

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第3部門第2区分
 【発行日】平成24年6月7日(2012.6.7)

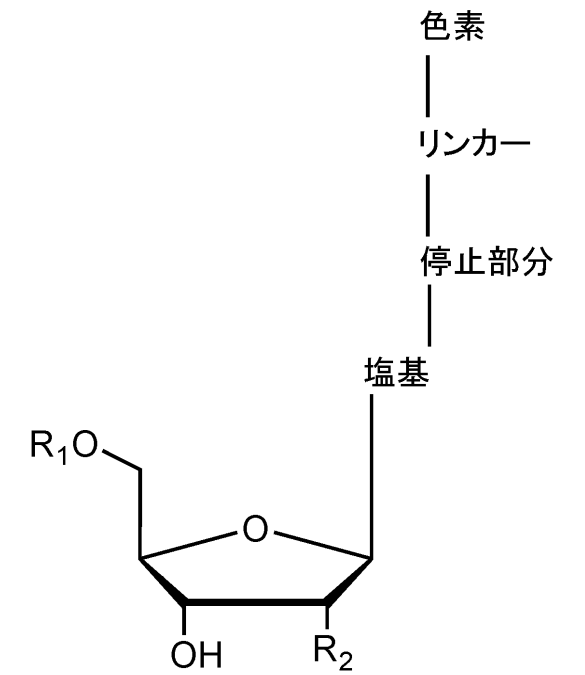
【公表番号】特表2011-506265(P2011-506265A)
 【公表日】平成23年3月3日(2011.3.3)
 【年通号数】公開・登録公報2011-009
 【出願番号】特願2009-540462(P2009-540462)
 【国際特許分類】

C 0 7 H 19/10 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 0 7 H 19/20 (2006.01)

【F I】

C 0 7 H 19/10 C S P
 C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 0 7 H 19/20

【手続補正書】
 【提出日】平成24年4月12日(2012.4.12)
 【手続補正1】
 【補正対象書類名】特許請求の範囲
 【補正対象項目名】全文
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【特許請求の範囲】
 【請求項1】
 下記式の化合物：



式中、R₁はH、一リン酸、二リン酸、または三リン酸であり、
 R₂はHまたはOHであり、
 塩基はシトシン、ウラシル、チミン、アデニン、もしくはグアニン、またはその天然誘導体であり、

停止部分 (terminating moiety) は化合物にポリメラーゼ停止特性を与える基であり、リンカーは二官能性基であり、かつ色素は蛍光体である。

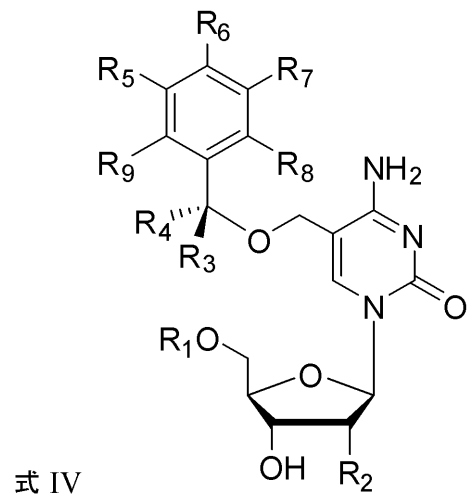
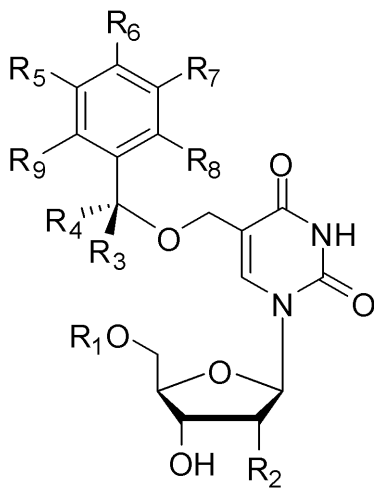
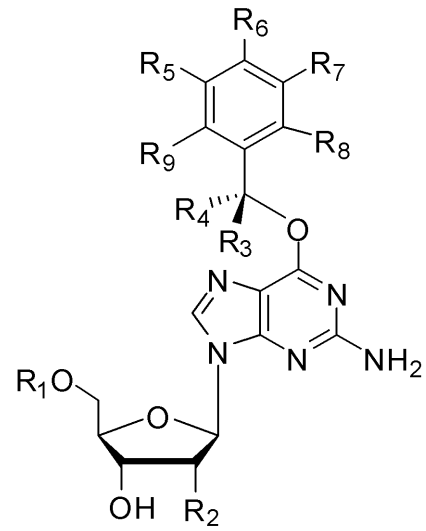
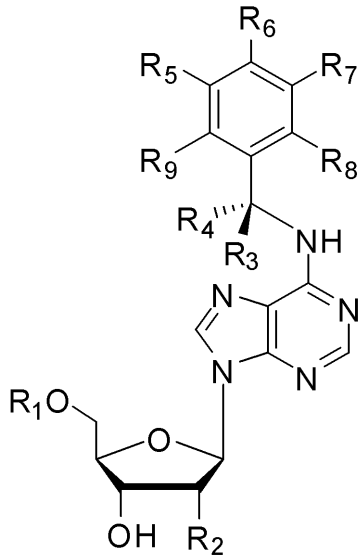
【請求項 2】

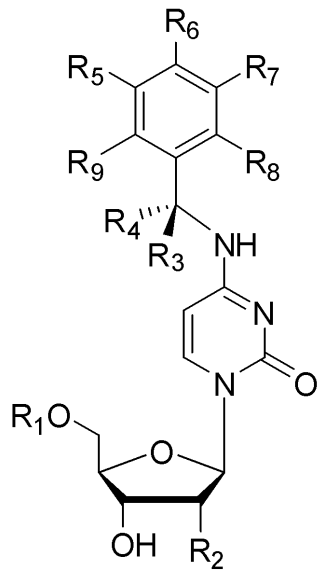
停止部分が光開裂性である、請求項1記載の化合物。

【請求項 3】

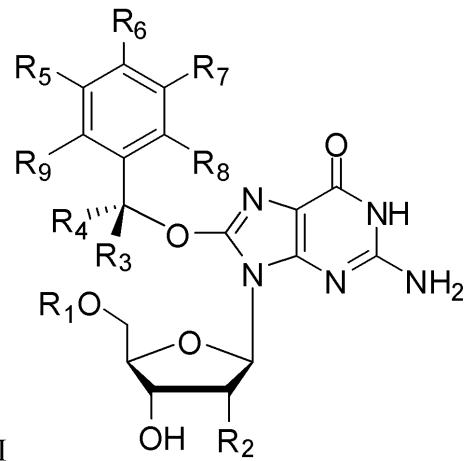
停止部分が光開裂性でない、請求項1記載の化合物。

【請求項 4】

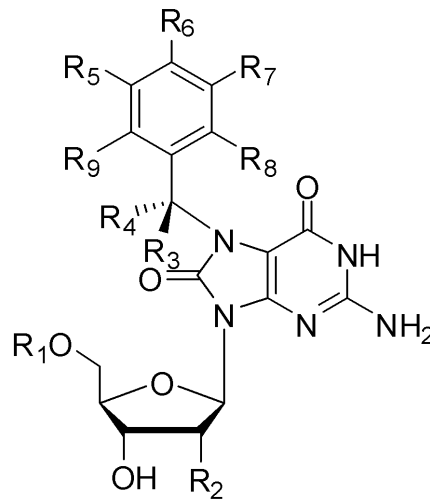




式 V



式 VI



および

式 VII

からなる群より選択される化合物としてさらに定義される、請求項1記載の化合物：

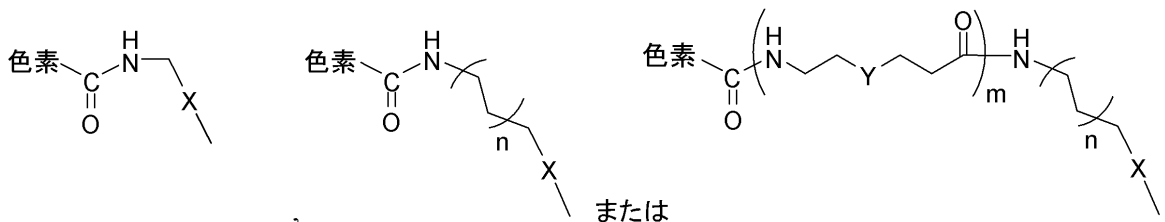
式中、 R_1 はH、一リン酸、二リン酸、または三リン酸であり、

R_2 はHまたはOHであり、

R_3 および R_4 は、H、 C_1 - C_{12} 直鎖または分枝アルキル、 C_2 - C_{12} 直鎖または分枝アルケニルまたはポリエニル、 C_2 - C_{12} 直鎖または分枝アルキニルまたはポリアルキニル、および芳香族基の群よりそれぞれ独立に選択され、

R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 および R_9 は、H、 OCH_3 、 NO_2 、CN、ハロゲン化物、 C_1 - C_{12} 直鎖もしくは分枝アルキル、 C_2 - C_{12} 直鎖もしくは分枝アルケニルもしくはポリエニル、 C_2 - C_{12} 直鎖もしくは分枝アルキニルもしくはポリアルキニル、および芳香族基からなる群よりそれぞれ独立に選択され、

ただし、 R_5 、 R_6 、および R_7 は以下の構造の基であり：



式中、Xは CH_2 、 $CH=CH$ 、 C 、 C 、O、S、またはNHであり、

Yは CH_2 、O、またはNHであり、

nは0～12の整数であり、
mは0～12の整数であり、および
色素は蛍光体である。

【請求項5】

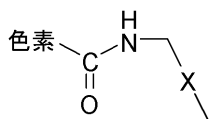
R₉がNO₂であり、かつR₃およびR₄の少なくとも1つがHである、請求項4記載の化合物。

【請求項6】

R₉がNO₂でない、請求項4記載の化合物。

【請求項7】

R₅、R₆、およびR₇のいずれか1つが以下の構造の基である、請求項5または6記載の化合物：



式中、XはC Cであり、かつ色素は蛍光体である。

【請求項8】

R₃およびR₄が、H、-CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂CH₃、イソプロピル、tert-ブチル、フェニル、2-ニトロフェニル、および2,6-ジニトロフェニルからなる群よりそれぞれ独立に選択される、請求項5または6記載の化合物。

