



등록특허 10-2765335



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월13일
(11) 등록번호 10-2765335
(24) 등록일자 2025년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09B 3/14 (2006.01) *C09B 69/10* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C09B 3/14 (2013.01)
C09B 69/101 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7019776

(22) 출원일자(국제) 2016년05월11일

심사청구일자 2021년05월11일

(85) 번역문제출일자 2017년07월14일

(65) 공개번호 10-2018-0005650

(43) 공개일자 2018년01월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/031831

(87) 국제공개번호 WO 2016/183185

국제공개일자 2016년11월17일

(30) 우선권주장

62/159,771 2015년05월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160022358 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 15 항

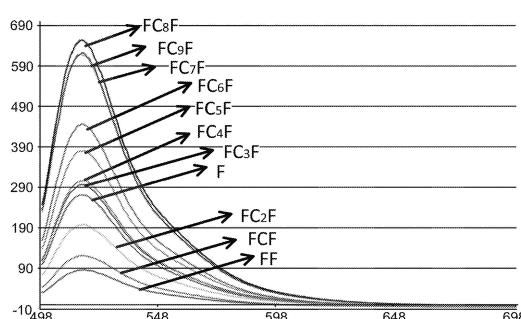
심사관 : 조혜진

(54) 발명의 명칭 **초회도 이랑체성 또는 중합체성 염료**

(57) 요약

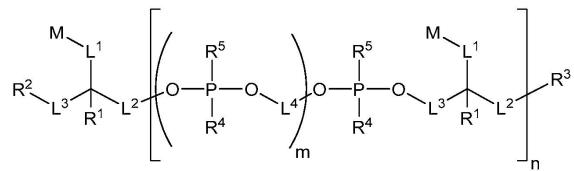
형광 또는 유색 염료로서 유용한 화합물이 개시되어 있다. 상기 화합물은 하기 화학식 I을 가지며, 이의 입체 (뒷면에 계속)

대 표 도



이성체 염 및 토토머를 포함한다:

화학식 I



상기 화학식 I에서,

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

제조와 관련된 방법 및 상기 화합물의 용도가 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

C09B 69/102 (2013.01)

C09B 69/103 (2013.01)

C09B 69/109 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20070077549 A1

WO2014064687 A1

EP02014698 A1

CP2272256 A

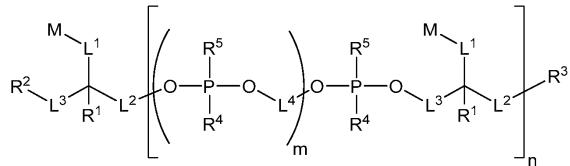
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 I을 갖는 화합물 또는 이의 입체이성체, 염 또는 토토며.

화학식 I



상기 화학식 I에서,

M은 각각 독립적으로 3개 이상의 공유 결합된 아릴 또는 헤테로아릴 고리, 또는 이들의 조합을 포함하는 형광 또는 유색 모이어티(moiety)이고;

L^1 , L^2 및 L^3 은 각각 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자성 링커(linker)이고;

L^4 는 각각 독립적으로 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고;

R^1 은 각각 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로 OH, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, 여기서, 상기 분석물 분자는 핵산 또는 이들의 중합체, 아미노산 또는 이들의 중합체, 또는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앱타며 또는 프리온이고; 상기 고체 지지체는 중합체성 비드 또는 비중합체성 비드이고; R_a 는 O 또는 S이고; R_b 는 OH, SH, O^- , S^- , OR^d 또는 SR^d 이고; R_c 는 OH, SH, O^- , S^- , OR^d , SR^d , 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고, 상기 "링커"는 공유 결합 또는 이온 또는 수소 결합 상호 작용을 통해 분자의 부분을 동일 분자의 또 다른 부분에 또는 상이한 분자, 모이어티 또는 고체 지지체에 연결하는, 적어도 하나의 원자의 인접한 쇄를 나타내고;

R^4 는 각각 독립적으로 OH, SH, O^- , S^- , OR^d 또는 SR^d 이고;

R^5 는 각각 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 또는 부재하고;

Q는 각각 독립적으로 설프하이드릴, 디설파이드, 활성화된 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨, 알켄, 디엔, 친디엔체, 산 할로겐화물, 설포닐 할로겐화물, 포스핀, α -할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이이미드 관능성 그룹을 포함하고, 여기서, 상기 활성화된 에스테르는 N-석신이미드 에스테르, 이미도에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르이고, 상기 아지드는 알킬 아지드 또는 아실 아지드이고;

R^d 는 양이온이고;

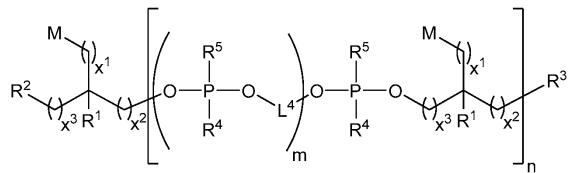
m 은 각각 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단 m 의 적어도 하나의 발생은 3 이상의 정수이고;

n은 1 이상의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물이 화학식 IA를 갖는, 화합물.

화학식 IA



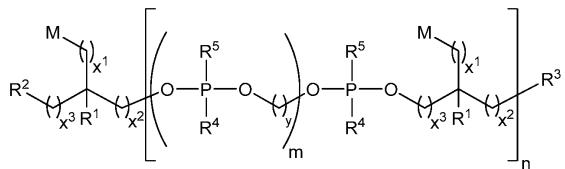
상기 화학식 IA에서,

x^1 , x^2 및 x^3 은 각각 독립적으로 0 내지 6의 정수이다.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물이 화학식 IB를 갖는, 화합물.

화학식 IB



상기 화학식 IB에서,

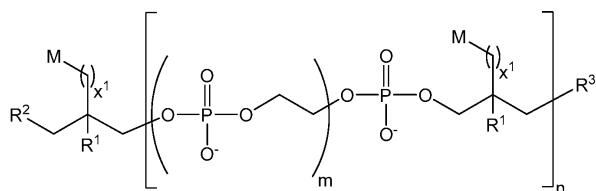
x^1 , x^2 및 x^3 은 각각 독립적으로 0 내지 6의 정수이고;

y는 1 내지 6의 정수이다.

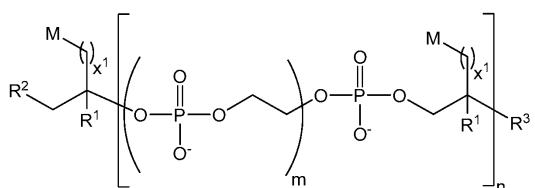
청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 화합물이 화학식 IB' 또는 화학식 IB" 중 하나를 갖는, 화합물.

화학식 IB'



화학식 IB"



청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

A) R^2 및 R^3 이 각각 독립적으로 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이거나;

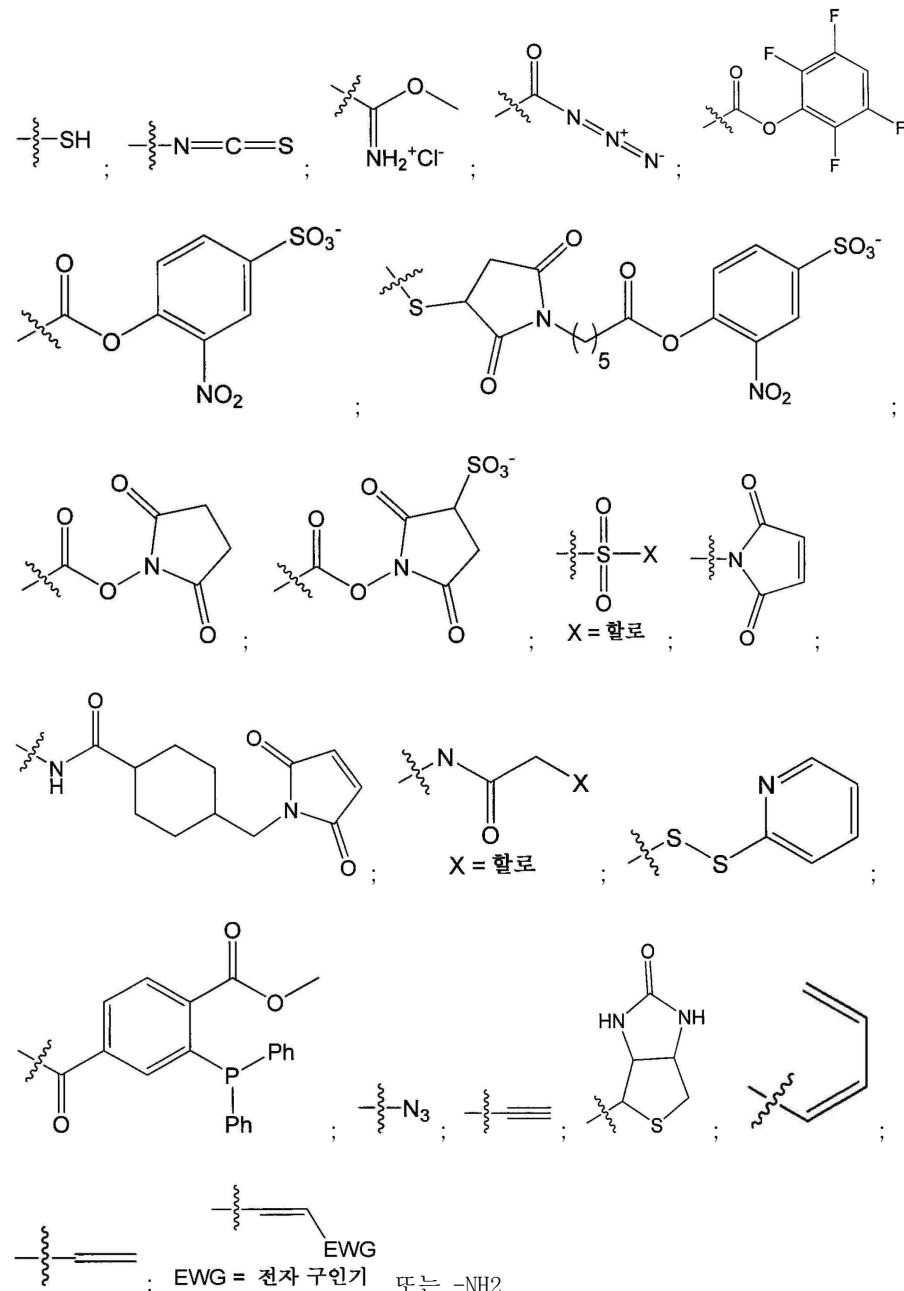
B) R^2 또는 R^3 중 하나가 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 Q 또는 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이거나; 또는

C) R^2 또는 R^3 중 하나가 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 또는 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인, 화합물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

Q가 하기 구조들:



중 하나의 모이어티를 포함하는, 화합물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

- A) $m \in \mathbb{N}$ 각각 독립적으로 3 내지 10의 정수이거나;
 - B) $m \in \mathbb{N}$ 각각 독립적으로 7 내지 9의 정수이거나;
 - C) $n \in \mathbb{N}$ 1 내지 100의 정수이거나; 또는
 - D) $n \in \mathbb{N}$ 1 내지 10의 정수인, 화합물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

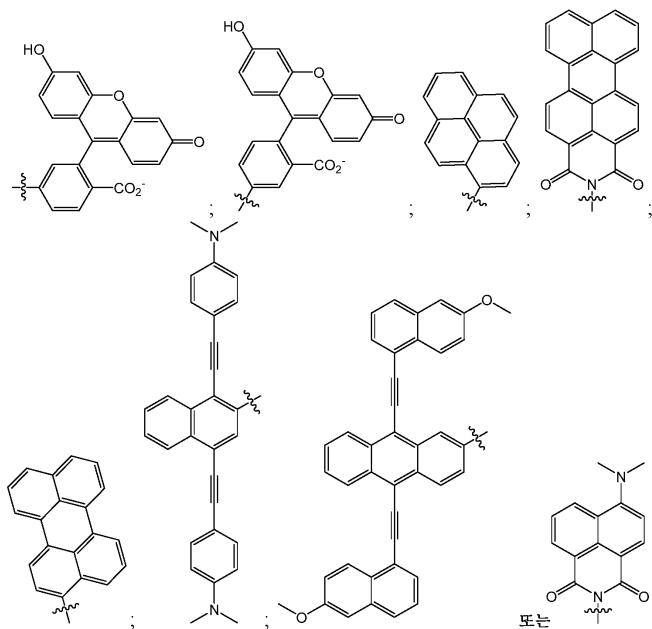
- A) M이 각각 독립적으로 퀴나크리돈, 플루오로페닐-디메틸-BODIPY, his-플루오로페닐-BODIPY, 아크리딘, 테릴렌, 섹시페닐, 포르피린, 벤조페렌, (플루오로페닐-디메틸-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, (비스-플루오로페닐-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, 퀴터페닐, 바이-벤조티아졸, 터-벤조티아졸, 바이-나프틸, 바이-안트라실, 스쿠아레인, 스쿠아릴륨, 9,10-에티닐안트라센 또는 터-나프틸 모이어티이거나;

B) M이 각각 독립적으로 p-테르페닐, 페릴렌, 페나진, 페난트롤린, 아크리딘, 티오크산트렌, 크리센, 루브렌, 코로넨, 시아닌, 페릴렌 아미드, 또는 페릴렌 아미드이거나;

C) M이 각각 독립적으로 쿠마린 염료, 레조루핀 염료, 디페로메텐보론 디플루오라이드 염료, 루테늄 바이페리딜 염료, 에너지 전달 염료, 티아졸 오렌지 염료, 폴리메틴 또는 N-아릴-1,8-나프탈이미드 염료이거나;

D) M이 각각 독립적으로 피렌, 페릴렌, 페릴렌 모노아미드 또는 6-카복시플루오레세인이거나; 또는

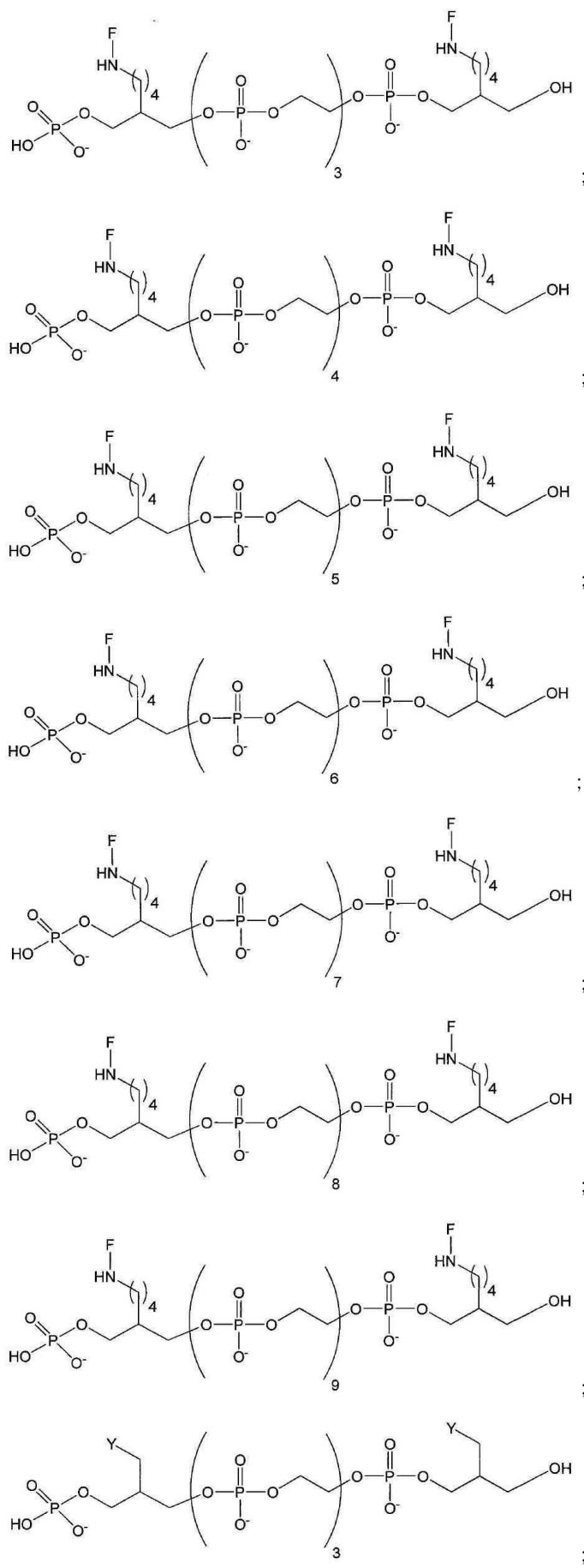
E) M이 각각 독립적으로 하기 구조들:

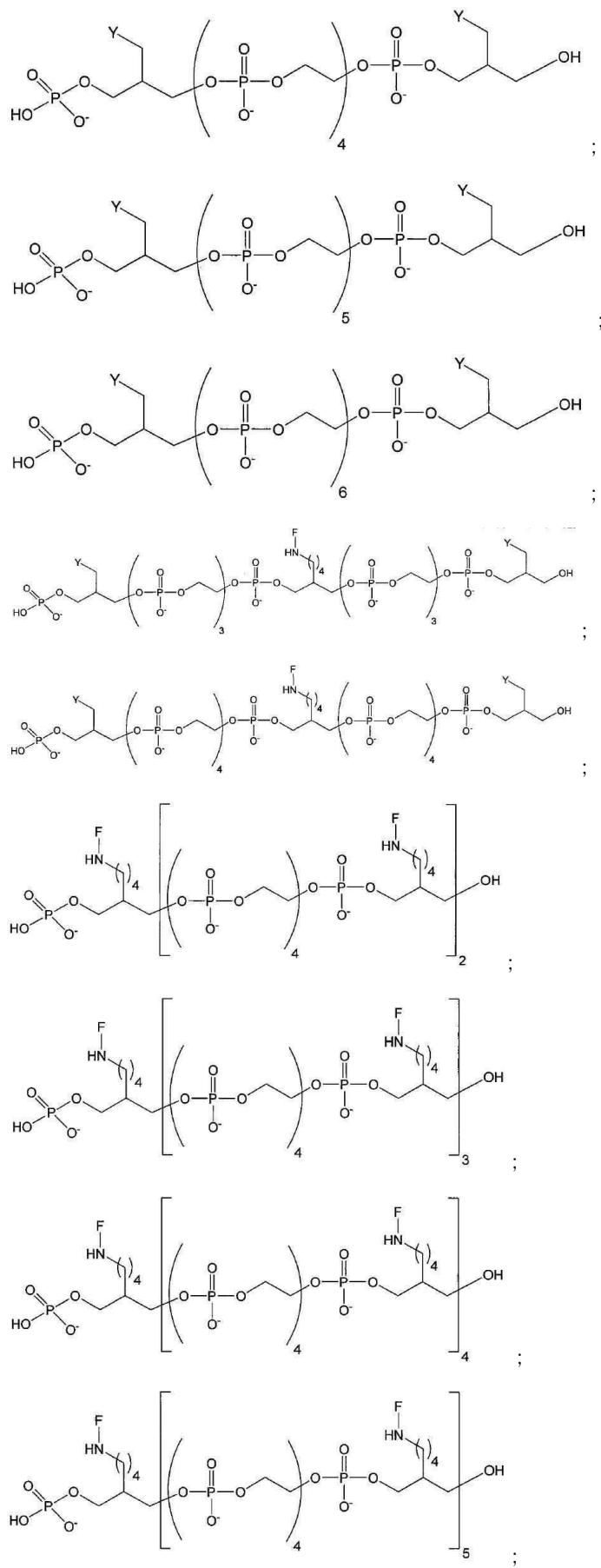


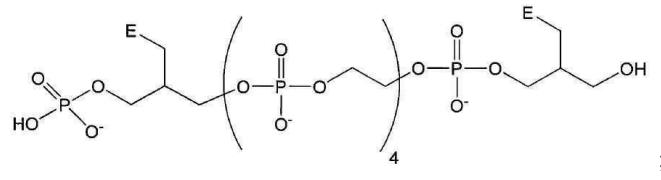
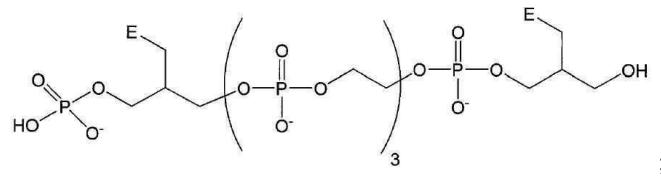
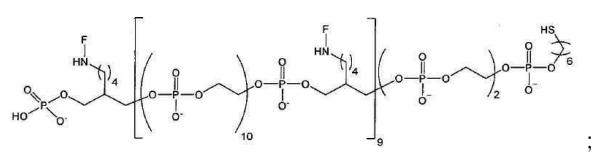
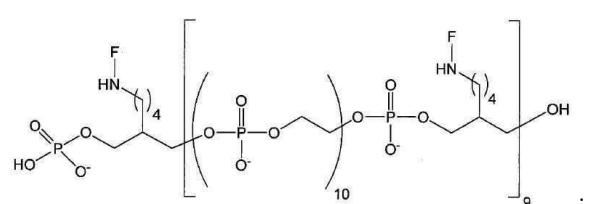
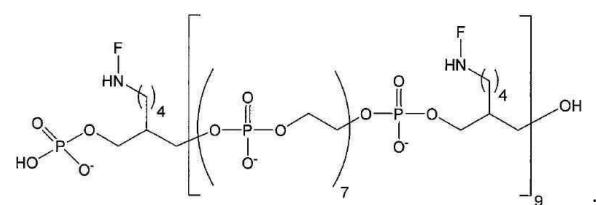
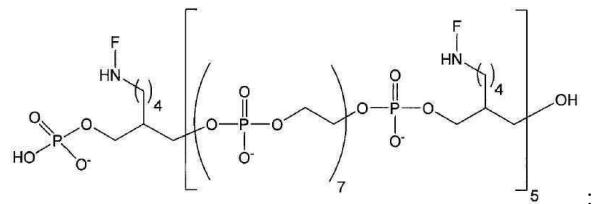
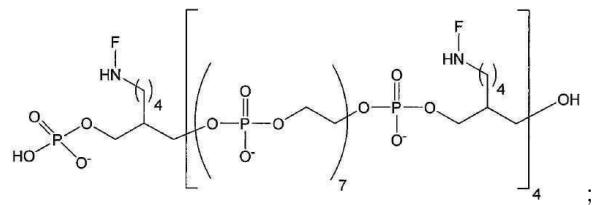
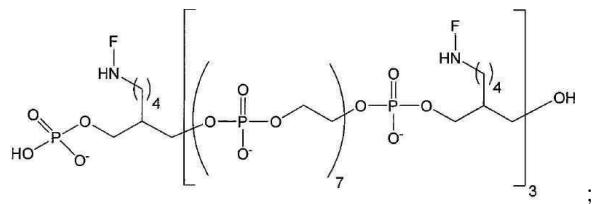
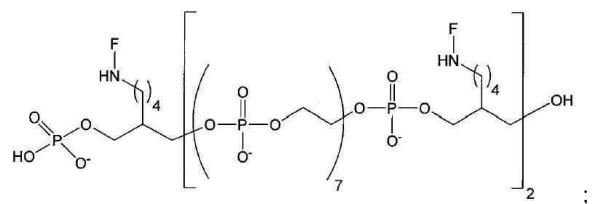
중 하나를 가지는, 화합물.

