(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월16일
(11) 등록번호 10-2742386
(24) 등록일자 2024년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/533 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/533 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7029879
(22) 출원일자(국제) 2019년03월08일
심사청구일자 2022년03월07일
(85) 번역문제출일자 2020년10월16일
(65) 공개번호 10-2020-0135424
(43) 공개일자 2020년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/021323
(87) 국제공개번호 WO 2019/182765
국제공개일자 2019년09월26일
(30) 우선권주장
62/645,121 2018년03월19일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20170292957 A1
KR1020180005650 A
US20150110715 A1
WO2011088193 A2

(73) 특허권자
소니그룹주식회사
일본국 도쿄도 미나토쿠 코난 1-7-1
(72) 발명자
잭슨 멜리사
미국 뉴욕주 10010 뉴욕 매디슨 애비뉴 25 소니 코포레이션 오브 아메리카
보이스 크리스토퍼
미국 뉴욕주 10010 뉴욕 매디슨 애비뉴 25 소니 코포레이션 오브 아메리카
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

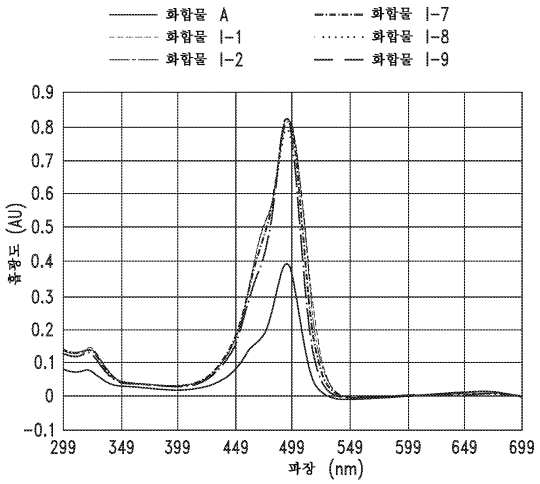
전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **형광 신호 향상을 위한 2가 금속의 사용**

(57) 요 약

본 발명은 형광 또는 착색 염료를 포함하는 조성물 및 이를 2가 금속 염과 조합하여 샘플을 분석하기 위해 사용하는 방법을 개시한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

마츠이 에리코

미국 뉴욕주 10010 뉴욕 매디슨 애비뉴 25 소니 코포레이션 오브 아메리카

반브룬트 마이클

미국 워싱턴주 98042 코빙턴 에스이 261스트 스트리트 16619

싱 샤라트

미국 캘리포니아주 92067 란초 산타페 피엠비 69 피. 오. 박스 5000 탑 오 모닝 웨이 8171

마트레이 트레이시

미국 워싱턴주 98296 스노호미쉬 78쓰 애비뉴 에스이 15233

명 세 서

청구범위

청구항 1

중합체성 염료 및 표적화 모이어티(targeting moiety)의 공유 접합체(covalent conjugate)를 형성하는 방법으로서, 상기 방법은, 상기 중합체성 염료, 상기 표적화 모이어티, 및 마그네슘 염을 포함하는 혼합물을 제조하는 단계, 및 상기 공유 접합체를 형성하기 위해 충분한 시간 동안 및 온도에서 상기 혼합물을 숙성시키는(age) 단계를 포함하고, 여기서:

a) 상기 중합체성 염료는:

i) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티(fluorescent or colored moieties)로서, 상기 형광 및 착색 모이어티는 아릴 또는 헤테로아릴 환으로부터 선택되는 3개 이상의 환을 포함하는, 형광 또는 착색 모이어티;

ii) 적어도 하나의 음전하 포스페이트 그룹; 및

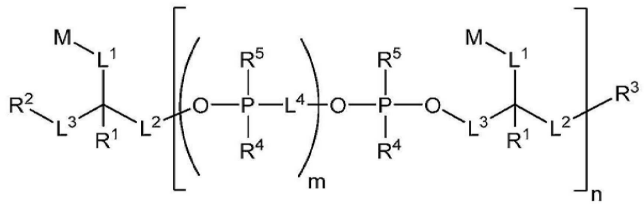
iii) 상기 표적화 모이어티 상 상보적 반응성 그룹(complementary reactive group) Q'와의 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹 Q

를 포함하고;

여기서, 상기 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티 각각이 상기 적어도 하나의 음전하 포스페이트 그룹을 포함하는 링커를 통해 인접한 형광 또는 착색 모이어티에 연결되고,

상기 중합체성 염료가 하기 구조 (I) 또는 이의 입체이성체, 염 또는 호변체를 가지며:

화학식 (I)



상기 화학식 (I)에서,

M은, 각 발생에서, 독립적으로 상기 형광 또는 착색 모이어티를 포함하는 모이어티이고;

L^1은, 각 발생에서, 독립적으로: i) 임의의(optional) 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이거나; 또는 ii) 2개의 상보적 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능 그룹을 포함하는 링커이고;

L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이고;

L^4는, 각 발생에서, 독립적으로 알킬렌 또는 알킬렌 옥사이드 링커이고;

R^1은, 각 발생에서, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

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

R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

R^5는, 각 발생에서, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

R_a는 O 또는 S이고;

R_b는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

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

R_d는 카운터 이온이고;

L'는, 각 발생에서, 독립적으로 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체 잔기(residue)에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

m은, 각 발생에서, 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단, 적어도 하나의 발생의(at least one occurrence of) m은 1 이상의 정수이고, 이에 의해 상기 화합물은 적어도 하나의 L^4를 포함하고;

n은 1 이상의 정수이다;

b) 상기 표적화 모이어티는 표적 분석물(target analyte)에 대해 친화도를 갖고, 상기 상보적 반응성 그룹 Q'를 포함하는, 방법.

청구항 2

표적 분석물의 검출 방법으로서, 상기 방법은:

a) 공유 접합체를 상기 표적 분석물과 회합시켜(associating) 분석물-표적화 모이어티 복합물(complex)을 마그네슘 염의 존재하에 형성하는 단계로서, 상기 공유 접합체가:

i) 상기 표적 분석물에 대한 친화도를 갖고, 중합체성 염료에 대한 공유 결합을 포함하는 표적화 모이어티;

ii) A) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티로서, 상기 형광 및 착색 모이어티는 아릴 또는 헤테로아릴 환으로부터 선택되는 3개 이상의 환을 포함하는, 형광 또는 착색 모이어티;

B) 적어도 하나의 음전하 포스페이트 그룹; 및

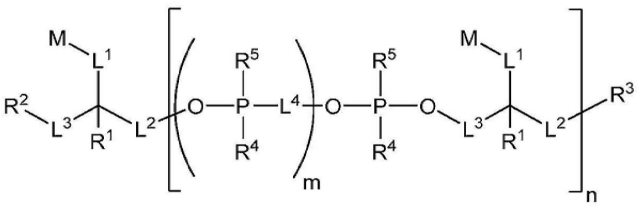
C) 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합

을 포함하는, 상기 중합체성 염료

를 포함하고, 여기서, 상기 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티 각각이 상기 적어도 하나의 음전하 포스페이트 그룹을 포함하는 링커를 통해 인접한 형광 또는 착색 모이어티에 연결되고,

상기 중합체성 염료가 하기 구조 (I) 또는 이의 입체이성체, 염 또는 호변체를 가지며:

화학식 (I)



상기 화학식 (I)에서,

M은, 각 발생에서, 독립적으로 상기 형광 또는 착색 모이어티를 포함하는 모이어티이고;

L^1은, 각 발생에서, 독립적으로: i) 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이거나; 또는 ii) 2개의 상보적 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능 그룹을 포함하는 링커이고;

L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이고;

L^4는, 각 발생에서, 독립적으로 알킬렌 또는 알킬렌 옥사이드 링커이고;

R^1은, 각 발생에서, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

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

R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

R^5는, 각 발생에서, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

R_a는 O 또는 S이고;

R_b는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

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

R_d는 카운터 이온이고;

L'는, 각 발생에서, 독립적으로 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체 잔기(residue)에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

m은, 각 발생에서, 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단, 적어도 하나의 발생의(at least one occurrence of) m은 1 이상의 정수이고, 이에 의해 상기 화합물은 적어도 하나의 L^4를 포함하고;

n은 1 이상의 정수인, 상기 단계; 및

b) 상기 분석물-표적화 모이어티 복합물로부터 형광 또는 착색 신호(fluorescent or colored signal)를 검출하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 3

표적 분석물의 검출 방법으로서, 상기 방법은:

a) 공유 접합체를 상기 표적 분석물과 회합시켜 분석물-표적화 모이어티 복합물을 형성하는 단계로서, 상기 공유 접합체가:

i) 상기 표적 분석물에 대한 친화도를 갖고, 중합체성 염료에 대한 공유 결합을 포함하는 표적화 모이어티; 및

ii) A) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티로서, 상기 형광 및 착색 모이어티는 아릴 또는 헤테로아릴 환으로부터 선택되는 3개 이상의 환을 포함하는, 형광 또는 착색 모이어티;

B) 적어도 하나의 음전하 포스페이트 그룹; 및

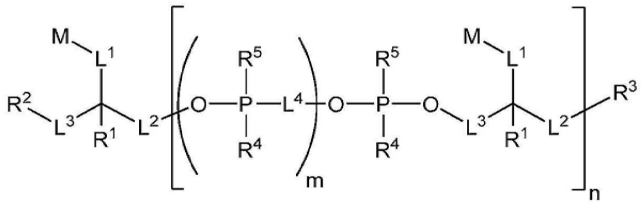
C) 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합

을 포함하는, 상기 중합체성 염료

를 포함하고, 여기서, 상기 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티 각각이 상기 적어도 하나의 음전하 포스페이트 그룹을 포함하는 링커를 통해 인접한 형광 또는 착색 모이어티에 연결되고,

상기 중합체성 염료가 하기 구조 (I) 또는 이의 입체이성체, 염 또는 호변체를 가지며:

화학식 (I)



상기 화학식 (I)에서,

M은, 각 발생에서, 독립적으로 상기 형광 또는 착색 모이어티를 포함하는 모이어티이고;

L^1은, 각 발생에서, 독립적으로: i) 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이거나; 또는 ii) 2개의 상보적 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능 그룹을 포함하는 링커이고;

L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이고;

L^4는, 각 발생에서, 독립적으로 알킬렌 또는 알킬렌 옥사이드 링커이고;

R^1은, 각 발생에서, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

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

R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

R^5는, 각 발생에서, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

R_a는 O 또는 S이고;

R_b는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

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

R_d는 카운터 이온이고;

L'는, 각 발생에서, 독립적으로 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체 잔기(residue)에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

m은, 각 발생에서, 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단, 적어도 하나의 발생의(at least one occurrence of) m은 1 이상의 정수이고, 이에 의해 상기 화합물은 적어도 하나의 L^4를 포함하고;

n은 1 이상의 정수인, 상기 형성 단계;

b) 처리 단계로서:

i) 상기 공유 접합체 및 상기 표적 분석물을 회합시키는 동안, 상기 공유 접합체 및 상기 표적 분석물을 마그네슘 염으로 처리하고/하거나;

ii) 상기 공유 접합체 및 상기 표적 분석물을 회합시킨 후, 상기 분석물-표적화 모이어티 복합물을 마그네슘 금속 염을 포함하는 세척 용액으로 처리하는, 처리 단계; 및

c) 상기 분석물-표적화 모이어티 복합물로부터 형광 또는 착색 신호를 검출하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 공유 접합체와 상기 표적 분석물의 회합을 마그네슘 염의 존재하에 수행하는, 방법.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

A) 상기 형광 또는 착색 신호를 검출하기 전에 상기 분석물-표적화 모이어티 복합물로부터 마그네슘 염 모두를 실질적으로 제거하는 단계;

B) 상기 공유 접합체를 형성하는 단계로서, 상기 공유 접합체를 형성하기 전에, 상기 중합체성 염료 및 마그네슘 염을 혼합하여 상기 중합체성 염료 및 상기 마그네슘 염을 포함하는 조성물을 형성시키는 단계, 및

C) 상기 공유 접합체를 형성하기 전에, 상기 중합체성 염료 및 상기 마그네슘 염을 포함하는 조성물을 숙성시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 6

공유 접합체 및 마그네슘 염을 포함하는 조성물로서, 상기 공유 접합체가:

i) 중합체성 염료에 대한 공유 결합을 포함하는 표적화 모이어티;

ii) a) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티로서, 상기 형광 및 착색 모이어티는 아릴 또는 헤테로아릴 환으로부터 선택되는 3개 이상의 환을 포함하는, 형광 또는 착색 모이어티;

b) 적어도 하나의 음전하 포스페이트 그룹; 및

c) 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합

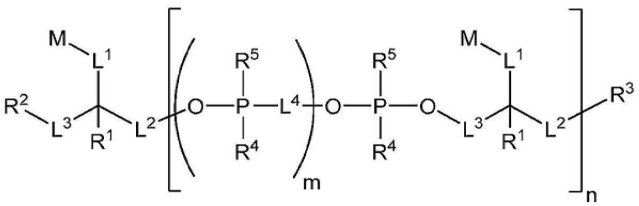
을 포함하는, 상기 중합체성 염료

를 포함하고,

상기 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티 각각이 상기 적어도 하나의 음전하 포스페이트 그룹을 포함하는 링커를 통해 인접한 형광 또는 착색 모이어티에 연결되며,

상기 중합체성 염료가 하기 구조 (I) 또는 이의 입체이성체, 염 또는 호변체를 갖는, 조성물:

화학식 (I)



상기 화학식 (I)에서,

M은, 각 발생에서, 독립적으로 상기 형광 또는 착색 모이어티를 포함하는 모이어티이고;

L^1은, 각 발생에서, 독립적으로: i) 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이거나; 또는 ii) 2개의 상보적 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능 그룹을 포함하는 링커이고;

L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이고;

L^4는, 각 발생에서, 독립적으로 알킬렌 또는 알킬렌 옥사이드 링커이고;

R^1은, 각 발생에서, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

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

R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

R^5는, 각 발생에서, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

R_a는 O 또는 S이고;

R_b는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

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

R_d는 카운터 이온이고;

L'는, 각 발생에서, 독립적으로 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체 잔기(residue)에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

m은, 각 발생에서, 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단, 적어도 하나의 발생의(at least one occurrence of) m은 1 이상의 정수이고, 이에 의해 상기 화합물은 적어도 하나의 L^4를 포함하고;

n은 1 이상의 정수이다.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 마그네슘 염이 염화마그네슘인, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커가 하나 이상의 알킬렌 또는 알킬렌 옥사이드 모이어티를 추가로 포함하고, 임의로 상기 알킬렌 옥사이드 모이어티가 폴리에틸렌 옥사이드 모이어티를 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

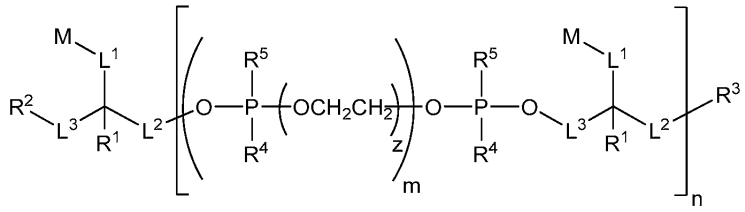
A) 상기 공유 접합체가 상기 마그네슘 염의 부재하에 제조된 상응하는 접합체보다 적어도 1.1 배 높은 형광 소광 계수(fluorescent extinction coefficient)를 갖거나;

B) 상기 공유 접합체가 상기 마그네슘 염의 부재하에 제조된 상응하는 접합체보다 적어도 1.2 배 높은 형광 소광 계수를 갖는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중합체성 염료가 하기 구조 (IA)를 갖는, 방법:

화학식 (IA)



상기 화학식 (IA)에서,

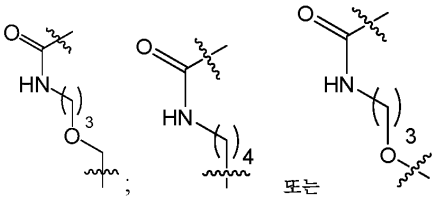
A) z는 2 내지 100의 정수이거나;

B) z는 3 내지 6의 정수이다.

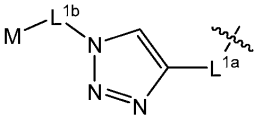
청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

A) L^1이 하기 구조 중 하나를 갖거나:

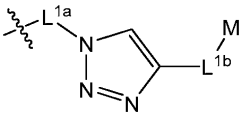


B) 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, L^1-M이 하기 구조를 갖거나;



여기서, L^{1a} 및 L^{1b}는 각각 독립적으로 임의의 링커이다;

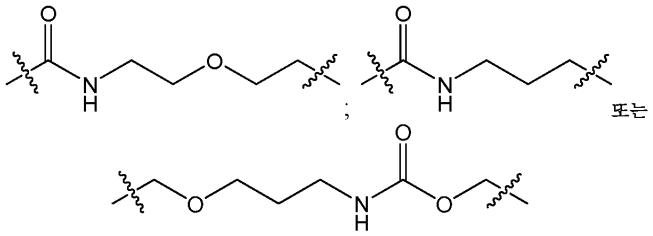
C) 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, L^1-M이 하기 구조를 갖거나;



여기서, L^{1a} 및 L^{1b}는 각각 독립적으로 임의의 링커이거나,

L^{1a} 및 L^{1b}가, 존재하는 경우, 각각 독립적으로 알킬렌 또는 헤테로알킬렌이거나,

L^{1a} 및 L^{1b}가, 존재하는 경우, 독립적으로 하기 구조 중 하나를 갖는다;

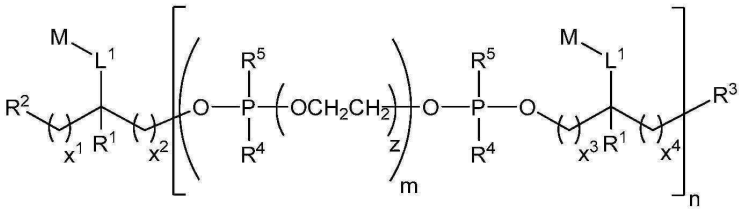


D) L^1이 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커인, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 화합물이 하기 구조 (IB)를 갖는, 방법:

화학식 (IB)



상기 화학식 (IB)에서,

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

z는 2 내지 100의 정수이다.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

A) R^4가, 각 발생에서, 독립적으로 OH, O^- 또는 OR_d이고/이거나;

B) R^5가, 각 발생에서, 옥소이고/이거나;

C) R^1이, 각 발생에서, H이고/이거나;

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

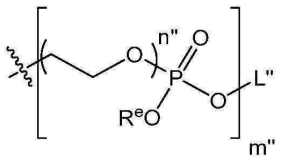
E) R^2 또는 R^3 중 하나가 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, R^2 또는 R^3 중 다른 하나가 Q 또는 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고/이거나;

F) R^2 및 R^3이 각각 독립적으로 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, 임의로 R_c가 OL'이고/이거나,

L'가, Q, 상기 표적화 모이어티, 분석물 분자, 고체 지지체, 고체 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 헤테로알킬렌 링커이고/이거나,

L'가 알킬렌 옥사이드 또는 포스포디에스테르 모이어티, 또는 이의 조합을 포함하고/하거나,

L'가 하기 구조를 갖고/갖거나;

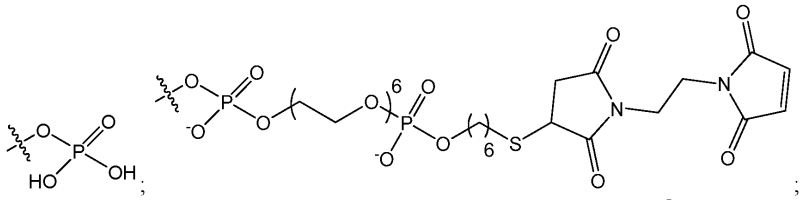


여기서, m" 및 n"는 독립적으로 1 내지 10의 정수이고;

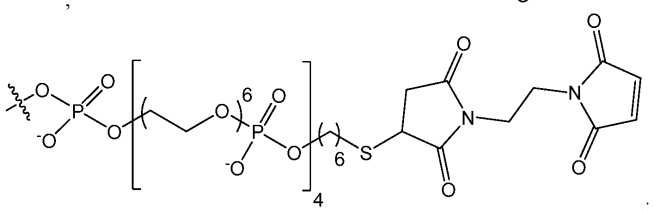
R^e는 H, 전자쌍 또는 카운터 이온이고;

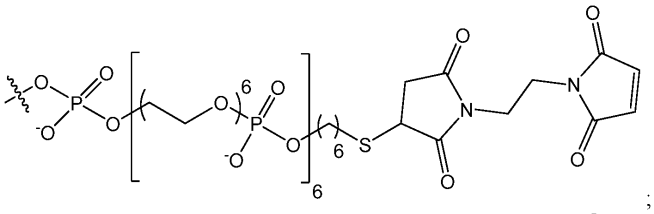
L"는, R^e 또는, Q, 상기 표적화 모이어티, 분석물 분자, 고체 지지체, 고체 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 직접 결합 또는 링크(linkage)이다;

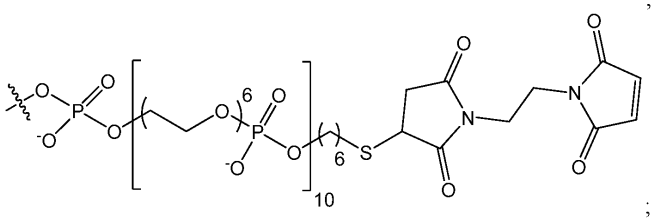
G) R^2 또는 R^3이 하기 구조 중 하나를 갖고/갖거나;

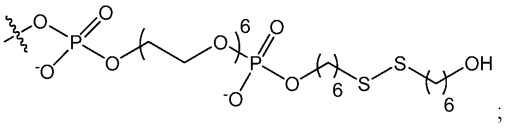

;

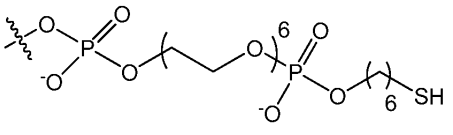
;


;

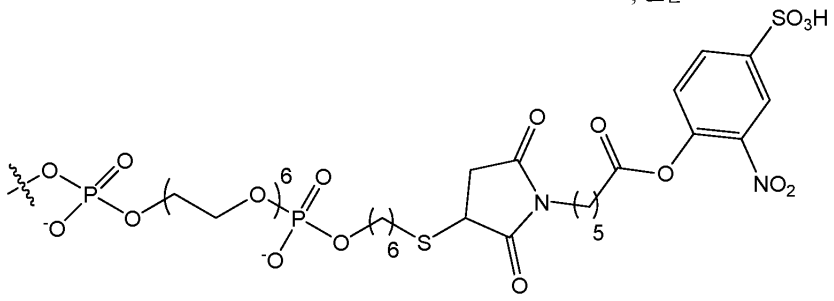

;


;

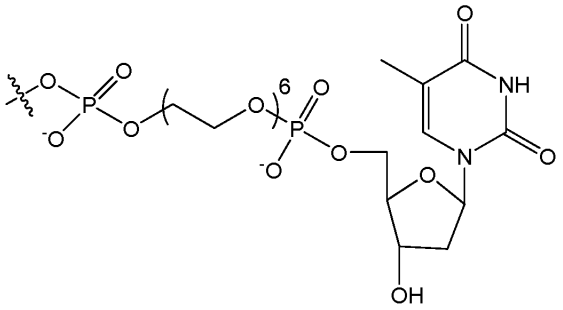

;



; 또는



H) R^2 또는 R^3이 하기 구조



를 갖는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

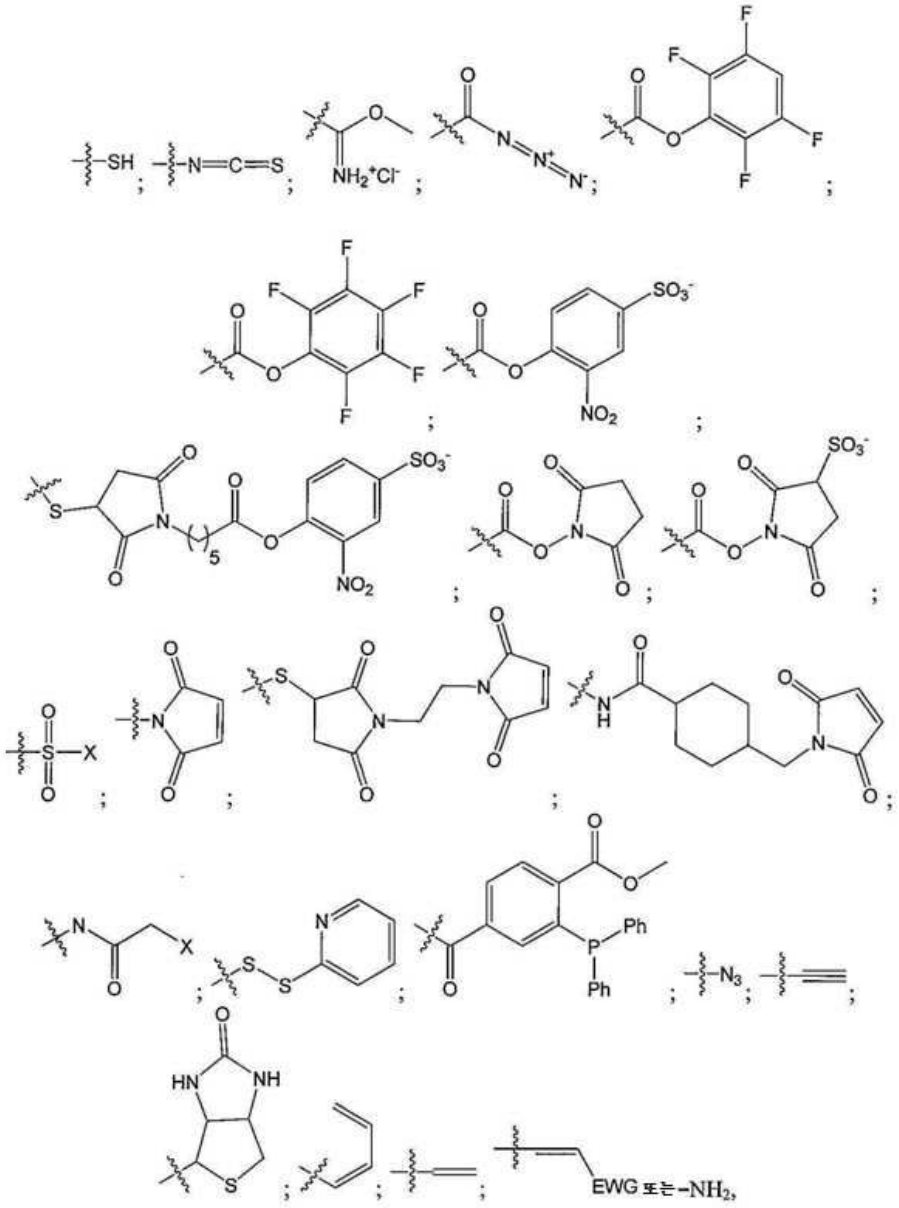
A) Q가 친핵성 반응성 그룹, 친전자성 반응성 그룹 또는 첨가환화 반응성 그룹을 포함하고/하거나;

B) Q가 설프하이드릴, 디설파이드, 활성화 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨, 알켄, 디엔, 친디엔체, 산 할라이드, 설포닐 할라이드, 포스핀, α-할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이미드 관능 그룹을 포함하고, 임의로

상기 활성화 에스테르가 N-석신이미드 에스테르, 이미도에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르이고, 또는

상기 아지드가 알킬 아지드 또는 아실 아지드이고/이거나;

C) Q가 하기의 구조 중 하나를 갖는 모이어티인, 방법:



상기식에서,

X는 할로이고;

EWG는 전자 인출 그룹 (electron withdrawing group)이다.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

A) M이, 각 발생에서, 독립적으로 아릴 또는 헤테로아릴 환으로부터 선택되는 4개 이상의 환을 포함하는 모이어티이고/이거나;

B) M이 착색되거나;

C) M이 형광성이고/이거나;

D) M이, 각 발생에서, 독립적으로 적어도 4개의 융합된 환을 포함하는 융합된-멀티사이클릭 아릴 모이어티를 포함하고/하거나;

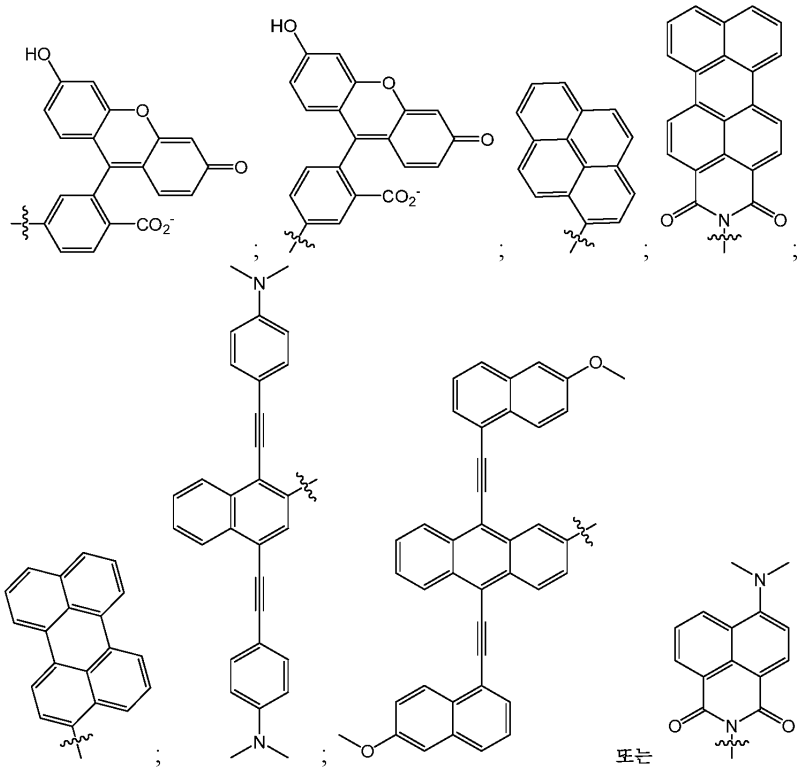
E) M이, 각 발생에서, 독립적으로 디메틸아미노스틸벤, 퀴나크리돈, 플루오로페닐-디메틸-BODIPY, his-플루오로페닐-BODIPY, 아크리딘, 테릴렌, 섹시페닐, 포르피린, 벤조피렌, (플루오로페닐-디메틸-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, (비스-플루오로페닐-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, 쿼터페닐, 바이(bi)-벤조티아졸, 터(ter)-벤조티아졸, 바이-나프틸, 바이-안트라실, 스쿠아레인, 스쿠아릴륨, 9,10-에티닐안트라센 또는 터-나프틸 모이어티이고/이거나;

F) M이, 각 발생에서, 독립적으로 p-터페닐, 페릴렌, 아조벤젠, 페나진, 페난트롤린, 아크리딘, 티옥산트렌, 크리센, 루브렌, 코로넨, 시아닌, 페릴렌 이미드, 또는 페릴렌 아미드 또는 이의 유도체이고/이거나;

G) M이, 각 발생에서, 독립적으로 쿠마린 염료, 레조루핀 염료, 디피로메텐붕소 디플루오라이드 염료, 루테늄 비피리딜 염료, 에너지 전달 염료, 티아졸 오렌지 염료, 폴리메틴 또는 N-아릴-1,8-나프탈이미드 염료이고/이거나;

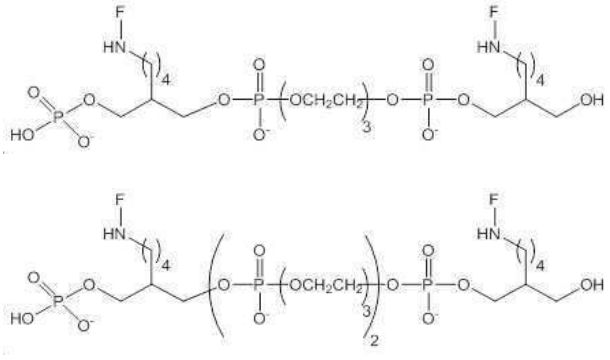
H) M이, 각 발생에서, 독립적으로 피렌, 페릴렌, 페릴렌 모노이미드 또는 6-FAM 또는 이의 유도체이고/이거나;

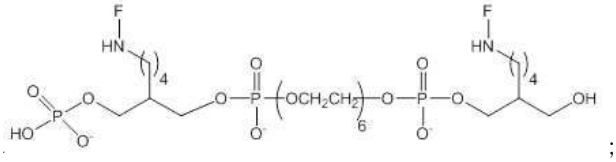
I) M이, 각 발생에서, 독립적으로 하기 구조 중 하나를 갖는, 방법:

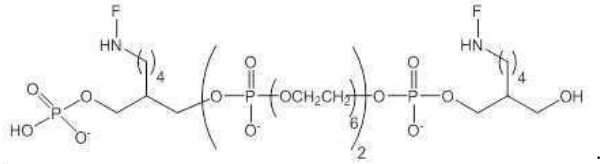


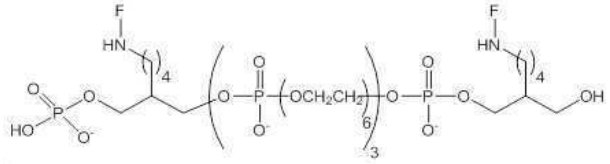
청구항 16

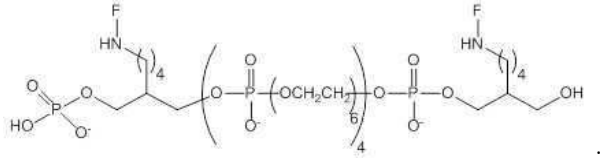
제15항에 있어서, 상기 중합체성 염료가 하기의 구조 중 하나를 갖는, 방법:

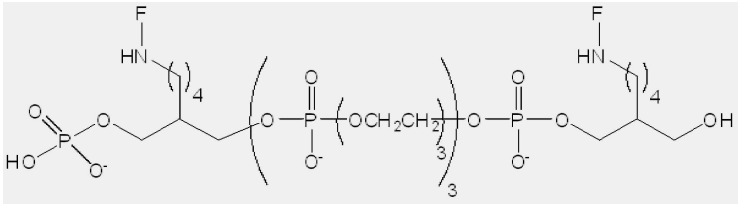


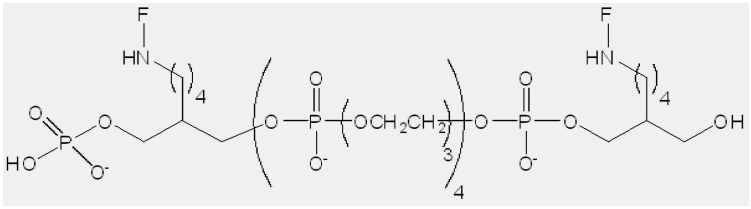

;

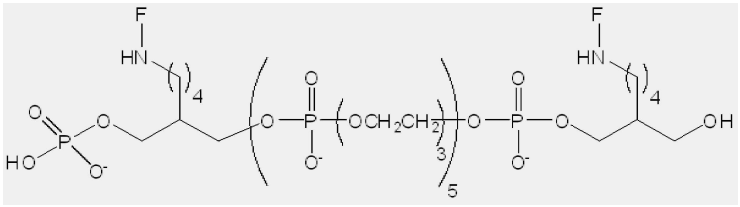

;

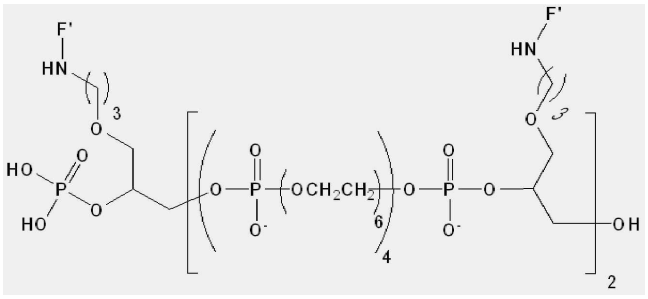

;

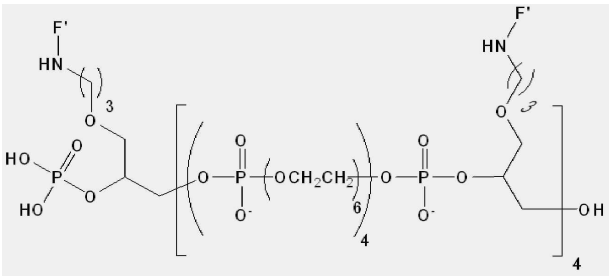

;

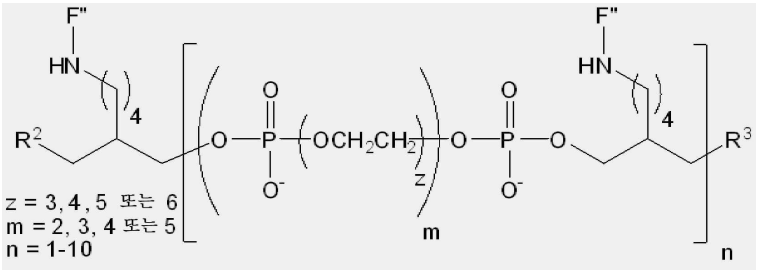

;


;


;


;

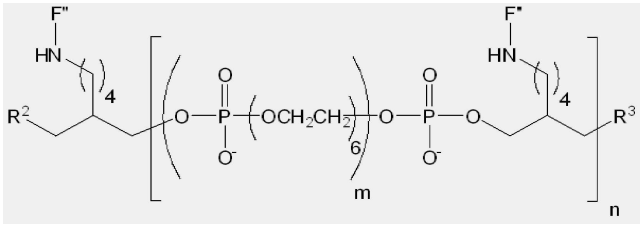

;



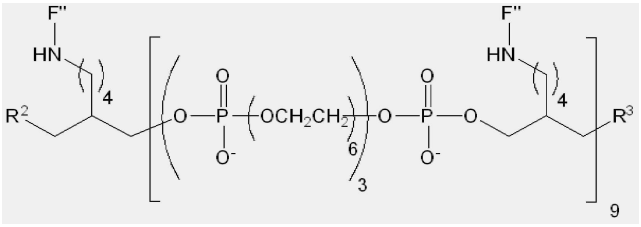
상기식에서,

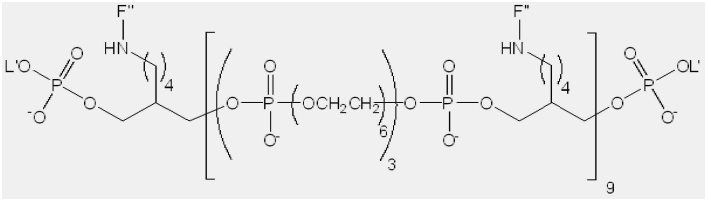
z는 3 내지 6의 정수이고,

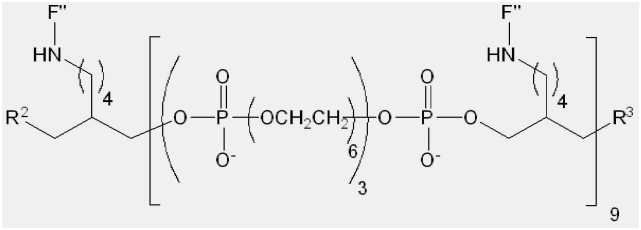
m은 2 내지 5의 정수이고,


;

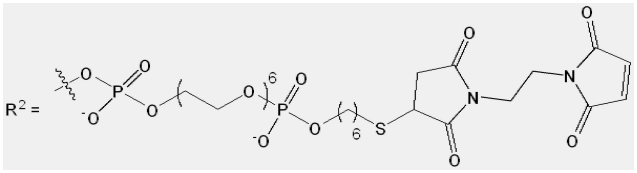
n은 1 내지 10의 정수이다;


;

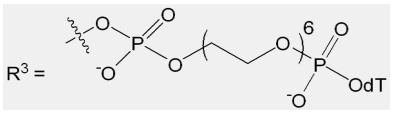




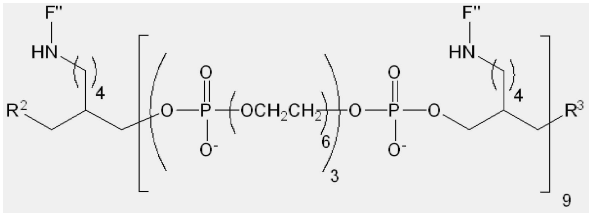
상기식에서,



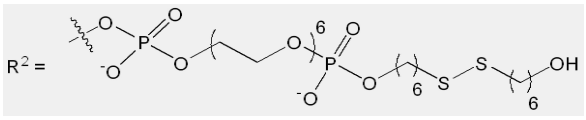
이고,



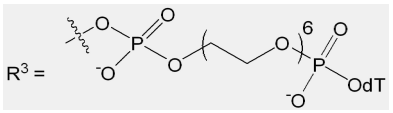
이다;



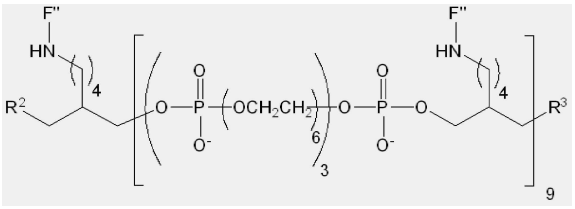
상기식에서,



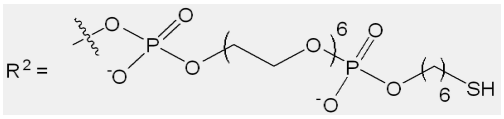
이고,



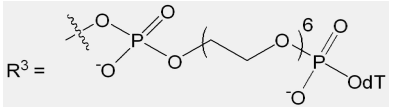
이다;



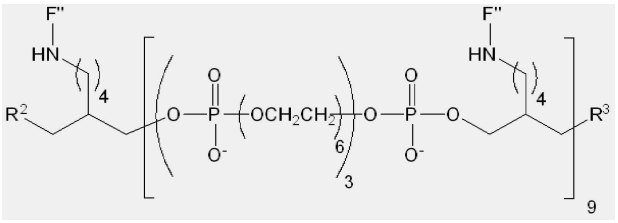
상기식에서,



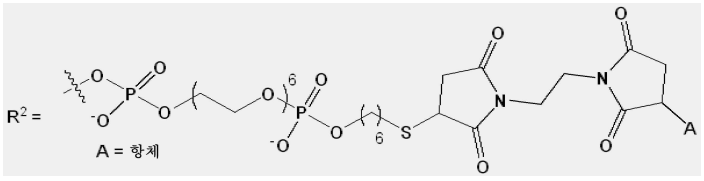
이고,



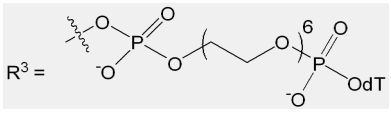
이다;



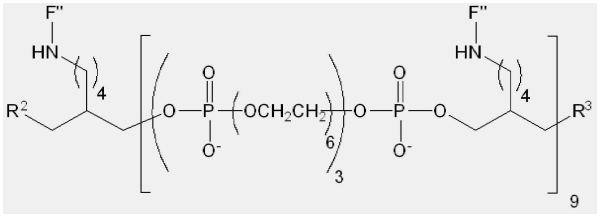
상기식에서,



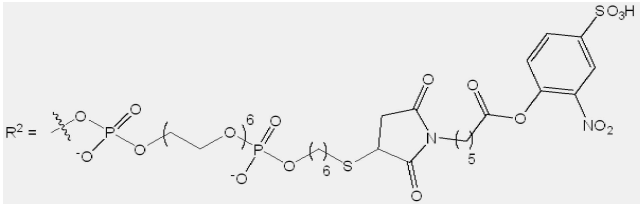
이고 , 여기서, A는 항체이고,



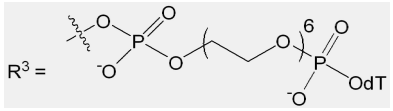
이다;



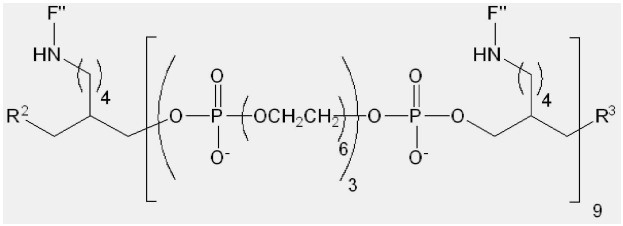
상기식에서,



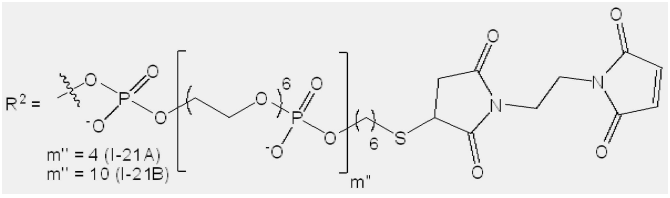
이고,



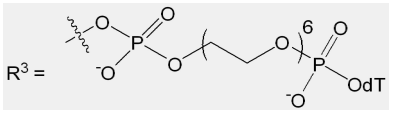
이다;



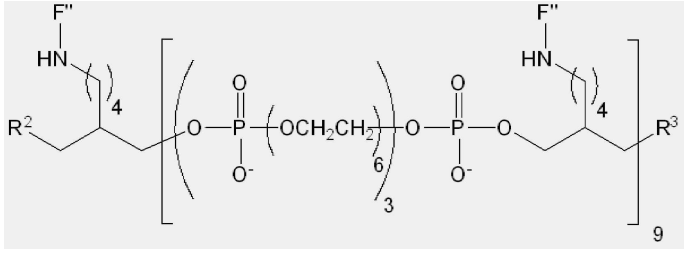
상기식에서,



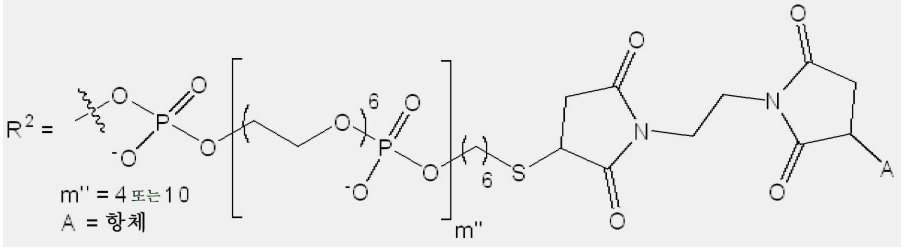
이고, 여기서, m"는 4 또는 10이고,



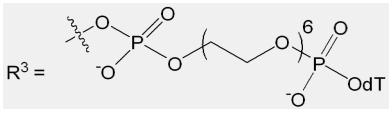
이다;



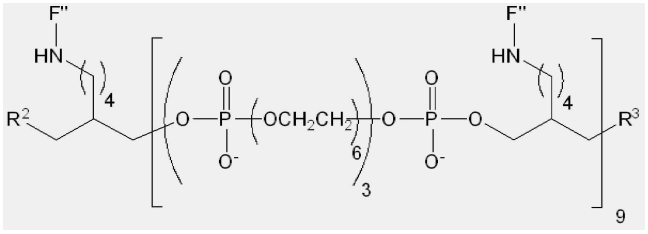
상기식에서,



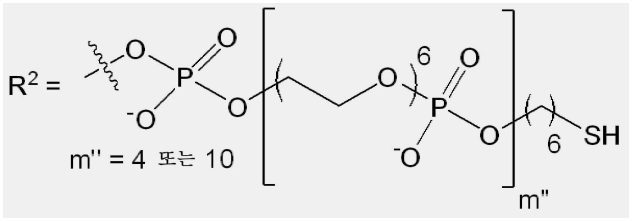
이고, 여기서, m"는 4 또는 10이고, A는 항체이고,



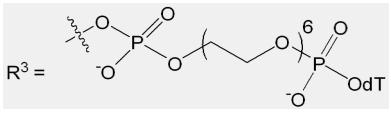
이다;



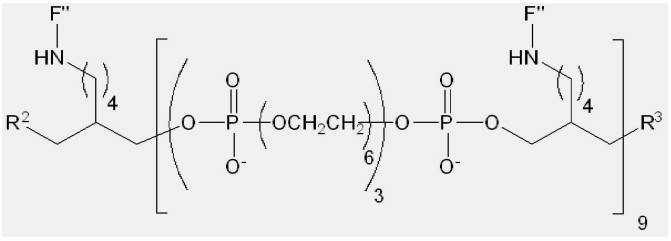
상기식에서,



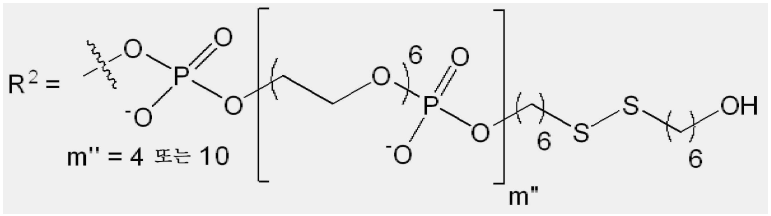
이고, 여기서, m"는 4 또는 10이고,



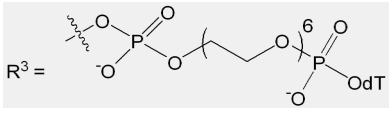
이다;



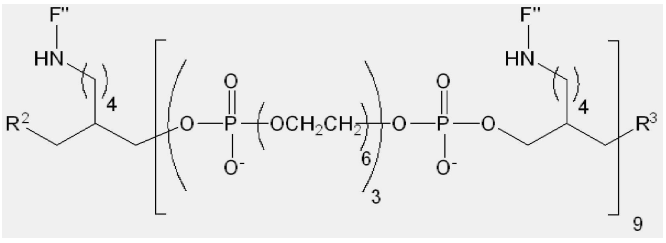
상기식에서,



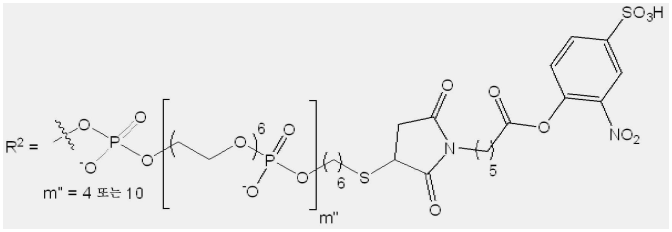
이고, 여기서, m"는 4 또는 10이고,



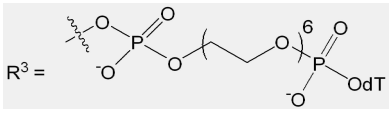
이다;



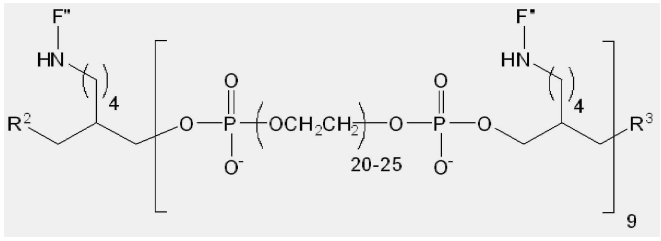
상기식에서,



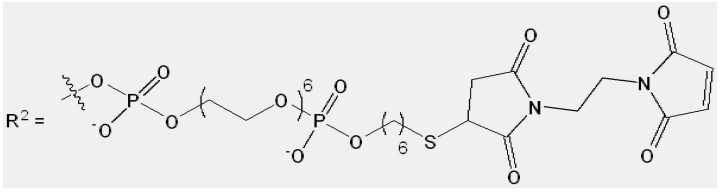
이고, 여기서, m"는 4 또는 10이고,



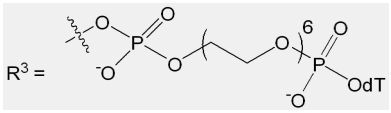
이다;



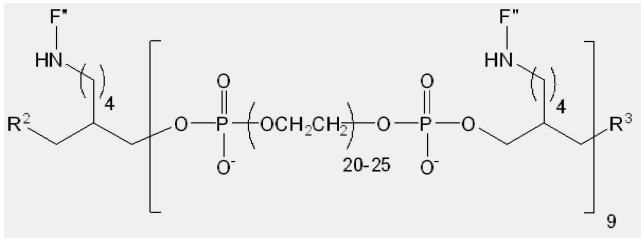
상기식에서,



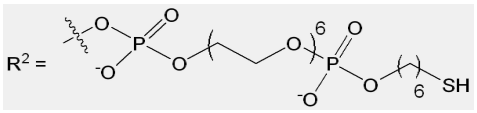
이고,



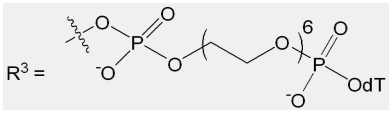
이다;



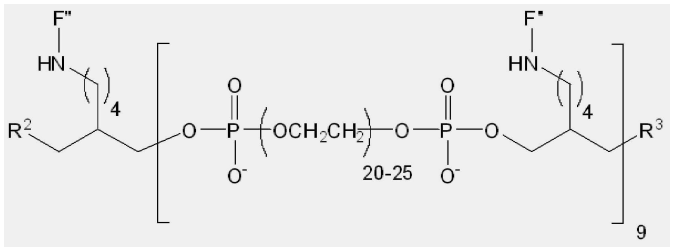
상기식에서,



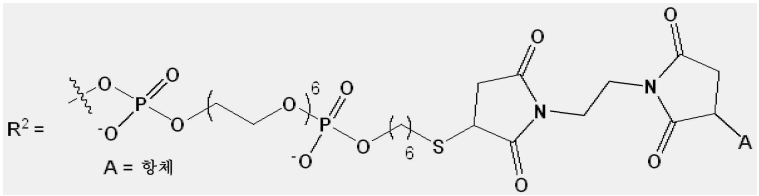
이고,



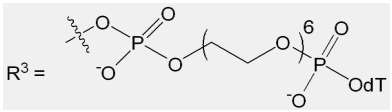
이다;



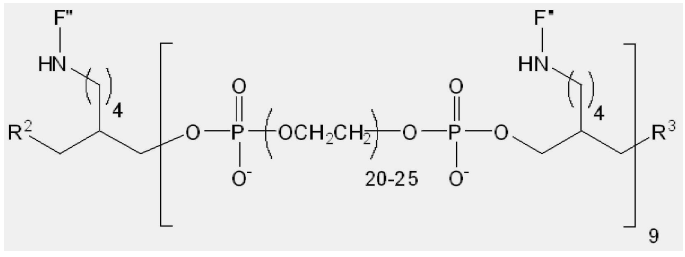
상기식에서,



이고,

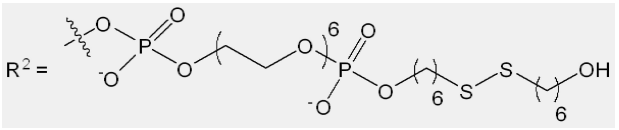


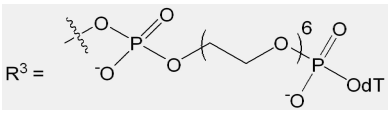
이

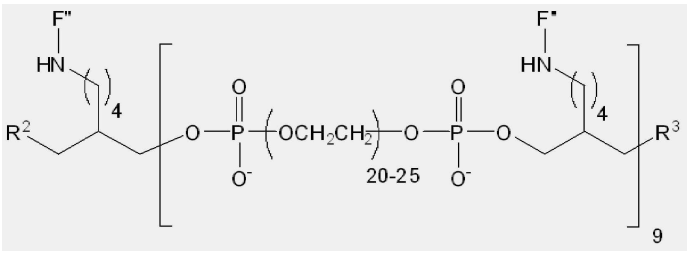


다;

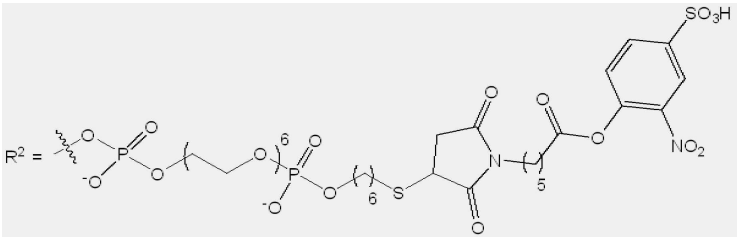
상기식에서,

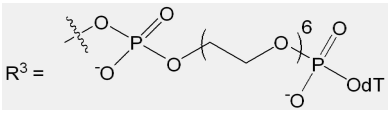

이고,

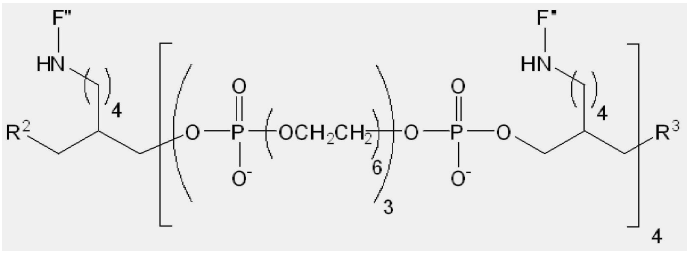

이다;



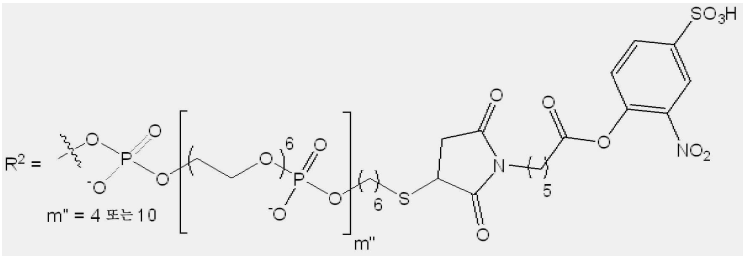
상기식에서,

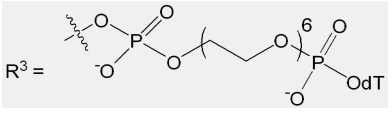

이고,

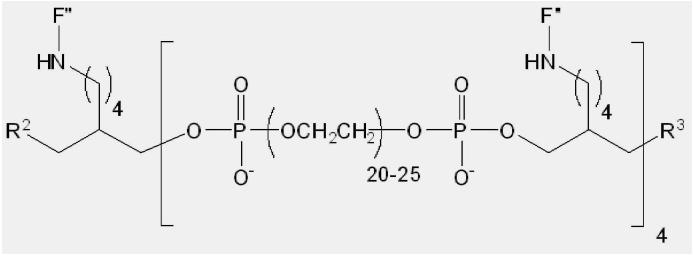

이다;



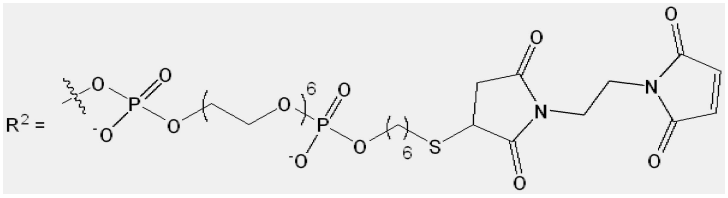
상기식에서,


이고, 여기서, m"는 4 또는 10이고,

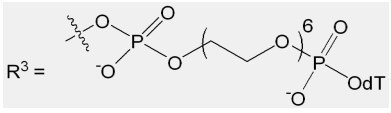

이다;



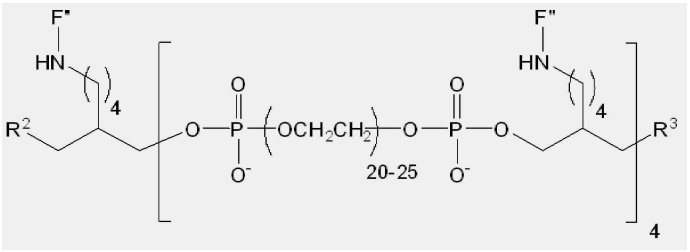
상기식에서,



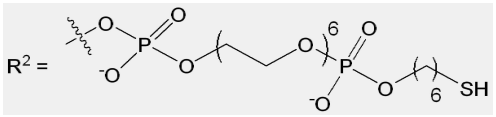
이고,



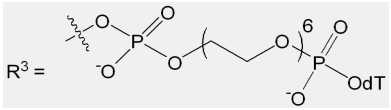
이다;



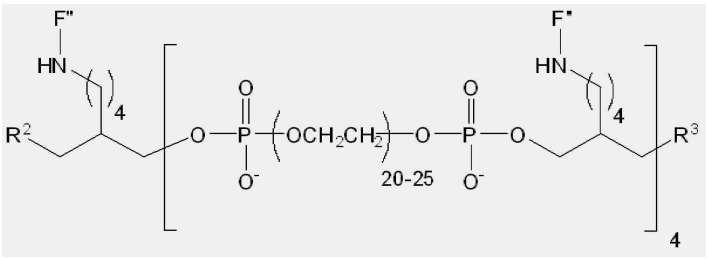
상기식에서,



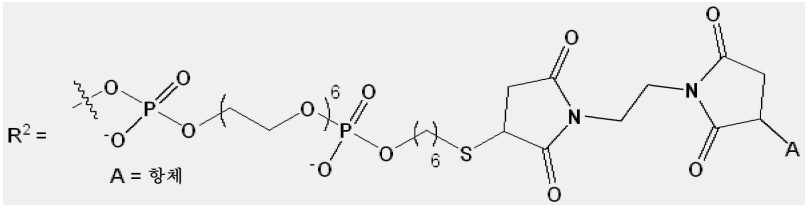
이고,



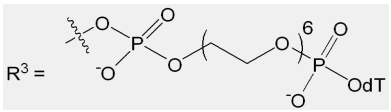
이다;



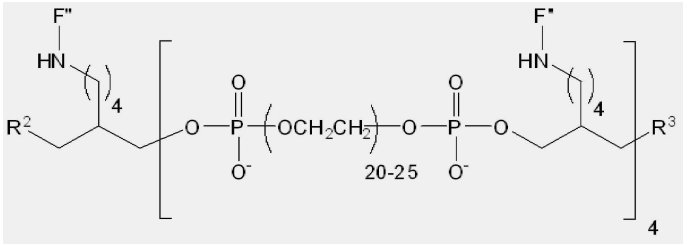
상기식에서,



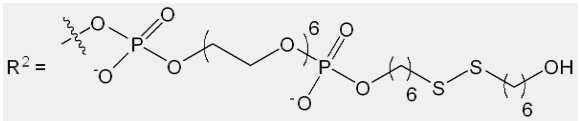
이고,



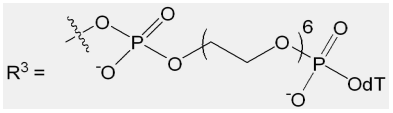
이다;

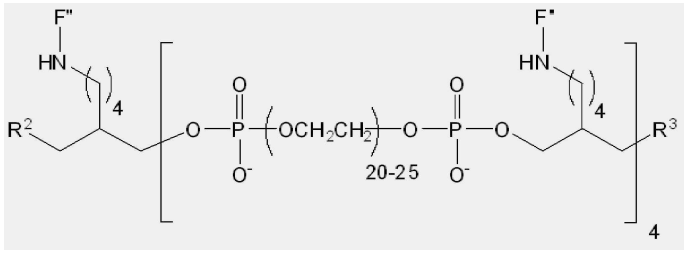


상기식에서,

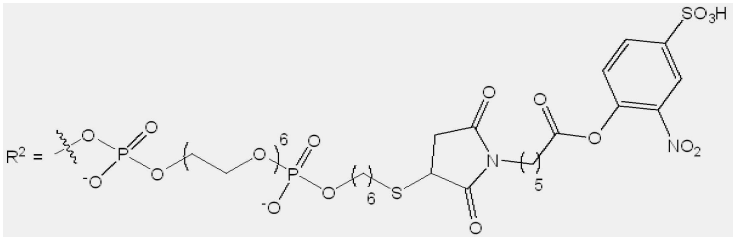


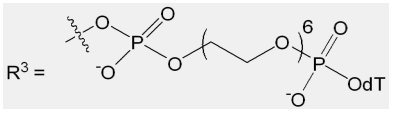
이고,

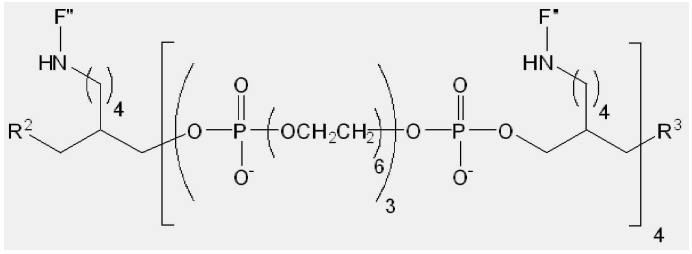

이다;



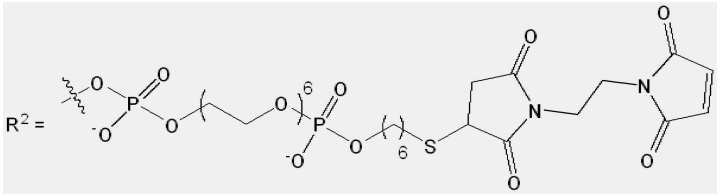
상기식에서,

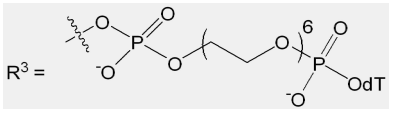

이고,

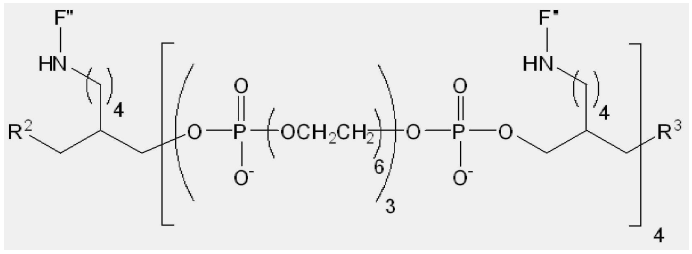

이다;



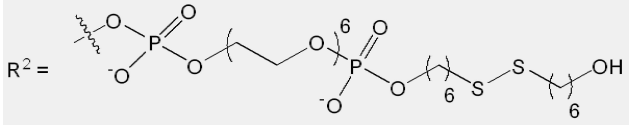
상기식에서,

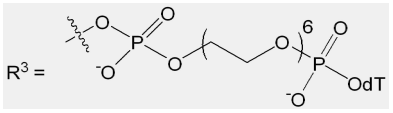

이고,


이다;

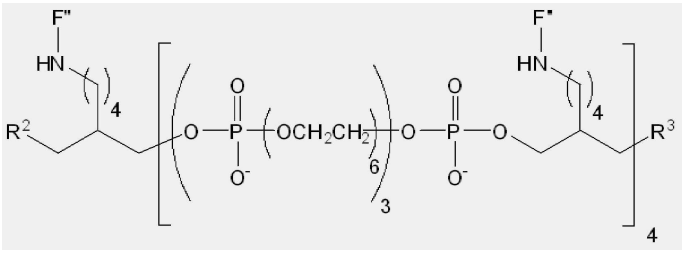


상기식에서,

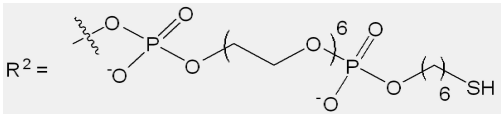

이고,



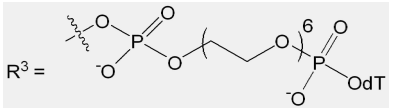
이다;