【請求項9】

R₃およびR₄が、-CH₃、イソプロピル、またはtert-ブチルである、請求項8記載の化合物

【請求項10】

R₃およびR₄が、H、アルキルまたは芳香族基中に少なくとも1つのヘテロ原子を任意で含んでもよいアルキルおよび芳香族基からなる群よりそれぞれ独立に選択され、さらに該芳香族基が任意でアリールまたは多環式基であってよい、請求項5または6記載の化合物。

【請求項11】

式(I)の化合物としてさらに定義される、請求項5または6記載の化合物。

【請求項12】

式(II)の化合物としてさらに定義される、請求項5または6記載の化合物。

【請求項13】

式(III)の化合物としてさらに定義される、請求項5または6記載の化合物。

【請求項14】

式(IV)の化合物としてさらに定義される、請求項5または6記載の化合物。

【請求項15】

式(V)の化合物としてさらに定義される、請求項5または6記載の化合物。

【請求項16】

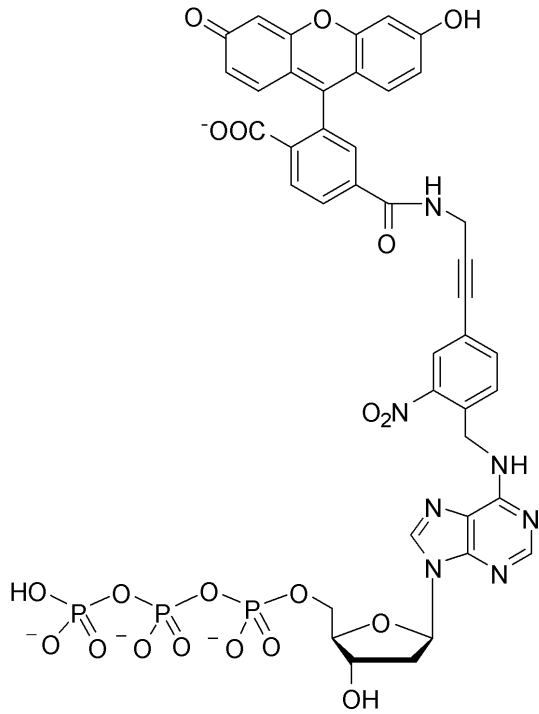
式(VI)の化合物としてさらに定義される、請求項5または6記載の化合物。

【請求項17】

式(VII)の化合物としてさらに定義される、請求項5または6記載の化合物。

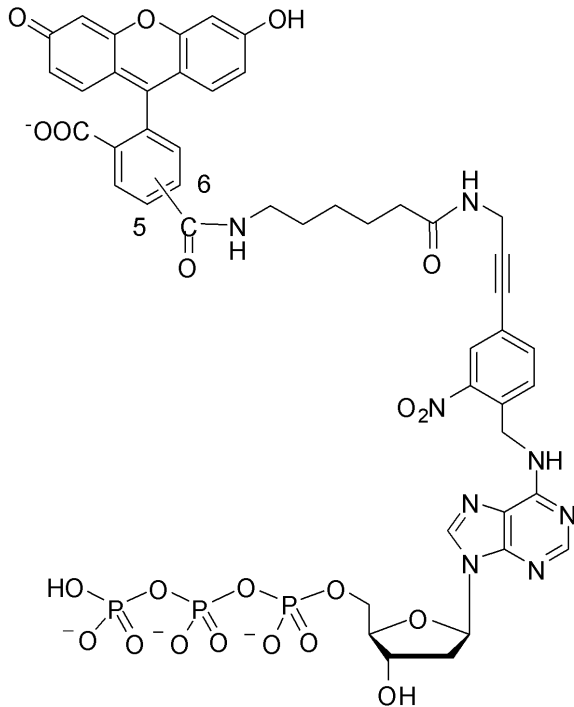
【請求項18】

下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



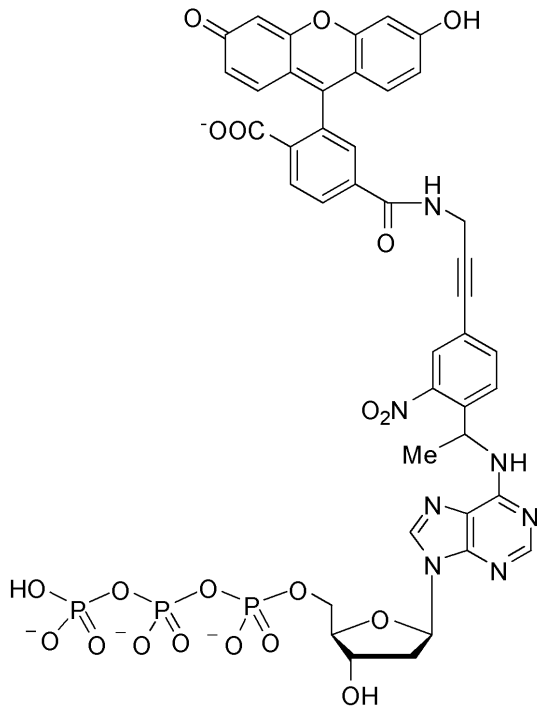
°
【請求項 19】

下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°
【請求項 20】

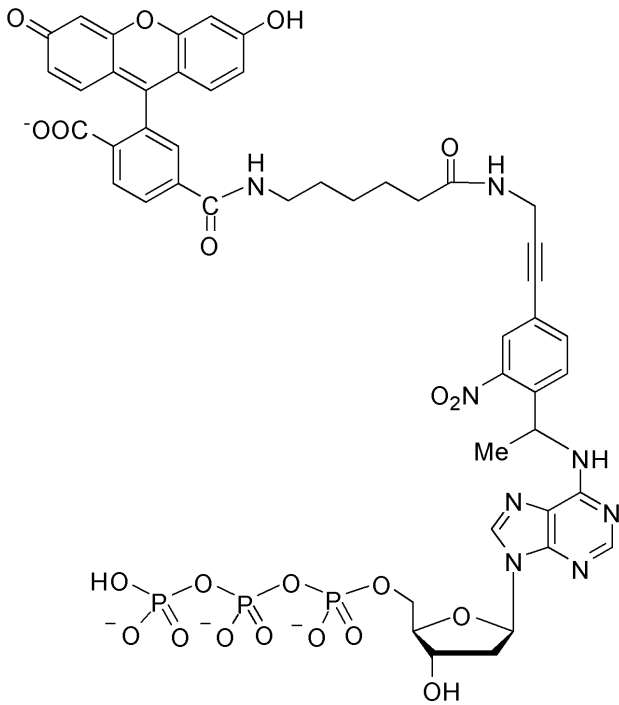
下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°

【請求項 2 1】

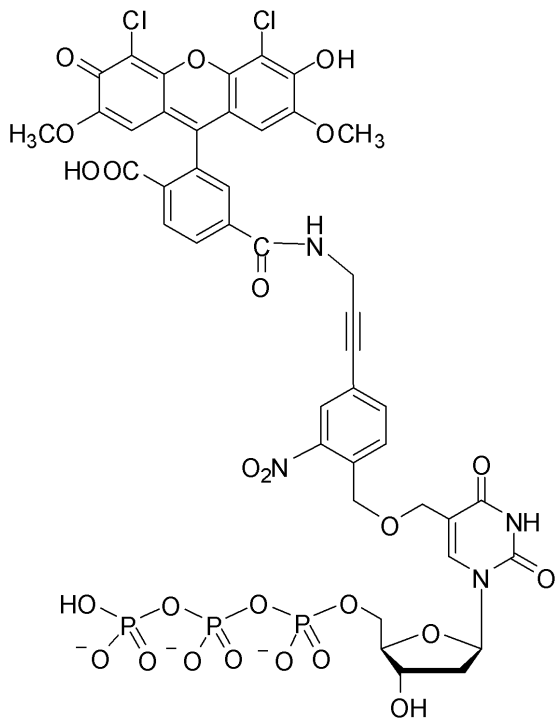
下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°

【請求項 2 2】

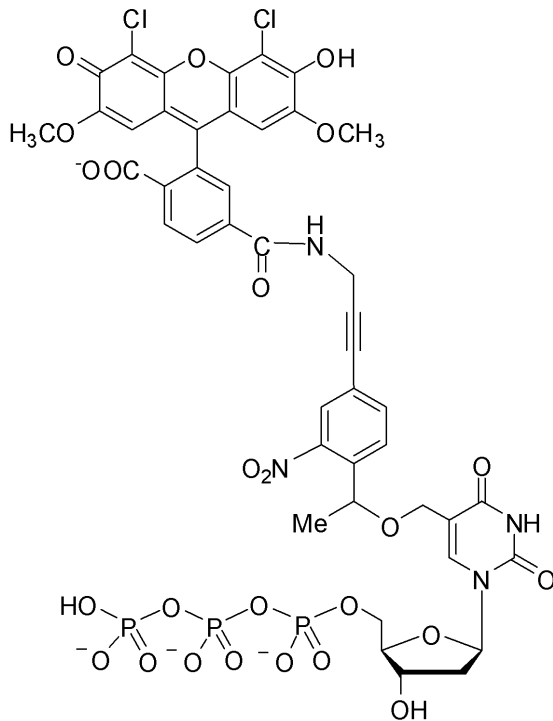
下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°

【請求項 2 3】

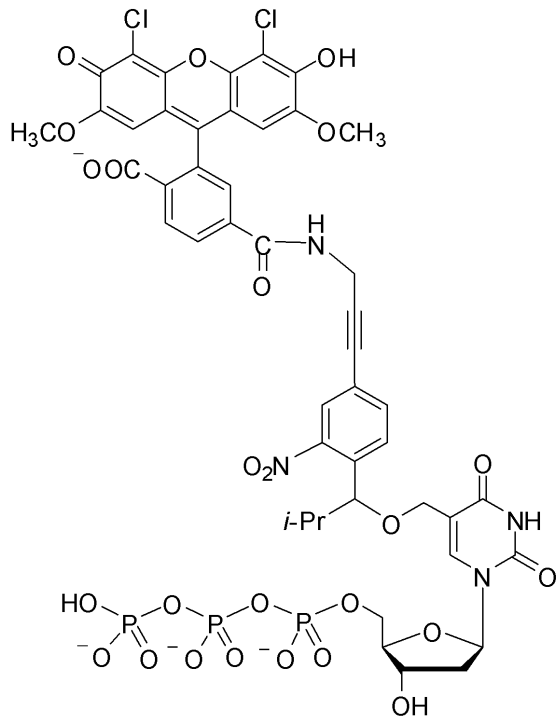
下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°