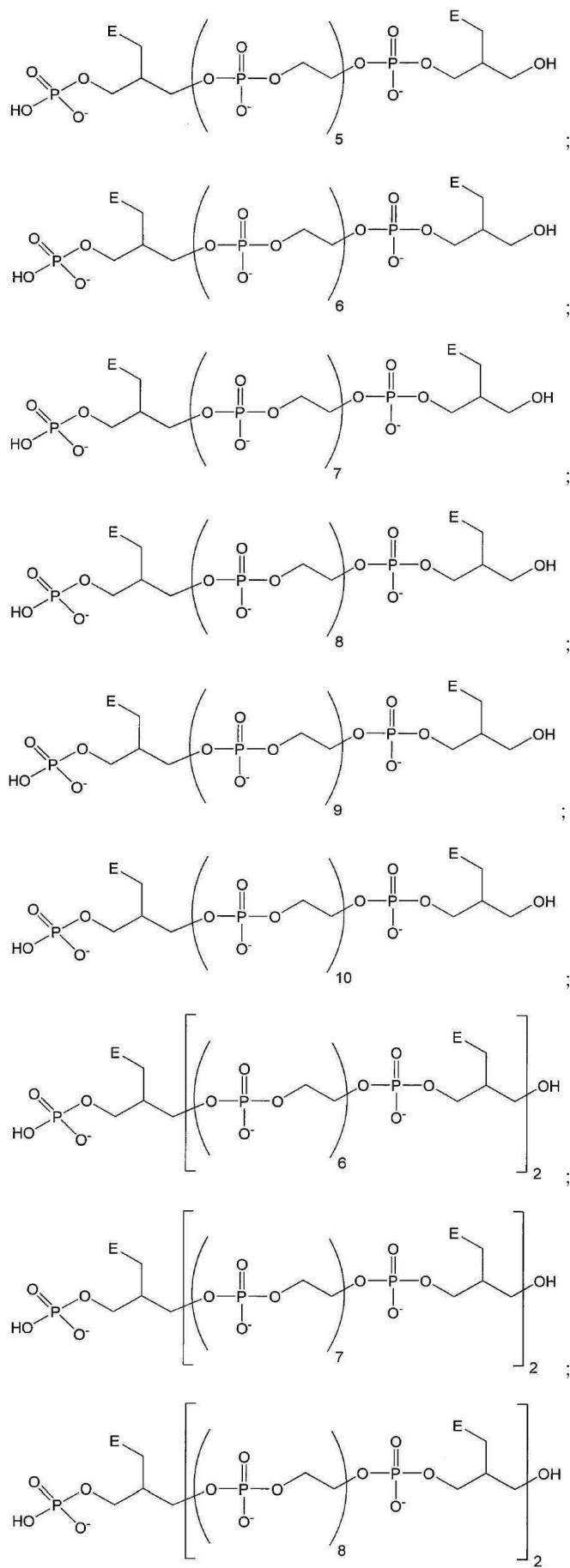
청구항 9

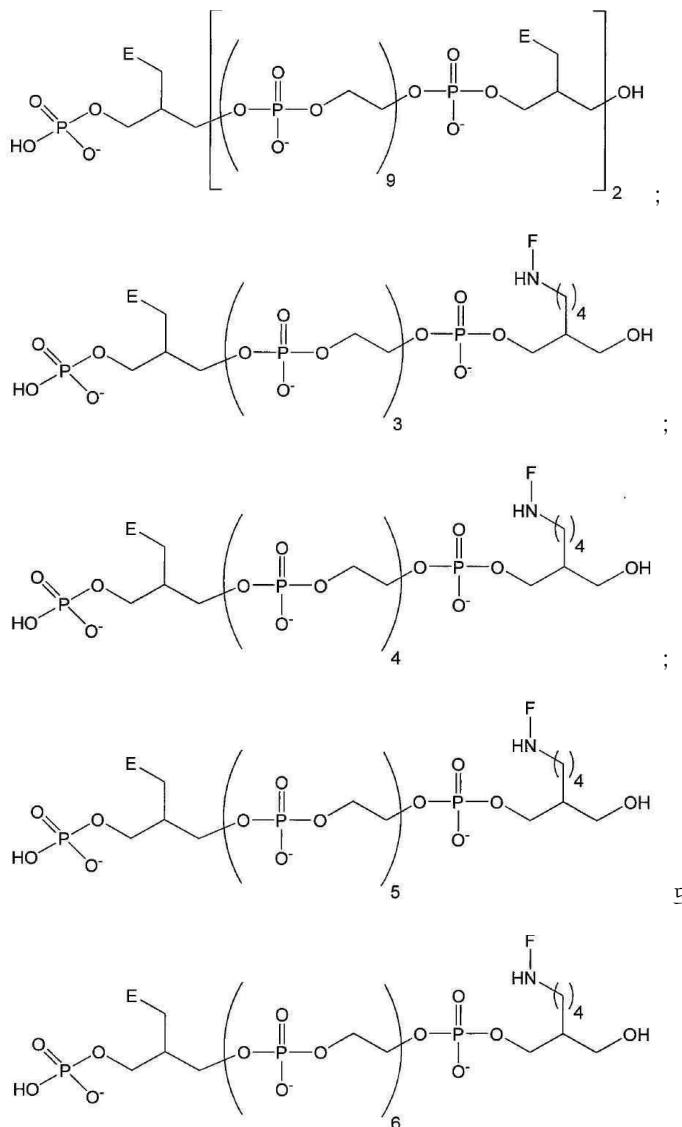
제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화합물이 하기 구조들:



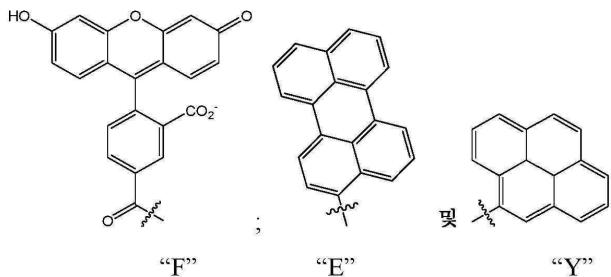








중 하나로부터 선택되고,
여기서, F, E 및 Y는 하기 구조:



를 가지는, 화합물.

청구항 10

샘플을 적절한 파장에서 조사(illuminated)하는 경우 광학 응답을 유발하기에 충분한 양으로 제1항 또는 제2항의 화합물을 상기 샘플에 첨가하는 단계를 포함하는, 샘플을 염색하는 방법.

청구항 11

분석물 분자를 시각적으로 검출하기 위한 방법으로서, 상기 방법은

- (a) R^2 또는 R^3 이 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인, 제1항의 화합물을 제공하는 단계; 및
(b) 상기 화합물을 이의 시각적인 성질들에 의해 검출하는 단계
를 포함하는, 분석물 분자를 시각적으로 검출하기 위한 방법.

청구항 12

분석물 분자를 시각적으로 검출하기 위한 방법으로서, 상기 방법은

- (a) R^2 또는 R^3 이 Q이거나, 또는 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커인 제1항의 화합물을 분석물 분자와 혼합하는 단계;
(b) 상기 화합물과 상기 분석물 분자의 접합체(conjugate)를 형성하는 단계; 및
(c) 상기 접합체를 이의 시각적인 성질들에 의해 검출하는 단계
를 포함하는, 분석물 분자를 시각적으로 검출하기 위한 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항의 화합물 및 하나 이상의 분석물 분자를 포함하는 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 하나 이상의 분석물 분자의 검출을 위한 분석 방법에 사용되는, 조성물.

청구항 15

샘플에서 죽은 세포의 존재를 결정하기 위한 방법으로서, 상기 방법은 상기 샘플을 제1항 또는 제2항의 화합물과 접촉시켜, 상기 화합물을 상기 죽은 세포와 결합 또는 회합시키는 단계 및 상기 죽은 세포와 결합하거나 회합한 화합물로부터 형광 신호를 관찰하는 단계를 포함하는, 샘플에서 죽은 세포의 존재를 결정하기 위한 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

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

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 일반적으로 이량체성 및 중합체성 형광 또는 유색 염료, 및 이들의 제조 방법 및 다양한 분석 방법에 서의 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

형광 및/또는 유색 염료는 고감도 검출 시약이 바람직한 적용에서 특히 적합한 것으로 알려져 있다. 샘플 내의 특정 구성요소(ingredient) 또는 성분(component)을 우선적으로 표지화할 수 있는 염료로 인해 연구원이 특정 구성요소 또는 성분의 존재, 양 및/또는 위치를 결정할 수 있게 된다. 또한, 특정 시스템은 다양한 환경에서 이들의 공간적 및 시간적 분포와 관련하여 모니터링할 수 있다.

[0003]

형광 및 비색 방법은 화학 및 생물학에서 극히 광범위하다. 이들 방법은 생체분자에 관한 존재, 구조, 거리, 배향, 착물화 및/또는 위치에 대한 유용한 정보를 제공한다. 또한, 시간-분해 방법(time-resolved method)은 역학과 동역학의 측정에서 점차적으로 사용되고 있다. 그 결과, 핵산 및 단백질과 같은 생체분자의 형광 또는 색 표지화를 위한 많은 전략들이 개발되었다. 생체분자의 분석이 전형적으로 수성 환경에서 발생하기 때문에 수용성 염료의 개발 및 사용에 중점을 두었다.

[0004]

이러한 염료의 사용은 신호 대 잡음 비를 증가시키고 다른 관련 이익을 제공하기 때문에 고도로 형광성이거나 또는 고도로 착색된 염료("더 밝은")가 바람직하다. 따라서, 공지된 형광성 및/또는 유색 모이어티(moiety)들로부터 신호를 증가시키려고 시도되어 왔다. 예를 들면, 2종 이상의 형광 및/또는 유색 모이어티들을 포함하는 이량체성 및 중합체성 화합물은 이러한 화합물이 더 밝은 염료를 생성할 것이라는 예상하에 제조되었다. 그러나, 분자내 형광 소광의 결과로서, 이량체성 및 중합체성 염료는 바람직한 휘도 증가를 달성하지 못했다.

[0005] 따라서, 몰 휘도(molar brightness)가 증가된 수용성 염료가 당업계에 필요하다. 이상적으로, 이러한 염료 및 바이오마커는 강렬하게 유색성 또는 형광성이어야 하며, 다양한 색들로 그리고 다양한 형광 파장에서 이용가능 해야 한다. 본 발명은 이러한 필요성을 충족시키며, 추가의 관련 이점을 제공한다.

발명의 내용

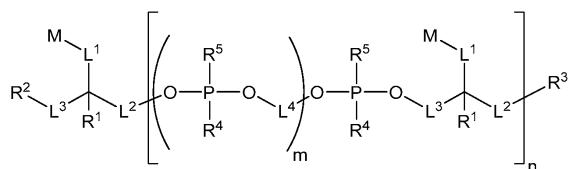
[0006] 간단히, 본 발명은 일반적으로 생체분자와 같은 분석물 분자 뿐만 아니라 이들의 제조용 시약의 시각적 검출을 가능하게 하는 수용성, 형광 또는 유색 염료 및 프로브로서 유용한 화합물에 관한 것이다. 염료를 사용하여 분석물 분자를 시각적으로 검출하는 방법이 또한 기재되어 있다.

[0007] 본원에 개시된 염료의 양태는 전형적으로 1 내지 14 범위의 pH, 예를 들면, 7 초과의 pH에서 하전되는 링커(linker)에 의해 공유 결합된 2종 이상의 형광 및/또는 유색 모이어티를 포함한다. 이량체성 및/또는 중합체성 염료의 이전 보고와는 달리, 본 발명의 염료는 상응하는 단량체성 염료 화합물보다 상당히 더 밝다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니나, 하전된 링커의 정전기적 반발력이 형광 및/또는 유색 모이어티들 사이의 공간적 거리를 유지하도록 작용하고, 따라서 분자내 형광 소광이 감소 및/또는 제거되는 것으로 여겨진다.

[0008] 본 발명의 수용성 형광 또는 유색 염료는 강렬하게 유색성 및/또는 형광성이며, 육안 검사 또는 다른 수단에 의해 용이하게 관찰될 수 있다. 일부 양태에서, 화합물은 이전의 조명 또는 화학적 또는 효소적 활성화 없이 관찰될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 염료의 적절한 선택에 의해, 다양한 색의 시각적으로 검출가능한 분석물 분자를 얻을 수 있다.

[0009] 한 양태에서, 하기 화학식 I을 갖는 화합물 또는 이의 임체이성체, 토토머 또는 염이 제공된다.

[0010] [화학식 I]



[0011]

[0012] 상기 화학식 I에서,

[0013] R¹, R², R³, R⁴, R⁵, L¹, L², L³, L⁴, M, m 및 n이 본원에 정의된 바와 같다.

[0014] 또 다른 양태에서, 샘플을 염색하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 샘플을 적절한 파장에서 조사(illustrated)하는 경우 광학 응답을 유발하기에 충분한 양으로 본원에 기재된 바와 같은 대표적 화합물을 상기 샘플에 첨가하는 단계를 포함한다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 분석물 분자를 시각적으로 검출하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은

[0016] (a) 본원에 기재된 대표적 화합물을 제공하는 단계; 및

[0017] (b) 상기 화합물을 이의 시각적 성질들에 의해 검출하는 단계

[0018] 를 포함한다.

[0019] 다른 개시된 방법들은 생체분자를 시각적으로 검출하기 위한 방법을 포함하며, 상기 방법은

[0020] (a) 개시된 화합물 중 어느 하나를 하나 이상의 생체분자와 혼합하는 단계; 및

[0021] (b) 상기 화합물을 이의 시각적 성질들에 의해 검출하는 단계

[0022] 를 포함한다.

[0023] 다른 양태는 개시된 화합물 중 어느 하나 및 하나 이상의 생체분자를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 하나 이상의 생체분자를 검출하기 위한 분석 방법에서의 이러한 조성물의 용도가 또한 제공된다.

[0024] 본 발명의 이들 및 다른 측면은 하기 상세한 설명을 참조로 분명할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025]

도면에서, 동일한 참조 번호는 유사한 요소들을 식별한다. 도면에서 요소들의 크기 및 상대적 위치는 반드시 일정한 비로 그려지는 것은 아니며, 이들 요소들 중 일부는 임의로 확대되어 도면의 가독성을 개선시키기 위해 배치된다. 또한, 그려진 요소들의 특정 형상은 특정 요소들의 실제 형상에 관한 임의의 정보를 전달하려는 것이 아니며, 도면에서 용이한 인식을 위해서만 선택되었다.

도 1은 비교용 염료 화합물에 대한 UV 흡광 스펙트럼을 제공한다.

도 2는 비교용 염료 화합물에 대한 형광 발광 스펙트럼의 오버레이(overlay)이다.

도 3은 예시적인 염료 화합물에 대한 UV 흡광 스펙트럼을 나타낸다.

도 4는 도 3의 염료 화합물에 대한 형광 발광 스펙트럼을 도시한다.

도 5는 대표적인 염료 화합물의 UV 흡광 스펙트럼의 또 다른 오버레이이다.

도 6은 대표적인 염료 화합물에 대한 형광 발광 스펙트럼을 도시한다.

도 7은 모(parent) 형광단에 대한 대표적인 염료 화합물에 대한 형광 발광 스펙트럼의 또 다른 오버레이를 제공한다.

도 8은 모 형광단에 대한 대표적인 염료 화합물에 대한 형광 발광 스펙트럼의 또 다른 오버레이이다.

도 9는 모 형광 물질에 대한 대표적인 화합물의 추가의 형광 발광 스펙트럼을 제공한다.

도 10a 및 10b는 세포의 스파이크(spike) 및 회수 검정으로부터의 용량 의존적 데이터를 제공한다.

도 11a 및 11b는 DNA 삽입된 7-AAD를 사용하여 염료 염색된 생존/죽은 세포 게이팅(live/dead gating)을 연관시키는 유동 세포계측법 데이터를 제공한다.

도 12는 막 투과성의 단계적 상태와 연관되는 생존능 기울기(vitality gradient)를 보여주는 유동 세포계측법 데이터를 제공한다.

도 13은 2종의 상이한 배양물 및 형태학적(morphology) 해석 사이의 생존능 상태의 민감성 검출을 도시한다.

도 14a 및 14b는 죽은 세포에서 발견된 유사분열의 패턴을 도시한다.

도 15a 및 도 15b는 죽은 세포 및 아폽토시스성 세포의 증식 효과의 패턴을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026]

하기 설명에서, 특정 구체적 세부 사항은 본 발명의 다양한 양태의 완전한 이해를 제공하기 위해 제시된다. 그러나, 당해 기술분야의 숙련가는 본 발명이 이들 세부 사항 없이 실시될 수 있음을 이해할 것이다.

[0027]

문맥상 달리 요구되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위 전반에 걸쳐, 단어 "포함한다" 및 이의 변형, 예를 들면, "포함한다" 및 "포함하는"는 개방, 포괄적 의미, 즉 "을 포함하지만, 이로써 제한되지 않는"으로 해석되어야 한다.

[0028]

본 명세서 전반에 걸쳐 "한 양태(one embodiment)" 또는 "하나의 양태(an embodiment)"에 대한 언급은 양태와 관련하여 기재된 특정의 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 양태에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에 걸쳐 다양한 장소에서 어구 "한 양태에서" 또는 "하나의 양태에서"의 출현이 반드시 모두 동일한 양태를 지칭하고 있는 것은 아니다. 또한, 특정의 특징, 구조, 또는 특성은 하나 이상의 양태에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다.

[0029]

"아미노"는 $-\text{NH}_2$ 그룹을 나타낸다.

[0030]

"카복시"는 $-\text{CO}_2\text{H}$ 그룹을 나타낸다.

[0031]

"시아노"는 $-\text{CN}$ 그룹을 나타낸다.

[0032]

"포밀"은 $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ 그룹을 나타낸다.

[0033]

"하이드록시" 또는 "하이드록실"은 $-\text{OH}$ 그룹을 나타낸다.

[0034]

"이미노"는 $=\text{NH}$ 그룹을 나타낸다.

- [0035] "니트로"는 $-NO_2$ 그룹을 나타낸다.
- [0036] "옥소"는 $=O$ 치환체 그룹을 나타낸다.
- [0037] "설프하이드릴"은 $-SH$ 그룹을 나타낸다.
- [0038] "티옥소"는 $=S$ 그룹을 나타낸다.
- [0039] "알킬"은 1 내지 12개 탄소 원자(C_1-C_{12} 알킬), 바람직하게는 1 내지 8개 탄소 원자(C_1-C_8 알킬) 또는 1 내지 6개 탄소 원자(C_1-C_6 알킬)를 갖는, 포화 또는 불포화(즉, 1개 이상의 이중 및/또는 삼중 결합을 함유하는)되고, 단일 결합에 의해 분자의 나머지에 부착되어 있는, 탄소 및 수소 원자로만 이루어진 선형 또는 분지형 탄화수소 쇄 그룹, 예를 들면, 메틸, 에틸, n -프로필, 1-메틸에틸(이소-프로필), n -부틸, n -펜틸, 1,1-디메틸에틸(t -부틸), 3-메틸헥실, 2-메틸헥실, 에테닐, 프로프-1-에닐, 부트-1-에닐, 펜트-1-에닐, 펜타-1,4-디에닐, 에티닐, 프로피닐, 부티닐, 펜티닐, 헥시닐 등을 나타낸다. "알케닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 알킬이다. "알키닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 알킬이다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 알킬, 알케닐 및 알키닐 그룹은 임의로 치환된다.
- [0040] "알킬렌" 또는 "알킬렌 쇄"는 분자의 나머지를 치환체 그룹에 연결하는, 포화 또는 불포화(즉, 1개 이상의 이중 및/또는 삼중 결합을 함유하는)된, 탄소 및 수소 원자로만 이루어지며, 1 내지 12개 탄소 원자를 갖는, 선형 또는 분지형 2가 탄화수소 쇄, 예를 들면, 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, n -부틸렌, 에테닐렌, 프로페닐렌, n -부테닐렌, 프로피닐렌, n -부티닐렌 등을 나타낸다. "알케닐렌"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 알킬렌이다. "알키닐렌"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 알킬렌이다. 알킬렌 쇄는 단일 또는 이중 결합을 통해 분자의 나머지에 그리고 단일 또는 이중 결합을 통해 치환체 그룹에 부착된다. 알킬렌 쇄의 분자의 나머지 및 치환체 그룹으로의 부착점은 쇄 내에 1개 탄소 또는 임의의 2개 탄소를 통해서일 수 있다. 본 명세서에서 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 알킬렌, 알케닐렌 및 알키닐렌은 임의로 치환된다.
- [0041] "알킬에테르"는 상기 정의된 바와 같은 임의의 알킬 그룹을 나타내고, 여기서 적어도 하나의 탄소-탄소 결합은 탄소-산소 결합으로 대체된다. 탄소-산소 결합은 말단 단부(알콕시 그룹에서와 같이) 상에 있을 수 있거나 탄소 산소 결합은 내부(즉, $C-O-C$)일 수 있다. 알킬에테르는 적어도 1개의 탄소 산소 결합을 포함하나, 하나 초과를 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)은 알킬에테르의 의미 내에 포함된다. 본 명세서에서 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 알킬에테르 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들면, 일부 양태에서 알킬에테르는 알콜 또는 포스페이트로 치환된다.
- [0042] "알콕시"는 화학식 $-OR_a$ 의 그룹을 나타내고, 여기서 R_a 는 1 내지 12개 탄소 원자를 함유하는 상기 정의된 바와 같은 알킬 그룹이다. 본 명세서에서 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 알콕시 그룹은 임의로 치환된다.
- [0043] "헤테로알킬렌"은 적어도 하나의 헤테로 원자(예를 들면, N, O 또는 S)를 포함하는 알킬렌 그룹을 나타낸다. 일부 양태에서, 헤테로 원자는 알킬렌 쇄 내에 존재한다(즉, 헤테로알킬렌은 적어도 하나의 탄소-헤테로 원자-탄소 결합을 포함한다). 다른 양태에서, 헤테로 원자는 알킬렌의 말단에 존재하며 따라서 알킬렌을 분자의 나머지 부분에 결합시키는 역할을 한다(예를 들면, $M_1-H-A-M_2$, 여기서, M_1 및 M_2 는 분자의 부분이고, H는 헤테로 원자이고, A는 알킬렌이다). "헤테로알케닐렌"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 헤테로알킬렌이다. "헤테로알키닐렌"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 헤테로알킬렌이다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 및 헤테로알키닐렌은 임의로 치환된다.
- [0044] 예시적인 헤테로알킬렌 연결기를 아래에 예시한다:
- "C 링커"
- [0045] 상기 C-링커의 다양체는 헤테로알킬렌 링커의 다양한 양태에 포함된다.
- [0046] "헤테로원자성 링커"와 관련하여 "헤테로원자성"은 하나 이상의 헤테로 원자로 이루어진 링커 그룹을 나타낸다. 예시적인 헤테로원자성 링커는 O, N, P 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택된 단일 원자, 및 다중 헤테로 원자, 예를 들면, 화학식 $-P(O^-)(=O)O^-$ 또는 $-OP(O^-)(=O)O^-$ 를 갖는 링커 및 다양체 및 이들의 조합을 포함한다.

