



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월09일

(11) 등록번호 10-2287718

(24) 등록일자 2021년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 19/14 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)(52) CPC특허분류
C07H 19/14 (2013.01)
C12Q 1/6869 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2017-7006407

(22) 출원일자(국제) 2015년08월06일

심사청구일자 2020년06월11일

(85) 번역문제출일자 2017년03월07일

(65) 공개번호 10-2017-0039743

(43) 공개일자 2017년04월11일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2015/052282

(87) 국제공개번호 WO 2016/020691

국제공개일자 2016년02월11일

(30) 우선권주장

1414098.2 2014년08월08일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

JP2010503705 A*

W02002086088 A2*

W02002088381 A2*

W02012159072 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

일루미나 케임브리지 리미티드

영국 케임브리지 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19
그랜타 파크

(72) 발명자

우 샤오린

영국 에섹스 씨비10 1엑스엘 니어 새프런 윌든 체
스터포드 리서치 파크 리틀 체스터포드 일루미나
케임브리지 리미티드 내

리우 샤오하이

영국 에섹스 씨비10 1엑스엘 니어 새프런 윌든 체
스터포드 리서치 파크 리틀 체스터포드 일루미나
케임브리지 리미티드 내

(74) 대리인

특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 31 항

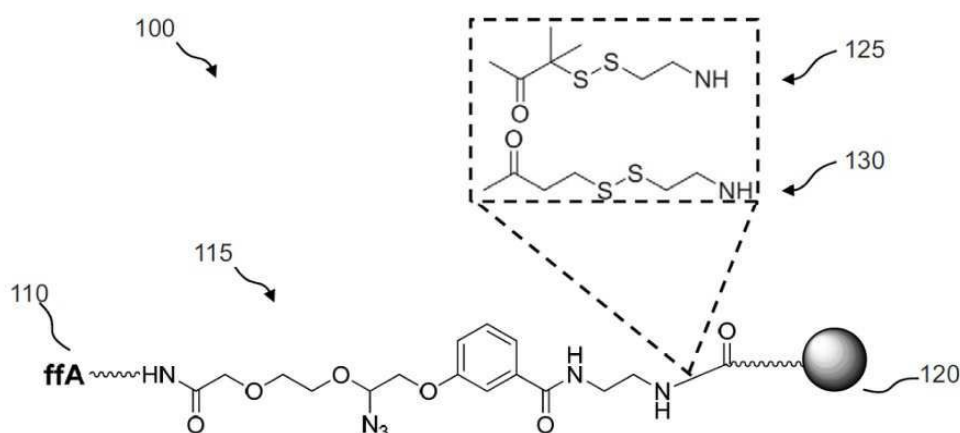
심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 변형된 뉴클레오타이드 링커

(57) 요약

본 출원의 몇몇 실시형태는 합성에 의한 서열분석 적용분야에서 뉴클레오타이드 혼입의 효율을 증가시키기 위한 신규한 변형된 뉴클레오타이드 링커에 관한 것이다. 이러한 변형된 뉴클레오타이드 링커를 제조하는 방법이 또한 본 명세서에서 제공된다.

대표도 - 도1b

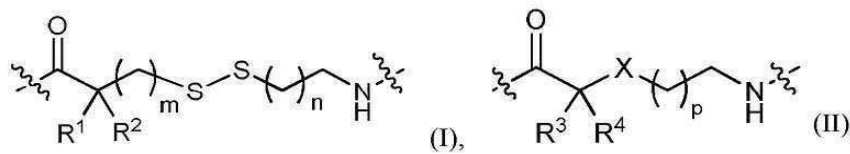


명세서

청구범위

청구항 1

링커를 통해서 형광단에 공유 부착된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드로서, 상기 링커는 하기 화학식 (I) 또는 (II)의 구조를 포함하는, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드:



식 중,

R^1 은 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이고;

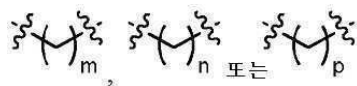
R^2 는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이고;

R^3 은 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, $-NR^5-C(=O)R^6$ 또는 $-NR^7-C(=O)-OR^8$ 이고;

R^4 는 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이고;

각각의 R^5 및 R^7 은 독립적으로 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이고;

각각의 R^6 및 R^8 은 독립적으로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이고;



중의 메틸렌 반복 단위의 각각은 선택적으로 치환되고;

X는 메틸렌(CH_2), 산소(O) 또는 황(S)이고;

m은 0 내지 20의 정수이고;

n은 1 내지 20의 정수이며; 그리고

p는 1 내지 20의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, R^1 은 메틸인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, R^2 는 메틸인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 4

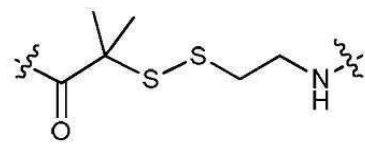
제1항에 있어서, m은 0 또는 1인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 5

제1항에 있어서, n은 1인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 구조는 또한 하기 화학식 (Ia)로 표시되는, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드:



청구항 7

제1항에 있어서, R³은 메틸인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 8

제1항에 있어서, R³은 -NH-C(=O)CH₃인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 9

제1항에 있어서, R³은 -NH-C(=O)O*t*-부틸인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 10

제1항에 있어서, R⁴는 수소 또는 메틸인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 11

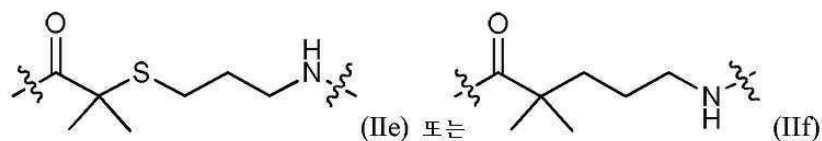
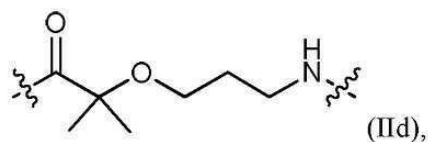
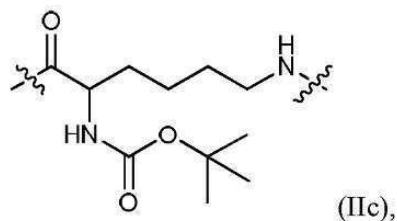
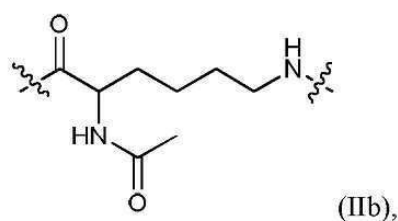
제1항에 있어서, X는 메틸렌인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 12

제1항에 있어서, p는 1 또는 2인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 화학식 (II)의 구조는 또한 하기 화학식 (IIb), (IIc), (IId), (IIe) 또는 (IIf)로 표시되는, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드:



청구항 14

제1항에 따른 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 포함하는 키트.

청구항 15

제1항에 따른 형광단 및 링커를 포함하는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 변형시키기 위한 시약.

청구항 16

하기 단계들을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 검출하기 위한 방법:

- (a) 제1항에 따른 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입시키는 단계; 및
- (b) 단계 (a)에서 혼입된 상기 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드로부터 형광 신호를 검출하는 단계.

청구항 17

제16항에 있어서, 주형 핵산 가닥 및 부분적으로 혼성화된 핵산 가닥을 제공하는 단계를 더 포함하되, 단계 (a)는 상기 주형 핵산 가닥의 대응하는 위치에서 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 상보적인 적어도 하나의 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 상기 혼성화된 핵산 가닥 내로 혼입시키고, 그리고 단계 (b)는 혼입된 상기 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 염기를 확인함으로써, 상기 주형 핵산 가닥의 상기 상보적인 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 동질성(identity)을 나타내는, 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 검출하기 위한 방법.

청구항 18

주형 핵산 분자를 서열분석하는 방법으로서,

상기 주형 핵산에 상보적인 핵산의 가닥 내로 하나 이상의 표지된 뉴클레오타이드를 혼입시키는 단계; 및

상기 주형 핵산 분자의 서열을 결정하기 위하여 하나 이상의 혼입된 표지된 뉴클레오타이드에 존재하는 염기의 동질성을 결정하는 단계를 포함하되,

상기 하나 이상의 표지된 뉴클레오타이드에 존재하는 상기 염기의 동질성은 상기 표지된 뉴클레오타이드에 의해 생성된 형광 신호를 검출함으로써 결정되고;

적어도 하나의 혼입된 표지된 뉴클레오타이드는 제1항에 따른 뉴클레오타이드인, 주형 핵산 분자를 서열분석하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 뉴클레오타이드에 존재하는 상기 염기의 동질성은 각 뉴클레오타이드 혼입 단계 후에 결정되는, 주형 핵산 분자를 서열분석하는 방법.

청구항 20

제9항에 있어서, R^4 는 수소 또는 메틸인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 21

제20항에 있어서, R^4 는 수소인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 22

제21항에 있어서, X는 메틸렌인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 링커는 화학식 (II)의 구조를 포함하되, R^3 은 $-NR^7-C(=O)-OR^8$ 인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 24

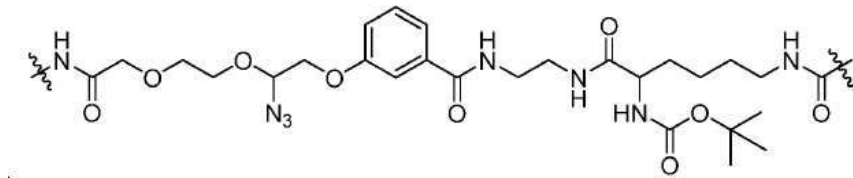
제23항에 있어서, X는 메틸렌인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 25

제24항에 있어서, p는 2인, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 링커는 하기 구조:



를 포함하는, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드.

청구항 27

제14항에 있어서, 뉴클레오타이드를 포함하는, 키트.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 링커는 화학식 (II)의 구조를 포함하되, R³은 -NR⁷-C(=O)-OR⁸인, 키트.

청구항 29

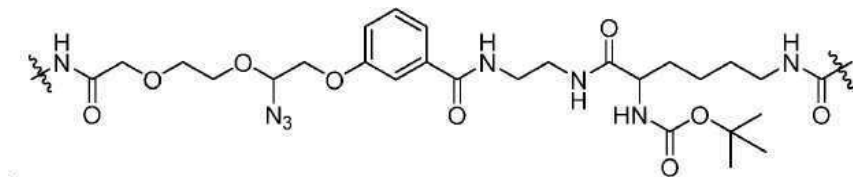
제28항에 있어서, X는 메틸렌인, 키트.

청구항 30

제29항에 있어서, p는 2인, 키트.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 링커는 하기 구조:



를 포함하는, 키트.

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원의 몇몇 실시형태는 DNA 서열분석 및 기타 진단 적용 분야, 예를 들어, 합성에 의한 서열분석에서 뉴클레오타이드의 혼입을 증가시키기 위한 신규한 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드 링커에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 분자의 연구에서의 진전은, 부분적으로는, 분자 또는 그들의 생물학적 반응을 특성 규명하는데 이용되는 기술에서의 개선에 의해 이루어져 왔다. 특히, 핵산 DNA 및 RNA의 연구는 서열 분석 및 혼성화 이벤트의 연구를 위하여 이용되는 기술의 개발로부터 이익을 얻었다.

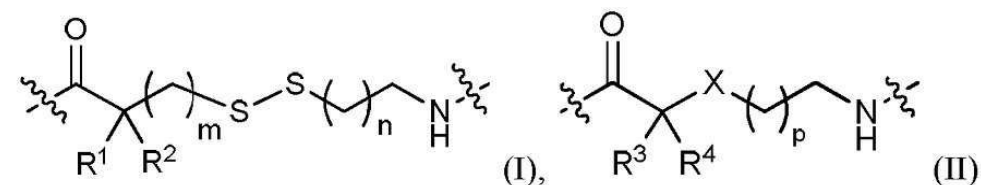
[0003] 핵산의 연구를 개선시킨 기술의 일례는 고정된 핵산의 제작된 어레이(array)들의 개발이다. 이들 어레이는 전형적으로 고체 지지 재료 상에 고정된 폴리뉴클레오타이드의 고밀도 매트릭스를 구비한다. 이에 대해서는, 예컨대, 문헌[Fodor et al., *Trends Biotech.* 12: 19-26, 1994]을 참조하면 되며, 이 문헌은 적절하게 변형된 뉴클레오타이드 포스포라미다이트의 부작을 허용하도록 규정된 영역에 노출되지만 마스크에 의해 보호된 화학적으로 민감화된 유리 표면을 이용해서 상이한 핵산을 조립하는 방식을 기술하고 있다. 제작된 어레이는 또는 소정의 위치에서 고체 지지체 상에 "스포팅"(spotting) 공지된 폴리뉴클레오타이드의 수법에 의해 제작될 수 있다 (예컨대, 문헌[Stimpson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6379-6383, 1995]).

[0004] 어레이에 결합된 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 하나의 방식은 "합성에 의한 서열분석"(sequencing by synthesis) 또는 "SBS"라 불린다. DNA의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 이 수법은 이상적으로는 서열분석 중인 핵산 반대쪽에 올바른 상보적인 뉴클레오타이드의 제어된(즉, 한번에 하나) 혼입을 요구한다. 이것은 각 뉴클레오타이드 잔기가 한번에 하나씩 서열분석되므로 다수 사이클에서 뉴클레오타이드를 부가함으로써 정확한 서열분석을 허용하며, 이에 따라서 제어되지 않은 일련의 뉴클레오타이드의 혼입이 일어나는 것을 방지한다. 각각 혼입된 뉴클레오타이드는 표지 모이어티의 제거 및 그 후속 회의 서열분석 전에 이에 부착된 적절한 표지를 이용해서 판독된다.

[0005] 따라서, 핵산 서열분석 반응의 맥락에서, 서열분석 방법의 효율이 개선될 수 있도록 합성에 의한 서열분석 동안에 뉴클레오타이드 혼입의 속도의 증가를 가능하도록 하는 것이 바람직할 것이다.

발명의 내용

[0006] 본 명세서에 개시된 몇몇 실시형태는 링커를 통해서 형광단에 공유 부착된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 관한 것으로, 여기서 상기 링커는 하기 화학식 (I) 또는 (II)의 구조, 또는 둘 다의 조합을 포함한다:



[0007]

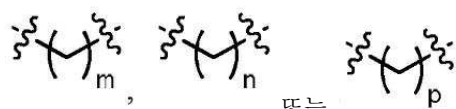
[0008] 각각의 R^1 및 R^2 는 독립적으로 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고;

[0009] R^3 은 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, $-NR^5-C(=O)R^6$, 또는 $-NR^7-C(=O)-OR^8$ 로부터 선택되며;

[0010] R^4 는 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고;

[0011] 각각의 R^5 및 R^7 은 독립적으로 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, 선택적으로 치환된 페닐, 또는 선택적으로 치환된 C_{7-12} 아르알킬로부터 선택되며;

[0012] 각각의 R^6 및 R^8 은 독립적으로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, 선택적으로 치환된 페닐, 선택적으로 치환된 C_{7-12} 아르알킬, 선택적으로 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬, 또는 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴로부터 선택되고;



[0013] 또는 CH_2 중의 메틸렌 반복 단위의 각각은 선택적으로 치환되며;

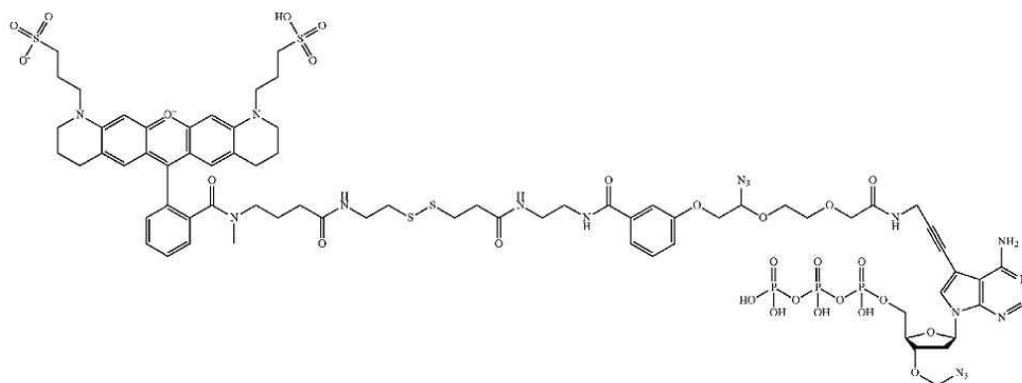
[0014] X는 메틸렌(CH_2), 산소(O) 또는 황(S)으로부터 선택되고;

[0015] m은 0 내지 20의 정수이며;

[0016] n은 1 내지 20의 정수이고; 그리고

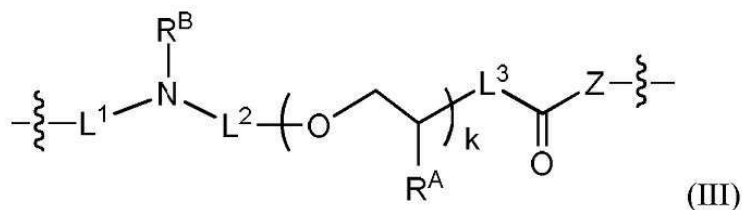
[0017] p는 1 내지 20의 정수이다.

