고, 현탁액의 pH를 5 M NaOH 용액의 첨가에 의해 약 5로 조정하였다. 생성된 혼합물을 10 mL의 메탄올에 붓고, 현탁액을 여과하였다. 여과액을 증발 건조시켜 염료를 소듐 염으로서 제공하였다(I-2A-Na). 순도, 구조 및 조성을 HPLC, NMR 및 LCMS에 의해 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 488.07. 실측치 m/z: (+) 489 (M+1)⁺; (-) 243 (M-1)²⁻, 487 (M-1)⁻.

[0240]

2A 및 2B의 트리에틸암모늄 염의 제조: 화합물 I-1-1(0.41 g, 1 mmol)을 드라이-아이스/아세톤 조에서 냉각된 20% 발연 황산(5 mL)으로 교반하면서 소량씩 첨가하였다. 첨가를 완료한 후, 혼합물을 1시간 동안 0℃에서 교반하고, 실온으로 가온시킨 다음, 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 용액을 무수 에테르(50 mL)에 부었다. 실온에서 1시간 동안 정치시킨 후, 유기 용매 층을 따라내고, 반고체 바닥 층을 아세토니트릴-물(1:1, 10 mL)에 용해시켰다. 용액의 pH를 물 중 2 M TEAB 용액의 첨가에 의해 약 7.0으로 조정하였다. 생성된 용액을 20 μm Nylon 필터를 통해 여과하고, 이성질체를 분취용 HPLC에 의해 분리하였다. 이성질체의 용액을 진공에서 농축한 다음 물(20 μL)에 재용해하고, 용매를 진공에서 제거 건조시켜 염료를 트리에틸암모늄 염으로서 제공하였다. 순도 및 조성을 HPLC 및 LCMS에 의해 확인하였다.

[0241]

실시에 3: 7-(5-카르복시펜틸)아미노-3-[5-설포나토(벤조티아졸-2-일)-쿠마린-6-설포네이트 트리에틸암모늄 염



[0242]

[0243]

화합물 I-1-1(0.08 g, 0.2 mmol)을 드라이-아이스/아세톤 조에서 냉각된 20% 발연 황산(2 mL)으로 교반하면서 소량씩 첨가하였다. 첨가를 완료한 후, 혼합물을 1시간 동안 0℃에서 교반하고, 실온으로 가온시킨 다음, 2시간 동안 70℃에서 교반하였다. 이후 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용액을 무수 에테르(30 mL)에 부었다. 실온에서 1시간 동안 교반한 후, 생성된 침전물을 흡입 여과에 의해 수집하였다. 수율 43 mg (38%).

[0244]

침전물을 물(2 mL)에 재현탁하고, 현탁액의 pH를 물 중 2 M TEAB 용액의 첨가에 의해 약 7.5로 조정하였다. 생성된 혼합물을 20 μm Nylon 필터를 통해 여과하고, 분취용 HPLC에 의해 정제하였다. 염료 분획을 진공에서 농축한 다음 물(20 μL)에 재용해하고, 용매를 진공에서 제거 건조시켜 염료를 비스-트리에틸암모늄 염으로서 제공하였다. 순도 및 조성을 HPLC 및 LCMS에 의해 확인하였다. MS (DUIS): MW 계산치 568.03. 실측치 m/z: (+) 569 (M+1)⁺.

[0245]

예시적인 염료 용액의 형광 강도를 동일한 스펙트럼 영역에 대해 상업적인 염료와 비교하였다. 결과를 표 2에 나타내고 형광 기반 분석 적용을 위한 예시적인 염료의 상당한 이점을 입증한다.

[0246] 표 2. 실시예에 개시된 새로운 형광 염료의 스펙트럼 특성.