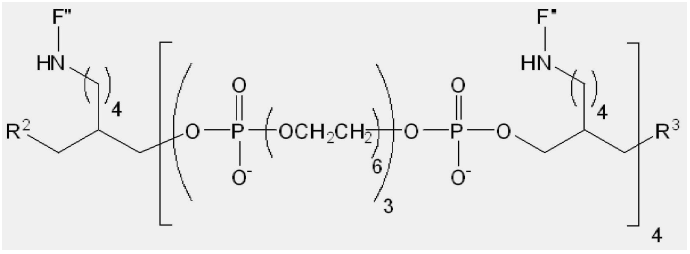
상기식에서,



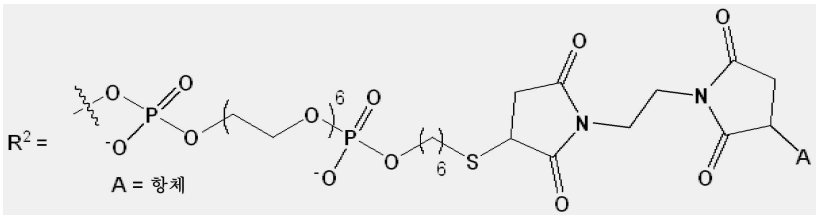
이고,



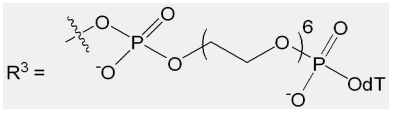
이다;



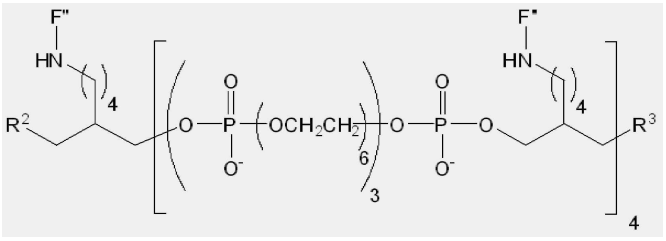
상기식에서,



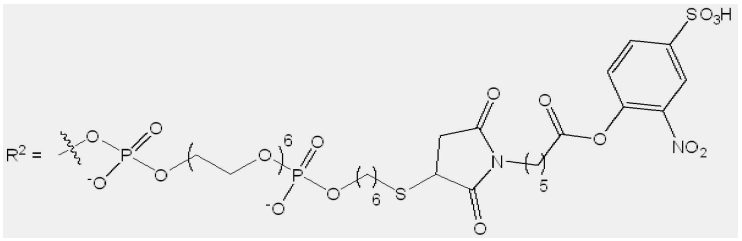
이고,



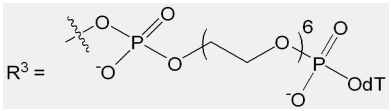
이다;



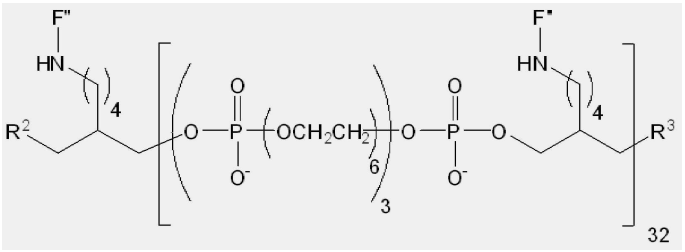
상기식에서,



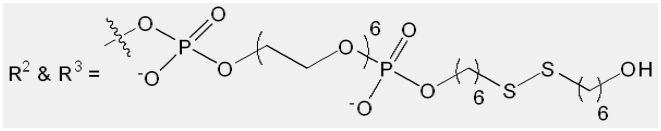
이고,



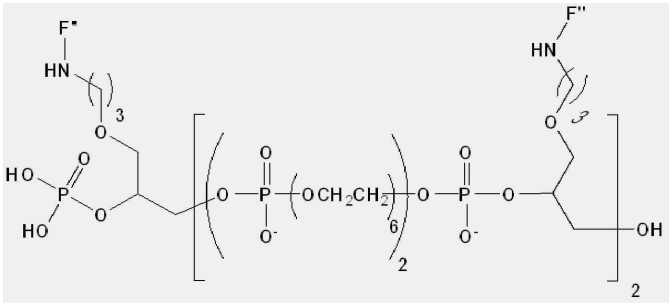
이다;



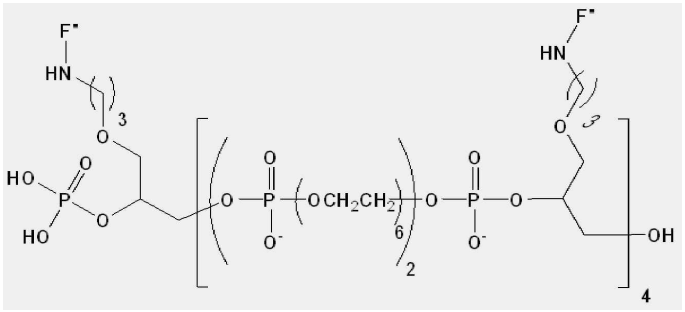
상기식에서,



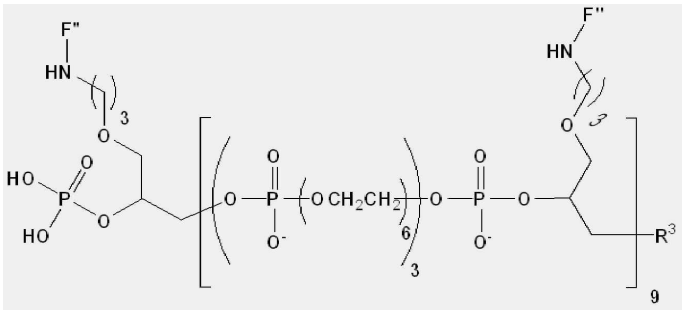
이다;



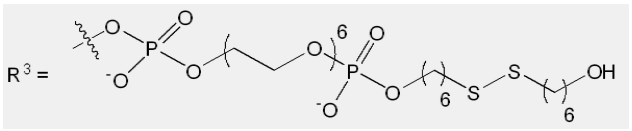
;



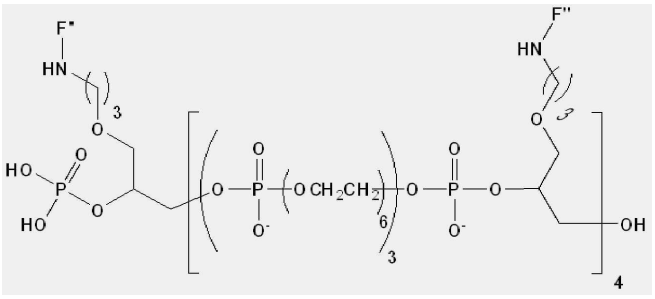
;

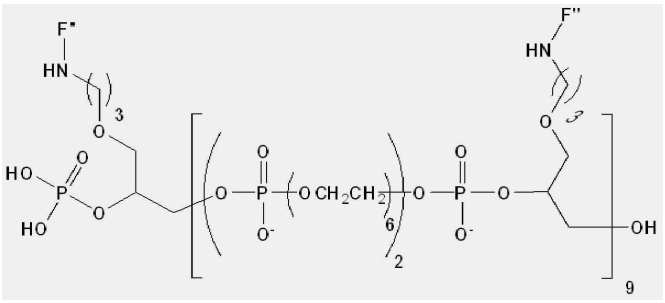


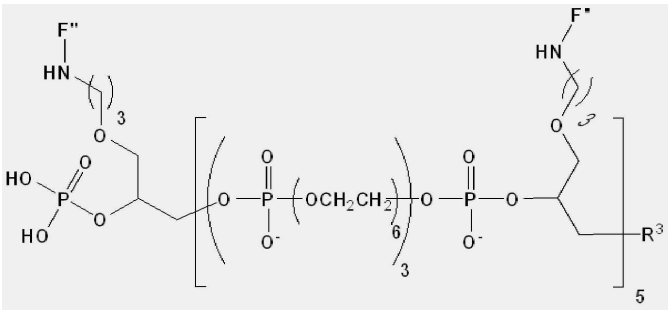
상기식에서,



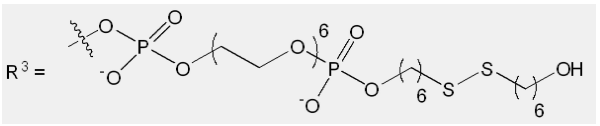
이다;

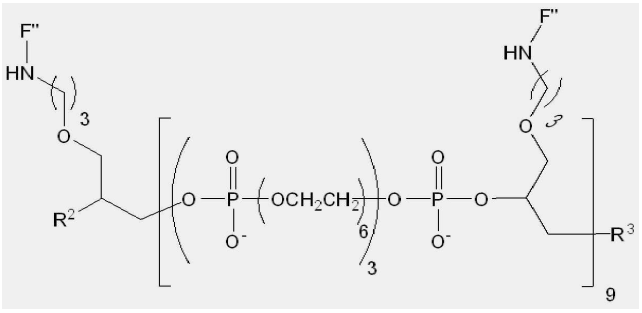

;


;

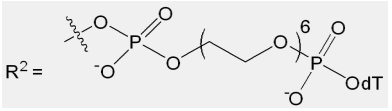


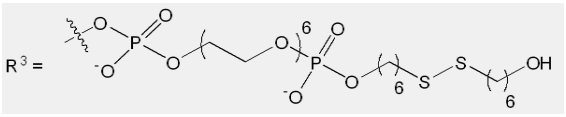
상기식에서,

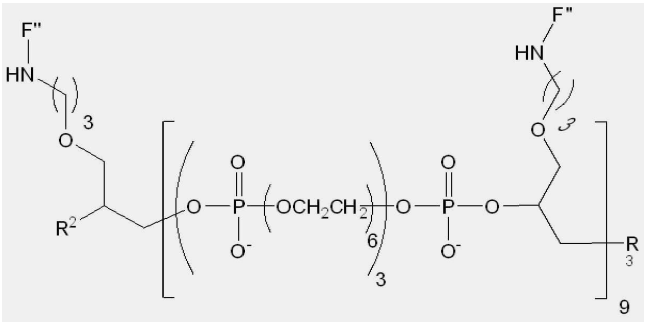

이다;



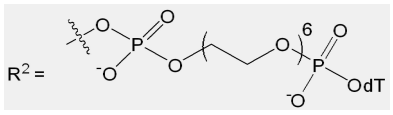
상기식에서,

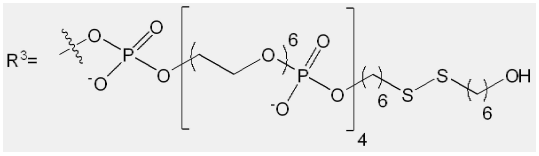

이고,

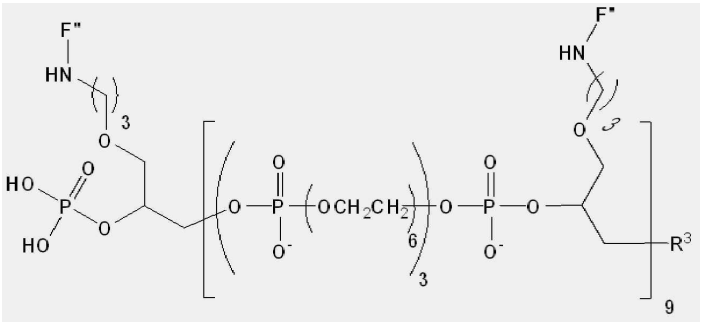

이다;



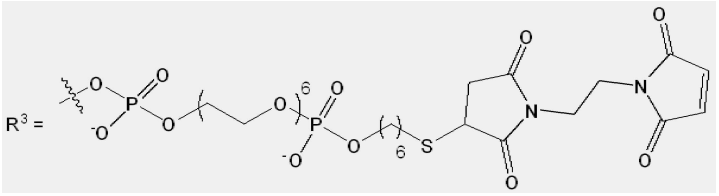
상기식에서

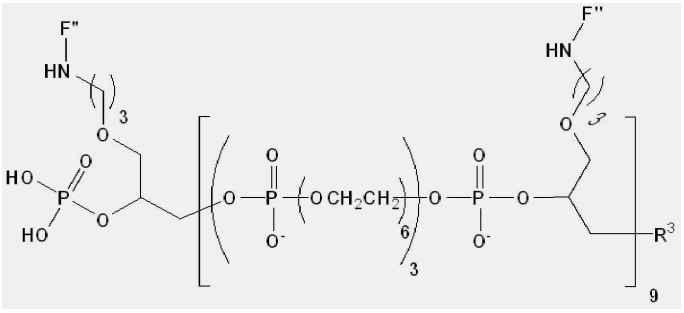

이고,


이다;

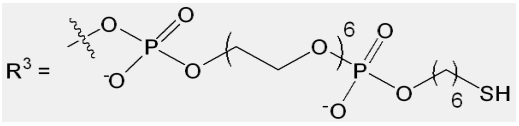


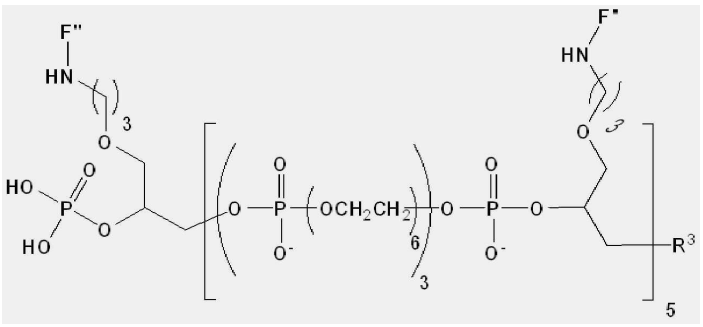
상기식에서,


이다;

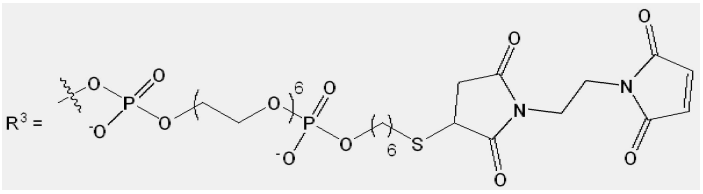


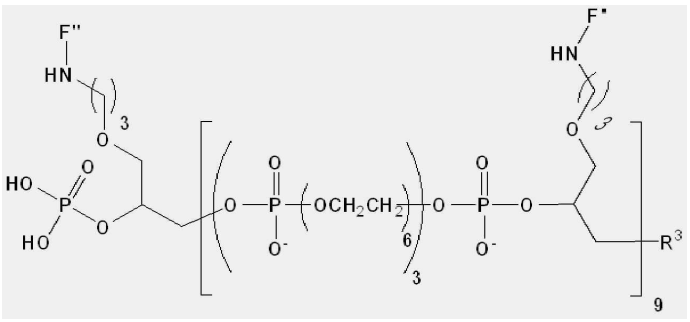
상기식에서,


이다;

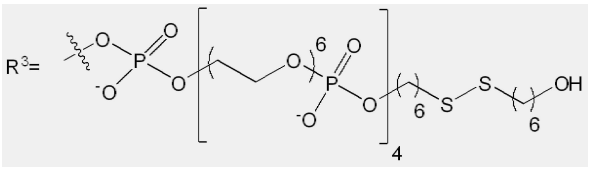


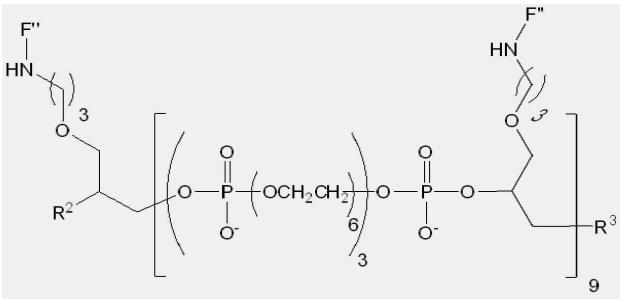
상기식에서,


이다;

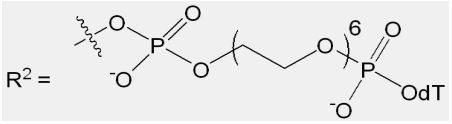


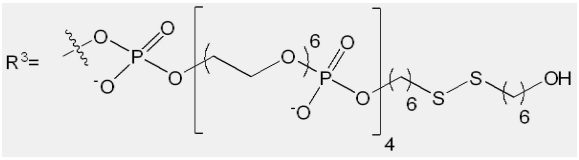
상기식에서,


이다;

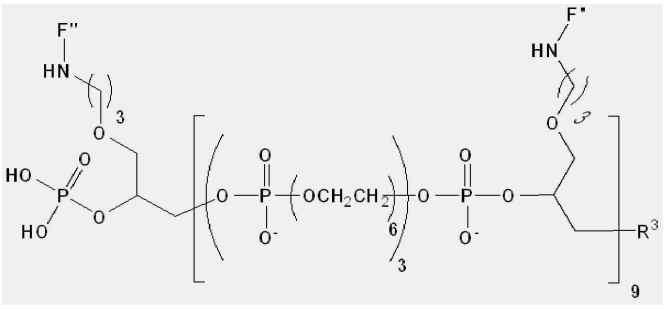


상기식에서,

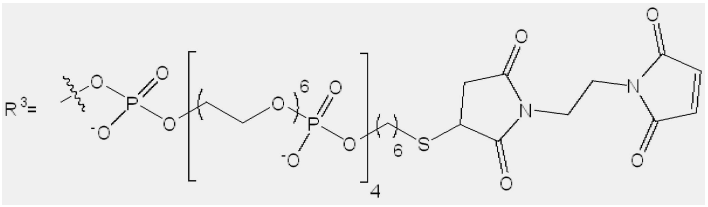

이고,



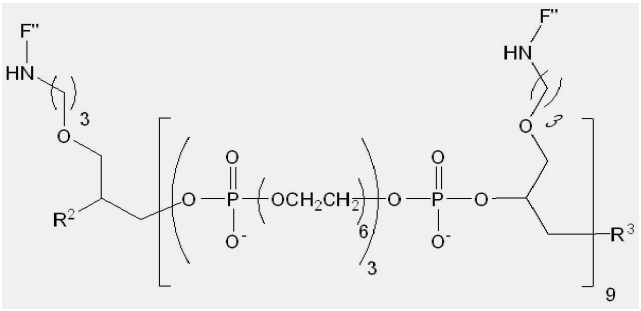
이다;



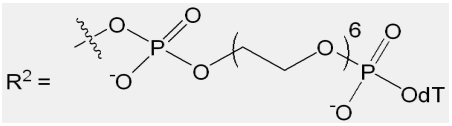
상기식에서,



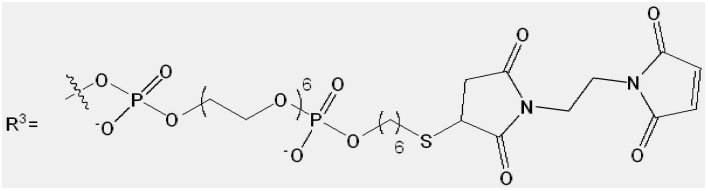
이다;



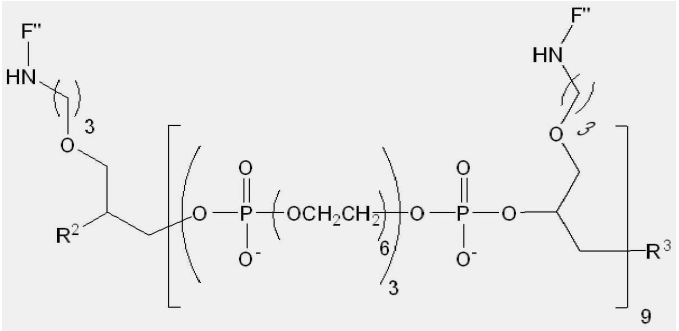
상기식에서,



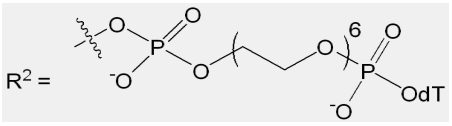
이고,



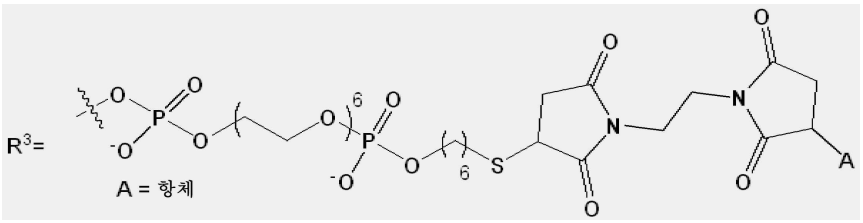
이다;



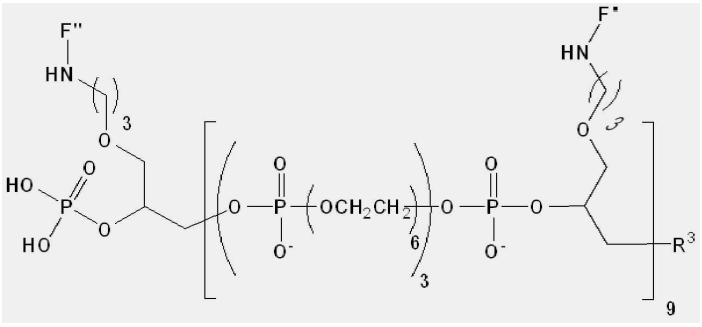
상기식에서,



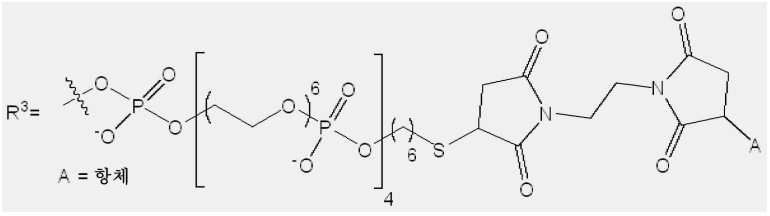
이고,



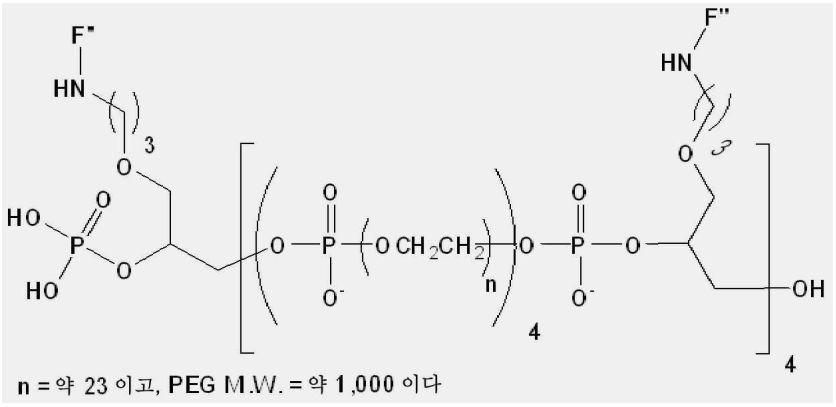
이고, 여기서, A는 항체이다;



상기식에서,



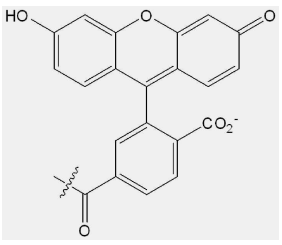
이고, 여기서, A는 항체이다; 또는

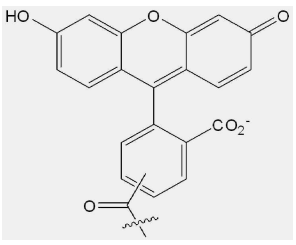


, 여기서, n은 23이고,

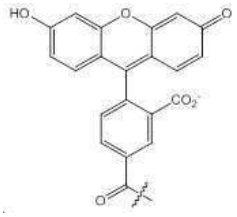
상기식에서,

F, F' 및 F''는 각각 하나의 구조를 갖는다:



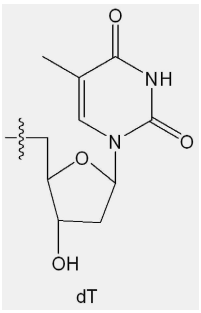


F F'



F'' ; 그리고

dT는 하기의 구조를 갖는다:



.

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

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명 일반적으로 스페이스 그룹을 갖는 이량체성 및 중합체성 형광 또는 착색 염료 및 다양한 분석 방법에서 2가 또는 3가 금속 염과 함께 이들을 사용하기 위한 방법을 지시한다.

배 경 기 술

[0002] 형광 및/또는 착색 염료는 높은 민감성 검출 시약이 바람직한 적용을 위해 특히 적합한 것으로 공지되어 있다. 생물학적 샘플에서 특정 성분 또는 구성성분을 우선적으로 표지화할 수 있는 염료로 연구자가 특정 성분 또는 구성성분의 존재, 정량화 및/또는 위치를 측정할 수 있다. 추가로, 특정 시스템을 다양한 환경에서 이들의 공간 및 시간 분포에 대해 모니터링할 수 있다.

[0003] 형광 및 비색 방법은 화학 및 생물학에 매우 널리 퍼져있다. 이들 방법은 생체분자에 대한 존재, 구조, 거리, 배향, 복합화 및/또는 위치에 대한 유용한 정보를 제공한다. 추가로, 시간-분해 방법은 동역학 및 운동학의 측정에서 점점 더 많이 사용된다. 결과적으로, 생체분자, 예를 들면, 핵산 및 단백질의 형광 및 착색 표지화에 대한 다수의 전략을 개발해 왔다. 생체분자의 분석이 전형적으로 수성 환경에서 일어나기 때문에, 수용성 염료의 개발 및 사용에 초점을 맞췄다.

[0004] 고 형광 또는 착색 염료는 이러한 염료의 사용이 신호 대 노이즈 비를 증가시키고 다른 관련 이익을 제공하기 때문에 바람직하다. 따라서, 공지된 형광 및/또는 착색 모이어티(moieties)로부터의 신호를 증가시키는 시도가 있었다. 예를 들면, 2개 이상의 형광 및/또는 착색 모이어티를 포함하는 이량체성 및 중합체성 화합물을, 이러한 화합물이 더 밝은 염료를 수득할 것을 예상하면서 제조하였다. 그러나, 분자내 형광 켄칭(intramolecular fluorescence quenching)의 결과로서, 공지된 이량체성 및 중합체성 염료는 목적하는 명도(brightness)의 증가를 성취하지 못하였다.

[0005] 따라서, 당해 기술분야에 증가된 몰 명도를 갖는 수용성 염료를 사용하는 방법이 필요하다. 이상적으로, 이러한 염료 및 바이오마커를 사용하는 방법은 강렬하게 착색 또는 형광성이어야 하고, 다양한 유색 및 형광 파장에서 이용가능하다. 본 발명은 이러한 필요성을 수행하고, 추가로 관련 이점을 제공한다.

발명의 내용

[0006] 간단한 요지

[0007] 간략하게, 본 발명의 실시형태는 일반적으로 분석물(analyte) 분자, 예를 들면, 생체분자를 가시적 검출을 가능

하게 하는 형광 및/또는 착색 염료 및/또는 프로브, 뿐만 아니라 이들의 제조를 위한 시약을 사용하는 조성물 및 방법을 지시한다. 염료를 사용하여 분석물 분자를 가시적으로 검출하는 방법을 또한 기재한다.

[0008] 실시형태에서, 본 발명의 개시내용은, a) i) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티; ii) 적어도 하나의 음전하 그룹; 및 iii) 반응성 그룹 Q를 포함하는 중합체성 염료; 및 b) 2가 또는 3가 금속 염을 포함하는 조성물을 제공한다. 임의의 적합한 중합체성 염료는 본원 개시 내용의 임의의 방법 또는 조성물에서 사용될 수 있다.

[0009] 실시형태에서, 본 발명의 개시내용은 중합체성 염료 및 표적화 모이어티의 공유 접합체(covalent conjugate)를 형성하는 방법을 제공하고, 상기 방법은, 상기 중합체성 염료, 상기 표적화 모이어티, 및 2가 또는 3가 금속 염을 포함하는 혼합물을 제조하는 단계, 및 상기 공유 접합체를 형성하기 위해 충분한 시간 동안 및 온도에서 상기 혼합물을 숙성시키는 단계를 포함하고, 여기서: a) 상기 중합체성 염료는: i) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티; ii) 적어도 하나의 음전하 그룹; 및 iii) 상기 표적화 모이어티 상 상보적 반응성 그룹 Q'와의 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹 Q를 포함하고; b) 상기 표적화 모이어티는 표적 분석물에 대해 친화도를 갖고, 상기 상보적 반응성 그룹 Q'를 포함한다.

[0010] 일부 실시형태에서, 본 발명의 개시내용은 표적 분석물을 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다: a) 공유 접합체를 표적 분석물과 회합시켜 2가 또는 3가 금속 염의 존재하에 분석물-표적화 모이어티 복합물을 형성시키는 단계 [상기 공유 접합체는: i) 표적 분석물에 대한 친화도를 갖고 중합체성 염료에 대해 공유 결합하는 반응성 그룹 Q'를 포함하는, 표적화 모이어티; ii) 중합체성 염료를 포함하고, 상기 중합체성 염료는: A) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티; B) 적어도 하나의 음전하 그룹; 및 C) 반응성 그룹 Q'와 공유결합된 상보적 반응성 그룹 Q를 포함하는, 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합을 포함한다]; 및 b) 상기 분석물-표적화 모이어티 복합물로부터 형광 또는 착색 신호를 검출하는 단계.

[0011] 일부 실시형태에서, 본 발명의 개시내용은 표적 분석물을 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다: a) 공유 접합체를 표적 분석물과 회합시켜 분석물-표적화 모이어티 복합물을 형성하는 단계 [상기 공유 접합체는: i) 표적 분석물에 대한 친화도를 갖고, 중합체성 염료에 공유결합된 반응성 그룹 Q'를 포함하는, 표적화 모이어티; 및 ii) 중합체성 염료를 포함하고, 상기 중합체성 염료는: A) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티; B) 적어도 하나의 음전하 그룹; 및 C) 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합 상 반응성 그룹 Q'와 공유결합된 상보적 반응성 그룹 Q를 포함한다]; b) 분석물-표적화 모이어티 복합물을 2가 또는 3가 금속 염을 포함하는 세척 용액으로 처리하는 단계; c) 상기 분석물-표적화 모이어티 복합물로부터 형광 또는 착색 신호를 검출하는 단계.

[0012] 본 발명의 이들 및 다른 측면은 하기 상세한 설명을 참조하여 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도면에서, 동일한 참조 번호는 유사한 요소와 동일하다. 도면에서 요소의 크기와 상대적 위치는 반드시 축척에 따라 도시되지는 않고, 이들 요소 중 일부는 도면 식별을 개선시키기 위해 임의로 확대 및 배치된다. 추가로, 요소의 특정한 형태는 특정 요소의 실제 형태에 대한 임의의 정보를 전달하기 위한 의도가 아니고, 단지 도면에서 용이하게 인식하기 위해 선택되었다.

도 1은 5 μm 및 pH 9에서 트리에틸렌 글리콜 스페이서를 포함하는 대표적인 화합물(spacer) 및 비교 화합물에 대한 UV 흡광 스펙트럼을 제공한다.

도 2는 5 μm 및 pH 9에서 헥사에틸렌 글리콜 스페이서를 포함하는 대표적인 화합물 및 비교 화합물에 대한 UV 흡광 데이터이다.

도 3은 50 nM 및 pH 9에서 트리에틸렌 글리콜 스페이서를 포함하는 대표적인 화합물 및 비교 화합물에 대한 형광 방출 스펙트럼이다.

도 4는 50 nM 및 pH 9에서 헥사에틸렌 글리콜 스페이서를 포함하는 대표적인 화합물 및 비교 화합물에 대한 형광 방출 스펙트럼을 나타낸다.

도 5는 단일 플루오레세인 모이어티를 갖는 비교 화합물에 비해 4개의 헥사에틸렌 글리콜 스페이서 및 2 또는 3개의 플루오레세인 모이어티를 포함하는 대표적인 화합물에 대한 5 μm에서 UV 흡광 데이터이다.

도 6은 단일 플루오레세인 모이어티를 갖는 비교 화합물에 비해 4개의 헥사에틸렌 글리콜 스페이서 및 2 또는 3개의 플루오레세인 모이어티를 포함하는 대표적인 화합물에 대한 5 μm에서 형광 방출 데이터의 그래프이다.

도 7은 다양한 m 값을 사용한 예시적인 화합물에 대한 비교 형광 방출 응답을 나타낸다.

도 8은 화합물 A에 비해 "HEG" 화합물에 대한 형광 방출을 비교하는 데이터를 제공하고, 여기서, m은 1, 2 또는 3이다.

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

도 10은 PAGE로 분석된 화합물 I-42를 삼량화하는 반응의 결과를 나타낸다.

도 11은 면역형광법에서 양이온 배치의 다이어그램이다.

도 12는 신호 향상 및 켄칭에 관련된 2가 금속 양이온 배치의 다이어그램이다. 상기 다이어그램은 상기 방법 단계로 코팅되고, 여기서, 양이온은 시약 또는 방법 (즉, 접합, 용리, 저장, 인큐베이션, 세척, 또는 가시화 시점) 예시 S+, I+ W+, V-에 존재한다. 이들 방법은 표준 방법에 대하여 대조되고, 이에 의해 2가 양이온 존재는 미공지되거나 켄칭에 기여하는 미량으로 존재하는 것으로 공지되어 있다.

도 13은 현미경관찰법에서 고정된 및 침투된 사람 PBMC의 발견의 요약을 나타낸다: 세포외 및 세포내 CD3 형광 분해능은 2가 양이온, $MgCl_2$ 구배, 10x I-16 UCHT1로 인큐베이션하여 향상된다 (그리고 이어서, 켄칭함). 표면 및 세포내 CD3의 검출을 위해 I-16 UCHT1에 대한 5개의 형광 현미경관찰법 실험의 1-원 ANOVA 통계학적 분석을 사용한 분석의 요약을 나타낸다. 데이터는 $MgCl_2$ 적정 (pH 7.4에서) (범위 0-1000 mM)의 존재하에 대표적인 CD3 발현의 통합 밀도(integrated density) (임의의 단위)로서 나타낸다. 통계학적 유의성은 공유된 또는 상이한 문자로 나타낸다. 예를 들면; 250 mM (a)는 50 mM (b)와 상당히 상이한 반면, 1000 mM (a)는 0 mM (a, c)와 상당히 상이하지 않다. N=5는 동일한 표본으로 첫째 날에 두 번, 둘째 날에 세 번 2일 동안 수행된 개별적인 실험으로서 기술된다.

도 14는 고정된 및 침투된 사람 PBMC의 형광 현미경관찰법으로부터 첫번째 예시 결과를 나타낸다. 세포외 및 세포내 CD3 형광 분해능을 2가 양이온, $MgCl_2$ 구배, 10x I-16 UCHT1로 인큐베이션하여 향상시켰다 (이어서 켄칭하였다). $MgCl_2$ 적정 (pH 7.4에서) (범위 0-1000 mM)을 표면 및 세포내 CD3의 검출을 위해 표적화 모이어티 (10x I-16 UCHT1)로 인큐베이션 동안만 적용하고, 이어서, 양이온 비함유 완충액으로 세척하였다.

도 15는 고정된 및 침투된 사람 PBMC의 형광 현미경관찰법를 나타낸다. 세포외 및 세포내 CD3 형광 분해능을 2가 양이온, $MgCl_2$ 구배, 5x I-32 UCHT1로 인큐베이션하여 향상시켰다 (이어서 켄칭하였다). $MgCl_2$ 적정 (pH 7.4에서)을 인큐베이션 표면 및 세포내 CD3의 검출을 위해 표적화 모이어티 (5x I-32 UCHT1)로 인큐베이션 동안만 적용하고, 이어서, 양이온 비함유 완충액으로 세척하였다.

도 16은 파라포름알데히드 고정된 주카트(Jurkat) T 세포, 또한 CD3에 특이적인 세포주의 형광 현미경관찰법의 결과를 나타낸다. 세포외 CD3 형광 분해능을 2가 양이온 $MgCl_2$ 10x I-16 UCHT1 구배로 인큐베이션하여 향상시켰다 (이어서 켄칭하였다). $MgCl_2$ 적정 (pH 7.4에서)을 표면 및 세포내 CD3의 검출을 위해 표적화 모이어티 (10x I-16 UCHT1)로 인큐베이션 동안 적용하고, 이어서, 양이온 비함유 완충액으로 세척하였다.

도 17은 $MgCl_2$ 적정 (pH 7.4에서)을 표면 CD3의 검출을 위해 표적화 모이어티 (10x I-51 UCHT1 및 10x I-56 UCHT1)로 인큐베이션 동안 (0-100 mM) 적용하고, 이어서, 양이온 비함유 완충액으로 세척한, 살아있는 주카트 T 세포 결과의 유세포분석(flow cytometry) 결과를 나타낸다. 세포외 CD3 형광 분해능을 2가 양이온 $MgCl_2$ 구배, 10x I-51 UCHT1 및 10x I-56 UCHT1로 인큐베이션하여 향상시켰다. 양이온 농도는 살아있는 세포의 완전성을 보존하기 위해 100 mM를 초과하지 않았다.

도 18은 $MgCl_2$ 적정 (pH 7.4에서)을 표면 CD3의 검출을 위해 표적화 모이어티 (10x I-51 UCHT1 및 10x I-56 UCHT1, 10x I-16 UCHT1)로 인큐베이션 동안 (0-100 mM) 적용하고, 이어서, 양이온 비함유 완충액으로 세척한, 살아있는 주카트 T 세포 결과의 유세포분석의 반복 시험을 나타낸다. 세포외 CD3 형광 분해능을 2가 양이온 $MgCl_2$ 구배, 10x I-51 UCHT1 및 10x I-56 UCHT1, 10x I-16 UCHT1로 인큐베이션하여 향상시켰다. 양이온 농도는 살아있는 세포의 완전성을 보존하기 위해 100 mM를 초과하지 않았다.

도 19는 항체 접합 (표적화 모이어티를 구축)을 위한 신규한 방법과 비교한 양이온 배치의 개요이다; 예를 들면, C-E-S- 대조군 대 C+E+S+로 표현됨. 실제로, 이는 말레이미드 활성화된 모이어티를 물 + 0.1M $MgCl_2$로 재

-현탁시켜 항체의 접합 및 정제 및 용리 동안, 및 저장에서 0.1 $MgCl_2$ 중에 포함시킨다.

도 20a는 사람 전혈 세포 유세포분석으로부터 유도된 적정 곡선으로서 신호 향상의 발견을 요약한 예를 나타낸다. 2개의 배치에서 CD3 형광 분해능을 나타낸다. S/N은, 10x I-16 UCHT1에 대해 $MgCl_2$이 접합 프로세스 단계에 포함되는 경우, 2가 양이온의 포함에 의해 향상된다. 칼륨 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 적혈구 용해된 전혈 세포 (WBC)의 경우, $MgCl_2$가 표면 CD3의 검출을 위해 표적화 모이어티 (10x I-16 UCHT1)의 접합, 용리 (정제), 및 저장에 포함되는 경우의 결과를 나타낸다. 결과를 BD Horizon Brilliant Blue 515™ UCHT1 및 FITC UCHT1과 비교하였다. 검정을 인큐베이팅하고, 양이온 비함유 완충액으로 세척하였다.

도 20b는 사람 전혈 세포 유세포분석으로부터 유도된 적정 곡선으로서 신호 향상의 발견을 요약한 예를 나타낸다. 2개의 배치에서 CD3 형광 분해능을 나타낸다. S/N은, $MgCl_2$이 10x I-21A UCHT1에 대해 접합 프로세스 단계에 포함되는 경우, 2가 양이온의 포함에 의해 향상된다. 칼륨 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 적혈구 용해된 전혈 세포 (WBC)의 경우, $MgCl_2$가 표면 CD3의 검출을 위해 표적화 모이어티 (10x I-21A UCHT1)의 접합, 용리 (정제), 및 저장에 포함되는 경우, 결과를 나타낸다. 결과를 BD Horizon Brilliant Blue 515™ UCHT1 및 FITC UCHT1과 비교하였다. 검정을 인큐베이팅하고, 양이온 비함유 완충액으로 세척하였다.

도 21은 항체 농도에 대한 S/N 응답의 히스토그램으로서 발견된 추가의 예를 나타낸다. 2개의 배치에서 CD3 형광 분해능을 나타낸다. S/N은, 10x I-16 UCHT1에 대해 $MgCl_2$이 접합 프로세스 단계에 포함되는 경우, 2가 양이온의 포함에 의해 향상된다. 데이터는, $MgCl_2$가 표면 CD3의 검출을 위해 I-16 UCHT1의 2개의 배치: (C+E+S+) 및 (C+E-S-)에서 접합에서 포함되는 경우, 유세포분석 및 칼륨 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 적혈구 용해된 WBC로부터 유도되고, (C+E+S+)의 이전 시도와 비교하였다. 결과를 UCHT1 FITC과 비교하였다. 검정을 인큐베이팅하고, 양이온 비함유 완충액으로 세척하였다.

도 22는 등가량 가용성 형광단의 분자 (Molecules of Equivalent Soluble Fluorescein; MESF)를 측정하는 유세포분석에 의한 비드 대조군에 상호관련된 형광 강도 응답 곡선(fluorescence intensity response curves)을 나타낸다. 2개의 배치의 형광을 나타낸다. S/N은 10x I-16 UCHT1에 대해 $MgCl_2$가 접합 프로세스 단계에 포함되는 경우 2가 양이온의 포함에 의해 향상된다. 데이터는, $MgCl_2$가 표면 CD3의 검출을 위해 I-16 UCHT1의 2개의 배치: (C+E+S+) 및 (C+E-S-)에서 접합에서 포함되는 경우, 칼륨 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 적혈구 용해된 WBC의 유세포분석으로부터 유래된다. 결과를 BD Horizon™ Brilliant Blue 515 UCHT1 및 2개 로트의 FITC UCHT1과 비교하였다. 검정을 인큐베이팅하고, 양이온 비함유 완충액으로 세척하였다.

도 23은 항체 농도에 대한 S/N 응답의 히스토그램을 나타낸다. 데이터는, $MgCl_2$가 표면 CD3의 검출을 위해 I-16 UCHT1의 2개의 배치: (C+E+S+) 및 (C+E-S-)에서 접합에서 포함되는 경우, 살아있는 주카트 T 세포의 유세포분석으로부터 유도된다. 결과를 FITC UCHT1와 비교하였다. 이러한 경우, 다른 표적화 모이어티 I-32, I-21B, I-16 UCHT1은 음성 대조군 (양이온 C-E-S 없음)으로서 포함되었다. 검정을 인큐베이팅하고, 양이온 비함유 완충액으로 세척하였다. 2개의 시스템에서 CD3 형광 분해능은 S/N이 10x I-16 UCHT1에 대해 $MgCl_2$이 접합 프로세스 단계에 포함되는 경우 2가 양이온의 포함에 의해 향상된다는 것을 나타낸다.

도 24는 WBC 중 항체 농도에 대한 S/N 응답의 히스토그램을 나타낸다. I-51-유사 (I-49 및 I-16 UCHT1)인 표적화 모이어티 배치 (C+E-S-)의 3개의 로트를 사용하여 나타내고, 용리 및 저장은 필수적이지 않을 수 있다. 데이터는, $MgCl_2$가 표면 CD3의 검출을 위해 I-16 UCHT1의 접합에 포함되는 경우, 칼륨 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 적혈구 용해된 WBC의 유세포분석로부터 유도된다. 결과를 I-51 UCHT1 및 FITC UCHT1과 비교하였다. 검정을 인큐베이팅하고, 양이온 비함유 완충액으로 세척하였다. C+E-S 시스템 및 3개의 로트에서 세포외 CD3 형광 분해능은 형광 효율이, $MgCl_2$가 10x I-16 UCHT1에 대해 접합 프로세스에 포함되는 경우, 2가 양이온의 포함에 의해 향상된다는 것을 나타낸다.

도 25a는 표면 CD3의 검출을 위해 10x I-16 UCHT1을 사용하는 3개의 양이온 배치: (C+E+S+, C+E-S-, 및 대조군 C-E-S)의 비교를 나타낸다. 데이터는 형광 효율로서 나타낸다 [실제 신호-대-노이즈 / 이론적인 S/N] * 100. 데이터는, $MgCl_2$가 접합 프로세스에 포함되는 경우, 칼륨 완충된 암모늄 클로라이드 (ACK) 적혈구 용해된 WBC의 유세포분석으로부터 유래된다. 검정을 인큐베이팅하고, 양이온 비함유 완충액으로 세척하였다. 3개의 배치에서 세포외 CD3 발현은, 형광 효율이, $MgCl_2$가 10x I-16 UCHT1에 대해 접합 프로세스 단계에 포함되는 경우, 2가 양

이온의 포함에 의해 향상됨을 나타낸다.

도 25b는 프로세스 배치와 상호작용하는 경우 용액에서 켄칭 패턴을 입증하하는 다중 접합체 결과를 사용하는 2개의 실험으로부터 2개의 예시 분석을 나타낸다. 표적화 모이어티를 $MgCl_2$의 존재 및 $MgCl_2$의 부재하에 다양한 양이온 배치 (I-51 UCHT1-유사 모이어티)에서 프로세싱하고, 이어서, 가시화에서 0-100 mM의 $MgCl_2$ 적정 (pH 7.4에서)과 비교하였다. $MgCl_2$로 프로세싱된 표적화 모이어티를 사전-켄칭한 반면, $MgCl_2$ 2가 양이온 적정은 모든 배치를 켄칭한다. 첫번째 예에서, 그룹당 N=3 복제 판독, 및 N=1 접합체를 플롯팅하고, (C+E-S+)의 정보를 얻는다. 두번째 예에서, 그룹당 N=3 복제 판독 N=4 접합체를 분석하고, 다중 프로세스 배치를 $MgCl_2$가 존재하는 것과 부재하는 것으로 그룹화하였다. 오차 막대는 1SDEV로 나타낸다.

도 26 접합 효율, 접합에서 회수된 중합체-염료 모이어티는 $MgCl_2$가 $MgCl_2$ 배치 C+E+S+, 및 C+E-S-를 사용하는 I-16 UCHT1 빌딩 프로세스에 포함되는 경우, 더 높은 것으로 관찰된다. 데이터는 [측정된 실제 표지화 정도/이론적인 표지화 정도(Theoretical degree of labeling)] (M)로서 표현된다. 등가량의 중합체-염료*100 = 회수된 %. 기준선(baseline) 프로세스를 넘어서는 회수에서 개선 백분율을 유념한다. 데이터는 NanoDrop™ 분광광도계를 사용하는 시험관내 형광 측정치로부터 유도되고, 염료 농도를 정량화하기 위해 3개의 접합 및 비어-람버트 법칙의 적용으로부터 컴파일된다.

도 27a 및 도 27b는 유세포분석, 10x I-51 UCHT1에서 주카트 T 세포의 획득 (가시화) 동안 세포외 CD3 형광 분해능이 2가 양이온의 제외에 의해 향상되었음을 나타낸다. 도 27a는 유세포분석에 의해 주카트 T 세포 염색을 나타내고, S/N은, 미량의 칼슘 및 마그네슘을 포함하는 완충된 용액 (pH 7.4에서)과 비교하여, 데이터 획득 (형광 가시화) 동안 2가 양이온의 제외에 의해 향상되었다. 도 27b는 용액 중 형광 방출 강도가 2가 양이온의 제외에 의해 향상되거나, 플레이트 판독 (형광 가시화) 동안 미량의 칼슘 및 마그네슘를 포함하는 경우 켄칭됨을 나타낸다. 10x I-51 UCHT1을 이러한 분석을 위해 사용하였다

도 28은 양이온을 갖는 완충액 (pH 7.4에서)을 사용하는 경우 켄칭 패턴의 결과를 나타낸다. 10x I-16 UCHT1을 사용한 실험에서 2개의 $MgCl_2$ 프로세스 배치를 사용하였다 (2개 로트의 C+E-S+, 및 1개 로트의 C-E-S-). 데이터는 안정화된 전혈 세포 (고정된) 및 용해 고정 용액으로 용해된 적혈구의 CD Chex Plus™의 유세포분석에서 중앙(median) 형광 강도로부터 유도된 S/N으로서 표현되고, 세척하고, 상이한 완충액에서 가시화하였다. 모든 표본을 검정 말기까지 동일하게 취급하고, 이어서, 3개의 샘플로 나누고, 세척하고, 무-양이온, 미량 양이온, 또는 50 mM의 양이온 중 어느 하나를 포함하는 3개의 전형적 유세포분석 완충액에 재-현탁시켰다. 세포외 CD3 형광 분해능은 $MgCl_2$ 및 10x I-16 UCHT1 (3개의 로트) 획득 (가시화) 동안 2가 양이온의 제외에 의해 향상되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 상세한 설명

[0015] 하기 설명에서, 본 발명의 다양한 실시형태에 대한 완전한 이해를 제공하기 위해 특정한 구체적인 세부 사항이 설명된다. 그러나, 당해 기술분야의 숙련가는 본 발명을 이러한 세부 사항 없이 실시할 수 있음을 이해할 것이다.

[0016] 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 본원 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐서, "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"과 같은 단어 "포함하다(comprise)" 및 이의 변형은 개방적이고 포괄적인 의미, 즉 "포함하지만 이에 제한되지 않는(including, but not limited to)"으로 해석되어야 한다.

[0017] 본원 명세서 전체에 걸쳐서 "하나의 실시형태" 또는 "일 실시형태"에 대한 언급은 실시형태와 관련하여 기재된 구체적인 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 실시형태에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본원 명세서 전반에 걸쳐서 다양한 곳에서 구절 "하나의 실시형태에서" 또는 "일 실시형태"의 출현은 반드시 모두 동일한 실시형태를 언급하는 것은 아니다. 추가로, 구체적인 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 실시형태에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다.

[0018] "아미노"는 $-NH_2$ 그룹을 언급한다.

[0019] "카복시"는 $-CO_2H$ 그룹을 언급한다.

[0020] "시아노"는 -CN 그룹을 언급한다.

[0021] "포밀"은 -C(=O)H 그룹을 언급한다.

[0022] "하이드록시" 또는 "하이드록실"은 -OH 그룹을 언급한다.

[0023] "이미노"논 =NH 그룹을 언급한다.

[0024] "니트로"는 $-NO_2$ 그룹을 언급한다.

[0025] "옥소"는 =O 치환체 그룹을 언급한다.

[0026] "설프하이드릴"은 -SH 그룹을 언급한다.

[0027] "티옥소"는 =S 그룹을 언급한다.

[0028] "알킬"은, 탄소 및 수소 원자로만 이루어지고, 불포화를 포함하지 않고, 1 내지 12개의 탄소 원자 (C_1-C_{12} 알킬), 1 내지 8개의 탄소 원자 (C_1-C_8 알킬) 또는 1 내지 6개의 탄소 원자 (C_1-C_6 알킬)를 갖고, 단일 결합으로 분자의 나머지에 부착된, 선형 또는 분지된 하이드로탄소 쇄 그룹을 언급하고, 예를 들면, 메틸, 에틸, n-프로필, 1-메틸에틸 (이소-프로필), n-부틸, n-펜틸, 1,1-디메틸에틸 (t-부틸), 3-메틸헥실, 2-메틸헥실 등이다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 알킬 그룹은 임의로 치환된다.

[0029] "알킬렌" 또는 "알킬렌 쇄"는 탄소 및 수소만으로 이루어지고 불포화를 포함하지 않고, 1 내지 12개의 탄소 원자를 갖는 분자의 나머지를 라디칼 그룹에 링크하는 선형 또는 분지된 2가 하이드로탄소 쇄를 언급하고, 예를 들면, 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, n-부틸렌, 에테닐렌, 프로페닐렌, n-부테닐렌, 프로피닐렌, n-부티닐렌 등이다. 알킬렌 쇄는 분자의 나머지에 단일 결합을 통해 부착되고, 라디칼 그룹에 단일 결합을 통해 부착된다. 분자의 나머지에 및 라디칼 그룹에 알킬렌 쇄의 부착점은 쇄 내에 하나의 탄소 또는 임의의 2개의 탄소를 통해 존재할 수 있다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 알킬렌은 임의로 치환된다.

[0030] "알케닐렌" 또는 "알케닐렌 쇄"는 탄소 및 수소만으로 이루어지고, 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하고, 2 내지 12개의 탄소 원자를 갖는 라디칼 그룹에 분자의 나머지를 링크하는 선형 또는 분지된 2가 하이드로탄소 쇄를 언급하고, 예를 들면, 에테닐렌, 프로페닐렌, n-부테닐렌 등이다. 알케닐렌 쇄는 단일 결합을 통해 분자의 나머지에 부착되고, 이중 결합 또는 단일 결합을 통해 라디칼 그룹에 부착된다. 분자의 나머지에 대한 및 라디칼 그룹에 대한 알케닐렌 쇄의 부착점은 쇄 내에 하나의 탄소 또는 임의의 2개의 탄소를 통해 존재할 수 있다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 알케닐렌은 임의로 치환된다.

[0031] "알키닐렌" 또는 "알키닐렌 쇄"는 탄소 및 수소만으로 이루어지고, 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하고, 2 내지 12개의 탄소 원자를 갖는 분자의 나머지를 라디칼 그룹에 연결하는 선형 또는 분지된 2가 하이드로탄소 쇄를 언급하고, 예를 들면, 에테닐렌, 프로페닐렌, n-부테닐렌 등이다. 알키닐렌 쇄는 단일 결합을 통해 분자의 나머지에 부착되고, 이중 결합 또는 단일 결합을 통해 라디칼 그룹에 부착된다. 분자의 나머지에 대한 및 라디칼 그룹에 대한 알키닐렌 쇄의 부착점은 쇄 내에 하나의 탄소 또는 임의의 2개의 탄소를 통해서 존재할 수 있다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 알키닐렌은 임의로 치환된다.

[0032] "알킬에테르"는, 적어도 하나의 탄소-탄소 결합이 탄소-산소 결합으로 대체된 상기 정의된 바와 같은 임의의 알킬 그룹을 언급한다. 탄소-산소 결합은 종말 말단 상에 존재할 수 있거나 (알콕시 그룹에서와 같이), 탄소 산소 결합은 내부에 존재할 수 있다 (즉, C-O-C). 알킬에테르는 적어도 하나의 탄소 산소 결합을 포함하지만, 하나 초과를 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)은 알킬에테르의 의미에 포함된다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 알킬에테르 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 알킬에테르는 알콜 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$로 치환되고, 여기서, 각각의 R_a, R_b 및 R_c는 구조 (I)의 화합물에 정의된 바와 같다.

[0033] "알콕시"는 화학식 $-OR_a$의 그룹을 언급하고, 여기서, R_a는 1 내지 12개의 탄소 원자를 포함하는 상기 정의된 바와 같은 알킬 그룹이다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 알콕시 그룹은 임의로 치환된다.

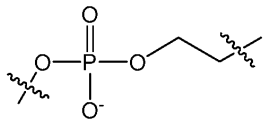
[0034] "알콕시알킬에테르"는 화학식 $-OR_aR_b$의 그룹을 언급하고, 여기서, R_a는 1 내지 12개의 탄소 원자를 포함하는 상기 정의된 바와 같은 알킬렌 그룹이고, R_b는 본원에 정의된 알킬에테르 그룹이다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 알콕시알킬에테르 그룹은 임의로 치환되고, 예를 들면, 알콜 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$로 치환되고,

여기서, 각각의 R_a, R_b 및 R_c는 구조 (I)의 화합물에 정의된 바와 같다.

[0035] "헤테로알킬"은 알킬 그룹 내에 또는 알킬 그룹의 말단에 적어도 하나의 헤테로원자 (예를 들면, N, O, P 또는 S)를 포함하는 상기 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 언급한다. 일부 실시형태에서, 헤테로원자는 알킬 그룹 내에 존재한다 (즉, 헤테로알킬은 적어도 하나의 탄소-[헤테로원자]$_x$-탄소 결합을 포함하고, 여기서, x는 1, 2 또는 3이다). 다른 실시형태에서, 헤테로원자는 알킬 그룹의 말단에 존재하고, 이에 따라 알킬 그룹을 분자의 나머지에 연결한다 (예를 들면, M1-H-A, 여기서, M1은 분자의 부분이고, H는 헤테로원자이고, A는 알킬 그룹이다). 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 헤테로알킬 그룹은 임의로 치환된다. 예시적인 헤테로알킬 그룹은 에틸렌 옥사이드 (예를 들면, 폴리에틸렌 옥사이드)를 포함하고, 임의로 인-산소 결합, 예를 들면, 포스포디에스테르 결합을 포함한다.

[0036] "헤테로알콕시"는 화학식 -OR$_a$의 그룹을 언급하고, 여기서, R_a는 1 내지 12개의 탄소 원자를 포함하는 상기 정의된 바와 같은 헤테로알킬 그룹이다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 헤테로알콕시 그룹은 임의로 치환된다.

[0037] "헤테로알킬렌"은, 알킬렌 쇄 내에 또는 알킬렌 쇄의 말단에 적어도 하나의 헤테로원자 (예를 들면, N, O, P 또는 S)를 포함하는 상기 정의된 바와 같은 알킬렌 그룹을 언급한다. 일부 실시형태에서, 헤테로원자는 알킬렌 쇄 내에 존재한다 (즉, 헤테로알킬렌은 적어도 하나의 탄소-[헤테로원자]-탄소 결합을 포함하고, 여기서, x는 1, 2 또는 3이다). 다른 실시형태에서, 헤테로원자는 알킬렌의 말단에 존재하고, 이에 따라 알킬렌은 분자의 나머지에 연결된다 (예를 들면, M1-H-A-M2, 여기서, M1 및 M2는 상기 분자의 부분이고, H는 헤테로원자이고, A는 알킬렌이다). 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 헤테로알킬렌 그룹은 임의로 치환된다. 예시적인 헤테로알킬렌 그룹은 에틸렌 옥사이드 (예를 들면, 폴리에틸렌 옥사이드) 및 하기 예시된 "C" 링크(linking) 그룹을 포함한다:



[0038] "C 링커"

[0039] 상기 C-링커의 다량체(Multimers)는 헤테로알킬렌 링커의 다양한 실시형태에 포함된다.

[0040] "헤테로알케닐렌"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 상기 정의된 바와 같은 헤테로알킬렌이다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 헤테로알케닐렌 그룹은 임의로 치환된다.

[0041] "헤테로알키닐렌"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 헤테로알킬렌이다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 헤테로알키닐렌 그룹은 임의로 치환된다.

[0042] "헤테로원자 링커"에 언급된 "헤테로원자"는 하나 이상의 헤테로원자로 이루어진 링커 그룹을 언급한다. 예시적인 헤테로원자 링커는 O, N, P 및 S, 및 다중 헤테로원자로 이루어진 그룹으로부터 선택된 단일 원자를 포함하고, 예를 들면, 화학식 -P(O$^-$)(=O)O- 또는 -OP(O$^-$)(=O)O-를 갖는 링커 및 다량체 및 이의 조합이다.

[0043] "포스페이트"는 -OP(=O)(R_a)R_b 그룹을 언급하고, 여기서, R_a는 OH, O$^-$ 또는 OR$_c$이고; R_b는 OH, O$^-$, OR$_c$, 티오포스페이트 그룹 또는 추가 포스페이트 그룹이고, 여기서, R_c는 카운터 이온 (예를 들면, Na^+ 등)이다.

[0044] "포스포알킬"은 -OP(=O)(R_a)R_b 그룹을 언급하고, 여기서, R_a는 OH, O$^-$ 또는 OR$_c$이고; R_b는 -O알킬이고, 여기서, R_c는 카운터 이온 (예를 들면, Na^+ 등)이다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 포스포알킬 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 포스포알킬 그룹에서 -O알킬 모이어티는 하이드록실, 아미노, 설프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스포알킬에테르 또는 -OP(=R_a)(R_b)R_c 중 하나 이상으로 임의로 치환되고, 여기서, 각각의 R_a, R_b 및 R_c는 구조 (I)의 화합물에 정의된 바와 같다.

[0045] "포스포알킬에테르"는 -OP(=O)(R_a)R_b 그룹을 언급하고, 여기서, R_a는 OH, O$^-$ 또는 OR$_c$이고; R_b는 -O알킬에테르이

고, 여기서, R_c는 카운터 이온 (예를 들면, Na^+ 등)이다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 포스포알킬에테르 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 포스포알킬에테르 그룹에서 -O알킬에테르 모이어티는 하이드록실, 아미노, 설프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스포알킬에테르 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 중 하나 이상으로 임의로 치환되고, 여기서, 각각의 R_a, R_b 및 R_c는 구조 (I)의 화합물에 정의된 바와 같다.

[0046] "티오포스페이트"는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 그룹을 언급하고, 여기서, R_a는 O 또는 S이고, R_b는 OH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고; R_c는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d, SR_d, 포스페이트 그룹 또는 추가 티오포스페이트 그룹이고, 여기서, R_d는 카운터 이온 (예를 들면, Na^+ 등)이고, 단: i) R_a는 S이고; ii) R_b는 S^- 또는 SR_d이고; iii)R_c는 SH, S^- 또는 SR_d이고; 또는 iv) i), ii) 및/또는 iii)의 조합이다.

[0047] "티오포스포알킬"은 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 그룹을 언급하고, 여기서, R_a는 O 또는 S이고, R_b는 OH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고; R_c는 -O알킬이고, 여기서, R_d는 카운터 이온 (예를 들면, Na^+ 등)이고, 단: i) R_a는 S이고; ii) R_b는 S^- 또는 SR_d이고; 또는 iii) R_a는 S이고, R_b는 S^- 또는 SR_d이다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 티오포스포알킬 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 티오포스포알킬 그룹에서 -O알킬 모이어티는 하이드록실, 아미노, 설프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스포알킬에테르 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 중 하나 이상으로 임의로 치환되고, 여기서, 각각의 R_a, R_b 및 R_c는 구조 (I)의 화합물에 정의된 바와 같다.

[0048] "티오포스포알킬에테르"는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 그룹을 언급하고, 여기서, R_a는 O 또는 S이고, R_b는 OH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고; R_c는 -O알킬에테르이고, 여기서, R_d는 카운터 이온 (예를 들면, Na^+ 등)이고, 단: i) R_a는 S이고; ii) R_b는 S^- 또는 SR_d이고; 또는 iii) R_a는 S이고, R_b는 S^- 또는 SR_d이다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 티오포스포알킬에테르 그룹은 임의로 치환된다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 티오포스포알킬 그룹에서 -O알킬에테르 모이어티는 하이드록실, 아미노, 설프하이드릴, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스포알킬에테르 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$중 하나 이상으로 임의로 치환되고, 여기서, 각각의 R_a, R_b 및 R_c는 구조 (I)의 화합물에 정의된 바와 같다.

[0049] "카보사이클릭"은 3 내지 18개의 탄소 원자를 포함하는 안정한 3 내지 18 원 방향족 또는 비-방향족 환을 언급한다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 카보사이클릭 환은 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있고, 이는 융합(fused) 또는 브릿지(bridged) 환 시스템을 포함할 수 있고, 부분 또는 완전 포화될 수 있다. 비-방향족 카보사이클릴 라디칼은 사이클로알킬을 포함하지만, 방향족 카보사이클릴 라디칼은 아릴을 포함한다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 카보사이클릭 그룹은 임의로 치환된다.

[0050] "사이클로알킬"은 안정한 비-방향족 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 카보사이클릭 환을 언급하고, 이는 융합 또는 브릿지 환 시스템을 포함할 수 있고, 3 내지 15개의 탄소 원자를 갖고, 바람직하게는 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖고, 포화 또는 불포화이고, 단일 결합에 의해 분자의 나머지에 부착된다. 모노사이클릭 사이클로알킬은, 예를 들면, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 및 사이클로옥틸을 포함한다. 폴리사이클릭 사이클로알킬은, 예를 들면, 아다만틸, 노르보르닐, 데칼리닐, 7,7-디메틸-바이사이클로-[2.2.1]헵타닐 등을 포함한다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 사이클로알킬 그룹은 임의로 치환된다.

[0051] "아릴"은 적어도 하나의 카보사이클릭 방향족 환을 포함하는 환 시스템을 언급한다. 일부 실시형태에서, 아릴은 6 내지 18개의 탄소 원자를 포함한다. 아릴 환은 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있고, 이는 융합 또는 브릿지 환 시스템을 포함할 수 있다. 아릴은 아세안트릴렌, 아세나프틸렌, 아세페난트릴렌, 안트라센, 아줄렌, 벤젠, 크리센, 플루오란텐, 플루오렌, as-인다센, s-인다센, 인단,

인덴, 나프탈렌, 페날렌, 페난트렌, 플레이아덴, 피렌, 및 트리페닐렌로부터 유도된 아릴을 포함한다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 아릴 그룹은 임의로 치환된다.

[0052] "헤테로사이클릭"은 1 내지 12개의 탄소 원자를 포함하고 질소, 산소 및 황으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자를 포함하는 안정한 3 내지 18 원 방향족 또는 비-방향족 환을 언급한다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 헤테로사이클릭 환은 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있고, 이는 융합 또는 브릿지 환 시스템을 포함할 수 있고; 헤테로사이클릭 환에서 질소, 탄소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있고; 질소 원자는 임의로 사급화될 수 있고; 헤테로사이클릭 환은 부분 또는 완전 포화될 수 있다. 방향족 헤테로사이클릭 환의 예는 하기 헤테로아릴의 정의에서 열거된다 (즉, 헤테로아릴은 헤테로사이클릭의 서브셋이다). 비-방향족 헤테로사이클릭 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 포함한다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 헤테로사이클릭 그룹은 임의로 치환된다.

[0053] "헤테로아릴"은 1 내지 13개의 탄소 원자, 질소, 산소 및 황으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자 및 적어도 하나의 방향족 환을 포함하는 5 내지 14 원 환 시스템을 언급한다. 본 발명의 특정 실시형태의 목적을 위해, 헤테로아릴 라디칼은 모노사이클릭, 바이사이클릭, 트리사이클릭 또는 테트라사이클릭 환 시스템일 수 있고, 이는 융합 또는 브릿지 환 시스템를 포함할 수 있고; 헤테로아릴 라디칼에서 질소, 탄소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있고; 질소 원자는 임의로 사급화될 수 있다. 이의 예는 아제피닐, 아크리디닐, 벤즈이미다졸릴, 벤즈티아졸릴, 벤즈인돌릴, 벤조디옥솔릴, 벤조푸라닐, 벤조옥사졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조티아디아졸릴, 벤조[b][1,4]디옥세피닐, 1,4-벤조디옥사닐, 벤조나프토푸라닐, 벤즈옥사졸릴, 벤조디옥솔릴, 벤조디옥시닐, 벤조피라닐, 벤조피라노닐, 벤조푸라닐, 벤조푸라노닐, 벤조티에닐 (벤조티오페닐), 벤조트리아졸릴, 벤조[4,6]이미다조[1,2-a]피리디닐, 벤즈옥사졸리노닐, 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-오닐, 티에노[2,3-d]피리미딘-4-오닐, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 트리아지닐, 및 티오페닐 (즉, 티에닐)을 포함한다. 명세서에 달리 구체적으로 기재하지 않는 한, 헤테로아릴 그룹은 임의로 치환된다.

[0054] "융합된"은 적어도 2개의 환을 포함하는 환 시스템을 언급하고, 여기서, 2개의 환은 적어도 하나의 공통 환 원자, 예를 들면, 2개의 공통 환 원자를 공유한다. 융합된 환이 헤테로사이클릴 환 또는 헤테로아릴 환인 경우, 공통 환 원자(들)는 탄소 또는 질소일 수 있다. 융합된 환은 바이사이클릭, 트리사이클릭, 테트라사이클릭 등을 포함한다.