[0018] 몇몇 실시형태에 있어서, 형광단 표지된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드는 하기 구조를 갖지 않은 화학식 (I)의 구조를 포함한다:



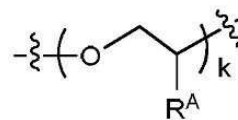
[0019]

[0020] 본 명세서에 개시된 몇몇 실시형태는 링커를 통해서 형광단에 공유 부착된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드로서, 상기 링커는 하기 화학식 (III)의 구조를 포함한다:



[0021]

[0022] 식 중, L^1 은 존재하지 않거나 또는 화학식 (I) 또는 (II)에 기재된 어느 하나의 것의 링커, 또는 보호 모이어티, 또는 이들의 조합을 포함하고; L^2 는 선택적으로 치환된 C_{1-20} 알킬렌, 선택적으로 치환된 C_{1-20} 헤테로알킬렌, 치환된 방향족기가 개입된(interrupted) 선택적으로 치환된 C_{1-20} 알킬렌, 또는 치환된 방향족기가 개입된 선택적으로 치환된 C_{1-20} 헤테로알킬렌으로부터 선택되며; L^3 은 선택적으로 치환된 C_{1-20} 알킬렌, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-20} 헤테로알킬렌으로부터 선택되고; R^A 는 수소, 사이아노, 하이드록시, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕



시, C_{1-6} 할로알킬, C_{1-6} 할로알콕시 또는 아지도로부터 선택되고, 그리고

들 중 적어도 하나는 아지도기를 포함하며; Z는 산소(O) 또는 NR^B 로부터 선택되고; 각각의 R^B 및 R^C 는 독립적으로 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고; 그리고 k는 1 내지 50의 정수이다.

[0023]

본 명세서에 개시된 몇몇 실시형태는 형광단과 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드 사이에 링커를 포함하는, 표지된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 포함하는 키트에 관한 것으로, 여기서 링커는 화학식 (I), (II) 또는 (III) 중 어느 하나의 구조, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0024] 본 명세서에 개시된 몇몇 실시형태는 형광단과 링커를 포함하는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 변형시키기 위한 시약에 관한 것으로, 여기서 링커는 화학식 (I), (II) 또는 (III) 중 어느 하나의 구조, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0025] 본 명세서에 개시된 몇몇 실시형태는 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입된 뉴클레오사이드를 검출하기 위한 방법에 관한 것으로, 해당 방법은 (a) 링커를 포함하는 표지된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입시키는 단계; 및 (b) 단계 (a)에서 혼입된 상기 표지된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드로부터 형광 신호를 검출하는 단계를 포함하되, 여기서 링커는 화학식 (I), (II) 또는 (III) 중 어느 하나의 구조, 또는 이들의 조합을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 상기 방법은 주형 핵산 가닥 및 부분적으로 혼성화된 핵산 가닥을 제공하는 단계를 더 포함하되, 단계 (a)는 주형 가닥의 대응하는 위치에서 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 상보적인 적어도 하나의 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 혼성화된 핵산 가닥 내로 혼입시키고, 그리고 단계 (b)는 혼입된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 염기를 확인함으로써, 주형 가닥의 상보적인 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 동질성(identity)을 나타낸다.

[0026] 본 명세서에 개시된 몇몇 실시형태는 주형 핵산 분자를 서열분석하는 방법에 관한 것으로서, 해당 방법은 주형 핵산에 상보적인 핵산의 가닥 내로 하나 이상의 표지된 뉴클레오타이드를 혼입시키는 단계; 주형 핵산 분자의 서열을 결정하기 위하여 하나 이상의 혼입된 표지된 뉴클레오타이드에 존재하는 염기의 동질성을 결정하는 단계를 포함하되; 하나 이상의 표지된 뉴클레오타이드에 존재하는 염기의 동질성은 표지된 뉴클레오타이드에 의해 생성된 형광 신호를 검출함으로써 결정되고; 그리고 적어도 하나의 혼입된 표지된 뉴클레오타이드는 위에서 기재된 바와 같은 링커를 포함하며, 여기서 링커는 화학식 (I), (II) 또는 (III) 중 어느 하나의 구조, 또는 이들의 조합을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 하나 이상의 뉴클레오타이드에 존재하는 염기의 동질성은 각 뉴클레오타이드 혼입 단계 후에 결정된다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1a는 표준 표지된 뉴클레오타이드의 부분 연결기 구조를 예시한 도면.

도 1b는 2개의 가능한 링커(125 및 130)가 도 1a의 표준 연결기 내로 삽입되는 상태의 도 1a의 표지된 뉴클레오타이드를 예시한 도면;

도 2는 도 1a의 표지된 뉴클레오타이드 및 도 1b의 변형된 표지된 뉴클레오타이드를 이용하는 뉴클레오타이드 혼입물의 플롯을 입증하는 도면.

도 3A 내지 도 3E는 도 1a의 표준 연결기 내로 삽입될 추가의 링커의 구조식을 예시한 도면.

도 4는 서열분석 품질에 대한 도 1b의 삽입물(125) 및 도 3B의 삽입물(315)의 효과를 평가하기 위하여 사용되는 두 염료 서열분석 실행의 데이터 표를 나타낸 도면.

도 5A 및 도 5B는 링커 삽입물(125 및 315)을 이용하는 도 4의 서열분석 실행의 판독치 1에 대한 에러율의 플롯 및 판독치 2에 대한 에러율의 플롯.

도 6은 서열분석 품질에 대한 도 1b의 삽입물(125) 및 도 3A의 삽입물(310)의 효과를 평가하기 위하여 사용되는 서열분석 실행의 데이터 표를 나타낸 도면.

도 7A 및 도 7B는 링커 삽입물(125)을 이용하는 도 6의 서열분석 실행의 판독치 1에 대한 에러율의 플롯 및 판독치 2에 대한 에러율의 플롯.

도 8A는 표준 LN₃ 링커 구조의 일례를 도시한 도면.

도 8B, 도 8C 및 도 8D는 도 8A의 LN₃ 링커의 변형된 구조의 3가지 예를 나타낸 도면.

도 8E는 도 8D의 링커 내로 보호 모이어티의 삽입을 예시한 도면.

도 9a는 SS-링커를 가진 ffa 내의 불순물의 존재를 나타낸 크로마토그램. 도 9b는 SS-링커 및 AEDI-링커를 가진 ffa의 안정성을 비교한 표. 도 9c는 22시간 동안 IMX 60° 내의 SS-링커 및 AEDI-링커의 비교를 도시한 크로마토그램으로, SS 링커를 가진 불순물을 제거 도시하는 도면.

도 10a, 도 10b 및 도 10c는 링커 변화를 지닌 용액 중 뉴클레오타이드 혼입 속도의 예기치 않은 증가를 도시한 도면. 도 10a는 1 μM에서의 혼입물을 도시한 그래프이고, 도 10b는 표로 만든 결과를 도시한 도면. 도 10c는

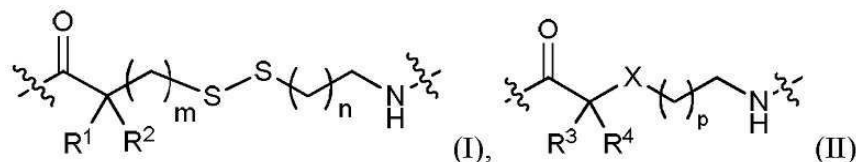
NR550S0를 가진 AEDI 및 SS 링커를 개략적으로 도시한 도면.

도 11a는 상이한 A-550S0(동일 농도)를 가진 V10에 대한 산란 플롯을 도시한 도면. 도 11b는 용액 중 Kcat FFA 링커를 도시한 도면.

도 12A 및 도 12B는 M111, 인간(Human)550, 2x151 사이클에 대한 서열분석 매트릭스를 나타낸 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 명세서에 개시된 몇몇 실시형태는 링커를 통해서 형광단에 공유 부착된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 관한 것으로, 여기서 링커는 이하의 화학식 (I) 또는 (II)의 구조, 또는 둘 다의 조합을 포함하고, 변수의 정의는 위에서 정의되어 있다:



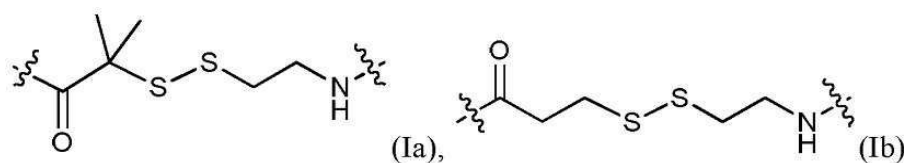
화학식 (I)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, R^1 은 수소이다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, R^1 은 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, R^1 은 메틸이다.

화학식 (I)의 본 명세서에 기재된 바와 같은 R^1 의 임의의 실시형태에 있어서, R^2 는 수소이다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, R^2 은 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, R^2 는 메틸이다. 일 실시형태에 있어서, R^1 및 R^2 둘 다는 메틸이다. 다른 실시형태에 있어서, R^1 및 R^2 둘 다는 수소이다.

화학식 (I)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, m 은 0이다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, m 은 1이다.

화학식 (I)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, n 은 1이다.

화학식 (I)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, 화학식 (I)의 구조는 또한 하기 화학식 (Ia) 또는 (Ib)로 표시될 수 있다:



본 명세서에 기재된 몇몇 실시형태에 있어서, 화학식 (Ia)는 "AEDI"로 지칭되고, 화학식 (Ib)는 "SS"로 지칭된다.

화학식 (II)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, R^3 은 수소이다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, R^3 은 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, R^3 은 메틸이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R^3 은 $-NR^5-C(=O)R^6$ 이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, R^5 는 수소이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, R^6 은 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, 예를 들어, 메틸이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R^3 은 $-NR^7-C(=O)OR^8$ 이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, R^7 은 수소이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, R^8 은 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, 예를 들어, t -뷰틸이다.

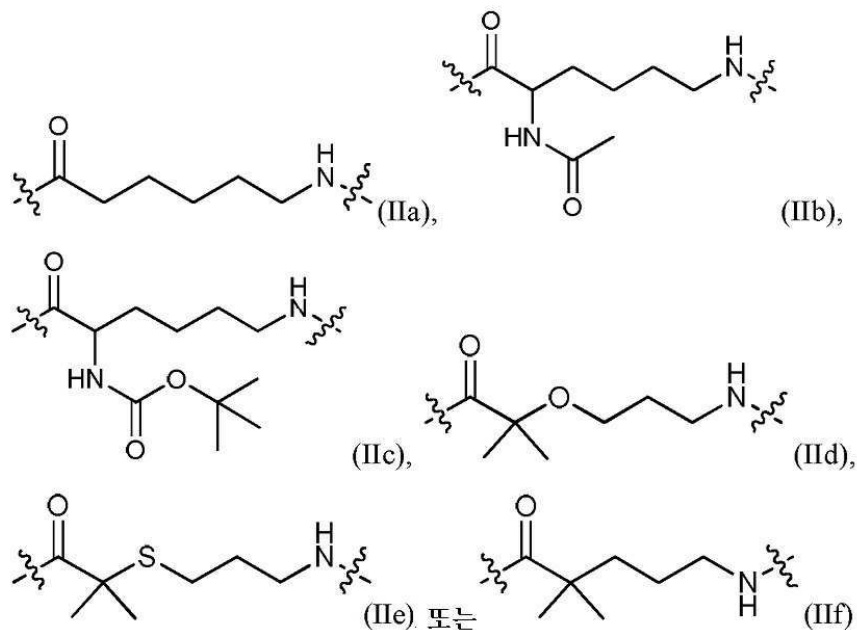
화학식 (II)의 본 명세서에 기재된 바와 같은 R^3 의 임의의 실시형태에 있어서, R^4 는 수소이다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, R^4 는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, R^4 는 메틸이다. 일 실시형태에 있어서, R^3 및 R^4 둘 다는 메틸이다. 다른 실시형태에 있어서, R^3 및 R^4 둘 다는 수소이다. 일 실시형태에

있어서, R^3 은 $-NH(C=O)CH_3$ 이고, R^4 는 수소이다. 다른 실시형태에 있어서, R^3 은 $-NH(C=O)O^tBu(Boc)$ 이고, R^4 는 수소이다.

[0039] 화학식 (II)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, X는 선택적으로 치환될 수 있는 메틸렌이다. 다른 실시형태에 있어서, X는 산소(O)이다. 또 다른 실시형태에 있어서, X는 황(S)이다.

[0040] 화학식 (II)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, p는 1이다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, p는 2이다.

[0041] 화학식 (II)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, 화학식 (II)의 구조는 또한 하기 화학식 (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe) 또는 (IIf)로 표시될 수 있다:

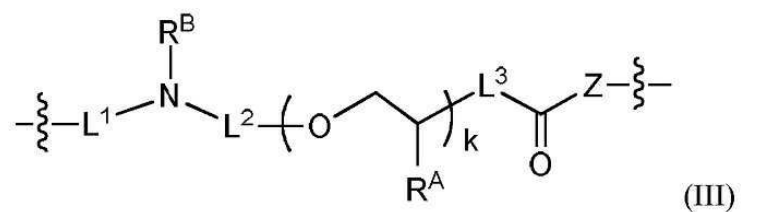


[0042]

[0043] 본 명세서에 기재된 몇몇 실시형태에 있어서, 화학식 (IIa)는 "ACA"로 지칭되고, 화학식 (IIb)는 "AcLys"로 지칭되며, 화학식 (IIc)는 "BocLys"로 지칭되고, 화학식 (IId)는 "dMeO"로 지칭되며, 화학식 (IIe)는 "dMeS"로 지칭되고, 화학식 (IIf)는 "DMP"로 지칭된다.

[0044] 본 명세서에 기재된 바와 같은 화학식 (I) 또는 (II)의 구조를 포함하는 링커를 통한 형광단 표지된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 임의의 실시형태에 있어서, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드는 링커의 좌측에, 직접 또는 추가의 연결 모이어티를 통해서 부착될 수 있다.

[0045] 본 명세서에 개시된 몇몇 실시형태는 링커를 통해서 형광단에 공유 부착된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 관한 것으로, 상기 링커는 하기 화학식 (III)의 구조를 포함하고, 변수의 정의는 위에서 정의되어 있다:

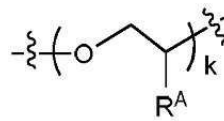


[0046]

[0047] 화학식 (III)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, L^1 은 존재하지 않는다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, L^1 은 화학식 (I) 또는 (II), 특히 화학식 (Ia), (Ib), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe) 또는 (IIf)의 구조를 포함하는 위에서 기재된 링커이다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, L^1 은 DNA 손상으로부터 보호하는 분자를 포함하는 보호 모이어티일 수 있다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, 보호 모이어티는 트롤록스(Trolox), 갈산, p-나이트로-벤질(pNB), 또는 아스코르베이트, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0048] 화학식 (III)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, L^2 는 선택적으로 치환된 C_{1-20} 알킬렌이다. 몇몇 추가의 실시형

태에 있어서, L^2 는 선택적으로 치환된 C_{4-10} 알킬렌이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, L^2 는 헵틸렌이다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, L^2 는 선택적으로 치환된 C_{1-20} 헤테로알킬렌이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, 선택적으로 치환된 C_{1-20} 헤테로알킬렌은 1개 이상의 질소 원자를 포함한다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, C_{1-20} 헤테로알킬렌 중 탄소 원자들 중 적어도 하나는 옥소(=O)로 치환된다. 몇몇 추가의 실시형태에 있어서, L^2 는 선택적으로 치환된 C_{3-6} 헤테로알킬렌이다. 몇몇 실시형태에 있어서, L^2 에는 치환된 방향족 기, 예컨대, 치환된 C_{6-10} 아릴기, 또는 1 내지 3개의 헤테로원자를 포함하는 5 내지 10원 치환된 헤테로아릴기가 개재되어 있다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, L^2 에는 치환된 페닐기가 개재되어 있다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, 페닐기는 나이트로, 사이아노, 할로, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬, C_{1-6} 할로알콕시 또는 설폰일 하이드록사이드로부터 선택된 1개 이상(4개까지)의 치환기로 치환된다. 몇몇 추가의 이러한 실시형태에 있어서, 페닐기는 나이트로, 사이아노, 할로 또는 설폰일 하이드록사이드(즉, $-S(=O)_2OH$)로부터 선택된 1 내지 4개의 치환기로 치환된다.

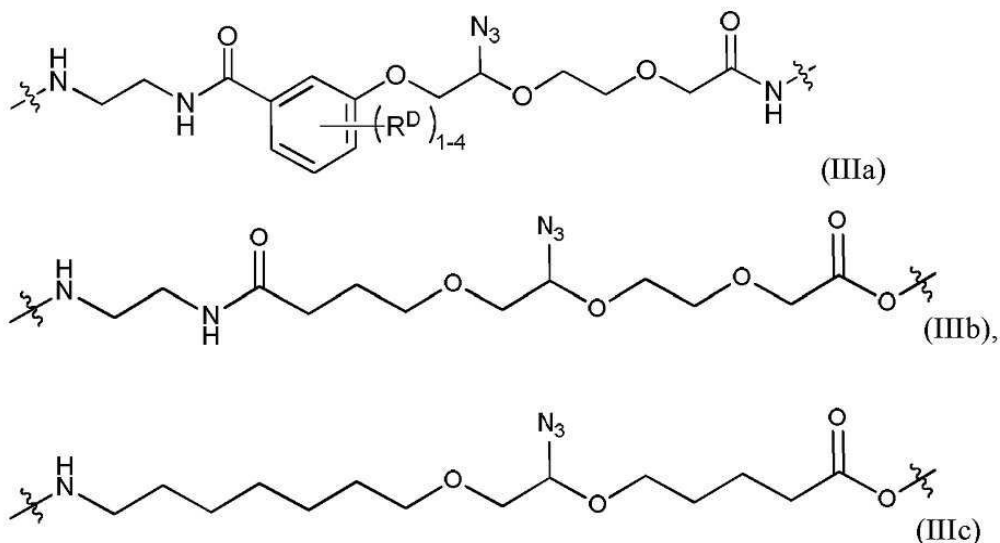


[0049] 화학식 (III)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, R^A 는 수소 또는 아지도로부터 선택된다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, k 는 2이고 하나의 R^A 는 아지도이고 다른 하나는 수소이다.

[0050] 화학식 (III)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, L^3 는 선택적으로 치환된 C_{1-20} 알킬렌이다. 몇몇 추가의 실시형태에 있어서, L^3 는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬렌이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, L^3 는 에틸렌이다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, L^3 는 선택적으로 치환된 C_{1-20} 헤테로알킬렌이다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, 선택적으로 치환된 C_{1-20} 헤테로알킬렌은 1개 이상의 산소 원자를 포함한다. 몇몇 이러한 실시형태에 있어서, L^1 는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬렌 옥사이드, 예를 들어, C_{1-3} 알킬렌 옥사이드이다.