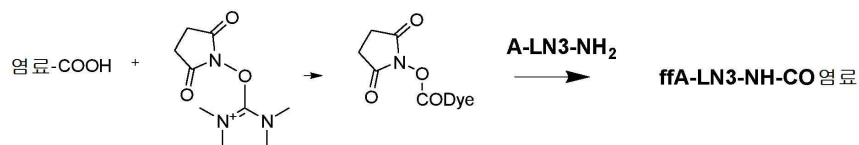
번호	구조	EtOH-물 1:1 에서 스펙트럼 특성		
		최대 흡광도 nm	최대 형광 nm	상대 형광* 강도, %
I-1-1		460	499	275
I-1-2		437	488	175
I-1-3		453	499	230
I-1-4		455	500	220
I-1-5		430	490	200
I-2A		465	503	395
I-2B		466	505	280
I-3		472	515	330
표준	AttoTec로부터의 Atto465	455	508	100

[0247]

[0248] *460 nm에서 형광의 여기

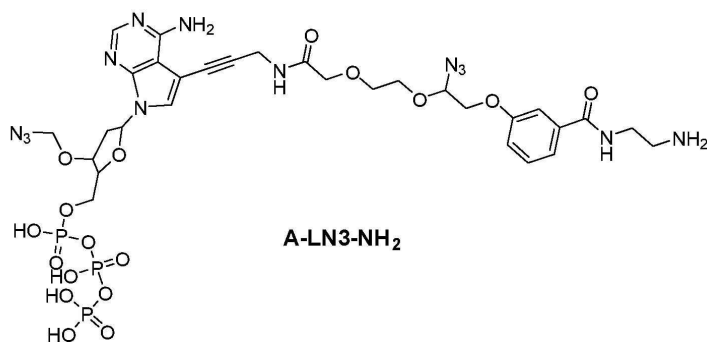
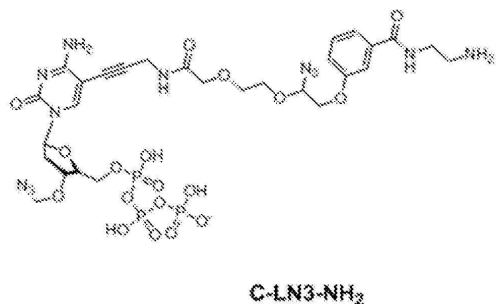
[0249] 실시예 4: 새로운 형광 염료를 갖는 완전 기능성 뉴클레오타이드 컨쥬게이트의 합성을 위한 일반적인 절차

[0250] 본원에 개시된 쿠마린 형광 염료는 하기 아데닌 예시적인 반응식에 따른 적절한 시약으로 염료의 카르복실기의 활성화 후:



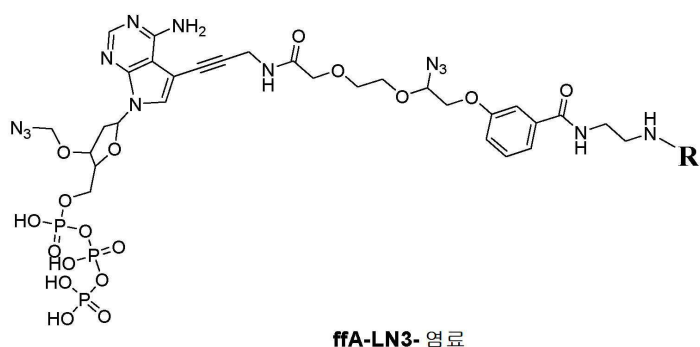
[0251]

[0252] 적절한 아미노-치환된 아데닌(A) 및 시토신(C) 뉴클레오타이드 유도체 A-LN3-NH₂ 또는 C-LN3-NH₂와 커플링되었다:



[0253]

[0254] 아데닌 커플링의 일반적인 생성물은 하기에 제시된 바와 같다:



[0255]

[0256] ffA-LN3-염료는 LN3 링커를 갖고 본원에 개시된 쿠마린 염료로 표지된 완전히 작용기화된 A 뉴클레오타이드를 지칭한다. 각각의 구조에서 R 기는 컨쥬게이션 후 쿠마린 염료 모이어티를 지칭한다.