[0055] 본원에 사용된 용어 "치환된"은 상기 그룹 중 어느 것 (예를 들면, 알킬, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 헤테로알킬, 헤테로알콕시, 포스포알킬, 포스포알킬에테르, 티오포스포알킬, 티오포스포알킬에테르, 카보사이클릭, 사이클로알킬, 아릴, 헤테로사이클릭 및/또는 헤테로아릴)을 의미하고, 여기서, 적어도 하나의 수소 원자 (예를 들면, 1, 2, 3개 또는 전체 수소 원자)는, 비-수소 원자, 예를 들면: 할로겐 원자, 예를 들면, F, Cl, Br, 및 I; 다음 그룹 중 산소 원자: 예를 들면, 하이드록실 그룹, 알콕시 그룹, 및 에스테르 그룹; 다음 그룹 중 황 원자: 예를 들면, 티올 그룹, 티오알킬 그룹, 설폰 그룹, 설포닐 그룹, 및 설폭사이드 그룹; 다음 그룹 중 질소 원자: 예를 들면, 아민, 아미드, 알킬아민, 디알킬아민, 아릴아민, 알킬아릴아민, 디아릴아민, N-옥사이드, 이미드, 및 엔아민; 다음 그룹 중 규소 원자: 예를 들면, 트리알킬실릴 그룹, 디알킬아릴실릴 그룹, 알킬디아릴실릴 그룹, 및 트리아릴실릴 그룹; 및 다양한 다른 그룹 중 다른 헤테로원자로의 결합에 의해 대체된다. "치환된"은 또한, 하나 이상의 수소 원자가 더 높은-순서(order) 결합 (예를 들면, 이중- 또는 트리플-결합)으로 헤테로원자, 예를 들면, 옥소, 카보닐, 카복실, 및 에스테르 그룹에서 산소; 및 이민, 옥심, 하이드라존, 및 니트릴과 같은 그룹에서 질

소로 대체되는, 상기 그룹 중 어느 것을 의미한다. 예를 들면, "치환된"은 하나 이상의 수소 원자가 $-NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)R_h$, $-NR_gC(=O)NR_gR_h$, $-NR_gC(=O)OR_h$, $-NR_gSO_2R_h$, $-OC(=O)NR_gR_h$, $-OR_g$, $-SR_g$, $-SOR_g$, $-SO_2R_g$, $-OSO_2R_g$, $-SO_2OR_g$, $=NSO_2R_g$, 및 $-SO_2NR_gR_h$로 대체되는 상기 그룹 중 어느 것을 포함한다. "치환된"은 또한 하나 이상의 수소 원자가 $-C(=O)R_g$, $-C(=O)OR_g$, $-C(=O)NR_gR_h$, $-CH_2SO_2R_g$, $-CH_2SO_2NR_gR_h$로 대체되는 상기 그룹 중 어느 것을 의미한다. 상기에서, R_g 및 R_h는 동일하거나 상이하고, 독립적으로 수소, 알킬, 알콕시, 알킬아미노, 티오알킬, 아릴, 아르알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 할로알킬, 헤테로사이클릴, N-헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴알킬, 헤테로아릴, N-헤테로아릴 및/또는 헤테로아릴알킬이다. "치환된"은 추가로 하나 이상의 수소 원자가 아미노, 시아노, 하이드록실, 이미노, 니트로, 옥소, 티옥소, 할로, 알킬, 알콕시, 알킬아미노, 티오알킬, 아릴, 아르알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 할로알킬, 헤테로사이클릴, N-헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴알킬, 헤테로아릴, N-헤테로아릴 및/또는 헤테로아릴알킬 그룹에 대한 결합으로 대체된 상기 그룹 중 어느 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 임의의 치환체는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, 여기서, 각각의 R_a, R_b 및 R_c는 구조 (I)의 화합물에 정의된 바와 같다. 추가로, 상기한 치환체 각각은 또한 상기 치환체 중 하나 이상의로 임의로 치환될 수 있다.

[0056] "접합"은 개재하는(intervening) 시그마 결합을 가로지르는 하나의 p-오비탈의 또다른 p-오비탈과의 중첩을 언급한다. 접합은 사이클릭 또는 아사이클릭 화합물에서 발생할 수 있다. "접합도(degree of conjugation)"는 개재하는 시그마 결합을 가로지르는 적어도 하나의 p-오비탈의 또다른 p-오비탈과의 중첩을 언급한다. 예를 들면, 1,3-부타딘은 하나의 접합도를 갖지만, 벤젠 및 다른 방향족 화합물은 전형적으로 다중 접합도를 갖는다. 형광 및 착색 화합물은 전형적으로 적어도 하나의 접합도를 포함한다.

[0057] "형광"은 특정 주파수의 광을 흡수할 수 있고, 상이한 주파수의 광을 방출할 수 있는 분자를 언급한다. 형광은 당해 기술분야의 숙련가에게 잘 공지되어 있다.

[0058] "착색된(Colored)"은 유색 스펙트럼 (즉, 적색, 황색, 청색 등) 내에 광을 흡수하는 분자를 언급한다.

[0059] "링커(linker)"는, 분자를 동일한 분자의 또다른 부분에 또는 상이한 분자, 모이어티 또는 고체 지지체 (예를 들면, 마이크로입자)에 연결하는, 적어도 하나의 원자, 예를 들면, 탄소, 산소, 질소, 황, 인 및 이의 조합의 인접한 쇄를 언급한다. 링커는 공유 결합 또는 다른 수단, 예를 들면, 이온성 또는 수소 결합 상호작용을 통해 분자를 연결할 수 있다.

[0060] 용어 "생체분자"는 다양한 생물학적 물질 중 어느 것을 언급하고, 핵산, 탄수화물, 아미노산, 폴리펩타이드, 당단백질, 호르몬, 압타머 및 이의 혼합물을 포함한다. 보다 특히, 용어는 RNA, DNA, 올리고뉴클레오티드, 개질 또는 유도체화된 뉴클레오티드, 효소, 수용체, 프리온, 수용체 리간드 (호르몬 포함), 항체, 항원, 및 독소, 뿐만 아니라 박테리아, 바이러스, 혈액 세포, 및 조직 세포를 포함함을 의도한다. 본 발명의 가시적으로 검출가능한 생체분자 (예를 들면, 이에 링크된 생체분자를 갖는 구조 (I)의 화합물)를 본원에 추가로 기재된 바와 같이 임의의 이용가능한 원자 또는 관능 그룹, 예를 들면, 생체분자 상 아미노, 하이드록시, 카복실, 또는 설프하이드릴 그룹을 통해 화합물에 생체분자의 부착을 가능하게 하는 반응성 그룹을 갖는 화합물과 생체분자를 접촉시켜 제조한다.

[0061] "반응성 그룹"은, 예를 들면, 변위(displacement), 산화, 환원, 첨가 또는 첨가환화 반응에 의해, 두번째 반응성 그룹 (예를 들면, "상보적 반응성 그룹")과 반응하여 하나 이상의 공유 결합을 형성할 수 있는 모이어티이다. 예시적인 반응성 그룹은 표 1에 제공되고, 예를 들면, 친핵체, 친전자체, 디엔, 친디엔체, 알데히드, 옥심, 하이드라존, 알킨, 아민, 아지드, 아실아지드, 아실할라이드, 니트릴, 니트론, 설프하이드릴, 디설파이드, 설포닐 할라이드, 이소티오시아네이트, 이미도에스테르, 활성화 에스테르, 케톤, α,β-불포화 카보닐, 알켄, 말레이미드, α-할로이미드, 에폭사이드, 아지리딘, 테트라진, 테트라졸, 포스핀, 비오틴, 티란 등을 포함한다.

[0062] 용어 "가시성" 및 "가시적으로 검출가능한"은 사전 조명, 또는 화학적 또는 효소적 활성화 없이 가시적 검사로 관찰가능한 물질을 언급하기 위해 본원에 사용된다. 이러한 가시적으로 검출가능한 물질은 약 300 내지 약 900 nm 범위의 스펙트럼 영역에서 광을 흡수하고 방출한다. 바람직하게는, 이러한 물질은 강렬한 색상이고, 바람직하게는 적어도 약 40,000, 보다 바람직하게는 적어도 약 50,000, 또한 추가의 바람직하게는 적어도 약 60,000, 여전히 또한 추가의 바람직하게는 적어도 약 70,000, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 80,000 $M^{-1}cm^{-1}$의 몰 소광계수를 갖는다. 본 발명의 화합물을 육안으로 또는, 흡수 분광광도계, 투과광 현미경, 디지털 카메라 및 스캐너

를 포함하는 광학 기반 검출 장치로 도움으로 받아 관찰하여 검출할 수 있다. 가시적으로 검출가능한 물질은 가시 스펙트럼의 광을 방출 및/또는 흡수하는 물질에 제한되지 않는다. 자외선 (UV) 영역 (약 10 nm 내지 약 400 nm)에서 광을 방출 및/또는 흡수하는 물질, 적외선 (IR) 영역 (약 700 nm 내지 약 1 mm)에서 광을 방출 및/또는 흡수하는 물질, 및 다른 영역에서 방출 및/또는 흡수하는 전자기 스펙트럼의 물질이 또한 "가시적으로 검출가능한" 물질의 범위에 포함된다.

[0063] 본 발명의 실시형태의 목적을 위해, 용어 "광안정성 가시성 염료(photostable visible dye)"는 본원에 상기 정의된 가시적으로 검출가능한 화학적 모이어티를 언급하고, 광에 노출시 상당히 변경되거나 분해되지 않는다. 바람직하게는, 광안정성 가시성 염료는 적어도 1 시간 동안 광에 노출시킨 후 상당한 표백 또는 분해를 나타내지 않는다. 보다 바람직하게는, 가시성 염료는 적어도 12 시간, 또한 추가의 바람직하게는 적어도 24 시간, 여전히 또한 보다 바람직하게는 적어도 1주, 및 가장 바람직하게는 적어도 1개월 동안 광에 노출 후 안정하다. 본 발명의 화합물 및 방법에 사용하기에 적합한 광안정성 가시성 염료의 예는 아조 염료, 티오인디고 염료, 퀴나크리돈 안료, 디옥사진, 프탈로시아닌, 페리논, 디케토피롤로피롤, 퀴노프탈론, 및 트루아리카보늄(truarycarbonium)을 포함한다.

[0064] 본원에 사용된 용어 "페릴렌 유도체"는 가시적으로 검출가능한 임의의 치환된 페릴렌을 포함하는 것을 의도한다. 그러나, 상기 용어는 페릴렌 자체를 포함하는 것을 의도하지 않는다. 용어 "안트라센 유도체", "나프탈렌 유도체" 및 "피렌 유도체"는 유사하게 사용된다. 일부 바람직한 실시형태에서, 유도체 (예를 들면, 페릴렌, 피렌, 안트라센 또는 나프탈렌 유도체)는 페릴렌, 안트라센, 나프탈렌, 또는 피렌의 이미드, 비스이미드 또는 하이드라잠이미드 유도체이다.

[0065] 본 발명의 다양한 실시형태의 가시적으로 검출가능한 분자는 광범위하게 다양한 분석적 적용, 예를 들면, 생화학적 및 생의학적 적용에 유용하고, 여기서, 특정 분석물 (예를 들면, 생체분자)의 존재, 위치, 또는 수량을 측정하는 것이 필요하다. 또다른 측면에서, 따라서, 본 발명은 다음을 포함하는 생체분자를 가시적으로 검출하는 방법을 제공한다: (a) 생체분자에 링크된 구조 (I)의 화합물을 포함하는 가시적으로 검출가능한 생체분자를 갖는 생물학적 시스템을 제공하고; (b) 상기 생체분자를 이의 가시성 성질에 의해 검출함. 본 발명의 목적을 위해, 구절 "생체분자를 이의 가시성 성질에 의해 검출함"은 생체분자를 조명 또는 화학적 또는 효소적 활성화 없이 육안으로 또는, 흡수 분광광도계, 투과광 현미경, 디지털 카메라 및 스캐너를 포함하는 광학 기반 검출 장치로 도움으로 받아 관찰하여 검출함을 의미한다. 농도계(densitometer)를 사용하여 존재하는 가시적으로 검출가능한 생체분자의 양을 정량화할 수 있다. 예를 들면, 두 샘플 중 상대적 수량의 생체분자를 상대적 광학 밀도를 측정하여 측정할 수 있다. 생체분자당 염료 분자의 화학양론이 공지되어 있는 경우, 염료 분자의 소광 계수가 공지되어 있는 경우, 생체분자의 절대 농도를 또한 광학 밀도의 측정으로부터 측정할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "생물학적 시스템"는 가시적으로 검출가능한 생체분자 이외에 하나 이상의 생체분자를 포함하는 임의의 용액 또는 혼합물을 언급하기 위해 사용한다. 이러한 생물학적 시스템의 예는 세포, 세포 추출물, 조직 표본, 전기영동 겔, 검정 혼합물, 및 하이브리드화 반응 혼합물을 포함한다.

[0066] "고체 지지체"는 분자의 고체-상 지지체에 대한 당해 기술분야에 공지된 임의의 고체 기질을 언급하고, 예를 들면, "마이크로입자"는 본 발명의 화합물에 부착에 유용한 임의의 수의 작은 입자를 언급하고, 유리 비드, 자석 비드, 중합체성 비드, 비-중합체성 비드 등을 포함한다. 특정 실시형태에서, 마이크로입자는 폴리스티렌 비드를 포함한다.

[0067] "고체 지지체 잔기"는, 분자가 고체 지지체로부터 개열되는 경우, 분자에 부착되어 남아있는 관능 그룹을 언급한다. 고체 지지체 잔기(residues)는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 고체 지지체 및 이에 분자를 링크하는 그룹의 구조를 기반으로 용이하게 유도될 수 있다.

[0068] "표적화 모이어티"는 특정한 표적, 예를 들면, 분석물 분자에 선택적으로 결합하거나 회합하는 모이어티이다. "선택적(Selectively)" 결합 또는 회합은 다른 표적에 비해 목적하는 표적와 우선적으로 회합 또는 결합하는 표적화 모이어티를 의미한다. 동일한 실시형태에서 본원에 개시된 화합물은 관심 대상 분석물 (즉, 표적화 모이어티의 표적)을 갖는 화합물을 선택적으로 결합 또는 회합하여 분석물의 검출을 가능하게 하기 위한 목적의 표적화 모이어티에 대한 링크(linkages)를 포함한다. 예시적인 표적화 모이어티는 항체, 항원, 핵산 서열, 효소, 단백질, 세포 표면 수용체 길항제 등을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 모이어티는 세포 상 표적 피처, 예를 들면, 세포 막 또는 다른 세포 구조 상 표적 피처에 선택적으로 결합 또는 회합하여 관심 대상 세포의 검출을 가능하게 하는 모이어티, 예를 들면, 항체이다. 목적하는 분석물과 선택적으로 결합 또는 회합하는 소 분자는 또한 특정 실시형태에서 표적화 모이어티로서 고려된다. 당해 기술 분야의 숙련가는 다양한 실시형태에 유

용한 다른 분석물, 및 상응하는 표적화 모이어티를 이해할 것이다.

[0069] "염기 쌍(Base pairing) 모이어티"는 수소 결합 (예를 들면, Watson-Crick base pairing)을 통해 상보적 헤테로사이클릭 모이어티와 하이리드화하는 헤테로사이클릭 모이어티를 언급한다. 염기 쌍 모이어티는 천연 및 비천연 염기를 포함한다. 염기 쌍 모이어티의 예는 RNA 및 DNA 염기, 예를 들면, 아데노신, 구아노신, 티미딘, 시토신 및 우리딘 및 이의 유사체이다.

[0070] 본원에 기재된 본 발명의 실시형태는 또한 하나 이상의 원자가 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자로 대체된 동위원소-표지된 모든 구조 (I) 또는 (II)의 화합물을 포함함을 의미한다. 개시된 화합물에 도입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 불소, 염소 또는 요오드의 동위원소, 예를 들면, ^{2}H, ^{3}H, ^{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}I를 각각 포함한다.

[0071] 동위원소-표지된 구조 (I) 또는 (II)의 화합물을 일반적으로 당해 기술 분야에 공지된 통상의 기술로 또는 이전 사용된 비-표지된 시약 대신에 적합한 동위원소-표지된 시약을 사용하는 하기 및 하기 실시예에 기재된 것과 유사한 공정으로 제조할 수 있다.

[0072] "안정한 화합물" 및 "안정한 구조"는 반응 혼합물, 및 제형에서 효율적인 치료제로 되는 유용한 정도의 순도로 단리할 때 생존하는 충분히 강건한 화합물을 지시함을 의미한다.

[0073] "임의의" 또는 "임의로"는 하기 기재된 사건 또는 상황이 발생할 수 있거나 발생하지 않을 수 있고, 상기 기재가 상기 사건 또는 상황이 일어나는 경우를 및 일어나지 않는 경우를 포함함을 의미한다. 예를 들면, "임의로 치환된 알킬"은 알킬 그룹이 치환될 수 있거나 되지 않을 수 있고, 상기 기재가 치환된 알킬 그룹 및 치환을 갖지 않는 알킬 그룹 둘 다를 포함함을 의미한다.

[0074] "염"은 산 및 염기 부가 염 둘 다를 포함한다.

[0075] "산 부가 염"은, 염산, 브롬화염소산, 황산, 질산, 포스포르산 등과 같은 무기산으로, 및 아세트산, 2,2-디클로로아세트산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산, 아스파르트산, 벤젠설폰산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 캄포르산, 캄포르-10-설폰산, 카프르산, 카프로산, 카프릴산, 탄소산, 신남산, 시트르산, 사이클람산, 도데실황산, 에탄-1,2-디설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 포름산, 푸마르산, 갈락타르산, 겐티스산, 글루코헵톤산, 글루콘산, 글루쿠론산, 글루탐산, 글루타르산, 2-옥소-글루타르산, 글리세로포스포르산, 글리콜산, 히푸르산, 이소부티르산, 락트산, 락토비온산, 라우르산, 말레산, 말산, 말론산, 만델산, 메탄설폰산, 무크산, 나프탈렌-1,5-디설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, 1-하이드록시-2-나프토산, 니코틴산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 팔미트산, 파모산, 프로피온산, 피로글루탐산, 피루브산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 세박산, 스테아르산, 석신산, 타르타르산, 티오시안산, p-톨루엔설폰산, 트리플루오로아세트산, 운데실렌산, 등과 같은 유기산으로 형성된 염을 언급한다.

[0076] "염기 부가 염"은 유리 산으로 무기 염기 또는 유기 염기를 첨가하여 제조된 염을 언급한다. 무기 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 철, 망간, 알루미늄 염 등을 포함한다. 유기 염기로부터 유도된 염은 1급, 2급, 및 3급 아민, 천연 발생 치환된 아민, 사이클릭 아민을 포함하는 치환된 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, 벤즈아틴, 에틸렌디아민, 글루코사민, 메틸글루카민, 테오브로민, 트리에탄올아민, 트로메타민, 푸린, 피페라진, 피페리딘, N-에틸피페리딘, 폴리아민 수지 등의 염이다. 특히 바람직한 유기 염기는 이소프로필아민, 디에틸아민, 에탄올아민, 트리메틸아민, 디사이클로헥실아민, 콜린 및 카페인이다.

[0077] 결정화는 본원에 기재된 화합물의 용매화물을 제조할 수 있다. 본 발명의 실시형태는 기재된 화합물의 모든 용매화물을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명의 화합물의 하나 이상의 분자를 용매의 하나 이상의 분자와 함께 포함하는 응집물(aggregate)을 언급한다. 용매는 물일 수 있고, 이 경우, 용매화물은 하이드레이트일 수 있다. 대안적으로, 용매는 유기 용매일 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 하이드레이트로서 존재할 수 있고, 모노하이드레이트, 디하이드레이트, 헤미하이드레이트, 세스퀴하이드레이트, 트리하이드레이트, 테트라하이드레이트 등, 뿐만 아니라 상응하는 용매화 형태를 포함한다. 본 발명의 화합물은 참(true) 용매화물일 수 있지만, 다른 경우, 본 발명의 화합물은 우연한 물 또는 또다른 용매를 거의 보유하지 않을 것이고, 또는 물 플러스 몇몇 우발적 용매의 혼합물일 수 있다.

[0078] 본 발명의 화합물 (예를 들면, 구조 I 또는 II의 화합물), 또는 이들의 염, 호변체 또는 용매화물의 실시형태는 하나 이상의 비대칭 중심을 포함할 수 있고, 이에 따라 에난티오머, 부분입체이성체, 및 절대 입체화학의 관점에서 아미노산에 대한 (R)- 또는 (S)-로서 또는, (D)- 또는 (L)-로서 정의될 수 있는 다른 입체이성체 형태가 발생할 수 있다. 본 발명의 실시형태는 모든 이러한 가능한 이성체, 뿐만 아니라 이들의 라세미체 및 광학적으로 순수한 형태를 포함함을 의미한다. 광학 활성 (+) 및 (-), (R)- 및 (S)-, 또는 (D)- 및 (L)- 이성체를 키랄 신톤 또는 키랄 시약을 사용하여 제조할 수 있거나, 통상의 기술, 예를 들면, 크로마토그래피 및 분별 결정화를 사용하여 분해할 수 있다. 개별적인 에난티오머를 제조/단리하기 위한 통상의 기술은, 적합한 광학적으로 순수한 전구체 또는 라세미체 (또는 염 또는 유도체의 라세미체)의 분해능으로부터의 키랄 합성, 예를 들면, 키랄 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 포함한다. 본원에 기재된 화합물이 올레핀성 이중 결합 또는 기하학적 비대칭의 다른 중심을 포함하는 경우, 달리 명시하지 않는 한, 화합물이 E 및 Z 기하학적 이성체 둘 다를 포함함을 의도한다. 또한, 모든 호변체 형태가 또한 포함되는 것을 의도한다.

[0079] "입체이성체"는 동일한 결합에 의해 결합된 동일한 원자로 이루어지지만 상이한 삼-차원 구조를 갖는 상호교환되지 않는 화합물을 언급한다. 본 발명은 다양한 입체이성체 및 이의 혼합물을 고려하고, 이의 분자가 포개놓을 수 없는 또다른 거울상인 2개의 입체이성체를 언급하는 "에난티오머"를 포함한다.

[0080] "호변체"는 분자의 하나의 원자가 동일한 분자의 또다른 원자로 양성자 이동함을 언급한다. 본 발명은 상기 화합물 중 어느 것의 호변체를 포함한다. 화합물의 다양한 호변체 형태는 당해 기술분야의 숙련가에 의해 용이하게 유도될 수 있다.

[0081] 본원에 사용되는 화학 명칭 프로토콜 및 구조 다이어그램은 ACD/Name Version 9.07 소프트웨어 프로그램 및/또는 ChemDraw Ultra Version 11.0 소프트웨어 명명 프로그램 (CambridgeSoft)을 사용하는 I.U.P.A.C. 명명법 시스템의 변형된 형태이다. 당해 기술분야의 숙련가에게 친근한 통상의 명칭이 또한 사용된다.

[0082] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 하나의 실시형태에서, 다양한 분석 방법에서 형광 및/또는 착색 염료로서 유용한 화합물이 제공된다. 다른 실시형태에서, 형광 및/또는 착색 염료로서 유용한 화합물의 제조를 위한 합성 중간체로서 유용한 화합물이 제공된다. 일반적으로, 본 발명의 실시형태는 형광 및/또는 착색 모이어티의 이량체 및 더 높은 중합체를 지시한다. 형광 및/또는 착색 모이어티는 링크 모이어티에 의해 링크된다. 이론에 결부시키는 것을 원하지 않고, 링커가 형광 및/또는 착색 모이어티 사이의 충분한 공간 거리를 유지하는 것을 돕고, 분자내 켄칭이 감소 또는 제거되어, 높은 몰 "명도" (예를 들면, 고 형광 방출)을 갖는 염료 화합물을 야기한다고 고려된다.

[0083] 상기한 화합물 중 어느 것 및 하나 이상의 분석물 분자 (예를 들면, 생체분자)를 포함하는 조성물은 다양한 다른 실시형태에 제공된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 분석물 분자의 검출을 위한 분석 방법에서 이러한 조성물의 사용이 또한 제공된다.

[0084] 유리하게는, 본 발명자들은 2가 또는 3가 금속 염 (예를 들면, $MgCl_2$)이 전하 차폐 및 안정화를 위해 특정 중합체성 염료와 조합하여 사용될 수 있다는 것을 발견하였다. 특정 조건하에, 본원 개시내용의 하나 이상의 2가 또는 3가 금속 염 및 중합체성 염료의 조합은 접합, 용리, 저장에서, 또는 인큐베이션 동안 사용되는 경우 표적화 모이어티의 친화도를 개선시킨다. 놀랍게도, 본 발명자들은 2가 또는 3가 금속 염이 용액 중에서 및 존재하는 경우 샘플 획득 동안 이러한 중합체성 염료를 켄칭할 수 있음을 발견하였다.

[0085] 이론에 결부시키는 것을 원하지 않고, 2가 또는 3가 금속 염 (예를 들면, $MgCl_2$)은 염료 및/또는 존재하는 경우 표적화 모이어티의 친화도를 변경시킬 수 있고, 따라서 본원 개시내용의 중합체성 염료의 항체 접합 효율을 개선시키고, 접합, 용리, 저장, 인큐베이션에서 사용되는 경우, 또는 세척 도구로서 사용되는 경우, 검정 결과 (분해능)을 개선시킨다.

[0086] 표적화 모이어티 (예를 들면, 항체)에 대한 중합체성 염료의 접합은 일반적으로 3 단계, 접합, 용리, 및 저장을 갖는다. 실시형태에서, 하나 이상의 2가 또는 3가 금속 염 (예를 들면, $MgCl_2$)은 중합체성 염료 및 표적화 모이어티의 접합 동안 존재한다. 실시형태에서, 하나 이상의 2가 또는 3가 금속 염은 접합된 중합체성 염료 및 표적화 모이어티의 용리 동안 존재한다. 실시형태에서, 추가 2가 또는 3가 금속 염은 접합된 중합체성 염료 및 표적화 모이어티의 저장 동안 존재한다. 실시형태에서, 추가 2가 또는 3가 금속 염은 중합체성 염료 및 표적화 모이어티의 접합 및 용리 동안 존재한다. 실시형태에서, 추가 2가 또는 3가 금속 염은 접합된 중합체성 염료 및 표적화 모이어티의 용리 및 저장 동안 존재한다. 실시형태에서, 추가 2가 또는 3가 금속 염은 중합체성 염료 및

표적화 모이어티의 접합 및 저장 동안 존재한다. 실시형태에서, 추가 2가 또는 3가 금속 염은 중합체성 염료 및 표적화 모이어티의 접합, 용리, 및 저장 동안 존재한다. 임의로, 접합 프로세스는 염료의 재구성 단계를 포함할 수 있다. 항체 접합 (표적화 모이어티를 구축함) 동안 수행된 양이온 배치는, 예를 들면, C+E-S-로서 표현될 수 있다 (즉, 접합시, 그러나 용리시 부재, 및 저장시 부재).

[0087] 면역형광 염색 방법은 일반적으로 적어도 3 단계, 인큐베이션, 세척, 및 가시화를 포함한다. 실시형태에서, 하나 이상의 2가 또는 3가 금속 염은 분석물-표적화 모이어티 복합물의 인큐베이션 동안 존재한다. 실시형태에서, 추가 2가 또는 3가 금속 염은 분석물-표적화 모이어티 복합물의 세척 동안 존재한다. 실시형태에서, 추가 2가 또는 3가 금속 염은 분석물-표적화 모이어티 복합물의 인큐베이션 및 세척 동안 존재한다. 실시형태에서, 하나 이상의 2가 또는 3가 금속 염은 가시화 동안 존재하지 않는다.

[0088] 본원에 기재된 다양한 방법의 특정 실시형태를 도 12 및 13에 가시화한다. 도 12는 일반적인 방법을 나타낸다. 도 13은 보다 특정한 예시적인 방법을 나타낸다. 도 12 및 도 13의 맨 왼쪽 컬럼(left-most column)은 현재 사용되는 방법의 예시를 나타낸다.

[0089] 실시형태에서, 신호 대 노이즈 (signal-to-noise; S/N)가, 표적화 모이어티를 2가 양이온 및 세포와 함께 인큐베이팅하고 세척하는 경우, 면역형광에서 향상된다.

[0090] 일부 실시형태에서, 항체 접합체가 2가 양이온을 갖는 경우 프로세스 향상이 존재한다.

[0091] 실시형태에서, 항체 접합체가 양이온 없이 (pH 7.4에서) 최종 완충액에서 가시화되는 경우, 검정의 말기에 S/N는 향상된다.

[0092] 실시형태에서, 항체 접합체를 2가 양이온을 포함하는 완충액 (pH 7.4에서)으로 세척하지만, 이온을 포함하지 않는 완충액으로 가시화하는 경우, S/N는 향상된다. 실시형태에서, 2가 양이온 세척은 비-특이 결합 및 기질 조직으로 야기된 켄칭을 방해하지만, 양이온 없이 가시화 완충액 (pH 7.5에서)으로 신호를 향상시킨다: (I-W+V-) 또는 (I+W+V-).

[0093] 실시형태에서, 본 발명의 개시내용은 다음을 포함하는 조성물을 제공한다:

[0094] a) i) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티;

[0095] ii) 적어도 하나의 음전하 그룹; 및

[0096] iii) 반응성 그룹 Q

[0097] 를 포함하는 중합체성 염료; 및

[0098] b) 2가 또는 3가 금속 염.

[0099] 임의의 적합한 중합체성 염료는 본원 개시 내용의 임의의 방법 또는 조성물에 사용될 수 있다.

[0100] 실시형태에서, 본원 개시내용의 방법은 중합체성 염료 및 표적화 모이어티의 공유 접합체의 형성 방법을 포함하고, 상기 방법은 상기 중합체성 염료, 상기 표적화 모이어티, 및 2가 또는 3가 금속 염을 포함하는 혼합물을 제조하는 단계, 및 상기 공유 접합체를 형성하기 위해 충분한 시간 동안 및 온도에서 상기 혼합물을 숙성시키는 단계를 포함하고, 여기서:

[0101] a) 상기 중합체성 염료는:

[0102] i) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티;

[0103] ii) 적어도 하나의 음전하 그룹; 및

[0104] iii) 상기 표적화 모이어티 상 상보적 반응성 그룹 Q'와의 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹 Q를 포함하고;

[0105] b) 상기 표적화 모이어티는 표적 분석물에 대해 친화도를 갖고, 상기 상보적 반응성 그룹 Q'를 포함한다.

[0106] 일부 실시형태에서, 본원 개시내용의 방법은 표적 분석물의 검출 방법을 포함하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0107] a) 공유 접합체를 표적 분석물와 회합시켜 2가 또는 3가 금속 염의 존재하에 분석물-표적화 모이어티 복합물을 형성하는 단계 [상기 공유 접합체는:

[0108] i) 표적 분석물에 대한 친화도를 갖고, 중합체성 염료에 대해 공유 결합되는 반응성 그룹 Q'를 포함하는 표적화 모이어티;

[0109] ii) 중합체성 염료를 포함하고, 상기 중합체성 염료는:

[0110] A) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티;

[0111] B) 적어도 하나의 음전하 그룹; 및

[0112] C) 반응성 그룹 Q'와 공유결합되는 상보적 반응성 그룹 Q를 포함하는, 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합을 포함한다]; 및

[0113] b) 상기 분석물-표적화 모이어티 복합물로부터 형광 또는 착색 신호를 검출하는 단계.

[0114] 실시형태에서, 상기 방법은 분석물-표적화 모이어티 복합물을 2가 또는 3가 금속 염을 포함하는 세척 용액으로 처리함을 추가로 포함한다.

[0115] 일부 실시형태에서, 본원 개시내용의 방법은 표적 분석물의 검출 방법으로서, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0116] a) 공유 접합체를 표적 분석물와 회합시켜 분석물-표적화 모이어티 복합물을 형성하는 단계 [상기 공유 접합체는:

[0117] i) 표적 분석물에 대한 친화도를 갖고, 중합체성 염료에 대한 반응성 그룹 Q'공유 결합을 포함하는, 표적화 모이어티; 및

[0118] ii) 중합체성 염료를 포함하고, 상기 중합체성 염료는:

[0119] A) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티;

[0120] B) 적어도 하나의 음전하 그룹; 및

[0121] C) 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합 상 반응성 그룹 Q'와 공유결합된 상보적 반응성 그룹 Q을 포함한다];

[0122] b) 처리 단계로서:

[0123] i) 공유 접합체 및 표적 분석물의 회합 동안 공유 접합체 및 표적 분석물을 2가 또는 3가 금속 염으로 처리하는 단계; 및/또는

[0124] ii) 공유 접합체 및 표적 분석물의 회합 후 분석물-표적화 모이어티 복합물을 2가 또는 3가 금속 염을 포함하는 세척 용액으로 처리하는 단계; 및

[0125] c) 상기 분석물-표적화 모이어티 복합물로부터 형광 또는 착색 신호를 검출하는 단계.

[0126] 실시형태에서, 공유 접합체의 표적 분석물과의 회합은 2가 또는 3가 금속 염의 존재하에 수행한다. 실시형태에서, 상기 방법은 형광 또는 착색 신호를 검출하기 전에 분석물-표적화 모이어티 복합물로부터 2가 또는 3가 염 모두를 실질적으로 제거함을 추가로 포함한다. 실시형태에서, 2가 또는 3가 금속 염은 분석물-표적화 모이어티 복합물을 포함하는 완충액으로부터 제거된다.

[0127] 실시형태에서, 상기 방법은 공유 접합체를 형성함을 추가로 포함한다. 실시형태에서, 중합체성 염료 및 2가 또는 3가 염을, 공유 접합체를 형성하기 전에 중합체성 염료 및 2가 또는 3가 염를 포함하는 조성물을 형성하기 위해 혼합하였다. 실시형태에서, 상기 방법은 공유 접합체를 형성하기 전에 중합체성 염료 및 2가 또는 3가 염을 포함하는 조성물을 숙성시킴을 추가로 포함한다. 실시형태에서, 2가 또는 3가 염은 공유 접합체를 형성하는 동안 실질적으로 부재한다.

[0128] 실시형태에서, 본원 개시내용의 조성물은 공유 접합체 및 2가 또는 3가 염을 포함하고, 상기 공유 접합체는:

[0129] i) 중합체성 염료에 대한 공유 결합을 포함하는 표적화 모이어티;

[0130] ii) a) 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티;

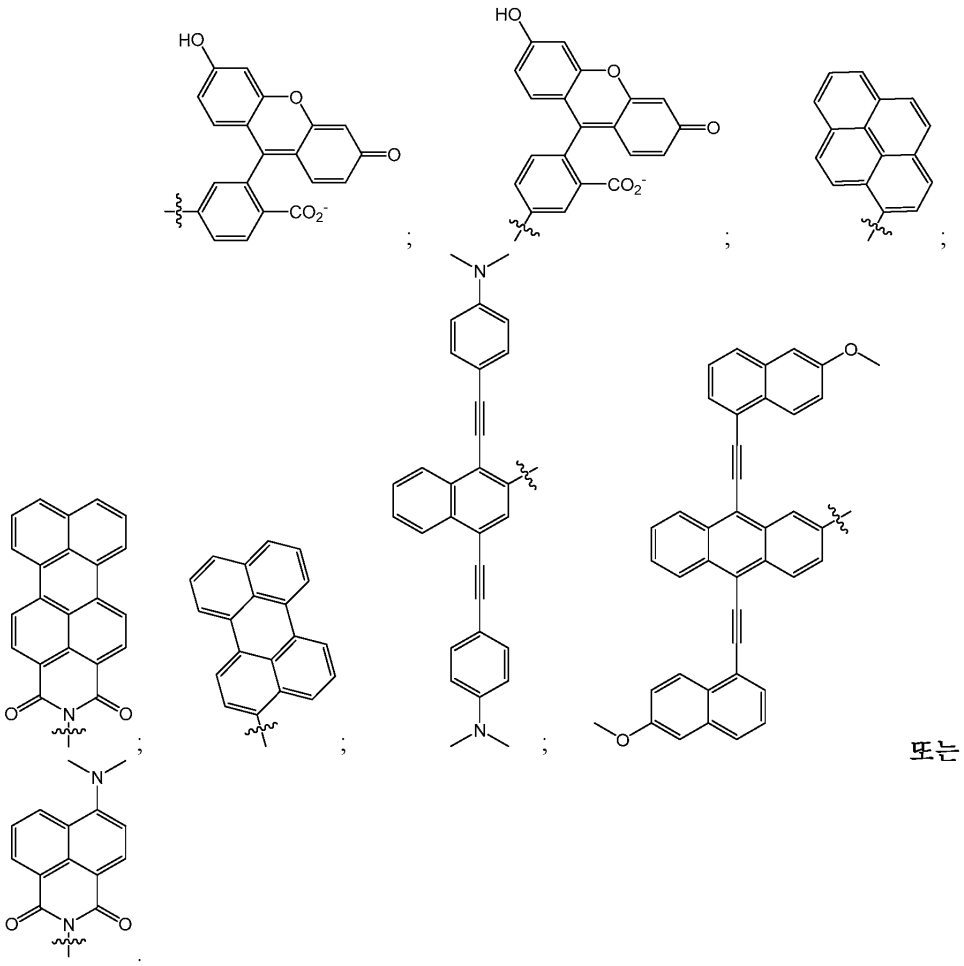
[0131] b) 적어도 하나의 음전하 그룹; 및

[0132] c) 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 중합체성 염료

[0133] 를 포함한다.

[0134] 실시형태에서, 표적화 모이어티는 표적 분석물에 대해 친화도를 갖고. 실시형태에서, 표적화 모이어티는 항체를 포함한다. 실시형태에서, 2가 또는 3가 염은 2가 염이다. 실시형태에서, 2가 염은 마그네슘 염이다. 실시형태에서, 마그네슘 염은 염화마그네슘이다.

[0135] 실시형태에서, 형광 또는 착색 모이어티는 형광 모이어티이다. 실시형태에서, 형광 또는 착색 모이어티는, 각 발생(occurrence)에서, 피렌, 페릴렌, 페릴렌 모노이미드, 및 6-FAM 모이어티로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된다. 실시형태에서, 형광 또는 착색 모이어티는, 각 발생에서, 독립적으로 하기 구조 중 하나를 갖는다:



[0136] .

[0137] 실시형태에서, 중합체성 염료는 다수의 음전하 그룹을 포함한다. 실시형태에서, 중합체성 염료는 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티를 포함하고, 2개 이상의 형광 또는 착색 모이어티는 각각 인접한 형광 또는 착색 모이어티에 적어도 하나의 음전하 그룹을 포함하는 링커를 통해 연결된다.

[0138] 실시형태에서, 링커는 추가로 하나 이상의 알킬렌 또는 알킬렌 옥사이드 모이어티를 포함한다. 실시형태에서, 알킬렌 옥사이드 모이어티는 폴리에틸렌 옥사이드 모이어티를 포함한다. 실시형태에서, 음전하 그룹은 포스페이트이다. 실시형태에서, 중합체성 염료는 2 내지 100개의 형광 또는 착색 모이어티를 포함하고, 상기 형광 또는 착색 모이어티는 인접한 형광 또는 착색 모이어티에 적어도 하나의 음전하 그룹을 포함하는 링커를 통해 연결된다. 실시형태에서, 중합체성 염료는 2 내지 10개의 형광 또는 착색 모이어티를 포함하고, 상기 형광 또는 착색 모이어티는 인접한 형광 또는 착색 모이어티에 적어도 하나의 음전하 그룹을 포함하는 링커를 통해 연결된다.

[0139] 실시형태에서, 상기 방법은 공유 접합체를 정제함을 추가로 포함한다. 실시형태에서, 공유 접합체를 정제하는 것은 공유 접합체로부터 2가 또는 3가 염 모두를 실질적으로 제거함을 포함한다.

[0140] 실시형태에서, 공유 접합체는, 2가 또는 3가 염의 부재하에 제조된 상응하는 접합체보다 적어도 1.1 배 높은 형광 소광 계수를 갖는다. 실시형태에서, 공유 접합체는, 2가 또는 3가 염의 부재하에 제조된 상응하는 접합체보

다 적어도 1.2 배 높은 형광 소광 계수를 갖는다.

[0141] 실시형태에서, 표적화 모이어티는 항체이다.

[0142] 상기 실시형태 중 어느 것에서, 중합체성 염료는 구조 (I) 또는 구조 (II)의 화합물일 수 있다.

[0143] 다양한 실시형태에서, 형광 또는 착색 신호를 검출하는 것은 당해 기술 분야의 숙련가에게 이해되는 기술을 사용하는 유세포분석의 사용을 포함한다.

[0144] 실시형태에서, 화합물은 다양한 분석 방법에서 유용하다. 예를 들면, 특정 실시형태에서 본원 개시내용은 샘플을 염색하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 샘플에 구조 (I)의 화합물 (예를 들면, 여기서, R^2 또는 R^3 중 하나는 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 (예를 들면, 생체분자) 또는 마이크로입자이고, R^2 또는 R^3 중 나머지 하나는 H, OH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이다)을 상기 샘플이 적합한 파장에서 조명(illuminated)되는 경우 광학 응답을 생성하기에 충분한 양으로 첨가함을 포함한다.

[0145] 상기한 방법의 동일한 실시형태에서, R^2는 분석물 분자, 예를 들면, 생체분자. 예를 들면, 핵산, 아미노산 또는 이의 중합체 (예를 들면, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드)에 대한 공유 링크를 포함하는 링커이다. 또한 추가의 실시형태에서, 생체분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 압타머 또는 프리온이다.

[0146] 상기한 방법의 또한 다른 실시형태에서, R^2는 고체 지지체, 예를 들면, 마이크로입자에 대한 공유 링크를 포함하는 링커이다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 마이크로입자는 중합체성 비드 또는 비-중합체성 비드이다.

[0147] 또한 추가의 실시형태에서, 상기 광학 응답은 형광 응답이다.

[0148] 다른 실시형태에서, 상기 샘플은 세포를 포함하고, 일부 실시형태는 유세포분석으로 상기 세포를 관찰함을 추가로 포함한다.

[0149] 또한 추가의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 형광 응답을 검출가능한 상이한 광학 성질을 갖는 두번째 형광단의 것과 구별하는 것을 추가로 포함한다.

[0150] 다른 실시형태에서, 본원 개시내용은 다음을 포함하는 분석물 분자, 예를 들면, 생체분자를 가시적으로 검출하는 방법을 제공하였다:

[0151] (a) 구조 (I)의 화합물 (예를 들면, 여기서, R^2 또는 R^3 중 하나는 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, R^2 또는 R^3 중 나머지 하나는 H, OH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이다)을 제공하는 단계; 및

[0152] (b) 화합물을 이의 가시성 성질에 의해 검출하는 단계.

[0153] 동일한 실시형태에서 분석물 분자는 핵산, 아미노산 또는 이의 중합체 (예를 들면, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드)이다. 또한 추가의 실시형태에서, 분석물 분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 압타머 또는 프리온이다.

[0154] 다른 실시형태에서, 분석물 분자, 예를 들면, 생체분자를 가시적으로 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0155] (a) 상기한 화합물 중 어느 것을 하나 이상의 분석물 분자와 혼합하는 단계; 및

[0156] (b) 화합물을 이의 가시성 성질에 의해 검출하는 단계.

[0157] 다른 실시형태에서 분석물 분자를 가시적으로 검출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0158] (a) 제1항의 화합물 (여기서, R^2 또는 R^3은 Q 또는 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다)을, 분석물 분자와 혼합하는 단계;

[0159] (b) 상기 화합물 및 분석물 분자의 접합체를 형성하는 단계; 및

[0160] (c) 접합체를 이의 가시성 성질에 의해 검출하는 단계.

[0161] 다른 예시적인 방법은 분석물을 검출하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:

[0162] (a) 분석물에 대한 특이성(specificity)을 갖는 구조 (I)의 화합물 (여기서, R^2 또는 R^3은 표적화 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커를 포함한다)을 제공하는 단계;

[0163] (b) 상기 화합물 및 분석물을 혼합하여, 표적화 모이어티 및 분석물을 회합시키는 단계; 및

[0164] (c) 화합물을, 예를 들면, 이의 가시성 또는 형광 성질에 의해 검출하는 단계.

[0165] 상기한 방법의 특정 실시형태에서, 분석물은 입자, 예를 들면, 세포이고, 상기 방법은 유세포분석의 이용을 포함한다. 예를 들면, 화합물은, 목적하는 세포에 선택적으로 회합하여 세포를 다수의 기술, 예를 들면, 가시성 또는 형광 검출에 의해 검출가능하게 하기 위해, 표적화 모이어티, 예를 들면, 항체와 함께 제공될 수 있다. 적합한 항체는 목적하는 목적 사용에 좌우되어 당해 기술분야의 숙련가에 의해 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서 사용하기 위한 예시적인 항체는 UCHT1 및 MOPC-21을 포함한다.

[0166] 따라서, 본 발명의 화합물의 실시형태는 다음을 포함하는 다수의 방법에서 이용을 발견한다: 세포 계수; 세포 분류; 바이오마커 검출; 아폽토시스 수량화; 세포 생존력 측정; 세포 표면 항원 확인; 총 DNA 및/또는 RNA 함량 측정; 특이적 핵산 서열 (예를 들면, 핵산 프로브로서) 확인; 및 질환, 예를 들면, 혈액 암 진단.

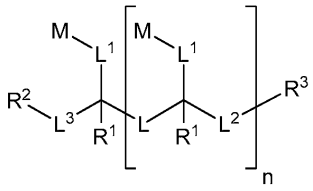
[0167] 상기 방법에 추가하여, 구조 (I)의 화합물의 실시형태는 다음을 포함하는 다양한 분야 및 방법에서 용도를 발견한다: 암성 및 다른 조직의 확인을 위한 내시경 절차에서 영상화; 단일-세포 및/또는 단일 분자 분석 방법, 예를 들면, 증폭이 거의 없거나 없는 폴리뉴클레오티드의 검출; 예를 들면, 구조 (I)의 화합물에 표적화 모이어티, 예를 들면, 항체 또는 당 또는 암 세포에 우선적으로 결합하는 다른 모이어티를 포함시켜 암 영상화; 수술 절차에서 영상화; 다양한 질환의 확인을 위한 히스톤의 결합; 예를 들면, 구조 (I)의 화합물 중 M 모이어티를 활성 모이어티로 대체하여 약물 전달; 및/또는 예를 들면, 다양한 식물군 및/또는 유기체에 구조 (I)의 화합물을 우선 결합시킴에 의한 치과 작업 및 다른 절차에서 조영제.

[0168] 구조 (I)의 화합물의 상기 명시된 임의의 실시형태, 및 상기 명시된 구조 (I)의 화합물에서 R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, L', L^1, L^2, L^3, L^4, M, m 및/또는 n 변수에 대해 본원에 명시된 임의의 특정 선택은, 독립적으로 구조 (I)의 화합물의 다른 실시형태 및/또는 변수와 조합되어 상기 구체적으로 명시되지 않은 본 발명의 실시형태를 형성할 수 있다는 것이 이해된다. 추가로, 선택 목록이 임의의 구체적인 R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, L', L^1, L^2, L^3, L^4, M, m 및/또는 n 변수에 대해 특정 실시형태 및/또는 청구범위에서 나열되는 경우, 각각의 개별적인 선택이 특정 실시형태 및/또는 청구범위로부터 제거될 수 있고, 나머지 선택 목록이 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 고려될 수 있음을 이해하여야 한다.

[0169] 본 발명의 추가 실시형태에서, 본원에 기재된 다양한 방법 및 조성물에 사용된 형광 및/또는 착색 염료는 형광 및/또는 착색 모이어티의 이량체 및 보다 고차 중합체일 수 있다. 형광 및/또는 착색 모이어티는 검정이 수행되는 pH에서 다중 양전하 모이어티 또는 다중 음전하 모이어티를 갖는 링커에 의해 링크된다.

[0170] 따라서, 동일한 실시형태에서 화합물은 하기 구조 (A)를 갖는다:

[0171] 화학식 (A)

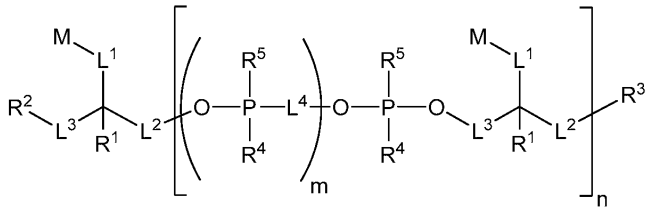
[0172] 

[0173] 상기 화학식 (A)에서,

[0174] L은 하나 이상의 (예를 들면, 각각의) M 그룹 사이에 공간 분리를 유지시켜 분자내 켄칭이 감소 또는 제거되도록 하기 위해 충분한 링커이고, R^1, R^2, R^3, L^1, L^2, L^3 및 n은 구조 (I)에 정의된 바와 같다. 구조 (A)의 동일한 실시형태에서, L은 하나 이상의 에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함하는 링커이다.

[0175] 다른 실시형태에서 하기 구조 (I) 또는 이의 입체이성체, 염 또는 호변체를 갖는 화합물을 제공한다:

[0176] 화학식 (I)



[0177]

[0178] 상기 화학식 (I)에서,

[0179] M은, 각 발생에서, 독립적으로 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 하나의 접합도를 포함하는 모이어티이고;

[0180] L^1은, 각 발생에서, 독립적으로: i) 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이거나; 또는 ii) 2개의 상보적 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능 그룹을 포함하는 링커이고;

[0181] L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이고;

[0182] L^4는, 각 발생에서, 독립적으로 3개 초과의 원자 길이의 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고, 여기서, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 및 헤테로알키닐렌 링커에서 헤테로원자는 O, N 및 S로부터 선택되고;

[0183] R^1은, 각 발생에서, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0184] R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 헤테로알킬, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q 또는 L'이고;

[0185] R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

[0186] R^5는, 각 발생에서, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

[0187] R_a는 O 또는 S이고;

[0188] R_b는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

[0189] R_c는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d, OL', SR_d, 알킬, 알콕시, 헤테로알킬, 헤테로알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

[0190] R_d는 카운터 이온이고;

[0191] Q는, 각 발생에서, 독립적으로, 분석물 분자, 표적화 모이어티, 고체 지지체 또는 상보적 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있는, 반응성 그룹, 또는 이의 보호된 유사체를 포함하는 모이어티이고;

[0192] L'는, 각 발생에서, 독립적으로 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 표적화 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체 잔기에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

[0193] m은, 각 발생에서, 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단, 적어도 하나의 발생의 m은 1 이상의 정수이고;

[0194] n은 1 이상의 정수이다.

[0195] 구조 (I)의 화합물의 다른 실시형태에서:

[0196] M은, 각 발생에서, 독립적으로 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 하나의 접합도를 포함하는 모이어티이고;

[0197] L^1은, 각 발생에서, 독립적으로: i) 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이거나; 또는 ii) 2개의 상보적 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능 그룹을 포함하는 링커이고;

[0198] L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이고;

[0199] L^4는, 각 발생에서, 독립적으로 3개 초과의 원자 길이의 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고, 여기서, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 및 헤테로알키닐렌 링커에서 헤테로원자는 O, N 및 S로부터 선택되고;

[0200] R^1은, 각 발생에서, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0201] R^2 및 R^3은 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 링커 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, 여기서: R_a는 O 또는 S이고; R_b는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고; R_c는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d, SR_d, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고; R_d는 카운터 이온이고;

[0202] R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

[0203] R^5는, 각 발생에서, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

[0204] Q는, 각 발생에서, 독립적으로 분석물 분자, 고체 지지체 또는 상보적 반응성 그룹 Q'와의 공유 결합을 형성하는 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이고;

[0205] m은, 각 발생에서, 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단, 적어도 하나의 발생의 m은 1 이상의 정수이고;

[0206] n은 1 이상의 정수이다.

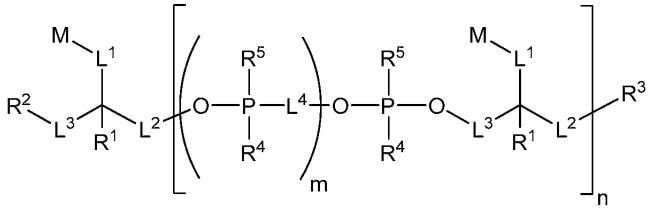
[0207] 구조 (I)의 화합물에서 다양한 링커 및 치환체 (예를 들면, M, Q, R^1, R^2, R^3, R^c L^1, L^2, L^3 및 L^4)는 하나 이상의 치환체로 임의로 치환된다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 임의의 치환체는 물 구조 (I)의 화합물의 수용해도 또는 다른 성질을 최적화하기 위해 선택된다. 특정 실시형태에서, 구조 (I)의 화합물에서 각각의 알킬, 알콕시, 알킬에테르 , 알콕시알킬에테르, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 및 티오포스포알킬에테르는 하이드록실, 알콕시, 알킬에테르 , 알콕시알킬에테르, 설프하이드릴, 아미노, 알킬아미노, 카복실, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 및 티오포스포알킬에테르로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 임의로 치환된다. 특정 실시형태에서 임의의 치환체는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, 여기서, R_a, R_b 및 R_c는 구조 (I)의 화합물에 대해 정의된 바와 같다.

[0208] 일부 실시형태에서, L^1은 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이다. 다른 실시형태에서, L^1은 각 발생에서, 독립적으로 2개의 상보적 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능 그룹을 포함하는 링커, 예를 들면, Q 그룹이다.

[0209] 일부 실시형태에서, L^4는 각 발생에서, 독립적으로 헤테로알킬렌 링커이다. 다른 보다 특정한 실시형태에서, L^4는 각 발생에서, 독립적으로 알킬렌 옥사이드 링커이다.

[0210] 실시형태에서, 중합체성 염료는 하기 구조 (I) 또는 이의 입체이성체, 염 또는 호변체를 갖는다:

[0211] 화학식 (I)



[0212]

[0213] 상기 화학식 (I)에서,

[0214] M은, 각 발생에서, 독립적으로 형광 또는 착색 모이어티를 포함하는 모이어티이고;

[0215] L^1은, 각 발생에서, 독립적으로: i) 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이거나; 또는 ii) 2개의 상보적 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능 그룹을 포함하는 링커이고;

[0216] L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이고;

[0217] L^4는, 각 발생에서, 독립적으로 알킬렌 또는 알킬렌 옥사이드 링커이고;

[0218] R^1은, 각 발생에서, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0219] R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 H, OH, SH, 알킬, 알콕시, 알킬에테르, 헤테로알킬, $-OP(=R_a)(R_b)R_c$, Q, 또는 이의 보호된 형태, 또는 L'이고;

[0220] R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

[0221] R^5는, 각 발생에서, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

[0222] R_a는 O 또는 S이고;

[0223] R_b는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

[0224] R_c는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d, OL', SR_d, 알킬, 알콕시, 헤테로알킬, 헤테로알콕시, 알킬에테르, 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

[0225] R_d는 카운터 이온이고;

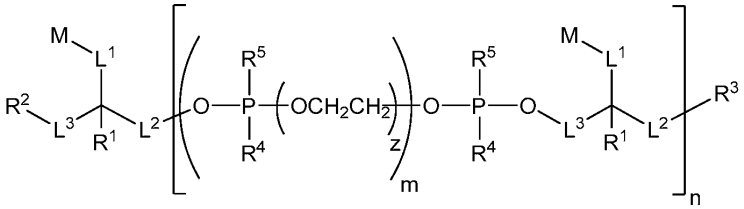
[0226] L'는, 각 발생에서, 독립적으로 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 상기 표적화 모이어티에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 고체 지지체 잔기에 대한 공유 결합을 포함하는 링커, 뉴클레오시드에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고;

[0227] m은, 각 발생에서, 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단, 적어도 하나의 발생의 m은 1 이상의 정수이고, 이에 의해 상기 화합물은 적어도 하나의 L^4를 포함하고;

[0228] n은 1 이상의 정수이다.

[0229] 예를 들면, 동일한 실시형태에서 L^4는 폴리에틸렌 옥사이드이고, 화합물은 하기 구조 (IA)를 갖는다:

[0230] 화학식 (IA)



[0231]

[0232] 화학식 (IA)에서,

[0233] z는 2 내지 100의 정수이다. (IA)의 동일한 실시형태에서, z는 2-30의 정수, 예를 들면, 약 20 내지 25, 또는 약 23이다. 일부 실시형태에서, z는 2 내지 10의 정수, 예를 들면, 3 내지 6의 정수이다. 일부 실시형태에서, z는 3이다. 일부 실시형태에서, z는 4이다. 일부 실시형태에서, z는 5이고, 일부 실시형태에서, z는 6이다.

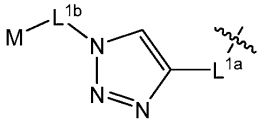
[0234] 임의의 링커 L^1은 화합물의 나머지에 대한 M 모이어티의 부착점으로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 구조 (I)의 화합물에 대한 합성 전구체를 제조하고, M 모이어티를 당해 기술분야에 공지된 다수의 용이한 방법, 예를 들면, "클릭 화학(click chemistry)"으로서 언급되는 방법을 사용하여 합성 전구체에 부착시킨다. 이러한 목적을 위해 신속하고 실질적으로 비가역적인 임의의 반응을 사용하여 M을 합성 전구체에 부착하여 구조 (I)의 화합물을 형성할 수 있다. 예시적인 반응은, 트리아졸을 형성하기 위한 아지드 및 알킨의 구리 촉매된 반응 (Huisgen 1,3-쌍극자 첨가환화), 디엔 및 친디엔체 (Diels-Alder)의 반응, 변형(strain)-촉진된 알킨-니트론 첨가환화, 선형 알켄의 아지드, 테트라진 또는 테트라졸과의 반응, 알켄 및 아지드 [3+2] 첨가환화, 알켄 및 테트라진 역-수요 디엘스-알더(inverse-demand Diels-Alder), 알켄 및 테트라졸 광반응 및 다양한 변위 반응, 예를 들면, 친핵성 공격에 의한 친전자성 원자 상 이탈 그룹의 변위를 포함한다. 예시적인 변위 반응은 아민의: 활성화 에스테르; N-하이드록시석신이미드 에스테르; 이소시아네이트; 이소티오시아네이트 등과의 반응을 포함한다. 동일한 실시형태에서 L^1을 형성하는 반응을 수성 환경에서 수행할 수 있다.

[0235] 따라서, 동일한 실시형태에서 L^1은 각 발생에서 2개의 상보적 반응성 그룹의 반응에 의해 형성될 수 있는 관능 그룹을 포함하는 링커, 예를 들면, 상기한 "클릭" 반응 중 하나의 생성물인 관능 그룹이다. 다양한 실시형태에서, 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, 관능 그룹은, 알데히드, 옥심, 하이드라존, 알킨, 아민, 아지드, 아실아지드, 아실할라이드, 니트릴, 니트론, 설프하이드릴, 디설파이드, 설포닐 할라이드, 이소티오시아네이트, 이미도에스테르, 활성화 에스테르 (예를 들면, N-하이드록시석신이미드 에스테르), 케톤, α,β-불포화 카보닐, 알켄, 말레이미드, α-할로이미드, 에폭사이드, 아지리딘, 테트라진, 테트라졸, 포스핀, 비오틴 또는 티란 관능 그룹의 상보적 반응성 그룹과의 반응에 의해 형성될 수 있다. 예를 들면, 아민의 N-하이드록시석신이미드 에스테르 또는 이소티오시아네이트과의 반응.

[0236] 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, 관능 그룹은 알킨 및 아지드의 반응에 의해 형성될 수 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, 관능 그룹은 아민 (예를 들면, 1급 아민) 및 N-하이드록시석신이미드 에스테르 또는 이소티오시아네이트의 반응에 의해 형성될 수 있다.

[0237] 추가의 실시형태에서, 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, 관능 그룹은 알켄, 에스테르, 아미드, 티오에스테르, 디설파이드, 카보사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 그룹을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, 관능 그룹은 알켄, 에스테르, 아미드, 티오에스테르, 티오우레아, 디설파이드, 카보사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 그룹을 포함한다. 다른 실시형태에서, 관능 그룹은 아미드 또는 티오우레아를 포함한다. 일부 보다 특정한 실시형태에서, 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, L^1은 트리아졸릴 관능 그룹을 포함하는 링커이다. 반면 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, L^1은 아미드 또는 티오우레아 관능 그룹을 포함하는 링커이다.

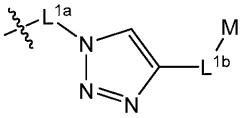
[0238] 또한 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, L^1-M은 하기 구조를 갖는다:



[0239]

[0240] 여기서, L^{1a} 및 L^{1b}는 각각 독립적으로 임의의 링커이다.

[0241] 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 발생의 L^1의 경우, L^1-M은 하기 구조를 갖는다:

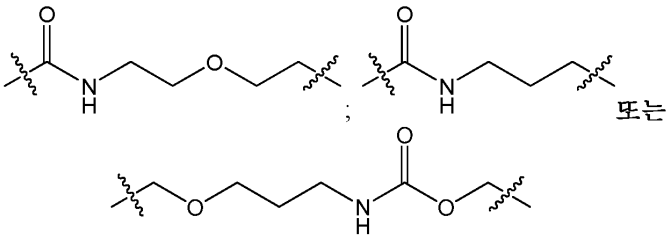


[0242]

[0243] 여기서, L^{1a} 및 L^{1b}는 각각 독립적으로 임의의 링커이다.

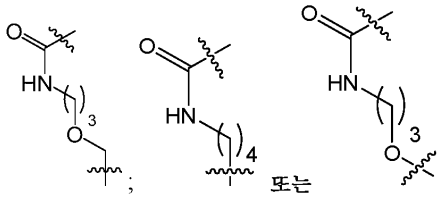
[0244] 상기한 다양한 실시형태에서, L^{1a} 또는 L^{1b}, 또는 이들 둘 다는, 부재한다. 다른 실시형태에서, L^{1a} 또는 L^{1b}, 또는 이들 둘 다는, 존재한다.

[0245] 동일한 실시형태에서 L^{1a} 및 L^{1b}는, 존재하는 경우, 각각 독립적으로 알킬렌 또는 헤테로알킬렌이다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 L^{1a} 및 L^{1b}는, 존재하는 경우, 독립적으로 하기 구조 중 하나를 갖는다:



[0246]

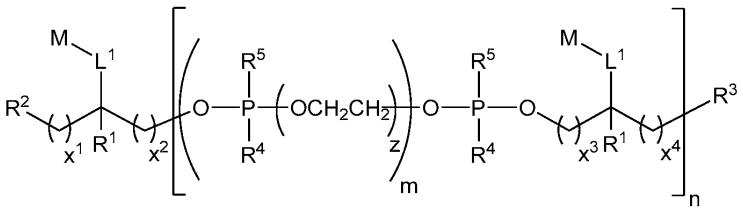
[0247] 구조 (I)의 또한 다른 상이한 실시형태에서, L^1은 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커이다. 특정 실시형태에서, L^1은 하기 구조 중 하나를 갖는다:



[0248]

[0249] 추가의 실시형태에서, L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 C_1-C_6 알킬렌, C_2-C_6 알케닐렌 또는 C_2-C_6 알키닐렌이다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 화합물은 하기 구조 (IB)를 갖는다:

[0250] 화학식 (IB)



[0251]

[0252] 상기 화학식 (IB)에서:

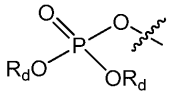
[0253] x^1, x^2, x^3 및 x^4는, 각 발생에서, 독립적으로 0 내지 6의 정수이고;

[0254] z는 2 내지 100의 정수, 예를 들면, 3 내지 6의 정수이다.

[0255] 구조 (IB)의 화합물의 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 발생의 x^1, x^2, x^3 또는 x^4는 1이다. 다른 실시형태에서, x^1, x^2, x^3 및 x^4는 각 발생에서 각각 1이다. 다른 실시형태에서, x^1 및 x^3은 각각 각 발생에서 0이다. 일부 실시형태에서, x^2 및 x^4는 각 발생에서 각각 1이다. 또한 다른 실시형태에서, x^1 및 x^3은 각각 각 발생에서 0이고, x^2 및 x^4는 각 발생에서 각각 1이다.

[0256] 구조 (IB)의 화합물의 일부 보다 특정한 실시형태에서, L^1은, 각 발생에서, 독립적으로 트리아졸릴 관능 그룹을 포함한다. 구조 (IB)의 화합물의 일부 다른 특정 실시형태에서, L^1은, 각 발생에서, 독립적으로 아미드 또는 티오우레아 관능 그룹을 포함한다. 구조 (IB)의 화합물의 다른 실시형태에서, L^1은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커이다.

[0257] 구조 (I)의 화합물 중 어느 것의 또한 다른 실시형태에서, R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, O^- 또는 OR_d이다. "OR_d" 및 "SR_d"가 양이온과 회합된 O^- 및 S^-를 언급하는 것을 의도함을 이해한다. 예를 들면, 포스페이트 그룹의 이나트륨 염은 다음과 같이 나타낼 수 있다:

[0258] 

[0259] 여기서, R_d는 나트륨 (Na^+)이다.

[0260] 구조 (I)의 화합물 중 어느 것의 다른 실시형태에서, R^5는, 각 발생에서, 옥소이다.

[0261] 상기한 화합물 중 어느 것의 일부 상이한 실시형태에서, R^1은 H이다.

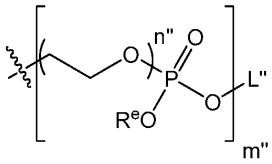
[0262] 다른 다양한 실시형태에서, R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이다. 일부 상이한 실시형태에서, R^2 또는 R^3은 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, R^2 또는 R^3 중 나머지 하나는 Q 또는 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다.

[0263] 상기한 구조 (I)의 화합물 중 어느 것의 또한 추가의 상이한 실시형태에서, R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이다. 일부 이들 실시형태에서, R_c는 OL'이다.

[0264] 다른 실시형태에서, R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 $-OP(=R_a)(R_b)OL'$이고, L'는, Q, 표적화 모이어티, 분석물 (예를 들면, 분석물 분자), 고체 지지체, 고체 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한: 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커이다.

[0265] 링커 L'는 Q, 표적화 모이어티, 분석물 (예를 들면, 분석물 분자), 고체 지지체, 고체 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 구조 (I)의 추가 화합물을 구조 (I)의 화합물에 부착시키는데 적합한 임의의 링커일 수 있다. 유리하게는 특정 실시형태는 화합물의 수용해도를 증가시키거나 최적화시키기 위해 선택된 L' 모이어티의 사용을 포함한다. 특정 실시형태에서, L'는 헤테로알킬렌 모이어티이다. 일부 다른 특정 실시형태에서, L'는 알킬렌 옥사이드 또는 포스포디에스테르 모이어티, 또는 이의 조합을 포함한다.

[0266] 특정 실시형태에서, L'는 하기 구조를 갖는다:



[0267]

[0268] 여기서:

[0269] m" 및 n"는 독립적으로 1 내지 10의 정수이고;

[0270] R^e는 H, 전자쌍 또는 카운터 이온이고;

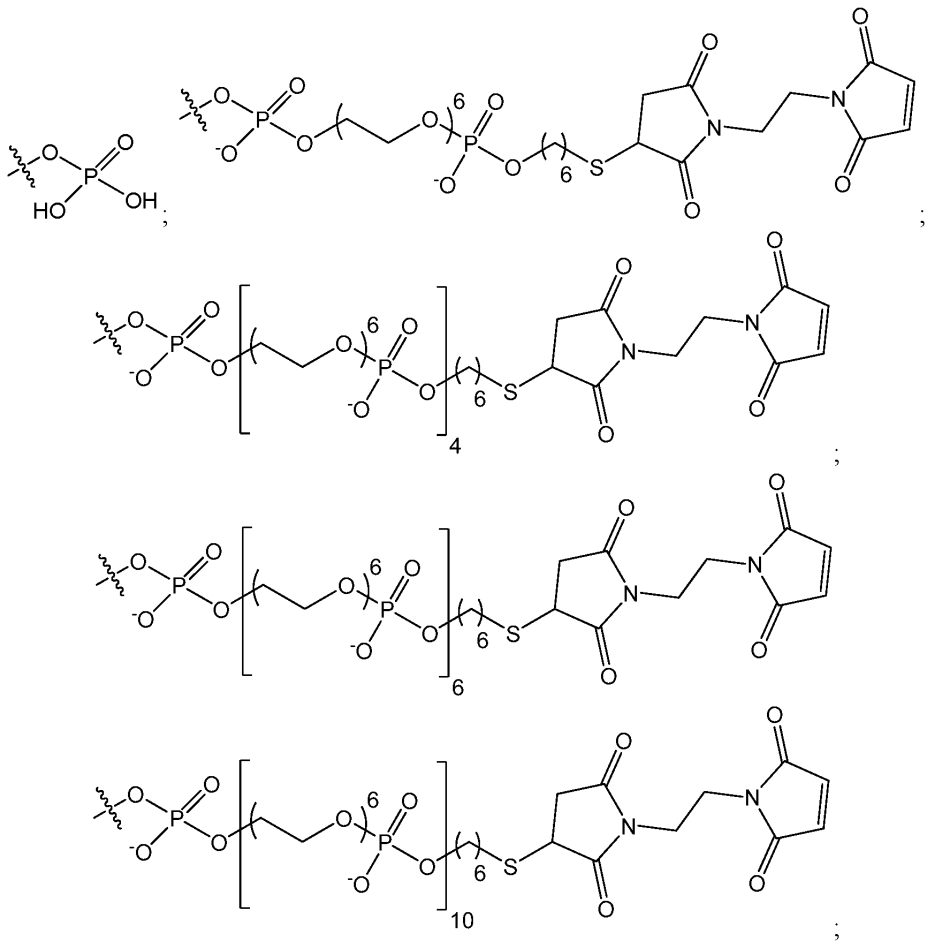
[0271] L"는, R^e 또는, Q, 표적화 모이어티, 분석물 (예를 들면, 분석물 분자), 고체 지지체, 고체 지지체 잔기, 뉴클레오시드 또는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 직접 결합 또는 링크이다.