[0051] 화학식 (III)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, R^B 는 수소이다. 몇몇 실시형태에 있어서, R^C 는 수소이다. 몇몇 추가의 실시형태에 있어서, R^B 및 R^C 둘 다는 수소이다.

[0052] 화학식 (III)의 구조의 몇몇 실시형태에 있어서, 화학식 (III)의 구조는 또한 하기 화학식 (IIIa), (IIIb) 또는 (IIIc)로 표시될 수 있다:



[0053]

- [0054] 식 중, R^D 는 나이트로, 사이아노, 할로, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, C_{1-6} 할로알킬, C_{1-6} 할로알콕시 또는 설폰일 하이드록사이드로부터 선택된다. 몇몇 추가의 실시형태에 있어서, R^D 는 나이트로, 사이아노, 할로 또는 설폰일 하이드록사이드로부터 선택된다.
- [0055] 본 명세서에 기재된 바와 같은 화학식 (III)의 구조를 포함하는 링커를 통한 형광단 표지된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 임의의 실시형태에 있어서, 형광단은 링커의 좌측에, 직접 또는 추가의 연결 모이어티를 통해서 부착될 수 있다.
- [0056] 화학식 (I), (II) 또는 (III)의 구조를 포함하는 링커에 관하여 본 명세서에 기재된 임의의 실시형태에 있어서, 용어 "선택적으로 치환된"이 변수를 정의하도록 사용된 경우, 그러한 변수는 비치환되어 있을 수 있다.
- [0057] 정의
- [0058] 달리 규정되지 않는 한, 본 명세서에서 이용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자가 통상적으로 이해하고 있는 것과 동일한 의미를 지닌다. 용어 "포함하는(including)"뿐만 아니라 "포함하다(include)", "포함하다(includes)" 및 "포함된(included)" 등과 같은 기타 형태의 이용은 제한적이지 않다. 용어 "가지는(having)"뿐만 아니라, "가지다(have)", "가진(has)" 및 "가졌다(had)" 등과 같은 기타 형태의 이용은 제한적이지 않다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 과도적 어구에서든 또는 청구범위의 내용에서든, 용어 "포함하다(comprise(s))" 및 "포함하는(comprising)"은 제약을 두지 않는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 한다. 즉, 상기 용어는 어구 "적어도 가지는" 또는 "적어도 포함하는"과 동의어로 해석되어야 한다. 예를 들어, 방법의 맥락에서 이용될 경우, 용어 "포함하는"은 그 방법이 적어도 언급된 단계들을 포함하지만, 추가의 단계들을 포함할 수도 있는 것을 의미한다. 화합물, 조성물 또는 장치의 맥락에서 이용될 경우, 용어 "포함하는"은, 그 화합물, 조성물 또는 장치가 적어도 언급된 특성부들 또는 요소들을 포함하지만, 추가의 특성부들 또는 요소들을 포함할 수도 있는 것을 의미한다.
- [0059] 본 명세서에서 이용되는 부문의 제목은 단지 조직화의 목적을 위한 것일 뿐, 기술된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0060] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 유기 화학 약어는 다음과 같이 정의된다:
- | | | |
|--------|-------------------|------------------------------------|
| [0061] | Ac | 아세틸 |
| [0062] | Ac ₂ O | 무수 아세트산 |
| [0063] | aq. | 수성 |
| [0064] | Bn | 벤질 |
| [0065] | Bz | 벤조일 |
| [0066] | BOC 또는 Boc | tert-부톡시카보닐 |
| [0067] | Bu | n-부틸 |
| [0068] | cat. | 촉매 |
| [0069] | °C | 섭씨온도 |
| [0070] | CHAPS | 3-[(3-콜라미도프로필)다이메틸암모니오]-1-프로판설포네이트 |
| [0071] | dATP | 데옥시아데노신 트라이포스페이트 |
| [0072] | dCTP | 데옥시시티딘 트라이포스페이트 |
| [0073] | dGTP | 데옥시구아노신 트라이포스페이트 |
| [0074] | dTTP | 데옥시티미딘 트라이포스페이트 |
| [0075] | ddNTP(s) | 다이데옥시뉴클레오타이드(들) |
| [0076] | DCM | 염화메틸렌 |

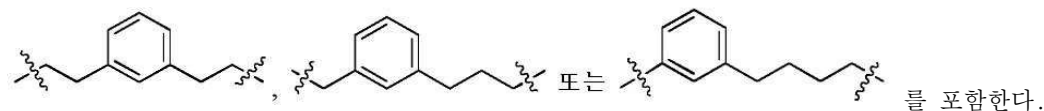
[0077]	DMA	다이메틸아세트아마이드
[0078]	DMAP	4-다이메틸아미노피리딘
[0079]	DMF	N,N'-다이메틸폼아마이드
[0080]	DMSO	다이메틸설펍사이드
[0081]	DSC	N,N'-다이숙신이미딜 카보네이트
[0082]	EDTA	에틸렌 다이아민 테트라-아세트산
[0083]	Et	에틸
[0084]	EtOAc	에틸 아세테이트
[0085]	ffN	완전 작용성 뉴클레오타이드
[0086]	ffa	완전 작용화된 아데노신 뉴클레오타이드
[0087]	g	그램(들)
[0088]	GPC	겔 침투 크로마토그래피
[0089]	h 또는 hr	시간(들)
[0090]	후니그의 염기(Hunig's base)	N,N-다이아이소프로필에틸아민
[0091]	iPr	아이소프로필
[0092]	KPi	pH 7.0에서의 10mM 인산칼륨 완충액
[0093]	IPA	아이소프로필 알코올
[0094]	LCMS	액체 크로마토그래피-질량 분광법
[0095]	LDA	리튬 다이아이소프로필아마이드
[0096]	m 또는 min	분(들)
[0097]	MeCN	아세토나이트릴
[0098]	mℓ	밀리리터(들)
[0099]	PEG	폴리에틸렌 글리콜
[0100]	PG	보호기
[0101]	Ph	페닐
[0102]	pNB	p-나이트로-벤질
[0103]	ppt	석출물
[0104]	rt	실온
[0105]	SBS	합성에 의한 서열분석
[0106]	-S(O) ₂ OH 설폰닐	하이드록사이드
[0107]	TEA	트라이에틸아민
[0108]	TEAB	테트라에틸암모늄 브로마이드
[0109]	TFA	트라이플루오로아세트산
[0110]	Tert, t 3차(또는 3급)	
[0111]	THF	테트라하이드로퓨란

- [0112] TLC 박층 크로마토그래피
- [0113] TSTU O-(N-숙신이미딜)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트
- [0114] $\mu\ell$ 마이크로리터(들)
- [0115] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 용어 "어레이"는 상이한 프로브 분자가 상대적인 위치에 따라서 서로 구별될 수 있도록 하나 이상의 기재에 부착된 상이한 프로브 분자의 집단을 지칭한다. 어레이는 기재(substrate) 상의 상이한 접근 가능한 위치에서 각각 위치된 상이한 프로브 분자를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 어레이는 상이한 프로브 분자를 각각 보유하는 별개의 기재를 포함할 수 있고, 여기서 상이한 프로브 분자는 액체 중 기재의 위치에 따라서 또는 기재가 부착된 기재 상의 기재의 위치에 따라서 식별될 수 있다. 별개의 기재가 표면 상에 위치된 예시적인 어레이는, 제한 없이, 예를 들어, 미국 특허 제6,355,431 B1호, 제US 2002/0102578호 및 PCT 공개 제WO 00/63437호에 기재된 웰 내 비드를 포함하는 것들을 포함한다. 예를 들어, FACS(fluorescent activated cell sorter) 등과 같이, 미세유체 장치를 이용해서 액체 어레이 내 비드를 구별하기 위하여 본 발명에서 이용될 수 있는 예시적인 형태는, 예를 들어, 미국 특허 제6,524,793호에 기재되어 있다. 본 발명에서 이용될 수 있는 어레이의 추가의 예는, 제한 없이, 미국 특허 제5,429,807호; 제5,436,327호; 제5,561,071호; 제5,583,211호; 제5,658,734호; 제5,837,858호; 제5,874,219호; 제5,919,523호; 제6,136,269호; 제6,287,768호; 제6,287,776호; 제6,288,220호; 제6,297,006호; 제6,291,193호; 제6,346,413호; 제6,416,949호; 제6,482,591호; 제6,514,751호 및 제6,610,482호; 및 제WO 93/17126호; 제WO 95/11995호; 제WO 95/35505호; 제EP 742 287호; 및 제EP 799 897호에 기재된 것들을 포함한다.
- [0116] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 용어 "공유 부착된" 또는 "공유 결합된"이란 원자들 간의 전자 쌍의 공유를 특징으로 하는 화학적 결합의 형성을 지칭한다. 예를 들어, 공유 부착된 중합체 코팅은, 기타 수단, 예를 들어, 접착 또는 정전기 상호작용을 통해서 표면에 부착된 것에 비해서, 기재의 작용화된 표면을 이용해서 화학 결합을 형성하는 중합체 코팅을 지칭한다. 표면에 공유 부착된 중합체가 공유 부착에 부가해서 수단을 통해서 또한 결합될 수 있는 것을 알 수 있을 것이다.
- [0117] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "C_a 내지 C_b" 또는 "C_{a-b}"(여기서 "a" 및 "b"는 정수임)는 그 특정 기 내의 탄소 원자의 수를 지칭한다. 즉, 당해 기는 "a" 내지 "b"(양끝 모두 포함)개의 탄소 원자를 함유할 수 있다, 따라서, 예를 들어, "C₁ 내지 C₄ 알킬" 또는 "C₁₋₄ 알킬"기는 CH₃-, CH₃CH₂-, CH₃CH₂CH₂-, (CH₃)₂CH-, CH₃CH₂CH₂CH₂-, CH₃CH₂CH(CH₃)- 및 (CH₃)₃C-인 1 내지 4개의 탄소를 가진 모든 알킬기를 지칭한다.
- [0118] 용어 "할로젠" 또는 "할로"는, 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 주기율표의 제7족의 방사성-안정 원자들 중 임의의 하나, 예컨대, 플루오린, 염소, 브로민 또는 요오드를 의미하고, 플루오린 및 염소가 바람직하다.
- [0119] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "알킬"이란 완전 포화된(즉, 이중 혹은 삼중 결합을 함유하지 않는) 직쇄 또는 분지쇄의 탄화수소 사슬을 지칭한다. 알킬기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다(이것이 본 명세서에 출현할 때는 언제든지, "1 내지 20" 등과 같은 수치 범위는 종점을 포함하는 주어진 범위 내의 각 정수를 지칭하며; 예컨대, "1 내지 20개의 탄소 원자"는 알킬기가 1개의 탄소 원자, 2개의 탄소 원자, 3개의 탄소 원자, 등등, 20개까지를 포함하는 탄소 원자로 이루어질 수 있는 것을 의미하지만, 본 정의는 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "알킬"의 경우도 커버한다). 알킬기는 1 내지 9개의 탄소 원자를 가진 중간 크기의 알킬일 수도 있다. 알킬기는 또한 1 내지 4개의 탄소 원자를 가진 저급 알킬일 수도 있었다. 알킬기는 "C₁₋₄ 알킬" 또는 유사한 표시로서 지칭될 수 있다. 단지 예로서, "C₁₋₄ 알킬"은 알킬 사슬 내에 1 내지 4개의 탄소 원자가 있는 것을 나타내며, 즉, 알킬 사슬은 메틸, 에틸, 프로필, 아이소-프로필, n-뷰틸, 아이소-뷰틸, sec-뷰틸 및 t-뷰틸로 이루어진 군으로부터 선택된다. 전형적인 알킬기는, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 뷰틸, 아이소뷰틸, 3차뷰틸, 펜틸, 헥실 등을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 알킬기는 치환되거나 비치환될 수 있다.
- [0120] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "알콕시"는 화학식 -OR(여기서 R은 위에서 정의된 바와 같은 알킬임)을 지칭하며, 예컨대 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 1-메틸에톡시(아이소프로폭시), n-뷰톡시, 아이소-뷰톡시, sec-뷰톡시 및 tert-뷰톡시 등을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌, "C₁₋₉ 알콕시"이다.
- [0121] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "헤테로알킬"은, 사슬 골격에, 질소, 산소 및 황을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌, 탄소 이외의 원소인 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄의 탄화수소 사슬을 지칭한다. 헤테로알킬기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 이 정의는 수치 범위가 지정되지 않은

경우 용어 "헤테로알킬"의 경우를 또한 포함한다. 헤테로알킬기는 또한 1 내지 9개의 탄소 원자를 가진 중간 크기의 헤테로알킬일 수 있다. 헤테로알킬기는 또한 1 내지 4개의 탄소 원자를 가진 저급 헤테로알킬일 수 있었다. 헤테로알킬기는 " C_{1-4} 헤테로알킬" 또는 유사한 명칭으로서 표기될 수 있다. 헤테로알킬기는 1개 이상의 헤테로원자를 함유할 수 있다. 단지 예로서, " C_{1-4} 헤테로알킬"은 헤테로알킬 사슬 내에 1 내지 4개의 탄소 원자와, 사슬의 골격 내에 추가로 1개 이상의 헤테로원자가 있는 것을 나타낸다.

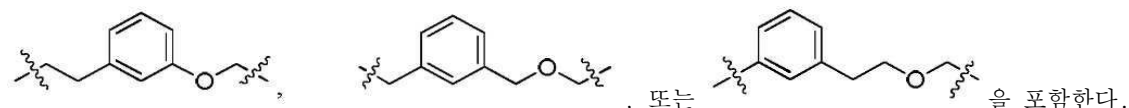
[0122]

본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "알킬렌"은 두 부착점을 통해서 분자의 나머지에 부착된 탄소와 수소만을 함유하는 분지쇄 또는 직쇄의 완전 포화된 다이-라디칼(즉, 알칸다이일)을 의미한다. 알킬렌기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 이 정의는 수치 범위가 지정되지 않은 경우 용어 알킬렌의 경우를 또한 포함한다. 알킬렌기는 또한 1 내지 9개의 탄소 원자를 가진 중간 크기의 알킬렌일 수 있다. 알킬렌기는 또한 1 내지 4개의 탄소 원자를 가진 저급 알킬렌일 수도 있었다. 알킬렌기는 " C_{1-4} 알킬렌" 또는 유사한 명칭으로서 표기될 수 있다. 단지 예로서, " C_{1-4} 알킬렌"은 알킬렌 사슬 내에 1 내지 4개의 탄소 원자가 있는 것을 의미하며, 즉, 알킬렌 사슬은 메틸렌, 에틸렌, 에탄-1,1-다이일, 프로필렌, 프로판-1,1-다이일, 프로판-2,2-다이일, 1-메틸-에틸렌, 뷰틸렌, 부탄-1,1-다이일, 부탄-2,2-다이일, 2-메틸-프로판-1,1-다이일, 1-메틸-프로필렌, 2-메틸-프로필렌, 1,1-다이메틸-에틸렌, 1,2-다이메틸-에틸렌, 및 1-에틸-에틸렌으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 알킬렌에 방향족기가 개재되어 있을 경우, 이것은 알킬렌 사슬의 하나의 탄소-탄소결합 사이의 방향족기의 2개의 부착점을 통한 삽입 또는 알킬렌 사슬의 하나의 말단에 하나의 부착점을 통한 방향족기의 부착을 지칭한다. 예를 들어, n-뷰틸렌에 페닐기가 개재되어 있을 경우, 예시적인 구조는



[0123]

본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 용어 "헤테로알킬렌"은 알킬렌 중의 하나 이상의 골격 원자가 탄소 이외의 원자, 예컨대, 산소, 질소, 황, 인 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 알킬렌 사슬을 지칭한다. 헤테로알킬렌 사슬은 2 내지 20,000의 길이를 가질 수 있다. 예시적인 헤테로알킬렌은, $-OCH_2-$, $-OCH(CH_3)-$, $-OC(CH_3)_2-$, $-OCH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)O-$, $-CH_2OCH_2-$, $-CH_2OCH_2CH_2-$, $-SCH_2-$, $-SCH(CH_3)-$, $-SC(CH_3)_2-$, $-SCH_2CH_2-$, $-CH_2SCH_2CH_2-$, $-NHCH_2-$, $-NHCH(CH_3)-$, $-NHC(CH_3)_2-$, $-NHCH_2CH_2-$, $-CH_2NHCH_2-$, $-CH_2NHCH_2CH_2-$ 등을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 헤테로알킬렌에 방향족기가 개재되어 있을 경우, 이것은 헤테로알킬렌 사슬의 하나의 탄소-탄소결합 또는 탄소-헤테로원자 결합 사이의 방향족기의 2개의 부착점을 통한 삽입 또는 헤테로알킬렌 사슬의 하나의 말단에 하나의 부착점을 통한 방향족기의 부착을 지칭한다. 예를 들어, n-프로필렌 옥사이드에 페닐기가 개재되어 있을 경우, 예시적인 구조는



[0124]

본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "알켄일"은 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 사슬에 하나 이상의 이중 결합을 포함하는 알킬기를 지칭한다. 알켄일기는 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0125]

본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "알킨일"은 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 사슬에 하나 이상의 삼중 결합을 포함하는 알킬기를 지칭한다. 알킨일기는 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0126]

본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "사이클로알킬"이란 완전히 포화된(이중 혹은 삼중 결합이 없는) 단환식 또는 다환식 탄화수소 고리계를 지칭한다. 2개 이상의 고리로 구성된 경우, 그 고리들은 융합된(즉, 축합된) 형태로 함께 접합될 수 있다. 사이클로알킬기는 고리(들) 내에 3 내지 10개의 원자를 함유할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 사이클로알킬기는 고리(들) 내에 3 내지 8개의 원자를 함유할 수 있다. 사이클로알킬기는 치환되거나 비치환될 수 있다. 전형적인 사이클로알킬기는, 사이클로프로필, 사이클로뷰틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸 및 사이클로옥틸을 포함하지만 이들로 결코 제한되는 것은 아니다.