- [0048] "포스페이트"는 $-OP(=O)(R_a)R_b$ 그룹을 나타내고, 여기서 R_a 는 OH , O^- 또는 OR_c 이고; R_b 는 OH , O^- , OR_c , 티오포스페이트 그룹 또는 추가의 포스페이트 그룹이고, 여기서, R_c 는 짹이온(예를 들면, Na^+ 등)이다.
- [0049] "포스포알킬"은 $-OP(=O)(R_a)R_b$ 그룹을 나타내고, 여기서, R_a 는 OH , O^- 또는 OR_c 이고; R_b 는 $-O$ 알킬이고, 여기서 R_c 는 짹이온(예를 들면, Na^+ 등)이다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 포스포알킬 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들면, 특정 양태에서, 포스포알킬 그룹 내의 $-O$ 알킬 모이어티는 1개 이상의 하이드록실, 아미노, 셀프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르로 임의로 치환된다.
- [0050] "포스포알킬에테르"는 $-OP(=O)(R_a)R_b$ 그룹을 나타내고, 여기서, R_a 는 OH , O^- 또는 OR_c 이고; R_b 는 $-O$ 알킬에테르이고, 여기서 R_c 는 짹이온(예를 들면, Na^+ 등)이다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 포스포알킬에테르 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들면, 특정 양태에서, 포스포알킬에테르 그룹 내의 $-O$ 알킬에테르 모이어티는 1개 이상의 하이드록실, 아미노, 셀프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르로 임의로 치환된다.
- [0051] "티오포스페이트"는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 그룹을 나타내고, 여기서, R_a 는 O 또는 S 이고; R_b 는 OH , O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고; R_c 는 OH , SH , O^- , S^- , OR_d , SR_d , 포스페이트 그룹 또는 추가의 티오포스페이트 그룹이고, 여기서, R_d 는 짹이온(예를 들면, Na^+ 등)이며, 단, i) R_a 는 S 이거나; ii) R_b 는 S^- 또는 SR_d 이거나; iii) R_c 는 SH , S^- 또는 SR_d 이거나; iv) i), ii) 및/또는 iii)의 조합이다.
- [0052] "티오포스포알킬"은 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 그룹을 나타내고, 여기서, R_a 는 O 또는 S 이고; R_b 는 OH , O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고; R_c 는 $-O$ 알킬이고, 여기서 R_d 는 짹이온(예를 들면, Na^+ 등)이며, 단, R_a 는 S 이거나, R_b 는 S^- 또는 SR_d 이거나; 단, R_a 는 S 이고, R_b 는 S^- 또는 SR_d 이다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 티오포스포알킬 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들면, 특정 양태에서, 티오포스포알킬 그룹 내의 $-O$ 알킬 모이어티는 1개 이상의 하이드록실, 아미노, 셀프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르로 임의로 치환된다.
- [0053] "티오포스포알킬에테르"는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 그룹을 나타내고, 여기서, R_a 는 O 또는 S 이고; R_b 는 OH , O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고; R_c 는 $-O$ 알킬에테르이고, 여기서 R_d 는 짹이온(예를 들면, Na^+ 등)이며, 단, R_a 는 S 이거나, R_b 는 S^- 또는 SR_d 이거나; 단, R_a 는 S 이고, R_b 는 S^- 또는 SR_d 이다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 티오포스포알킬에테르 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들면, 특정 양태에서, 티오포스포알킬 그룹 내의 $-O$ 알킬에테르 모이어티는 1개 이상의 하이드록실, 아미노, 셀프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르로 임의로 치환된다.
- [0054] "카보사이클릭"은 3 내지 18개의 탄소 원자를 포함하는 안정한 3 내지 18원의 방향족 또는 비방향족 환을 나타낸다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 카보사이클릭 환은 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있으며, 융합 또는 브릿징된 환 시스템을 포함할 수 있으며, 일부 또는 전부 포화될 수 있다. 비-방향족 카보사이클릭 라디칼은 사이클로알킬을 포함하고, 방향족 카보사이클릭 라디칼은 아릴을 포함한다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 카보사이클릭 그룹은 임의로 치환된다.
- [0055] "사이클로알킬"은 3 내지 15개의 탄소 원자, 바람직하게는 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는, 융합 또는 브릿징된 환 시스템 포함할 수 있으며, 포화 또는 불포화되고 단일 결합에 의해 분자의 나머지에 부착되는, 안정한 비방향족 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 카보사이클릭 환을 나타낸다. 모노사이클릭 사이클로알킬은, 예를 들면, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 및 사이클로옥틸을 포함한다. 폴리사이클릭 사이클로알킬은, 예를 들면, 아다만틸, 노보닐, 테칼리닐, 7,7-디메틸-바이사이클로-[2.2.1]헵타닐

등을 포함한다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 사이클로알킬 그룹은 임의로 치환된다.

[0056] "아릴"은 적어도 하나의 카보사이클릭 방향족 환을 포함하는 환 시스템을 나타낸다. 일부 양태에서, 아릴은 6 내지 18개의 탄소 원자를 포함한다. 아릴 환은 융합 또는 브릿징된 환 시스템을 포함할 수 있는, 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있다. 아릴은 아세안트릴렌, 아세나프틸렌, 아세페난트릴렌, 안트라센, 아줄렌, 벤젠, 크리센, 플루오르안텐, 플루오렌, *as*-인다센, *s*-인다센, 인단, 인덴, 나프탈렌, 페닐렌, 페난트렌, 플레이아멘, 피렌, 및 트리페닐렌으로부터 유도된 아릴을 포함하지만, 이로써 제한되지 않는다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 아릴 그룹은 임의로 치환된다.

[0057] "헤테로사이클릭"은 1 내지 12개 탄소 원자 및 질소, 산소 및 황으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 내지 6개 헤테로 원자를 포함하는 안정한 3 내지 18원 방향족 또는 비방향족 환을 나타낸다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 헤테로사이클릭 환은 융합 또는 브릿징된 환 시스템을 포함할 수 있는, 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있으며; 헤테로사이클릭 환 내의 질소, 탄소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있으며; 질소 원자는 임의로 4급화될 수 있고; 헤�테로사이클릭 환은 일부 또는 전부 포화될 수 있다. 방향족 헤�테로사이클릭 환의 예는 하기 헤테로아릴(즉, 헤테로아릴은 헤테로사이클릭의 서브세트임)의 정의에 열거되어 있다. 비방향족 헤�테로사이클릭 환의 예는 디옥솔라닐, 티에닐[1,3]디티아닐, 데카하이드로이소퀴놀릴, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 이소티아졸리디닐, 이속사졸리디닐, 모르폴리닐, 옥타하이드로인돌릴, 옥타하이드로이소인돌릴, 2-옥소피페라지닐, 2-옥소피페리디닐, 2-옥소피롤리디닐, 옥사졸리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 피라졸리디닐, 피라졸로피리미디닐, 퀴누클리디닐, 티아졸리디닐, 테트라하이드로푸릴, 트리옥사닐, 트리티아닐, 트리아지나닐, 테트라하이드로피라닐, 티오모르폴리닐, 티아모르폴리닐, 1-옥소-티오모르폴리닐, 및 1,1-디옥소-티오모르폴리닐을 포함하지만, 이로써 제한되지 않는다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 헤�테로사이클릭 그룹은 임의로 치환된다.

[0058] "헤테로아릴"은 1 내지 13개 탄소 원자, 질소, 산소 및 황으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 내지 6개 헤테로 원자, 및 적어도 하나의 방향족 환을 포함하는 5 내지 14원 환 시스템을 나타낸다. 본 발명의 목적을 위해, 헤테로아릴 라디칼은 융합 또는 브릿징된 환 시스템을 포함할 수 있는, 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있고; 헤�테로아릴 라디칼 내의 질소, 탄소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있고; 질소 원자는 임의로 4급화될 수 있다. 예는 아제피닐, 아크리디닐, 벤즈이미다졸릴, 벤즈티아졸릴, 벤즈인돌릴, 벤조디옥솔릴, 벤조푸라닐, 벤조옥사졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조티아디아졸릴, 벤조[b][1,4]디옥세피닐, 1,4-벤조디옥사닐, 벤조나프토푸라닐, 벤족사졸릴, 벤조디옥솔릴, 벤조디옥시닐, 벤조피라닐, 벤조피라노닐, 벤조푸라닐, 벤조푸라노닐, 벤조티에닐(벤조티오페닐), 벤조트리아졸릴, 벤조[4,6]이미다조[1,2-a]피리디닐, 벤족사졸리노닐, 벤즈이미다졸티오닐, 카바졸릴, 신놀리닐, 디벤조푸라닐, 디벤조티오페닐, 푸라닐, 푸라노닐, 이소티아졸릴, 이미다졸릴, 인다졸릴, 인돌릴, 인다졸릴, 이소인돌릴, 인돌리닐, 이소인돌리닐, 이소퀴놀릴, 인돌리지닐, 이속사졸릴, 나프티리디닐, 옥사디아졸릴, 2-옥소아제피닐, 옥사졸릴, 옥시라닐, 1-옥시도피리디닐, 1-옥시도피리미디닐, 1-옥시도피라지닐, 1-옥시도피리다지닐, 1-페닐-1H-피롤릴, 페나지닐, 페노티아지닐, 페녹사지닐, 프탈라지닐, 프테리디닐, 프테리디노닐, 푸리닐, 피롤릴, 피라졸릴, 피리디닐, 피리디노닐, 피라지닐, 피리미디닐, 피리미디노닐, 피리다지닐, 피롤릴, 피리도[2,3-d]피리미디노닐, 퀴나졸리닐, 퀴나졸리노닐, 퀴녹살리닐, 퀴녹살리노닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 테트라하이드로퀴놀리닐, 티아졸릴, 티아디아졸릴, 티에노[3,2-d]피리미딘-4-노닐, 티에노[2,3-d]피리미딘-4-노닐, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 트리아지닐, 및 티오페닐(즉, 티에닐)을 포함하지만, 이로써 제한되지 않는다. 본 명세서에 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 헤�테로아릴 그룹을 임의로 치환된다.

[0059] "융합된"은 적어도 2개의 환을 포함하는 환 시스템을 나타내며, 여기서, 2 개의 환은 적어도 하나의 공통 환 원자, 예를 들면, 2개의 공통 환 원자를 공유한다. 융합된 환이 헤�테로사이클릴 환 또는 헤�테로아릴 환인 경우, 공통 환 원자(들)는 탄소 또는 질소일 수 있다. 융합된 환은 바이사이클릭, 트리사이클릭, 테트라사이클릭 등을 포함한다.

[0060] 본원에 사용된 용어 "치환된"은 상기 그룹들 중 어느 하나(예를 들면, 알킬, 알케닐, 알키닐, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌, 알콕시, 알킬에테르, 포스페이트, 포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스페이트, 티오포스포알킬, 티오포스포알킬에테르, 카보사이클릭, 사이클로알킬, 아릴, 헤�테로사이클릭 및/또는 헤테로아릴)를 의미하고, 여기서, 적어도 하나의 수소 원자(예를 들면, 1, 2, 3 또는 모든 수소 원자)는, 예를 들면, 할로겐 원자, 예를 들면, F, Cl, Br, 및 I; 하이드록실 그룹, 알콕시 그룹, 및 에스테르 그룹과 같은 그룹 중의 산소 원자; 티올 그룹, 티오알킬 그룹, 설휴 그룹, 설포

닐 그룹, 및 셀록사이드 그룹과 같은 그룹 내의 황 원자; 아민, 아미드, 알킬아민, 디알킬아민, 아릴아민, 알킬아릴아민, 디아릴아민, N-옥사이드, 이미드, 및 엔아민과 같은 그룹 내의 질소 원자; 트리알킬실릴 그룹, 디알킬아릴실릴 그룹, 알킬디아릴실릴 그룹, 및 트리아릴실릴 그룹과 같은 그룹 내의 규소 원자; 및 다양한 다른 그룹 내의 다른 혼합으로 원자이지만, 이에 제한되지 않는 수소 원자가 아닌 원자에 대한 결합에 의해 대체된다. 예를 들면, "치환된"은 또한 상기 그룹 중 어느 하나를 의미하며, 여기서 1개 이상의 수소 원자는 혼합으로 원자, 예를 들면, 옥소, 카보닐, 카복실, 및 에스테르 그룹 내의 산소; 및 이민, 옥심, 하이드라존, 및 니트릴과 같은 그룹 내의 질소에 대한 고위 결합(higher-order bond)(예를 들면, 이중- 또는 삼중 결합)에 의해 대체된다. 예를 들면, "치환된"은 상기 그룹 중 어느 하나를 포함하며, 여기서 1개 이상의 수소 원자는 $-NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)R_h$, $-NR_gC(=O)NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)OR_h$, $-NR_gSO_2R_h$, $-OC(=O)NR_gR_h$, $-OR_g$, $-SR_g$, $-SOR_g$, $-SO_2R_g$, $-OSO_2R_g$, $-SO_2OR_g$, $=NSO_2R_g$, 및 $-SO_2NR_gR_h$ 로 대체된다. "치환된"은 또한 상기 그룹 중 어느 하나를 포함하며, 여기서 1개 이상의 수소 원자는 $-C(=O)R_g$, $-C(=O)OR_g$, $-C(=O)NR_gR_h$, $-CH_2SO_2R_g$, $-CH_2SO_2NR_gR_h$ 로 대체된다. 상기에서, R_g 및 R_h 는 동일하거나 상이하고 독립적으로 수소, 알킬, 알콕시, 알킬아미노, 티오알킬, 아릴, 아르알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 할로알킬, 혼합로사이클릴, N-혼합로사이클릴, 혼합로사이클릴알킬, 혼합로아릴, N-혼합로아릴 및/또는 혼합로아릴알킬이다. "치환된"은 추가로, 상기 그룹 중 어느 하나의 그룹 의미하며, 여기서 1개 이상의 수소 원자는 아미노, 시아노, 하이드록실, 이미노, 니트로, 옥소, 티옥소, 할로, 알킬, 알콕시, 알킬아미노, 티오알킬, 아릴, 아르알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 할로알킬, 혼합로사이클릴, N-혼합로사이클릴, 혼합로사이클릴알킬, 혼합로아릴, N-혼합로아릴 및/또는 혼합로아릴알킬 그룹에 대한 결합에 의해 대체된다. 또한, 상기 치환체 각각은 또한 상기 치환체 중 1개 이상으로 임의로 치환될 수 있다.

[0061]

"공액(conjugation)"은 1개의 p-오비탈과 개재 시그마 결합을 가로지르는 또 다른 p-오비탈의 중첩을 나타낸다. 공액은 사이클릭 또는 비사이클릭(acyclic) 화합물에서 발생할 수 있다. "공액도(degree of conjugation)"는 적어도 하나의 p-오비탈과 개재 이중 결합을 가로지르는 다른 p-오비탈의 중첩을 나타낸다. 예를 들면, 1,3-부타디엔은 1의 공액도를 갖는 한편, 벤젠 및 다른 방향족 화합물은 전형적으로 다중 공액도를 갖는다. 형광성 및 유색 화합물은 전형적으로 공액도가 적어도 1이다.

[0062]

"형광"은 특정 주파수의 빛을 흡수하고 상이한 주파수의 빛을 발광할 수 있는 분자를 나타낸다. 형광은 당해 기술분야의 숙련가에게 익히 공지되어 있다.

[0063]

"유색"은 유색 스펙트럼(즉, 적색, 황색, 청색 등) 내에서 빛을 흡수하는 분자를 나타낸다.

[0064]

"링커"는 분자의 부분을 동일 분자의 또 다른 부분에 또는 상이한 분자, 모이어티 또는 고체 지지체(예를 들면, 미세입자)에 연결하는, 적어도 하나의 원자, 예를 들면, 탄소, 산소, 질소, 황, 인 및 이들의 조합의 인접한 쇄를 나타낸다. 링커는 공유 결합 또는 다른 수단, 예를 들면, 이온 결합 또는 수소 결합 상호 작용을 통해 분자를 연결할 수 있다.

[0065]

용어 "생체분자"는 핵산, 탄수화물, 아미노산, 폴리펩티드, 당단백질, 호르몬, 앱타미 및 이들의 혼합물을 포함하는, 다양한 생물학적 물질 중 어느 하나의 물질을 나타낸다. 보다 구체적으로, 용어는 제한 없이 RNA, DNA, 올리고뉴클레오티드, 변형된 또는 유도체화된 뉴클레오티드, 효소, 수용체, 프리온, 수용체 리간드(호르몬 포함), 항체, 항원, 및 독소, 뿐만 아니라 박테리아, 바이러스, 혈액 세포, 및 조직 세포를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 시각적으로 검출가능한 생체분자(즉, 이에 연결된 생체분자를 갖는 화학식 I의 화합물)는, 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 생체분자를 임의의 이용가능한 원자 또는 관능성 그룹, 예를 들면, 생체분자상의 아미노, 하이드록시, 카복실, 또는 셀프하이드릴 그룹을 통해 화합물에 대해 생체분자의 부착을 가능하게 하는 반응성 그룹을 갖는 화합물과 접촉시킴으로써 제조된다.

[0066]

용어 "시각적" 및 "시각적으로 검출가능한"은 본원에 사용되어, 이전의 조명, 또는 화학적 또는 효소적 활성화 없이, 육안 검사에 의해 관찰가능한 물질을 나타낸다. 이러한 시각적으로 검출가능한 물질은 약 300 nm 내지 약 900nm 범위에 이르는 스펙트럼의 영역에서 빛을 흡수하고 발광한다. 바람직하게는, 이러한 물질은, 바람직하게는 적어도 약 $40,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, 보다 바람직하게는 적어도 약 $50,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, 더욱 보다 바람직하게는 적어도 약 $60,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, 더더욱 보다 바람직하게는 적어도 약 $70,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, 가장 바람직하게는 적어도 약 $80,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 의 물 흡광 계수를 갖는 강렬하게 착색된다. 본 발명의 화합물은 육안으로, 또는 흡수 분광광도계, 투과광현미경, 디지털 카메라 및 스캐너를 포함하지만 제한 없이 광학 기반 검출 장치를 활용하여 관찰에 의해 검출될 수 있다. 시각적으로 검출가능한 물질은 가시 스펙트럼에서 빛을 발광 및/또는 흡수하는 것들에 제한되지 않는

다. 자외선(UV) 영역(약 10nm 내지 약 400nm), 적외선(IR) 영역(약 700nm 내지 약 1mm)에서 빛을 발광 및/또는 흡수하는 물질, 및 전자기 스펙트럼의 다른 영역에서 발광 및/또는 흡수하는 물질은 또한 "시각적으로 검출 가능한" 물질의 범주 내에 포함된다.

[0067] 본 발명의 목적을 위해, 용어 "광안정성 가시 염료"는 상기 본원에 정의된 바와 같은, 시각적으로 검출가능하고, 빛에 노출시 상당히 변경되거나 분해되지 않는 화학적 모이어티를 나타낸다. 바람직하게는, 광안정성 가시 염료는 적어도 1시간 동안 빛에 노출된 후 상당한 표백 또는 분해를 나타내지 않는다. 보다 바람직하게는, 가시 염료는 적어도 12시간, 더욱 보다 바람직하게는 적어도 24시간, 더더욱 바람직하게는 적어도 1주, 가장 바람직하게는 적어도 1개월 동안 빛에 노출 후 안정하다. 본 발명의 화합물 및 방법에서 사용하기에 적합한 광안정성 가시 염료의 비제한적 예는 아조 염료, 티오인디고 염료, 퀴나크리돈 안료, 디옥사진, 프탈로시아닌, 페리논, 디케토페롤로피롤, 퀴노프탈론, 및 트리아릴카보늄을 포함한다.

[0068] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "페릴렌 유도체"는 시각적으로 검출가능한 임의의 치환된 페릴렌을 포함하고자 하는 것이다. 그러나, 상기 용어는 페릴렌 자체를 포함하고자 하는 것은 아니다. 용어 "안트라센 유도체", "나프탈렌 유도체", 및 "페렌 유도체"는 유사하게 사용된다. 일부 바람직한 양태에서, 유도체(예를 들면, 페릴렌, 페렌, 안트라센 또는 나프탈렌 유도체)는 페릴렌, 안트라센, 나프탈렌, 또는 페렌의 이미드, 비스이미드 또는 하이드라잡이미드 유도체이다.

[0069] 본 발명의 시각적으로 검출가능한 분자는 특정 분석물(예를 들면, 생체분자)의 존재, 위치 또는 양을 결정할 필요가 있는 생화학 및 생물의학 적용과 같은 매우 다양한 분석 적용에 유용하다. 따라서, 또 다른 양상에서, 본 발명은 (a) 생물계(biological system)에 생체분자에 연결된 화학식 I의 화합물을 포함하는 시각적으로 검출가능한 생체분자를 제공하는 단계; 및 (b) 상기 생체분자를 이의 시각적 성질들에 의해 검출하는 단계를 포함하는, 생체분자를 시각적으로 검출하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 목적을 위해, 어구 "생체분자를 이의 시각적 성질들에 의해 검출하는 것"은 생체분자가, 조명 또는 화학적 또는 효소적 활성화 없이, 육안으로, 또는 흡수 분광광도계, 투과광 현미경, 디지털 카메라 및 스캐너를 제한 없이 포함하는, 광학 기반 검출 장치를 활용하여 관찰됨을 의미한다. 농도계(densitometer)는 존재하는 시각적으로 검출가능한 생체분자의 양을 정량하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 두 샘플 중의 생체분자의 상대적 양은 상대 광학 밀도를 측정함으로써 결정될 수 있다. 생체분자당 염료 분자의 화학량론이 알려져 있고, 염료 분자의 흡광 계수가 알려진 경우라면, 생체분자의 절대 농도가 또한 광학 밀도의 측정으로부터 결정될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생물계"는 사용되어 시각적으로 검출가능한 생체분자 이외에도 하나 이상의 생체분자를 포함하는 임의의 용액 또는 혼합물을 나타낸다. 이러한 생물계의 비제한적 예는 세포, 세포 추출물, 조직 샘플, 전기영동 젤, 검정용 혼합물, 및 혼성화 반응 혼합물을 포함한다.

[0070] "고체 지지체"는 분자의 고체상 지지체에 대해 당업계에 공지된 임의의 고체 기질을 나타내며, 예를 들면, "미세입자"는 유리 비드, 자성 비드, 중합체성 비드, 비중합체성 비드 등을 포함하지만, 이로써 제한되지 않는 본 발명의 화합물에 부착하기에 유용한 다수의 작은 입자 중 어느 하나를 나타낸다. 특정 양태에서, 미세입자는 폴리스티렌 비드를 포함한다.

[0071] "염기 쌍형성(pairing) 모이어티"는 수소 결합을 통해 상보적 헤테로사이클릭 모이어티와 혼성화할 수 있는 헤테로사이클릭 모이어티(예를 들면, 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍형성)를 나타낸다. 염기 쌍형성 모이어티는 천연 및 비천연 염기를 포함한다. 염기 쌍형성 모이어티의 비제한적 예는 RNA 및 DNA 염기, 예를 들면, 아데노신, 구아노신, 티미딘, 시토신 및 우리딘 및 이들의 유사체이다.

[0072] 본원에 개시된 발명의 양태는 또한 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자로 대체된 1개 이상의 원자를 가짐으로써 동위원소로 표지된 화학식 I의 모든 화합물을 포함하고자 한다. 개시된 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 불소, 염소, 및 요오드의 동위원소, 예를 들면, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I , 및 ^{125}I 각각을 포함한다.

[0073] 화학식 I의 동위원소로 표지된 화합물은 일반적으로 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 통상적인 기법에 의해 또는 이하에 기재된 것들과 유사한 공정에 의해 및 이전에 사용된 비표지된 시약 대신에 적절한 동위원소로 표지된 시약을 사용한 하기 실시예에서 제조될 수 있다.

[0074] "안정한 화합물" 및 "안정한 구조"는 반응 혼합물로부터 유용한 정도의 순도로의 단리, 및 효과적인 치료제로의 제형화를 존속시키기에 충분히 견고한 화합물을 나타내고자 한다.