【請求項 2 4】

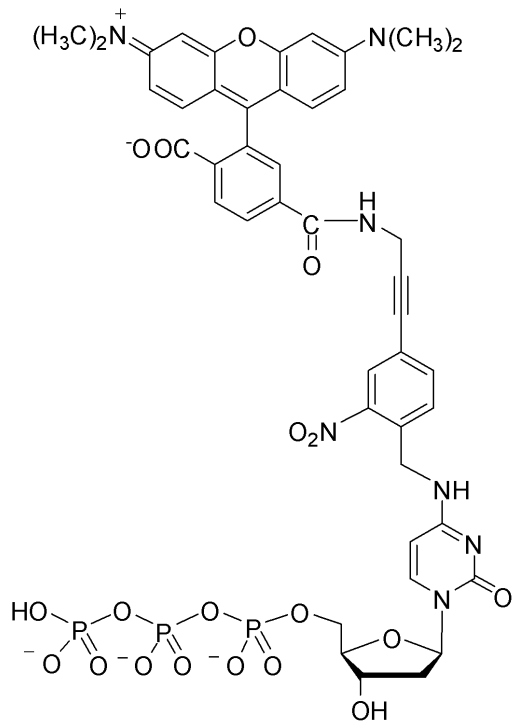
下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°

【請求項 25】

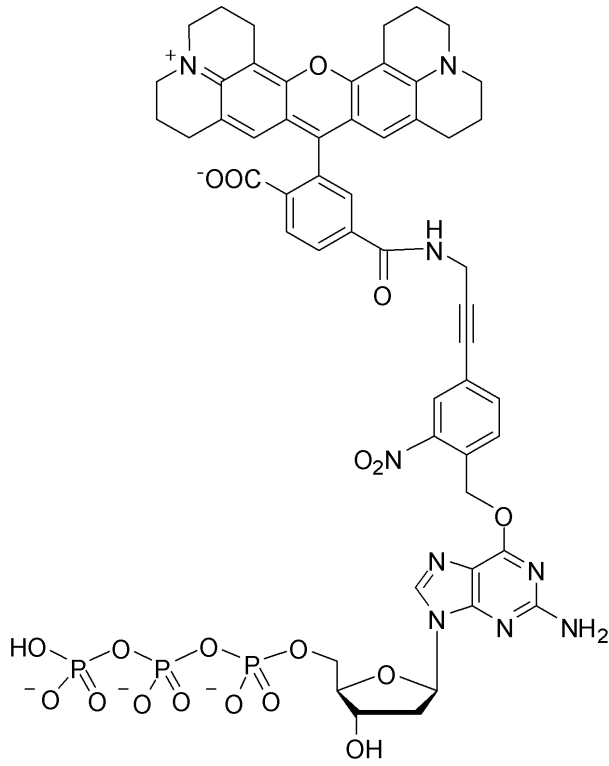
下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°

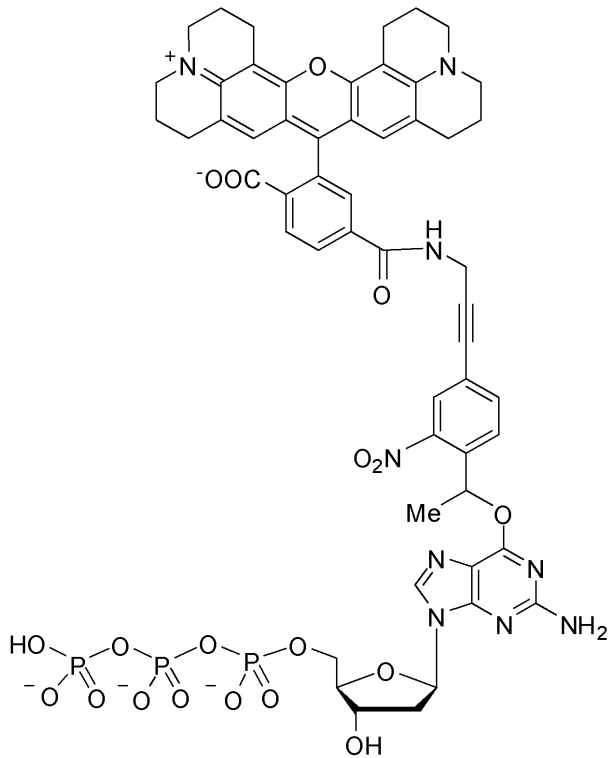
【請求項 26】

下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



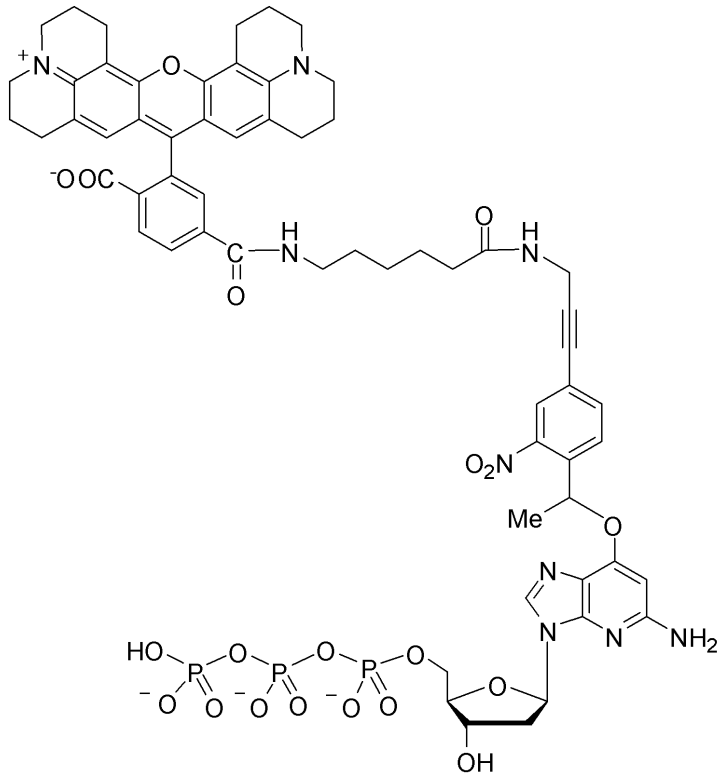
°
【請求項 27】

下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°
【請求項 28】

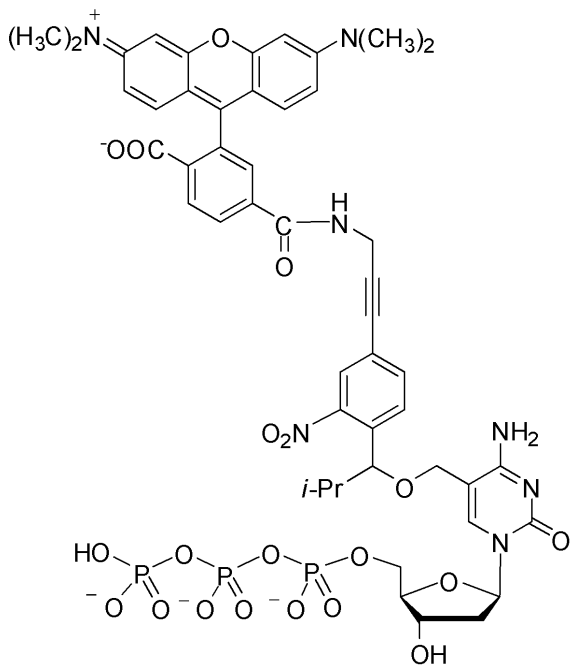
下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°

【請求項 29】

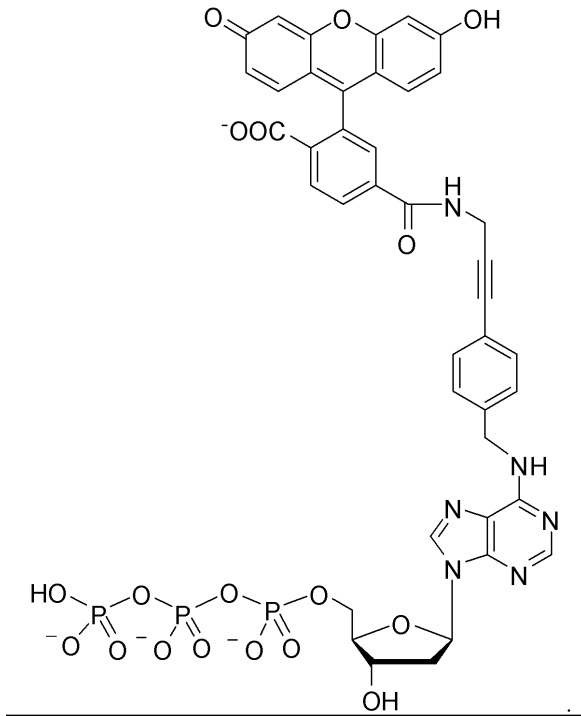
下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°

