



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109476694 B

(45) 授权公告日 2022.09.30

(21) 申请号 201680074649.5

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

(22) 申请日 2016.11.04

有限公司 11038

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 袁志明

申请公布号 CN 109476694 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2019.03.15

C07H 19/14 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07H 19/10 (2006.01)

62/251,884 2015.11.06 US

C07F 7/18 (2006.01)

62/327,555 2016.04.26 US

C07C 323/12 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07D 207/46 (2006.01)

2018.06.20

C12Q 1/6811 (2018.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12Q 1/6869 (2018.01)

PCT/US2016/060435 2016.11.04

C12Q 1/6876 (2018.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

(56) 对比文件

W02017/079498 EN 2017.05.11

US 2015/0140561 A1, 2015.05.21

(73) 专利权人 奇根科学有限责任公司

US 2014/0234832 A1, 2014.08.21

地址 美国马里兰

US 7279563 B2, 2015.05.21

(72) 发明人 M·S·玛尔玛 J·欧乐尼克

CN 104024269 A, 2014.09.03

I·科尔伯克

CN 103484106 A, 2014.01.01

审查员 汪国进

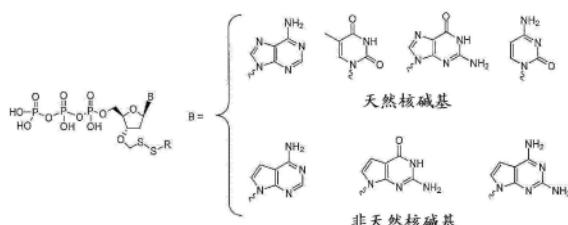
权利要求书6页 说明书64页 附图67页

(54) 发明名称

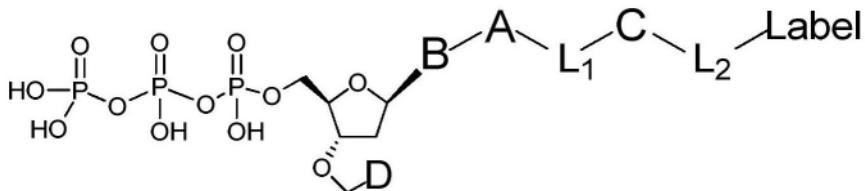
核苷酸类化合物

(57) 摘要

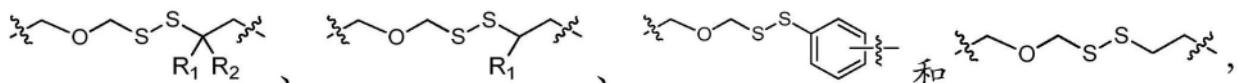
本发明提供了使用三磷酸脱氧核苷的方法、组合物、混合物和试剂盒，所述三磷酸脱氧核苷包含被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0位和可逆地连接至所述脱氧核苷的核碱基的可检测标记。这类化合物为未来测序技术(包括但不限于边合成边测序)提供了新的可能性。



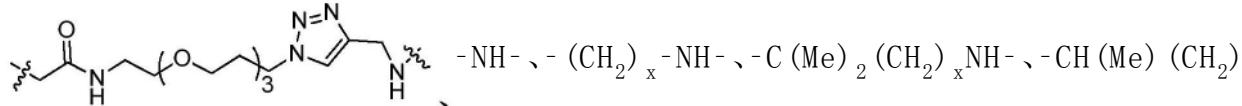
1. 根据如下结构的经标记的三磷酸脱氧核昔：



其中D选自叠氮化物、二硫烷基、二硫被取代的烷基和二硫烯丙基；B是核碱基，其为选自胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶的天然核碱基，或为选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基、7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤的非天然核碱基；A是附着基团，选自炔丙基、羟基甲基、环外胺、炔丙基胺和炔丙基羟基；C是可裂解位置核心，选自

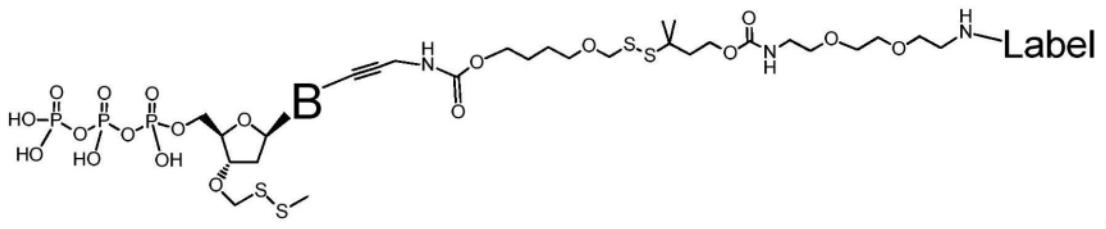


其中R₁和R₂是独立地选择的烷基；L₁和L₂是连接基团，其中L₁选自-CONH(CH₂)_x-、-CO-O(CH₂)_x-、-CONH-(OCH₂CH₂O)_x-、-CO-O(CH₂CH₂O)_x-和-CO(CH₂)_x-，其中x是0-10；L₂选自



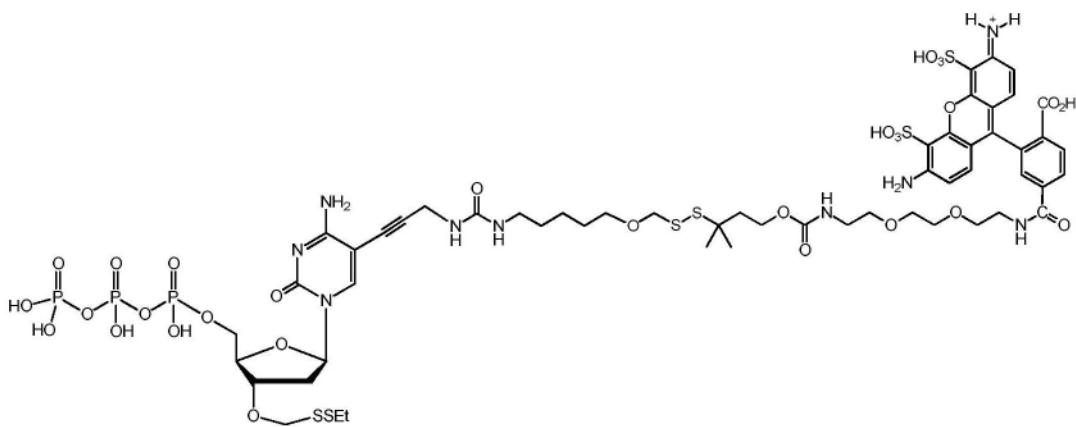
_xNH-、-C(Me)₂(CH₂)_xCO-、-CH(Me)(CH₂)_xCO-、-(CH₂)_xOCONH(CH₂)_yO(CH₂)_zNH-、-(CH₂)_xCONH(CH₂CH₂O)_y(CH₂)_zNH-、-(CH₂)_xOCONH(CH₂CH₂O)_y(CH₂)_zNH-、-CONH(CH₂)_x和-CO(CH₂)_x-，其中x、y和z各自独立地选自0-10；且Label是标记，选自荧光团染料、能量转移染料、物质-标签、生物素和半抗原，其中所述的烷基为-CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂CH₃、-CH(CH₃)₂、-CH(CH₂)₂、-CH₂CH₂CH₂CH₃、-CH(CH₃)CH₂CH₃、-CH₂CH(CH₃)₂、-C(CH₃)₃、-CH₂C(CH₃)、环丁基、环戊基、环己基或环己基甲基，所述被取代的烷基为-CH₂OH、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂SH、-CF₃、-CH₂CN、-CH₂C(O)H、-CH₂C(O)OCH₃、-CH₂C(O)NH₂、-CH₂C(O)NHCH₃、-CH₂C(O)CH₃、-CH₂OCH₃、-CH₂OCH₂CF₃、-CH₂OC(O)CH₃、-CH₂NH₂、-CH₂NHCH₃、-CH₂N(CH₃)₂、-CH₂CH₂Cl、-CH₂CH₂OH、-CH₂CF₃、-CH₂CH₂OC(O)CH₃、-CH₂CH₂NHCO₂C(CH₃)₃或-CH₂Si(CH₃)₃。

2. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核昔，其中该化合物具有如下结构：

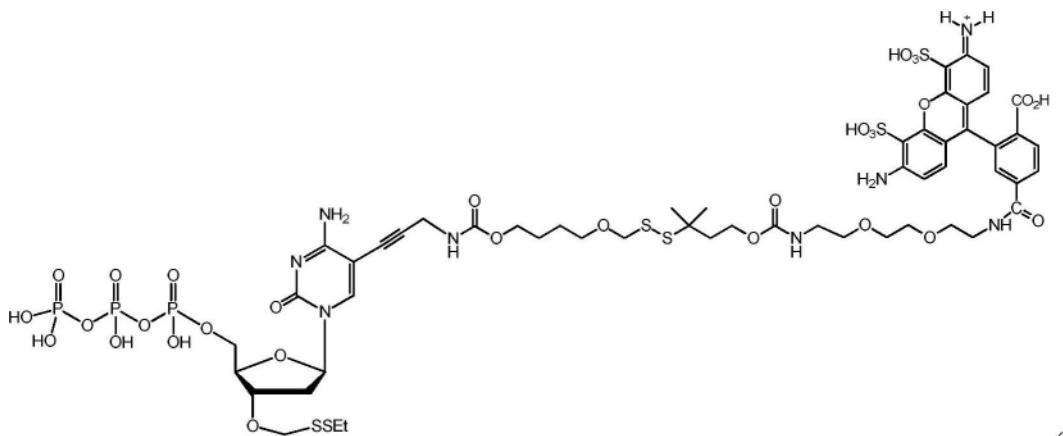


其中所示的Label是染料。

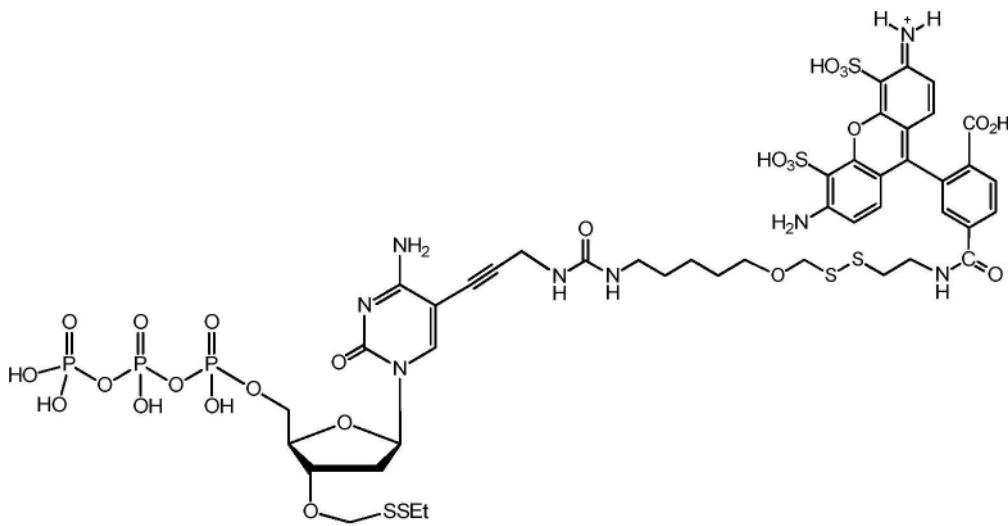
3. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核昔，其中该化合物具有如下结构：



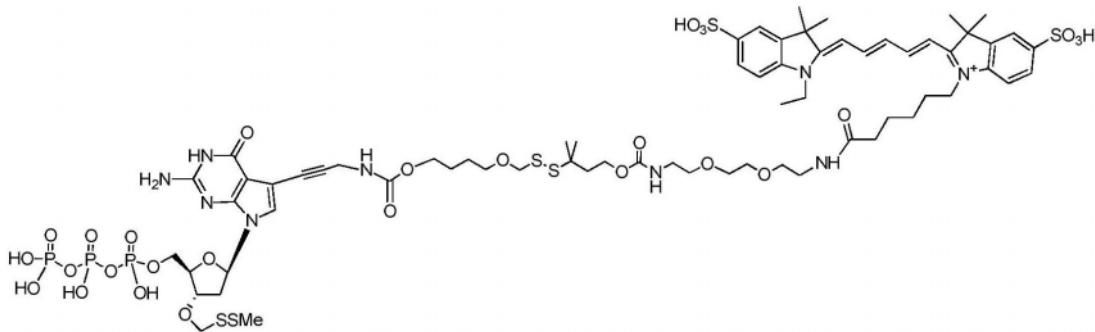
4. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷，其中该化合物具有如下结构：



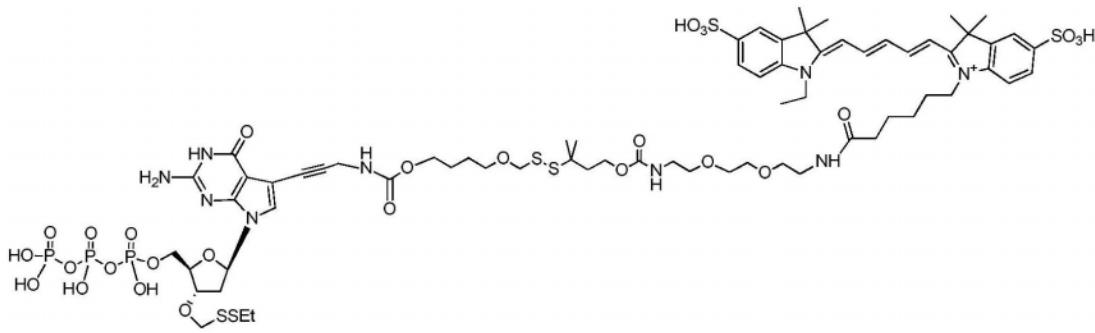
5. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷，其中该化合物具有如下结构：



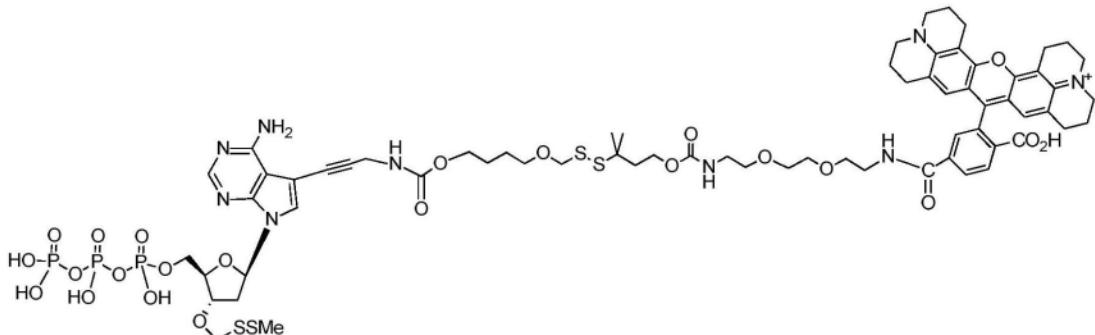
6. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷，其中该化合物具有如下结构：



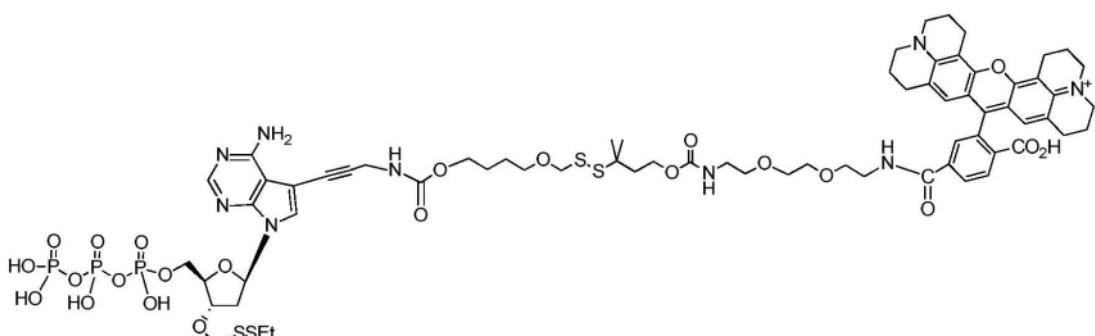
7. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



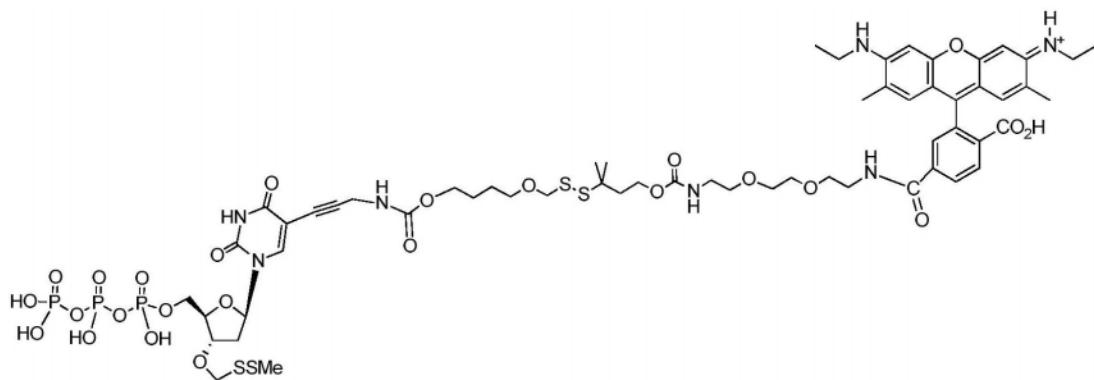
8. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



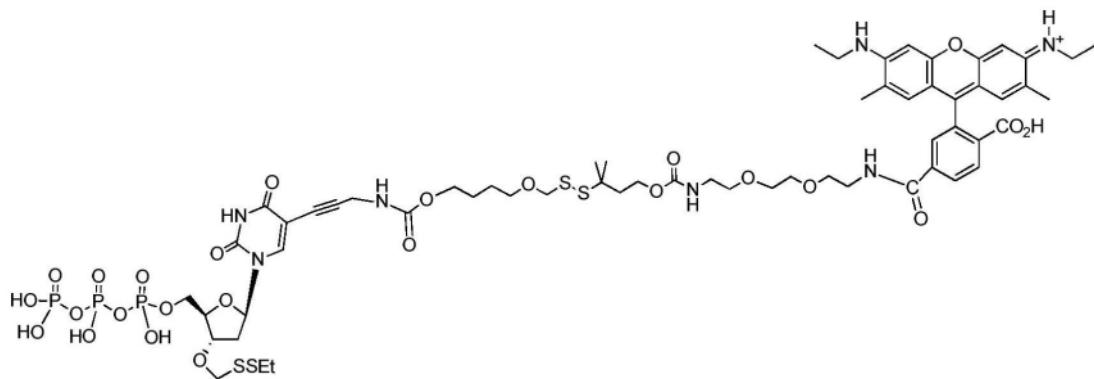
9. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



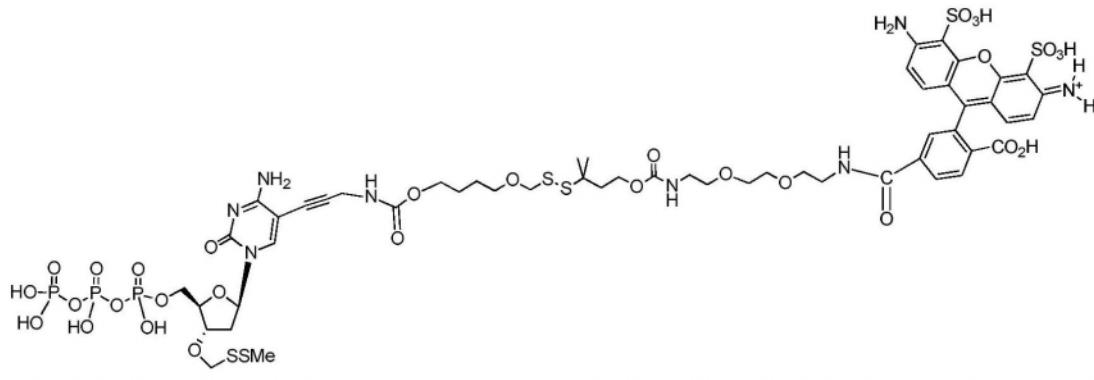
10. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



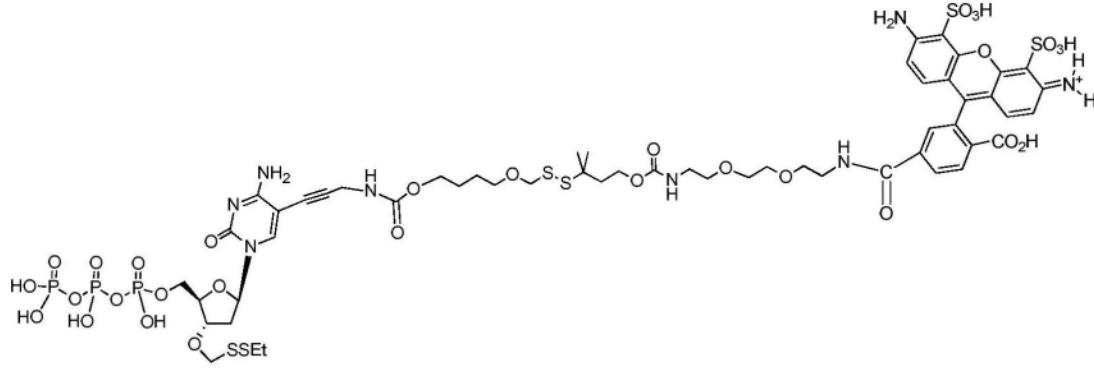
11. 根据权利要求的1标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



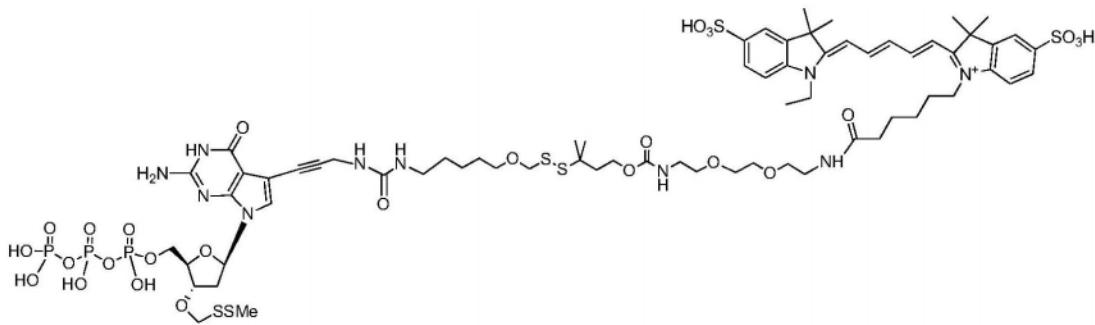
12. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



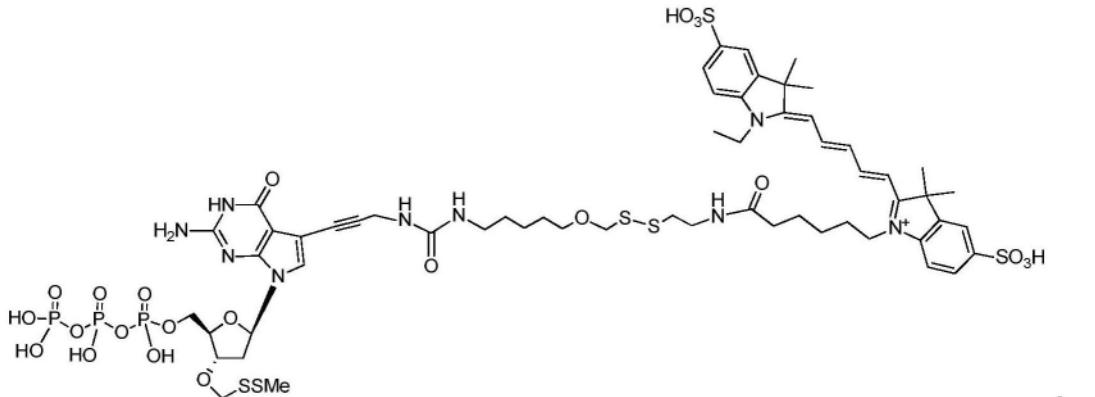
13. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



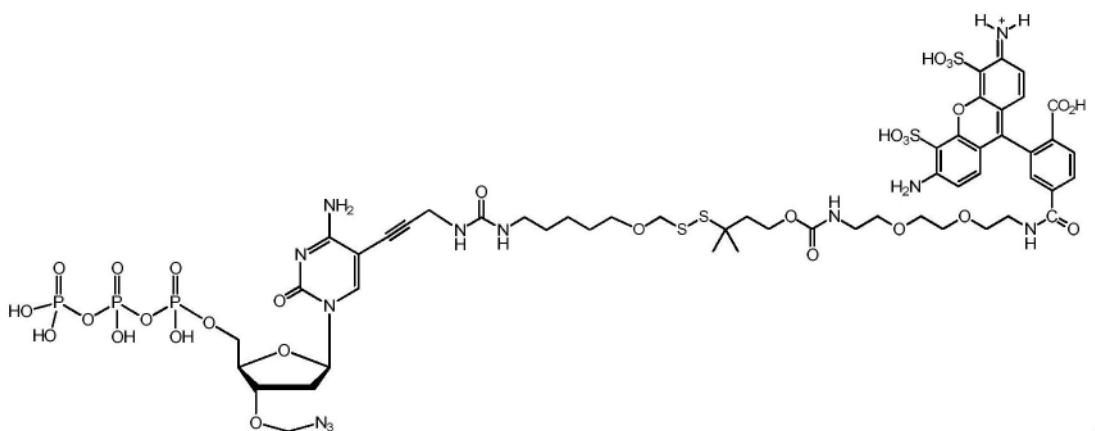
14. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



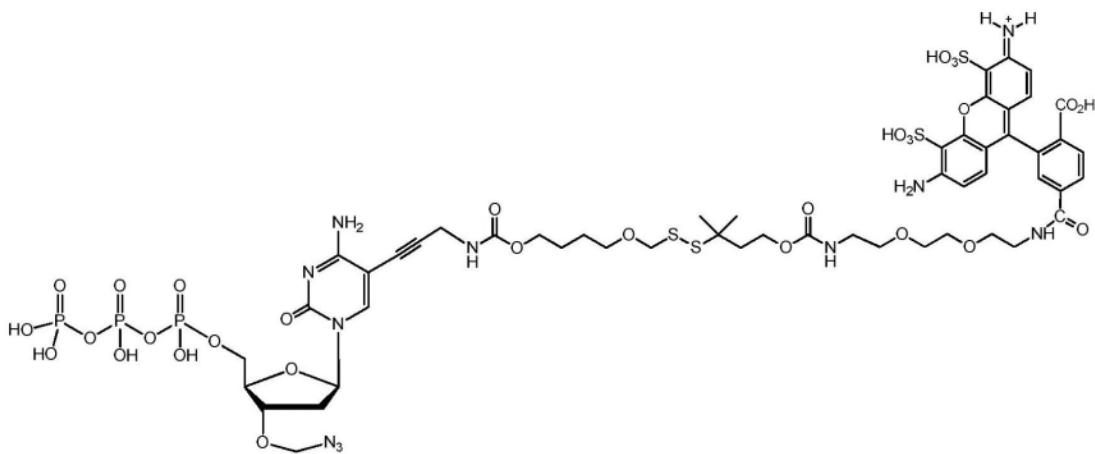
15. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



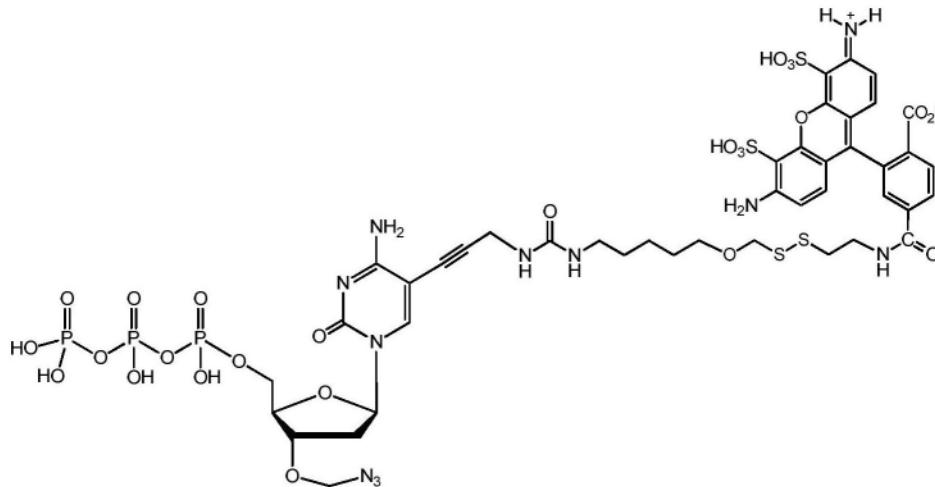
16. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



17. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



18. 根据权利要求1的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中该化合物具有如下结构:



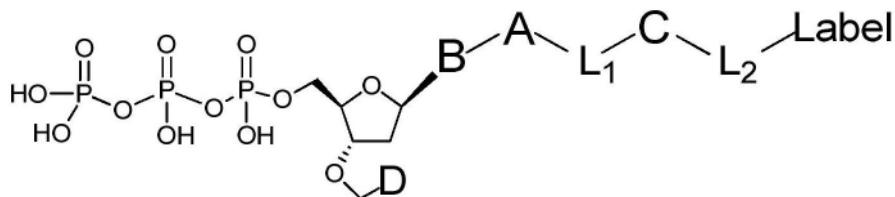
19. 一种混合物,其包含根据权利要求1的三磷酸脱氧核苷与聚合酶。

20. 根据权利要求19的混合物,其中所述的混合物还包含引物。

21. 根据权利要求20的混合物,其中所述的引物与核酸模板杂交。

22. 根据权利要求21的混合物,其中所述的核酸模板被固定。

23. 根据如下结构的经标记的三磷酸脱氧核苷:



其中D选自叠氮化物、二硫烷基、二硫被取代的烷基和二硫烯丙基;B是核碱基,其为选自胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶的天然核碱基,或为选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基,7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤的非天然核碱基,A是附着基团,其中该附着基团A是化学基团,选自炔丙基、羟基甲基、环外胺、炔丙基胺和炔丙基羟基;C是可裂解位置核心,其中该可裂解位置核心选自 $\text{R}_1\text{R}_2\text{S}-\text{S}-$ 、 $\text{R}_1\text{S}-\text{S}-$ 和 $\text{R}_1\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{S}-$, 其中 R_1 和 R_2 是独立地选择的烷基;且 L_1 和 L_2 是连接基团,其中 L_1 选自 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_x-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}(\text{CH}_2)_x-$ 、 $-\text{CONH}-\text{(OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-$ 和 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_x-$, 其中 x 是 0-10, 其中 L_2 选自 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CONH}-$ 、 $-\text{NHCONH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}=\text{N}-$ 、 $-\text{N}=\text{N}-$ 和烷基,且其中Label是可检测的标记,选自荧光团染料、能量转移染料、物质-标签、生物素和半抗原,其中所述的烷基为 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)$ 、环丁基、环戊基、环己基或环己基甲基,所述被取代的烷基为 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。

24. 根据权利要求23的经标记的三磷酸脱氧核苷,其中 L_2 不是 $-\text{S}-$ 。

核苷酸类化合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有2015年11月6日提交的美国临时专利申请号 62/251,884和2016年4月26日提交的美国临时专利申请62/327,555 的权益,通过引用将它们并入本申请。

发明领域

[0003] 本发明提供了利用三磷酸脱氧核苷的方法、组合物、混合物和试剂盒,所述的三磷酸脱氧核苷包含被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-O位置以及与所述脱氧核苷的核碱基可逆连接的可检测标记。这类化合物为未来测序技术,包括但不限于边合成边测序,提供了新的可能性。

[0004] 发明背景

[0005] DNA测序是现代生物技术中最重要的分析方法之一。M.L. Metzker, *Nature Reviews* 2010, 11, 31[1] 和C.W.Fuller等人, *Nature Biotechnology* 2009, 27, 1013[2] 中提供了关于当前测序技术的详细综述。

[0006] 一种众所周知的测序方法是边合成边测序(SBS)方法。根据该方法,三磷酸核苷可逆地被3'-OH保护基(尤其是酯和醚)封闭。酯的实例是链烷酸酯如乙酰基、磷酸酯和碳酸酯。三磷酸核苷通常在碱基上包含标记。

[0007] Hiatt和Rose(美国专利5,990,300) [3]描述了使用可逆的3'-OH封闭的三磷酸核苷以逐步方式酶促合成预定序列的多核苷酸的方法。除了酯,醚,腈,磷酸酯,磷酰胺,碳酸酯,氨基甲酸酯,硼酸酯,糖,氨基磷酸酯,苯基亚磺酸酯,硫酸酯和砜以外,他们还公开了硝酸酯作为可裂解3'-OH保护基。脱保护可以通过化学或酶促方式进行。对于硝酸酯基团,既没有公开合成方法,也没有公开脱保护条件和酶促结合资料。所要求保护的解封闭溶液优选包含二价阳离子如Co²⁺和生物缓冲液如Tris。未披露含有标记的3'-OH封闭的三磷酸核苷。

[0008] Buzby(US2007-0117104) [4]公开了用于SBS的在3'-羟基处被可逆地保护并且在碱基处携带标记的三磷酸核苷。该标记经由可裂解的连接体,如二硫连接体或光可裂解的连接体连接。所述连接体由至多约25个原子组成。除了羟胺,醛,烯丙基胺,烯烃,炔烃,醇,胺,芳基,酯,醚,腈,磷酸酯,碳酸酯,氨基甲酸酯,硼酸酯,糖,氨基磷酸酯,苯基氨基磺酸酯,硫酸酯,砜和杂环,3' OH-保护基也可以是硝酸酯。

[0009] 为了在核酸测序中获得更长的读取长度和更好的准确性需要的是具有可裂解的保护基和可裂解的连接体的核苷酸类似物,其在裂解后不遗留反应性残基[5]。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了利用三磷酸脱氧核苷的方法、组合物、混合物和试剂盒,所述的三磷酸脱氧核苷包含被基团加帽的3'-O位置,所述的基团包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基和可逆地连接至所述脱氧核苷的核碱基的可检测标记。在一个实施方案中,本发明考虑到了具有可逆保护基的核苷酸类似物,所述可逆保护基包含亚甲二硫化物和在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体。这类化合物为未来测序技术,包括但不限于边合成

边测序,提供了新的可能性。

[0012] 就混合物而言,本发明在一个实施方案中包括与一种或多种另外的测序试剂(包括但不限于缓冲液、聚合酶、引物、模板等)混合的三磷酸脱氧核苷,该三磷酸脱氧核苷包含在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体和被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0位。就试剂盒而言,本发明在一个实施方案中包括测序试剂盒,其中测序试剂被共同提供在分开的容器中(或混合物中),包括三磷酸脱氧核苷,该三磷酸脱氧核苷包含被包含亚甲基二硫基作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0位置,连同(任选)在测序中使用这类试剂的说明书。不想本发明受试剂盒中测序试剂的数量或性质限制。在一个实施方案中,试剂盒包含一种或多种另外的测序试剂,包括但不限于缓冲液、聚合酶、引物等。

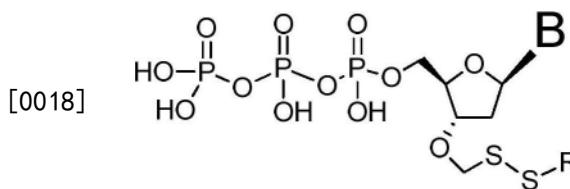
[0013] 不想本发明限于任何特定的聚合酶。本发明考虑到了核苷酸衍生物结合增强的改造的(例如突变的)聚合酶。例如,Tabor,S.和Richardson,C.C.((1995)Proc.Nat1.Acad.Sci(USA)92:6339[6])描述了在水生栖热菌(*T.aquaticus*)DNA聚合酶中用酪氨酸替代苯丙氨酸667,以及这对DNA聚合酶对双脱氧核苷酸的识别的影响。在一个实施方案中,本发明考虑到了缺乏3'-5'外切核酸酶活性的聚合酶(命名为exo-)。例如,Perler等人,1998US 5756334[7]和Southworth等人,1996Proc.Nat1 Acad.Sci USA 93:5281[8]描述了9°N聚合酶的exo-变体。另一个聚合酶的实例是Pfu DNA聚合酶的A486Y变体(Evans等人,2000.Nucl. Acids.Res.28:1059[9])。另一个实例是Tsp JDF-3DNA聚合酶的A485T 变体(Arezi等人,2002.J.Mol.Biol.322:719[10])。WO 2005/024010 A1涉及基元A区的修饰和9°N DNA聚合酶,通过引用将其并入本申请[11]。

[0014] 就方法而言,本发明考虑到了合成三磷酸脱氧核苷的方法,所述三磷酸脱氧核苷包含在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体和被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0位置,以及利用三磷酸脱氧核苷的方法,所述三磷酸脱氧核苷包含被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0位置。

[0015] 在一个实施方案中,本发明涉及(a)具有被包含亚甲二硫结构(例如通式-CH₂-SS-R)作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0的三磷酸核苷;以及(b)它们的经标记的类似物,其中标记通过可裂解氧基亚甲二硫基连接体(-OCH₂-SS-) (尽管该连接体可以包含另外的基团)连接到核碱基上。此类核苷酸可用于边合成边核酸测序(SBS)技术中。在一个实施方案中,本发明涉及被包含亚甲二硫结构(例如-CH₂-SS-R)作为可裂解保护基的基团加帽的核苷酸3'-0的合成、脱保护条件或酶促参入。

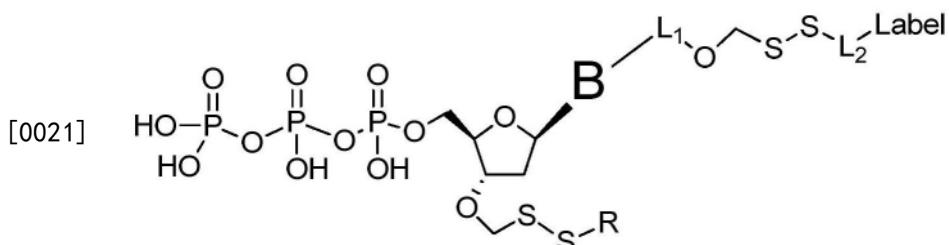
[0016] 在一个实施方案中,本发明涉及三磷酸脱氧核苷,其包含在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体以及被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0。在一个实施方案中,所述核苷的核碱基是非天然的。在一个实施方案中,所述核苷的非天然核碱基选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基,7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤。在一个实施方案中,所述包含亚甲二硫化物的基团是-CH₂-SS- R,其中R选自烷基和被取代的烷基。在一个实施方案中,所述可检测标记经由可裂解氧基亚甲二硫基连接体(例如具有式-OCH₂-SS-)连接至所述核碱基。在一个实施方案中,所述可检测标记是荧光标记。在一个实施方案中,式(-CH₂-S-S-R)中的R可以是烷基或烯丙基。

[0017] 在一个实施方案中,本发明涉及根据以下结构的三磷酸脱氧核苷:



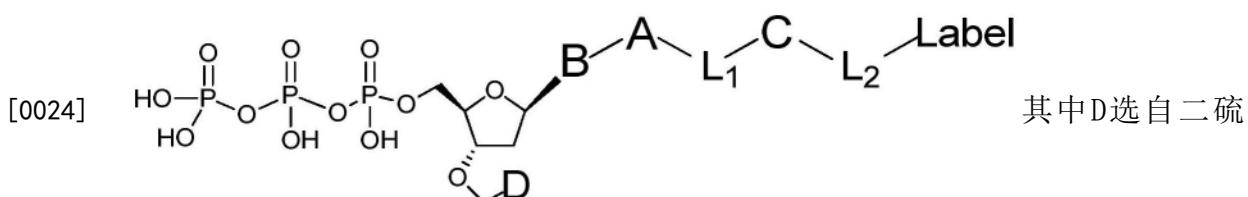
[0019] 其中B是核碱基并且R选自烷基和被取代的烷基。在一个实施方案中,所述核碱基是天然核碱基(胞嘧啶,鸟嘌呤,腺嘌呤,胸腺嘧啶和尿嘧啶)。在一个实施方案中,所述核碱基是选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基,7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤的非天然核碱基。在类似物的情况下,可检测标记还可以包括所述核碱基与所述可检测标记之间的连接体部分。

[0020] 在一个实施方案中,本发明涉及根据如下结构的经标记的三磷酸脱氧核昔:



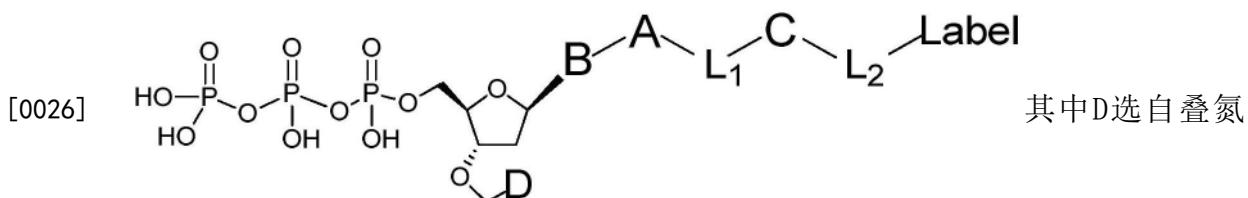
[0022] 其中B是核碱基,R选自烷基和被取代的烷基,且L₁和L₂是连接基团。在一个实施方案中,所述核碱基是天然核碱基类似物。在一个实施方案中,所述核碱基是非天然核碱基类似物,其选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基,7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤。在类似物的情况下,可检测标记可以还包括所述核碱基与所述可检测标记之间的连接体部分。在一个实施方案中,L₁和L₂独立地选自-CO-、-CONH-、-NHCONH-、-O-、-S-、-ON和-N=N-、烷基、芳基、支链烷基、支链芳基或其组合。优选L₂不为“-S-”。在一个实施方案中,本发明考虑到了L₁是碱基上的胺或碱基上的羟基。在一个实施方案中,所述的Label选自荧光团染料、能量转移染料、物质-标签、生物素和半抗原。在一个实施方案中,所述的Label是可检测的标记。

[0023] 在一个实施方案中,本发明涉及根据如下结构的经标记的三磷酸脱氧核昔:



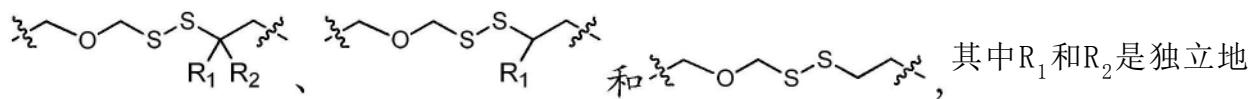
化物烯丙基和二硫化物取代的烯丙基;B是核碱基;A是附着基团;C是可裂解位置核心;L₁和L₂是连接基团;且Label是标记(例如可检测的部分)。

[0025] 在一个实施方案中,本发明涉及根据如下结构的经标记的三磷酸脱氧核昔:

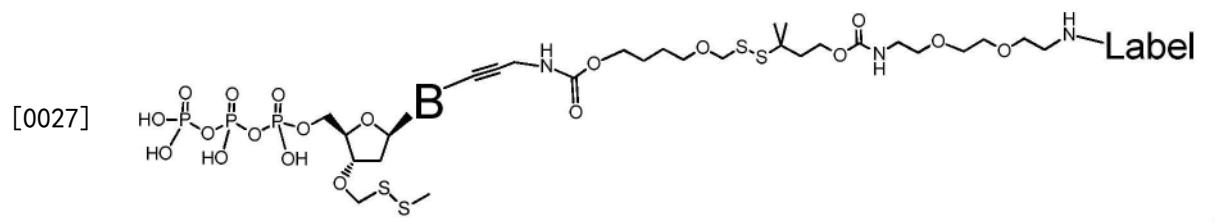


化物、二硫化物烷基、二硫化物取代的烷基;B是核碱基;A是附着基团;C是可裂解位置核心;

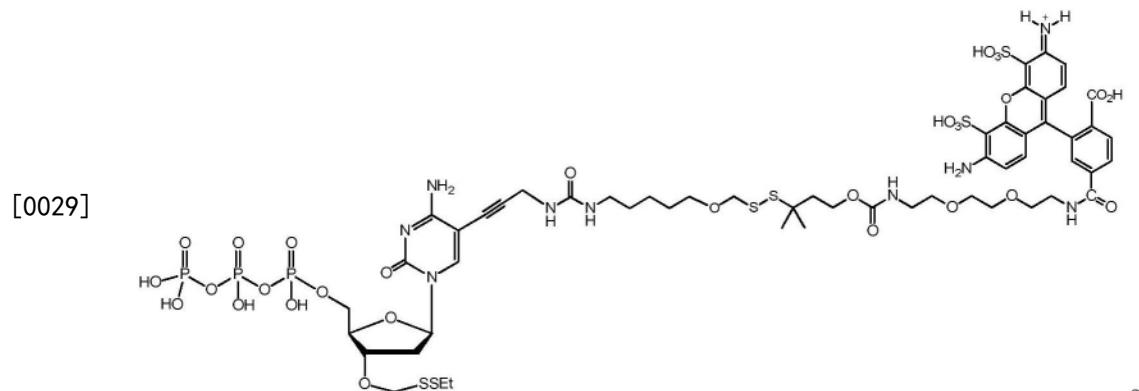
L_1 和 L_2 是连接基团；且Label是标记。在一个实施方案中，所述核碱基是非天然核碱基类似物，其选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基，7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤。在一个实施方案中，所述附着基团A是化学基团，其选自炔丙基、羟基甲基、环外胺、炔丙基胺和炔丙基羟基。在一个实施方案中，所述可裂解位置核心选自：



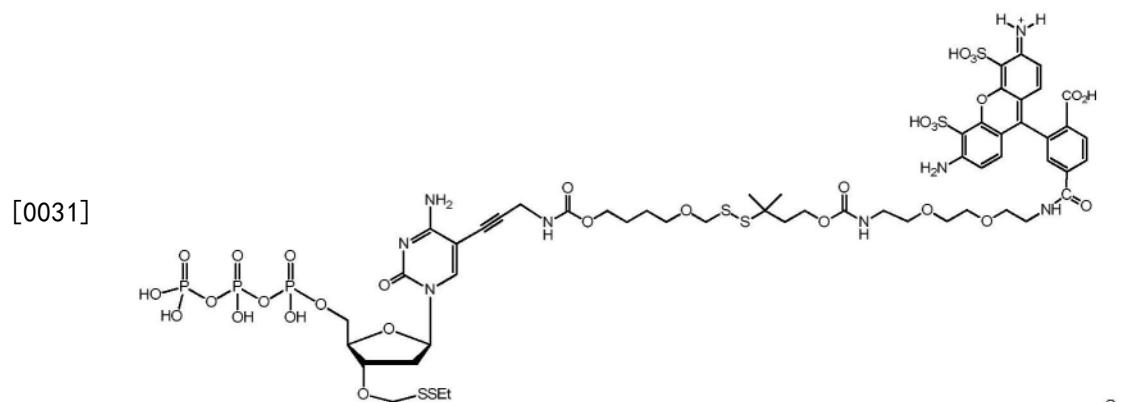
选择的烷基。在一个实施方案中, L_1 选自 $-CONH(CH_2)_x-$ 、 $-CO-O(CH_2)_x-$ 、 $-CONH-(OCH_2CH_2O)_x-$ 、 $-CO-O(CH_2CH_2O)_x-$ 和 $-CO(CH_2)_x-$, 其中 x 是 0-10, 但更优选 1-6。在一个实施方案中, L_2 选自 $-NH-$ 、 $- (CH_2)_x-NH-$ 、 $-C(Me)_2(CH_2)_xNH-$ 、 $-CH(Me)(CH_2)_xNH-$ 、 $-C(Me)_2(CH_2)_xCO-$ 、 $-CH(Me)(CH_2)_xCO-$ 、 $- (CH_2)_xOCONH(CH_2)_yO(CH_2)_zNH-$ 、 $- (CH_2)_xCONH(CH_2CH_2O)_y(CH_2)_zNH-$ 和 $-CONH(CH_2)_x-$ 、 $-CO(CH_2)_x-$, 其中 x 、 y 和 z 各自独立地选自 0-10, 但更优选 1-6。在一个实施方案中, 所述的标 Label 选自荧光团染料、能量转移染料、物质-标签、生物素和半抗原。在一个实施方案中, 该化合物具有如下结构:



[0028] 其中所述的Label是染料。在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

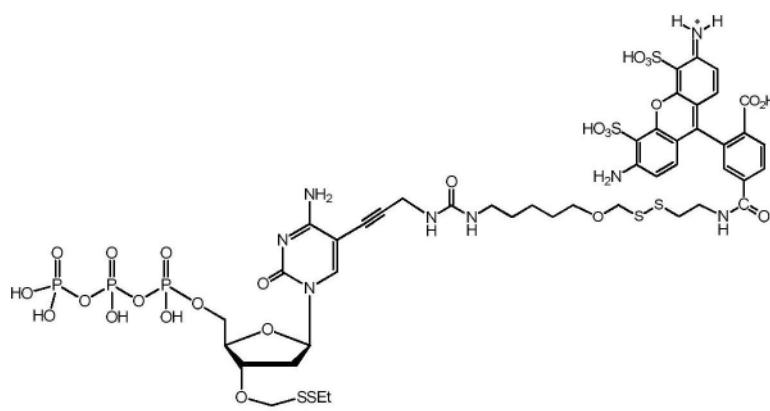


[0030] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:



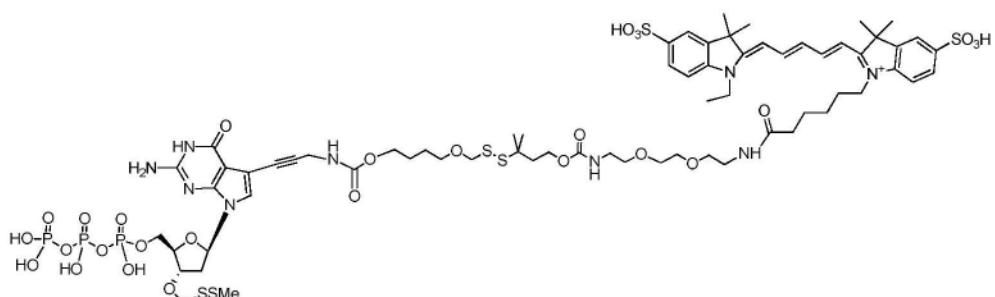
[0032] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0033]



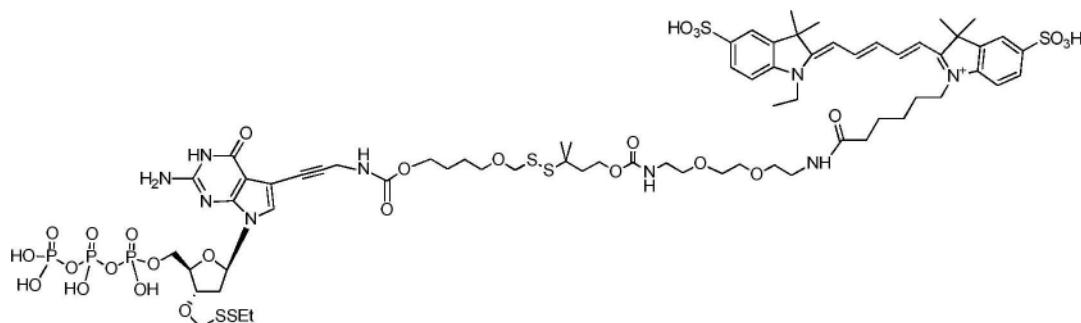
[0034] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0035]



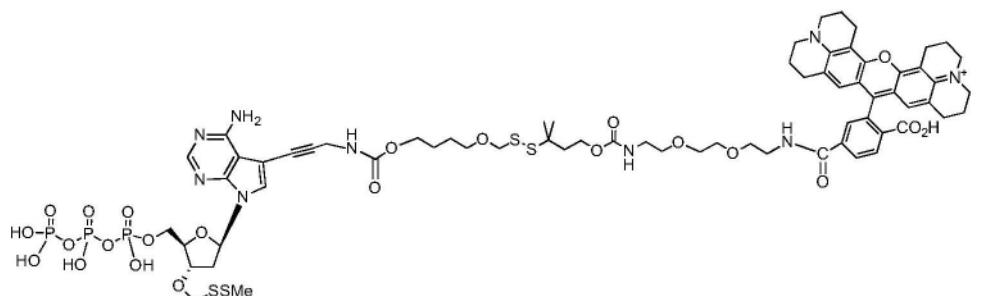
[0036] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0037]



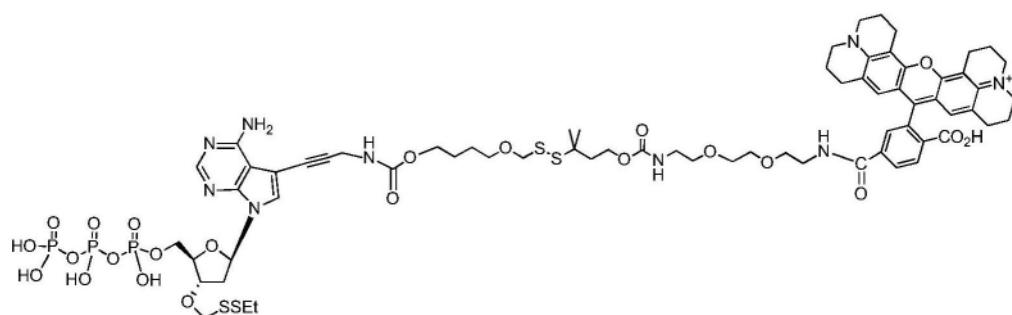
[0038] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0039]



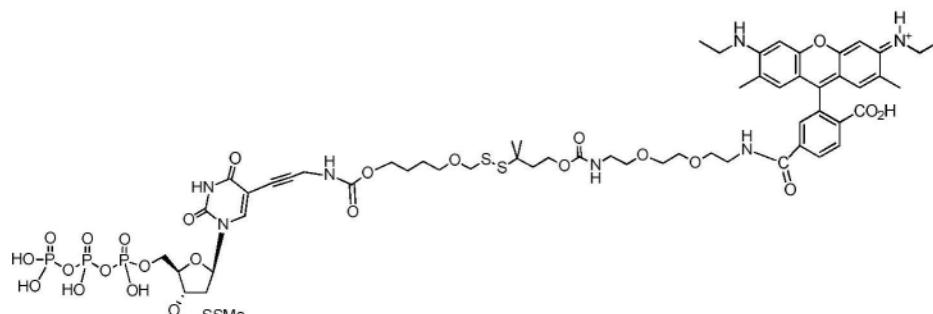
[0040] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0041]



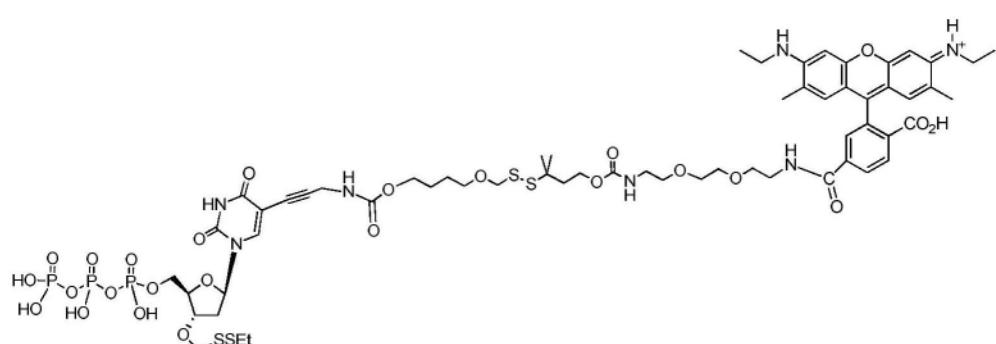
[0042] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0043]



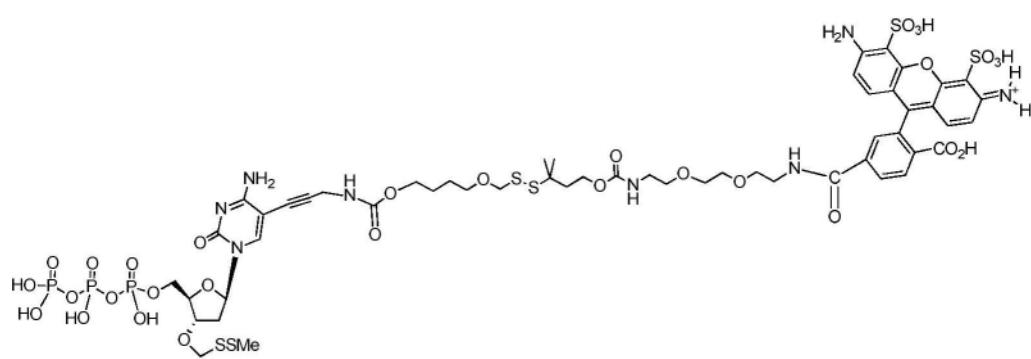
〔0044〕 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0045]



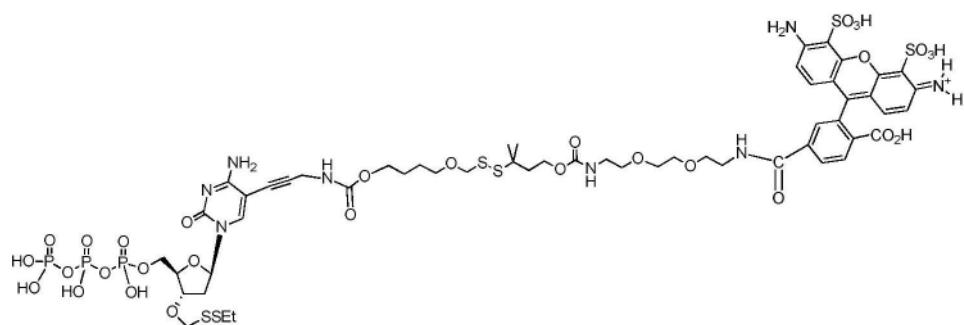
[0046] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0047]



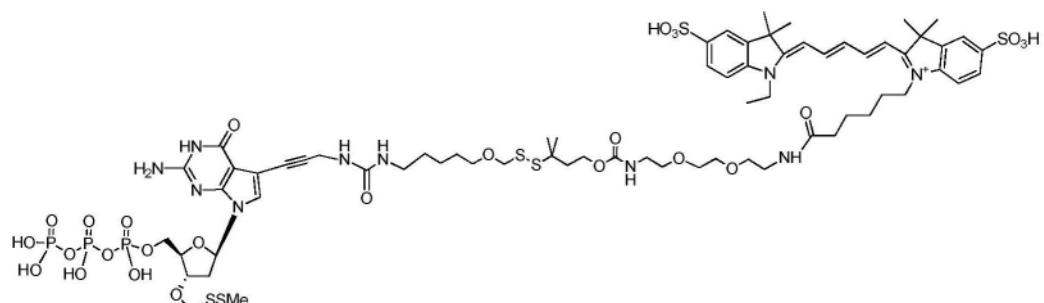
[0048] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0049]



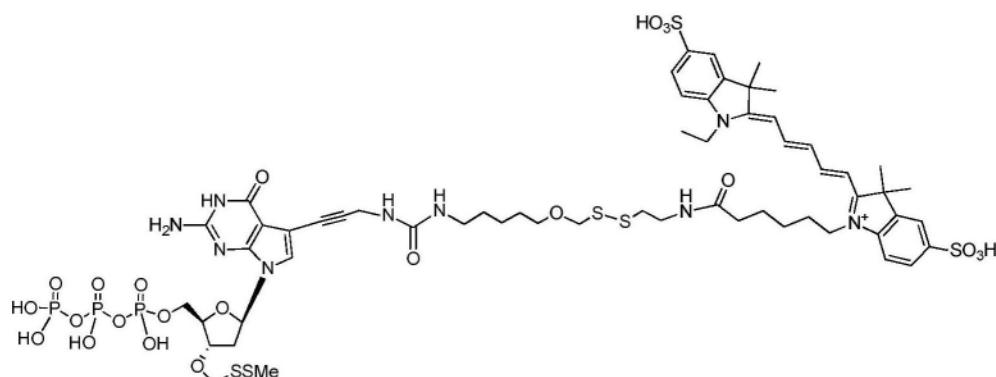
[0050] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0051]



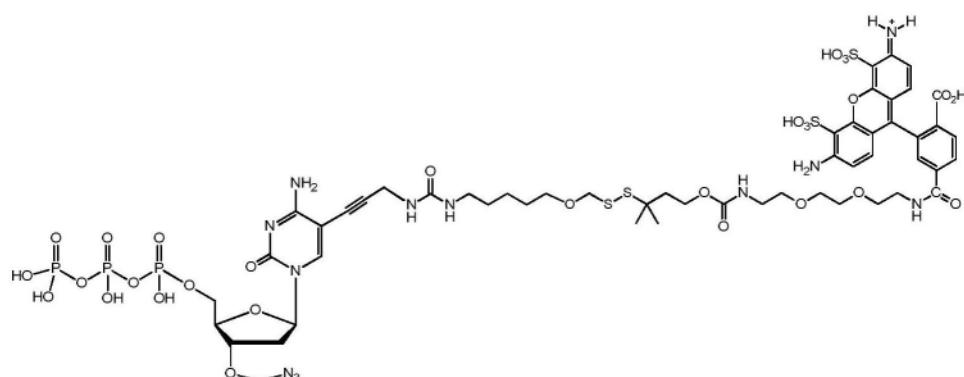
[0052] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0053]



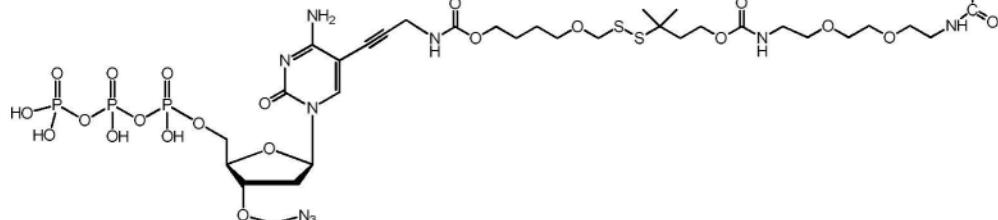
[0054] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0055]



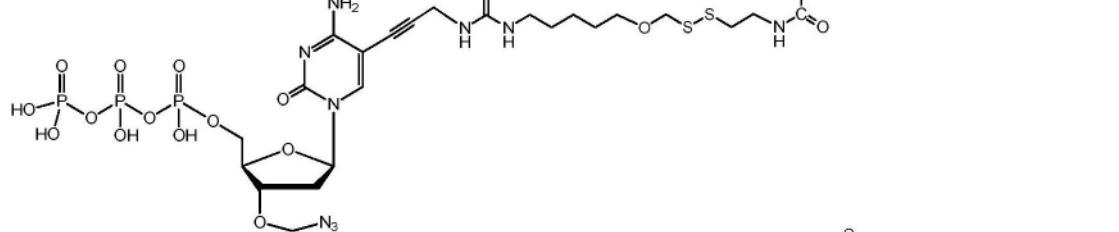
[0056] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0057]

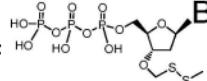


[0058] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

[0059]



[0060] 在一个实施方案中,本发明涉及根据如下结构的三磷酸脱氧核苷:



其中B是核碱基。

[0061] 在一个实施方案中,本发明涉及试剂盒,其包含一种或多种测序试剂(例如DNA聚合酶)和至少一种三磷酸脱氧核苷,该三磷酸脱氧核苷包含在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体,被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0。在一个实施方案中,所述核碱基是天然核碱基类似物。在一个实施方案中,所述核苷的核碱基是非天然的。在一个实施方案中,所述核苷的非天然核碱基选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基,7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤。