- [0075] "임의의" 또는 "임의로"는 후속적으로 기재된 사건 또는 상황이 일어나거나 일어나지 않을 수 있고, 본 기재는 상기 사건 또는 상황이 일어나는 경우, 그리고 일어나지 않는 경우를 포함함을 의미한다. 예를 들면, "임의로 치환된 알킬"은 알킬 그룹이 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있고 본 기재는 치환된 알킬 그룹 및 치환되지 않은 알킬 그룹 둘 다를 포함함을 의미한다.
- [0076] "염"은 산 및 염기 부가염 둘 다를 포함한다.
- [0077] "산 부가염"은, 예를 들면, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등이나 이에 제한되지 않는 무기 산, 및 예를 들면, 아세트산, 2,2-디클로로아세트산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산, 아스파르트산, 벤젠설폰산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 캄포르산, 캄포르-10-설폰산, 카프르산, 카프로산, 카프릴산, 탄산, 신남산, 시트르산, 사이클람산, 도데실설푸르산, 에탄-1,2-디설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 포름산, 푸마르산, 갈락타르산, 젠티스산, 글루코헵تون산, 글루콘산, 글루쿠론산, 글루탐산, 글루타르산, 2-옥소-글루타르산, 글리세로인산, 글리콜산, 히푸르산, 이소부티르산, 락트산, 락토비온산, 라우르산, 말레산, 말산, 말론산, 만델산, 메탄설폰산, 점액산, 나프탈렌-1,5-디설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, 1-하이드록시-2-나프토산, 니코틴산, 올레산, 오로트산, 옥실산, 팔미트산, 파모산, 프로피온산, 피로글루탐산, 피루브산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 세박산, 스테아르산, 석신산, 타르타르산, 티오시안산, p-톨루엔설폰산, 트리플루오로아세트산, 운데실렌산 등이나 이로써 제한되지 않는 유기 산으로 형성되는 이러한 염을 나타낸다.
- [0078] "염기 부가염"은 유리 산에 무기 염기 또는 유기 염기를 첨가하여 제조되는 이러한 염을 나타낸다. 무기 염기로부터 유래된 염은 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄 염 등을 포함하지만, 이로써 제한되지 않는다. 유기 염기로부터 유래된 염은, 1급, 2급, 및 3급 아민, 자연 발생 치환된 아민을 포함한 치환 아민, 사이클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지, 예를 들면, 암모니아, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 디에탄올아민, 에탄올아민, 데아놀, 2-디메틸아미노에탄올, 2-디에틸아미노에탄올, 디사이클로헥실아민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 하이드라바민, 콜린, 베타인, 베네타민, 벤자린, 에틸렌디아민, 글루코스아민, 메틸글루카민, 테오브로민, 트리에탄올아민, 트로메타민, 퓨린, 피페라진, 피페리딘, N-에틸피페리딘, 폴리아민 수지 등의 염을 포함하지만, 이로써 제한되지 않는다. 특히 바람직한 유기 염기는 이소프로필아민, 디에틸아민, 에탄올아민, 트리메틸아민, 디사이클로헥실아민, 콜린 및 카페인이다.
- [0079] 종종 결정화는 본 발명의 화합물을 용매화물을 생성한다. 본 발명은 기재된 화합물의 모든 용매화물을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "용매화물"은 용매의 하나 이상의 분자와 본 발명의 화합물의 하나 이상의 분자를 포함하는 집합체를 지칭한다. 용매는 물일 수 있으며, 이 경우에 용매화물은 수화물 일 수 있다. 대안으로, 용매는 유기 용매일 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 일수화물, 이수화물, 반수화물, 세스퀴수화물, 삼수화물, 사수화물 등을 포함한 수화물, 뿐만 아니라 상응하는 용매화된 형태로서 존재할 수 있다. 본 발명의 화합물은 진정한 용매화물일 수 있으며, 한편 다른 경우에 본 발명의 화합물은 단지 외래성 (adventitious) 물 또는 또 다른 용매를 보유하거나 물과 일부 외래성 용매의 혼합물일 수 있다.
- [0080] 본 발명의 화합물 또는 이의 염, 토토머 또는 용매화물은 1개 이상의 비대칭 중심을 함유할 수 있고, 따라서 절대 입체화학의 면에서 (R)- 또는 (S)-로서, 또는 아미노산에 대해서는 (D)- 또는 (L)-로서 정의될 수 있는, 예난티오머, 부분입체이성체, 및 다른 입체이성체를 야기할 수 있다. 본 발명은 모든 이러한 가능한 이성체, 뿐만 아니라 이의 라세미 및 광학적으로 순수한 형태를 포함하고자 한다. 광학 활성 (+) 및 (-), (R)- 및 (S)-, 또는 (D)- 및 (L)-이성체는 키랄 신톤 또는 키랄 시약을 사용하여 제조되거나, 통상적인 기법, 예를 들면, 크로마토그래피 및 분별 결정을 사용하여 분할될 수 있다. 개개 예난티오머의 제조/단리를 위한 통상적인 기법은 적합한 광학적으로 순수한 전구체로부터의 키랄 합성 또는 라세미체(또는 염 또는 유도체의 라세미체)의 분할(예를 들면, 키랄 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용)을 포함한다. 본원에 기재된 화합물이 올레핀성 이중 결합 또는 기하학적 비대칭의 다른 중심을 함유한 경우, 그리고 달리 구체화되지 않는 한, 화합물은 E 및 Z 기하이성체 둘 다를 포함하는 것으로 의도한다. 마찬가지로, 모든 토토머 형태가 또한 포함되는 것으로 의도된다.
- [0081] "입체이성체"는 동일 결합에 의해 결합된 동일 원자로 이루어지나 교체가능하지 않은 상이한 3차원 구조를 갖는 화합물을 나타낸다. 본 발명은 다양한 입체이성체 및 이들의 혼합물을 고려하고, 이 분자가 서로의 겹쳐질 수 없는 거울상인 두개의 입체이성체를 지칭하는 "예난티오머"를 포함한다.
- [0082] "토토머"는 분자의 한 원자에서 동일 분자의 또 다른 원자로의 양성자 이동을 나타낸다. 본 발명은 임의의 상기 화합물의 토토머를 포함한다. 화합물의 다양한 토토머 형태는 당해 기술분야의 숙련가에 의해 용이하게 유

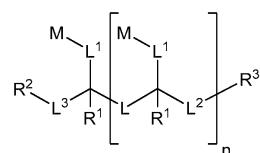
래 가능하다.

[0083] 본원에 사용된 화학 명명 프로토콜 및 구조 다이어그램은 ACD/명명(Name) 버전 9.07 소프트웨어 프로그램 및/또는 켐드로우(ChemDraw) 버전 11.0 소프트웨어 명명 프로그램(캠브릿지소프트(CambridgeSoft))을 이용하는, I.U.P.A.C. 명명법 시스템의 변형 형태이다. 당해 기술분야의 숙련가에게 친숙한 속명이 또한 사용된다.

[0084] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 한 양태에서, 다양한 분석 방법들에서 형광 및/또는 유색 염료로서 유용한 화합물이 제공된다. 일반적으로, 본 발명의 양태는 형광 및/또는 유색 모이어티의 이량체 및 고급 중합체에 관한 것이다. 형광 및/또는 유색 모이어티는 분석이 수행되는 pH에서 다수의 양으로 하전된 모이어티 또는 다수의 음으로 하전된 모이어티를 갖는 링커에 의해 연결된다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니라, 링커 내의 다수의 하전된 모이어티의 정전기적 반발력은 형광 및/또는 유색 모이어티 사이의 충분한 공간적 거리를 유지시켜 분자내 소광이 감소되거나 제거되도록 도와 주며, 이로 인해 높은 몰 "획도"(예를 들면, 높은 형광 발광)를 갖는 염료 화합물이 생성된다고 여겨진다.

[0085] 예를 들면, 음전하가 요구되는 경우 상기 링커는 포스페이트 및/또는 티오 포스페이트 모이어티를 포함할 수 있다. 양전하가 요구되는 경우, 4급 아민 그룹 및/또는 양전하를 보유할 수 있는 다른 그룹을 함유하는 연결기가 사용될 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 화합물을 하기 화학식 A를 갖는다.

[0086] 화학식 A



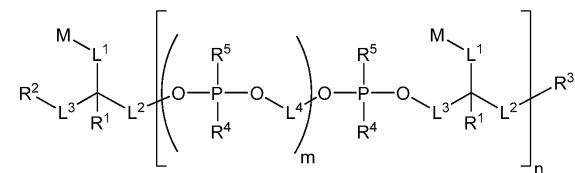
[0087]

[0088] 상기 화학식 A에서,

[0089] L은 다수의 양으로 하전된 모이어티 또는 다수의 음으로 하전된 모이어티를 포함하는 링커이고, 다른 변수들은 화학식 I에 대해 정의된 바와 같다. "하전된 모이어티"란, 모이어티가 특정 pH, 예를 들면, 화합물을 사용하는 분석이 수행되는 pH에서 하전되지만 "하전된 모이어티"가 모든 pH에서 하전되는 것을 요구하지 않는 것으로 이해된다.

[0090] 일부 기타 양태에서, 화합물을 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 입체이성체, 토토며 또는 염을 갖는다.

[0091] 화학식 I



[0092]

[0093] 상기 화학식 I에서,

[0094] M은, 각각의 발생시, 독립적으로 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 1 이상의 공액도를 포함하는 모이어티이고,

[0095] L¹, L² 및 L³은, 각각의 발생시, 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자성 링커이고;

[0096] L⁴는, 각각의 발생시, 독립적으로 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고;

[0097] R¹은, 각각의 발생시, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0098] R² 및 R³은, 각각 독립적으로 H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, -OP(=R_a)(R_b)R_c, Q, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링

커 또는 추가의 화학식 I의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, 여기서, R_a 는 O 또는 S이고; R_b 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고; R_c 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d , SR_d , 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

[0099] R^4 는, 각각의 발생시, 독립적으로 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;

[0100] R^5 는, 각각의 발생시, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 또는 부재하고;

[0101] Q는, 각각의 발생시, 독립적으로 분석물 분자, 고체 지지체 또는 상보적 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이고;

[0102] R^d 는 양이온이고;

[0103] m은, 각각의 발생시, 독립적으로 0 이상의 정수이며, 단, m의 적어도 하나의 발생은 3 이상의 정수이고;

[0104] n은 1 이상의 정수이다.

[0105] 일부 양태에서, m은, 각각의 발생시, 독립적으로 3 이상의 정수이다.

[0106] 일부 양태에서, L^1 , L^2 및 L^3 은, 각각의 발생시, 독립적으로 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커이다.

[0107] 화학식 I의 화합물의 일부 기타 양태에서,

[0108] M은, 각각의 발생시, 독립적으로 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 모이어티이고 공액도가 적어도 1이고;

[0109] L^1 , L^2 및 L^3 은, 각각의 발생시, 독립적으로 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커이고;

[0110] L^4 는, 각각의 발생시, 독립적으로 길이가 최대 20개 원자인 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고;

[0111] R^1 은, 각각의 발생시, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0112] R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로 H, OH, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, 여기서, R_a 는 O 또는 S이고; R_b 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고; R_c 는 OH, SH, O^- , S^- , OR_d , SR_d , 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

[0113] R^4 는, 각각의 발생시, 독립적으로 OH, SH, O^- , S^- , OR_d 또는 SR_d 이고;

[0114] R^5 는, 각각의 발생시, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 또는 부재하고;

[0115] Q는 분석물 분자 또는 고체 지지체와 결합할 수 있는 모이어티이고;

[0116] R_d 는 양이온이고;

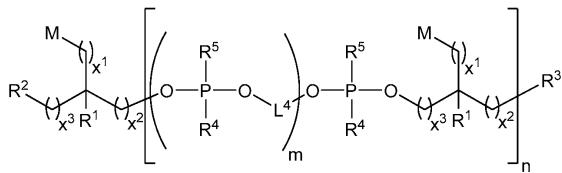
[0117] m은, 각각의 발생시, 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단, m의 적어도 하나의 발생은 3 이상의 정수이고;

[0118] n은 1 이상의 정수이다.

[0119] 일부 양태에서, 화합물은 하기 화학식 IA의 화합물을 갖는다.

[0120]

화학식 IA



[0121]

[0122]

상기 화학식 IA에서,

[0123]

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

[0124]

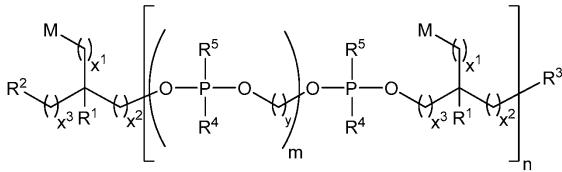
L^4 링커는 바람직한 형광 및/또는 색(형광 및/또는 색 "조정")을 제공하기 위해 다른 변수들과 함께 선택될 수 있다. 일부 양태에서, L^4 는 길이가 최대 20개 원자, 길이가 최대 13개 원자, 예를 들면, 길이가 최대 10개 원자 또는 길이가 최대 6개 원자 링커이다. 특정 양태에서, L^4 는 디설파이드 결합을 포함하지 않는다. 다른 양태에서, L^4 는, 각각의 발생시, 독립적으로 C_1-C_6 알킬렌 또는 C_2-C_6 알키닐렌이다. 일부 양태에서, L^4 는 2개-탄소 링커이다.

[0125]

일부 기타 상이한 양태에서, 화합물은 하기 화학식 IB의 화합물을 갖는다.

[0126]

화학식 IB



[0127]

[0128]

상기 화학식 IB에서,

[0129]

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

[0130]

y는, 각각의 발생시, 독립적으로 1 내지 6의 정수이다.

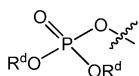
[0131]

상기한 특정 양태에서, y는 2이다. 다른 양태에서, x^1 , x^2 및 x^3 은 각각의 발생시, 각각 1이다. 일부 상이한 양태에서, x^2 는 0이고, x^3 은 각각의 발생시, 1이다.

[0132]

또 다른 양태에서, R^4 는, 각각의 발생시, 독립적으로 OH , O^- 또는 OR_d 이다. " OR_d " 및 " SR_d "는 양이온과 관련된 O^- 및 S^- 를 나타내는 것으로 이해된다. 예를 들면, 포스페이트 그룹의 디나트륨 염은 다음과 같이 나타낼 수 있다:

[0133]



[0134]

상기 화학식에서,

[0135]

 R^d 는 나트륨(Na^+)이다.

[0136]

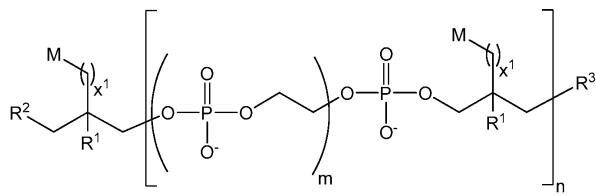
추가의 상기 양태에서, R^5 는, 각각의 발생시, 옥소이다.

[0137]

일부 기타 양태에서, 화합물은 하기 화학식 IB' 또는 화학식 IB"의 화합물 중 하나를 갖는다.

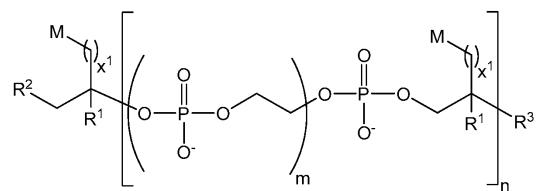
[0138]

화학식 IB'



[0139]

화학식 IB''



[0141]

임의의 상기 양태에서, R¹은 H이다.

[0143]

상이한 양태에서, R² 및 R³은 각각 독립적으로 OH 또는 -OP(=R_a)(R_b)R_c이다. 예를 들면, 일부 양태에서, R² 및 R³은 각각 독립적으로 OH 또는 -OP(=R_a)(R_b)R_c이고, 여기서, R^a는 O이고, R_b는 OH, O⁻ 또는 OR^d이고; R_c는 OH, O⁻, OR^d, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고; R^d는 짹이온이다.

[0144]

기타 상이한 양태에서, R² 또는 R³ 중 하나는 OH 또는 -OP(=R_a)(R_b)R_c이고, R² 또는 R³ 중 다른 하나가 Q이거나 또는 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 예를 들면, 일부 양태에서, R² 또는 R³ 중 하나는 OH 또는 -OP(=R_a)(R_b)R_c이고, R² 또는 R³ 중 다른 하나가 Q이거나 또는 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, 여기서, R^a는 O이고, R_b는 OH, O⁻ 또는 OR^d이고; R_c는 OH, O⁻, OR^d, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고; R^d는 짹이온이다.

[0145]

또 다른 양태에서, Q는 분석물 분자 또는 고체 지지체와 결합할 수 있는 모이어티이거나, 상기 모이어티를 포함한다. 특정 양태에서, Q는 화학식 I의 화합물을 분석물 분자 또는 고체 지지체에 연결시키는 수단을 제공한다 (예를 들면, 공유 결합에 의해). 예를 들면, 일부 양태에서, Q는 분석물 분자 또는 고체 지지체와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹이거나, 상기 반응성 그룹을 포함한다. 이와 관련하여, Q 그룹의 유형 및 Q 그룹의 화학식 I의 화합물의 나머지에 대한 연결성은 제한되지 않는다. 특정 양태에서, Q는 수성 조건하에 가수분해를 일으키지 않지만, 분석물 분자 또는 고체 지지체(예를 들면, 아민) 상의 상응하는 그룹과 결합을 형성하기에 충분히 반응성인 모이어티이다.

[0146]

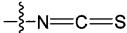
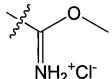
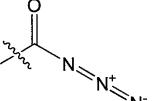
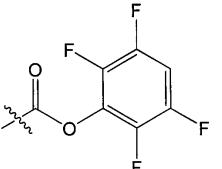
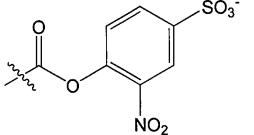
화학식 I의 화합물의 특정 양태는 생체접합 분야에 통상적으로 사용되는 Q 그룹을 포함한다. 예를 들면 일부 양태에서, Q는 친핵성 반응성 그룹, 친전자성 반응성 그룹 또는 부가환화 반응성 그룹이거나, 이를 포함한다. 일부 보다 구체적인 양태에서, Q는 설프하이드릴, 디설파이드, 활성화된 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨, 알켄, 디엔, 친디엔체, 산 할로겐화물, 설포닐 할로겐화물, 포스핀, α-할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이이미드이거나 또는 이를 포함한다. 일부 양태에서, 활성화된 에스테르는 N-석신이미드 에스테르, 이미도에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르이다. 다른 양태에서, 알킨은 알킬 아지드 또는 아실 아지드이다.

[0147]

예시적인 Q 모이어티는 하기 표 1에 제공된다.

표 1

예시적인 Q 모이어티들

구조	부류
	설프하이드릴
	이소티오시아네이트
	이미도에스테르
	아실 아지드
	활성화된 에스테르
	활성화된 에스테르

[0148]

구조	부류
	활성화된 에스테르
	활성화된 에스테르
	활성화된 에스테르
	설포닐 할라이드
	말레이미드

[0149]

구조	부류
	말레이미드
	α -할로이미드
	디설파이드
	포스핀
	아지드
	알케인

[0150]

구조	부류
	비오틴
	디엔
	알케인/친디엔체
	알케인/친디엔체
	아미노

[0151]

- [0152] Q가 SH인 일부 양태에서, SH 모이어티는 화학식 I의 또 다른 화합물 상에 또 다른 설프하이드릴 그룹과의 디설파이드 결합을 형성하는 경향이 있음을 주목해야 한다. 따라서, 일부 양태는 디설파이드 이랑체 형태로 존재하는 화학식 I의 화합물을 포함하며 상기 디설파이드 결합은 SH Q 그룹으로부터 유도된다.
- [0153] 일부 기타 양태에서, R^2 또는 R^3 중 하나는 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나는 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 일부 상이한 양태에서, R^2 또는 R^3 중 하나는 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나는 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, 여기서, R^a 는 O이고, R_b 는 OH, O^- 또는 OR^d 이고; R_c 는 OH, O^- , OR^d , 포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고; R^d 는 짹이온이다. 예를 들면, 일부 양태에서, 분석물 분자는 혼산, 아미노산 또는 이의 중합체이다. 다른 양태에서, 분석물 분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앱타미 또는 프리온이다. 여전히 상이한 양태에서, 고체 지지체는 중합체성 비드 또는 비중합체성 비드이다.
- [0154] 값 형태는 바람직한 형광 및/또는 색상 강도에 기반하여 선택할 수 있는 또 다른 변수이다. 일부 양태에서, M은, 각각의 발생시, 독립적으로 3 내지 10의 정수이다. 다른 실시 양태에서, M은, 각각의 발생시, 독립적으로 7 내지 9의 정수이다.
- [0155] 형광 강도는 상이한 n 값을 선택하여 조정할 수도 있다. 특정 양태에서, n은 1 내지 100의 정수이다. 다른 양태에서, n은 1 내지 10의 정수이다.
- [0156] M은 바람직한 광학 성질들에 기반하여, 예를 들면, 바람직한 색 및/또는 형광 발광 파장에 기반하여 선택된다. 일부 양태에서, M은 각각의 발생시, 동일하지만, M의 각각의 발생시, 동일한 M일 필요는 없고, 특정 양태는 M이 각각의 발생시, 동일하지 않은 화합물을 포함함을 주목하는 것이 중요하다. M은 M 상의 임의의 위치(즉, 원자)로부터 분자의 나머지에 부착될 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가는 M을 분자의 나머지에 부착시키기 위한 수단으로 인식할 것이다.
- [0157] 일부 양태에서, M은 형광성 또는 유색 모이어티이다. 당해 기술분야에 공지되어 있으며 전형적으로 비색계, UV 및/또는 형광 분석에 사용되는 임의의 형광 및/또는 유색 모이어티가 사용될 수 있다. 본 발명의 다양한 양태에 유용한 M 모이어티들의 예는 다음을 포함하지만, 이로써 제한되지 않는다: 크산텐 유도체(예를 들면, 플루오레세인, 로다민, 오레곤 그린(Oregon green), 에오신 또는 텍사스 레드(Texas red)); 시아닌 유도체(예를 들면, 시아닌, 인도카보시아닌, 옥사카보시아닌, 티아카보시아닌 또는 메로시아닌); 세타(Setter), 세타우(SeTau) 및 스퀘어(Square) 염료를 포함하는 스쿠아레인 유도체 및 환-치환된 스쿠아레인; 나프탈렌 유도체(예를 들면, 단실 및 프로단 유도체); 쿠마린 유도체; 옥사디아졸 유도체(예를 들면, 피리딜옥사졸, 니트로벤즈옥사디아졸 또는 벤즈옥사디아졸); 안트라센 유도체(예를 들면, DRAQ5, DRAQ7 및 CyTRAK 오렌지(Orange)를 포함하는 안트라퀴논); 피렌 유도체, 예를 들면, 캐스케이드 블루(cascade blue); 옥사진 유도체(예를 들면, 나일 레드(Nile red), 나일 블루, 크레실 바이올렛, 옥사진 170); 아크리딘 유도체(예를 들면, 프로플라빈, 아크리딘 오렌지, 아크리딘 엘로우); 아릴메틴 유도체: 아우라민, 결정 바이올렛, 말라카이트 그린; 및 테트라피롤 유도체(예를 들면, 포르핀, 프탈로시아닌 또는 빌리루빈). M 모이어티들의 기타 예로 다음을 포함한다: 시아닌 염료, 크산테이트 염료(예를 들면, Hex, Vic, Nedd, Joe 또는 Tet); 야키마 엘로우(Yakima yellow); 레드몬드 레드(Redmond red); 탐라(tamra); 텍사스 레드 및 알렉사 플루오르(alexander fluor)® 염료.
- [0158] 상기 임의의 것 중 또 다른 양태에서, M은 3개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환 또는 이들의 조합, 예를 들면, 4개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환 또는 이들의 조합, 또는 5개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 양태에서, M은 6개의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이의 조합을 포함한다. 추가의 양태에서, 환은 융합된다. 예를 들면, 일부 양태에서, M은 3개 이상의 융합된 환, 4개 이상의 융합된 환, 5개 이상의 융합된 환, 또는 심지어 6개 이상의 융합된 환을 포함한다.
- [0159] 일부 양태에서, M은 사이클릭이다. 예를 들면, 일부 양태에서 M은 카보사이클릭이다. 기타 양태에서, M은 헤테로사이클릭이다. 상기한 임의의 또 다른 양태에서, M은, 각각의 발생시, 독립적으로 아릴 모이어티를 포함한다. 이들 양태의 일부에서, 아릴 모이어티는 멀티사이클릭이다. 기타 보다 구체적인 양태에서, 아릴 모이어티는, 예를 들면, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 심지어 4개 초과의 아릴 환을 포함할 수 있는 융합된-멀티사이클릭 아릴 모이어티이다.

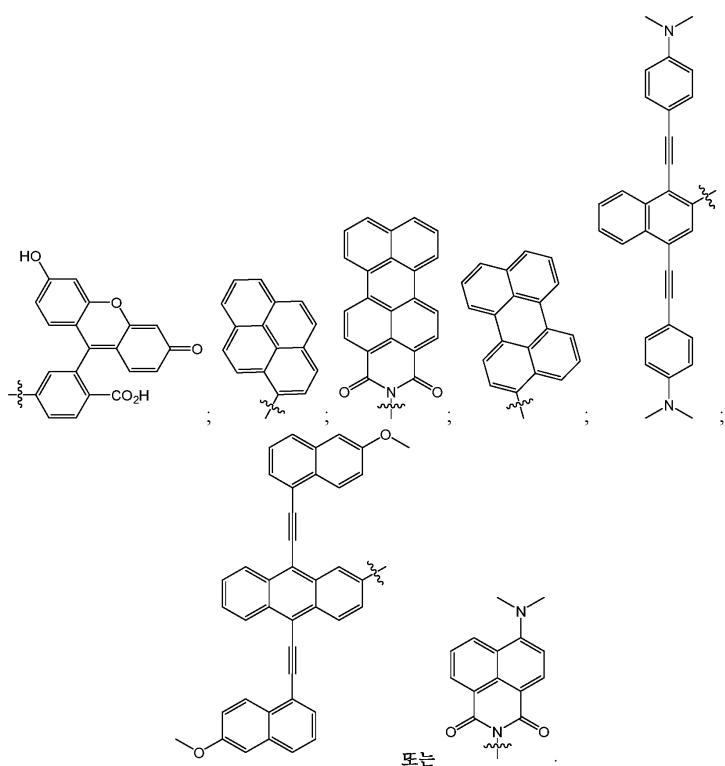
상기 화학식 I의 화합물 중 어느 하나의 다른 양태에서, M은, 각각의 발생시, 독립적으로 적어도 하나의 혜테로 원자를 포함한다. 예를 들면, 일부 양태에서, 혜테로 원자는 질소, 산소 또는 황이다.