[0272] 일부 실시형태에서, m"는 4 내지 10의 정수, 예를 들면, 4, 6 또는 10이다. 다른 실시형태에서 n"는 3 내지 6의 정수, 예를 들면, 3, 4, 5 또는 6이다.

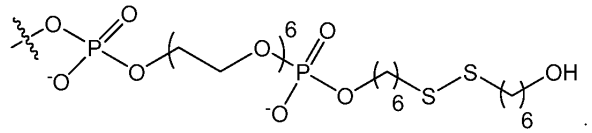
[0273] 일부 다른 실시형태에서, L"는 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 모이어티이다. 일부 다른 특정 실시형태에서, L"는 알킬렌 옥사이드, 포스포디에스테르 모이어티, 설프하이드릴, 디설파이드 또는 말레이미드 모이어티 또는 이의 조합을 포함한다.

[0274] 상기한 특정 실시형태에서, 표적화 모이어티는 항체 또는 세포 표면 수용체 길항제이다.

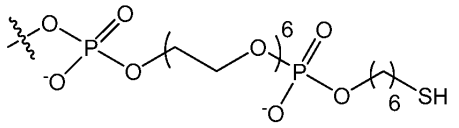
[0275] 상기한 구조 (I)의 화합물 중 어느 것의 다른 보다 특정한 실시형태에서, R^2 또는 R^3은 하기 구조 중 하나를 갖는다:



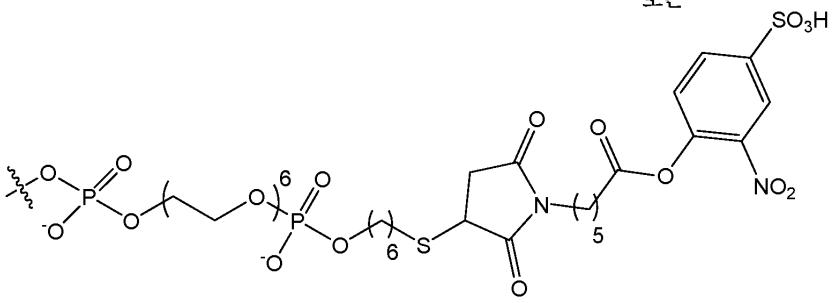
[0276]



;

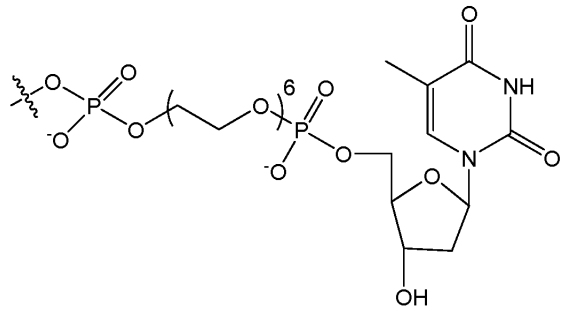


또는



[0277] .

[0278] 구조 (I)의 화합물의 특정 실시형태는 올리고뉴클레오티드의 제조를 위해 당해 기술분야에 공지된 것과 유사한 고체-상 합성 방법에 따라서 제조할 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, L'는 고체 지지체, 고체 지지체 잔기 또는 뉴클레오시드에 대한 링크이다. 활성화된 데옥시티미딘 (dT) 그룹을 포함하는 고체 지지체는 용이하게 이용가능하고, 동일한 실시형태에서 구조 (I)의 화합물의 제조를 위한 출발 물질로서 이용할 수 있다. 따라서, 동일한 실시형태에서 R^2 또는 R^3은 하기 구조를 갖는다:



[0279]

[0280] 당해 기술 분야의 숙련가는 상기 도시된 dT 그룹이 단지 합성 용이성 및 경제적 효율만을 위해 포함되고, 필수적이지 않다는 것을 이해할 것이다. 다른 고체 지지체를 사용하고 L' 상 존재하는 상이한 뉴클레오시드 또는 고체 지지체 잔기를 야기할 수 있거나, 뉴클레오시드 또는 고체 지지체 잔기는 합성 후 제거 또는 개질될 수 있다.

[0281] 또한 다른 실시형태에서, Q는, 각 발생에서, 독립적으로 분석물 분자 또는 고체 지지체와의 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이다. 다른 실시형태에서, Q는, 각 발생에서, 독립적으로 상보적 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, Q'는 구조 (I)의 추가 화합물 상 (예를 들면, R^2 또는 R^3 위치에서) 존재하고, Q 및 Q'는 상보적 반응성 그룹을 포함하고, 이에 의해 구조 (I)의 화합물 및 구조 (I)의 추가 화합물의 반응은 구조 (I)의 화합물의 공유 결합된 이량체를 야기한다. 다량체 구조 (I)의 화합물은 또한 유사한 방식으로 제조할 수 있고, 본 발명의 실시형태의 범위 내에 포함된다.

[0282] Q 그룹의 유형 및 Q 그룹의 구조 (I)의 화합물의 나머지로의 연결은 제한되지 않고, 단, Q는 목적하는 결합을 형성하기 위한 적합한 반응성을 갖는 모이어티를 포함한다.

[0283] 특정 실시형태에서, Q는, 수성 조건하에 가수분해에 민감하지 않지만, 분석물 분자 또는 고체 지지체 (예를 들면, 아민, 아지드 또는 알킨) 상 상응하는 그룹과 결합을 형성하기 위해 충분하게 반응성인 모이어티이다.

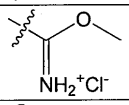
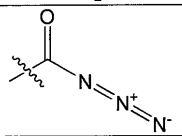
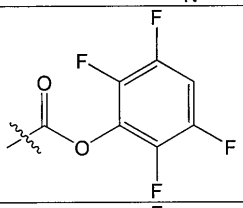
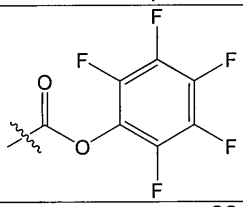
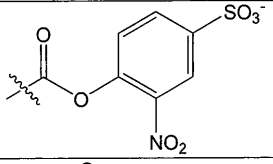
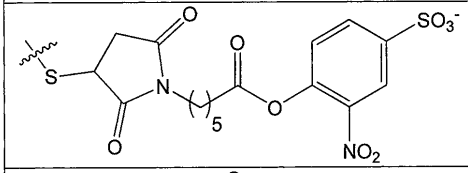
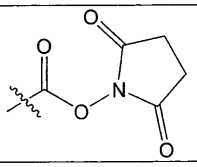
[0284] 구조 (I)의 화합물의 특정 실시형태는 생체접합 분야에서 통상 사용되는 Q 그룹을 포함한다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, Q는 친핵성 반응성 그룹, 친전자성 반응성 그룹 또는 첨가환화 반응성 그룹을 포함한다. 일부 보다 특정한 실시형태에서, Q는 설프하이드릴, 디설파이드, 활성화 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨,

알켄, 디엔, 친디엔체, 산 할라이드, 설포닐 할라이드, 포스핀, α-할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이미드 관능 그룹을 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 에스테르는 N-석신이미드 에스테르, 이미도에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르이다. 다른 실시형태에서, 알킨은 알킬 아지드 또는 아실 아지드이다.

[0285] Q 그룹은 저장 안정성 또는 다른 목적하는 성질을 증가시키기 위해 보호된 형태로 용이하게 제공될 수 있고, 이어서, 보호 그룹은 예를 들면, 표적화 모이어티 또는 분석물과의 접합을 위해 적합한 시점에 제거될 수 있다. 따라서, Q 그룹은 반응성 그룹의 "보호된 형태"를 포함하고, 상기 및 하기 하기 표 1에 기재된 반응성 그룹 중 어느 것을 포함한다. Q의 "보호된 형태"는 미리결정된 반응 조건하에 Q에 비해 더 낮은 반응성을 갖지만 상기 조건하에 Q로 전환될 수 있는, 바람직하게는 구조 (I)의 화합물의 다른 부분을 분해하지 않고 이와 반응하지 않는 모이어티를 언급한다. 당해 기술 분야의 숙련가는 특정한 Q 및 목적하는 최종 용도 및 저장 조건을 기초로 하여 Q의 적합한 보호된 형태를 유도할 수 있다. 예를 들면, Q가 SH인 경우, Q의 보호된 형태는 디설파이드를 포함하고, 이는 통상 공지된 기술 및 시약을 사용하여 SH 모이어티를 나타내기 위해 환원될 수 있다.

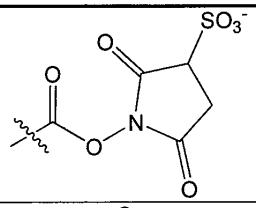
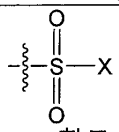
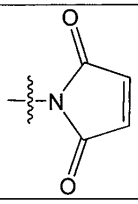
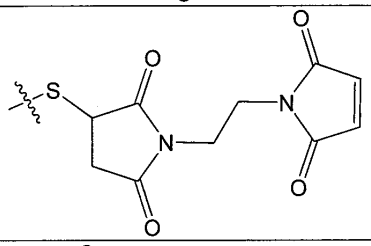
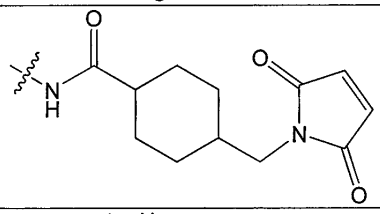
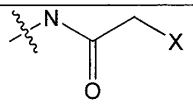
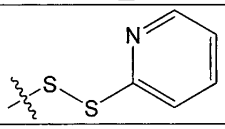
[0286] 예시적인 Q 모이어티를 하기 표 1에 제공한다.

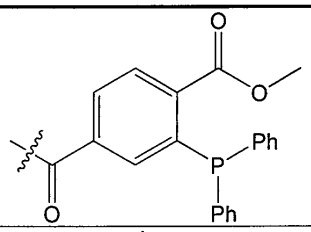
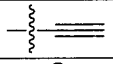
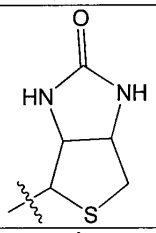
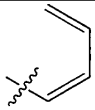
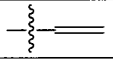
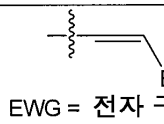
[0287] 표 1. 예시적인 Q 모이어티

구조	부류
	설프하이드릴
	이소티오시아네이트
	이미도에스테르
	아실 아지드
	활성화된 에스테르
	활성화된 에스테르
	활성화된 에스테르
	활성화된 에스테르
	활성화된 에스테르

[0288]

[0289]

구조	부류
	활성화된 에스테르
 X = 할로	설포닐 할라이드
	말레이미드
	말레이미드
	말레이미드
 X = 할로	α-할로이미드
	디설파이드

구조	부류
	포스핀
	아지드
	알킨
	비오틴
	디엔
	알켄/친디엔체
 EWG = 전자 구인 그룹	알켄/친디엔체
$-NH_2$	아미노

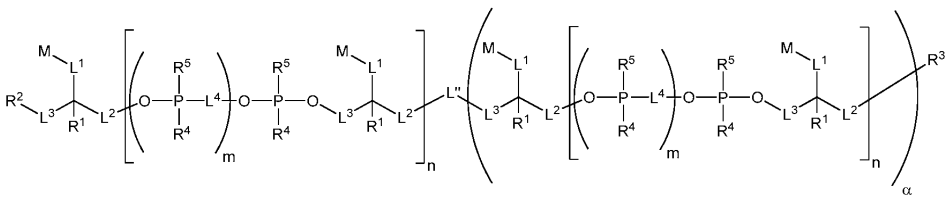
[0290]

[0291] 실시형태에서, Q는 표 1로부터 선택된 모이어티이다.

[0292] Q는 SH인 일부 실시형태에서, SH 모이어티는, 예를 들면, 또다른 구조 (I)의 화합물 상 또다른 설프하이드릴 그룹과의 디설파이드 결합을 형성하는 경향이 있을 것임을 주의하여야 한다. 따라서, 일부 실시형태는 디설파이드 이량체 형태로 존재하고, 디설파이드 결합이 SH Q 그룹으로부터 유도되는 구조 (I)의 화합물을 포함한다.

[0293] R^2 및 R^3 중 하나, 또는 이들 둘 다가 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 링크를 포함하는 구조 (I)의 화합물이 또한 특정 실시형태의 범위 내에 포함된다. 예를 들면, 여기서, R^2 및 R^3 중 하나 또는 이들 둘 다는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, R_c는 OL'이고, L'는 구조 (I)의 추가 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 이러한 화합물은, 예를 들면, 약 10개 "M" 모이어티 (즉, n =9)를 갖고 두번째 구조 (I)의 화합물 상 상보적 Q' 그룹과의 반응을 위해 적합한 "Q"를 갖는 첫번째 구조 (I)의 화합물을 제조하여 제조할 수 있다. 이러한 방식으로, 다수의, 예를 들면, 100 이상의 "M" 모이어티를 갖는 구조 (I)의 화합물은, 각 단량체의 순차적 커플링을 필요로 하지 않고 제조할 수 있다. 이러한 구조 (I)의 화합물의 예시적인 실시형태는 하기 구조 (I')를 갖는다:

[0294] 화학식 (I')



[0295]

[0296] 상기 화학식 (I')에서:

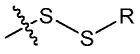
[0297] 각 발생의 R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, L^1, L^2, L^3, L^4, M, m 및 n은 독립적으로 구조 (I)의 화합물에서 정의된 바와 같고;

[0298] L"는 Q 모이어티의 상응하는 Q' 모이어티와 반응으로 수득된 관능 그룹을 포함하는 링커이고;

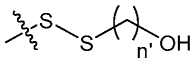
[0299] α는 1 초과의 정수, 예를 들면, 1 내지 100, 또는 1 내지 10이다.

[0300] 구조 (I')의 예시적인 화합물는 실시예 5에 제공된다. 구조 (I')의 다른 화합물은 당해 기술분야의 숙련가에 의해, 예를 들면, 본원에 제공된 구조 (I)의 화합물을 이량체화 또는 중합하여 유도될 수 있다.

[0301] 다른 실시형태에서, Q 모이어티는 용이하게 디파이드 모이어티로서 마스킹 (예를 들면, 보호)될 수 있고, 이는 이후에 환원되어 목적하는 분석물 분자 또는 표적화 모이어티에 결합하기 위한 활성화된 Q 모이어티를 제공할 수 있다. 예를 들면, Q 모이어티는 하기 구조를 갖는 디설파이드로서 마스킹될 수 있다:

[0302] 

[0303] 여기서, R은 임의로 치환된 알킬 그룹이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, Q는 하기 구조를 갖는 디설파이드 모이어티로서 제공된다:

[0304] 

[0305] 여기서, n은 1 내지 10의 정수, 예를 들면, 6이다.

[0306] 일부 다른 실시형태에서, R^2 또는 R^3 중 하나는 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, R^2 또는 R^3 중 나머지 하나는 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 분석물 분자는 핵산, 아미노산 또는 이의 중합체이다. 다른 실시형태에서, 분석물 분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 압타머 또는 프리온이다. 또한 상이한 실시형태에서, 고체 지지체는 중합체성 비드 또는 비-중합체성 비드이다.

[0307] m의 값은 목적하는 형광 및/또는 색상 강도를 기준으로 하여 선택될 수 있다 또다른 변수이다. 일부 실시형태에서, m은, 각 발생에서, 독립적으로 1 내지 10의 정수이다. 다른 실시형태에서, m은, 각 발생에서, 독립적으로 1 내지 5의 정수, 예를 들면, 1, 2, 3, 4 또는 5이다.

[0308] 다른 실시형태에서, m은, 각 발생에서, 독립적으로 2 초과의 정수이고, z는 3 내지 10의 정수이고, 예를 들면, 동일한 실시형태에서 m은, 각 발생에서, 독립적으로 2 초과의 정수, 예를 들면, 3, 4, 5 또는 6이고, z는 3 내지 6의 정수이다.

[0309] 형광 강도는 또한 상이한 값의 n을 선택하여 조정할 수 있다. 특정 실시형태에서, n은 1 내지 100의 정수이다. 다른 실시형태에서, n은 1 내지 10의 정수이다. 동일한 실시형태에서 n은 1이다. 동일한 실시형태에서 n은 2이다. 동일한 실시형태에서 n은 3이다. 동일한 실시형태에서 n은 4이다. 동일한 실시형태에서 n은 5이다. 동일한 실시형태에서 n은 6이다. 동일한 실시형태에서 n은 7이다. 동일한 실시형태에서 n은 8이다. 동일한 실시형태에서 n은 9이다. 동일한 실시형태에서 n은 10이다.

[0310] M은 목적하는 광학 성질에 기초하여, 예를 들면, 목적하는 착색 및/또는 형광 방출 파장에 기초하여, 선택된다. 일부 실시형태에서, M은 각 발생에서 동일하고; 그러나, 각 발생의 M은 동일한 M일 필요는 없고, 특정 실시형태는 M이 각 발생에서 동일하지 않는 화합물을 포함한다는 것을 주의하는 것이 중요하다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 각각의 M은 동일하지 않고, 상이한 M 모이어티는 형광 공명 에너지 전달 (fluorescence resonance energy transfer; FRET) 방법에서 사용하기 위해 흡광도 및/또는 방출를 갖도록 선택된다. 예를 들면, 이러한 실시형태에서 상이한 M 모이어티는, 하나의 파장에서 조사의 흡광도가 FRET 메카니즘에 의해 상이한 파장에서 조사의 방출을 야기하도록, 선택된다. 예시적인 M 모이어티는 목적하는 최종 사용을 기초로 하여 당해 기술분야의 숙련가에 의해 적합하게 선택될 수 있다. FRET 방법을 위한 예시적인 M 모이어티는 플루오레세인 및 5-탐라(5-카복시테트라메틸로다민, 석신이미딜 에스테르) 염료를 포함한다.

[0311] M은 M 상 임의의 위치 (즉, 원자)로부터 분자의 나머지에 부착될 수 있다. 당해 기술 분야의 숙련가는 M을 분자의 나머지에 부착하기 위하 수단을 인지할 것이다. 예시적인 방법은 본원에 기재된 "클릭" 반응을 포함한다.

[0312] 일부 실시형태에서, M은 형광 또는 착색 모이어티이다. 실시형태에서, M은 형광 모이어티이다. 실시형태에서, M은 착색 모이어티이다. 임의의 형광 및/또는 착색 모이어티가 사용되고, 예를 들면 당해 기술분야에 공지되고 전형적으로 비색, UV, 및/또는 형광 검정에서 사용되는 것이 사용될 수 있다. 본 발명의 다양한 실시형태에서 사용되는 M 모이어티의 예는 다음을 포함한다: 잔텐 유도체 (예를 들면, 플루오레세인, 로다민, 오리건 그린, 에오신 또는 텍사스 레드; 시아닌 유도체 (예를 들면, 시아닌, 인도카보시아닌, 옥사카보시아닌, 티아카보시아닌 및 메로시아닌); 스쿠아레인 유도체 및 환-치환된 스쿠아레인, Seta, SeTau, 및 Square 염료를 포함함; 나프탈렌 유도체 (예를 들면, 단실 및 프로단 유도체); 쿠마린 유도체; 옥사디아졸 유도체 (예를 들면, 피리딜옥사졸, 니트로벤즈옥사디아졸 또는 벤즈옥사디아졸); 안트라센 유도체 (예를 들면, 안트라퀴논, DRAQ5, DRAQ7 및 CyTRAK 오렌지를 포함함); 피렌 유도체, 예를 들면, 캐스캐이드 블루; 옥사진 유도체 (예를 들면, 나일 레드, 나일 블루, 크레실 바이올렛, 옥사진 170); 아크리딘 유도체 (예를 들면, 프로플라빈, 아크리딘 오렌지, 아크리딘 옐로우); 아릴메틴 유도체: 아우라민, 크리스탈 바이올렛, 말라카이트 그린; 및 테트라피롤 유도체 (예를 들면, 포르핀, 프탈로시아닌 또는 빌리루빈). 다른 예시적인 M 모이어티는 다음을 포함한다: 시아닌 염료, 잔테이트 염료 (예를 들면, Hex, Vic, Nedd, Joe 또는 Tet); 야키마 옐로우; 레드몬드 레드; 탐라; 텍사스 레드 및 알렉사 플루오르(alexa fluor)® 염료.

[0313] 상기한 것들 중 어느 것의 또한 다른 실시형태에서, M은 3개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이의 조합, 예를 들면, 4개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이의 조합, 또는 심지어 5개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 4개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이의 조합을 포함하는 모이어티이다. 일부 실시형태에서, M은 6개의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이의 조합을 포함한다. 추가 실시형태에서, 환은 융합된다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, M은 3개 이상의 융합된 환, 4개 이상의 융합된 환, 5개 이상의 융합된 환, 또는 심지어 6개 이상 융합된 환을 포함한다. 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 적어도 4개의 융합된 환을 포함하는 융합된-멀티사이클릭 아릴 모이어티를 포함한다.

[0314] 일부 실시형태에서, M은 사이클릭이다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 M은 카보사이클릭이다. 다른 실시형태에서, M은 헤테로사이클릭이다. 상기한 또한 다른 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 아릴 모이어티를 포함한다. 일부 이들 실시형태에서, 아릴 모이어티는 멀티사이클릭이다. 다른 보다 특정한 예에서, 아릴 모이어티는 융합된-멀티사이클릭 아릴 모이어티이고, 예를 들면, 이는 적어도 3, 적어도 4, 또는 또한 4개 초과의 아릴 환을 포함할 수 있다.

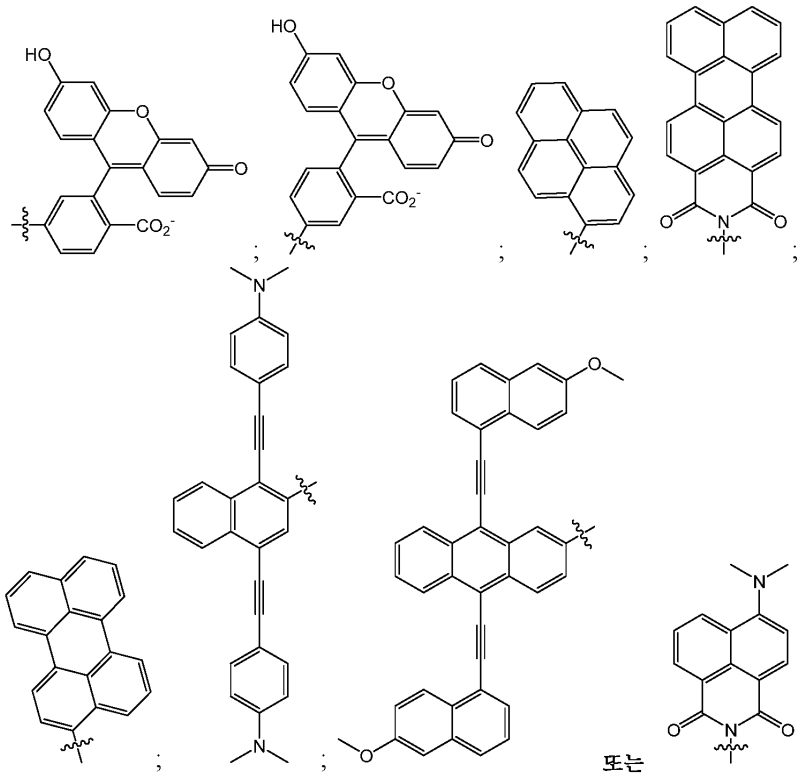
[0315] 상기한 구조 (I), (IA), (IB) 또는 (I')의 화합물 중 어느 것의 다른 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 헤테로원자는 질소, 산소 또는 황이다.

[0316] 상기한 것들 중 어느 것의 또한 추가의 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 적어도 하나의 치환체를 포함한다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 치환체는 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 하이드록시, 설프하이드릴, 알콕시, 아릴옥시, 페닐, 아릴, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 이소프로필, t-부틸, 카복시, 설포네이트, 아미드, 또는 포밀 그룹이다.

[0317] 상기한 것의 일부 또한 추가의 특정 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 디메틸아미노스틸벤, 퀴나크리돈, 플루오로페닐-디메틸-BODIPY, his-플루오로페닐-BODIPY, 아크리딘, 테릴렌, 섹시페닐, 포르피린, 벤조피렌, (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 모이어티이다. 다른 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 p-터페닐, 페릴렌, 아조벤젠, 페나진, 페난트롤린, 아크리딘, 티옥산트렌, 크리센, 루브렌, 코로넨, 시아닌, 페릴렌 이미드, 또는 페릴렌 아미드 또는 이의 유도체이다. 또한 추가의 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 쿠마린 염료, 레조루핀 염료, 디피로메텐붕소 디플루오라이드 염료, 루테늄 비피리딜 염료, 에너지 전달 염료, 티아졸 오렌지 염료, 폴리메틴 또는 N-아릴-1,8-나프탈이미드 염료이다.

[0318] 상기한 것들 중 어느 것의 또한 추가의 실시형태에서, M은 각 발생에서 동일하다. 다른 실시형태에서, 각각의 M은 상이하다. 또한 추가의 실시형태에서, 하나 이상의 M은 동일하고, 하나 이상의 M은 상이하다.

[0319] 일부 실시형태에서, M은 피렌, 페릴렌, 페릴렌 모노이미드 또는 6-FAM 또는 이의 유도체이다. 일부 다른 실시형태에서, M은 하기 구조 중 하나를 갖는다:

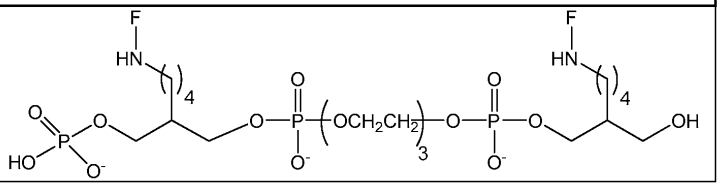
[0320] 

[0321] 카복실산 그룹을 포함하는 M 모이어티가 상기한 음이온성 형태 (CO_2^-)로 도시되지만, 당해 기술 분야의 숙련가는 이것이 pH에 좌우되어 변화될 것이고, 양성자 형태 (CO_2H)가 다양한 실시형태에 포함되는 것을 이해할 것이다.

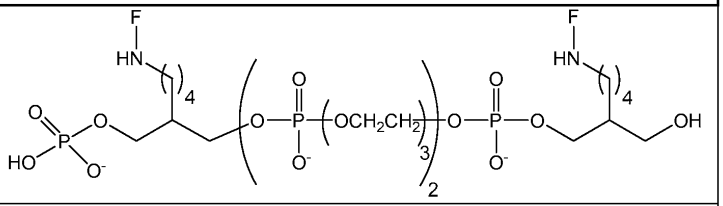
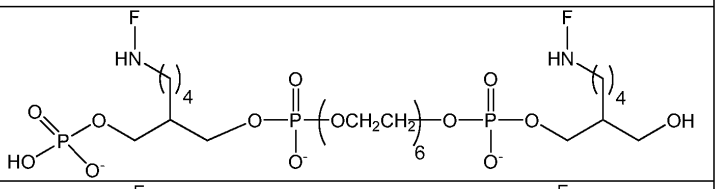
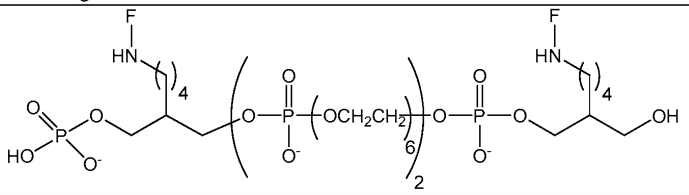
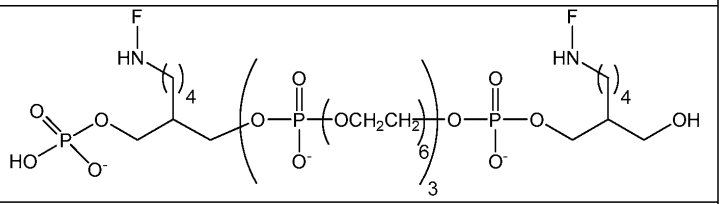
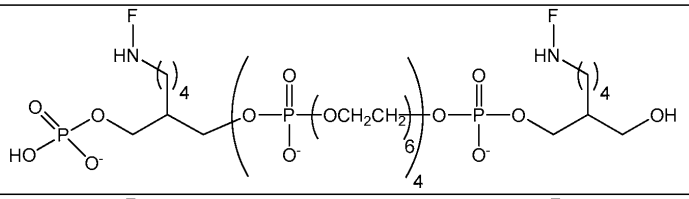
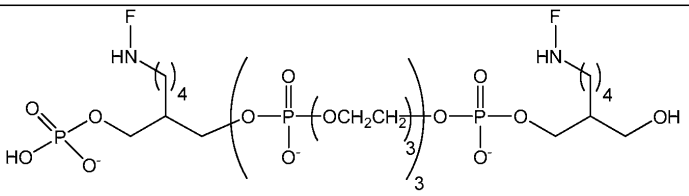
[0322] 일부 특정 실시형태에서, 화합물은 표 2로부터 선택된 화합물이다. 표 2에서 화합물을 실시예에 기재된 절차에 따라서 제조하고, 이들의 신원을 질량 분광분석으로 확인하였다.

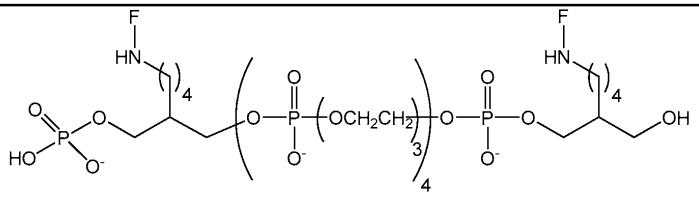
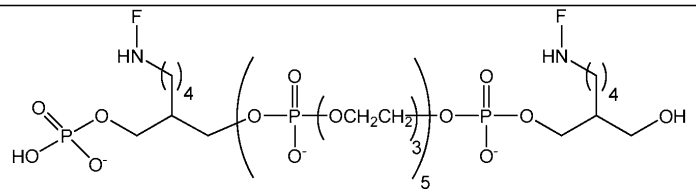
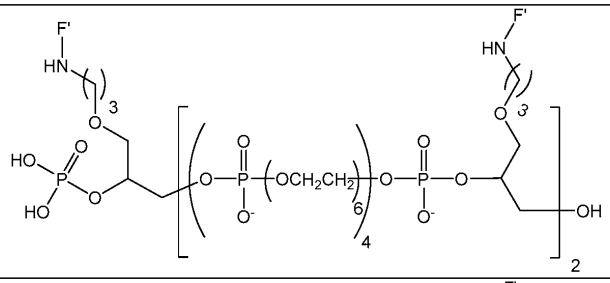
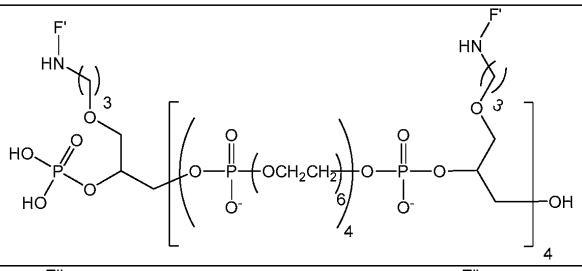
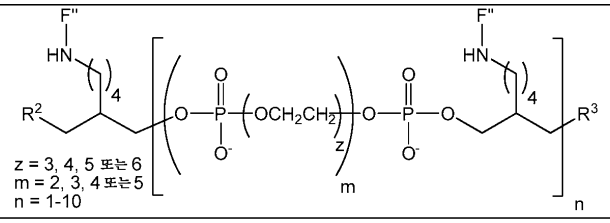
[0323] 표 2. 구조 I의 예시적인 화합물

[0324]

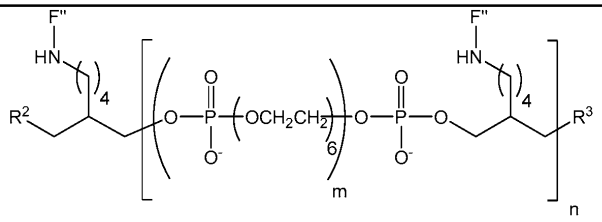
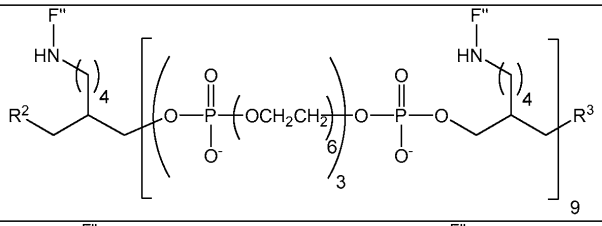
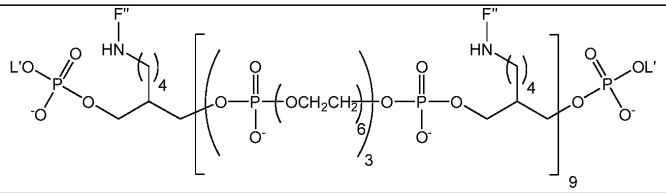
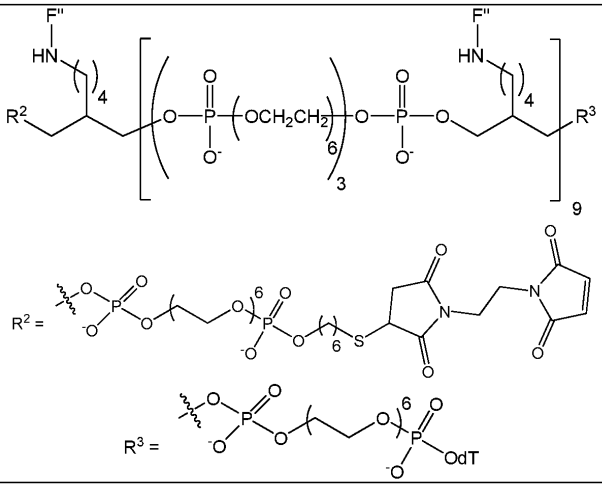
번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-1	1364.6 1365.2	

[0325]

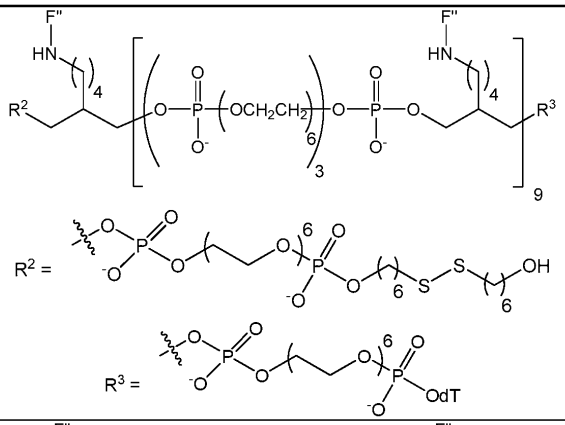
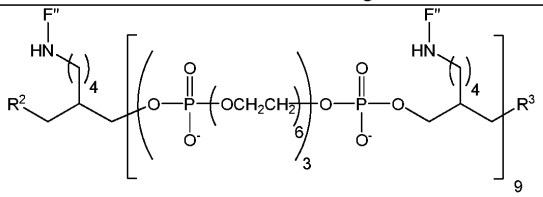
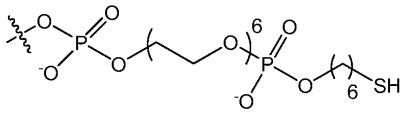
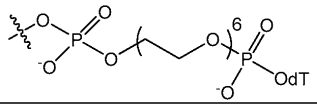
번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-2	1576.2 1577.3	
I-3	1497.4 1497.3	
I-4	1841.4 1841.6	
I-5	2185.8 2185.9	
I-6	2532.2 2530.2	
I-7	1789.6 1789.5	

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-8	2001.6 2001.6	
I-9	2213.5 2213.8	
I-10	4481.6 4480.9	
I-11	8375.9 8374.3	
I-12	TBD	 z = 3, 4, 5 또는 6 m = 2, 3, 4 또는 5 n = 1-10

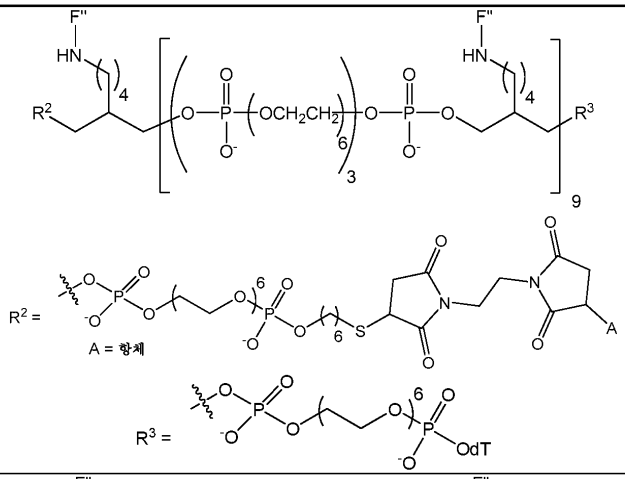
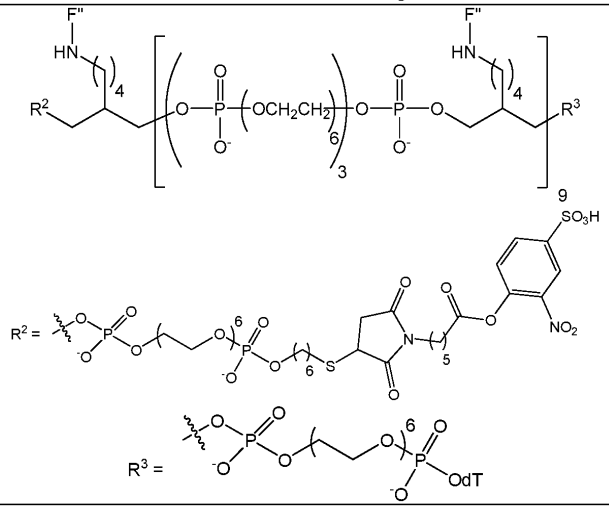
[0326]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-13	TBD	
I-14	TBD	
I-15	TBD	
I-16	TBD	

[0327]

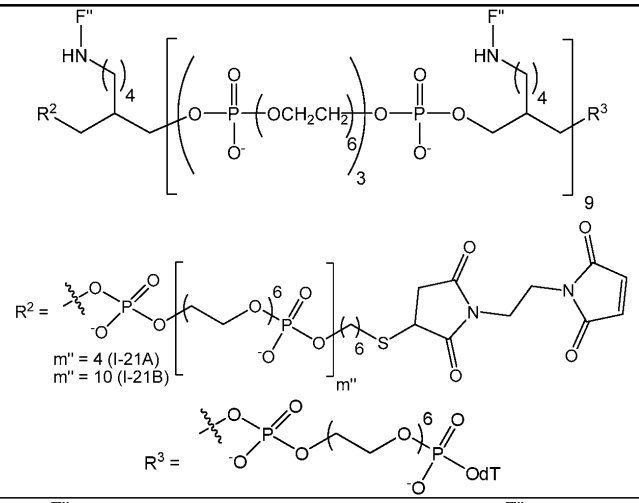
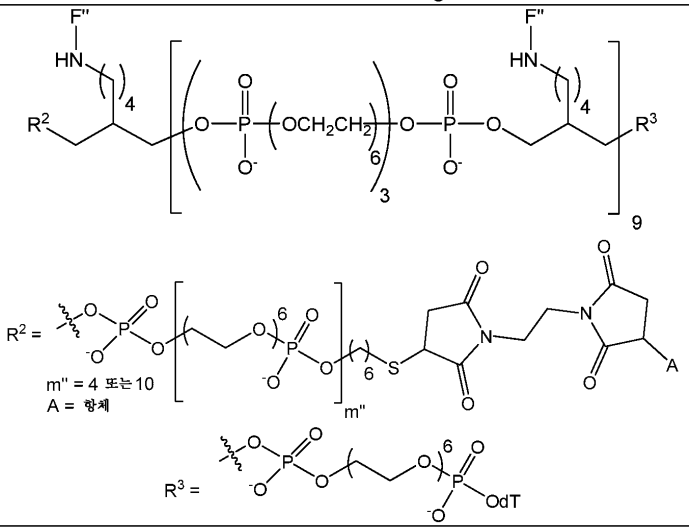
번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-17	15684.6 15681.5	 R2 = R3 =
I-18	TBD	 R2 =  R3 = 

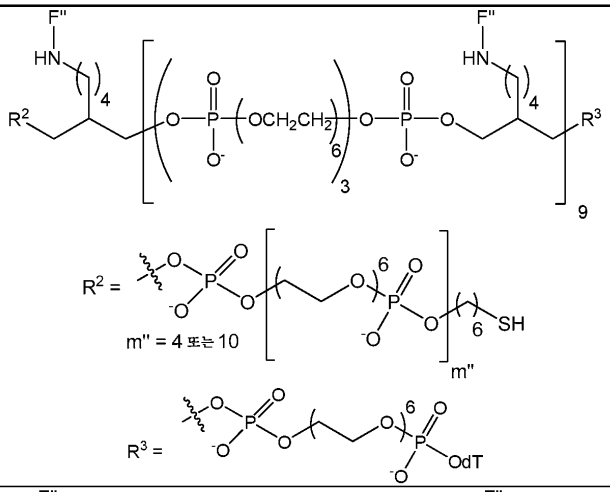
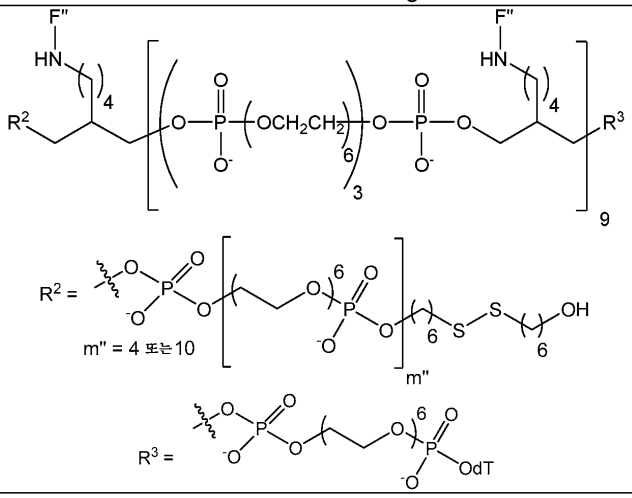
[0328]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-19	TBD	
I-20	TBD	

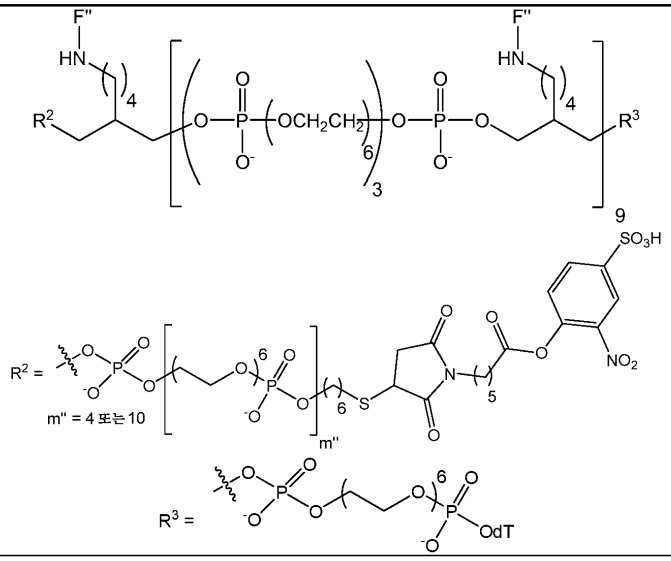
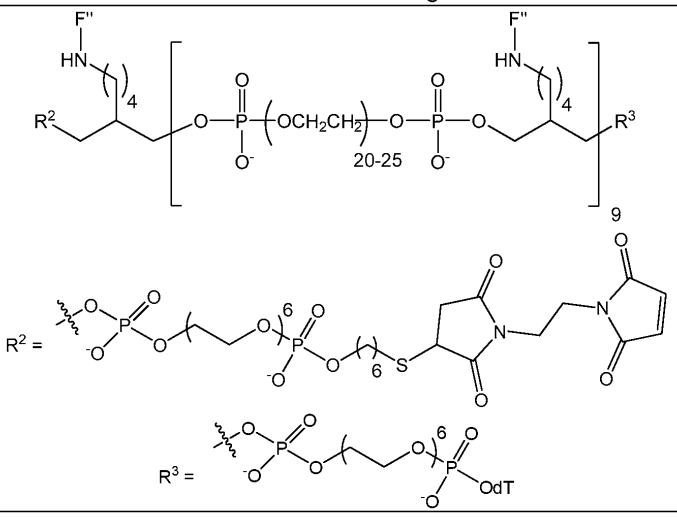
[0329]

[0330]

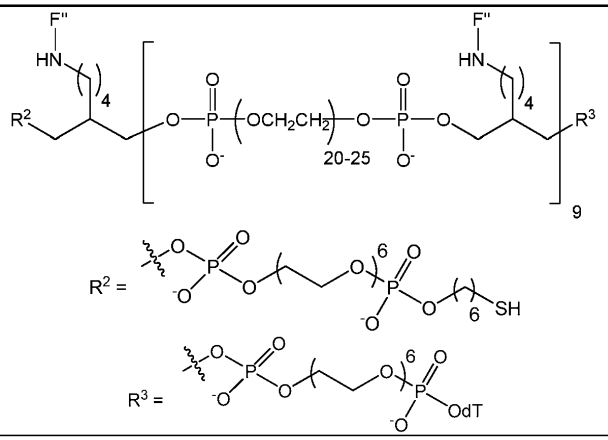
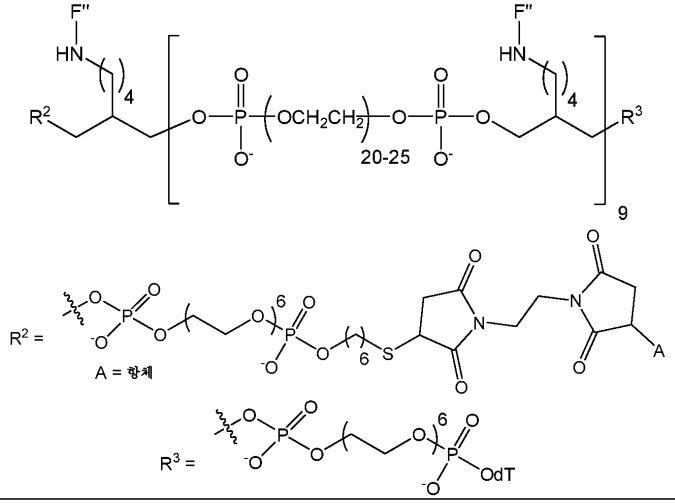
번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-21	TBD	
I-22	TBD	

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-23	TBD	
I-24	TBD	

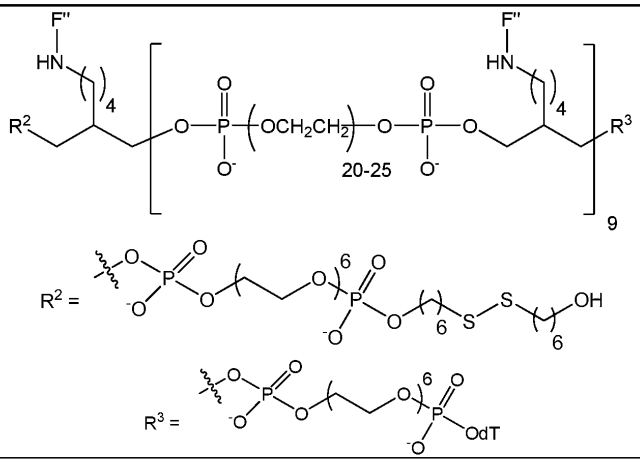
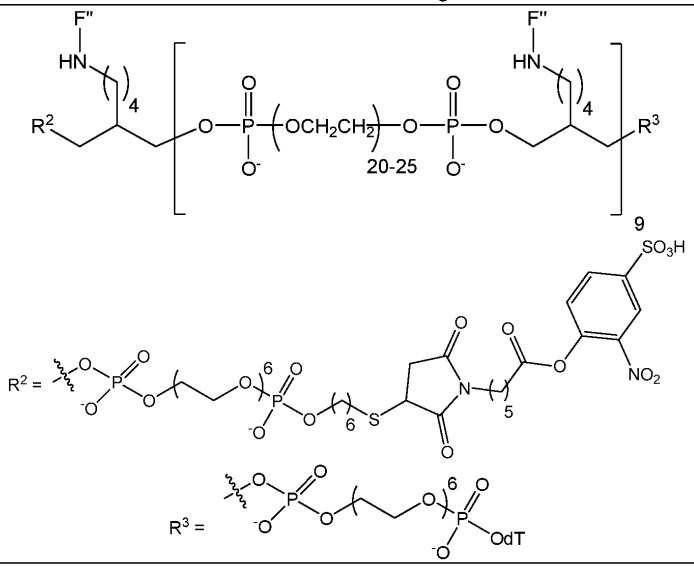
[0331]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-25	TBD	
I-26	TBD	

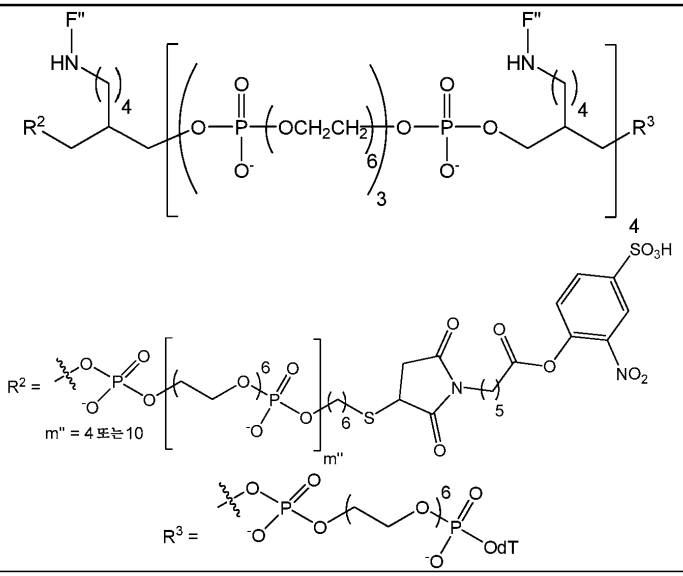
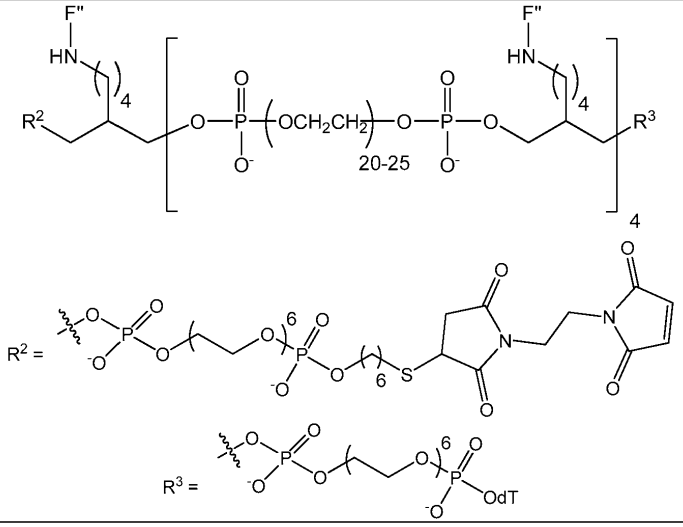
[0332]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-27	TBD	
I-28	TBD	

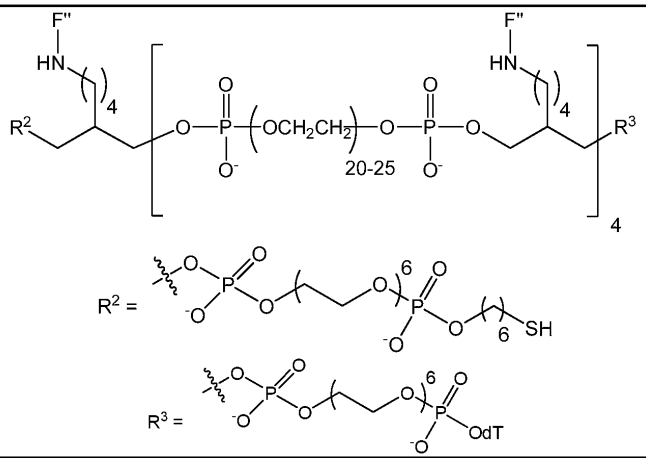
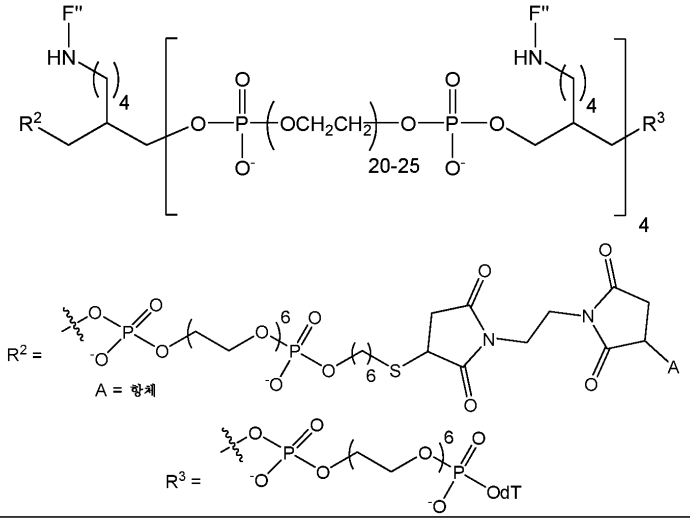
[0333]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-29	TBD	
I-30	TBD	

[0334]

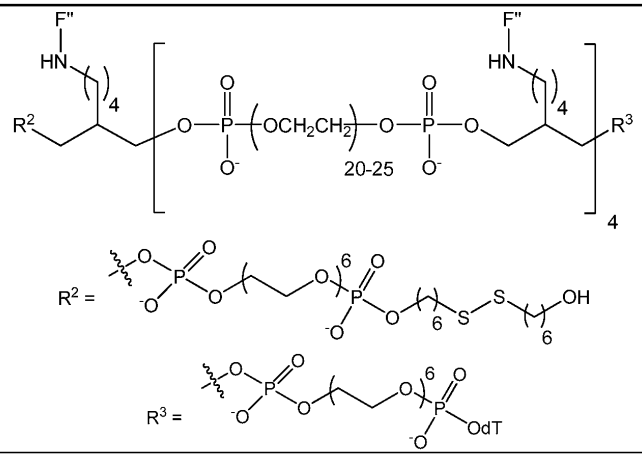
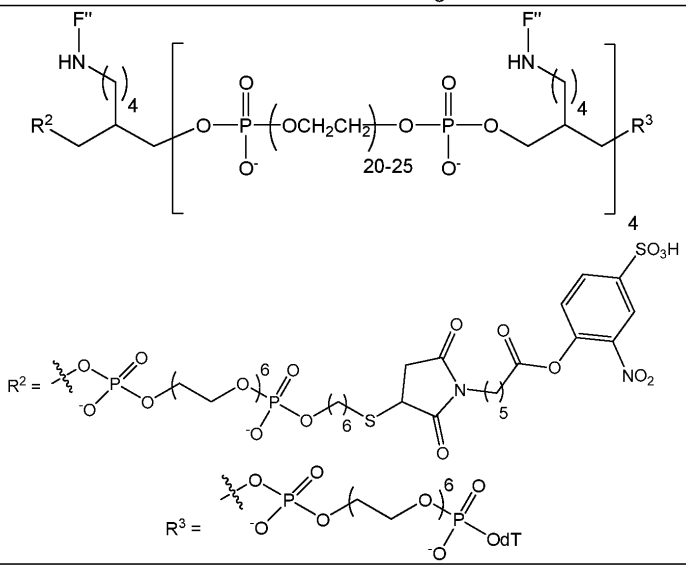
번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-31	TBD	
I-32	7241.2 7238.2	

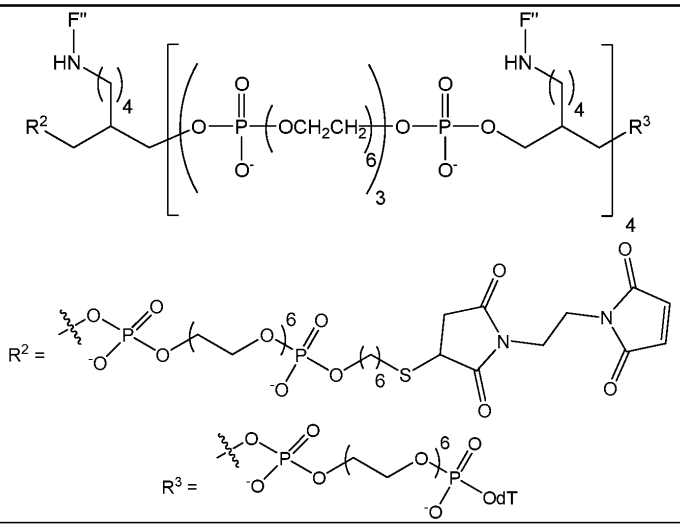
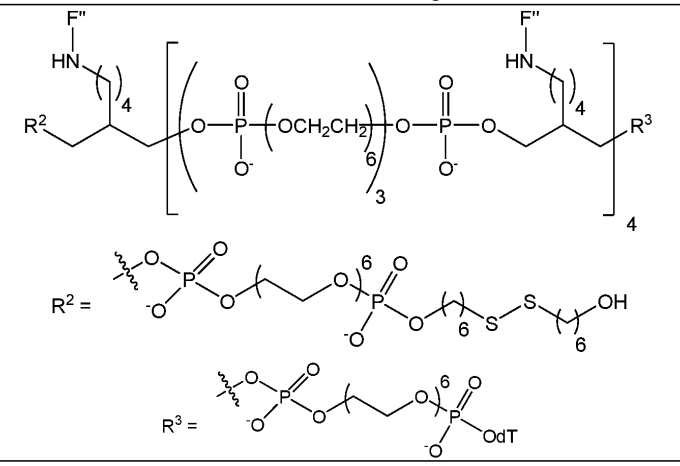
[0335]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-33	TBD	
I-34	TBD	

[0336]

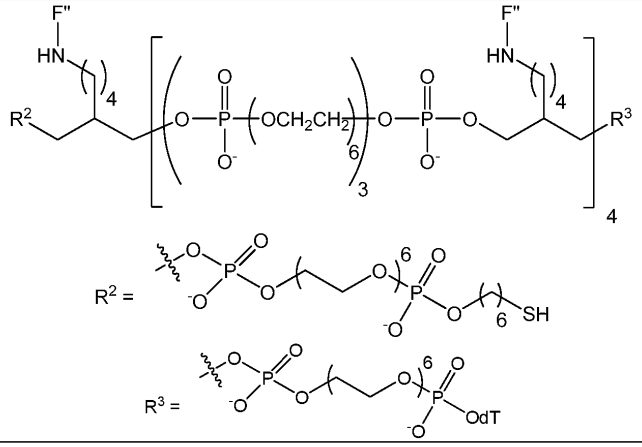
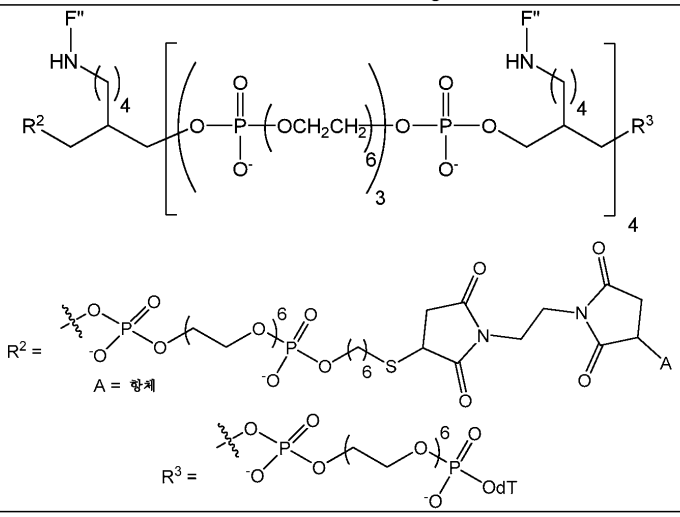
[0337]

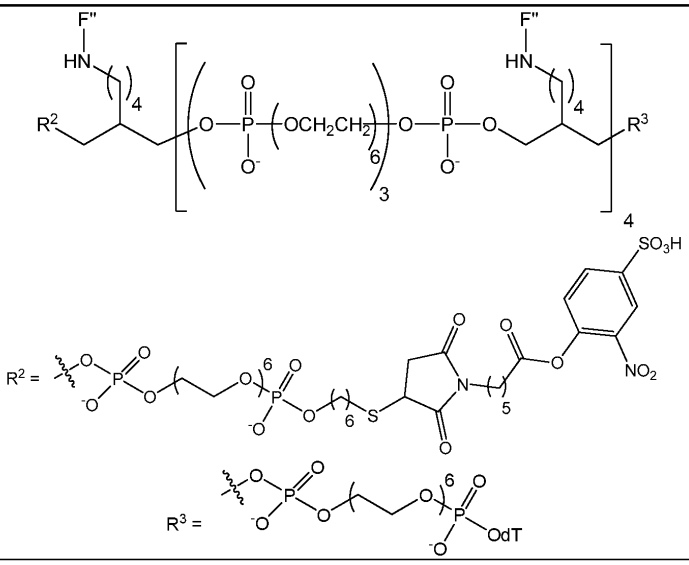
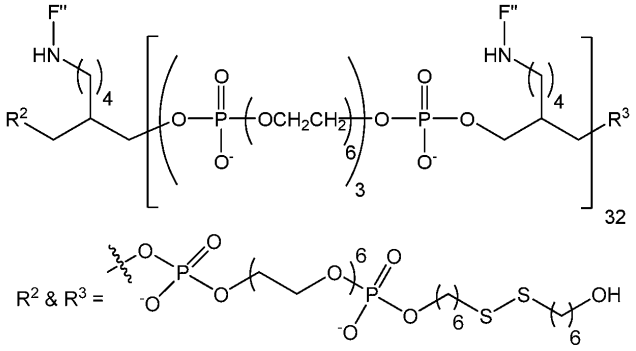
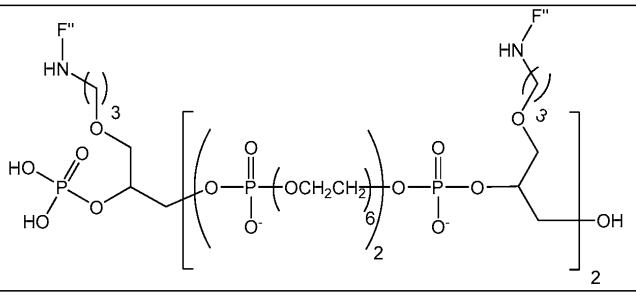
번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-35	TBD	
I-36	TBD	

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-37	6997.1 6997.0	
I-38	TBD	

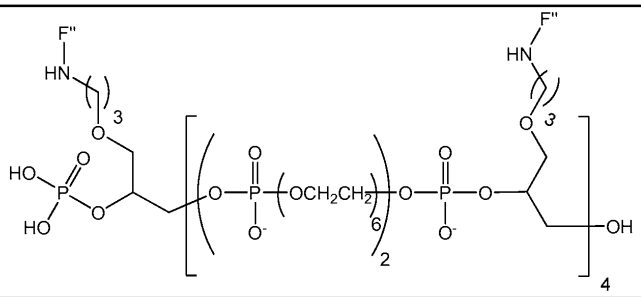
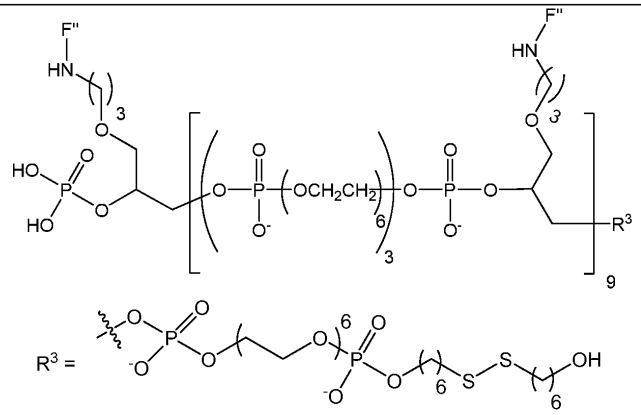
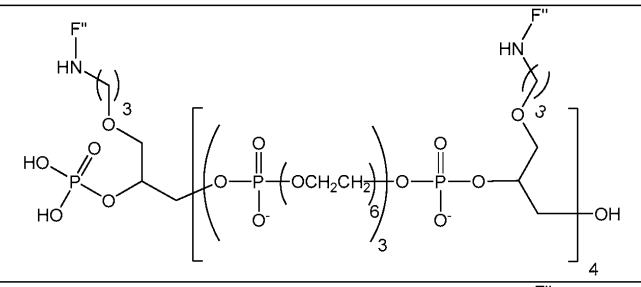
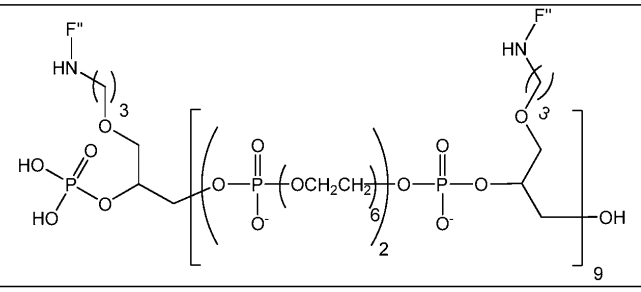
[0338]

[0339]

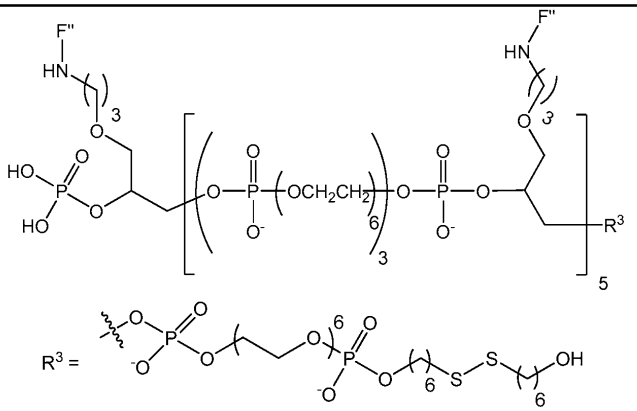
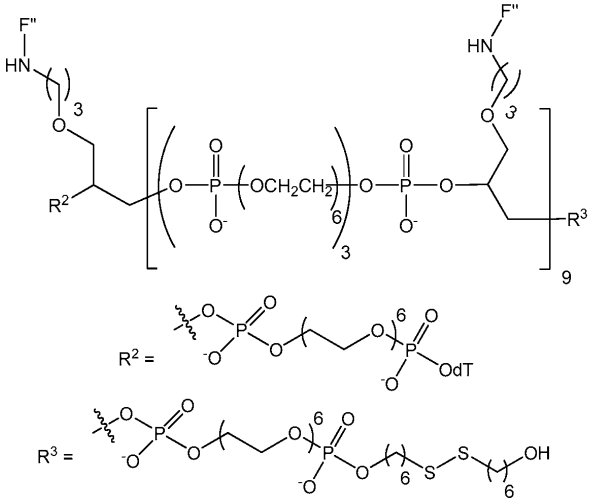
번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-39	TBD	
I-40	TBD	