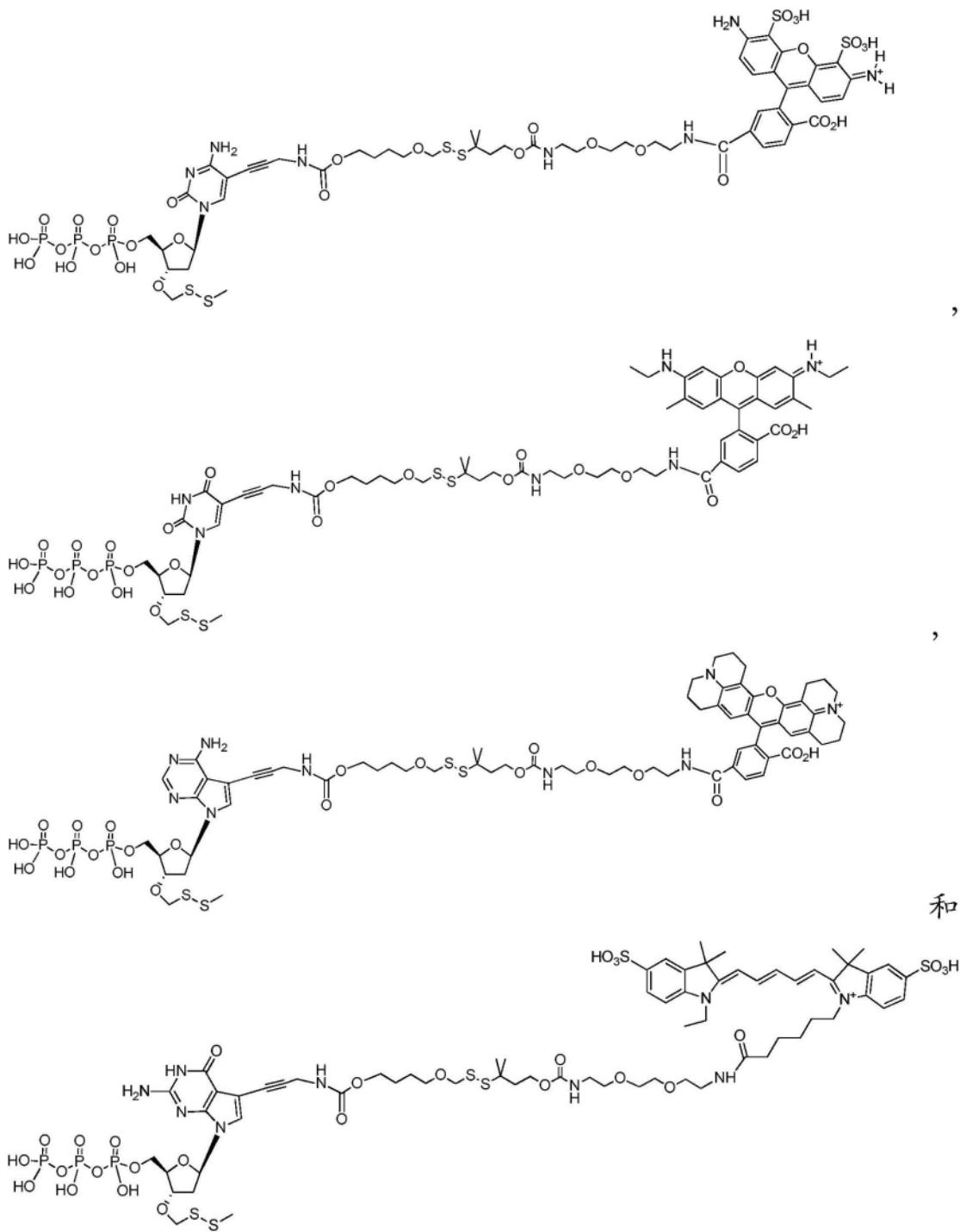
[0062] 本发明还包括混合物,即与一种或多种额外试剂(无论是干燥的还是在溶液中)混合的至少一种三磷酸脱氧核苷,所述三磷酸脱氧核苷包含在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体,被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0。在一个实施方案中,本发明涉及反应混合物,其包含具有引物的核酸模板、DNA聚合酶和至少一种三磷酸脱氧核苷,所述的引物与所述的模板杂交,所述的三磷酸脱氧核苷包含核碱基、标记和糖、在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体,所述的糖包含被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0,其中所述的核苷还包含共价结合至所述核苷的核碱基的可检测标记。

[0063] 在一个实施方案中,本发明涉及进行DNA合成反应的方法,它包括下列步骤:a)提供反应混合物,其包含具有引物的核酸模板、DNA聚合酶、至少一种三磷酸脱氧核苷,所述

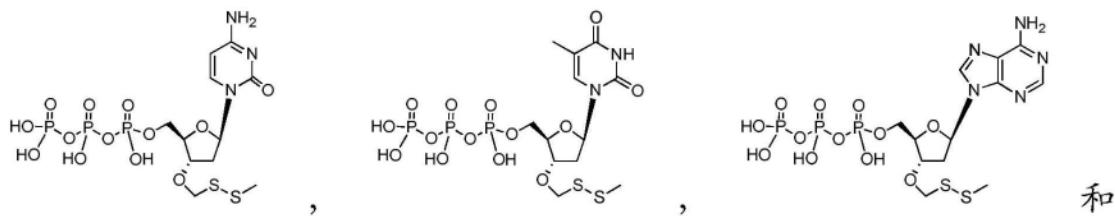
的引物与所述的模板杂交,所述的三磷酸脱氧核苷包含在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体,具有被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的 3'-0;以及 b) 使所述的反应混合物经受能够进行DNA聚合酶催化的引物延伸反应的条件。这允许将至少一种三磷酸脱氧核苷(包含在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体,具有被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0)参入所结合的引物。在一个实施方案中,所述DNA聚合酶催化的延伸反应是测序反应(例如SBS)的一部分。在一个实施方案中,通过暴露于还原剂从所述核碱基中除去所述可检测标记。不表示本发明限于一种还原剂类型。可以使用能够还原二硫键的任意适合的还原剂来实施本发明。在一个实施方案中,所述还原剂是膦[12],例如三苯膦、三丁膦、三羟基甲基膦、三羟基丙基膦、三乙酯基-膦(TCEP)[13,14]。在一个实施方案中,所述还原剂是TCEP。在一个实施方案中,通过暴露于携带硫氢基的化合物从所述核碱基上除去所述可检测标记和3'-OCH₂-SS-R基团[15],以便裂解基于二硫基的连接体和终止(保护)基团,这类含硫氢基的化合物,包括(但不限于)半胱氨酸、半胱胺、二硫-琥珀酸、二硫苏糖醇、2,3-二巯基-1-丙磺酸钠盐、二硫丁胺[16]、内消旋-2,5-二巯基-N,N,N',N'-四甲基己二酰二胺、2-巯基-乙磺酸盐和N,N'-二甲基,N,N'-双(巯基乙酰基)-肼[17]。可以通过包含硒醇被进一步催化反应[18]。此外,硼氢化物例如硼氢化钠也可以用于该目的[19](以及抗坏血酸[20])。此外,用于裂解二硫键的酶方法也是已知的,例如二硫化物和硫还原酶,并且可以与本发明的化合物一起使用[21]。

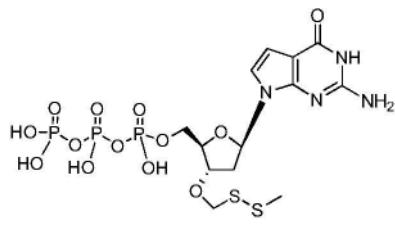
[0064] 在一个实施方案中,本发明涉及用于分析DNA序列的方法,它包括下列步骤:a) 提供反应混合物,其包含具有引物的核酸模板,所述的引物与所述模板杂交,形成引物/模板杂交复合物;b) 加入DNA 聚合酶和第一种三磷酸脱氧核苷,该三磷酸脱氧核苷包含核碱基、在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体,具有被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0;c) 使所述的反应混合物经受能够进行DNA聚合酶催化的延伸反应的条件,以便生成经修饰的引物/模板杂交复合物;以及d) 检测所述经修饰的引物/模板杂交复合物中的所述三磷酸脱氧核苷的所述第一种可检测标记。在一个实施方案中,该检测能够确定参入了哪种类型的类似物(A、T、G、C或U)。在一个实施方案中,该方法还包括下列步骤:e) 从修饰的引物/模板杂交复合物中除去所述可裂解保护基和任选的所述可检测标记;以及f) 重复步骤b)-e) 至少一次(和任选地重复这些步骤多次,例如10-200次)。在一个实施方案中,包含可裂解氧基亚甲二硫基的连接体是疏水性的并且具有大于0的logP值。在一个实施方案中,包含可裂解氧基亚甲二硫基的连接体是疏水性的并且具有大于0.1的logP值。在一个实施方案中,包含可裂解氧基亚甲二硫基的连接体是疏水性的并且具有大于1.0的logP值。在一个实施方案中,该方法还包括在步骤b)的重复过程中加入第二种三磷酸脱氧核苷,其中所述的第二种三磷酸脱氧核苷包含第二种可检测标记,其中所述的第二种可检测标记与所述第一种可检测标记不同。在一个实施方案中,所述第二种三磷酸脱氧核苷的核碱基与所述第一种脱氧黄三磷酸的核碱基不同。在一个实施方案中,在步骤b)中使用至少4种不同标记的表示A、G、C和T或U的类似物的3'-0亚甲二硫化物加帽的三磷酸脱氧核苷化合物。在一个实施方案中,具有如下结构的至少4种不同标记的3'-0亚甲二硫化物加帽的三磷酸脱氧核苷化合物的所述混合物

[0065]



用于步骤b)。在一个实施方案中,所述混合物还包含未标记的3'-0-亚甲二硫化物加帽的三磷酸脱氧核苷化合物,例如具有如下结构的那些:





它们也用于步骤b)。在一个实施方案中,步骤e)通过使所述

经修饰的引物/模板杂交复合物暴露于还原剂来进行。在一个实施方案中,所述还原剂是TCEP。在一个实施方案中,通过暴露于携带硫氢基的化合物从所述核碱基上除去所述可检测标记,以便裂解基于二硫基的连接体和终止(保护)基团,这类含硫氢基的化合物,包括(但不限于)半胱氨酸、半胱胺、二硫-琥珀酸、二硫苏糖醇、2,3-二硫基-1-丙磺酸钠盐、二硫丁胺、内消旋-2,5-二硫基-N,N,N',N'-四甲基己二酰二胺、2-巯基-乙磺酸盐和N,N'-二甲基,N,N'-双(巯基乙酰基)-肼。

[0066] 不表示本发明限于特定的测序平台。然而,优选的仪器为QIAGEN的GeneReader DNA测序系统(GR)。在一个实施方案中,通过经边合成边测序(SBS)的方法来测定DNA序列。在一个实施方案中,每个测序循环由8个步骤组成:延伸1,延伸2,洗涤1,添加成像溶液,洗涤2,裂解和洗涤3。用分析软件加工成像循环中采集的数据,得到错误率、生产率值和适用的定相校正值。

[0067] 包括相同或类似方法通常可以改善其它SBS平台(即在类似条件下操作的任何边合成边测序的方法)以及特异性SBS平台例如HiSeq和miSeq平台来自Illumina;Roche 454;Ion Torrent PGM和Proton平台;以及PacificBio平台的性能。

[0068] 不表示本发明仅限于一种类型的测序。在一个实施方案中,所述三磷酸脱氧核苷(包含核碱基、标记和糖、在标记与核碱基之间的可裂解氧基亚甲二硫基连接体,所述的糖包含被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-O)可以用于热测序。

[0069] 在一个实施方案中,本发明涉及包含核碱基和糖的三磷酸脱氧核苷,所述核碱基包含经由可裂解氧基亚甲二硫基连接体连接的可检测标记,所述的糖包含被包含亚甲二硫结构基团作为可裂解保护基的基团加帽的3'-O。在一个实施方案中,所述核苷是与聚合酶(或一些另外的测序试剂)的混合物。在一个实施方案中,所述核苷的核碱基是非天然的。在一个实施方案中,所述核苷的非天然核碱基选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基,7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤。在一个实施方案中,包含亚甲二硫化物的所述基团具有式-CH₂-SS-R,其中R选自烷基和被取代的烷基。在一个实施方案中,所述混合物还包含引物。在一个实施方案中,所述引物与核酸模板杂交。在一个实施方案中,所述可检测标记是荧光标记。在一个实施方案中,所述核酸模板被固定(例如在孔、通道或其它结构中或可选地在珠上)。

[0070] 在一个实施方案中,本发明涉及制备3'-0-(甲硫基甲基)-5'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧核苷的方法,它包括:a)提供5'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧核苷,其中所述的5'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧核苷包含核碱基和糖,和ii)甲硫基甲基供体;以及b)在生成3'-0-(甲硫基甲基)-5'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧核苷的条件下处理所述5'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧核苷。在一个实施方案中,所述甲硫基甲基供体是DMSO。在一个实施方案中,所述条件包含酸性条件。在一个实施方案中,所述5'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧核苷包含所述核苷的核碱基上的保护基。

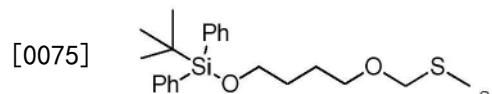
在一个实施方案中,用柱色谱法纯化所述3' -0- (甲硫基甲基) -5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -2' -脱氧核苷。

[0071] 在一个实施方案中,本发明涉及制备3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -2' -脱氧核苷的方法,它包括:a) 提供i) 3' -0- (甲硫基甲基) -5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -2' -脱氧核苷和ii) R- SH,其中R包含烷基或被取代的烷基;以及b) 在生成3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -2' -脱氧核苷的条件下处理所述3' -0- (甲硫基甲基) -5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -2' -脱氧核苷。在一个实施方案中,所述R-SH是乙硫醇。在一个实施方案中,所述条件包含碱性条件。

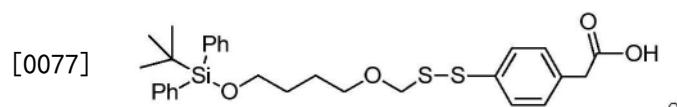
[0072] 在一个实施方案中,本发明涉及制备3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -2' -脱氧核苷的方法,它包括:a) 提供3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -2' -脱氧核苷;以及b) 在生成3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -2' -脱氧核苷的条件下处理所述3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -2' -脱氧核苷。在一个实施方案中,所述条件包含使所述3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -2' -脱氧核苷暴露于NH₄F。

[0073] 在一个实施方案中,本发明涉及制备3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -2' -脱氧核苷的三磷酸酯的方法,它包括:a) 提供3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -2' -脱氧核苷;以及b) 在生成3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -2' -脱氧核苷的三磷酸的条件下处理所述3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -2' -脱氧核苷。在一个实施方案中,所述条件包含使所述3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -2' -脱氧核苷暴露于(MeO)₃PO与POCl₃和Bu₃N。在一个实施方案中,所述方法还包括步骤c) 除去所述核碱基保护基。在一个实施方案中,所述保护基包含N-三氟乙酰基-氨基炔丙基保护基。在一个实施方案中,通过溶剂分解除去所述N-三氟乙酰基-氨基炔丙基保护基,产生 5' -0- (三磷酸) -3' -0- (R-取代的-二硫甲基) -5- (氨基炔丙基) -2' -脱氧核苷。

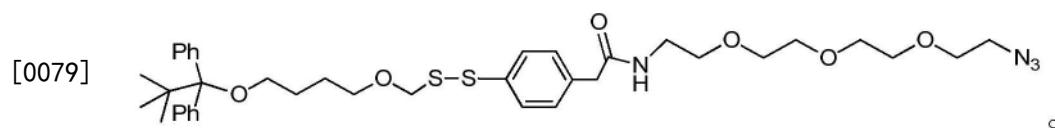
[0074] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:



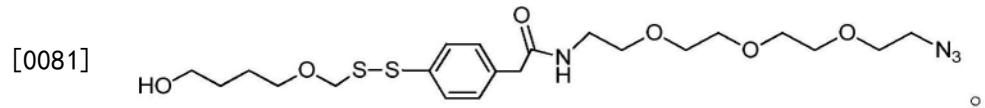
[0076] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:



[0078] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:

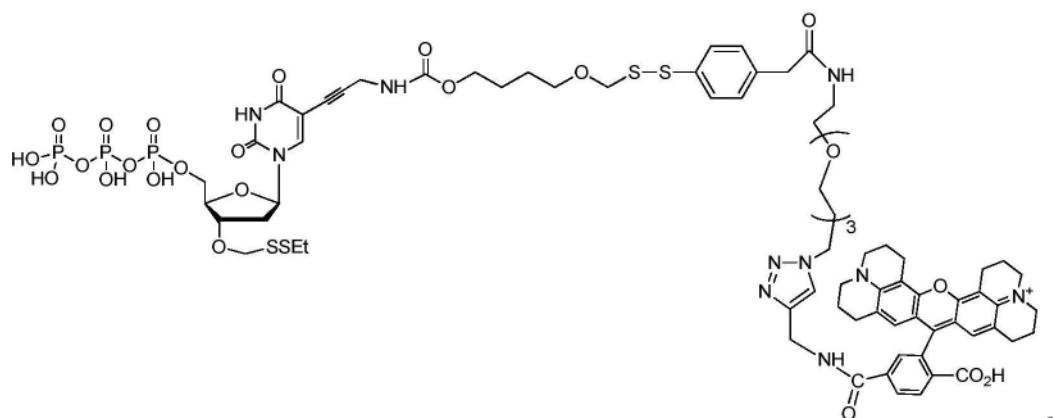


[0080] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:



[0082] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:

[0083]



[0084] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:

[0085] 

[0086] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:

[0087] 

[0088] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:

[0089]

[0090] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:

[0091]

[0092] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:

[0093] 

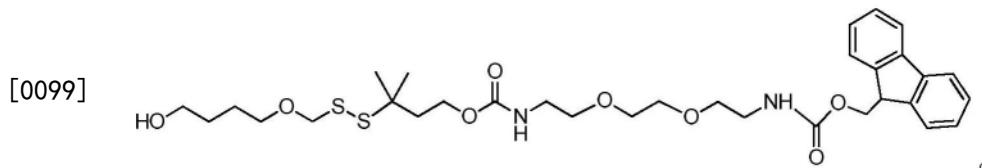
[0094] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:

[0095]

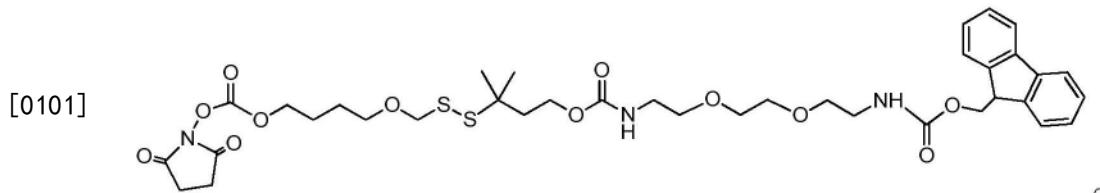
[0096] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:

[0097] 

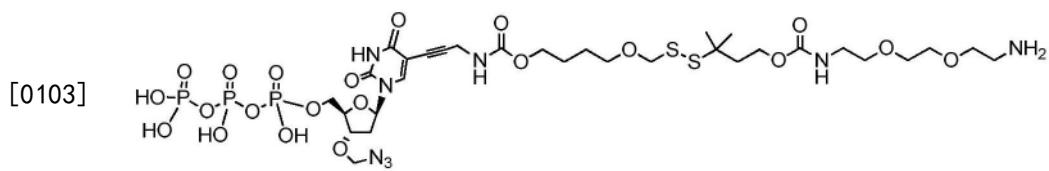
[0098] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:



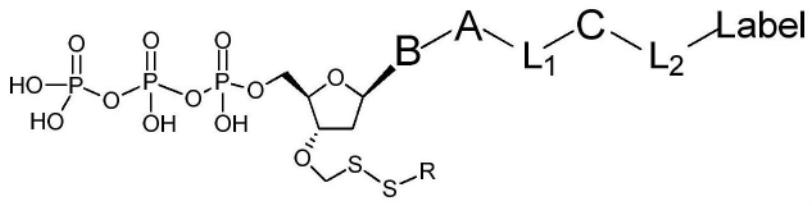
[0100] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:



[0102] 在一个实施方案中,本发明涉及化合物,其中其结构为:

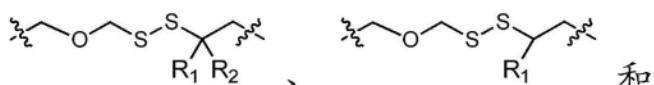


[0104] 在一个实施方案中,本发明涉及根据如下结构的经标记的三磷酸脱氧核昔:

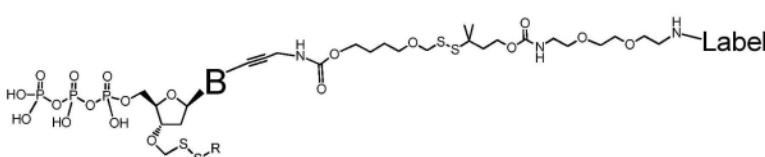


其中R选自烷基、被取代的烷

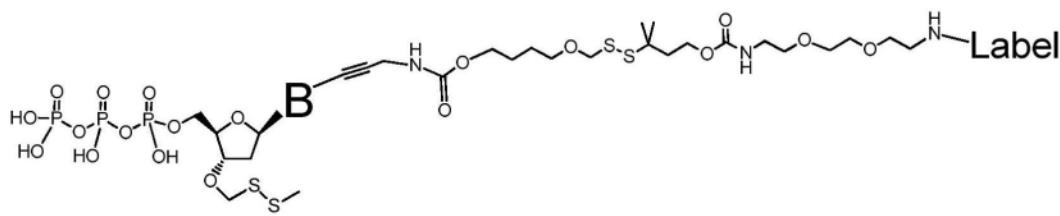
基、烯丙基、取代的烯丙基;B是核碱基;A是附着基团;C是可裂解位置核心;L₁和L₂是连接基团;且Label是标记。在一个实施方案中,所述核碱基是非天然核碱基类似物,其选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基,7-脱氮腺嘌呤和2-氨基鸟嘌呤。在一个实施方案中,所述附着基团A是化学基团,其选自选自炔丙基、羟基甲基、环外胺、炔丙基胺和炔丙基羟基。在一个实施方案中,所述可裂解位置核心选自:



，其中R₁和R₂是独立地选择的烷基。在一个实施方案中,其中L₁选自-CONH(CH₂)_x-、-COO(CH₂)_x-、-CO(CH₂)_x-，其中x是0-10,但更优选1-6。在一个实施方案中,其中L₂选自-NH-、-(CH₂)_xOCONH(CH₂)_yO(CH₂)_zNH-、-(CH₂)_xOCONH(CH₂)_yO(CH₂)_zNH-、-CONH(CH₂)_x-、-CO(CH₂)_x-，其中x、y和z各自独立地选自0-10,但更优选1-6。在一个实施方案中,所述的Label选自荧光团染料、能量转移染料、物质-标签、生物素和半抗原。在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:



其中所述的Label为染料,且其中R选自烷基、被取代的烷基、烯丙基、取代的烯丙基。在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:

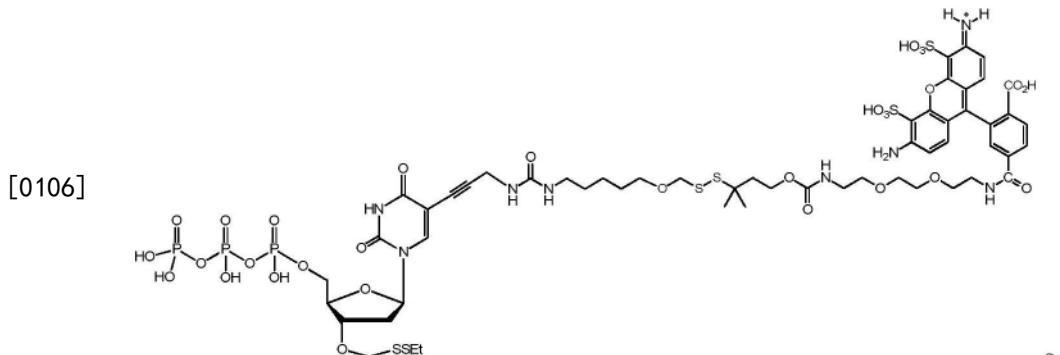


其中所述的

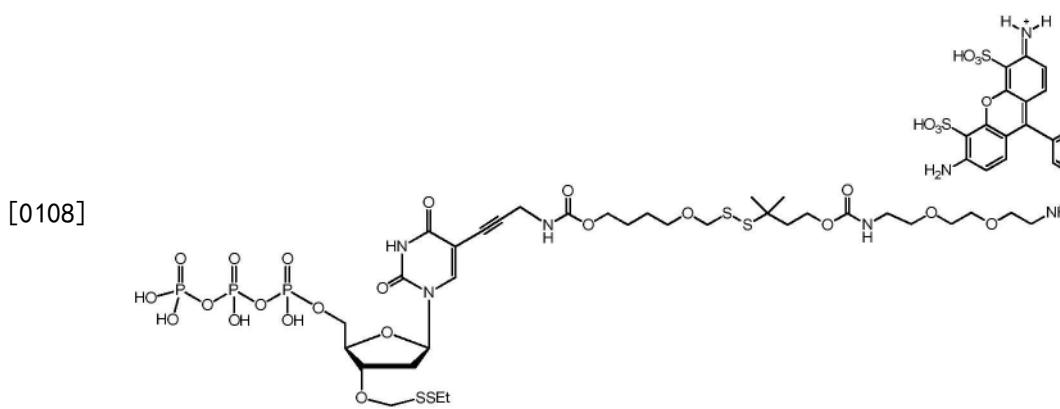
,

Label是染料。

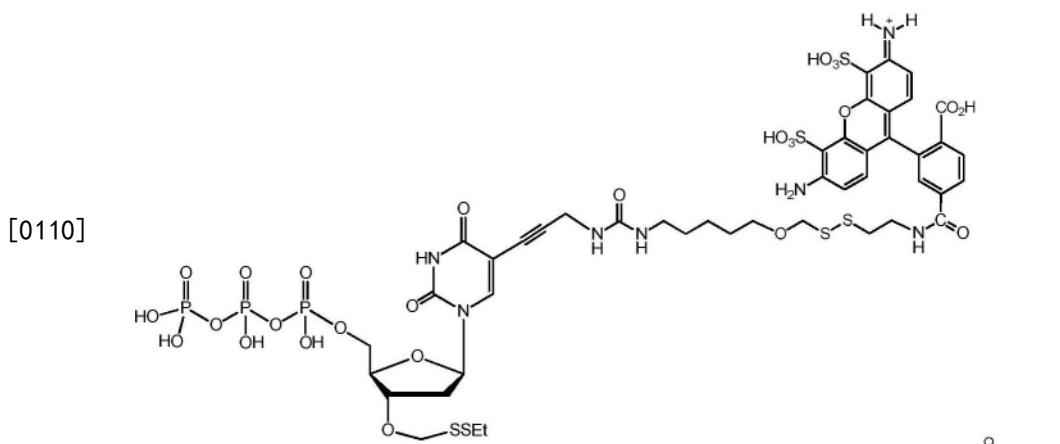
[0105] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:



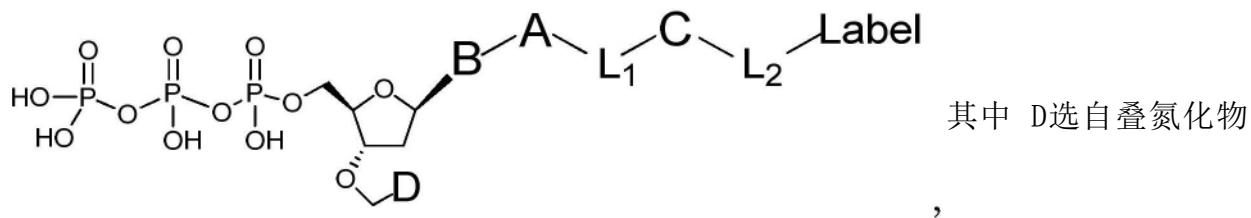
[0107] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:



[0109] 在一个实施方案中,该化合物具有如下结构:



[0111] 在一个实施方案中,本发明涉及根据如下结构的经标记的三磷酸脱氧核苷:



(-N₃)、二硫化物烷基(-SS-R)和二硫化物取代的烷基，B是核碱基，A是连接基团，C是可裂解位置核心，L₁和L₂是连接体，且Label是标记。在一个实施方案中，所述核碱基是天然核碱基。在一个实施方案中，所述核碱基是非天然核碱基类似物，其选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基，7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤。在一个实施方案中，所述连接体(A)是化学基团，其选自选自炔丙基、羟基甲基、环外胺、炔丙基胺和炔丙基羟基。在一个实施方案中，

所述可裂解(C)位置核心选自： 、 、 ，

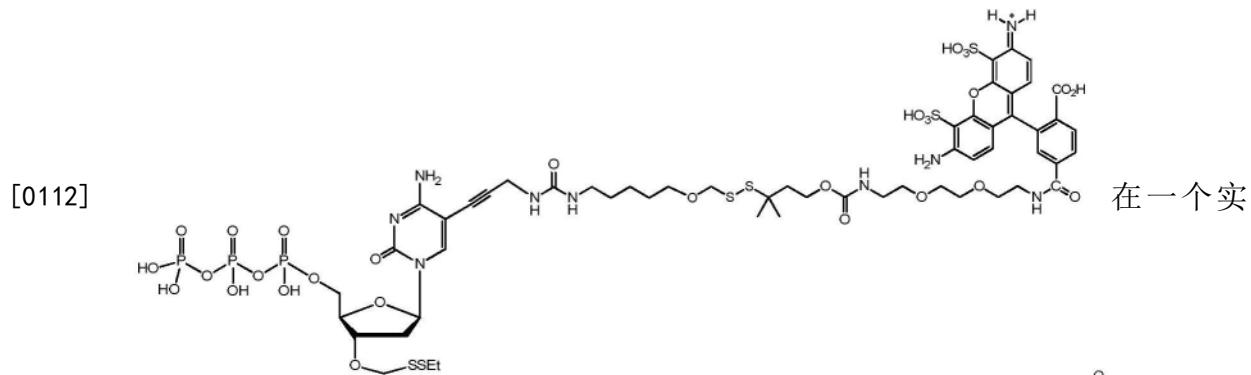
和 ，其中R₁和R₂是独立地选择的烷基。在一个实施方案中，所述可裂解

位置核心选自： 、 和 ，其中

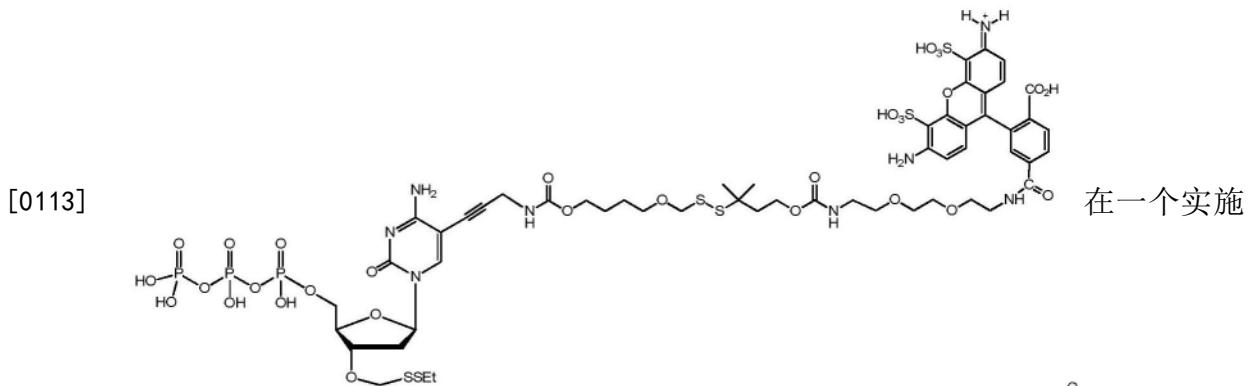
R₁和R₂是独立地选择的烷基。在一个实施方案中，L₁选自-CONH(CH₂)_x-、-CO-O(CH₂)_x-、-CONH-(OCH₂CH₂O)_x-、-CO-O(CH₂CH₂O)_x-和-CO(CH₂)_x-，其中x是0-100。在一些实施方案中，x

是0-10，但更优选1-6。在一个实施方案中，L₂选自 、 、 ，

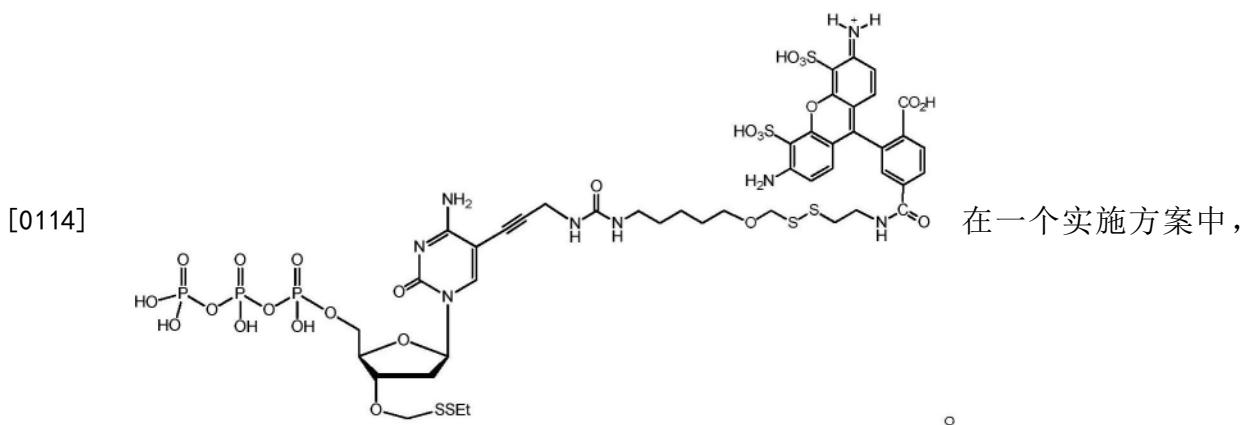
(CH₂)_x-NH-、-C(Me)₂(CH₂)_xNH-、-CH(Me)(CH₂)_xNH-、-C(Me)₂(CH₂)_xCO-、-CH(Me)(CH₂)_xCO-、-(CH₂)_xOCONH(CH₂)_yO(CH₂)_zNH-、-(CH₂)_xCONH(CH₂CH₂O)_y(CH₂)_zNH-和-CONH(CH₂)_x-、-CO(CH₂)_x-，其中x、y和z各自独立地选自0-10，但更优选1-6。在一个实施方案中，L₂选自-NH-、-(CH₂)_x-NH-、-C(Me)₂(CH₂)_xNH-、-CH(Me)(CH₂)_xNH-、-C(Me)₂(CH₂)_xCO-、-CH(Me)(CH₂)_xCO-、-(CH₂)_xOCONH(CH₂)_yO(CH₂)_zNH-和-CONH(CH₂)_x-、-CO(CH₂)_x-，其中x、y和z各自独立地选自0-100。在一个实施方案中，x、y和z各自独立地选自0-10，但更优选1-6。在一个实施方案中，所述的Label选自荧光团染料、能量转移染料、物质-标签、生物素和半抗原。在一个实施方案中，所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示，包括另外类似的核苷酸对应物，即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同)：



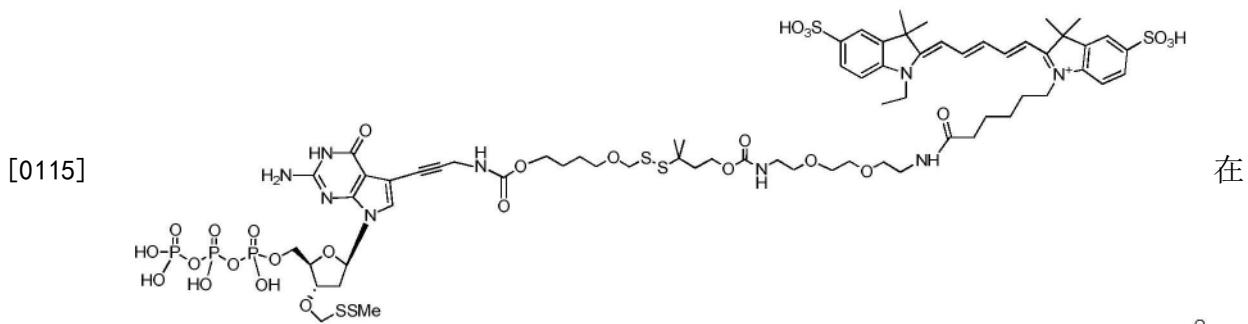
施方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



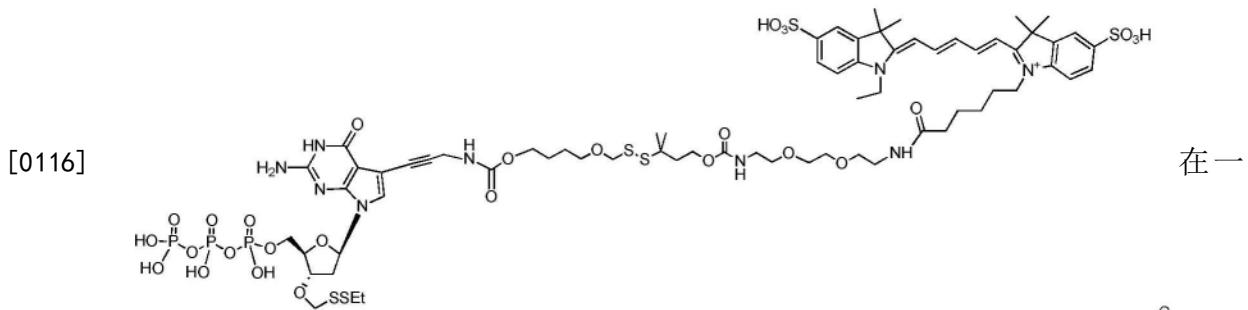
方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



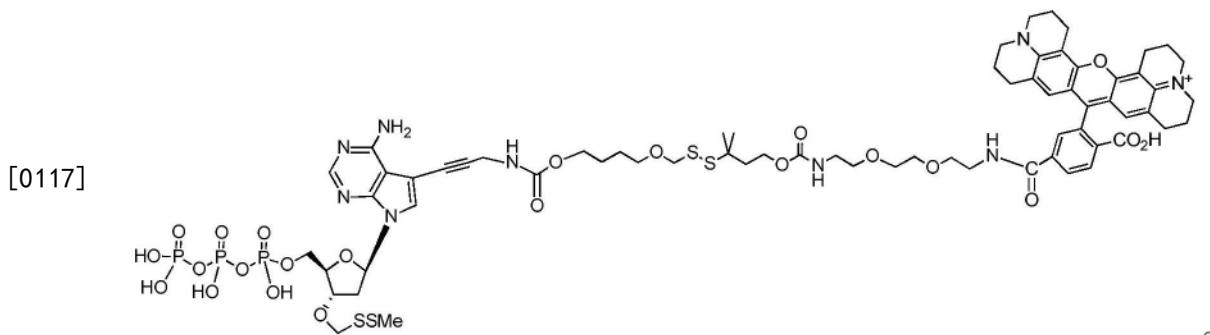
所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



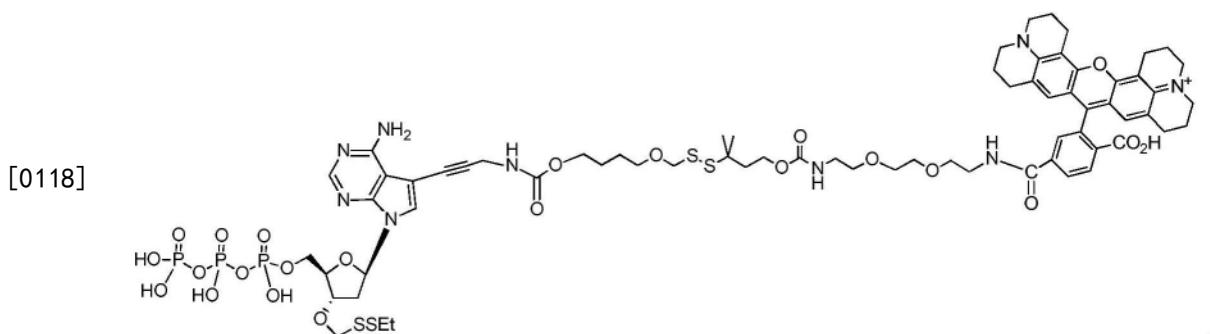
一个实施方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



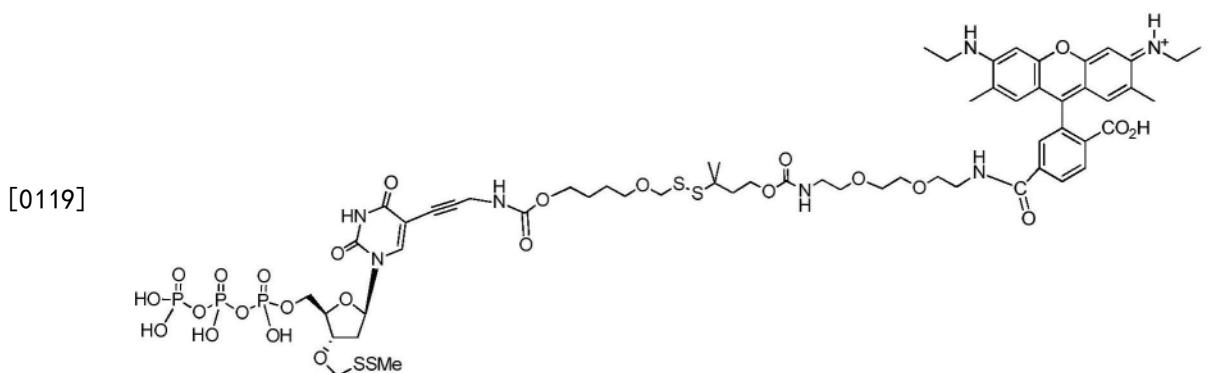
个实施方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



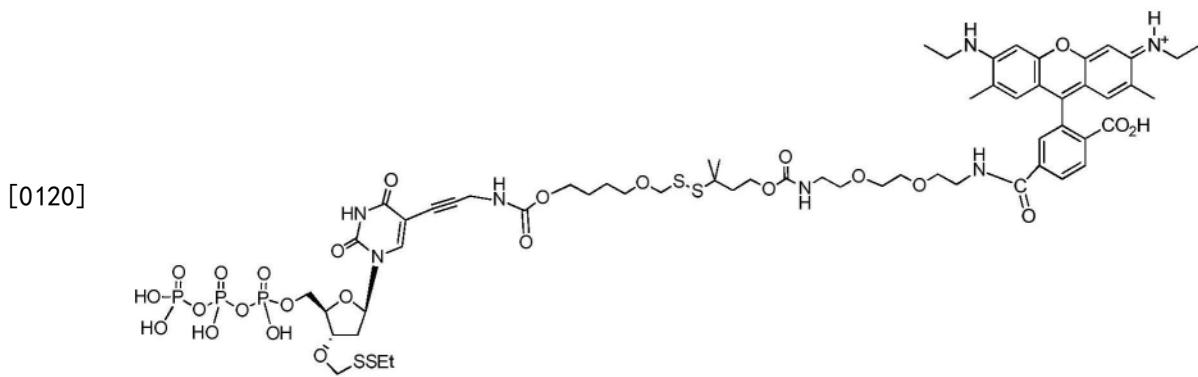
在一个实施方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



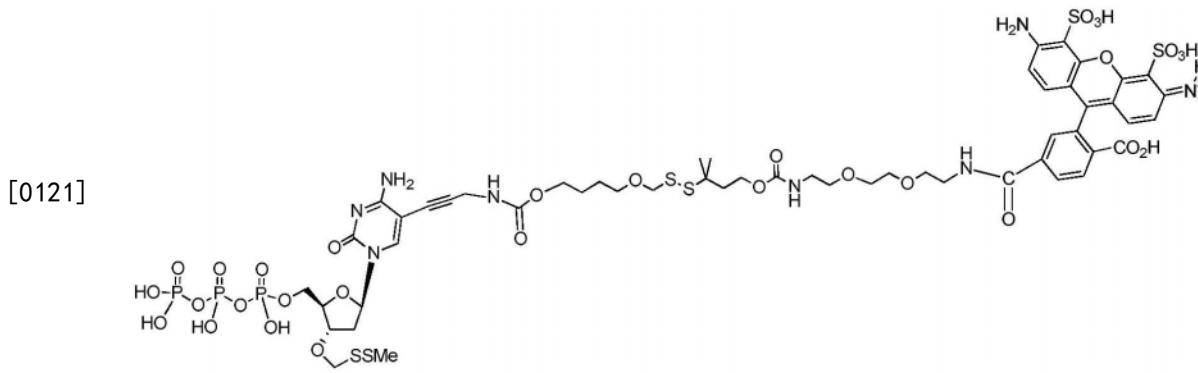
在一个实施方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



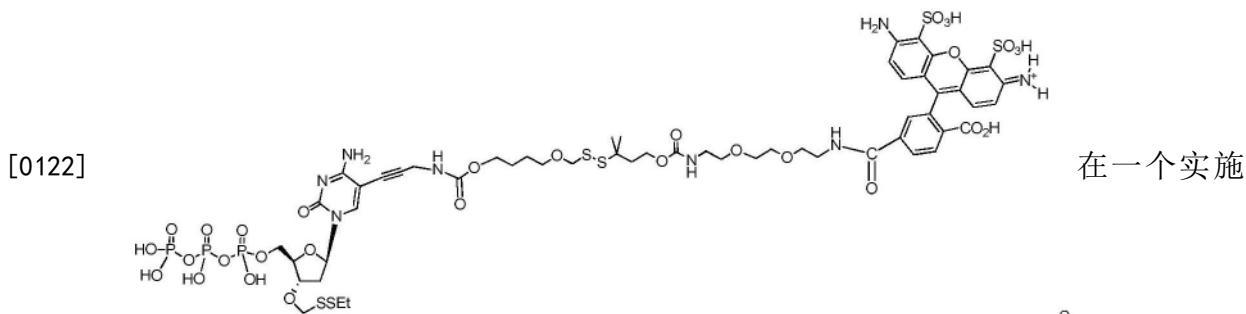
在一个实施方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



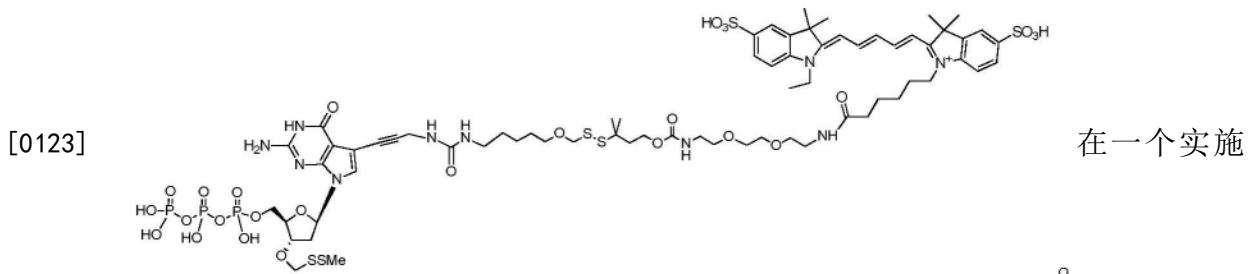
在一个实施方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



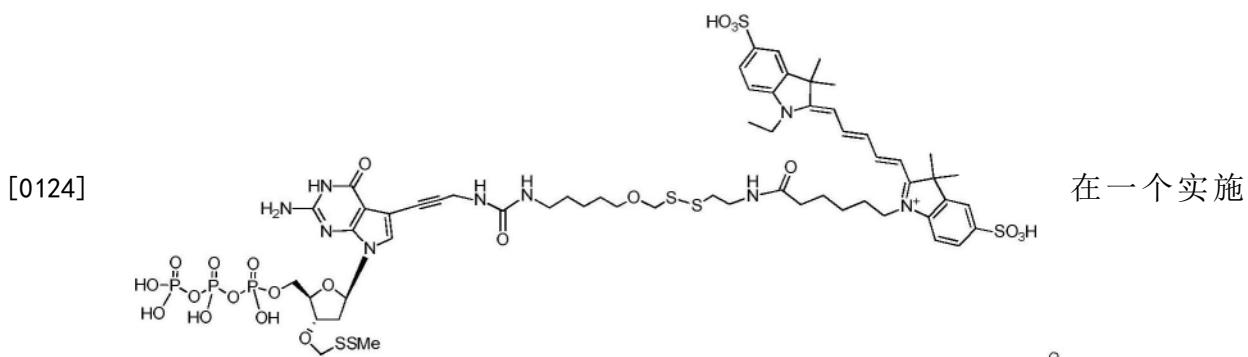
在一个实施方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



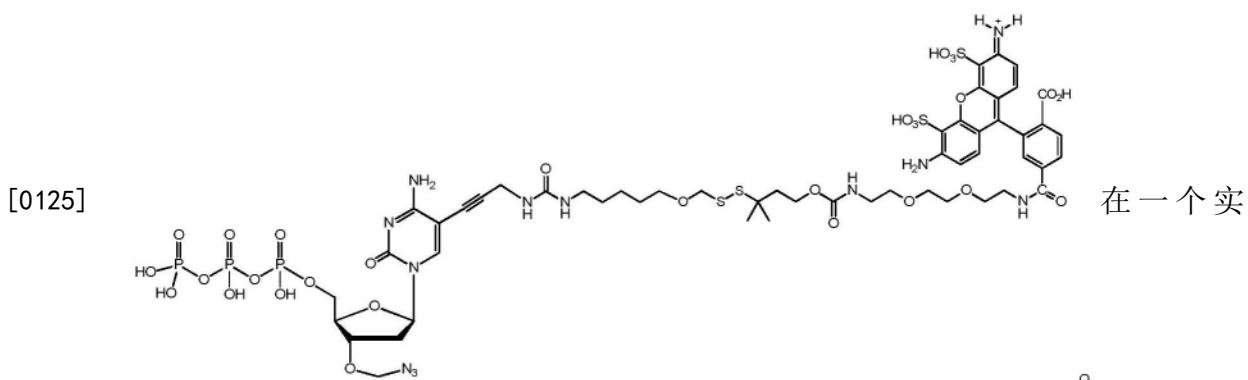
方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



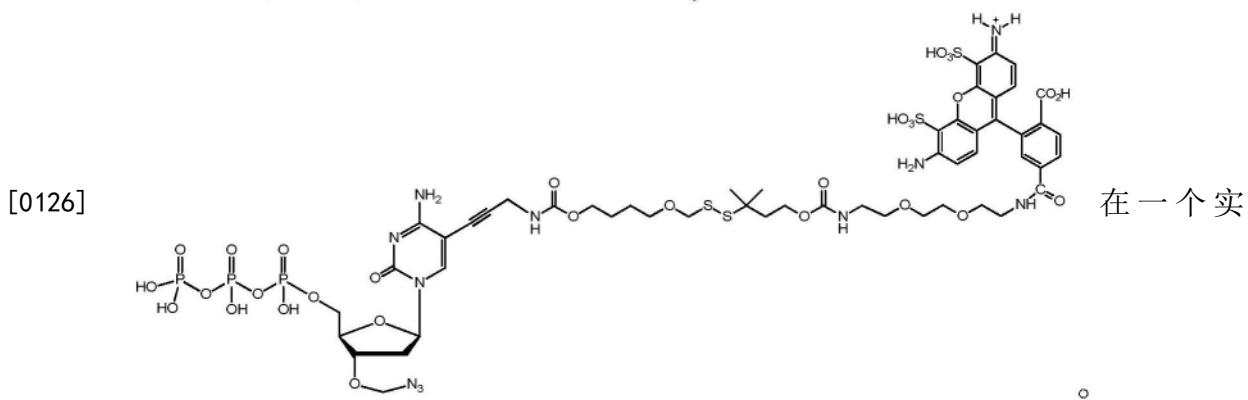
方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):



方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):

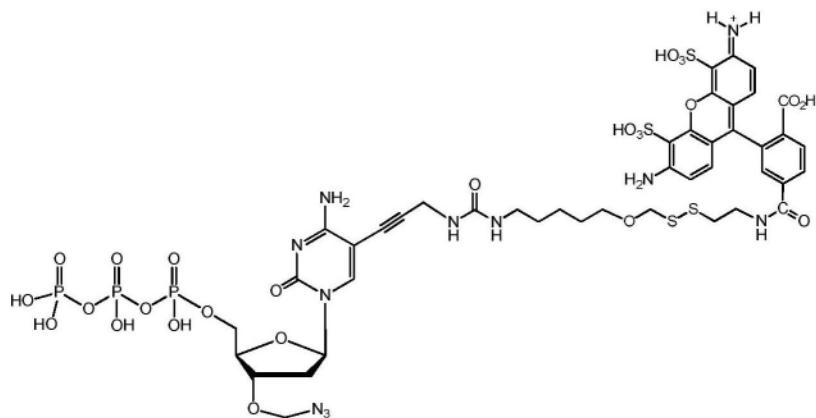


施方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):

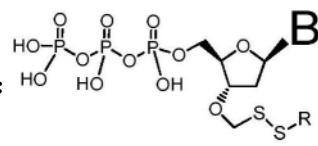


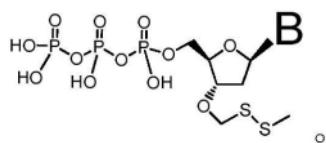
施方案中,所述化合物具有如下结构(而特定的核碱基和标记如下所示,包括另外类似的核苷酸对应物,即本说明书和附图中的任意不同的标记可以被取代并且核碱基可以不同):

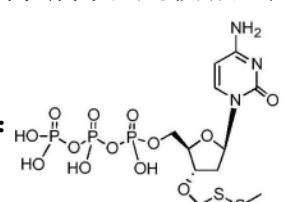
[0127]

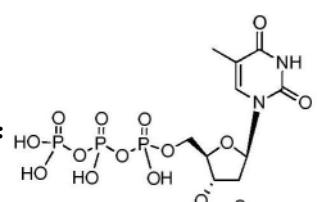


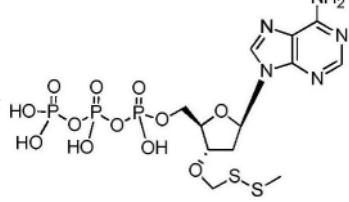
[0128] 在一个实施方案中,本发明考虑到了未标记的化合物。在一个实施方案中,该化合

物具有如下结构:  其中R选自烷基、被取代的烷基、烯丙基、取代的
烯丙基,且B是核碱基。在一个实施方案中,所述化合物具有如下结构(再次B是核碱基):

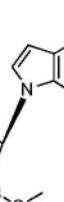


在一个实施方案中,该化合物具有如下结构: 

在一个实施方案中,该化合物具有如下结构: 

该化合物具有如下结构: 

在一个实施方案中,该化合物具有如下

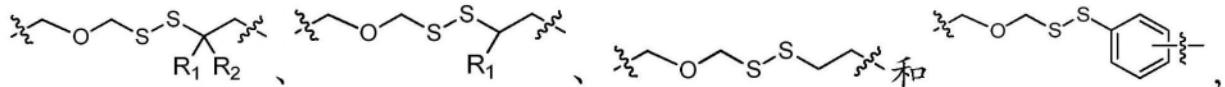
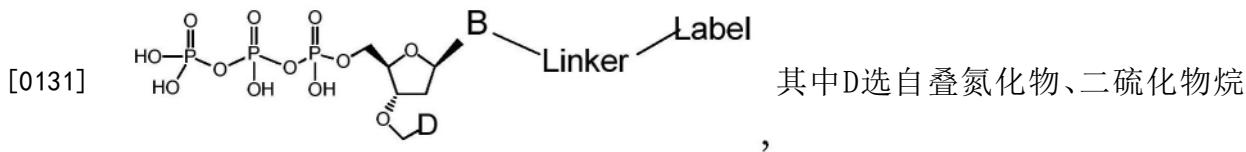
结构: 

在一个实施方案中,所述核碱基是非天然核碱基类似

物,其选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基,7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤。

[0129] 在一个实施方案中,本发明涉及使用3'-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇核苷作为中间体和DMTSF和二甲基二硫化物作为硫源合成3' - OCH₂-SSMe核苷酸类似物的方法,如附图43中所示。

[0130] 在一个实施方案中,本发明涉及根据如下结构的经标记的三磷酸脱氧核昔:



其中R₁和R₂是独立地选择的烷基;且Label是标记。在一个实施方案中,所述Linker是疏水性的。在一个实施方案中,所述Linker具有大于0的logP值。在一个实施方案中,所述Linker具有大于0.1的logP值。在一个实施方案中,所述Linker具有大于0.5的logP值。在一个实施方案中,所述Linker具有大于1.0的logP值。

[0132] 定义

[0133] 为了便于理解本发明,下文定义了许多术语。本申请中所定义的术语具有与本发明相关的领域的中普通技术人员通常理解的含义。术语例如“一种(a)”、“一个(an)”和“该(the)”不旨在仅指单一实体,而是包括可以使用特定示例来说明的一般类。本申请中的术语用于描述本发明的具体实施方案,但是它们的使用不限定本发明,权利要求书中所概述的除外。

[0134] 如本申请中所用,“氢”是指-H;“羟基”是指-OH;“氧代”意指=O;“卤素”独立地指-F、-Cl、-Br或-I;“氨基”是指-NH₂(见下面关于含有术语氨基的基团的定义,例如烷基氨基)。“羟基氨基”是指-NHOH;“硝基”是指-NO₂;“亚氨基”意指=NH(见下面关于含有术语亚氨基的基团的定义,例如烷基氨基);“氰基”是指-CN;“叠氮基”是指-N₃;“巯基”是指-SH;“硫代”是指=S;“磺酰氨基”是指-NHS(0)₂⁻(参见下面有关含有术语磺酰氨基的基团的定义,例如烷基磺酰氨基)。“磺酰基”是指-S(0)₂⁻(参见下文对于含有术语磺酰基的基团的定义(例如烷基磺酰基));且“甲硅烷基”是指-SiH₃(见下文关于含有术语甲硅烷基的基团的定义,例如烷基甲硅烷基)。

[0135] 如本申请中所用,“亚甲基”是指其中碳原子与两个氢原子键合的化学种类。-CH₂-基团被认为是标准的亚甲基。链或环中的亚甲基有助于其大小和亲脂性。在这方面,双脱氧也指亚甲基。特别地,2,3-双脱氧化合物与2,3-亚甲基(2,3-亚甲基-糖昔=2,3-双脱氧糖昔)相同。

[0136] 对于下面的组,下列括号下标进一步定义如下组:“(C_n)”定义组中碳原子的确切数量(n);“(C≤n)”定义组中可以存在的碳原子的最大数量(n);(C_{n-n})定义组中碳原子的最小值(n)和最大值(n')。例如,“烷氧基_(C≤10)”表示具有1至10个碳原子的那些烷氧基(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或其中任何可衍生的范围(例如3-10个碳原子))。类似地,“烷基_(C2-10)”表示具有2至10个碳原子的那些烷基(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个,或其中可衍生的任何范围(例如,3-10个碳原子))。

[0137] 当没有使用“被取代的”修饰语时,术语“烷基”是指具有饱和碳原子作为连接点、直链或支链、环状、含环或无环结构、不含碳-碳双键或三键和除碳和氢以外不含其它原子

的非芳族一价基团。基团-CH₃ (Me)、-CH₂CH₃ (Et)、-CH₂CH₂CH₃ (n-Pr)、-CH(CH₃)₂ (异-Pr或i-Pr)、-CH(CH₂)₂ (环丙基)、-CH₂CH₂CH₂CH₃ (n-Bu)、-CH(CH₃)CH₂CH₃ (仲丁基或仲Bu)、-CH₂CH(CH₃)₂ (异-丁基或i-Bu)、-C(CH₃)₃ (叔丁基或t-Bu)、-CH₂C(CH₃) (新戊基)、环丁基、环戊基、环己基、环己基甲基是烷基的非限制性实例。术语“被取代的烷基”是指具有饱和碳原子作为连接点、直链或支链、环状、含环或无环结构、无碳-碳双键或三键和至少一个独立地选自N、O、F、Cl、Br、I、Si、P和S的原子的非芳族一价基团。下列基团是被取代的烷基的非限制性实例：-CH₂OH、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂SH、-CF₃、-CH₂CN、-CH₂C(O)H、-CH₂C(O)OH、-CH₂C(O)OCH₃、-CH₂C(O)NH₂、-CH₂C(O)NHCH₃、-CH₂C(O)CH₃、-CH₂OCH₃、-CH₂OCH₂CF₃、-CH₂OC(O)CH₃、-CH₂NH₂、-CH₂NHCH₃、-CH₂N(CH₃)₂、-CH₂CH₂Cl、-CH₂CH₂OH、-CH₂CF₃、-CH₂CH₂OC(O)CH₃、-CH₂CH₂NHCO₂C(CH₃)₃和-CH₂Si(CH₃)₃。

[0138] 术语“可裂解氧基亚甲二硫基连接体”和“包含可裂解氧基亚甲二硫基连接体”意在表示该连接体包含氧基亚甲二硫基基团，并且不应被视为仅限于氧基亚甲二硫基基团，而应被视为可以包含不只氧基亚甲二硫基基团的连接体，例如在图25中的化合物中所示的基团。类似地，术语“氧基亚甲二硫基位置核心”和“包含氧基亚甲二硫基的位置核心”旨在表示该位置核心包氧基亚甲二硫基基团，并且不应被视为仅限于氧基亚甲二硫基基团，而应被视为可以包含不只氧基亚甲二硫基基团的位置核心。

[0139] 术语“核酸”一般是指DNA或RNA，无论其为扩增的产物、合成产生的产物、RNA逆转录的产物还是天然存在的产物。典型地，核酸是单链或双链分子并且由天然存在的核苷酸组成。双链核酸分子可以具有3'-或5'-突出端，因此不需要在其整个长度上是完全双链的或推定它们在其整个长度上是完全双链的。此外，核酸可以由非天然存在的核苷酸和/或对天然存在的核苷酸的修饰物组成。在本申请中列出了实例，但它们不限于：分别允许连接或防止外切核酸酶降解/聚合酶延伸的5'或3'核苷酸的磷酸化；用于共价和近共价连接的氨基、巯基、炔烃或生物素化修饰；荧光团和猝灭剂；防止降解的核苷酸之间的硫代磷酸、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯和磷酸三酯键；甲基化；以及修饰的碱基或核苷如脱氧肌苷，5-溴-dU、2'-脱氧尿苷、2-氨基嘌呤、2',3'-双脱氧-胞苷、5-甲基-dC、连锁核酸(LNA's)、异-dC和-dG碱基、2'-O-甲基RNA碱基和氟修饰的核苷。

[0140] 在本申请中包括的一些方法中，引物与被测序模板的至少一部分至少部分互补。术语“互补”通常是指在适合的温度和离子缓冲条件下形成两个核苷酸碱基(例如A和T)之间有利的热力学稳定性和特异性配对的能力。该配对取决于每个核苷酸的氢键性质。最基本的实例是胸腺嘧啶/腺嘌呤和胞嘧啶/鸟嘌呤碱基之间的氢键对。在本发明中，用于目标核酸扩增的引物可以与目标核酸分子完全互补超出其全长或“半互补”，其中引物包含额外的非互补序列，其与目标核酸能够最低限度地杂交或不能与之杂交。

[0141] 术语“杂交”通常是指与其核苷酸序列一致的不同核酸分子之间的碱基配对。术语“杂交”和“退火”可以互换使用。

[0142] 术语“寡核苷酸”通常是指典型地被设计为单链DNA且长度小于75个核苷酸的核酸序列。

[0143] 术语“引物”通常是指能够退火或杂交的寡核苷酸，核酸序列，并允许与引物互补的核酸在充分条件(缓冲液，dNTP's，聚合酶，一价和二价盐，温度等....)下延伸。

[0144] 术语“模板核酸”、“模板分子”、“目标核酸”和“目标分子”可以互换使用并且是指

核酸分子,它是扩增反应的对象,其可以任选地被测序反应询问以便衍生其序列信息。模板核酸可以是通过克隆扩增方法产生并且可以被固定在固体表面上(即固定在珠或阵列上)的核酸。

[0145] 术语“核苷”是指由与糖例如核糖或脱氧核糖的C-1'碳连接的碱基组成的化合物。核苷的碱基部分通常是杂环碱基,例如嘌呤或嘧啶。

[0146] 术语“核苷酸”是指作为单体单元或在多核苷酸内的核苷的磷酸酯。“核苷5'-三磷酸”是指在糖5'-碳位置连接有三磷酸酯基的核苷酸,且有时称作“NTP”,“dNTP”(三磷酸2'-脱氧核苷或三磷酸脱氧核苷)和“ddNTP”(三磷酸2',3'-双脱氧核苷或三磷酸双脱氧核苷)。“核苷5'-四磷酸”是指具有连接至糖5'-碳位置的四磷酸酯基团的交替活化的核苷酸。PA-核苷酸是指炔丙基类似物。