모든 상기한 것의 또 다른 양태에서, M은, 각각의 발생시, 독립적으로 적어도 하나의 치환체를 포함한다. 예를 들면, 일부 양태에서, 치환체는 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 하이드록시, 셀프하이드릴, 알콕시, 아릴옥시, 페닐, 아릴, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 이소프로필, t-부틸, 카복시, 셀포네이트, 아미드, 또는 포밀 그룹이다.

상기의 일부 더 구체적인 양태에서, M은, 각각의 발생시, 독립적으로 디메틸아미노스틸벤, 퀴나크리돈, 플루오로페닐-디메틸-BODIPY, his-플루오로페닐-BODIPY, 아크리딘, 테릴렌, 섹시페닐, 포르피린, 벤조페렌, (플루오로페닐-디메틸-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, (비스-플루오로페닐-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, 퀴터페닐, 바이-벤조티아졸, ter-벤조티아졸, 바이-나프틸, 바이-안트라실, 스쿠아레인, 스쿠아릴륨, 9,10-에티닐안트라센 또는 ter-나프틸 모이어티이다. 다른 양태에서, M¹은, 각각의 발생시, 독립적으로 p-테르페닐, 페릴렌, 아조벤젠, 페나진, 페난트롤린, 아크리딘, 티오크산트렌, 크리센, 루브렌, 코로넨, 시아닌, 페릴렌 이미드, 또는 페릴렌 아미드 또는 이들의 유도체이다. 더 추가의 양태에서, M은, 각각의 발생시, 독립적으로 쿠마린 염료, 레조루핀 염료, 디페로메텐보론 디플루오라이드 염료, 루테늄 바이피리딜 염료, 에너지 전달 염료, 티아졸오렌지 염료, 폴리메탄 또는 N-아릴-1,8-나프탈이미드 염료이다.

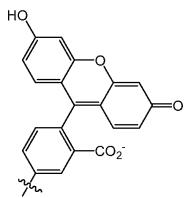
모든 상기한 것의 또 다른 양태에서, M 은, 각각의 발생시, 동일하다. 다른 양태에서, 각각의 M 은 상이하다. 더 추가의 양태에서, 하나 이상의 M 은 동일하고 하나 이상의 M 은 상이하다.

일부 양태에서, M은 피렌, 페릴렌, 페릴렌 모노이미드 또는 6-카복시플루오레세인(6-FAM) 또는 이들의 유도체이다. 일부 기타 양태에서, M^1 은 하기 화학식:



죽 하나를 갖는다

[0167] 일부 기타 양태에서, M¹은 하기 화학식:



[0168]

[0169] 을 갖는다.

[0170] 일부 특정 양태에서, 화합물은 표 2로부터 선택된 화합물이다:

표 2

예시 화합물

명칭	구조
FC ₃ F	
FC ₄ F	
FC ₅ F	
FC ₆ F	
FC ₇ F	

[0171]

명칭	구조
FC ₈ F	
FC ₉ F	
YC ₃ Y	
YC ₄ Y	
YC ₅ Y	
YC ₆ Y	

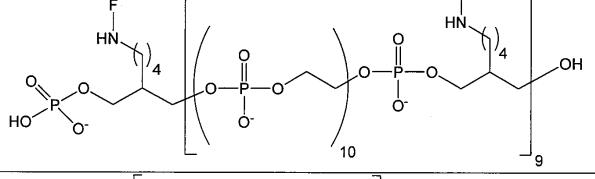
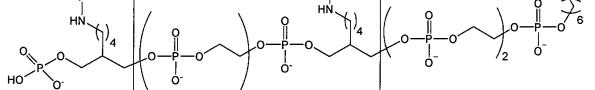
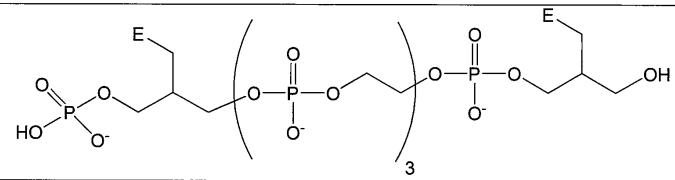
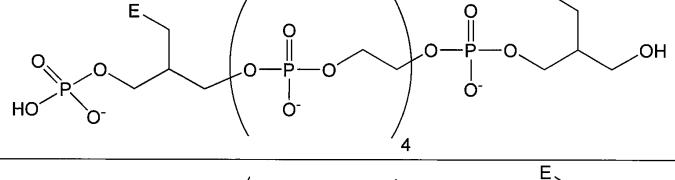
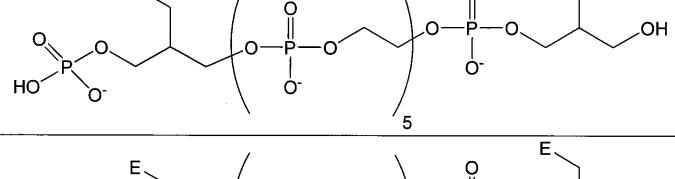
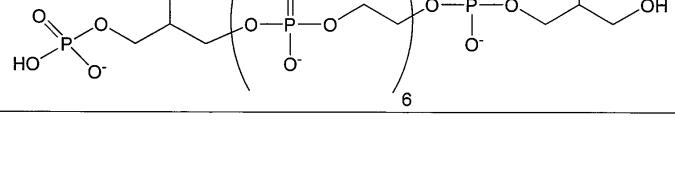
[0172]

명칭	구조
YC ₃ FC ₃ Y	
YC ₄ FC ₄ Y	
F(C ₄ F) ₂	
F(C ₄ F) ₃	
F(C ₄ F) ₄	
F(C ₄ F) ₅	

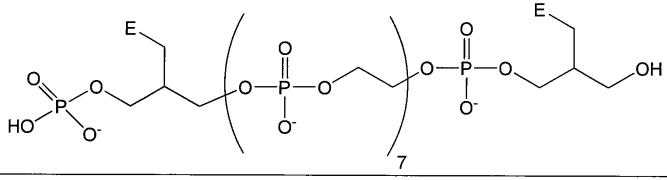
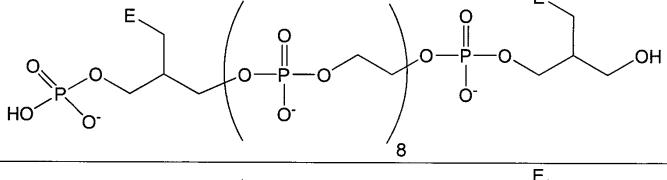
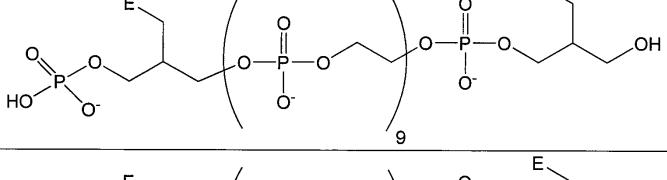
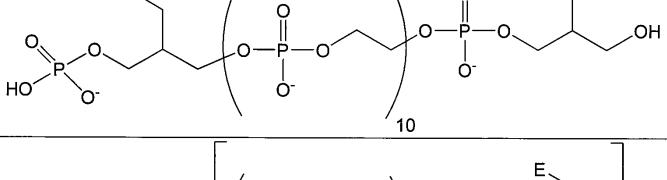
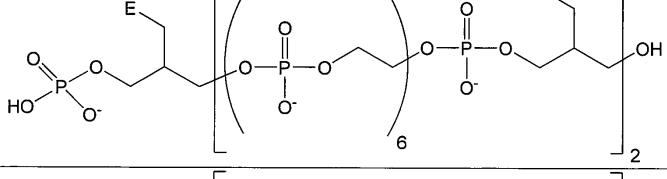
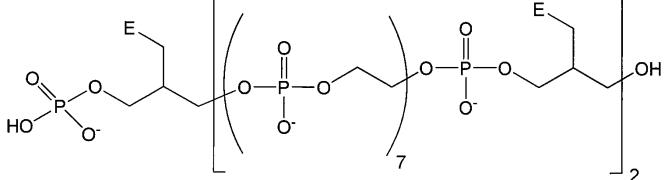
[0173]

명칭	구조
$F(C_7F)_2$	
$F(C_7F)_3$	
$F(C_7F)_4$	
$F(C_7F)_5$	
$F(C_7F)_9$	

[0174]

명칭	구조
$F(C_{10}F)_9$	
$F(C_{10}F)_9SH$	
EC_3E	
EC_4E	
EC_5E	
EC_6E	

[0175]

명칭	구조
EC ₇ E	
EC ₈ E	
EC ₉ E	
EC ₁₀ E	
E(C ₆ E) ₂	
E(C ₇ E) ₂	

[0176]

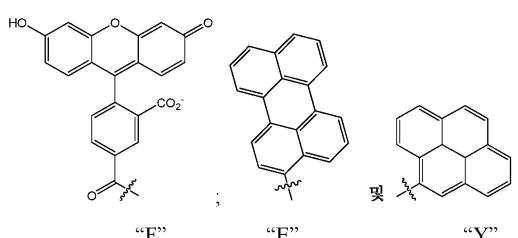
명칭	구조
$E(C_8E)_2$	
$E(C_9E)_2$	
EC_3F	
EC_4F	
EC_5F	

[0177]

명칭	구조
EC_6F	

[0178]

표 2와 출원서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같이, F, E 및 Y는 각각 플루오레세인, 페릴렌 및 피렌 모이어티를 나타내며, 하기 구조를 갖는다:



[0180]

현재 개시된 염료 화합물은 "조정가능"하며, 이는 상기 화합물 중 어느 하나의 변수의 적절한 선택에 의해, 당

해 기술분야의 숙련가는 바람직한 및/또는 소정의 몰 형광(몰 휘도)을 갖는 화합물에 도달할 수 있음을 의미한다. 화합물의 조정가능성은 사용자가 특정 분석에서 또는 관심 있는 특정 분석물을 식별하기 위해 바람직한 형광 및/또는 색을 갖는 화합물에 쉽게 도달할 수 있도록 한다. 모든 변수들이 화합물의 몰 형광에 대한 효과를 가질 수 있지만, M, m, n 및 L⁴의 적절한 선택은 화합물의 몰 형광에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 따라서, 하나의 양태에서 바람직한 몰 형광을 갖는 화합물을 수득하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 공지된 형광을 갖는 M 모이어티를 선택하는 단계, M을 포함하는 화학식 I의 화합물을 제조하는 단계 및 바람직한 몰 형광에 도달하기 위해 m, n 및 L⁴에 대한 적절한 변수를 선택하는 단계를 포함한다.

[0182] 특정 양태에서 몰 형광은 모 형광단(예를 들면, 단량체)의 형광 발광에 대한 배 증가 또는 감소로 표현될 수 있다. 일부 양태에서, 본 발명의 화합물의 몰 형광은 모 형광단에 비해 1.1배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 이상이다. 다양한 양태는 m, n 및 L⁴의 적절한 선택에 의해 모 형광단에 비해 형광에서 바람직한 배 증가를 갖는 화합물의 제조를 포함한다.

[0183] 설명을 용이하게 하기 위해, 인 모이어티들을 포함하는 다양한 화합물(예를 들면, 포스페이트 등)은 음이온 상태(예를 들면, $-OPO(OH)O^-$, $-OPO_3^{2-}$)로 도시된다. 당해 기술분야의 숙련가는 전하가 pH에 의존하고, 비전하(예를 들면, 양성자화된 또는 염, 예를 들면, 나트륨 또는 다른 양이온) 형태가 또한 본 발명의 범주에 포함됨을 용이하게 이해할 것이다.

[0184] 상기 화합물 중 어느 하나 및 하나 이상의 분석물 분자(예를 들면, 생체 분자)를 포함하는 조성물이 다양한 다른 양태에서 제공된다. 일부 양태에서, 하나 이상의 분석물 분자를 검출하기 위한 분석 방법에서의, 이러한 조성물의 용도가 또한 제공된다.

[0185] 또 다른 양태에서, 화합물은 다양한 분석 방법에서 유용하다. 예를 들면, 특정 양태에서 본 개시내용은 샘플을 염색하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 샘플을 적절한 과장에서 조사(illustrated)하는 경우 광학 응답을 유발하기에 충분한 양의 화학식 I의 화합물(여기서, R² 또는 R³ 중 하나는 분석물 분자(예를 들면, 생체 분자) 또는 미세입자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, R² 또는 R³ 중 다른 하나는 H, OH, 포스페이트 또는 티오포스페이트이다)을 상기 샘플에 첨가하는 단계를 포함한다.

[0186] 상기 방법의 일부 양태에서, R²는 생체분자와 같은 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 예를 들면, 핵산, 아미노산 또는 이의 중합체(예를 들면, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드)이다. 또 다른 양태에서, 생체분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앱타머 또는 프리온이다.

[0187] 상기 방법의 또 다른 양태에서, R²는 미세입자와 같은 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 예를 들면, 일부 양태에서, 미세입자는 중합체성 비드 또는 비중합체성 비드이다.

[0188] 또 다른 양태에서, 상기 광학 응답은 형광 응답이다.

[0189] 다른 양태에서, 상기 샘플은 세포를 포함하고, 일부 양태는 유동 세포계측법에 의해 상기 세포를 관찰하는 단계를 추가로 포함한다.

[0190] 또 다른 양태에서, 상기 방법은 형광 응답을, 검출가능하게 상이한 광학 성질들을 갖는 제2 형광의 형광 응답과 구별하는 단계를 추가로 포함한다.

[0191] 다른 양태에서, 본 개시내용은 생체분자와 같은 분석물 분자를 시각적으로 검출하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은

[0192] (a) 화학식 I의 화합물(여기서, R² 또는 R³ 중 하나는 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, R² 또는 R³ 중 다른 하나는 H, OH, 포스페이트 또는 티오포스페이트이다)을 제공하는 단계; 및

[0193] (b) 상기 화합물을 이의 시각적 성질들에 의해 검출하는 단계

[0194] 를 포함한다.

[0195] 일부 양태에서, 분석물 분자는 핵산, 아미노산 또는 이의 중합체(예를 들면, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드)이다. 또 다른 양태에서, 분석물 분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 앱타머 또는

는 프리온이다.

[0196] 다른 양태에서, 생체분자와 같은 분석물 분자를 시각적으로 검출하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은

[0197] (a) 상기 화합물 중 어느 하나를 하나 이상의 분석물 분자와 혼합하는 단계; 및

[0198] (b) 상기 화합물을 이의 시각적 성질들에 의해 검출하는 단계

[0199] 를 포함한다.

[0200] 일부 다른 상이한 양태에서, 화학식 I의 화합물은 세포 분석을 위한 다양한 방법에 사용될 수 있다. 예를 들면, 유동 세포계측법을 사용하여, 화합물은 생존 세포와 죽은 세포를 구별하고, 세포의 건강을 평가하고(예를 들면, 괴사 대 조기 아폽토시스 대 후기 아폽토시스 대 생존 세포), 세포 주기 동안 배수체와 유사분열을 추적하고, 세포 증식의 다양한 상태를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니나, 화학식 I의 화합물의 양태는 양으로 하전된 모이어티와 우선적으로 결합하거나 회합한다고 여겨진다. 따라서, 일부 양태에서, 상기 화합물은 비-온전한 세포, 예를 들면, 괴사성 세포의 존재를 결정하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 예를 들면, 일부 양태에서는 괴사성 세포의 존재를 결정하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 세포를 함유하는 샘플을 화학식 I의 화합물과 혼합하는 단계 및 상기 혼합물을 유동 세포계측법으로 분석하는 단계를 포함한다. 화학식 I의 화합물은 괴사성 세포와 결합 또는 회합한다고, 따라서 괴사성 세포의 존재는 유동 세포계측법 조건하에 검출가능하다. 괴사성 세포에 결합하기 위해 아민 반응성 그룹(또는 다른 반응성 그룹)을 필요로 하는 다른 염색 시약과는 달리, 화학식 I의 화합물을 사용하는 염색 방법의 양태는 단백질-비함유 배양 완충액을 필요로 하지 않으며, 따라서 상기 방법은 관련된 공지된 방법보다 수행하기에 보다 효율적이다.

[0201] 따라서, 일부 양태에서, 본 발명은 샘플에서 죽은 세포(또는 비-온전한 세포 또는 괴사 조직 등)의 존재를 결정하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 샘플을 화학식 I의 화합물과 접촉시켜 상기 화합물 죽은 세포와 결합 또는 회합시키는 단계 및 상기 죽은 세포와 결합 또는 회합된 화합물로부터 형광 신호를 관찰하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 일부 양태는 죽은 세포와 결합 또는 회합된 화합물을 관찰하기 위한 유동 세포계측법의 사용을 포함한다. 상기 나타낸 바와 같이, 특정 방법은 죽은 세포와 결합 또는 회합하기 위해 반응성 그룹의 사용을 필요로 하지 않는다. 따라서, 특정 양태에서, 죽은 세포의 동정에 사용하기 위한 화학식 I의 화합물은 R^2 및 R^3 이 각각 독립적으로 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 인 화학식 I의 화합물이다.

[0202] 다양한 기타 양태에서, 화합물은 온전한 또는 비-온전한 세포, 아폽토시스성체, 탈분극된 막 및/또는 투과성 막에서 양으로 하전된 모이어티의 존재를 결정하기 위한 관련 방법에 사용될 수 있다.

[0203] 상기 방법 이외에, 화학식 I의 화합물의 양태는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 학문분야 및 방법에서 유용성을 발견한다: 암성 및 기타 조직의 확인을 위한 내시경검사 절차의 영상화; 화합물의 죽은 세포로의 우선적 결합에 의한 괴사 조직의 동정; 단일-세포 및/또는 단일 분자 분석 방법, 예를 들면, 증폭이 거의 또는 전혀 없는 폴리뉴클레오타이드의 검출; 예를 들면, 암 세포에 우선적으로 결합하는 항체 또는 당 또는 기타 모이어티에 화학식 I의 화합물을 접합시킴에 의한 암 영상화; 수술 절차의 영상화; 각종 질병의 동정을 위한 히스톤의 결합; 예를 들면, 화학식 I의 화합물에서의 M 모이어티를 활성 약물 모이어티로 대체함에 의한 약물 전달; 및/또는 예를 들면, 화학식 I의 화합물을 다양한 식물 및/또는 유기체에 우선적으로 결합시킴에 의한 치과 작업 및 기타 절차에서의 조영제.

[0204] 상기 서술된 바와 같은 화학식 I의 화합물의 임의의 양태, 및 상기 서술된 바와 같은 화학식 I의 화합물에서의 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , M , m 및 n 변수에 대해 본원에 서술된 임의의 구체적 선택이, 독립적으로 화학식 I의 화합물의 다른 양태 및/또는 변수와 조합되어 상기에서 구체적으로 서술되지 않은 본 발명의 양태를 형성할 수 있음이 이해된다. 또한, 선택의 목록이 특정 양태 및/또는 청구범위에서 임의의 특정 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , L^1 , L^2 , L^3 , L^4 , M , m 및 n 변수에 대해 열거되어 있는 경우, 각각의 개별 선택은 특정 양태 및/또는 청구범위로부터 제거될 수 있고 나머지 선택 목록은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주될 것이라는 점이 이해된다.

[0205] 본 개시내용에서, 도시된 화학식의 치환체 및/또는 변수의 조합은 이러한 기여가 안정한 화합물을 초래하는 경우에만 허용되는 것으로 이해된다.

[0206] 또한, 본원에 기재된 공정에서 중간체 화합물의 관능성 그룹이 적합한 보호 그룹에 의해 보호될 필요가 있음을

당해 기술분야의 숙련가에 의해 인식될 것이다. 이러한 관능성 그룹은 하이드록시, 아미노, 머캅토 및 카복실산을 포함한다. 하이드록시에 적합한 보호 그룹은 트리알킬실릴 또는 디아릴알킬실릴(예를 들면, *t*-부틸디메틸실릴, *t*-부틸디페닐실릴 또는 트리메틸실릴), 테트라하이드로파라닐, 벤질 등을 포함한다. 아미노, 아미디노 및 구아니디노에 적합한 보호 그룹은 *t*-부톡시카보닐, 벤질옥시카보닐 등을 포함한다. 머캅토에 적합한 보호 그룹은 $-C(O)-R''$ (여기서, R'' 은 알킬, 아릴 또는 아릴알킬이다), *p*-메톡시벤질, 트리틸 등을 포함한다. 카복실산에 적합한 보호 그룹은 알킬, 아릴 또는 아릴알킬 에스테르를 포함한다. 보호 그룹은 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되고 본원에 기재된 바와 같이, 표준 기법에 따라서 첨가되거나 제거될 수 있다. 보호 그룹의 사용은 문헌[Green, T.W. and P.G.M. Wutz, *Protective group in Organic Synthesis* (1999), 3rd Ed., Wiley]에 상세히 기술되어 있다. 당해 기술분야의 숙련가가 인식할 수 있는 바와 같이, 보호 그룹은 또한 중합체 수지, 예를 들면, 왕(Wang) 수지, 링크(Rink) 수지 또는 2-클로로트리틸-클로라이드 수지일 수 있다.

[0207]

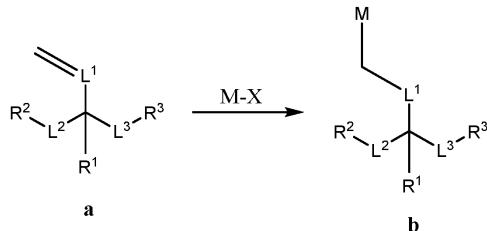
또한, 유리 염기 또는 산 형태로 존재하는 본 발명의 모든 화합물은 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 적절한 무기 또는 유기 염기 또는 산을 사용한 처리에 의해 이들의 염으로 전환시킬 수 있다. 본 발명의 화합물의 염은 표준 기술에 의해 이들의 유리 염기 또는 산 형태로 전환시킬 수 있다.

[0208]

하기 반응식은 본 발명의 화합물을 제조하는 예시적 방법을 설명한다. 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 다른 방법을 조합함으로써 또는 유사한 방법에 의해 이들 화합물을 제조할 수 있음이 이해된다. 또한, 당해 기술분야의 숙련가가, 이하에 기재된 바와 유사한 방식으로, 필요에 따라 적절한 출발 성분을 사용하고 합성의 파라미터를 변경함으로써 이하에 구체적으로 설명되지 않은 화학식 I의 다른 화합물을 제조할 수 있을 것임이 이해된다. 일반적으로, 출발 성분은 시그마 알드리치(Sigma Aldrich), 랭커스터 신테시스, 인코포레이티드(Lancaster Synthesis, Inc.), 메이브릿지(Maybridge), 매트릭스 사이언티픽(Matrix Scientific), TCI, 및 플루오로켐 유에스에이(Fluorochem USA) 등과 같은 공급처로부터 구입할 수 있거나, 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 공급처(예를 들면, 문헌 [Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition (Wiley, December 2000)] 참조)에 따라 합성될 수 있거나, 본원에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0209]

반응식 I



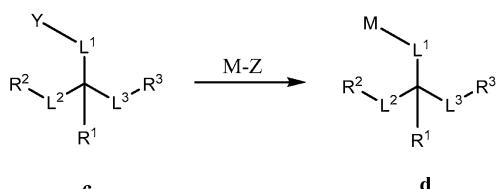
[0210]

[0211]

반응식 I은 R^1 , L^1 , L^2 , L^3 및 M 이 상기 정의된 바와 같고, R^2 및 R^3 이 상기 정의된 바와 같거나 이의 보호된 변이체인 화학식 I의 화합물을 제조하는데 유용한 중간체를 제조하기 위한 예시적인 방법을 설명한다. 반응식 I을 참조로 하면, 구조 a의 화합물은 구입하거나 당해 기술분야의 숙련가에게 익히 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. a를 $M-X$ (여기서, x는 할로젠, 예를 들면, 브로모이다)와 당해 기술분야에 공지된 스즈키(Suzuki) 커플링 조건하에 반응시켜, 구조 b의 화합물을 생성한다. 하기 기재된 화학식 I의 화합물을 제조하기 위해 구조 b의 화합물이 사용될 수 있다.