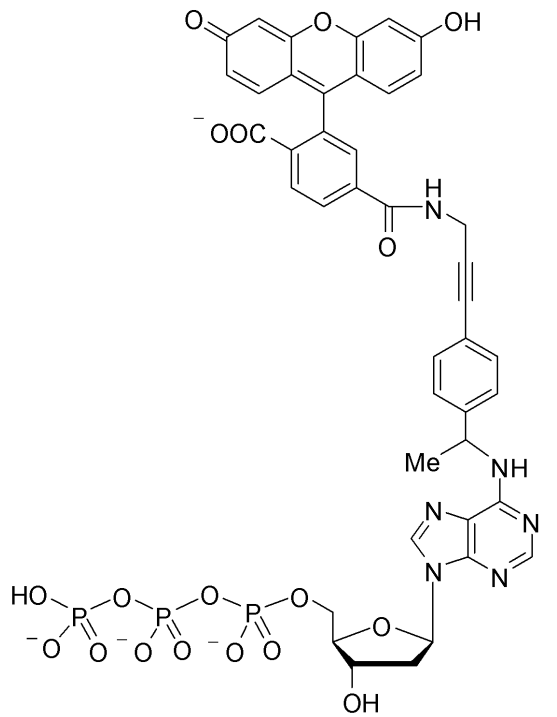
【請求項 30】

下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



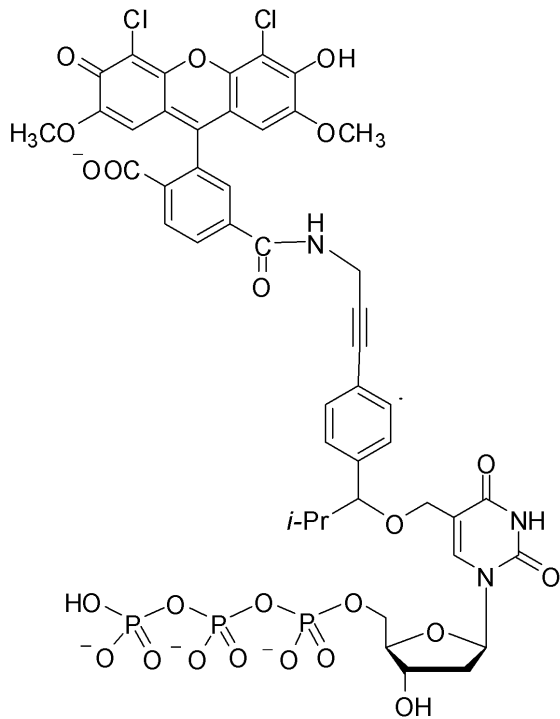
°
【請求項 3 1】

下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



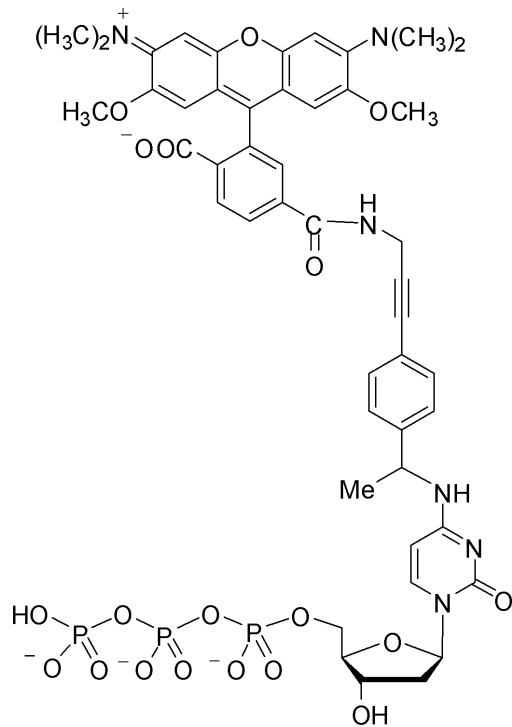
°
【請求項 3 2】

下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



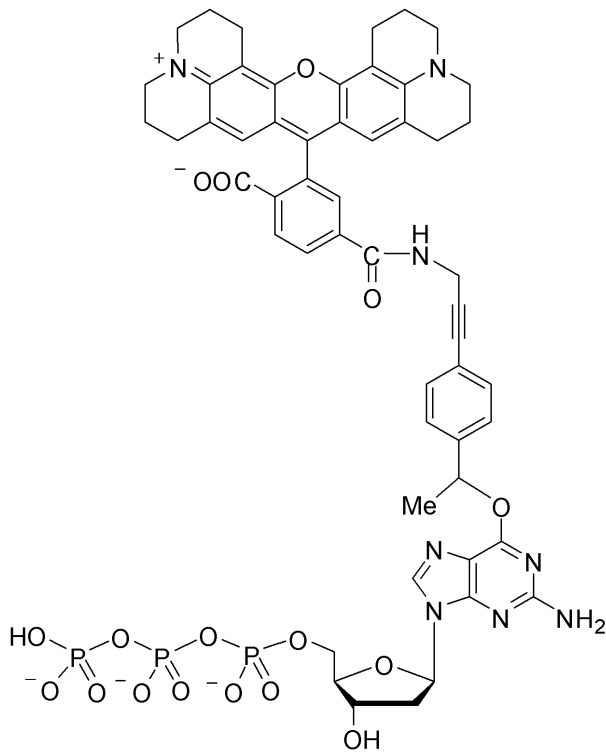
°
【請求項 3 3】

下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



°
【請求項 3 4】

下記式によりさらに定義される、請求項4記載の化合物：



【請求項 35】

(i) プライマーの5'末端を固体表面に結合する段階；

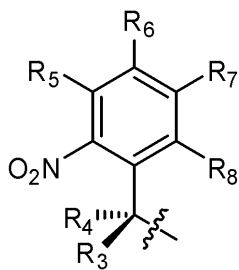
(ii) 固体表面に結合したプライマーに標的核酸をハイブリダイズして、ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体を形成する段階；

(iii) 異なる式I~VIIIの化合物が異なる蛍光体を有するという条件で、ポリメラーゼおよび請求項5記載の1つまたは複数の化合物を得る段階；

(iv) ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体とポリメラーゼおよび段階(iii)の1つまたは複数の化合物とを反応させて、ポリメラーゼ反応によって伸長中のプライマー鎖を形成する、段階；

(v) 伸長中のプライマー鎖を撮像して、その蛍光体によって、段階(iv)の取り込まれた化合物を同定する段階；

(vi) 伸長中のプライマー鎖を伴う固体表面を光源に曝露して、下記式：



の光開裂性停止部分を除去し、それにより、天然成分を有する伸長したプライマーを得る段階；

(vii) 段階(iv)から(vi)を1回または複数回繰り返して、標的核酸内の複数の塩基を同定する段階であって、先のサイクルの段階(vi)の伸長したプライマーが、次のサイクルの段階(iv)のハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体の代わりに反応する、段階

を含む、標的核酸を配列決定する方法。

【請求項 36】

(i) 核酸の5'末端を固体表面に結合する段階；

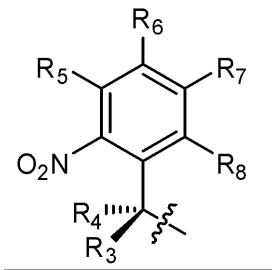
(ii) 固体表面に結合した核酸にプライマーをハイブリダイズして、ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体を形成する段階；

(iii) 異なる式I~VIIIの化合物が異なる蛍光体を有するという条件で、ポリメラーゼおよび請求項5記載の1つまたは複数の化合物を得る段階；

(iv) ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体とポリメラーゼおよび段階(iii)の1つまたは複数の化合物とを反応させて、ポリメラーゼ反応によって伸長中のプライマー鎖を形成する、段階；

(v) 伸長中のプライマー鎖を撮像して、その蛍光体によって、段階(iv)の取り込まれた化合物を同定する段階；

(vi) 伸長中のプライマー鎖を伴う固体表面を光源に曝露して、下記式；



の光開裂性停止部分を除去し、それにより、天然成分を有する伸長したプライマーを得る段階；

(vii) 段階(iv)から(vi)を1回または複数回繰り返して、標的核酸内の複数の塩基を同定する段階であって、先のサイクルの段階(vi)の伸長したプライマーが、次のサイクルの段階(iv)のハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体の代わりに反応する、段階を含む、標的核酸を配列決定する方法。

【請求項37】

段階(iv)の少なくとも1つの化合物の取り込みが、天然のヌクレオチド同等物の取り込み効率の約70%から約100%で起こる、請求項35または36記載の方法。

【請求項38】

取り込み効率が約85%から約100%で起こる、請求項37記載の方法。

【請求項39】

ポリメラーゼが、逆転写酵素、ターミナルトランスフェラーゼ、およびDNAポリメラーゼからなる群より選択される、請求項35または36記載の方法。

【請求項40】

段階(vi)の光源への曝露によって、約85%から約100%の光開裂性停止部分が除去される、請求項35または36記載の方法。

【請求項41】

段階(iv)の少なくとも1つの化合物の取り込みの後に、鎖伸長の停止が約90%から約100%の効率で起こる、請求項35または36記載の方法。

【請求項42】

段階(v)の撮像にパルスマルチライン励起検出器が用いられる、請求項35または36記載の方法。

【請求項43】

段階(iv)の後に、伸長中のプライマー鎖を洗浄する段階をさらに含む、請求項35または36記載の方法。

【請求項44】

段階(iv)の後に、伸長したプライマーを洗浄する段階をさらに含む、請求項35または36記載の方法。

【請求項45】

段階(iv)の前に、段階(iv)で未反応の任意のプライマーまたは伸長中のプライマー鎖をキャップする段階をさらに含む、請求項35または36記載の方法。

【請求項46】

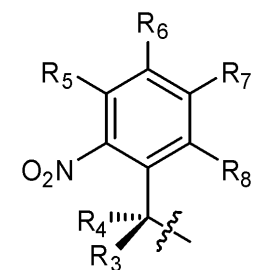
複数の標的核酸を同時に配列決定する段階をさらに含む、請求項35または36記載の方法

。

【請求項47】

(i) 請求項5記載の化合物を取り込む段階；および

(ii) 得られた核酸を光源に曝露して、下記式：



の光開裂性停止部分を該核酸から除去する段階を含む、核酸分子の非天然成分を天然成分に変換する方法。

【請求項48】

複数の核酸分子中の非天然成分を天然成分に同時に変換する段階をさらに含む、請求項47記載の方法。

【請求項49】

複数の核酸合成を同時に停止する段階をさらに含む、請求項48記載の方法。

【請求項50】

請求項1～34のいずれか一項記載の3'-OH非ブロックヌクレオチドまたはヌクレオシドをポリメラーゼの環境下に配置する段階、および3'-OH非ブロックヌクレオチドまたはヌクレオシドの核酸分子中への取り込みを可能にする段階

を含む、核酸合成を停止する方法。

【請求項51】

3'-OH非ブロックヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込みの際、DNA合成の停止効率が約90%から約100%の範囲である、請求項50記載の方法。

【請求項52】

3'-OH非ブロックヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み効率が、3'-OH非ブロックヌクレオチドまたはヌクレオシドと同じ塩基を有する天然ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み効率に比べて約70%から約100%の範囲である、請求項50記載の方法。