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-41	TBD	
I-42	TBD	
I-43	3103.9 3103.6	

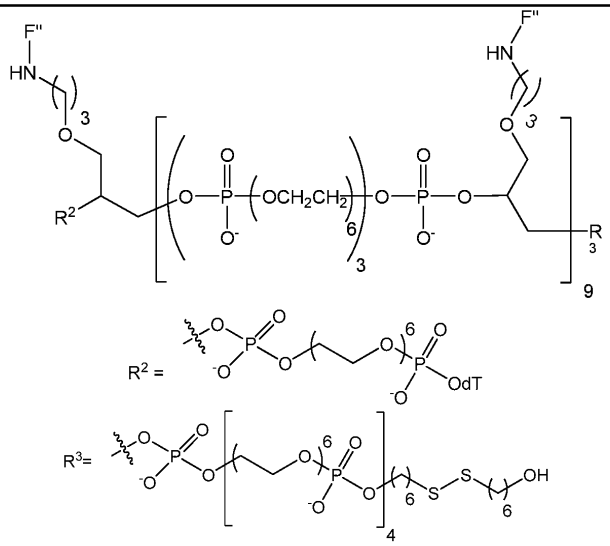
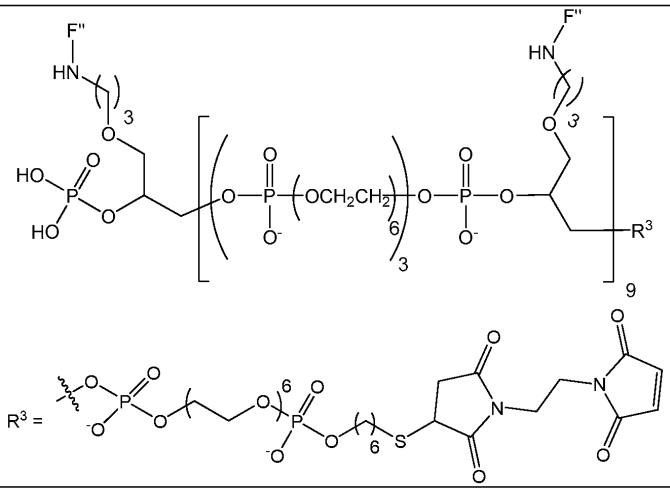
[0340]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-44	5619.5 5619.8	
I-45	15684.6 15681.5	
I-46	6997.1 6997.0	
I-47	11912.1 11910.1	

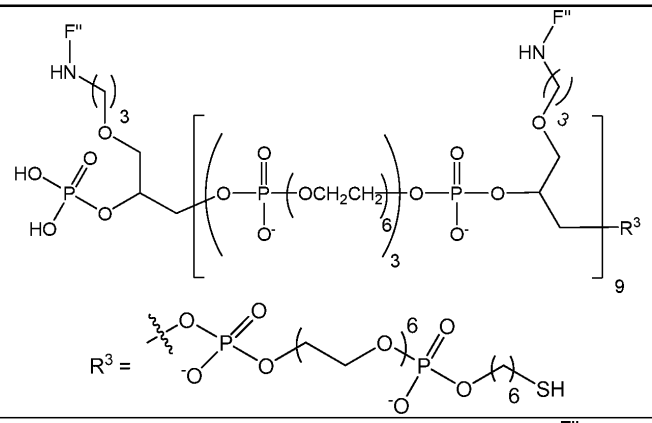
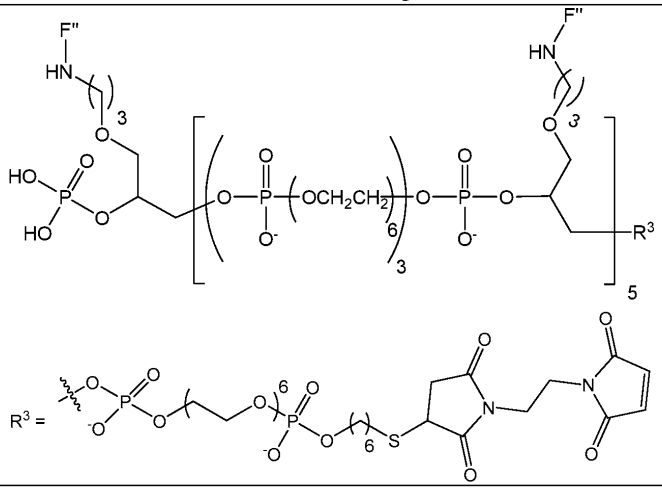
[0341]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-48	9273.9 9272.0	
I-49	16252.9 16250.0	

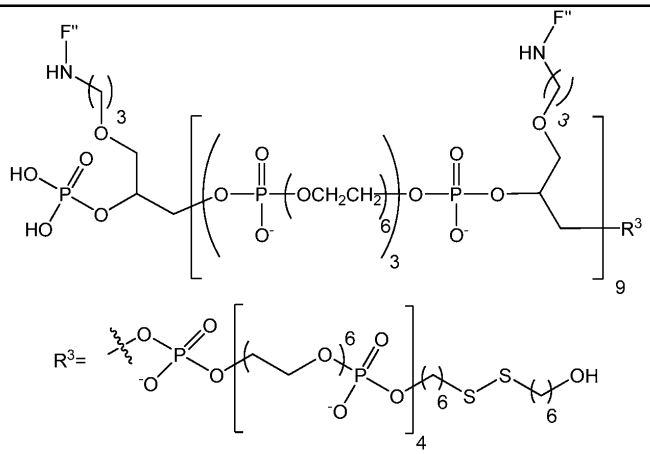
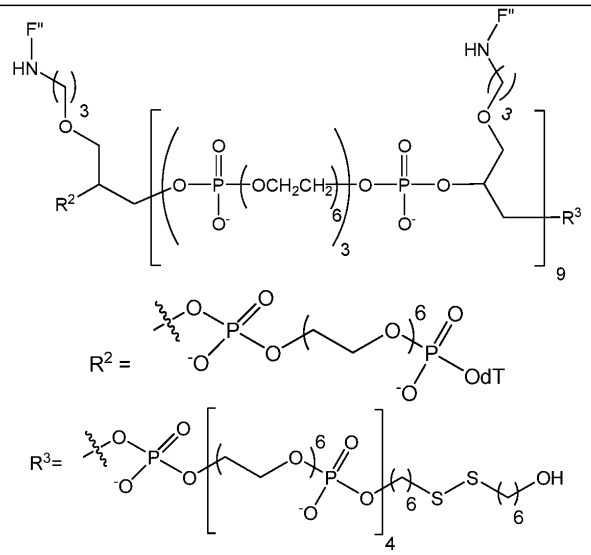
[0342]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-50	17260.3 17260.0	
I-51	TBD	

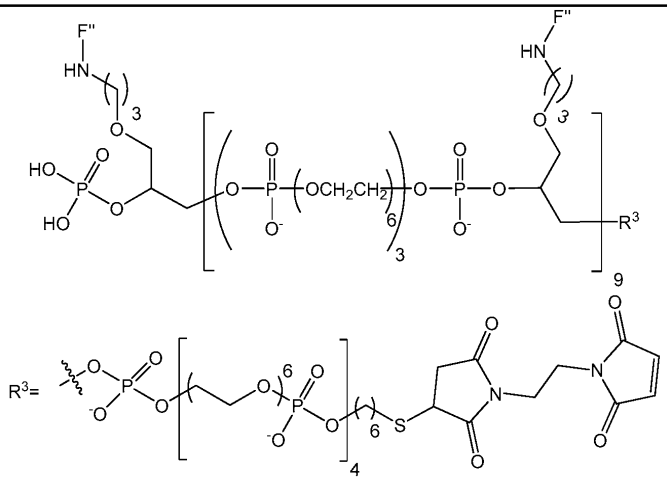
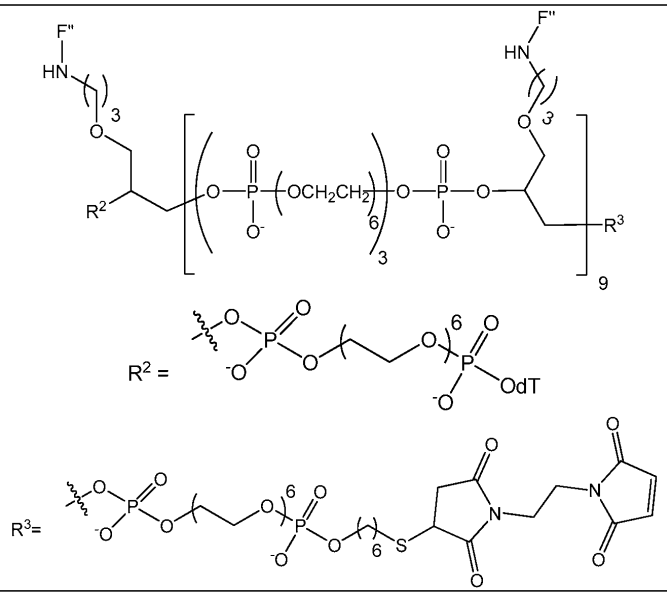
[0343]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-52	TBD	
I-53	TBD	

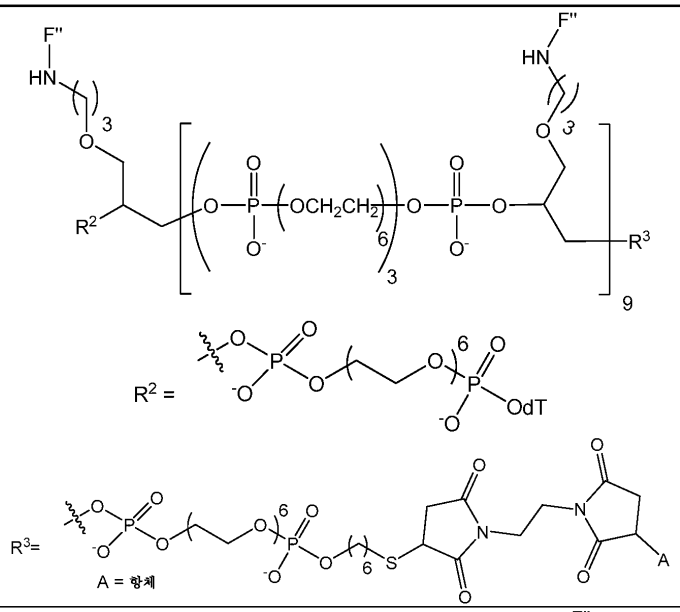
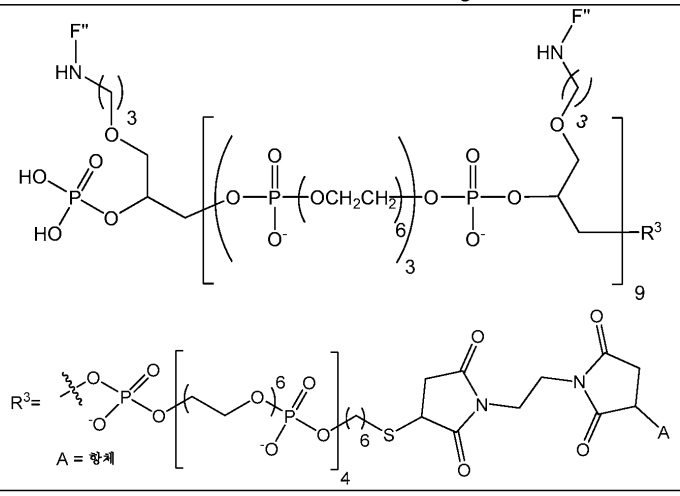
[0344]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-54	TBD	
I-55	TBD	

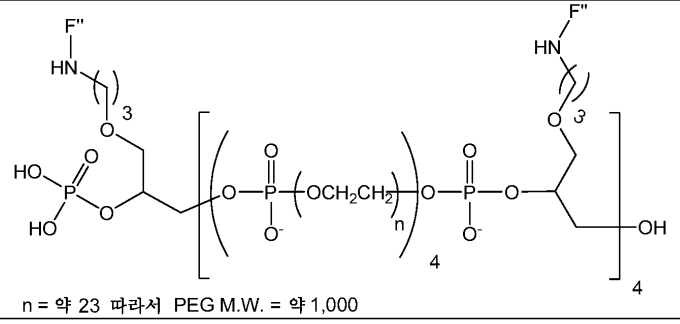
[0345]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-56	TBD	
I-57	TBD	

[0346]

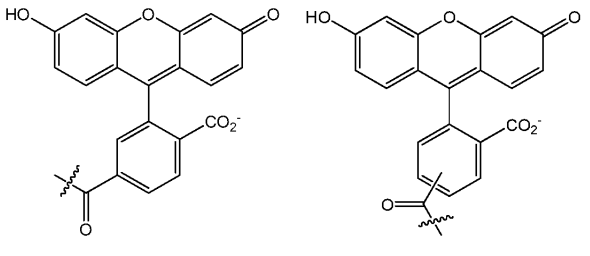
번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-58	TBD	
I-59	TBD	

[0347]

번호	MW. 실측치 계산치	구조
I-60	TBD	

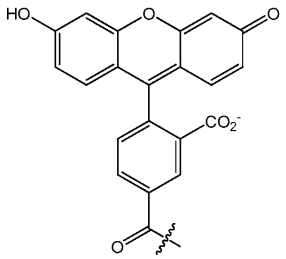
[0348] * TBD = 측정됨

[0349] 표 2에서 및 본원 출원에 걸쳐서 사용된 바와 같이, R^2, R^3, m, n 및 L'는, 달리 나타내지 않는 한, 구조 (I)의 화합물에 제공된 정의를 갖고, F, F' 및 F"는 각각 하기 구조를 갖는 플루오레세인 모이어티를 언급한다:



F

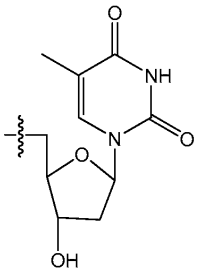
F′



F″

[0350]

[0351] "dT"는 하기 구조를 언급한다:



dT

[0352]

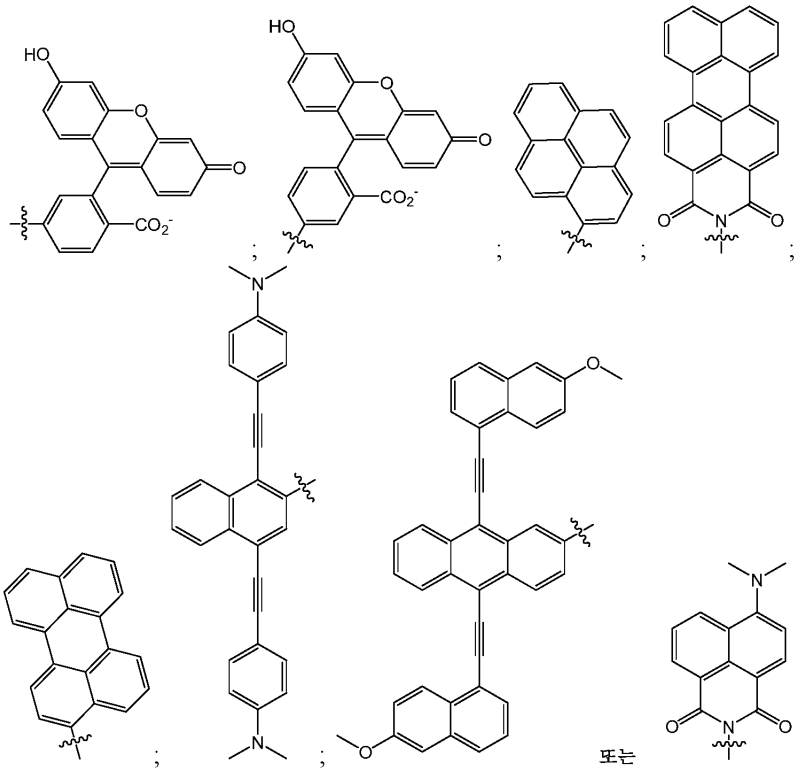
[0353] 일부 실시형태는, 표적화 모이어티, 예를 들면, 항체에 접합된, 표 2에 제공된 특정한 화합물을 포함하는 상기 한 화합물 중 어느 것을 포함한다.

[0354] 본 발명의 개시내용은 일반적으로 이전에 공지된 화합물 및 이를 사용하는 방법에 비해 증가된 형광 방출을 갖는 화합물을 포함하는 조성물을 제공한다. 따라서, 특정 실시형태는 Y 형광 모이어티 M을 포함하는 형광 화합물을 지시하고, 여기서, 형광 화합물은 미리결정된 파장의 자외선으로 여기하는 경우, 동일한 파장의 자외선으로 여기하는 경우 단일 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 85%의 Y 배 더 큰 피크 형광 방출을 갖고, 여기서, Y는 2 이상의 정수이다. 형광 화합물은 광, 예를 들면, 자외선으로 여기하는 경우 형광 신호를 방출하는 화합물을 포함한다.

[0355] 일부 실시형태에서, 형광 화합물은 단일 M 모이어티의 피크 형광 방출보다 적어도 90%의 Y 배, 95%의 Y 배, 97%의 Y 배 또는 99%의 Y 배 더 큰 피크 형광 방출을 갖는다.

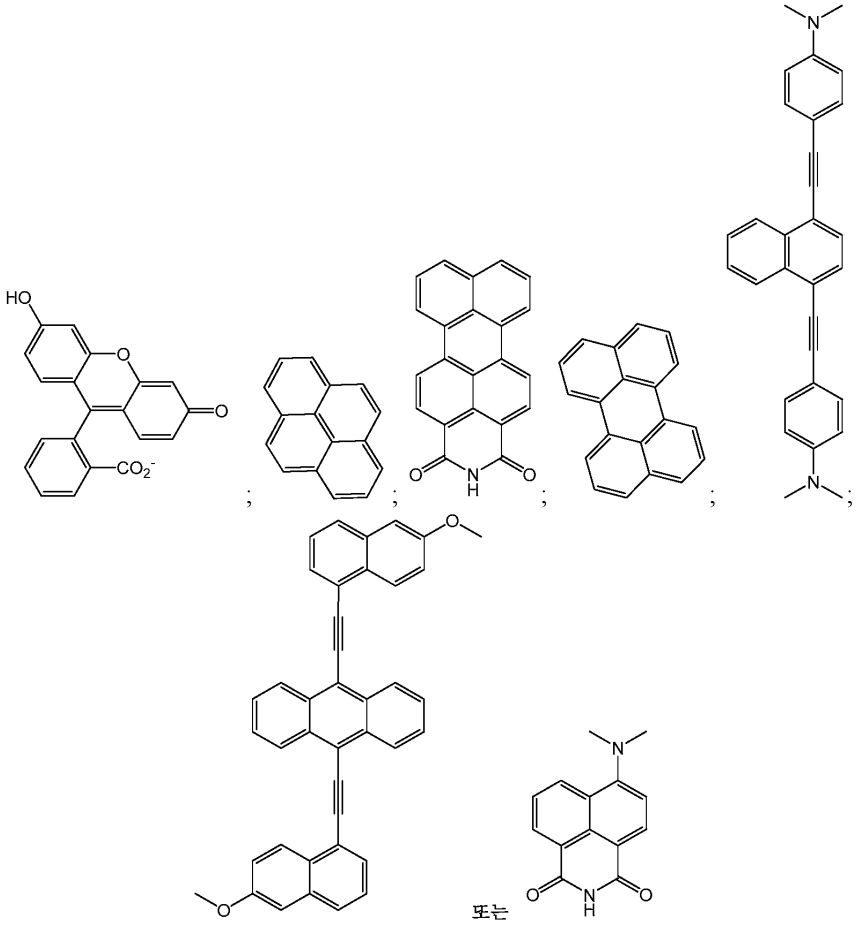
[0356] 일부 실시형태에서,Y는 2 내지 100의 정수, 예를 들면, 2-10이다.

[0357] 일부 실시형태에서, Y M 모이어티는, 독립적으로, 하기 구조 중 하나를 갖는다:



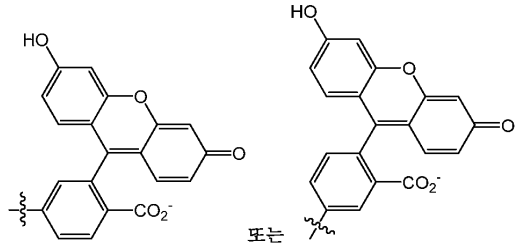
[0358] ; ; ;

[0360] 다른 실시형태에서, 단일 M 모이어티는, 독립적으로, 하기 구조 중 하나를 갖는다:



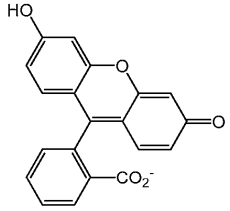
[0361]

[0362] 보다 특정한 실시형태에서, 형광 화합물은 Y M 모이어티를 포함하고, 이는 독립적으로 하기 구조 중 하나를 갖는다:



[0363]

[0364] 여기서, 〰 는 형광 화합물에 대한 부착점을 나타내고, 단일 M 모이어티는 하기 구조를 갖는다:



[0365]

[0366] 다른 실시형태에서, 피크 형광 방출은 약 500 내지 약 550 nm 범위의 파장에서 존재한다.

[0367] 또한 추가의 실시형태에서, 형광 화합물은 적어도 하나의 에틸렌 옥사이드 모이어티를 포함한다.

[0368] 청구항 중 어느 하나의 형광 화합물 및 분석물을 포함하는 조성물을 또한 제공한다.

[0369] 본원에 개시된 화합물은 "조정할 수 있고(tunable)", 이는 상기한 화합물 중 어느 것의 변수를 적합하게 선택함

에 의해, 당해 기술 분야의 숙련가는 목적하는 및/또는 미리결정된 몰 형광(molar fluorescence) (몰 명도(molar brightness))를 갖는 화합물에 도달할 수 있다. 화합물의 조정성(tunability)은 사용자가 특정 검정에 사용하기 위한 또는 관심 대상 특정 분석물을 확인하기 위한 목적하는 형광 및/또는 착색을 갖는 화합물에 도달하기 용이하게 한다. 모든 변수가 화합물의 몰 형광에 영향을 줄 수 있지만, M, L^4, m 및 n의 적합한 선택은 화합물의 몰 형광에서 중요한 역할을 하는 것으로 고려된다. 따라서, 하나의 실시형태에서 목적하는 몰 형광을 갖는 화합물을 수득하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 공지된 형광을 갖는 M 모이어티를 선택하고, M 모이어티를 포함하는 구조 (I)의 화합물을 제조하고, L^4, m 및 n에 대한 적합한 변수를 선택하여 목적하는 몰 형광에 도달함을 포함한다.

[0370] 특정 실시형태에서 몰 형광은 모 형광단 (예를 들면, 단량체)의 형광 방출에 비해 증가 또는 감소 배수의 관점에서 표현될 수 있다. 동일한 실시형태에서 본 발명의 화합물의 몰 형광은 모 형광단에 비해 1.1x, 1.5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x 10x 또는 심지어 더 높다. 다양한 실시형태는 L^4, m 및 n을 적합하게 선택하여 모 형광단에 비해 목적하는 배수의 형광 증가를 갖는 화합물을 제조함을 포함한다.

[0371] 용이하게 예시하기 위해, 인 모이어티(예를 들면, 포스페이트 등)를 포함하는 다양한 화합물은 음이온성 상태(예를 들면, $OPO(OH)O^-$, $-OPO_3^{2-}$)로 도시된다. 당해 기술 분야의 숙련가는 전하가 pH에 좌우되고, 하전되지 않은(예를 들면, 양성화자 또는 염, 예를 들면, 나트륨 또는 다른 양이온) 형태가 또한 본 발명의 범위에 포함된다는 것을 용이하게 이해할 것이다

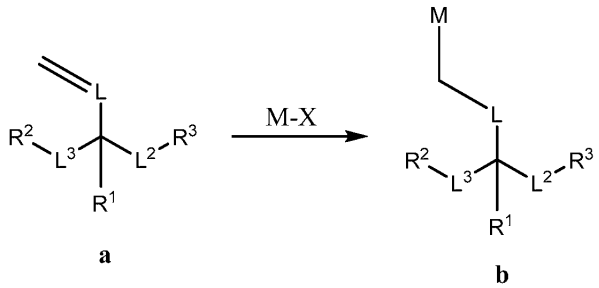
[0372] 본원 설명에서, 도시된 화학식의 치환체 및/또는 변수의 조합은, 이러한 기여가 안정한 화합물을 야기하는 경우에만 허용가능하다는 것이 이해된다.

[0373] 본원에 기재된 방법에서 중간체 화합물의 관능 그룹은 적합한 보호 그룹으로 보호될 필요가 있다는 것을 당해 기술분야의 숙련가가 또한 인지할 것이다. 이러한 관능 그룹은 하이드록시, 아미노, 머캅토 및 카복실산을 포함한다. 하이드록시를 위한 적합한 보호 그룹은 트리알킬실릴 또는 디아릴알킬실릴 (예를 들면, t-부틸디메틸실릴, t-부틸디페닐실릴 또는 트리메틸실릴), 테트라하이드로피라닐, 벤질 등을 포함한다. 아미노, 아미디노 및 구아니디노를 위한 적합한 보호 그룹은 t-부톡시카보닐, 벤질옥시카보닐 등을 포함한다. 머캅토를 위한 적합한 보호 그룹은 -C(O)-R" (여기서, R"는 알킬, 아릴 또는 아릴알킬이다), p-메톡시벤질, 트리틸 등을 포함한다. 카복실산을 위한 적합한 보호 그룹은 알킬, 아릴 또는 아릴알킬 에스테르를 포함한다. 보호 그룹을 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되고 본원에 기재된 표준 기술에 따라서 첨가 또는 제거할 수 있다. 보호 그룹의 사용은 문헌에 상세하게 기재되어 있다 [참조: Green, T.W. and P.G.M. Wutz, Protective Groups in Organic Synthesis (1999), 3rd Ed., Wiley]. 당해 기술 분야의 숙련가가 인지할 수 있는 바와 같이, 보호 그룹은 또한 중합체 수지, 예를 들면, Wang 수지, Rink 수지 또는 2-클로로트리틸-클로라이드 수지일 수 있다.

[0374] 추가로, 유리 염기 또는 산 형태로 존재하는 본 발명의 모든 화합물을 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법으로 적합한 무기 또는 유기 염기 또는 산으로 처리하여 이들의 염으로 전환될 수 있다. 본 발명의 화합물의 염을 표준 기술에 의해 이들의 유리 염기 또는 산 형태로 전환할 수 있다.

[0375] 하기 반응식은 본 발명의 화합물을 제조하는 예시적인 방법을 나타낸다. 당해 기술분야의 숙련가가 이들 화합물을 유사한 방법으로 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 다른 방법과 조합하여 제조할 수 있다는 것이 이해된다. 당해 기술분야의 숙련가가 하기 구체적으로 나타내지 않는 다른 구조 (I)의 화합물을 적합한 출발 성분을 사용하고 필요한 합성 파라미터를 변형시켜 하기한 것과 유사한 방식으로 제조할 수 있다는 것이 또한 이해된다. 일반적으로, 출발 성분을 Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI, 및 Fluorochem USA 등과 같은 공급원으로부터 입수할 수 있거나, 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 공급원에 따라서 합성할 수 있거나 (참조: 예를 들면, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition (Wiley, December 2000)) 본 발명에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다.

[0376] 반응식 I

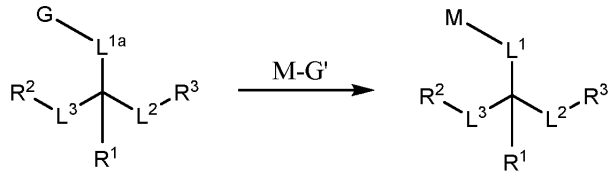


a b

[0377]

[0378] 반응식 I은 구조 (I)의 화합물 (여기서, R^1, L^2, L^3 및 M은 상기 정의된 바와 같고, R^2 및 R^3은 상기 정의된 바와 같거나 이의 보호된 변형물이고, L은 임의의 링커이다)의 제조에 유용한 중간체의 예시적인 제조 방법을 나타낸다. 반응식 1을 참조하여, 상기 구조의 화합물은 구입하거나 당해 기술분야의 숙련가에게 잘 공지된 방법으로 제조할 수 있다. M-X (여기서, x는 할로겐, 예를 들면, 브로모이다)와의, 당해 기술분야에 공지된 스즈키 커플링 조건하에 반응은 구조 b의 화합물을 야기한다. 구조 b의 화합물은 하기한 구조 (I)의 화합물의 제조에 사용될 수 있다.

[0379] 반응식 II



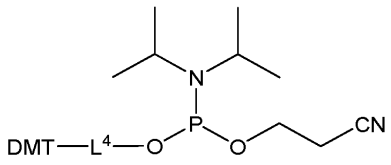
c d

[0380]

[0381] 반응식 II는 구조 (I)의 화합물의 제조에 유용한 중간체를 제조하기 위한 대안적인 방법을 나타낸다. 반응식 II를 참조하여 (여기서, R^1, L^1, L^2, L^3, G 및 M은 상기 정의된 바와 같고, R^2 및 R^3은 상기 정의된 바와 같거나, 이의 보호된 변형물이다), 구입하거나 잘 공지된 기술에 의해 제조할 수 있는 구조 c의 화합물을, M-G'와 반응시켜 구조 d의 화합물을 수득한다. 여기서, G 및 G'는 상보적 반응성을 갖는 관능 그룹을 나타낸다 (즉, 공유 결합을 형성하기 위해 반응하는 관능 그룹). G'는 M 또는 M의 구조적 골격의 부분에 대한 펜던트(pendant)일 수 있다. G 및 G'는 임의의 수의 본원에 기재된 관능 그룹, 예를 들면, 각각 알킨 및 아지드, 각각 아민 및 활성화 에스테르, 또는 각각 아민 및 이소티오시아네이트 등일 수 있다.

[0382] 구조 (I)의 화합물은 하기 구조 (e)를 갖는 포스포르아미다이트 화합물과 잘 공지된 자동화된 DNA 합성 조건하에 반응시켜 구조 b 또는 d 중 하나로부터 제조할 수 있다:

[0383] 화학식 (e)



[0384]

[0385] 상기 화학식 (e)에서,

[0386] A는 본원에 정의된 바와 같고, 각각의 L은 독립적으로 임의의 링커이다.

[0387] DNA 합성 방법은 당해 기술분야에 잘 공지되어 있다. 간략하게, 2개의 알콜 그룹, 예를 들면, 상기 중간체 b 또는 d에서 R^2 및 R^3은, 각각 디메톡시트리틸 (DMT) 그룹 및 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노 포스포르아미다이트 그룹으로 관능화된다. 포스포르아미다이트 그룹을, 전형적으로 활성화제, 예를 들면, 테트라졸의 존재하에, 알콜 그룹에 커플링하고, 이어서, 인 원자를 요오드로 산화시킨다. 디메톡시트리틸 그룹을 산 (예를 들면, 클로로아세트산)으로 제거하여 유리 알콜을 노출시킬 수 있고, 이를 포스포르아미다이트 그룹과 반응시킬

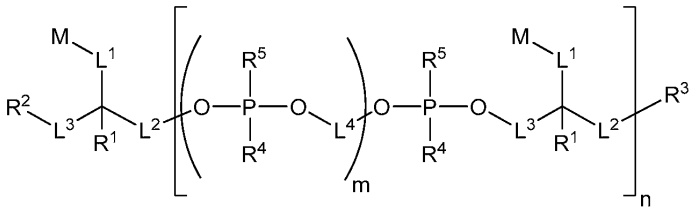
수 있다. 2-시아노에틸 그룹은 수성 암모니아로 처리하여 올리고머화 후 제거될 수 있다.

[0388] 올리고머화 방법에서 사용되는 포스포르아미다이트의 제조는 또한 당해 기술분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 1급 알콜 (예를 들면, R^3)을 DMT-Cl와 반응시켜 DMT 그룹으로서 보호할 수 있다. 이어서, 2급 알콜 (예를 들면, R^2)을 적합한 시약, 예를 들면, 2-시아노에틸 N,N-디이소프로필클로로포스포르아미다이트와 반응시켜 포스포르아미다이트로서 관능화시킨다. 포스포르아미다이트의 제조 방법 및 이들의 올리고머화는 당해 기술분야에 잘 공지되어 있고, 실시예에 상세하게 기재되어 있다.

[0389] 구조 (I)의 화합물을 상기한 잘 공지된 포스포르아미다이트 화학에 따라서 중간체 b 또는 d 및 e를 올리고머화하여 제조한다. 목적하는 수의 m 및 n 반복 단위를 포스포르아미다이트 커플링을 목적하는 횟수로 반복하여 분자 내에 도입한다.

[0390] 일부 다른 실시형태에서, 화합물은 하기 구조 (II) 또는 이의 입체이성체, 호변체 또는 염을 갖는다:

[0391] 화학식 (II)

[0392] 

[0393] 상기 화학식 (II)에서,

[0394] M은, 각 발생에서, 독립적으로 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 하나의 접합도를 포함하는 모이어티이고;

[0395] L^1, L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌 또는 헤테로원자 링커이고;

[0396] L^4는, 각 발생에서, 독립적으로 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고;

[0397] R^1은, 각 발생에서, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0398] R^2 및 R^3은 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 링커 또는 추가 구조 (II)의 화합물에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, 여기서: R_a는 O 또는 S이고; R_b는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고; R_c는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d, SR_d, 알킬, 알콕시, 알킬에테르 , 알콕시알킬에테르, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

[0399] R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

[0400] R^5는, 각 발생에서, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

[0401] Q는, 각 발생에서, 독립적으로 분석물 분자, 고체 지지체 또는 상보적 반응성 그룹 Q'와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹을 포함하는 모이어티이고;

[0402] R^d는 양이온이고;

[0403] m은, 각 발생에서, 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단, 적어도 하나의 발생의 m은 3 이상의 정수이고;

[0404] n은 1 이상의 정수이다.

[0405] 일부 실시형태에서, m은, 각 발생에서, 독립적으로 3 이상의 정수이다.

[0406] 일부 실시형태에서, L^1, L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커이다.

[0407] 구조 (II)의 화합물의 일부 다른 실시형태에서:

[0408] M은, 각 발생에서, 독립적으로 2개 이상의 탄소-탄소 이중 결합 및 적어도 하나의 접합도를 포함하는 모이어티이고;

[0409] L^1, L^2 및 L^3은, 각 발생에서, 독립적으로 임의의 알킬렌 또는 헤테로알킬렌 링커이고;

[0410] L^4는, 각 발생에서, 독립적으로 20개 이하의 원자 길이의 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌 또는 헤테로알키닐렌 링커이고;

[0411] R^1은, 각 발생에서, 독립적으로 H, 알킬 또는 알콕시이고;

[0412] R^2 및 R^3은 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_a는 O 또는 S이고; R_b는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고; R_c는 OH, SH, O^-, S^-, OR_d, SR_d, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고;

[0413] R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, SH, O^-, S^-, OR_d 또는 SR_d이고;

[0414] R^5는, 각 발생에서, 독립적으로 옥소, 티옥소이거나 부재하고;

[0415] Q는 분석물 분자 또는 고체 지지체와 결합할 수 있는 모이어티고;

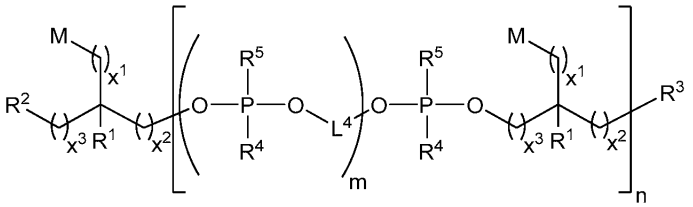
[0416] R_d는 양이온이고;

[0417] m은, 각 발생에서, 독립적으로 0 이상의 정수이고, 단, 적어도 하나의 발생의 m은 3 이상의 정수이고;

[0418] n은 1 이상의 정수이다.

[0419] 일부 실시형태에서, 화합물은 하기 구조 (IIA)를 갖는다:

[0420] 화학식 (IIA)

[0421] 

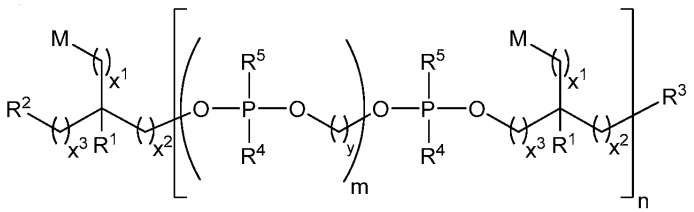
[0422] 상기 화학식 (IIA)에서,

[0423] x^1, x^2 및 x^3은, 각 발생에서, 독립적으로 0 내지 6의 정수이다.

[0424] L^4 링커를, 다른 변수와 함께, 선택하여, 목적하는 형광 및/또는 착색을 제공할 수 있다 (형광 및/또는 착색을 "조정함"). 일부 실시형태에서, L^4는 20개 이하 원자 길이, 13개 이하 원자 길이, 예를 들면, 10개 이하 원자 길이 또는 6개 이하 원자 길이의 링커이다. 특정 실시형태에서, L^4는 디설파이드 결합을 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, L^4는, 각 발생에서, 독립적으로 C_1-C_6 알킬렌 또는 C_2-C_6 알키닐렌이다. 일부 실시형태에서, L^4는 2개의-탄소 링커이다.

[0425] 일부 다른 상이한 실시형태에서, 화합물은 하기 구조 (IIB)를 갖는다:

[0426] 화학식 (IIB)



[0427]

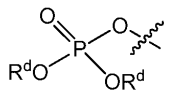
[0428] 상기 화학식 (IIB)에서:

[0429] x^1, x^2 및 x^3은, 각 발생에서, 독립적으로 0 내지 6의 정수이고;

[0430] y는, 각 발생에서, 독립적으로 1 내지 6이다.

[0431] 상기한 특정 실시형태에서, y는 2이다. 다른 실시형태에서, x^1, x^2 및 x^3은 각 발생에서 각각 1이다. 일부 상이한 실시형태에서, x^2는 0이고, x^3은 각 발생에서 1이다.

[0432] 또한 다른 실시형태에서, R^4는, 각 발생에서, 독립적으로 OH, O^- 또는 OR_d이다. "OR_d" 및 "SR_d"이 양이온와 회합된 O^- 또는 S^-를 언급하도록 의도되는 것이 이해된다. 예를 들면, 포스페이트 그룹의 이나트륨 염을 다음과 같이 나타낼 수 있다:



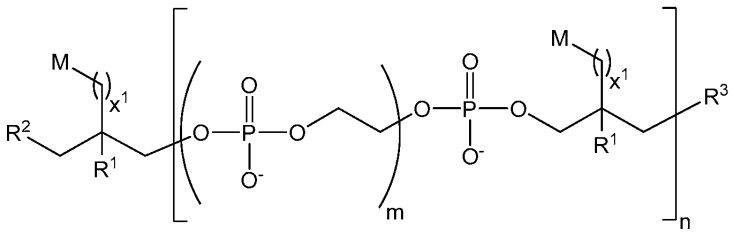
[0433]

[0434] 여기서, R_d는 나트륨 (Na^+)이다.

[0435] 추가의 상기한 실시형태에서, R^5는, 각 발생에서, 옥소이다.

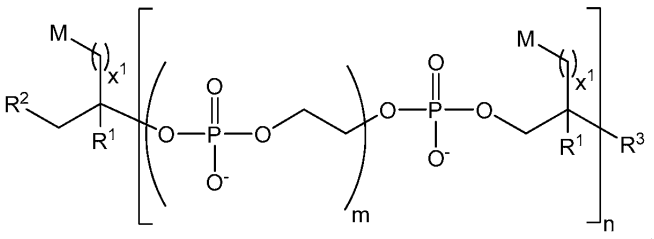
[0436] 일부 다른 실시형태에서, 화합물은 하기 구조 (IIB') 또는 (IIB") 중 하나를 갖는다:

[0437] 화학식 (IIB')



[0438]

[0439] 화학식 (IIB")



[0440]

[0441] 상기한 임의의 실시형태에서, R^1은 H이다.

[0442] 다른 실시형태에서, R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서

R^2 및 R^3은 각각 독립적으로 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, 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 카운터 이온이다.

[0443] 또한 다른 상이한 실시형태에서, R^2 또는 R^3 중 하나는 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, R^2 또는 R^3 중 나머지 하나는 Q 또는 Q에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 R^2 또는 R^3 중 하나는 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, R^2 또는 R^3 중 나머지 하나는 Q 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 카운터 이온이다.

[0444] 또한 다른 실시형태에서, Q는 분석물 분자 또는 고체 지지체와 결합할 수 있는 모이어티이거나 이를 포함한다. 특정 실시형태에서, Q는 구조 (II)의 화합물을 분석물 분자 또는 고체 지지체에 (예를 들면, 공유 결합에 의해) 연결하는 수단을 제공한다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 Q는 분석물 분자 또는 고체 지지체와 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 그룹이거나 이를 포함한다. 이와 관련하여, Q 그룹의 유형 및 Q 그룹의 구조 (II)의 화합물의 나머지로의 연결은 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, Q는, 수성 조건하에 가수분해에 민감하지 않지만, 분석물 분자 또는 고체 지지체 (예를 들면, 아민) 상 상응하는 그룹과 결합을 형성하기 위해 충분한 반응성인 모이어티이다.

[0445] 구조 (II)의 화합물의 특정 실시형태는 생체접합 분야에 통상 사용되는 Q 그룹을 포함한다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, Q는 친핵성 반응성 그룹, 친전자성 반응성 그룹 또는 첨가환화 반응성 그룹이거나 이를 포함한다. 일부 보다 특정한 실시형태에서, Q는 설프하이드릴, 디설파이드, 활성화 에스테르, 이소티오시아네이트, 아지드, 알킨, 알켄, 디엔, 친디엔체, 산 할라이드, 설포닐 할라이드, 포스핀, α-할로아미드, 비오틴, 아미노 또는 말레이미드이거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 에스테르는 N-석신이미드 에스테르, 이미도 에스테르 또는 폴리플루오로페닐 에스테르이다. 다른 실시형태에서, 알킨은 알킬 아지드 또는 아실 아지드이다. 예시적인 Q 모이어티는 상기 표 1에 제공된다.

[0446] Q가 SH인 일부 실시형태에서, SH 모이어티는 또다른 구조 (II)의 화합물 상 또다른 설프하이드릴 그룹과 디설파이드 결합을 형성하는 경향이 있을 것임을 주의하여야 한다. 따라서, 일부 실시형태는 디설파이드 이량체 형태의 구조 (II)의 화합물을 포함하고, 디설파이드 결합은 SH Q 그룹으로부터 유도된다.

[0447] 일부 다른 실시형태에서, R^2 또는 R^3 중 하나는 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, R^2 또는 R^3 중 나머지 하나는 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이다. 일부 상이한 실시형태에서, R^2 또는 R^3 중 하나는 OH 또는 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$이고, R^2 또는 R^3 중 나머지 하나는 분석물 분자에 대한 공유 결합을 포함하는 링커 또는 고체 지지체에 대한 공유 결합을 포함하는 링커이고, 여기서, R_a는 O이고, R_b는 OH, O^- 또는 OR^d; R_c는 OH, O^-, OR^d, 포스페이트, 티오포스페이트, 포스포알킬, 티오포스포알킬, 포스포알킬에테르 또는 티오포스포알킬에테르이고; R^d는 카운터 이온이다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 분석물 분자는 핵산, 아미노산 또는 이의 중합체이다. 다른 실시형태에서, 분석물 분자는 효소, 수용체, 수용체 리간드, 항체, 당단백질, 압타머 또는 프리온이다. 또한 상이한 실시형태에서, 고체 지지체는 중합체성 비드 또는 비-중합체성 비드이다.

[0448] 수치 형태는 목적하는 형광 및/또는 색상 강도를 기초로 하여 선택될 수 있는 또다른 변수이다. 일부 실시형태에서, m은, 각 발생에서, 독립적으로 3 내지 10의 정수이다. 다른 실시형태에서, m은, 각 발생에서, 독립적으로 7 내지 9이다.

[0449] 형광 강도는 또한 상이한 값의 n을 선택하여 조정될 수 있다. 특정 실시형태에서, n은 1 내지 100의 정수이다. 다른 실시형태에서, n은 1 내지 10의 정수이다.

[0450] M은 목적하는 광학 성질을 기초로 하여, 예를 들면, 목적하는 착색 및/또는 형광 방출 파장을 기초로 하여 선택된다. 일부 실시형태에서, M은 각 발생에서 동일하고; 그러나, 각 발생의 M은 동일한 M일 필요는 없고, 특정 실

시형태는 M이 각 발생에서 동일하지 않는 화합물을 포함한다는 것을 주의하는 것이 중요하다. M은 M 상의 임의의 위치 (즉, 원자)로부터 분자의 나머지에 부착될 수 있다. 당해 기술 분야의 숙련가는 분자의 나머지에 M을 부착하기 위한 수단을 인지할 것이다.

[0451] 일부 실시형태에서, M은 형광 또는 착색 모이어티이다. 당해 기술분야에 공지되고 전형적으로 비색, UV, 및/또는 형광 검정에 사용되는 임의의 형광 및/또는 착색 모이어티가 사용될 수 있다. 본 발명의 다양한 실시형태에서 사용되는 M 모이어티의 예는 다음을 포함한다: 잔텐 유도체 (예를 들면, 플루오레세인, 로다민, 오리건 그린, 에오신 또는 텍사스 레드; 시아닌 유도체 (예를 들면, 시아닌, 인도카보시아닌, 옥사카보시아닌, 티아카보시아닌 또는 메로시아닌); 스쿠아레인 유도체 및 환-치환된 스쿠아레인, Seta, SeTau, 및 Square 염료를 포함함; 나프탈렌 유도체 (예를 들면, 단실 및 프로단 유도체); 쿠마린 유도체; 옥사디아졸 유도체 (예를 들면, 피리딜옥사졸, 니트로벤즈옥사디아졸 또는 벤즈옥사디아졸); 안트라센 유도체 (예를 들면, 안트라퀴논, DRAQ5, DRAQ7 및 CyTRAK 오렌지를 포함함; 피렌 유도체, 예를 들면, 캐스케이드 블루; 옥사진 유도체 (예를 들면, 나일 레드, 나일 블루, 크레실 바이올렛, 옥사진 170); 아크리딘 유도체 (예를 들면, 프로플라빈, 아크리딘 오렌지, 아크리딘 옐로우); 아릴메틴 유도체: 아우라민, 크리스탈 바이올렛, 말라카이트 그린; 및 테트라피롤 유도체 (예를 들면, 포르핀, 프탈로시아닌 또는 빌리루빈). 다른 예시적인 M 모이어티는 다음을 포함한다: 시아닌 염료, 잔테이트 염료 (예를 들면, Hex, Vic, Nedd, Joe 또는 Tet); 야키마 옐로우; 레드몬드 레드; 탐라; 텍사스 레드 및 알렉사 플루오르(alexa fluor)® 염료.

[0452] 상기한 것들 중 어느 것의 또한 다른 실시형태에서, M은 3개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이의 조합, 예를 들면, 4개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이의 조합, 또는 심지어 5개 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, M은 6개의 아릴 또는 헤테로아릴 환, 또는 이의 조합을 포함한다. 추가 실시형태에서, 환은 융합된다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, M은 3개 이상의 융합된 환, 4개 이상의 융합된 환, 5개 이상의 융합된 환, 또는 심지어 6개 이상 융합된 환을 포함한다.

[0453] 일부 실시형태에서, M은 사이클릭이다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 M은 카보사이클릭이다. 다른 실시형태에서, M은 헤테로사이클릭이다. 상기한 것의 또한 다른 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 아릴 모이어티를 포함한다. 일부 이들 실시형태에서, 아릴 모이어티는 멀티사이클릭이다. 다른 보다 특정한 예에서, 아릴 모이어티는 융합된-멀티사이클릭 아릴 모이어티이고, 예를 들면, 이는 적어도 3, 적어도 4, 또는 또한 4개 초과의 아릴 환을 포함할 수 있다.

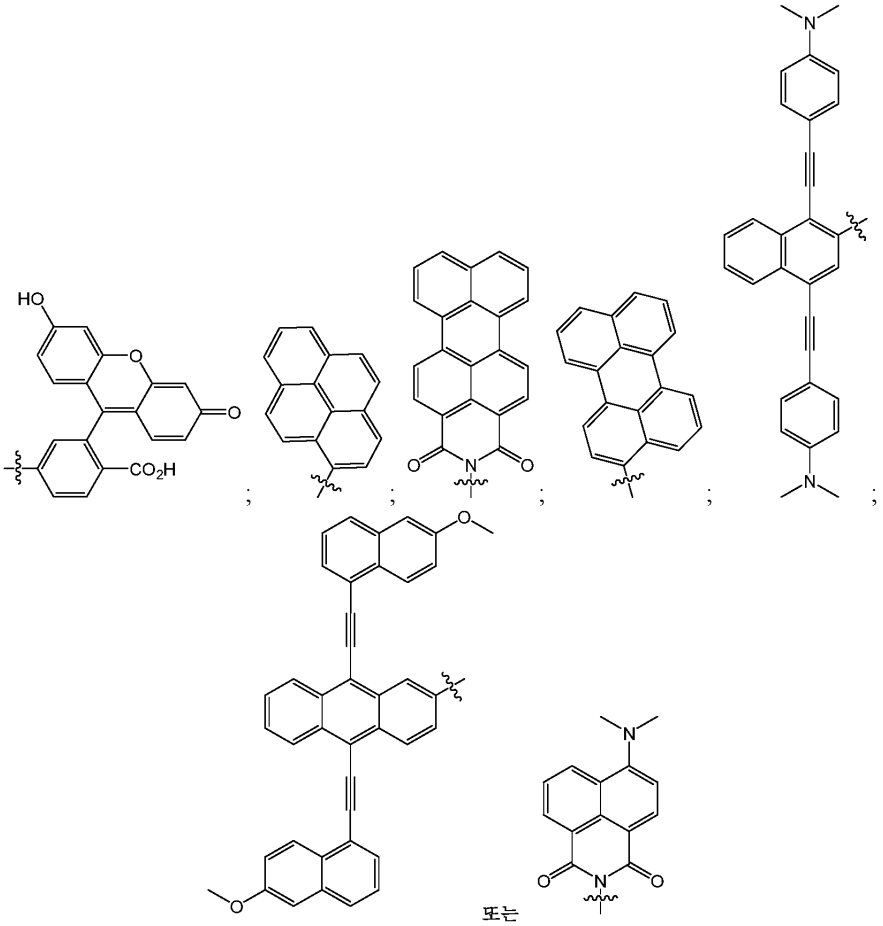
[0454] 구조 (II)의 상기한 화합물 중 어느 것의 다른 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 헤테로원자는 질소, 산소 또는 황이다.

[0455] 상기한 것들 중 어느 것의 또한 추가의 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 적어도 하나의 치환체를 포함한다. 예를 들면, 동일한 실시형태에서 치환체는 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 하이드록시, 설프하이드릴, 알콕시, 아릴옥시, 페닐, 아릴, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 이소프로필, t-부틸, 카복시, 설포네이트, 아미드, 또는 포밀 그룹이다.

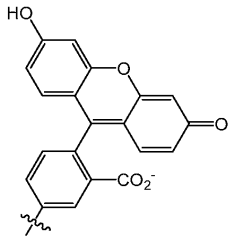
[0456] 상기한 것의 일부 또한 추가의 특정 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 디메틸아미노스틸벤, 퀴나크리돈, 플루오로페닐-디메틸-BODIPY, his-플루오로페닐-BODIPY, 아크리딘, 테릴렌, 섹시페닐, 포르피린, 벤조피렌, (플루오로페닐-디메틸-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, (비스-플루오로페닐-디플루오로보라-디아자-인다센)페닐, 쿼터페닐, 바이-벤조티아졸, 터-벤조티아졸, 바이-나프틸, 바이-안트라실, 스쿠아레인, 스쿠아릴륨, 9,10-에티닐안트라센 또는 터-나프틸 모이어티이다. 다른 실시형태에서, M^1은, 각 발생에서, 독립적으로 p-터페닐, 페릴렌, 아조벤젠, 페나진, 페난트롤린, 아크리딘, 티옥산트렌, 크리센, 루브렌, 코로넨, 시아닌, 페릴렌 이미드, 또는 페릴렌 아미드 또는 이의 유도체이다. 또한 추가의 실시형태에서, M은, 각 발생에서, 독립적으로 쿠마린 염료, 레조루핀 염료, 디피로메텐붕소 디플루오라이드 염료, 루테늄 비피리딜 염료, 에너지 전달 염료, 티아졸 오렌지 염료, 폴리메틴 또는 N-아릴-1,8-나프탈이미드 염료이다.

[0457] 상기한 것들 중 어느 것의 또한 추가의 실시형태에서, M은 각 발생에서 동일하다. 다른 실시형태에서, 각각의 M은 상이하다. 또한 추가의 실시형태에서, 하나 이상의 M은 동일하고, 하나 이상의 M은 상이하다.

[0458] 일부 실시형태에서, M은 피렌, 페릴렌, 페릴렌 모노이미드 또는 6-FAM 또는 이의 유도체이다. 일부 다른 실시형태에서, M^1은 하기 구조 중 하나를 갖는다:

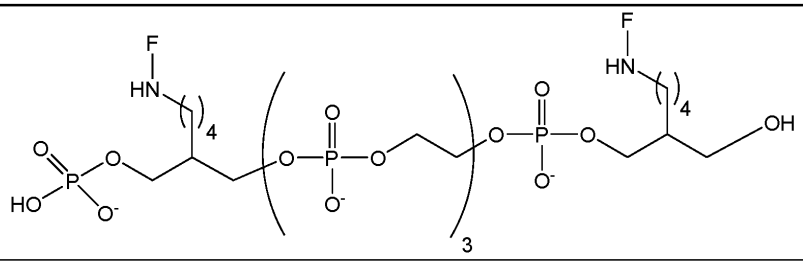
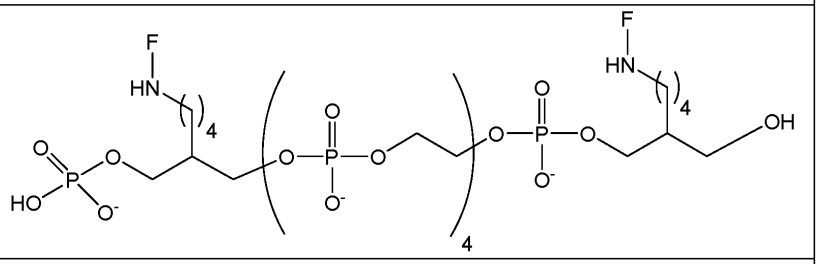
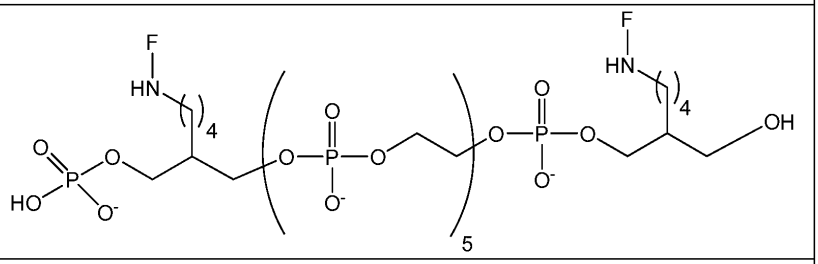
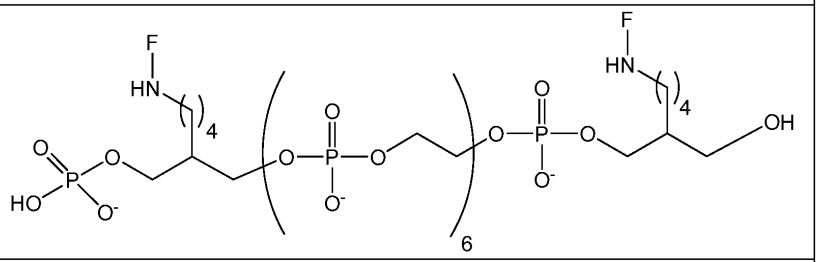
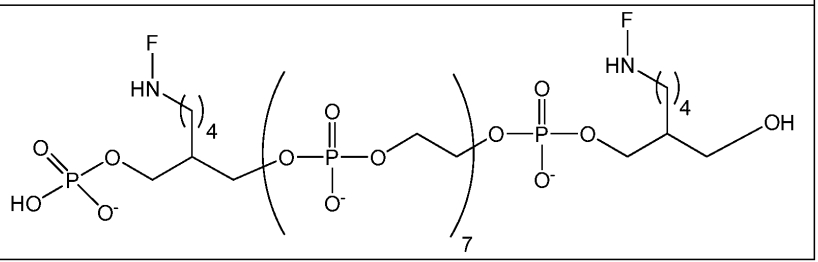
[0459] 

[0460] 일부 다른 실시형태에서, M^1은 하기 구조를 갖는다:

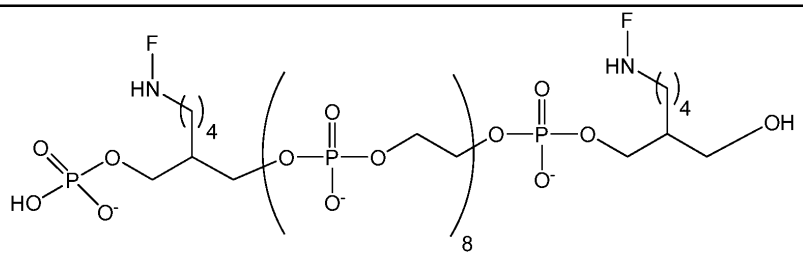
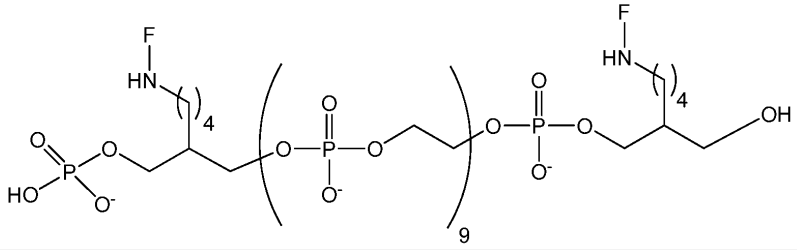
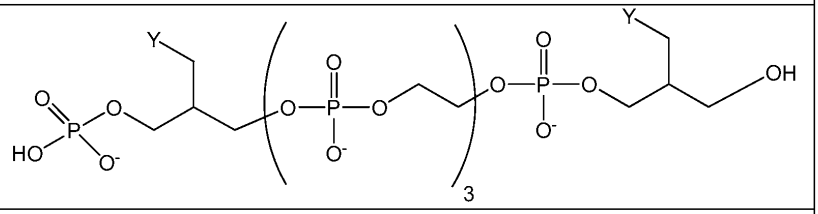
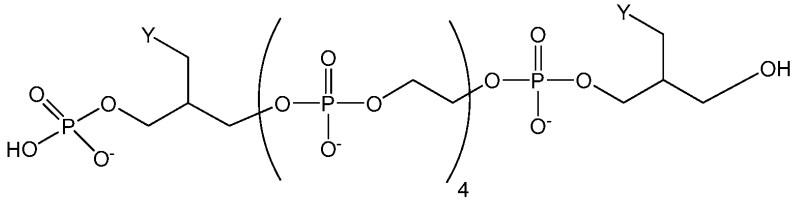
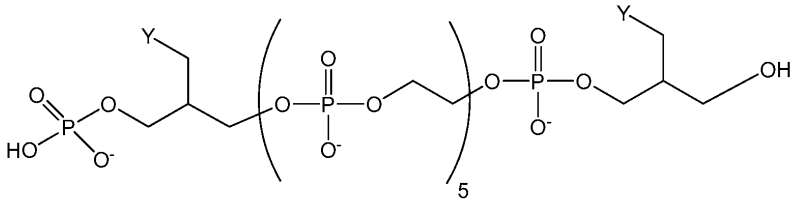
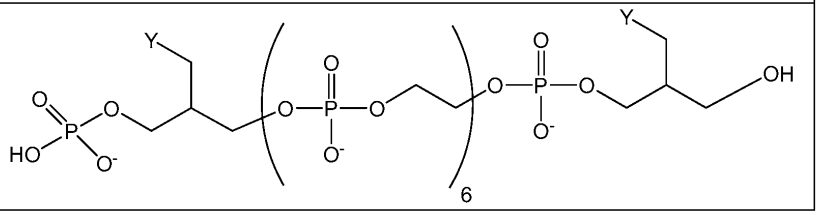
[0461] 

[0462] 일부 특정 실시형태에서, 화합물은 표 3으로부터 선택된 화합물이다:

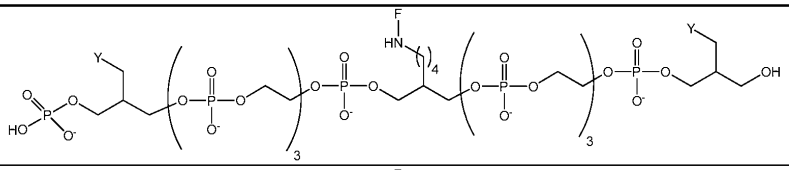
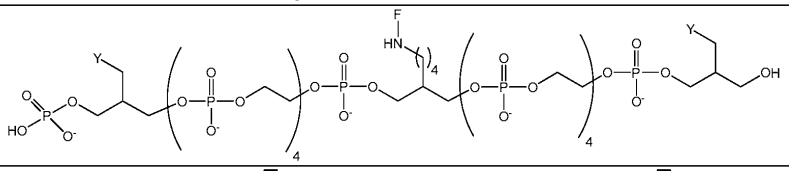
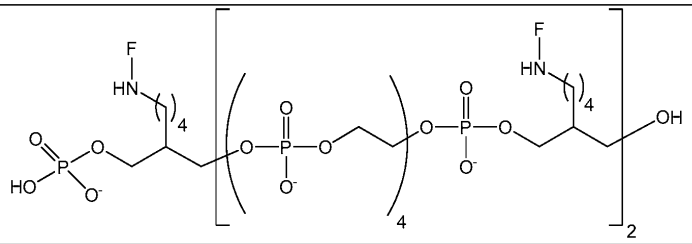
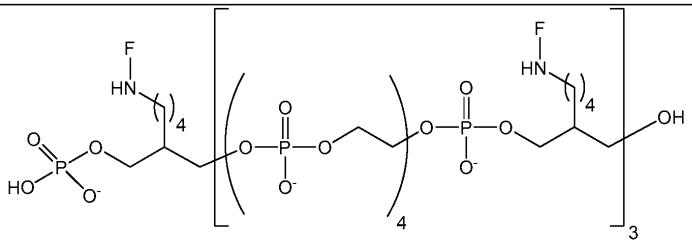
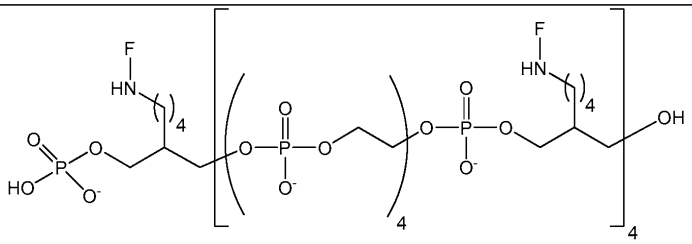
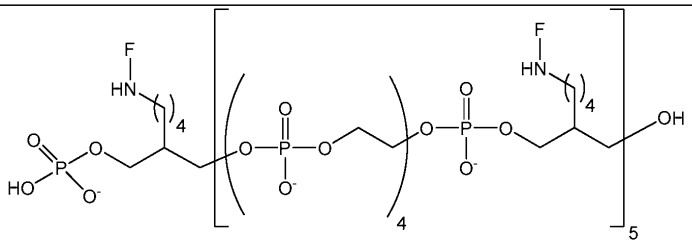
[0463] 표 3. 예시적인 화합물

명칭	구조
FC_3F	
FC_4F	
FC_5F	
FC_6F	
FC_7F	

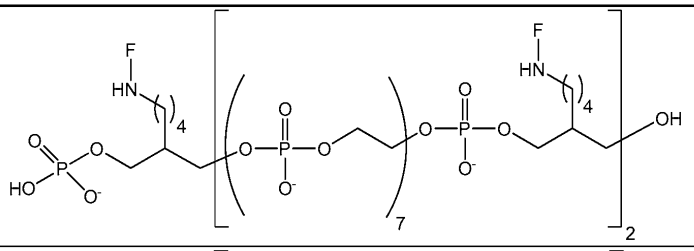
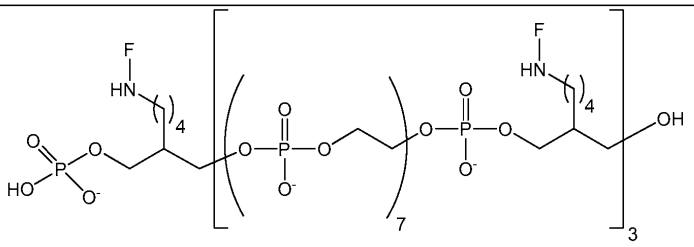
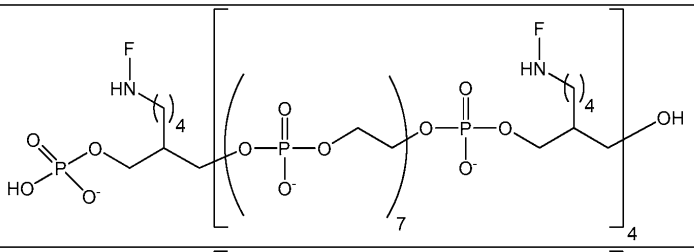
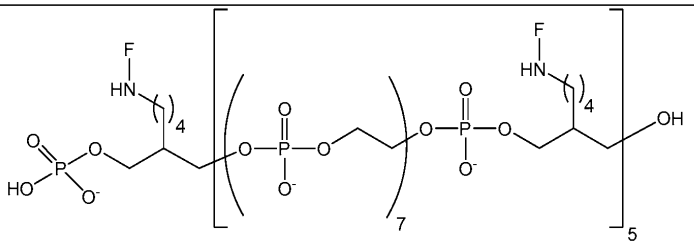
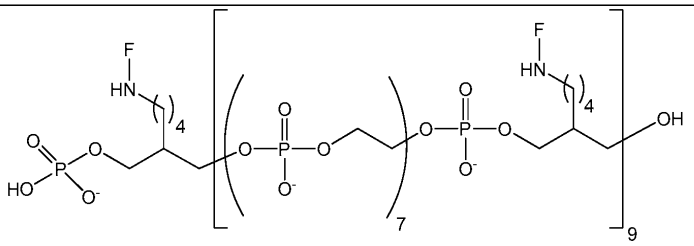
[0464]