[0212]

반응식 II



[0213]

[0214]

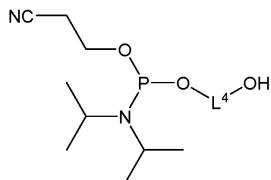
반응식 II는 화학식 I의 화합물을 제조하기에 유용한 중간체의 화합물의 대안적 제조 방법을 설명한다. R^1 , L^1 , L^2 , L^3 및 M 이 상기 정의된 바와 같고, R^2 및 R^3 이 상기 정의된 바와 같거나 이의 보호된 변이체인 반응식 II를 참조로 하면, 구입하거나 익히 공지된 기술에 의해 제조할 수 있는 구조 c의 화합물을 $M-Z$ 와 반응시켜 구조 d의 화합물을 수득한다. 여기서, Y 및 Z는 상보적인 반응성을 갖는 관능성 그룹(즉, 반응하여 공유 결합을 형성하

는 관능성 그룹)을 나타낸다. Z는 M의 웬던트이거나 M의 구조 골격의 일부일 수 있으며, 예를 들면, 사이클릭 무수물이다. Y는 아미노와 같은 다수의 관능성 그룹일 수 있다.

[0215] 특정 양태에서, 화학식 I의 화합물은 2 내지 100개의 반복 단위를 포함하는 올리고머이다. 이러한 올리고머는 익히 공지된 자동화된 DNA 합성 방법과 유사한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. DNA 합성 방법은 당해 기술분야에 익히 공지되어 있다. 간단히 말해서, 2개의 알콜 그룹, 예를 들면, 중간체 b 또는 d에서 R² 및 R³이 디메톡시트리틸(DMT) 그룹 및 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노 포스포르아미다이트 그룹 각각으로 관능화시킨다. 포스포르아미다이트 그룹을 전형적으로 활성화제, 예를 들면, 테트라졸의 존재하에 알콜 그룹에 커플링시킨 후에, 인 원자를 요오드로 산화시킨다. 디메톡시트리틸 그룹을 산(예를 들면, 클로로아세트산)을 사용하여 제거하여 유리 알콜을 노출시키고, 이는 포스포르아미다이트 그룹과 반응시킬 수 있다. 2-시아노에틸 그룹을 수성 암모니아로 처리함에 의해 올리고머화 후에 제거할 수 있다.

[0216] 올리고머화 방법에서 사용되는 포스포르아미다이트의 제조는 또한 당해 기술분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들면, 1급 알콜(예를 들면, R³)은 DMT-Cl과의 반응에 의해 DMT 그룹으로서 보호될 수 있다. 이어서, 2급 알콜(예를 들면, R²)을 2-시아노에틸 N,N-디이소프로필클로로포스포르아미다이트와 같은 적절한 시약과의 반응에 의해 포스포르아미다이트로서 관능화시킨다. 포스포르아미다이트의 제조 방법 및 포스포르아미다이트의 올리고머화는 당해 기술분야에 익히 공지되어 있고 실시예에서 보다 상세히 기술된다.

[0217] 중간체 b 또는 d의 올리고머는 상기 기술된 익히 공지된 포스포르아미다이트 화학법에 따라 제조된다. 바람직한 수의 m 반복 단위는 포스포르아미다이트 커플링을 원하는 횟수만큼 적절한 중간체, 예를 들면, 하기 구조:



[0218]

를 갖는 중간체로 반복함으로써 분자에 혼입된다.

[0220]

하기 실시예는 제한이 아니라 설명을 목적으로 제공된다.

실시예

[0222]

일반적인 방법

[0223] ¹H 및 ³¹P NMR 스펙트럼을 JEOL 400MHz 분광계 상에서 얻었다. ³¹P NMR 스펙트럼은 85% 수성 인산에 대해 기준으로 하였고 ¹H 스펙트럼은 TMS에 대해 기준으로 하였다. 역상 HPLC 염료 분석을 45°C에서 유지된 2.1mm x 50mm 액츄티(Acquity) BEH-C18 칼럼을 갖춘 워터스 액츄티(Waters Acquity) UHPLC 시스템을 사용하여 수행하였다. 질량 스펙트럼 분석을 매스링크스(MassLynx) 4.1 획득(acquisition) 소프트웨어를 사용하여 워터스/마이크로매스 쿼트로(Waters/Micromass Quattro) 마이크로 MS/MS 시스템(MS 유일한 모드로) 상에서 수행하였다. 염료 상에서 LC/MS에 사용된 이동상은 100mm 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(HFIP), 8.6mm 트리에틸아민(TEA), pH 8이었다. Aapptec[®] Spirit[™] 웨이퍼드 C18 칼럼(4.6mm x 100mm, 5μm 입자 크기)을 사용하는 고성능 오토샘플러(High Performance Autosampler) 및 다이오드 어레이 검출기를 갖춘 애질런트 인피니티(Agilent Infinity) 1260 UHPLC 시스템을 사용하여 포스포르아미다이트 및 전구체 분자를 분석하였다. 여기 및 발광 프로파일 실험을 캐리 이클립스(Cary Eclipse) 분광광도계 상에서 기록하였다.

[0224]

달리 언급되지 않는 한, 모든 반응을 질소 대기하에 오븐 건조된 유리 제품에서 수행하였다. 시판 DNA 합성 시약을 글렌 리서치(Glen Research)(버지니아주 스텔링)로부터 구입하였다. 무수 피리딘, 톨루엔, 디클로로메탄, 디이소프로필에틸 아민, 트리에틸아민, 아세트산, 피리딘, 및 THF를 알드리치로부터 구입하였다. 모든 다른 화학물질을 알드리치 또는 TCI로부터 구입하고 추가 정제 없이 그대로 사용하였다.

[0225]

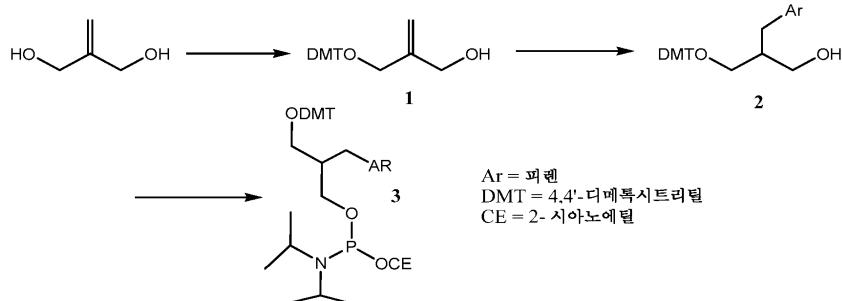
모든 올리고머(즉, 이랑체 및 고급) 염료를 포스포르아미다이트-기반 커플링 접근법에 관한 표준 프로토콜을 사용하여 ABI 394 DNA 합성장치 상에서 합성하였다. 올리고머 합성을 위한 쇄 어셈블리 사이클은 다음과 같았다: (i) 탈트리틸화(detritylation), 디클로로메탄 중 3% 트리클로로아세트산, 1분; (ii) 커플링, 아세토니트릴 중

0.1M 포스포르아미다이트 및 0.45M 테트라졸, 10분; (iii) 캡핑, THF/루티딘, 1/1, v/v 중 0.5M 아세트산 무수물, 15초; (iv) 산화, THF/파리딘/물, 10/10/1, v/v/v 중 0.1M 요오드, 30초.

[0226] 사이클 내에 화학적 단계 후에 아세토니트릴 세척하고 0.2 내지 0.4분 동안 무수 아르곤으로 플러싱하였다. 지지체로부터의 절단 및 염기 및 포스포르아미다이트 보호 그룹의 제거는 실온에서 1시간 동안 암모니아로 처리하여 탈성하였다. 이어서, 올리고머 염료는 상기 기재된 바와 같이 역상 HPLC에 의해 분석하였다.

[0227] 실시예 1

포스포르아미다이트 염료 단량체의 합성



[0228]

1-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2-메틸렌-1,3-프로판디올(1). 건조 500mL들이 환저 플라스크에 교반 바를 넣었다. 질소로 플러싱한 후, 무수 파리딘(240mL)을 첨가하고, 플라스크를 냉온에서 15분 동안 냉각시켰다. 냉각 직후 DMTrCl(7.65g, 22.5mmol)을 첨가하고 그 후 플라스크를 질소 대기하에 4°C에서 냉장고에서 밤새 교반하였다. 이어서, 몇 방울의 메탄올을 첨가하고 반응물을 진공 중에 농축하여 점성 검을 얻었다. 생성된 검을 EtOAc(200mL)에 용해시키고 NaHCO₃(250mL) 및 포화 NaCl(250mL)로 세척하였다. 유기 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 진공 중에 농축하여 점성 검을 얻었다. 이어서, 단리된 조 생성물을 EtOAc:헥산(25:75 v/v)-(1:1 v/v)의 구배로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 1을 투명 검(5.21g, 60%)으로서 수득하였다. ¹H NMR을 기록하고 화합물 1의 구조와 일치하는 것으로 밝혀졌다.

[0230]

1-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2-하이드록시메틸-3-페닐프로판(2). 콘덴서가 장착된 건조 250mL들이 환저 플라스크에 교반 바를 넣었다. 상기 플라스크를 질소로 펴징하고, 무수 THF(40mL) 및 화합물 1(5.0g, 12.8mmol)을 첨가하였다. THF(65mL, 32mmol) 중 0.5M 9-BBN을 시린지를 통해 첨가하고 반응물을 12시간 동안 환류하에 가열하였다. 반응을 실온으로 냉각시킨 후, 3M K₂CO₃(11mL) 및 무수 DMF(100mL)를 첨가하였다. 1-브로모페렌(2.0g, 6.5mmol) 및 PdCl₂(dppf)(0.65g, 0.8mmol)를 첨가하고, 용액을 실온에서 15시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂(300mL)에 끓고 H₂O(500mL)로 세척하였다. 이어서, 수성 층을 추가의 CH₂Cl₂(200mL)로 역추출하였다. 합한 유기 층을 포화 NaCl(300mL)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 중에 농축하여 점성 검을 얻었다. 이어서, 단리된 조 생성물을 EtOAc:헥산(25:75 v/v)-(1:1 v/v)의 구배로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 2를 투명 검(3.0g, 79%)으로서 수득하였다. ¹H NMR 스펙트럼을 기록하고 화합물 2의 구조와 일치하는 것으로 밝혀졌다.

[0231]

1-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2-메틸페렌-3-O-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필)프로판 포스포르아미다이트(3). 건조 100mL들이 환저 플라스크에 교반 바를 넣었다. 상기 플라스크를 질소로 펴징한 후, CH₂Cl₂(20mL) 및 화합물 2(0.30g, 0.50mmol)를 첨가하였다. N,N-디이소프로필에틸아민(0.88mL, 5.0mmol) 및 2-시아노에틸 디이소프로필클로로포스포르아미다이트(0.45mL, 2.0mmol)를 시린지를 통해 첨가하였다. 실온에서의 교반 1시간 후, TLC 분석에 의해 반응이 완료된 것으로 측정되었다. 이어서, 조 반응 혼합물을 EtOAc:TEA(22.5:72.5:5 v/v/v)의 구배로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 직접 정제하여 3을 백색 밸포체(0.28g, 70%)로서 수득하였다. ³¹P NMR 스펙트럼을 기록하고 화합물 3의 구조와 일치하는 것으로 밝혀졌다. 254 및 340nm에서 검출하면서 HPLC 분석에 의해 순도를 측정하였다.

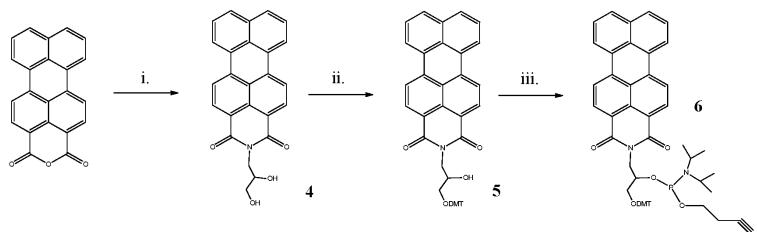
[0232]

상이한 Ar 그룹을 갖는 다른 화합물(예를 들면, 본원에 기재된 "M" 그룹 중 어느 하나)을 유사한 방식으로 제조하였다.

[0233]

실시예 2

페닐렌 카보디이미드 염료 단량체의 합성



[0234]

[0235]

N-(2,3-프로판디올) 페닐렌모노이미드(4). 콘텐서가 장착된 건조 200mL들이 환저 플라스크에 교반 바 및 페닐렌 일무수물¹(1.83g, 5.67mmol)을 넣었다. 3-아미노-1,2-프로판디올(1.1g, 2.1mmol) 및 이미다졸(14.3g, 0.21Mol)을 첨가한 후, 용기를 15시간 동안 오일조에서 140°C로 가열하였다. 반응물을 실온으로 냉각시킨 다음에, 10% HCl(500mL)을 첨가하였다. 생성된 짙은 적색 침전물을 여과에 의해 수집하고, 물로 잘 세척하고 180°C에서 수시간 동안 건조시켜 4를 짙은 적색 고체(1.95g, 86%)로서 수득하였다.

[0236]

N-(3-0-(4,4'-디메톡시트리틸-2-하이드록시프로판) 페닐렌모노이미드(5). 건조 200mL들이 환저 플라스크에 교반 바를 넣었다. 상기 플라스크를 질소로 페징한 후, 무수 피리딘(120mL), 화합물 4(0.44g, 1.1mmol), 및 디메톡시트리틸클로라이드(0.45g, 1.3mmol)를 모두 첨가하고, 반응물을 48시간 동안 실온에서 교반하였다. 이어서, 몇 방울의 메탄올을 첨가하고, 반응물을 진공 중에 농축하여 점성 검을 얻었다. 생성된 검을 CH₂Cl₂(200mL)에 용해시키고 포화 NaCl(200mL)로 세척하였다. 수성 층을 CH₂Cl₂(3x100mL)로 세척하였다. 합한 유기 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 진공 중에 농축하여 점성 검을 얻었다. 이어서, 단리된 조 생성물을 EtOAc:CH₂Cl₂(0:100 v/v)-(2:3 v/v)의 구배로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 5를 짙은 적색 발포체(0.25g, 50%)로서 수득하였다.

[0237]

N-(3-0-(4,4'-디메톡시트리틸-2-0-(2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노 포스포르아미다이트) 페닐렌-모노이미드(6). 건조 50mL들이 환저 플라스크에 교반 바를 넣었다. 상기 플라스크를 질소로 페징한 후, CH₂Cl₂(5mL) 및 화합물 5(0.25g, 0.36mmol)를 첨가하였다. N,N-디이소프로필에틸아민(0.24mL, 1.79mmol) 및 2-시아노에틸 N,N-디이소프로필클로로포스포르아미다이트(0.16mL, 0.72mmol)를 시린지를 통해 첨가하였다. 실온에서의 교반 1시간 후, TLC 분석에 의해 반응이 완료된 것으로 측정되었다. 이어서, 조 반응 혼합물을 CH₂Cl₂:TEA(95:5 v/v)로 용리시키면서 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 직접 정제하여 6을 짙은 적색 발포체(0.26g, 80%)로서 수득하였다. 정제된 화합물을 254 및 500nm에서 관찰하면서 RP-HPLC에 의해 분석하였다. 2개의 입체이성 질체가 존재하는 것으로 밝혀졌다.

[0238]

상이한 M 그룹을 갖는 다른 염료 단량체를 유사한 방식으로 제조하였다.

[0239] 실시예 3

[0240] 올리고머 염료의 합성

올리고머 염료를 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 394 DNA/RNA 합성장치 상에서 또는 GE AKTAE 10 올리고파일럿(OligoPilot) 상에서 1 μmol 또는 10 μmol 규모로 합성하고 3'-포스페이트 그룹을 프로세싱하였다. 염료를 CPG 비드 상에서 또는 폴리스티렌 고체 지지체 상에서 직접 합성하였다. 염료를 표준 고체상 DNA 방법에 의해 3'에서 5' 방향으로 합성하였다. 커플링 방법은 표준 β-시아노에틸 포스포르아미다이트 화학 조건을 사용하였다. 상이한 수의 "m"반복 단위가 합성 사이클을 적절한 포스포르아미다이트로 원하는 횟수만큼 반복함으로써 혼입되었다. 모든 포스포르아미다이트 단량체를 아세토니트릴/디클로로메탄(0.1M 용액)에 용해시키고, 하기 합성 사이클을 사용하여 연속적인 순서로 첨가하였다: 1) 톨루엔 중 디클로로아세트산을 이용한 5'-디메톡시트리틸 보호 그룹의 제거, 2) 아세토니트릴 중 활성화제 시약을 이용한 다음, 포스포르아미다이트의 커플링, 3) 요오드/피리딘/물의 산화, 및 4) 아세트산 무수물/1-메틸이미다졸/아세토니트릴을 이용한 캡핑. 5' 올리고플로로시드가 어셈블링될 때까지 합성 사이클을 반복하였다. 쇄 어셈블리의 말단에서, 모노메톡시트리틸(MMT) 그룹 또는 디메톡시트리틸(DMT) 그룹을 디클로로메탄 중 디클로로아세트산 또는 톨루엔 중 디클로로아세트산을 이용하여 제거하였다.

- [0242] 염료를 고체 지지체로부터 절단하고 다음과 같이 탈보호하였다:
- [0243] 1mL의 마이크로피펫터를 사용하여 1.5mL의 에펜도르프 투브 내에서 ~25mg의 반응된 CPG 고체 지지체에 450 μ L의 농축된 NH₄OH를 첨가하였다. 슬러리를 보텍스(Vortex) 혼합기를 사용하여 간단히 혼합하고, 가스 형성(및 버블링)이 감소하기 시작할 때까지 55°C의 가열 블록 상에 놓기(개방) 전에 침전되도록 하였으며, 이 시점에서 투브를 단단히 밀폐시켰다. 2시간 동안(+/- 15분) 열처리하고 이어서 투브를 제거하여 실온으로 냉각시켰다. 투브와 이의 내용물을 원심분리기에서 최대 속도(13400rpm)로 1분 동안 회전시킨 다음, 상층액을 유리 피펫으로 꺼내어 라벨이 붙은 제2의 1.5mL 에펜도르프 투브에 넣었는데, 이때 지지체를 포함하지 않도록 주의한다. 지지체를 세척하고 ~150 μ L의 아세토니트릴로 2회 선회 감소시켜 염료 제거를 극대화를 돋고, 세척하여 조심스럽게 지지체로부터 제거하고 라벨이 붙은 제2 투브에 첨가하였다. 정화된 상층액을 40°C에서 CentriVap 농축기에서 완전히 건조시켜 NH₄OH를 제거하였다.
- [0244] 실시예 4
- [0245] 올리고머 염료의 특성확인
- [0246] 1mL의 탈이온수를 실시예 3에 따라 제조된 전조된 염료 서열에 첨가하여 ~0.3 내지 1.0mM(이후 결정됨)의 농축된 스톡을 재구성하고 확립하였다. 각 염료 작제물의 2 μ L 분취량은, 45°C 가열된 초고성능 2.1mm x 50mm C18 컬럼(1.7 μ m) 및 150mM HFIP/TEA(pH 9) 이동상 및 유기 용리 성분으로서의 메탄올을 사용하는 HPLC-MS로 분석하여 아이덴티티 및 상대적 순도를 결정하였다. 구배는 10분에 걸쳐 1 내지 100%였다. 염료 서열의 분자량을 결정하고 불순물을 특성확인을 돋기 위해 전자분무 이온화(음의 모드로)가 사용되었다.
- [0247] 샘플을 마이크로피펫터를 사용하여 농축된 스톡에서 채취하고 NanoDrop UV-vis 분광광도계(Thermo Scientific)의 선형 범위 내에 있도록 0.1X PBS(10x 내지 100x)로 적절히 희석시켰다. 0.1X PBS를 사용하여 NanoDrop 상에서 블랭크 측정을 수행한 다음, 적절한 파장에서 희석된 염료 서열의 흡광도를 기록하였다. 흡광계수(ϵ)는, 서열에 존재하는 각 플루오레세인에 대해 75,000M⁻¹ cm⁻¹(F; 494nm에서 판독); 각 피렌에 대해 34,500(Y; 343nm에서 판독); 각 페릴렌에 대해 40,000(E; 440nm에서 판독)을 사용하여 염료 작제물 내의 총 형광체 수(M 모이어티)에 의해 결정되었다. 스페이서는 ϵ 에 어떠한 효과도 갖지 않는 것으로 가정된다. 구조 [F(CCCCCCF)₅]를 갖는 염료의 몰 농도의 예시적인 계산은 다음과 같다:
- [0248] 식 1: 염료의 몰 농도 = {A₄₉₄/(L * ϵ 염료)} * 희석 배수
- [0249] $E_{\text{염료}} = 450,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- [0250] L_{나노점적} = 0.1 cm
- [0251] A₄₉₄ = 0.254 AU
- [0252] 희석 배수 = 100
- [0253] 염료의 몰 농도 = 5.64 x 10⁻⁴ M, 또는 0.564mM.
- [0254] 농도가 결정되면, 염료 스톡을 NaPO₄⁴⁻(pH 7.5에서 0.1M)와 NaCO₃³⁻(pH 9.0에서 0.1M) 완충액에서 희석하여 최종 용적 ~3.5mL로 2 μ M(또는 5 μ M, 장비의 선형 범위에서 작동하는 모든 것) 용액을 만들었다. 이들 용액을 UV/Vis로 주사한 다음, 이들을 사용하여 형광측정기에서 판독하기 위해 적절한 완충액에서 두 번째 희석액을 10 내지 50nM 범위로 만들었다. 필요한 농도는 M 모이어티의 아이덴티티에 좌우될 것이다. 상기 염료에 대해, 25nM 용액을 사용하였다.
- [0255] 1cm 석영 큐벳을 사용하여 300nm로부터 700nm까지 주사하여 2 μ M 샘플의 흡광도를 측정하였다. 주사 속도를 중간으로 설정하였다.
- [0256] 1cm 석영 큐벳과 캐리 이클립스 분광계를 사용하여, 적절한 여기 파장(상기 염료에 대해 494nm)을 사용하고 499nm에서 700nm까지 주사하여 25nM 샘플의 빌광을 판독하였다. 주사 속도를 중간으로 설정하였다.
- [0257] 실시예 5

올리고머 염료의 UV 및 형광 성질들

표 3에 열거된 염료 화합물은 상기 일반적인 절차에 따라 제조하였고, 이들의 UV 및 형광 성질들은 2nM 및 pH 9에서 측정하였다. 도 1의 UV 스펙트럼으로부터 알 수 있는 바와 같이, 다양한 염료 화합물의 흡광 계수는 대략적으로 이론 값에 상응한다(즉, 흡광 계수는 가산적이다).

표 3의 염료의 499nm에서 700nm까지의 형광 발광 스펙트럼도 측정되었다(도 2). 흡광 계수와 대조적으로, 다중 형광 모이어티를 함유하는 염료의 발광은 모 화합물(F)보다 현저히 적었다. 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니나, 이 현상은 다중 형광 모이어티에 의한 형광의 분자내 켄칭에 의해 설명될 수 있다고 여겨진다.

豆 3

비교용 염료 화합물

명칭	구조	ϵ_F^*
F	F-OH	75k
FCF		150k
F(CF) ₂		225k

[0261]

명칭	구조	ε^*
$F(CF)_3$		300k
$F(CF)_4$		375k
$F(CF)_5$		450k
$F(CF)_6$		525k

$$\varepsilon_t = \text{이론적 물 흡광 계수}$$

[0262]

[0263] 실시예 6

[0264] 올리고머 염료의 UV 및 형광 성질들

[0265] 형광 모이어티 사이의 다양한 링커 길이의 효과를 조사하기 위해, 표 4에 열거된 염료 화합물은 상기 일반적인 절차에 따라 제조하였고 이들의 UV 및 형광 성질들을 측정하였다.

[0266] 표 4에서 플루오레세인 이량체 염료 각각의 흡광 계수는 2개의 플루오레세인 모이어티의 합에 근거한 예상 이론 값과 대략적으로 일치하였다(도 3). 놀랍게도, 이량체의 형광 발광 스펙트럼은 링커 길이가 염료의 형광 발광에 상당한 영향을 미침을 나타낸다(도 4). 구체적으로, 플루오레세인 모이어티 사이에 적어도 "C" 스페이서(하기 구조 참조)를 포함하면 단일 플루오레세인에 비해 발광이 전반적으로 증가하는 반면, 플루오레세인 모이어티 사이의 짧은 링커는 단일 플루오레세인에 비하여 감소된 형광을 초래한다는 것이 밝혀졌다.