[0147] 作为在本说明书和/或权利要求中使用的术语“保护基”以常规化学意义作为一个基团使用,其在期望反应的某些条件下可逆地赋予官能团非反应性,并且应当理解为不是H。在期望的反应后,可以除去保护基以使保护的官能团脱保护。在一个优选的实施方案中,所有的保护基应当在不降解正在合成的分子的实质部分的条件下可除去(因此是不稳定的)。保护基也可以称为“加帽基”或“封闭基”或“可裂解的保护基”。应当注意,为方便起见,被保护基保护的官能团也可以被显示或称为保护基的一部分。在本申请中所述的核苷酸衍生物的背景下,在3'位上使用保护基。不表示本发明受限于测序中使用的可逆终止核苷酸上该保护基的性质或化学性质。为此目的包括多种保护基,其包括但不限于:3'-0-叠氮基甲基核苷酸,3'-0-氨基氧基核苷酸,3'-0-烯丙基核苷酸;以及二硫化核苷酸,3'-0-叠氮基烷基,3'-0-二硫甲基烷基,3'-0-二硫甲基芳基,3'-0-乙酰基,3'-0-肼基甲酸酯,3'-0-烷基醚,3'-0-烷基酯,3'-0-醛肟(-0-N=CH-R),3'-0-酮肟(-0-N=C(R,R'))。

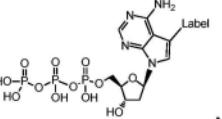
[0148] 本发明的一个实施方案包括通过保护基的官能化将标记物直接连接到核苷酸的3'-OH官能团上。

[0149] 术语“标记”或“可检测标记”在其最广义上是指可检测到的或允许其检测与其相关的任何部分或性质。例如,包含标记的核苷酸、寡核苷酸或多核苷酸是可检测的。理想地,标记的寡核苷酸或多核苷酸允许检测杂交复合物,特别是在通过酶促方式将标记的核苷酸参入引物和模板核酸的所述杂交复合物之后。标记可以共价地或非共价地连接至核苷酸、寡核苷酸或多核苷酸。在不同的方面,标记可以交替地或组合地:(i)提供可检测信号;(ii)与第二标记相互作用以修饰由第二标记提供的可检测信号,例如FRET;(iii)稳定杂交,例如双链体形成;(iv)赋予捕获功能,例如疏水亲和力,抗体/抗原,离子配位,或(v)改变物理性质,如电泳迁移率,疏水性,亲水性,溶解度或色谱行为。标记在其结构和作用机制方面差异很大。标记的实例包括但不限于荧光标记,非荧光标记,比色标记,化学发光标记,生物发光标记,放射性标记,质量修饰基团,抗体,抗原,生物素,半抗原,酶(包括例如,过氧化物酶,磷酸酶等)等。为了进一步示例,荧光标记可以包括荧光素家族的染料,罗丹明家族的染料,花菁家族的染料,或香豆素,恶嗪,硼杂二氮杂引达省或其任意衍生物。荧光素家族的染料包括,例如,FAM、HEX、TET、JOE、NAN和ZOE。荧光素家族的染料包括,例如,德克萨斯红、ROX、R110、R6G和TAMRA。FAM、HEX、TET、JOE、NAN、ZOE、ROX、R110、R6G和TAMRA,并且购自例如Perkin-Elmer, Inc. (Wellesley, Mass., USA), 德克萨斯红购自例如Life Technologies (Molecular Probes, Inc.) (Grand Island, N.Y.)。罗丹明家族的染料包括,例如CY2、CY3、

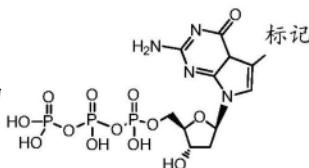
CY5、CY5.5和CY7,并且购自例如 GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, N.J., USA)。

[0150] 如本申请中所用,术语“不同标记的”是指可检测标记是不同标记,而不是在标记的核苷碱基上的不同位置中发现的标记。

[0151] 术语“A、G、C和T或U的类似物”是指修饰的三磷酸脱氧核苷化合物,其中所述的脱氧核苷的核碱基紧密地组装相应核苷脱氧腺苷、脱氧鸟苷和胸苷或脱氧尿苷。在可检测标记的三磷酸脱氧核苷化合物的情况下,A或脱氧胸苷的类似物可以表示为



不过,优选在核碱基与标记之间存在连接体。在可检测标记的三磷酸脱氧核苷化合物的情



况中,G或脱氧鸟苷的类似物可以表示为

不过,优选在核碱基与标记

之间操作连接体。在可检测标记的三磷酸脱氧核苷化合物的情况下,C或脱氧胞苷的类似物

可以表示为

不过,优选在核碱基与标记之间操作连接体。在可检测

标记的三磷酸脱氧核苷化合物的情况下,T或U 或胸苷或脱氧尿苷的类似物可以表示为

不过,优选在核碱基与标记之间操作连接体。额外的核碱基可以

包括:非天然核碱基,其选自7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2-氨基,7-脱氮腺嘌呤和2-氨基腺嘌呤。在类似物的情况下,可检测标记还可以包括所述核碱基与所述可检测标记之间的连接体部分。

[0152] 术语“TCEP”或“三(2-羧乙基)膦”是指经常用于生物化学和分子生物学应用的还原剂。它通常以分子量为286.65克/摩尔的盐酸盐 (TCEP-HCl) 制备和使用。它可溶于水,在中性pH下可作为稳定溶液使用,并固定在琼脂糖支持物上以促进还原剂的去除。不表示本发明限于一种类型的还原剂。任何能够还原二硫键的适合的还原剂都可用于实施本发明。在一个实施方案中,所述还原剂是膦[12],例如三苯膦,三丁膦,三羟基甲基膦,三羟基丙基膦,三乙酯膦 (TCEP) [13,14]。不表示本发明限于使用TCEP。在一个实施方案中,通过暴露于携带硫醇基的化合物从所述核碱基上去除所述可检测标记和3'-OCH₂-SS-R基团,以进行基于二硫键的连接体和终止(保护)基团的裂解,这类包含硫醇的化合物包括(但不限于)半胱氨酸,半胱胺,二硫琥珀酸,二硫苏糖醇,2,3-二巯基-1-丙磺酸钠盐,二硫丁胺,内消旋-2,5-二巯基-N,N,N',N'-四甲基己二酰二胺,2-巯基乙烷磺酸盐和N,N'-二甲基,N,N'-双(巯基乙酰基)肼[17]。包含硒醇可进一步催化反应[18]。此外,硼氢化物如硼氢化钠也可用于此目的[19](以及抗坏血酸[20])。另外,用于裂解二硫键的酶法也是众所周知的,如二硫化物和硫还原酶,并且可以与本发明的化合物一起使用[21]。

附图说明

[0153] 并入本说明书并构成本说明书一部分的附图示例了本发明的几个实施方案，并与本说明书一起用于解释本发明的原理。附图仅用于示例本发明的优选实施方案，而不应被解释为限制本发明。

[0154] 图1显示具有被包含亚甲二硫结构的基团加帽的3'-0的三磷酸核苷的实例，其中R表示烷基例如甲基、乙基、异丙基、叔丁基、正丁基或它们的具有取代基的含有杂原子如O、N、S等的类似物。

[0155] 图2显示具有包含3'-0亚甲二硫化物的保护基的三磷酸核苷的标记类似物，其中标记通过可裂解氧基亚甲二硫基连接体(-OCH₂-SS-)与核碱基连接。所述类似物是(上部左起顺时针)脱氧腺苷、胸苷或脱氧尿苷，脱氧胞苷和脱氧鸟苷。

[0156] 图3显示用还原剂如TCEP脱保护3'-0保护基的逐步机制。

[0157] 图4显示裂解反应产物传统的硫化物和氧基亚甲二硫基连接的经标记的核苷酸。

[0158] 图5显示标记的核苷酸的实例，其中可裂解连接体的间隔基包含炔丙基醚连接体。类似物是(上部左起顺时针)脱氧腺苷、胸苷或脱氧尿苷、脱氧胞苷和脱氧鸟苷。

[0159] 图6显示标记核苷酸的实例，其中可裂解连接体的间隔基包含炔丙基胺连接体。类似物是(上部左起顺时针)脱氧腺苷、胸苷或脱氧尿苷、脱氧胞苷和脱氧鸟苷。

[0160] 图7显示标记的核苷酸的实例，其中可裂解连接体的间隔基包括在嘧啶的5-位直接连接到核碱基上的亚甲基(-CH₂)_n-和在嘌呤的7-脱氮-碳上的核碱基。该连接体可以是亚甲基(n=1)或聚亚甲基(n>1)，其中在裂解后，连接体在核碱基上的连接点产生-(CH₂)_nOH基团，并且其中L₁和L₂代表间隔基，且取代基R₁、R₂、R₃和R₄如前所述为可裂解连接体提供稳定性的原子团。类似物(左上起顺时针)是关于脱氧腺苷、胸苷或脱氧尿苷、脱氧胞苷和脱氧鸟苷的。

[0161] 图8显示未标记的dT类似物(化合物5)的合成。

[0162] 图9显示3'-0-(乙基二硫甲基)-dCTP(10)的合成。

[0163] 图10显示对标记的dT中间体具有特异性的经标记的核苷酸的合成路线。

[0164] 图11显示从1,4-丁二醇开始的可裂解连接体合成。

[0165] 图12显示可裂解连接体的另一种变体，其中稳定化偕二甲基连接至可裂解连接体的α-碳。

[0166] 图13显示可裂解连接体的合成，其中二硫化物侧翼为偕二甲基并连接至柔性乙二醇连接体(PEG)。连接体通过氨基甲酸酯基团(-NH-C(=O)O-)连接至PA-核苷酸。在这种情况下得到的核苷酸类似物可以如化合物35中所示(dUTP类似物)。

[0167] 图14显示dATP类似物的可裂解连接体的合成，其中可裂解的二硫化物侧翼为偕二甲基并且连接体通过脲基团(-NH-C(=O)-NH-)连接至PA-核苷酸。对于其它核苷酸类似物(例如dCTP、dGTP、dUTP的类似物)可以通过在顺序序列的最后一步用适合的PA类似物代替42来类似地合成。

[0168] 图15显示可裂解连接体化合物45的合成，其中连接体通过脲官能团与PA核苷酸连接，并且二硫化物通过两个碳连接体与染料连接。在这种情况下得到的核苷酸类似物可以如化合物49中所示(dGTP类似物)。其它核苷酸类似物(例如dATP、dUTP、dCTP的类似物)可以通过在反应顺序的第三步中用适合的PA-核苷酸类似物替代核苷酸46而类似地合成。

[0169] 图16显示当标记的核苷酸50在65°C暴露于10eq TCEP时,其产生包括化合物52在内的许多副产物以及预期产物51。

[0170] 图17显示暴露5分钟后分析的在292nm(下部)和524nm(上部)提取的化合物50的TCEP暴露产物的LC-MS迹线,其中在11.08分钟的峰相当于化合物51,在10.88分钟的峰相当于化合物52,且其它峰相当于副产物。

[0171] 图18显示15分暴露后分析的在292nm(下部)和524nm(上部)提取的化合物50的TCEP暴露产物LC-MS迹线;其中在11.32分钟的峰相当于化合物51并且其它峰相当于副产物。

[0172] 图19显示在相同的裂解条件下,氧基亚甲二硫基连接的核苷酸 35洁净地产生了所需的裂解产物化合物53和54。在裂解二硫化物基团后,连接体的亚甲基硫醇节段(-CH₂SH)从核苷酸中完全消除。

[0173] 图20显示暴露5分钟后分析的在292nm(下部)和524nm(上部)提取的化合物35的TCEP暴露产物的LC-MS迹线,其中在11.24分钟的峰相当于化合物53并且峰在34.70分钟的峰相当于化合物54。

[0174] 图21显示暴露15分钟后分析的在292nm(下部)和524nm(上部)提取的化合物35的TCEP暴露产物的LC-MS迹线,其中11.25分钟的峰相当于化合物53并且峰在34.70分钟的峰相当于化合物54。

[0175] 图22显示3' -OCH₂-SS-Me类似物的合成,其中在适当的步骤用甲硫醇或硫代甲醇钠替代巯基乙醇(EtSH),不同于3' -OCH₂-SS-Et(图 10)。

[0176] 图23显示PA-核苷酸(例如57)与适合的可裂解-OCH₂-SS-连接体的偶联,且最终使用活化的连接体32将其偶联至荧光染料。

[0177] 图24显示具有获得不同连接体的核苷酸类似物,化合物60和 61。

[0178] 图25显示由不同荧光团报道基团标记的4-种核苷酸类似物的结构,其中R=Me-或Et-。

[0179] 图26显示由不同荧光团报道基团标记的4-种核苷酸类似物的结构,其中R=Me-或Et-基团。

[0180] 图27显示由不同荧光团报道基团标记的4-核苷类似物的结构,其中R=Me-或Et-基团。

[0181] 图28显示包含本发明的新型可裂解连接体的通式结构单元结构。PG=保护基,L1、L2-连接体(脂族,芳族,混合极性直链或支链)。RG =反应基团。在本发明的一个实施方案中,这样的结构单元在连接体的一端携带Fmoc保护基,而在另一端携带反应性NHS碳酸酯或氨基甲酸酯。该优选组合在包含新的可裂解连接体的修饰核苷酸合成中特别有用。在与核酸/核苷酸化学相容的条件下,保护基团应当可以被除去,并且反应性基团应当是选择性的。在连接体上的活性NHS基团与胺终止核苷酸反应后,可以使用碱如哌啶或氨容易地去除Fmoc基团,因此暴露连接体末端的氨基用于连接可裂解标记。包含各种标记的化合物文库可以非常快速地以这种方式构建。

[0182] 图29显示通过本发明的新型连接体连接可携带可裂解标记的核苷酸的一般结构。S=糖(即核糖,脱氧核糖),B=核碱基,R=H或可逆终止基团(保护基)。优选的可逆终止基团包括但不限于:叠氮基甲基(-CH₂N₃)、二硫烷基(-CH₂-SS-R)、氨氧基(-ONH₂)。

[0183] 图30显示携带通过由本发明的可裂解连接体连接的可裂解标记的核苷酸的另一通式结构,其中D选自叠氮化物、二硫化物烷基和二硫化物取代的烷基,B是核碱基,A是连接基团,C是可裂解的位置核心,L₁和L₂是连接体,且Label是标记(在具有标记的化合物中)。

[0184] 图31显示在图32A-图 32C 中测试的化合物(L-系列(96)、B-系列(97)、(A-系列(98) 和(G-系列(99)家族)的化学结构。

[0185] 图32A显示将具有各种基于二硫化物的可裂解连接体的3'-0-叠氮甲基Alexa488标记的核苷酸类似物参入的时程:L系列(96),B系列(97),A系列(98)和G-系列(99)家族。

[0186] 图32B显示将具有各种基于二硫化物的可裂解连接体的3'-0-叠氮甲基Alexa488标记的核苷酸类似物参入的反应速率:L-系列(96), B-系列(97),A-系列(98)和G-系列(99)家族。

[0187] 图32C显示将具有各种基于二硫化物的可裂解连接体的3'-0-叠氮甲基Alexa488标记的核苷酸类似物参入的反应速率与核苷酸浓度的关系:L-系列(96),B-系列(97),A-系列(98)和G-系列(99)家族。

[0188] 图33显示dA3'-可逆终止核苷酸的参入动力学:-CH2-N3、-CH2-SS-Et、-CH2-SS-Me。

[0189] 图34显示使用3种不同DNA聚合酶:T9、J5和J8的具有3'-0-CH2-SS-Et终止基团的dC 3'可逆终止核苷酸参入动力学。

[0190] 图35显示用于GR测序仪上的延伸A反应的核苷酸的优化浓度 [nM]。

[0191] 图36显示如根据原始错误率测定的A系列(98)核苷酸的测序性能。

[0192] 图37显示如根据完美(无错误)读数的百分比测定的A-系列(98)核苷酸的测序性能。

[0193] 图38显示通过多种测序指标测定的A-系列(98)核苷酸的测序性能。

[0194] 图39显示如根据原始错误率测定的G-系列(99)核苷酸的测序性能。

[0195] 图40显示如根据完美(无错误)读数的百分比测定的G-系列(99)核苷酸的测序性能。

[0196] 图41显示来自ExtB和ExtB和A两者中包含3'-0-CH2-SS-Et核苷酸的测序运行的多重条形码的鉴定。

[0197] 图42显示具有各种可裂解的连接体的经标记的可逆终止dC在 Extend A缓冲液中在升温下的稳定性比较:B=B-系列(97、116、117 和118),G=G-系列(99、103、104和105),A=A-系列(98、100、101 和102) 和SS=L-系列(96、50、106和115)。

[0198] 图43显示示例由化合物62合成化合物63-67的合成方案。该合成描述于实施例33、实施例34和实施例35中。

[0199] 图44显示示例由化合物68合成化合物69-71和119-120的合成方案。该合成描述于实施例36、实施例37和实施例38中。

[0200] 图45显示从上部到下部(A-系列,98、100、101和102)相当于 dCTP、dTTP、dATP 和dGTP的4种标记的核苷酸的完整化学结构。

[0201] 图46显示从上部到下部(G-系列,99、103、104和105)相当于 dCTP、dTTP、dATP 和dGTP的4种标记的核苷酸的完整化学结构。

[0202] 图47显示从上部到下部(L-系列,96、50、106和115)相当于dCTP、dTTP、dATP和

dGTP的4种标记的核苷酸的完整化学结构。

[0203] 图48显示从上部到下部(B-系列:化合物97、116、117和118)相当于dCTP、dTTP、dATP和dGTP的4种标记的核苷酸的完整化学结构。

[0204] 图49显示在GR仪器(标记的化合物72、74、76,78)和未标记的(化合物120、126、132、138)上进行测序时使用的核苷酸的实例浓度,所述化合物全部在其3'上携带-CH₂-SS-Me作为可逆的终止基团。

[0205] 图50显示使用新型核苷酸(标记和未标记的,如图49所述),均携带-CH₂-SS-Me)在GR上测序运行产生的强度的实例。

[0206] 图51显示一系列具有由包含亚甲二硫化物甲基的基团加帽的3'-0的三磷酸核苷酯的无连接体实例。

[0207] 图52显示由不同荧光团报告基团标记的4-核苷酸类似物的结构,其中所述的荧光团报告基团具有被包含亚甲二硫结构甲基的基团加帽的3'-0。

[0208] 图53是显示常见连接体的NHS活化形式的合成的一个实施方案的示意图。

[0209] 图54是显示MeSSdATP合成的一个实施方案的示意图。

[0210] 图55是显示MeSSdCTP合成的一个实施方案的示意图。

[0211] 图56是显示MeSSdGTP合成的一个实施方案的示意图。

[0212] 图57是显示MeSSdTTP合成的一个实施方案的示意图。

[0213] 图58是显示MeSSdATP-PA合成的一个实施方案的示意图。

[0214] 图59是示出76的合成的一个实施方案的示意图。

[0215] 图60是显示MeSSdCTP-PA合成的一个实施方案的示意图。

[0216] 图61是显示72的合成的一个实施方案的示意图。

[0217] 图62是显示MeSSdGTP-PA合成的一个实施方案的示意图。

[0218] 图63是显示MeSSdGTP-ARA-Cy5合成的一个实施方案的示意图。

[0219] 图64是显示MeSSdUTP-PA合成的一个实施方案的示意图。

[0220] 图65是示出74的合成的一个实施例的示意图。

[0221] 图66是显示3'-OCH₂S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTPs的结构的示意图。

[0222] 图67是显示由3'-OCH₂S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP合成3'-(OCH₂SSMe)-dNTP的一个实施方案的示意图。

[0223] 图68显示用于合成3'-(OCH₂SSMe)-dNTP-PA的关键中间体。

[0224] 图69是显示由3'-OCH₂S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP-PA合成3'-(OCH₂SSMe)-dNTP-PA的一个实施方案的示意图。

[0225] 图70是显示荧光染料的连接体组装和缀合的示意图。

[0226] 图71显示可用于连接本发明的连接体和终止基团的羟甲基衍生物核碱基衍生物的结构。R=可逆终止基团,CL=本发明的可裂解连接体。

[0227] 图72显示在裂解完成后羟甲基衍生物核碱基衍生物的结构。

[0228] 图73显示携带硫醇的化合物的实例,所述硫醇官能团可用于进行本发明的基于二硫基的连接体和终止基团的裂解:A)-半胱胺,B)-二硫琥珀酸,C)-半胱胺,D)-二硫苏糖醇,E)-2,3-二巯基-1-丙磺酸钠盐,F)-二硫丁胺,G)-内消旋-2,5-二巯基-N,N,N',N'-四甲基己二酰二胺,H)-2-巯基乙磺酸盐,I)-N,N'-二甲基,N,N'-双(巯基乙酰基)肼。

- [0229] 图74显示连接体和3'-保护基的选择性和逐步裂解的实例-化学结构和反应方案。
- [0230] 图75显示连接体的选择性和逐步裂解的实例—与裂解的每一步相关的色谱图。
- [0231] 图76显示连接体的选择性和逐步裂解的实例—从对应于选择性裂解反应的所有步骤的峰提取的吸收谱图。
- [0232] 图77显示在3'和基于二硫基的连接体上的具有二硫保护基的核苷酸的裂解反应方案。
- [0233] 图78A显示与裂解试剂二硫琥珀酸、L-半胱氨酸、DTT和半胱胺一起温育10分钟后通过RP-HPLC分析的原料和裂解反应混合物的色谱图。
- [0234] 图78B显示通过RP-HPLC分析的反应混合物的组成。
- [0235] 本发明的描述
- [0236] 本发明提供了利用三磷酸脱氧核苷的方法、组合物、混合物和试剂盒，所述三磷酸脱氧核苷包含被包含亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-O位置和与所述脱氧核苷的核碱基可逆连接的可检测标记。这类化合物为未来测序技术(包括但不限于边合成边测序)提供了新的可能性。作为物质组合物，本发明考虑到了整个说明书和附图中所示的各种结构。这些组合物可用于反应，包括但不限于引物延伸反应。这些组合物可以是混合物的形式。例如，经标记的核苷酸的一种或多种(例如图25中所示的那些)可以与一种或多种未标记的核苷酸(例如图51中所示的那些)一起在混合物中(并用于混合物中)。它们可以与其它剂(例如缓冲液，聚合酶，引物等)一起在试剂盒中。
- [0237] 在一个实施方案中，本发明的经标记的核苷酸需要几个合成步骤并涉及将多种染料连接至不同的碱基。期望能够以模块化方式进行连接体和染料连接，而不是分步过程。模块化方法包括预先构建连接体部分，其一端具有保护基，另一端具有活化基团。然后这类预先构建的连接体可以用于偶联炔丙基胺核苷酸；然后可以将掩蔽的氨基脱保护，然后偶联活化的染料。与分步合成相比，这具有步骤更少和收率更高的优点。
- [0238] 在一个实施方案中，本发明标记的核苷酸用于DNA测序。DNA测序是生物学的基本工具。它是基础研究、生物医学、诊断和法医应用以及基础和应用研究的许多其它领域中广泛使用的方法。新一代的DNA测序技术正在改变常规进行的生物学研究的方式。它在未来数年中的精密药物、伴随诊断等领域发挥关键作用。
- [0239] 边合成边测序(SBS)是革命性的下一代测序(NGS)技术，其中数百万的DNA分子单个或其簇可以同时测序。该技术的基础在于使用称为可裂解核苷酸终止子的修饰核苷酸，其允许仅一个碱基延伸和检测固体表面上的DNA分子，从而允许DNA测序中的大规模并行性(有关综述：Cheng-Yao, Chen, *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5, 1[22]；Fei Chen等人, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2013, 11, 34- 40[5]；C.W.Fuller等人, *Nature Biotechnology*, 2009, 27, 1013[2]；M.L.Metzker, *Nature Reviews*, 2010, 11, 31[1]) - 通过引用将全部文献并入本申请。
- [0240] 修饰的核苷酸具有被可裂解保护基封闭的3'-OH位置，其在参入DNA引物并随后检测后可通过化学反应除去，这些核苷酸是SBS化学成功的关键(Ju等人, US7,883,869, 2011[23]；Ju等人, US8, 088,575, 2012[24]；Ju等人, US8,796,432, 2014[25]；Balasubramanian, US6,833,246, 2004[26]；Balasubramanian等人, US7785796B2, 2010[27]；Milton等人, US7,414,116B2, 2008[28]；Metzker, M.L.等人, *Nucleic Acids Res*,

1994,22:4259-4267[29]；Ju等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,103 (52),19635,2006[30]；Rupare1等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,102 (17),5932,2005[31]；Bergmann等人,US2015/0140561A1[32]；Kwiatkowski, US2002/0015961A1[33]) -通过引用将全部文献并入本申请。

[0241] 也有人试图开发被称为虚拟终止子的核苷酸类似物,其中3'-OH 未被保护,但碱基被修饰成使修饰基团在单个碱基并入DNA模板后阻止进一步延伸,迫使链终止事件发生(Andrew F.Gardner等人,Nucleic Acids Res 40 (15),7404-7415 2012[34],Litosh等人,Nuc.Acids,Res., 2011,第39卷,第6期,39[35],Bowers等人,Nat.Methods,2009, 6,593 [36]) -通过引用将全部文献并入本申请。

[0242] 还公开了核糖核苷酸类似物,其中2'-OH被可除去基团保护,其防止相邻的3'-OH基团参与链延伸反应,从而在单碱基延伸后停止 (Zhao等人,US 8,399,188 B2,2013 [37]),通过引用将其并入本申请。

[0243] 另一方面,Zon提出应用包含具有被可除去基团封闭的3' -OH的核苷酸之一的二核苷酸终止子(Gerald Zon,US 8,017,338B2,2011 [38]),通过引用将其并入本申请。

[0244] 先前已使用可裂解的二硫键(-SS-)将荧光染料连接至标记的核苷酸中以用于GeneReader测序。认为裂解步骤后留在生长的DNA链上的-SH痕迹引起许多副反应,这限制了实现更长的读取长度。

[0245] 已知在裂解步骤中使用的TCEP存在下,-SH残基可以发生自由基反应,产生不期望的官能团,并且它可能会损坏DNA分子(由样品制备产生的含半胱氨酸的肽的脱硫化以用于通过MS进行蛋白质表征,Zhouxi Wang等人,Rapid Commun Mass Spectrom,2010,24 (3), 267- 275[39])。

[0246] -SH痕迹还可以与流动池内进入的核苷酸发生相互作用,从而过早裂解3'OH保护基团,导致进一步的链延伸,因此它可以引起信号去相位。

[0247] -SH的有害副反应的最终结果在于测序运行中读取长度的减少和错误率的增加。

[0248] 发明详述

[0249] 本发明提供了利用三磷酸脱氧核苷的方法、组合物、混合物和试剂盒,所述三磷酸脱氧核苷包含被包含亚甲二硫结构作为亚甲二硫化物作为可裂解保护基的基团加帽的3'-0位置和与所述脱氧核苷的核碱基可逆连接的可检测标记。这类化合物为未来测序技术(包括但不限于边合成边测序)提供了新的可能性。

[0250] 在一个实施方案中,本发明涉及在标记和核碱基之间包含可裂解的氧基亚甲二硫基连接体的经标记的三磷酸核苷的合成和其在DNA 测序(例如边合成边测序)中的用途,所述的三磷酸核苷具有包含亚甲二硫化物作为保护基的3'-0基团,所述的亚甲二硫化物具有式-CH₂-SS- R,其中R表示烷基,例如甲基、乙基、异丙基、叔丁基、正丁基,或它们的具有含杂原子例如O、N、S等的取代基的类似物(参见图1)。在一个实施方案中,R基团可以包含可调节3'-0加帽基团的稳定性和可裂解性同时可被DNA聚合酶接受的官能团。

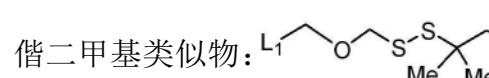
[0251] 在另一方面,本发明涉及在标记和核苷碱基之间包含可裂解的氧基亚甲二硫基连接体的经标记的三磷酸核苷,该三磷酸核苷具有被包含亚甲二硫结构的基团加帽的3'-0位置,其中核碱基可以是天然的或非天然的碱基,它们可以通过与DNA模板的天然核碱基的氢键相互作用形成DNA双链体,并且可以是dG和dA的7-脱氮类似物和2-氨基-dA。由于缺乏7-

N原子,所以dA和dG的7-脱氮类似物可以减少DNA三级结构的形成。可以设想,在一个实施方案中,这样的核苷可以通过增强DNA模板和聚合酶相互作用潜在地改善DNA测序读取长度。另外可能的情况是,2-氨基-dA由于与其互补成分形成更稳定的3个氢键(而不是天然状态下的2个键)的能力而可以增加DNA双链体的稳定性,因此,它可以在DNA测序过程中降低失去DNA引物的风险 (A. Jung等人,Mol. Pathol.,2002,55(1),55-57[40];2-amino-dATP: Igor V. Kutyavin,Biochemistry,2008,47(51),13666-73[41])。

[0252] 在另一个实施方案中,所述核苷酸可具有可检测的报道分子,例如经由可裂解连接体- OCH_2SS -连接至核碱基的荧光染料。经标记的核苷酸,其中- $\text{OCH}_2\text{-SS}$ -基团直接连接至核碱基以及其作为可裂解连接体的用途在现有技术中是未知的。与传统上广泛使用的二硫连接体(-SS-)相反,这类可裂解的连接体(- $\text{OCH}_2\text{-SS}$ -)在DNA分子上不留下硫踪迹,通过在还原裂解后所得中间体- $\text{OCH}_2\text{-SH}$ 的快速水解将其完全转化为- OH 基团。正因为如此,这些连接体可以是传统二硫连接体更好的替代物。在传统的基于二硫键的连接体(-SS-)中,所得到的巯基(-SH)在通过还原剂如TCEP裂解时可以发生副反应,如图4所示(参考文献: Desulfurization of Cysteine-Containing Peptides Resulting from Sample Preparation for Protein Characterization by MS, Zhouxi Wang等人,Rapid Commun Mass Spectrom,2010,24(3),267-275[39])。

[0253] 在另一个实施方案中,所述报道基团可以在5-C位置上连接至嘧啶碱基(dT,dC),在天然碱基的7-N上或脱氮类似物的7-C上连接至嘌呤碱基(dA,dG)。

[0254] 在另一个实施方案中,经标记的核苷酸的结构可以如图5所示,其中可裂解连接体的间隔基包括炔丙醚连接体。具有炔丙基醚的核碱基可以根据化学合成的现有技术来合成。 L_1 和 L_2 代表化学间隔基,并且取代基 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 是调节对可裂解连接体的稳定性和可裂解性的原子团。它们可以是氢原子,偕二甲基或任何烷基,苯基或被取代的烷基,例如甲基,乙基,正丁基,苯基等。它们也可以含有具有- O 、=O、NH、-N=N、酸、酰胺、聚乙二醇链(PEG)等的烃链。核苷酸上的标记可以是荧光染料,能量转移染料,放射性标记,化学发光探针,庚烷和允许通过化学或物理方法检测的其它形式的标记。

[0255] 在另一个实施方案中,经标记的核苷酸的结构可以如图6所示。可裂解连接体的间隔基包括炔丙基胺连接体。此外, L_1 和 L_2 代表化学间隔基,并且取代基 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 是如前所述提供稳定性和调节连接体的可裂解性的原子团。它们可以是氢原子,烷基如甲基、乙基和其它取代基团或它们的盐。可裂解二硫连接体的 α -碳上的偕二烷基(例如根据以下结构的偕二甲基类似物:提供对连接体更好的稳定性,从而允许标记核苷酸的模块化合成。推定这可以防止基于二硫化物的有机化合物之间普遍存在的不成比例的反应。还增加了连接体的疏水性,这有助于标记的核苷酸类似物的合成和纯化[42-44]。存在于连接体中的偕二甲基官能团被认为不仅用于在电子上稳定二硫键,而且可能通过位阻效应防止在分子间和分子内发生二硫化物交换。已经证明,在胱胺存在下,终止子上的二硫官能团参与二硫化物交换,而装载有偕二甲基的连接体则不参与二硫化物交换。图42中的连接体研究比较了具有和不具有偕二甲基的连接体。从该研究中可以看出,没有偕二甲基的连接体G和L与胱胺迅速交换导致产物降解。正如预期的,这种现象在我们所选择的附着基团A和类似的连接体B中都没有观察到。此外,由于标记的核苷酸含有两个二硫化物,一个在

分子的终止子上,且一个在连接体部分上,认为这种稳定效果防止染料与终止剂子间发生干扰。这种稳定性对于我们的核苷酸在测序中的表现是重要的。

[0256] 在另一个实施方案中,经标记的核苷酸的结构可以如图7所示。可裂解连接体的间隔基包括在嘧啶的5-位和在嘌呤的7-脱氮-碳直接连接至核碱基的亚甲基($-(\text{CH}_2)_n-$)。该连接体可以是亚甲基($n=1$)或聚亚甲基($n>1$),其中在裂解后,连接体在核碱基上的连接点产生 $-(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ 基团,并且其中 L_1 和 L_2 代表化学间隔基,并且取代基 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 是如前所述对连接体提供稳定性的原子团。

[0257] 在另一个实施方案中,本发明涉及所要求保护的核苷酸的合成方法。加帽基团和连接体可以通过改进所述的现有技术来合成,例如,未标记的dT类似物(化合物5)可以如图8所示合成。

[0258] 在一个实施方案中,本发明涉及:(a)具有被包含亚甲二硫结构的基团(例如式 $-\text{CH}_2-\text{SS}-\text{R}$)加帽的3'-0作为可裂解保护基团的三磷酸核苷(参见图1);以及(b)它们的标记类似物(参见图2),其中标记通过可裂解氧基亚甲二硫基连接体($-\text{OCH}_2-\text{SS}-$)连接至核碱基。此类核苷酸可用于通过合成(SBS)技术的核酸测序。还描述了合成所要求保护的核苷酸的一般方法。

[0259] 在一个实施方案中,如图1中所示,未经标记的核苷酸的一般结构具有被包含亚甲二硫化物的具有共同结构 $-\text{CH}_2-\text{SS}-\text{R}$ 的基团保护的3'-0基团,其中R可以是常规烷基或被取代的烷基,例如-Me、-Et、-nBu、-tBu、-CH₂CH₂NH₂、-CH₂CH₂NMe等,且B可以是天然的或非天然的核碱基。非天然核碱基的一些具体实例是7-脱氮dG和dA,2-氨基-dA等。

[0260] 在图2中,除了可检测的报道分子(标记)如荧光团通过具有通式结构 $-\text{L}_1-\text{OCH}_2-\text{SS}-\text{L}_2-$ 的可裂解的连接体连接至核碱基之外,标记的类似物的一般结构显示为如图1中被包含亚甲二硫化物的基团保护的3'-0。相应地, L_1 代表将核碱基与可裂解连接体分开的分子间隔基,而 L_2 代表可裂解连接体与标记之间的分子间隔基。 L_1 和 L_2 均可以具有用于连接至相应化学实体如-CO-、-CONH-、-NHCONH-、-O-、-S-、-C=N、-N=N-等的适当官能团。所述标记可以是荧光染料,能量转移染料,质量标记,生物素,半抗原等。标记在不同的核苷酸上可以不同以用于同时检测多个碱基,或者对于空间分离的寡核苷酸相同或它们在固体表面上扩增的克隆的逐步检测。

[0261] 在一个实施方案中,本发明涉及一类新的核苷酸,其具有被 $-\text{CH}_2-\text{SS}-\text{R}$ 基团加帽的3'-0和通过具有通式结构 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{SS}-$ 的可裂解连接体连接至核碱基的标记。通过用TCEP或相关化学物质进行单一处理,这类加帽基团和连接体可以同时洁净地裂解,从而在DNA分子上不留下硫痕迹。

[0262] 这类核苷酸可能足够稳定以承受核苷酸参入由热活性聚合酶催化的DNA模板所必需的相对高的温度($\sim 65^\circ\text{C}$),但仍足够不稳定以在DNA相容条件下裂解,如用TCEP等还原。在一些实施方案中,可通过暴露于二硫苏糖醇来完成裂解。

[0263] 当暴露于还原剂例如TCEP时,核苷酸通过图3所示的逐步机制去除3'-0保护基的加帽,从而恢复3'-OH基团的天然状态。已知TCEP及其类似物对生物分子是良性的,这是在SBS中应用的先决条件。

[0264] 在一个实施方案中,本发明涉及包含新的可裂解连接体的通式结构单元结构,如图28所示。PG=保护基,L1、L2-连接体(脂族,芳族,混合极性的直链或支链)。RG=反应基

团。在本发明的一个实施方案中,这样的结构单元在连接体的一端携带Fmoc保护基,并且在另一端上携带反应性NHS碳酸酯或氨基甲酸酯。该优选组合在包含新的可裂解连接体的修饰核苷酸合成中特别有用。在与核酸/核苷酸化学相容的条件下,保护基团应当是可除去的,并且反应性基团应当是选择性的。在连接体上的活性NHS基团与胺末端核苷酸反应后,可以使用碱如哌啶或氨容易地去除Fmoc基团,因此暴露连接体末端的氨基用于连接可裂解标记。包含各种标记的化合物文库可以非常快速地以这种方式构建。

[0265] 在一个实施方案中,本发明涉及携带通过新连接体连接的可裂解标记的核苷酸的一般结构,如图29中所示。S=糖(即核糖,脱氧核糖),B=核碱基,R=H或可逆终止基团(保护基)。优选的可逆终止基团包括,但不限于:叠氮基甲基(-CH₂N₃)、二硫基-烷基(-CH₂-SS-R)、氨氨基(-ONH₂)。

实施例

[0266] 提供下列实施例是为了显示和进一步示例本发明的某些优选实施方案和方面,但不应将它们解释为限制本发明的范围。

[0267] 实施例1

[0268] 3'-0-(甲硫基甲基)-5'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧胸苷(2)的合成

[0269] 在250mL圆底烧瓶中将5'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧胸苷(1)(2.0g,5.6mmol)溶于由DMSO(10.5mL)、乙酸(4.8mL)和乙酐(15.4mL)的组成的混合物中,在室温搅拌48小时。然后通过添加饱和K₂CO₃溶液使该混合物猝灭,直到气态CO₂放出停止。然后用EtOAc(3X100mL),应用分液漏斗萃取该混合物。然后用饱和NaHCO₃溶液(2X150mL),应用分配漏斗洗涤合并的有机萃取物,用Na₂SO₄干燥有机层。通过旋转蒸发浓缩有机部分。最终通过硅胶柱色谱法(Hex:EtOAc/7:3-1:1)纯化该反应混合物,见图8。得到3'-0-(甲硫基甲基)-5'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧胸苷(2),为白色粉末,75%收率(1.75g,R_f=0.6,hex:EtOAc/1:1)。¹H-NMR(CDCl₃):δ_H 8.16(s,1H),7.48(s,1H),6.28(m,1H),4.62(m,2H),4.46(m,1H),4.10(m,1H),3.78-3.90(m,2H),2.39(m,1H),2.14,2.14(s,3H),1.97(m,1H),1.92(s,3H),0.93(s,9H)和0.13(s,3H)ppm。

[0270] 实施例2

[0271] 3'-0-(乙基二硫甲基)-2'-脱氧胸苷(4)的合成

[0272] 向高度真空干燥过夜的溶于20mL无水CH₂Cl₂中的化合物2(1.75g,4.08mmol)中加入Et₃N(0.54mL,3.87mmol)和5.0g分子筛-3A,在Ar气氛下搅拌30分钟。然后将反应烧瓶置于冰浴上以使温度至低于零度,缓慢地加入1.8eq 1M SO₂Cl₂的CH₂Cl₂溶液(1.8mL),在相同温度下搅拌1.0小时。然后除去冰浴以使烧瓶达到室温,加入硫代甲苯磺酸钾(1.5g)在4mL无水DMF中的溶液,在室温搅拌0.5小时。

[0273] 然后加入2eq EtSH(0.6mL),再搅拌40分钟。然后用50mL CH₂Cl₂稀释该混合物,在漏斗中通过硅藻土-S过滤。用足量的CH₂Cl₂洗涤样品,以确保过滤出产物。然后浓缩CH₂Cl₂萃取物,通过硅胶柱色谱法纯化(Hex:EtOAc/1:1-1:3,R_f=0.3,在Hex:EtOAc/1:1中)。然后用在20mL MeOH中的2.2g NH₄F处理得到的粗制产物。36小时后,用20mL饱和NaHCO₃使反应停止,通过分配用CH₂Cl₂萃取。用Na₂SO₄干燥CH₂Cl₂部分,通过色谱法纯化(Hex:EtOAc/1:1-1:2),见图8。得到纯化的产物(4),为白色粉末,18%收率,0.268g,R_f=0.3,Hex:EtOAc/1:

2)。

[0274] $^1\text{H-NMR}$, CDCl_3 : δ_{H} 11.25 (1H, s), 7.65 (1H, s), 6.1 (1H, m), 5.17 (1H, m), 4.80 (2H, s), 4.48 (1H, m), 3.96 (1H, m), 3.60 (2H, m), 3.26 (3H, s), 2.80 (2H, m), 2.20 (2H, m) 和 1.14 (3H, m) ppm。

[0275] 实施例3

[0276] 3' -0- (乙基二硫甲基) -2' -脱氧胸昔三磷酸酯(5)的合成

[0277] 在25mL烧瓶中,向化合物4 (0.268g, 0.769mmol) 中加入配备橡胶塞的质子海绵 (210mg)。将样品在高度真空中干燥过夜。将该物质在氩气气氛中溶于2.6mL $(\text{MeO})_3\text{PO}$ 。将配备Ar-气体供应源的烧瓶置于冰浴上,搅拌至温度达到零度以下。然后用注射器立即加入1.5当量的 POC_3 且在相同温度和氩气气氛中搅拌2小时。然后除去冰浴,制备由三丁基铵-焦磷酸盐 (1.6g) 和 Bu_3N (1.45mL) 在无水DMF (6mL) 中组成的混合物。立即加入全部混合物,搅拌10分钟。然后用TEAB缓冲液 (30mL, 100mM) 稀释该反应混合物,在室温再搅拌3小时。通过旋转蒸发浓缩粗制产物,通过C18制备型HPLC纯化 (方法:0-5分钟 100%A, 然后是梯度至50%B, 历时72分钟, A=50mM TEAB, 且 B=乙腈)。冷冻干燥目标级分后,通过离子交换HPLC, 使用PL-SAX 制备柱 (方法:0-5分钟100%A, 然后梯度至70%B, 历时70分钟, 其中A=15%乙腈水溶液, B=在15%乙腈柱中的0.85M TEAB缓冲液) 进一步纯化半-纯的产物。如上所述通过C18制备型HPLC进行最终的纯化,得到~25%收率的化合物5,见图8。

[0278] 实施例4

[0279] N^4 -苯甲酰基-5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -3' -0- (甲硫基甲基) -2' 脱氧胞昔 (7)的合成

[0280] 根据图9实现3' -0- (乙基二硫甲基) -dCTP (10)的合成。在2L圆底烧瓶中将 N^4 -苯甲酰基-5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -2' -脱氧胞昔 (6) (50.0g, 112.2mmol) 溶于DMSO (210mL)。依次加入乙酸 (210mL) 和乙酐 (96mL), 在室温搅拌48小时。在该时间期限过程中,通过TLC 观察到完全转化成产物 (对于产物, $R_f = 0.6$, EtOAc:hex/10:1)。

[0281] 将该混合物分离成两个等分的部分,将它们各自转移至2000mL 烧杯,通过缓慢加入饱和 K_2CO_3 中和,直到 CO_2 气体放出停止 (pH 8)。然后在分液漏斗中用EtOAc萃取该混合物。然后用饱和 NaHCO_3 溶液 (2X1L), 然后用蒸馏水 (2X1L) 洗涤有机部分,然后用 Na_2SO_4 干燥有机部分。

[0282] 通过旋转蒸发浓缩有机部分。通过硅胶急骤柱色谱法,使用 puriflash柱 (Hex: EtOAc/1:4-1:9 , 3次柱运行, 使用15um, HC 300g puriflash柱) 纯化产物, 得到 N^4 -苯甲酰基-5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -3' -0- (甲硫基甲基) -2' -脱氧胞昔 (7), 为灰色粉末, 60%收率 (34.0g, $R_f = 0.6$, EtOAc:hex/9:1), 见图9。

[0283] $^1\text{H-NMR}$ 化合物7 (CDCl_3): δ_{H} 8.40 (d, $J = 7.1\text{Hz}$, 1H), 7.93 (m, 2H), 7.64 (m, 1H), 7.54 (m, 3H), 6.30 (m, 1H), 4.62&4.70 (2Xd, $J = 11.59\text{Hz}$, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.84&3.99 (2Xdd, $J = 11.59\&2.79\text{Hz}$, 2H), 2.72 (m, 1H), 2.21 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 0.99 (s, 9H) 和 0.16 (s, 6H) ppm。

[0284] 实施例5

[0285] N^4 -苯甲酰基-3' -0- (乙基二硫甲基) -5' -0- (叔丁基二甲基甲硅烷基) - 2' -脱氧胞昔 (8)

[0286] 向溶于无水CH₂Cl₂ (35mL) 中的N⁴-苯甲酰基-5' -O- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -3' -O- (甲硫基甲基) -2' -脱氧胞苷 (7) (2.526g, 5.0mmol) 中加入分子筛-3A (10g)。将该混合物搅拌30分钟。然后加入Et₃N (5.5mmol) , 在冰-盐-水浴上搅拌20分钟。然后使用注射器缓慢地加入1M SO₂Cl₂的CH₂Cl₂溶液 (7.5mL, 7.5mmol) , 在相同温度下在N₂气氛中搅拌2 小时。然后加入在8mL无水DMF中的苯硫代磷酸钠盐 (1.6g, 8.0mmol) , 在室温搅拌30分钟。最终加入EtSH (0.74mL) , 在室温再搅拌50分钟。通过硅藻土-S过滤该反应混合物, 用CH₂Cl₂洗涤出产 物。浓缩后, 得到CH₂CH₂部分, 通过急骤色谱法, 使用硅胶柱纯化 (1:1-3:7/Hex: EtOAc) , 得到化合物8, 54.4% 收率 (1.5g) , 见图9。¹H-NMR化合物8 (CDCl₃) : δ_H 8.40 (m, 1H) , 7.95 (m, 2H) , 7.64 (m, 1H) , 7.54 (m, 3H) , 6.25 (m, 1H) , 4.69&4.85 (2Xd, J=11.60Hz, 2H) , 4.50 (m, 1H) , 4.21 (m, 1H) , 3.84&3.99 (2Xdd, J=11.59&2.79Hz, 2H) , 2.75 (m, 3H) , 2.28 (m, 1H) , 1.26 (m, 3H) , 0.95 (s, 9H) 和0.16 (s, 6H) ppm。

[0287] 实施例6

[0288] N⁴-苯甲酰基-3' -O- (乙基二硫甲基) -2' -脱氧胞苷 (9)

[0289] 将N⁴-苯甲酰基-3' -O- (乙基二硫甲基) -5' -O- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -2' -脱氧胞苷 (8, 1.50g, 2.72mmol) 溶于50mL THF中。然后在冰冷温度下在氮气气氛中加入1M TBAF 的THF溶液 (3.3mL) 。将该混合物在室温搅拌1小时。然后通过加入1mL MeOH使反应停止, 10分钟后通过旋转蒸发除去溶剂。通过硅胶急骤色谱法, 使用梯度1:1-1: 9/Hex:EtOAc纯化产物, 得到化合物9 (0.78g, 65% 收率, R_f=0.6, 在 1:9/Hex:EtOAc中) , 见图9。¹H-NMR化合物9 (CDCl₃) : δ_H 8.41 (m, 1H) , 8.0 (m, 2H) , 7.64 (m, 2H) , 7.50 (m, 2H) , 6.15 (m, 1H) , 4.80 &4.90 (2Xd, J=11.60Hz, 2H) , 4.50 (m, 1H) , 4.21 (m, 1H) , 4.00& 3.85 (2Xdd, J=11.59&2.79Hz, 2H) , 2.80 (m, 2H) , 2.65 (m, 1H) , 2.40 (m, 1H) 和1.3 (s, 3H) ppm。

[0290] 最终, 按照化合物5的合成中所述的标准合成方案, 由化合物9 实现了化合物10的合成(参见附图8)。

[0291] 实施例7

[0292] 可以按照图10和图11中所示的合成路线实现经标记的核苷酸的合成。图10是专门用于经标记的dT中间体的合成的, 且其它类似物可以类似地合成。

[0293] 5' -O- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -5- (N-三氟乙酰基-氨基炔丙基) -2' - 脱氧尿苷 (12) 的合成

[0294] 在2颈圆底烧瓶中将5' -O- (叔丁基二甲基甲硅烷基) -5- 碘-2' -脱氧尿苷 (11, 25.0g, 53.4mmol) 溶于无水DMF (200mL) 中。用Ar-气填充的球囊吹扫反应烧瓶。然后加入新鲜开放的真空干燥的四(三苯膦) 钯 (0) (6.16g, 5.27mmol) 和CuI (2.316g, 12.16mmol) , 在室温在氩气气氛中搅拌10分钟。接下来依次加入N-三氟乙酰基-炔丙基胺 (23.99g, 157.8mmol, 2.9eq) 和Et₃N (14.7mL, 105.5mmol) 。将该混合物在室温搅拌3.0小时, 通过TLC 证实反应完成(对于产物, R_f=0.5, 在EtOAc: Hex/3:2中)。

[0295] 通过旋转蒸发除去溶剂。将所得到的产物溶于500mL EtOAc, 转入分液漏斗。分别用饱和NaHCO₃ (2X400 mL) 和饱和NaCl (2X400 mL) 溶液洗涤有机部分。然后用无水Na₂SO₄ 干燥EtOAc部分。过滤出 Na₂SO₄ 盐后, 使用旋转蒸发器浓缩滤液。通过硅胶急骤色谱法纯化 (1: 1Hex:EtOAc至2:3Hex:EtOAc, 200gm, 15um HP puriflash柱, 3次柱运行) , 结合至3X40gm硅胶后得到21.994g 12 (83.88% 收率) , 见图10。

[0296] $^1\text{H-NMR}$, 化合物12 (DMF- d_7) : δ 11.65 (brs, 1H), 10.15 (brs, 1H), 8.15 (brs, 1H, H6), 6.37 (t, $J=5.99\text{Hz}$, 1H, H1'), 5.42 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.37 (brs, 2H, 对于炔丙基胺基团的 NH-CH_2), 4.00 (m, 1H), 3.84-3.97 (m, 2H), 2.30 (m, 1H, H2'), 2.20 (m, 1H, H2'), 0.97 (s, 9H, 3X- CH_3 , TBDMS) 和 0.19 (s, 6H, 2X CH_3 , TBDMS) ppm。

[0297] 实施例8

[0298] 5'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-3'-0-(甲硫基甲基)-5-(N-三氟乙酰基-氨基炔丙基)-2'-脱氧尿苷(13)的合成

[0299] 在1000mL圆底烧瓶中将化合物12 (21.99g, 44.77mmol) 溶于 DMSO (90mL) 中。然后依次加入AcOH (40mL) 和乙酐 (132mL), 在室温搅拌48小时。通过TLC证实反应完成 (对于产物, $R_f=0.5$; Hex: EtOAc/1:1)。

[0300] 然后将该反应混合物转入2,000mL烧杯, 用饱和 K_2CO_3 中和至 CO_2 气体放出停止 (\sim pH 8.0)。然后将该混合物转入分液漏斗, 萃取 (2X500 mL CH_2Cl_2)。然后用饱和 NaHCO_3 (1X500 mL) 洗涤合并的有机部分, 用 Na_2SO_4 干燥。过滤出 Na_2SO_4 后, 通过旋转蒸发浓缩有机部分, 通过硅胶急骤色谱法纯化 (Hex:EtOAc/7:3-1:1), 得到12.38g化合物13 (\sim 50% 收率), 见图10。TLC: $R_f=0.5$; Hex:EtOAc/1:1, $^1\text{H-NMR}$ 化合物13 (DMSO- d_6) : δ 11.69 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 7.93 (s, 1H, H6), 6.07 (m, 1H, H1'), 4.69 (m, 2H), 4.38 (m, 1H), 4.19 (m, 2H), 4.03 (m, 1H), 3.75 (m, 2H), 2.34 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 0.86 (s, 9H) 和 0.08 (s, 6H) ppm。

[0301] 可以按照对化合物5和10所述的相关步骤的合成方案实现化合物14、15和16的合成。另外的N-三氟乙酰基-氨基炔丙基核碱基的合成如美国专利US 8,017,338[38]中所述进行, 通过引用将该文献并入本申请。可以在适度条件下通过溶剂分解产生除去N-三氟乙酰基团产生氨基炔丙基核碱基[45]。

[0302] 另一方面, 可以如图11中所示, 从1,4-丁二醇开始实现可裂解连接体合成并且其如实施例9中所述。

[0303] 实施例9

[0304] 4-0-(叔丁基二苯基甲硅烷基)-丁烷-1-0-(甲硫基甲基), 18的合成

[0305] 使在1L烧瓶中溶于100mL无水吡啶中的18.3g 1,4-丁二醇17 (18.3g, 203.13mmol) 在冰浴上在氮气气氛中达到零度以下温度。使用注射器缓慢地加入叔丁基二苯基甲硅烷基氯 (TBDPSCl, 19.34g, 70.4 mmol)。除去冰浴允许反应烧瓶温热至室温并且在室温持续搅拌过夜。然后通过旋转蒸发除去溶剂, 通过急骤色谱法, 使用硅胶柱纯化 (7:3-1:1:1/Hex:EtOAc), 得到4-0-(叔丁基二苯基甲硅烷基)-丁-1-醇 (13.7g, 59.5% 收率, $R_f=0.7$, 1:1/Hex:EtOAc, $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ H7.70 (4H, m), 7.40 (4H, m), 3.75 (2H, m), 3.65 (m, 2H), 3.70 (4H, m) 和 1.09 (9H, m) ppm。将所得到的产物中的6.07g (18.5mmol) 溶于90mL 无水DMSO 中, 见图11。然后加入乙酸 (15mL) 和乙酐 (50mL)。将该混合物在室温搅拌20小时。然后转入分液漏斗, 通过用相同体积的 EtOAc 分配用300mL蒸馏水洗涤。然后将EtOAc部分转入1, 000mL 烧杯, 用饱和 K_2CO_3 溶液中和。通过分配除去水部分, 然后用蒸馏水 (3X300 mL) 进一步洗涤EtOAc部分, 用 MgSO_4 干燥。然后浓缩EtOAc 部分, 通过硅胶柱急骤色谱法纯化 (Hex: EtOAc/97:3至90:10), 得到4-0-(叔丁基二苯基甲硅烷基)-1-0-(甲硫基甲基)-丁烷18 (5.15g, 71.7% 收率, $R_f=0.8$, 在9:1/Hex:EtOAc柱)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ H7.70 (4H, m), 7.40

(6H, m), 4.62 (2H, s), 3.70 (2H, m), 3.50 (2H, m), 2.15 (2H, s), 1.70 (4H, m) 和 1.08 (9H, m) ppm。

[0306] 实施例10

[0307] 化合物19的合成

[0308] 将化合物18 (2.0g, 5.15mmol) 溶于40mL无水CH₂Cl₂中, 加入10g分子筛-3A和0.78mL Et₃N (5.66mmol)。将该混合物在N₂气气氛中在室温搅拌30分钟。然后将烧瓶置于冰浴上以使温度达到零度以下。然后缓慢地加入7.7mL 1M SO₂Cl₂/CH₂Cl₂溶液 (7.7mmol), 在N₂气气氛中搅拌1小时。然后除去冰浴, 加入在8mL DMF中的苯硫代磺酸-Na 盐 (1.6g, 8.24mmol), 在室温搅拌30分钟。然后加入在7mL无水DMF 中的4-巯基苯乙酸 (1.73g, 10.3mmol, 2.0eq), 搅拌2小时。然后通过硅藻土-S充分过滤全部粗样品。用EtOAc洗涤产物。然后通过旋转蒸发浓缩EtOAc萃取物, 用硅胶柱纯化 (1:1-3:7/Hex:EtOAc), 得到 1.19g化合物19, 43%收率, 见图11, R_f = 0.5Hex:EtOAc/3:7。¹HNMR (CDCl₃) : 7.65 (4H, m), 7.55 (2H, m), 7.45 (6H, m), 7.20 (2H, s), 4.80 (2H, m), 3.65 (4H, m), 3.50 (2H, m), 1.60 (4H, m) 和 1.09 (9H, s) ppm。

[0309] 实施例11

[0310] 化合物20的合成

[0311] 在室温用DSC (0.426g, 1.5eq) 和Et₃N (0.23mL) 处理已溶于20 mL无水DMF中的化合物19 (0.6g, 1.11mmol), 在氮气气氛中搅拌 1.5小时。然后在5mL DMF中制备由11-叠氮基-3,6,9-三氧杂癸烷-1- 胺 (2.0eq) 和Et₃N (2.0eq) 组成的混合物。立即将全部溶液加到反应混合物中, 搅拌1小时。然后真空除去溶剂, 通过硅胶急骤色谱法纯化, 使用梯度0-10% CH₂Cl₂:MeOH, 得到化合物20, 36%收率 (0.297g, R_f = 0.8, 10%MeOH:CH₂Cl₂), 见图11。¹HNMR (MeOH-d₄) : δ_H 7.70 (4H, m), 7.55 (2H, m), 7.40 (6H, m), 7.45 (2H, m), 4.85 (2H, s), 3.65-3.30 (22H, m), 1.65 (4H, m) 和 1.09 (9H, m) ppm。

[0312] 然后在烧瓶中将产物20 (0.297g) 溶于7mL无水THF中, 置于冰浴上以便在氮气气氛中达到零度以下的温度。然后滴加0.6mL 1M TBAF的THF溶液, 在冰冷温度下搅拌3小时。用1mL MeOH使该混合物猝灭, 通过旋转蒸发除去挥发性物质, 通过急骤色谱法纯化, 得到165mg产物21, 见图11, ¹H NMR (MeOH-d₄) : δ_H 7.55 (2H, m), 7.25 (2H, m), 4.85 (2H, s), 3.75-3.30 (22H, m) 和 1.50 (4H, m) ppm。可以使用点击化学使该产物与炔取代的染料偶联并且使用CDI作为活化剂使其与核苷酸偶联, 得到化合物22。

[0313] 可以按照图12得到可裂解连接体的另一种变体, 其中稳定的偕二甲基连接至可裂解连接体的α-碳。

[0314] 实施例12

[0315] 在另一方面, 可裂解连接体可以是化合物30, 其中二硫键侧翼为偕二甲基并连接至柔性乙二醇连接体(PEG)。该连接体通过氨基甲酸酯基团 (-NH-C(=O)O-) 与PA-核苷酸(例如化合物33)连接。在这种情况下得到的核苷酸类似物可以如化合物35(dUTP类似物)所示, 其可以根据图13合成。其它核苷酸类似物(例如dATP、dGTP、dCTP的类似物)可以通过在反应顺序的最后一步用适当的PA-核苷酸类似物替代PA- 核苷酸33来类似地合成。

[0316] 实施例13

[0317] 化合物28的合成

[0318] 在圆底烧瓶中将化合物18 (15.53g, 40mmol) (见实施例9) 用于化合物18的合成) 溶

于450mL无水二氯甲烷中。加入分子筛(3Å, 80g) 和三乙胺(5.6mL), 将该反应混合物在0℃在氮气氛下搅拌0.5小时。接下来, 通过注射器缓慢加入SO₂Cl₂(1M的DCM溶液, 64mL), 在0℃温度下搅拌1.0小时。然后, 去除冰水浴, 立即加入硫代乙酸钾(10.9g, 48.1mmol)的20mL无水DMF溶液, 在室温下搅拌20分钟。然后将反应混合物倾入2L圆底烧瓶中的溶于20mL DMF的3-巯基-3-甲基丁-1-醇(4.4mL, 36mmol)中。将所得到的混合物在室温搅拌0.5小时, 通过硅藻土过滤。用乙酸乙酯萃取产物。用蒸馏水在分液漏斗中洗涤合并的有机萃取物, 随后通过旋转蒸发浓缩粗制产物。通过硅胶急骤色谱法纯化后, 使用EtOAc:己烷作为流动相得到产物(28), 26%收率(5.6g), 见图13。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.67-7.70 (m, 4H), 7.37-7.47 (m, 6H), 4.81 (s, 2H), 3.81 (t, J=6.73Hz, 2H), 3.70 (t, J=6.21Hz, 2H), 3.59 (t, J=6.55, 2H), 1.90 (t, J=6.95Hz, 2H), 1.58-1.77 (m, 4H), 1.34 (s, 6H) 和1.07 (s, 9H) ppm。

[0319] 实施例14

[0320] 化合物29的合成

[0321] 在500mL圆底烧瓶中将化合物28(5.1g, 10.36mmol)溶于100mL无水吡啶中。向该溶液中一次性加入1,1'-羰基二咪唑(CDI)(3.36g, 20.7mmol), 将该反应体系在室温在氮气气氛中搅拌1.0小时。然后将该反应混合物倾入由2,2'-(亚乙二氧基)双(乙胺)(7.6mL, 51.8mmol)和无水吡啶(50mL)组成的溶液。将该混合物在室温搅拌1.0小时, 通过旋转蒸发除去挥发性物质。通过硅胶急骤色谱法纯化得到的粗制产物, 使用MeOH:CH₂Cl₂/9.5:0.5, 得到纯化合物29(4.4g, 65%收率), 见图13。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.63-7.68 (m, 4H), 7.34-7.44 (m, 6H), 4.76 (s, 2H), 4.17 (t, J=7.07Hz, 2H), 3.65 (t, J=6.16Hz, 2H), 3.60 (s, 4H), 3.49-3.51 (m, 6H), 3.31-3.39 (m, 2H), 2.88 (m, 2H), 1.9 (t, J=7.06Hz, 2H), 1.57-1.73 (m, 4H), 1.31 (s, 6H) 和1.03 (s, 9H) ppm。

[0322] 实施例15

[0323] 化合物31的合成

[0324] 将化合物29(0.94g, 1.42mmol)溶于40mL无水THF中, 用1M TBAF的THF溶液(1.6mL, 1.6mmol)在0℃在氮气气氛中处理。将该反应混合物在0℃搅拌2.0小时, 在此过程中, LC-MS证实TBDPS 保护基完全除去。通过旋转蒸发除去溶剂后, 通过C18急骤柱急骤色谱法纯化产物(梯度: 0-100% B, 历时50分钟, 其中A=50mM TEAB, 且B=乙腈)。合并目标级分, 冻干, 得到纯化合物30(0.284g, 47%收率), MS (ES+) 计算值(M+H) 429.21, 测定值m/z 429.18。接下来, 在氮气气氛中将化合物30(0.217g, 0.51mmol)溶于13mL无水乙腈。在0℃温度向该溶液中加入DIPEA(97.7uL, 0.56mmol)和Fmoc-NHS酯(273.6mg, 0.81mmol), 在相同温度下搅拌2.0小时。然后通过1:1至1:9/hex:EtOAc梯度的硅胶急骤色谱法纯化产物, 得到半-纯产物, 使用2-5%/MeOH-CH₂Cl₂梯度进一步纯化, 得到化合物31(0.245g, 74%收率), 见图13。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.70 (2H, d, J=7.3Hz), 7.59 (2H, d, J=7.6Hz), 7.32 (2H, m), 7.24 (2H, m), 4.69 (2H, s), 4.35 (2H, m), 4.16 (1H, m), 4.09 (2H, m), 3.60-3.45 (12H, m), 3.36-3.26 (4H, m), 1.82 (2H, m), 1.60 (4H, m) 和1.22 (6H, s) ppm。

[0325] 实施例16

[0326] 化合物32的合成

[0327] 在配备了搅棒和氮气源的圆底烧瓶中将化合物31(93mg, 0.143 mmol)溶于无水乙腈(12.0mL)中。向该溶液中依次加入DSC(56mg, 0.21mmol)和DIPEA(37.4uL, 0.21mmol), 将

所得到的混合物在室温搅拌5.0小时。再加入DSC (48mg, 0.18mmol) 和DIPEA (37.4 μ L, 0.21 mmol), 在室温持续搅拌15.0小时, 在此过程中TLC显示完全转化成活化的NHS酯。进行使用己烷-乙酸乙酯(3:7至1:9)梯度的硅胶急骤色谱法纯化后得到产物32 (59mg, 53%收率), 为浓稠油状物, 用于下一步, 见图13。 1 H NMR (CDCl₃) : δ _H 7.70 (2H, d, J=7.53Hz), 7.53 (2H, d, J=7.3Hz), 7.33 (2H, m), 7.24 (2H, m), 4.69 (2H, s), 4.34 (2H, m), 4.28 (2H, m), 4.16 (1H, m), 4.09 (2H, m), 3.57-3.46 (10H, m), 3.35-3.26 (4H, m), 2.75 (4H, s), 1.74 (4H, m), 1.62 (2H, m) 和 1.23 (6H, s) ppm。