[0127]

용어 "방향족"은 접합된 파이 전자 시스템을 가진 고리 또는 고리계를 지칭하며, 탄소환식 방향족기(예컨대, 페닐)와 복소환식 방향족기(예컨대, 피리딘) 둘 다를 포함한다. 이 용어는, 전체 고리계가 방향족이라는 조건 하에, 단환식 또는 다환식(즉, 인접하는 원자의 쌍을 공유하는 고리)기를 포함한다.

- [0128] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "아릴"은 고리 골격 내에 탄소만을 함유하는 방향족 고리 또는 고리계(즉, 두 인접한 탄소 원자를 공유하는 2개 이상의 융합된 고리)를 지칭한다. 아릴이 고리계인 경우 당해 계 내의 모든 고리는 방향족이다. 아릴기는 6 내지 18개의 탄소 원자를 가질 수 있지만, 이 정의는 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "아릴"의 경우를 또한 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 아릴기는 6 내지 10개의 탄소 원자를 갖는다. 아릴기는 "C₆₋₁₀ 아릴," "C₆ 또는 C₁₀ 아릴" 또는 유사한 명칭으로서 표기될 수 있다. 아릴기의 예는, 페닐, 나프틸, 아줄렌일 및 아트라센일을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0129] "아르알킬" 또는 "아릴알킬"은, 치환기로서, 알킬렌기를 통해서 연결된 아릴기, 예컨대, 벤질, 2-페닐에틸, 3-페닐프로필 및 나프틸알킬을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌, "C₇₋₁₄ 아르알킬" 등이다. 몇몇 경우에, 알킬렌기는 저급 알킬렌기(즉, C₁₋₄ 알킬렌기)이다.
- [0130] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "헤테로아릴"은, 고리 골격에, 질소, 산소 및 황을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌, 탄소 이외의 원소인 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 방향족 고리 또는 고리계(즉, 두 인접한 원자를 공유하는 2개 이상의 융합된 고리)를 지칭한다. 헤테로아릴이 고리계인 경우, 계 내 모든 고리는 방향족이다. 헤테로아릴기는 5 내지 18개의 고리 구성원(ring member)(즉, 탄소 원자와 헤테로원자를 포함하는, 고리 골격을 구성하는 원자의 개수)을 갖지만, 이 정의는 수치 범위가 지정되지 않은 경우 용어 "헤테로아릴"의 경우를 또한 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 헤테로아릴기는 5 내지 10개의 고리 구성원 또는 5 내지 7개의 고리 구성원을 갖는다. 헤테로아릴기는 "5-7원 헤테로아릴", "5-10원 헤테로아릴" 또는 유사한 명칭으로서 표기될 수 있다. 헤테로아릴 고리의 예는, 퓨릴, 티엔일, 프탈라진일, 피롤릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 아이소옥사졸릴, 아이소티아졸릴, 트리아아졸릴, 티아다리아아졸릴, 피리딘일, 피리다진일, 피리미딘일, 피라진일, 트리아아진일, 퀴놀린일, 아이소퀴놀린일, 벤즈이미다졸릴, 벤즈옥사졸릴, 벤조티아졸릴, 인돌릴, 아이소인돌릴 및 벤조티엔일을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0131] "헤테로아르알킬" 또는 "헤테로아릴알킬"은, 치환기로서, 알킬렌기를 통해서 연결된 헤테로아릴기이다. 그 예는 2-티엔일메틸, 3-티엔일메틸, 퓨릴메틸, 티엔일메틸, 피롤릴알킬, 피리딜알킬, 아이소옥사졸릴알킬 및 이미다졸릴알킬을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에, 알킬렌기는 저급 알킬렌기(즉, C₁₋₄ 알킬렌기)이다.
- [0132] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "사이클로알킬"은 완전 포화된 카보사이클릴 고리 또는 고리계를 의미한다. 그 예는 사이클로프로필, 사이클로뷰틸, 사이클로펜틸 및 사이클로헥실을 포함한다.
- [0133] "O-카복시"기는 "-OC(=O)R"기를 지칭하며, 여기서 R은, 본 명세서에서 정의된 바와 같은, 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴 및 5-10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다.
- [0134] "C-카복시"기는 "-C(=O)OR"를 지칭하며, 여기서 R은, 본 명세서에서 정의된 바와 같은, 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴 및 5-10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다. 비제한적인 예는 카복실(즉, -C(=O)OH)을 포함한다.
- [0135] "사이아노"기는 "-CN"기를 지칭한다.
- [0136] "아지도"기는 "-N₃"기를 지칭한다.
- [0137] "O-카바밀"기는 "-OC(=O)NR_AR_B"기를 지칭하며, 여기서 R_A 및 R_B는, 각각 독립적으로, 본 명세서에서 정의된 바와 같은, 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴 및 5-10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다.
- [0138] "N-카바밀"기는 "-N(R_A)OC(=O)R_B"기를 지칭하며, 여기서 R_A 및 R_B는, 각각 독립적으로, 본 명세서에서 정의된 바와 같은, 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴 및 5-10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다.
- [0139] "C-아미도"기는 "-C(=O)NR_AR_B"기를 지칭하며, 여기서 R_A 및 R_B는, 각각 독립적으로, 본 명세서에서 정의된 바와 같은, 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알켄일, C₂₋₆ 알킨일, C₃₋₇ 카보사이클릴, C₆₋₁₀ 아릴, 5-10원 헤테로아릴 및 5-10원

헤테로사이클릴로부터 선택된다.

[0140] "N-아미도"기는 $-N(R_A)C(=O)R_B$ 기를 지칭하며, 여기서 R_A 및 R_B 는, 각각 독립적으로, 본 명세서에서 정의된 바와 같은, 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-7} 카보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5-10원 헤테로아릴 및 5-10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다.

[0141] "아미노"기는 $-NR_AR_B$ 기를 지칭하며, 여기서 R_A 및 R_B 는, 각각 독립적으로, 본 명세서에서 정의된 바와 같은, 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, C_{3-7} 카보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5-10원 헤테로아릴 및 5-10원 헤테로사이클릴로부터 선택된다. 비제한적인 예는 유리 아미노(즉, $-NH_2$)를 포함한다.

[0142] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 용어 "트롤록스"는 6-하이드록시-2,5,7,8-테트라메틸크로만-2-카복실산을 지칭한다.

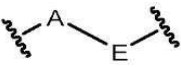
[0143] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 용어 "아스코르베이트"는 아스코르브산의 염을 지칭한다.

[0144] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 용어 "갈산"은 3,4,5-트라이하이드록시벤조산을 지칭한다.

[0145] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 치환된 기는 비치환된 모 기로부터 유도되고, 여기서 하나 이상의 수소 원자가 다른 원자 또는 기로 교체되어 있다. 달리 나타내지 않는 한, 하나의 기가 "치환된" 것으로 간주될 경우, 이것은 그 기가 하기로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 치환기로 치환된 것을 의미한다: C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알켄일, C_1-C_6 알킨일, C_1-C_6 헤테로알킬, (할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환된) C_3-C_7 카보사이클릴, (할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환된) C_3-C_7 -카보사이클릴- C_1-C_6 -알킬, (할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환된) 5-10원 헤테로사이클릴, (할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환된) 5-10원 헤테로사이클릴- C_1-C_6 -알킬, (할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환된) 아릴, (할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환된) 아릴(C_1-C_6)알킬, (할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환된) 5-10원 헤테로아릴, (할로, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알킬 및 C_1-C_6 할로알콕시로 선택적으로 치환된) 5-10원 헤테로아릴(C_1-C_6)알킬, 할로, 사이아노, 하이드록시, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 알콕시(C_1-C_6)알킬(즉, 에터), 아릴옥시, 설피드릴(머캅토), 할로(C_1-C_6)알킬(예컨대, $-CF_3$), 할로(C_1-C_6)알콕시(예컨대, $-OCF_3$), C_1-C_6 알킬티오, 아릴티오, 아미노, 아미노(C_1-C_6)알킬, 나이트로, O-카바밀, N-카바밀, O-티오카바밀, N-티오카바밀, C-아미도, N-아미도, S-설피온아미도, N-설피온아미도, C-카복시, O-카복시, 아실, 사이아나토, 아이소사이아나토, 티오사이아나토, 아이소티오사이아나토, 설피닐, 설피닐, 및 옥소(=O). 하나의 기가 "선택적으로 치환된"으로 기재된 경우에는 언제든지, 그 기는 상기 치환기로 치환될 수 있다.

[0146] 특정 라디칼 명명 규칙은 정황에 따라서 모노-라디칼 또는 다이-라디칼을 포함할 수 있는 것이 이해되어야 한다. 예를 들어, 치환기가 분자의 나머지에 2개의 부착점을 필요로 할 경우, 치환기는 다이-라디칼인 것으로 이해된다. 예를 들어, 2개의 부착점을 필요로 하는 알킬로서 확인된 치환기는 $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$ 등과 같은 다이-라디칼을 포함한다. 마찬가지로, 2개의 부착점을 필요로 하는 아미노로서 확인된 기는 $-NH-$, $-N(CH_3)-$ 등과 같은 다이-라디칼을 포함한다. 기타 라디칼 명명 규칙은 명확하게 라디칼이 "알킬렌" 또는 "알켄일렌" 등과 같은 다이-라디칼인 것을 나타낸다.

[0147] 치환기가 다이-라디칼로서 표시될(즉, 분자의 나머지에 2개의 부착점을 가질) 때는 언제든지, 그 치환기는 달리 나타내지 않는 한 임의의 방향성 입체 형태에서 부착될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 예를 들어,

$-AE-$ 또는 로서 표시되는 치환기는, A가 분자의 최우측 부착점에 부착되는 경우뿐만 아니라 A가 분자의 최좌측 부착점에 부착되도록 그 치환기가 배향되어 있는 것을 포함한다.

[0148] 본 명세서에 개시된 화합물들이 적어도 하나의 입체중심을 가질 경우, 이들은 개별의 거울상이성질체 및 부분입체이성질체로서 또는, 라세미체를 비롯하여 이러한 이성질체들의 혼합물로서 존재할 수 있다. 개별의 이성질체

의 분리, 또는 개별의 이성질체의 선택적 합성은 당업계에서의 전문가에게 충분히 공지된 각종 방법의 적용에 의해 달성된다. 달리 나타내지 않는 한, 이러한 모든 이성질체 및 이들의 혼합물은 본 명세서에 개시된 화합물의 범위에 포함된다.

[0149] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "뉴클레오타이드"는 질소 함유 헤테로사이클릭 염기, 당 및 하나 이상의 포스페이트기를 포함한다. 이들은 핵산 서열의 단량체 유닛이다. RNA에서, 당은 리보스이고, DNA에서는 데옥시리보스, 즉, 리보스에 존재하는 하이드록실기를 결여하는 당이다. 질소 함유 헤테로사이클릭 염기는 퓨린 또는 피리미딘 염기일 수 있다. 퓨린 염기는 아데닌(A) 및 구아닌(G), 및 그들의 변형된 유도체 또는 유사체를 포함한다. 피리미딘 염기는 사이토신(C), 티민(T) 및 유라실(U), 및 그들의 변형된 유도체 또는 유사체를 포함한다. 데옥시리보스의 C-1 원자는 피리미딘의 N-1 또는 퓨린의 N-9에 결합된다.

[0150] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "뉴클레오사이드"는 뉴클레오타이드와 구조적으로 유사하지만, 포스페이트 모이어티를 결여한다. 뉴클레오사이드 유사체의 예는 표지가 염기에 연결되고 당 분자에 부착된 포스페이트기가 없는 것일 것이다. 용어 "뉴클레오사이드"는, 당업자가 알고 있는 그의 통상의 의미로 본 명세서에서 이용된다. 그 예는 리보스 모이어티를 포함하는 리보뉴클레오사이드 및 데옥시리보스 모이어티를 포함하는 데옥시리보뉴클레오사이드를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 변형된 5탄당 모이어티는, 산소 원자가 탄소로 교체되고/되거나 탄소가 황 또는 산소 원자로 교체된 5탄당 모이어티이다. "뉴클레오사이드"는 치환된 염기 및/또는 당 모이어티를 가질 수 있는 단량체이다. 또한, 뉴클레오사이드는 보다 큰 DNA 및/또는 RNA 중합체 및 올리고머 내로 혼입될 수 있다.

[0151] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오타이드"는, 일반적으로, DNA(예컨대, 게놈 DNA cDNA), RNA(예컨대, mRNA), 합성 올리고뉴클레오타이드 및 합성 핵산 유사체를 포함하는 핵산에 관한 것이다. 폴리뉴클레오타이드는 천연 또는 비천연 염기, 또는 이들의 조합 및 천연 또는 비천연 골격 연결, 예컨대, 포스포로티오에이트, PNA 또는 2'-O-메틸-RNA, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0152] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 용어 "페이징"(phasing)이란, 주어진 서열분석 사이클에서 중합효소에 의해 클러스터 내의 DNA 가닥의 일부의 혼입을 완성시키는데 대한 실패 및 3' 종결자 및 형광단의 불완전한 제거로 인해 초래되는 SBS에서의 현상을 지칭한다. 프레-페이징은 유효한 3' 종결자가 없는 뉴클레오타이드의 혼입에 의해 초래되고, 그 혼입 이벤트는 1사이클을 선행한다. 페이징 및 프레-페이징은 선행하는 사이클 및 후속하는 사이클로부터의 잡음뿐만 아니라 현재 사이클의 신호로 구성되도록 특정 사이클을 위한 추출된 강도를 유발한다. 사이클 수가 증가함에 따라서, 페이징에 의해 영향을 미치는 클러스터 당 서열의 분획이 증가하여 정확한 염기의 식별화를 방해한다. 프레-페이징은 합성에 의한 서열분석(SBS) 동안 보호되지 않은 혹은 차단되지 않은 3'-OH 뉴클레오타이드의 혼적량의 존재에 의해 유발될 수 있다. 보호되지 않은 3'-OH 뉴클레오타이드는 제조 과정 동안 또는 가능하게는 보관 및 시약 취급 과정 동안 발생할 수도 있었다. 따라서, SBS 사이클 타임의 더욱 신속화, 페이징 및 프레-페이징값의 저하 및 더 긴 길이를 초래하는 뉴클레오타이드 유사체 또는 연결기의 변형은 SBS 적용의 더욱 큰 이점을 제공한다.

[0153] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 용어 "보호 모이어티"는 DNA 손상(예컨대, 광 손상 또는 기타 화학적 손상)으로부터 보호할 수 있는 분자를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 구체적인 예는 항산화제, 예컨대, 비타민 C, 비타민 E 유도체, 페놀산, 폴리페놀, 및 이들의 유도체 및 유사체를 포함한다. 특정 맥락에서, 용어 "보호 모이어티"가 정의되는 경우, 이것은 본 명세서에 기재된 바와 같은 링커의 대응하는 작용기를 지닌 보호 모이어티의 하나 이상의 작용기 사이의 반응에 기인하는 모이어티를 지칭한다. 예를 들어, 보호 모이어티가 "갈산"인 경우, 이것은 유리 카복실기를 가진 갈산 자체보다는 오히려 갈산의 에스터와 아마이드를 지칭할 수 있다.

[0154] 검출 가능한 표지

[0155] 본 명세서에 기재된 몇몇 실시형태는 통상의 검출 가능한 표지의 이용에 관한 것이다. 검출은 형광 분광법을 비롯한 임의의 적절한 방법에 의해 또는 기타 광학적 수단에 의해 수행될 수 있다. 바람직한 표지는 형광단이며, 이것은 에너지의 흡수 후, 규정된 파장에서 방사선을 방출한다. 많은 적절한 형광 표지가 공지되어 있다. 예를 들어, Welch 등(*Chem. Eur. J.* 5(3):951-960, 1999)은 본 발명에서 이용될 수 있는 단일-작용화된 형광 모이어티를 개시하고 있다. Zhu 등(*Cytometry* 28:206-211, 1997)은 본 발명에서 또한 이용될 수 있는 형광 표지 Cy3 및 Cy5의 사용을 기술하고 있다. 이용하는데 적합한 표지는 또한 Prober 등(*Science* 238:336-341, 1987); Connell 등(*BioTechniques* 5(4):342-384, 1987), Ansorge 등(*Nucl. Acids Res.* 15(11):4593-4602, 1987) 및 Smith 등(*Nature* 321:674, 1986)에 개시되어 있다. 기타 상업적으로 입수 가능한 형광 표지는, 플루오레세인

(fluorescein), 로다민(TMR, 텍사스 레드(texas red) 및 Rox를 포함함), 알렉사(alexa), 보디피(bodipy), 아크리딘(acridine), 쿠마린(coumarin), 피렌(pyrene), 벤잔트라센(benzanthracene) 및 사이아닌을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0156] 다수의 표지, 예를 들어, 바이-형광단 FRET 카세트(*Tet. Let.* 46:8867-8871, 2000)가 또한 본 출원에서 이용될 수 있다. 멀티-플루오르 수지상 시스템(Multi-fluor dendrimeric systems)(*J. Am. Chem. Soc.* 123:8101-8108, 2001)이 또한 이용될 수 있다. 형광 표지가 바람직하지만, 기타 형태의 검출 가능한 표지가 당업자에게 유용한 것은 명백할 것이다. 예를 들어, 양자점(Empodocles *et al.*, *Nature* 399:126-130, 1999), 금 나노입자(Reichert *et al.*, *Anal. Chem.* 72:6025-6029, 2000) 및 마이크로비드(Lacoste *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 97(17):9461-9466, 2000)를 비롯하여 마이크로입자가 모두 이용될 수 있다.

[0157] 다성분 표지가 또한 본 출원에서 이용될 수 있다. 다성분 표지는 검출용의 추가의 화합물과의 상호작용에 좌우되는 것이다. 생물학에서 이용되는 가장 흔한 다성분 표지는 바이오틴-스트렙타비딘 시스템이다. 바이오틴은 뉴클레오타이드 염기에 부착된 표지로서 이용된다. 스트렙타비딘은 이어서 검출이 발생할 수 있도록 별도로 첨가된다. 기타 다성분 시스템이 입수 가능하다. 예를 들어, 다이나이트로페놀은 검출에 이용될 수 있는 상업적으로 입수 가능한 형광성 항체이다.