【請求項53】

請求項1～34のいずれか一項記載の化合物を停止ヌクレオチドアナログとして使用する段階を含む、サンガーまたはサンガー型配列決定を行う方法。

【請求項54】

(i) 標的核酸をサンガーまたはサンガー型配列決定装置に加える段階；

(ii) 複数の型の塩基が存在し、各塩基が異なる蛍光体に結合されている条件で、請求項1～34のいずれか一項記載の1つまたは複数の化合物を該配列決定装置に加える段階；

(iii) 相補的プライマーおよびポリメラーゼ酵素を加える段階；

(iv) ポリメラーゼ反応を行って段階(ii)の化合物の少なくとも1つを伸長中の核酸鎖に取り込む段階；ならびに

(v) 蛍光配列決定機器またはパルスマルチライン励起蛍光によってサンガー配列決定反応の結果を分析する段階

を含む、標的核酸の配列を決定する方法であって

段階(i)～(iii)は任意の順序で行うことができる、方法。

【請求項55】

段階(iv)の少なくとも1つの化合物の取り込みの後に、鎖伸長の停止が約90%から約100%の効率で起こる、請求項54記載の方法。

【請求項56】

ポリメラーゼ反応において、段階(iv)の少なくとも1つの化合物の取り込みが、同じ塩基を有する天然基質の取り込み効率の約70%から約100%で起こる、請求項54記載の方法。

【請求項57】

取り込み効率が約85%から約100%で起こる、請求項56記載の方法。

【請求項58】

ポリメラーゼが逆転写酵素、ターミナルトランスフェラーゼ、およびDNAポリメラーゼからなる群より選択される、請求項54記載の方法。

【請求項59】

(i) 標的核酸を配列決定装置に加える段階；
(ii) 複数の型の塩基が存在し、各塩基が異なる蛍光体に結合されている条件で、請求項1~34のいずれか一項記載の1つまたは複数の化合物を該配列決定装置に加える段階；
(iii) ポリメラーゼ酵素を加える段階；および
(iv) ポリメラーゼ反応を行って段階(ii)の化合物の少なくとも1つを伸長中の核酸鎖に取り込む段階
を含む、非天然成分を核酸に取り込む方法であって、
段階(i)~(iii)は任意の順序で行うことができる、方法。

【請求項60】

(v) 段階(ii)からの少なくとも1つの化合物の取り込みについて、ポリメラーゼ連鎖反応の結果を分析する段階
をさらに含む、請求項59記載の方法。

【請求項61】

段階(iv)の少なくとも1つの化合物の取り込みの後に、鎖伸長の停止が約90%から約100%の効率で起こる、請求項59記載の方法。

【請求項62】

ポリメラーゼ反応において、段階(iv)の少なくとも1つの化合物の取り込みが、同じ塩基を有する天然基質の取り込み効率の約70%から約100%で起こる、請求項59記載の方法。

【請求項63】

請求項1~34のいずれか一項記載の化合物をミニシーケンスまたはミニシーケンス型配列決定法に加える段階を含む、ミニシーケンスまたはミニシーケンス型配列決定を行う方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

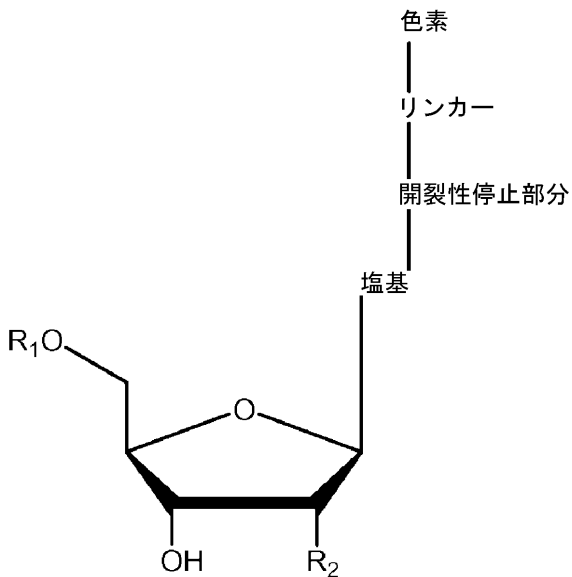
【補正の内容】

【0024】

特に、基礎をなすDNA配列を明らかにするために、取り込まれた塩基を同定するために用いる、本明細書に記載の、異なる蛍光色素で標識した、非開裂性停止基で修飾した4つのヌクレオシド三リン酸化合物、および誘導体の組み合わせを用いての、DNA配列決定の方法が提供される。

[本発明1001]

下記式の化合物：



式中、 R_1 はH、一リン酸、二リン酸、または三リン酸であり、

R_2 はHまたはOHであり、

塩基はシトシン、ウラシル、チミン、アデニン、もしくはグアニン、またはその天然誘導体であり、

開裂性停止部分 (cleavable terminating moiety) は化合物にポリメラーゼ停止特性を与える基であり、

リンカーは二官能性基であり、かつ

色素は蛍光体である。

[本発明1002]

開裂性停止部分が、ベンジルアミン、ベンジルエーテル、カルバメート、カルボネート、2-(*o*-ニトロフェニル)エチルカルバメート、および2-(*o*-ニトロフェニル)エチルカルボネートからなる群より選択される連結基により塩基に結合されている、本発明1001の化合物。

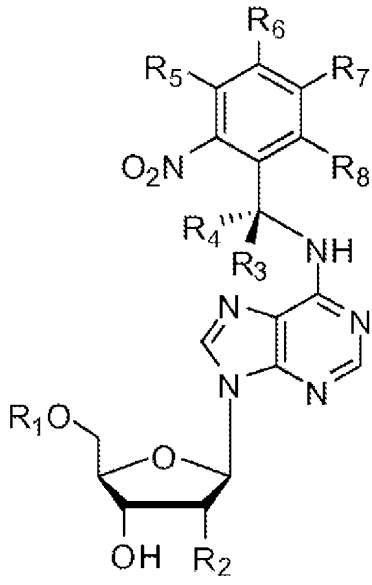
[本発明1003]

式I~VIIで表される化合物、

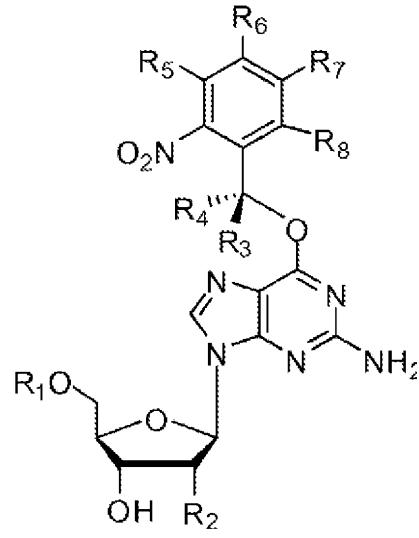
式I~VIIで表される化合物の薬学的に許容される塩またはエステル、ならびに

式I~VIIで表される化合物の鏡像異性体、ラセミ混合物、または立体異性体、およびその薬学的に許容される塩またはエステル

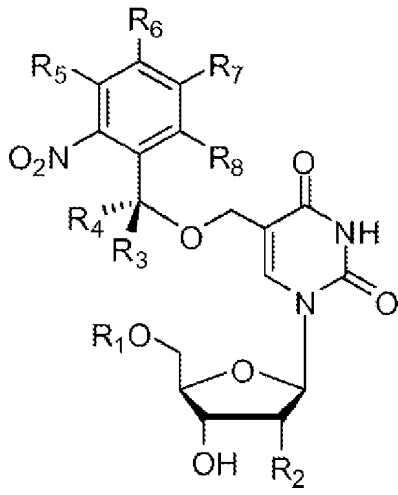
からなる群より選択される、本発明1001または1002の化合物：



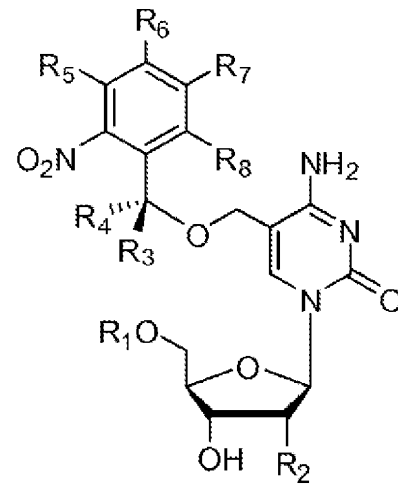
式 I



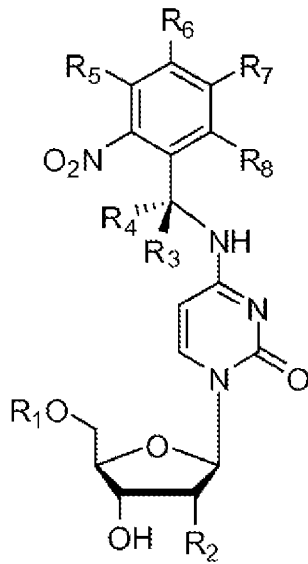
式 II



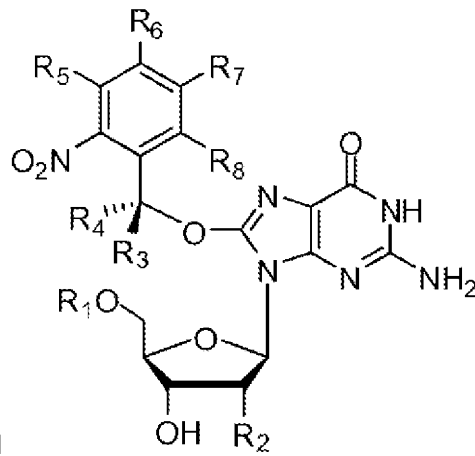
式 III



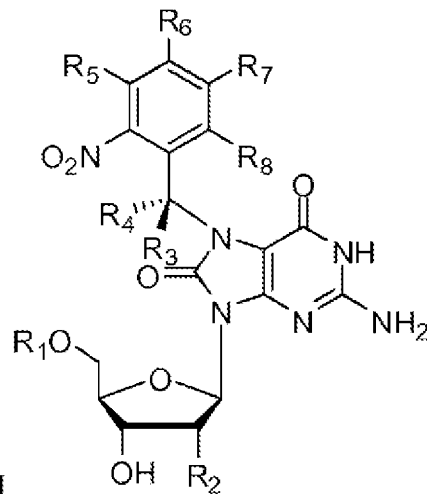
式 IV



式 V



式 VI



または

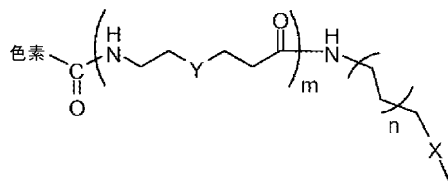
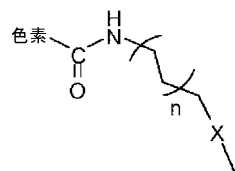
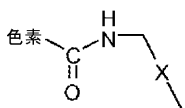
式 VII