[0328] 实施例17

[0329] 化合物34的合成

[0330] 在15mL离心管内将化合物33的等分部分 (10 μ mol s) (根据参考文献US 2013/0137091 A1合成) 冻干至干。然后使其与60 μ mol s DIPEA 一起再悬浮于1.0mL无水DMF中。在单独的试管中, 将化合物32 (30 μ mol s, 3eq) 溶于3.33mL无水DMF中, 立即性完全加入。通过用手剧烈振摇充分混合该反应体系, 置于振荡器上在室温下12小时。接下来, 加入哌啶 (0.33mL), 在室温持续搅拌30分钟。然后通过使用C18 柱的HPLC纯化产物 (梯度: 0-70% B, 历时40分钟, 其中A=50mM TEAB, 且B=乙腈)。冻干目标级分后得到产物34, 73.3%收率 (7.33 umol s), 见图13。

[0331] 实施例18

[0332] 化合物35的合成

[0333] 在15mL离心管内将化合物34的等分部分 (4.9 μ mol s) 溶于1.0 mL蒸馏水和0.5M Na₂HPO₄ (0.49mL) 中。在单独的试管中, 将10mg 5-CR₆G-NHS酯 (17.9 μ mol) 溶于0.9mL无水DMF中。然后立即将该溶液全部加到反应混合物中, 在室温搅拌6.0小时。然后用50mM TEAB (25mL) 稀释该反应混合物。通过HPLC C18纯化产物 (梯度: 0-60% B, 历时70分钟)。冻干目标级分后得到化合物35 (2.15 μ mol, 44%收率, 通过HPLC测定~98%纯度且通过MS证实结构 (ES+): 计算值 (M-H) C₅₈H₇₆N₁₀O₂₅P₃S₂⁻, 1469.36, 测定值m/z 1469.67, 见图13)。

[0334] 类似地, 按照对化合物35所述的类似的方法合成了dATP、dCTP 和dGTP的类似物并且通过HPLC和LC-MS表征, 得到完整组的A- 系列 (98、100、101和102, 附图45)。对于dATP类似物, C₆₆H₈₃N₁₂O₂₃P₃S₂, 计算值 (M-H) 1,568.4348, 测定值m/z 1,568.4400; 对于dCTP类似物, C₅₂H₆₅N₁₁O₃₀P₃S₄, 计算值 (M-H) 1,545.2070, 测定值m/z 1,545.2080, 且对于dGTP类似物, C₆₆H₉₃N₁₂O₂₇P₃S₄, 计算值 (M-H) 1,706.4369, 测定值m/z 1,706.4400。在一方面, 本发明涉及具有如dATP类似物的化合物43中的可裂解连接体的核苷酸, 其中可裂解二硫化物的侧翼为偕二甲基且连接体通过脲基团 (-NH (C=O) NH-) 连接至PA-核苷酸。可以根据图14合成该化合物 (对于dATP类似物)。对于另外的核苷酸类似物 (例如对于dCTP、dGTP、dUTP的类似物), 可以通过在反应顺序的最后步骤时用适合的PA-类似物替代42类似地合成。

[0335] 实施例19

[0336] 化合物37的合成

[0337] 在室温在配备了搅棒的1L圆底烧瓶中, 将5- (fmoc-氨基) -1- 戊醇 (36, 20g, 62mmol) 溶于DMSO (256mL) 中。向该溶液中依次加入AcOH (43mL) 和Ac₂O (145mL)。用橡胶塞封闭烧瓶, 置于N₂ 气氛中, 在室温搅拌20小时。通过TLC证实反应完成。然后将该反应混合物转入3 L烧杯, 用水洗涤烧瓶。将烧杯在冰浴中冷却, 用50%饱和K₂CO₃ (400 mL) 将该反应混

合物中和30分钟。将该混合物转入分液漏斗,用EtOAc (2x700 mL) 萃取。然后用50%饱和K₂CO₃ (2x400 mL) 洗涤有机相,用Na₂SO₄干燥,过滤,真空浓缩。通过硅胶色谱法纯化粗油状物 (0-20% B, 历时20分钟, A=Hex, B=EtOAc)。采集和浓缩级分,得到化合物37 (17.77g, 75%) ,为白色固体,见图14。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.79 (d, J=7.33, 2H) , 7.63 (d, J=7.83, 2H) , 7.441 (t, J=7.33, 2H) , 7.357 (t, J=7.58, 2H) , 4.803 (bs, 1H) , 4.643 (s, 2H) , 4.43 (d, J= 6.82, 2H) , 4.24 (t, J=6.82, 1H) , 3.54 (t, J=6.32, 2H) , 3.251 (m, 1H) , 2.167 (s, 3H) , 1.657-1.550 (m, 4H) 和1.446-1.441 (m, 2H) ppm。

[0338] 实施例20

[0339] 化合物38的合成

[0340] 在N₂气氛中在配备了搅棒和塞子的250mL圆底烧瓶中将化合物 37 (2.77g, 7.2mmol) 溶于DCM (60mL) 中。向烧瓶中加入三乙胺 (3.0 mL, 21.6mL, 3eq) 和4Å分子筛 (28g)。将该混悬液在室温搅拌10分钟,然后在冰浴中搅拌30分钟。向烧瓶中加入SO₂Cl₂ (1M的DCM溶液, 14.4mL, 14.4mmol, 2eq) ,将该反应混合物在冰浴中搅拌1小时。经由TLC (1:1Hex:EtOAc) 通过原料消失监测反应进程。一旦 SO₂Cl₂活化完成,则快速加入硫代甲苯磺酸钾 (2.45g, 10.8mmol, 1.5 eq) 在DMF (60mL) 中的溶液。将该反应混合物缓慢地温热至室温1小时。然后向烧瓶中加入3-巯基-3-甲基丁醇 (1.8mL, 14.4mmol, 2eq) ,在室温搅拌1小时。过滤该反应混合物,在40°C 真空浓缩。通过FCC (0-50% B, 历时30分钟, A=Hex, B=EtOAc) 纯化,得到38 (482mg, 14%) ,为黄色油状物,见图14。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.76 (d, J=7.81, 2H) , 7.59 (d, J=7.32, 2H) , 7.40 (t, J=7.32, 2H) , 7.31 (t, J=7.32, 2H) , 4.87 (bs, 1H) , 4.79 (s, 2H) , 4.40 (d, J=6.84, 2H) , 4.21 (t, J = 6.84 1H) , 3.78 (t, J=6.84, 2H) , 3.57 (t, J = 6.35, 2H) , 3.20 (m, 2H) , 1.88 (t, J=6.84, 2H) , 1.64-1.50 (m, 4H) , 1.42-1.39 (m, 2H) 和1.32 (s, 6H) ppm。

[0341] 实施例21

[0342] 化合物39的合成

[0343] 在50mL圆底烧瓶中将化合物38 (135mg, 0.275mmol) 真空干燥 2小时。除去真空,将烧瓶放入N₂气氛中。将化合物38溶于DMF (3.1 mL) 中,向烧瓶中加入DIPEA (96μL, 0.55mmol, 2eq)。将该溶液搅拌10分钟,然后以一个剂量加入作为固体的DSC (120mg, 0.468mmol, 1.7eq)。将该反应混合物搅拌2小时,通过TLC (1:1Hex:EtOAc) 验证完成。然后在35°C 真空浓缩,在高度真空进一步干燥1小时。使粗油状物上硅胶,通过FCC纯化 (0-50% B, 历时14分钟, A=hex, B= EtOAc)。通过TLC检查级分,浓缩以得到化合物39 (133mg, 76%) ,为油状物,随时间结晶,见图14。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.78 (d, J= 7.58, 2H) , 7.61 (d, J=7.58, 2H) , 7.42 (t, J=7.58, 2H) , 7.33 (t, J= 7.58, 2H) , 4.87 (bs, 1H) , 4.80 (s, 2H) , 4.48 (t, J=7.07, 2H) , 4.44 (d, J=6.82, 2H) , 4.24 (t, J=7.07, 1H) , 3.58 (t, J=6.32, 2H) , 3.22 (m, 2H) , 2.83 (s, 4H) , 2.08 (m, 2H) , 1.649-1.562 (m, 4H) , 1.443-1.390 (m, 2H) 和1.366 (s, 6H) ppm。

[0344] 实施例22

[0345] 化合物40的合成

[0346] 将2,2'-(亚乙二氧基) 双(乙胺) (92μL, 635μmol, 10eq) 和三乙胺 (176μL, 1270μmol, 20eq) 溶于DMF (10mL) 中。还制备单独的6- ROX, NHS酯 (40mg, 64umol, 1eq) 在DMF (2.7mL) 中的溶液。将6- ROX, NHS酯溶液滴加到快速搅拌的包含所述二胺的溶液中。将该反

应体系搅拌2小时,通过C18 HPLC-MS (0-100% B,历时10分钟,A= 50mM TEAB,B=MeCN) 监测进程。一旦完成,则通过制备型C18- HPLC (10-100% B,历时50分钟,A=50mM TEAB,B=MeCN) 纯化该反应体系。合并级分,冻干,得到化合物40 (20mg,48%),为紫红色固体,见图14。MS (ES-) 计算值 (M-H) $C_{39}H_{45}N_4O_6$ 664.33,测定值 m/z 664.56。

[0347] 实施例23

[0348] 化合物41的合成

[0349] 将化合物40 (10mg,15 μ mol) 溶于DMF (1mL) 中,加入DIPEA (8 μ L,45 μ mol,3eq)。单独地,将化合物39 (28mg,45 μ mol,3eq) 溶于DMF (0.21mL) 中。将化合物39的溶液快速加到具有化合物40的溶液中。将该反应体系置于摇动平板上1.5小时,此时,分析型C18- HPLC (0-100% B,历时10分钟,A=50mM乙酸盐缓冲液pH 5.2,B =MeCN) 显示剩余化合物40。再加入化合物39 (13mg,21 μ mol,1.4 eq),将该反应体系置于摇动平板上再经过1小时。不再进行分析,加入哌啶 (300 μ L),允许反应10分钟。然后将该反应混合物直接注射在制备型C18-HPLC 上 (10-100% B,历时50分钟,A=50mM TEAB,B=MeCN)。采集级分,冻干,得到化合物41 (4.7mg,34%),为紫红色固体,见图14。MS (ES+) 计算值 (M+H) $C_{51}H_{68}N_5O_9S_2^+$ 959.45,测定值 m/z 959.76

[0350] 实施例24

[0351] 化合物43的合成

[0352] 向5mL样品小瓶中加入胺41 (2mg,2 μ mol)、DSC (0.8mg,3 μ mol,1.5eq)、DIPEA (0.7 μ L,4 μ mol,2eq) 和N,N-二甲基甲酰胺 (1.7 mL)。将该反应混合物置于振荡器上1小时。通过C18-HPLC (0-100% B,历时10分钟,A=50mM乙酸盐缓冲液pH 5.2,B=MeCN) 监测反应进程。接下来,加入在0.1Na₂HPo₄ (3.3mL) 中的核苷酸42 (6 μ mol, 3eq,参考文献US 2013/0137091 A1),将该反应混合物置于振荡器上过夜。接下来用水稀释该反应体系,通过制备型C18-HPLC (0-60% B,历时70分钟,A=50mM TEAB,B=MeCN) 纯化,得到标题化合物 43 (0.5 μ mol, 25%),见图14。MS (ES-) 计算值 (M-H) $C_{67}H_{87}N_{13}O_{22}P_3S_2$ 1581.47,测定值 m/z 1581.65。

[0353] 实施例25

[0354] 在另一方面,可裂解连接体可以为化合物45,其中该连接体通过脲官能团连接至PA-核苷酸且二硫化物通过2个碳连接体连接至染料。在这种情况下,得到的核苷酸类似物可以如化合物49 (dGTP类似物) 中所示,其可以根据图15合成。其它核苷酸类似物(例如dATP、dUTP、dCTP的类似物)可以类似地通过在反应顺序的第3步中用适合的PA- 核苷酸类似物替代核苷酸46来类似地合成。

[0355] 实施例26

[0356] 化合物44的合成

[0357] 在配备了磁力搅棒的100mL圆底烧瓶中加入在CH₂Cl₂中的37 (1.00g,2.59mmol)、分子筛和三乙胺 (0.72mL,5.18mmol)。将该反应混合物在室温搅拌10分钟,冷却至0℃。缓慢地加入亚硫酰氯 (4.40 mL,4.40mmol),将所得到的混合物在0℃搅拌1小时。使用20%乙酸乙酯的己烷溶液的TLC分析显示原料消失,在0℃一次性加入苯硫代磺酸钠盐 (648mg, 3.89mmol) 在N',N' -二甲基甲酰胺 (5mL) 中的溶液,将该反应混合物在室温搅拌20分钟。接下来,一次性加入N- (三氟乙酰氨基) 乙硫醇 (896mg,5.18mmol),将所得到的混合物在室温搅拌30分钟。过滤出分子筛,减压除去溶剂,通过使用0-20%乙酸乙酯-己烷梯度的硅胶柱

色谱法纯化残余物,得到标题化合物44 (529mg, 39%), 为淡黄色油状物。 ^1H NMR (CDCl_3), 见图15: δ_{H} 7.76 (d, $J = 7.52\text{Hz}$, 2H), 7.57 (d, $J = 7.50\text{Hz}$, 2H), 7.40-7.38 (m, 2H), 7.30-7.25 (m, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.42 (d, 2H), 4.21-4.20 (m, 1H), 3.70-3.67 (m, 2H), 3.59-3.55 (m, 2H), 3.17-3.16 (m, 2H) 和 1.64-1.40 (m, 6H) ppm。

[0358] 实施例27

[0359] 化合物45的合成

[0360] 在室温在配备了磁力搅棒的25mL圆底烧瓶中加入氨基甲酸酯 44 (100mg, 0.184mmol) 和1mL 20% 呓啶的N,N-二甲基甲酰胺溶液。将该反应混合物在室温搅拌10分钟, 然后用乙腈(5mL)稀释, 通过反相制备型HPLC, 使用0-30%乙腈-TEAB缓冲液梯度纯化, 得到标题化合物45 (11mg, 20%), 为澄清油状物, 见图15。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ_{H} 4.90 (s, 2H), 3.64-3.60 (m, 2H), 3.32 (s, 2H), 2.98-2.93 (m, 2H), 2.86-2.82 (m, 2H), 1.66-1.60 (m, 2H), 1.50-1.48 (m, 2H) 和 1.33-1.30 (m, 2H) ppm。

[0361] 实施例28

[0362] 化合物47的合成

[0363] 向5mL样品小瓶中加入胺45 (0.960mg, 3.0 μmol)、DSC (1.15mg, 4.5 μmol) 和三乙胺 (60 μL , 6.0 μmol), 在室温振摇2小时。然后加入由在N,N-二甲基甲酰胺中的3eq核苷酸46在200 μL (参考文献US 2013/0137091A1) 中组成的溶液。将该反应混合物置于振荡器上12小时。接下来用TEAB缓冲液稀释该反应体系, 通过制备型反相HPLC, 使用0-30%乙腈:50mM TEAB缓冲液梯度纯化, 得到标题化合物47 (14%收率), 见图15。MS (ES-): 计算值 (M-H) $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{F}_3\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2^-$, 959.10, 测定值m/z 959.24。

[0364] 实施例29

[0365] 化合物48的合成

[0366] 将核苷酸47 (1 μmol) 溶于TEAB缓冲液 (200 μL 50mM水溶液) 中, 用200 μL 氢氧化铵 (30%水溶液) 在室温处理50分钟。然后用TEAB 缓冲液 (1mL 1M溶液) 和蒸馏水 (5mL) 稀释该反应体系, 通过C18- HPLC, 0-30%乙腈:50mM TEAB缓冲液梯度纯化得到的混合物, 得到标题化合物48 (0.40 μmol , 90%), 见图15。MS (ES-): 计算值 (M-H) $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}_2^-$, 863.12, 测定值m/z 863.45。

[0367] 实施例30

[0368] 化合物49的合成

[0369] 在3mL eppendorf试管中将化合物48的等分部分 (0.04 μmol s) 溶于0.1mL蒸馏水和 0.5M Na_2HPO_4 (20 μL) 中。在单独的试管中, 将1 mg ROX-NHS酯 (0.168 μmol) 溶于48 μL 无水DMF 中。然后立即性将该溶液全部加到反应混合物中, 在室温搅拌6.0小时。然后用50mM TEAB (5mL) 稀释该反应混合物。通过C18-HPLC, 使用 (0-60% B梯度, A=50mM TEAB, B=乙腈) 纯化产物。冻干目标级分后得到化合物49 (0.03 μmol , 30%收率), 见图15。MS (ES-) 计算值 (M-H), $\text{C}_{57}\text{H}_{67}\text{N}_{12}\text{O}_{19}\text{P}_3\text{S}_2^-$ 1380.33, 测定值1380.25。

[0370] 与常规二硫键连接的核苷酸的裂解比较

[0371] 将本申请中所公开的含有可裂解氧基亚甲二硫基 (-OCH₂-SS-) 连接体的这类新核苷酸类别与常规二硫键-SS-连接的核苷酸 (例如, 在美国专利申请2013/0137091 [46] 中所述的核苷酸50) 在还原性基于膦的裂解条件下进行比较。观察到这两类核苷酸有明显的差

异。当使经标记的核苷酸50在65°C暴露于10eq的TCEP时,其产生包括化合物52在内的许多副产物以及通过LC-MS鉴定的预期产物51(图16和图17,5分钟暴露)。不需要的副产物的比例随时间推移而增加(图18,15分钟暴露)。在相同的裂解条件下,氧基亚甲二硫基连接的核苷酸35洁净地产生了所期望的裂解产物化合物53和54。连接体的亚甲基硫氢基片段(-CH₂SH)在裂解二硫基团时完全从核苷酸中消除(图20和图21,5分钟暴露)。另外,LC-MS显示,延长露于TCEP不会产生另外的副产物(图22,15分钟暴露)。因此,如图4中所示,这类新的核苷酸能够通过消除硫氢基的存在所固有的副反应,在边合成(SBS)边DNA测序的应用中提供显著的优势。

[0372] 实施例31

[0373] 化合物57的合成

[0374] 在另一个实施方案中,核苷酸的3'-OH基团可以被-CH₂-SS-Et或-CH₂-SS-Me加帽,且荧光团染料通过上述可裂解-OCH₂-SS-连接体之一连接至核碱基(例如如化合物35、43和49中所示)。

[0375] 具有3'-OCH₂-SS-Et和-3'-OCH₂-SS-Me的PA核苷酸的合成可以分别根据图10和图22实现。3'-OCH₂-SS-Me类似物与3'-OCH₂-SS-Et类似物的合成中的差异(图10)在于在适合的步骤中用甲硫醇或硫代甲醇钠替代巯基乙醇(EtSH),如图22中所示。在所有可能的3'-O-CH₂-SS-R类似物中-OCH₂-SS-Me基团是最小结构。因此,具有3'-OCH₂-SS-Me加帽基团的核苷酸类似物在酶促参入速率和用还原剂例如TCEP的可裂解性方面将优于其它类似物。

[0376] 接下来,可以使所得到的PA-核苷酸(例如57)与适合的可裂解-OCH₂-SS-连接体偶联,且使用活化的连接体32最终与如图23中所示的荧光染料偶联。可以使用适合的PA-核苷酸(例如dATP、dGTP、dCTP的PA类似物)和NHS活化染料(Alexa488-NHS、ROX-NHS、Cy5-NHS酯等)类似地合成具有不同染料的其它核苷酸,得到用不同荧光团报道基团标记的核苷酸类似物。

[0377] 实施例32

[0378] 可以按照如所述的方案,如化合物60和61的合成中所示(图24)得到具有不同连接体的核苷酸类似物。

[0379] 可以类似地合成不同组的3'-OCH₂-SS-Et和3'-OCH₂-SS-Me核苷酸,其具有可裂解连接体-OCH₂-SS-,但在链长和 α -碳上的取代不同。得到的核苷酸类型如图25、图26和图27中所示。在如图25中所示的核苷酸中,通过稳定连接至柔性乙二醇连接体并且通过氨基甲酸酯官能团(-NH-C(=O)-O-)连接至PA-核碱基的偕二甲基,使可裂解连接体位于侧翼,而在图26中,氨基甲酸酯基团被脲基团(-NH-C(=O)-NH-)替代。另一方面,在图27中所示的核苷酸中,二硫基团连接至伯碳链且通过脲官能团连接至PA-核碱基。

[0380] 实施例33

[0381] 化合物64的合成:

[0382] 向250mL圆底烧瓶中加入化合物62(3.0g,4.58mmol)、25mL无水CH₂Cl₂、3- \AA 分子筛(5.0g)和环己烯(0.55mL,5.4mmol)。将所得到的混合物在室温在氮气气氛中搅拌10分钟。然后将反应烧瓶置于冰浴上,通过注射器缓慢地加入SO₂Cl₂(6.8mL,1M的CH₂Cl₂溶液,1.5 eq),在0°C搅拌1小时。接下来加入额外的0.5eq SO₂Cl₂以确保完全转化成化合物63。真空除去挥发性物质,同时保持温度接近10°C。将所得到的固体重新悬浮于20mL无水DMF中,

保持在氮气气氛中。

[0383] 在单独的烧瓶中,在氮气气氛中将(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(2.45g,11.44mmol)溶于无水DMF(30mL)中,用NaH(274.5mg,60%在油中)处理,得到灰色浆液。向其中立即加入化合物63。在室温在氮气气氛中搅拌3小时。然后通过celite®-S(20g)在漏斗中过滤该反应混合物,用EtOAc(100mL)洗脱产物。然后用蒸馏水(2X100 mL)洗涤EtOAc溶液。用Na₂SO₄干燥EtOAc萃取物,通过旋转蒸发浓缩,通过急骤色谱法纯化(柱:720g RediSepRfGold,梯度:80%Hex至50Hex:EtOAc)。见图43。得到目标化合物(64),为白色固体(1.2g,32%收率, R_f:0.4,Hex:EtOAc/3:2)。¹H NMR(CDCl₃):δH 8.13(m,3H),7.43(m,1H),7.32(m,2H),6.12(m,1H),6.00(s,2H),4.62(m,2H),4.31(m,3H),4.00(m,1H),3.82-3.60(m,13H),2.39(m,1H),1.84(m,1H),0.78(m,9H)和0.01(m,6H)ppm。

[0384] 实施例34

[0385] 化合物65的合成:

[0386] 在高度真空中在具有P₂O₅的干燥器中将化合物64(1.2g 1.46 mmol)干燥过夜,在配备磁力搅拌器的100mL烧瓶中溶于30mL无水CH₂Cl₂。向其中加入二甲基二硫化物(0.657mL,7.3mmol),将该反应烧瓶置于冰浴上。然后加入四氟硼酸二甲基(甲硫基)锍(DMTSF,316 mg,1.1eq),在0℃搅拌1.5小时。将该反应混合物转入250mL分液漏斗,用50mL 0.1M NaHCO₃水溶液中和,用CH₂Cl₂(2X 50mL)萃取。见图43。用Na₂SO₄干燥有机部分,通过旋转蒸发浓缩。用硅胶柱,使用梯度80-50%Hex-EtOAc纯化粗制产物(80g RediSepRf金),得到0.82g化合物65(82%收率,R_f=0.5,Hex:EtOAc/3:2)。¹H NMR(CDCl₃):δH 8.15(m,3H),7.42(m,1H),7.35(m,2H),6.11(m,1H),4.80-4.65(m,2H),4.34(m,1H),4.28(m,2H),4.10(m,1H),3.83-3.67(m,2H),2.49(m,1H),2.34(s,3H),1.90(m,1H),0.78(m,9H)和0.10(m,6H)ppm。

[0387] 实施例35

[0388] 化合物66的合成:

[0389] 向配备了磁力搅棒的圆底烧瓶中加入化合物65(0.309g,0.45 mmol)和10.0mL无水CH₂Cl₂(10.0mL),在氮气气氛中置于冰浴上。通过注射器缓慢地加入TBAF(0.72mL,0.72mmol,1M溶液)。将该反应混合物在0℃搅拌3小时。然后将该反应混合物转入分液漏斗,用0.5M NaHCO₃溶液(50mL)猝灭。用EtOAc(2X100 mL)萃取得到的混合物,用Na₂SO₄干燥。使用40g RediSepRf柱,应用于梯度7:3至2:3Hex:EtOAc进行硅胶柱色谱后得到产物66,为白色粉末,76%收率(196mg,R_f=0.3,Hex:EtOAc/1:1)。见图43。¹H NMR(CDCl₃):δH 8.40(s,1H),8.25(m,2H),7.60(m,1H),7.52(m,2H),6.21(m,1H),4.90-80(m,2H),4.65(m,1H),4.40(m,2H),4.25(m,1H),4.05-3.85(m,2H),2.62(m,1H),2.50(s,3H)和2.31(m,1H)ppm。

[0390] 通过标准三磷酸酯合成方法(参见化合物5的合成详细描述且见图8)使化合物66磷酸化后得到产物67(对于67,通过LC-MS证实m/z (M-H) 611.19C₁₄H₂₃N₄O₁₃P₃S₂)。根据对图13、图14和图15中呈现的化合物所述的方法进一步转化成染料标记的产物。

[0391] 实施例36

[0392] 化合物70的合成:

[0393] 在N₂气氛中在配备了搅棒和橡胶塞的干500mL圆底烧瓶中将化合物68(7.3g,13.8mmol)在干燥器中干燥过夜,溶于无水DCM(70 mL)。向该反应混合物中加入环己烯

(1.54mL, 15.2mmol, 1.1当量) 和干3-Å分子筛(16.6g), 将所得到的混悬液在0℃在冰浴中搅拌20分钟。接下来加入 SO_2Cl_2 (1M的DCM溶液, 32.7mL, 2.36equiv), 将所得到的混合物在0℃搅拌1小时。通过TLC(100% EtOAc)根据原料消失监测反应进程。一旦 SO_2Cl_2 活化完成, 则制备($\text{MeO})_3\text{BnSH}$ (7.4g, 34.5mmol, 2.5equiv)和NaH(1.32g, 33.12mmol, 60%的矿物油中)在DMF(120mL)中的混合物, 且将其一次性快速加入。将该反应体系缓慢地温热至室温, 搅拌1小时。过滤该反应混合物, 在40℃真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化(用0-60%乙酸乙酯:己烷梯度洗脱, 15分钟, 然后60%乙酸乙酯:己烷45分钟), 得到所期望的化合物70(4.2g, 43.7%收率), 为澄清油状物。见图44。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3): \delta_{\text{H}} 8.72(\text{s}, 1\text{H}), 8.31(\text{s}, 1\text{H}), 7.94(\text{m}, 2\text{H}), 7.52(\text{m}, 1\text{H}), 7.44(\text{m}, 2\text{H}), 6.41(\text{m}, 1\text{H}), 6.03(\text{s}, 2\text{H}), 4.67(\text{s}, 2\text{H}), 4.50(\text{m}, 1\text{H}), 4.10(\text{m}, 1\text{H}), 3.73(\text{m}, 13\text{H}), 2.52(\text{m}, 2\text{H}), 0.81(\text{s}, 9\text{H})$ 和0.002(d, 6H) ppm。

[0394] 实施例37

[0395] 化合物71的合成:

[0396] 在 N_2 气氛中在安装了搅棒和橡胶塞的200mL圆底烧瓶中将化合物70(2g, 2.87mmol)溶于无水DCM(38mL)中, 用冰-水浴冷却。向该混合物中加入二甲基二硫化物(1.3mL, 14.36mmol, 5当量), 然后一次性加入作为在DCM中的溶液(20mL)的DMTSF(620mg, 3.15 mmol, 1.1当量)。将所得到的混合物缓慢地温热至室温, 然后再搅拌4小时。通过添加饱和 NaHCO_3 水溶液(100mL)使反应停止, 用DCM(150mL x 2)和EtOAc(200mL)萃取, 用 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化(用0-60%乙酸乙酯:己烷梯度洗脱, 15分钟, 然后60%乙酸乙酯:己烷, 45分钟), 得到所期望的化合物71(1g, 62%收率), 为白色粉末。见图44。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3): \delta_{\text{H}} 8.69(\text{s}, 1\text{H}), 8.24(\text{s}, 1\text{H}), 7.94(\text{m}, 1\text{H}), 7.51(\text{m}, 1\text{H}), 7.42(\text{m}, 2\text{H}), 6.41(\text{m}, 1\text{H}), 4.82(\text{m}, 2\text{H}), 4.57(\text{m}, 1\text{H}), 4.15(\text{m}, 1\text{H}), 3.77(\text{m}, 2\text{H}), 2.61(\text{m}, 2\text{H}), 2.40(\text{s}, 3\text{H}), 0.81(\text{s}, 9\text{H})$ 和0.00(d, 6H) ppm。

[0397] 实施例38

[0398] 化合物72的合成:

[0399] 在 N_2 气氛中在配备了搅棒和橡胶塞的100mL圆底烧瓶中将化合物71(562mg, 1.25mmol)溶于无水THF(30mL)中, 用冰-水浴冷却。然后滴加TBAF(1.5mL 1M的THF溶液, 1.5当量), 在0℃搅拌2小时。通过TLC监测反应进程(100%乙酸乙酯, 对于化合物72 $R_f = 0.205$, 对于化合物71, $R_f = 0.627$)。在反应完成时, 加入甲醇(5mL), 通过旋转器浓缩反应体系, 通过硅胶柱色谱法纯化残余物(用0-60%乙酸乙酯:己烷梯度洗脱, 15分钟, 然后60%乙酸乙酯:己烷, 45分钟), 得到所期望的化合物72(280mg, 62%收率), 为白色粉末。见图44。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3): \delta_{\text{H}} 8.69(\text{s}, 1\text{H}), 8.02(\text{s}, 1\text{H}), 7.95(\text{m}, 2\text{H}), 7.53(\text{m}, 1\text{H}), 7.44(\text{m}, 2\text{H}), 6.25(\text{m}, 1\text{H}), 4.83(\text{m}, 2\text{H}), 4.70(\text{m}, 1\text{H}), 4.29(\text{m}, 1\text{H}), 3.93(\text{m}, 1\text{H}), 3.74(\text{m}, 1\text{H}), 2.99(\text{m}, 1\text{H}), 2.43(\text{s}, 3\text{H})$ 和2.41(m, 1H) ppm。

[0400] 然后按照上述标准三磷酸酯合成将化合物72转化成三磷酸酯73(见图8中化合物5的合成)。

[0401] 实施例39

[0402] 化合物108的合成:

[0403] 在配备了搅棒的1L圆底烧瓶中加入100mL无水吡啶中的1,4-丁二醇(18.3g, 203.13mmol), 在氮气氛围下冷却至0℃。然后通过注射器滴加叔丁基二苯基甲硅烷基氯

(13.8mL, 70mmol), 使反应逐渐升温至室温, 在室温继续搅拌12小时。通过旋转蒸发除去挥发性物质, 将残余物吸附到80克硅胶上。通过使用在己烷中的30-50%乙酸乙酯梯度的硅胶急骤柱色谱法纯化得到4-0-(叔丁基二苯基甲硅烷基)-丁-1-醇 108 (13.7g, 59.5%收率, $R_f = 0.7$ 与1:1/己烷:乙酸乙酯, ^1H NMR (CDCl_3) : δ_{H} 7.70 (m, 4H), 7.40 (m, 6H), 3.75 (m, 2H), 3.65 (2H, m), 1.70 (m, 4H), 1.09 (m, 9H), ppm。合成示例在图53中。

[0404] 实施例40

[0405] 化合物109的合成:

[0406] 向配备了磁力搅棒的250mL圆底烧瓶中加入化合物108 (6.07g, 18.5mmol) 和90mL 无水DMSO。在室温依次加入乙酸 (15mL) 和乙酐 (50mL), 将该反应体系在室温搅拌20小时, 转入分液漏斗, 使其分配在300mL蒸馏水与300mL乙酸乙酯之间。然后将有机层转入1L烧杯, 用饱和 K_2CO_3 水溶液 (500mL) 中和。用蒸馏水 (3x 300mL) 洗涤有机层, 用 MgSO_4 干燥。减压除去挥发性物质, 通过硅胶急骤柱色谱法纯化残余物 (己烷:乙酸乙酯/97:3至90:10), 得到4-0-(叔丁基二苯基甲硅烷基)-1-0-(甲硫基甲基)-丁烷109 (5.15g, 71.7%收率, $R_f = 0.8$, 在9:1/己烷:乙酸乙酯中)。 ^1H NMR (CDCl_3) : δ_{H} 7.70 (m, 4H), 7.40 (m, 6H), 4.62 (s, 2H), 3.70 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 2.15 (s, 2H), 1.70 (m, 4H), 1.08 (m, 9H), ppm。合成示例在中图53。

[0407] 实施例41

[0408] 化合物110的合成:

[0409] 在配备了搅棒的1L圆底烧瓶中加入化合物109 (15.5g, 40mmol)、无水二氯甲烷 (450mL)、3 \AA 分子筛 (80g) 和三乙胺 (5.6mL), 将该反应体系在0°C在氮气气氛中搅拌30分钟。接下来, 通过注射器缓慢地加入 SO_2Cl_2 (64mL 1M在二氯甲烷中的溶液), 在0°C搅拌1小时。然后除去冰浴, 立即加入硫代甲苯磺酸钾 (10.9g, 48.1mmol) 在20mL无水DMF中的溶液。将所得到的混合物在室温搅拌20分钟, 立即加到包含3-巯基-3-甲基丁-1-醇 (4.4mL, 36mmol) 在DMF (20mL) 中的溶液的2L圆底烧瓶中。将该反应体系在室温搅拌30分钟, 然后通过硅藻土-S过滤。使产物分配在等量乙酸乙酯与水之间, 用蒸馏水在分液漏斗中洗涤有机萃取物, 然后通过旋转蒸发浓缩粗制产物。通过硅胶急骤柱色谱法使用乙酸乙酯:己烷梯度纯化, 得到标题化合物110 (5.6g, 26%)。 ^1H NMR (CDCl_3) : δ_{H} 7.67-7.70 (m, 4H), 7.37-7.47 (m, 6H), 4.81 (s, 2H), 3.81 (t, $J=6.73\text{Hz}$, 2H), 3.70 (t, $J=6.21\text{Hz}$, 2H), 3.59 (t, $J=6.55$, 2H), 1.90 (t, $J=6.95\text{Hz}$, 2H), 1.58-1.77 (m, 4H), 1.34 (s, 6H) 和1.07 (s, 9H), ppm。合成示例在图53中。

[0410] 实施例42

[0411] 化合物111的合成:

[0412] 在氮气气氛中在配备了搅棒的500mL圆底烧瓶中加入化合物110 (5.1g, 10.36mmol)、无水吡啶 (100mL) 和1,1'-羰基二咪唑 (CDI) (3.36g, 20.7mmol)。将该反应混合物在室温搅拌1小时, 倾入2,2'-(亚乙二氧基)双(乙胺) (7.6mL, 51.8mmol) 在无水吡啶 (50mL) 中的溶液。持续搅拌1小时, 通过旋转蒸发除去挥发性物质, 通过使用(0-15%甲醇的 CH_2Cl_2 溶液)的硅胶急骤柱色谱法纯化得到的粗制产物, 得到化合物111 (4.4g, 65%收率)。 ^1H NMR (CDCl_3) : δ_{H} 7.63-7.68 (m, 4H), 7.34-7.44 (m, 6H), 4.76 (s, 2H), 4.17 (t, $J=7.07\text{Hz}$, 2H), 3.65 (t, $J=6.16\text{Hz}$, 2H), 3.60 (s, 4H), 3.49-3.51 (m, 6H), 3.31-3.39 (m, 2H), 2.88 (m, 2H), 1.9 (t, $J=7.06\text{Hz}$, 2H), 1.57-1.73 (m, 4H), 1.31 (s, 6H) 和1.03 (s, 9H), ppm。合成示例在

图53中。

[0413] 实施例43

[0414] 化合物113的合成:

[0415] 在0℃在氮气气氛中在配备了搅棒的50mL圆底烧瓶中加入化合物111 (0.94g, 1.42mmol)、无水THF (40mL) 和TBAF (1.6mL 1M 的THF溶液, 1.6mmol)。将该反应混合物在0℃搅拌2.0小时,在此过程中,LC-MS显示TBDPS保护基完全除去。通过旋转除去挥发性物质后,通过硅胶急骤色谱法纯化产物 (0-5% 甲醇的二氯甲烷溶液梯度,得到纯化合物112 (0.284g,47%收率),MS (ES+) 计算值 (M+H) 429.21,测定值m/z 429.18.

[0416] 接下来,将化合物112 (0.217g, 0.51mmol) 在氮气气氛中溶于无水乙腈 (13mL),冷却至0℃。加入DIPEA (97.7μL, 0.56mmol) 和Fmoc- NHS酯 (273.6mg, 0.81mmol),将该反应体系在0℃搅拌2小时。通过使用50-90%乙酸乙酯的己烷溶液梯度的硅胶急骤柱色谱法纯化,得到半-纯产物,通过使用2-5%甲醇的CH₂Cl₂溶液梯度的硅胶柱色谱法进一步纯化,得到化合物113 (0.245g,74%收率)。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.70 (2H, d, J=7.3Hz) , 7.59 (2H, d, J=7.6Hz) , 7.32 (2H, m) , 7.24 (2H, m) , 4.69 (2H, s) , 4.35 (2H, m) , 4.16 (1H, m) , 4.09 (2H, m) , 3.60-3.45 (12H, m) , 3.36-3.26 (4H, m) , 1.82 (2H, m) , 1.60 (4H, m) 和1.22 (6H, s) ppm。合成示例在图53中。

[0417] 实施例44

[0418] 化合物114的合成:

[0419] 向配备了磁力搅棒的50mL圆底烧瓶中加入化合物7 (170mg, 0.26mmol)、无水乙腈 (15mL)、DSC (100mg, 0.39mmol) 和DIPEA (68μL, 0.39mmol)。将反应混合物在室温下搅拌3小时,再加入DSC (100mg, 0.39mmol) 和DIPEA (68μL, 0.39mmol)。将所得到的混合物室温下搅拌搅拌12小时。通过TLC跟踪反应进程 (原料R_f=0.4,产物R_f=0.8,在9:1/乙酸乙酯:己烷中)。通过旋转蒸发除去挥发性物质,剩余的残余物用己烷-乙酸乙酯梯度经3-连续硅胶柱纯化,得到化合物114 (121mg,59%收率)。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.81 (m, 2H) , 7.63 (m, 2H) , 7.42 (m, 2H) , 7.33 (m, 2H) , 4.78 (s, 2H) , 4.43 (m, 2H) , 4.37 (t, J=7.65Hz, 2H) , 4.25 (m, 2H) , 4.18 (m, 2H) , 3.67-3.55 (m, 10H) , 3.39 (m, 4H) , 2.84 (s, 4H) , 1.88 (m, 4H) , 1.73 (m, 4H) 和1.32 (s, 6H) ppm。合成示例在图53中。

[0420] 实施例45

[0421] 化合物117的合成:

[0422] 向配备了磁力搅棒的500mL圆底烧瓶中加入化合物68 (7.3g,13.8mmol,预先用干燥器干燥过夜)、无水二氯甲烷 (70mL)、环己烯 (1.54mL,15.2mmol) 和3-Å分子筛 (16.6g),将所得悬浮液在0℃和氮气气氛中搅拌20分钟。接下来,加入SO₂Cl₂ (1M的二氯甲烷溶液, 32.7mL,2.36当量),将所得混合物在0℃下搅拌1小时。通过TLC 监测反应进程以确认原料 (100%乙酸乙酯) 消失。一旦SO₂Cl₂活化完成,则制备(MeO)₃BnSH (7.4g,34.5mmol,2.5eqiv) 和NaH (1.32g,33.12 mmol,60%的矿物油中) 在DMF (120mL) 中的混合物,且将其立即性迅速加入。使反应体系缓慢温热至室温,搅拌1小时。将该反应混合物过滤,在40℃下真空浓缩。通过使用0-60%乙酸乙酯的己烷梯度溶液的硅胶柱色谱法纯化,得到所期望的化合物70 (4.2g,43.7%收率),为澄清油状物。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 8.72 (s, 1H) , 8.31 (s, 1H) , 7.94 (m, 2H) , 7.52 (m, 1H) , 7.44 (m, 2H) , 6.41 (m, 1H) , 6.03 (s, 2H) , 4.67 (s, 2H) , 4.50 (m, 1H) , 4.10

(m, 1H), 3.73 (m, 13H), 2.52 (m, 2H), 0.81 (s, 9H) 和 0.002 (d, 6H) ppm。合成示例在图54中。

[0423] 实施例46

[0424] 化合物71的合成:

[0425] 在 N_2 气氛中在配备了磁力搅棒的200毫升圆底烧瓶中加入化合物 117 (2.0g, 2.87mmol) 和二氯甲烷 (38mL), 用冰水浴中冷却。向该混合物中加入二甲基二硫化物 (1.3mL, 14.36mmol, 5当量), 然后加入作为在二氯甲烷 (20mL) 中的溶液的DMTSF (620mg, 3.15mmol, 1.1 当量)。使得到的混合物缓慢温热至室温, 再搅拌4小时。然后通过加入饱和 $NaHCO_3$ 水溶液 (100mL) 使反应停止, 用二氯甲烷 (150mL x 2) 和乙酸乙酯 (200mL) 萃取, 用 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化 (用0-60% 乙酸乙酯的己烷溶液梯度洗脱), 得到所期望的化合物71 (1.0g, 62%), 为白色粉末。 1H NMR ($CDCl_3$) : δ_H 8.69 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.94 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.42 (m, 2H), 6.41 (m, 1H), 4.82 (m, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 2.61 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 0.81 (s, 9H) 和 0.00 (d, 6H) ppm。合成示例在图54中。

[0426] 实施例46

[0427] 化合物119的合成:

[0428] 在配备了搅棒和橡胶塞的圆底烧瓶中, 在 N_2 气氛中将化合物 71 (562mg, 1.25mmol) 溶于无水THF (30mL) 中, 用冰-水浴中冷却。然后滴加TBAF (1.5mL的1M THF溶液, 1.5当量), 在0°C下搅拌2 小时。通过TLC (100% 乙酸乙酯, 化合物119的 R_f = 0.2, 化合物71的 R_f = 0.6) 监测反应进程。在反应完成时, 加入甲醇 (5mL), 将该反应体系用旋转器浓缩, 将残余物通过硅胶柱色谱法纯化 (用0-60% 乙酸乙酯:己烷梯度洗脱, 15分钟, 然后60% 乙酸乙酯的己烷溶液, 45分钟), 得到所期望的化合物119 (280mg, 62% 收率), 为白色粉末。 1H NMR ($CDCl_3$) : δ_H 8.69 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.25 (m, 1H), 4.83 (m, 2H), 4.70 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 2.99 (m, 1H), 2.43 (s, 3H) 和 2.41 (m, 1H) ppm。

[0429] 然后使用如下所示的标准三磷酸酯合成方法将化合物119转化为三磷酸酯120, 但是在室温下用10% NH_4OH 处理5小时以进行脱保护, 以使-SSMe裂解减少到最低限度。收率 25%; HRMS-ES⁺: 计算值 $C_{12}H_{20}N_5O_{12}P_3S_2$, 582.976, 测定值 m/z 582.975。合成示例在图54中。

[0430] 实施例47

[0431] 化合物123的合成:

[0432] 将化合物121 (2.5g, 4.94mmol) 在干燥器中干燥过夜, 在 N_2 气氛中在干燥的具有搅棒和橡塞的圆底烧瓶中溶于无水无水二氯甲烷 (25mL) 中。将环己烯 (0.55mL, 1.1当量) 和干 3- \AA 分子筛 (6.0g) 加到反应混合物中, 将所得悬浮液在室温下搅拌20分钟。然后将反应烧瓶置于冰-盐-水浴中, 使温度降至零度以下, 用注射器缓慢加入 SO_2Cl_2 (7.4mL, 1M 二氯甲烷溶液)。将所得到的混合物在0°C搅拌1小时, 接着加入0.5当量的 SO_2Cl_2 以使反应完成。通过 TLC, 根据原料消失监测反应进程。接下来, 在单独的烧瓶中制备 (MeO)₃BnSH (2.65g, 12.35 mmol, 2.5equiv) 和 NaH (0.472g, 11.85mmol, 60% 的矿物油) 在DMF (40mL) 中的悬浮液。将反应混合物合并, 缓慢温热至室温, 搅拌1小时。然后将该反应混合物通过玻璃烧结漏斗过滤以除去MS, 通过加入 50mM NaH_2PO_4 水溶液 (50mL) 猥灭滤液, 用二氯甲烷萃取。将合并的有机层用 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩。使用己烷:乙酸乙酯梯度的硅胶柱色谱法纯化, 得到所期望的

化合物123 (1.4g, 42.2% 收率)。 ^1H NMR (CDCl_3) : δ_{H} 8.29 (m, 1H), 7.77 (m, 2H), 7.48 (m, 1H), 7.38 (m, 2H), 6.15 (m, 1H), 5.99 (m, 2H), 4.55 (m, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.69 (m, 9H), 2.52 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 0.80 (m, 9H) 和 0.01 (m, 6H) ppm。合成示例在图55中。

[0433] 实施例48

[0434] 化合物124的合成:

[0435] 在 N_2 气氛中在配备了搅棒和橡胶塞的 200mL 圆底烧瓶中将化合物123 (1.4g, 2.08mmol) 溶于无水二氯甲烷 (42mL), 冷却至 0°C。向该混合物中加入二甲基二硫化物 (0.93mL, 10.4mmol, 5当量), 然后加入 DMTSF (450mg, 2.28mmol, 1.1当量)。将所得到的混合物在 0°C 搅拌 2 小时。通过添加 50mM NaHCO_3 (100mL) 使反应停止, 用二氯甲烷 (100mL x 2) 萃取, 用 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩。通过硅胶柱色谱法纯化产物 (0-30% 乙酸乙酯的二氯甲烷溶液梯度洗脱, 得到所期望的化合物124 (0.93g, 83.1%) , 为白色粉末。 ^1H NMR (CDCl_3) : δ_{H} 8.48 (m, 1H), 7.93 (m, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.37 (m, 2H), 6.00 (m, 1H), 4.73 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 4.07 (m, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 2.44 (m, 1H), 2.33 (m, 3H), 2.25 (m, 1H), 0.76 (m, 9H) 和 0.01 (m, 6H) ppm。合成示例在图55中。

[0436] 实施例49

[0437] 化合物125的合成:

[0438] 在 N_2 气氛中在配备了搅棒和橡胶塞的 100mL 圆底烧瓶中将化合物124 (930mg, 1.73mmol) 溶于无水 THF (52mL) 中, 用冰-水浴冷却至 0°C。然后滴加 TBAF (3.5mL 的 1M THF 溶液, 1.5当量), 在 0°C 下搅拌 4 小时。在反应完成时, 加入甲醇 (5mL) 以使反应停止, 减压除去挥发性物质, 将残余物通过硅胶柱色谱法 (0-75% 乙酸乙酯的己烷溶液梯度) 纯化, 得到所期望的化合物125 (425mg, 58% 收率), 为白色粉末。 ^1H -NMR (CDCl_3) : δ_{H} 8.24 (m, 1H), 7.81 (m, 1H), 7.51-7.42 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 6.09 (m, 1H), 4.80 (m, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.40 (m, 3H) 和 2.41 (m, 1H) ppm。合成示例在图55中。

[0439] 实施例50

[0440] 化合物126的合成:

[0441] 然后使用下文所示的标准三磷酸酯合成方法将化合物125转化成三磷酸酯126; 通过在室温用 10% NH_4OH 处理 2 小时进行最终的脱保护步骤以便将-SSMe 裂解减少到最低限度。30% 收率, HR MS-ES⁺: 计算值 $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}_2$, 558.965; 测定值 m/z 558.964。合成示例在图55 中。

[0442] 实施例51

[0443] 化合物130的合成:

[0444] 在配备了磁力搅棒的 100mL 圆底烧瓶中加入 127 (2.0g, 2.8 mmol), 在干燥器中用 P_2O_5 高真空下干燥 12 小时。在 N_2 气氛中加入二氯甲烷 (40mL), 将所得溶液在盐冰-浴上冷却 15 分钟。加入环己烯 (0.34mL, 3.4mmol), 然后滴加 SO_2Cl_2 (3.4mL, 1M 二氯甲烷溶液, 3.4mmol)。将所得混合物搅拌 30 分钟, 通过 TLC 监测反应进程 (对于 - CH_2Cl 分解产物, 乙酸乙酯:己烷/1:1, $127R_f = 0.5$, $128R_f = 0.15$)。再滴加 SO_2Cl_2 (3.1mL, 1M 二氯甲烷溶液, 3.1mmol), 将该反应混合物再搅拌 40 分钟以确保完全转化为化合物128。然后将该混合物在 0°C 高真空下浓缩。

[0445] 然后在N₂气氛中将无水二氯甲烷(40mL)加到残余物中,将该混合物在0℃下搅拌,直至所有固体溶解。缓慢加入对甲苯硫代磺酸钾(0.96g,425mmol)的DMF(8mL)溶液,将所得反应混合物在0℃下搅拌1小时。首先将该混合物在0℃下、然后在室温下减压浓缩。通过0-100%乙酸乙酯的己烷溶液梯度的硅胶柱急骤柱色谱法纯化残余物,得到化合物130,为乳膏状固体(1.1g,51%;TLC R_f:0.35,乙酸乙酯:己烷2:1)。MS (ES) m/z:733 [M+1⁺]。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : δ_H 8.02 (br. s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.88 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.45 (m, 4H), 7.38 (m, 6H), 7.27 (m, 2H), 6.01 (t, J=6.6Hz 1H), 5.46&5.38 (AB, J_{AB}=12.1Hz, 2H), 4.97 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.74 (dd, J=12.5, 2.8Hz, 1H), 3.55 (dd, J=12.5, 2.9Hz, 1H), 2.87 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.17 (m, 1H), 1.26 (d, J=6.8Hz, 3H), 1.25 (d, J=6.9Hz, 3H) ppm。合成示例在图56中。

[0446] 实施例52

[0447] 化合物131的合成:

[0448] 在N₂气氛中在冰-浴中冷却的130(1.1g 1.5mmol)在二氯甲烷(无水,40mL)中的溶液中加入二甲基二硫化物(0.66mL,7.5mmol)。将所得混合物搅拌15分钟,立即加入NaSMe(0.23g,3.3mmol)。将所得反应混合物在0℃下搅拌4小时(通过TLC监测反应进程(乙酸乙酯:己烷/2:1,130R_f=0.35,131R_f=0.45)。将该混合物通过硅藻土-S过滤,减压浓缩,用硅胶柱纯化残余物,用乙酸乙酯的己烷溶液(0-100%)洗脱,得到化合物131,为白色固体(0.68g,75%;TLC R_f:0.45,乙酸乙酯/己烷/2:1)。MS (ES) m/z:625 [M+1⁺]。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 8.02 (s, 1H), 8.00 (br. s, 1H), 7.45 (m, 4H), 7.39 (m, 4H), 7.28 (m, 2H), 6.24 (t, J=6.2Hz, 1H), 5.05 (m, 1H), 4.99&4.94 (AB, J_{AB}=11.4 Hz, 2H), 4.27 (m, 1H), 3.99 (dd, J=12.5, 2.3Hz, 1H), 3.86 (dd, J=12.5, 2.3Hz, 1H), 3.12 (m, 1H), 2.74 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.50 (m, 1H), 1.30 (d, J=6.6Hz, 3H) 和1.29 (m, 3H) ppm。合成示例在图 56中。

[0449] 实施例53

[0450] 化合物132的合成:

[0451] 然后通过标准方法部分中所述的标准三磷酸酯合成方法将化合物131转化成三磷酸酯132。25%收率;HRMS-ES⁺:计算值 C₁₂H₂₀N₅O₁₃P₃S₂, 598.971, 测定值m/z 598.970。合成示例在图56中。

[0452] 实施例54

[0453] 化合物134的合成:

[0454] 将化合物133(4.47g,10.7mmol)和(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(TMPM-SH)在高真空下干燥2小时,然后置于具有P₂O₅的干燥器中12 小时。将化合物133溶于无水CH₂Cl₂(50.0mL)中,加入环己烯(10mL, 96.6mmol)。在氮气气氛中,在-10℃将所得到的混合物搅拌15分钟。接着通过加液漏斗滴加新制备的1M SO₂Cl₂的CH₂Cl₂溶液(25mL, 26.75mmol),将所得混合物在-10℃下搅拌1小时。真空除去挥发性物质,同时将浴温保持在10℃。然后将残余物溶于无水DMF(52mL)中,保持在氮气气氛中。

[0455] 在单独的烧瓶中,将(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(4g,18.7mmol)溶于无水DMF(48mL),冷却至0℃。然后加入NaH(1.1g,26.8mmol, 60%的矿物油中),将所得灰色浆液在0℃下搅拌15分钟。将其一次性加到前一溶液中,将该反应体系在室温下搅拌1小时。然后将该反应混合物在分液漏斗中分配(150:300mL/盐水:乙酸乙酯)。然后用盐水(2×150mL)洗

涤有机层。将水层反萃取 (4×50mL乙酸乙酯)。用无水硫酸钠干燥合并的有机层。除去溶剂并通过硅胶柱急骤色谱法纯化产物 (柱:120g RediSepRfGold-ISCO, 梯度0-100%乙酸乙酯的己烷溶液)。得到目标化合物134, 为白色固体, 22%收率 (1.35g)。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 8.17 (s, 1H), 7.39 (d, 1H), 6.30 (m, 1H), 6.12 (s, 2H), 4.71 (dd, 2H), 4.43 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.83 (m, 9H), 3.74 (dd, 1H), 2.74 (ddd, 1H), 2.34 (ddd, 1H), 1.93 (m, 2H) 1.53 (s, 3H), 0.93 (m, 9H), 0.11 (m, 6H) ppm。LCMS (ESI) [M-H⁺] 测定值581, R_f=0.59 (4:6/己烷-乙酸乙酯)。并且还分离了化合物135, 为副产物, 22.5%收率 (1.13g)。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 8.55 (s, 1H), 7.41 (m, 1H), 6.12 (M, 3H), 4.76 (dd, 2H), 4.47 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.82 (m, 9H), 3.75 (m, 1H), 2.29 (m, 2H), 2.04 (s, 3H) 和1.91 (m, 2H) ppm。LCMS (ESI) [M-H⁺] 测定值467。合成示例在图57中。

[0456] 实施例55

[0457] 化合物136的合成:

[0458] 将化合物134 (3.6g, 6.2mmol) 在100mL圆底烧瓶中高真空干燥 2小时, 然后置于具有P₂O₅的真空干燥器中12小时。加入无水CH₂Cl₂ (96mL) 和二甲基二硫化物 (2.8mL, 30.9mmol), 将该反应体系冷却至 0℃。然后加入四氟硼酸二甲基(甲硫基)锍 (DMTSF, 1.34g, 6.82mmol), 将该反应体系在0℃下搅拌1小时。然后将该反应混合物转移至250 mL分液漏斗中, 用90mL 0.1M NaHCO₃水溶液中和, 用乙酸乙酯 (2×200mL) 萃取。用无水硫酸钠干燥合并的有机层, 旋转浓缩。通过使用30-50%乙酸乙酯的己烷溶液梯度的硅胶柱急骤色谱法纯化残余物, 使用己烷梯度为30-50%乙酸乙酯。得到目标化合物136, 为白色固体 (2.1g, 收率77%)。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.99 (s, 1H), 7.47 (d, 1H), 6.29 (dd, 1H), 4.87 (dd, 2H), 4.49 (m, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.5 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.45 (dd, 1H), 2.04 (dd, 1H) 和1.54 (s, 2H), 0.93 (m, 9H) 和0.13 (m, 6H) ppm。LCMS (ESI) [M-H⁺] 测定值447.0。合成示例在图57中。

[0459] 实施例56

[0460] 化合物137的合成:

[0461] 将化合物136 (2.16g, 4.8mmol) 在100mL圆底烧瓶中在高真空下干燥2小时, 然后加入无水THF (40mL), 然后加入乙酸 (1.2mL) 和 TBAF的THF溶液 (6.7mL 1M溶液, 6.72mmol)。将反应混合物在0℃搅拌1小时, 然后在室温下再搅拌2小时。真空除去挥发性物质, 残余物经使用0-8%甲醇的二氯甲烷溶液梯度的40g RediSepRf金柱急骤色谱法纯化。得到目标化合物137, 为白色固体 (1.45g, 90%收率)。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 8.12 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 6.11 (t, 1H), 4.87 (dd, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.14 (q, 1H), 3.94 (dd, 1H), 3.83 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.4 (m, 2H), 1.93 (s, 3H) ppm; LCMS (ESI) [M-H⁺] 测定值 333。合成示例在图57中。

[0462] 实施例57

[0463] 化合物138的合成:

[0464] 使用下文所述的标准三磷酸酯合成方法在化合物137磷酸化后得到产物138。40%收率, HR LC-MS: 计算值C₁₂H₂₁N₂O₁₄P₃S₂, 573.965; 测定值m/z 573.964。合成示例在图57中。

[0465] 实施例58

[0466] 化合物141的合成:

[0467] 向配备了磁力搅棒的100mL圆底烧瓶中加入化合物139 (2.23g, 3.55mmol)、CH₂Cl₂

(20mL)、3- \AA 分子筛(3.5g)和环己烯(0.60mL)。在室温下,在氮气气氛中将所得到的混合物搅拌20分钟。将该反应体系冷却至0℃,通过注射器缓慢加入 SO_2Cl_2 (5.4mL,1M的 CH_2Cl_2 溶液,1.5当量)。将该反应体系在0℃下搅拌1.5小时,再加入1.8mL SO_2Cl_2 (1M二氯甲烷溶液),在0℃下继续搅拌40分钟以确保完全转化为化合物140。减压除去挥发性物质,同时保持浴温接近10℃。将所得固体重新悬浮于20mL无水DMF中,保持在氮气气氛中。

[0468] 在单独的烧瓶中,将(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(1.98g,9.25 mmol)溶于无水DMF(15mL)中,用NaH(247mg,60%的矿物油中,6.17mM)处理,产生深灰色浆液。接下来,一次性加入化合物140溶液,将该反应体系在室温下搅拌1小时。然后使该反应混合物分配在蒸馏水(150mL)和乙酸乙酯(150mL)之间。用蒸馏水(2×150mL)进一步洗涤有机层,用 Na_2SO_4 干燥。减压除去挥发性物质,通过使用80-100%乙酸乙酯的己烷溶液梯度的硅胶柱快速柱色谱法纯化残余物。得到目标化合物141,为白色固体(798mg,28%)。 ^1H NMR(CDCl_3) : δ_{H} 8.33 (s, 1H), 7.57 (m, 1H), 6.53 (m, 2H), 6.00 (s, 2H), 4.62 (m, 2H), 4.44 (m, 1H), 4.32 (m, 2H), 3.97 (m, 1H), 3.80-3.60 (m, 11H), 3.10 (m, 6H), 2.36 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 0.80 (m, 9H) 和 0.01 (m, 6H) ppm。通过LC-MS进一步证实:测定值m/z 795.25 (M-H)。合成示例在图58中。

[0469] 实施例59

[0470] 化合物142的合成:

[0471] 向配备有磁力搅棒的100mL圆底烧瓶中加入化合物141(0.779 gm,0.98mmol,用 P_2O_5 真空干燥12h)和无水THF(20.0mL),在氮气气氛中冷却至0℃。通过注射器缓慢加入TBAF(1.17mL,在THF中的1M溶液,1.17mmol),将该反应混合物在0℃下搅拌1.5小时,接下来,再加入TBAF(1mL,1M的THF溶液,1mmol),在0℃下反应3小时。然后将该反应混合物转移至分液漏斗,通过加入甲醇(5mL)猝灭,加入蒸馏水(100mL),用乙酸乙酯(2×100mL)萃取该反应体系。用 Na_2SO_4 干燥有机层,真空浓缩。将残余物上使用80-100%乙酸乙酯的己烷溶液梯度的硅胶柱色谱法,得到化合物142,为白色粉末(525mg, 79%)。 ^1H NMR(甲醇-d4): δ_{H} 8.33 (s, 1H), 7.19 (m, 1H), 6.06 (m, 2H), 6.03 (m, 1H), 4.72 (m, 2H), 4.64 (m, 1H), 4.57 (m, 1H), 4.35 (m, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.75 (m, 9H), 3.16 (m, 6H), 2.80 (m, 1H) 和 2.28 (m, 1H) ppm; LC-MS: M-H测定值m/z 680.0。合成示例在图 58中。

[0472] 实施例60

[0473] 化合物143的合成:

[0474] 通过标准方法部分中所述的标准三磷酸酯合成方法由化合物142 合成化合物143。收率65%,LRMS-ES⁻:计算值 $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}^-$, 768.09;测定值m/z 768.54 (M-H)。合成示例在图58中。

[0475] 实施例61

[0476] 化合物144的合成:

[0477] 向50mL锥形管中加入化合物143(3.80mL的5.25mM在HPLC 级水中的溶液,20 μmol)和pH 4.65乙酸盐缓冲液(4.75mL),快速地与 9.0mL在pH 4.65乙酸盐缓冲液中新制备的DMTSF(80mM)的溶液合并。将所得混合物在室温下振摇2小时,通过加入饱和 NaHCO_3 水溶液(2mL)猝灭。立即在制备型HPLC(柱:30 \times 250 mM C_{18} Sunfire,方法:0至2.0分钟100%A,然后50%B,历时70分钟,流量:25毫升 / 分钟,A=50mM TEAB,B=乙腈)上纯化产物。将适合的级分冻干,在溶于HPLC级水中后合并,得到23.4 μmol 的化合物144(73%收率)。LRMS-ES⁻:计

算值 $C_{16}H_{23}N_5O_{12}P_3S_2^-$, 634.00, m/z 测定值 634.42 ($M^- H$)。合成示例在图58中。

[0478] 根据标准方法部分中所述的方法将化合物144转化成染料标记的产物 (76) (图 59)。得到化合物146, 75% 收率, 2步, LRMS-ES⁺: 计算值 $C_{34}H_{59}N_7O_{19}P_3S_4$, 1090.20, m/z 测定值 1090.24 ($M+H$)。由146得到化合物76, 50-70% 收率, HRMS-ES⁻: 计算值 $C_{67}H_{86}N_9O_{23}P_3S_4$, 1605.393; 测定值 m/z 1605.380 ($M-H$)。

[0479] 实施例62

[0480] 化合物150的合成:

[0481] 在250mL圆底烧瓶中加入化合物148 (3.0g, 4.58mmol)、25mL 无水 CH_2Cl_2 、3- \AA 分子筛 (5.0g) 和环己烯 (0.55mL, 5.4mmol)。在室温和氮气气氛中将所得混合物搅拌10分钟。然后将反应烧瓶置于冰浴上, 通过注射器缓慢加入 SO_2Cl_2 (6.8mL, 1M的 CH_2Cl_2 溶液, 1.5当量), 将该反应体系在0°C下搅拌1小时。接下来, 再加入0.5当量 SO_2Cl_2 以确保完全转化为化合物149。在真空下除去挥发性物质, 同时保持温度接近10°C。将所得固体重新悬浮于20mL 无水DMF中, 保持在氮气气氛中。

[0482] 在单独的烧瓶中, 将 (2,4,6-三甲氧基苯基) 甲硫醇 (2.45g, 11.44 mmol) 溶于DMF (30mL) 中, 用NaH (274.5mg, 60% 的硅油中) 处理, 产生灰色浆液。向其中立即加入化合物149, 将该反应体系在室温下在氮气气氛中搅拌3小时。然后将该反应混合物通过 celite®-S 过滤, 用乙酸乙酯 (100mL) 洗涤。用蒸馏水 (2×100mL) 洗涤乙酸乙酯溶液, 用 Na_2SO_4 干燥有机萃取物, 真空浓缩, 通过使用20-50% 乙酸乙酯的己烷溶液梯度的硅胶柱急骤柱色谱法纯化。得到目标化合物150, 为白色固体 (1.2g, 32% 收率, R_f : 0.4, 己烷:乙酸乙酯/3:2)。¹H NMR ($CDCl_3$) : δ_H 8.13 (m, 3H), 7.43 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 6.12 (m, 1H), 6.00 (s, 2H), 4.62 (m, 2H), 4.31 (m, 3H), 4.00 (m, 1H), 3.82-3.60 (m, 13H), 2.39 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 0.78 (m, 9H) 和 0.01 (m, 6H) ppm。合成示例在图60中。

[0483] 实施例63

[0484] 化合物151的合成:

[0485] 将化合物150 (1.2g 1.46mmol) 在高真空下用 P_2O_5 在干燥器中干燥过夜, 在配备了磁力搅棒的100mL烧瓶中溶于30mL无水 CH_2Cl_2 。向其中加入二甲基二硫化物 (0.657mL, 7.3mmol), 将反应烧瓶置于冰浴上。加入四氟硼酸二甲基(甲硫基)锍 (DMTSF, 316mg, 1.1当量), 在0°C下搅拌1.5小时。将该反应混合物转移至250mL分液漏斗, 用 50mL 0.1M $NaHCO_3$ 水溶液中和, 用 CH_2Cl_2 (2x 50mL) 萃取。用 Na_2SO_4 干燥有机层, 通过旋转蒸发浓缩。粗制产物在硅胶柱上用梯度为80- 50% 乙酸乙酯的己烷溶液梯度纯化, 得到0.82g化合物151 (82% 收率, R_f =0.5, 己烷:乙酸乙酯/3:2)。¹H NMR ($CDCl_3$) : δ_H 8.15 (m, 3H), 7.42 (m, 1H), 7.35 (m, 2H), 6.11 (m, 1H), 4.80-4.65 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 4.28 (m, 2H), 4.10 (m, 1H), 3.83-3.67 (m, 2H), 2.49 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.90 (m, 1H), 0.78 (m, 9H) 和 0.10 (m, 6H) ppm。合成示例在图60中。

[0486] 实施例64

[0487] 化合物152的合成:

[0488] 向配备了磁力搅棒的100mL圆底烧瓶中加入化合物151 (0.309 g, 0.45mmol) 和 10.0mL无水THF (10.0mL), 置于氮气气氛中的冰- 溶上。通过注射器缓慢加入TBAF (0.72mL, 1M的THF溶液, 0.72 mmol)。将该反应混合物在0°C下搅拌3小时。然后将该反应混合物转移

至分液漏斗,用0.5M NaHCO₃水溶液(50mL)猝灭。然后用乙酸乙酯(2×100mL)萃取所得混合物,用Na₂SO₄干燥。使用梯度7:3至2:3 己烷:乙酸乙酯的硅胶柱色谱后,得到产物152,为白色粉末,76%收率(196mg, R_f=0.3,己烷:乙酸乙酯/1:1)。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 8.40 (s, 1H), 8.25 (m, 2H), 7.60 (m, 1H), 7.52 (m, 2H), 6.21 (m, 1H), 4.90-80 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.25 (m, 1H), 4.05-3.85 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.50 (s, 3H) 和2.31 (m, 1H) ppm。合成示例在图60中。

[0489] 实施例65

[0490] 化合物153的合成:

[0491] 使用如下所示的标准三磷酸酯合成方法,在化合物152磷酸化后得到化合物153,30%收率(LC-MS:计算值C₁₄H₂₃N₄O₁₃P₃S₂,610.98;测定值m/z 611.11 (M-H)。根据标准方法部分中所述的方法将其进一步转化成染料标记的产物(72)(图61)。得到化合物155,49%收率,2步,和化合物72,60-85%收率,HRMS-ES⁻:计算值C₅₃H₆₈N₈O₃₀P₃S₆⁻, 1581.156 (M-H);测定值m/z 1582.160。

[0492] 实施例66

[0493] 化合物159&160的合成:

[0494] 在配备了磁力搅棒的100mL圆底烧瓶中加入化合物157(2.04g, 2.39mmol),在高真空下干燥12小时。用氩气吹扫反应容器后,依次加入13mL无水CH₂Cl₂和环己烯(0.30mL, 2.86mmol)。然后将反应烧瓶置于冰-水-盐浴中,搅拌10分钟以使混合物低于0℃。通过注射器滴加SO₂Cl₂(4.0mL,1M的CH₂Cl₂溶液,4.0mmol),历时2分钟,将该反应混合物在0℃下搅拌1小时。再滴加0.8当量的SO₂Cl₂(2.0 mL,2.0mmol),历时1分钟,在0℃再搅拌该反应体系1/2小时。接下来,真空除去挥发性物质,同时将浴温保持在-10℃。将所得固体重新悬浮于15mL无水DMF中,保持在氩气气氛中。

[0495] 在单独的100mL烧瓶中,在氩气气氛中将(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(TMPM-SH, 1.27g, 6.0mmol, 真空干燥过夜)溶于无水DMF(16 mL),用NaH(195mg, 60%在油中, 4.88mmol)处理,产生灰色浆液 TMPMT-SNa盐。搅拌混合物直至气体形成消退(大约10分钟)。向该混合物中立即加入TMPMT-SNa盐,在室温和氩气气氛中搅拌该混合物直至TLC(微量后处理:二氯甲烷/水;溶剂:己烷:乙酸乙酯/1:1)证实完全转化(1小时)。然后将反应混合物通过celite®-S(10g)过滤,用二氯甲烷(100mL)洗脱产物。然后用水(3×100mL)洗涤二氯甲烷溶液。用3×100mL二氯甲烷萃取水层。用Na₂SO₄干燥合并的二氯甲烷提取物,通过旋转蒸发浓缩。然后通过急骤色谱法(柱:100g,梯度:25% -50%己烷:乙酸乙酯5CV,然后50%EE 10CV)纯化。

[0496] 得到目标化合物160,为白色泡沫体(1.22g,51%收率)。¹H NMR (DMSO-d₆) : δ_H 10.63 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.3-7.5 (m, 8H), 7.20-7.3 (m, 2H), 6.40 (m, 1H), 6.15 (m, 1H), 4.69 (m, 2H), 4.50 (dd, 1H), 4.30 (m, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.81 (m, 11H), 3.3 (m, 4H), 2.7 (m, 1H), 1.05 (m, 8H), 0.8 (m, 9H) 和0.11 (m, 6H) ppm。LCMS:1019.371Da。合成示例在图62中。

[0497] 另外,得到TBDMS-脱保护的产物159,为副产物,25%收率(0.48 g)。R_f=0.2/己烷:乙酸乙酯/1:1。¹H NMR (DMSO-d₆) : δ_H 10.63 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.3-7.5 (m, 8H), 7.20-7.3 (m, 2H), 6.40 (m, 1H), 6.15 (m, 1H), 4.69 (m, 2H), 4.50 (dd, 1H), 4.30 (m,

2H), 3.95 (m, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.5 (m, 1H), 3.3 (m, 4H), 2.7 (m, 1H) 和 1.04 (m, 8H) ppm。LCMS: 905.286Da。

[0498] 实施例67

[0499] 化合物161的合成:

[0500] 在配备了磁力搅棒和橡胶塞的100mL圆底烧瓶中加入化合物160 (0.36g, 0.35mmol), 在高真空下干燥12小时。用氩气吹扫后, 加入7 mL无水二氯甲烷和二甲基二硫化物 (0.16mL, 1.76mmol)。将反应烧瓶置于冰-浴中, 搅拌10分钟以使混合物达到0°C。然后加入四氟硼酸二甲基(甲硫基)锍 (DMTSF, 80mg, 0.4mmol), 将反应混合物在0°C下搅拌直至TLC (微量后处理: 二氯甲烷/水; 溶剂: 己烷: 乙酸乙酯/1: 1)。将该反应混合物转移至250mL分液漏斗中, 用50mL 0.1M的NaHCO₃水溶液中和, 用CH₂Cl₂ (3x 50mL) 萃取。用Na₂SO₄干燥有机层, 通过旋转蒸发浓缩。将粗制产物用硅胶柱(柱: 25g, 梯度: 10% - 50% 己烷: 乙酸乙酯 3CV, 然后 50% 乙酸乙酯 5CV) 纯化。得到目标化合物161, 为黄色泡沫体 (0.23g, 收率 74%)。合成示例在图62中。

[0501] 实施例68

[0502] 化合物162的合成:

[0503] 向配备有磁力搅棒的100mL圆底烧瓶中加入溶于7.0mL无水THF中的化合物161 (0.18g, 0.20mmol), 置于氩气气氛中的冰浴中。将该混合物搅拌10分钟以使其达到0°C, 加入0.28mL乙酸。通过注射器滴加TBAF (1M在THF中的溶液, 0.47mL, 0.47mmol), 历时1分钟。将反应混合物在0°C下搅拌0.5小时, 然后在室温下1小时。TLC (己烷: 乙基乙酸酯/1:1) 仍显示原料。通过注射器经1分钟再滴加TBAF (1M THF溶液, 0.47mL, 0.47mmol), 在室温下将该反应混合物搅拌1小时。接下来, 用2mL甲醇使该混合物猝灭, 在室温下搅拌10分钟。通过旋转蒸发除去溶剂, 通过硅胶柱色谱法纯化粗制产物 (柱: 10g, 己烷: 乙酸乙酯/1:1至100%, 用2CV, 然后 100% 乙酸乙酯, 用20CV) 至得到化合物162, 为白色泡沫体 (96mg, 62%)。合成示例在图62中。

[0504] 实施例69

[0505] 化合物163的合成:

[0506] 使用在下文中所示的标准三磷酸酯合成方法使化合物162磷酸化后获得化合物163, 但是在脱保护步骤中使用AMA或甲醇氨代替氢氧化铵。根据下面的标准方法将其进一步转化为染料标记的产物78。化合物78得自化合物165, 97% 收率。HRMS-ES⁻计算值 C₆₇H₉₆N₉O₂₇P₃S₆, (M-H) 1743.395, 测定值 1743.390。合成示例在图62中。

[0507] 实施例70

[0508] 化合物169的合成:

[0509] 在100mL圆底烧瓶中加入化合物167 (3.120g, 5.66mmol)、30.0 mL无水CH₂Cl₂、3-Å分子筛 (5.0g) 和环己烯 (0.70mL, 6.9mmol)。在室温和氮气气氛中将所得混合物搅拌10分钟。然后将反应烧瓶置于冰浴上。向其中通过注射器缓慢加入SO₂Cl₂ (8.5mL, 在CH₂Cl₂中的1 M, 1.5当量) 并, 在0°C搅拌1小时。接下来, 再加入4.0mL 1M SO₂Cl₂, 搅拌40分钟以确保完全转化为化合物168。在真空下除去挥发性物质, 同时保持温度接近10°C。将所得固体重新悬浮于20mL无水DMF中并保持在氮气气氛下。

[0510] 在单独的烧瓶中, 在氮气气氛中将 (2,4,6-三甲氧基苯基) 甲硫醇 (3.028g,

14.15mmol) 溶于无水DMF (40mL), 用NaH (566mg, 60% 在油中, 14.15mM) 处理, 产生灰色浆液。向其中立即加入化合物168 溶液, 在室温下在氮气气氛中搅拌2.5小时。然后将该反应混合物通过celite®-S (20g) 过滤用乙酸乙酯 (200mL)。然后用蒸馏水 (3×200mL) 洗涤乙酸乙酯溶液, 用Na₂SO₄ 干燥, 通过旋转蒸发浓缩, 通过120g RediSepRf金急骤色谱法纯化, 梯度: 己烷: 乙酸乙酯 (7:3至3:7)。得到目标化合物 (169)。为白色固体 (1.43g, 35.5% 收率, R_f: 0.5, 己烷: 乙酸乙酯/1:1)。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.98 (m, 1H), 6.09 (m, 1H), 6.00 (m, 2H), 4.67-4.51 (m, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.22 (m, 2H), 4.00 (m, 1H), 3.80-3-60 (m, 11H), 2.31 (m, 1H), 1.83 (m, 1H), 0.80 (m, 9H) 和 0.01 (m, 6H) ppm。合成示例在图64中。

[0511] 实施例71

[0512] 化合物170的合成:

[0513] 用P₂O₅将化合物169 (1.43g, 1.99mmol) 在高真空下干燥12小时, 并在配备了磁力搅拌棒和氮气源的烧瓶中溶于无水CH₂Cl₂ (25mL)。向其中加入二甲基二硫化物 (0.89mL, 9.88mmol), 将反应烧瓶在冰浴上搅拌。然后加入四氟硼酸二甲基 (甲硫基) 铌 (DMTSF, 430mg, 2.19 mmol), 在0°C下搅拌1.0小时。将该反应混合物转移至500mL分液漏斗中, 用100mL 50mM的NaHCO₃水溶液猝灭, 用CH₂Cl₂ (2X 150 mL) 萃取。用Na₂SO₄干燥有机部分, 通过旋转蒸发浓缩。使用己烷-乙酸乙酯 (8:2至3:7) 梯度的硅胶柱 (80g RediSepRf金) 纯化将粗制产物, 得到0.622g化合物170 (54% 收率, R_F=0.6, 己烷: 乙酸乙酯/1:1)。¹H NMR (CDCl₃) : δ_H 7.99 (brs, 1H, NH), 7.98 (s, 1H), 6.12 (m, 1H), 4.69 (m, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.19 (m, 2H), 4.06 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.60 (m, 2H), 2.40 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.88 (m, 1H), 0.78 (m, 9H) 和 0.10 (m, 6H) ppm。合成示例在图64中。

[0514] 实施例72

[0515] 化合物171的合成:

[0516] 向配备了磁力搅拌棒的100mL圆底烧瓶中加入化合物170 (0.623 g, 1.06mmol, 用P₂O₅ 真空干燥12h) 和无水THF (20.0mL), 置于冰浴上和氮气气氛中。通过注射器缓慢加入TBAF (1.27mL, 1M的THF 溶液, 1.27mmol)。将该反应混合物在0°C搅拌1.5小时, 再加入0.9 mL在THF中的1M TBAF溶液, 并在0°C下总计搅拌4小时。然后将该反应混合物转移至分液漏斗并用0.5M NaHCO₃ (50mL) 猥灭。用乙酸乙酯 (2×100mL) 萃取所得混合物, 用Na₂SO₄ 干燥, 在80g RediSepRf柱, 应用梯度7:3-3:7乙酸乙酯的己烷溶液的硅胶柱色谱后获得产物171, 为白色粉末, 63% 收率 (311mg)。¹H NMR (甲醇-d₄) : δ_H 8.16 (s, 1H), 6.06 (m, 1H), 4.79 (m, 2H), 4.69 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.99 (m, 1H), 3.63 (m, 2H), 2.36 (m, 3H), 2.32 (m, 1H) 和 2.08 (m, 1H) ppm, LRMS-ES- : M-H 测定值m/z 468.0Da。合成示例在图64中。

[0517] 实施例73

[0518] 化合物172的合成:

[0519] 通过标准的三磷酸酯合成方法, 在化合物171磷酸化后以58% 收率获得产物172。LRMS计算值C₁₄H₂₁N₃O₁₄P₃S₂⁻ (M-H), 611.97, 测定值612.15。根据下文所示标准方法部分中所示的标准方法将化合物171 进一步阐明为染料标记的产物 (74) (图65)。得到化合物174, 2步74% 收率 (HRMS-ES⁻计算值C₃₂H₅₅N₅O₂₁P₃S₄⁻ (M-H) 1066.15, 测定值1066.42。得到化合物74, 62% 收率 (HRMS-ES⁻计算值C₅₉H₈₀N₇O₂₅P₃S₄⁻ (M-H), 1507.330, 测定值1507.325。

[0520] 实施例74

[0521] 用于三磷酸酯合成的标准方法:

[0522] 将在高真空下用P₂O₅预干燥的核昔(160μmol)和质子海绵(1.5当量)在N₂气氛中在25mL梨形瓶中溶解于三甲基磷酸酯(0.8mL)中,搅拌20分钟,直到所有固体完全溶解。然后将烧瓶置于冰-水浴上以使反应达到(-5至0℃)。然后,通过注射器一次性加入POCl₃(1.5eq.),并将该反应体系搅拌1小时。

[0523] 在15mL锥形管中制备焦磷酸正丁基铵(0.36g)、n-Bu₃N(0.36mL)和无水DMF(1.3mL)的混合物,产生浓稠浆液。一旦完全溶解,则立即将其迅速加入剧烈搅拌的混合物中,在室温下搅拌15分钟。

[0524] 然后将反应混合物倾入250mL圆底烧瓶中的100mL 0.1M TEAB 缓冲液中并在室温下搅拌3小时。然后真空浓缩至25mL,在室温下用25mL氢氧化铵(28-30% NH₃含量)处理8小时。在减压除去大部分挥发性物质后,将反应粗制产物重新悬浮于0.1M TEAB缓冲液(30mL)中,通过C18制备型HPLC(30×250 mM, C18 Sunfire柱,方法:0至2分钟100%A,然后50%B,历时70分钟,流速25毫升/分钟;A=50mM TEAB, B=ACN)纯化。将目标级分冻干并在溶于HPLC级水(20mL)中后合并。该半纯产物通过PL-SAX Prep柱上的离子交换HPLC 进一步纯化(方法:0-5分钟100%A,然后线性梯度高达70%B,历时70分钟,其中A=15%乙腈水溶液,B=在15%乙腈中的0.85M TEAB 缓冲液)。如上所述通过C18制备型HPLC进行最终纯化。在冷冻干燥后以20-65%的收率获得三磷酸核昔。

[0525] 实施例75

[0526] 使用DMTSF将3'-OCH₂S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP 转化成3'-(OCH₂SSMe)-dNTP的标准方法:

[0527] 向50mL锥形管中加入3'-OCH₂S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP(3.80mL 5.25毫摩尔浓度溶液,在HPLC级水中,20μmol)和 pH=4.65乙酸盐缓冲液(5.20mL)并快速与9.0mL的DMTSF(在pH=4.65乙酸盐缓冲液中的80mmol溶液)合并。将所得混合物在室温下摇动2小时,通过2.0mL饱和NaHCO₃溶液使反应停止,立即通过30×250mM C18 Sunfire柱上的制备型HPLC纯化,方法:0至2.0分钟, 100%A,然后线性梯度至50%B,历时70分钟,流速:25毫升/分钟, A=50mM TEAB, B=乙腈。将目标级分冻干并在溶于HPLC级水中后合并,根据核昔酸的不同产生50-75%收率的3'-(OCH₂SSMe)-dNTP。3'-OCH₂S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP的结构实例如图66中所示。

[0528] 实施例76

[0529] 用于NHS活化连接体的缀合的标准方法:

[0530] 用新制备的0.5M Na₂HPO₄水溶液(1mL)稀释溶于HPLC级水(2 mL)中的MeSSdNTP-PA(10ummol)。在锥形管中,将NHS-活化的连接体(NHS-A-Fmoc, 114,35mg, 2.5eq.)溶于无水DMF(2.0mL)中。然后立即将其加到MeSSdNTP-PA/Na₂HPO₄溶液中,在室温下搅拌8 小时。

[0531] 然后用0.1M TEAB缓冲液(2.0mL)稀释反应,用哌啶(0.6mL)处理。将该混合物在室温下搅拌1小时,用0.1M TEAB(10mL)进一步稀释,通过制备型HPLC在30×250 mM C18 Sunfire柱上快速纯化,方法:0至2.0分钟100%A,然后线性梯度至多50%B,历时70分钟,流速:25毫升/分钟,A=50mM TEAB, B=乙腈。将目标级分冻干并在溶于HPLC级水中后合并,得到45%-75%收率的MeSSdNTP-A-NH₂。

[0532] 实施例77

[0533] 用NHS染料标记的标准方法:

[0534] 在15mL锥形管中将在2.0mL HPLC级水中的MeSSdNTP-A- NH₂ (4.55μmol) 用Na₂HP0₄ (0.8mL 0.5摩尔水溶液) 稀释,与1.4mL无水DMF中的NHS-活化染料(2.5eq.) 合并。将反应混合物在室温下搅拌 8小时,用0.1M TEAB缓冲液(40mL) 稀释,通过制备型HPLC在 30X250 mM C18 Sunfire柱上纯化,方法:0至5分钟100% A,然后线性梯度至50% B,历时70分钟,流速25毫升/分钟)。将目标级分冻干并在溶于HPLC级水中后合并,得到标记产物的50-80% 收率。

[0535] 实施例78

[0536] 可裂解连接体和标记物与核碱基的连接

[0537] 用于连接可裂解连接体的优选部分之一是基于炔丙基或烯丙基的部分。另外包括连接可裂解连接体和染料的其它方式。具体地,特别优选裂解之后导致几乎没有或没有残留连接体的与碱基部分的连接。还优选裂解后产生的残余连接体不携带电荷的与碱基的连接。这些特征对于确保在标记/染料裂解之后核苷酸以有效方式被酶参入生长的核酸链中是重要的。本发明考虑到一个具体实施方案包含使用羟基甲基修饰的碱基部分连接可裂解染料。这类化合物的实例如图71所示。图72显示染料和3'-0保护基裂解后羟基甲基衍生物的结构。

[0538] 实施例79

[0539] 可裂解连接体和3'-0保护基的裂解

[0540] 多种裂解剂可用于裂解本发明的连接体和保护基。例如,可以使用多种携带硫氢基的化合物,如(“Thiol-Disulfide Interchange”, Singh, R. 和 Whitesides, G. M., Sulfur-Containing Functional Groups; Supplement S, Patai, S., Eds., J. Wiley and Sons, Ltd., 1993. p633-658,) [15] 所述。特别是具有降低的巯基pKa的化合物可以用于实现例如二硫丁胺、DTBA的大量和有效的裂解收率 (Lukesh等人, J. Am. Chem. Soc., 2012, 134 (9), pp 4057-4059[16])。图73显示了可用于进行本发明裂解的含硫氢基化合物的实例。

[0541] 适合于裂解本发明的二硫终止基团和连接体的另一类化合物是膦 (Harpp等人, J. Am. Chem. Soc. 1968 90 (15) 4181-4182[12], Burns 等人, J. Org. Chem. 1991, 56, 2648-2650[13], Getz等人, Analytical Biochemistry 273, 73-80 (1999) [14])。用于裂解本发明的基于二硫基的保护基和连接体的膦的实例包括:三苯膦,三丁膦,三羟基甲基膦 (THMP), 三羟基丙基膦 (THPP), 三-乙酯基-膦 (TCEP)。在某些情况下,可能期望能够选择性裂解连接体或3'-保护基。这可以通过设计保护基团和连接体以及选择裂解试剂来实现。例如,为此目的可以使用3'-叠氮基甲基醚保护基和具有二硫连接体的核苷酸的组合。在这种情况下,二硫桥的选择性裂解可以通过使用基于硫醇的裂解剂来实现,并且通过使用膦例如TCEP可以实现3'-叠氮基甲基醚保护基的去除。图74、图75和图76中示例了这类方法的实施例。图74显示发生化学反应的方案和形成的化合物的结构;图75显示在每个阶段收集的HPLC色谱图且图76从每个峰提取的吸收光谱。步骤A) 标记的3'-0-保护的核苷酸在两个核苷酸(280nm; 注意炔丙基化合物的最大值向280-290nm移动) 和染料(575nm) 处显示一个峰(1) 和吸收。步骤B) 用DTT处理产生具有染料吸收峰(575nm) 的峰2并且更慢迁移(更疏水), 以及峰3(278 nm) 吸收并且由于更亲水的特性而更快迁移。步骤C) 用TCEP进行另外的处理产生峰4, 其吸收最大值在278, 并且没有染料在甚至更低的保留时间, 与3'-OH保护基的丧失一致。裂解的染料分裂成另外的峰 (5,6), 但是两个峰具有相同的吸收。

[0542] 图77和图78显示裂解的另一个实施例。图77显示使用在3'末端上携带基于二硫基的保护基和基于二硫基的连接体的核苷酸的裂解反应的示意图。正如该图显示的，裂解反应可以作为一步或两步过程进行。图78显示使用多种裂解剂进行的裂解实验的结果：二硫琥珀酸，L-半胱氨酸，DTT和半胱胺。图78A 显示与裂解剂二硫琥珀酸、L-半胱氨酸、DTT和半胱胺温育后，原料和反应混合物产生的RP-HPLC色谱图。图78B 显示鉴定的反应混合物的组合物，表明在L-半胱氨酸、DTT和半胱胺的情况下连接体和3'-保护基都完全裂解，并且在二硫琥珀酸的情况下选择性裂解3'-O-保护基。这表明选择性可以通过选择连接体、保护基的结构和裂解剂的性质(即，改变SH基团的pKa和空间位阻程度)来实现。除此之外，还可以使用各种适合的裂解剂，例如双(2-巯基乙基)砜(BMS)和N,N'-二甲基-N,N'-双(巯基乙酰基)肼(DMH) (Singh等人, Bioorg. Chem., 22, 109-115 (1994) [17]。通过包含硒醇可进一步催化反应(Singh等人, Anal. Biochem. 1995 Nov 20; 232 (1): 86-91 [18])。硼氢化物，如硼氢化钠以及抗坏血酸(Nardai等人, J. Biol. Chem. 276, 8825-8828 (2001) [20])也可用于此目的(Stahl等人, Anal. Chem., 1957, 29 (1), pp 154-155 [19])。另外，用于裂解二硫键的酶促方法也是众所周知的，例如二硫化物和硫还原酶，并且可以与本发明的化合物一起使用(Holmgren等人, Methods in Enzymology, 第252卷, 1995, 第199-208页[21])。

[0543] 实施例80

[0544] 清除剂

[0545] 根据所使用的裂解剂，本领域技术人员需要选择在裂解反应完成后将去除过量的裂解剂的清除剂。例如，对于含巯基的裂解剂，可以使用能够与游离SH基团反应的清除剂。例如，可以使用烷基化剂如碘乙酰胺或马来酰亚胺衍生物(美国专利号8,623,598[47]，在此引入作为参考)。对于硼氢化物，本领域技术人员可以使用含酮化合物例如乙酰丙酸或类似化合物。最终，还可以使用氧化剂，例如高碘酸盐，将过量的裂解剂氧化为非反应性物质(Molecules 2007, 12 (3), 694-702[48])。

[0546] 实施例81

[0547] 模块合成

[0548] 本发明的经标记的核苷酸需要几个合成步骤并涉及将多种染料连接到不同的碱基。期望能够以模块化方式而不是逐步的方法进行连接体和染料连接。模块化方法包括预先构建连接体部分，其一端具有保护基，而另一端具有活化基团。然后可以使用这类预先构建的连接体偶联至炔丙基胺核苷酸，将掩蔽的胺基团脱保护，然后偶联活化的染料。与逐步合成相比，这具有步骤更少和收率更高的优点。例如，图 13中的化合物32是包含可裂解官能团的预活化的连接体的实例，其具有活化的活性基团(碳酸二琥珀酰亚胺酯)和掩蔽/保护的胺(Fmoc)。在与炔丙基胺核苷酸上的游离胺偶联后，通过用碱(氨水，哌啶)处理可以便利地除去保护基，并且可以与活化的(NHS)染料分子偶联。

[0549] 实施例82

[0550] 测试了本发明的连接体以测定它们的疏水性。化合物的logP值是其在正辛醇和水之间的分配系数的对数 $\log(c_{\text{辛醇}}/c_{\text{水}})$ ，为化合物亲水性(或其缺乏)的公认测定值[49]。低亲水性和因此高logP值导致差的吸收或渗透。在这种情况下，使用预测软件计算logP值，下表显示结果，其表明连接体(例如图25中的连接体)是疏水连接体，而一些商业上使用的连接体是亲水性的。

连接体	分子式	LogP			
		Osiris*	ChemDraw	Molinsp. **	MarvinSketch
传统	C8H16N2O2S2	0.60	0.49	-0.14	-0.76
新的	C22H43N3O8S2	2.57	2.09	1.30	0.71
ILMN PEG11	C43H74N6O18	-1.80	-1.80	-2.37	-1.30
ILMN PEG23	C63H114N6O28	-2.74	-3.60	-4.34	-1.77

[0552] 尽管已经参照优选实施方案描述了本发明,但是其它实施方案可以实现相同的结果。本发明的改变和变型对于本领域技术人员而言显而易见,且预想所附的权利要求覆盖所有这类变型和等效方案。通过引用将上文引用的全部申请、专利和出版物以及相应申请的全部公开内容并入本申请。

[0553] 参考文献:

- [0554] 1. Metzker, M.L. (2010) "Sequencing Technologies-the Next Generation," *Nat. Rev. Genet.* 11 (1), 31-46.
- [0555] 2. Fuller, C.W. et al. (2009) "The Challenges of Sequencing by Synthesis," *Nat. Biotechnol.* 27 (11), 1013-1023.
- [0556] 3. Hiatt, A.C. and Rose, F. "Enzyme Catalyzed Template-Independent Creation of Phosphodiester Bonds Using Protected Nucleotides," United States Patent 5,990,300, Application 08/300,484, filed 9/2/1994. (issued 11/23/1999).
- [0557] 4. Buzby, P.R. "Nucleotide Analogs," United States Patent Application Publication Number US 2007-0117104 A1, Application 11/295,406, filed 12/5/2005. (published 5/24/2007).
- [0558] 5. Chen, F. et al. (2013) "The History and Advances of Reversible Terminators Used in New Generations of Sequencing Technology," *Genomics Proteomics Bioinformatics* 11 (1), 34-40.
- [0559] 6. Tabor, S. and Richardson, C.C. (1995) "A Single Residue in DNA Polymerases of the *Escherichia coli* DNA Polymerase I Family Is Critical for Distinguishing between Deoxy- and Dideoxyribonucleotides," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (14), 6339-6343.
- [0560] 7. Perler, F.B. and Southworth, M.W. "Thermostable Dna Polymerase from 9on-7 and Method for Producing the Same," United States Patent 5,756,334, Application 08/271,364, filed 7/6/1994. (issued 5/26/1998).
- [0561] 8. Sonthworth, M.W. et al. (1996) "Cloning of Thermostable DNA Polymerases from Hyperthermophilic Marine Archaea with Emphasis on *Thermococcus* Sp. 9Degrees N-7 and Mutations Affecting 3'-5' Exonuclease Activity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (11), 5281-5285.
- [0562] 9. Evans, S.J. et al. (2000) "Improving Dideoxynucleotide-Triphosphate Utilisation by the Hyper-Thermophilic DNA Polymerase from the Archaeon *Pyrococcus Furiosus*," *Nucleic Acids Res.* 28 (5), 1059-1066.
- [0563] 10. Arezi, B. et al. (2002) "Efficient and High Fidelity Incorporation of Dye-Terminators by a Novel Archaeal DNA Polymerase Mutant," *J. Mol. Biol.* 322 (4),

719-729.

[0564] 11. Smith, G.P. et al. "Modified Polymerases for Improved Incorporation of Nucleotide Analogues," WIPO PCT Patent Publication Number WO/2005/024010, Application PCT/GB2004/003891, filed 9/10/2004. (published 3/17/2005).

[0565] 12. Harpp, D.N. et al. (1968) "Organic Sulfur Chemistry. I. The Disulfide-Phosphine Reaction. Desulfurization with Tris(Diethylamino) Phosphine," J. Am. Chem. Soc. 90 (15), 4181-4182.

[0566] 13. Burns, J.A. et al. (1991) "Selective Reduction of Disulfides by Tris (2-Carboxyethyl) Phosphine," J. Org. Chem. 56 (8), 2648-2650.

[0567] 14. Getz, E.B. et al. (1999) "A Comparison between the Sulphydryl Reductants Tris(2-Carboxyethyl) Phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry," Anal. Biochem. 273 (1), 73-80.

[0568] 15. Singh, R. and Whitesides, G.M. (1993) "Thiol-Disulfide Interchange," in Sulfur-Containing Functional Groups (Supplement, S. and Patai, S., Eds.), pp 633-658, J. Wiley and Sons, Ltd.

[0569] 16. Lukesh, J.C. et al. (2012) "A Potent, Versatile Disulfide-Reducing Agent from Aspartic Acid," J. Am. Chem. Soc. 134 (9), 4057-4059.

[0570] 17. Singh, R. and Whitesides, G.M. (1994) "Reagents for Rapid Reduction of Native Disulfide Bonds in Proteins," Bioorg. Chem. 22, 109-115.

[0571] 18. Singh, R. and Kats, L. (1995) "Catalysis of Reduction of Disulfide by Selenol," Anal. Biochem. 232 (1), 86-91.

[0572] 19. Stahl, C.R. and Siggia, S. (1957) "Determination of Organic Disulfides by Reduction with Sodium Borohydride," Anal. Chem. 29 (1), 154-155.

[0573] 20. Nardai, G. et al. (2001) "Protein-Disulfide Isomerase-and Protein Thiol-Dependent Dehydroascorbate Reduction and Ascorbate Accumulation in the Lumen of the Endoplasmic Reticulum," J. Biol. Chem. 276 (12), 8825-8828.

[0574] 21. Holmgren, A. and Bjornstedt, M. (1995) "[21] Thioredoxin and Thioredoxin Reductase," in Methods in Enzymology, pp 199-208, Academic Press.

[0575] 22. Chen, C.-Y. (2014) "DNA Polymerases Drive DNA Sequencing-by-Synthesis Technologies: Both Past and Present," Frontiers in Microbiology 5.

[0576] 23. Ju, J. et al. "Four-Color Dna Sequencing by Synthesis Using Cleavable Fluorescent Nucleotide Reversible Terminators," United States Patent 7,883,869, Application 12/312,903, filed 7/9/2009. (issued 2/8/2011).

[0577] 24. Ju, J. et al. "Massive Parallel Method for Decoding DNA and RNA," United States Patent 8,088,575, Application 12/804,284, filed 7/19/2010. (issued 1/3/2012).

[0578] 25. Ju, J. et al. "Chemically Cleavable 3'-0-Allyl-Dntp-Allyl-Fluorophore Fluorescent Nucleotide Analogues and Related Methods," United States Patent 8,796,432, Application 12/084,457, filed 4/30/2008. (issued 8/5/2014).

- [0579] 26.Balasubramanian,S."Polynucleotide Sequencing,"United States Patent 6,833,246, Application 10/113,221,filed 3/29/2002.(issued 12/21/2004) .
- [0580] 27.Balasubramanian,S.et al."Labelled Nucleotides,"United States Patent 7,785,796, Application 12/460,741,filed 7/23/2009.(issued 8/31/2010) .
- [0581] 28.Milton,J.et al."Labelled Nucleotides,"United States Patent 7,414,116,Application 10/525,399,filed 2/23/2005.(issued 8/19/2008) .
- [0582] 29.Metzker,M.L.et al.(1994)"Termination of DNA Synthesis by Novel 3'-Modified-Deoxyribonucleoside 5'-Triphosphates,"Nucleic Acids Res.22(20) ,4259-4267.
- [0583] 30.Ju,J.et al.(2006)"Four-Color DNA Sequencing by Synthesis Using Cleavable Fluorescent Nucleotide Reversible Terminators," Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.103 (52) , 19635-19640.
- [0584] 31.Ruparel,H.et al.(2005)"Design and Synthesis of a 3'-0-Allyl Photocleavable Fluorescent Nucleotide as a Reversible Terminator for DNA Sequencing by Synthesis," Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.102 (17) ,5932-5937.
- [0585] 32.Bergmann,F.et al."Compound for Sequencing by Synthesis,"United States Patent Application Publication Number US 2015-0140561 A1,Application 14/542,980,filed 11/17/2014. (published 5/21/2015) .
- [0586] 33.Kwiatkowski,M."Compounds for Protecting Hydroxyls and Methods for Their Use," United States Patent Application Publication Number US 2002-0015961 A1,Application 09/952,719,filed 9/12/2001. (published 2/7/2002) .
- [0587] 34.Gardner,A.F.et al.(2012)"Rapid Incorporation Kinetics and Improved Fidelity of a Novel Class of 3'-Oh Unblocked Reversible Terminators,"Nucleic Acids Res.40 (15) , 7404-7415.
- [0588] 35.Litosh,V.A.et al.(2011)"Improved Nucleotide Selectivity and Termination of 3'-Oh Unblocked Reversible Terminators by Molecular Tuning of 2-Nitrobenzyl Alkylated Homed Triphosphates,"Nucleic Acids Res.39 (6) ,e39-e39.
- [0589] 36.Bowers,J.et al.(2009)"Virtual Terminator Nucleotides for Next Generation DNA Sequencing,"Nat.Meth.6 (8) ,593-595.
- [0590] 37.Zhao,C.et al."Compositions and Methods for Nucleotide Sequencing,"United States Patent 8,399,188,Application 12/442,925,filed 12/23/2009. (issued 3/19/2013) .
- [0591] 38.Zon,G."Reversible Di-Nucleotide Terminator Sequencing,"United States Patent 8,017,338,Application 12/275,161,filed 11/20/2008.(issued 9/13/2011) .
- [0592] 39.Wang, Z.et al.(2010)"Desulfurization of Cysteine-Containing Peptides Resulting from Sample Preparation for Protein Characterization by MS,"Rapid Commun.Mass Spectrom. 24 (3) ,267-275.

- [0593] 40.Jung,A.et al.(2002)"7-Deaza-2'-Deoxyguanosine Allows PCR and Sequencing Reactions from CpG Islands,"Mol.Pathol.55(1),55-57.
- [0594] 41.Kutyavin,I.V.(2008)"Use of Base-Modified Duplex-Stabilizing Deoxynucleoside 5' -Triphosphates to Enhance the Hybridization Properties of Primers and Probes in Detection Polymerase Chain Reaction,"Biochemistry 47(51),13666-13673.
- [0595] 42.Semenyuk,A.et al.(2006)"Synthesis of RNA Using 2 '-O-Dtm Protection,"J.Am.Chem. Soc.128(38),12356-12357.
- [0596] 43.Semenyuk,A.and Kwiatkowski,M.(2007)"A Base-Stable Dithiomethyl Linker for Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotides,"Tetrahedron Lett.48(3),469-472.
- [0597] 44.Semenyuk,A.(2006)"Novel Methods for Synthesis of High Quality Oligonucleotides," Uppsala University.
- [0598] 45.Bellamy,A.J.et al.(2007)"The Use of Trifluoroacetyl as an N-and O-Protecting Group During the Synthesis of Energetic Compounds Containing Nitramine and/or Nitrate Ester Groups,"Propellants Explos.Pyrotech.32(1),20-31.
- [0599] 46.Gordon,S.and Olejnik,J."Methods and Compositions for Incorporating Nucleotides," United States Patent Application PublicationNumber US 2013-0137091 A1,Application 13/305,415,filed 11/28/2011.(published 5/30/2013).
- [0600] 47.Olejnik,J.et al."Methods and Compositions for Inhibiting Undesired Cleaving of Labels,"United States Patent 8,623,598,Application 12/405,866, filed 3/17/2009.(issued 1/7/2014).
- [0601] 48.Montazerozohori,M.et al.(2007)"Fast and Highly Efficient Solid State Oxidation of Thiols,"Molecules 12(3),694.
- [0602] 49.Clark,D.E.(1999)"Rapid Calculation of Polar Molecular Surface Area and Its Application to the Prediction of Transport Phenomena.2.Prediction of Blood-Brain Barrier Penetration,"J.Pharm.Sci.88(8),815-821.