[0257]

염료(10 μ mol)를 5 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣어 건조시키고 무수 디메틸포름아미드(DMF, 1 mL)에 용해시킨 다음 용매를 진공에서 증류 제거한다. 이 절차를 2회 반복한다. 건조된 염료를 무수 N,N-디메틸아세트아미드(DMA, 0.2 mL)에 실온에서 용해시킨다. N,N,N',N'-테트라메틸-0-(N-석신이미딜)우로늄 테트라플루오로보레이트(TSTU, 1.5 eq., 15 μ mol, 4.5 mg)를 염료 용액에 첨가한 다음, DIPEA(3 eq., 30 μ mol, 3.8 mg, 5.2 μ L)를 마이크로피펫을 통해 이 용액에 첨가한다. 반응 플라스크를 질소 가스하에 밀봉한다. 반응 진행을 TLC(용리액 아세토니트릴-물 1:9) 및 HPLC에 의해 모니터링한다. 한편, 적절한 아미노-치환된 뉴클레오타이드 유도체(A-LN3-NH₂, 20 mM, 1.5eq, 15 μ mol, 0.75 mL)의 용액을 진공에서 농축한 다음 물(20 μ L)에 재용해시킨다. DMA 중 활성화된 염료의 용액을 N-LN3-NH₂의 용액을 함유하는 플라스크로 옮긴다. DIPEA(3 eq, 30 μ mol, 3.8mg, 5.2 μ L)를 트리에틸아민(1 μ L)과 함께 더 첨가한다. 커플링 진행은 TLC, HPLC, 및 LCMS에 의해 매시간 모니터링된다. 반응이 완료되면, 트리에틸아민 바이카르보네이트 완충제(TEAB, 0.05 M-3 mL)를 피펫을 통해 반응 혼합물에 첨가한다. 완전히 작용기화된 뉴클레오타이드의 초기 정제는 켄칭된 반응 혼합물을 DEAE-Sephadex® 컬럼을 통해 진행시켜 잔류하는 미반응 염료의 대부분을 제거함으로써 수행된다. 예를 들어, Sephadex를 빈 25 g Biotage 카트리지, 용매 시스템 TEAB/MeCN에 붓는다. Sephadex 컬럼으로부터의 용액을 진공에서 농축한다. 나머지 물질은 20 μ m 나일론 필터를 통해 여과하기 전에 최소량의 물과 아세토니트릴에 재용해된다. 여과된 용액을 분취용-HPLC로 정제한다. 제조된 화합물의 조성을 LCMS로 확인하였다.

[0258] 표 3. 본원에 개시된 새로운 쿠마린 염료로 표지된 다양한 뉴클레오타이드의 구조 및 스펙트럼 특성.

Compd.	SRE 의 형광 특성		
	흡광도, nm	형광, nm	상대 형광 강도, %
ffA-I-1-1	448	505	480
ffA-I-1-3	454	499	500
ffA-I-2A	475	510	575
ffA-표준	465	504	100

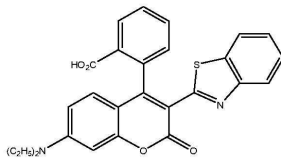
[0259]

[0260] 본원에 개시된 염료로 표지된 뉴클레오타이드 용액의 형광 강도와 동일한 스펙트럼 영역에 대해 상업적 염료 (AttoTec GmbH로부터의 Atto465)로 표지된 뉴클레오타이드에 대한 적절한 데이터의 비교는 형광 기반 분석 적용에 사용되는 생체분자의 표지화를 위한 본원에 기재된 염료의 이점을 입증한다.

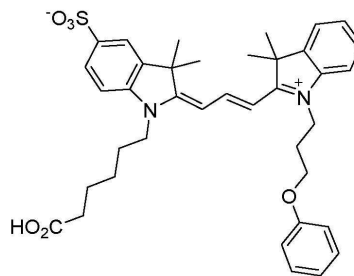
[0261] 실시예 5: 서열화 분석

[0262] 본원에 개시된 염료에 기반한 ffA들은 합성에 의한 서열화 화학을 사용하여 Illumina 시퀀서 상에서 서열화에 사용되었고 도 1A, 1B, 및 1C의 이미지는 이들의 유용성을 입증한다. 스캔 온도 22°C, 노출 시간: 청색 500 ms, 녹색 500 ms; SFA 플로우 셀. 아래 차트에서 괄호 안의 숫자는 새로운 청색 ffA 대 녹색A의 비를 나타낸다. A, C, G, 및 T 뉴클레오타이드는 다음과 같이 표지되었다: A: Ex 2A(도 1A), Ex I-1-3(도 1B), 및 Ex I-1-1(도 1C); C: NR440; G: 다크; 및 T: AF550POPOS0.

NR440 (WO2018/060482호 참조)



AF550POPOS0 (WO2017/051201호 참조)



[0263]

도면

도면1