式中、 $R_1 = \text{H}$ 、一リン酸、二リン酸、または三リン酸、
 $R_2 = \text{H}$ または OH 、

R_3 および R_4 は、 H 、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 直鎖または分枝アルキル、 $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ 直鎖または分枝アルケニルまたはポリエニル、 $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ 直鎖または分枝アルキニルまたはポリアルキニル、および例えばフェニル、ナフチル、またはピリジン環などの芳香族基の群よりそれぞれ独立に選択され

ただし R_3 および R_4 の少なくとも1つは H であり、

R_5 、 R_6 、 R_7 、および R_8 は、 H 、 OCH_3 、 NO_2 、 CN 、ハロゲン化物、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 直鎖もしくは分枝アルキル、 $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ 直鎖もしくは分枝アルケニルもしくはポリエニル、 $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ 直鎖もしくは分枝アルキニルもしくはポリアルキニル、例えばフェニル、ナフチル、もしくはピリジン環などの芳香族基、および/または下記の一般構造のリンカー基の群よりそれぞれ独立に選択され：



式中、 $X = \text{CH}_2$ 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 C 、 C 、 O 、 S 、または NH 、
 $Y = \text{CH}_2$ 、 O 、または NH 、

$n = 0 \sim 12$ の整数、
 $m = 0 \sim 12$ の整数、および
色素 = 蛍光体である。

[本発明1004]

R_3 および R_4 が、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、イソプロピル、tert-ブチル、フェニル、
2-ニトロフェニル、および2,6-ジニトロフェニルからなる群より独立に選択される、本発明1003の化合物。

[本発明1005]

R_3 および R_4 の少なくとも1つが、アルキルまたは芳香族基中に少なくとも1つのヘテロ原子を任意で含んでもよいアルキルおよび芳香族基からなる群より選択され、さらに芳香族基が任意でアリールまたは多環式基であってよい、本発明1003の化合物。

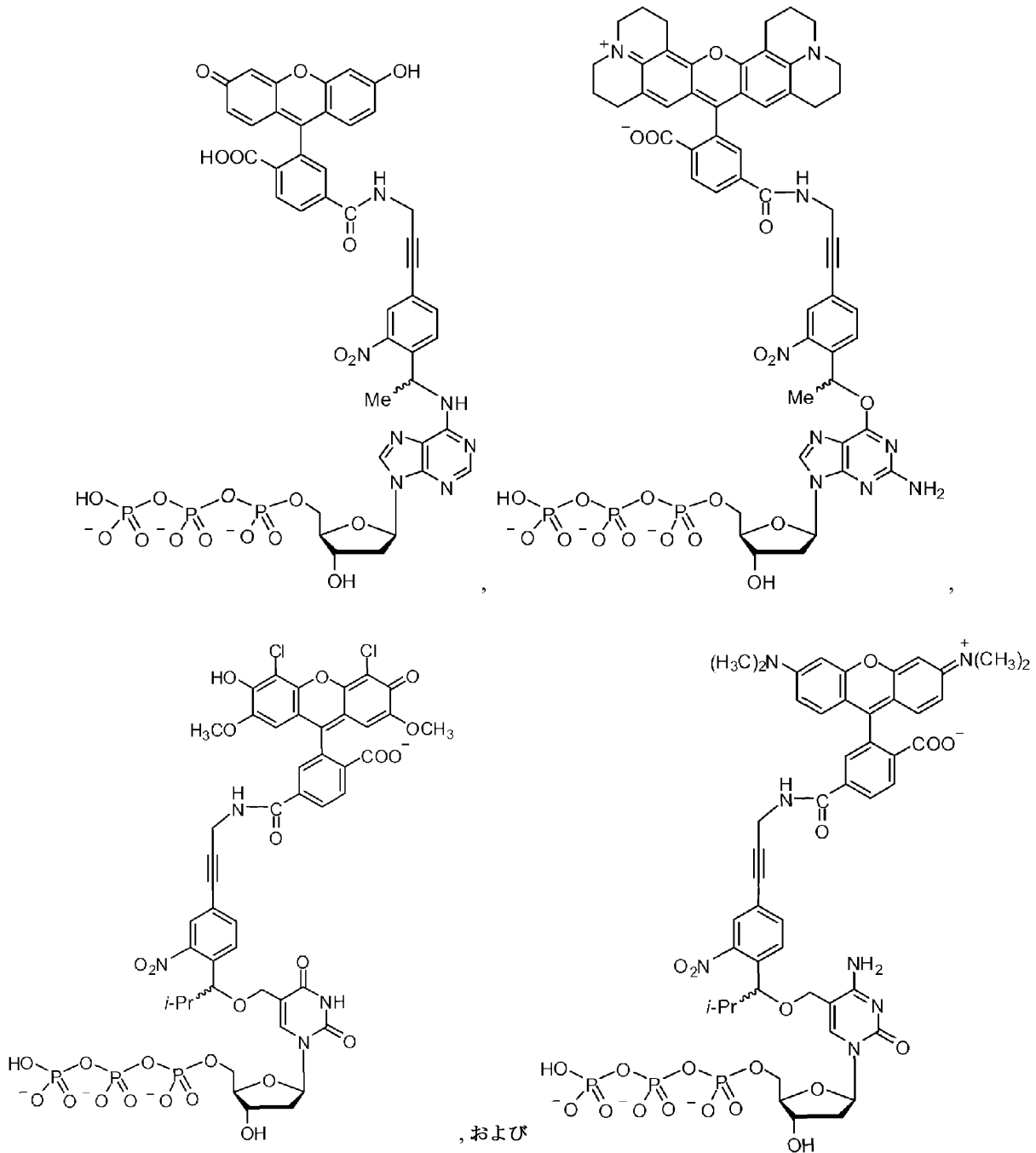
[本発明1006]

R_5 、 R_6 、 R_7 、および R_8 の少なくとも1つが、アリールおよび多環式基からなる芳香族群より選択される、本発明1003～1005のいずれかの化合物。

[本発明1007]

蛍光体が、BODIPY、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、キサントン、シアニン、ピレン、フタロシアニン、フィコピリンタンパク質、アレクサ、スクアレン色素、エネルギー転移色素を生じる組み合わせ、およびその誘導体からなる群より選択される、本発明1001～1006のいずれかの化合物。

[本発明1008]



からなる群より選択される、本発明1003の化合物。

[本発明1009]

- (i) プライマーを固体表面に結合する段階；
- (ii) 固体表面に結合したプライマーに標的核酸をハイブリダイズする段階；
- (iii) 複数の型の塩基が存在する場合、各塩基は異なる蛍光体に任意で結合していてもよい、本発明1001～1008のいずれかの1つまたは複数の化合物を加える段階；
- (iv) ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体にポリマーゼを加えて、段階 (iii) の化合物を伸長中のプライマー核酸鎖にポリマーゼ触媒反応によって取り込む段階であって、段階 (iii) の取り込まれた化合物が約70%から約100%の間の効率でポリマーゼ反応を停止する、段階；
- (v) 任意で固体表面を洗浄して、取り込まれていない成分を除去する段階；
- (vi) 取り込まれた蛍光体を検出して段階 (iii) の取り込まれた化合物を同定する段階であって、検出が任意で蛍光色素を撮像するためのパルスマルチライン励起検出器を用いて行われる、段階；

(vii) 任意で1つまたは複数の化学的化合物を加えて、伸長しなかったプライマーを永久的にキャップする段階；

(viii) 固体表面を光源に曝露して、光開裂性停止部分を除去し、天然成分を有する伸長したプライマー核酸を得る段階；

(ix) 任意で固体表面を洗浄して、開裂した光開裂性停止部分を除去する段階；

(x) 段階(iii)から(ix)を1回または複数回繰り返して、標的核酸内の複数の塩基を同定する段階を含む、標的核酸の配列決定する方法。

[本発明1010]

ポリメラーゼ反応において、段階(iv)の少なくとも1つの化合物の取り込みが、同じ塩基を有する天然基質の取り込み効率の約70%から約100%で起こる、本発明1009の方法。

[本発明1011]

取り込み効率が約85%から約100%で起こる、本発明1010の方法。

[本発明1012]

ポリメラーゼが、逆転写酵素、ターミナルトランスフェラーゼ、およびDNAポリメラーゼからなる群より選択される、本発明1009~1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

ポリメラーゼがTaq DNAポリメラーゼ、Klenow(-exo-) DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、Vent(-exo-) DNAポリメラーゼ、Pfu(-exo-) DNAポリメラーゼ、およびDeepVent(exo-) DNAポリメラーゼからなる群より選択される、本発明1012の方法。

[本発明1014]

ポリメラーゼが、Taq FS DNAポリメラーゼ、ThermoSequenase DNAポリメラーゼ、ThermoSequenase II DNAポリメラーゼ、Therminator DNAポリメラーゼ、Therminator II DNAポリメラーゼ、およびVent(-exo-) A488L DNAポリメラーゼからなる群より選択される改変ポリメラーゼである、本発明1012の方法。

[本発明1015]

段階(viii)の光源への曝露によって、約85%から約100%の光開裂性停止部分が除去される、本発明1009~1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

段階(iv)の少なくとも1つの化合物の取り込みの後にプライマー核酸鎖伸長の停止が約90%から約100%の効率で起こる、本発明1009~1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

(i) 本発明1001~1008のいずれかの化合物を核酸に取り込む段階；および

(ii) 得られた核酸を光源に曝露して、核酸から光開裂性停止部分を除去する段階を含む、核酸分子の非天然成分を天然成分に変換する方法。

[本発明1018]

本発明1001~1008のいずれかの3'-OH未保護ヌクレオチドまたはヌクレオシドをポリメラーゼの環境下に配置する段階、および

3'-OH未保護ヌクレオチドまたはヌクレオシドの核酸分子中への取り込みを可能にする段階を含む、核酸合成を停止する方法。

[本発明1019]