명칭	구조
FC_8F	
FC_9F	
YC_3Y	
YC_4Y	
YC_5Y	
YC_6Y	

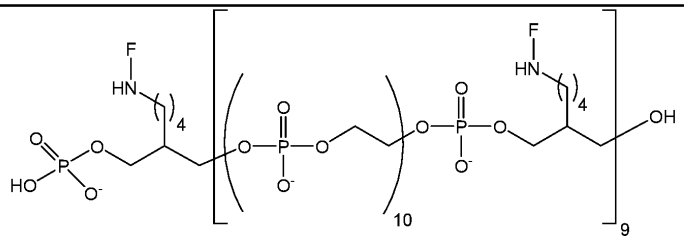
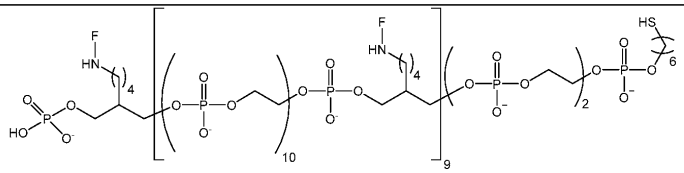
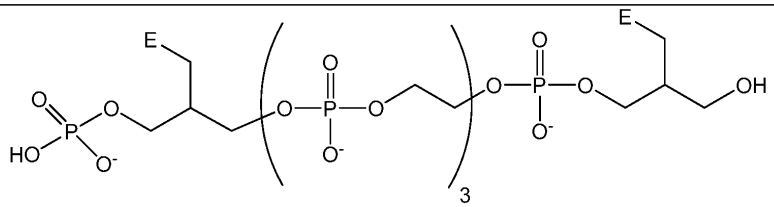
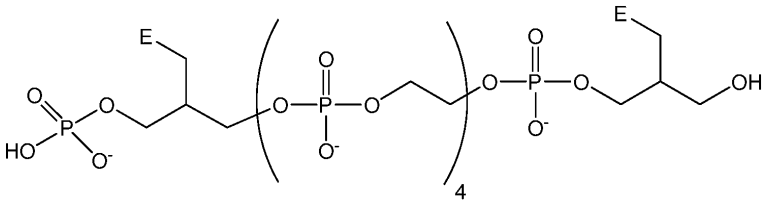
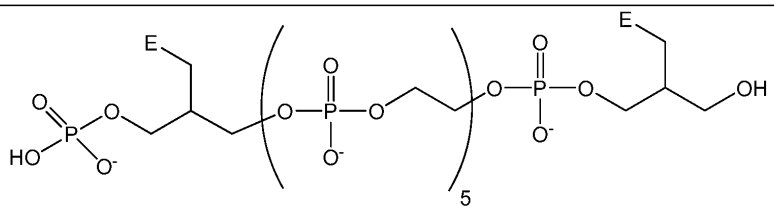
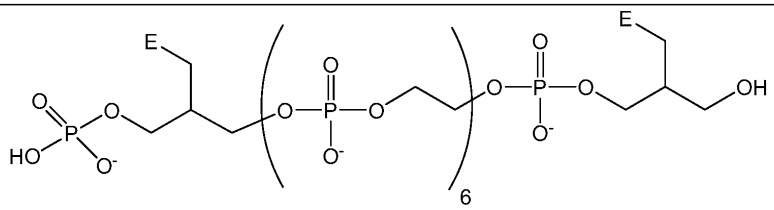
[0465]

명칭	구조
YC_3FC_3Y	
YC_4FC_4Y	
$F(C_4F)_2$	
$F(C_4F)_3$	
$F(C_4F)_4$	
$F(C_4F)_5$	

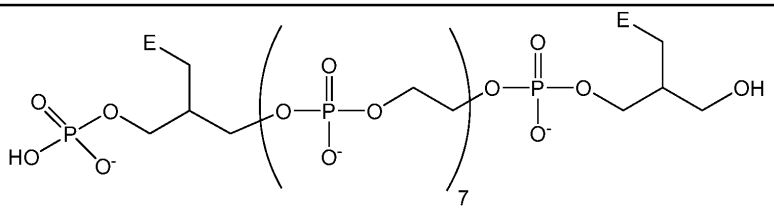
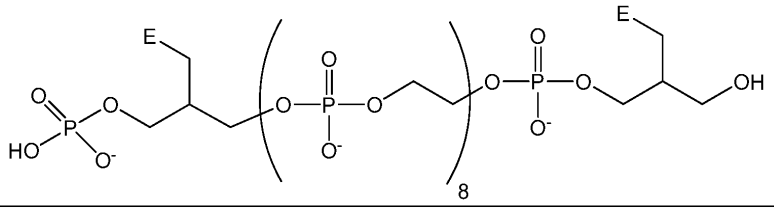
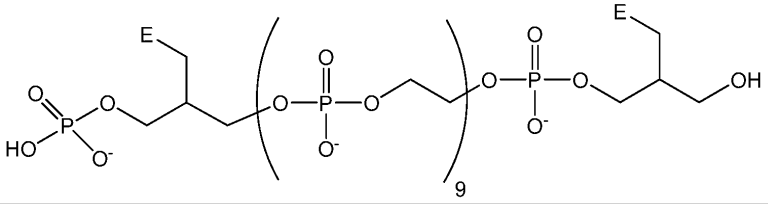
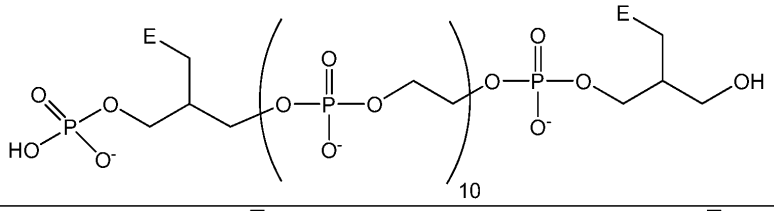
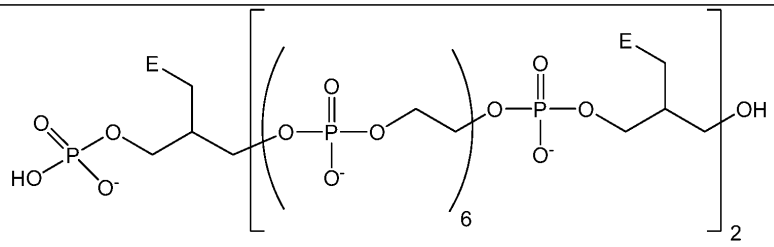
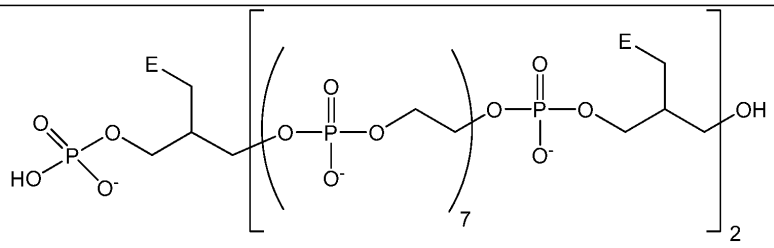
[0466]

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

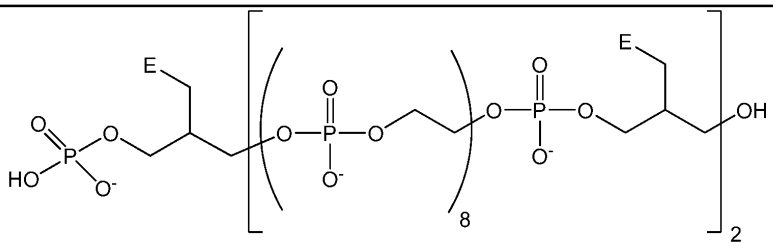
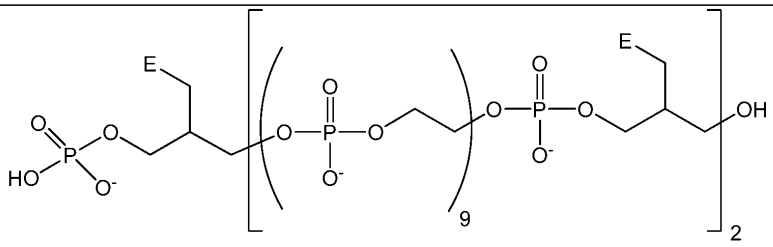
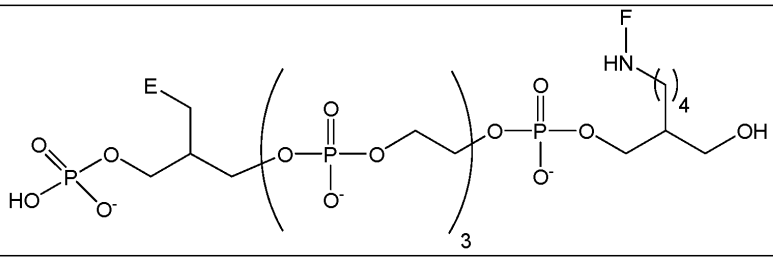
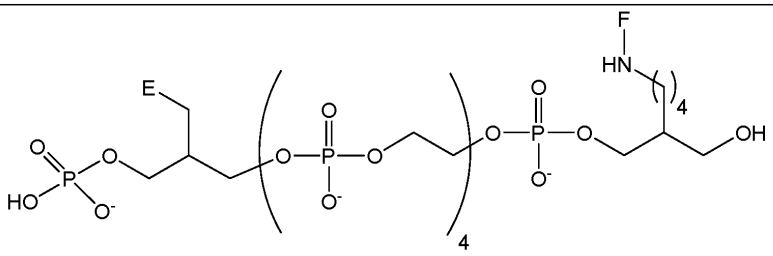
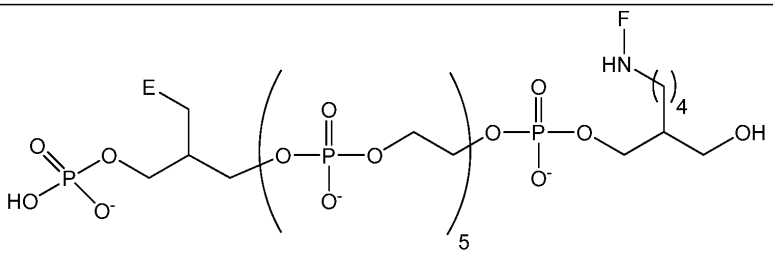
[0467]

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

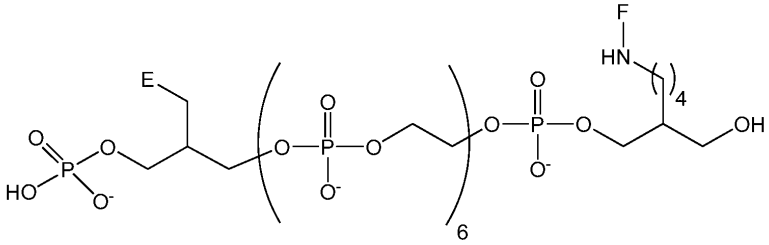
[0468]

명칭	구조
EC_7E	
EC_8E	
EC_9E	
$EC_{10}E$	
$E(C_6E)_2$	
$E(C_7E)_2$	

[0469]

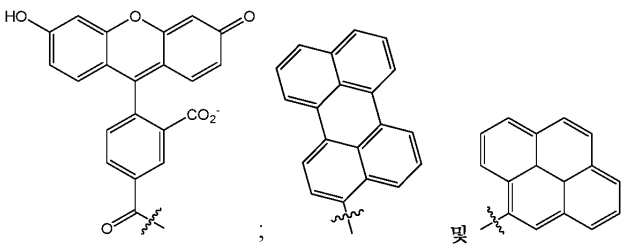
명칭	구조
$E(C_8E)_2$	
$E(C_9E)_2$	
EC_3F	
EC_4F	
EC_5F	

[0470]

명칭	구조
EC_6F	

[0471]

[0472] 표 3에서 및 본 출원 전반에 걸쳐 사용된 바와 같이, F, E 및 Y는 각각 플루오레세인, 페릴렌 및 피렌 모이어티를 언급하고, 하기 구조를 갖는다:

[0473] 

"F" "E" "Y"

[0474] 본원에 개시된 염료 화합물은 "조정할 수 있고", 이는 상기한 화합물 중 어느 것의 변수를 적합하게 선택함에 의해, 당해 기술 분야의 숙련가가 목적하는 및/또는 미리결정된 몰 형광 (몰 명도)을 갖는 화합물에 도달할 수 있음을 의미한다. 화합물의 조정성은 사용자가 특정 검정에 사용하기 위한 또는 관심 대상 특정 분석물을 확인하기 위한 목적하는 형광 및/또는 착색을 갖는 화합물에 도달하기 용이하게 한다. 모든 변수가 화합물의 몰 형광에 영향을 줄 수 있지만, M, m, n 및 L^4의 적합한 선택은 화합물의 몰 형광에서 중요한 역할을 하는 것으로 고려된다. 따라서, 하나의 실시형태에서 목적하는 몰 형광을 갖는 화합물을 수득하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 공지된 형광을 갖는 M 모이어티를 선택하고, M을 포함하는 구조 (II)의 화합물를 제조하고, m, n 및 L^4에 대한 적합한 변수를 선택하여 목적하는 몰 형광에 도달함을 포함한다.

[0475] 특정 실시형태에서 몰 형광은 모 형광단 (예를 들면, 단량체)의 형광 방출에 비해 증가 또는 감소 배수의 관점에서 표현될 수 있다. 동일한 실시형태에서 본 발명의 화합물의 몰 형광은 모 형광단에 비해 1.1x, 1.5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x 10x 또는 심지어 더 높다. 다양한 실시형태는 m, n 및 L^4를 적합하게 선택하여 모 형광단에 비해 목적하는 배수의 형광 증가를 갖는 화합물을 제조함을 포함한다.

[0476] 용이하게 예시하기 위해, 인 모이어티를 포함하는 다양한 화합물 (예를 들면, 포스페이트 등)은 음이온성 상태 (예를 들면, $OPO(OH)O^-$, $-OPO_3^{2-}$)로 도시된다. 당해 기술 분야의 숙련가는 전하가 pH에 좌우되고, 하전되지 않은 (예를 들면, 양성화자 또는 염, 예를 들면, 나트륨 또는 다른 양이온) 형태가 또한 본 발명의 범위에 포함된다는 것을 용이하게 이해할 것이다.

[0477] 상기 열거된 구조 (II)의 화합물의 임의의 실시형태, 및 구조 (II)의 화합물에서 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 열거된 임의의 특정 선택이, 구조 (II)의 화합물의 다른 실시형태 및/또는 변수와 독립적으로 조합되어 상기 구체적으로 열거되지 않은 본 발명의 실시형태를 형성할 수 있다는 것이 이해된다. 추가로, 선택 목록이 특정 실시형태 및/또는 청구범위에서 임의의 구체적인 R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, L^1, L^2, L^3, L^4, M, m 및 n 변수에 대해 열거된 경우, 각각의 개별적인 선택이 특정 실시형태 및/또는 청구범위로부터 제거될 수 있고, 나머지 선택 목록이 본 발명의 범위 내로 고려되는 것으로 이해된다.

[0478] 본원 설명에서, 도시된 화학식의 치환체 및/또는 변수의 조합은, 이러한 기여가 안정한 화합물을 야기하는 경우에만 허용가능하다는 것이 이해된다.

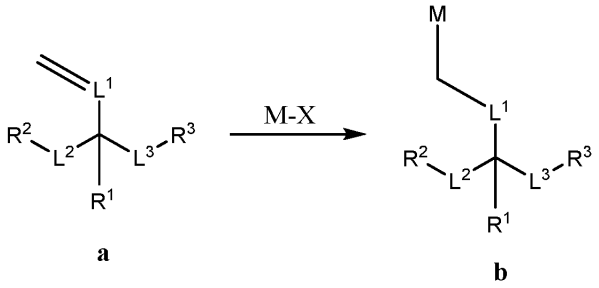
[0479] 본원에 기재된 방법에서 중간체 화합물의 관능 그룹은 적합한 보호 그룹으로 보호될 필요가 있다는 것을 당해 기술분야의 숙련가가 또한 인지할 것이다. 이러한 관능 그룹은 하이드록시, 아미노, 머캅토 및 카복실산을 포함한다. 하이드록시를 위한 적합한 보호 그룹은 트리알킬실릴 또는 디아릴알킬실릴 (예를 들면, t-부틸디메틸실릴, t-부틸디페닐실릴 또는 트리메틸실릴), 테트라하이드로피라닐, 벤질, 등이다. 아미노, 아미디노 및 구아니디노를 위한 적합한 보호 그룹은 t-부톡시카보닐, 벤질옥시카보닐 등을 포함한다. 머캅토를 위한 적합한 보호 그룹은 -C(O)-R" (여기서, R"는 알킬, 아릴 또는 아릴알킬이다), p-메톡시벤질, 트리틸 등을 포함한다. 카복실산을 위한 적합한 보호 그룹은 알킬, 아릴 또는 아릴알킬 에스테르를 포함한다. 보호 그룹을 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되고 본원에 기재된 표준 기술에 따라서 첨가 또는 제거할 수 있다. 보호 그룹의 사용은 문헌에 상세하게 기재되어 있다 [참조: Green, T.W. and P.G.M. Wutz, Protective Groups in Organic Synthesis (1999), 3rd Ed., Wiley]. 당해 기술 분야의 숙련가가 인지할 수 있는 바와 같이, 보호 그룹은 또한 중합체 수지, 예를 들면, Wang 수지, Rink 수지 또는 2-클로로트리틸-클로라이드 수지일 수 있다.

[0480] 추가로, 유리 염기 또는 산 형태로 존재하는 본 발명의 모든 화합물을 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법

으로 적합한 무기 또는 유기 염기 또는 산으로 처리하여 이들의 염으로 전환될 수 있다. 본 발명의 화합물의 염을 표준 기술에 의해 이들의 유리 염기 또는 산 형태로 전환할 수 있다.

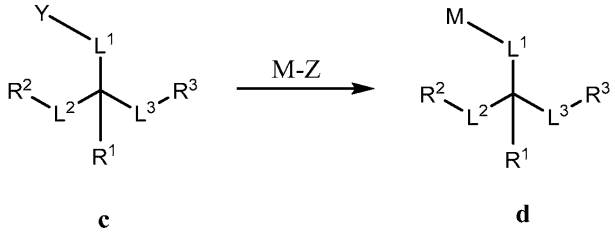
[0481] 하기 반응식은 본 발명의 화합물을 제조하는 예시적인 방법을 나타낸다. 당해 기술분야의 숙련가가 이들 화합물을 유사한 방법으로 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 다른 방법과 조합하여 제조할 수 있다는 것이 이해된다. 당해 기술분야의 숙련가가 하기 구체적으로 나타내지 않는 다른 구조 (II)의 화합물을 적합한 출발 성분을 사용하고 필요한 합성 파라미터를 변형시켜 하기한 것과 유사한 방식으로 제조할 수 있다는 것이 또한 이해된다. 일반적으로, 출발 성분을 Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI, 및 Fluorochem USA 등과 같은 공급원으로부터 입수할 수 있거나, 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 공급원에 따라서 합성할 수 있거나 (참조: 예를 들면, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th edition (Wiley, December 2000)) 본 발명에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다.

[0482] 반응식 I

[0483] 

[0484] 반응식 I은 구조 (II)의 화합물의 제조에 유용한 중간체를 제조하는 예시적인 방법을 나타내고, 여기서, R^1, L^1, L^2, L^3 및 M은 상기 정의된 바와 같고, R^2 및 R^3은 상기 정의된 바와 같거나, 이의 보호된 변형물이다. 반응식 1을 참조하여, 상기 구조의 화합물을 구입하거나 당해 기술분야의 숙련가에서 잘 공지된 방법으로 제조할 수 있다. M-X (여기서, x는 할로겐, 예를 들면, 브로모이다)와 당해 기술분야에 공지된 스즈키 커플링 조건하에 반응은 구조 b의 화합물을 야기한다. 구조 b의 화합물을 하기한 구조 (II)의 화합물의 제조에 사용할 수 있다.

[0485] 반응식 II

[0486] 

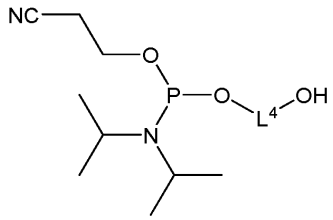
[0487] 반응식 II는 구조 (II)의 화합물의 화합물의 제조에 유용한 중간체의 화합물을 제조하는 대안적인 방법을 나타낸다. 반응식 II를 참조하여, (여기서, R^1, L^1, L^2, L^3 및 M은 상기 정의된 바와 같고, R^2 및 R^3은 상기 정의된 바와 같거나 이의 보호된 변형물이다), 구입하거나 잘 공지된 기술으로 제조할 수 있는 구조 c의 화합물을, M-Z와 반응시켜 구조 d의 화합물을 수득한다. 여기서, Y 및 Z는 상보적 반응성을 갖는 관능 그룹을 나타낸다 (즉, 공유 결합을 형성하기 위해 반응하는 관능 그룹). Z는 M에 또는 M, 예를 들면, 사이클릭 무수물의 구조적 주쇄의 부분에 펜던트될 수 있다. Y는 임의의 수의 관능 그룹, 예를 들면, 아미노일 수 있다.

[0488] 특정 실시형태에서, 구조 I의 화합물은 2-100개의 반복 단위를 포함하는 올리고머이다. 이러한 올리고머는 잘 공지된 자동화된 DNA 합성 방법과 유사한 방법을 사용하여 제조할 수 있다. DNA 합성 방법은 당해 기술분야에 잘 공지되어 있다. 간략하게, 2개의 알콜 그룹, 예를 들면, 상기 중간체 b 또는 d에서 R^2 및 R^3은, 각각 디메톡시트리틸 (DMT) 그룹 및 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필아미노 포스포르아미다이트 그룹으로 관능화된다. 포스포르아미다이트 그룹을 알콜 그룹에, 전형적으로 활성화제, 예를 들면, 테트라졸의 존재하에 커플링시키고, 이어서, 인 원자를 요오드로 산화시킨다. 디메톡시트리틸 그룹을 산 (예를 들면, 클로로아세트산)으로 제거하여 유리 알콜을 노출시킬 수 있고, 이를 포스포르아미다이트 그룹과 반응시킬 수 있다. 2-시아노에틸 그룹은 수성

암모니아로 처리하여 올리고머화 후 제거될 수 있다.

[0489] 올리고머화 방법에 사용되는 포스포르아미다이트의 제조는 또한 당해 기술분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 1급 알콜 (예를 들면, R^3)을 DMT-Cl과 반응시켜 DMT 그룹으로서 보호할 수 있다. 이어서, 2급 알콜 (예를 들면, R^2)을 적합한 시약, 예를 들면, 2-시아노에틸 N,N-디이소프로필클로로포스포르아미다이트와 반응시켜 포스포르아미다이트로서 관능화한다. 포스포르아미다이트의 방법 및 이들의 올리고머화는 당해 기술분야에 잘 공지되어 있고, 실시예에 상세하게 기재되어 있다.

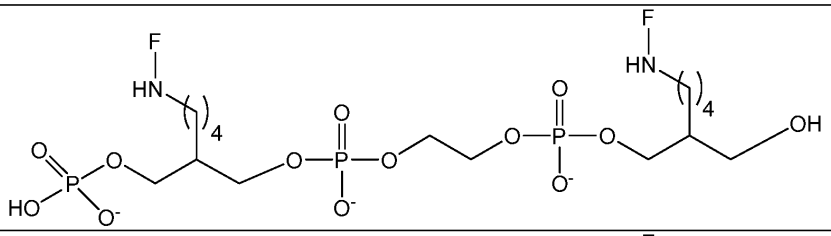
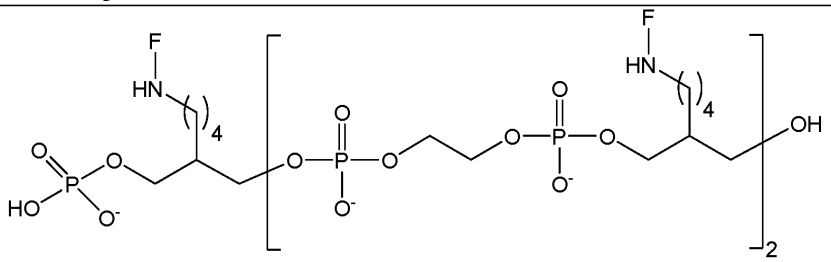
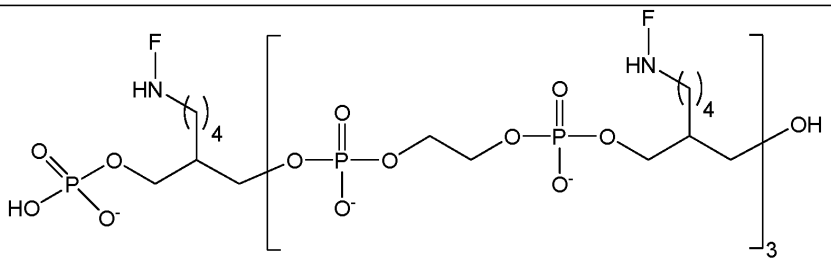
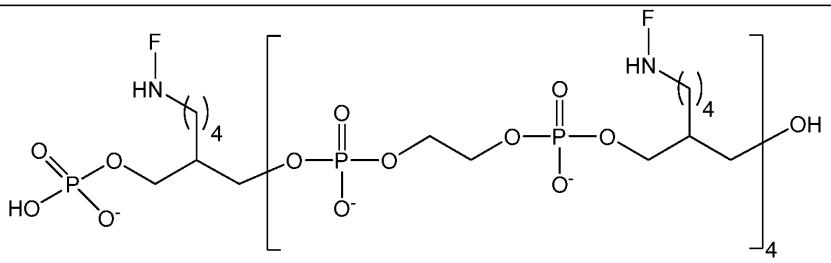
[0490] 중간체 b 또는 d의 올리고머를 상기한 잘 공지된 포스포르아미다이트 화학에 따라서 제조한다. 목적하는 수의 m 반복 단위를, 적합한 중간체, 예를 들면, 하기 구조를 갖는 중간체를 사용하여 포스포르아미다이트 커플링을 목적하는 횟수로 반복하여 분자 내에 도입한다.



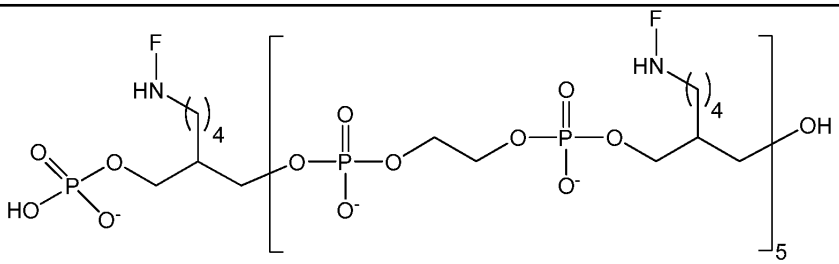
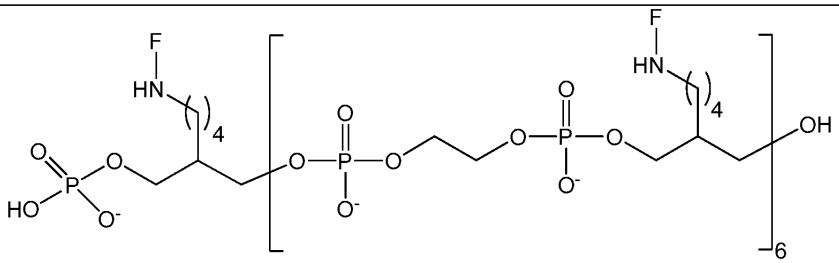
[0491]

[0492] 실시형태에서, 표 4에 열거된 염료 화합물을 본원 개시내용의 조성물 및/또는 방법에 사용될 수 있다. 표 4에 열거된 염료 화합물을 당해 기술분야에 공지된 절차에 따라서 제조하였다 (참조: 예를 들면, WO 2016/183185, 합성 방법에 대한 교시를 위해 본원에 참조로서 포함됨). UV 및 형광 성질을 2 nM 및 pH 9에서 측정하였다.

[0493] 표 4. 염료 화합물

명칭	구조	ε_t*
F	F-OH	75k
FCF		150k
$F(CF)_2$		225k
$F(CF)_3$		300k
$F(CF)_4$		375k

[0494]

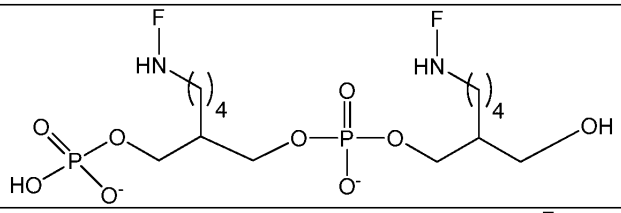
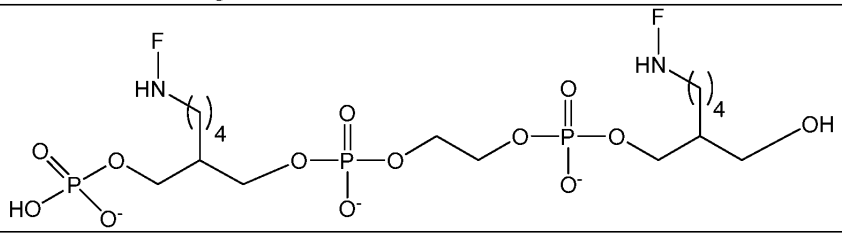
명칭	구조	ε_t*
$F(CF)_5$		450k
$F(CF)_6$		525k

[0495]

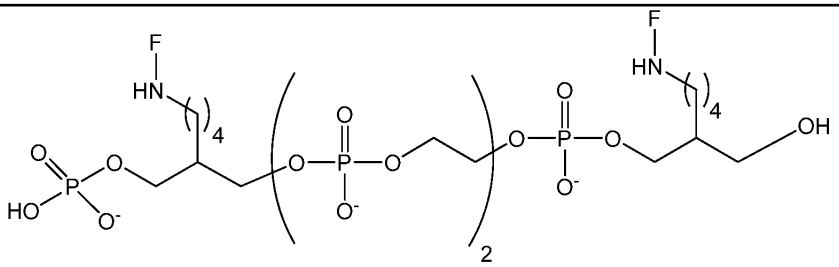
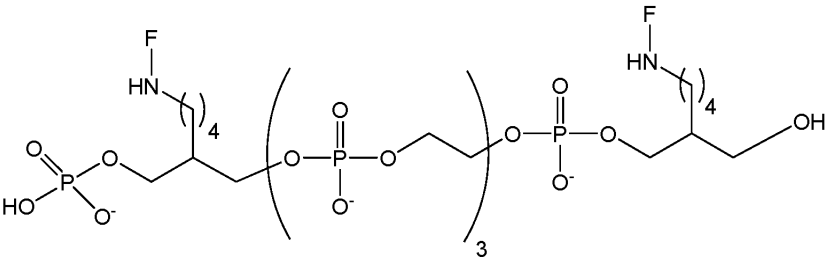
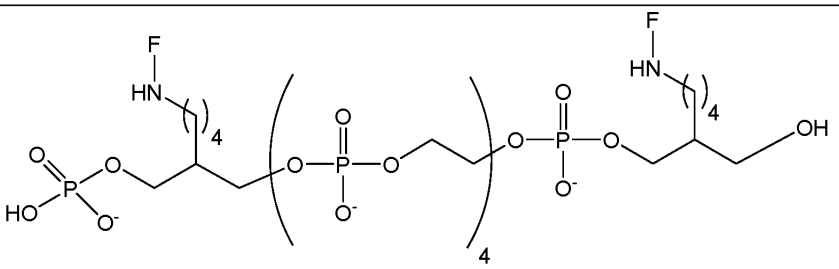
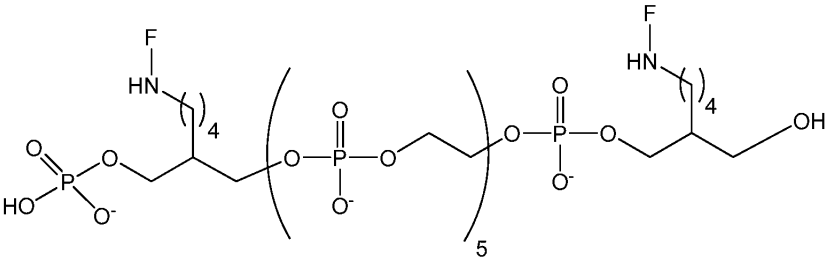
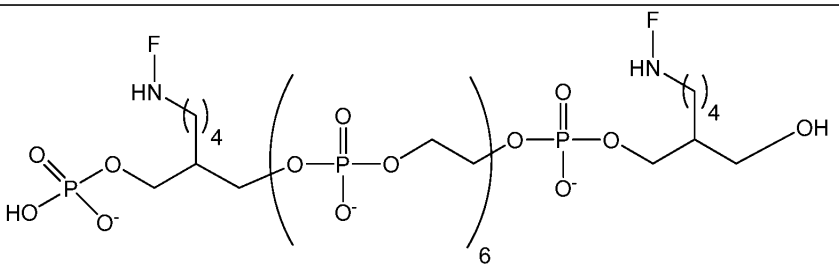
[0496] ε_t = 이론적인 몰 소광 계수

[0497] 실시형태에서, 표 5에 열거된 염료 화합물을 본원 개시내용의 조성물 및/또는 방법에 사용될 수 있다. 표 5에 열거된 염료 화합물을 당해 기술분야에 공지된 절차에 따라서 제조하였다 (참조: 예를 들면, WO 2016/183185, 합성 방법에 대한 교시를 위해 본원에 참조로서 포함됨).

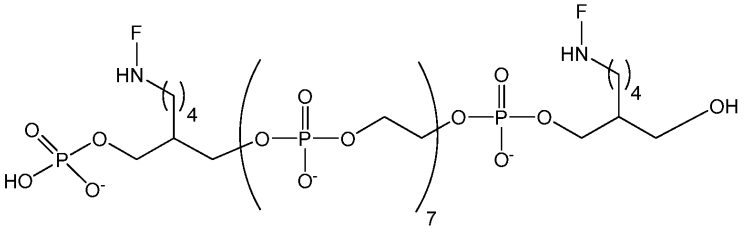
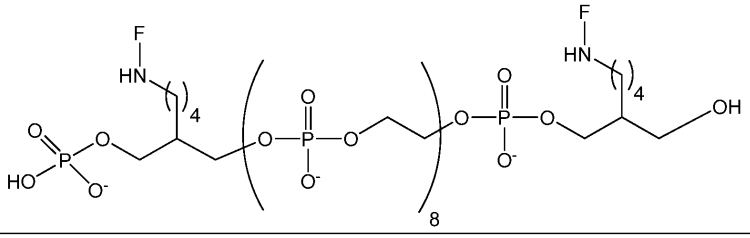
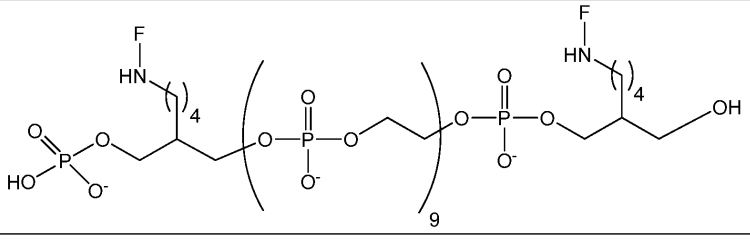
[0498] 표 5. 염료 화합물

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

[0499]

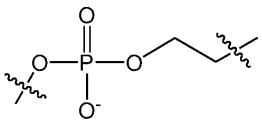
명칭	구조	ε_t*
FC_2F		150k
FC_3F		150k
FC_4F		150k
FC_5F		150k
FC_6F		150k

[0500]

명칭	구조	ε_t*
FC_7F		150k
FC_8F		150k
FC_9F		150k

[0501]

[0502] ε_t 및 F는 상기 정의된 바와 같고, "C 링커"는 하기 구조를 갖는다:

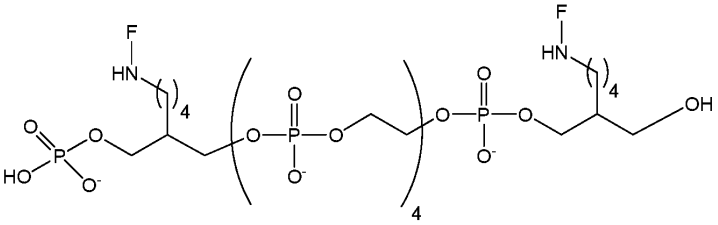
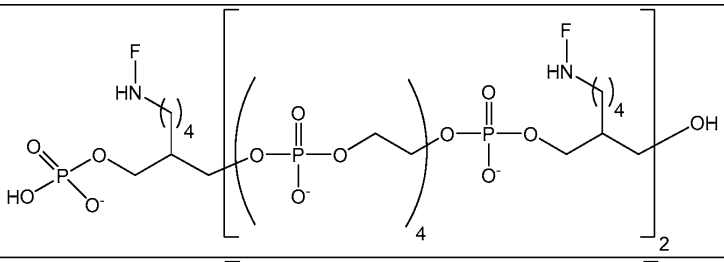
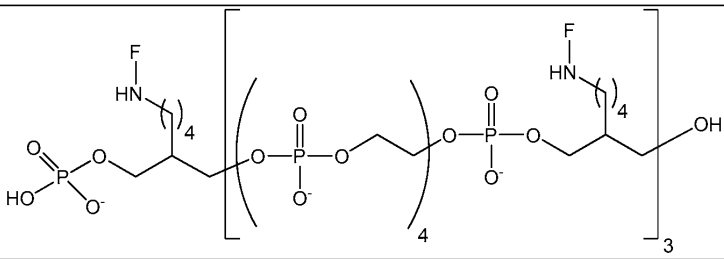
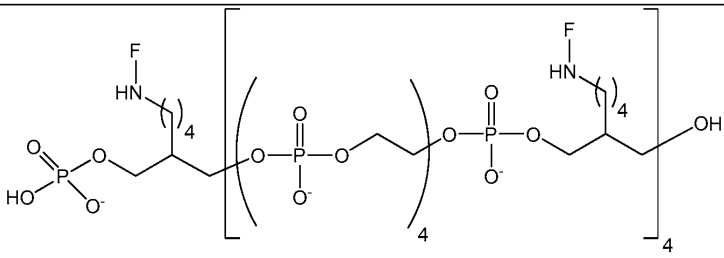
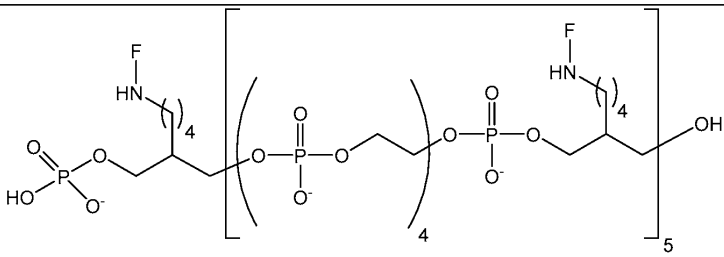


"C 링커"

[0503]

[0504] 실시형태에서, 표 6에 열거된 염료 화합물을 본원 개시내용의 조성물 및/또는 방법에 사용될 수 있다. 표 6에 열거된 염료 화합물을 당해 기술분야에 공지된 절차에 따라서 제조하였다 (참조: 예를 들면, WO 2016/183185, 합성 방법에 대한 교시를 위해 본원에 참조로서 포함됨). UV 및 형광 성질을 2 nM 및 pH 9에서 측정하였다.

[0505] 표 6. 염료 화합물

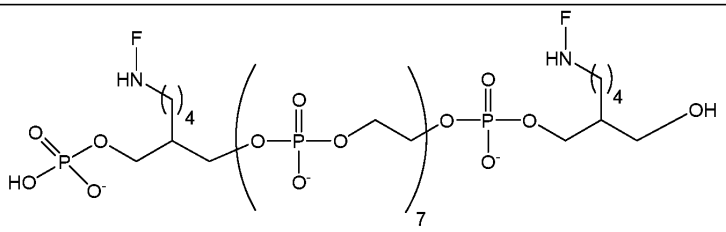
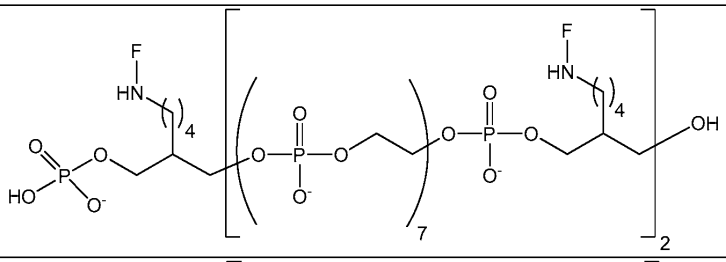
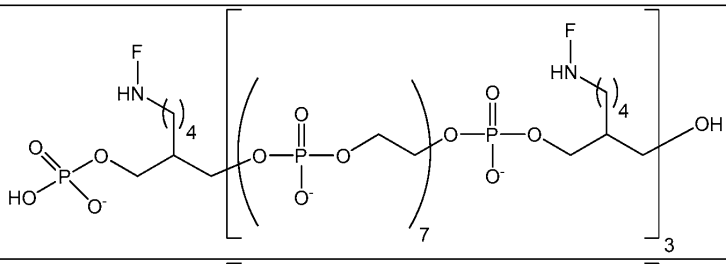
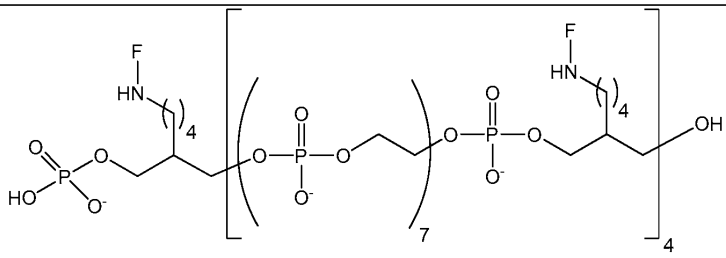
명칭	구조	ε_t*
F	F-OH	75k
FC_4F		150k
$F(C_4F)_2$		225k
$F(C_4F)_3$		300k
$F(C_4F)_4$		375k
$F(C_4F)_5$		450k

[0506]

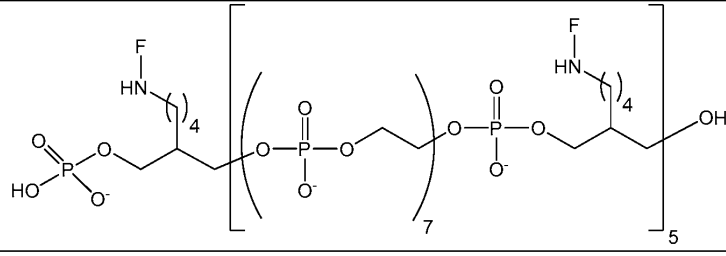
[0507] ε_t 및 F는 상기 정의된 바와 같다.

[0508] 실시형태에서, 표 7에 열거된 염료 화합물을 본원 개시내용의 조성물 및/또는 방법에 사용될 수 있다. 표 7에 열거된 염료 화합물을 당해 기술분야에 공지된 절차에 따라서 제조하였다 (참조: 예를 들면, WO 2016/183185, 합성 방법에 대한 교시를 위해 본원에 참조로서 포함됨). UV 및 형광 성질을 25 nM 및 pH 9에서 측정하였다.

[0509] 표 7. 염료 화합물

명칭	구조	ε_t*
F	F-OH	75k
FC_7F		150k
$F(C_7F)_2$		225k
$F(C_7F)_3$		300k
$F(C_7F)_4$		375k

[0510]

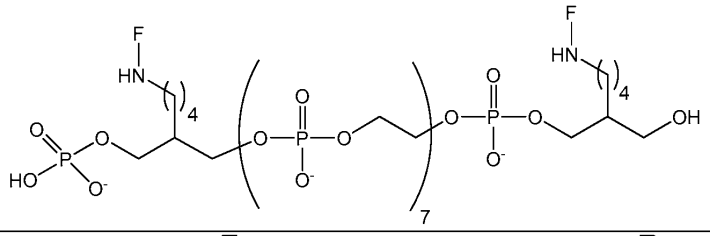
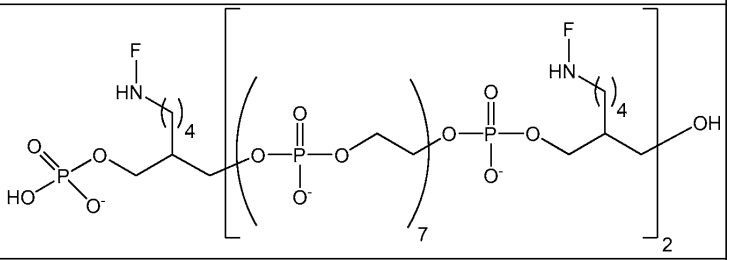
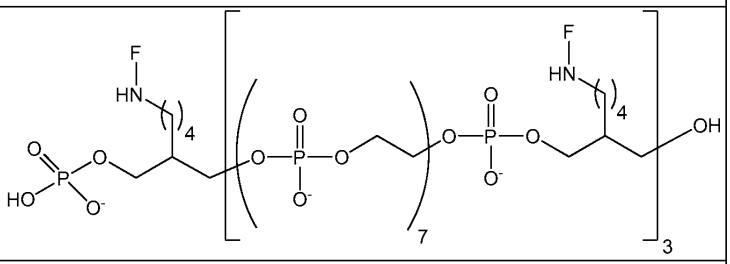
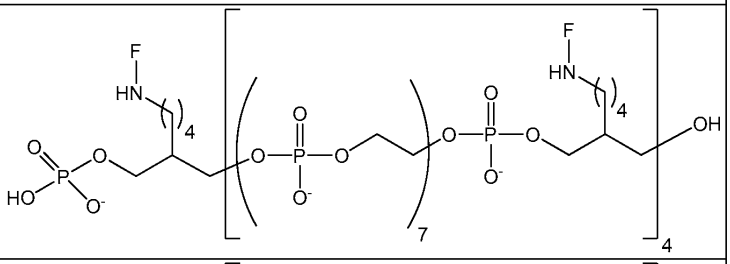
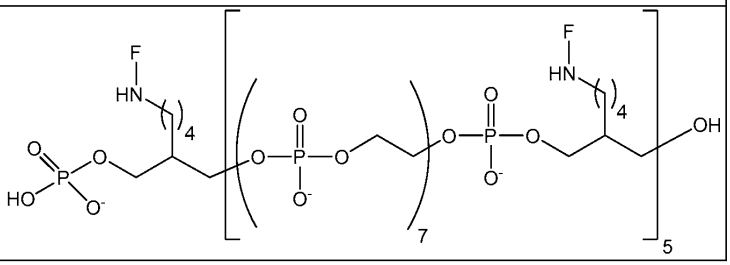
명칭	구조	ε_t*
$F(C_7F)_5$		450k

[0511]

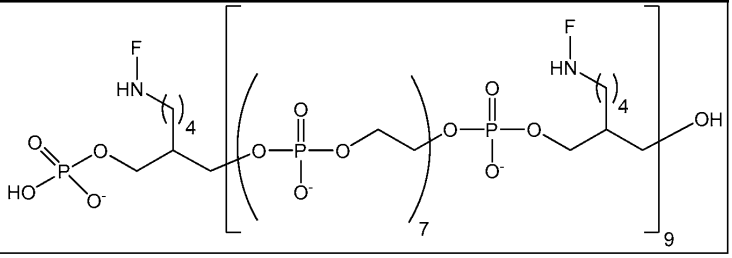
[0512] ε_t 및 F는 상기 정의된 바와 같다.

[0513] 실시형태에서, 표 8에 열거된 염료 화합물을 본원 개시내용의 조성물 및/또는 방법에 사용될 수 있다. 표 8에 열거된 염료 화합물을 당해 기술분야에 공지된 절차에 따라서 제조하였다 (참조: 예를 들면, WO 2016/183185, 합성 방법에 대한 교시를 위해 본원에 참조로서 포함됨). UV 및 형광 성질을 10 nM 및 pH 9에서 측정하였다.

[0514] 표 8. 염료 화합물

명칭	구조
F	F-OH
FC_7F	
$F(C_7F)_2$	
$F(C_7F)_3$	
$F(C_7F)_4$	
$F(C_7F)_5$	

[0515]

명칭	구조
$F(C_7F)_9$	

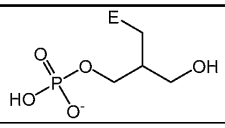
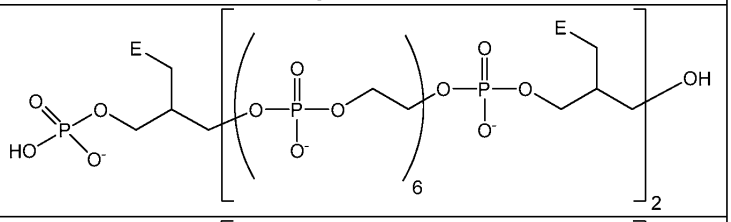
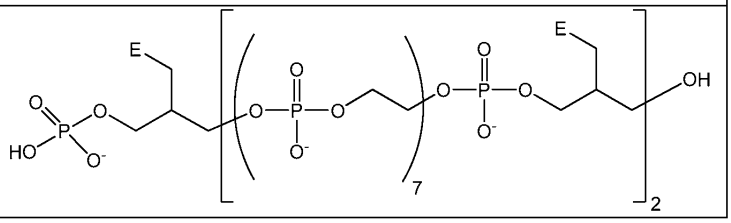
[0516]

[0517] F는 상기 정의된 바와 같다.

[0518] 실시형태에서, 표 9에 열거된 염료 화합물을 본원 개시내용의 조성물 및/또는 방법에 사용될 수 있다. 표 9에

열거된 염료 화합물을 당해 기술분야에 공지된 절차에 따라서 제조하였다 (참조: 예를 들면, WO 2016/183185, 합성 방법에 대한 교시를 위해 본원에 참조로서 포함됨). UV 및 형광 성질을 50 nM 및 pH 9에서 측정하였다.

[0519] 표 9. 염료 화합물

명칭	구조
E	
$E(C_6E)_2$	
$E(C_7E)_2$	

[0520]

[0521] E는 상기 정의된 바와 같다.

[0522] 하기 실시예를 제안하려는 목적이 아니라 예시하기 위해 제공한다.

[0523] 실시예

[0524] 일반적 방법

[0525] 질량 스펙트럼 분석을 MassLynx 4.1 획득 소프트웨어를 사용하는 Waters/Micromass Quattro micro MS/MS 시스템 (MS 단독 모드에서) 상에서 수행하였다. 염료 상 LC/MS을 위해 사용되는 이동상은 100 mM 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올 (HFIP), 8.6 mM 트리에틸아민 (TEA), pH 8이었다. 포스포르아미다이트 및 전구체 분자를 또한 아세토니트릴/물 이동상 구배를 이용하여, 45℃에서 유지되는 2.1mm x 50mm Acquity BEH-C18 컬럼을 갖는 Waters Acquity UHPLC 시스템을 사용하여 분석하였다. 단량체 중간체에 대한 분자량을 Waters/Micromass Quattro micro MS/MS 시스템 (MS 단독 모드) 상 트로필륨 양이온 주입 향상된 이온화를 사용하여 입수하였다. 여기 및 방출 프로파일 실험을 Cary Eclipse 분광광도계 상에서 기록하였다.

[0526] 모든 반응을 달리 지시하지 않는 한 질소 분위기하에 오븐 건조 유리용기에서 수행하였다. 시판되는 DNA 합성 시약을 Glen Research (Sterling, VA)로부터 구입하였다. 무수 피리딘, 톨루엔, 디클로로메탄, 디이소프로필에틸 아민, 트리에틸아민, 아세트산, 피리딘, 및 THF를 Aldrich로부터 구입하였다. 모든 다른 화학물질을 Aldrich 또는 TCI로부터 구입하고, 추가 정제 없이 그대로 사용하였다.

[0527] 실시예 1

[0528] 에틸렌 글리콜 스페이서를 갖는 염료의 합성

[0529] 에틸렌 옥사이드 링커를 갖는 화합물을 다음과 같이 제조하였다:

[0530] 올리고플루오로사이드 구조물(constructs) (즉, 구조 (I)의 화합물)을 Applied Biosystems 394 DNA/RNA 합성기에서 1 μmol 스케일로 합성하고, 3'-포스페이트 그룹 또는 3'-S_2-$(CH_2)_6$-OH 그룹 또는 본원에 기재된 다른 그룹을 포함하였다. 합성을 CPG 비드 상 또는 폴리스티렌 고체 지지체 상에서 표준 포스포르아마다이트 화학을 사용하여 수행하였다. 올리고플루오로사이드를 3'에서 5' 방향으로 표준 고체상 DNA 방법을 사용하여 합성하고, 커플링은 표준 β-시아노에틸 포스포르아미다이트 화학을 이용하였다. 플루오로사이드 포스포르아미다이트 및 스페이서 (예를 들면, 헥사에틸옥시-글리콜 포스포르아미다이트, 트리에틸옥시-글리콜 포스포르아미다이트, 폴리에틸렌 글리콜 포스포르아미다이트) 및 링커 (예를 들면, 5'-아미노-개질제(Modifier) 포스포르아미다이트 및 티올-개질제 S2 포스포르아미다이트)를 아세토니트릴에 용해시켜 0.1 M 용액을 제조하고, 하기 합성 주기를 사

용하여 연속적 순서로 첨가하였다: 1) 디클로로메탄 중 디클로로아세트산으로 5'-디메톡시트리틸 보호 그룹의 제거, 2) 다음 포스포르아미다이트를 아세토니트릴 중 활성화제 시약으로 커플링, 3) P(III)를 산화시켜 요오드/피리딘/물과 함께 안정한 P(v)를 형성함, 및 4) 임의의 미반응된 5'-하이드록실 그룹을 아세트산 무수물/1-메틸로이미다졸/아세토니트릴로 캡핑(capping)함. 합성 주기를 전체 길이 올리고플루오로사이드 구조물이 어셈블리될 때까지 반복하였다. 쇄 어셈블리의 말단에, 모노메톡시트리틸 (MMT) 그룹 또는 디메톡시트리틸 (DMT) 그룹을 디클로로메탄 중 디클로로아세트산으로 제거하였다.

[0531] 화합물을 제어된-기공 유리 (controlled-pore glass; CPG) 지지체 상에서 0.2umol 스케일로 표지된 에펜도르프 튜브에 제공하였다. 400 μL의 20-30% NH_4OH를 첨가하고, 온화하게 혼합하였다. 오픈 튜브를 55℃에서 약 5 분 동안 또는 과량의 가스가 유리될 때까지 위치시키고, 이어서, 밀폐시키고, 2hr (+/- 15 min) 동안 인큐베이팅하였다. 튜브를 열 블록으로부터 제거하고, 실온으로 도달하게 하고, 이어서, 13,400 RPM에서 30 초 동안 원심분리하여 상청액 및 고체를 통합시켰다. 상청액을 조심스럽게 제거하고, 표지된 튜브 내로 위치시키고, 이어서, 150 μL 아세토니트릴을 첨가하여 지지체를 세척하였다. 세척물을 튜브에 첨가한 후, 이들을 CentriVap 장치 내로 40℃에서 건조될 때까지 위치시켰다.

[0532] 생성물을 ESI-MS (표 2 참조), UV-흡광도, 및 형광 분광분석으로 특성화하였다.

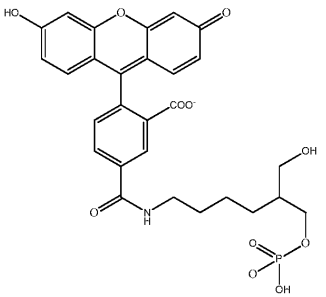
[0533] 실시예 2

[0534] 화합물의 스펙트럼 시험

[0535] 건조된 화합물을 150 μL의 0.1M Na_2CO_3 완충액에 재구성하여 약 1 mM 스톡(stock)을 제조하였다. 농축된 스톡을 0.1 x PBS 중에 50x 희석시키고, NanoDrop UV 분광기 상에서 분석하여 흡광도를 판독하였다. 흡광도 판독을 소광 계수 (각 FAM 단위에 대해 75,000 M^{-1} cm^{-1}) 및 비어 법칙과 함께 사용하여 스톡의 실제 농도를 측정하였다.

[0536] 계산된 스톡 농도로부터, 약 4mL의 5 μM 용액을 0.1M Na_2CO_3 (pH 9) 중에서 제조하고, 1 x 1 cm 석영 큐벳에서 Cary 60 UV 분광기 상에서, 300nm 내지 700nm의 스펙트럼 범위를 사용하여 분석하여, 그룹에 대한 전체 흡광도를 측정하였다. 이들 5 μM 용액으로부터, 두번째 희석물을 Cary Eclipse 형광측정계 상 스펙트럼 분석을 위해 50nM 또는 25nM 중 어느 하나(또한 0.1M Na_2CO_3에서, pH 9)에서 제조하였다. 여기를 494nm로 설정하고, 방출 스펙트럼을 499 내지 700nm에서 수집하였다.

[0537] 도 1 및 도 2는 대표적인 구조 (I)의 화합물 및 비교 화합물 ("화합물 A")의 UV 흡광도를 제공한다. 도 1 및 2에 나타낸 바와 같이, 2개의 플루오레세인 모이어티를 포함하는 대표적인 구조 (I)의 화합물의 UV 소광 계수는 대략적으로 화합물 A의 두배이다.

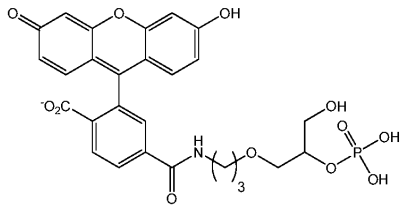
[0538] 

[0539] 화합물 A

[0540] 대표적인 구조 (I)의 화합물의 형광 방출 스펙트럼을 또한 측정하고, 화합물 A의 방출 스펙트럼과 비교하였다. 도 3 및 4의 데이터로 입증된 바와 같이, 대표적인 구조 (I)의 화합물의 형광 방출은 화합물 A보다 더 높고, 방출은, 트리에틸렌 글리콜 또는 헥사에틸렌 글리콜 단위의 수가 증가함에 따라 증가한다. 이론에 결부시키는 것을 원하지 않지만, 이러한 형광 방출의 예상치못한 증가는 L^4로 제공된 공간 거리와 연관된 내부 켄칭의 감소에 관련된다는 것을 고려한다.

[0541] 화합물 I-10 및 I-11을 시험하여 화합물의 UV 흡광도 및 형광 방출에 미치는 M 모이어티의 수의 효과를 측정하였다. 도 5는 5 μm에서 화합물 I-10 및 I-11의 UV 흡광도를 단일 M 모이어티를 갖는 비교 화합물 ("화합물

B")과 비교하는 데이터를 제공한다. 5uM에서, 단일 FAM 단위를 포함하는 화합물 B는, 0.43 AU에서 흡광된 반면, 화합물 I-10 (3개의 FAM 단위)은 1.17 AU에서 흡광되고, 화합물 I-11 (5 FAM 단위)은 2.00 AU에서 흡광되었다.

[0542] 

[0543] 화합물 B

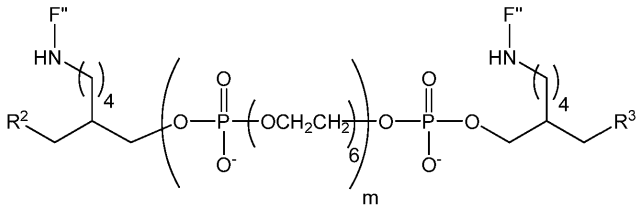
[0544] 25 nM에서 화합물 I-10, I-11 및 B에 대한 형광 방출 스펙트럼은 도 6에 제시한다. 켄칭 보다는 (보다 밀접한-간격의 FAM 단위가 수행되기 때문에), 화합물 I-10 및 I-11은, 화합물 B의 값과 비교하여, 각각 2.5x 및 4.3x까지 증가된 방출 응답을 나타내었다.

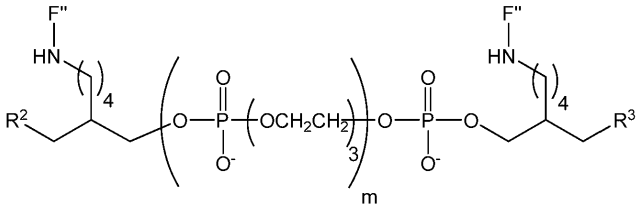
[0545] 실시예 3

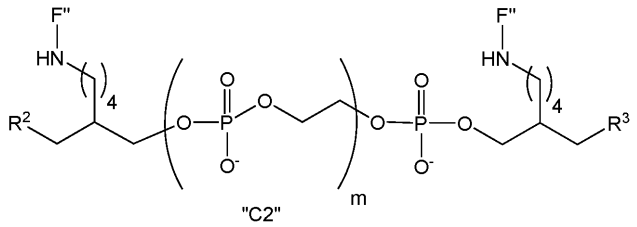
[0546] 비교 형광 방출 응답

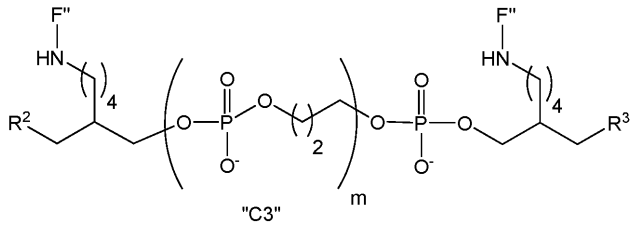
[0547] 화합물 "HEG," "TEG," "C2," "C3," "C4" 및 "C6" (여기서, R^2 및 R^3은 화합물 I-3에 대해 정의된 바와 같고, m은 1 내지 9로 가변적이다)을 제조하고, 이들의 형광 방출 스펙트럼을 측정하였다. 결과를 도 7에 제시한다. 데이터는, 다른 염료 화합물에 비해 더 적은 반복 스페이서 모이어티 (즉, 더 낮은 값의 m)를 갖는 본 발명의 실시형태에 따른 화합물 (즉, HEG 및 TEG)이 증가된 형광 방출을 갖는다는 것을 나타낸다.

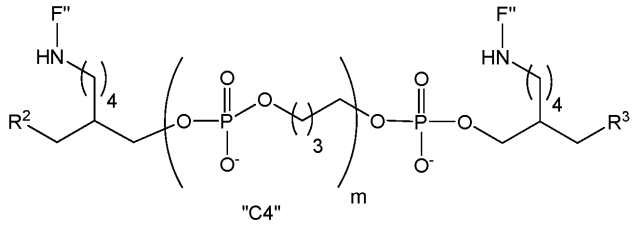
[0548] 도 8은, 화합물 A에 비해 (50nM, pH = 9), "HEG" 화합물 (여기서, m은 1, 2 또는 3이다)에 대한 형광 방출을 비교하는 데이터를 제공한다. 데이터는, m이 2 초과인 화합물 A에 비해, HEG에 대한 형광 방출의 증가를 나타낸다.

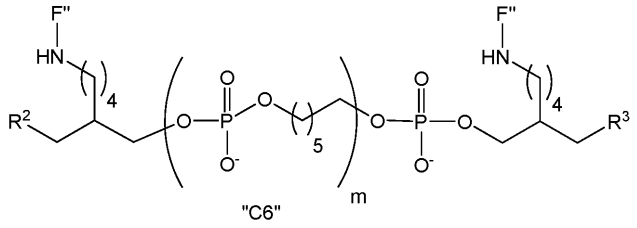
[0549] 
"HEG"


"TEG"









[0550]

[0551] 실시예 4

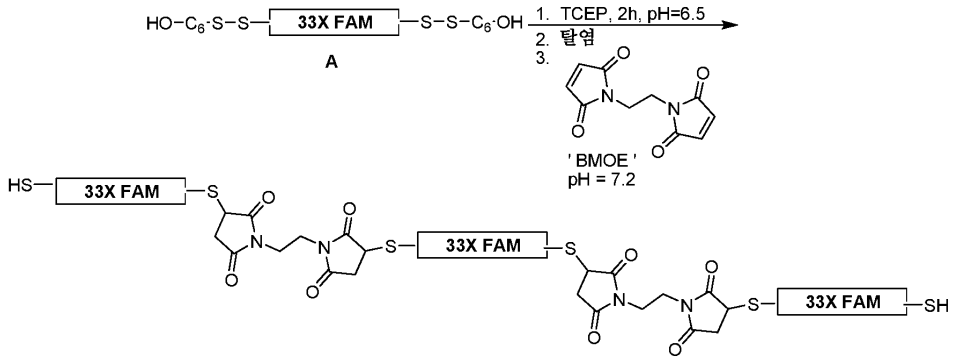
[0552] 대표적인 화합물의 제조

[0553] 화합물 I-29, I-32 및 대표적인 유사체를 제조하고, 시험하여 화합물 (여기서, L^4는 긴 링커 (약 1,000 달톤 PEG)이다)이 더 짧은 L^4 링커를 갖지만 다중 반복된 (즉, m은 1 초과이다) 화합물과 유사한 성질을 갖는지 여부를 결정하였다. 도 9는 화합물 I-60, 화합물 I-46 및 화합물 B에 대한 UV 흡광 데이터를 제공한다. 데이터는, 긴 L^4 링커를 갖는 화합물이, 다중 반복을 갖지만 더 짧은 링커의 반복을 갖는 화합물과 유사한 UV 흡광도를 갖고, 대조군 화합물 B에 비해 둘 다의 화합물은 증가된 흡광도를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0554] 실시예 5

[0555] 99-MER 염료의 제조

[0556] 33 플루오레세인 모이어티를 갖는 화합물 I-42는, 본원에 기술된 표준 고체-상 올리고뉴클레오티드 기술을 사용하여 제조하였다. I-42 (하기 반응식에 "A"로 나타냄)를 하기에 예시되고 기술된 바와 같이 삼량체화하여 99-mer 염료를 형성하였다.



[0557]

[0558] 200μL 폴리프로필렌 튜브에 나트륨 포스페이트 완충액 (3.5μL, 100mM, pH=6.5) 및 I-42 비스-디설파이드의 용액 (5.5μL, 물 중 0.18 mM)을 위치시켰다. 여기에 트리스(2-카복시에틸)포스핀 (TCEP, 1.0μL, 물 중 10mM) 용액을 첨가하였다. 튜브의 뚜껑을 덮고, 와류시키고, 실온에서 2h 동안 인큐베이팅되게 하였다. 혼합물을 micro Zeba Spin 탈염 칼럼 (Pierce, Cat# 89877)을 통해 탈염시켰다. 탈염 용액을 나트륨 포스페이트 완충액 (2.0 μL, 500mM, pH=7.2) 및 비스말레이미도에탄 (BMOE, 1.0 μL, 0.25mM)의 DMSO 용액으로 처리하고, 밤새 실온에서 인큐베이팅하였다. 반응 혼합물을 물 (100μL)로 희석하고, PAGE로 분석하였다 (도 10, Invitrogen EC6875, 10% TBE-우레아 겔, 180V 상수, 최고 MW 종의 분해능 완료로 전기 영동 중단, UV 조명 (365nm)으로 가시화).

[0559] 임의의 목적하는 수의 염료 모이어티를 갖는 다른 올리고머 염료를 유사한 방식으로 제조한다.

[0560] 실시예 6

[0561] 일반적인 유세포분석 방법

[0562] 달리 언급하지 않는 한, 하기 실시예에서 하기 일반적인 절차를 사용하였다.

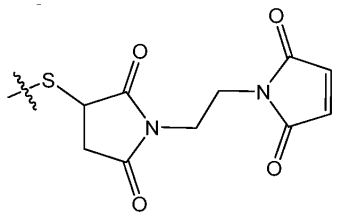
[0563] 전혈의 용해:

[0564] 완충된 암모늄 클로라이드 방법. 살아있는 세포의 염색을 위해, 에틸렌디아민테트라아세테이트 (EDTA) 항응고된 정상 사람 혈액을 암모늄 클로라이드 용액 (ACK), 15 mL 혈액 내지 35 mL 용해물로 15 min 동안 실온 (RT)에서 벌크(bulk) 용해시킨다. 세포를 50% 행크 밸런싱 염 용액 (HBSS) 및 0.02% 나트륨 아지드를 갖는 50% 1% 소 태아 혈청 (FBS) 1x 둘베코 포스페이트-완충된 염수 (DPBS)로 2회 세척하였다. 이어서, 세포를 공여자 혈장에서 100μL/시험/0.1-1x10e6으로 재-현탁시켰다. 혈장 중 세포를 폴리프로필렌 96 웰 HTS 플레이트에서 100μL 1% 소 혈청 알부민 (BSA)의 V_f 및 0.02% 나트륨 아지드를 갖는 1x DPBS에 대해 미리-희석된 항체에 첨가하였다. 45 min. 동안 RT에서 인큐베이팅 후, 세포를 50% HBSS 및 0.02% 나트륨 아지드를 갖는 50% - 1% FBS 1x DPBS로 2회 세척하였다.