[0158] 달리 표시되지 않는 한, 뉴클레오타이드란 언급은 또한 뉴클레오사이드에 적용 가능하도록 의도된다. 본 출원은 또한 DNA를 참고하여 더욱 기재될 것이지만, 그 설명은, 달리 표시되지 않는 한, RNA, PNA, 및 기타 핵산에도 또한 적용 가능할 것이다.

[0159] 서열분석 방법

[0160] 본 명세서에 기재된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드는 각종 서열분석 수법과 함께 이용될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 표적 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 방법은 자동화 과정일 수 있다.

[0161] 본 명세서에서 제공되는 뉴클레오타이드 유사체는 서열분석 절차, 예컨대, 합성에 의한 서열분석(SBS) 수법에서 이용될 수 있다. 간략히 말하면, SBS는 표적 핵산을 하나 이상의 표지된 뉴클레오타이드, DNA 중합효소 등과 접촉시킴으로써 개시될 수 있다. 프라이머가 표적 핵산을 주형으로서 이용해서 연장되는 이들 특성부는 검출될 수 있는 표지된 뉴클레오타이드를 혼입할 것이다. 선택적으로, 표지된 뉴클레오타이드는 일단 뉴클레오타이드가 프라이머에 부가되면 추가의 프라이머 연장을 종결시키는 가역적 종결 특성을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 가역적 종결자 모이어티를 가진 뉴클레오타이드 유사체는 프라이머에 부가될 수 있으므로, 후속의 연장은 탈블로킹제(deblocking agent)가 모이어티를 제거하도록 전달될 때까지 일어나지 않을 수 있다. 따라서, 가역적 종결을 이용하는 실시형태에 대해서, 탈블로킹 시약은 (검출이 일어나기 전 혹은 후에) 유동 세포에 전달될 수 있다. 세척은 각종 전달 단계들 사이에 일어날 수 있다. 이어서 사이클은 n개의 뉴클레오타이드만큼 프라이머를 연장시키기 위하여 n회 반복될 수 있고, 이에 따라서 서열 길이 n을 검출할 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 생성되는 어레이와 함께 이용하기에 용이하게 적합할 수 있는 예시적인 SBS 절차, 유체 시스템 및 검출 플랫폼은, 예를 들어, 문헌[Bentley *et al.*, *Nature* 456:53-59 (2008), 제WO 04/018497호; 제WO 91/06678호; 제WO 07/123744호; 미국 특허 제7,057,026호; 제7,329,492호; 제7,211,414호; 제7,315,019호 또는 제7,405,281호 및 미국 특허 출원 공개 제2008/0108082 A1호(이들 각각은 참고로 본 명세서에 편입됨)]에 기재되어 있다.

[0162] 환식 반응을 이용하는 기타 서열분석 절차, 예컨대, 파이로서열분석(pyrosequencing)이 이용될 수 있다. 파이로서열분석은 특정 뉴클레오타이드가 초기 핵산 가닥 내로 혼입됨에 따라서 무기 파이로포스페이트(PPi)의 방출을 검출한다(Ronaghi, *et al.*, *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi *et al.* *Science* 281(5375), 363 (1998); 미국 특허 제6,210,891호; 제6,258,568호; 및 제6,274,320호(이들 각각은 참고로 본 명세서에 편입된다). 파이로서열분석에서, 방출된 PPi는 ATP 선헤틸라제에 의해 아데노신 트라이포스페이트(ATP)로 전환됨으로써 검출될 수 있고, 얻어진 ATP는 루시페라제-생성 양성자를 통해서 검출될 수 있다. 이와 같이 해서, 서열분석 반응은 발광 검출 시스템을 통해서 모니터링될 수 있다. 형광 기반 검출 시스템에 이용되는 여기 방사선 공급원은 파이로서열분석 절차를 위하여 필요하지 않다. 본 발명의 어레이에 파이로서열분석의 적용을 위하여 이용될 수 있는 유용한 유체 시스템, 검출기 및 절차는, 예를 들어, 국제 특허 출원 제PCT/US11/57111호, 미국 특허 공개 제2005/0191698 A1호, 미국 특허 제7,595,883호 및 미국 특허 제7,244,559호(이들 각각은 참고로 본 명세서에 편입됨)에 기재되어 있다.

[0163] 예를 들어, 문헌[Shendure *et al.* *Science* 309:1728-1732 (2005); 미국 특허 제5,599,675호; 및 미국 특허 제5,750,341호(이들 각각은 참고로 본 명세서에 편입됨)]에 기재된 것들을 비롯한 결찰 반응에 의한 서열분석이

또한 유용하다. 몇몇 실시형태는, 예를 들어, 문헌[Bains et al., *Journal of Theoretical Biology* 135(3), 303-7 (1988); Drmanac et al., *Nature Biotechnology* 16, 54-58 (1998); Fodor et al., *Science* 251(4995), 767-773 (1995); 및 제WO 1989/10977호(이들 각각은 참고로 본 명세서에 편입됨)]에 기재된 바와 같은 혼성화에 의한 서열분석 절차를 포함할 수 있다. 결찰에 의한 서열분석 및 혼성화에 의한 서열분석 절차 둘 다에서, 겔-함유 웰(또는 다른 오목 특성부)에 존재하는 핵산에는 올리고뉴클레오타이드 전달 및 검출의 반복 사이클이 시행된다. 본 명세서에서 또는 본 명세서에 인용된 문헌에서 기재된 바와 같은 SBS 방법을 위한 유체 시스템은, 결찰에 의한 서열분석 또는 혼성화에 의한 서열분석 절차를 위한 시약 전달을 위하여 용이하게 적합화될 수 있다. 전형적으로, 올리고뉴클레오타이드는 형광 표지되고, 본 명세서에서 SBS 절차에 관하여 그리고 본 명세서에 인용된 문헌에서 기재된 것들과 유사한 형광 검출기를 이용해서 검출될 수 있다.

[0164] 몇몇 실시형태는 DNA 중합효소 활성을 실시간 모니터링하는 것을 포함하는 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 혼입은 형광단-보유 중합효소와 γ -포스페이트-표지된 뉴클레오타이드 간의 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer: FRET) 상호작용을 통해서 또는 제로모드 도광체(zeromode waveguide)를 이용해서 검출될 수 있다. FRET-기반 서열분석을 위한 수법 및 시약은, 예를 들어, 문헌[Levene et al. *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist et al. *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korlach et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008)]에 기재되어 있으며, 이 문헌의 개시내용은 참고로 본 명세서에 편입된다.

[0165] 몇몇 SBS 실시형태는 연장 산물 내로 뉴클레오타이드의 혼입 시 방출된 양성자의 검출을 포함한다. 예를 들어, 방출된 양성자의 검출에 기초한 서열분석은 이온 토렌트사(Ion Torrent)(코네티컷주의 길퍼드시에 소재, 라이프 테크놀로지스사(Life Technologies)의 자회사)로부터 상업적으로 입수 가능한 전기 검출기 및 관련된 수법, 또는 미국 특허 출원 공개 제2009/0026082 A1호; 제2009/0127589 A1호; 제2010/0137143 A1호; 또는 제2010/0282617 A1호(이들 각각은 참고로 본 명세서에 편입됨)에 기재된 서열분석 방법 및 시스템을 이용할 수 있다.

[0166] 예시적인 변형된 링커

[0167] 추가의 실시형태는 이하의 실시예에서 더욱 상세히 개시되며, 이는 결코 청구범위의 범주를 제한하도록 의도된 것은 아니다.

[0168] 도 1a는 표지된 뉴클레오타이드(100)의 부분 구조식을 예시한다. 표지된 뉴클레오타이드(100)는 완전 작용화된 아데노신 뉴클레오타이드(ffA)(110), 표준 링커 모이어티(115) 및 형광 염료(120)를 포함한다. 표준 링커 모이어티(115)는 합성에 의한 서열분석(SBS)을 위하여 표지된 뉴클레오타이드의 합성에서 전형적으로 사용되는 링커 모이어티일 수 있다. 일례에서, 형광 염료(120)는 NR550S0이다. 이 예에서, 표지된 뉴클레오타이드(100)는 "ffA-NR550S0"으로서 기재될 수 있다. 다른 예에서, 형광 염료(120)는 S07181이고 표지된 뉴클레오타이드(100)는 "ffA-S07181"로서 기재될 수 있다.

[0169] 도 1b는 표준 링커 모이어티(115)에 대해서 2가지 가능한 구조적 변형을 가진 도 1a의 표지된 뉴클레오타이드(100)를 예시한다. 일례에서, 표준 링커 모이어티(115)는 카보닐(즉, -C(=O)-)과 아미도 모이어티의 아미노(즉, -NH-) 부분 사이에 AEDI 삽입물(125)을 포함한다. 이 예에서, 변형된 표지된 뉴클레오타이드는 "ffA-AEDI-NR550S0"로서 기재될 수 있다. 다른 예에서, 표준 링커 모이어티(115)는 SS 삽입물(130)을 포함하고, 그리고 변형된 표지된 뉴클레오타이드는 "ffA-SS-NR550S0"로서 표기될 수 있다.

[0170] 도 2는 도 1a의 표지된 뉴클레오타이드(100) 및 도 1b의 변형된 표지된 뉴클레오타이드(100)를 사용하는 뉴클레오타이드 혼입물의 플롯을 도시한다. 검정은 20nM 프라이머:주형 DNA 및 30 μ g/ml 폴리메라제 812(MiSeq Kit V2), 1mM 뉴클레오타이드와 함께 40mM 에탄올아민(pH 9.8), 9mM MgCl₂, 40mM NaCl, 1mM EDTA, 0.2% CHAPS 중에서 55°C에서 수행하였다. 효소를 DNA에 결합시키고, 이어서 500mM EDTA로 반응 중지시키기 전에 짧은 시간 동안(10초까지) 퀸치 유량기(quench flow machine)에서 뉴클레오타이드와 신속하게 혼합한다. 각 뉴클레오타이드에 대해서 수개의 시점을 취한다. 생성된 샘플은 이어서 변성 겔에서 분석하고, DNA+1로 전환 중인 DNA의 퍼센트를 결정하고, 각 뉴클레오타이드에 대해서 1차 속도 상수를 결정하기 위하여 시간에 대해서 플롯한다. 데이터를 이하의 표 1에 요약한다. 데이터는 SS 삽입물(130)(ffa-SS-NR550S0)을 포함하는 표지된 뉴클레오타이드에 대한 혼입물이 표준 링커(115)(ffa-NR550S0)를 포함하는 표지된 뉴클레오타이드에 대한 혼입물에 비해서 약 2배 빨랐던 것을 나타낸다. AEDI 삽입물(125)(ffa-AEDI-NR550S0)을 포함하는 표지된 뉴클레오타이드에 대한 혼입물은 ffa-NR550S0에 대한 혼입물에 비해서 약 4배 빨랐다. 데이터는 또한 표준 링커(115) 및 형광 염료 S07181(ffa-S07181)을 포함하는 표지된 뉴클레오타이드에 대한 혼입물이 ffa-NR550S0의 혼입물에 비해서 약 4배 빨랐던 것

을 나타낸다.

표 1

ffA	K (μ M/분)
ffA-NR550S0	22 (1X)
ffA-SS-NR550S0	54 (2X)
ffA-AEDI-NR550S0	97 (4X)
ffA-S07181	99 (4X)

도 3A 내지 도 3F는 도 1a의 표준 링커 모이어티(115)에 대한 추가의 삽입물(310, 315, 320, 325, 330 및 335)에 대한 구조식을 나타낸다. ACA 삽입물(310)에서, 다이메틸 치환은 제거되고 황-황(S-S) 결합이 삽입물(125)에 비해서 탄소-탄소 결합으로 대체된다. 황-황 결합은 SBS(예컨대, 2-염료 또는 4-염료 SBS)에 대해서 필요하지 않다.

AcLys 삽입물(315)에서, 아세틸 보호된 라이신이 삽입물(125)을 대체하기 위하여 이용된다.

BocLys 삽입물(320)에서, tert-부톡시카보닐 보호된 라이신이 삽입물(125)을 대체하기 위하여 이용된다.

dMeO 삽입물(325)에서, 황-황(S-S) 결합이 삽입물(125)에 비해서 산소-탄소(O-CH₂) 결합으로 대체된다.

dMeS 삽입물(330)에서, 황-황(S-S) 결합이 삽입물(125)에 비해서 황-탄소(S-CH₂) 결합으로 대체된다.

DMP 삽입물(335)에서, 황-황(S-S) 결합이 삽입물(125)에 비해서 황-탄소(CH₂) 결합으로 대체된다.

본 명세서에 기재된 각종 예에서, 다이메틸 치환 패턴(예컨대, AEDI 삽입물(125), dMeO 삽입물(325), 및 dMeS 삽입물(330))을 포함하는 삽입물은 SBS 동안에 증가된 뉴클레오타이드 혼입률을 가진 것으로 판명되었다.

본 명세서에 기재된 각종 예에서, 삽입물에서 탄소 사슬의 길이는 또는 변화될 수 있다.

도 4는 서열분석 품질에 대한 도 1b의 삽입물(125) 및 도 3B의 삽입물(315)의 효과를 평가하기 위하여 사용되는 두 염료 서열분석 실험의 데이터 표를 나타낸다. 서열분석은 인간 550bp 주형을 가진 Miseq 혼성 플랫폼 상에서 2회 150 사이클로 시행되었다. 새로운 세트의 염료인, V10/사이안-peg4 A-AEDI550S0, V10/사이안-peg4 A-AcLys550S0, 및 V10/사이안 A-AcLys 550S0가 표준 상업적 염료 세트 V4 및 노바 플랫폼(Nova platform) V5.75의 개선된 염료 세트와 비교되었다. V10/사이안-peg4 A-AEDI550S0, V10/사이안-peg4 A-AcLys550S0 및 V10/사이안 A-AcLys 550S0 샘플의 각각에 대해서, 페이징값(Ph R1)은 AEDI 또는 AcLys 삽입물이 없는 샘플의 페이징값보다 낮았다. 따라서, 추가의 삽입물(125 및 315)을 포함하는 표지된 뉴클레오타이드는 서열분석 품질의 개선을 입증하였다.

도 5A 및 도 5B는 각각 도 4의 서열분석 실험의 판독치 1에 대한 에러율의 플롯 및 판독치 2에 대한 에러율의 플롯을 도시한다. 판독치 1에 대해서, V10/사이안-peg4 A-AEDI550S0 및 V10/사이안-peg4 A-AcLys550S0의 에러율은 삽입물이 없는 동일 세트의 염료 V10/사이안-peg4보다 낮았다. 판독치 2에 대해서, AcLys 삽입물(315)이 이용될 경우 더욱더 현저하였고, 이때 최종 에러율은 삽입물 없는 염료 세트에 비해서 30%만큼 저감되었다. 따라서, 삽입물(125 및 315)은 서열분석 품질을 상당히 개선시키는 것으로 입증되었다.

도 6은 서열분석 품질에 대한 AEDI 삽입물(125) 및 ACA 삽입물(310)의 효과를 평가하기 위하여 사용되는 서열분석 실험의 데이터 표를 나타낸다. 서열분석은 인간 550bp 주형 및 2회 150 사이클을 이용하는 Miseq 혼성 플랫폼 상에서 시행하였다. 새로운 세트의 염료인, V10/사이안-peg4 A-AEDI550S0, V10/사이안-peg4 A-ACALys550S0는, 표준 상업적 염료 세트 V4 및 개선된 염료 세트의 노바 플랫폼 V5.75와 비교되었다. 재차, V10/사이안-peg4 A-AEDI550S0 및 V10/사이안-peg4 A-ACA550S0 샘플의 각각은 AEDI 또는 ACA 삽입물이 없는 샘플에 비해서 더 낮은 페이징값(Ph R1)을 지니고, 따라서 서열분석 품질에 개선을 보였다.

도 7A 및 도 7B는 각각 도 6의 서열분석 실험의 판독치 1에 대한 에러율의 플롯 및 판독치 2에 대한 에러율의 플롯을 도시한다. 새로운 삽입물 AEDI(V10/사이안-peg4 A-AEDI550S0)를 포함하는 세트에 대한 판독치 1에 대한 에러율은, 삽입물인 V10/사이안-peg4가 없는 동일한 세트의 염료보다 더 낮았다. 삽입물 ACA(V10/사이안-peg4 ACA550S0)는 표준 V10/사이안-peg4에 대한 두 판독치에서 유사한 에러율 플롯을 제공하였다. AEDI는 서열분석 품질을 개선시킨 것을 재차 나타내었다. 이들 데이터는 또한 삽입물 자체의 구조가 서열분석 품질의 개선에 영

향을 갖는 것을 나타내었다.