3'-OH未保護ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込みの際、DNA合成の停止効率が約90%から約100%の範囲である、本発明1018の方法。

[本発明1020]

3'-OH未保護ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み効率が、3'-OH未保護ヌクレオチドまたはヌクレオシドと同じ塩基を有する天然ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み効率に比べて約70%から約100%の範囲である、本発明1018または1019の方法。

[本発明1021]

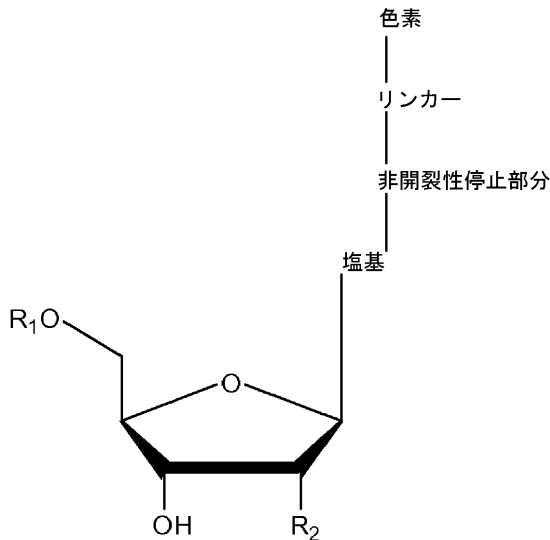
本発明1001～1008のいずれかの化合物をサンガーまたはサンガー型配列決定反応に加える段階を含む、サンガーまたはサンガー型配列決定を行う方法。

[本発明1022]

本発明1001～1008のいずれかの化合物をピロシーケンスまたはピロシーケンス型配列決定反応に加える段階を含む、ピロシーケンスまたはピロシーケンス型配列決定を行う方法。

[本発明1023]

下記式の化合物：



式中、 R_1 はH、一リン酸、二リン酸、または三リン酸であり、

R_2 はHまたはOHであり、

塩基はシトシン、ウラシル、チミン、アデニン、グアニン、またはその天然誘導体であり

非開裂性停止部分は化合物にポリメラーゼ停止特性を与える基であり、

リンカーは二官能性基であり、かつ

色素は蛍光体である。

[本発明1024]

非開裂性停止部分が、ベンジルアミン、ベンジルエーテル、カルバメート、カルボネート、2-(*o*-ニトロフェニル)エチルカルバメート、および2-(*o*-ニトロフェニル)エチルカルボネートからなる群より選択される連結基により塩基に結合されている、本発明1023の化合物。

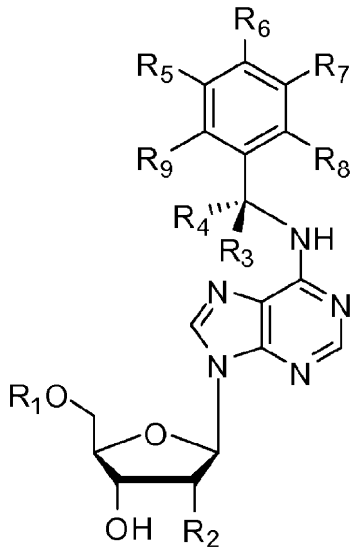
[本発明1025]

式I～VIIで表される化合物、

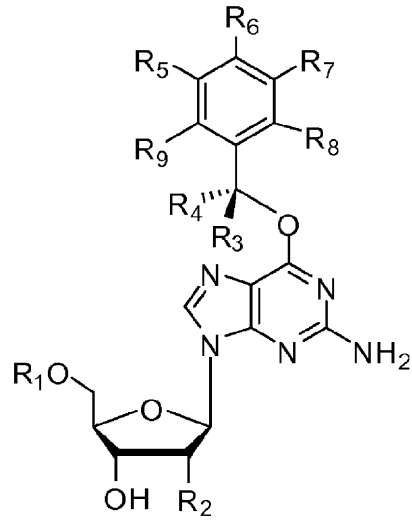
式I～VIIで表される化合物の薬学的に許容される塩またはエステル、ならびに

式I～VIIで表される化合物の鏡像異性体、ラセミ混合物、または立体異性体、およびその薬学的に許容される塩またはエステル

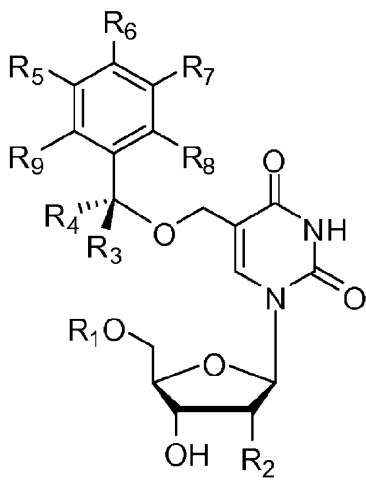
からなる群より選択される、本発明1001の化合物：



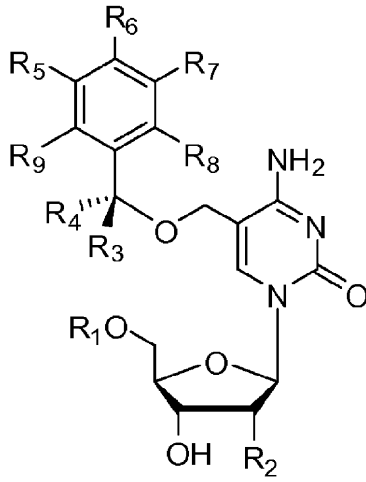
式 I



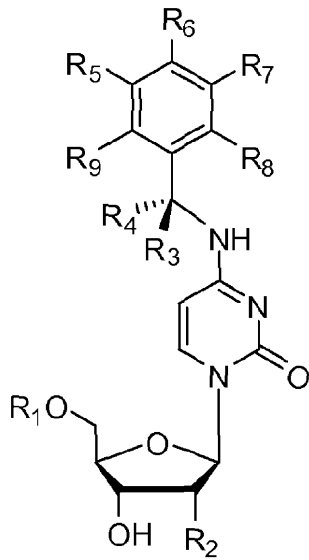
式 II



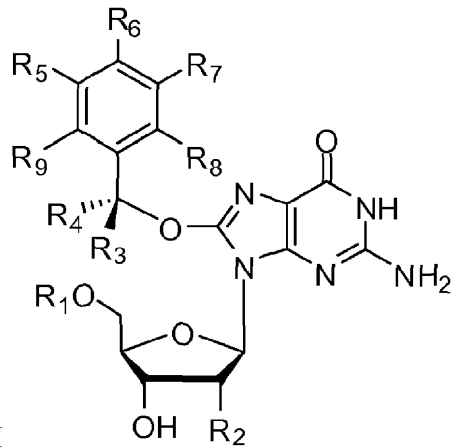
式 III



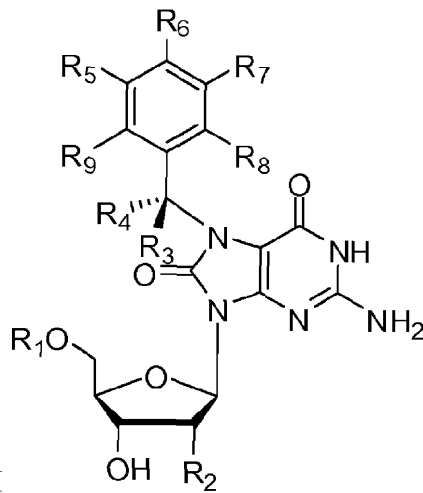
式 IV



式 V



式 VI



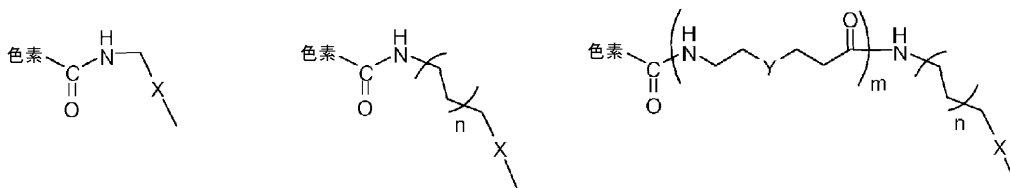
または 式 VII

式中、 $R_1 = \text{H}$ 、一リン酸、二リン酸、または三リン酸、
 $R_2 = \text{H}$ または OH 、

R_3 および R_4 は、 H 、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 直鎖または分枝アルキル、 $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ 直鎖または分枝アルケニルまたはポリエニル、 $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ 直鎖または分枝アルキニルまたはポリアルキニル、および例えばフェニル、ナフチル、またはピリジン環などの芳香族基の群よりそれぞれ独立に選択され

;

R_5 、 R_6 、および R_7 は、 H 、 OCH_3 、 NO_2 、 CN 、ハロゲン化物、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 直鎖もしくは分枝アルキル、 $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ 直鎖もしくは分枝アルケニルもしくはポリエニル、 $\text{C}_2\text{-C}_{12}$ 直鎖もしくは分枝アルキニルもしくはポリアルキニル、例えばフェニル、ナフチル、もしくはピリジン環などの芳香族基、および/または下記の一般構造のリンカー基の群よりそれぞれ独立に選択され：



式中、 $X = \text{CH}_2$ 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 C 、 C 、 O 、 S 、または NH 、
 $Y = \text{CH}_2$ 、 O 、または NH 、
 $n = 0 \sim 12$ の整数、

$m = 0 \sim 12$ の整数、および色素 = 蛍光体、かつ

R_8 および R_9 は、 R_5 、 R_6 、および R_7 について上で定義したとおりであり、ただし R_8 および R_9 は NO_2 ではない。

[本発明1026]

R_3 および R_4 の少なくとも1つが、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、イソプロピル、tert-ブチルおよびフェニルからなる群より選択される、本発明1025の化合物。

[本発明1027]

R_3 および R_4 の少なくとも1つが、アルキルまたは芳香族基中に少なくとも1つのヘテロ原子を任意を含んでもよいアルキルおよび芳香族基からなる群より選択され、さらに芳香族基が任意でアリールまたは多環式基であってよい、本発明1025の化合物。