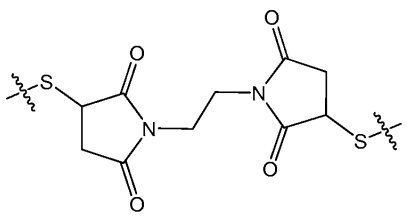
[0565] 용해/고정 방법. 혈액을 1.0 mL RBC 용해 용액 (암모늄 클로라이드), 100 - 15 mL 혈액 내지 35 mL 용해물로 15 min 동안 RT에서 용해시켰다. 이어서, 세포를 50% HBSS 및 0.02% 나트륨 아지드를 갖는 50% - 1% FBS 1x DPBS로 2회 세척하였다. 이어서, 세포를 공여자 혈장 중 100μL/시험/1x10e6으로 재-현탁시켰다. 미리-희석된 항체를 100μL 1% BSA 및 0.02% 나트륨 아지드를 갖는 1x DPBS에서 첨가하였다. 100μL 세포를 96 웰 폴리프로필렌 HTS 플레이트 (총 200μL 시험 크기)에 첨가하였다. 45 min. 동안 RT에서 인큐베이션 후 세포를 50% HBSS 및 0.02% 나트륨 아지드를 갖는 50% 1% FBS 1x DPBS로 2회 세척하였다.

[0566] 항체 접합체의 제조:

[0567] 항체 접합체를 Q 모이어티를 포함하는 구조 (I)의 화합물을 목적하는 항체와 반응시켜 제조하였다:

[0568] 

[0569] 따라서, 화합물 및 항체를 하기 링크 구조를 형성하기 위해 항체 상 S를 Q 모이어티와 반응시켜 접합시킨다:

[0570] 

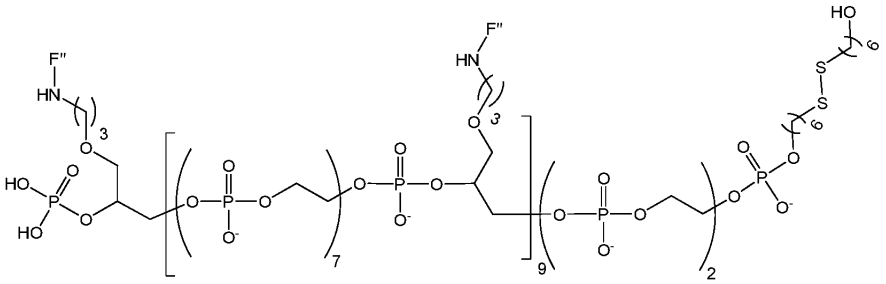
[0571] 항체 접합체를 화합물 수에 따른 항체 명칭으로 나타낸다. 예를 들면, UCHT1-I-45는 화합물 I-45 및 UCHT1 항체 사이의 형성된 접합체를 나타낸다. 표 2에서 참조 화합물 수가 상기 Q 모이어티를 포함하지 않는 경우, Q 모이어티가 설치되고 접합체가 Q 모이어티를 갖는 수득된 화합물로부터 제조되었음을 이해할 수 있다.

[0572] 접합체의 희석:

[0573] 항체를 RT로 가져왔다. 항체 접합체를 세포 염색 완충액 (1X DPBS, 1% BSA, 0.02% 나트륨 아지드) 중 0.1-540 nM 범위의 농도로 희석하였다 (시험당 8.0 마이크로그램 이하). 일부 실시예에서, 각 샘플에 대한 일련의 희석을 세포 염색 완충액 중 269 nM 항체에서 시작하고, 항체 희석을 사용까지 광 보호된 상태로 유지하였다. 다른 실험에서, 희석을 4.0 μg 항체/시험 크기에서 사용하고, 시험 크기는 100-200 μL 범위이다. 역가를 2배 또는 4배 희석으로 수행하여 결합 곡선을 생성하였다. 일부 경우에, 8.0 또는 2.0 μg /시험 크기를 일련의 희석으로 첫번째 웰에서 사용하였다.

[0574] 접합체를 사용한 유세포분석:

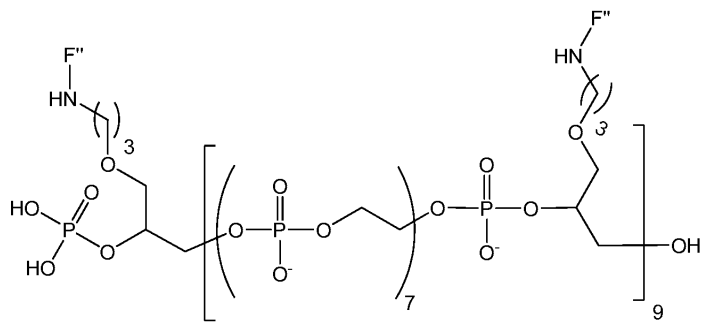
[0575] 물리적 특성화 후, 접합체를 활성 및 관능성 (염료의 항체 결합 친화도 및 명도)에 대해 시험하고, 참조 항체 염색과 비교하였다. 이어서, 분해능의 품질을 유세포분석기(flow cytometer)를 사용하여 자동-형광 음성 대조군과 비교하여 명도 및 다른 비-특이 결합을 검토하여 측정하였다. I-45를 시험한 경우 마우스 IgG1,k 이소형 대조군 MOPC-21 접합체의 대규모 연구는 포함되지 않았는데, 그 이유는 MOPC-21 비-특이 결합이 조기 시험에서 UCHT1-화합물 C 및 UCHT1-I-45의 시험 동안 특성화되기 때문이었다. I-45 접합체를 주카트 T 세포, 라모스 B 세포, 및 사람 혈액에서 백혈구 이종 집단 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에서 시험하고, 폴리스티렌 염소-항-마우스 Ig 코팅 비드를 사용하였다. 전혈 선별은 UCHT1 I-45 및 이의 유사체를 시험하기 위해 가장 일반적이다. 브릿징 연구는 신규 구조가 형성되는 경우 수행하였다. 추가의 유세포분석 방법을, 접합체 (UCHT1-I-56, I-48, I-49, I-16, 및 I-21B)를 시험하고 Sony Biotechnology로부터 항체 접합체 참조 (UCHT1-FITC) 및 대부분 연구에서 사전 특성화된 주요 브릿징 참조(예를 들면, UCHT1-I-45, UCHT1-I-49)와 비교하는 경우, 사용하였다.

[0576] 

[0577] 화합물 C

[0578] 유리 염료 유세포분석 수행:

[0579] 분자 및 물리적 특성화 후, 염료를 또한 참조 염료 염색과 비교하여 세포에 대한 잠재적 친화도에 대해 시험하였다. 염료가 또한 세포 프로브로서 기능하고 세포 물질에 결합하는 잠재성을 갖기 때문에, 염료를 일반적으로 특정한 특성을 확인하기 위해 고 농도 (>100nM-내지-10,000nM)에서 혈액에 대해 선별할 수 있다. 이어서, 자동-형광 음성 대조군, 및 유세포분석기를 사용하는 다른 염료 대조군을 비교하여 희석시 명도 및 선형성을 평가하여 예상하거나 예상하지 못한 오프 표적 결합을 검증하였다. 화합물 D (화합물 C 비함유 염료, 그러나 비-관능화됨)의 연구는 염료의 브라이트 오프(bright off) 표적 결합에 대한 양성 대조군이고, 접합체 형태인 경우 사전에 특성화되었다. 세포가 용해 및 고정 용액으로 처리되는 경우, 및 혈액이 숙성되는 경우, 또는, PBMC 단핵구 집단에 적용되는 경우, I-45 염료를 사람 혈액 중 백혈구 이종 집단에서 시험하였다. 친화도 순위 브릿지 연구 (화합물 D, I-45, I-49, 및 I-16)를 염료 로트 비교에 대해, 화합물 D를 특성화하는 경우 매우 조기 연구로부터의 염료를 포함면서 수행하였다.

[0580] 

[0581] 화합물 D

[0582] 유세포분석 작업 흐름:

[0583] 세포를 배양하고, 염료 선별 또는 오프 표적 결합 (나타내지 않은 데이터)을 위해 대사 스트레스의 가시적 징후에 대해 관찰하거나, 신선한 건강한 세포를 접합체 선별을 위해 사용하였다. 세포를 주기적으로 계수하여 세포 밀도를 체크하였다 (1 x 10e5 및 1 x 10e6 생존 세포/mL). 염색 완충액 (DPBS, 0.1% BSA, 0.02% 나트륨 아지드) 중 세포를 수거하기 전에 항체 접합체를 희석하였다 (바람직하게는 플레이트 또는 튜브에). 80-85% 생존력 범위를 갖는 세포를 사용하였다. 세포를 원심분리하고 완충액으로 세척하여 세포를 2회 세척하여, pH 지시자를 제거하고, 세포를 Ig 및 FBS에 포함된 다른 단백질로 블록킹하였다. 세포 밀도를 조정하여 염색 완충액 중에 크기를 시험하였다. 세포를 플레이팅하고, 웰당 하나로 시험하거나, 염료 (미리-희석된)를 플레이트 중 세포에 적용하였다. 이어서, 세포를 45 min 동안 23℃에서 인큐베이팅하였다. 세포를 원심분리하여 세척 완충액으로 세척하여 세포를 2회 세척하고, 이어서, 플레이트를 흡인하였다. 세포를 획득 완충액 중에 재-현탁시켰다. 5000개 온전한 세포를 유세포분석으로 획득하였다.

[0584] 염료의 형광을 525/50 통과대역 필터를 사용하여 검출된 피크 방출 (521 nM)을 사용한 유세포분석에 의한 488 nM 블루 레이저 라인으로 검출하였다. 3000-5000 온전한 세포의 표적 획득을 갖는 적어도 1500 온전한 세포를, 유세포분석으로 획득하고, 분석하여 세포 제제에 존재하는 생존 세포를 확인하였다.

[0585] 데이터 분석 방법:

[0586] 기술 통계학. EC-800 소프트웨어로 사용자는 각 샘플 획득을 위한 다수의 통계학적 데이터를 수집한다. FL1-A 채널에서 평균 또는 중앙 형광 강도 (MFI)를 사용하여, 유세포분석에서 정보를 얻는 경우 및 노이즈가 보고되는 경우 항체-염료 시약의 명도를 측정하였다. 다른 통계학은 중앙 신호-대-노이즈 및 절대 형광 (중앙 또는 기하 평균)을 포함하는 염료 특성 및 시약의 전반적 품질을 측정하기 위해 평가하였다.

[0587] 히스토그램. 유세포분석 사건은 전방 대 측면 스캐터 (세포 용적 대 세포 입도)에서 크기에 따라 게이팅되었다 (gated). 이어서, 이들 세포를 평균 형광 강도 (MFI)에 대해 515 nm에서 형광 방출에 의해 게이팅하였다. 수집된 데이터를, x-축상 로그 스케일로 나타낸 형광 강도에 대한 y-축상 사건의 수로서 플롯팅하여 이중 파라미터 히스토그램으로서 제시한다. 데이터를 친화도 곡선, 또는 상대 형광 강도의 히스토그램으로 요약할 수 있다.

[0588] 결합 곡선. MFI를, 항체-염료 시약의 명도를 가장 잘 측정하는 파라미터로서 선택하고, FCM로 정보를 얻는 경우, 이는 기하 평균, 중앙, 또는 평균으로 표현될 수 있고, 절대 형광 측정치를 나타낸다. 비교를 위해, 노이즈가 고도로 특성화되는 경우, 신호-대-노이즈 비는 MFI, S/N로서 보고된다.

[0589] 2-변량, 이중 파라미터 히스토그램. 일부 경우에, FCM 사건을 정성적 아웃풋을 평가하기 위해 게이팅하지 않았고, 데이터는 염료 형광에 대한 세포 입도 (SSC)로 표현된다. 이러한 방법은 전혈에서 회수된 모든 집단의 전반적 평가를 가능하게 한다.

[0590] 실시예 7

[0591] $MgCl_2$ 구배로 UCHT1-I-16으로 염색되고 현미경관찰법로 영상화된 고정된 PMBC

[0592] PBMC를 2% p.f.로 고정하고, 세척하고, 1xPBS로 2x 원심분리하였다. 이어서, 세포를 침투/블록킹 완충액으로 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 mAbs, DAPI, 및 Biolegend CD14 항체를 갖는 1% BSA 1XDPBS로 인큐베이팅하여 단핵구를, 1 hr 공동-염색하였다. UCHT1은 둘 다의 표면, 및 세포내 CD3를 표지화하고, 고정된 단백질의 NSB로 수행되는 것으로 예상된다. 블랙 96 편평한 웰 플레이트에서 UCHT1-염료-항체를 $MgCl_2$ 구배 (0-1000mM)로 인큐베이팅하였다. 세포를 항체-$MgCl_2$ 혼합물에 첨가하고, 1 시간 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 1xPBS (2가 양이온 부재)로 2회 세척하였다. 10ul Prolong Gold DAPI를 첨가하고, 5 min 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 1xPBS로 2x 세척하였다. 이어서, 세포를 투명 96 편평한 웰 플레이트에, 1xPBS 중에 플레이팅하고, 10x 대물렌즈 (100x 총 배율)로 영상화하였다. 도 13, 14, 및 15를 참조한다. 주카트 T 세포를 사용한 유사한 방법을 또한 사용하였다 (도 16).

[0593] 실시예 8

[0594] $MgCl_2$ 구배 중 UCHT1-I-16로 염색되고 현미경관찰법으로 영상화된 WBC 또는 PBMC

[0595] 웰당 150,000 내지 200,000 파라포름알데히드 고정되고 (1x DPBS 중 2%에서 1-24 시간 동안 2-8℃에서), 저장

된 (2-8℃ < 7일) WBC 또는 PBMC를 염화마그네슘 ($MgCl_2$) 구배로 UCHT1-I-16으로 염색하였다. 세포를 2000 RPM (600 RCF)에서 5 분 동안 원심분리하고, 1x DPBS로 세척하고, 다시 한번 원심분리하고, 블록킹 완충액 (1x DPBS + 1% FBS + 0.02% 나트륨 아지드) 중에 재-현탁시켰다. 세포를 완충액 중 RT에서 40 분 동안 인큐베이팅하였다.

[0596] 개별적으로, 1.5mL 에펜도르프 튜브에서, $MgCl_2$를 1x PBS + 1% FBS + 0.02% 나트륨 아지드 중에서 목적하는 농도 (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 또는 1000 mM)로 희석하고, UCHT1-I-16 (A4 분획, 로트 C0042 170105MFJ, 1.39mg/mL, DOL 3.07)을 각 희석물에 0.7 μg 또는 1.0 μg으로 첨가하였다. 혼합된 용액을 RT에서 40 분 동안 암실에서 인큐베이팅하였다. 40 분 인큐베이션 후, 세포를 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 이어서, 세포를 $MgCl_2$ 용액의 각각의 적정에서 재-현탁시켰다. 샘플을 45 분 동안 RT에서 암실에서 인큐베이팅하였다. 세포를 600 RCF에서 5 분 동안 원심분리하고, 800 μL의 1x DPBS로 2회 세척하였다. 세척 후, 세포를 100 μL의 1x DPBS에서 재-현탁시키고, 96-투명 편평한 웰 플레이트에 영상화를 위해 위치시켰다. 영상을 100x의 총 배율을 위한 10x 대물렌즈를 사용하여 500ms의 노출시간에 MetaMorph™ 영상화 소프트웨어를 사용하여 영상을 촬영하였다. Nikon 필터 큐브 96311 B-2E/C를 플루오레세인의 검출을 위해 사용하였다. 영상을 ImageJ 영상화 소프트웨어 (제조원: NIH)를 사용하여 분석하였다. 모든 영상을 동일한 방식으로 처리하였다. 배경 제거를 50 픽셀로 사용하였다. 영상을 8-비트 영상으로 전환시키고, 14의 역치를 할당하였다. 세포 수 및 통합 강도를 영상마다 분석하고, 히스토그램을 GraphPad™을 사용하여 플롯팅하였다. 단지 PBMC 데이터를 명확하게 하기 위해 도면에 나타내지만, WBC 실험을 유사한 결과를 갖는 PBMC 연구 전에 수행하였다 (나타내지 않은 데이터).

[0597] 실시예 9

[0598] 특이적 결합을 위한 $MgCl_2$ 용액 중 항체의 평가 및 유세포분석에 의한 형광 분해능

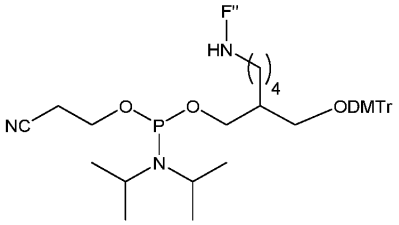
[0599] 항체를 $MgCl_2$ 용액 (pH 7.5) 중 유세포분석에 의해 특이 결합 및 형광 분해능에 대해 평가하였다. 주카트 세포를 ATCC에 제공된 지시에 따라 배양하고 살아있는 것을 수거하였다. 염색을 세포를 접합된 항체에 적용한 경우 수행하였고, 세포를 $MgCl_2$ 중 저장되고, 인큐베이팅하고, 세척하고, 유세포분석으로 획득하였다.

[0600] $MgCl_2$를 15 mL 폴리프로필렌 튜브에서 1x PBS 중에 목적하는 농도 (0, 10, 25, 50, 또는 100 nM)로 희석하고, pH를 측정하고 pH 7.5로 일정하게 유지하였다. 이어서, 90 μL $MgCl_2$를 96 웰 폴리프로필렌 플레이트의 각 웰에 분배하였다. 항체를 첫번째 웰에 첨가하고, 각 농도의 $MgCl_2$에서 일련의 희석을 수행하고, 사용 전에 40 분에서 RT에서 저장하여, 항체를 $MgCl_2$ 용액으로 사전-처리하였다. UCHT1-I-51, -I-56, 및 -I-49 항체 분획을 일련의 8.0 μg/시험 (100 μL의 V_f에 대해 조정된 C)에서 출발하여 희석하였다. 세포를 T-25 플라스크로부터 수거하고, 이어서, 세척하고, 1% FBS 세척 완충액에서 RT에서 2회 원심분리하여 (225 RCF) 단백질로 세포를 블록킹하고, 대사 억제제 나트륨 아지드로 처리하였다. 상청액을 원심분리 후 제거하였다. 세포를 인큐베이션을 위해 BSA 염색 완충액 중 $1\text{-}3x10^5$ 세포/10 μL 시험으로 재-현탁시키고, 이어서, $MgCl_2$ 용액에 첨가하고 (90 μL 항체 및 10 μL 세포의 100 μL V_f에 대해), 와류시키고, RT에서 40 분 동안 암실에서 인큐베이팅하였다. 혼합물을 원심분리하고, 1.6 mL BSA 염색 완충액으로 225 RCF에서 5 분 동안 2회 세척하고, 상청액을 제거하였다. 세포를 세척하고, 800 μL의 1x DPBS로 한번 더 원심분리하고, 0.1% BSA 및 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 400 μL 1x DPBS 중에서 재-현탁시키고, 유세포분석으로 획득하였다. 데이터를 획득하고, SONY EC-800 유세포분석 분석기 상에서 평가하고, 설명 분석을 위해 Microsoft Excel로 내보냈다. I-51 및 I-56의 비교 결과를 도 17에 나타낸다. I-51, I-56, 및 I-16의 비교 결과를 도 18에 나타낸다.

[0601] 실시예 10

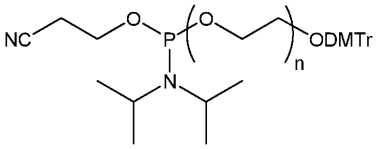
[0602] 포스포르아미다이트 및 화합물의 제조

[0603] 예시적인 화합물을 표준 고체-상 올리고뉴클레오티드 합성 프로토콜 및 하기 구조를 갖는, ChemGenes (Cat.# CLP-9780)로부터 구입되는 플루오레세인-함유 포스포르아미다이트를 사용하여 제조하였다:



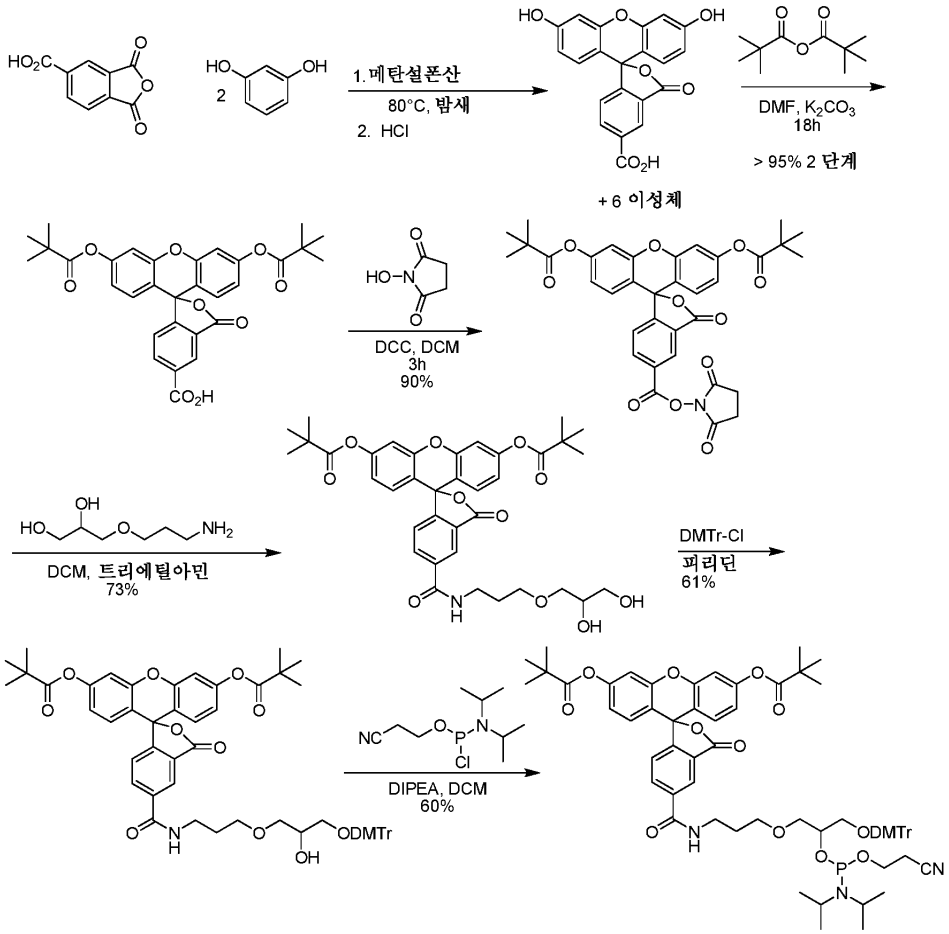
[0604]

[0605] 예시적인 링커 (L^4)는 또한 시판되는 하기 구조를 갖는 포스포르아미다이트와 커플링시켜 화합물에 포함되었다:



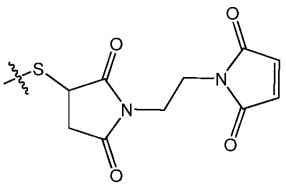
[0606]

[0607] 다른 예시적인 화합물을 하기 반응식에 따라 제조된 포스포르아미다이트를 사용하여 제조하였다:



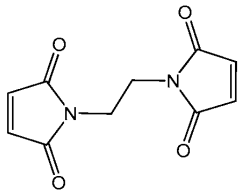
[0608]

[0609] 최종 탈보호는 목적하는 F" 모이어티를 제조한다. 화합물의 다양한 부분을 설치하기에 적합한 다른 시판되는 포스포르아미다이트 시약을 이용한다. 하기 구조를 갖는 Q 모이어티는:



[0610]

[0611] 다음 화학식을 유리 설프하이드릴과 반응시켜 설치된다:



[0612]

[0613] 다른 Q 모이어티는 당해 기술분야의 숙련가의 지식에 따르는 유사한 방식으로 설치된다.

[0614] 실시예 11

[0615] 주카트, 신선한, 살아있는 세포. UCHT1 I-16 분획, $MgCl_2$ 부재의 하나 및 $MgCl_2$ 존재의 하나를 비교하고, 또한 I-21B 및 다른 오른쪽 참조와 비교함(도 23 참조). 모든 항체를 동일한 표본을 사용하여 동일한 플레이트 상 함께 시험하였다. I-16을 접합 동안 적용된 $MgCl_2$에서 유세포분석에 의한 특이 결합 및 형광 분해능에 대해 평가한다. $MgCl_2$를 접합 동안 2개 스테이지로 단지 UCHT1 I-16에 적용하였다: (1) 말레이미드 (물 + 0.1M $MgCl_2$) 접합과의 반응물을 재-현탁시키는 경우. (2) 정제 및 용리, 및 PBS 중 0.1 $MgCl_2$에서 저장 동안. 항체를 세포 함유 완충액으로 $MgCl_2$의 임의의 추가 적용 없이 BSA 염색 완충액으로 희석시켰다. 유동 방법: 주카트 T 세포를 American Type Culture Collection (ATCC)에 의해 제공된 지시에 따라 배양하고, 살아있는 것을 수거한다. 간략하게, 염색을 세포를 접합된 항체에 적용하고, 인큐베이팅하고, 세척하고, 이어서, 유세포분석으로 획득된 경우 수행하고: 항체 분획을 일련의 2.0 μg/시험으로 시작하여 희석하였다 (100 μL의 V_f에 대해 조정된 C). 세포를 T-25 플라스크로부터 수거하고, 세척하고, 1% FBS 세척 완충액 중 실온에서 (RT) 2회 원심분리하여 (225 RCF), 세포를 단백질로 블록킹하고, 대사 억제제 나트륨 아지드로 처리하였다. 상청액을 원심분리 후 제거하였다. 세포를 인큐베이션 동안 BSA 염색 완충액 중 $1\text{-}3x10^5$ 세포/100 μL 시험에 재-현탁하고, 이어서, 항체에 첨가하고, 와류시키고, RT에서 40 분 동안 암실에서 인큐베이팅하였다. 혼합물을 원심분리하고, 1.6 mL BSA 염색 완충액으로 225 RCF에서 5 분 동안 2회 세척하고, 상청액을 제거하였다. 세포를 세척하고, 800 μL의 1xDPBS로 한번 더 원심분리하고, 이어서, 0.1% BSA 및 0.02% 나트륨 아지드를 포함하는 400 μL 1xDPBS에 재-현탁시키고, 유세포분석으로 획득하였다. 데이터를 획득하고, SONY EC-800 유세포분석 분석기로 평가하고, 기술 분석을 위해 Microsoft Excel로 내보냈다. 2.47의 DOL, f/p 25를 갖는 UCHT1 I-16 분획 A5는, UCHT1 I-21B, 분획 A5, DOL 3.0, f/p 30과 동등하거나 더 밝은 형광을 나타내었다. 접합 동안 $MgCl_2$의 첨가는 UCHT1 I-16, 분획 A6, DOL 4.18, f/p 42(여기서, $MgCl_2$는 존재하지 않는다)와 비교하여 UCHT1 I-16을 향상시킨다. 이러한 발견은, UCHT1 I-16이 I-51 및 I-21B 둘 다보다 흐릿하지만, $MgCl_2$가 항체를 정제하는데 사용된 경우가 더 밝다는 이전 실험에서 관찰된 것 때문에, 실질적으로 유의하다.

[0616] 실시예 12

[0617] 유세포분석에 의한 BB515 및 FITC에 대한 I-16의 비교

[0618] 일반적으로, 도 19, 및 20-24는 표지화 정도 (degree of labeling; DOL)의 약간의 차이를 갖는 양이온의 상이한 배치를 갖는 접합체의 3개 빌드의 결과를 나타내고, 이어서, 유세포분석으로 시험하였다 (상기됨). 간략하게, I-21B, BB515, 및 FITC에 대한 I-16의 비교를 수행하였다. 신선한 혈액의 세포외 염색 또는 세포를 염색하고, 용해시키고, 세척하고, 이어서 45 min 동안 실온에서 인큐베이팅하고, 이어서 다시 세척하였다.

[0619] 비교는 (상기한 바와 같이) 사람 CD3 발현에 대해 표지화하는 경우 CD3+ T 세포 및 주카트 T 세포 (도 23에서 주카트 T 세포) 상 WBC에서이다. UCHT1-I-16 및/또는 I-21A 및 I-57을 UCHT1-BB515 및 UCHT1-FITC와 비교하였다. UCHT1-I-16이 UCHT1-BB515보다 1.7x 더 밝고, UCHT1 FITC보다 5.7x 더 밝다는 것을 발견하였다. 상기 지시한 바와 같이, $MgCl_2$는, 제조 프로세스에서 상이한 상에 존재하였다 (예를 들면, 접합, 정제 동안 용리, 및/또는 저장, 예 C+E+S+로서 축약됨). 도 19를 참조한다.

[0620] 도 20a 및 20b는 C+E+S+를 UCHT1-I-16 및 UCHT1-1-21A의 C+E-S-와 비교함을 나타낸다. 반면 도 21는 배치 C+E+S+, C+E-S-, 및 C+E-S-를 사용하는 UCHT1-1-16의 3개지 접합 수행을 C+E+S+의 첫번째 시도 수행, 접합 양성 대조군 참조와 비교하여 입증한다.

[0621] 도 22는 신호 대 노이즈보다는 절대 형광을 측정하기 위해 적용된 유세포분석에 의한 추가 실험 절차를 나타낸다. 칼리브레이션 곡선을 가용성 형광단의 등가량으로 적정된 표지된 비드의 집단을 사용하여 측정하였다. 비드를 개별적인 등가량 수준의 형광단의 채널을 확인하기 위한 유세포분석에 의한 데이터의 획득에서와 동일한 조건으로 획득하였다. 비드에 의해 생성된 표준 곡선의 평가, 도 21에서와 유사한 실험으로부터의 데이터의 평가를 파워(power) 선형 회귀를 사용하는 계산으로 재-표현하였다. 이러한 방식, 3개의 프로세스 배치에 대한 가용성 형광단의 분자 등가량 (Molecular Equivalents of Soluble Fluorophore; MESF) 추정은, 3개의 로트에 대해 측정할 수 있다. UCHT1-I-16 UCHT1-1-16 로트 (1번째, 2번째, 3번째)의 각각 배치 C+E+S+, C+E-S-, C+E-S-, 이어서, BB515 (하나의 로트) 및 FITC (2개의 로트)와 비교하였다. 이러한 방법은 FITC보다 더 밝고, BB515에 등가인 8-10x의 절대 명도를 나타낸다.

[0622] 도 23은 음성 대조군, I-51, I-21B, 및 I-16, 및 양성 대조군 참조 FITC로서 다른 (C-E-S-) 배치와 비교하여 UCHT1-I-16 (C+E+S+)을 나타낸다. C+E+S+ 배치는 이러한 경우에 30의 표적 f/p과 비교하는 경우 이론적인 형광 수준을 초과하지만, C-E-S- 배치는 이론적으로 암시하는 것만큼 밝지 않다.

[0623] 도 24는 3개의 로트 시험된 A, B, 및 C를 나타내고, 이는 접합으로부터의 2개의 분획을 나타낸다. 이론적인 S/N은 C+E-S- 배치에 의해 초과되었다.

[0624] 전반적으로, 배치에서 양이온을 포함하는 이들 접합체는 유세포분석에 의해 다른 접합체보다 더 밝고, 용리 및 저장은 인큐베이션 동안 고 농도의 표적화 모이어티에서 단지 약간 유리한 것으로 관찰된다. 이는 접합체 배치 사이의 선형 회귀를 사용하여 상이한 분석 방법으로 측정되지만, 데이터는 나타내지 않는다.

[0625] 실시예 13

[0626] 올리고플루오로사이드 염료는 마그네슘과 함께 공동-적용시 유세포분석에 의해 이온 센서 및 높은 분해능인 것으로 입증된다

[0627] 생체-접합에 적용된 대안적인 반응의 생산성을 시험하였다. 물 및 0.1 M 염화마그네슘을 프리-말레이미드 활성화된 염료의 동결건조 상태로부터 재-구성 동안 첨가하고, 이어서, 생체-접합을 위해 환원제 처리된 항체 (TCEP)를 적용하였고, 항체 접합체가 아마도 전하 차폐 또는 루이스산 배위의 동일한 효과 때문에 항체 접합체를 개선시키는다는 가설을 세웠다. 또한, 유리 설프하이드릴 그룹과의 반응에 도입하기 전에 폴리포스페이트 전하 차폐로부터 가능하다. 요약하면, 접합 시도는 말레이미드 접합 반응 및 유세포분석 (FCM)을 사용하는 분석적 절차에서 염색을 위한 항체 접합체의 후속적 적용에서 추가로 사용하기 위해 매우 밝은(ultrabright) 형광단 중합체를 개질하는데 적합한 마그네슘을 나타낸다.

[0628] 방법: 실험을 다음 접근법으로 안내하였다:

[0629] 1) 10x 염료에 대한 UCHT1 항체 접합 표지화의 프로세스에서 마그네슘 포함 시스템을 선택하고, 동시에 5.0 미만의 표지에 대한 최종 염료 (DOL) 사양을 표적화함

[0630] 2) 세포 상 CD3 항원의 염색 방법 이전 및 동안 항체에 적용되는 마그네슘을 선택함. 분석적 절차에서 이온의 간섭 연구.

[0631] 3) 용액 중 접합체의 형광 방출 평가.

[0632] 상기한 것은 염료 형태 및 후속적 검정 아웃풋에 영향을 주는 항체 개발 프로세스에서 3개 의문점을 나타낸다. 이러한 시스템 접근은 1) 염료가 항체와 상호작용하는 방법을 변경하고, 2) DOL의 표적화를 개선시키고(효율적인 표지화), 3) FCM의 형광 분해능을 개선시킬 (신호, 및 항체 친화도를 개선시킴) 접합 방법을 추정한다.

[0633] 접합 방법: 염료를 물 + 0.1M $MgCl_2$에 재-현탁시키고, 이어서, 항체와 배합하고, 1시간 동안 0℃에서 인큐베이팅하였다 (최종 $MgCl_2$ C 약 25 mM). 접합체를 정제하고, 1x PBS 완충액을 사용하는 10x 300 nm Superdex 200 컬럼 상에서 용리하였다. 분획을 미세-원심분리기 바이알에서 수집한다. 일부 분획을 풀링하고(pooled), 30k MWCO 농축기를 사용하여 농축한다. 여기서, 마그네슘 상 용리 및 저장을 적용하고, 용리 완충액은 0.1 M $MgCl_2$를 포함하고, 및/또는 저장 완충액을 $MgCl_2$로 0.1 M의 C_f에 대해 스파이크하였다(spiked). 접합체의 농도를 Nano Drop 2000을 사용하여 측정한다. 흡광 값을 280 nm 및 495 nm에서 기록한다. 10x 염료에 대한 0.19의 보정 계수 (OD280/OD495) 및 비어 법칙의 원리를 사용하여 단백질에 대한 형광색소 (f/p) 비 = (표지 상 염료, DOL)를 측정하였다. 예를 들면, 3의 DOL은 30의 f/p와 동등하다.

[0634] 형광 연구: 살아있는 주카트 T 세포, 및/또는 칼륨 완충된 암모늄 클로라이드 용해된 (ACK) 전혈 세포 (WBC) 및 다른 WBC 모델을 사용하여 접합체를 제조한 후 FCM에서 형광 분해능을 입증하였다. 세포를 사용하여 인큐베이션하고 세척된 $MgCl_2$를 사용한 연구는, 검정에 2가 양이온을 첨가한 즉각적 효과를 모니터링하였다. 도 17 및 18을 참조한다. 대조적으로, 용액 연구에서 (완충액 단독에서) 스펙트럼을 수행하여 2가 양이온의 존재 및 부재하에 흡광 및 방출 스펙트럼을 산출하였다. 도 25b 및 27B를 참조한다. 유사하게, 최종 획득 완충액의 연구 (FCM에 의한)를 이용하여, 항체가 세포에 결합되는 경우, 판독 동안 이온 포함 또는 제외의 실질적인 결과를 나타내었다. 도 27a 및 28을 참조한다.

[0635] 접합 연구: 일반적으로, 3개의 로트를 일련의 상이한 배치로 제조하고, 이전 물질과 비교하였다. 프로세스 개선을, 본원 발명의 표준 말레이미드 UCHT1 (항-CD3) 생체-접합 내로 상이한 포인트에서 $MgCl_2$를 도입하여 조사하였다. 접합 시스템 등가 및 브릿징(bridging) 연구를 일련의 단계로 수행하여 이전에 확립된 본원 발명의 접합 방법을 사용하여 FCM에 의해 분해능을 최적화하였다. 도 21, 20b, 23, 24, 및 25a를 참조한다. 마그네슘을 비교를 위해 상이한 접합 시스템에서 접합 프로세스에 적용하였다. 시험된 시스템은 (C+E+S+), (C+E-S-), (C+E-S+)였다 (접합+용리+저장+($C_{onjugation}$+E_{lution}+S_{torage}+)으로서 두문자어(acronym)로 표현됨). f/p (표지 상 염료)를 본 발명자들의 실험실에서 이전에 확립된 비-$MgCl_2$ 말레이미드 반응의 TCEP 및 말레이미드 화학양론에 대한 이전 관찰을 기초로 한 각 시스템에서 표적화하고, 표적 DOL보다 2-4 등가량 더 높은 초기 표지화 정도 (DOL)까지 표적화하고 최종 DOL < 5.0을 제한한다. 일부 실험에서, 다른 테더 길이 (4x, 6x, 10x) 염료를 1x I-16의 테더 길이 제한과 동시에 시험하였다. (나타내지 않은 데이터).

[0636] 3개 시스템의 아웃풋의 데이터 분석을 다음을 사용하여 설명한다; 표지 효율에 대한 염료 [실제 DOL/접합에서 적용된 DOL]*100, 형광 강도 (상대 방출) (도 25a), FCM에 의한 신호-대-노이즈 (S/N) (CD3+ 집단의 중앙 신호/중앙 노이즈 CD3- 집단), 시스템, 및 다른 성능 파라미터 사이의 S/N의 회귀 분석을 평가하였다 (예를 들면, 비특이 결합의 정도).

[0637] 비드 표준(Bangs Laboratories)에 접합된 FITC를 사용하는 FCM 채널의 추가 정량화를 사용하여 10x FAM UCHT1 I-16의 등가량 가용성 형광색소의 분자 (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome; MESF) 아웃풋을 FCM에 의해 측정하였다. 도 22을 참조한다.

[0638] 결과: 조기 연구는 $MgCl_2$ (0-100 mM)가 항체 및 항원 인큐베이션 동안 존재하는 경우 지시하고, FCM 방법을 계속하여 세척 제거하고, 신호 향상 효과를 25-100 mM에서, 특히 고 농도의 항체 (염료)에서 관찰하고, 도 17 및 18를 참조한다. 접합: 염료 재구성, 접합, 용리, 저장의 모든 스테이지에서 $MgCl_2$를 포함하는 추가 예비 연구 [시스템 (C+E+S+)으로 기호화]는 이전 관찰된 $MgCl_2$의 부재하의 것 보다 우수한 성능의 매우 밝은 참조 (ultrabright reference) 항체의 제조를 나타내었다.

[0639] 예비 연구에서 관찰된 바와 같이 $MgCl_2$이 명도에 미치는 긍정적인 효과를 가질 것이라는 가정에서, 이에 따라, 본 발명자들은 추가 로트 (C+E+S+)를 제조하고, 동시에 낮은 DOL (즉, 1-3)을 표적화하여 [이론적인 염료 대 단백질 등가량 4.5:1] 과도한 접합을 피하고 항체 친화도의 변화를 제한하여 우수한 시약의 생산을 예상하였다. 유세포분석에 의한 다시 밝은 S/N은 DOL이 1.4-2.7 (f/p 14-27)의 범위인 30의 f/p에 대한 실질적인 형광 아웃풋을 야기하였다. S/N은 f/p 6.2을 갖는 FITC와 비교하여 이론적인 값을 초과하고, FITC 대조군보다 더 높은 4.8의 이론적인 명도 인자 (30/6.2)를 초과한다.

[0640] 이어서, 잠정적인 이온 간섭 연구를 I-16 (C+E-S-) 대 (C+E-S+)를 사용하여 수행되고, 잠재적으로 프로세스에서 조건으로서 용리를 제외하고, 저장이 중요한지를 알아본다. 본 발명자들은, (C+E-S-)가 (C+E-S-), (C+E+S+)와 비교하여 기대되는 바와 같이 작동하고 (높은 분해능을 위해 용리가 필수적이지 않음), 저장에서 스파이크 제형 (C+E-S+)을 원래 참조 시험으로 사용하였다는 것을 입증하고, 도 21을 참조한다. 결과는 잔류 양의 마그네슘이 FCM을 위해 저장된 물질의 희석 동안 존재하는 경우 세포를 사용한 인큐베이션에서 신호에 거의 이점이 없음을 나타낸다. 이들 결과를 미루어 볼 때, 접합에서 적어도 $MgCl_2$를 포함하는 것은 성능에 실질적인 이득이 있을 수 있고, 반면 용리 및 저장은 따로 고려(set aside)할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0641] 따라서, 본 발명자들이 이론적인 염료 대 단백질 등가량 7:1을 사용하여 더 간단한 시스템 (C+E-S-)에서 마그네슘을 포함시켜 DOL을 증가시킬 수 있음을 추정하였다. 따라서 추가 로트는 배치(C+E-S-)를 사용하여 최종 높은 DOL (3-5)을 목표로 하여 만들고, 스파이크(spiked-in)-저장 분획은 또한 저장 효과의 후기 재-확인을 위해

(C+E-S+)를 따로 고려된다(set aside) (인큐베이션 동안 존재하는 잔류 마그네슘). 일반적으로 신호는 UCHT1-I-16에 대해 예상한 바와 같이, 유지되었다. 저장 및 인큐베이션 신호 향상을 또한 이전과 같이 재확인하였지만, 시스템(C+E-S- ~ C+E-S+)의 전반적인 동등성에서 거의 중요하지 않다. 동일한 실험에서 UCHT1 I-16 첫번째 및 두번째 로트의 비교는 다시 낮은 DOL 1-3 시약 및 $MgCl_2$의 포함이 초과하는 UCHT1 BB515 (BD Biosciences) S/N 결과에 도움이 되는 것을 확인하였고, 이들 둘 다 시스템에 대한 FITC 대조군를 기초로 하는 30의 이론적인 f/p를 추정하였다.

[0642] 3번째 로트를 배치 C+E-S-를 이론적인 염료 대 단백질 등가량 4.5:1에서 사용하여 제조하였다. 시스템을 첫번재 로트와 같이 DOL를 표적화하였다 (최종 DOL 범위 1-3). 다시, 향상된 UCHT1 I-16을 관찰하였다. I-16 염료 접합체가 $MgCl_2$를 사용하기 전에 염료 표지화 효율이 약 두배인 더 높은 FCM에 의한 분해능이라는 것을 실질적인 암시한다 (평균 절대 표지화 효율, 이전 = 24%, $MgCl_2$와의 접합의 3개의 세트를 비교함; 53%, 58%, 62%).

[0643] pH 7.4에서 $MgCl_2$의 C (0-1000mM)를 포함하는 PBS를 갖는 용액 중 접합체의 용액 적용, 흡수 및 방출 스펙트럼에서 모의하기 위한 다운스트림은, 신호의 향상보다는 이온 농도 의존 켄칭을 나타내었다. 용액 중 방출 데이터는 접합된 염료를 예상한 바와 같이 사전-정량화된 DOL (Nano Drop로 측정됨)에 의해 순위 매김할 수 있음을 나타내만, 첨가제 EDTA < $MgCl_2$ < $CaCl_2$에 의한 순위로 용액에서 켄칭되고, 각각의 구조 및 배치에 대해 고유한 방식으로 폴리-양이온성 차단제에 의해 영향을 받는다. 데이터는 나타내지 않는다. 이러한 관찰은 마그네슘의 존재 또는 부재하에 상이한 재현탁 완충액을 사용하는 FCM에 의한 샘플 획득에서 켄칭의 관찰과 일치한다. 도 27a, 27b, 및 28에서와 같이, 임의의 방법의 형광 가시화 동안 (용액 중에서, 또는 FCM에 의한 획득 동안) 존재하는 $MgCl_2$의 첨가는, 신호를 켄칭하였음을 나타내었다. 이들 관찰은 예비 연구 FCM와 대조적이고, 여기서, $MgCl_2$가 세포로 인큐베이션 동안 존재하는 경우 신호/노이즈를 향상시켰음을 관찰하였지만, 후속적으로 샘플 획득 전에 세척 제거하였다. 도 17 및 18을 참조한다.

[0644] 최종적으로, 상이한 배치의 조기 일련의 실험에서 제조된 로트로 예비 연구를 확인하기 위해, 접합체를 동일한 날에 동일한 물질, 및 동일한 정제 절차로 다시 병행 제조하였다. 단지 양이온 배치가 변하였다 (C-E-S- 대조군, 및 C+E-S-, C+E+S). 또한, 이전 실험적 발견에도 불구하고, 최종 f/p는, 표지화 정도의 혼란스러운 해석을 제거하기 위해 모든 접합체 (19.7 내지 24.7)에 걸쳐서 대략적으로 동일한 것으로, 표적화하였다. 이어서, 이들 접합체를 FCM으로 시험하였다. 일반적으로, 이러한 실험으로 $MgCl_2$를 시스템에 첨가하는 효과가 더 효율적인 형광 아웃풋을 갖는 표적화 모이어티를 제조하는데 유리하는 것을 확인하였다. 도 25a를 참조한다.

[0645] 최종적으로, $MgCl_2$는, 접합 반응에 첨가하기 전에 활성화된 염료를 용해시켜 사용되는 경우, 접합 표지화 효율을 개선시키고, 이에 따라, 조기 프로세스 인풋 및 효율적인 표지화 사이의 품질 관계를 뒷받침하고, 더 높은 분해능 형광이 후기 프로세스 아웃풋에서 관찰된다. 이들 관찰은 또한 생산성 개선이 성취될 수 있음을 입증하기 위한 연구의 첫번째 목적을 뒷받침한다. 도 26을 참조한다. Bangs™ 비드 FITC 표준 (Bangs Laboratories)을 사용하는 가용성 플루오레세인의 분자 등가량 (MESF)을 정량화하기 위한 FCM 채널의 장치의 동적 범위의 추가 정량화 및 특성화는, 접합체가 UCHT1 FITC f/p 6-7보다 8-10x 더 밝다는 것을 나타내었다. 이는 FCM에서 중앙 신호-대-노이즈로 측정된 절대 S/N에 의해 보고될 수 있는 것보다 더 밝다. 도 22를 참조한다.

[0646] 논의: 고 밀도 전하를 갖는 본래의 중합체는 높은 수용성이 되도록 설계되고, 따라서, 염이 도입되는 경우, 형태 변화가 예상될 수 있다. 이는 아마도 유사한 디자인의 낮은 전하 밀도 분자를 갖는 경우 (I-16)이지만 더 낮은 정도까지 그렇다. 이는 이온이 분석적 절차의 간섭을 야기할 수 있는 통상의 경우를 제시한다 (이러한 경우 CD3의 형광 및 검출). 절차에 대해 또는 시약 자체에 대해 화학적 적응에 의해 제거 또는 통제될 수 있는 간섭을 이용할 수 있다.

[0647] 요약하면, 마그네슘이 생체-접합된 염료 및/또는 항체를 양성으로 변경할 가능성이 있음을 고려한다. 추가로, 시험되는 중합체는 이온 감지 특성이 있고 약한 2가 이온 킬레이터이고, 유사한 pH의 다양한 완충제 제형에 민감하다. 이론에 결부시키지 않고, $MgCl_2$가 적용되는 경우 염료가 효율적인 접합을 위한 유리한 형태로 존재하고 항체 등전점의 변경을 제한하고 더 낮은 농도에서 항원 결합을 개선시키는 것을 이해한다. $MgCl_2$가 특정 조건하에 전하 차폐 및 염료를 안정화시켜서, 접합, 용리, 저장에서 또는 인큐베이션 동안 사용되는 경우, 항체의 친화도를 개선시키지만, 용액 중에 관찰하는 경우, 켄칭함을 상정한다.

[0648] 더 연구가 필요하지만, 이상적으로, 이들 화합물이, 검정에 적용하기 전에, 켄칭이 없고 다른 폴리-양이온과의

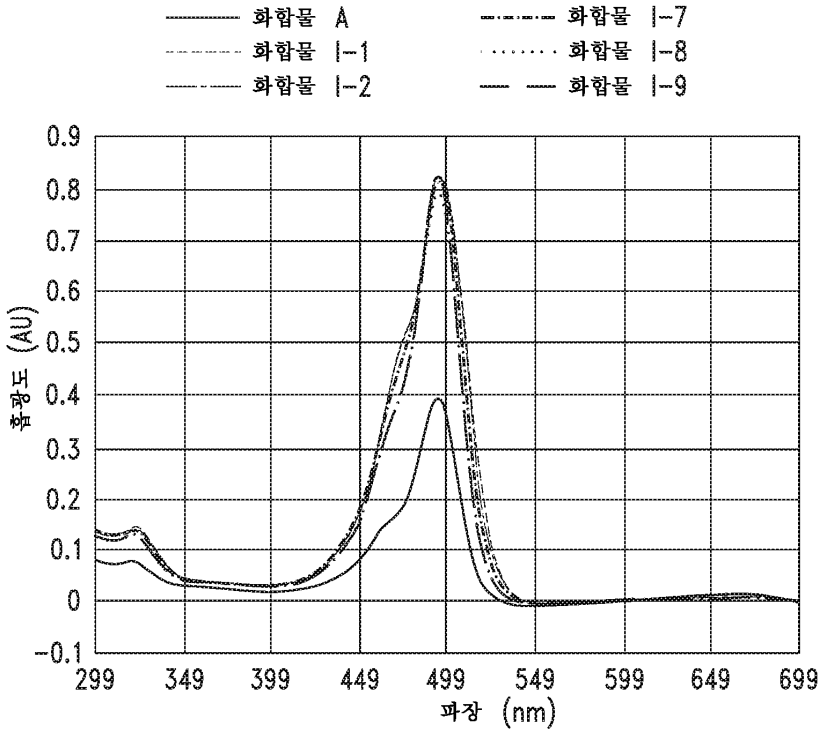
상호작용 없는, 안정화 (또는 전하 중화)된 이온 및 염 형태일 수 있는 경우, 염료의 이용 및 생체접합체의 제조를 상당히 개선시킬 수 있다. 아마도, 염색/용해/고정 절차 동안 혈장, 보충된 혈청, 블록, 또는 킬레이터가 존재하는 FCM 프로토콜, 특히 용해된 전혈에서, 본 발명자들은 염료의 이온과의 약간의 상호작용 (또는 이의 결핍)을 예상할 수 있다. 본 발명자들은 친화도의 손실 (적정에서 친화도 곡선으로 표현됨)과 같은 이러한 상호작용을 관찰하고, 염색/용해/고정/세척 절차를 겪는 신선한 세포에서 고정된 WBC와의 증가된 비-특이 결합은 증가한다. (나타내지 않은 데이터). 2가 양이온 및 폴리양이온이, 특히 용해된 적혈구로부터 방출된 혈장에, 또는 활성화된 세포에서, 또는 세포 표면 상에 존재하기 때문에, 유사한 이온성 상호작용을 예상할 수 있다. 사실상, 염료를 목표로 하는 마그네슘을 사용한 블록킹 또는 표적 기질을 목표로 하는 폴리-주쇄 블록은 혈장 및 복합 조직에서 간섭 인자에 대한 보호를 위해 적합할 수 있다. 추가로, 효과를 이용하기 위해 확인된 특정 방법론을 또한 면역조직화학, 및 조밀한 조직 섹션에서 특히 혹독한 고정/펌(perm) 방법 (메탄올)으로 수행할 수 있고, 여기서, 전하 차폐, 및 비-선형 더 큰 중성 하전 형태가 세포내 매트릭스를 통한 효율적인 확산을 위해 바람직하다. 최종적으로, 임의의 비-특이 결합 및 켄칭으로 인한 높은 배경 및 낮은 신호는 또한 인큐베이션 동안 마그네슘 세척, 또는 마그네슘 포함에 의해 잠재적으로 방해될 수 있다. 이는 고정된 및 침투된 조직에 존재하는 폴리-양이온과의 강한 이온성 회합을 야기하는 염색 조건에서 중요할 수 있다. 사실상, 2.0% 파라포름알데히드 고정, 적혈구 용해, 단리된 전혈 세포, PBMC, 및 주카트 T 세포를 사용한 관찰은 UCHT1-I-16 및 염화마그네슘으로 인큐베이팅된 세포 중 S/N의 향상을 나타낸다. 결과는 또한 2상(biphasic) 효과를 나타낸다; 낮은 농도에서, S/N는 낮지만, 100 mM-250 mM에서 향상되고, 이어서, 다시 1000 mM에서 켄칭된다. 이온성 회합이 예상되는 형태 변화에 의해 형광 강도를 교란한다(perturbing)는 것이 다시 확인된다. 도 13, 14, 15, 및 16을 참조한다.

[0649] 본원 명세서에 참조되고/되거나 출원 데이터 시트에 열거된, 2018년 3월 19일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/645,121을 포함하는, 모든 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비-특허 공보는 본원에 참조로서 이의 전문이 본 명세서에 일치하지 범위까지 포함된다.

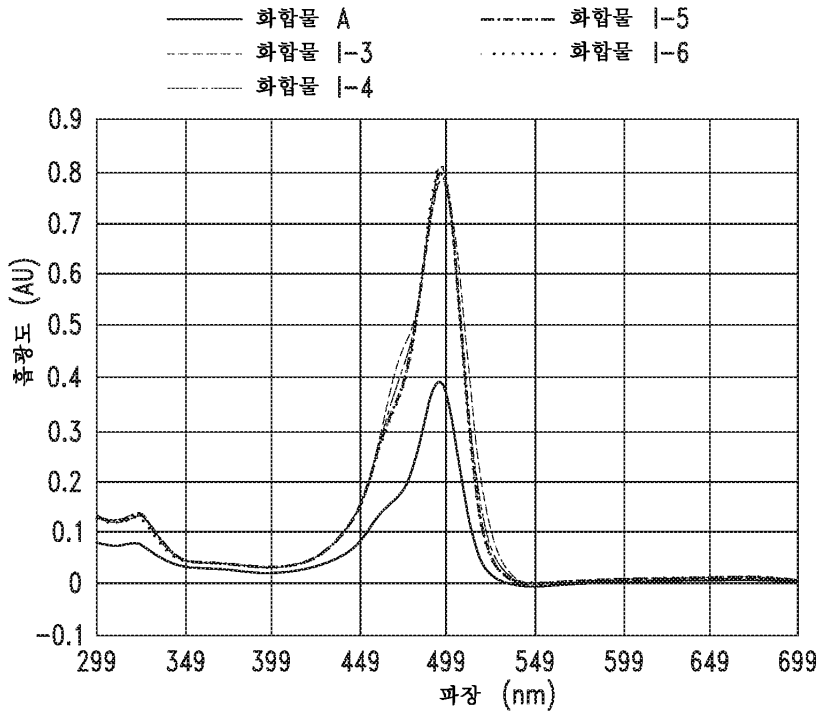
[0650] 상기로부터 본 발명의 특정 실시형태가 설명을 목적으로 본원에 기재되지만, 다양한 변형이 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수행될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구범위에 의한 것을 제외하고는 제한되지 않는다.

도면

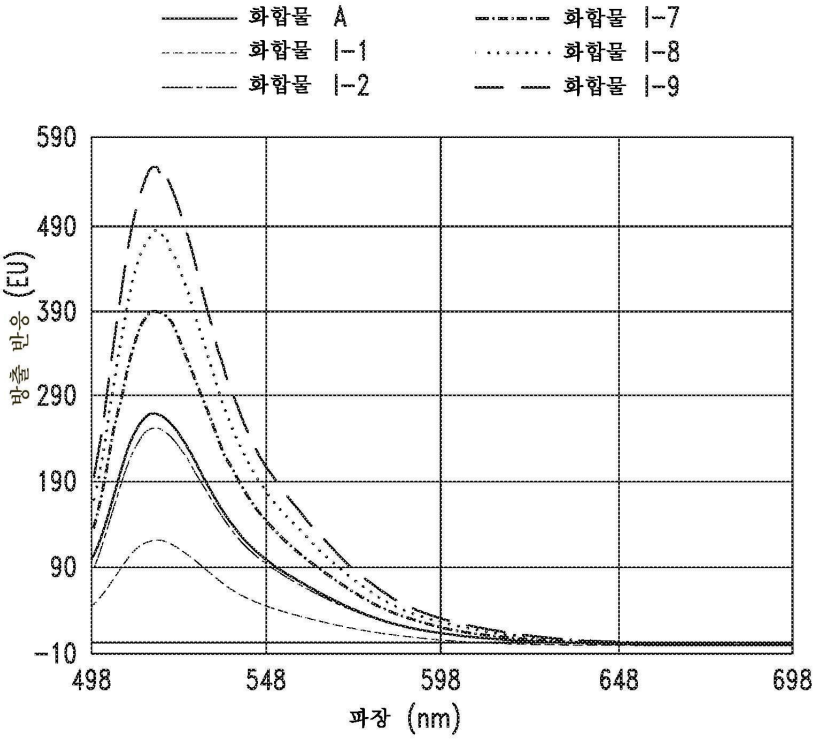
도면1



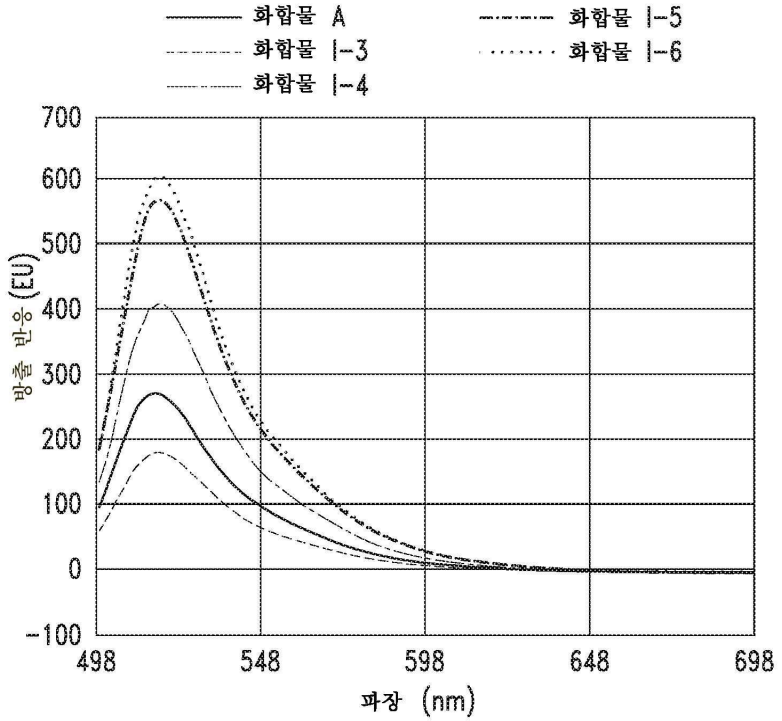
도면2


화합물 A
화합물 I-3
화합물 I-4
화합물 I-5
화합물 I-6
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
흡광도 (AU)
299
349
399
449
499
549
599
649
699
파장 (nm)

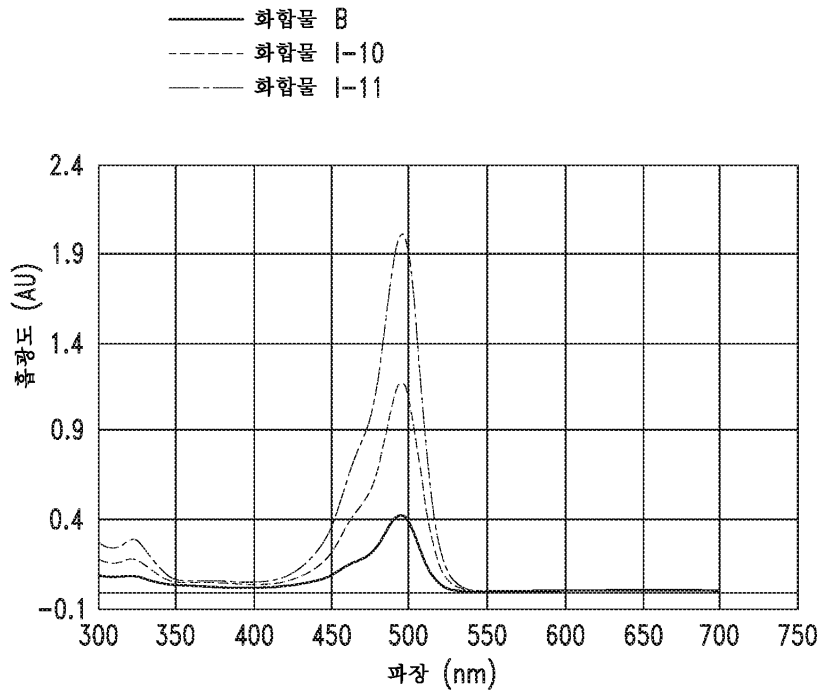
도면3


화합물 A
화합물 I-1
화합물 I-2
화합물 I-7
화합물 I-8
화합물 I-9
590
490
390
290
190
90
-10
발광 반응 (EU)
498
548
598
648
698
파장 (nm)

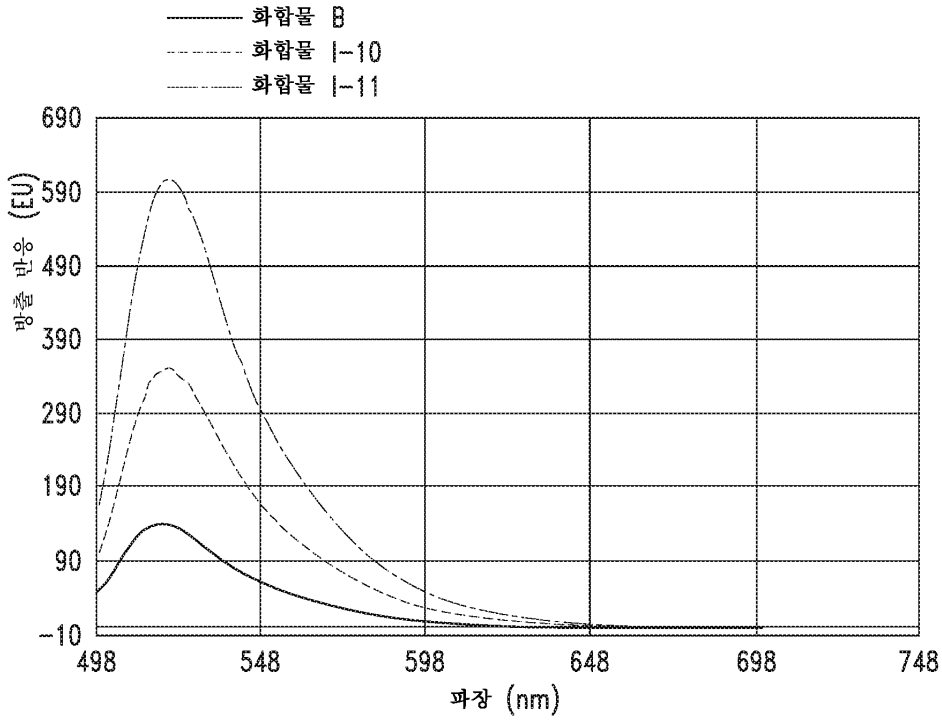
도면4


화합물 A
화합물 I-3
화합물 I-4
화합물 I-5
화합물 I-6
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
498
548
598
648
698
발광 반응 (EU)
파장 (nm)

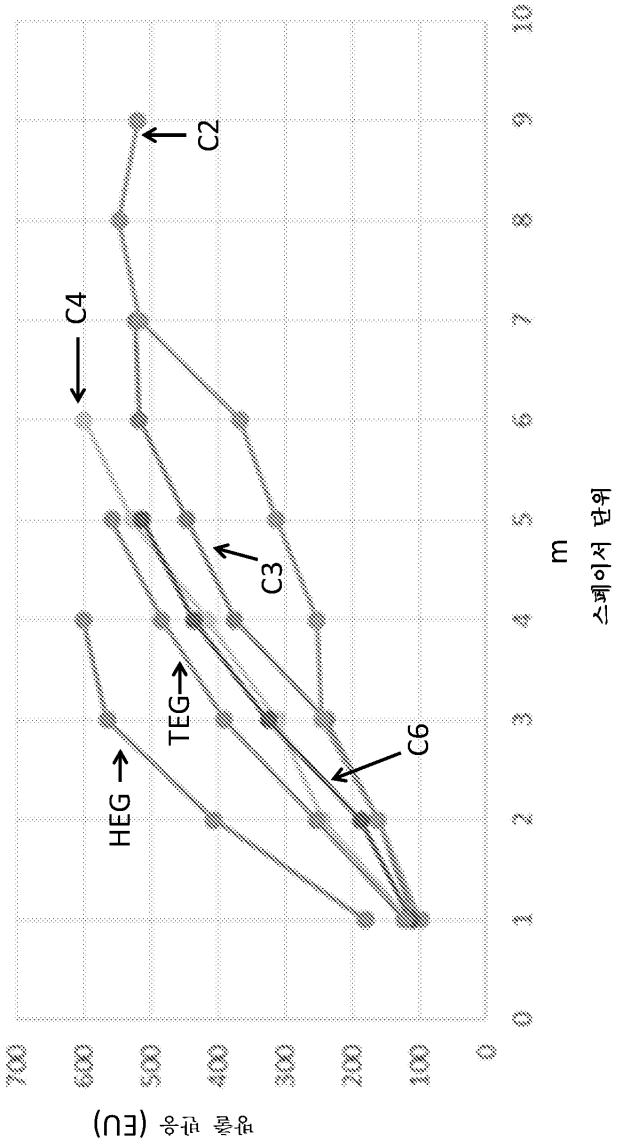
도면5


화합물 B
화합물 I-10
화합물 I-11
2.4
1.9
1.4
0.9
0.4
-0.1
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
흡광도 (AU)
파장 (nm)

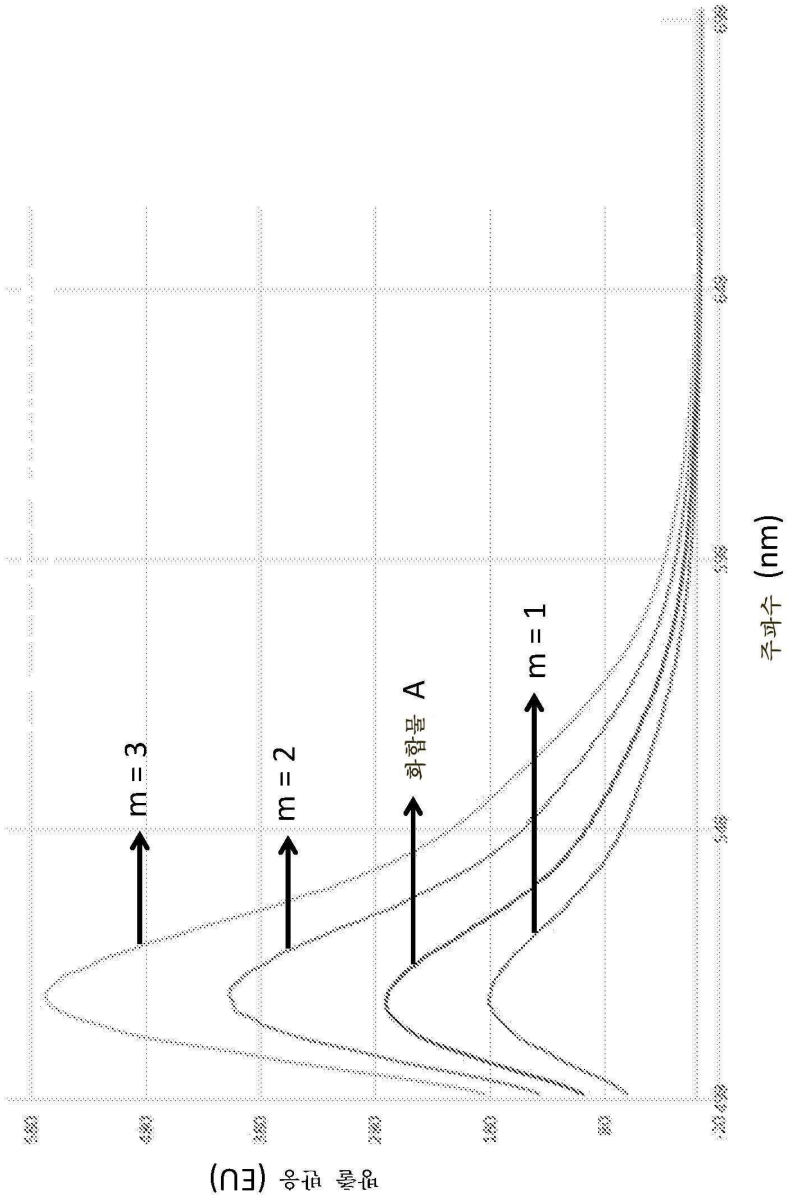
도면6


화합물 B
화합물 I-10
화합물 I-11
690
590
490
390
290
190
90
-10
방출 반응 (EU)
498
548
598
648
698
748
파장 (nm)