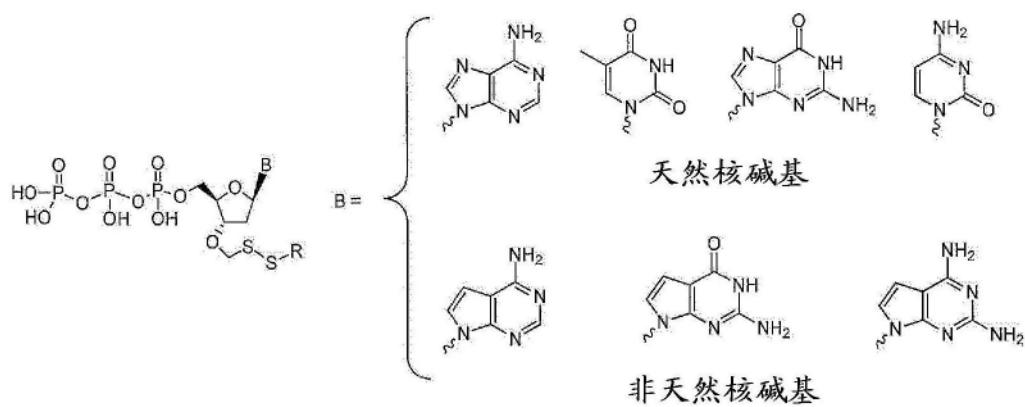


图1

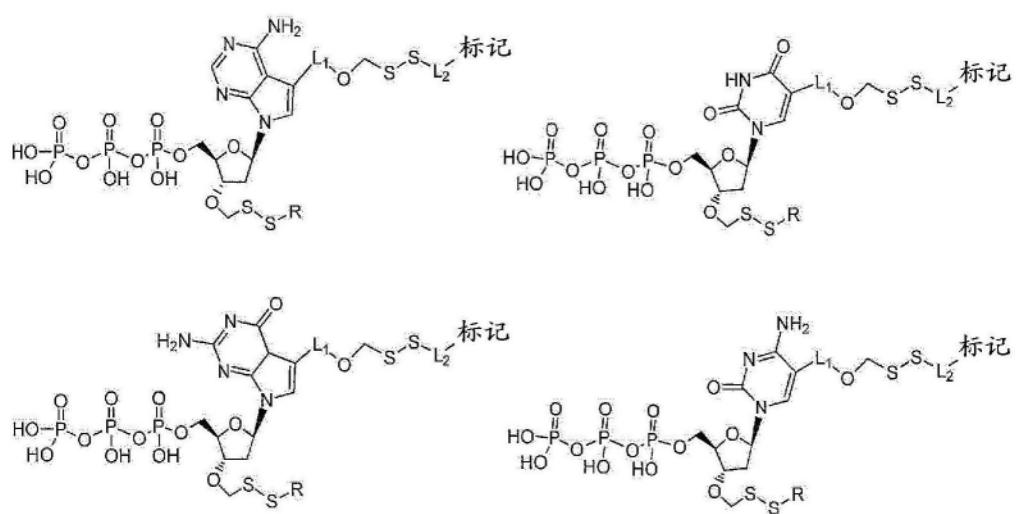


图2

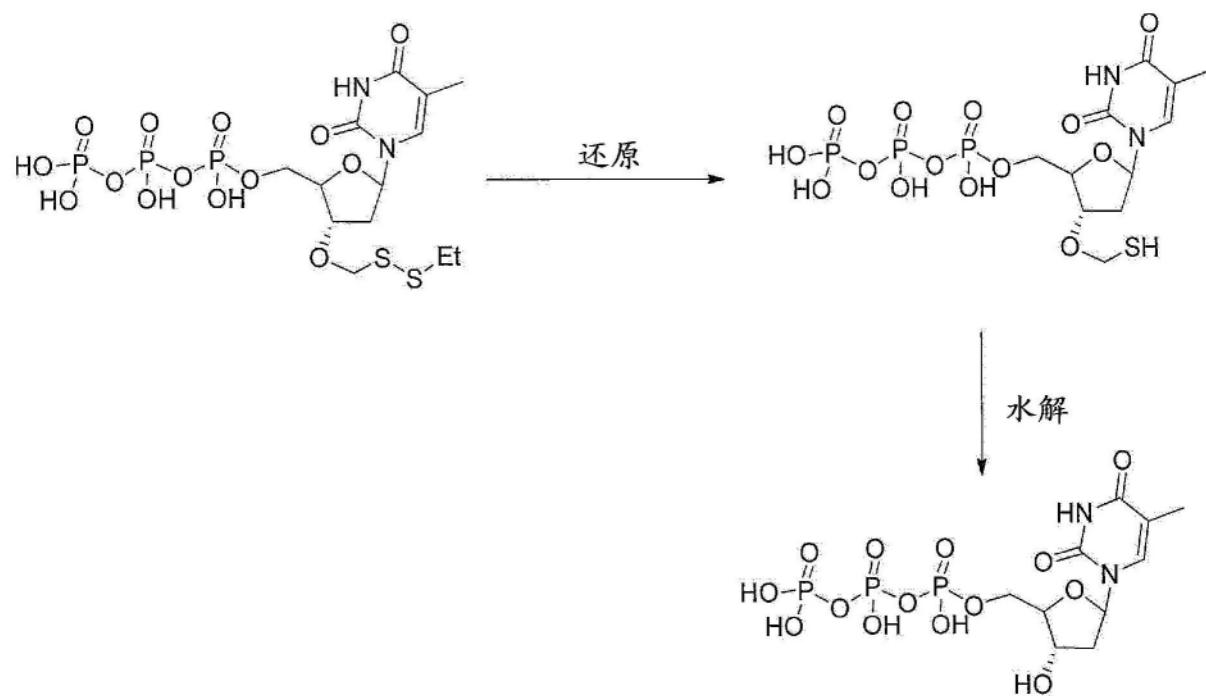


图3

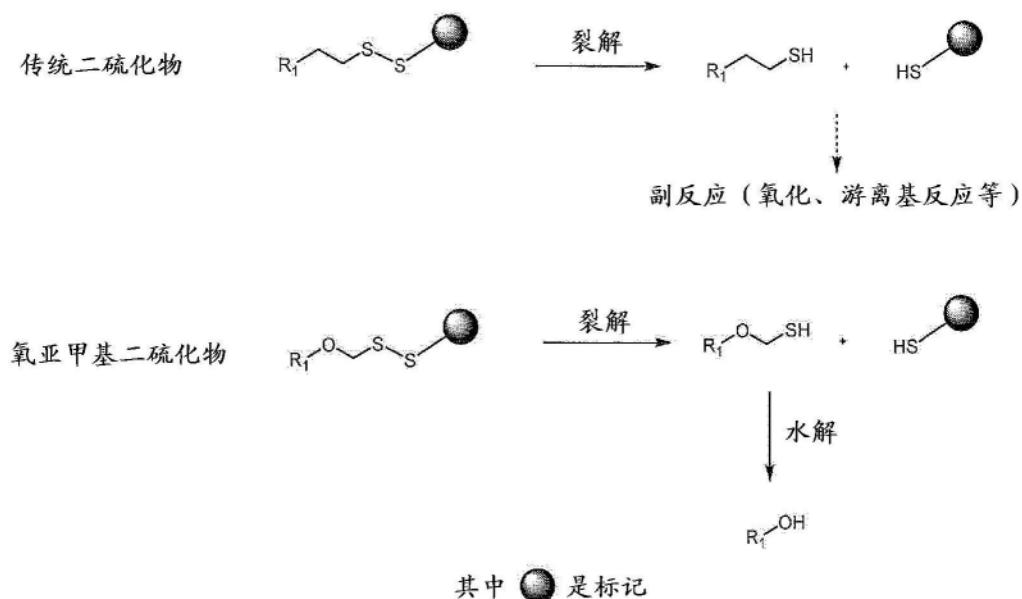


图4

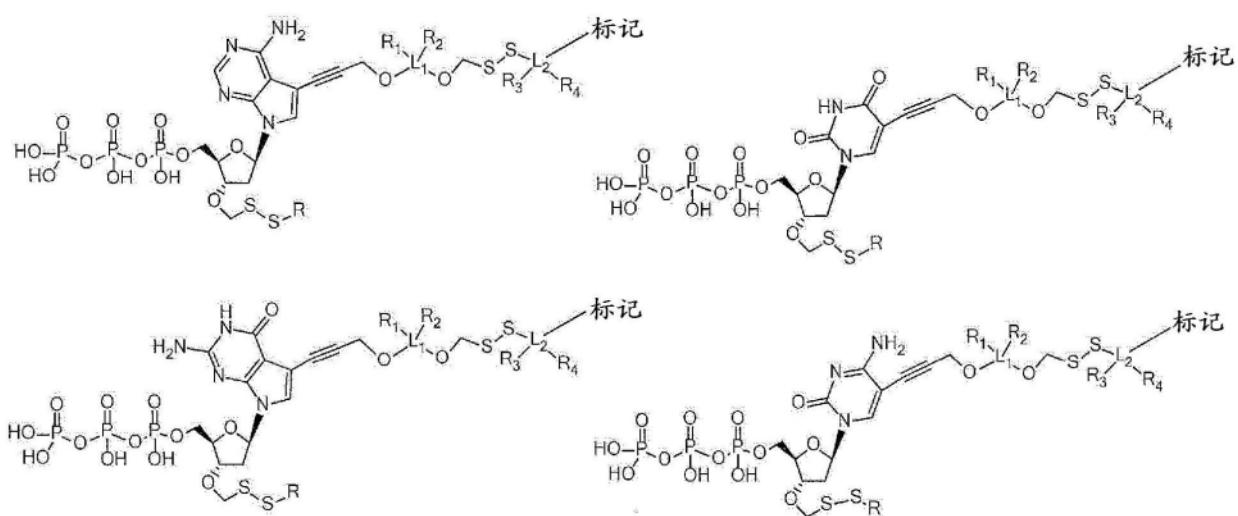


图5

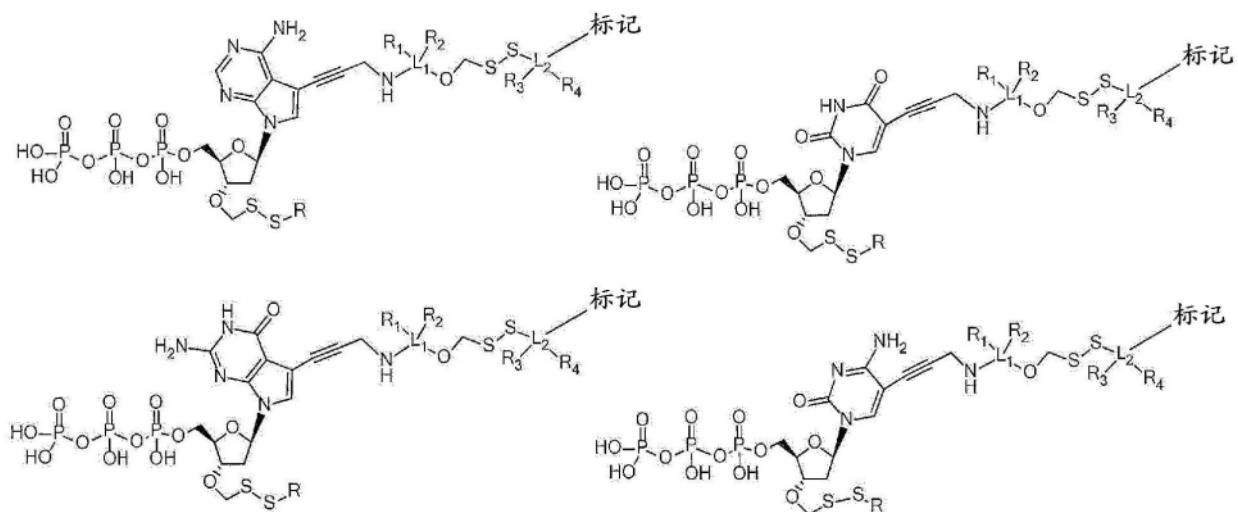


图6

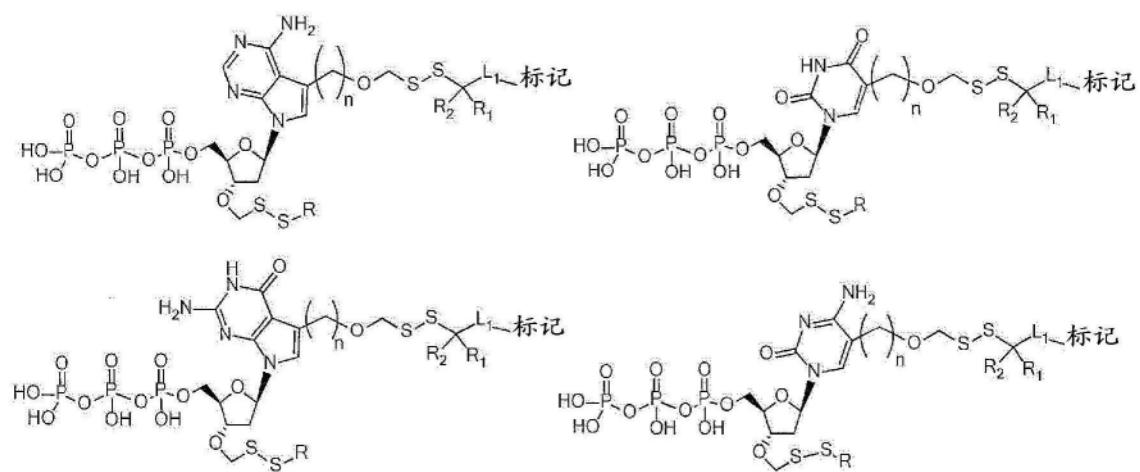


图7

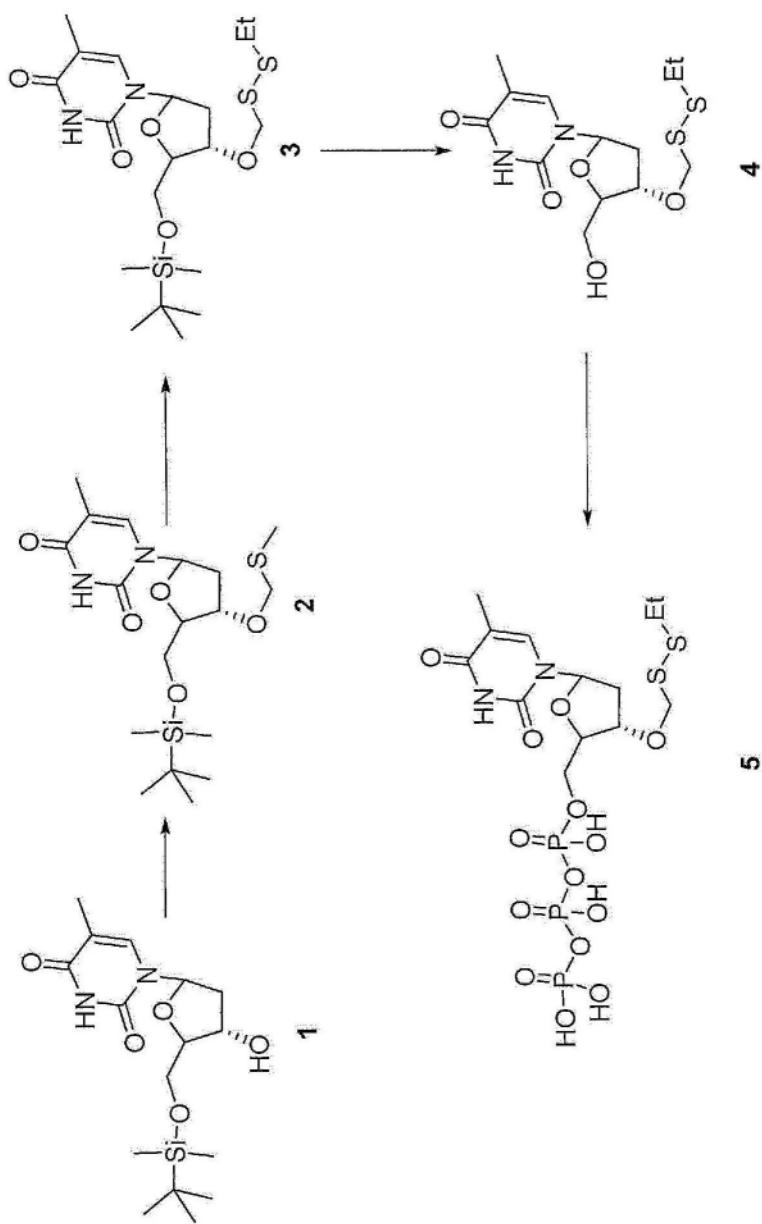


图8

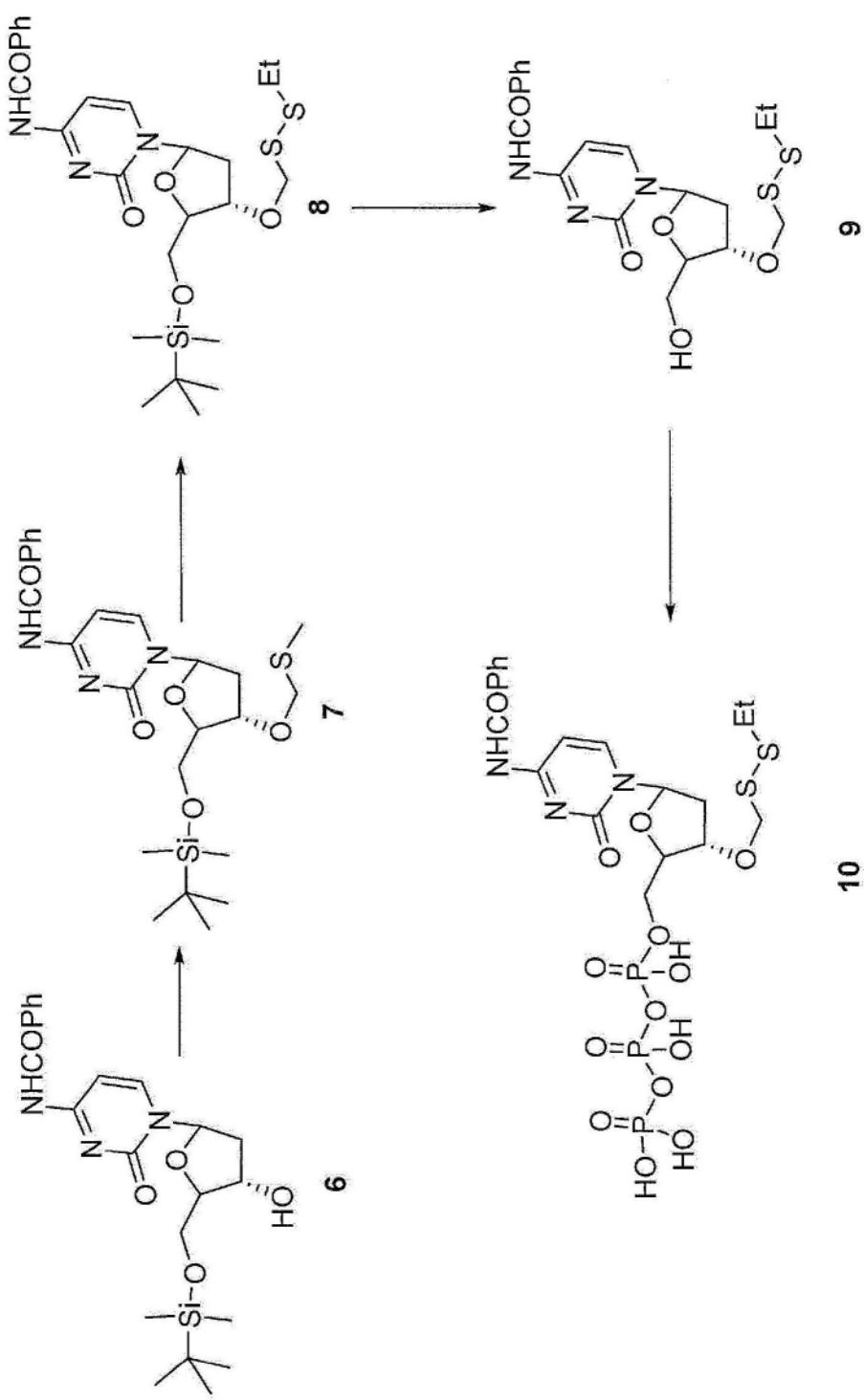


图9

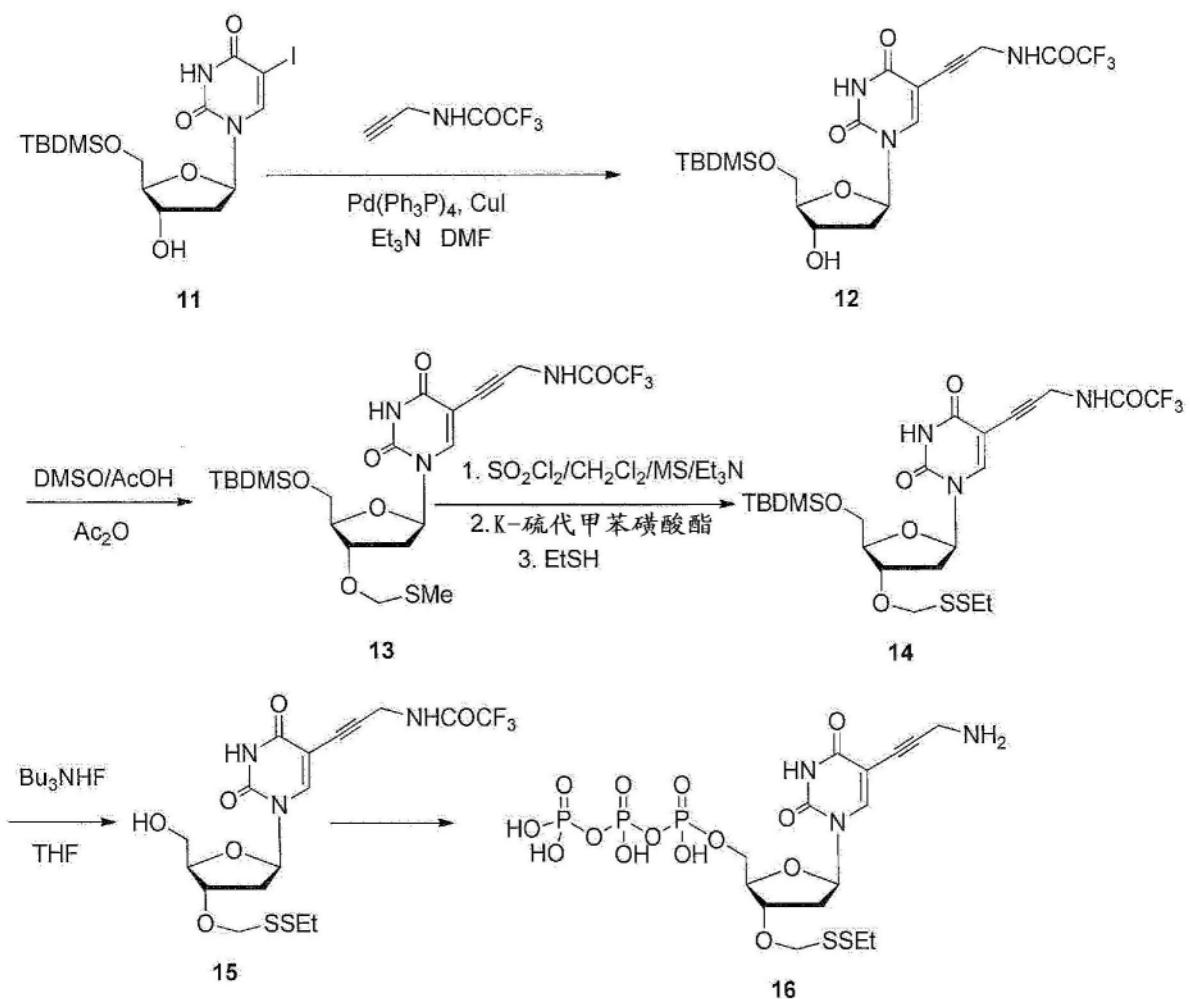


图10

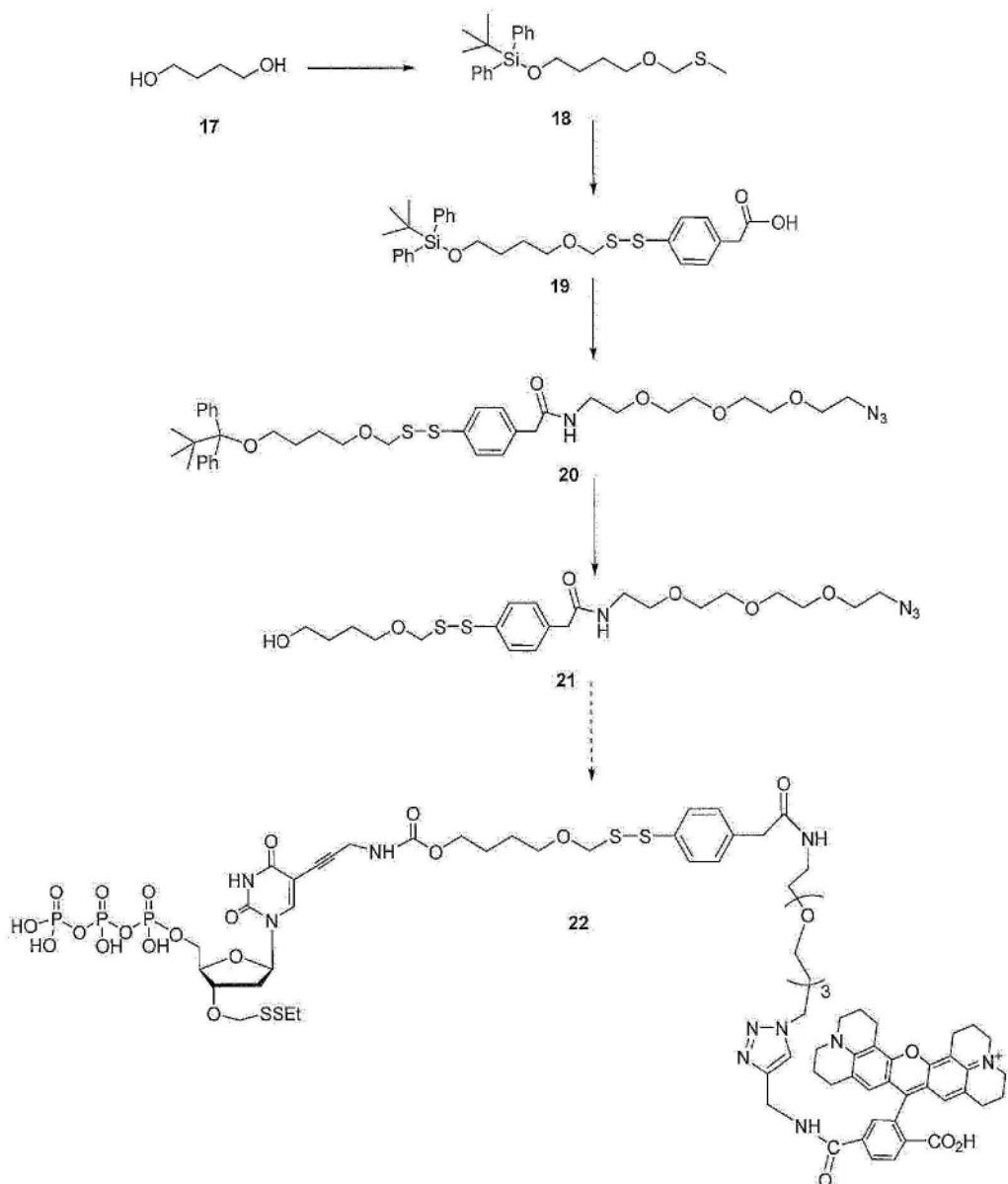


图11

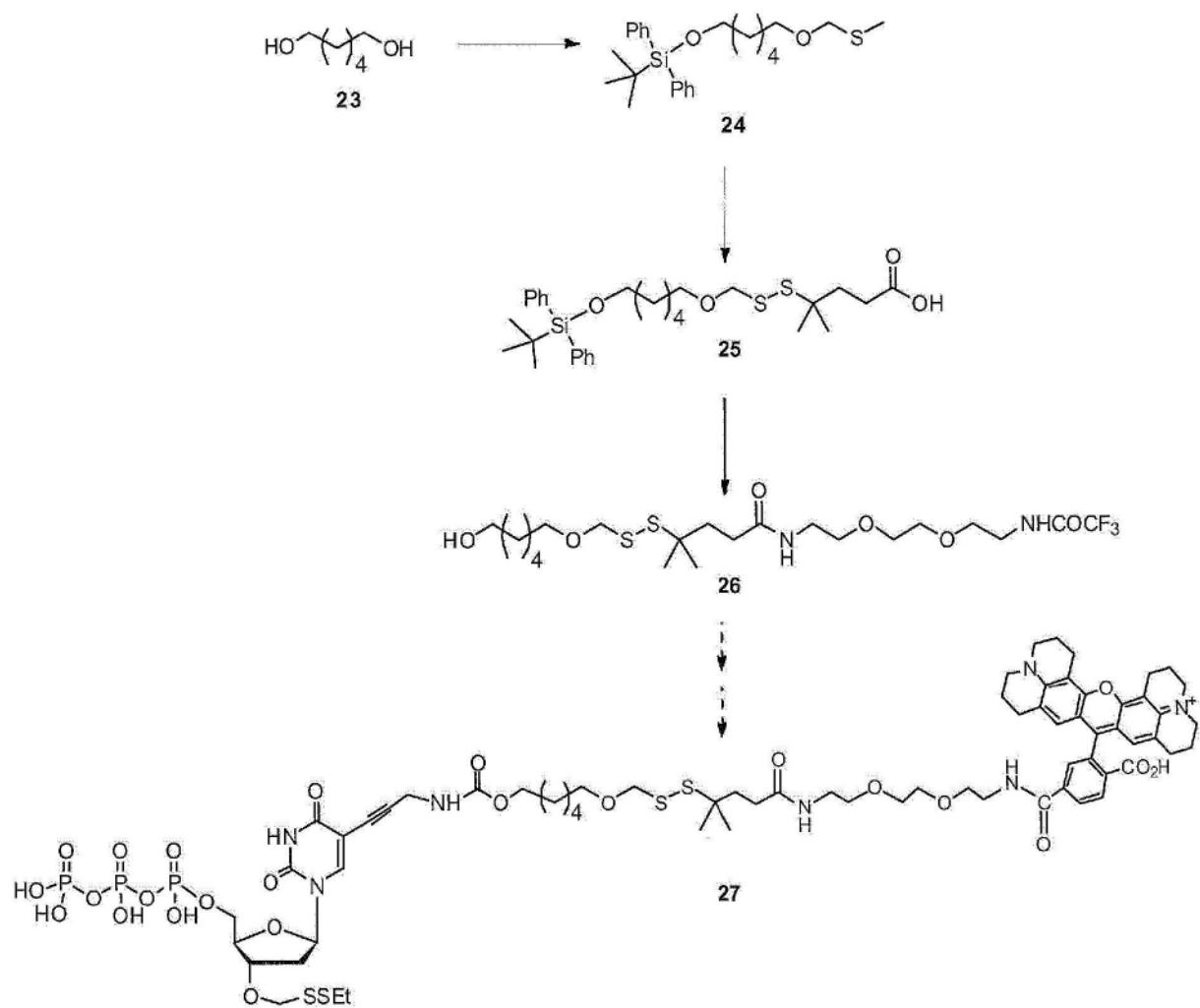


图12

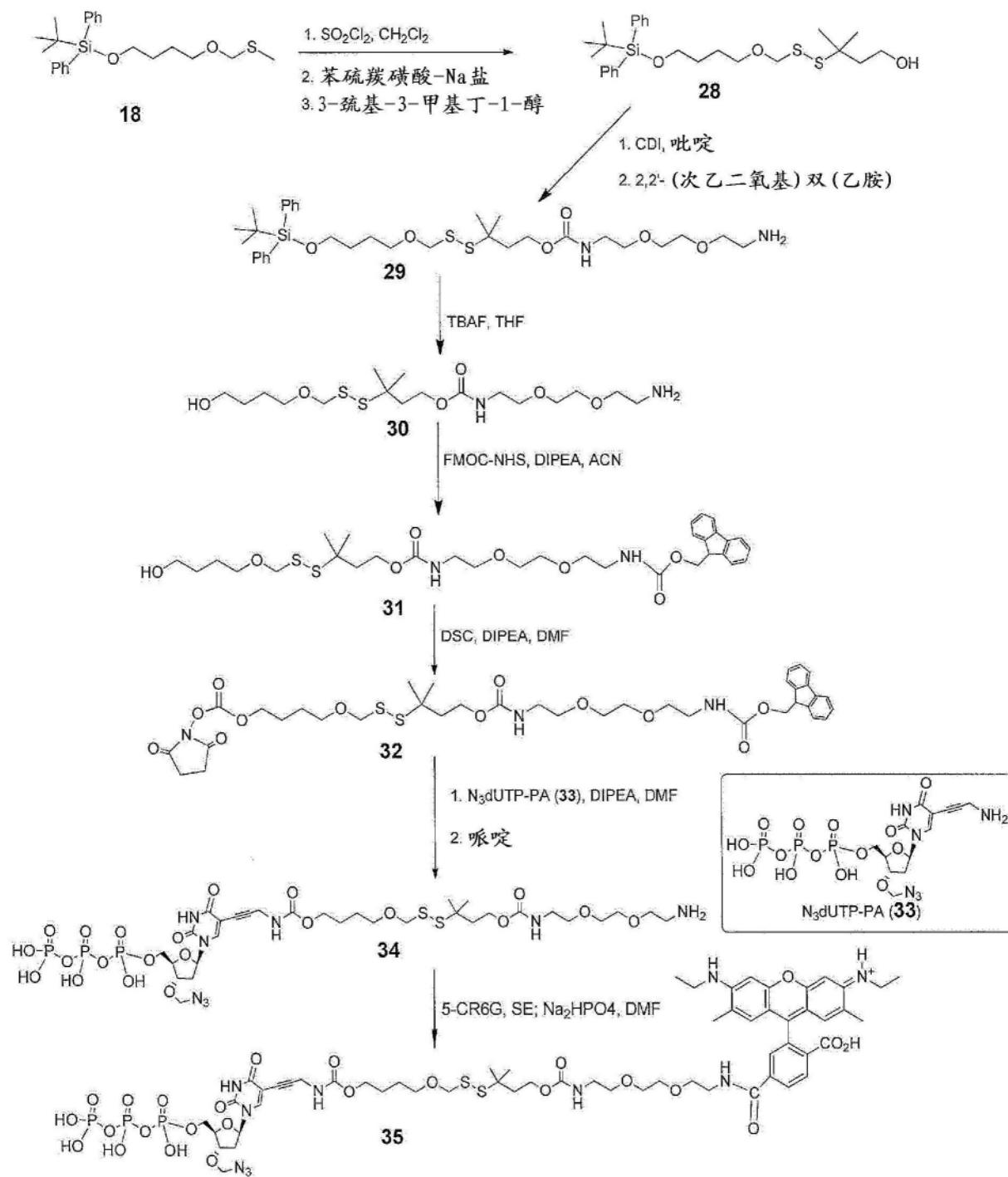


图13

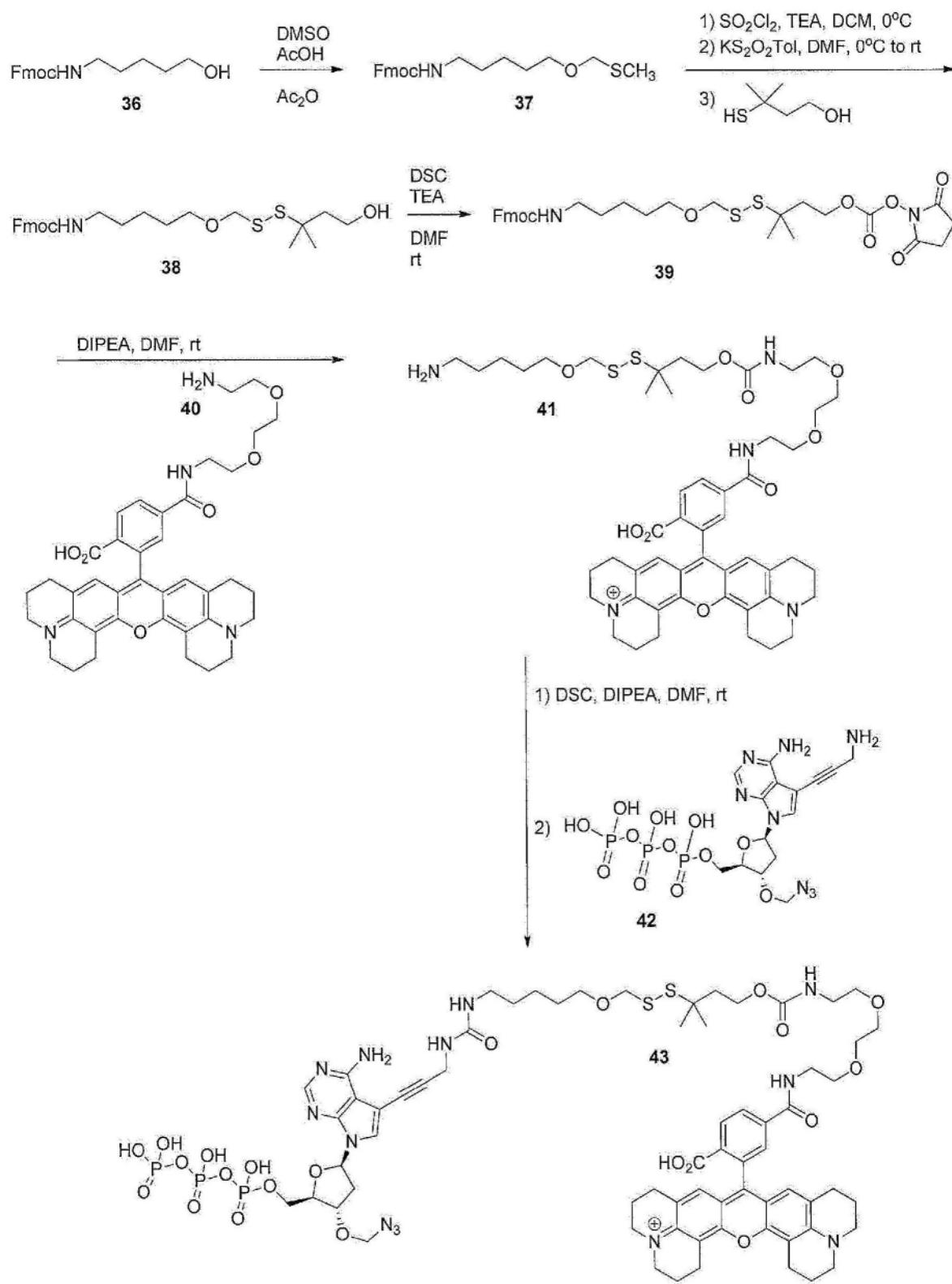


图14

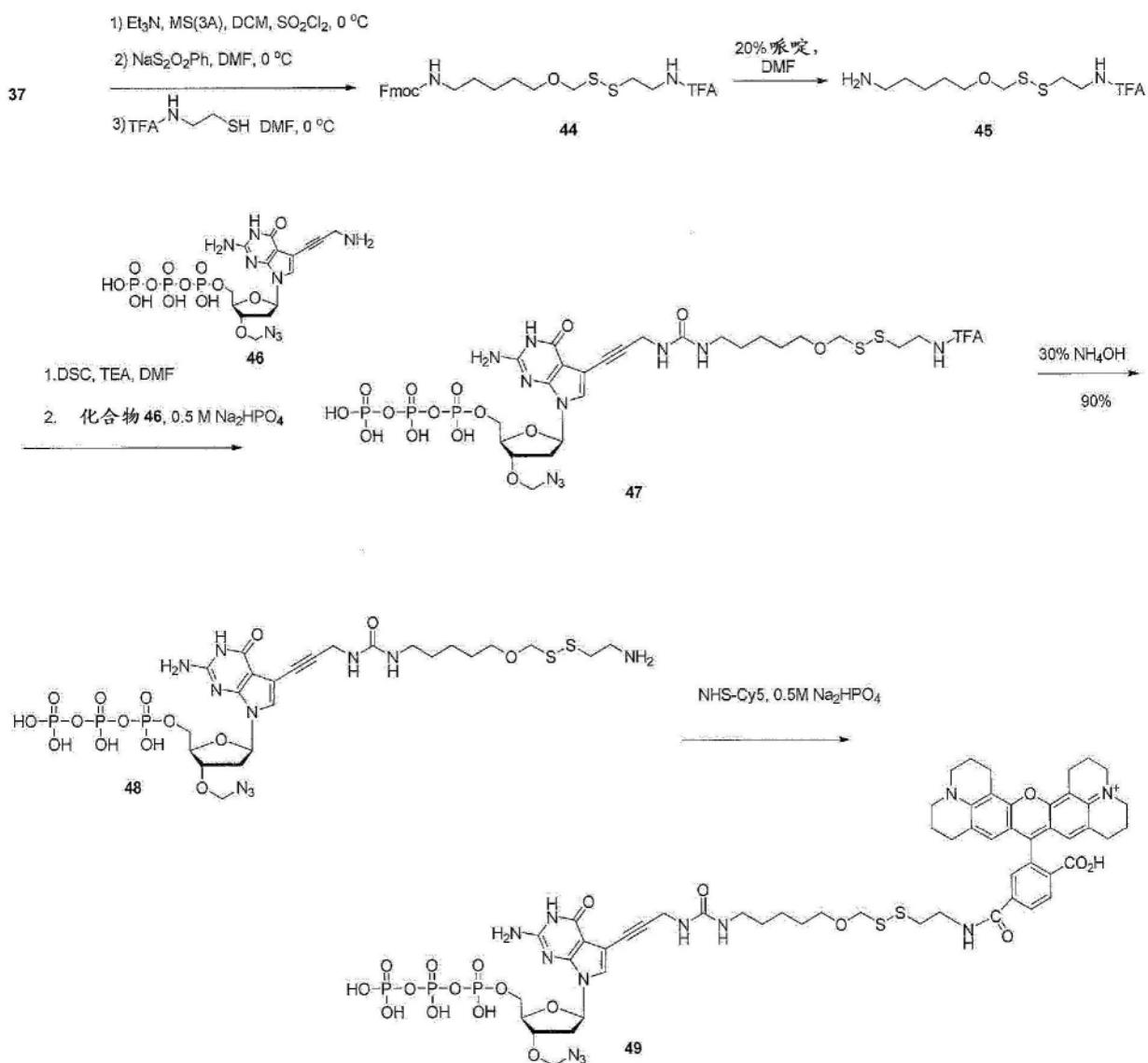


图15

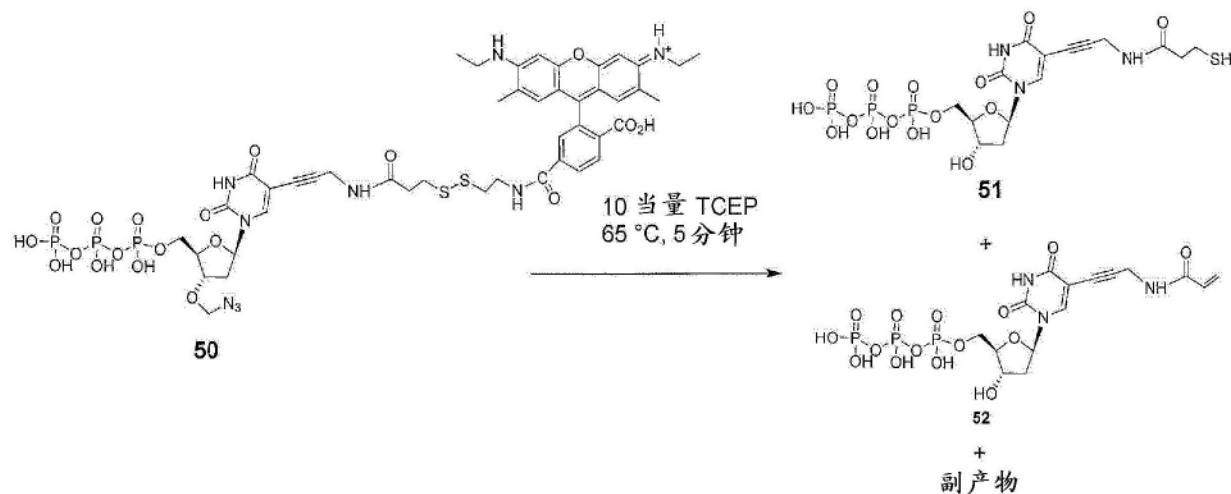


图16

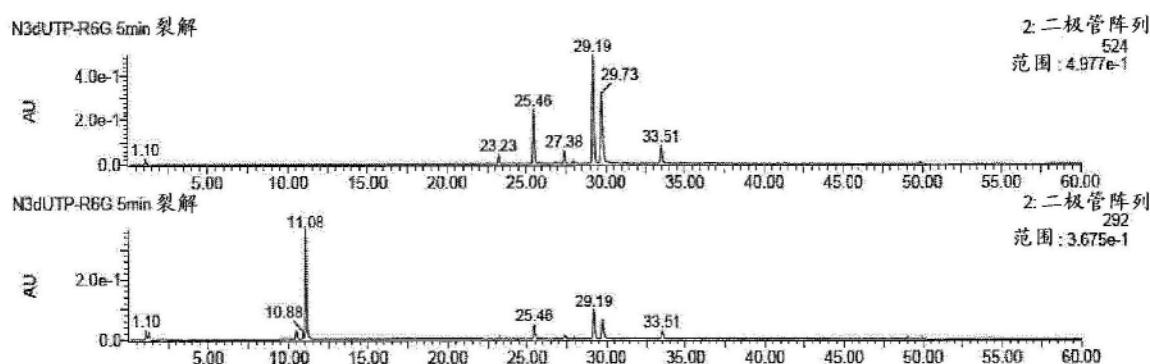


图17

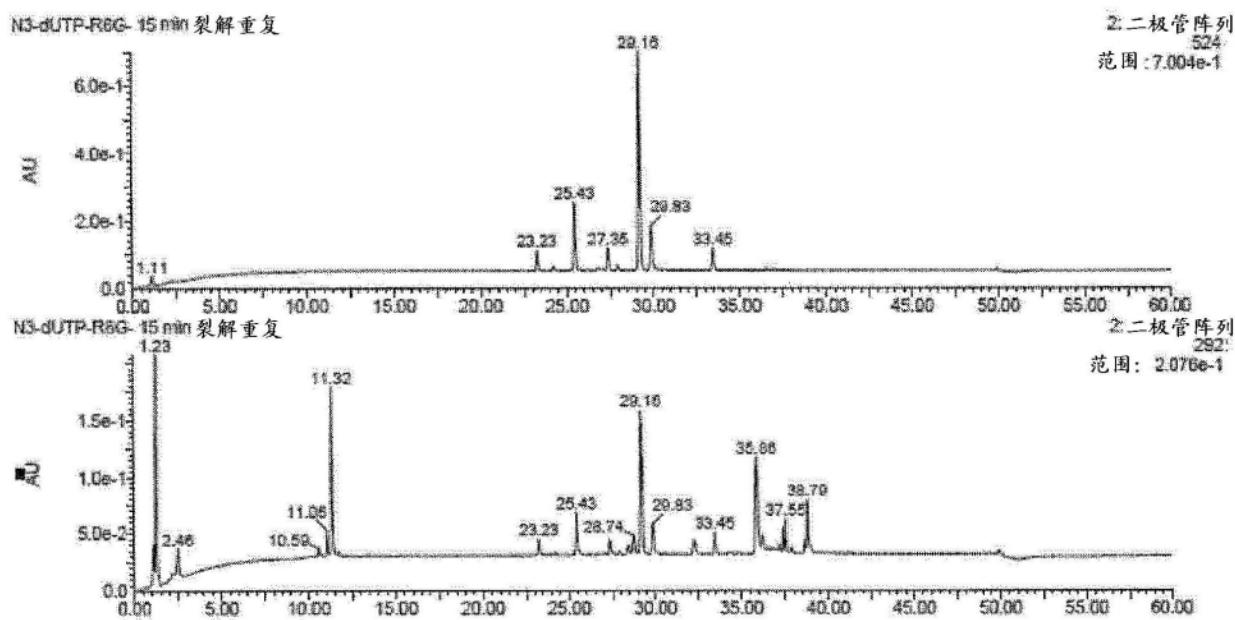


图18

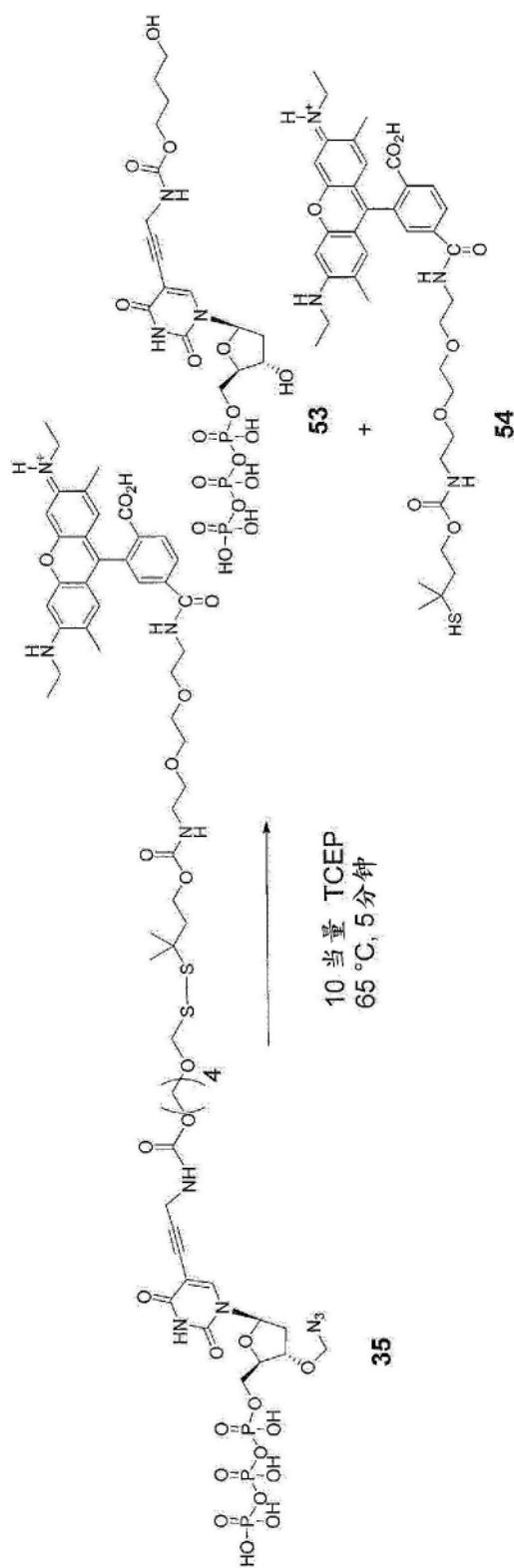


图19

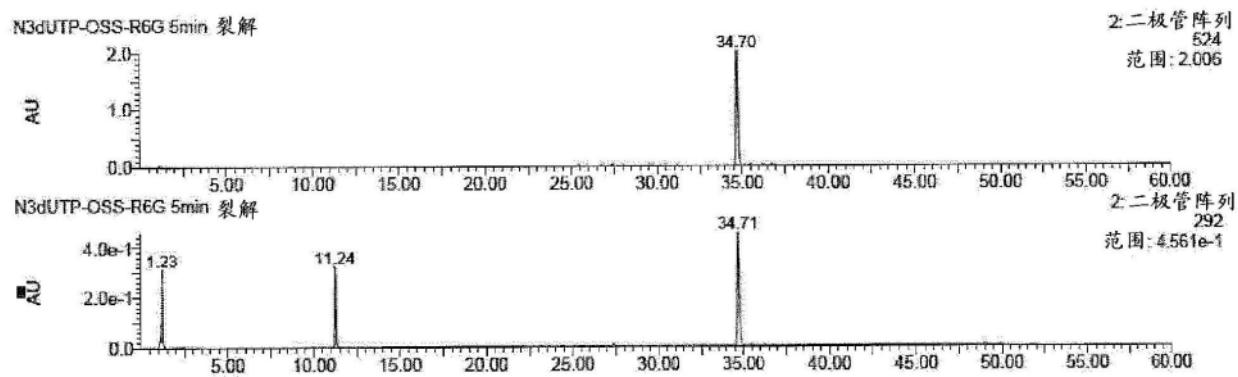


图20

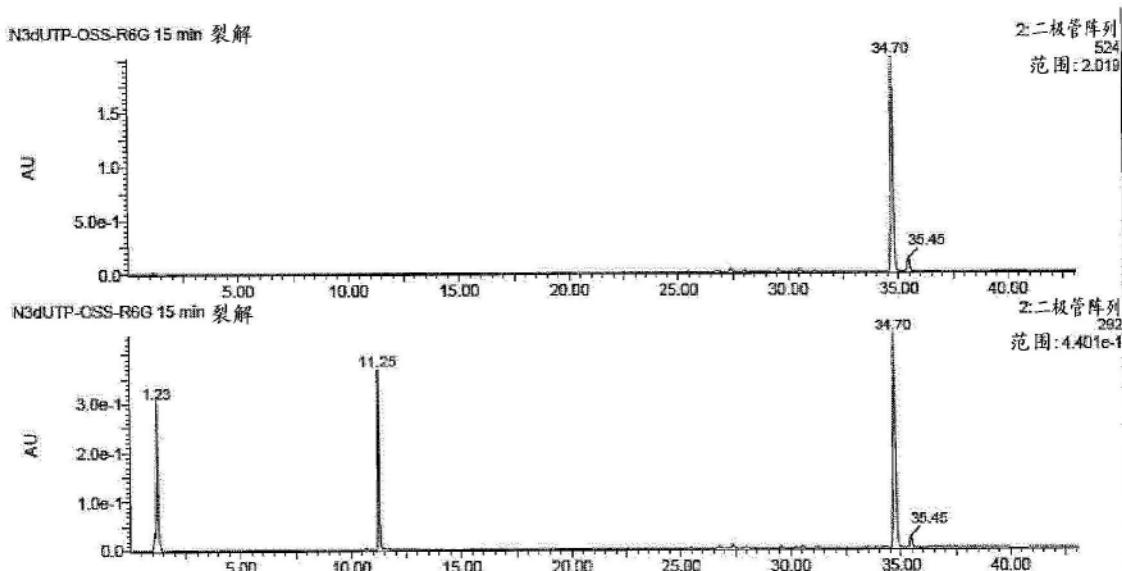


图21

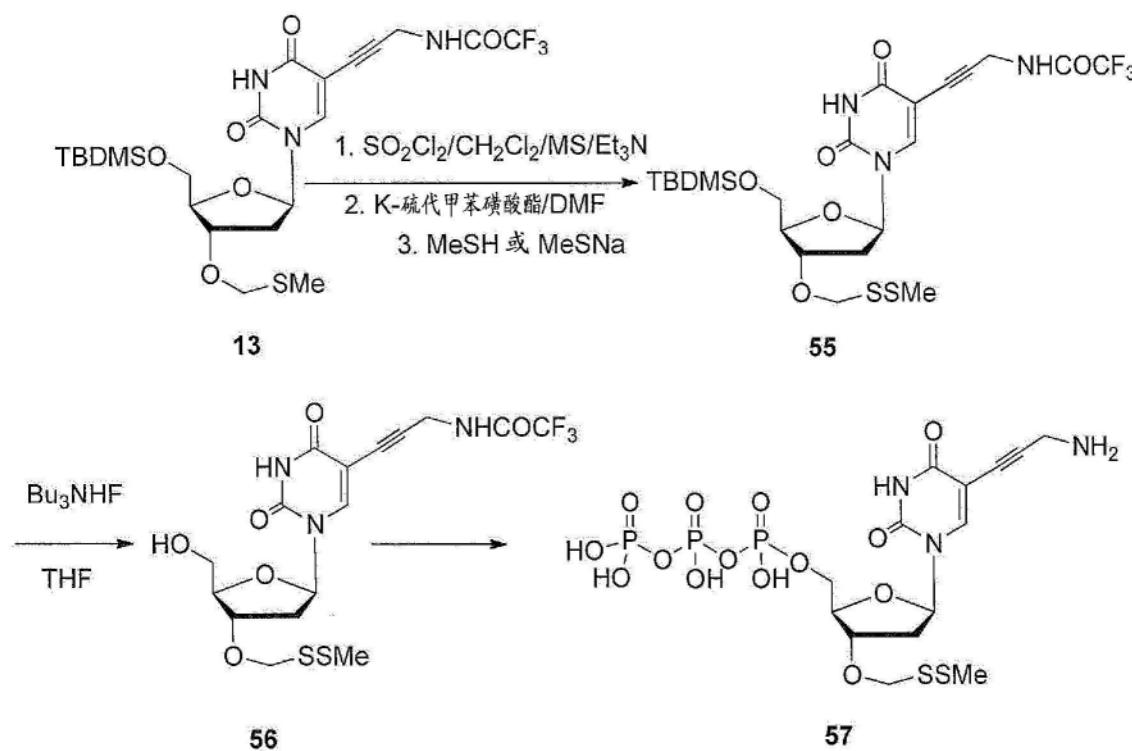


图22

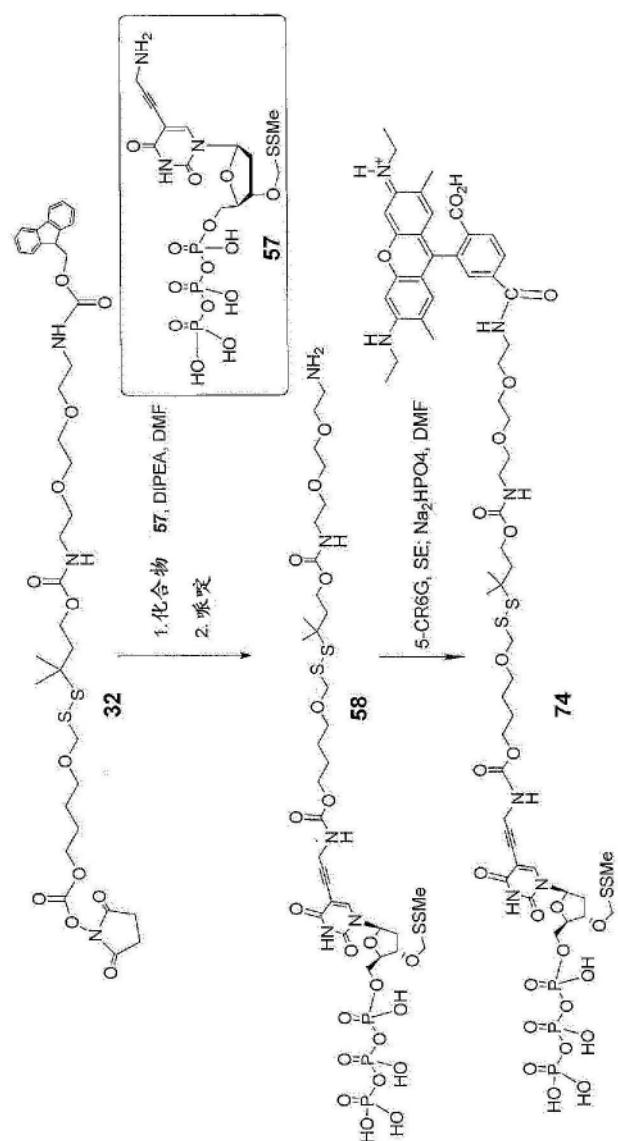


图23

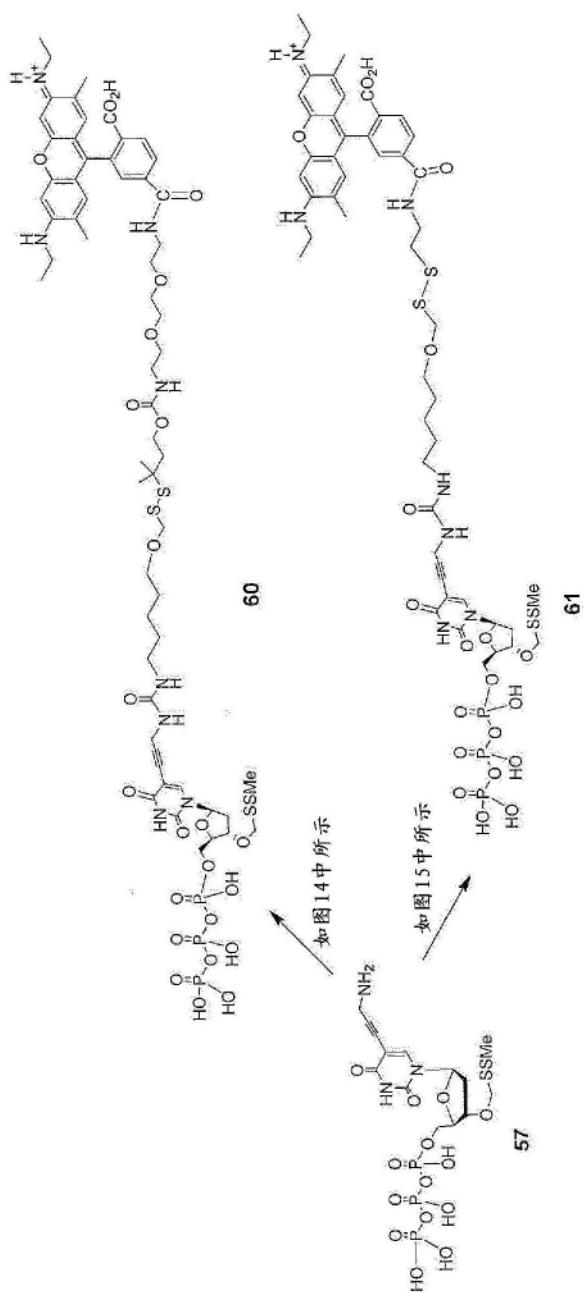


图24

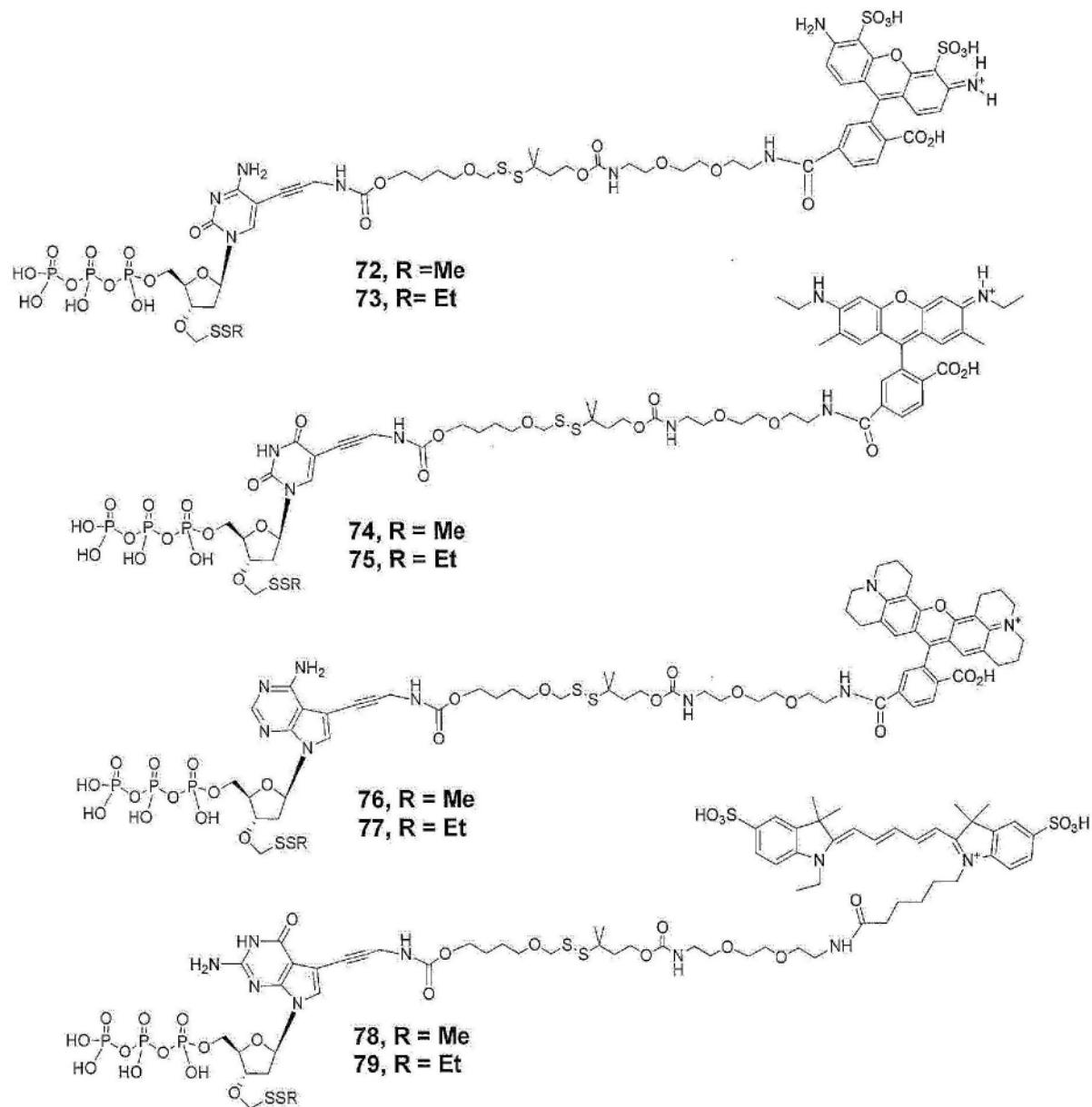


图25

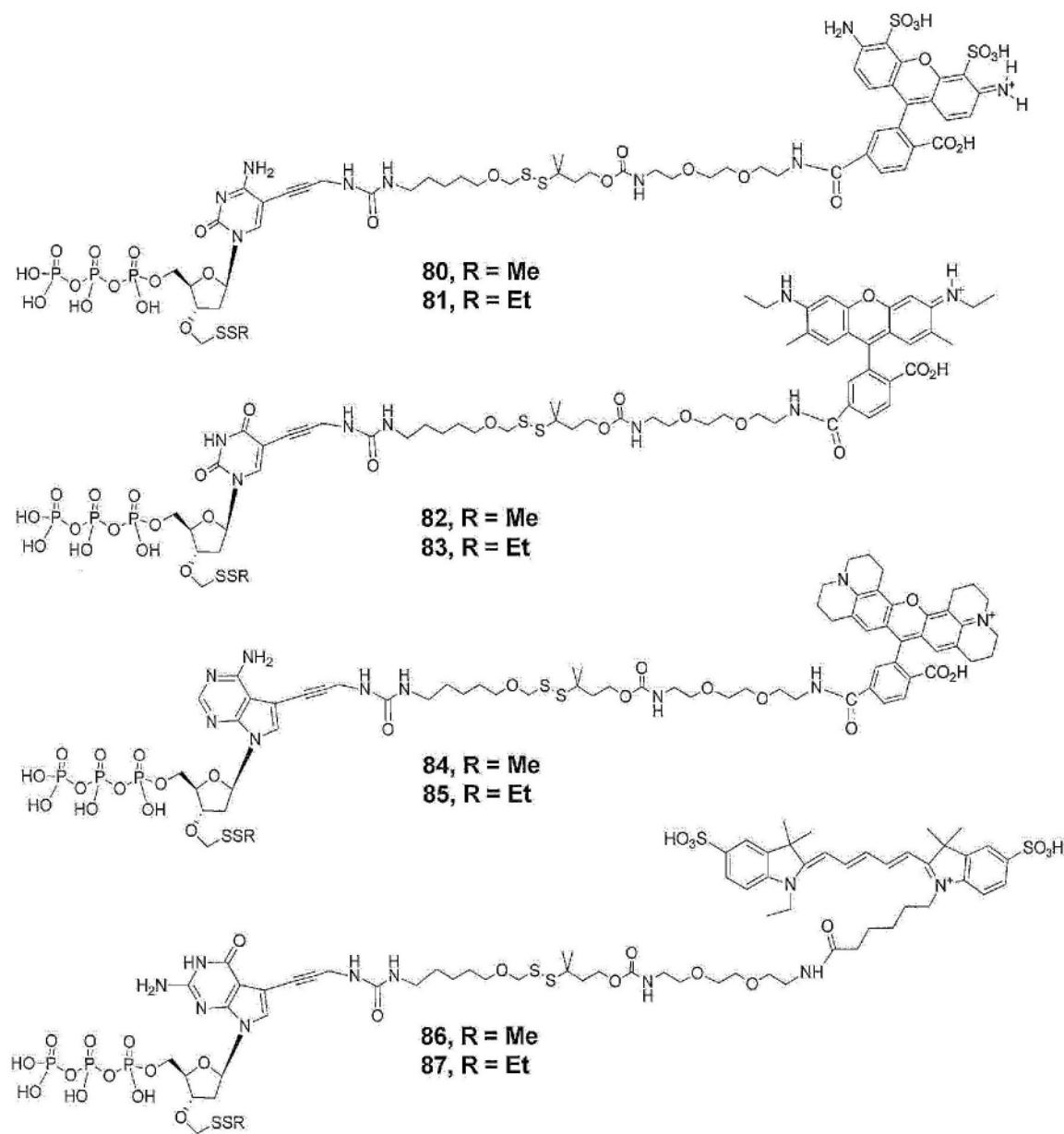


图26

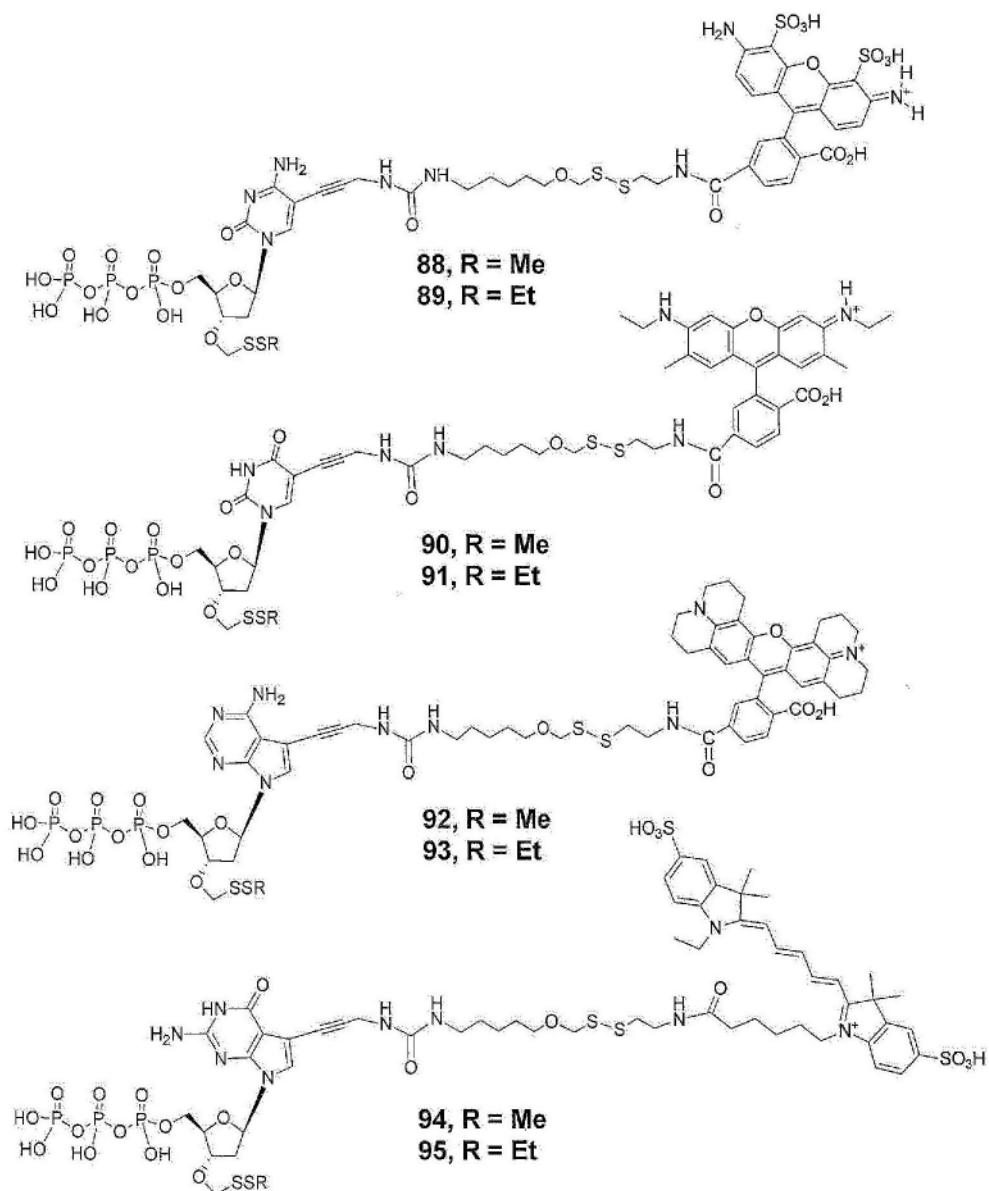


图27

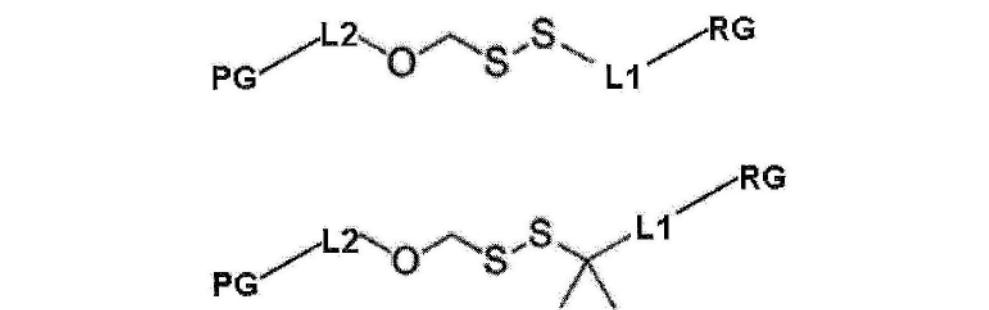


图28

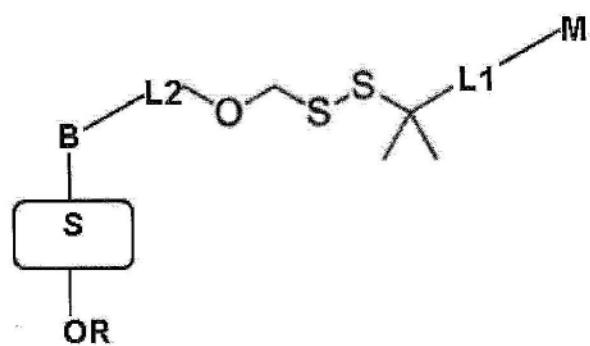


图29

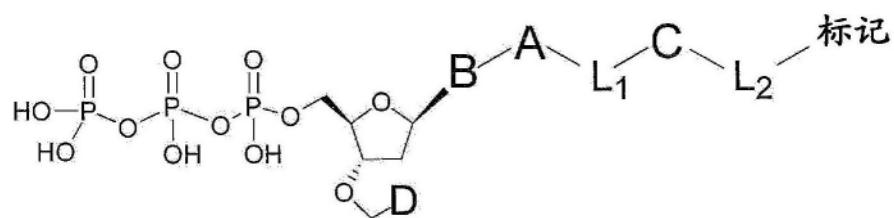


图30

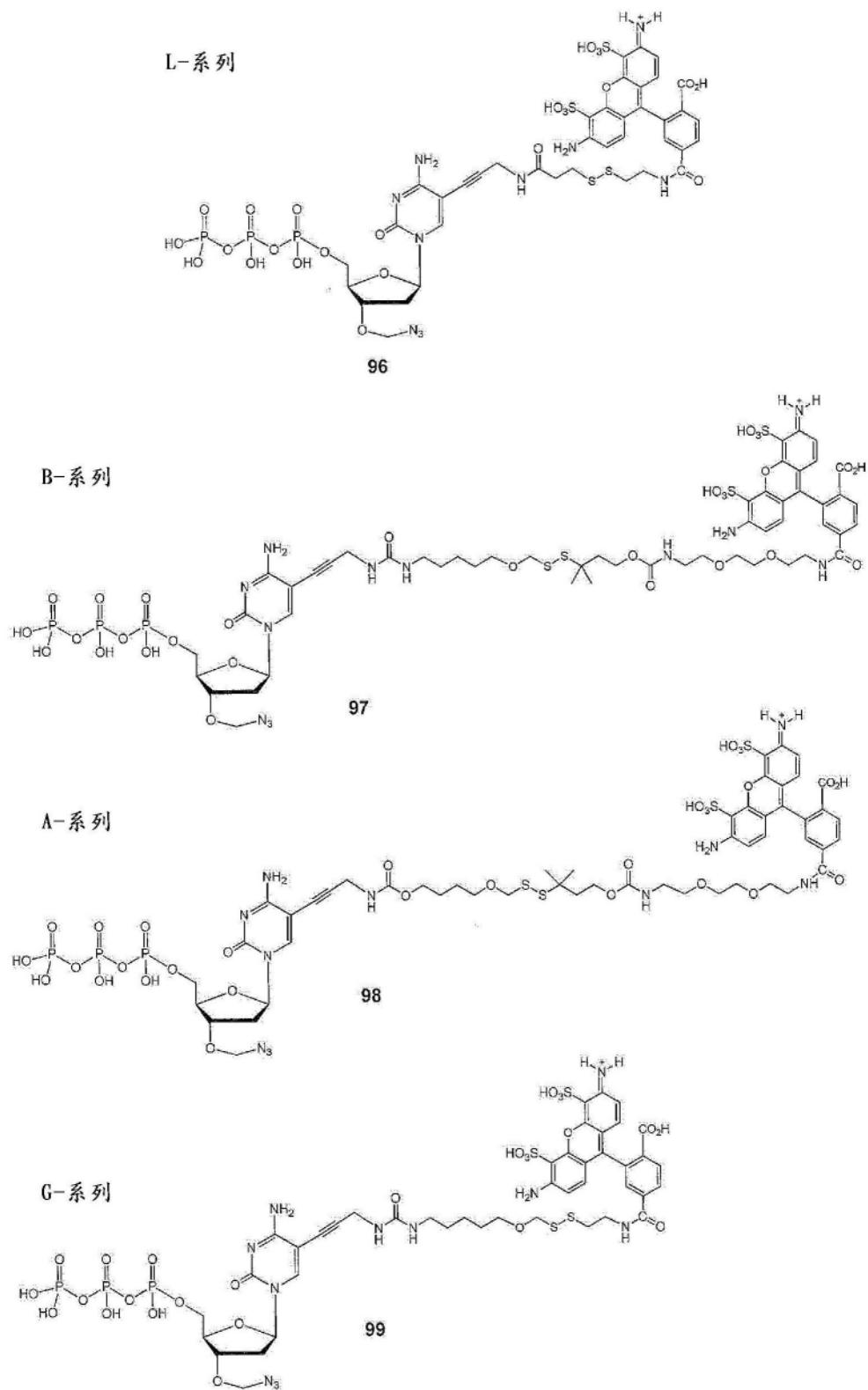
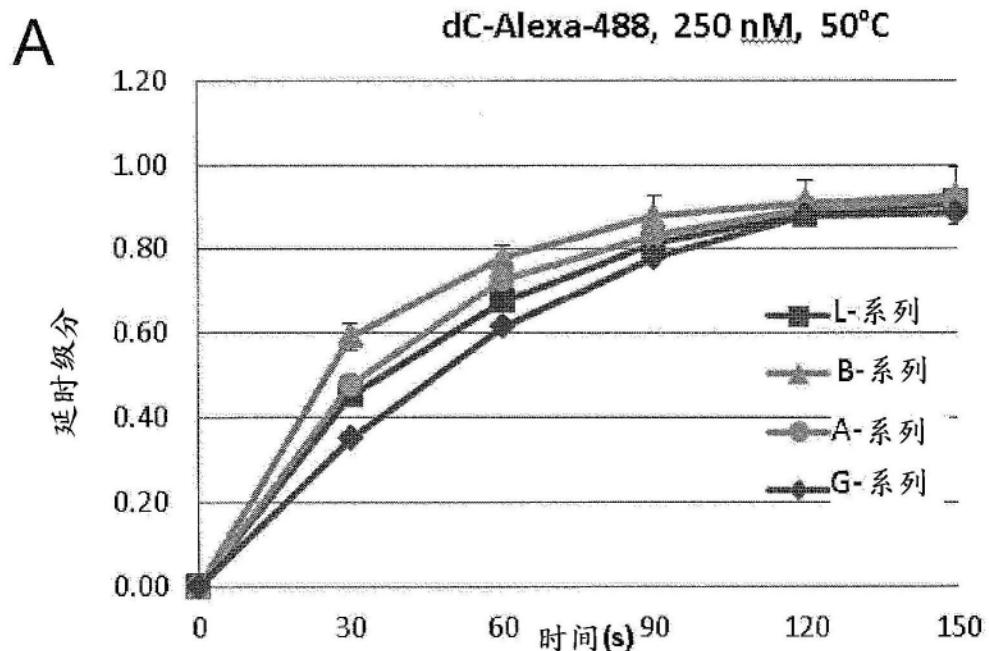


图31



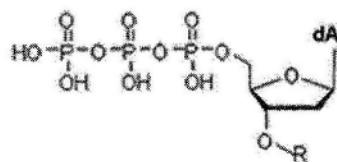
B

250 nM	AVG 率 s^{-1}
dC-Alexa-488 L- 系列	0.021
dC-Alexa-488 B- 系列	0.032
dC-Alexa-488 A- 系列	0.024
dC-Alexa-488 G- 系列	0.015

C

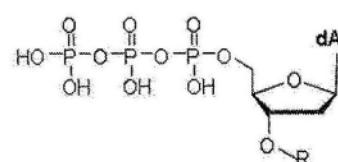
	率 s^{-1}	125nM	250nM	500nM
dC-Alexa-488 B- 系列	0.0021	0.003	0.0051	
dC-Alexa-488 A- 系列	0.0015	0.0021	0.0024	
dC-Alexa-488 L- 系列	0.0009	0.0015	0.0035	
dC-Alexa-488 G- 系列	0.0013	0.0022	0.0033	

图32



其中 $R =$

- CH₂-N₃
- CH₂-SS-Et (Et-O-SS-dA)
- CH₂-SS-Me (Me-O-SS-dA)



其中 $R =$

- CH₂-N₃
- CH₂-SS-Et
- CH₂-SS-Me

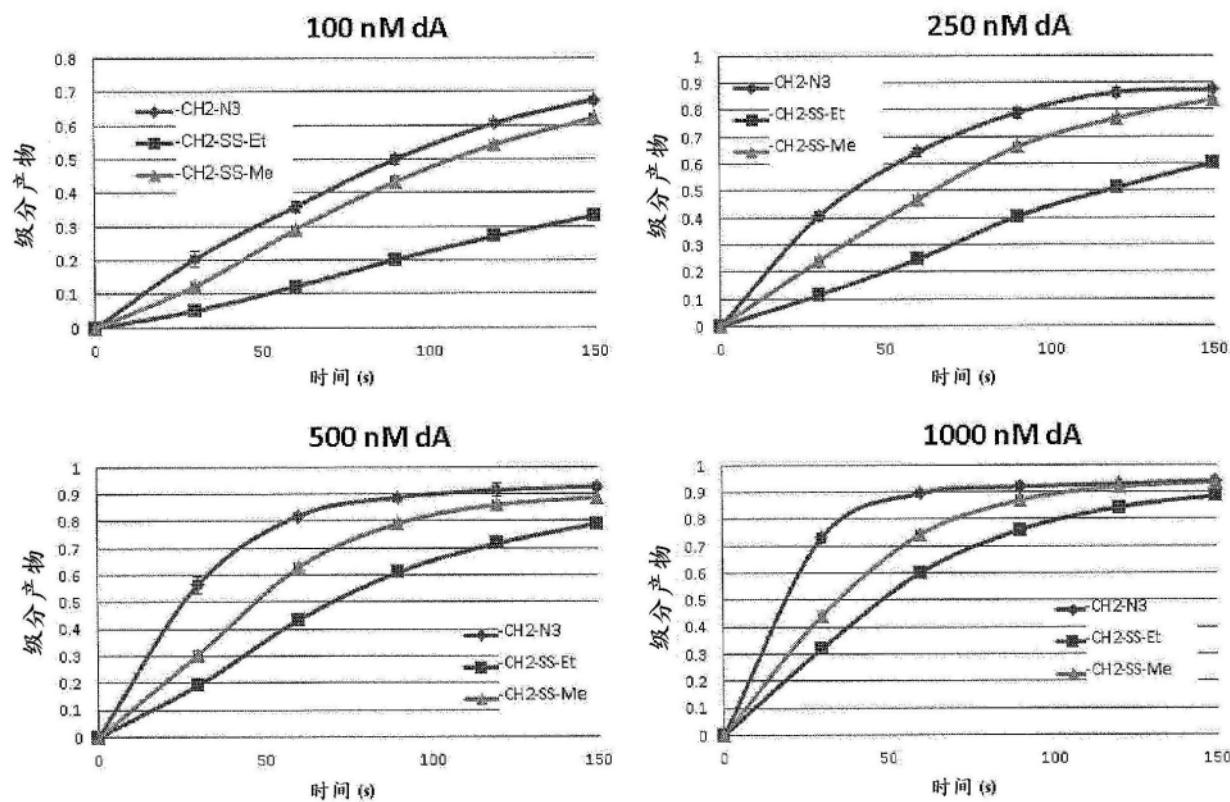


图33

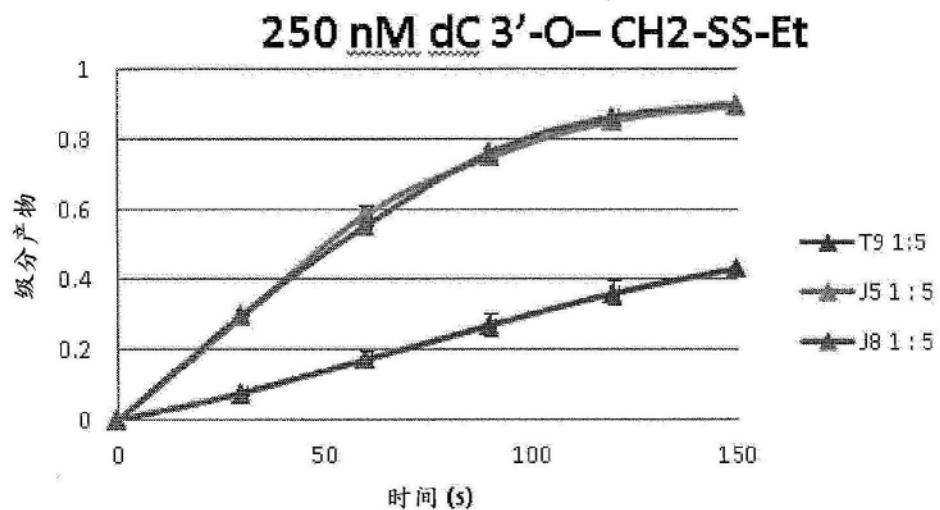


图34

	L-系列 (96)	G-系列 (99)	A-系列 (98)
标记的 C	400	250	180
标记的 T	30	22.5	90
标记的 A	100	150	120
标记的 G	100	80	120
未标记的 C	2000	2000	2000
未标记的 T	2000	2000	2000
未标记的 A	1000	1000	1000
未标记的 G	500	500	500