- [0184] 도 8A는 표준 LN₃ 링커(800)의 구조식을 나타낸다. LN₃ 링커(800)는, 뉴클레오타이드(830)에 염료 분자(825)를 연결하기 위한 링커 구조에서 바람직할 수 있는, 제1 치환된 아미도 작용성 모이어티(810), 제2 아지도-치환된 PEG 작용성 모이어티(815) 및 제3 에스터 작용성 모이어티(820)를 포함한다. 제1 작용성 모이어티(810)는, 예를 들어, 염료 분자(825)를 LN₃ 링커(800)에 부착시키는데 이용될 수 있다. 제2 작용성 모이어티(815)는, 예를 들어, LN₃ 링커(800)로부터 염료 분자(825)를 절단하는데 이용될 수 있는 절단성 작용기일 수 있다. 제3 작용성 모이어티(820)는, 예를 들어, 뉴클레오타이드(830)를 LN₃ 링커(800)에 부착시키는데 이용될 수 있다. 도 8B는 표준 LN₃ 링커에 대한 일부 변형을 예시하며, 여기서 폐녹시 모이어티(850)는 -NO₂, -CN, 할로 또는 -SO₃H로부터 선택된 1 내지 4개의 치환기로 치환된다. 또한, 에스터 모이어티(820)는 아미도 모이어티(855)로 대체된다.
- [0185] 도 9a는 SS-링커를 가진 ffA 내의 불순물의 존재를 나타내는 그래프이다. HPLC 정제 후의 ffA-SS-NR550S0에 의하면: 불순물이 0.1M TEAB/CH₃CN 중 r.t. 하룻밤에 약간 염기성 조건(pH 8 내지 9)에서 하룻밤에 나타났다. 도 9b는 SS-링커 및 AEDI-링커를 가진 ffA의 안정성을 비교하며, AEDI-링커는 SS 링커에 비해서 상당히 개선된 안정성을 나타낸다. ffA-LN3-NR550S0은 내부 기준으로서 사용되었다. 다이설파이드 부산물: (NR550S0-S-)2. 도 9c는 22시간 동안 IMX 60° 내의 SS-링커 및 AEDI-링커의 비교를 도시하며, SS 링커를 가진 불순물을 재차 도시한다. 내부 대조군은 ffA-LN3-NR550S0이다. Di-P: 다이포스페이트.
- [0186] 도 10a, 도 10b 및 도 10c는 링커 변화를 지닌 용액 중 뉴클레오타이드 혼입 속도의 예기치 않은 증가를 도시한다. 도 10a는 1 μM에서의 혼입물을 도시한다. 그 결과는 염료와 링커가 혼입 반응속도에 대해서 상당한 효과를 지녔던 것을 나타내고, 도 10b는 혼입 반응속도에서 AEDI 링커의 유익을 명백하게 나타낸다. 도 10c는 NR550S0를 가진 AEDI 및 SS 링커를 개략적으로 도시한다.
- [0187] 도 11a는 상이한 A-550S0(동일 농도)를 가진 V10 조합에 대한 산란 플롯을 도시하고 있다. 산란 플롯은 타일 1 사이클 2에 대한 것이다. 도 11b는 용액 중 Kcat FFA 링커를 도시한다. 혼입물의 관점에서 표면 상에서, AEDI 링커는 링커를 갖지 않은 것보다 더 빠른 것을 알 수 있다: 'A'-클라우드(산란 플롯 상)는 중앙을 향하여 다소 이동하고 있다. AcLys 링커는 AEDI 및 링커를 갖지 않은 것보다 더 느리다: 'A'-클라우드는 x축을 향하여 이동하고 있다. BocLys 링커는 링커를 갖지 않은 것과 유사한 것으로 보이고 AEDI 링커보다 멀지 않은 것을 나타낸다. 용액 중에서, ACA-링커가 가장 느렸던 반면, AEDI 및 ACLys는 유사한 Kcat을 지니고, 이어서 BocLys가 그 뒤를 따르는 것을 알 수 있다.
- [0188] 도 12A 및 도 12B는 M111, 인간550, 2x151 사이클 상의 서열분석 매트릭을 도시한다. 상이한 A-550S0(동일 농도)와 조합하여 ffN을 사용한다. AEDI 및 BocLys 링커 둘 다 유사한 양호한 서열분석 결과를 부여한 것을 알 수 있다. AEDI 및 AcLys의 용액 Kcat이 유사하더라도, AEDI의 서열분석 결과는 약간 더 양호하다.
- [0189] LN₃ 링커(800)는 도 8C에 나타난 바와 같이 LN₃ 링커(800)로부터 제거될 수 있는 선택적 폐녹시 모이어티(835)를 포함한다. LN₃ 링커(800)는 또한 선택적 아미도 모이어티(840) 및 선택적 에터 모이어티(845)를 포함하며, 이들 둘 다는 도 8D에 나타난 바와 같이 LN₃ 링커(800)로부터 제거될 수 있다. 아미도 모이어티(810), 폐녹시 모이어티(835)와 같은 특정 작용기를 제거하는 목적은, 이들이, 혼입 효율을 저감시킬 수도 있는, 뉴클레오타이드 혼입 동안 효소와 부정적인 상호작용을 갖는지의 여부를 시험하기 위한 것이다.
- [0190] 도 8E는 링커 내로의 보호 모이어티(860)의 삽입 또는 첨가를 예시한다. 보호 모이어티(860)는 작용성 모이어티(810)(또는 도 8A 내지 도 8C에서 폐녹시 모이어티(835 또는 850)에 부착될 수 있음)와 염료 분자(825) 사이에 삽입된다. 보호 모이어티(860)는, 예를 들어, DNA 손상으로부터 보호하는 분자일 수 있다. 광손상 또는 다른 화학적 손상을 포함하는 DNA 손상은 SBS의 누적 효과(즉, 사이클마다) 중 하나이다. DNA 손상을 실질적으로 저감 또는 제거하는 것은 더욱 효율적인 SBS 및 더욱 긴 서열분석 관독치를 제공할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 보호 모이어티(860)는 삼중항 상태 소광제(quencher), 예컨대, 트롤록스, 갈산, 2-머캅토에탄올(BME) 등으로부터 선택될 수 있다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, 보호 모이어티(860)는 소광 또는 보호 시약, 예컨대, 4-나이트로벤질 알코올 또는 아스코르브산의 염, 예컨대, 아스코르브산나트륨으로부터 선택될 수 있다. 몇몇 다른 실시형태에 있어서, 보호제는 표지된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드와 공유 결합을 형성하기보다 오히려 완충제에 물리적으로 혼합될 수 있다. 그러나, 이 접근법은 보다 고농도의 보호제를 필요로 할 수 있고, 더 적게 효율적일 수 있다. 대안으로서, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 공유 부착된 보호 모이어티는 DNA 손상에 대한 더욱 양호한 보호를 제공할 수 있다. 도 8C, 도 8D 및 도 8E의 몇몇 추가의 실시형태에 있

어서, 에스터 모이어티(820)는 또한 아미도 모이어티(855)와 대체될 수 있고 페녹시 모이어티(835)는 더욱 치환될 수 있다.

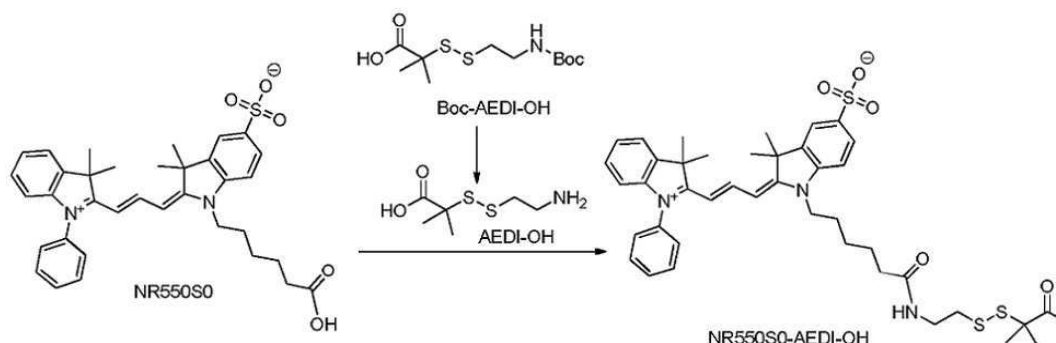
[0191] 도 8A 내지 도 8E에 나타난 예들 중 어느 것에 있어서도, 도 1b의 AEDI 삽입물(125) 및 SS 삽입물(130)과 도 3A 내지 도 3F의 삽입물(300)은, 예를 들어, 링커(800)의 염료 분자(825)와 제1 작용성 모이어티(810) 사이에 삽입될 수 있다.

[0192] 실시예

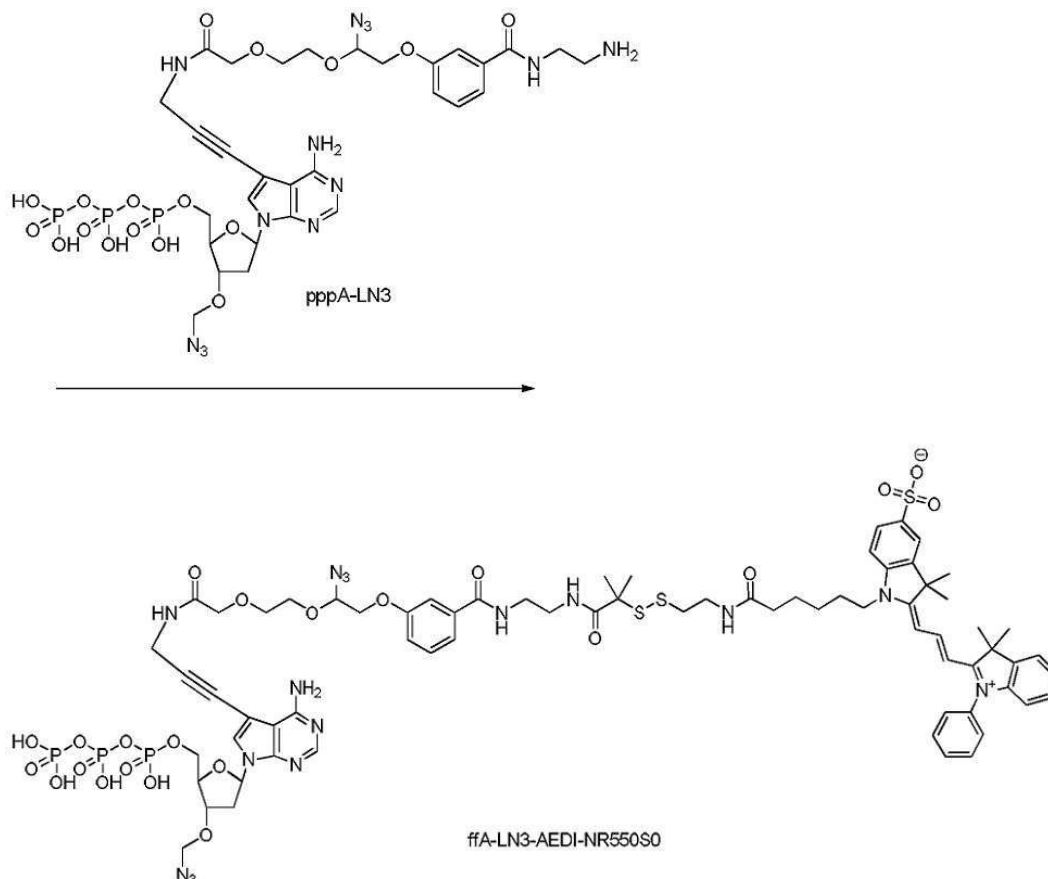
[0193] 추가의 실시형태는 이하의 실시예에서 더욱 상세히 개시되지만, 이들 실시예는 어떠한 방식으로 청구항의 범위를 제한하는 것으로 의도된 것은 아니다.

[0194] ffa-LN₃-AEDI-NR550S0를 제조하기 위한 일반적 반응 절차:

[0195]



[0196]



[0197]

[0198] 50ml 둥근-바닥 플라스크에, Boc-AEDI-OH(1g, 3.4 mmol)를 DCM(15ml)에 용해시키고, 이 용액에 rt에서 TFA(1.3 ml, 17ml)를 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. TLC(DCM:MeOH=9:1)는 Boc-AEDI-OH의 완전한 소비를 나타내었다. 이 반응 혼합물을 건조 상태로 증발시켰다. 얻어진 잔사에 이어서 TEAB(2M, ~15ml)를 첨가하고, 중성이 될 때까지 pH를 모니터링하였다. 그 후 이 혼합물을 이어서 H₂O/CH₃CN(1:1, ~15ml)에 용해시키고, 건조 상태로 증발시켰다. 이 절차는 과잉의 TEAB염을 제거하기 위하여 3회 반복하였다. 백색 고형

잔사를 CH_3CN (20ml)으로 처리하고 0.5시간 동안 교반하였다. 이 용액을 여과 제거하고 고형물을 CH_3CN 으로 세척하여, 순수한 AEDI-OH-TFA염을 수득하였다(530mg, 80%). ^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ (ppm)): 3.32 (t, J=6.5 Hz, 2H, $\text{NH}_2\text{-CH}_2$); 2.97 (t, J=6.5 Hz, 2H, S- CH_2); 1.53 (s, 6H, 2x CH_3). ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O , δ (ppm)): 178.21 (s, CO); 127.91, 117.71 (2s, TFA); 51.87 (s, C-(CH_3)₂); 37.76 (t, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 34.23 (t, S- CH_2); 23.84 (q, 2x CH_3). ^{19}F NMR (400 MHz, D_2O , δ (ppm)): -75.64.

[0199] 50ml 둥근-바닥 플라스크에서, 염료 NR550S0(114mg, 176 μmol)를 DMF(무수, 20ml)에 용해시키고, 건조 상태로 증발시켰다. 이 절차를 3회 반복하였다. 무수 DMA(10ml) 및 후니그의 염기(92 μl , 528 μmol , 3 당량)를 이어서 상기 둥근 바닥 플라스크에 피펫으로 가하였다. TSTU(69mg, 228 μmol , 1.3 당량)를 한번에 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 rt에서 유지시켰다. 30분 후, TLC($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}=85:15$) 분석은 반응이 완료된 것을 나타내었다. 이 반응 혼합물에 0.1M TEAB 중 AEDI-OH(68mg, 352 μmol , 2 당량)를 첨가하고 rt에서 3시간 동안 교반하였다. TLC($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}=8:2$)는 활성화 에스터의 완전한 소비와 활성화 에스터 미만에 나타난 적색 스팟(red spot)을 나타내었다. 한편, 분석적 HPLC는 또한 활성화 에스터의 완전한 소비와 최종 생성물의 형성을 나타내었다. 이 반응물은 TEAB 완충제(0.1M, 10ml)로 반응 중지시키고, 휘발성 용매를 감압 증발(HV)에 의해 제거하고, 액시아(Axia) 칼럼 상에서 정제시켜 NR550S0-AEDI-OH를 수득하였다. 수율: 60%.

[0200] 25ml 둥근-바닥 플라스크에서, NR550S0-AEDI-OH(10 μmol)를 DMF(무수, 5ml)에 용해시키고, 건조 상태로 증발시켰다. 이 절차는 3회 반복하였다. 무수 DMA(5ml) 및 DMAP(1.8ml, 15 μmol , 1.5 당량)를 이어서 상기 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였다. DSC(5.2mg, 20 μmol , 2 당량)를 한번에 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 실온에서 유지시켰다. 30분 후, TLC($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}=8:2$) 분석은, 반응이 완결된 것을 나타내었다. 후니그의 염기(3.5 μl , 20 μmol)를 이 반응 혼합물에 피펫으로 가하였다. 이어서 이 반응 혼합물에 pppA-LN₃(0.5ml H_2O 중 20 μmol , 2 당량) 및 Et₃N(5 μl)의 용액을 첨가하고, rt에서 하룻밤 교반하였다. TLC($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}=8:2$)는 활성화 에스터의 완전한 소비와 기준선 상에 나타난 적색 스팟을 나타내었다. 한편, 분석적 HPLC는 또한 활성화 에스터의 완전한 소비와 최종 생성물의 형성을 나타내었다. 이 반응물은 TEAB 완충제(0.1M, 10ml)로 반응 중지시키고 DEAE 세파덱스(Sephadex) 칼럼(25g 바이오타지(Biotage) 칼럼) 상에 장입하였다. 이 칼럼은 이하의 표 2에 표시된 바와 같은 구매로 용리되었다.

[0201] A: 0.1M TEAB 완충제(10% CH_3CN)

[0202] B: 1M TEAB 완충제(10% CH_3CN).

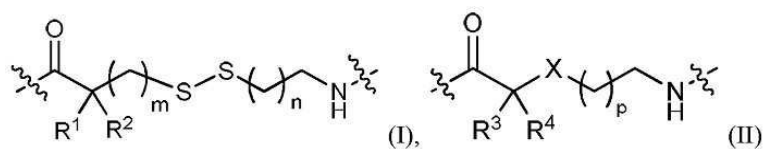
[0203] 구매:

표 2

단계	용매 혼합물(B%)	길이(ml)
1	0	100
2	0 - 45	50
3	45	100
4	45 - 100	50
5	100	100

[0205] 바람직한 생성물은 45% 내지 100%의 1M TEAB 완충제로부터 용리되었다. 생성물을 함유하는 분획들을 합하여, 증발시키고 HPLC(YLC 칼럼, 8ml/분)에 의해 정제시켰다. 수율: 53%.