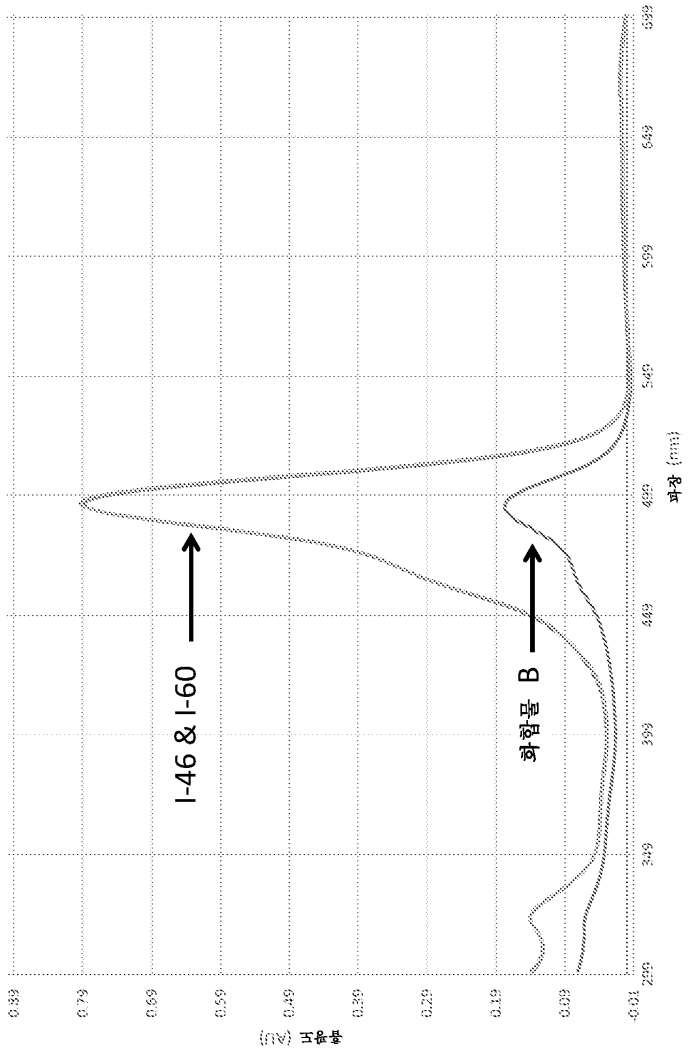
도면7


C2
C4
C3
TEG
HEG
C6
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
m
스페이서 단위
0
100
200
300
400
500
600
700
방출 반응 (EU)

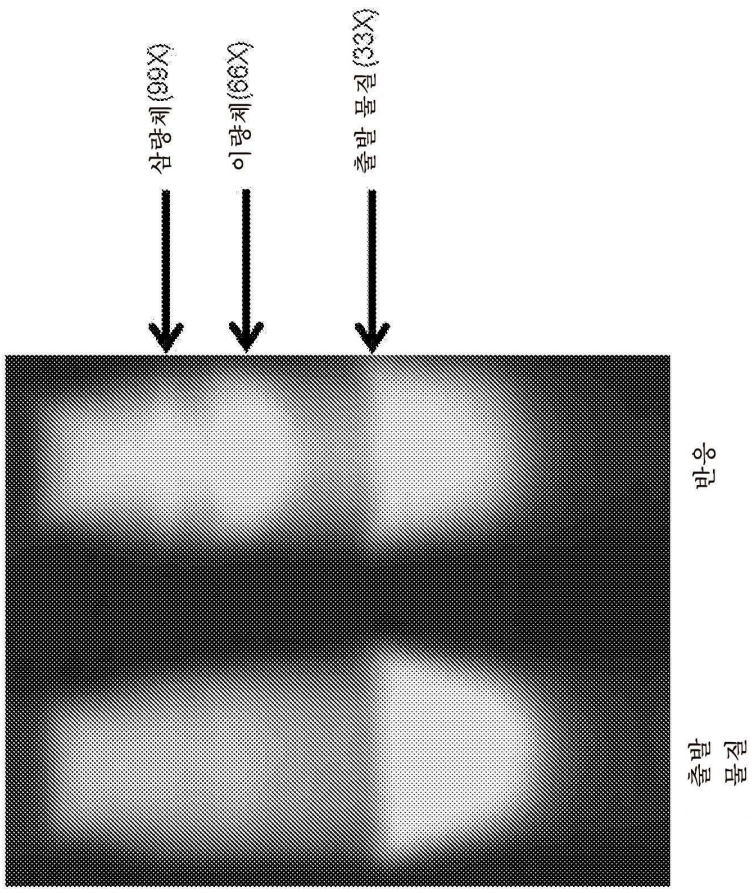
도면8



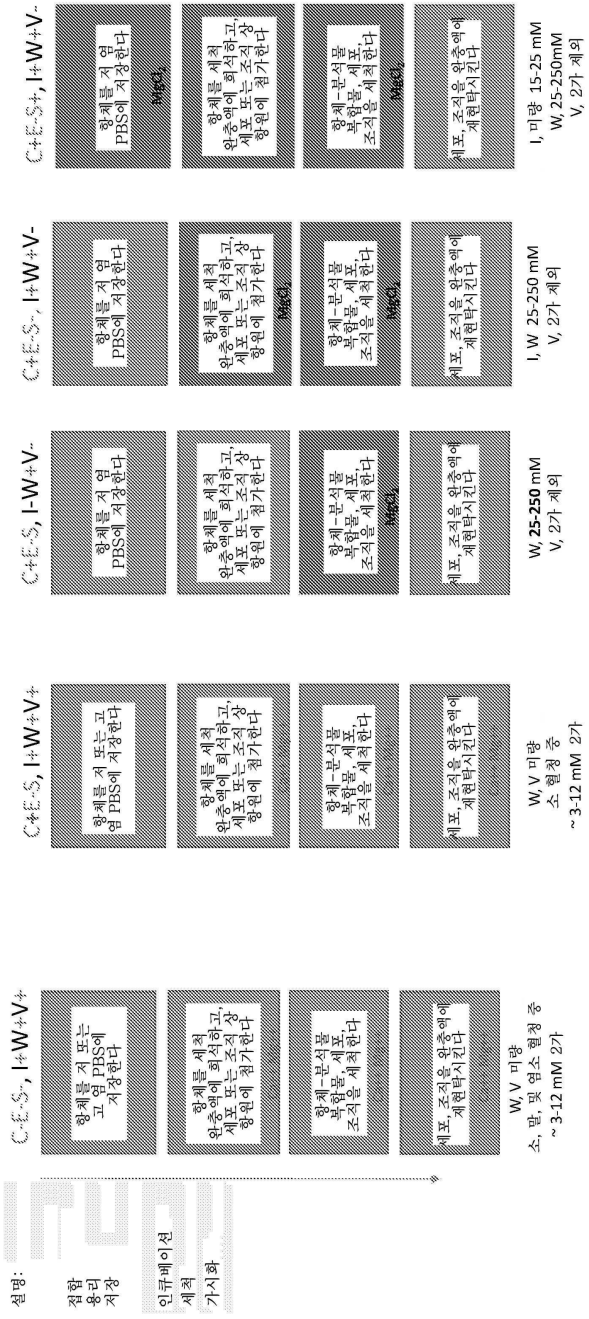
도면9


I-46 & I-60
화합물 B
흡광도 (AU)
0.83
0.79
0.69
0.59
0.49
0.39
0.29
0.19
0.09
-0.01
299
349
399
449
499
549
599
649
699
시간 (min)

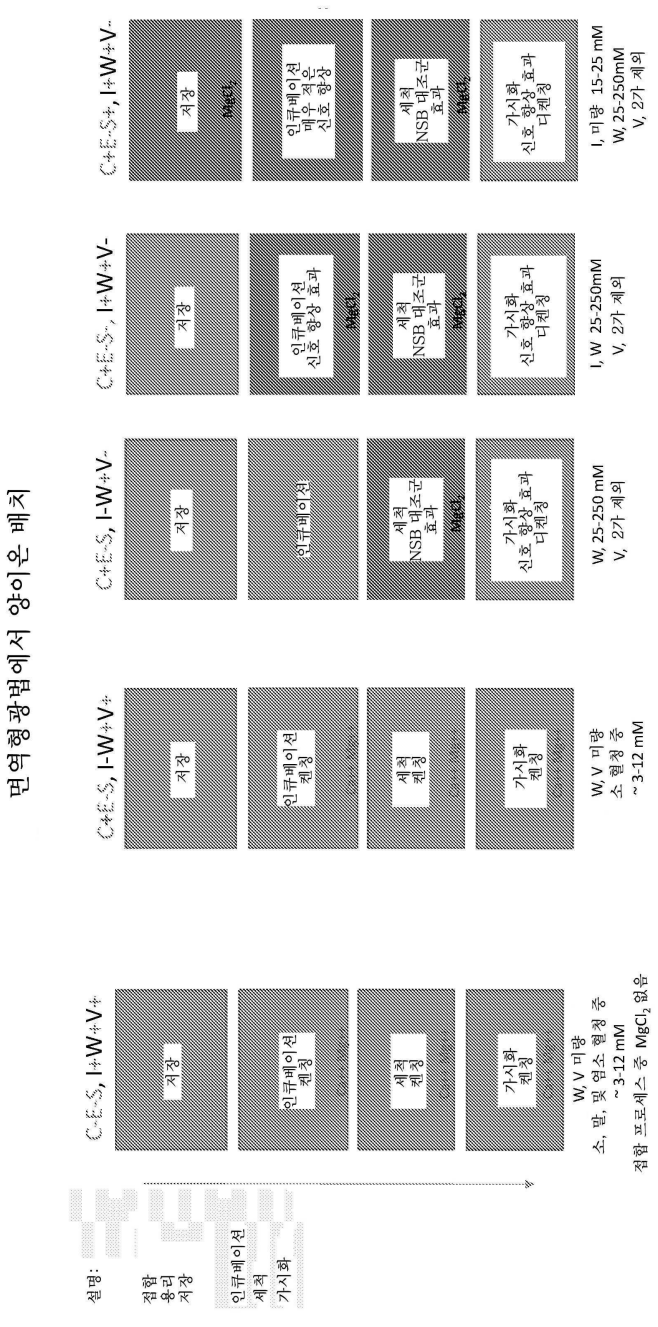
도면10



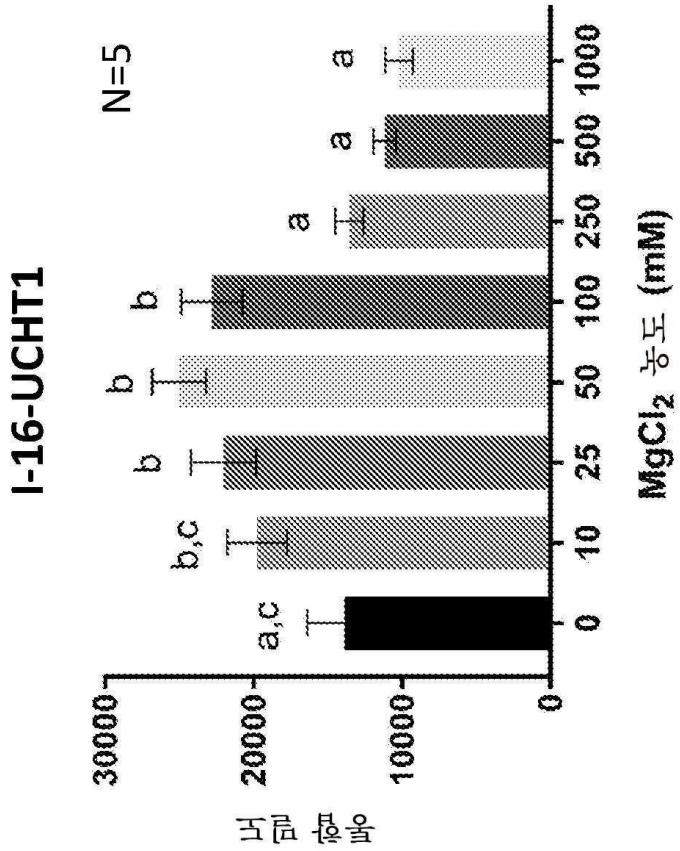
도면11


면역형광법에서 양이온 베치
설명:
접합
용리
저장
인큐베이션
세척
가시화
C+E-S, I+W+V+
항체를 저 또는
고 염 PBS에
저장한다
항체를 세척
완충액에 희석하고,
세포 또는 조직 상
항원에 첨가한다
항체-분석물
복합물 세척
조직을 세척한다
세포, 조직을 완충액에
재현탁시킨다
W, V 미량
소, 말, 및 염소 혈청 중
~ 3-12 mM 2가
C+E-S, I-W+V+
항체를 저 염
PBS에 저장한다
항체를 세척
완충액에 희석하고,
세포 또는 조직 상
항원에 첨가한다
항체-분석물
복합물, 세포,
조직을 세척한다
세포, 조직을 완충액에
재현탁시킨다
W, 25-250 mM
V, 2가 제외
C+E-S-, I+W+V-
항체를 저 염
PBS에 저장한다
항체를 세척
완충액에 희석하고,
세포 또는 조직 상
항원에 첨가한다
항체-분석물
복합물 세포
조직을 세척한다
세포, 조직을 완충액에
재현탁시킨다
I, W 25-250 mM
V, 2가 제외
C+E-S+, I+W+V-
항체를 저 염
PBS에 저장한다
항체를 세척
완충액에 희석하고,
세포 또는 조직 상
항원에 첨가한다
항체-분석물
복합물 세포
조직을 세척한다
세포, 조직을 완충액에
재현탁시킨다
I, 미량 15-25 mM
W, 25-250mM
V, 2가 제외

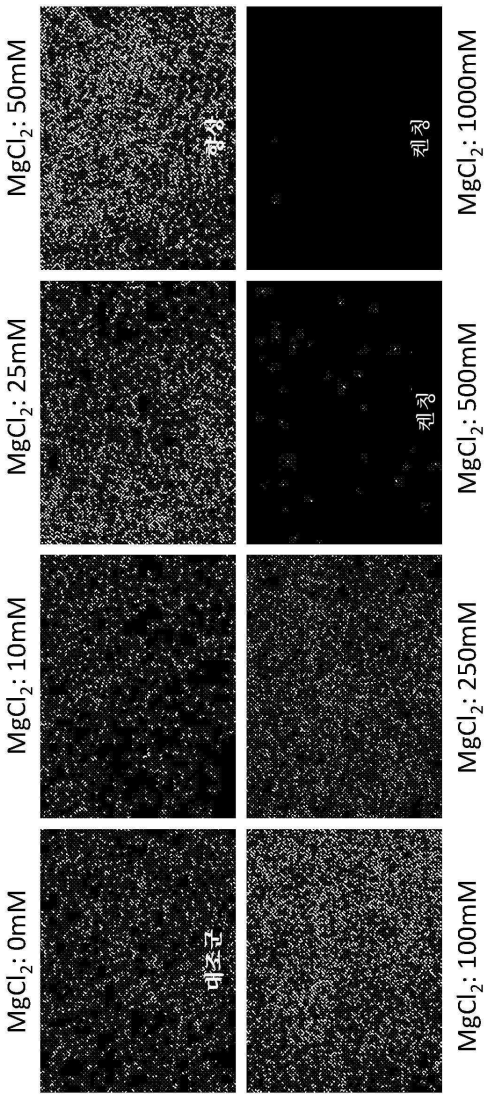
도면12


면역형광법에서 양이온 배치
C+E-S+, I+W+V+
C+E-S, I+W+V+
C+E-S-, I+W+V-
C+E-S+, I+W+V-
설명:
접합
용리
저장
인큐베이션
세척
가시화
저장
인큐베이션
켄칭
세척
켄칭
가시화
켄칭
W, V 미량
소, 말, 및 염소 혈청 중
~ 3-12 mM
접합 프로세스 중 MgCl2 없음
저장
인큐베이션
세척
켄칭
가시화
켄칭
W, V 미량
소 혈청 중
~ 3-12 mM
저장
인큐베이션
세척
NSB 대조군
효과
Met1
가시화
신호 향상 효과
디켄칭
W, 25-250 mM
V, 2가 제외
저장
인큐베이션
신호 향상 효과
Met1
세척
NSB 대조군
효과
Met2
가시화
신호 향상 효과
디켄칭
I, W 25-250mM
V, 2가 제외
저장
Met1
인큐베이션
비우 결합
신호 향상
세척
NSB 대조군
효과
Met2
가시화
신호 향상 효과
디켄칭
I, 미량 15-25 mM
W, 25-250mM
V, 2가 제외

도면13


I-16-UCHT1
N=5
통합 밀도
30000
20000
10000
0
a,c
b,c
b
b
b
b
a
a
a
0
10
25
50
100
250
500
1000
MgCl2 농도 (mM)

도면14

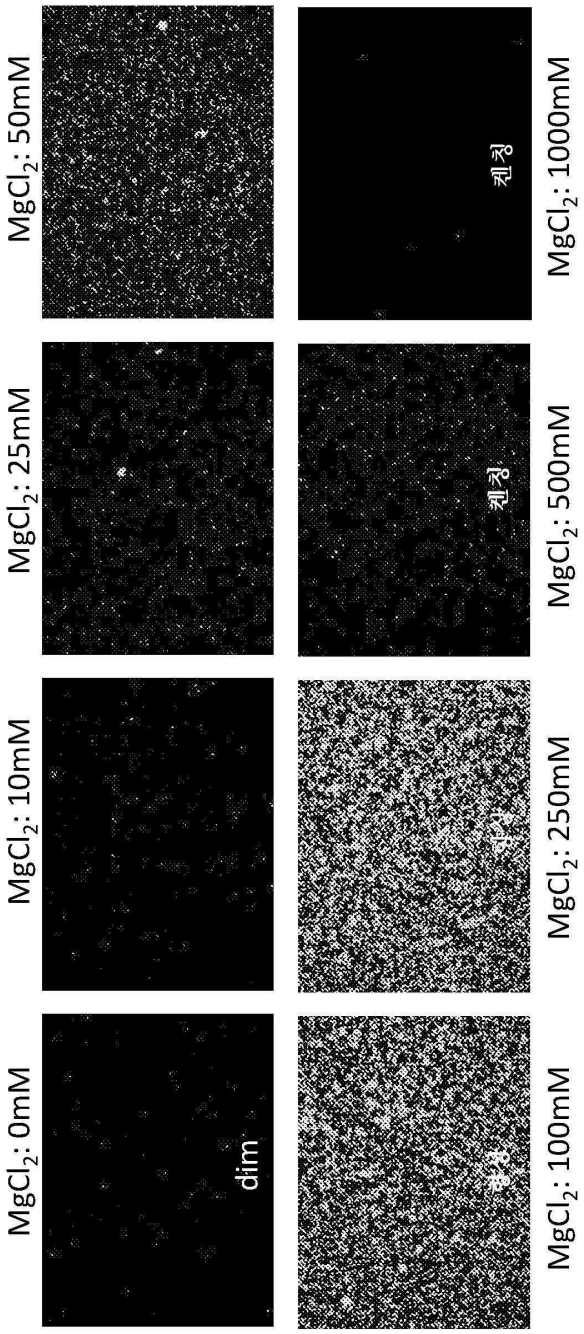

MgCl2: 0mM
MgCl2: 10mM
MgCl2: 25mM
MgCl2: 50mM
대조군
켄칭
MgCl2: 100mM
MgCl2: 250mM
MgCl2: 500mM
MgCl2: 1000mM
완충액: pH 7.5

5의 N에서 1

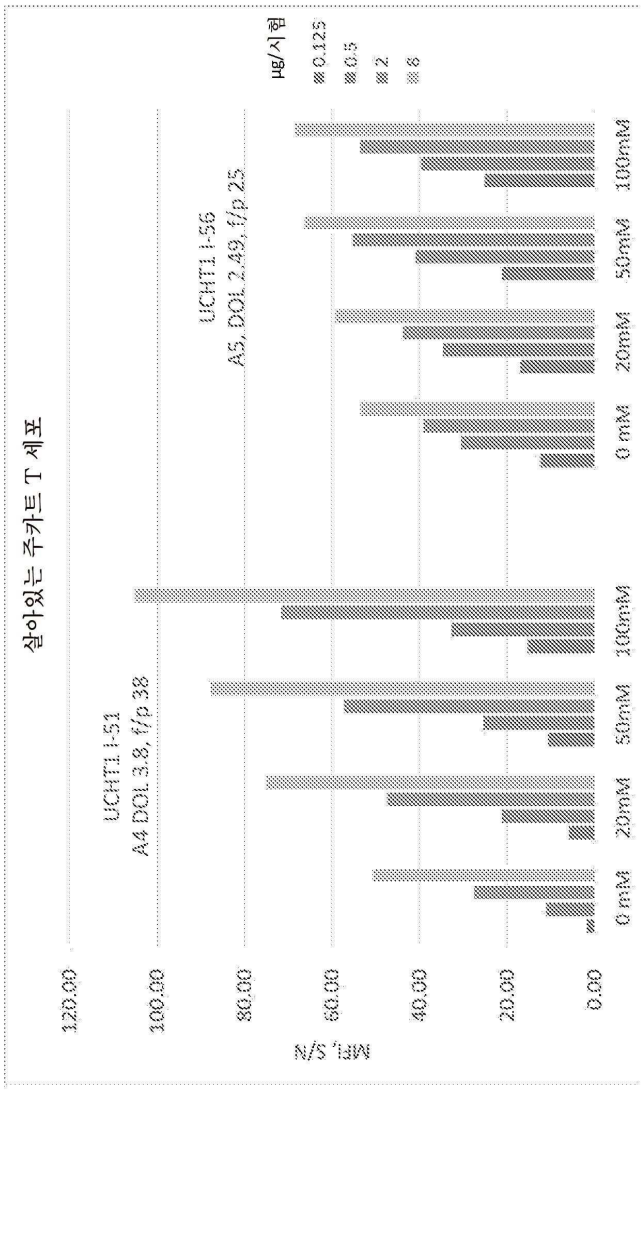
도면15

MgCl2: 0mM
MgCl2: 10mM
MgCl2: 25mM
MgCl2: 50mM
대조군
MgCl2: 100mM
MgCl2: 250mM
MgCl2: 500mM
MgCl2: 1000mM
켄칭
완충액: pH 7.5
5의 N에서 1

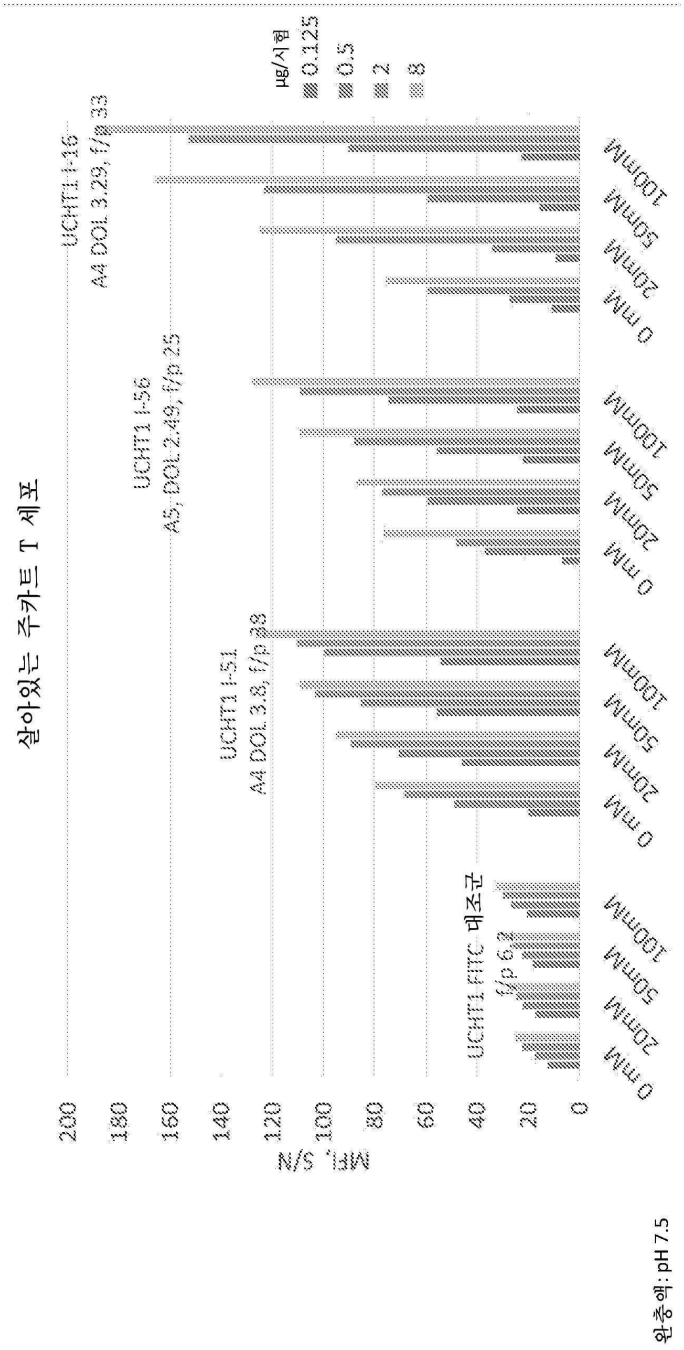
도면16


MgCl2: 0mM
dim
MgCl2: 10mM
MgCl2: 25mM
MgCl2: 50mM
MgCl2: 100mM
켄칭
MgCl2: 250mM
켄칭
MgCl2: 500mM
켄칭
MgCl2: 1000mM

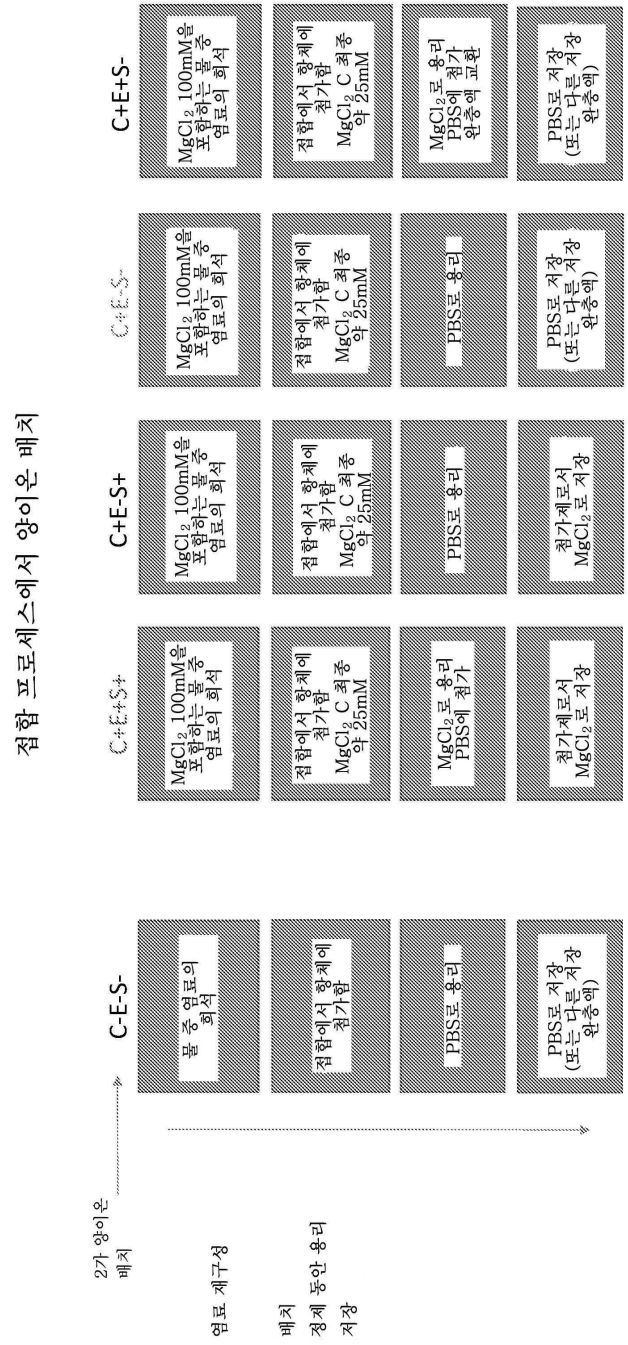
도면17


살아있는 주카트 T 세포
UCHT1 I-51
A4 DOL 3.8, f/p 38
UCHT1 I-56
A5, DOL 2.49, f/p 25
μg/시험
0.125
0.5
2
8
MFI, S/N
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
0 mM
20mM
50mM
100mM
0 mM
20mM
50mM
100mM
MgCl2, C
완충액: pH 7.5

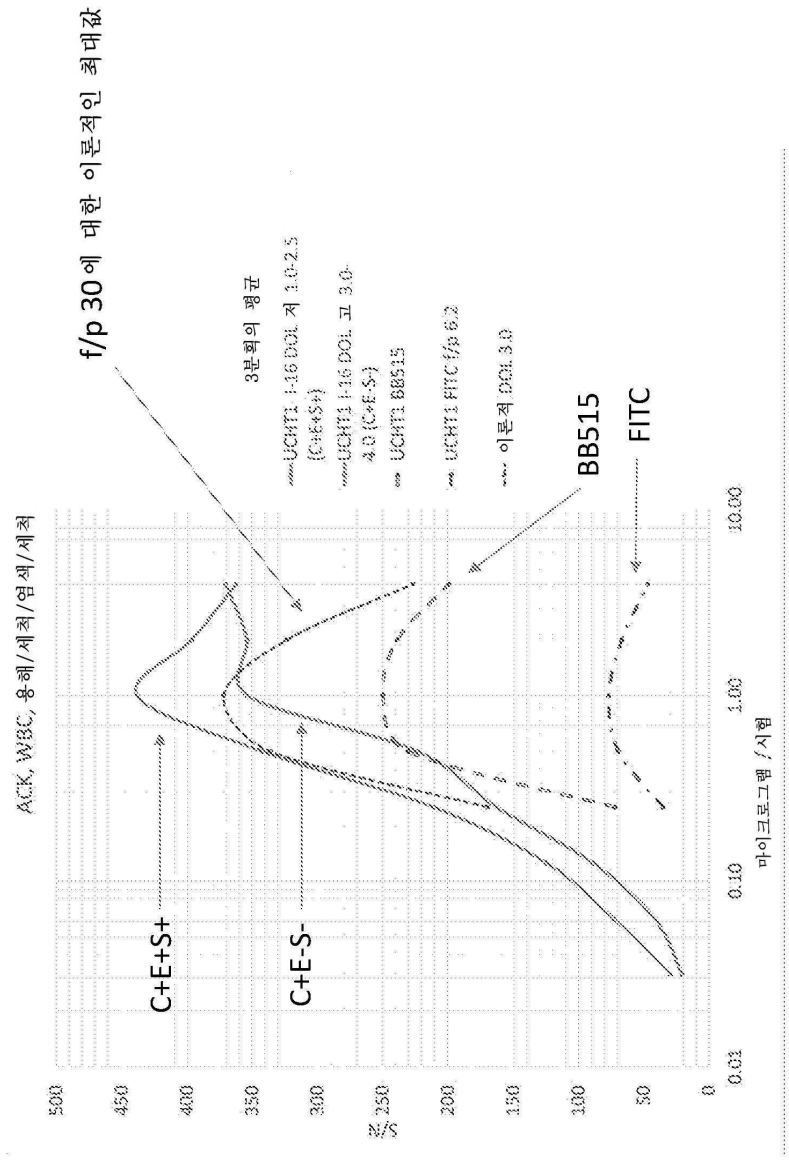
도면18


살아있는 주카트 T 세포
MFI, S/N
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
UCHT1 I-16
A4 DOL 3.29, f/p 33
UCHT1 I-56
A5, DOL 2.49, f/p 25
UCHT1 I-51
A4 DOL 3.8, f/p 38
UCHT1 FITC 대조군
f/p 6.2
0 mM
20mM
50mM
100mM
μg/시험
0.125
0.5
2
8
MgCl2 C
완충액: pH 7.5

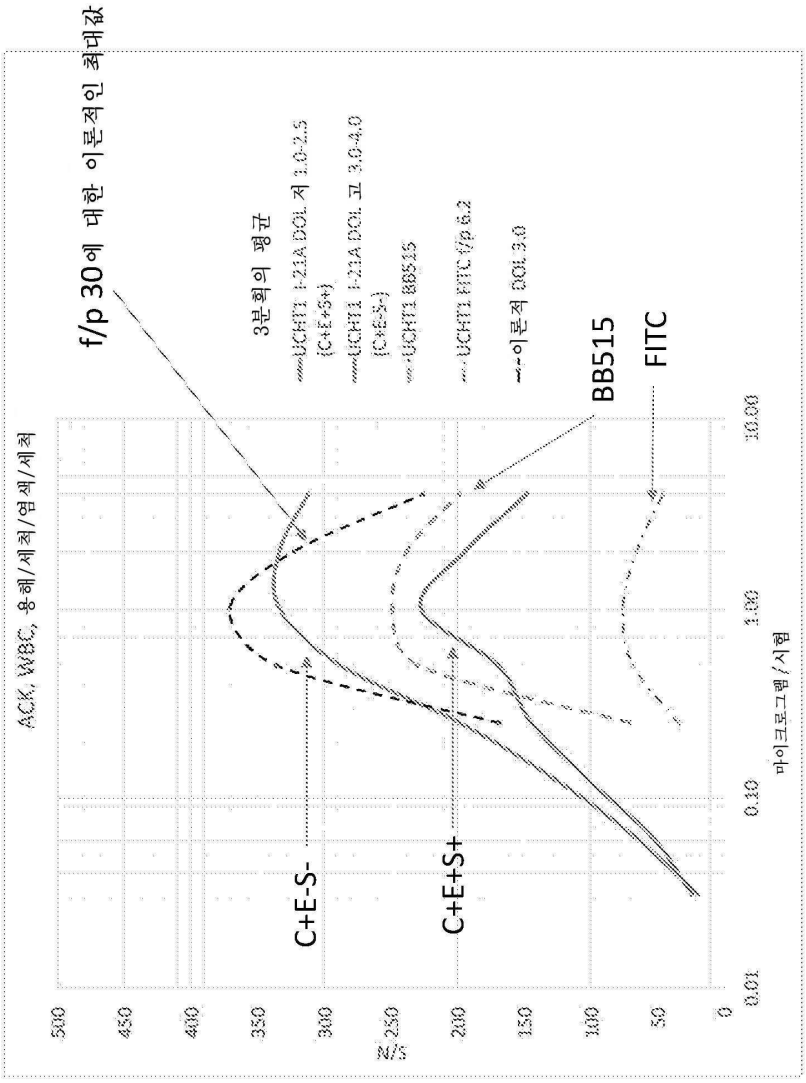
도면19


접합 프로세스에서 양이온 배치
2가 양이온 배치
염료 제구성
배치 정제 동안 용리 저장
C-E-S-
C+E+S+
C+E-S+
C+E+S-
물 중 염료의 희석
MgCl2 100mM을 포함하는 물 중 염료의 희석
접합에서 항체에 첨가함
MgCl2 C 최종 약 25mM
PBS로 용리
MgCl2로 용리 PBS에 첨가
PBS로 저장 (또는 다른 저장 완충액)
첨가제로서 MgCl2로 저장

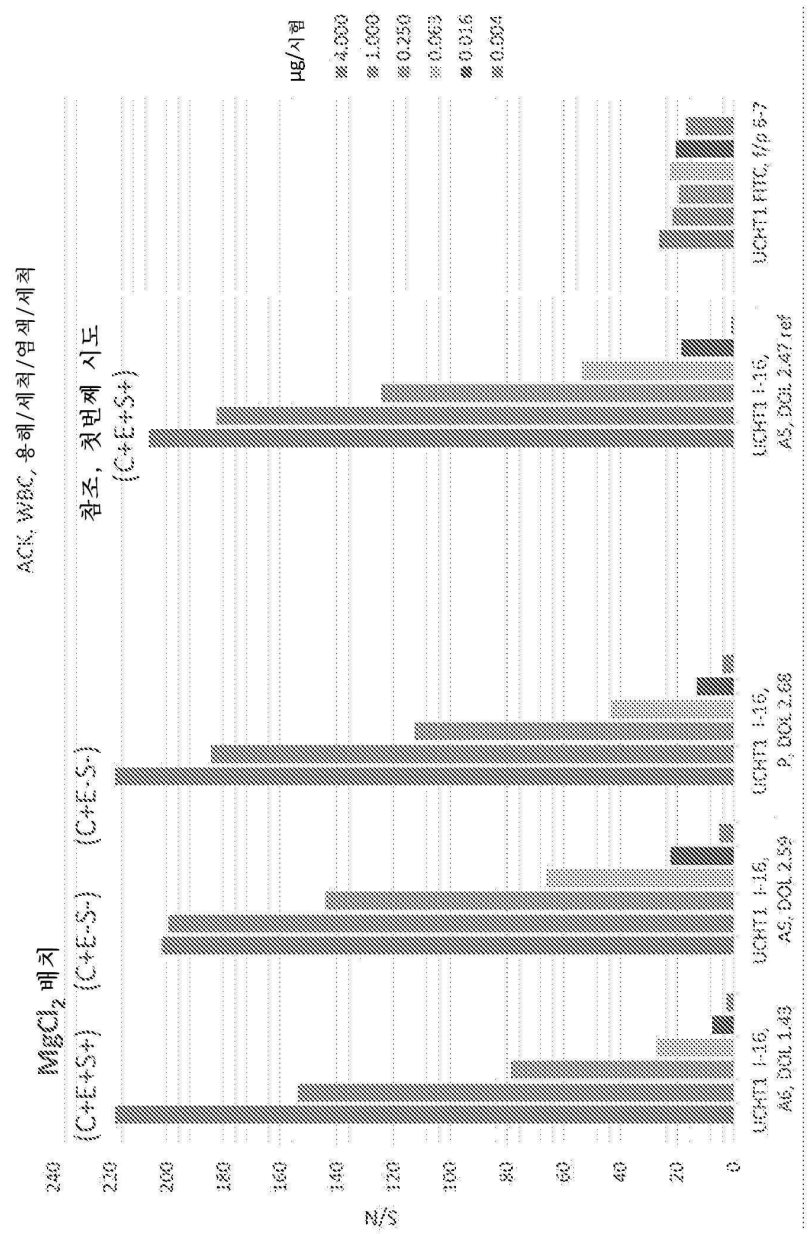
도면20a


f/p 30에 대한 이론적인 최대값
3분획의 평균
UCHT1 1-16 DOL 저 1.0-2.5 (C+E+S+)
UCHT1 1-16 DOL 고 3.0-4.0 (C+E-S-)
UCHT1 BB515
UCHT1 FITC f/p 6.2
이론적 DOL 3.0
BB515
FITC
C+E+S+
C+E-S-
ACK, WBC, 용해/세척/염색/세척
중간값
마이크로그램 / 시험
0.01
0.10
1.00
10.00
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500

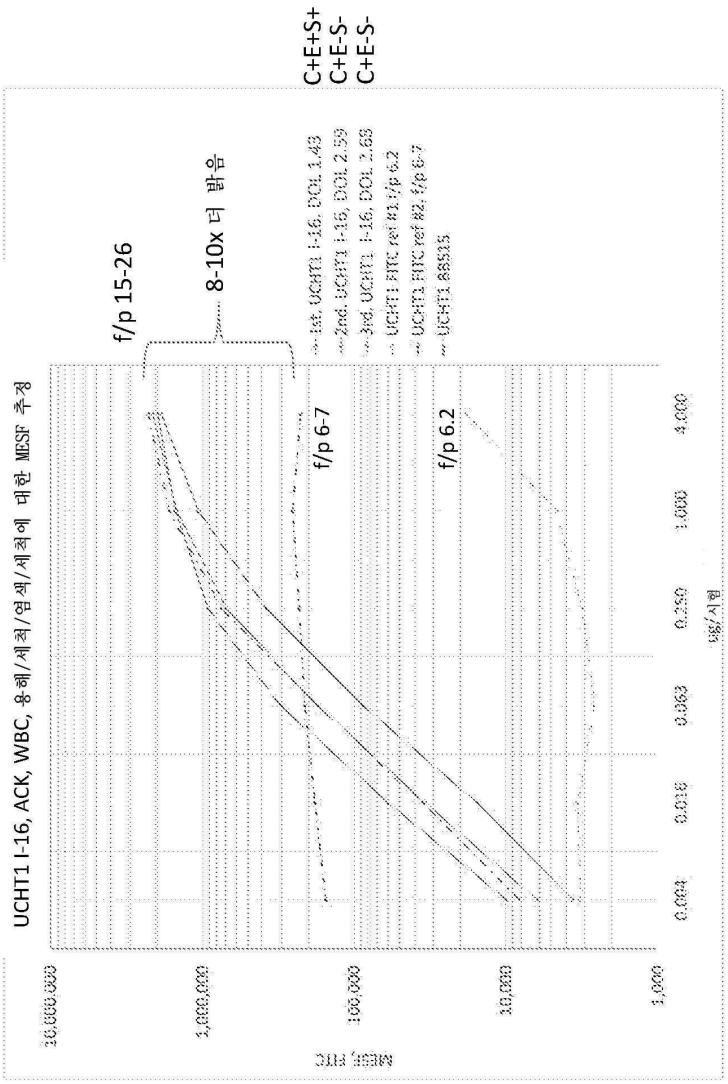
도면20b


f/p 30에 대한 이론적인 최대값
3분획의 평균
UCHT1 I-21A DOL 저 1.0-2.5 (C+E+S+)
UCHT1 I-21A DOL 고 3.0-4.0 (C+E+S+)
UCHT1 BB515
UCHT1 FITC f/p 6.2
이론적 DOL 3.0
BB515
FITC
C+E-S-
C+E+S+
ACK, WBC, 용해/세척/염색/세척
N/S
마이크로그램 / 시험
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0.01
0.10
1.00
10.00

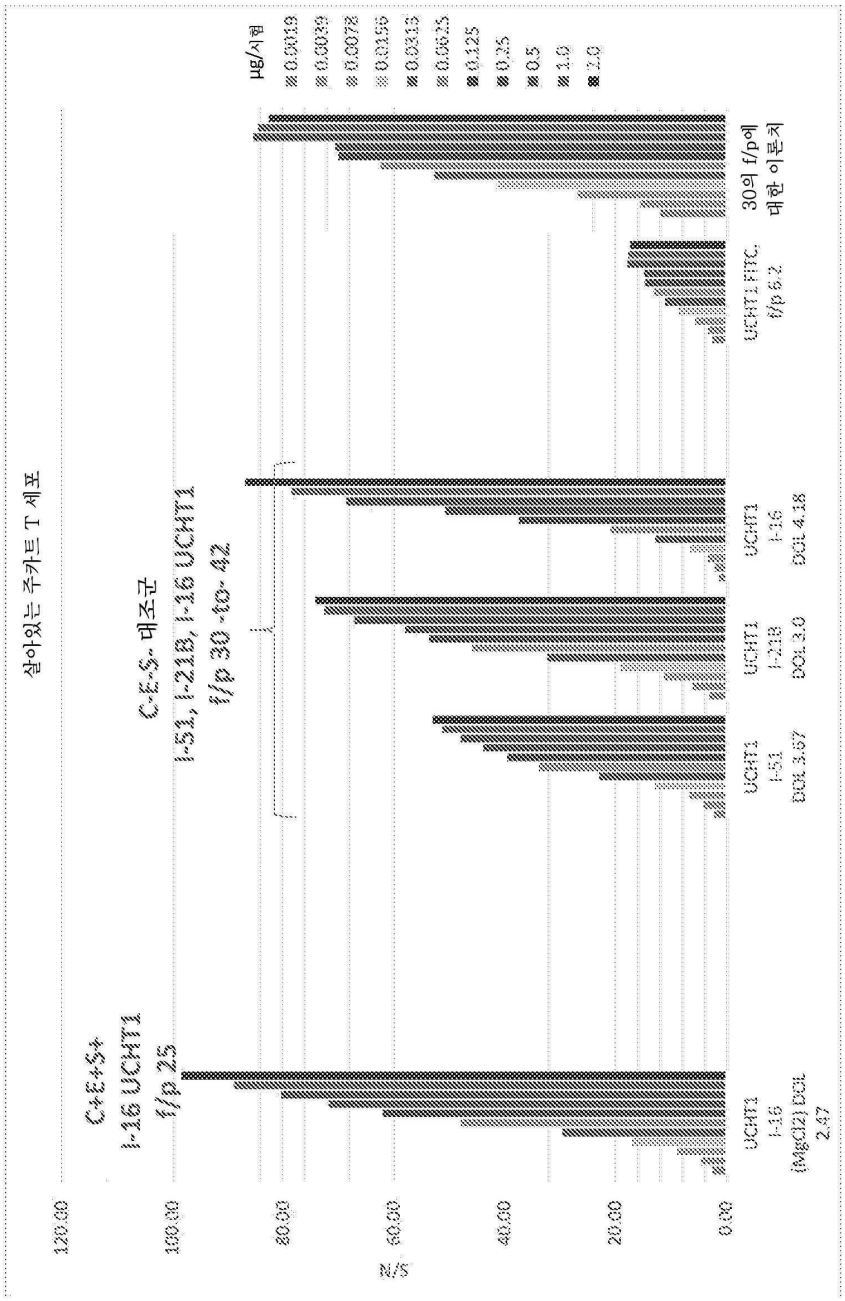
도면21


ACK, WBC, 용해/세척/염색/세척
MgCl2 배치
(C+E+S+)
(C+E-S-)
(C+E-S-)
참조, 첫번째 시도
(C+E+S+)
μg/시험
4.000
1.000
0.250
0.063
0.016
0.004
S/N
UCHT1 1-16, AS, DOL 1.43
UCHT1 1-16, AS, DOL 2.59
UCHT1 1-16, P, DOL 2.68
UCHT1 1-16, AS, DOL 2.47 ref
UCHT1 FITC, f/p 6-7

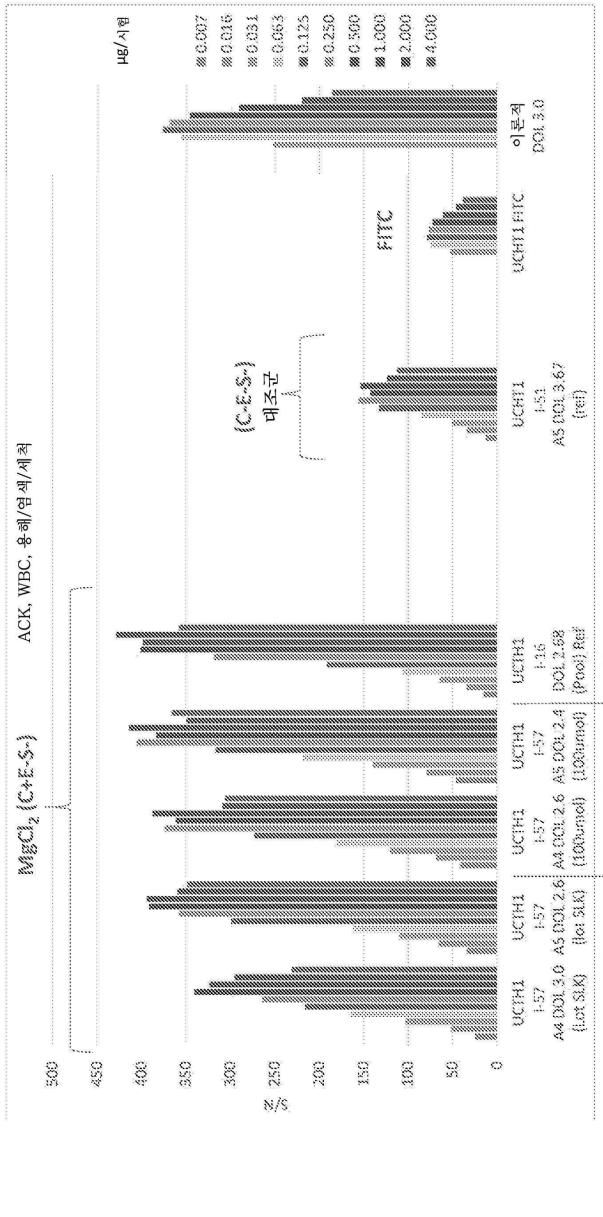
도면22


C+E+S+
C+E-S-
C+E-S-
8-10x 더 밝음
f/p 15-26
f/p 6-7
f/p 6.2
UCHT1 I-16, ACK, WBC, 용혈/세척/염색/세척에 대한 MESF 추정
MESF, FITC
10,000,000
1,000,000
100,000
10,000
1,000
0.004
0.016
0.063
0.250
1.000
4.000
μg/시험

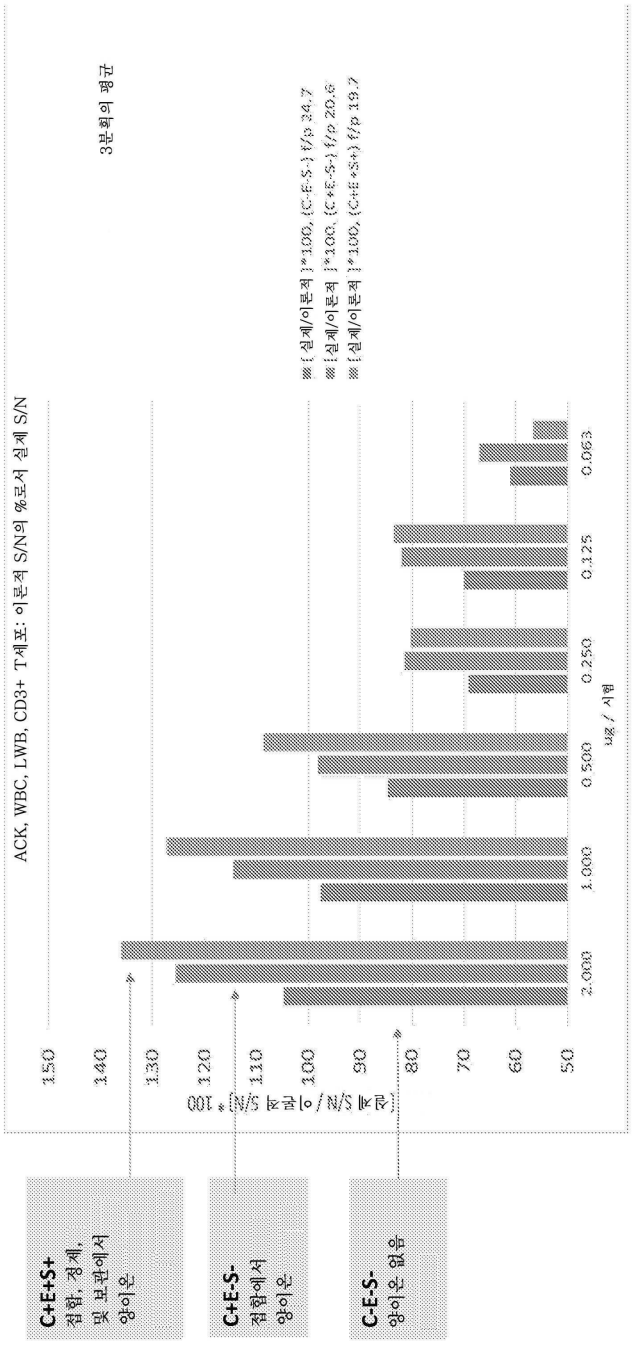
도면23


살아있는 주카트 T 세포
C+E+S+
I-16 UCHT1
f/p 25
C-E-S- 대조군
I-51, I-218, I-16 UCHT1
f/p 30 -to- 42
μg/시험
0.0019
0.0039
0.0078
0.0156
0.0313
0.0625
0.125
0.25
0.5
1.0
2.0
N/S
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
UCHT1 I-16 (MgCl2) DOL 2.47
UCHT1 I-51 DOL 3.67
UCHT1 I-218 DOL 3.0
UCHT1 I-16 DOL 4.18
UCHT1 FITC, f/p 6.2
30의 f/p에 대한 이론치

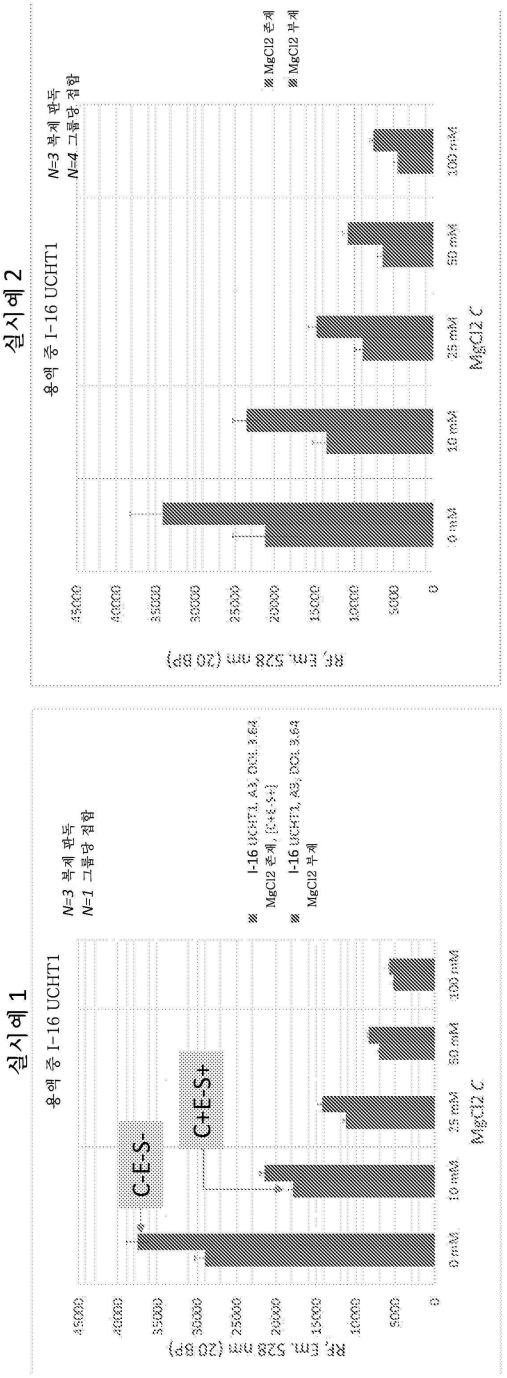
도면24


MgCl2 (C+E-S-)
ACK, WBC, 용혈/염색/세척
μg/시험
0.007
0.016
0.031
0.063
0.125
0.250
0.500
1.000
2.000
4.000
(C-E-S-)
대조군
FITC
이론적
DOL 3.0
UCH1 FITC
UCH1
1-57
A4 DOL 3.0
(Lot SLK)
UCH1
1-57
A5 DOL 2.6
(lot SLK)
UCH1
1-57
A4 DOL 2.6
(100umol)
UCH1
1-57
A5 DOL 2.4
(100umol)
UCH1
1-16
DOL 2.68
(Prod) Ref
UCH1
1-51
A5 DOL 3.67
(ref)
A
B
C
Lot

도면25a


ACK, WBC, LWB, CD3+ T세포: 이론적 S/N의 %로서 실제 S/N
3분획의 평균
실제/이론적 }*100, {C-E-S-} f/p 24.7
실제/이론적 }*100, {C+E-S-} f/p 20.6
실제/이론적 }*100, {C+E+S+} f/p 19.7
[실제 S/N / 이론적 S/N] * 100
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
2.000
1.000
0.500
0.250
0.125
0.063
nM / 시험
C+E+S+
접합, 경계,
및 보관에서
양이온
C+E-S-
접합에서
양이온
C-E-S-
양이온 없음

도면25b

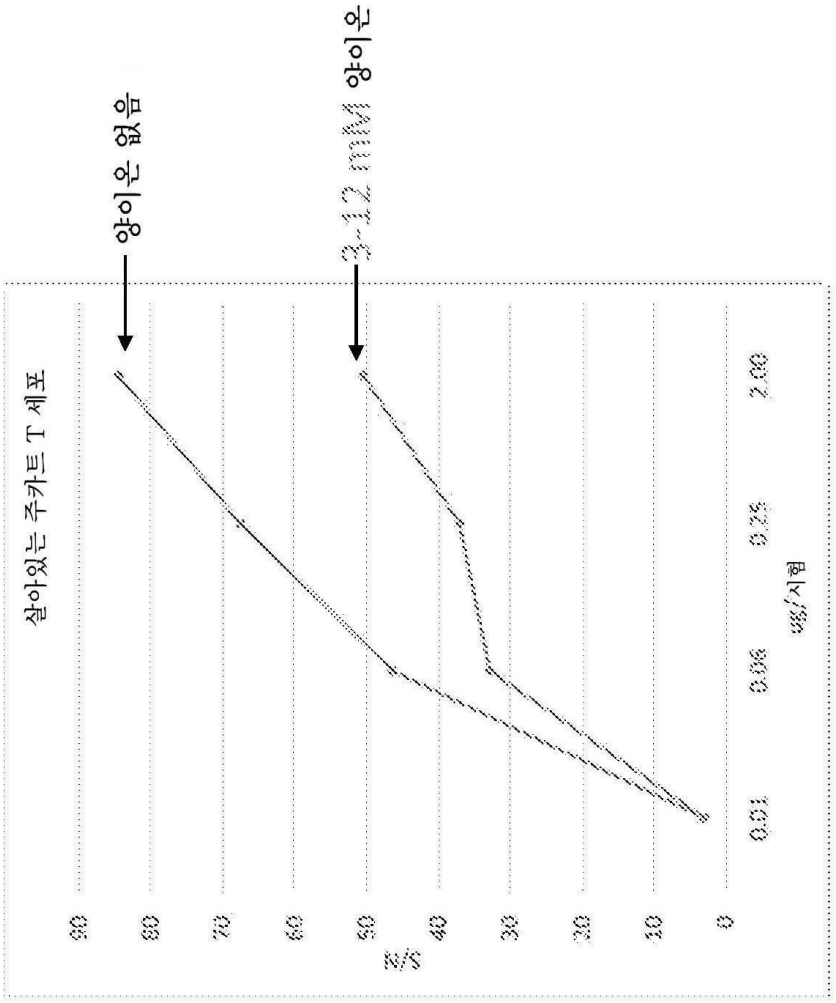

실시예 1
용액 중 I-16 UCHT1
N=3 복제 반독
N=1 그룹당 점함
C-E-S-
C+E-S+
Re, Em, 528 nm (20 BP)
0 mM
10 mM
25 mM
50 mM
100 mM
MgCl2 C
※ I-16 UCHT1, A3, DCI, 3.64 MgCl2 존재, [S+E-S+]
※ I-16 UCHT1, A3, DCI, 3.64 MgCl2 부재
실시예 2
용액 중 I-16 UCHT1
N=3 복제 반독
N=4 그룹당 점함
※ MgCl2 존재
※ MgCl2 부재

접합 효율, 접합에서 회수됨
[측정된 실제 표지화 정도/이론적 표지화 정도]
M. 당량의 중합체-염료 *100 = % 회수

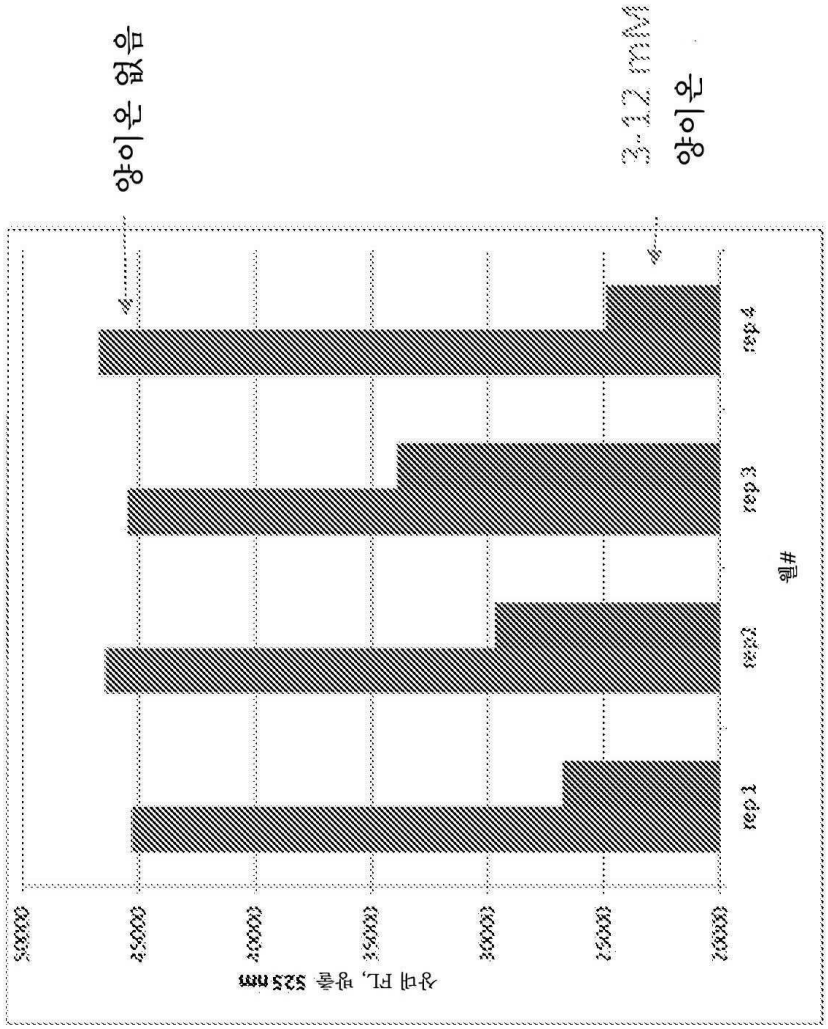
복제	$MgCl_2$ 부재 (C-E-S-)	$MgCl_2$ (C+E+S+)	$MgCl_2$ (C+E-S-)	$MgCl_2$ (C+E-S-)
평균 (%)	27.4	52.1	58.5	63.0
STDEV	3.9	12.2	21.8	10.8
CV%	14.2	23.4	37.3	17.1
N 분획	6	13	12	13

복제	$MgCl_2$ 부재 (C-E-S-)	$MgCl_2$ (C+E+S+)	$MgCl_2$ (C+E-S-)	$MgCl_2$ (C+E-S-)
접합에서 개선된 회수 %	기준선	90%	114%	130%

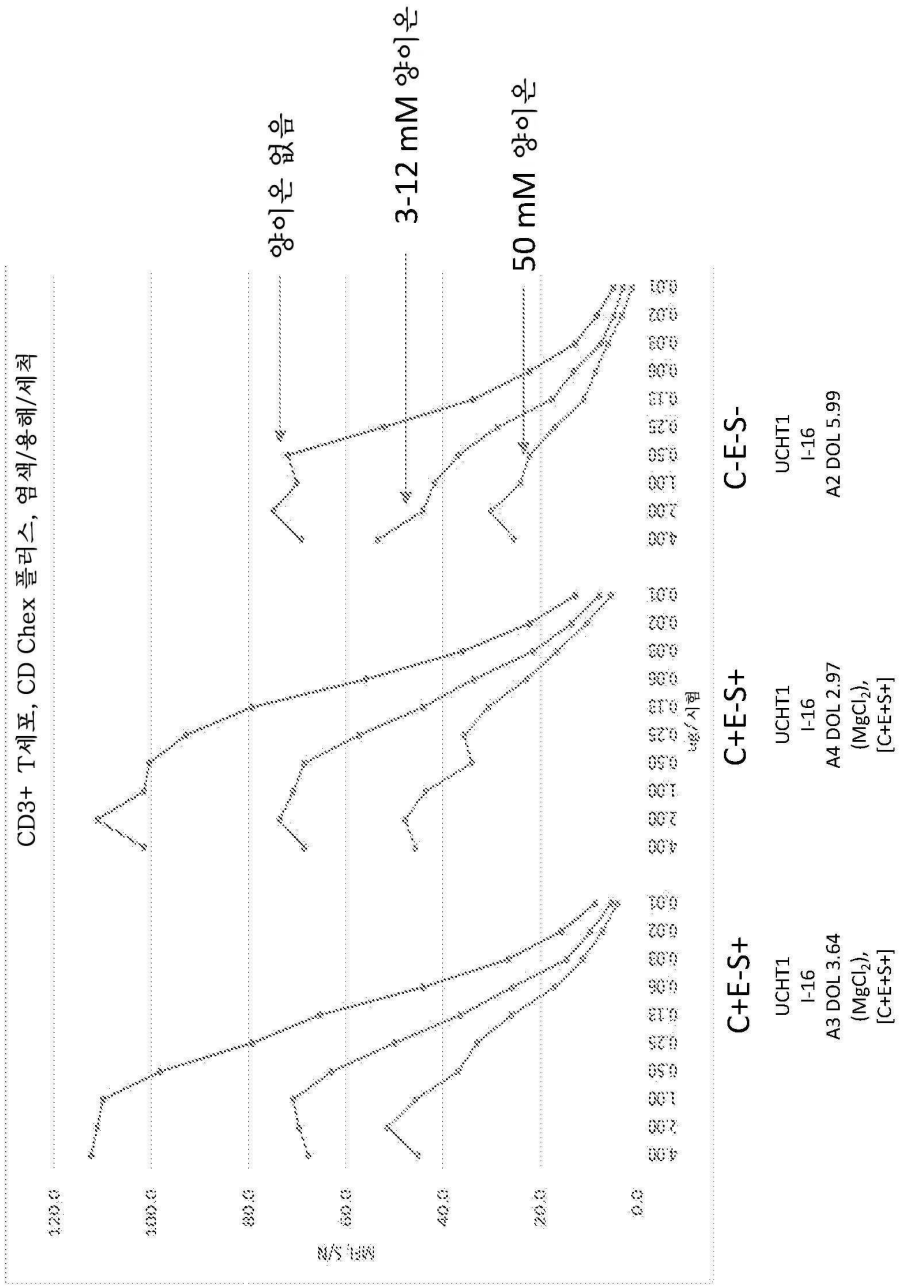
도면27a


양이온 없음
3-12 mM 양이온
살아있는 주카트 T 세포
80
60
70
50
40
30
20
10
0
S/S
0.01
0.06
0.25
2.00
ug/시험

도면27b



도면28


CD3+ T세포, CD Chex 플러스, 염색/용해/세척
양이온 없음
3-12 mM 양이온
50 mM 양이온
MFI S/N
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
4.00
2.00
1.00
0.50
0.25
0.13
0.06
0.03
0.02
0.01
농도/시험
C+E-S+
UCHT1
I-16
A3 DOL 3.64
(MgCl2),
[C+E+S+]
C+E-S+
UCHT1
I-16
A4 DOL 2.97
(MgCl2),
[C+E+S+]
C-E-S-
UCHT1
I-16
A2 DOL 5.99