표 4

염료 화합물

명칭	구조	ϵ_t^*
F	F-OH	75k
FF		150k
FCF		150k
FC ₂ F		150k

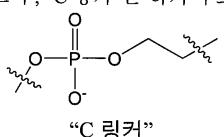
[0267]

명칭	구조	ϵ_t^*
FC ₃ F		150k
FC ₄ F		150k
FC ₅ F		150k
FC ₆ F		150k
FC ₇ F		150k

[0268]

명칭	구조	ϵ_t^*
FC ₈ F		150k
FC ₉ F		150k

ϵ_t 및 F는 상기 정의된 바와 같으며, “C 링커”는 하기 구조를 갖는다:



[0269]

[0270]

실시예 7

[0271]

올리고머 염료의 형광 성질들

[0272]

염료 분자 내의 형광 모이어티의 수의 효과를 조사하기 위해, 표 5에 열거된 염료 화합물은 상기 일반적인 절차에 따라 제조하였고 이들의 UV 및 형광 성질들은 2nM 및 pH 9에서 측정하였다.

[0273]

다시 표 5에서 플루오레세인 이량체 염료 각각의 흡광 계수는 가산적이며 예상 이론값과 대략적으로 일치하였다 (도 5). 표 5에서 각 화합물의 형광 발광은 모(즉, 단량체) 형광단보다 더 밝다(도 6).

표 5

염료 화합물

명칭	구조	ϵ_t^*
F	F-OH	75k
FC ₄ F		150k
F(C ₄ F) ₂		225k
F(C ₄ F) ₃		300k
F(C ₄ F) ₄		375k

[0274]

명칭	구조	ϵ_t^*
F(C ₄ F) ₅		450k

ϵ_t 및 F는 상기 정의된 바와 같다.

[0275]

[0276]

실시예 8

[0277]

올리고머 염료의 UV 및 형광 성질들

[0278]

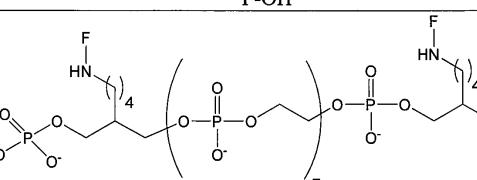
표 6에 열거된 염료 화합물은 상기 일반적인 절차 따라 제조하였고 이들의 형광 발광 성질들은 2nM 및 pH 9에서 측정하였다.

[0279]

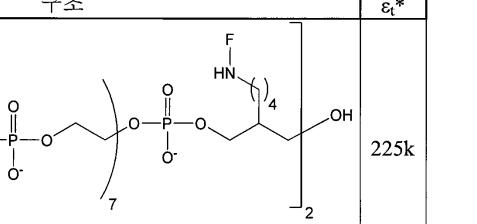
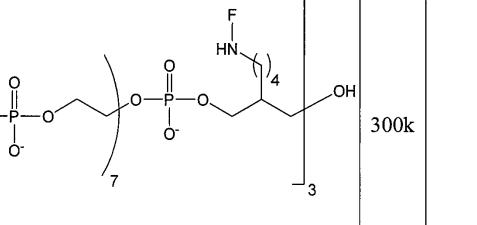
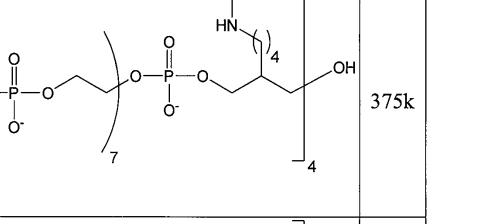
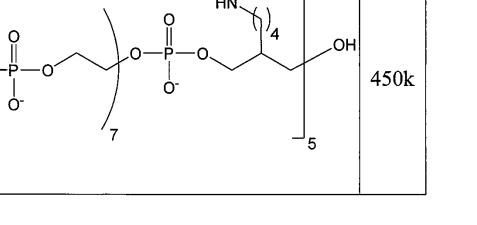
형광 발광 스펙트럼은 이들 화합물 각각이 모(즉, 단량체) 형광단보다 밝으며, 하나의 화합물이 약 6배 더 밝음을 나타낸다(도 7).

표 6

염료 화합물

명칭	구조	ϵ_t^*
F FC ₇ F		75k 150k

[0280]

명칭	구조	ϵ_t^*
F(C ₇ F) ₂		225k
F(C ₇ F) ₃		300k
F(C ₇ F) ₄		375k
F(C ₇ F) ₅		450k

 ϵ_t 및 F는 상기 정의된 바와 같다.

[0281]

[0282]

실시예 9

[0283]

올리고머 염료의 UV 및 형광 성질들

[0284]

표 7의 화합물은 상기 일반적인 절차에 따라 제조하였고 이들의 형광 발광 성질들은 10nM 및 pH 9에서 측정하였다.

[0285]

이들 화합물의 형광 발광 스펙트럼은 다시, 이들 화합물이 모(즉, F) 형광단 보다 더 밝음을 보여준다(도 8, 단일 값은 나타내지 않음)

표 7

염료 화합물

명칭	구조
F	F-OH
FC ₇ F	
F(C ₇ F) ₂	
F(C ₇ F) ₃	
F(C ₇ F) ₄	

[0286]

명칭	구조
$F(C_7F)_5$	
$F(C_7F)_9$	

F는 상기 정의된 바와 같다.

[0287]

실시예 10

페릴렌 함유 올리고머 염료의 UV 및 형광 성질들

[0289]

페릴렌 모이에티("E")를 포함하는 염료 화합물은 상기 일반적인 절차에 따라 제조하였고 이들의 형광 발광 성질들은 50nM 및 pH 9에서 측정하였다. 이들 염료의 구조는 표 8에 제시된다.

[0291]

형광 발광 스펙트럼은 이들 화합물 각각이 모(즉, "단일체") 형광단보다 더 밝음을 나타낸다(도 9). 수성 환경에서 페릴렌을 사용하여 몰 기준으로 이의 휘도를 증가시키는 능력은, 이 형광단의 소수성 특성을 고려할 때 주요한 진전이다.

표 8

페릴렌 함유 염료 화합물

명칭	구조
E	
$E(C_6E)_2$	
$E(C_7E)_2$	

E는 상기 정의된 바와 같다.

[0292]

실시예 11

일반적인 유동 세포계측법 및 적용

- [0295] 일반적인 유동 세포계측법 작업흐름은 다음 단계를 포함한다:
- [0296] 1. 대사적 스트레스의 정후에 대한 세포를 배양하고 가시적으로 관찰하고/하거나 새롭거나, 유도되거나 모방된 세포를 사용한다.
- [0297] 2. 염료 화합물을 작업 용적으로 희석한다.
- [0298] 3. 사멸시키거나 아폽토시스를 유도하는 것 없이 세포를 수거하고 제조한다.
- [0299] 4. 원심분리하고 세포를 적절한 완충액으로 세척한다.
- [0300] 5. 세포계수기 및 트립판 블루 배제를 사용하여 세포 계수를 수행한다.
- [0301] 6. 원심분리하고 세포를 세척한다.
- [0302] 7. 세포 밀도를 시험 규모로 조정한다.
- [0303] 8. 목적하는 염료(희석전) 및 다른 보조-착색제를 적용한다.
- [0304] 9. 세포/착색제/염료 혼합물을 항온처리한다.
- [0305] 10. 원심분리하고 세포를 적절한 완충액으로 세척한다.
- [0306] 11. 세포를 습득 완충액 중에 재현탁시킨다.
- [0307] 12. 유동 세포계측법에 의해 세포 데이터를 획득한다.

[0308] 상기된 일반적인 작업흐름은 특정 응용에 따라 변형될 수 있다. 특정 응용을 위한 일부 변형은 아래에 기술되어 있다.

생존하는 것/죽은 것의 식별

[0310] 세포는 손상된 세포와 온전한 세포를 비교하기 위해 괴저성 세포를 양성으로 염색시킴에 의해 생존능에 대해 시험한다. 양으로 하전된 모이어티, 세포 파쇄물, 아폽토시스체, 탈분극된 세포막, 및 투과성 막을 사용하여 비-온전한(고정화되고 비고정화된) 세포를 표적화하기 위한 검정을 사용한다. 이어서, 세포는 통상의 세포 제제(새롭거나 고정화된)를 사용하여 염료로 염색시키고 유동 세포계측법을 사용하여 분석하였다.

세포 건강

[0312] 죽은 세포(즉, 괴저성 세포), 초기 아폽토시스성 세포, 후기 아폽토시스성 세포 및 생존 세포들을 비교한다. 죽은 세포는 양성으로 염색시킨다. 아폽토시스성체는 중간정도로 염색하고 생존 세포는 생존 세포는 음성으로 잔류한다. 상기 전략은 매우 밝은 괴저성 세포를 유도하고 또한 세포 침투성을 평가하기 위해 작동한다. 양으로 하전된 모이어티, 세포 파쇄물, 아폽토시스성체, 탈분극된 세포막 및 투과성 막을 사용하여 비-온전한(고정화되고 비-고정화된) 세포를 표적화하기 위한 검정을 사용한다. 염료 염색은 시험관내 배양물, 1차 세포 및 생체 이물로 처리된 샘플에 대해 수행하고 유동 세포계측법을 사용하여 분석한다.

세포 주기

[0314] 세포 주기에서 세포 배수체 및 유사분열은 모든 세포, 및 혁산 및 세포 주기 관련 단백질을 함유하는 세포체에서 양성으로 염색하는 DNA 삽입제와 관련된 염색에 의해 추적한다. 양으로 하전된 모이어티, 세포 파쇄물, 아폽토시스성체, 탈분극된 세포막 및 투과성 막을 사용하여 비-온전한(단지 비-고정화된) 세포를 표적화하기 위한 검정을 사용한다. 세포의 보존이 고정화되고 세포내 염색을 위해 침투성화된 후 양으로 하전된 모이어티를 염색시킴에 의해 온전한(고정화되고 침투성화된) 세포를 표적화하기 위한 검정을 사용한다. 염료 염색(다른 염료와 조합된)은 시험관내 배양물, 1차 세포 및 생체 이물로 처리된 샘플에 대해 수행하고 유동 세포계측법을 사용하여 분석한다.

증식

[0316] 세포 증식은 모든 세포, 및 혁산 및 세포 주기 관련 단백질을 함유하는 세포체에서 양성으로 염색하는 DNA 삽입제와 관련된 염색에 의해 모니터링한다. 양으로 하전된 모이어티, 세포 파쇄물, 아폽토시스성체, 탈분극된 세포막 및 침투성막으로 비-온전한(단지 비-고정화된) 세포를 표적화하기 위한 검정을 사용한다. 세포의 보존이 고정화되고 세포내 염색을 위해 투파된 후 양으로 하전된 모이어티를 염색시킴에 의해 온전한(고정화되고 투파된) 세포를 표적화하기 위한 검정을 사용한다. 염료 염색(세포 증식에 대한 모니터링 마커, 예를 들면, Ki67,

BRDU와 조합된)은 시험관내 배양물, 1차 세포 및 생체 이물로 처리된 샘플에 대해 수행하고 유동 세포계측법을 사용하여 분석한다.

[0317] 실시예 12

[0318] 주르카트 세포(Jurkat cell)의 세포 배양물

[0319] 주르카트 세포(클론 E6-1; ATCC® TIB-152™)는 말초 혈액 조직에서 발견되고 급성 T 세포 백혈병을 모델링하기 위해 사용되는 인간 림프구 세포이다. 세포는 RPMI-1640 배지, 태아 소 혈청 10%, 0.1M HEPES, PenStrep 및 L-글루타민 중에서 배양하였다.

[0320] 배양은 새로운 배지를 첨가하거나 1×10^5 생존 세포/mL 내지 5×10^6 세포/mL의 배지로 대체하여 유지시켰다. 대안적으로, 배양은 원심분리하고 후속적으로 1×10^5 생존 세포/mL로 재현탁하여 확립하였다. 새로운 배지는 세포 밀도에 의존하여 2 내지 3일 마다 첨가하였다.

[0321] 실시예 13

[0322] 라모스 세포(Ramos cell)의 세포 배양

[0323] 라모스(RA 1; ATCC CRL-1596)는 인간 B 림프구이고 베켓 림프종(American)을 모델링하기 위해 사용된다. 세포는 열-불활성화된 태아 소 혈청 10%, 0.1 HEPES, PenStrep 및 L-글루타민을 갖는 RPMI-1640 배지 중에서 배양하였다.

[0324] 배양은 새로운 배지를 첨가하거나 1×10^5 생존 세포/mL 내지 5×10^6 세포/mL의 배지로 대체함에 의해 유지하였다. 대안적으로, 배양물은 원심분리하고 후속적으로 1×10^5 생존 세포/mL로의 재현탁하여 확립하였다. 새로운 배지는 세포 밀도에 의존하여 2 내지 3일 마다 첨가하였다.

[0325] 실시예 14

[0326] 세포사를 유도하고 죽은 세포를 회수하기 위한 일반적인 과정

[0327] 배양된 세포는 시험관내 괴사 및 아폽토시스로 유도하여 죽은 세포, 세포 파쇄물 및 아폽토시스성체를 형성한다. 세포는 열 응력 및/또는 대사적 스트레스를 도입함에 의해 유도하였다. 열 응력은 배양물을 3 내지 5분 동안 57 내지 60°C에 적용하고 이어서 세포 배양물을 10분 동안 열음에 전달하였다. 대사적 스트레스는 로그 상 성장 후 군집화, 독소 또는 생체 이물 처리(예를 들면, 10nM 맵토테신)로 수행하였다. 새로운 세포는 배양물을 무처리에 적용하여 유지하였다.

[0328] 세포 제제는 염색 완충액 중에 재현탁시킨 다음, 60 내지 80%의 온전한 세포의 생존 집단을 표적화하기 위한 비로 혼합하였다(즉, 유동 세포계측법 파라미터 FSC 대 SSC를 사용한 형태에 의해 측정된 바와 같은 20 내지 40%의 비-온전한 세포 파쇄물형 반응). 세포 생존능은 현미경으로 생존/죽은 트립판 블루 배체 또는 유동 세포계측법에 의한 7-아미노악티노마이신 D(7-AAD)에 의해 입증하였다. 일부 실험에서, 유도된/비-유도된 세포의 혼합물은 불필요하였다. 대신, 30% 내지 40% 괴저성 및 아폽토시스성 세포를 함유하는 대사적 스트레스를 진행하는 로그 상 성장 후 배양물을 사용하였다.

[0329] 실시예 15

[0330] 주르카트 및 라모스 세포에 대한 세포사 유도 및 죽은 세포의 회수

[0331] 중간 로그 성장 주르카트 및 라모스 또는 1차 PBMC 세포는 죽은 세포 및 세포 파쇄물을 형성하기 위해 시험관내 괴사로 유도하였다. 세포는 먼저 배양된 세포를 3 내지 5분 동안 58°C에 적용한 다음, 이들을 10 내지 50분 동안 열음에 전달함에 의해 유도하였다. 새로운 배지는 배양물을 무처리에 적용함에 의해 유지시켰다.

[0332] 세포는 10×10^6 세포/mL의 세포 밀도로 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 와 함께 1 x DBS 중에 재현탁시켰다. 이어서, 새로운 세포 (~8% 괴사성) 및 스트레스 받은 세포 (~20% 괴사성)는 생존 내지 괴저성 세포의 측정가능한 기울기를 생성하기 위해 하기의 비로 혼합하였다:

[0333] 1. 100% 생존:0% 죽음

[0334] 2. 50% 생존:50% 죽음

- [0335] 3. 25% 생존:75% 죽음
- [0336] 4. 12.75% 생존:85.25% 죽음
- [0337] 5. 6% 생존:94% 죽음
- [0338] 예상된 생존능은 8 내지 30% 범위였다. 출발 및 최종 생존능은 유동 세포계측법 또는 티판 블루 배제에 의한 7-아미노악티노마이신 D(7-AAD)에 의해 입증하였다.
- [0339] 실시예 16
- [0340] 죽은, 괴사성 및 아폽토시스성 세포와
- [0341] $F(C_{10}F)_9$ 및 $F(C_{10}F)_9SH$ 염료의 반응
- [0342] 세포 및 염료(예를 들면, 벌크 $F(C_{10}F)_9$ 또는 HNSA 활성화된, 아민 반응성 $F(C_{10}F)_9SH$, 표 2를 참조한다)는 함께 96웰 U-바닥 폴리프로필렌 플레이트 중에서 반응시켰다. 염료는 순수 탈이온수 또는 멸균 여과된 포스페이트 완충용액 중에서 25 내지 200 μL 의 용적 중에 15,000 내지 0.001 μM 의 농도 범위로 연속으로 희석시켰다. 포스페이트 완충 식염수는 아민 반응성 염료(즉, $F(C_{10}F)_9SH$)에 대해 사용하였다. 이어서, 염료 용액은 세포 제제에 적용하였다. 물 중에 희석된 염료는 세포에 적용된 바와 같이 $\leq 25 \mu L$ 의 시험 용적으로 재한하였다. 세포 밀도는 시험 웨ル당 2 내지 3×10^6 세포/ mL (V_f 범위 = 단백질 및 대사적 억제제 또는 포스페이트 완충 식염수를 함유하는 100 내지 200 μL 염색 완충액)로 유지하였다.
- [0343] 염료를 사용한 항온처리 전에, 세포는 완전 성장 배지 중에서 2회 이상 벌크 세척하고(15 내지 50mL 원뿔 튜브)(제1 세척), 세척액 $1mL$ 당 2 내지 3×10^5 세포/시험의 비로 단백질, 포스페이트 완충 식염수 및 대사적 억제제를 함유하는 세척 완충액으로 세척하였다(후반 세척). 대형 세척 용적은 10분 동안 원심분리($g \times 500$)하였다. $F(C_{10}F)_9SH$ 가 사용되는 경우, 세포는 염료로 염색시키기 전에 포스페이트 완충 식염수에 재현탁시켰다.
- [0344] 이어서, 염료 혼합물은 23 내지 25°C에서 30 내지 40분 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 세포는 웨ル당 600 내지 800 μL 의 첨가에 의해 완충액(단백질, 포스페이트 완충 식염수 및 대사적 억제제를 함유하는)으로 2회 세척하였다. 이어서, 혼합물은 5분 동안 원심분리($g \times 350$)하였다.
- [0345] 도 10a 및 10b에서의 데이터는 괴저성 세포의 염색이 사용되는 염료(예를 들면, $F(C_{10}F)_9SH$ 또는 $F(C_{10}F)_9$)의 농도와 관련하여 용량 의존성임을 보여준다.
- [0346] 실시예 17
- [0347] 세포 건강 평가에서 세포 물질의 $F(C_{10}F)_9$ 염색
- [0348] 림프성 암 세포주는 완전 성장 배지 중에서 제조하거나 또는 밀도 구배, 자기 세포 분류 또는 FACS에 의해 1차 조직 및/또는 혈액 샘플로부터 단리시킴에 의해 제조하였다. 이어서 세포는 시험관내에서 열 또는 대사적 스트레스에 의해 괴사 및 아폽토시스로 유도하여 죽은 세포, 세포 파쇄물 및 아폽토시스성체를 형성한다(스트레스 파라미터에 대해 실시예 14를 참조한다). 새로운 세포는 비유도에 의해 유지하였다.
- [0349] 이어서, 세포를 원심분리하고 표준 유동 세포계측법 세척 기술을 사용하여 세척하거나, 단백질, 포스페이트 완충 식염수 및 대사적 억제제를 함유하는 염색 완충액으로 세척하였다. 이어서, $F(C_{10}F)_9$ 염료 용액은 염색 완충 액의 시험 웨ル당 2 내지 3×10^6 세포/ mL 의 세포 밀도로 $0.5mL$ 의 세포와 50 μM 에서 항온처리하였다. 상기 혼합물은 30 내지 40분 동안 20 내지 25°C에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 세포는 600 내지 800 μL 의 세척 완충액 중에서 세척하고(실시예 16에 기재된) 5분 동안 원심분리($g \times 350$)하였다.
- [0350] DNA 삽입 제제인 7-아미노악티노마이신 D(7-AAD) 생존능 염색 및 프로파이드 요오다이드(PO-PRO®-1)를 함께 사용하여 다중-색, 5개 파라미터 검정에서 괴사성 및 아폽토시스성 세포를 동정하였다. 세포는 원심분리하고 세척하여 표준 유동 세포계측법 세척 기술을 사용하여 과량의 염료를 제거하거나 단백질, 포스페이트 완충 식염수 및 대사적 억제제를 함유하는 염색 완충액으로 세척하였다.
- [0351] 세포는 유동 세포계측법에 의해 획득하였고 세포 제제 중에 존재하는 생존 세포, 조기 아폽토시스성체 및 후기 아폽토시스성체를 동정하기 위해 분석하였다. 이것은 5000개 온전한 생존 세포를 표적화하고, 준세포 파쇄물을

측정하기에 충분히 낮은 FSC-Lin 역치를 유지함에 의해 달성하였다. 형광 검출은 유동 세포계측법에 의해 488nm 블루 레이저 라인에서 수행하였고 피크 발광(521nm)은 525/50 밴드패스 필터를 사용하여 검출하였다.

[0352] 새로운 배양물과 비교하는 경우, 상기 세포 제제의 염색 패턴은 7-AAD로 검출되지 않는 새로운 배양물 중에서 광범위한 형광성 및 검출 민감성을 지적한다. 도 11에서 발견되는 형광성 패턴(즉, $F(C_{10}F)_9SH$ 를 사용하여)은 7-AAD 및 프로피듐 요오다이드에 의해 동시 염색된 바와 같이 핵산과 유사한 세포 구조와 상호 관련된 3개 절반으로 형광성의 높은 해상력 및 광범위한 역학적 범위를 제공한다. 세포 생존능에 대한 상세한 정보는 염료(즉, $F(C_{10}F)_9$ 또는 $F(C_{10}F)_9SH$)가 단독으로 사용되고 이것이 다른 시약(즉, 7-AAD 및 프로피듐 요오다이드)과 조합되는 경우 발췌될 수 있다.

[0353] 상기 제제를 사용하여, 4개 집단을 밝혔다(생존 세포 [L], 염료 양성이 아닌 아폽토시스 세포 [A1], 낮은 것부터 중간 정도(low-to-mid)의 휘도를 갖는 세포 [A2], 및 괴사성 세포[D]; 도 12를 참조한다). 형광성 강도는 막 투과성의 등급화된 상태로 서로 관련되어야만 하는 구배를 밝힌다. 온전한 세포가 분석으로 배제된 경우, 추가의 생존 세포/손상된 세포의 상세한 패턴이 나타나고 이는 형태에 의해 게이팅된 "온전한" 세포 내에 속하지 않는다.

[0354] 도 13은 새로운 배양물, 및 수거된 이벤트들의 2개의 상이한 배양물과 2개의 상이한 형태학적 해석 간의 생존능 상태의 민감성 검출을 보여준다.

[0355] 실시예 18

[0356] $F(C_{10}F)_9$ 을 사용한 세포의 염색

[0357] 실시예 17에 기재된 제제에 사용되는 $F(C_{10}F)_9$ 벌크 염료는 예상치 않게 그리고 유리하게 실시예 16에 기재된 아민 반응성 염료와 매우 유사하게 죽은 세포를 염색시킨다. 이것은 용액 중 $F(C_{10}F)_9$ 염료가 결합하기 위해 기능 성화될 필요가 없음을 지적한다. 전형적인 생존/죽은 세포 프로토콜에 대한 상기 발견의 영향은 단백질 부재 항온처리 완충액을 위한 요건을 제공하고 죽은 세포를 염색시키기 위한 사용의 용이함을 증가시킨다. 통상의 아민 반응성(즉, 유동성) 염료는 염색 전 단백질 부재 완충액 중에 세포를 재현탁시킬 필요가 있다.

[0358] 실시예 19

[0359] 죽은/아폽토시스 세포의 패턴 및 효과

[0360] 유사분열의 패턴은 죽은 세포 분석시에 발견되었다. $F(C_{10}F)_9$ 를 사용하여 수득된 유동 세포계측법 데이터는 DNA 히스토그램과 유사한 패턴을 보여준다(도 14a 및 14b 참조). 또한, $F(C_{10}F)_9$ 염료 염색된 세포는 증식 arc와 유사한 패턴을 보여준다(도 15a 및 15b를 참조). 이들 발견은 염료가 온전한 세포가 아니지만 배수체의 핵산 염색 패턴의 통상적 해석과 상호 관련된 다중 규모의 세포 물질에 결합함을 지적한다. 염료가 "비-온전한 세포"를 표지시킨다는 사실에도 불구하고, 이들은 고정화되고 투과된 세포에서 DNA 또는 RNA와 연합된 단백질에 결합하는 것으로 예측된다.