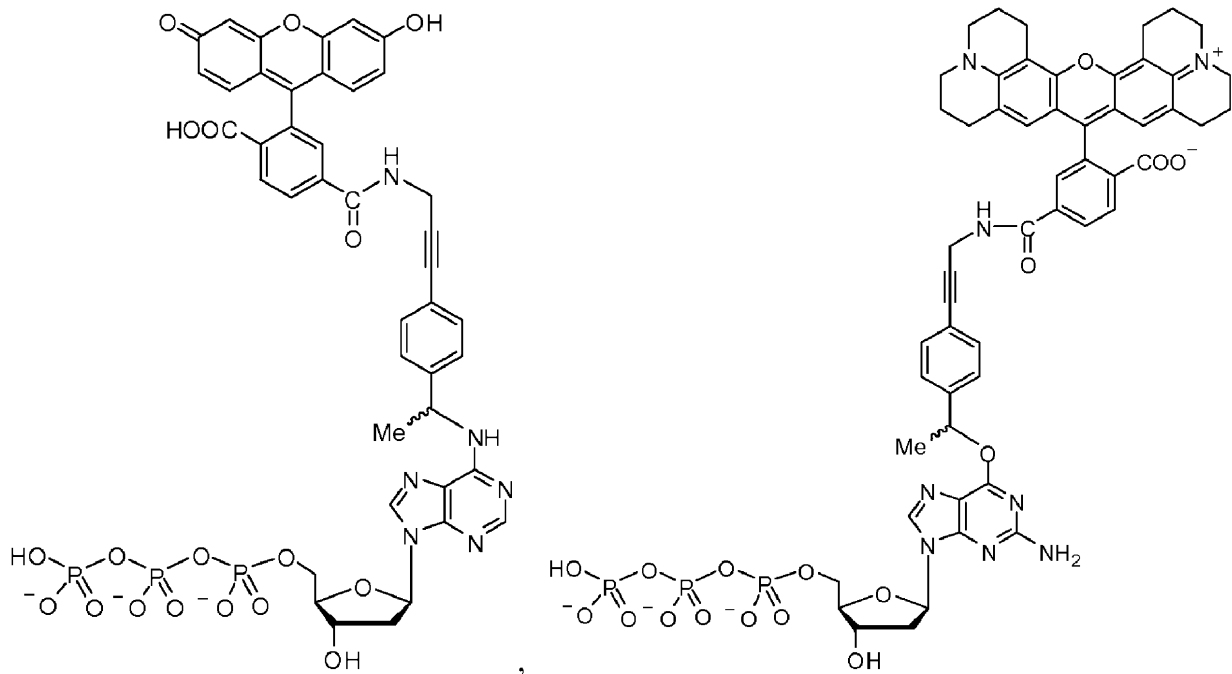
[本発明1028]

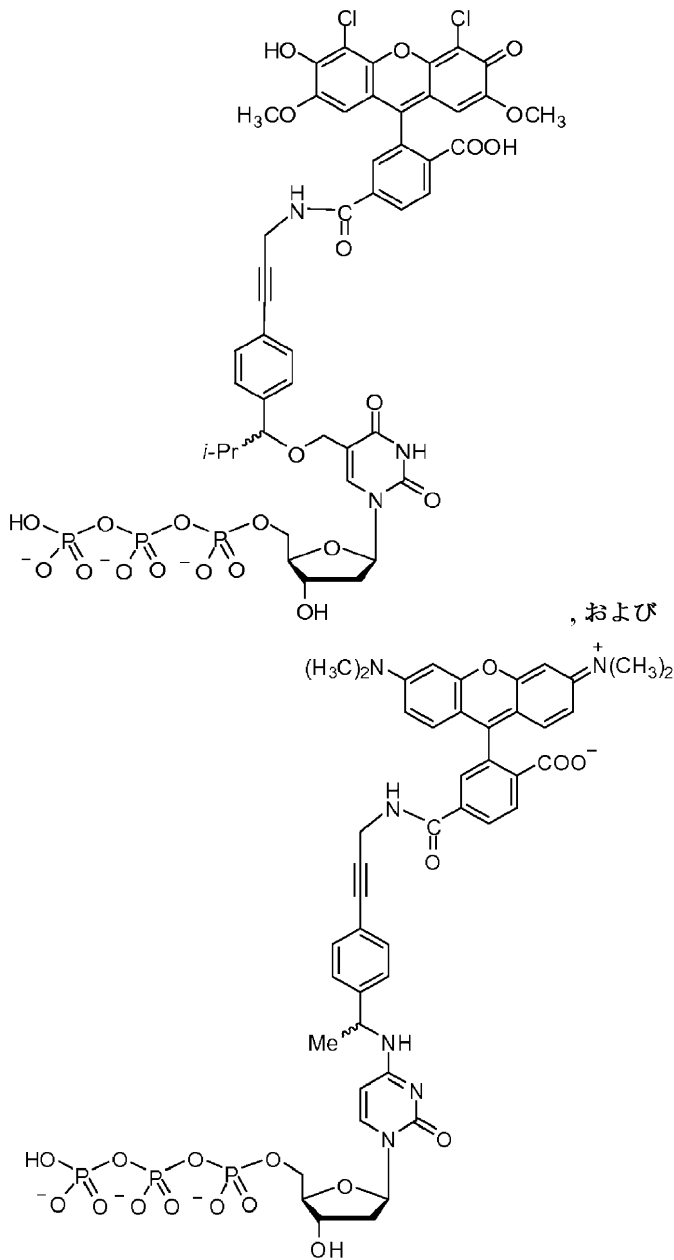
R_5 、 R_6 、 R_7 、および R_8 の少なくとも1つが、アリールおよび多環式基からなる芳香族群より選択される、本発明1025～1027のいずれかの化合物。

[本発明1029]

蛍光体が、BODIPY、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、キサンテン、シアニン、ピレン、フタロシアニン、フィコピリンタンパク質、アレクサ、スクアレン色素、エネルギー転移色素を生じる組み合わせ、およびその誘導体からなる群より選択される、本発明1023～1028のいずれかの化合物。

[本発明1030]





からなる群より選択される、本発明1025の化合物。

[本発明1031]

(i) 標的核酸をサンガーまたはサンガー型配列決定反応に加える段階；

(ii) 複数の型の塩基が存在する場合、各塩基は異なる蛍光体に任意で結合されている、本発明1023～1030のいずれかの1つまたは複数の化合物を配列決定反応に加える段階；

(iii) 相補的プライマーおよびポリメラーゼ酵素を加える段階；

(iv) ポリメラーゼ触媒反応を行って段階(ii)の化合物の少なくとも1つを伸長中の核酸鎖に取り込む段階；ならびに

(v) 配列決定反応の結果を分析する段階

を含む、標的核酸の配列を決定する方法であって

段階(i)～(iii)は任意の順序で行うことができる、方法。

[本発明1032]

段階 (iv) の少なくとも1つの化合物の取り込みの後に核酸鎖伸長の停止が約90%から約100%の効率で起こる、本発明1031の方法。

[本発明1033]

ポリメラーゼ反応において、段階 (iv) の少なくとも1つの化合物の取り込みが、同じ塩基を有する天然基質の取り込み効率の約70%から約100%で起こる、本発明1031の方法。

[本発明1034]

取り込み効率が約85%から約100%で起こる、本発明1033の方法。

[本発明1035]

ポリメラーゼが逆転写酵素、ターミナルトランスフェラーゼ、およびDNAポリメラーゼからなる群より選択される、本発明1031~1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

ポリメラーゼが、Taq DNAポリメラーゼ、Klenow(exo-) DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、Vent(-exo-) DNAポリメラーゼ、Pfu(-exo-) DNAポリメラーゼ、およびDeepVent(exo-) DNAポリメラーゼからなる群より選択される、本発明1035の方法。

[本発明1037]

ポリメラーゼが、TaqFS DNAポリメラーゼ、ThermoSequenase DNAポリメラーゼ、ThermoSequenase II DNAポリメラーゼ、Therminator DNAポリメラーゼ、Therminator II DNAポリメラーゼ、およびVent(exo-) A488L DNAポリメラーゼからなる群より選択される改変ポリメラーゼである、本発明1035の方法。

[本発明1038]

(i) 標的核酸を反応に加える段階；

(ii) 複数の型の塩基が存在する場合、各塩基は異なる蛍光体に任意で結合されている、本発明1023~1030のいずれかの1つまたは複数の化合物を反応に加える段階；

(iii) ポリメラーゼ酵素を反応に加える段階；および

(iv) ポリメラーゼ触媒反応を行って段階 (ii) の化合物の少なくとも1つを伸長中の核酸鎖に取り込む段階

を含む、非天然成分を核酸に取り込む方法であって、

段階 (i) ~ (iii) は任意の順序で行うことができる、方法。

[本発明1039]

段階 (ii) からの少なくとも1つの化合物の取り込みについて、ポリメラーゼ反応の結果を分析する段階をさらに含む、本発明1038の方法。

[本発明1040]

段階 (iv) の少なくとも1つの化合物の取り込みの後に鎖伸長の停止が約90%から約100%の効率で起こる、本発明1038~1039のいずれかの方法。

[本発明1041]

ポリメラーゼ反応において、段階 (iv) の少なくとも1つの化合物の取り込みが、同じ塩基を有する天然基質の取り込み効率の約70%から約100%で起こる、本発明1038~1040のいずれかの方法。

[本発明1042]

本発明1023~1030のいずれかの3'-OH未保護ヌクレオチドまたはヌクレオシドをポリメラーゼの環境下に配置する段階、および

3'-OH未保護ヌクレオチドまたはヌクレオシドの核酸中への取り込みを可能にする段階を含む、核酸合成を停止する方法。

[本発明1043]

3'-OH未保護ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込みの際、停止効率が約90%から約100%の範囲である、本発明1042の方法。

[本発明1044]

3'-OH未保護ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み効率が、同じ塩基を有する天然ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み効率に比べて約70%から約100%の範囲で

ある、本発明1042または1043の方法。

[本発明1045]

本発明1023～1030のいずれかの化合物をサンガーまたはサンガー型配列決定反応に加える段階を含む、サンガーまたはサンガー型配列決定を行う方法。

[本発明1046]

本発明1023～1030のいずれかの化合物をミニシーケンスまたはミニシーケンス型配列決定反応に加える段階を含む、ミニシーケンスまたはミニシーケンス型配列決定を行う方法

。