[0206] 요약하면, 본 발명은 링커를 통해서 형광단에 공유 부착된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 관한 것일 수 있고, 여기서 링커는 이하의 화학식 (I) 또는 (II)의 구조, 또는 둘 다의 조합을 포함한다:



식 중,

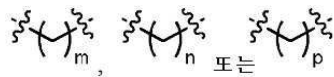
각각의 R^1 및 R^2 는 독립적으로 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고;

R^3 은 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, $-NR^5-C(=O)R^6$ 또는 $-NR^7-C(=O)-OR^8$ 로부터 선택되며;

R^4 는 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고;

각각의 R^5 및 R^7 은 독립적으로 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, 선택적으로 치환된 페닐, 또는 선택적으로 치환된 C_{7-12} 아르알킬로부터 선택되며;

각각의 R^6 및 R^8 은 독립적으로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, 선택적으로 치환된 페닐, 선택적으로 치환된 C_{7-12} 아르알킬, 선택적으로 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬, 또는 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴로부터 선택되고;



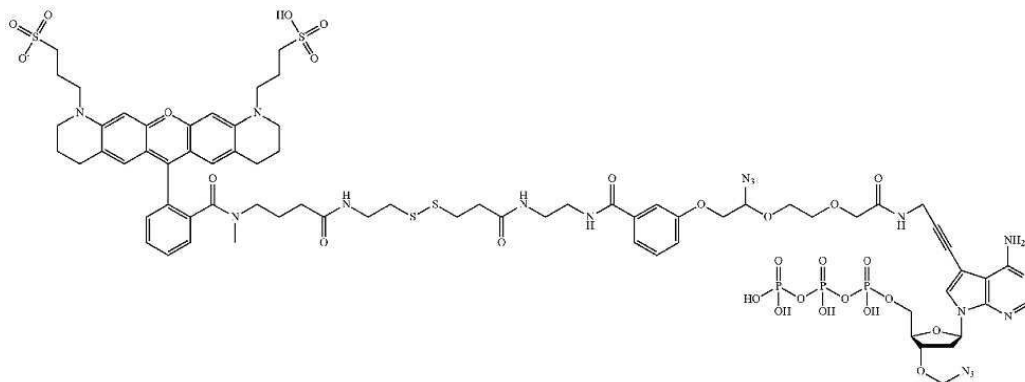
중의 메틸렌 반복 단위의 각각은 선택적으로 치환되며;

X는 메틸렌(CH_2), 산소(O) 또는 황(S)으로부터 선택되고;

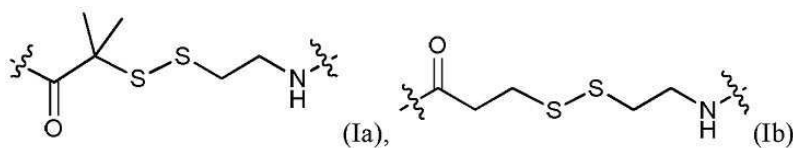
m은 0 내지 20의 정수이고;

n은 1 내지 20의 정수이며; 그리고

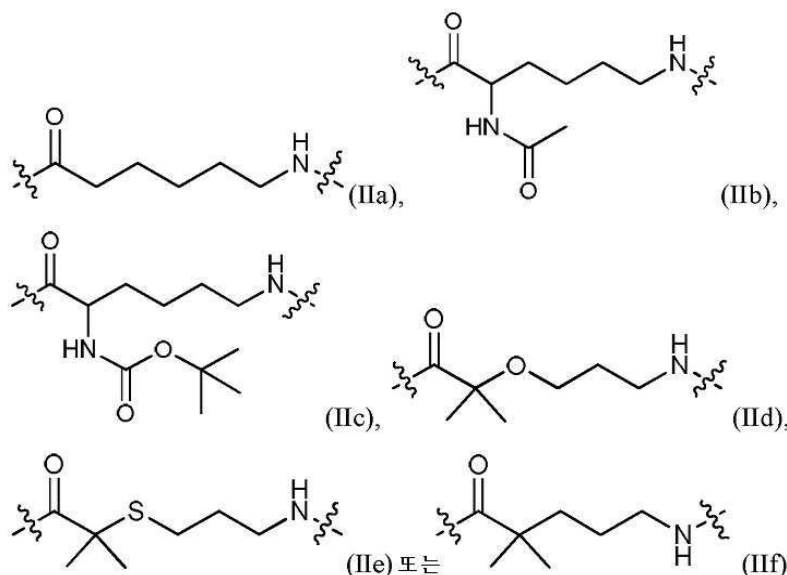
p는 1 내지 20의 정수이되, 단 형광단 표지된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드는 하기 구조를 갖지 않는다:



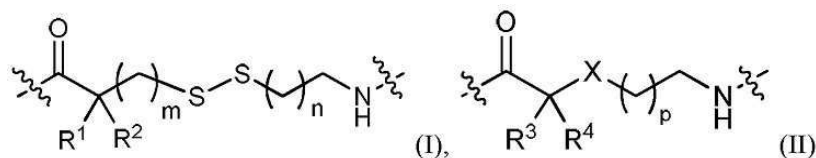
위에서 언급된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 몇몇 경우에, 화학식 (I)의 구조는 또한 하기 화학식 (Ia) 또는 (Ib)로 표시된다:



또한, 화학식 (II)의 구조는 또한 하기 화학식 (IIa), (IIb), (IIc), (IIId), (IIe) 또는 (IIIf)로 표시될 수 있다:



특히, 본 발명은 링커를 통해서 형광단에 공유 부착된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드에 관한 것일 수 있고, 여기서 링커는 이하의 화학식 (I) 또는 (II)의 구조, 또는 둘 다의 조합을 포함한다:



식 중,

R^1 은 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되고;

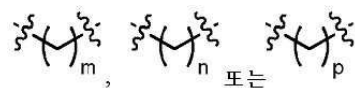
R^2 는 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되며;

R^3 은 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, $-NR^5-C(=O)R^6$ 또는 $-NR^7-C(=O)-OR^8$ 로부터 선택되고;

R^4 는 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 선택되며;

각각의 R^5 및 R^7 은 독립적으로 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, 선택적으로 치환된 페닐, 또는 선택적으로 치환된 C_{7-12} 아르알킬로부터 선택되고;

각각의 R^6 및 R^8 은 독립적으로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬, 선택적으로 치환된 페닐, 선택적으로 치환된 C_{7-12} 아르알킬, 선택적으로 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬, 또는 선택적으로 치환된 5 내지 10원 헤테로아릴로부터 선택되며;



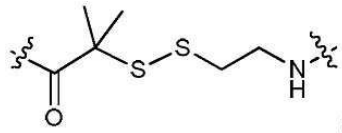
X는 메틸렌(CH_2), 산소(O) 또는 황(S)으로부터 선택되며;

m은 0 내지 20의 정수이고;

n은 1 내지 20의 정수이며; 그리고

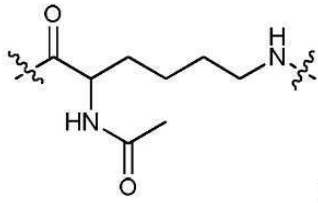
p는 1 내지 20의 정수이다.

화학식 (I)의 구조는 또한 하기 화학식 (Ia)로 표시되는 것이 바람직하다:

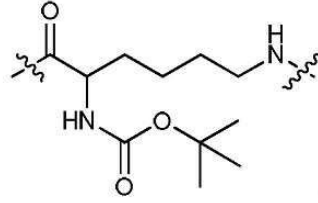


(Ia)

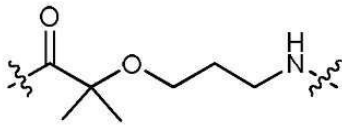
또한, 화학식 (II)의 구조는 또한 하기 화학식 (IIb), (IIc), (IId), (IIe) 또는 (IIf)로 표시된다:



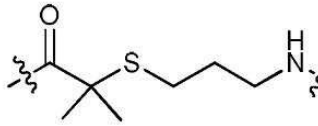
(IIb),



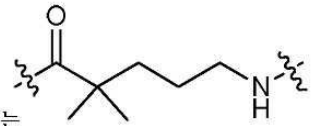
(IIc),



(IId),



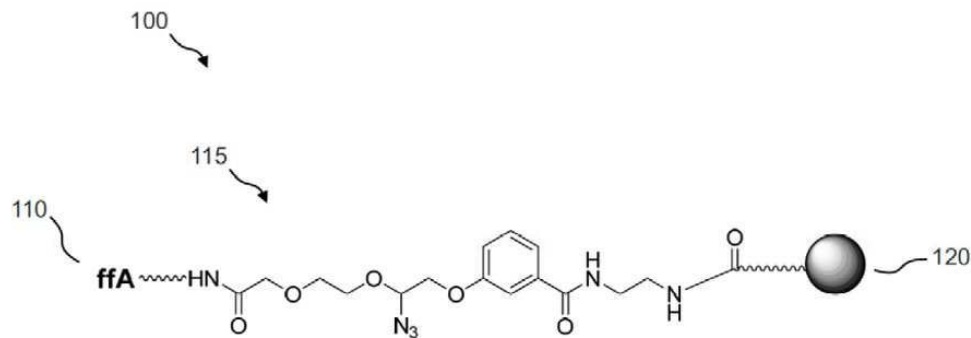
(IIe) 또는



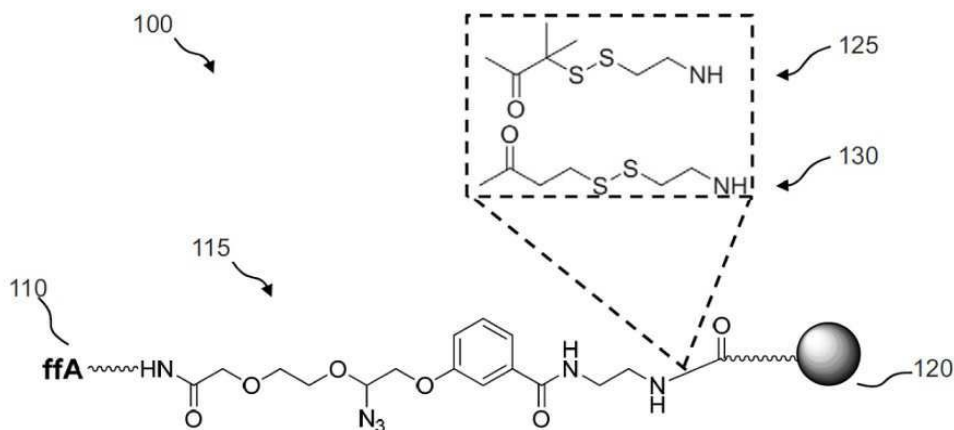
(IIf)

도면

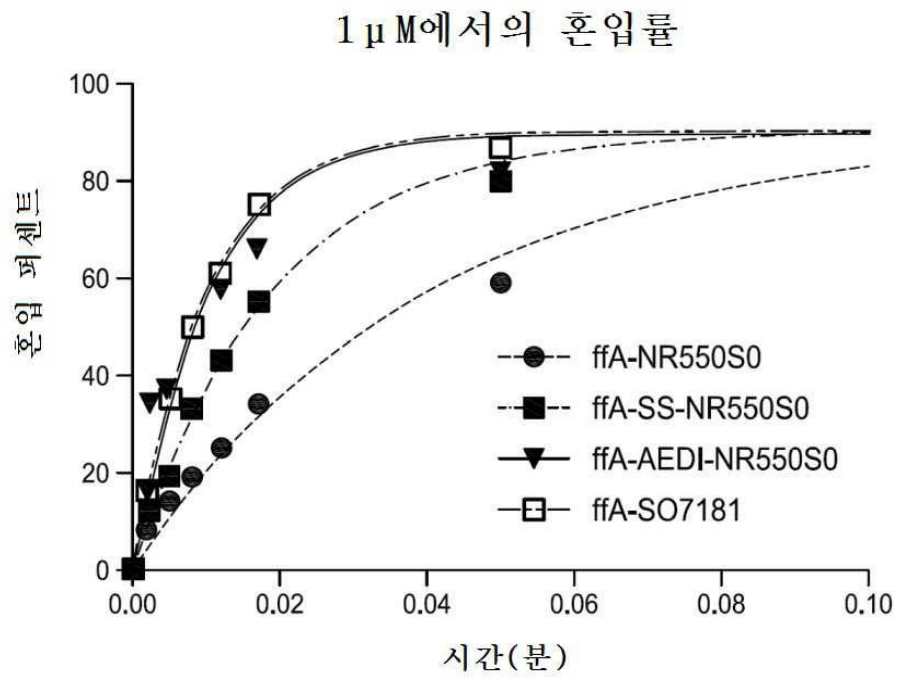
도면 1a



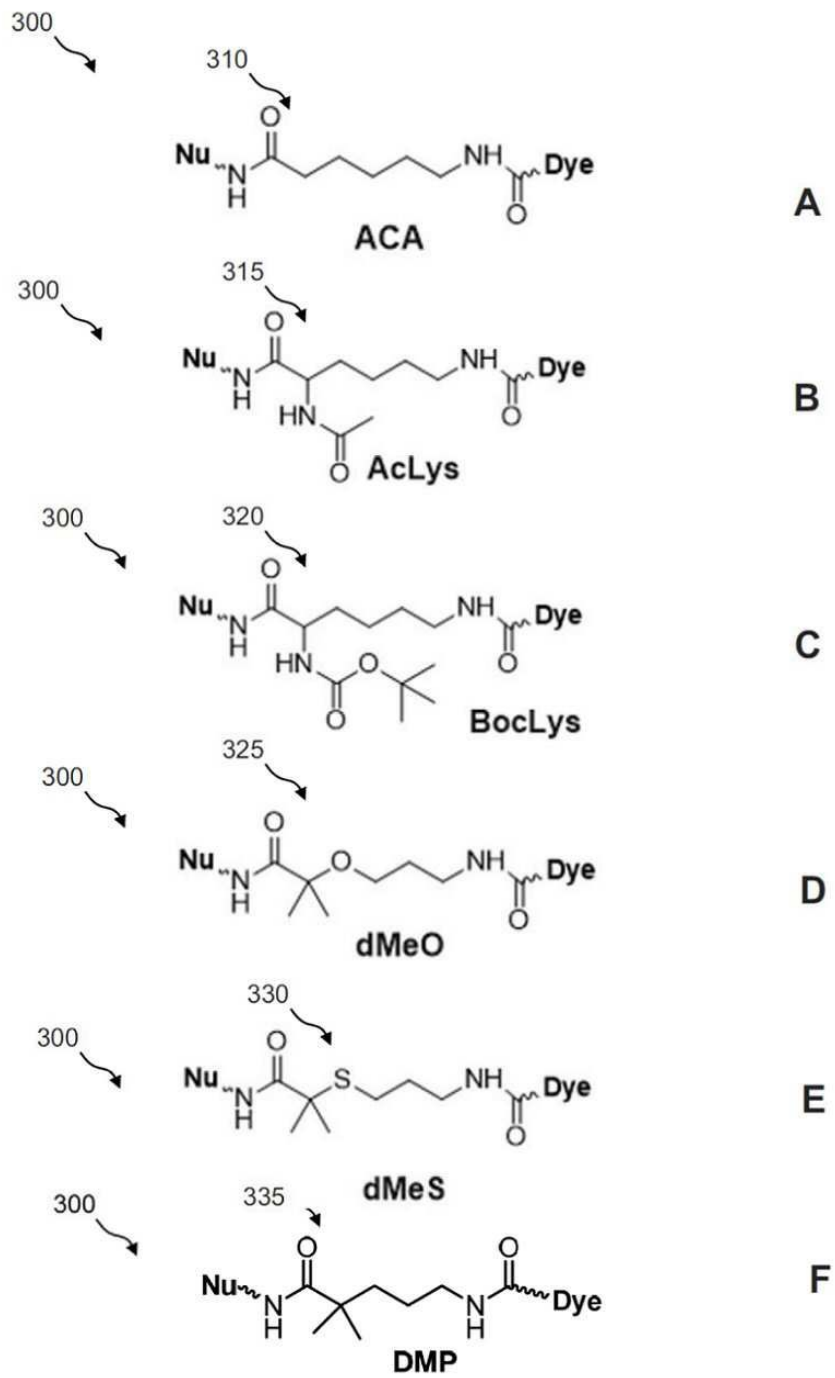
도면 1b



도면2



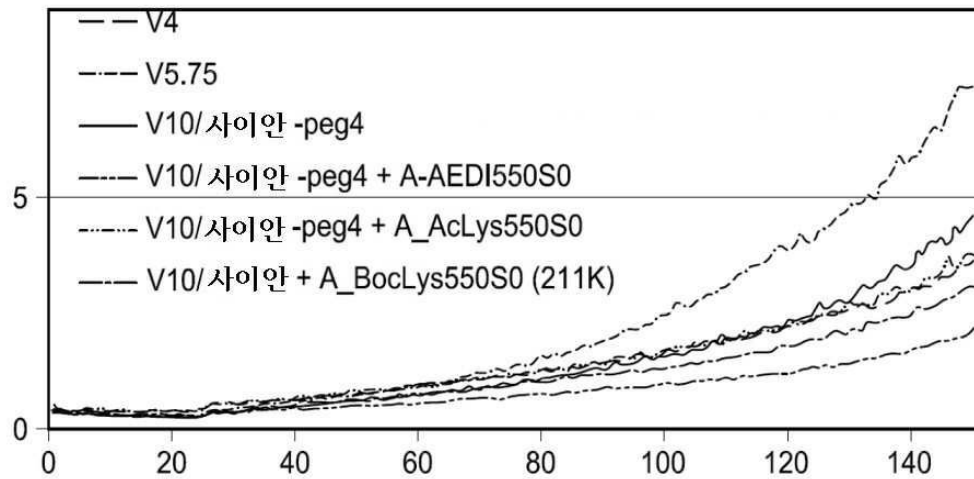
도면3



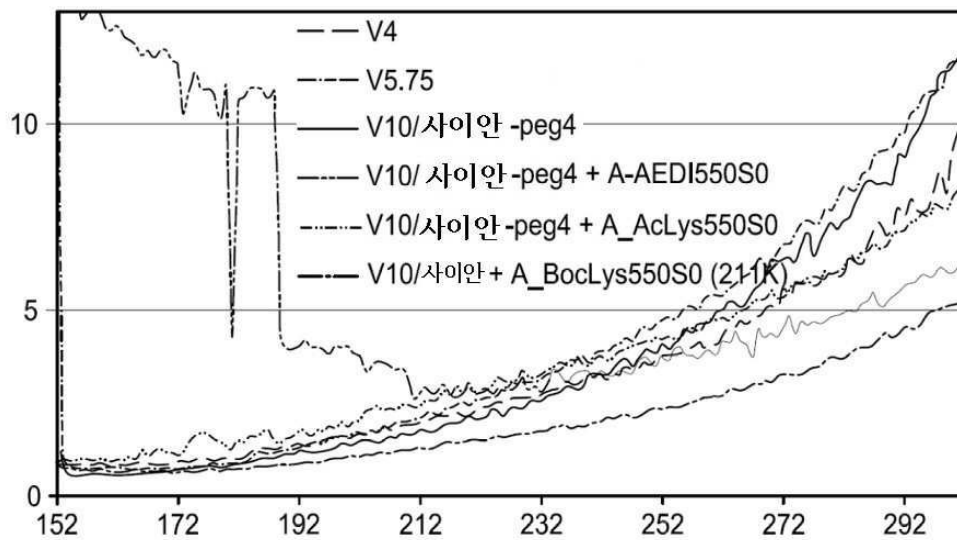
도면4

염료 세트	밀도	%PF	Ph R1	PPh R1	Ph R2	PPh R2	정렬% R1	정렬% R2	에러 R1	에러 R2
V4	230	79.6	0.205	0.111	0.35	0.149	82.2	79.3	1.41	3.19
V5.75	187	77.65	0.371	0.048	0.442	0.164	80.06	79.99	2.16	3.94
V10/ 사이안 -peg4	222	79.88	0.305	0.084	0.53	0.179	81.89	79.45	1.42	3.48
V10/사이안 -peg4, A-AEDI550S0	223	81.83	0.14	0.123	0.294	0.197	81.61	67.12	0.85	5.84
V10/ 사이안 -peg4, A-AcLys550S0	227	78.52	0.2	0.128	0.319	0.272	82.23	78.52	1.44	3.48
V10/ 사이안, A-AcLys550S0	145	86.27	0.178	0.211	0.283	0.29	82.4	79.84	1.33	3.33