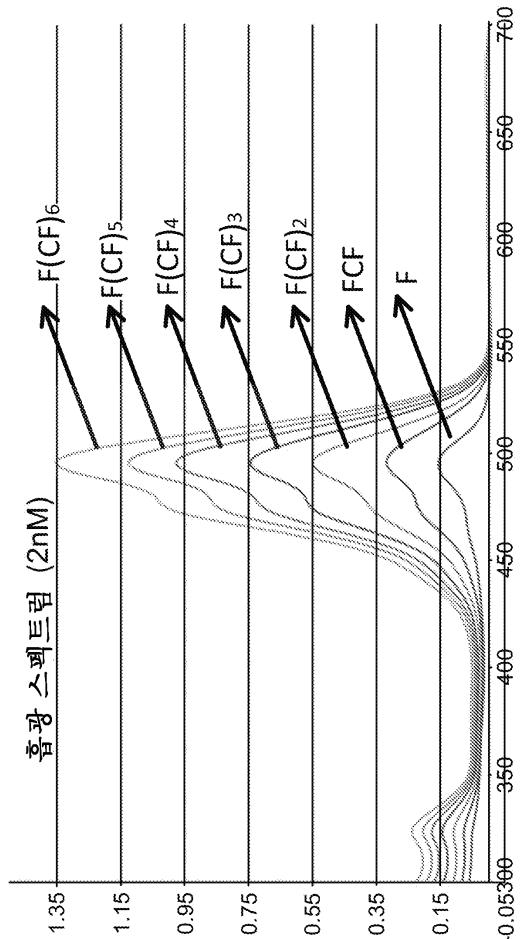
[0361] 염료 염색은 다수의 염색체를 발현하고 과다-배수체 상태에 있는 주르카트 세포를 보여준다(도 14a 및 14b). 염료 염색된 주르카트 및 라모스 세포 물질은 증식의 통상의 패턴과 상호관련된다(도 15a 및 15b).

[0362] 2015년 5월 11일자로 출원된 미국 특허 출원 일련 번호 제62/159,771호를 포함하는 본원 명세서에 언급된 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비-특허 공보는 이들의 전문이 본원에 기재된 내용과 일관성이 없지 않은 정도까지 참조로 인용된다.

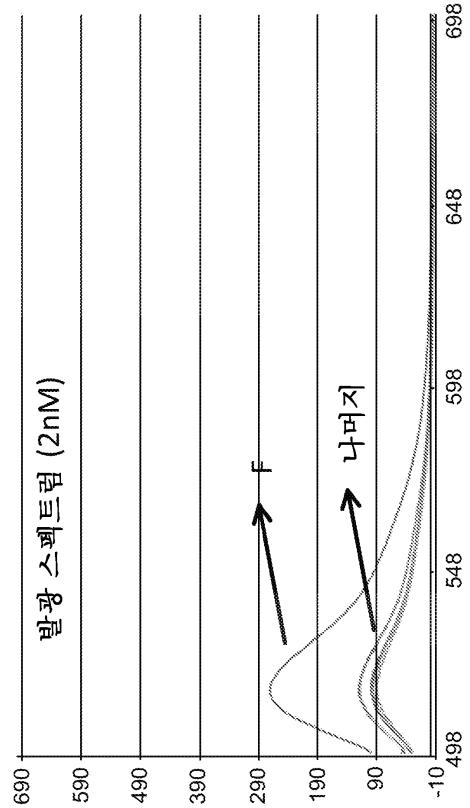
[0363] 이전의 기재로부터 본 발명의 특정 양태가 설명을 목적으로 본원에 기재되었지만 다양한 변형이 본 발명의 취지 및 범위로부터 벗어나는 것 없이 만들어질 수 있는 것으로 인정된다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구항에 의한 것을 제외하고는 제한되지 않는다.

도면

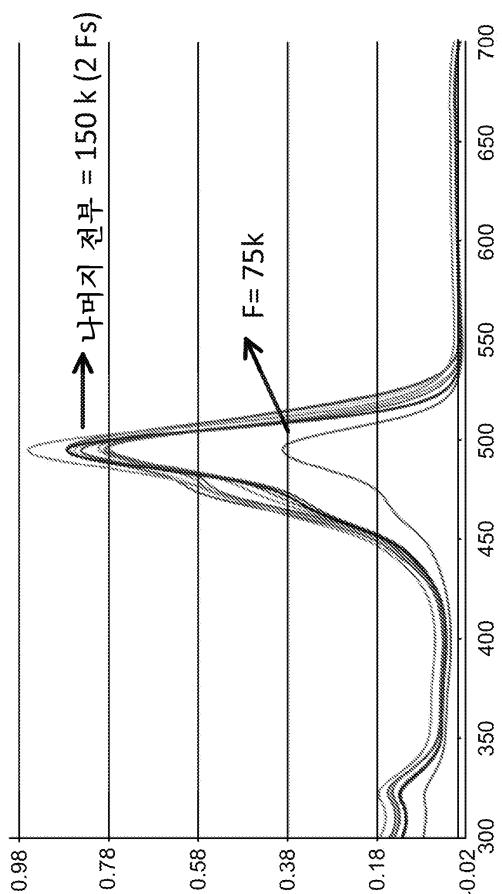
도면1



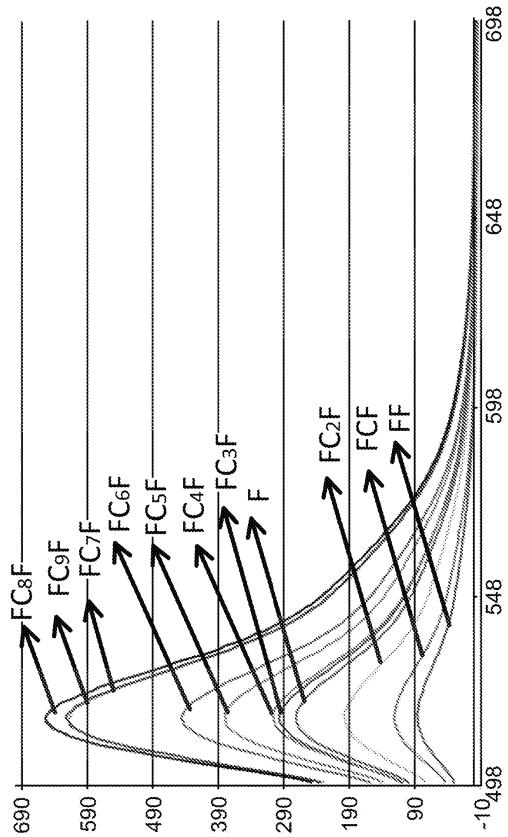
도면2



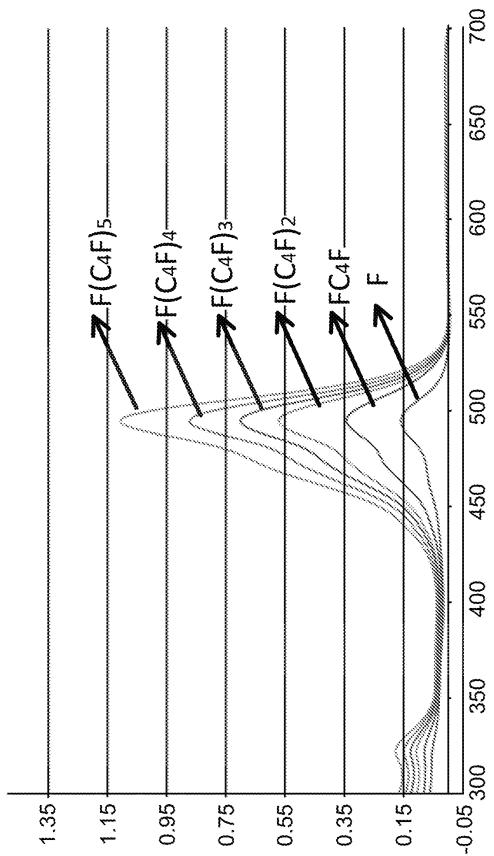
도면3



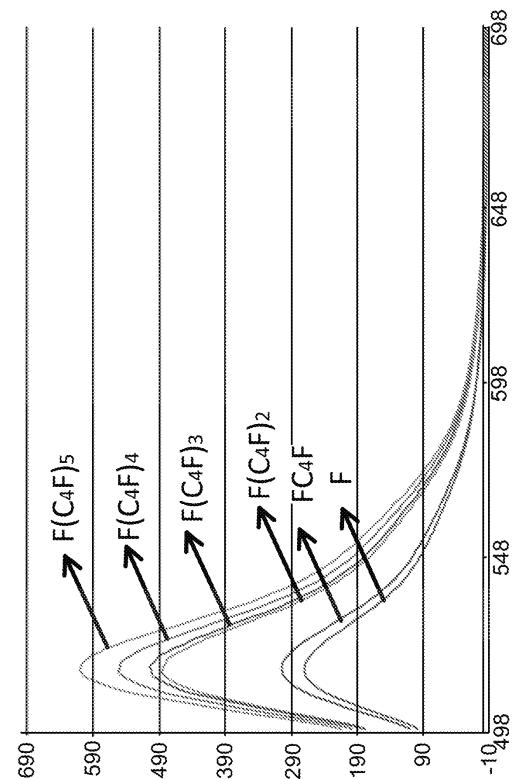
도면4



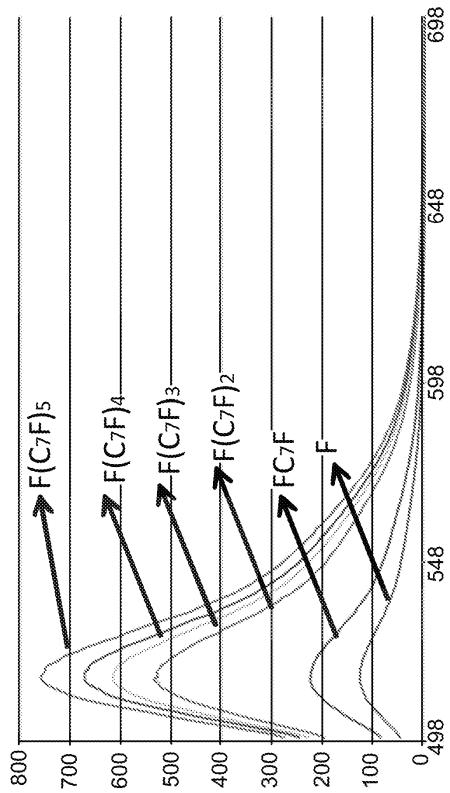
도면5



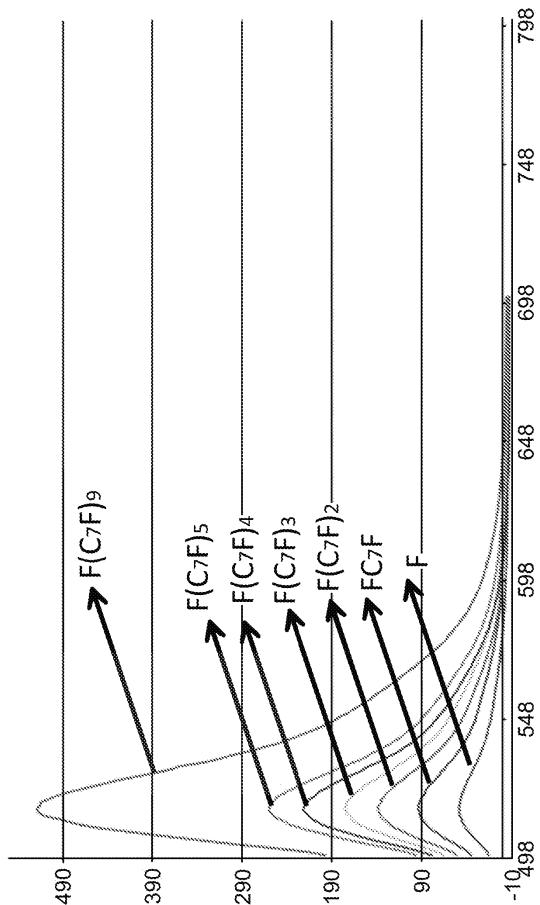
도면6



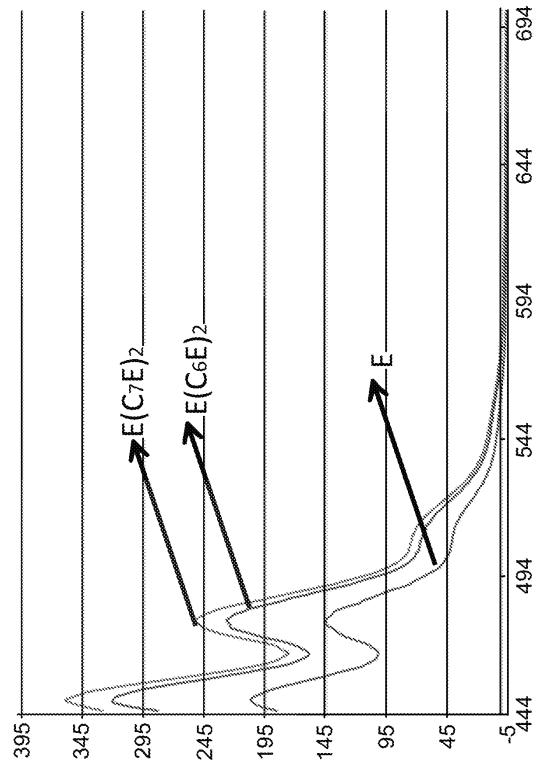
도면7



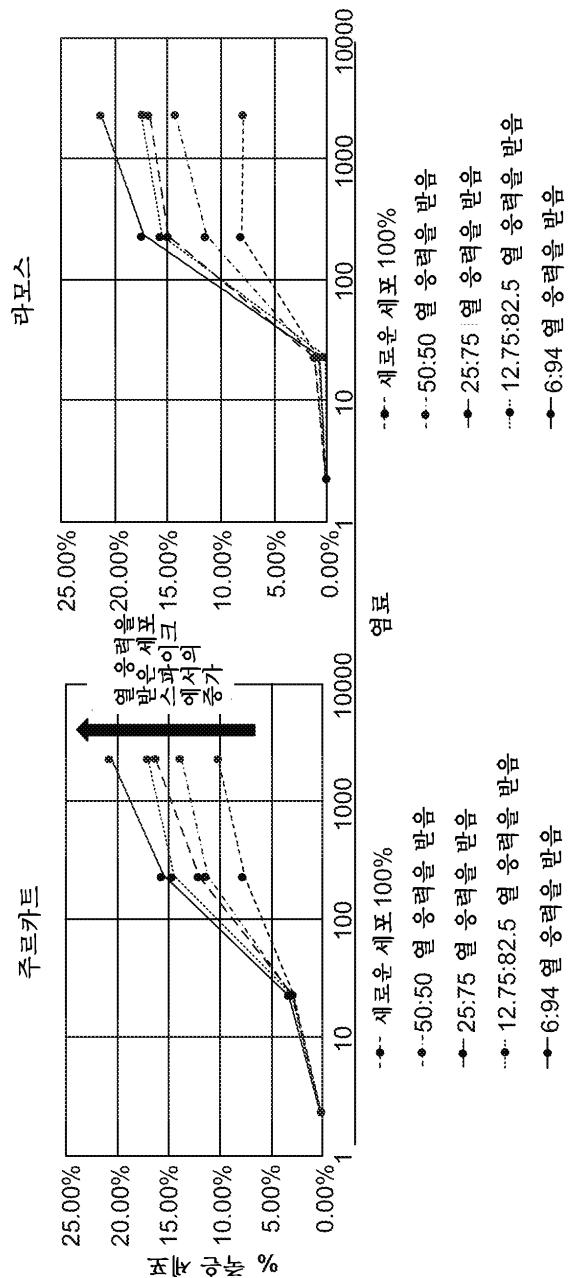
도면8



도면9



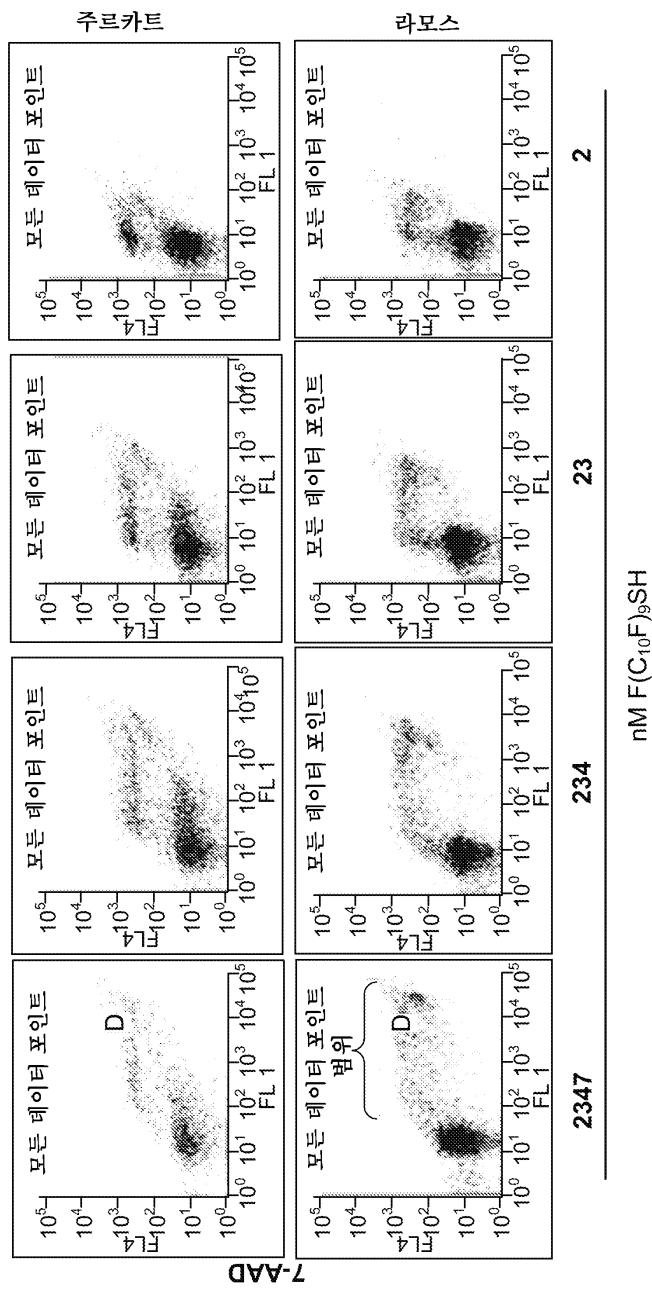
도면10



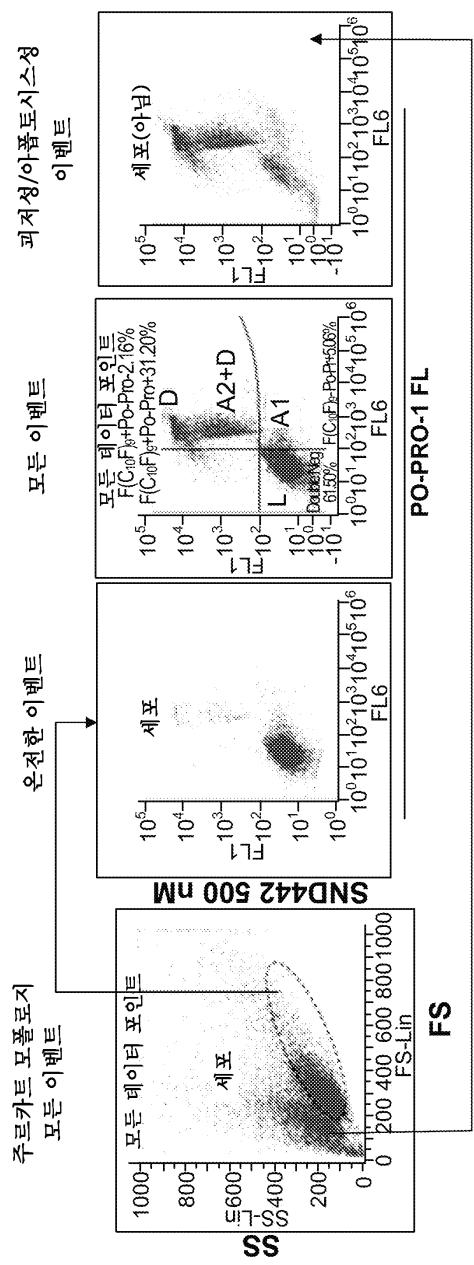
[E 10b]

[FIG 10a]

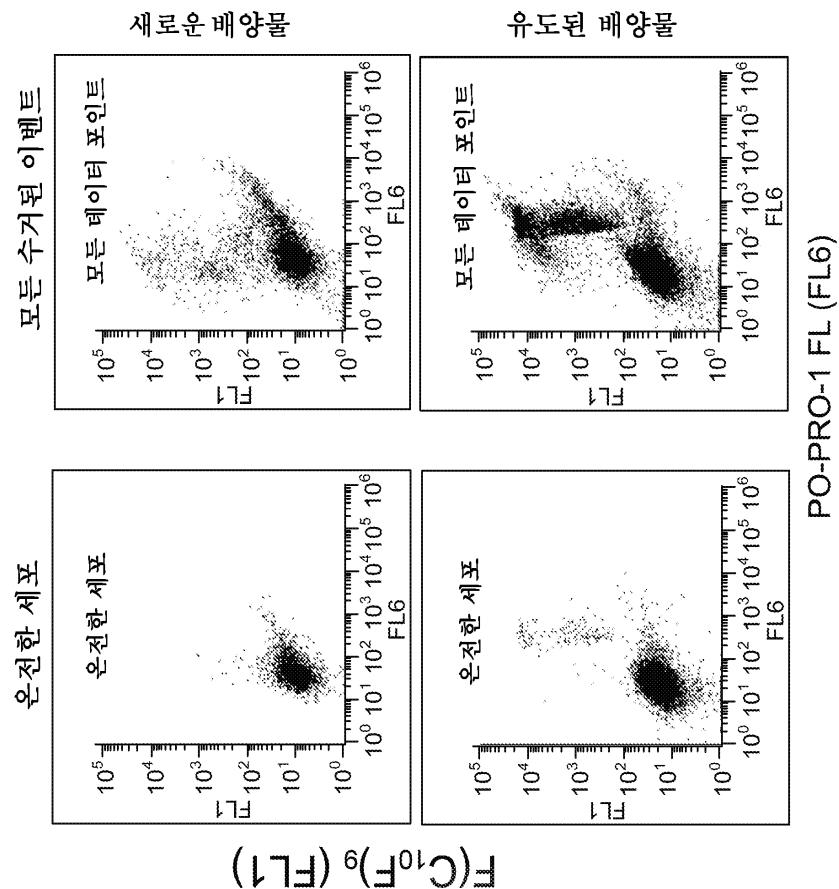
도면11



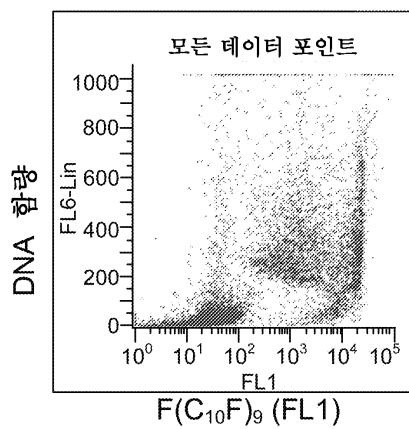
도면12



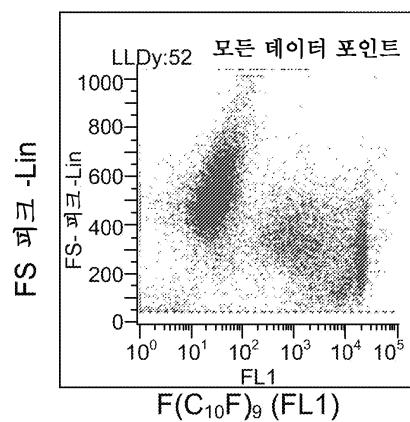
도면13



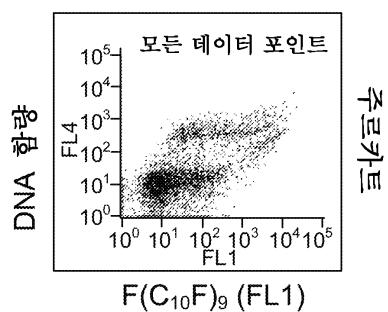
도면14a



도면14b



도면15a



도면15b