图35

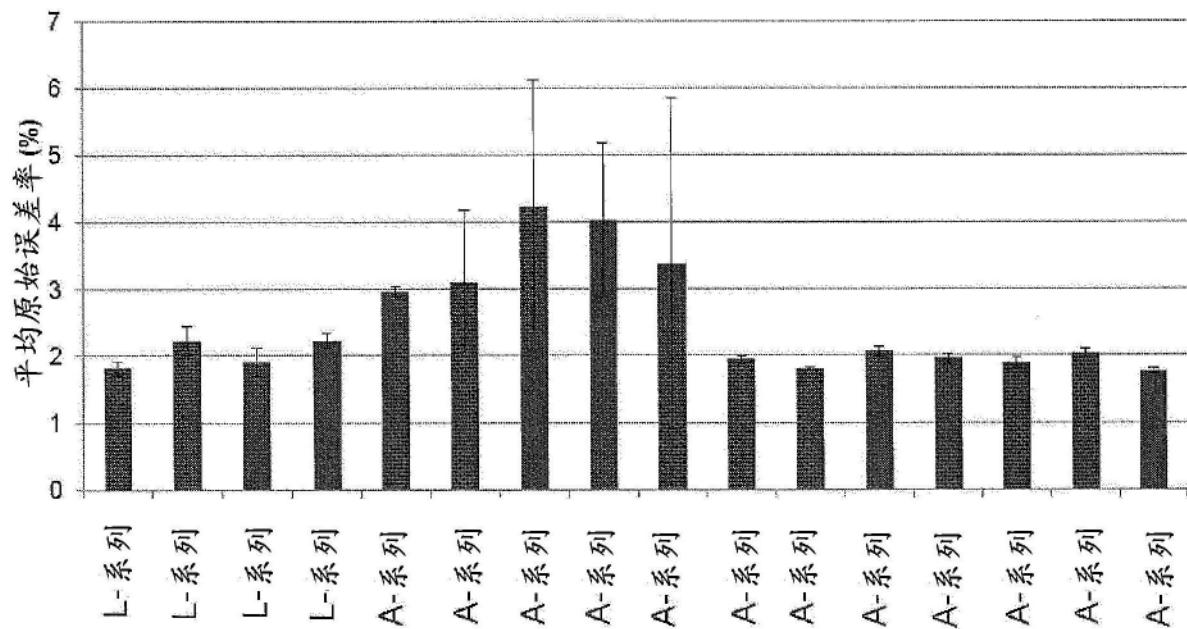


图36

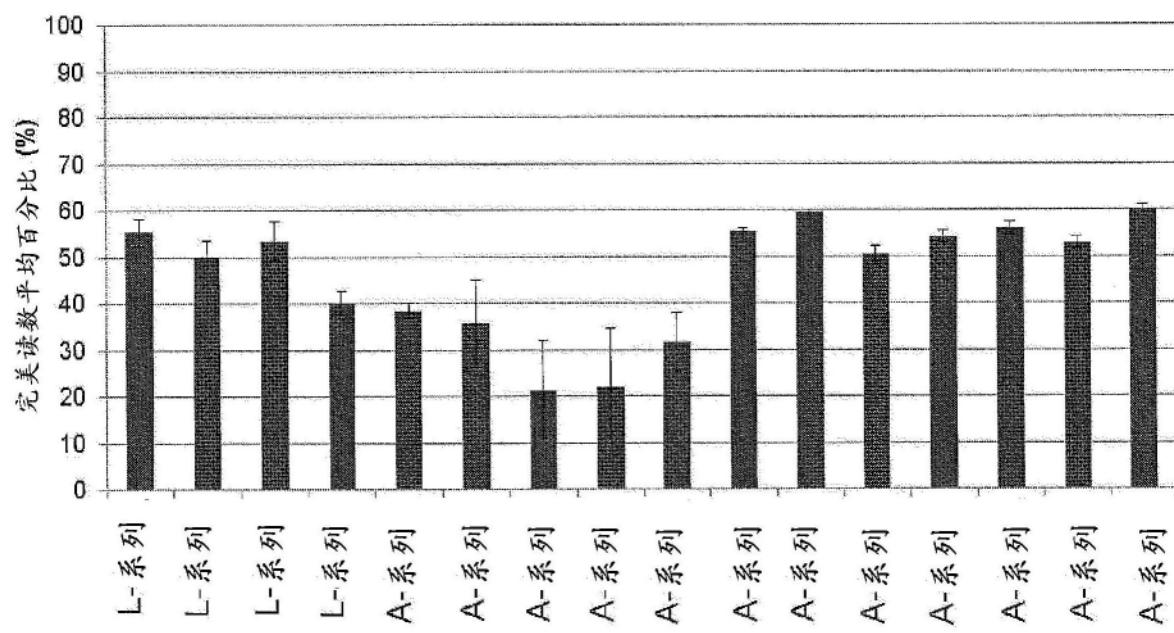


图37

2条件ANOVA L-系列 vs A-系列

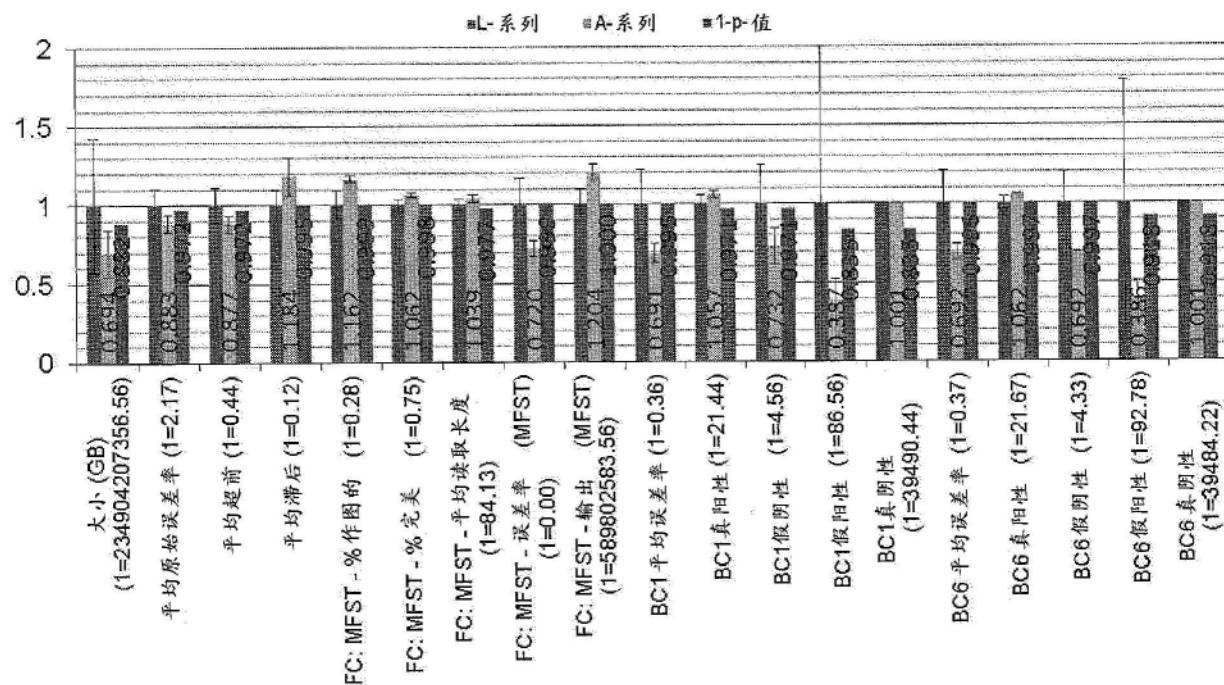


图38

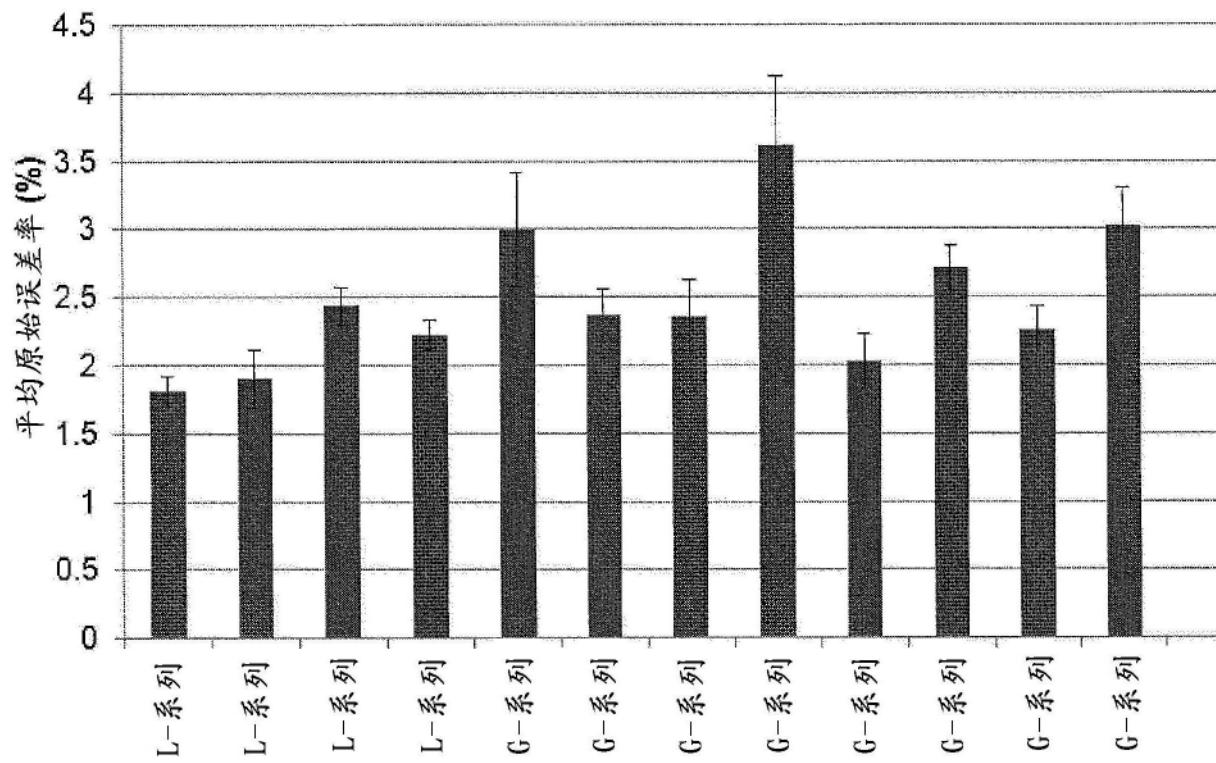


图39

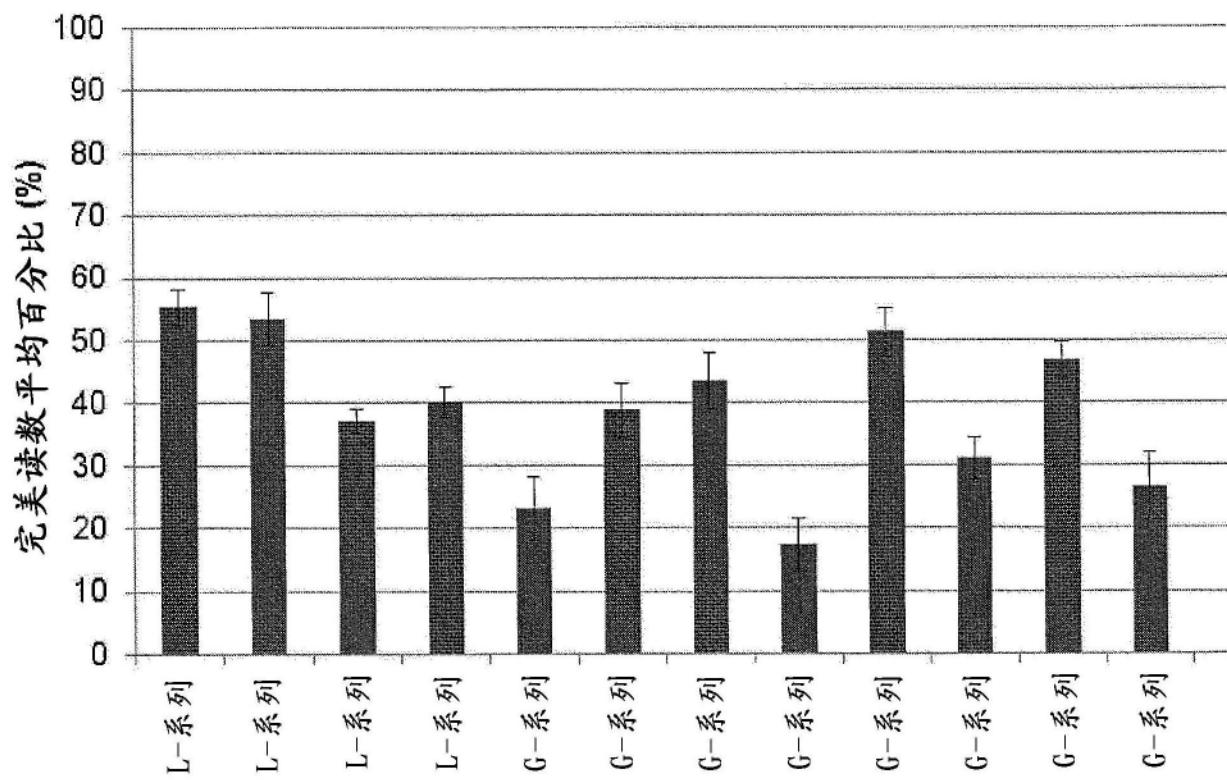


图40

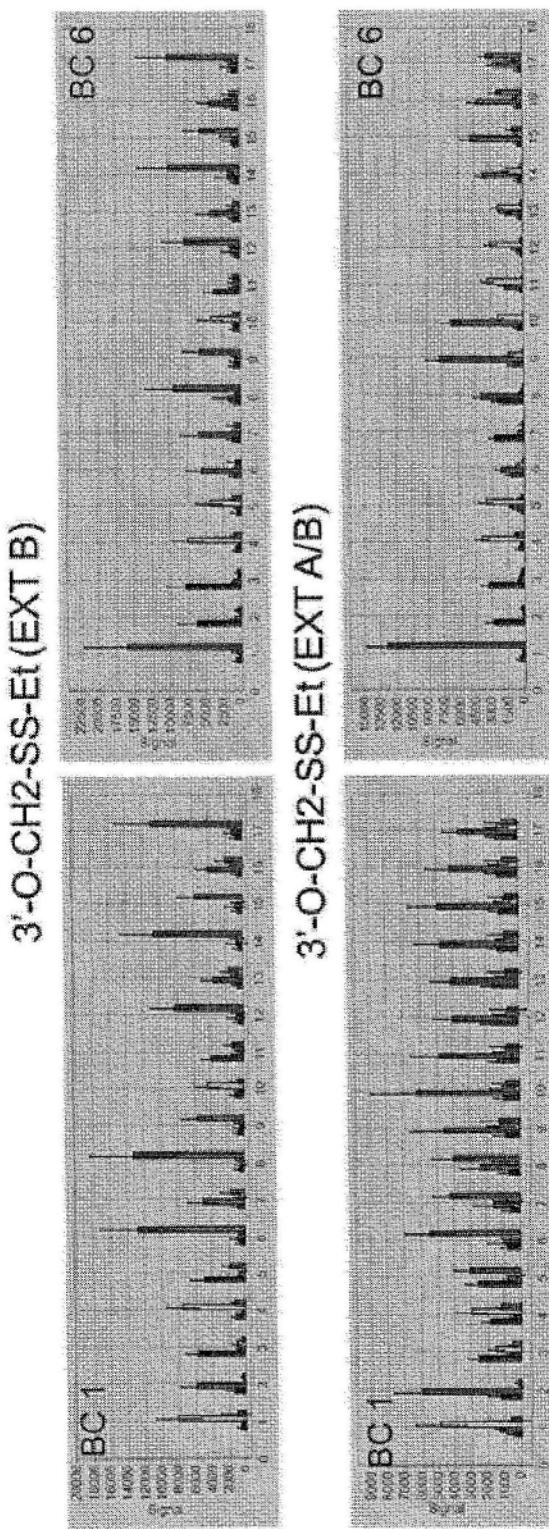


图41

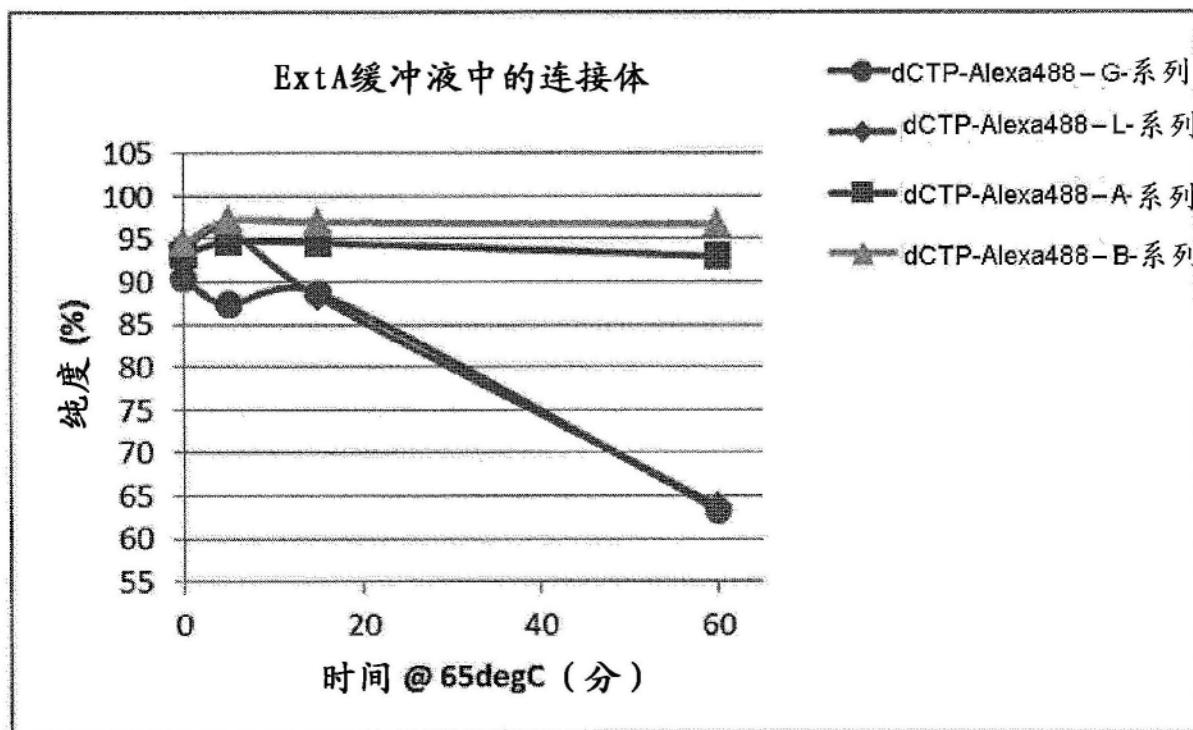


图42

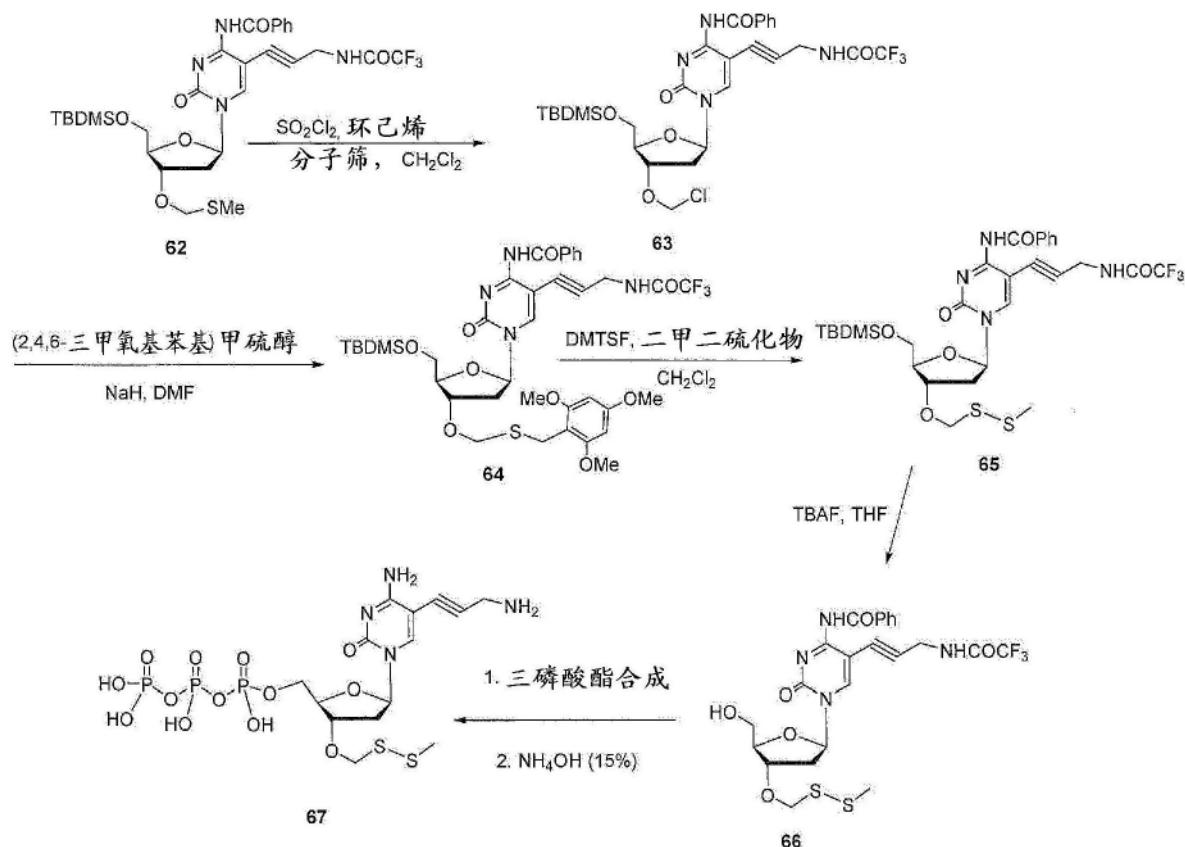


图43

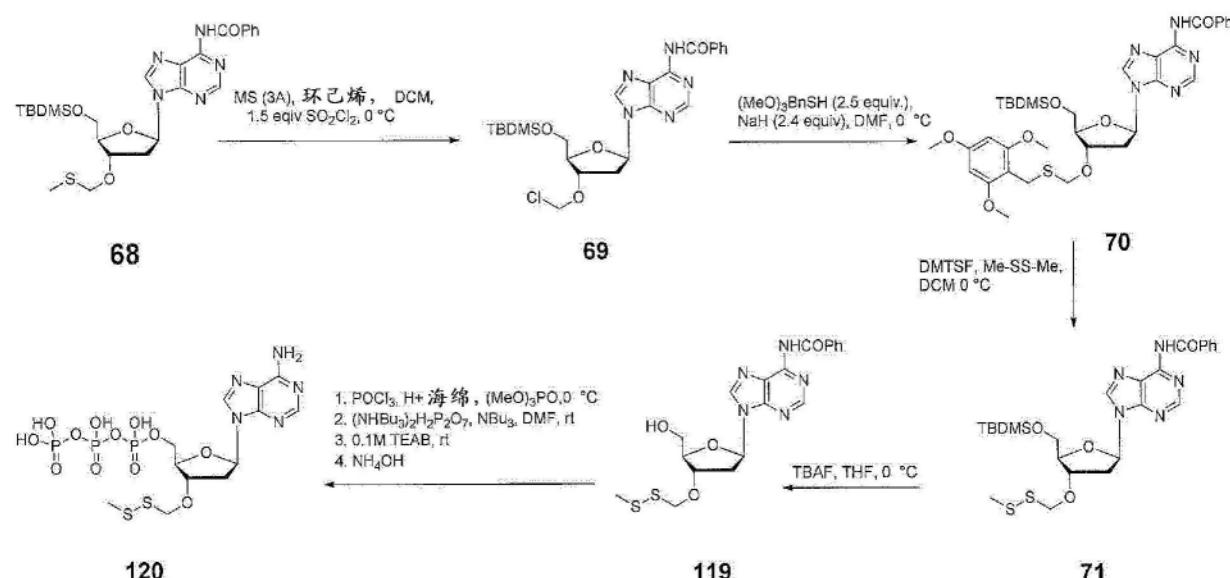


图44

A-系列

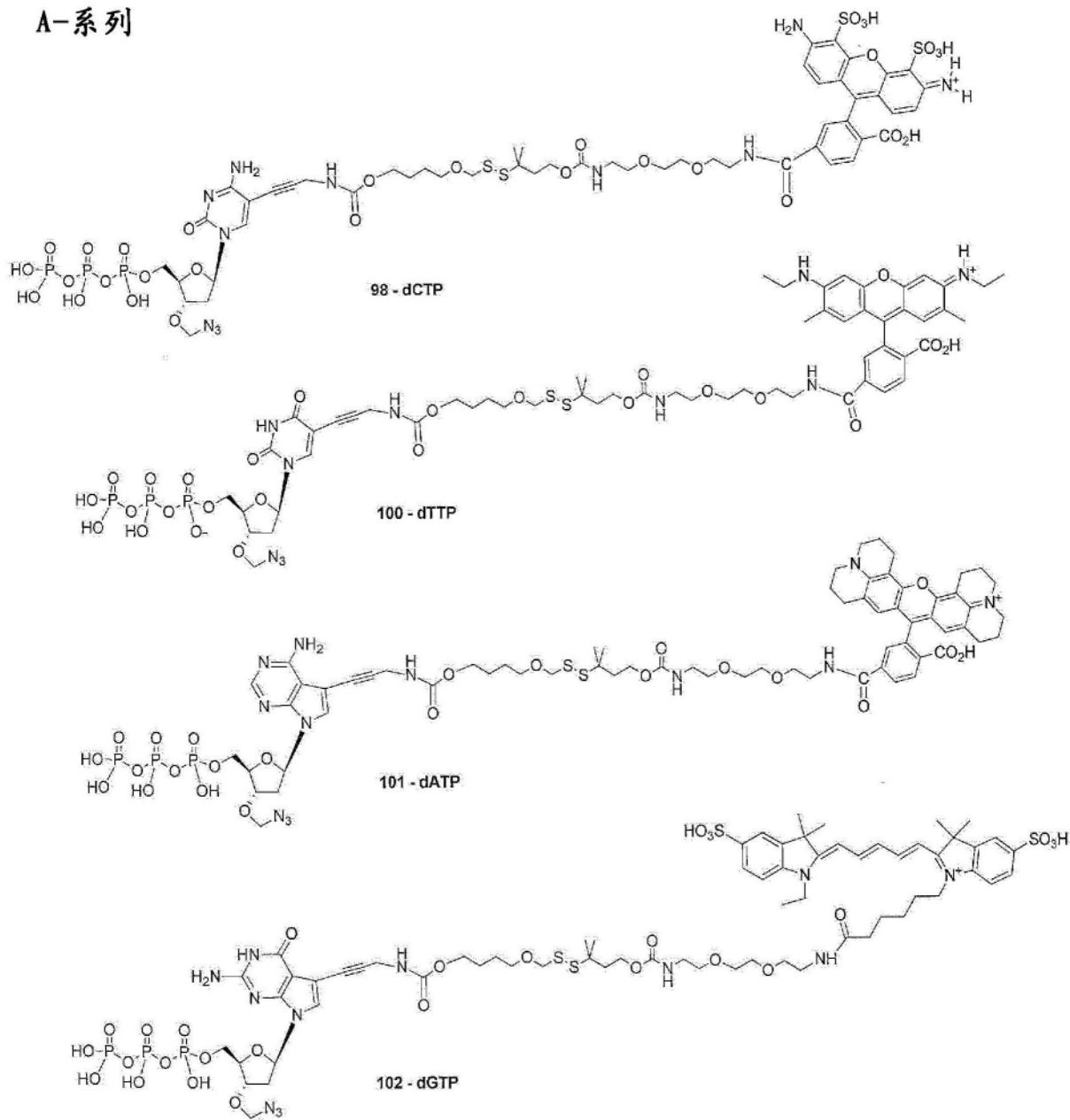


图45

G-系列

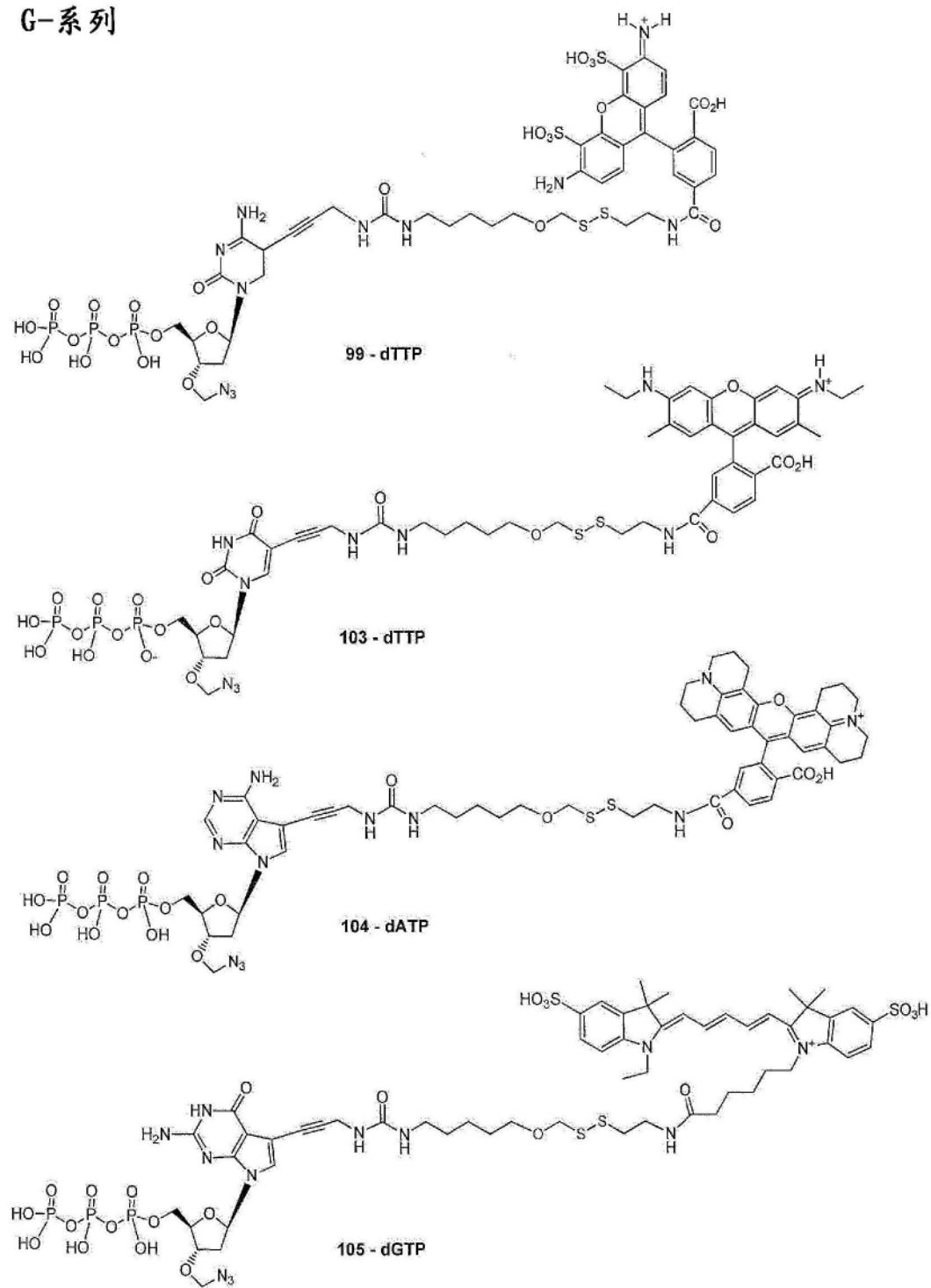


图46

L-系列

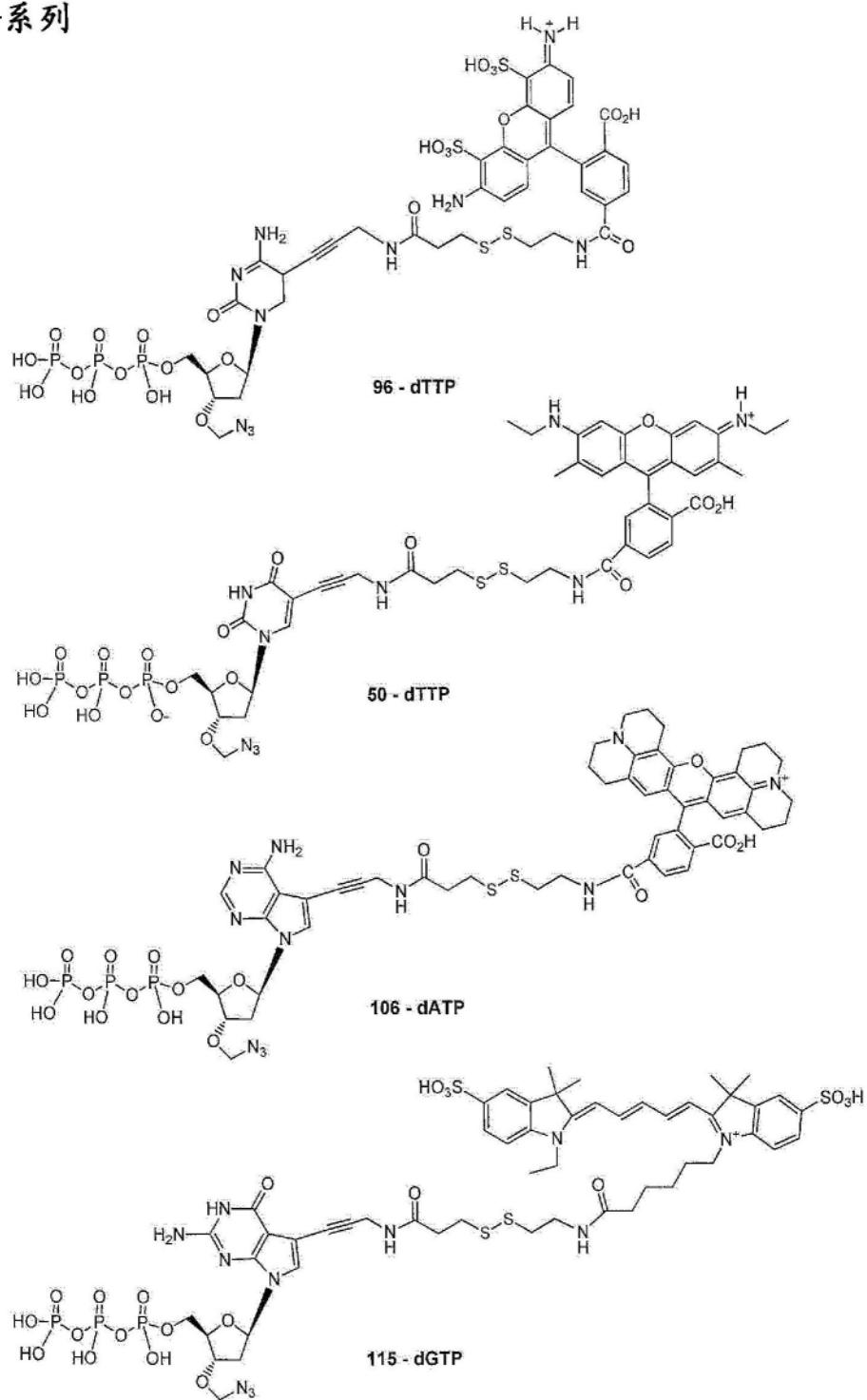


图47

B-系列

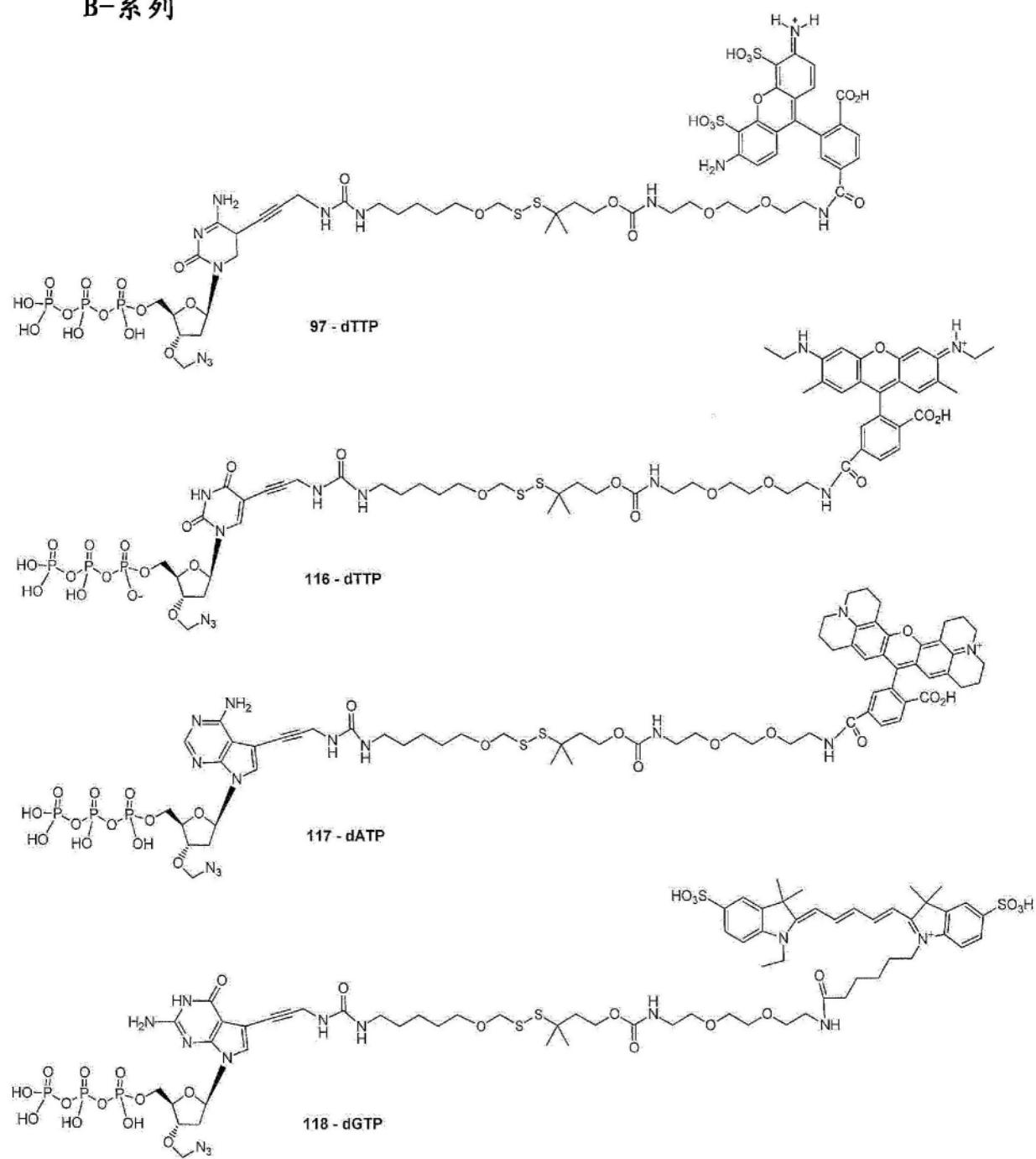


图48

	浓度 [nM]	化合物 编号
标记的 C	180	72
标记的 T	270	74
标记的 A	360	76
标记的 G	120	78
未标记的 C	2000	126
未标记的 T	2000	138
未标记的 A	1000	73
未标记的 G	500	132