도면5



A

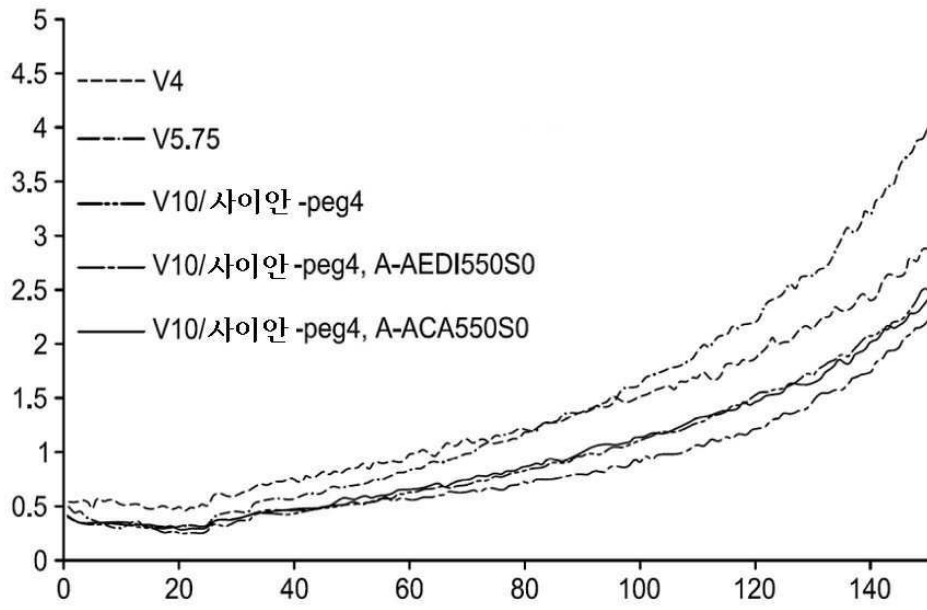


B

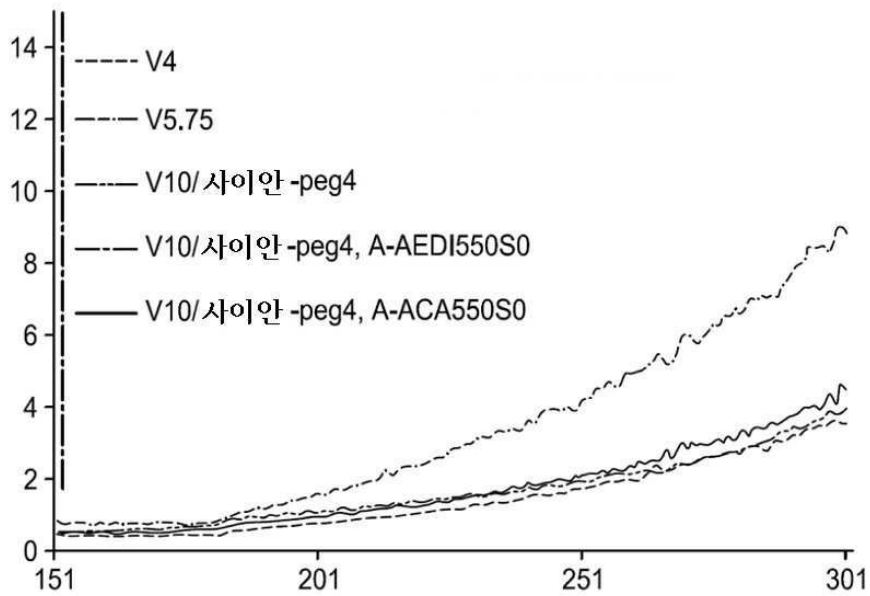
도면6

염료 세트	밀도	%PF	Ph R1	PPh R1	Ph R2	PPh R2	정렬% R1	정렬% R2	에러 R1	에러 R2
V4	191	82.62	0.132	0.151	0.242	0.163	81.91	79.59	1.34	2.43
V5.75	235	79.02	0.212	0.05	0.304	0.187	82.54	78.74	1.4	4.2
V10/사이안 -peg4	213	84.7	0.2	0.063	0.348	0.179	83.3	81.19	0.96	2.02
V10/사이안 -peg4	220	83.03	0.188	0.115	0.317	0.207	82.92	80.9	1.11	2.16
V10/사이안 -peg4, A-AEDI- 550S0	252	76.37	0.102	0.097	0.132	0.412	80.1	34.9	0.84	25.58
V10/사이안 -peg4, A- ACA550S0	204	85.88	0.145	0.076	0.271	0.222	83.21	80.58	0.96	2.39

도면7

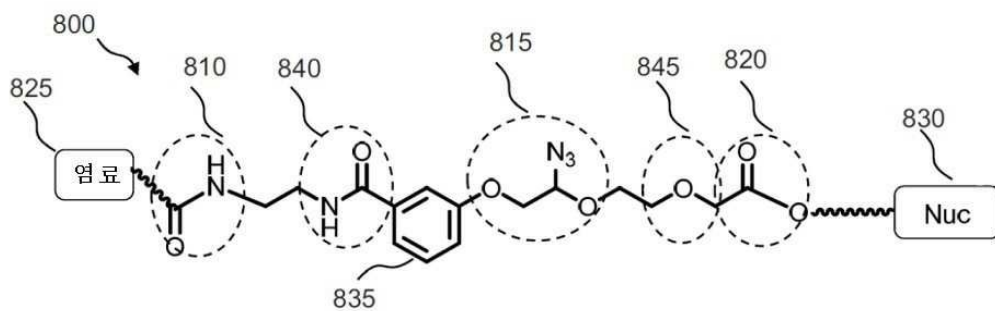


A

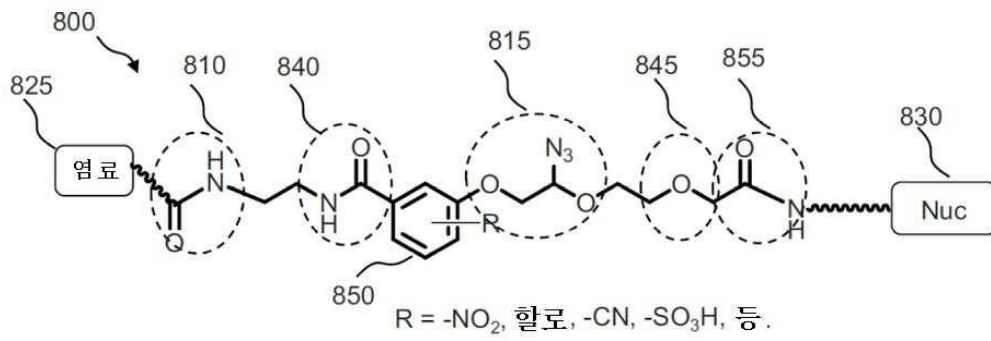


B

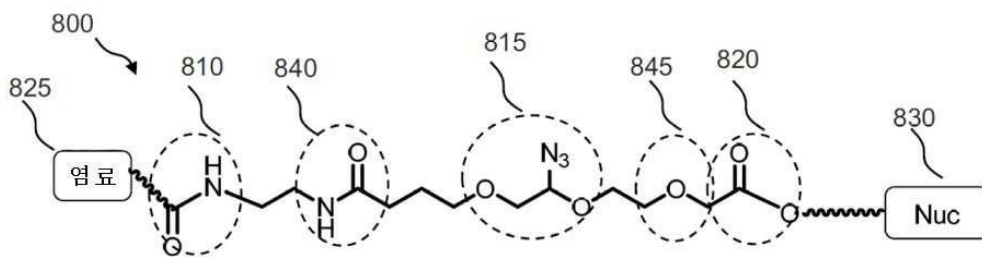
도면8a



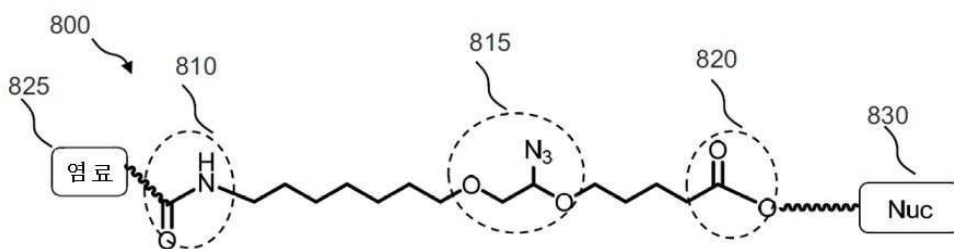
도면8b



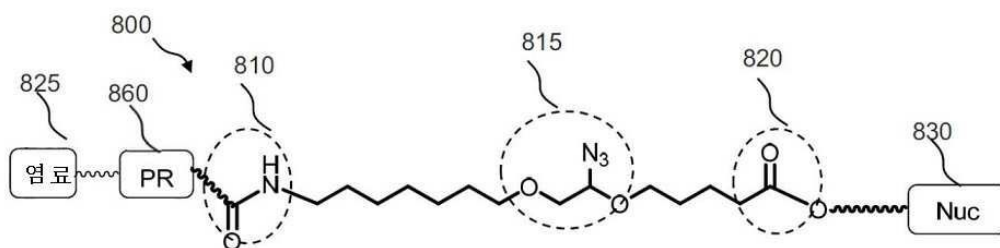
도면8c



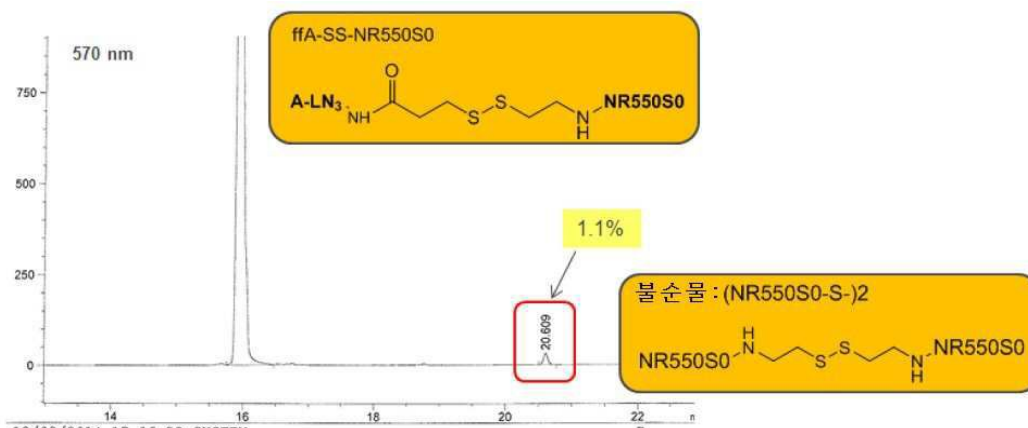
도면8d



도면8e



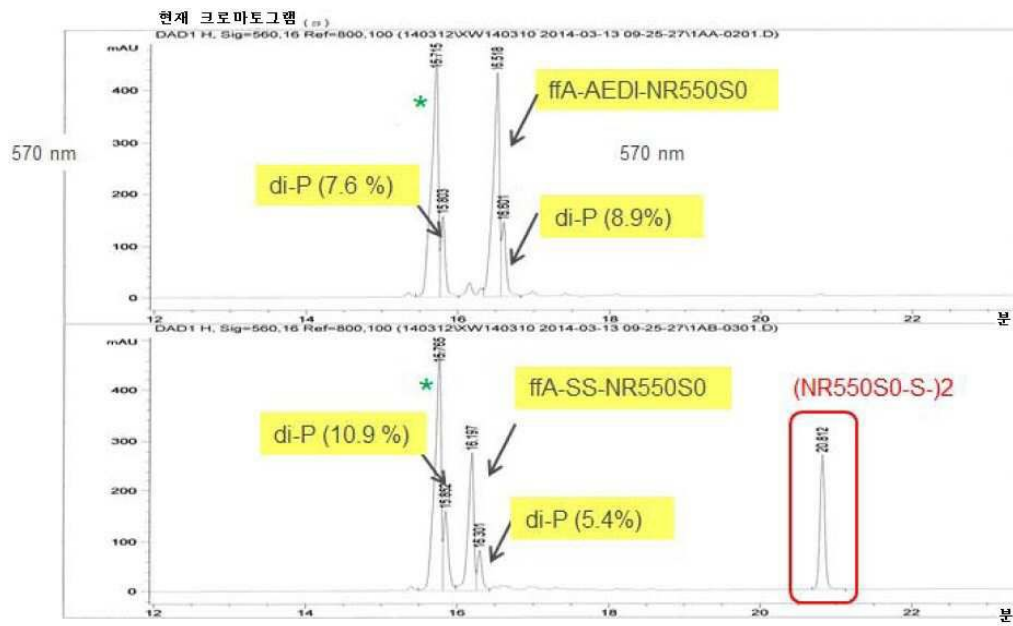
도면9a



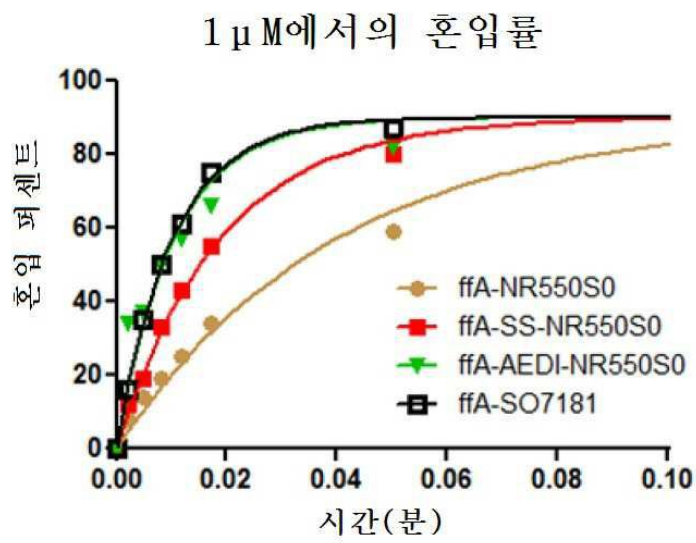
도면9b

	완충제	결과*	
	60°C에서 21시간	ffa-SS-NR550S0	ffa-AEDI-NR550S0
1	PR2 완충제	~50% 다이설파이드 부산물	~6% 다이설파이드 부산물
2	혼입 완충제 (pH 9.9) (Mg ²⁺ 무함유, Chaps 무함유)	~10% 다이설파이드 부산물	다이설파이드 부산물 없음
3	IMX	~38% 다이설파이드 부산물	다이설파이드 부산물 없음
4	IMX + Pol 812	~34% 다이설파이드 부산물	다이설파이드 부산물 없음
5	SRE	다이설파이드 부산물 없음	다이설파이드 부산물 없음
6	TEAB (0.1 M) : CH ₃ CN (1:1)	~20% 다이설파이드 부산물	다이설파이드 부산물 없음

도면9c



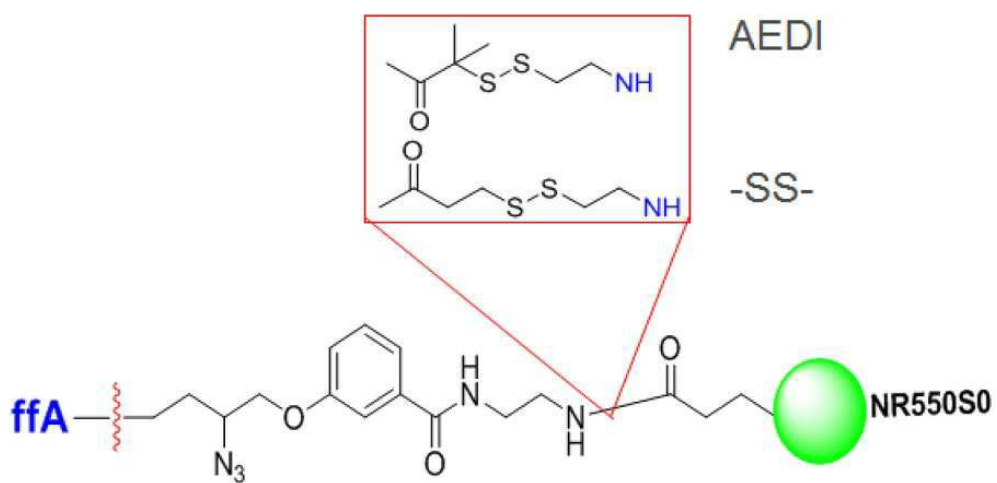
도면10a



도면10b

ffA	K (μ M/분)
NR550S0	22 (1X)
-SS-NR550S0	54 (2X)
-AEDI-NR550S0	97 (4X)
Std -SO7181	99 (4X)

도면10c



도면12a

염료 세트	밀도	%PF	Ph R1	PPh R1	Ph R2	PPh R2	정렬% R1	정렬% R2	에러 R1	에러 R2
ffNs + ffA-NR550S0	222	79.88	0.305	0.084	0.53	0.179	81.89	79.45	1.42	3.48
ffNs + ffA-AEDI-NR550S0	223	81.83	0.14	0.123	0.294	0.197	81.61	67.12*	0.85	5.84*
ffNs + ffA-AcLys-NR550S0	227	78.52	0.2	0.128	0.319	0.272	82.23	78.52	1.44	3.48
ffNs + ffA-BocLys-NR550S0	211	82.97	0.126	0.146	0.226	0.249	82.54	80.45	1.17	1.99

도면12b