图49

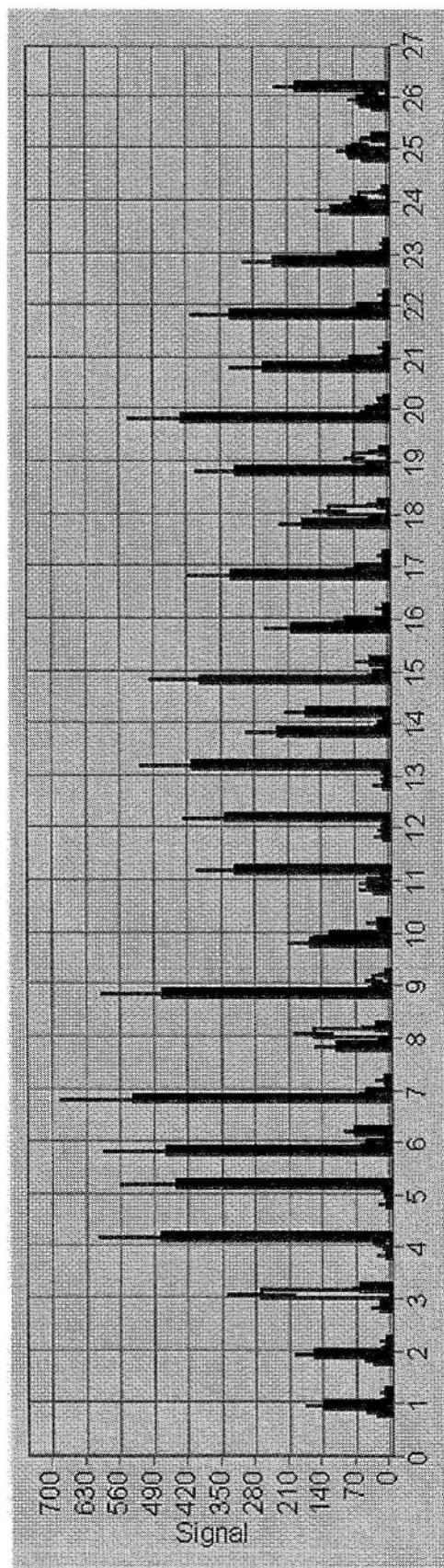


图50

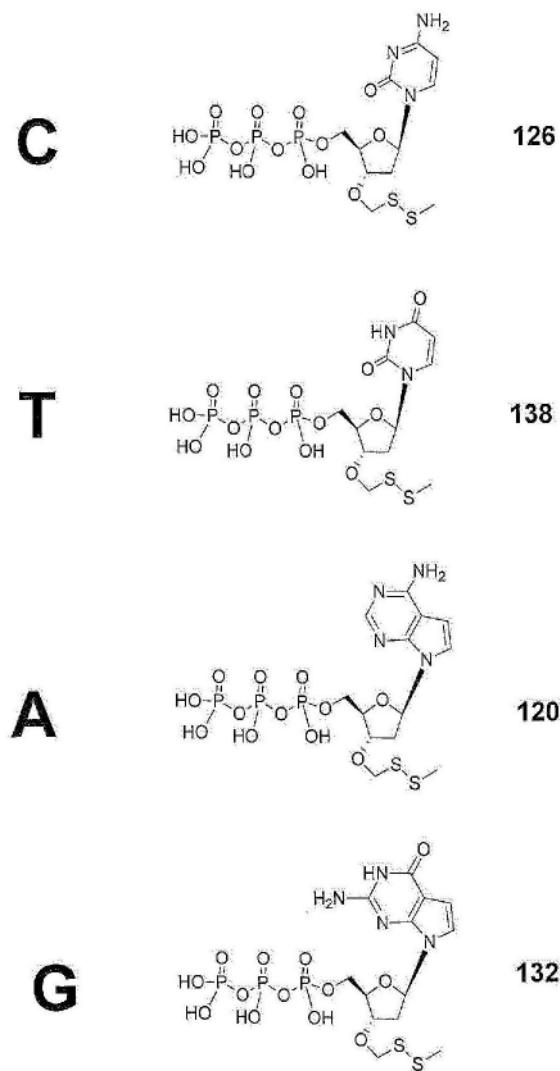


图51

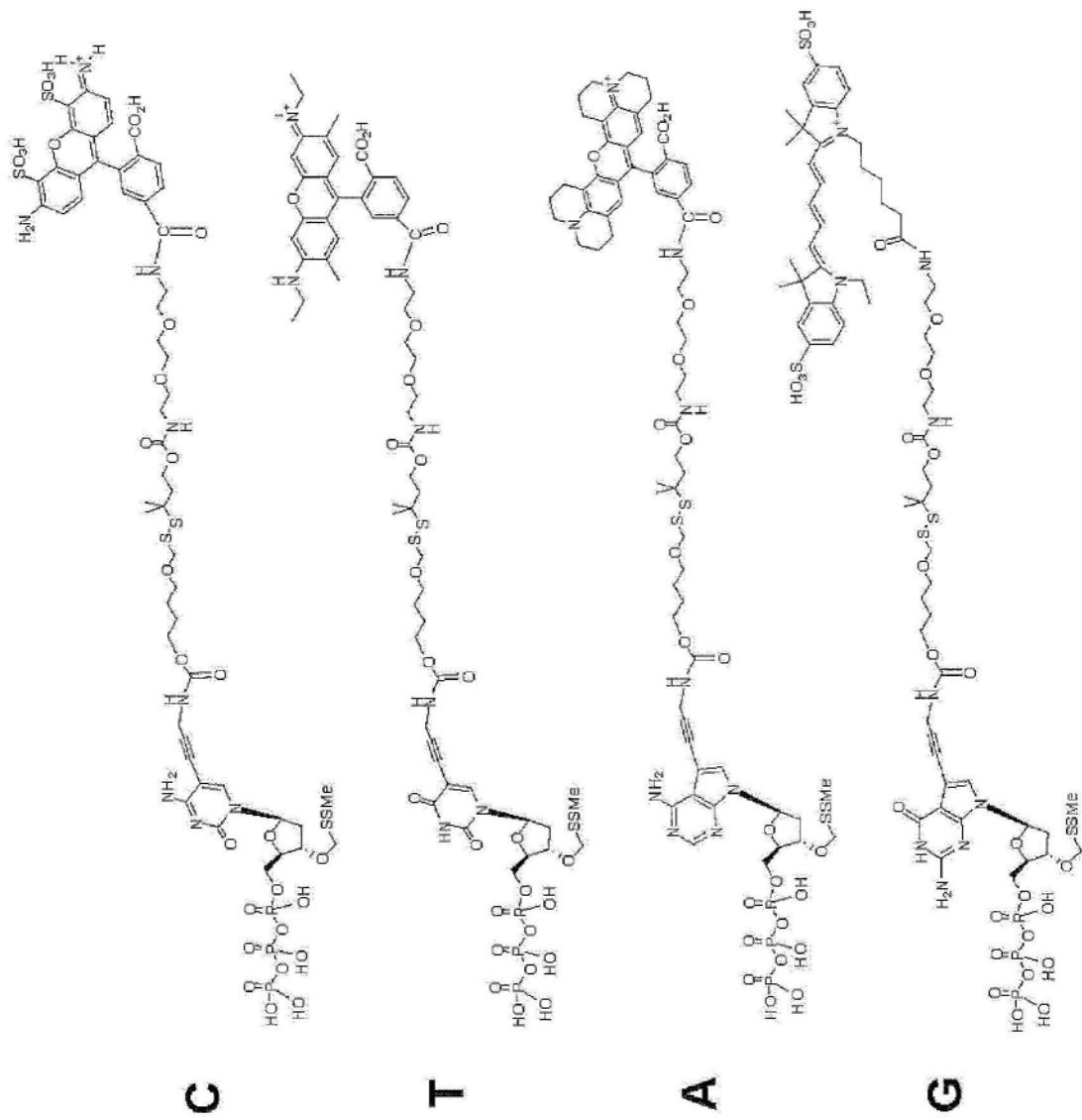


图52

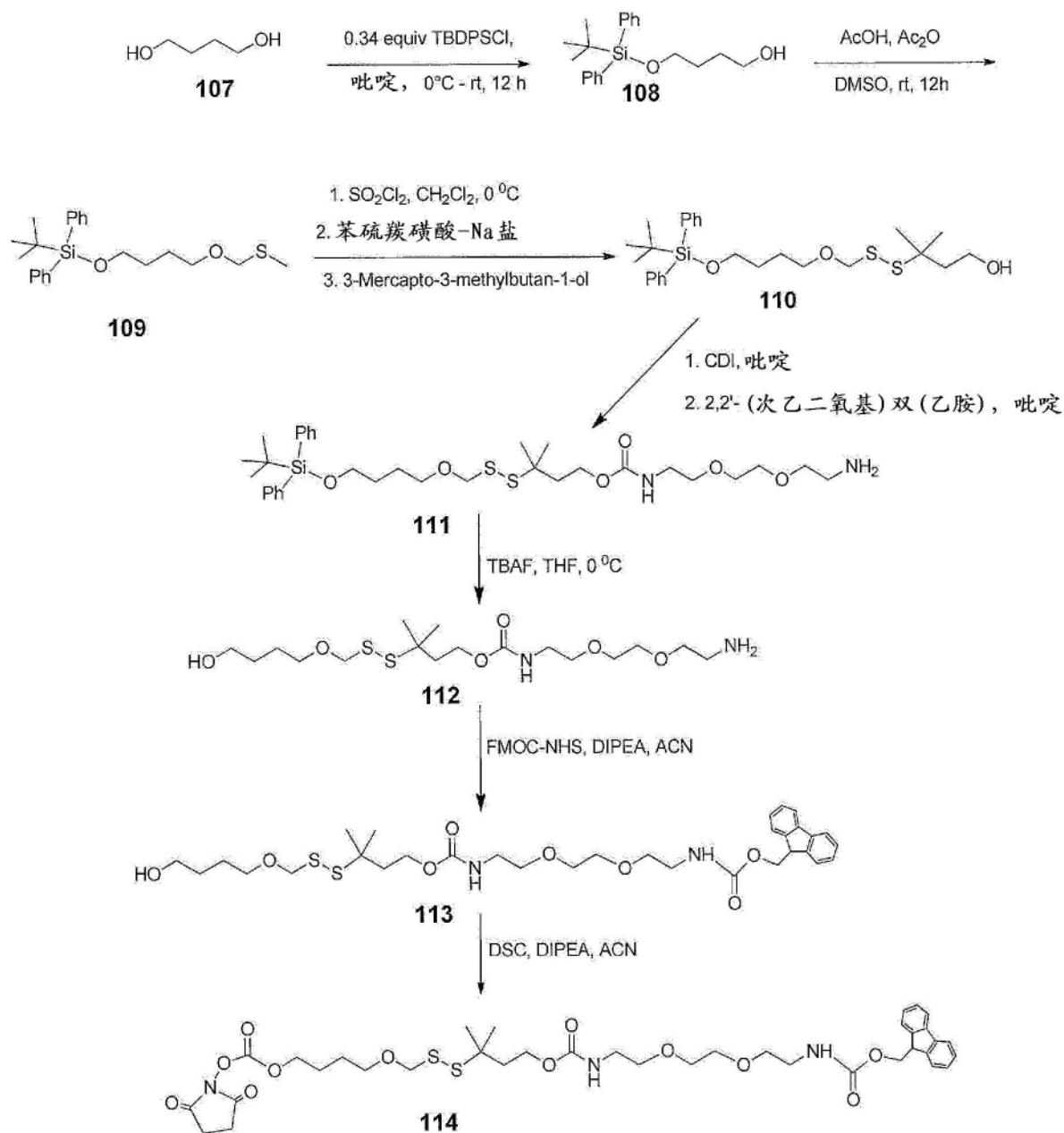


图53

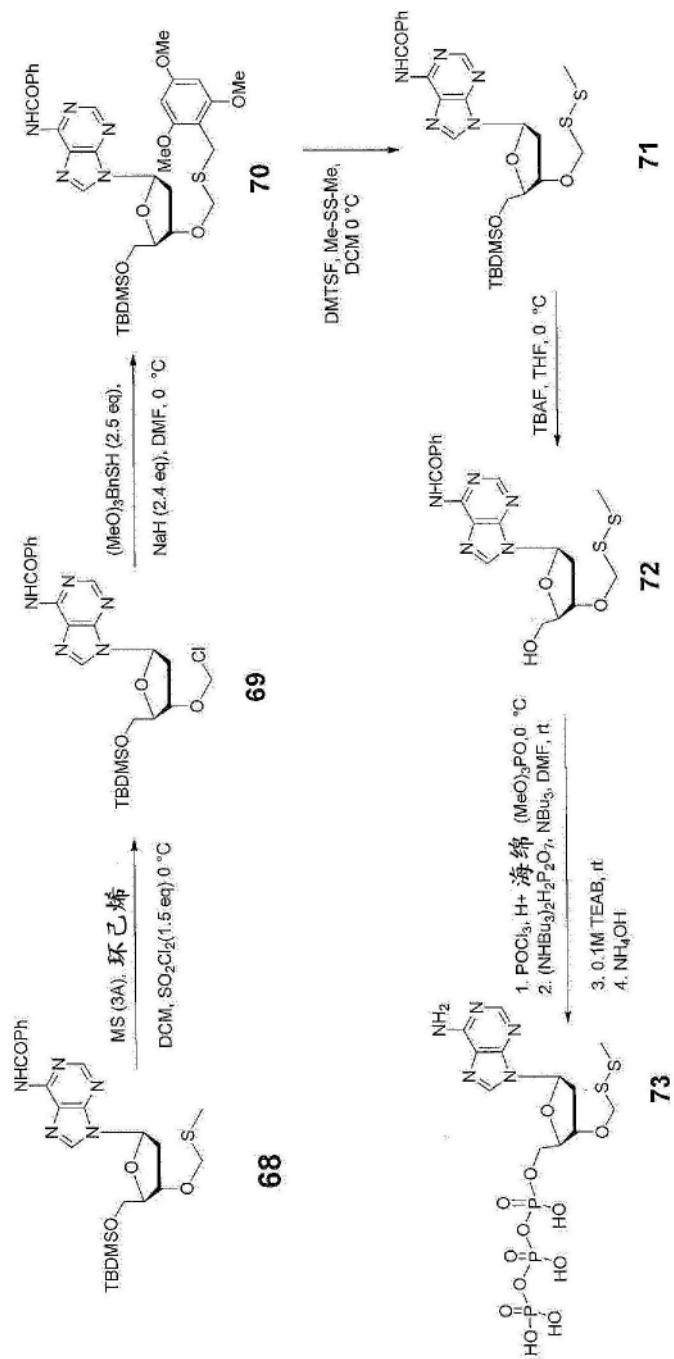


图54

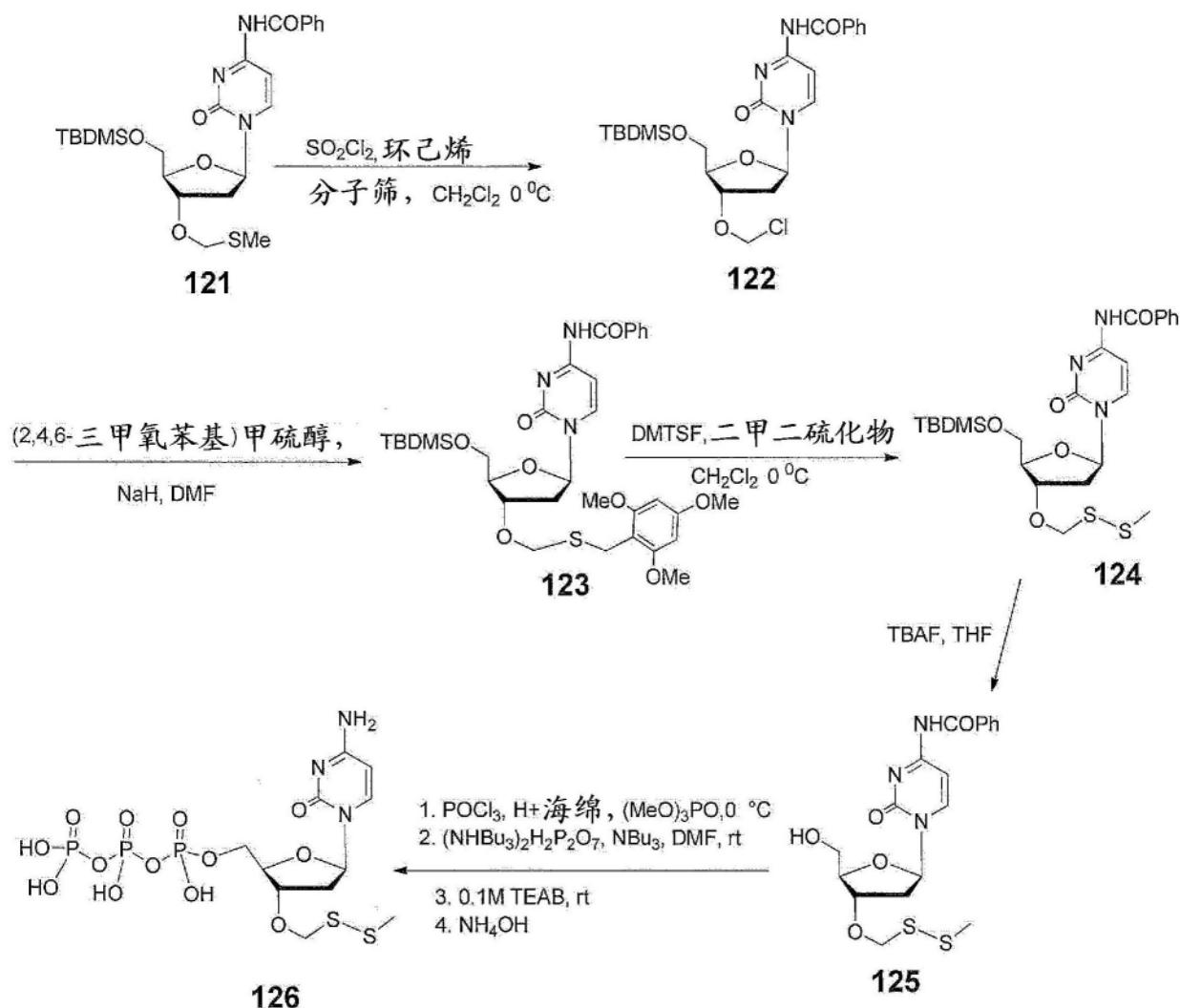


图55

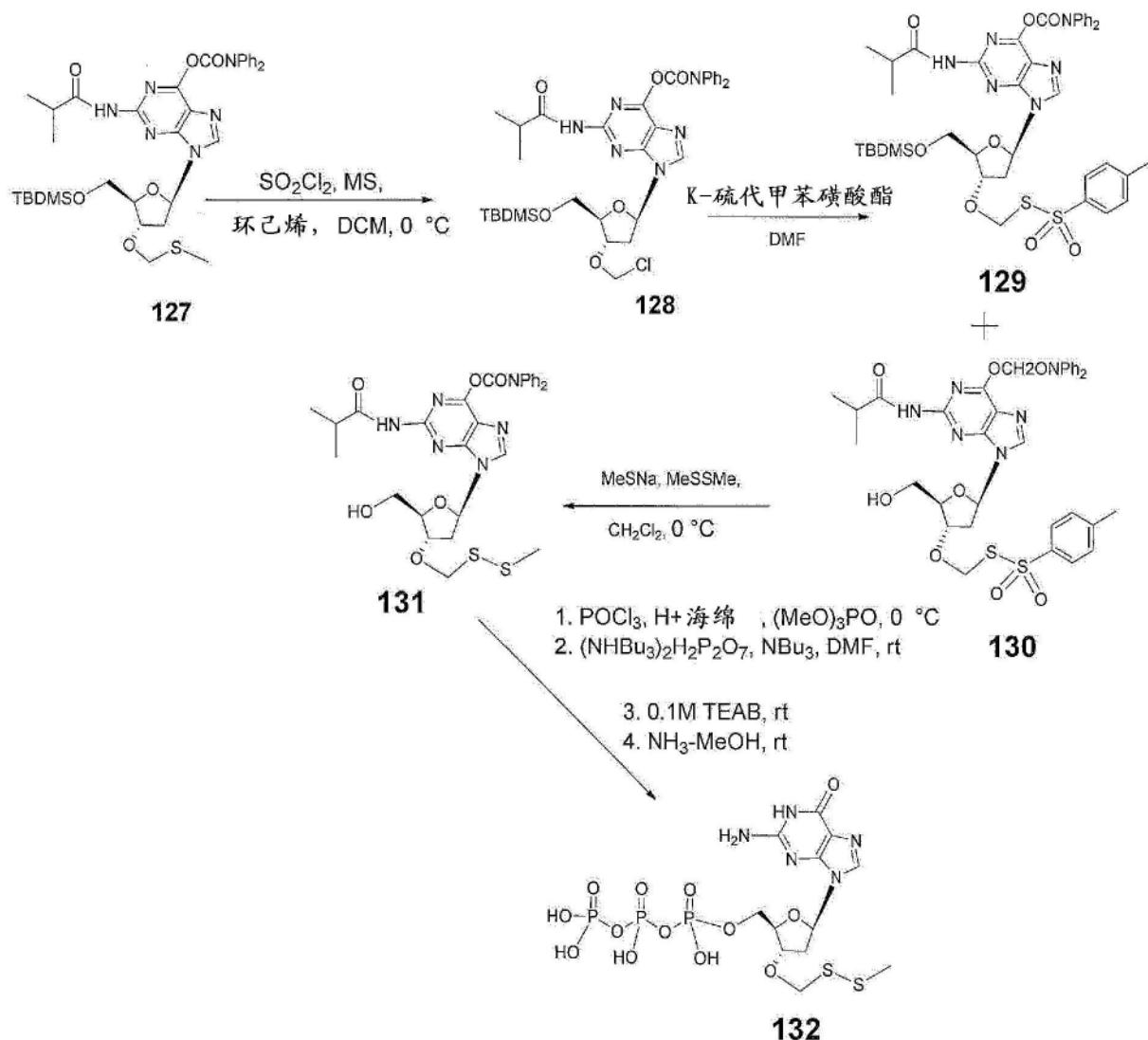


图56

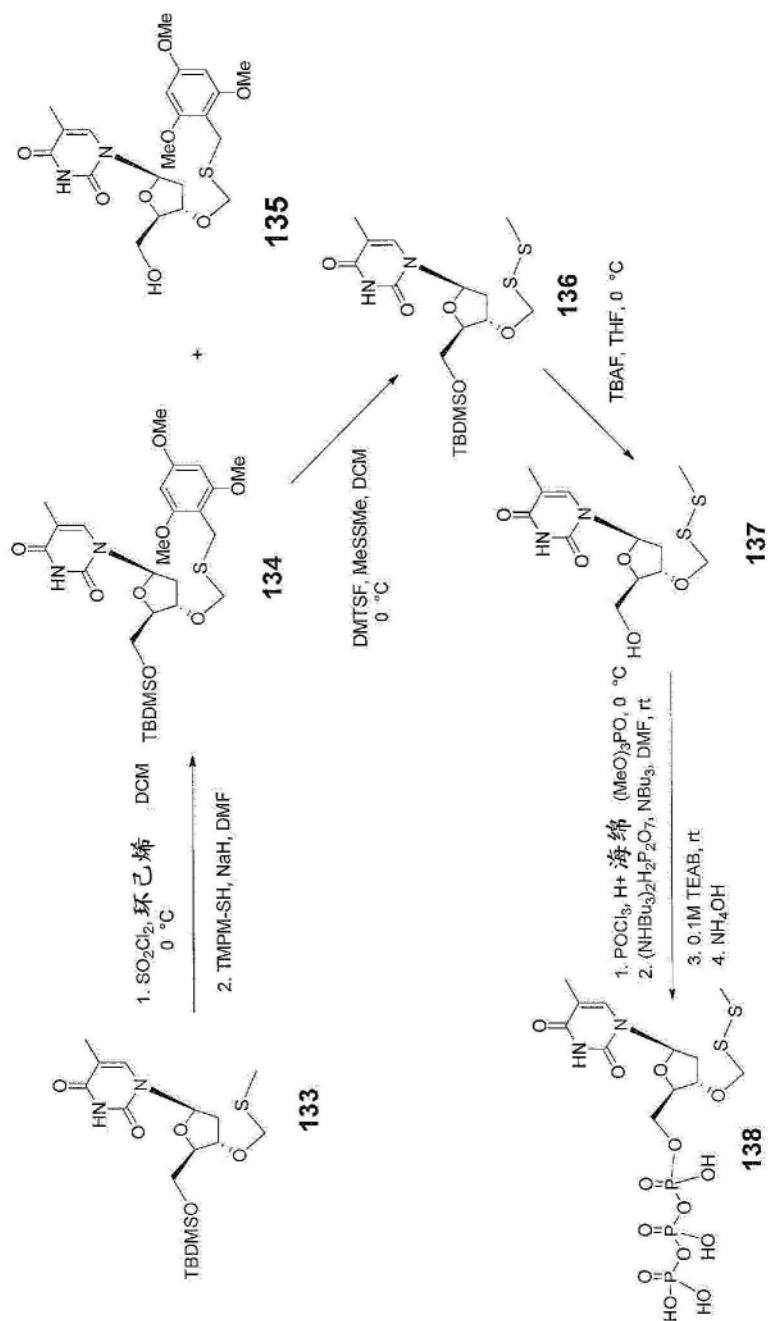


图57

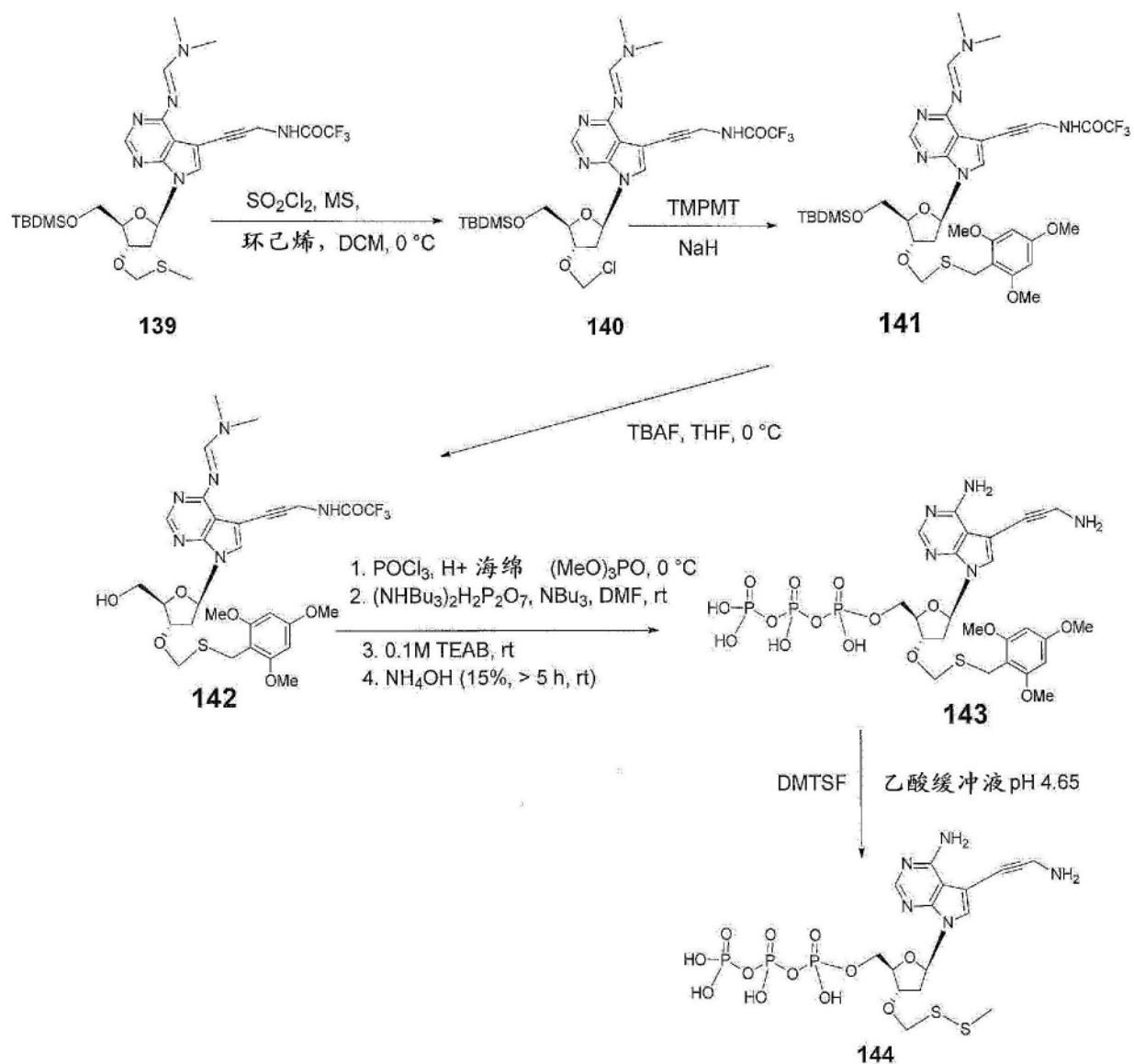


图58

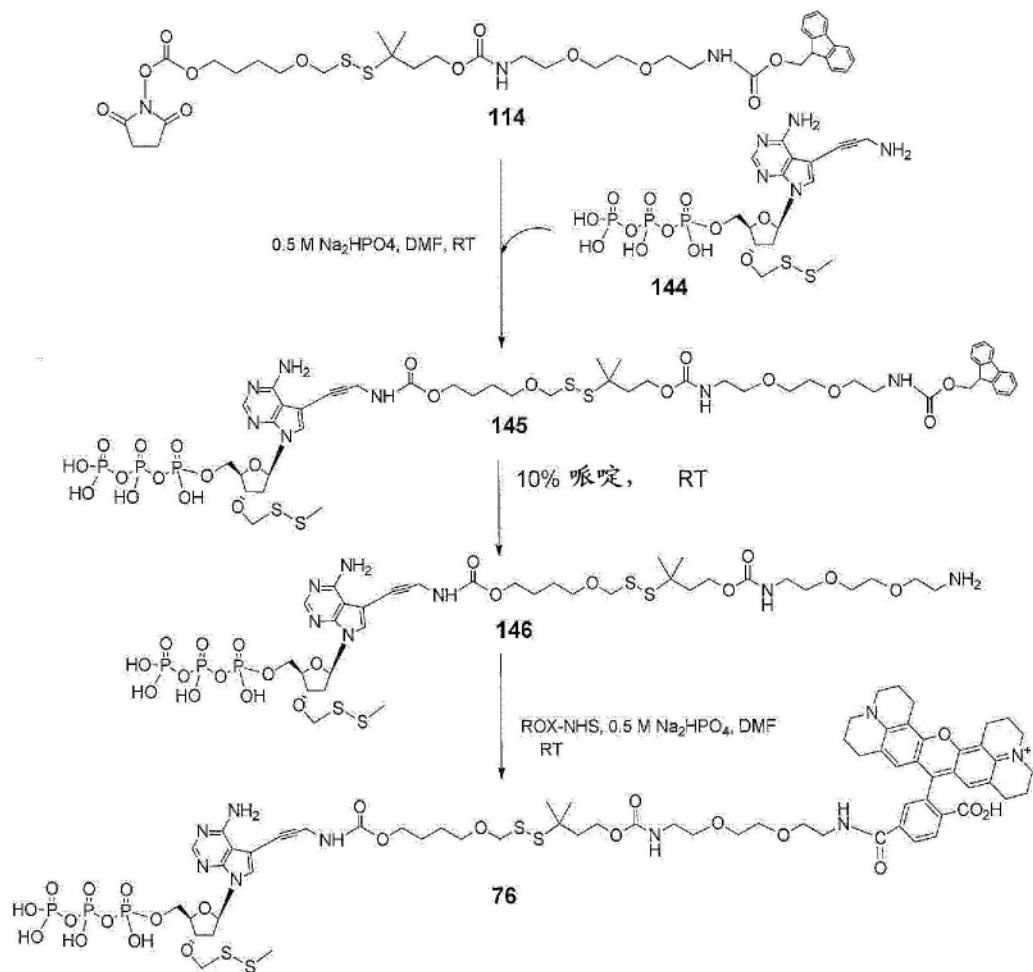


图59

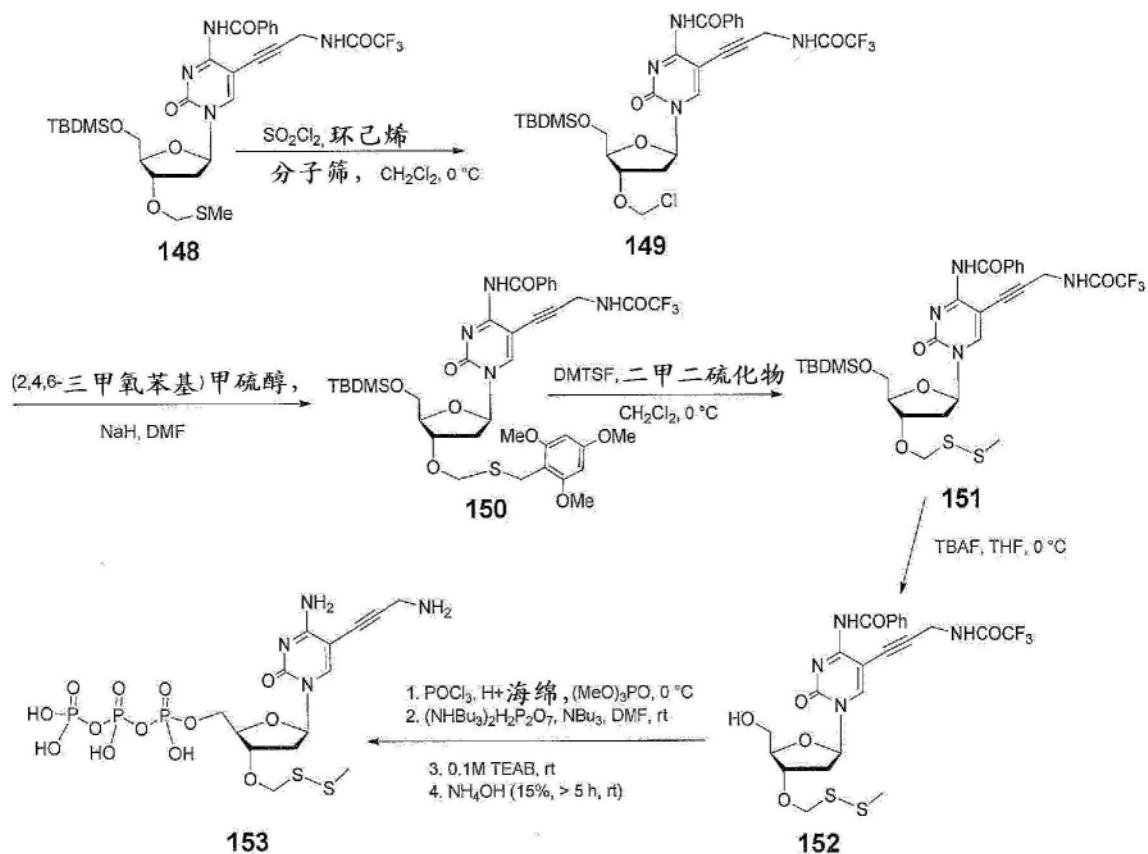


图60

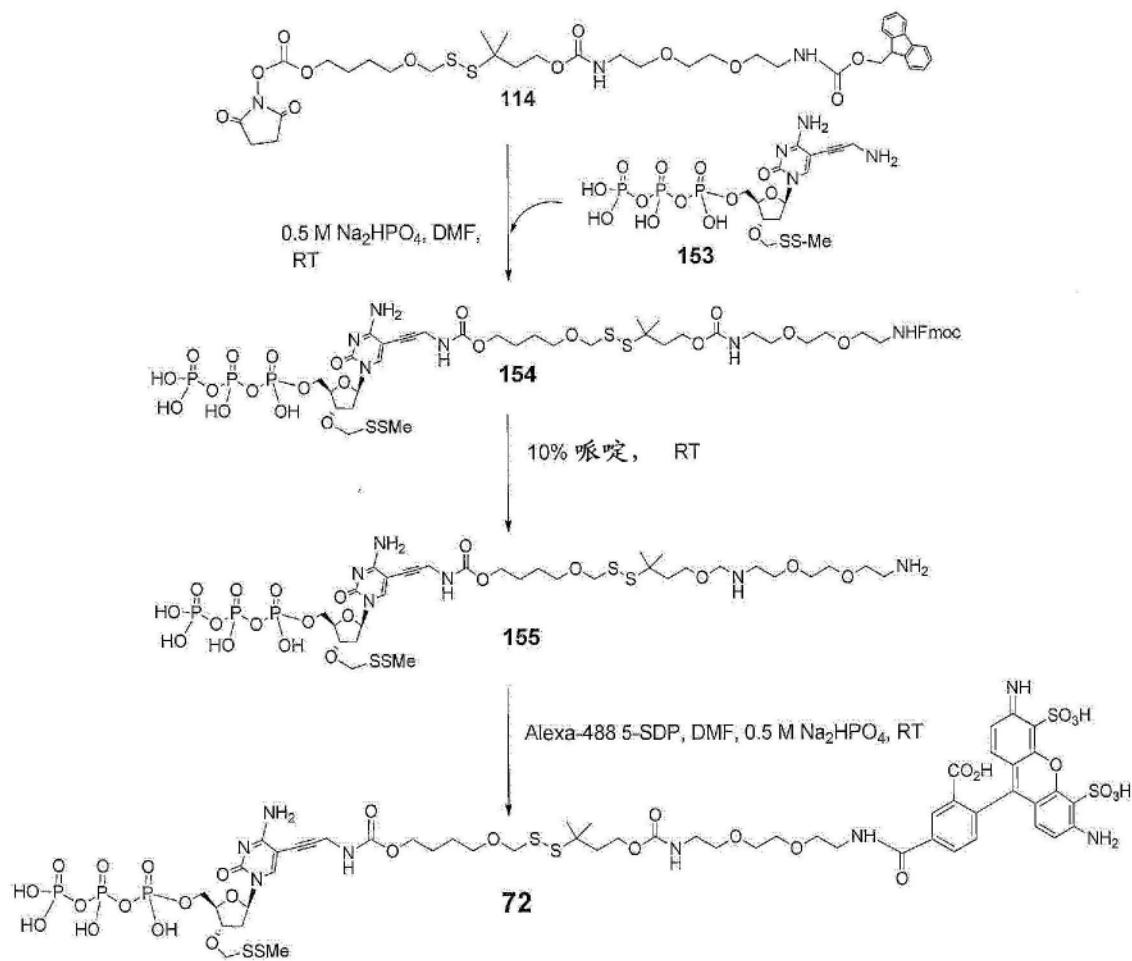


图61

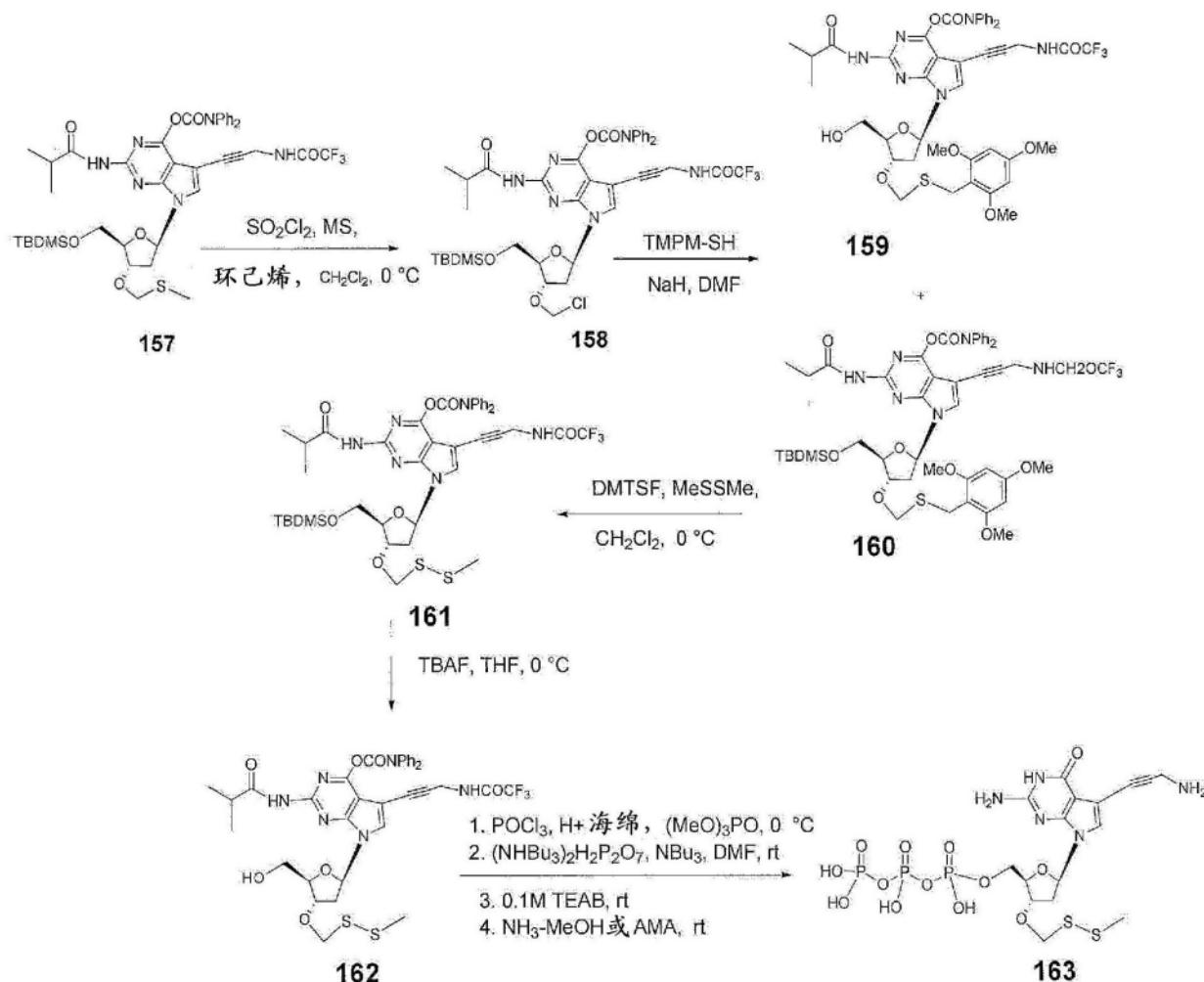


图62

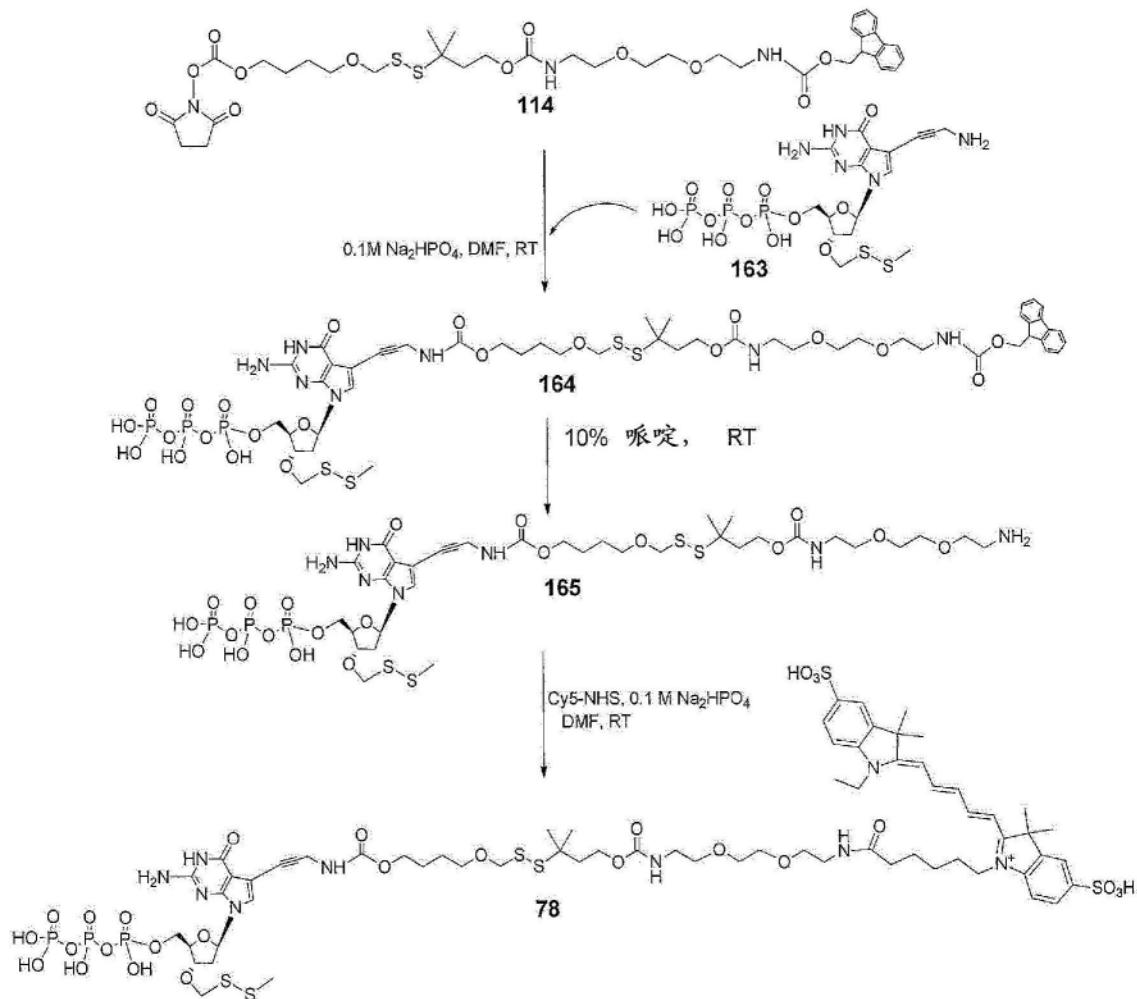


图63

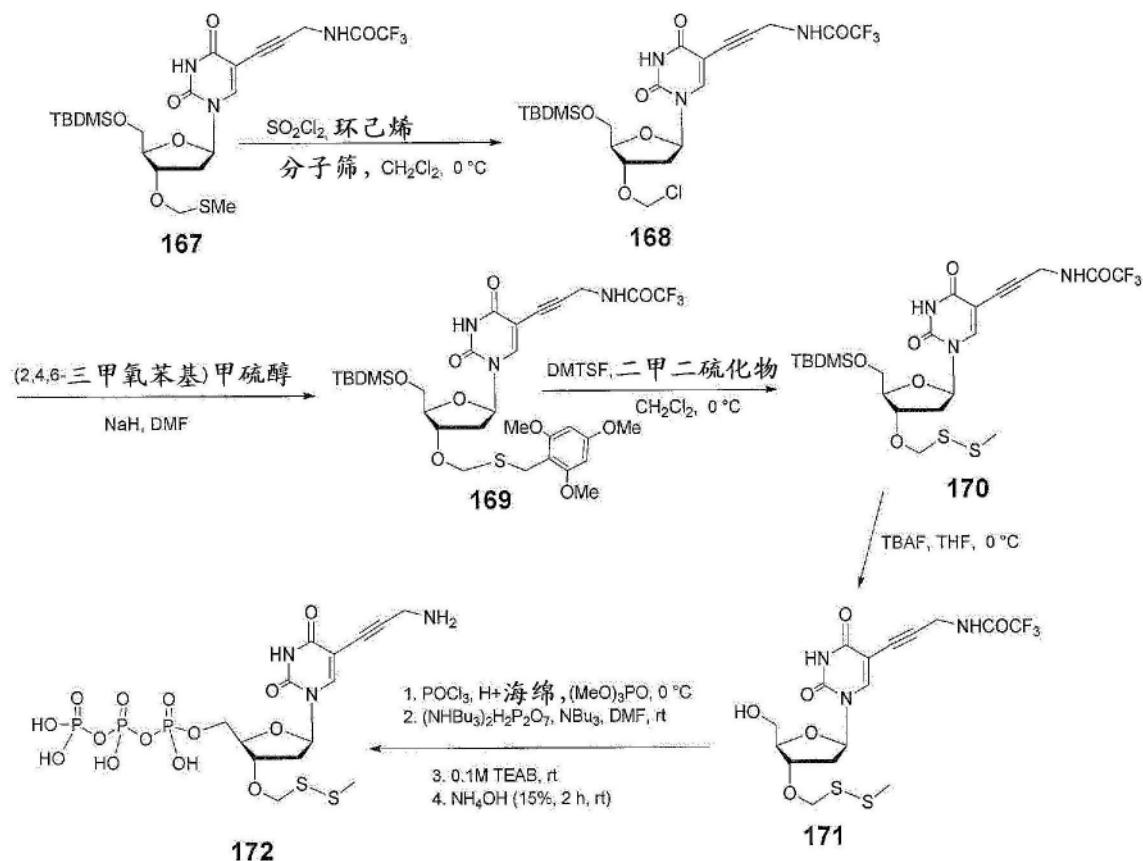


图64

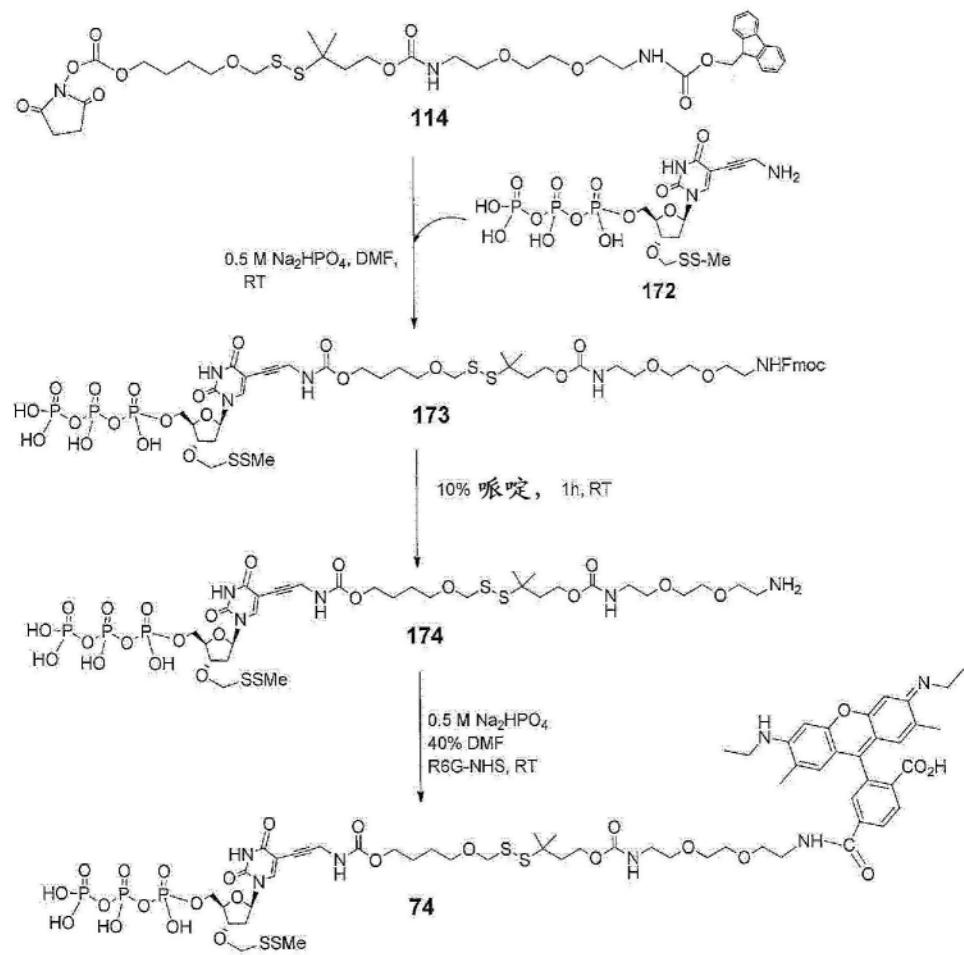


图65

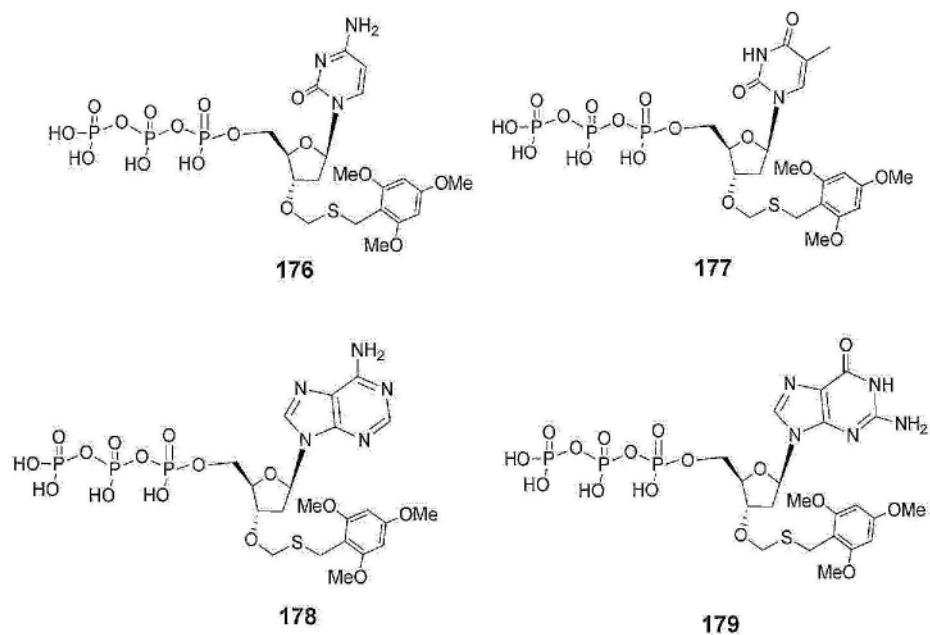


图66

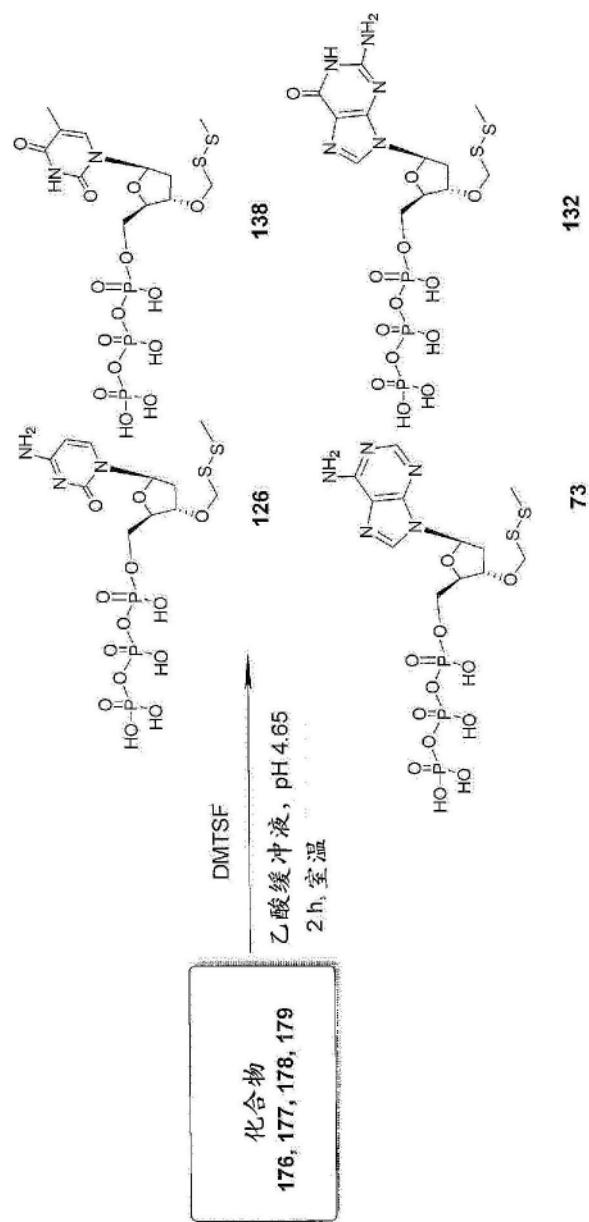
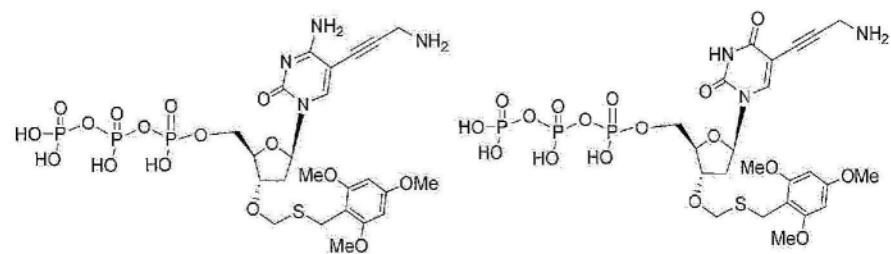
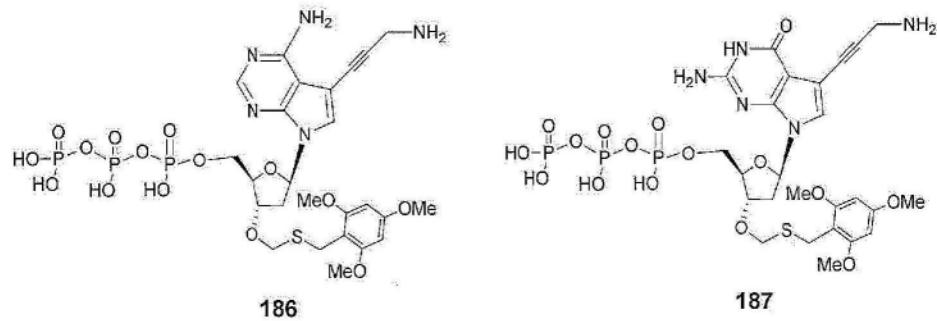


图67



184

185



186

187

图68

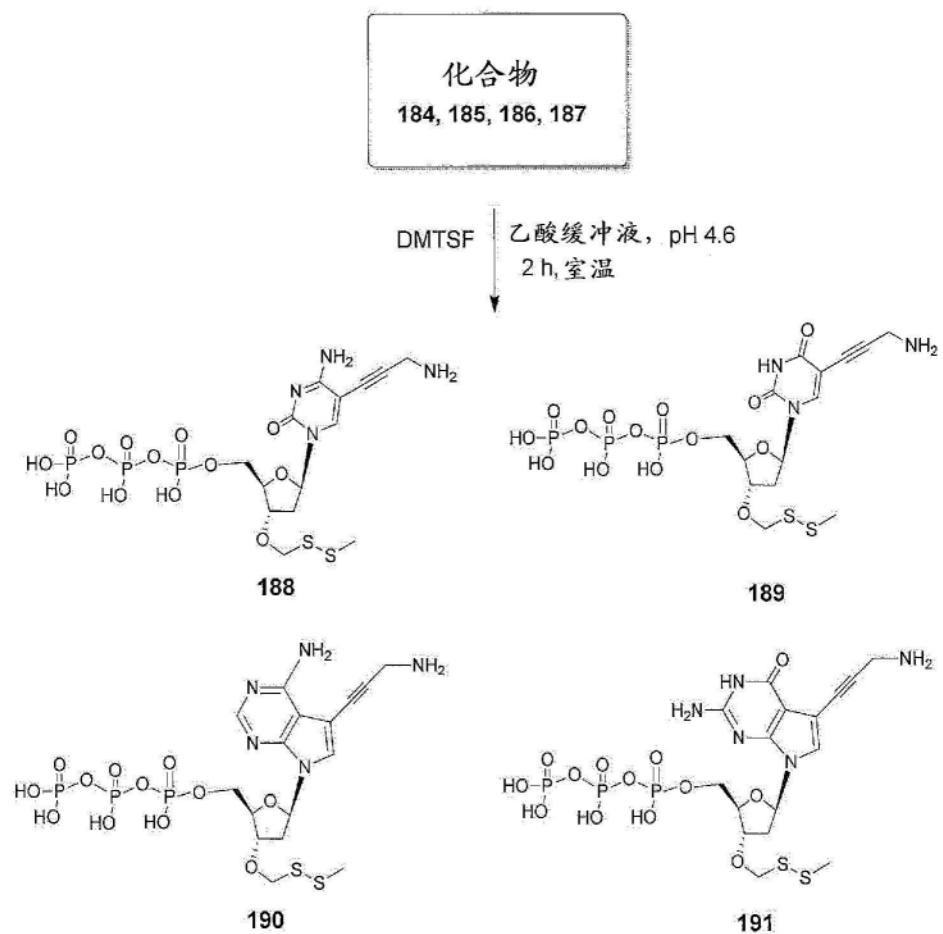


图69

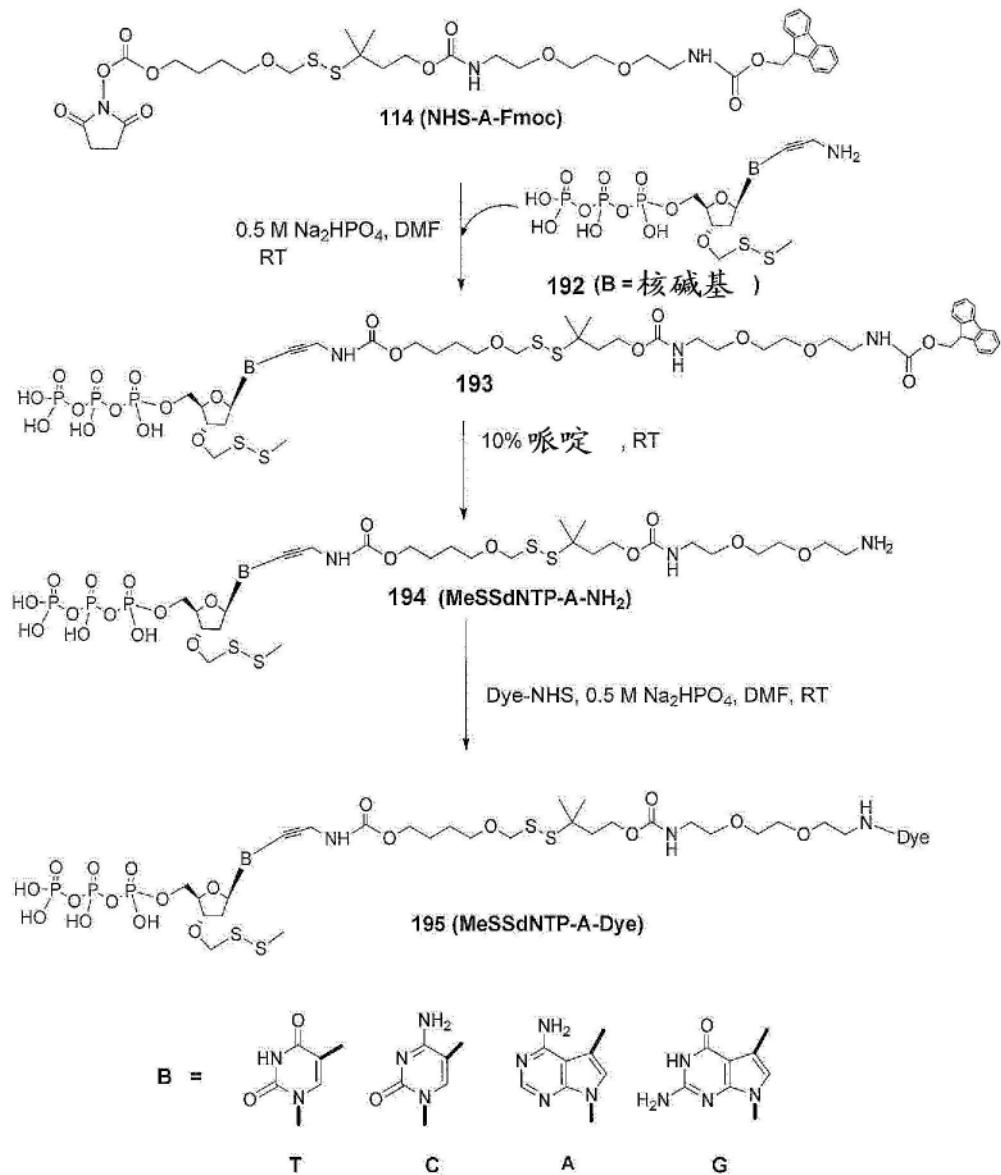


图70

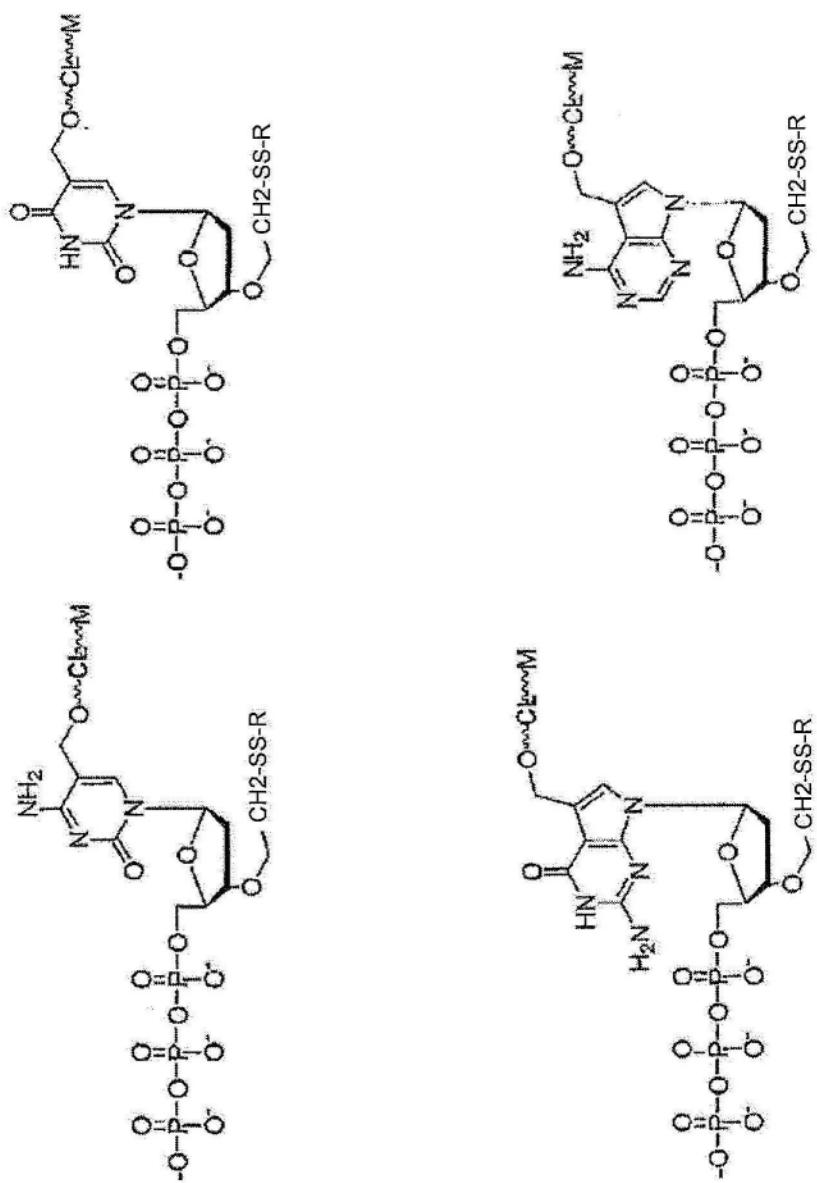


图71

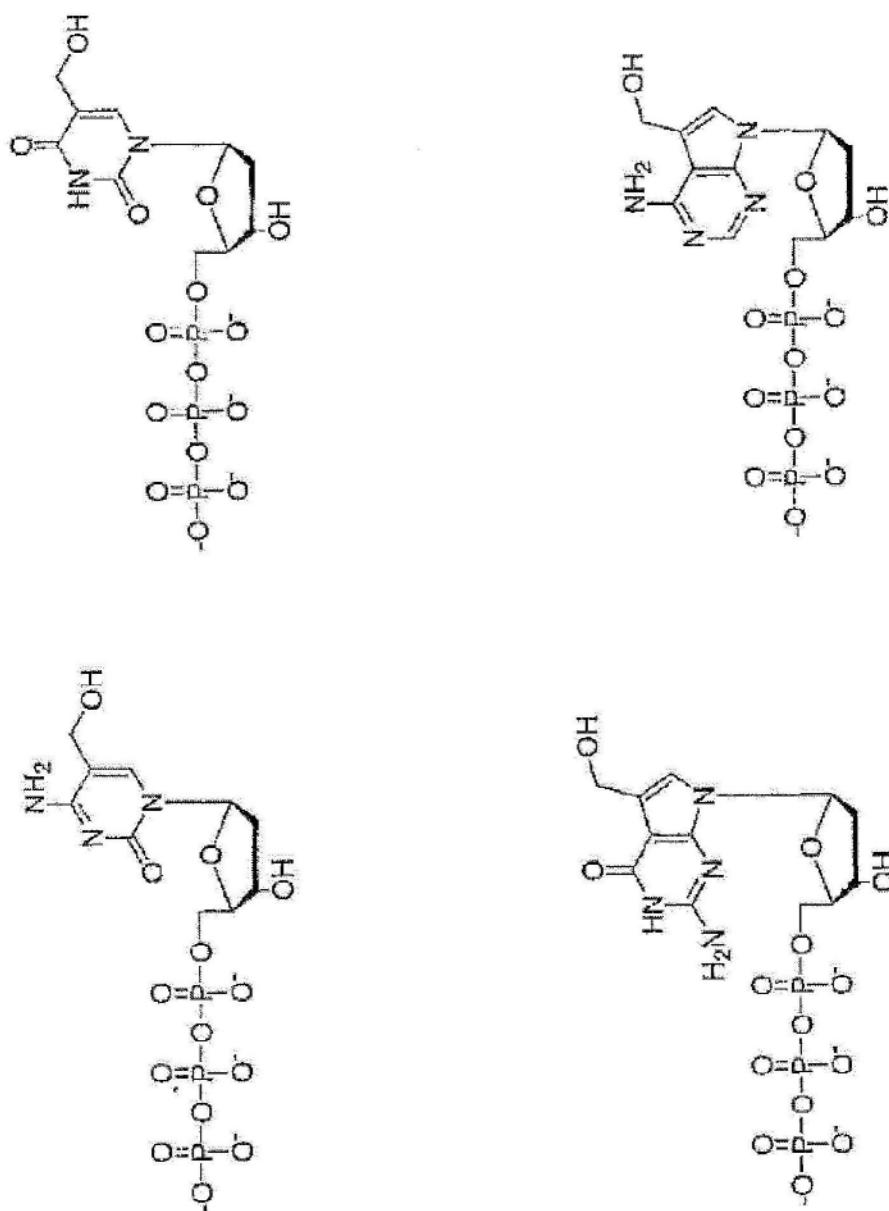


图72

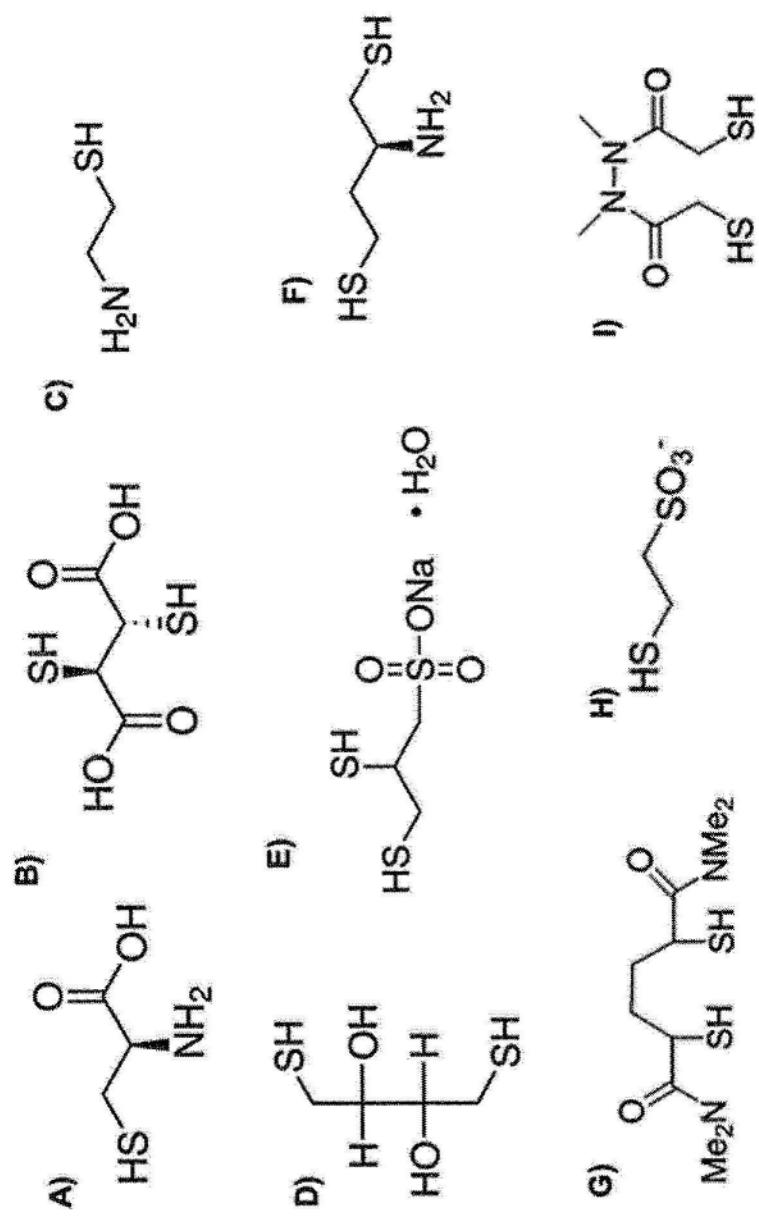


图73

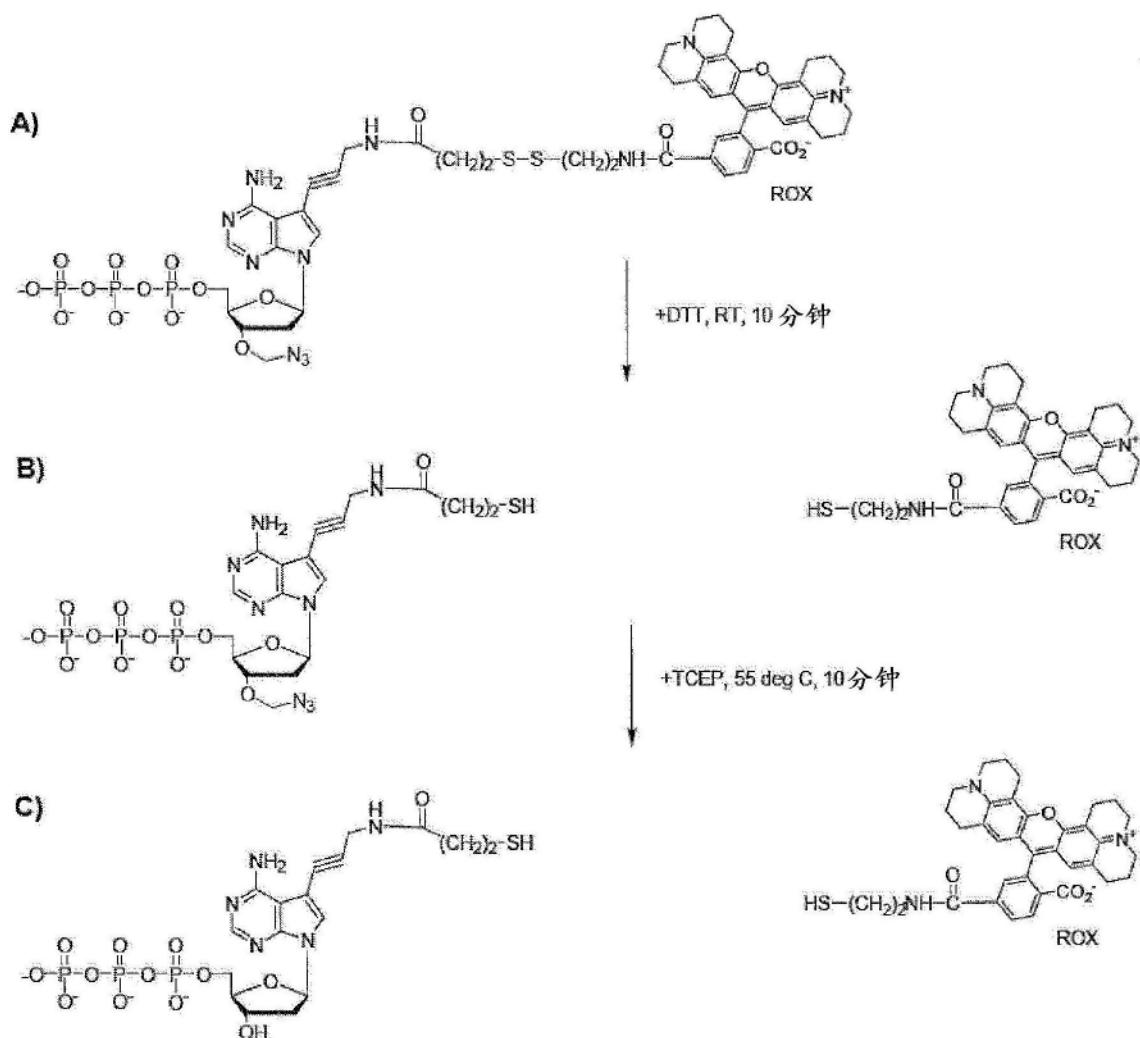


图74

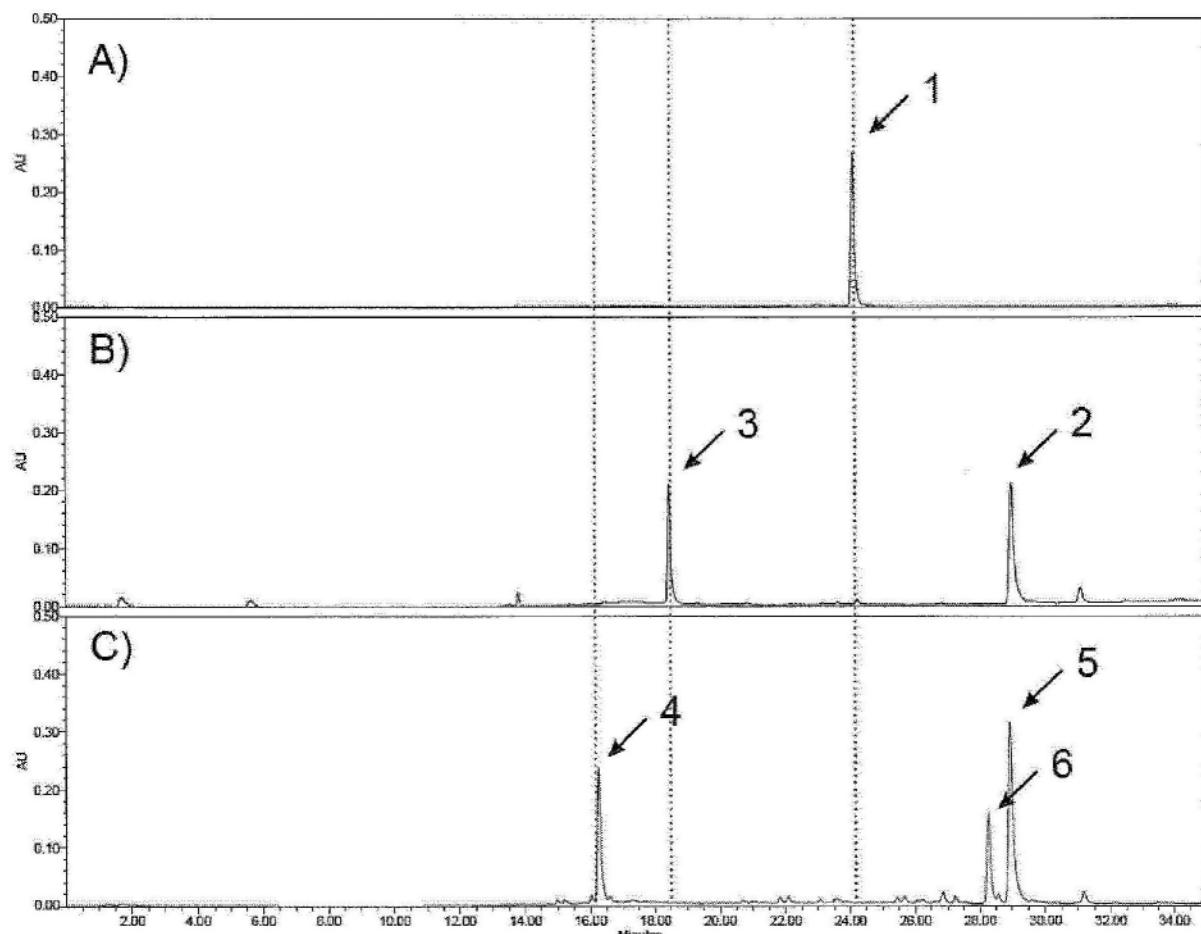


图75

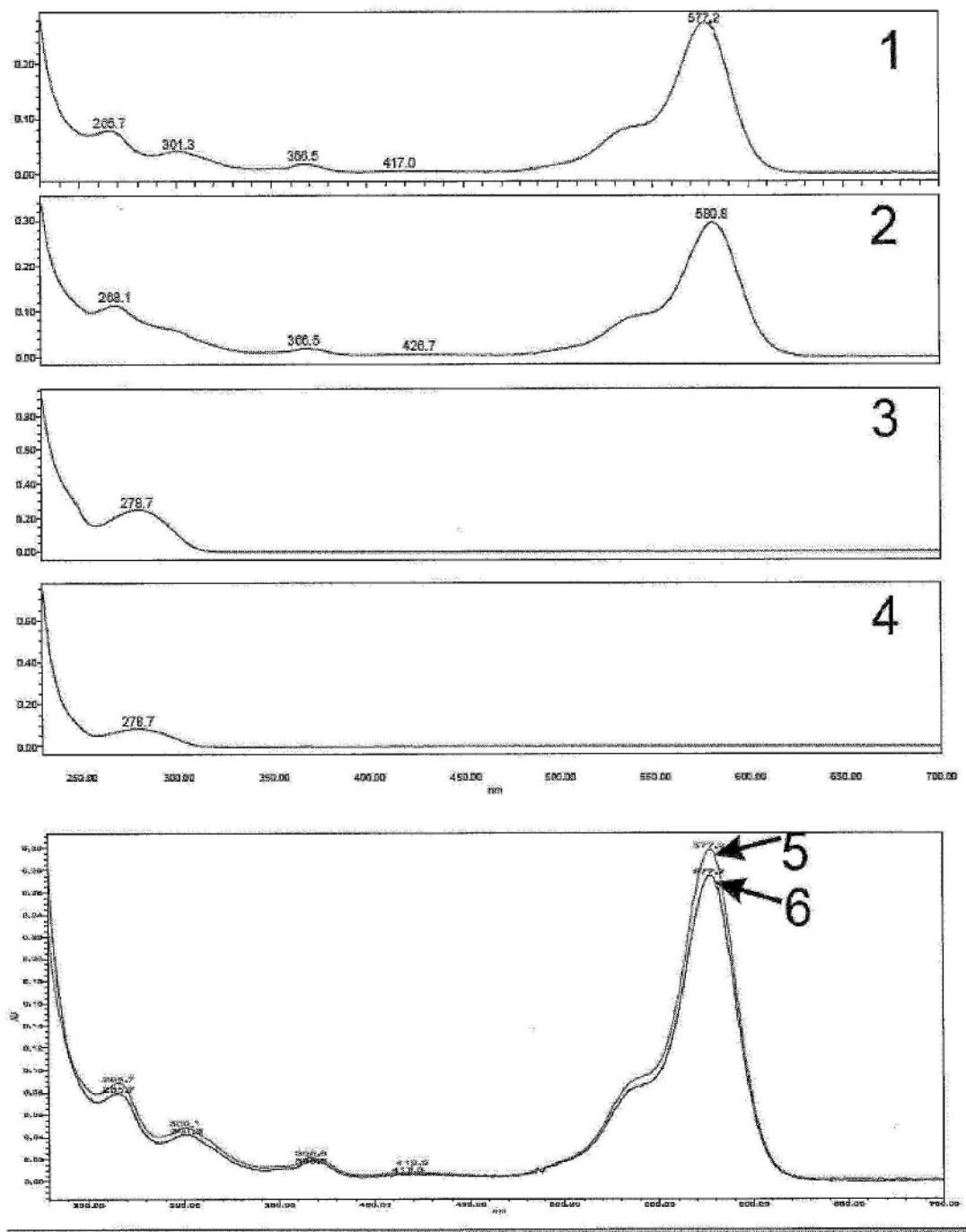


图76

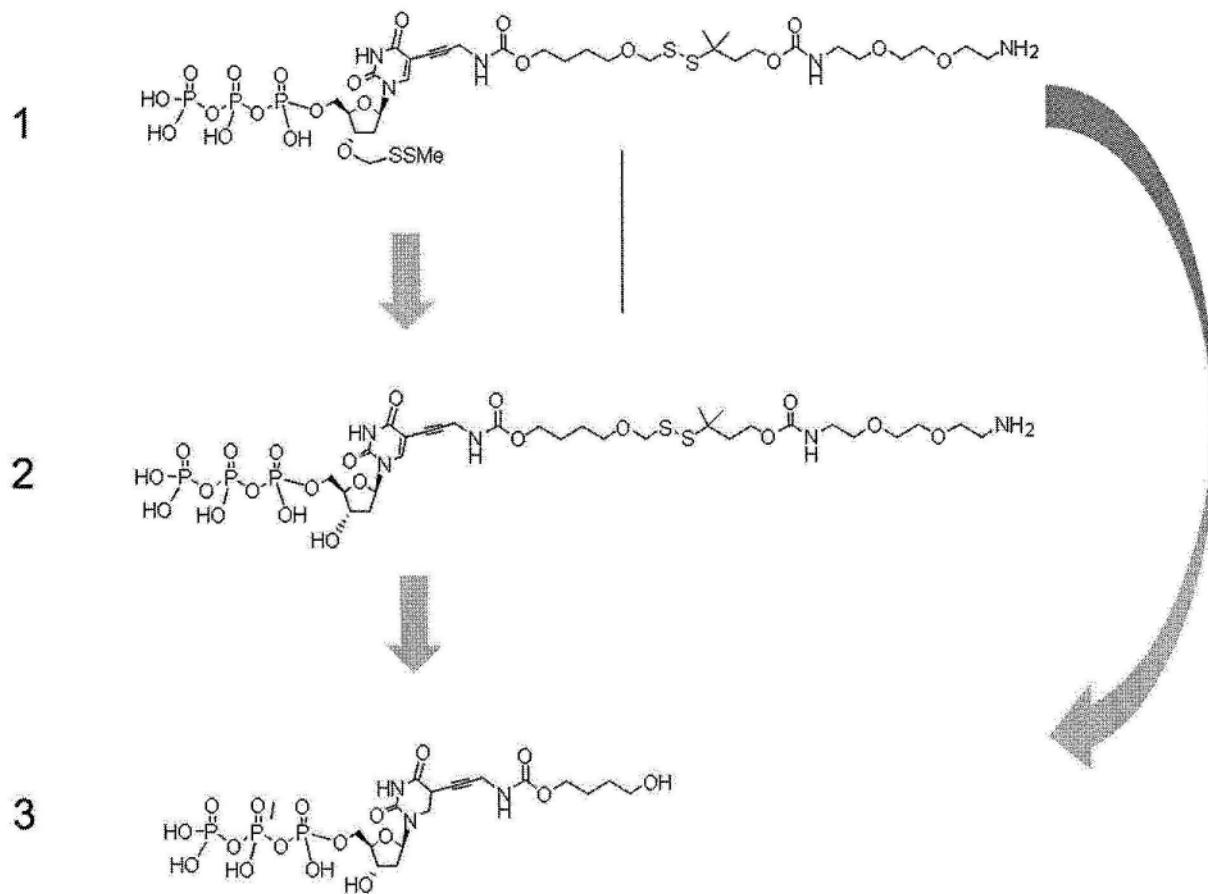
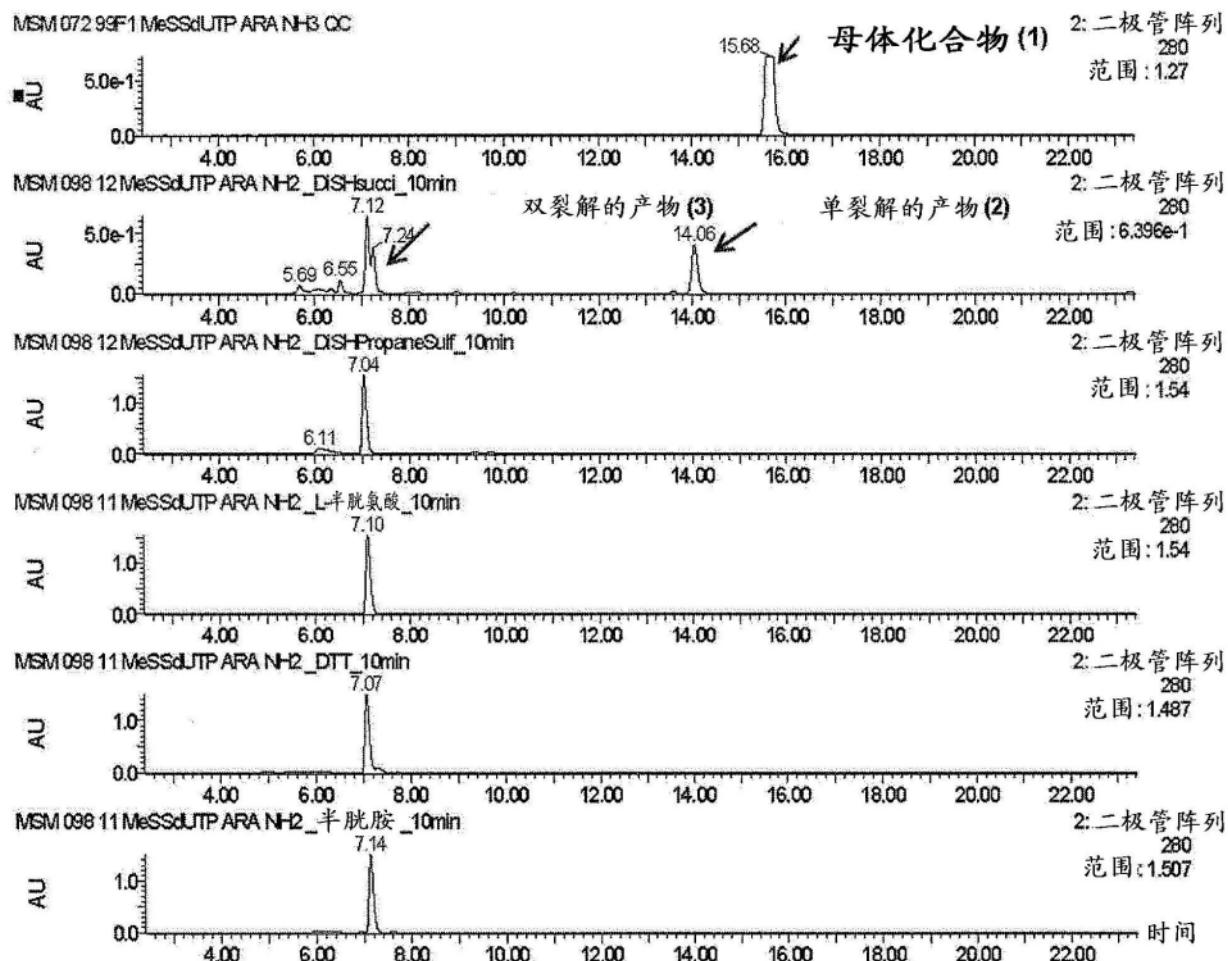


图77

A)



B)

裂解剂	反应条件	时间&温度	化合物1 [%]	化合物2 [%]	化合物3 [%]
二硫代琥珀酸	核苷酸-0.5 mM, 裂解剂-20 mM, 缓冲液: 200 mM TE, pH 8.5	10分钟@ 65 度 C	0	~50	~50
L-半胱氨酸			0	0	100
DTT			0	0	100
半胱胺			0	0	100

图78